

窦新雨,刘宇,刘啸,等. 小尾寒羊颈椎前路椎间盘切除融合模型的建立及评估 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 139-150.

DOU X Y, LIU Y, LIU X, et al. Establishment and evaluation of anterior cervical discectomy fusion model in small-tailed Han sheep model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 139-150.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.001

小尾寒羊颈椎前路椎间盘切除融合模型的建立及评估

窦新雨^{1,2,3}, 刘宇^{1,2,3}, 刘啸^{1,2,3}, 祝斌⁴, 贾斐⁵, 王霖邦^{1,2,3},
金攻⁶, 沈飞^{7*}, 刘晓光^{1,2,3*}

- (1. 北京大学第三医院骨科, 北京 100191; 2. 教育部骨与关节精准医学工程研究中心, 北京 100191;
3. 脊柱疾病研究北京市重点实验室, 北京 100191; 4. 首都医科大学附属北京友谊医院骨科,
北京 100050; 5. 山东第一医科大学附属省立医院脊柱外科, 济南 250000; 6. 中奥汇成
科技股份有限公司, 北京 100176; 7. 北京大学第三医院实验动物中心, 北京 100191)

【摘要】 目的 颈椎间盘突出症(cervical disc herniation, CDH)是骨科常见疾病之一,随着对该疾病研究的深入及颈椎内植物的发展,建立颈椎融合动物模型成为不可或缺的部分,目前国内对颈椎融合动物模型建立及评估的研究报道较少,本研究以期对颈椎融合相关研究提供完备的动物模型和内植物性能的评估方案。**方法** 选择小尾寒羊,改良术式后行颈椎前路椎间盘切除融合术(anterior cervical discectomy and fusion, ACDF),将聚醚醚酮(polyetheretherketone, PEEK)椎间融合器(interbody fusion cage, Cage)(对照组)、3D打印钛合金 Cage(实验组 1)及新方法钛合金 Cage(实验组 2)分别植入每只羊的不同颈椎节段(C2/3 ~ C4/5),术后行血液学检测、组织病理学分析评估手术恢复情况及材料生物安全性,利用 X 光、CT、Micro-CT 及定量分析、硬组织切片染色、生物力学试验评估内植物的骨长入及骨融合情况。**结果** 绵羊改良术式 ACDF 模型建立成功,血液学检测重要指标无显著性差异($P > 0.05$),组织病理学分析显示均无炎症细胞浸润等病理改变,内植物生物安全性良好,X 光及 CT 显示内固定位置及椎间融合情况良好,术后 3 个月及 6 个月 Micro-CT 及定量分析表明,与 PEEK Cage 组相比,新方法钛合金 Cage 组及 3D 打印钛合金 Cage 组内部的骨体积/总体积、骨小梁数目显著性升高($P < 0.01$),骨小梁间距显著性降低($P < 0.01$),且新方法钛合金 Cage 组骨质长入更多($P < 0.01$),硬组织切片染色表明新方法钛合金 Cage 组及 3D 打印钛合金 Cage 组孔隙内有明显骨质长入且较为密实,结合较 PEEK Cage 组略好,生物力学试验显示,与 PEEK Cage 组相比,新方法钛合金 Cage 及 3D 打印钛合金 Cage 在一定程度上降低了颈椎屈伸、侧弯、扭转运动范围($P < 0.05$),同时增强了颈椎的稳定性,且新方法钛合金 Cage 更有优势($P < 0.05$)。**结论** 建立绵羊改良术式 ACDF 模型后,利用合理有效的评估方法,证明了该模型的合理性及有效性,同时说明 3 种材料的 Cage 均显示出良好的生物安全性,新方法钛合金 Cage 及 3D 打印钛合金 Cage 较 PEEK Cage 的骨长入及骨融合性能更强,可增强颈椎的稳定性,且新方法钛合金 Cage 更有优势。

【关键词】 颈椎前路椎间盘切除融合术;颈椎间盘突出症;绵羊模型;椎间融合器

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0139-12

【基金项目】 北京市科学技术委员会中关村科技园区管理委员会项目(Z191100007619023),国家重点研发计划(2019YFB2204905)。

Funded by the Beijing Municipal Science & Technology Commission, Administrative Commission of Zhongguancun Science Park (Z191100007619023), the National Key Research and Development Program of China (2019YFB2204905).

【作者简介】 窦新雨,男,博士,研究方向:脊柱外科。Email:douxinyupku@stu.pku.edu.cn

【通信作者】 刘晓光,男,教授,主任医师,研究方向:脊柱外科。Email:xglius@163.com;

沈飞,主管技师,研究方向:医疗大动物实验技术和麻醉技术。Email:vikigomez@126.com。

* 共同通信作者

Establishment and evaluation of anterior cervical discectomy fusion model in small-tailed Han sheep model

DOU Xinyu^{1,2,3}, LIU Yu^{1,2,3}, LIU Xiao^{1,2,3}, ZHU Bin⁴, JIA Fei⁵, WANG Linbang^{1,2,3},
JIN Gong⁶, SHEN Fei^{7*}, LIU Xiaoguang^{1,2,3*}

(1. Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. Engineering Research Center of Bone and Joint Precision Medicine, Ministry of Education, Beijing 100191, China; 3. Beijing Key Laboratory of Spinal Disease Research, Beijing 100191, China; 4. Department of Orthopaedics, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China; 5. Department of Spine Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250000, China; 6. Zhonghahucheng Technology Co., Beijing 100176, China; 7. Laboratory Animal Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)
Corresponding author: LIU Xiaoguang. E-mail: xglius@163.com; SHEN Fei. E-mail: vikingomez@126.com

[Abstract] Objective Cervical disc herniation (CDH) is one of the common orthopaedic diseases. With the in-depth study of it and the development of cervical implants, the establishment of cervical fusion animal models has become an indispensable part. Notably however, studies of the establishment and evaluation of cervical fusion animal models in China are currently lacking. This study aimed to provide a suitable animal model and evaluation scheme for implants for cervical spine-related research. **Methods** Small-tailed Han sheep were chosen for anterior cervical discectomy fusion (ACDF) after modified surgery, and a polyetheretherketone (PEEK) interbody fusion cage (Cage) (control group), 3D-printed Ti6Al4V Cage (group 1), and new method Ti6Al4V Cage (group 2) were implanted in different cervical segments (C2/3 ~ C4/5) in each sheep, respectively. Hematology and histopathological analyses were carried out after surgery to evaluate recovery of sheep and the biosafety of the materials. Bone in-growth and bone fusion were assessed by X-ray, computed tomography (CT), Micro-CT and quantitative analysis, hard tissue section staining, and biomechanical tests. **Results** The modified ACDF ovine model was established successfully. There were no significant differences in important hematology indexes ($P > 0.05$) and histopathological analysis showed no pathological changes, such as inflammatory cell infiltration. The implants had good biosafety. Furthermore, X-ray and CT examinations showed that the position of internal fixation and the interbody fusion were good. Micro-CT and quantitative analysis at 3 and 6 months after operation showed that compared with PEEK Cage group, the bone volume/total volume and trabecular number were significantly increased ($P < 0.01$) while the trabecular spacing was significantly decreased in the new method Ti6Al4V and 3D-printed Ti6Al4V groups compared with the PEEK Cage group ($P < 0.01$). Moreover, the new method new method Ti6Al4V Cage group had more bone growth ($P < 0.01$). Hard tissue section staining demonstrated that the pores of the new method Ti6Al4V Cage and 3D-printed Ti6Al4V Cage had obvious bone growth and relatively dense pores in the new method Ti6Al4V and 3D-printed Ti6Al4V groups, and the combination was slightly better than that of PEEK Cage. Biomechanical evaluation indicated that the new method Ti6Al4V Cage and 3D-printed Ti6Al4V Cage reduced the range of cervical flexion-extension, lateral bending, and axial rotation ($P < 0.05$) compared with the PEEK cage, as well as enhancing the stability of the cervical vertebra, and the new method Ti6Al4V Cage was more advantageous ($P < 0.05$). **Conclusions** After the establishment of the modified ACDF ovine model, reasonable and effective assessment method were used to demonstrate the suitability and effectiveness of the model and the good biosecurity of all three Cage materials. Compared with the PEEK Cage, the new method Ti6Al4V Cage and 3D-printed Ti6Al4V Cages showed better performances in terms of bone growth and bone fusion, which could enhance the stability of the cervical vertebrae. The new method Ti6Al4V Cage was particularly advantageous.

[Keywords] anterior cervical discectomy and fusion; cervical disc herniation; ovine model; interbody fusion cage
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

颈椎间盘突出症(cervical disc herniation, CDH)作为脊柱外科常见疾病之一,是指颈椎间盘髓核突破纤维环,向后方压迫脊髓或向后外侧压迫神经

根而引起相应症状的疾病,以颈部酸胀疼痛、活动受限、上肢放射性疼痛麻木及下肢踩棉花感为主要症状^[1]。近年来,CDH 发病表现出年轻化趋势,严

重影响了患者的工作及生活质量,给社会和经济带来严重的负担。CDH 的治疗手段多样,保守治疗方案包括药物、针灸^[2]、理疗^[3]等,此外,介入治疗也在不断发展^[4]。当颈椎间盘突出较重,保守及介入治疗后反复或无效时,手术则成为重要的治疗手段^[5-6],根据颈椎间盘突出的数目及类型,目前临床常用手术方案包括颈椎前路椎间盘切除减压融合术(anterior cervical discectomy and fusion, ACDF)、颈椎后路单开门椎管扩大成形术、颈椎后路双开门椎管扩大成形术及微创手术等,其中,ACDF 手术较为常见且有效^[7]。

近年来,随着对 CDH 研究的深入及脊柱外科中颈椎内植物材料的发展,对相应颈椎融合动物模型的需求不断增大,建立理想且完备的动物模型及评价体系迫在眉睫。小尾寒羊作为偶蹄目牛科羊属绵羊种动物,已被证明在颈椎解剖结构、生物力学、骨密度及放射学特性上类似于人体颈椎,其中 C3/4 节段与人体颈椎最为相似^[8],可作为理想的颈椎动物模型^[9-10]。因此,本研究基于此,选择小尾寒羊作为实验动物,对手术方式进行革新,建立颈椎前路椎间盘切除融合模型,植入椎间融合器(interbody fusion cage, Cage),后续采取一系列检测方案,对手术安全性及植入物融合效果进行系统评估,以期对颈椎相关研究提供完善的动物模型方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 24 月龄普通级雄性健康小尾寒羊,体重约 30 ~ 35 kg,购于北京富龙腾飞实验动物研究院有限公司【SCXK(京)2023-0009】,所有小尾寒羊采取自由饮水及定时普通牧草饲料喂养,昼夜各半循环照明,湿度适宜且恒定(相对湿度为 50%),温度控制在 22 ~ 26℃。饲料由北京科澳协力饮料有限公司【SCXK(京)2020-0010】提供,手术及采食饲养均于北京大学第三医院实验动物中心【SYXK(京)2021-0054】进行。饲养环境:普通级环境。动物伦理通过北京大学第三医院伦理委员会批准(A2022064)。

1.1.2 主要试剂与仪器

聚醚醚酮(polyetheretherketone, PEEK) 颈椎 Cage(山东康盛,中国)、3D 打印钛合金 Cage(爱康,中国)、新方法钛合金 Cage(中奥汇成科技股份有限

公司,中国)、颈前路螺钉及钛板系统(Stryker, 美国)、可吸收缝线(Ethicon, 美国)、4%多聚甲醛溶液(G1101, 赛维儿, 中国)、甲基丙烯酸甲酯光聚树脂(TECHNOVIT 7200, EXAKT, 德国)、糊状黏合剂(TECHNOVIT 4000, EXAKT, 德国)、精密粘合剂(TECHNOVIT 7210VLC, EXAKT, 德国)、塑料载玻片(EXAKT, 德国)、甲苯胺蓝染色液试剂盒(G3663, 索莱宝, 中国)、亚甲基蓝染色液(G1303, 索莱宝, 中国)、酸性品红(F8220, 索莱宝, 中国)、Goldner 三色染色液试剂盒(G3550, 索莱宝, 中国)、苏木精-伊红染色试剂盒(C0105S, 碧云天, 中国)。

颈椎前路器械包(Stryker, 美国)、骨科手术器械包、C 型臂 X 光机(联影, 中国)、计算机断层扫描(computerized tomography, CT)机(联影, 中国)、生物力学试验机(MTS 858 Mini Bionix II, 美国)、光学测量系统(Optotrak 3020, 加拿大)、显微 CT(Micro-CT)机(Siemens, 德国)、硬组织切片机(EXAKT, 德国)、脱水浸透仪(EXAKT, 德国)、光固化包埋仪(EXAKT, 德国)、NanoZoomer 全景扫描显微镜(Hamamatsu photonics, 日本)、光学显微镜(Olympus BH-2, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组

18 只小尾寒羊采取随机数表法分组,每 3 只为 1 组,设置 6 组平行组,每平行组中每只羊植入 3 种不同材料的椎间融合器。随后,再以每节段颈椎为观察分组单位,根据每节段颈椎植入的材料种类,划分 PEEK Cage 为对照组,3D 打印钛合金 Cage 为实验组 1,新方法钛合金 Cage 为实验组 2,平行组中每只羊植入 Cage(见表 1)。

1.2.2 动物模型建立

术前禁食 24 h,不禁水,头皮针穿刺颈静脉并固定,5 mg/kg 丙泊酚推注,达到麻醉状态(头颈及四肢瘫软,针刺无反应)后,行气管插管(9.5 ~ 10.5 号气管插管),异氟烷吸入麻醉,潮气量 10 mL/kg,呼吸次数每分钟 18 ~ 20 次,异氟烷浓度 2% ~ 2.5%维持麻醉,静脉持续泵入美洛昔康注射液 0.05 mg/(kg·h)持续镇痛,选择仰卧位,将羊用绷带固定于手术台上,肩下垫枕,用 C 型臂 X 光机进行透视定位 C2/3,常规消毒铺巾,行颈部中线右侧纵行长切口(切口长约 12 cm),逐层切开皮肤、皮下组织、颈阔肌,由颈血管鞘及内脏鞘之间入路,显露并纵行切开颈前筋膜,找寻颈长肌,于颈长肌两头

表 1 颈椎椎间融合器植入分组方式

Table 1 Groups of cervical interbody fusion cage implantation

节段/编号 Segment/No.	每平行组 1 号羊 No. 1 in each parallel group	每组 2 号羊 No. 2 in each parallel group	每组 3 号羊 No. 3 in each parallel group
C2/3	聚醚醚酮 Cage PEEK Cage	3D 打印钛合金 Cage 3D-printed Ti6Al4V Cage	新方法钛合金 Cage New method Ti6Al4V Cage
C3/4	新方法钛合金 Cage New method Ti6Al4V Cage	聚醚醚酮 Cage PEEK Cage	3D 打印钛合金 Cage 3D-printed Ti6Al4V Cage
C4/5	3D 打印钛合金 Cage 3D-printed Ti6Al4V Cage	新方法钛合金 Cage New method Ti6Al4V Cage	聚醚醚酮 Cage PEEK Cage

间隙进入,显露 3 节椎体及椎间隙(C2 ~ C5)。用咬骨钳去除椎体正前方突出的骨脊,钻孔拧入撑开固定钉,安放撑开器,撑开椎间隙,用小圆刀切开纤维环,利用颈椎刮匙、髓核钳等切除椎间盘,刮除椎体上下终板软骨,利用椎板钳将上、下椎体终板突出的弧形骨质去除,生理盐水冲洗,植入 Cage(3D 打印 Cage 及新方法钛合金 Cage 不植骨,PEEK Cage 植入减压咬取的松质骨),松开撑开器使其嵌入椎间隙内,拔除撑开固定钉,用合适长度的颈前路 4 孔钛板及螺钉系统行内固定,上下椎体各拧入 2 颗螺钉,行 X 光透视定位评估位置良好,彻底冲洗后,放置引流管一根,逐层缝合颈阔肌及皮下组织,关闭切口,无菌敷料包扎伤口,观察术后活动及精神状态。

1.2.3 动物模型术后评估及取材

术后即刻行颈椎正侧位 X 光检查(目标节段为 C2/3 ~ C4/5),术后 2 个月行颈椎 CT 检查、血常规、C 反应蛋白及血清碱性磷酸酶水平检测,评估术后恢复情况。术后 3 个月处死 3 组平行组取材,另 3 组于术后 6 个月处死取材,行相关标本检测,评估颈椎融合效果。

1.2.4 X 光检查

术后即刻及术后 2 个月行颈椎正侧位 X 光,评估手术内植物及内固定位置情况。

1.2.5 颈椎 CT 检查

术后 2 个月对羊模型行颈椎 CT 检查(目标节段为 C2/3 ~ C4/5),静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行短期镇静,电流为 200 mA,电压为 120 kV,视场 21 cm,切片厚度为 3 mm,评估手术内植物位置及骨质生长情况。

1.2.6 血液学检测

术后 1 个月行血常规、C 反应蛋白检测,评估动物术后炎症情况,验证内植物的生物安全性,行血清碱性磷酸酶水平检测,评估动物成骨相关功能。

1.2.7 生物力学试验

处死羊模型后,将羊颈椎剔除所有肌肉组织,保留韧带、椎间盘,采用椎体整块切除术(en-block)

获得每段功能脊柱单元标本后^[11],螺钉穿过每个标本上下位椎体,包埋在聚甲基丙烯酸甲酯中,于生物力学试验机内固定,采用光学测量系统,在 2.5 Nm 的纯力矩下,分别在屈伸、左右侧向弯曲和左右轴向旋转 3 个运动平面上进行柔韧性测试。施加力矩的速率约为 0.5°/s,重复 4 个完整的过程加载循环,其中前 3 个循环用于减少粘弹性效应,第 4 个循环用于分析。所有标本在室温下测试,测试出每个标本的运动范围(range of motion, ROM, ROM 定义为最小弯矩和最大弯矩期间的角位移),并比较其运动学行为。

1.2.8 Micro-CT 检查及定量分析

术后 3 个月处死 3 组羊模型取材,另 3 组于术后 6 个月处死,采用 en-block 方式对羊颈椎进行取材。对颈椎标本进行 Micro-CT 扫描,扫描速度为 6°/min,分辨率为 9 μm。X 射线源电压为 80 kV,束电流为 80 mA。使用多模态三维可视化软件 Inveon Research Workplace 对扫描结果进行重建和分析。通过划分不同的阈值单位(hounsfield, HU)来区分骨组织、软组织和钛合金 Cage 并进行后续定量分析。骨组织定义在 1000 ~ 2250 HU 范围内,金属定义为大于 2250 HU,软组织在 0 ~ 1000 HU。重建后选择植入物周围 500 μm 区域和植入物内部孔隙空间作为感兴趣区域(region of interest, ROI)。在 ROI 中,骨体积/总体积(bone volume/total volume, BV/TV)、骨表面积/骨体积(bone surface area/bone volume, BS/BV)、骨小梁数目(trabecular number, Tb. N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)和骨小梁间距(trabecular spacing, Tb. Sp)通过 Inveon Research Workplace 直接计算得到,以此评估内植物骨长入及手术节段颈椎融合情况。

1.2.9 硬组织切片

将术后 3 个月及 6 个月处死羊模型获得的颈椎标本,用 4%多聚甲醛预固定 1 d。采用硬组织切片机修剪标本成适当形状,尽可能减小组织块的体积以便加快脱水浸塑的进程。然后正式固定于 4%多

聚甲醛中 2 周。将固定后的标本用流水冲洗 15 min 后置于脱水浸透仪中,真空环境下于梯度乙醇中震荡脱水(1000 mbar,振荡频率每分钟 40 ~ 50 次),分别为 40%乙醇 3 d、75%乙醇 3 d、95%乙醇 3 d、无水乙醇 3 d。之后将标本块置于甲基丙烯酸甲酯 TECHNOVIT 7200 光聚树脂中浸塑 7 ~ 14 d。将完成脱水浸塑程序的标本放于包埋盒中,倒入光聚树脂,置于光固化包埋仪包埋,采用黄光照射 5 h、蓝光照射 10 h 固化。包埋完成后将包埋好的标本块取出放在 60 ℃烘箱中 10 h 至彻底固化。依照说明配制 TECHNOVIT 4000 糊状黏合剂,用黏合剂将标本粘于塑料载玻片上,用于制作硬组织切片。先将标本用真空泵吸附在硬组织切片机上。将标本沿植入体纵轴切开至显露出金属内植物,800#砂纸抛光、干燥。然后用 TECHNOVIT 7210VLC 精密粘合剂将载玻片粘贴于标本上方,用金刚石锯切取厚度为 200 ~ 300 μm 的薄片,分别用 800#、1200#及 2000#砂纸磨至 80 ~ 100 μm。重复上述操作,每个样本制备 5 张硬组织切片以供后续染色及组织学分析。此后,应用甲苯胺蓝染色液试剂盒、亚甲基蓝-酸性品红染色液以及 Goldner 三色染色液试剂盒染色,使用 NanoZoomer 全景扫描显微镜和光学显微镜拍摄其整体和局部,观察 Cage 内骨长入及与周围椎体的成骨融合情况。



注:A:术前定位颈椎侧位 X 光;B:暴露颈血管鞘及内脏鞘之间入路;C:自颈长肌间隙进入;D ~ F:去除椎体骨脊,初步处理椎间隙;G:撑开椎间隙并彻底处理;H:植入椎间融合器;I:颈前路钛板螺钉系统内固定。

图 1 小尾寒羊改良 ACDF 术中解剖操作要点及术前定位 X 光

Note. A. Lateral cervical vertebrae X-ray of preoperative localization. B. Exposing the approach between the cervical vascular sheath and the visceral sheath. C. Entering through the space of the longus colli muscle. D ~ F. Removing the crest of vertebra centrum and make a primary process of the intervertebral space. G. Spreading the intervertebral space and make a thorough process. H. Implanting the interbody fusion cage. I. Internal fixation of anterior cervical plate and screws system.

Figure 1 Key points of intraoperative anatomical operation in modified ACDF and preoperative localization by X-ray

1. 2. 10 组织病理学分析

术后 6 个月处死羊模型后,随机抽取 3 只羊,选取心脏、肝、脾、肺、肾组织在 4% 的多聚甲醛中固定,将样品脱水后包埋于石蜡中行连续切片,采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,使用光学显微镜行镜检及图像采集,评估内植物对动物主要脏器的影响。

1. 3 统计学分析

计量资料用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。所有数据均采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析,两组以上的比较采用单因素方差分析(One-way variance, ANOVA),两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 表示具有统计学意义。

2 结果

2. 1 手术效果及术后恢复情况

行术前准确定位后(图 1A),所有建模手术均顺利进行,解剖及操作要点见图 1B ~ 1I,术后动物站立及四肢活动良好,精神状态可,除有 1 只羊术后存在异物排斥反应,致使伤口愈合缓慢外(后行数次伤口换药,伤口逐渐恢复),其余均无伤口渗液、感染等发生。所有模型自术后至处理期(喂养 3 个月及 6 个月)均无神经损伤表现,进食活动良好,体

重正常增长。

2.2 影像学检查结果

2.2.1 X 光检查

术后即刻行颈椎正侧位 X 光,观察到间盘处理充分,手术内植物及内固定位置良好,提示羊颈椎前路椎间盘切除融合模型建立成功(图 2A)。

2.2.2 颈椎 CT 检查

术后 2 个月行颈椎 CT,观察到羊模型手术节段颈椎间隙部分融合,不同材料 Cage 内均有骨质长入,内固定前方骨质增生(图 2B),在 CT 三维重建图像中该结果也得到了验证(图 2C)。

2.3 术后血液学检测

术后 1 个月行血液检测,结果显示各平行组血常规正常,重要指标组间无显著性差异($P > 0.05$)(图 3A ~ 3J),C 反应蛋白结果表明未有感染发生(均 $< 5.0 \text{ mg/L}$),各组血清碱性磷酸酶水平均高于正常值上限(100 U/L),提示成骨活跃(图 3K),上述检测表明手术建立模型的成功以及内植物良好的生物安全性。

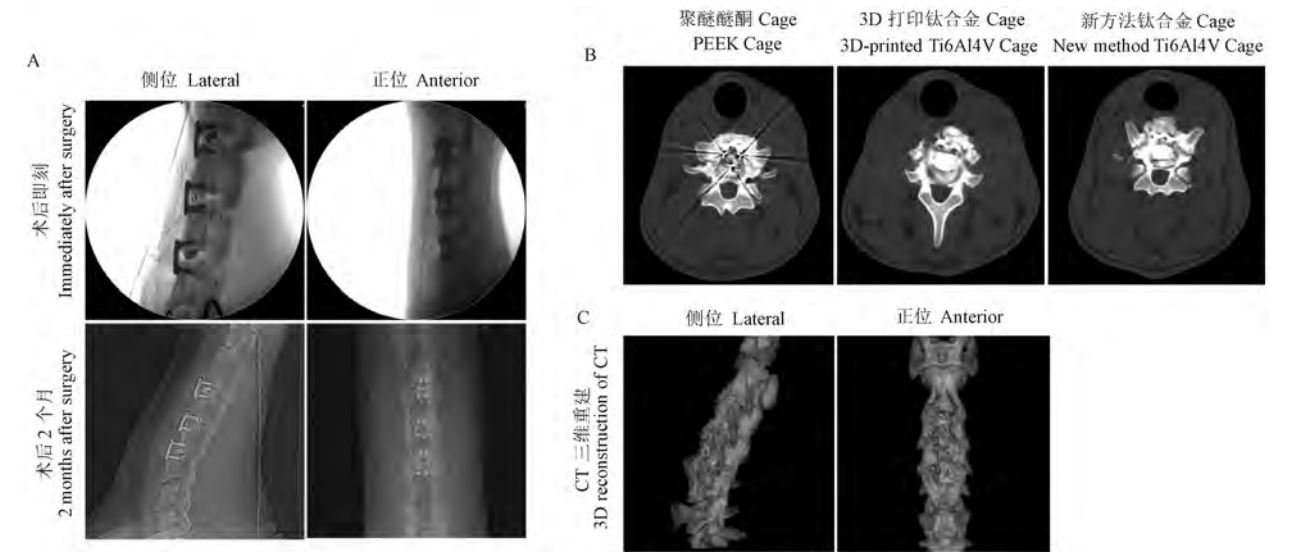
2.4 生物力学试验

为了研究不同材料 Cage 对颈椎 ROM 和颈椎稳定性的影响,本研究对术后 6 个月颈椎样本进行了一系列生物力学试验。结果如图 4 所示,对照组与实验组 1 及实验组 2 相比,在屈伸(图 4A)、侧弯

(图 4B)、扭转(图 4C)的关节活动度差异均有显著性($P < 0.05$),表明了新方法钛合金 Cage 及 3D 打印钛合金 Cage 在一定程度上降低了颈椎的 ROM,同时增强了颈椎的稳定性,且新方法钛合金 Cage 更有优势($P < 0.05$)。

2.5 Micro-CT 检查

为了评估不同材料 Cage 的骨长入及骨融合性能,本研究通过 Micro-CT,对术后 3 个月及 6 个月 Cage 内部及与椎体接触面的骨质进行了评估。如图 5A 所示,在二维图像上,Cage 内部及接触面的新生骨质被标记为黄色,相比于 PEEK Cage 组,新方法钛合金 Cage 组及 3D 打印钛合金 Cage 组在两个区域都有更多的骨形成。根据 Micro-CT,不同材料组内部及表面骨长入相关指标(如 BV/TV、BS/BV、Tb. N、Tb. Th、Tb. Sp)的定量分析结果如图 6 所示,结果表明,术后 3 个月及 6 个月,新方法钛合金 Cage 组及 3D 打印钛合金 Cage 组内部的 BV/TV、Tb. N 显著性升高($P < 0.01$),Tb. Sp 显著性降低($P < 0.01$),且新方法钛合金 Cage 组骨质长入更多($P < 0.01$),而在 BS/BV、Tb. Th 上无显著性差异(除术后 6 个月时新方法钛合金 Cage 组在 Tb. Th 上明显低于 PEEK Cage 组外, $P > 0.05$)。此外, Micro-CT 三维重建图像(Cage 被标记为白色,内部及接触面的新生骨质被标记为蓝色)证实,新方法

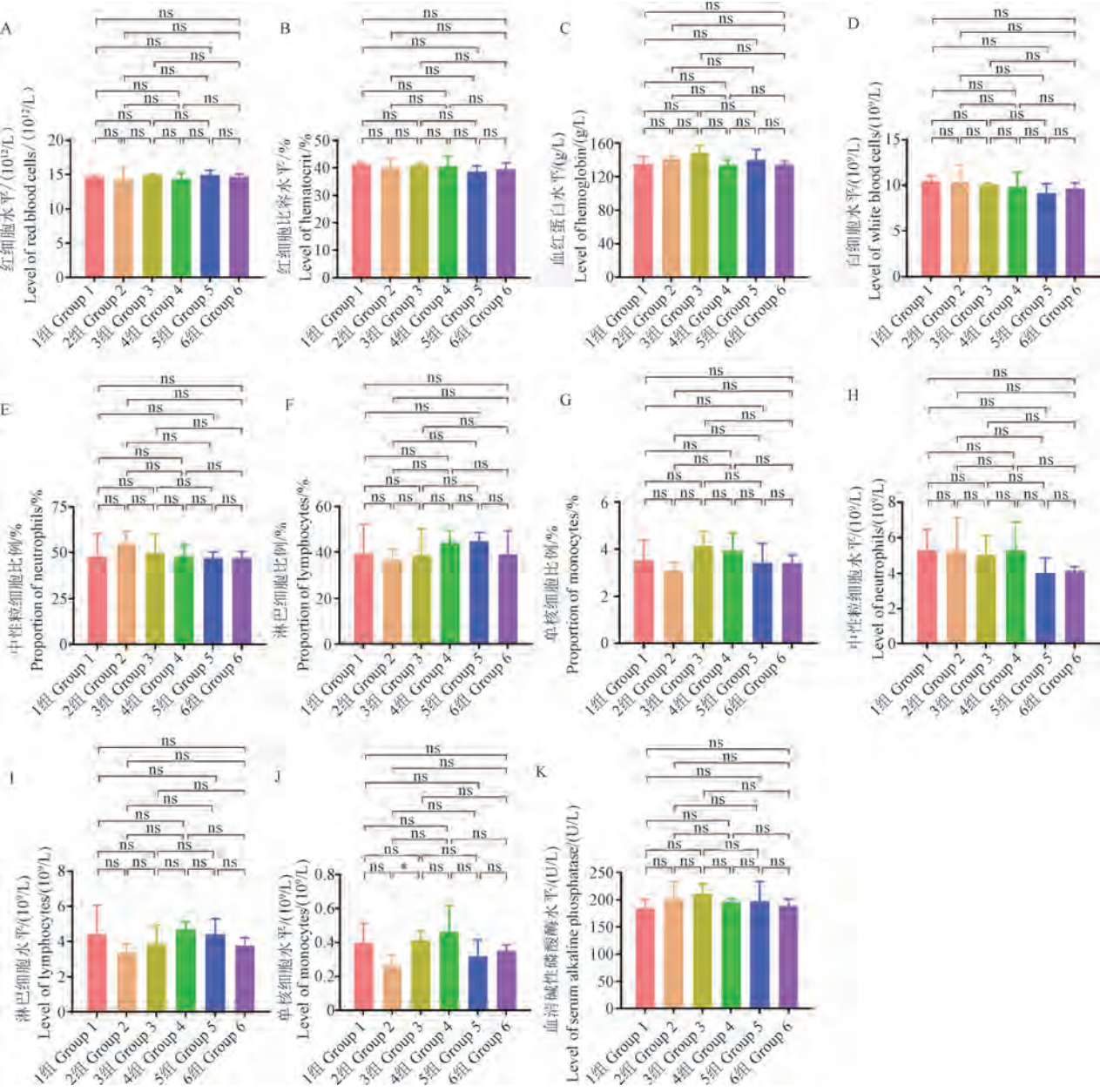


注:A:术后即刻及术后 2 个月颈椎正侧位 X 光;B:不同材料组术后 2 个月横断位 CT;C:术后 2 个月 CT 三维重建。

图 2 术后 X 光及 CT 检查

Note. A. Anterior and lateral cervical vertebrae X-ray at immediately and 2 months after surgery. B. Axial CT scan of different material groups at 2 months after surgery. C. 3D reconstruction of CT at 2 months after surgery.

Figure 2 Postoperative X-ray and CT examinations



注:不同平行组之间进行对比;与第2平行组相比, * $P < 0.05$ 。

图3 术后1个月血液学检测

Note. Comparison between different parallel groups. Compared with parallel group 2, * $P < 0.05$.

Figure 3 Hematological examinations at one month after surgery

钛合金 Cage 组的骨长入及骨融合性能优于 3D 打印钛合金 Cage 组及 PEEK Cage 组(图 5B), 这表明, 新方法钛合金 Cage 更能增强椎间骨长入及融合。

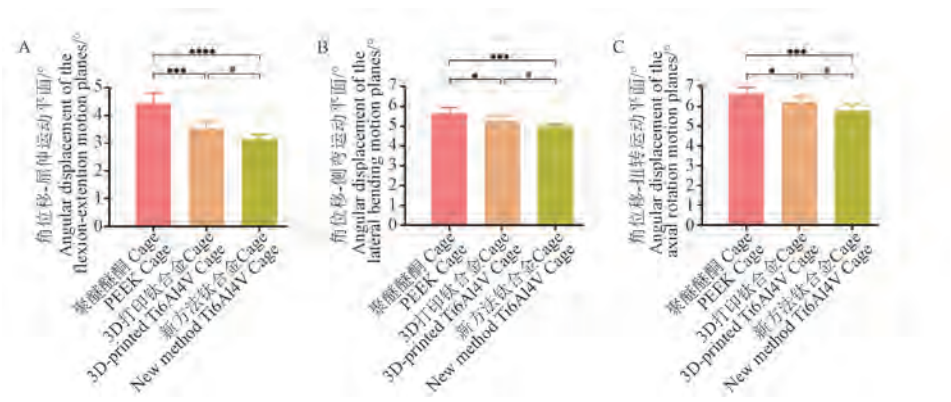
2.6 硬组织切片及染色

对术后 6 个月不同材料 Cage 组标本行硬组织切片, 随后使用甲苯胺蓝、亚甲基蓝-酸性品红、Goldner 三色 3 种不同方式染色, 结果如图 7 所示, 对于 PEEK Cage 组, 因其内部有填入的自体骨质, 6 个月时 Cage 中心骨质连接完整, 与上下终板融合

为一体, 但 Cage 表面与椎体界连接处有明显的空隙, 提示骨界面结合较差。对于新方法钛合金 Cage 组及 3D 打印钛合金 Cage 组, 术后 6 个月时 Cage 的孔隙内有明显骨质长入且较为密实, Cage 表面与椎体骨界面虽也有空隙, 但结合较 PEEK Cage 组略好。

2.7 组织病理学分析

对术后 6 个月随机抽取的羊模型心脏、肝、脾、肺及肾组织行 HE 染色, 由染色结果分析可得, 各组

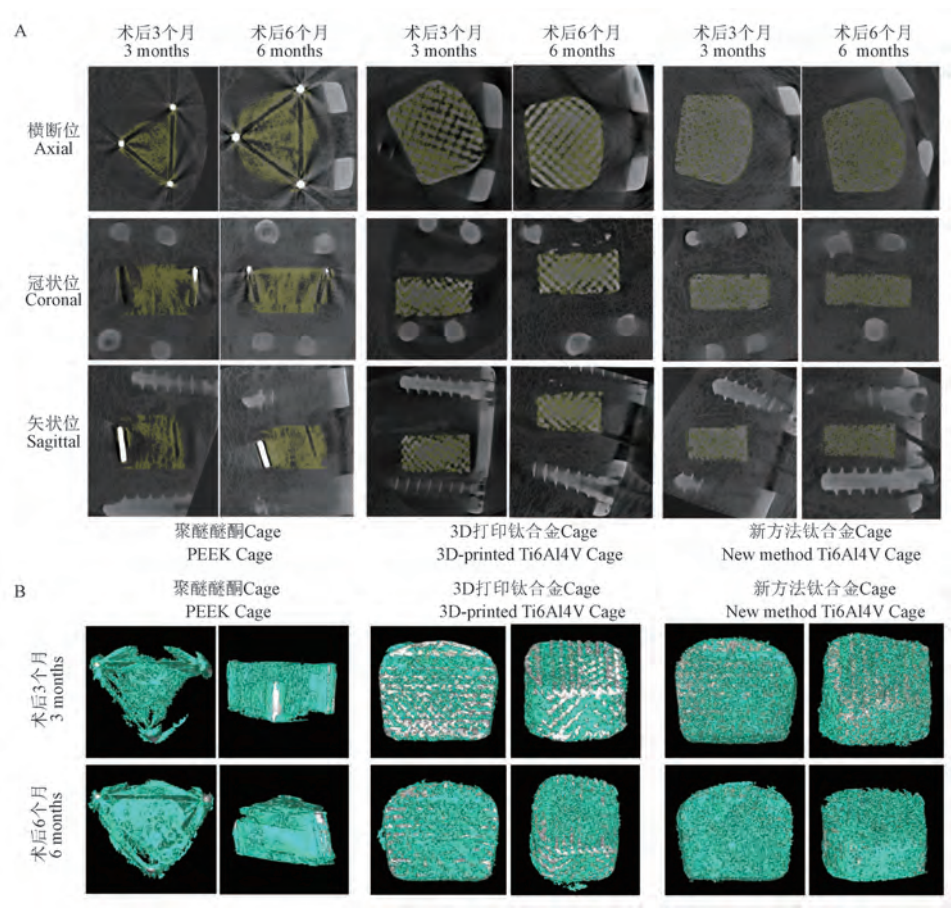


注:不同材料组不同运动平面之间的对比;与 PEEK Cage 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与 3D 打印钛合金 Cage 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 4 生物力学评估

Note. Comparison of a range of motions of different material groups segments in the flexion-extension, lateral bending and axial rotation motion planes. Compared with PEEK Cage group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with 3D-printed Ti6Al4V Cage group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Biomechanical evaluation

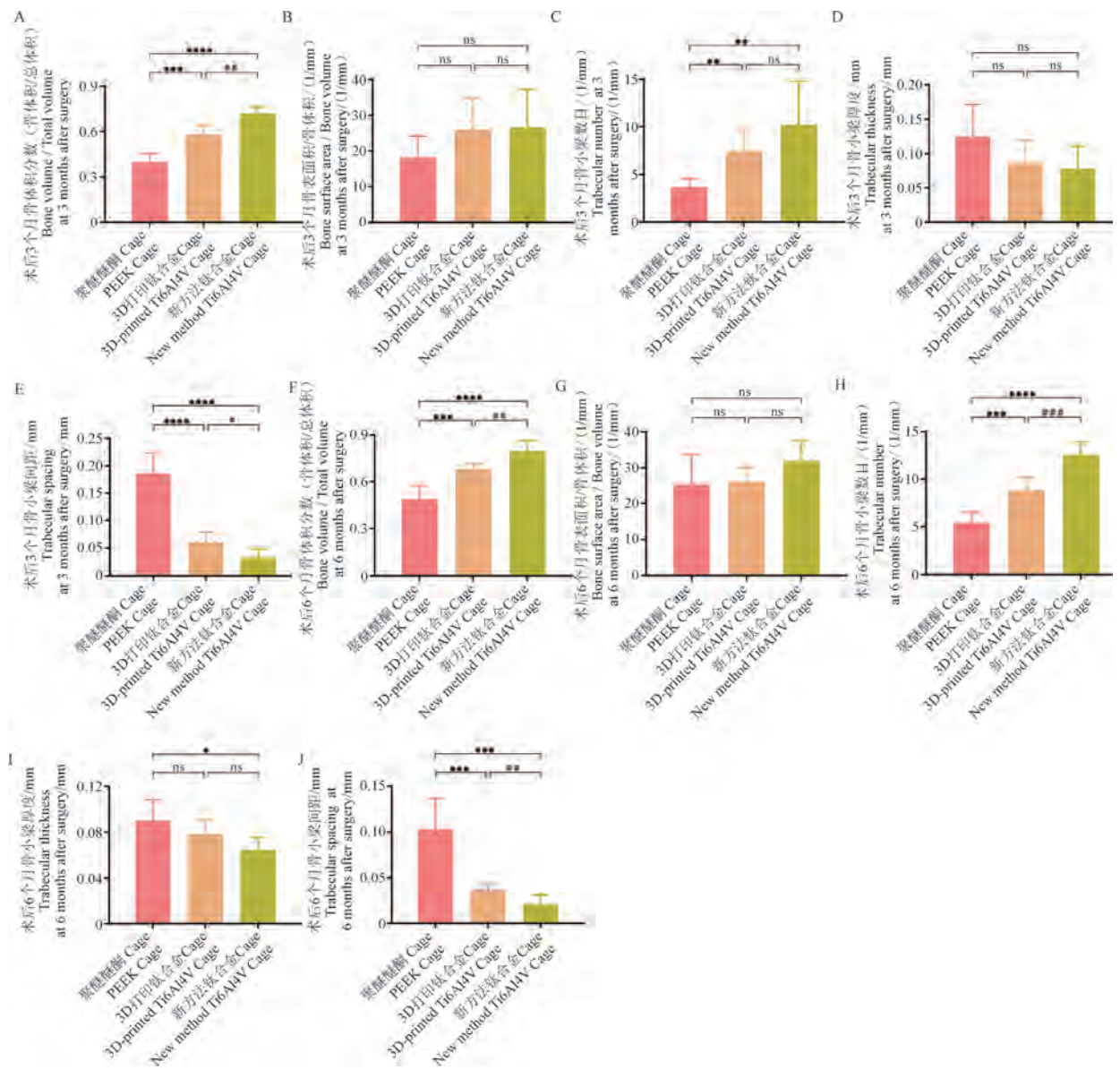


注:A:横断位、冠状位、矢状位 Micro-CT 影像,其中椎间融合器内部及表面新生骨用黄色标注;B:Micro-CT 三维重建,其中椎间融合器用白色标注,椎间融合器内部及表面新生骨用蓝色标注。

图 5 Micro-CT 检查

Note. A. Axial, coronal and sagittal positions Micro-CT images. New bones inside and on the surface of the material were indicated by yellow. B. 3D reconstruction Micro-CT images. Cages were indicated by white, and new bones inside and on the surface of cages were indicated by blue.

Figure 5 Micro-CT examination



注:根据 Micro-CT 行术后 3 个月及 6 个月不同材料组内部及表面骨长入相关指标定量分析;与 PEEK Cage 组相比, ** $P < 0.01$;与 3D 打印钛合金 Cage 组相比, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$ 。

图 6 Micro-CT 定量分析

Note. Quantitative analysis results of bone growth-related indexes at 3 months and 6 months after surgery about Micro-CT. Compared with PEEK Cage group, ** $P < 0.01$. Compared with 3D-printed Ti6Al4V Cage group, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$.

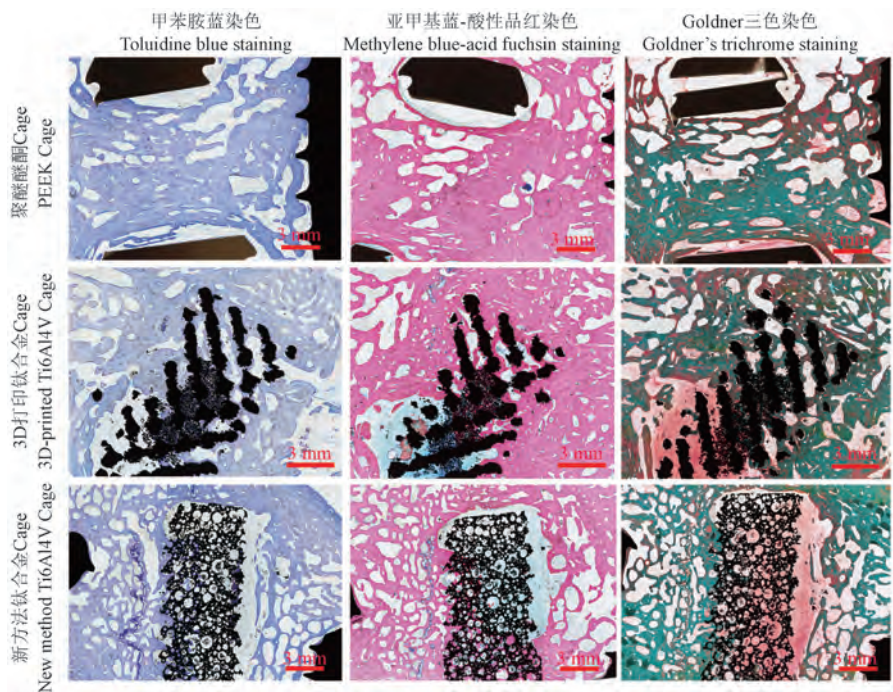
Figure 6 Quantitative analysis about Micro-CT

间羊模型的重要器官组织形态正常,均无炎症细胞浸润等病理改变(图 8),证明了材料具有良好的生物安全性。

3 讨论

目前,骨科新材料研究如火如荼,尤其在脊柱外科内植物方面取得了重要突破(如人工椎体^[12]、人工椎间盘^[13]、椎间融合器^[14]、脊柱内固定系统^[15-16]等),其中,颈椎内植物相关研究的飞速进步

对颈椎融合动物模型的建立提出了更高的要求。通过建立颈椎融合动物模型,可验证颈椎内固定器材的生物相容性及稳定性,亦可评估内植物材料或生物制剂对于骨融合的效果。因绵羊颈椎在解剖结构、前凸程度、材料性质及生物力学上与人体颈椎具有较高的相似性,其模型在国内外颈椎研究中被广泛应用,成为了此类研究中必不可少的研究工具及手段^[17-19]。此外,由于绵羊颈椎间盘具有高度较大的特点,也使其颈椎融合模型成为评估颈椎

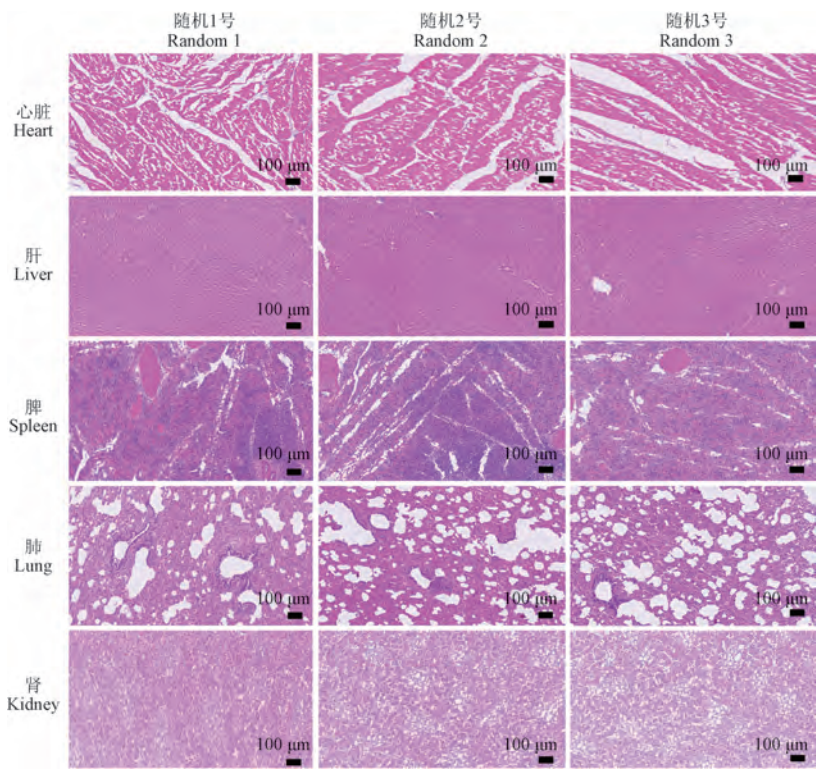


注:术后 6 个月骨组织切片甲苯胺蓝、亚甲基蓝-酸性品红及 Goldner 三色染色。

图 7 骨组织切片染色评估

Note. Toluidine blue staining, methylene blue-acid fuchsin staining and Goldner's trichrome staining of bone sections at 6 months after surgery.

Figure 7 Bone sections staining evaluation



注:术后 6 个月主要器官组织 HE 染色。

图 8 主要器官组织学分析

Note. HE staining of the tissue of major organs at 6 months after surgery.

Figure 8 Histological analysis of major organs

内植物的理想模型^[20]。然而,国内对于绵羊颈椎融合模型的建立及评估方法的研究较少,本研究通过改良手术方案建立小尾寒羊 ACDF 优化模型,植入 3 种不同材料的 Cage,而后制定较为完备的评估方法以评价不同 Cage 的骨长入及骨融合性能,以期为后续研究者提供思路。

本研究选取 ACDF 手术方式建立小尾寒羊颈椎融合模型,与常规 ACDF 颈椎融合动物模型建立时采用颈部横行切口不同的是,本研究采取改良术式,对模型手术方式进行优化,在符合动物伦理的要求下,采用颈部纵行切口,以缩减颈部切口数量,此外,纵行切口也便于选择合适的手术入路,以减少手术过程中对羊的损伤。该优化术式在多节段颈椎间盘的处理中具有优势,可充分利用羊颈椎节段,具有一定的经济实用性及有效性。行手术解剖入路时发现,绵羊的颈阔肌只有薄薄一层,切开时要特别注意不要损伤深部组织,电凝止血后由颈血管鞘及内脏鞘入路,剥开颈前筋膜,发现颈长肌一般为分叉状,从肌肉分叉处进入,可减少对于肌肉的损伤以及出血,认为这是很重要的。减压融合可按常规手术进行,值得注意的是,因绵羊的下位椎体前端终板有弧形凸起,且绵羊椎体后缘较前缘略高,应当用椎板钳将间隙仔细处理成平台状,才便于置入椎间融合器。术后切记密切观察绵羊苏醒后四肢活动情况、进食及精神状态,以确保术中无神经损伤的发生。值得注意的是,在术后恢复期,因进食及生活习性,绵羊无法像人类行颈托制动控制颈椎大幅度的活动,但本研究发现该问题并未影响术后内固定的稳定度及并发症的发生,反而因其术后早期开始颈部活动,颈部活动度恢复更佳。此外,在观察期内,未发现内固定松动及神经损伤的表现,日常活动及进食正常。对于实验分组方案,本研究将 3 种不同材料 Cage 分别植入每只羊的不同颈椎节段,这可以消除因个体差异产生的误差。但由于不同颈椎节段生物力学性能、椎间隙高度、所承受的应力等存在差异,因此本实验将同一材料 Cage 植入每平行组中羊的不同颈椎节段,确保每组羊中同一颈椎节段均有同种材料 Cage 植入,通过设立多组平行组的方法,使实验设计符合统计学要求。

对于模型评估方案,本研究选择血液学检测、组织病理学分析、影像学检查、Micro-CT 检查及分析、硬组织切片染色分析、生物力学试验等手段,充

分涵盖了对于材料的生物安全性、骨长入及骨融合性能以及颈椎生物力学方面的评估。血液学检测反映出动物体内有无贫血、炎症反应发生及成骨活跃情况,重要器官组织病理学分析展现了内植物对于各器官有无病理损害,上述检测方案可证明内植物的生物安全性^[21-22]。影像学检查中,X 光可以评估术后内固定位置及神经减压情况,活体颈椎 CT 检查反映出术后 2 个月椎间隙高度及融合情况,需要注意的是,CT 显示椎间隙前方内固定被骨组织包裹,手术节段椎体被骨桥连接一体,这反映了绵羊极强的成骨功能,在颈椎屈伸活动时有极高的稳定性,这一点也在取材时大体标本上得到证明。Micro-CT 检查及分析可以更直观地反映术后 3 个月及 6 个月标本中内植物中骨长入及与椎间隙融合情况,并能通过计算相关指标来量化这些改变,使得评估更为细致,更具可信度^[23]。此外,选取硬组织切片染色及软件定量分析方案,能更有对比性且更为客观地反映出内植物内新骨生成情况,使结果更具说服力^[24]。作为评估脊柱活动度及稳定性的重要方法,生物力学试验重要性不言而喻^[25],本研究通过生物力学试验机,测定颈椎屈伸、侧弯及轴向旋转的运动范围,可用于评价不同内植物的骨融合及脊柱稳定性。

根据本研究结果,3 种材料均展现出了良好的生物安全性;在骨长入及骨融合性能方面,新方法钛合金 Cage 及 3D 打印钛合金 Cage 更有优势,且新方法钛合金 Cage 性能更佳;在生物力学方面,新方法钛合金 Cage 及 3D 打印钛合金 Cage 在一定程度上降低了颈椎的 ROM,同时增强了颈椎的稳定性,且新方法钛合金 Cage 更有优势。上述结果证明了两实验组材料可以有效地维持椎间隙高度,促进骨长入及椎间融合,术后无明显炎症反应及并发症发生,表明材料在动物体内具备良好的安全性以及有效性。因此,本研究在成功建立小尾寒羊颈椎 ACDF 优化模型的同时,也为材料的临床应用奠定了前期动物实验基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] FEJER R, KYVIK K O, HARTVIGSEN J. The prevalence of neck pain in the world population: a systematic critical review of the literature [J]. Eur Spine J, 2006, 15(6): 834-848.
- [2] 买买提江·赛买提. 针灸治疗颈椎间盘突出症的临床效果观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(44): 152-153. MAIMAITIJANG S M T. Clinical observation on acupuncture treatment of cervical disc herniation [J]. World Latest Med Inf,

- 2017, 17(44): 152–153.
- [3] 王志权. 中医推拿治疗颈椎间盘突出症的临床效果 [J]. 中国城乡企业卫生, 2021, 36(8): 185–186.
WANG Z Q. Clinical effect of traditional Chinese medicine massage on cervical disc herniation [J]. Chin J Urban Rural Enterp Hyg, 2021, 36(8): 185–186.
- [4] 许刚, 张达颖. 颈椎间盘突出症介入治疗的现状和进展 [J]. 介入放射学杂志, 2020, 29(11): 1170–1173.
XU G, ZHANG D Y. Interventional therapy of cervical disc herniation: its current situation and progress [J]. J Interv Radiol, 2020, 29(11): 1170–1173.
- [5] CHEN X, GAO J A, DU Q, et al. Percutaneous full-endoscopic anterior transcorporeal cervical discectomy for the treatment of cervical disc herniation: surgical design and results [J]. Pain Physician, 2021, 24(6): E811-E819.
- [6] GEBREMARIAM L, KOES B W, PEUL W C, et al. Evaluation of treatment effectiveness for the herniated cervical disc: a systematic review [J]. Spine, 2012, 37(2): E109-E118.
- [7] MAZAS S, BENZAKOUR A, CASTELAIN J E, et al. Cervical disc herniation: which surgery? [J]. Int Orthop, 2019, 43(4): 761–766.
- [8] KANDZIORA F, PFLUGMACHER R, SCHOLZ M, et al. Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study [J]. Spine, 2001, 26(9): 1028–1037.
- [9] WILKE H J, KETTLER A, CLAES L E. Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? [J]. Spine, 1997, 22(20): 2365–2374.
- [10] LONG R G, FERGUSON S J, BENNEKER L M, et al. Morphological and biomechanical effects of annulus fibrosus injury and repair in an ovine cervical model [J]. JOR Spine, 2020, 3(1): e1074.
- [11] PAGE M I, EASLEY J T, BONILLA A F, et al. Biomechanical evaluation of a novel repair strategy for intervertebral disc herniation in an ovine lumbar spine model [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 1018257.
- [12] AMELOT A, COLMAN M, LORET J E. Vertebral body replacement using patient-specific three-dimensional-printed polymer implants in cervical spondylotic myelopathy: an encouraging preliminary report [J]. Spine J, 2018, 18(5): 892–899.
- [13] JACOBS C A M, DOODKORTE R J P, KAMALI S A, et al. Biomechanical evaluation of a novel biomimetic artificial intervertebral disc in canine cervical cadaveric spines [J]. JOR Spine, 2023, 6(2): e1251.
- [14] YANG S H, XIAO F R, LAI D M, et al. A dynamic interbody cage improves bone formation in anterior cervical surgery: a porcine biomechanical study [J]. Clin Orthop Relat Res, 2021, 479(11): 2547–2558.
- [15] BASRA S, BUCKLEN B, MUZUMDAR A, et al. A novel lateral lumbar integrated plate-spacer interbody implant: *in vitro* biomechanical analysis [J]. Spine J, 2015, 15(2): 322–328.
- [16] LV Q B, GAO X, PAN X X, et al. Biomechanical properties of novel transpedicular transdiscal screw fixation with interbody arthrodesis technique in lumbar spine: a finite element study [J]. J Orthop Translat, 2018, 15: 50–58.
- [17] SCHOLZ M, SCHLEICHER P, SEWING A, et al. Cyclic-RGD is as effective as rhBMP-2 in anterior interbody fusion of the sheep cervical spine [J]. Spine, 2013, 38(2): E59-E65.
- [18] LINDLEY E M, BARTON C, BLOUNT T, et al. An analysis of spine fusion outcomes in sheep pre-clinical models [J]. Eur Spine J, 2017, 26(1): 228–239.
- [19] POBLOTH A M, DUDA G N, GIESECKE M T, et al. High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(5): 1514–1523.
- [20] WANG L, WANG Y, SHI L, et al. Can the sheep model fully represent the human model for the functional evaluation of cervical interbody fusion cages? [J]. Biomech Model Mechanobiol, 2019, 18(3): 607–616.
- [21] 吴佳芸, 李玲玲, 乔佳君, 等. 持续高血压状态自发性高血压大鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 428–439.
WU J Y, LI L L, QIAO J J, et al. A serum metabolomics-based study on persistent hypertensive SHR [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 428–439.
- [22] LAI Y, LI Y, CAO H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect [J]. Biomaterials, 2019, 197: 207–219.
- [23] CLARK D P, BADEA C T. Advances in micro-CT imaging of small animals [J]. Phys Med, 2021, 88: 175–192.
- [24] YANG Y, CHU L, YANG S, et al. Dual-functional 3D-printed composite scaffold for inhibiting bacterial infection and promoting bone regeneration in infected bone defect models [J]. Acta Biomater, 2018, 79: 265–275.
- [25] METZGER M F, ROBINSON S T, MALDONADO R C, et al. Biomechanical analysis of lateral interbody fusion strategies for adjacent segment degeneration in the lumbar spine [J]. Spine J, 2017, 17(7): 1004–1011.

[收稿日期] 2023-08-04

王敦方,朱琳,冯雪,等. AOM/DSS 结肠癌模型优化及其肠道菌群变化探究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 151-160.
WANG D F, ZHU L, FENG X, et al. Optimization of the azomethane oxide and dextran sodium sulfate model of colitis-associated colon cancer and changes in the intestinal microbiota [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 151-160.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.002

AOM/DSS 结肠癌模型优化及其肠道菌群变化探究

王敦方¹,朱琳^{1,2},冯雪¹,张彩娟¹,刘海帆¹,刘雅清¹,刘滨^{1,2},刘丽¹,杨伟鹏^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700;2. 黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 优化氧化偶氮甲烷(azoxymethane,AOM)联合葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate,DSS)造模结肠炎相关性结肠癌(colitis-associated colorectal cancer,CAC)方法并探究肠道菌群在 CAC 中的发病机制。**方法** 通过 AOM 不同注射次数联合自由饮用 DSS 的方法建立 A(AOM 1 次注射)和 B(AOM 2 次注射)模型组,正常组采用腹腔注射生理盐水联合饮用纯净水,每组 10 只。造模结束后通过 DAI 评分、结肠长度、成瘤率及死亡率等指标综合评估,选择最佳的造模方案。然后对 B 模型组小鼠进行实验,取血清以 ELISA 法检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及肿瘤标志物 CA199、CEA、CA724 含量;同时进行 HE 染色观察结肠病变;并对小鼠粪便进行 16S rDNA 高通量基因测序法分析,以探究 CAC 小鼠肠道菌群的变化。**结果** 单次和加强 AOM 注射联合 DSS 均能诱导 CAC 小鼠模型。但与 A 模型组相比,B 模型组小鼠结肠内增生物较大,排列紧密且形态大小较一致,成瘤率达到 100%。与正常组相比,B 模型组 IL-6 显著升高($P < 0.05$),TNF- α 含量升高($P > 0.05$);肿瘤标志物除 CA724 外,CA199 和 CEA 含量均明显升高($P < 0.05$);HE 病理结肠内炎性细胞的浸润,并伴有管腔表面显示出高级别上皮内肿瘤样改变。菌群结果显示,与正常组相比,CAC 小鼠肠道菌群物种多样性及丰度降低,疣微菌门和放线菌门增多($P < 0.05$),拟杆菌门和弯曲菌门减少($P < 0.05$)。阿克曼菌、普雷沃菌、瘤胃球菌、双歧杆菌等显著增多($P < 0.05$);罗氏菌属、*Muribaculaceae*、理研菌属、厌氧原体属等显著减少($P < 0.05$)。**结论** AOM 2 次注射联合自由饮用 1.5%(1.5 g/100 mL)DSS 诱导的 CAC 模型小鼠结肠成瘤率高、肿瘤形态大小均一、死亡率低,可作为药效学实验评价的优选造模方案。多种肠道菌群紊乱或功能失调,造成的通透性增高,肠黏膜屏障功能破坏,进而诱发肠源性内毒素释放,导致持续的炎症反应或是诱发 CAC 发病的间接或直接原因。

【关键词】 结直肠癌;动物模型;肠黏膜屏障;炎症;肠道菌群

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0151-10

Optimization of the azomethane oxide and dextran sodium sulfate model of colitis-associated colon cancer and changes in the intestinal microbiota

WANG Dunfang¹, ZHU Lin^{1,2}, FENG Xue¹, ZHANG Caijuan¹, LIU Haifan¹, LIU Yaqing¹,
LIU Bin^{1,2}, LIU Li¹, YANG Weipeng^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

Corresponding author: YANG Weipeng. E-mail: wpyang@ icmm. ac. cn

【基金项目】 国家自然科学基金(82074328,81473592),中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04604),中国中医科学院中药研究所自选课题-人才引进项目(ZXKT20033)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82074328, 81473592), Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04604), the Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Selected a Project-Talent Introduction Project (ZXKT20033).

【作者简介】 王敦方,男,博士,研究方向:中药药理学研究。Email: wdf122644@126.com

【通信作者】 杨伟鹏,男,研究员,博士,研究方向:中药药理学研究。Email: wpyang@ icmm. ac. cn

[Abstract] Objective To optimize the method of combining azomethane oxide (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) to create a colitis-associated colon cancer (CAC) model, and to explore the pathogenesis of the intestinal flora in CAC. **Methods** Model groups A and B were established by one and two injections of AOM, respectively, combined with free drinking of DSS, and a normal control group was injected intraperitoneally with normal saline combined with purified water ($n = 10$ mice per group). The better modeling scheme was selected by comprehensive evaluation of the disease activity index score, colon length, tumor rate, and mortality. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and tumor markers CA199, CEA, and CA724 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Colon lesions were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Changes in the intestinal microbiota in CAC mice were detected by 16S rDNA high-throughput gene sequencing analysis of mouse feces. **Results** Both single and enhanced AOM injections combined with DSS induced CAC mice; however, colon growths were larger, more closely arranged, and their morphological size was more consistent in group B compared with group A, with a tumor-formation rate of 100%. IL-6 levels were increased in the model group compared with the normal group ($P < 0.05$). TNF- α levels were increased in the model group compared with the normal group ($P > 0.05$). The CA199 and CEA levels were also significantly increased ($P < 0.05$), but CA724 levels were not. Infiltration of inflammatory cells in the colon detected by HE pathology was accompanied by high-grade intraepithelial tumor-like changes on the surface of the lumen. The diversity and abundance of intestinal bacteria were decreased in CAC mice compared with normal mice; *phyla Verrucomicrobiota* and *Actinobacteriota* were significantly increased ($P < 0.05$), *Bacteroidota* and *Campilobacterota* were significantly decreased ($P < 0.05$). *Akkermansia*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcus*, and *Bifidobacterium* were significantly increased ($P < 0.05$), and *Roseburia*, *Rikenellaceae_RC9_gut_group*, *Anaeroplasm*, and *Muribaculaceae* were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Two injections of AOM combined with 1.5% (1.5 g/100 mL) DSS induced CAC model mice with a high colon-tumorigenesis rate, uniform tumor morphology, and low mortality, and may thus be the preferred modeling scheme for pharmacodynamic experiments. Disorders or dysfunction of the intestinal flora may lead to increased permeability, loss of intestinal mucosal barrier function, and the release of enterogenic endotoxins, Resulting in a sustained inflammatory response, as an indirect or direct cause of CAC pathogenesis.

[Keywords] colorectal cancer; animal model; intestinal mucosal barrier; inflammation; intestinal flora

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

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的恶性肿瘤, 据统计, 我国 2022 年 CRC 新发病例, 在全球占新发癌症病例数的第三位。CRC 发病率及病死率均居于全球恶性肿瘤前三位^[1-2]。炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是诱发结直肠癌的重要危险因素, 与健康人群相比, 克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 等炎症性肠病患者患结直肠癌的风险更高^[3]。现阶段 IBD-CRC 动态演进过程的有关机制是科学研究的聚焦点。结肠炎相关性结直肠癌 (colitis-associated colorectal cancer, CAC) 的发病中, 肿瘤微环境的存在是诱发肿瘤细胞增殖的关键, 而要模拟肿瘤微环境的发生, 开展体内动物模型的研究很有必要^[4]。CAC 的发病涉及多个阶段, 呈现“炎症-不典型增生-癌变”的发展规律^[5]。AOM/DSS 诱导的小鼠模型是 CAC 的常见实验肿瘤模型, 可以在正常上皮-腺瘤-癌进展方面模拟 CAC 的非遗传特征^[6-7], 是研究结直肠癌发生和发展潜在机制的重要工具。但 AOM/DSS 小鼠模型构建易受到小

鼠品系、造模浓度的影响, 死亡率和成瘤率并不稳定^[8-9]。因此有必要在相关指南的基础上对 AOM/DSS 模型构建方法进一步优化。

研究证明, 肠道菌群改变可增加肠黏膜通透性, 使肠黏膜免疫功能受损, 加剧炎症反应, 进而创造利于肿瘤发生的免疫微环境^[10-11]。此外, 肠道菌群的改变也可通过促进结肠细胞的过度增殖来驱动癌变。肠道细菌在定植和繁殖过程中产生一系列代谢物, 这些代谢物对宿主的代谢和免疫反应有直接或间接的影响。肠道微生物群的扰动能促进有害细菌致癌产物的产生。因此, 肠道菌群失衡可以作为结直肠癌的一个直接病因^[12]。故建立适当的结肠炎癌转化模型, 明确肠道微生物在 CAC 中的作用, 对 CAC 的预防和临床治疗均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究选用 30 只 5 ~ 6 周龄 SPF 级雄性

C57BL/6J 小鼠, 体重 20 ~ 21 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2021-0006】。所有小鼠均在中国中医科学院中药研究所动物实验室内饲养【SYXK(京)2019-0003】, 各组小鼠饲喂普通维持饲料由科澳协力(天津)饲料有限公司提供。饲养环境: 温度 23.0 ± 1.5 °C, 相对湿度 $45\% \pm 15\%$, 符合标准的日夜交替养殖环境。动物实验通过中国中医科学院中药研究所伦理委员会批准(2022B117)。

1.1.2 主要试剂与仪器

AOM(麦克林, C14453858, 纯度 95%); 葡聚糖硫酸钠(DSS, 分子量 36 000 ~ 50000, S7708, 美国 MP 公司); 4% 组织细胞固定液(20221220)和 PBS(20220726)购自北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤标志物检测试剂盒 CA724 (Sep2022)、CA199 (Oct2022)和 CEA(ml063107)均购自上海酶联生物科技有限公司; IL-6(P334473)和 TNF- α 试剂盒(P342290)购自美国 RD 公司。

SpectraMax Paradigm[®] Plus 384 酶标仪(Molecular Devices 公司, 美国); -80 °C 超低温冰箱(Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); J-301 Beckman 型高效冷冻离心机(Beckman 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型构建

经过 1 周适应性饲养后, 按体重随机分为 3 组: 正常组、A 模型组(注射 1 次, AOM)及 B 模型组(注射 2 次 AOM), 每组 10 只。A 模型组给予单次 1 mg/mL AOM 溶液(10 mg/kg)腹腔注射; B 模型组在 1 周内分别于第 1、5 天进行 1 mg/mL AOM 溶液(10 mg/kg)腹腔注射。A 模型组和 B 模型组小鼠均在进行首次 AOM 注射 7 d 后给予 1.5% (1.5 g/100 mL) DSS 溶液 1 周, 之后将 DSS 替换为纯净水饮用 2 周, 此为 1 个循环, 如此共重复 3 个循环。正常组小鼠同体积 AOM 腹腔注射生理盐水, 自由饮水。

1.2.2 炎症因子和肿瘤标志物的测定

3 个循环结束后, 采集正常组和 B 模型组小鼠血液, 3000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 取上清, ELISA 法检测小鼠血清中的炎症因子 IL-6、TNF- α 以及肿瘤标志物 CA199、CEA、CA724 的表达。

1.2.3 结肠组织病理学检验

3 个循环结束后, 处死所有小鼠, 切除包括肛门在内的结肠组织, 进行结直肠部位肿瘤计数。并将正常组和 B 模型组小鼠结肠浸泡于 4% 多聚甲醛中

固定, 按规定步骤进行包埋切片, 切片厚度为 4 μ m, 其后进行 HE 染色, 在 400 倍高倍镜下进行观察。依据溃疡区域、炎性浸透情况、整体完整程度、组织病变等指标对结肠组织的病变程度进行评价。

1.2.4 粪便样品采集

完成 3 个循环后, 小鼠处死前收集正常组和 B 模型组小鼠的新鲜粪便, 取 3 ~ 5 粒, 立即放入已灭菌的离心管中, 并在超低温下保存, 以便进行肠道菌群分析。

1.2.5 高通量测序检测肠道菌群组成结构与丰度差异

对于每个组别, 提取粪便 DNA 并进行 PCR 扩增。扩增的目标区域为 16S rDNA 的 V3 ~ V4 可变区, 反应体系为 20 μ L。PCR 扩增的条件为: 95 °C 解链 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 25 个循环, 72 °C 延伸 10 min。引物序列 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 806R: 5'-GGACTAC HVGGGTWTCTAAT-3'。扩增过程重复 3 次。使用 Illumina MiSeq 测序平台进行双末端测序, 并使用 UPARSE7.1 软件聚类生成操作分类单元(OUT), 相似度为 97%。本实验使用了 Silva(SSU11516S)核糖体 RNA 数据库进行分类学比对, 采用的算法是 RDP Classifier, 置信阈值设置为 70%。

1.3 统计学分析

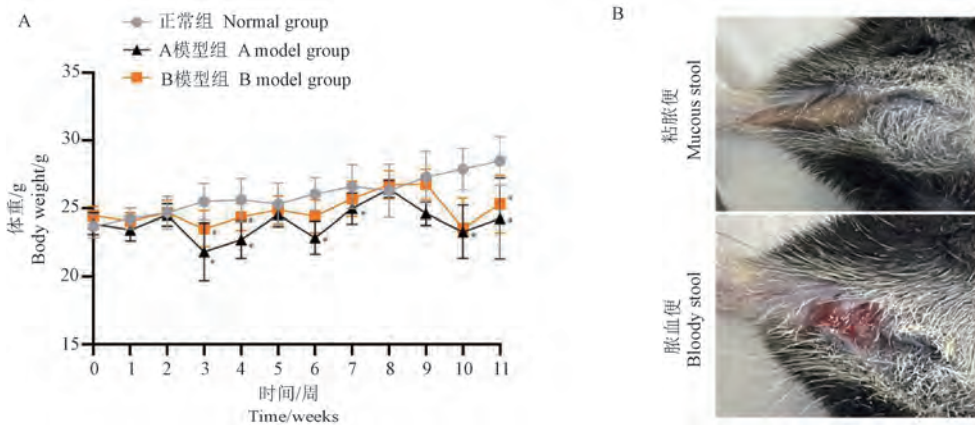
本实验使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。如果数据符合正态分布且方差齐, 则采用单因素方差分析进行统计检验; 如果数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用秩和检验进行统计检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 生存情况分析

2.1.1 造模情况与疾病活动指数评估

A 模型组和 B 模型组首次注射 AOM 后, 体重 3 d 内均明显下降, 而后呈现上升趋势, 说明 AOM 注射对小鼠体重有一定影响。A 模型组和 B 模型组在第一循环自由饮用 1.5% DSS 后, 先后出现肉眼可见黏脓血便, 部分伴有毛发色泽灰暗、精神萎靡、懒动状况。A 模型组在服用了第 1 个周期 DSS 后, 体重有所降低, 多数呈稀软便, 仅有极少数呈脓血之便; B 模型组体重较 A 组下降明显(图 1A), 大部分小鼠出现脓血便, 严重者伴随脱肛症状, 与临床发病情况符合度较高(图 1B)。



注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 1 CAC 小鼠体重变化及大便情况

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

Figure 1 Changes of body weight and stool in CAC mice

2. 1. 2 CAC 模型小鼠成瘤率及死亡情况

A 模型组和 B 模型组小鼠在给予 DSS 自由饮用的初期均表现出结肠炎的症状,包括腹泻、嗜睡、食欲不振、体重减轻等,后期逐渐出现黏液便和血便;给予第二循环 DSS 后,小鼠开始出现一定的 DSS 耐受,症状表现较第一循环轻微;第三循环时,随着 DSS 在体内蓄积量的增加,小鼠便血状况加重。至造模结束,A 模型组和 B 模型组小鼠均无死亡。解剖小鼠并取出同位置肠段进行对比后发现,正常组小鼠结肠弹性良好,肠壁光滑无增生,肠内容粪便性状正常;A 模型组和 B 模型组小鼠结肠弹性丧失,肠壁变薄皱缩,且长度均短于正常组;A 模型组和 B 模型组两组小鼠之间结肠长度无明显变化,且偶见明显血丝,肠壁有大块成形的“菜花状”增生物,肠内容粪便质地黏稀伴血。A 模型组小鼠结肠内增生物少,成瘤大小不一致,成瘤率 70%;B 模型组小鼠结肠内增生物较大,多数形态大小较一致,且排列较密,成瘤率达到了 100%(见表 1,图 2)。与 A 模型组相比,B 模型组小鼠成瘤率更高,且较

一致的肿瘤形态更有利于药效实验的评价。因此,本实验优选 B 模型组小鼠开展 CAC 相关发病机制研究及指标测定。

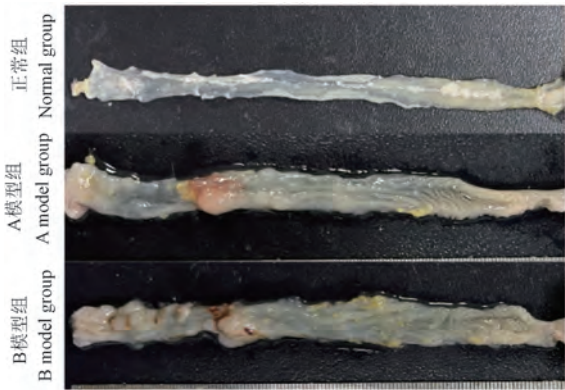


图 2 AOM/DSS 小鼠造模变化

Figure 2 AOM/DSS mouse modeling changes

2. 2 CAC 小鼠模型结肠组织的病理学

小鼠结肠进行 HE 染色并镜下观察,发现正常组小鼠结肠组织内腺体排列规律整齐并呈长管状,空泡杯状细胞及隐窝结构正常(见图 3A);B 模型组

表 1 CAC 小鼠成瘤率及死亡率

Table 1 Tumorigenesis and mortality in CAC mice

分组 Groups	AOM ip 次数 AOM ip times	DSS	结肠长度 Colon length	成瘤数目 Number of tumors	成瘤率/% Tumorigenesis rate/%	死亡率/% Mortality/%
正常组 Normal group	-	-	9.28 ± 0.62	0.00 ± 0.00	0.0	0.0
A 模型组 A model group	1	1.5%	6.96 ± 0.96 *	3.78 ± 3.42	70.0	0.0
B 模型组 B model group	2	1.5%	6.89 ± 0.65 *	6.89 ± 1.83	100.0	0.0

小鼠大多数显示深达肌层的溃疡,结肠隐窝结构的紊乱,失去了原有的管状结构且部分腺体萎缩坏死,异质细胞和深核染色出现,且管腔表面显示出高级别上皮内肿瘤样改变;组织内炎性细胞浸润明显,主要表现为基底浆细胞增多,大量淋巴细胞和中性粒细胞数量也明显增加(见图 3B)。

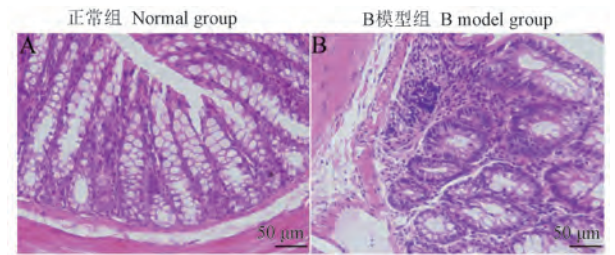


图 3 小鼠结肠组织病理
Figure 3 Mouse colon histopathology

2.3 CAC 小鼠血清中肿瘤标志物和炎症因子的表达
肿瘤标志物可以反映肿瘤存在和生长,是肿瘤诊断和治疗的重要指标之一。结直肠癌的早期诊断和判断预后常用 CA199、CEA 和 CA724 等标志物。这些标志物在结直肠癌患者的血液和尿液中存在,并随着疾病的进展而升高,因此可以用于监测疾病的进展和预后。与正常组相比,B 模型组小鼠中肿瘤标志物除 CA724 外,CA199 和 CEA 含量

均明显升高($P < 0.05$)(图 4A),这提示 CAC 小鼠体内肿瘤的发生与形成。炎症因子测定发现,B 模型组小鼠血清中 IL-6 含量显著高于正常组($P < 0.05$);TNF- α 含量高于正常组,但无统计学意义($P > 0.05$)(图 4B)。结合结肠病理组织中观察到的大量炎性细胞浸润及血清中升高的炎症因子,说明 CAC 小鼠肿瘤的形成伴有炎性发生的特征,这也从某种程度上体现了炎-癌的转变进程。

2.4 CAC 小鼠菌群分析

2.4.1 菌群的多样性分析

通过 alpha 和 beta 多样性分析,对正常组和 B 模型组小鼠菌群进行全面的表征和评估。香农指数(Shannon index)是评估样品中微生物多样性的指标,其数值越大,表示群落多样性越高^[13]。与正常组相比,B 模型组的群落多样性明显降低。Chao 和 Ace 指数是对细菌种群数量的评价,结果显示,B 模型组的种群数量低于正常组(见表 2,图 5A)。PCoA 主坐标分析的结果表明,两组菌群结构存在显著性差异(图 5B)。基于 β 多样性距离的非度量多维尺度分析(NMDS),通过点与点间的距离体现对不同样本间的差异程度,正常组和 B 模型组组间样本未重叠(图 5C),表明组间肠道菌群构成有明显差异^[14]。

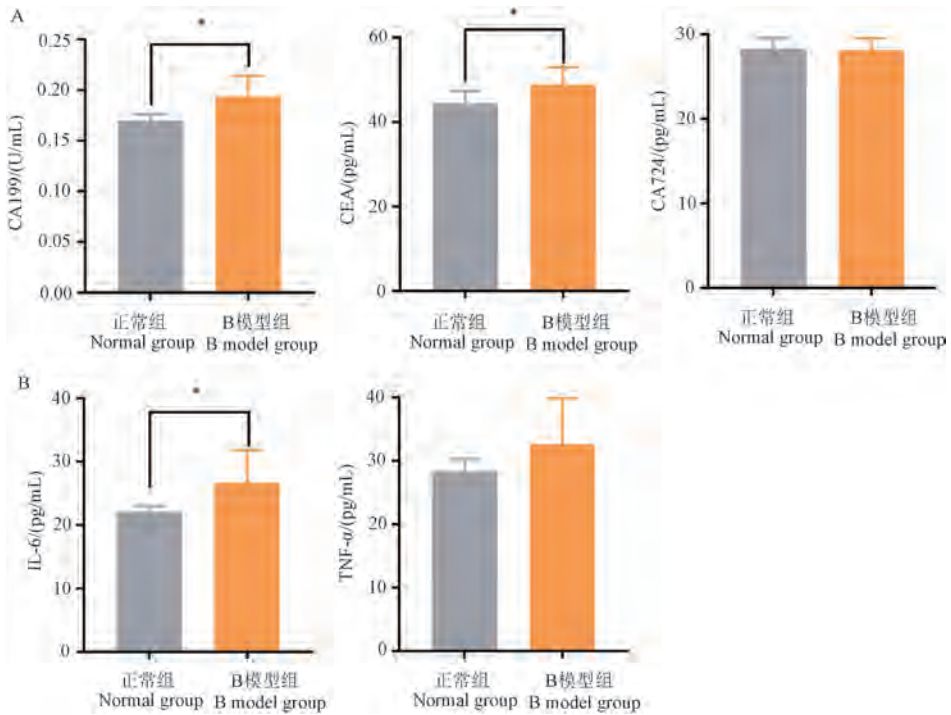


图 4 CAC 小鼠肿瘤标志物和炎症因子的表达
Figure 4 Expression of tumor markers and inflammatory factors in CAC mice

表 2 菌群多样性指数分析

Table 2 Analysis of microbiota diversity index	
组别 Groups	Ace 指数 Ace index
正常组 Normal group	375.40 ± 37.91
B 模型组 B model group	346.41 ± 51.76

2.4.2 肠道菌群物种组成分析

如图 6 所示,在门水平上,正常组和 B 模型组优势菌门为厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidota*),共占 90% 以上。其次为疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*)、弯曲菌门 (*Campilobacterota*) 和其他菌门(图 6A)。属水平上,*Muribaculaceae*、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、梭菌属 (*Clostridia*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属 (*Prevotellaceae*) 和阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 为主要优势菌属(图 6B)。

模型组中在所有样本中均检测出 *norank_f__Muribaculaceae*、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、普雷沃菌属 (*Prevotellaceae*)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、瘤胃球菌 (*Ruminococcus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*),这 6 种菌属丰度之和在每个样本中均超过 20%,但无论是组内还是组间均存在明显的差异。这也说明了微生物群落的构成存在着较大的个体差异。

2.4.3 肠道菌群差异物种检验

如图 7 所示,在门水平上,与正常组相比,B 模型组疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*) 增多 ($P < 0.05$),拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、弯曲菌门 (*Campilobacterota*) 门减少 ($P < 0.05$)(图 7A)。属水平上,B 模型组的阿克曼菌属 (*Akkermansia*)、普雷沃菌属 (*Prevotellaceae_NK3B31_group*)、*Prevotellaceae_UCG-001*、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、RF39、肠杆菌属 (*Enterorhabdus*)、*Gastranaerophilales*、

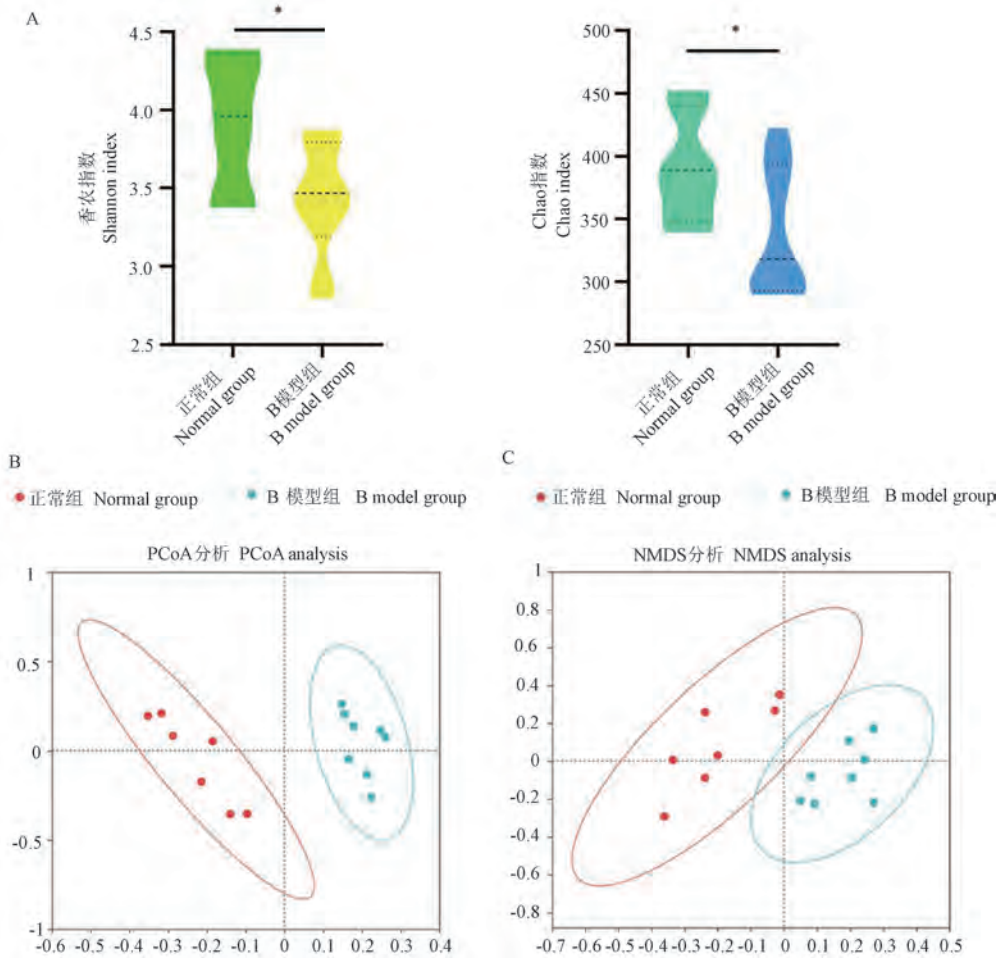


图 5 香农指数、Chao 指数分析及 PCoA 分析和 NMDS 分析

Figure 5 Shannon index and Chao index, PCoA analysis and NMDS analysis

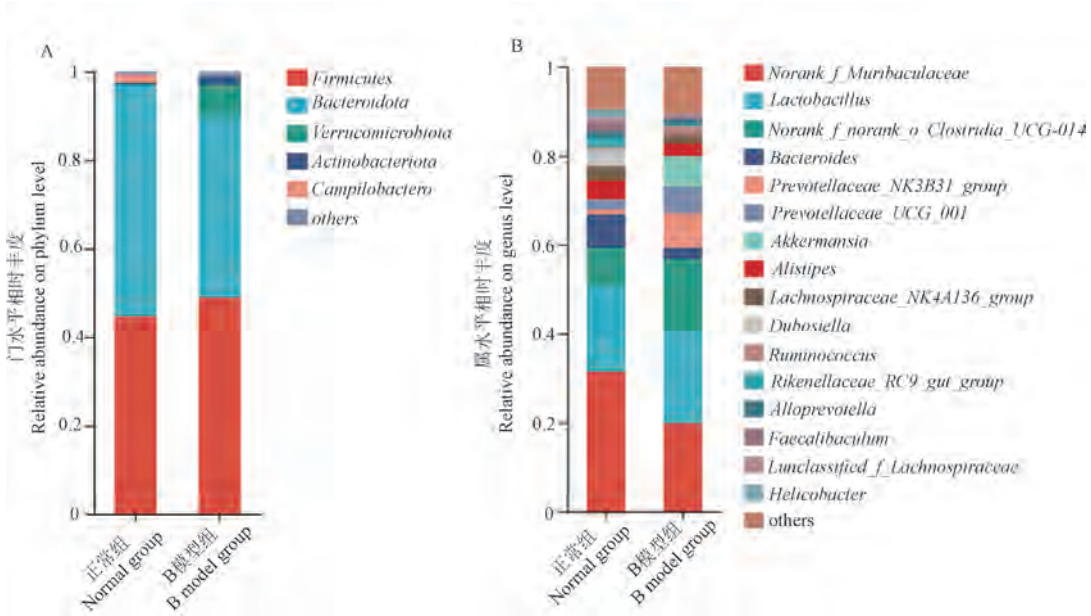


图 6 门和属水平的群落结构柱形图

Figure 6 Histogram of community structure at phylum level and genus level

Adlercreutz 显著增多 ($P < 0.05$) ; *Muribaculaceae*、理研菌属 (*Rikenellaceae_RC9_gut_group*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、*Odoribacter*、厌氧原体属 (*Anaeroplasm*)、罗氏菌属 (*Roseburia*) 等显著减少 ($P < 0.05$) (图 7B)。这些结果说明,AOM/DSS 联合造模形成的 CAC 小鼠模型肠道菌群发生紊乱。

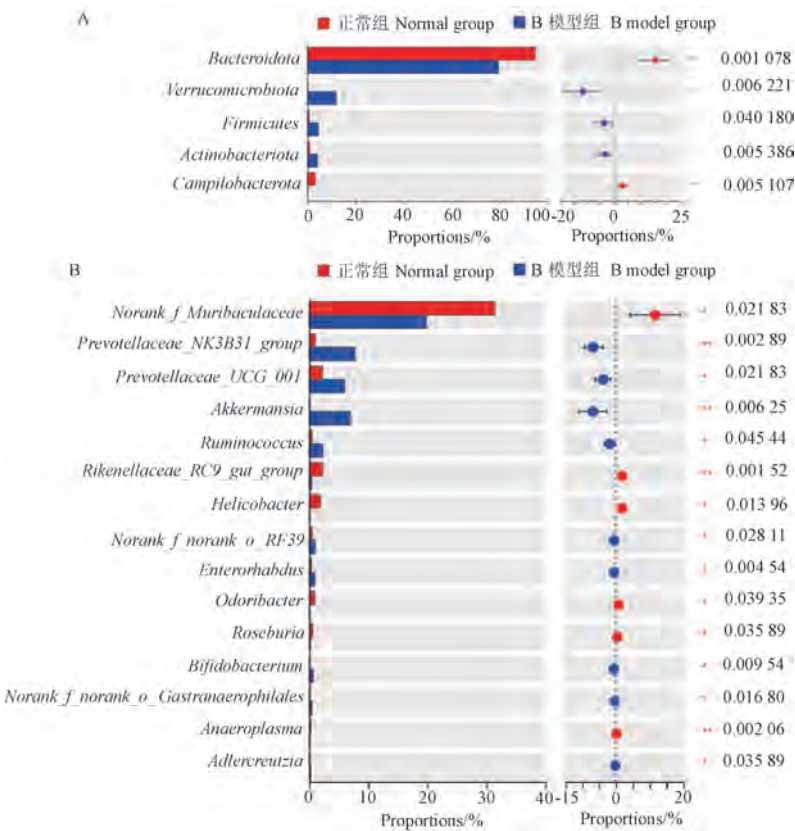


图 7 物种差异分析图

Figure 7 Analysis of species differences

LEfSe(LDA effect size)是一种差异分析方法,可以对所有微生物分类水平同时进行差异分析,并强调寻找组间稳健的差异物种,即生物标志物。这种方法可以更好地理解肠道微生物群落中的差异性,并发现潜在的生物标志物,从而为肠道微生物群落的研究提供新的思路和方法。如图 8,对 LDA 值前 15 的 LEfSe 分析进行展示,定义 LDA 值 > 4 为正常组和模型组两组间具有显著差异生物标志物,在属水平上检测出可以作为生物标志物主要是阿克曼菌属(*Akkermansia*)、普雷沃菌属(*Prevotellaceae* _ *NK3B31* _ group)、*Prevotellaceae* _ *UCG-001* 及 *Muribaculaceae*。

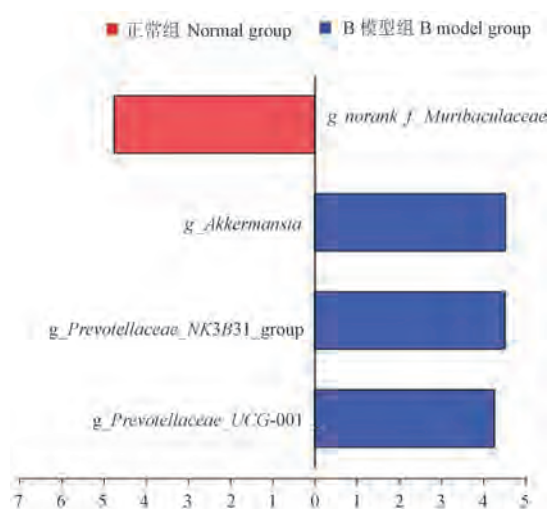


图 8 LDA 值分布柱状图

Figure 8 Histogram of LDA value distribution

3 讨论

AOM 联合 DSS 共同构建的小鼠结肠炎癌转化模型是研究 CAC 的有效工具。不同品系的小鼠对 AOM/DSS 耐受性、敏感性存在差异^[8]。C57BL/6 小鼠对 DSS 的耐受力低,诱发的炎症易持续,且迁延难愈,最终转变为慢性结肠炎^[15]。此外,C57BL/6 具有高度稳定的遗传背景,保证了实验数据的一致性^[16],为此,采用 C57BL/6 小鼠构建 CAC 研究模型。前期预实验发现,2%(2 g/100 mL)及以上 DSS 浓度给药,小鼠第三循环自由饮用时会出现不同程度的死亡,为此设置 1.5% DSS 给药浓度。检索文献发现^[17-18],不同的 AOM 注射次数会影响小鼠成瘤情况。为此本实验通过不同 AOM 注射次数对 CAC 造模方法进行了优化,结果发现,同为 1.5% DSS 浓度自由饮用的条件下,单次注射 AOM

注射小鼠成瘤率为 70%,而 AOM 加强注射 1 次后,实现了 100%成瘤率,且没有小鼠死亡。同时 HE 染色显示,B 模型组小鼠结肠内管腔表面出现高级别上皮内肿瘤样改变;血清中肿瘤标志物 CA199、CEA 显著性升高,验证 AOM/DSS 联合成功构建了 CAC 小鼠模型。为此,两次 AOM 腹腔注射(10 mg/kg)联合 1.5% DSS 自由饮用的给药方式可作为 CAC 造模的优选方案。

结直肠是人体中微生物大量聚集的部位,代谢尤为活跃。动物实验证实,无菌动物体内植入失调的肠道菌群,则罹患结肠炎和结肠癌的风险明显增加^[19]。本实验旨在研究 CAC 小鼠肠道微生物群落的变化,通过对 CAC 小鼠粪便进行肠道菌群分析,发现模型组与正常组之间存在显著性差异。结果显示,在模型组中,厚壁菌门和拟杆菌门是相对于正常组更为丰富的优势菌门,占比超过 90%,其次是疣微菌门、放线菌门和弯曲菌门,这与其他研究基本一致^[20-21]。CAC 模型小鼠肠道菌群的丰度和多样性降低,尤其拟杆菌门降低明显,作为肠道的优势菌群,拟杆菌门能够预防肠道炎症,维持肠道稳态等^[22],这提示 CAC 模型小鼠体内维持机体健康的菌群紊乱。

结肠微生物中,阿克曼菌属是疣微菌门唯一的菌属。作专性黏蛋白降解菌,小鼠肠道内增多的阿克曼菌消耗黏蛋白 MUC1,导致黏液层变薄,使得黏膜屏障通透性增加,病原体进一步入侵^[23-24]。推测 CAC 患者腹痛腹泻,黏液脓血便临床症状的发生与阿克曼菌丰度升高密切相关。普雷沃菌丰度和一系列的黏膜炎症因子如 IL-6、IL-23 等呈正相关^[25],并且是催化 IL-1 β 成熟的关键^[26]。此外,普雷沃菌增加还与黏蛋白 MUC 的降解呈现一定的正相关^[27]。为此,CAC 或许是肠道通透性增加和/或低度黏膜炎症的结果。瘤胃球菌能够作用于肠道屏障,激发肠道免疫细胞释放大促炎细胞因子,具有很强的促炎作用^[28-29]。本研究发现 CAC 模型结肠组织内以淋巴细胞和中性粒细胞增多为特征的炎性细胞浸润,同时,CAC 模型小鼠血清中炎性因子 IL-6 和 TNF- α 升高。作为强促炎细胞因子,过度表达的 IL-6 使得肠道内环境失衡,刺激肠上皮通透性升高,进而募集大量中性粒细胞到肠道炎症部位^[30]。在炎症环境下 IL-6 能够抑制细胞凋亡,促进肠上皮细胞增生及肿瘤细胞增殖^[31-32]。临床研究证实,IL-6 在结肠癌患者血清和肿瘤组织中高表

达^[33]。由此可见,普雷沃菌/瘤胃球菌参与 CAC 的发病作用机制可能与其诱导的肠粘膜通透性增高,导致肠黏膜屏障功能受损,进而引发持续的炎症反应密切相关。

研究证实,主要由罗氏菌属及毛螺菌科 (*Lachnospiraceae*) 产生的短链脂肪酸具有一定的抗肿瘤特性,如抑制肿瘤细胞的增殖、介导其凋亡、维持 T 细胞稳态等功能^[34]。丁酸盐是短链脂肪酸的一种,有研究发现,人肠道内罗氏菌属参与丁酸盐生成,从而推断罗氏菌属数量的减少可能间接促进了结直肠癌的发展^[35]。*Muribaculaceae* 同样被认为是一种与短链脂肪酸产生相关的菌群,其丰度降低会诱导肠癌的发生^[36]。此外,炎症可以使 *Muribaculaceae* 耗竭^[37]。值得研究的是,通常被认为在 CAC 中起作用的其他益生菌,如双歧杆菌,在肿瘤组中并没有显示出丰度降低,这表明炎症诱导的结直肠肿瘤发生过程中,肠道微生物组成的变化可能与传统 CRC 发生的变化不同。这些“异常”肠道菌群变化在 AOM/DSS 诱导的炎症 CAC 模型的背景下需进一步研究和讨论。

肠道的微生物群变化可能影响疾病的发生或发展,肠道菌群失调以及这种表型背后的机制需要阐明,在动物模型和人体中的诱发肿瘤作用尚需进一步证实。本研究进一步优化了 AOM/DSS 小鼠模型,研究了结肠直肠肿瘤的肠道微生态,展示了肠道中不同丰度的微生物群,并确定与 CAC 之间的潜在关键关系。这些发现为阐明炎症介导的结直肠肿瘤的发病机制提供指导。

参 考 文 献(References)

[1] 李清平. 中性鞘磷脂酶 2 经外泌体调控细胞间神经酰胺转移在再生肝组织抑制结直肠癌肝转移的作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2023.
LI Q P. Investigation on the role and mechanism of neutral sphingomyelinase 2 inhibits colorectal cancer liver metastasis by exosomal regulation of intercellular ceramide transfer in regenerative liver tissues [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2023.

[2] 邢艳丽, 尹星, 付民, 等. 结直肠癌组织和细胞中人整合素 $\alpha 6$ 的表达及作用分析 [J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(3): 336-340.
XING Y L, YIN X, FU M, et al. Expression of human integrin $\alpha 6$ in colorectal cancer tissues and cells and function analysis [J]. Chin J Lab Diagn, 2023, 27(3): 336-340.

[3] HUSSAIN S P, HARRIS C C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials [J]. Int J Cancer, 2007, 121(11): 2373-2380.

[4] 褚志杰, 张敬涛, 马艳, 等. AOM/DSS 诱导小鼠结直肠癌炎症癌转化模型的研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(17): 87-90.
CHU Z J, ZHANG J T, MA Y, et al. Research progress of AOM/DSS-induced colorectal cancer transformation model in mice [J]. Shandong Med J, 2019, 59(17): 87-90.

[5] ANGELOU A, ANDREATOS N, ANTONIOU E, et al. A novel modification of the AOM/DSS model for inducing intestinal adenomas in mice [J]. Anticancer Res, 2018, 38(6): 3467-3470.

[6] NEUFERT C, BECKER C, NEURATH M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. Nat Protoc, 2007, 2(8): 1998-2004.

[7] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.

[8] PERŠE M, CERAR A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 718617.

[9] SUZUKI R, KOHNO H, SUGIE S, et al. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane [J]. Histol Histopathol, 2005, 20(2): 483-492.

[10] KEKU T O, DULAL S, DEVEAUX A, et al. The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(5): G351-G363.

[11] BRENCHEY J M, DOUEK D C. Microbial translocation across the GI tract [J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 149-173.

[12] 赖雪莹, 刘乐, 陈烨. 肠道菌群与结直肠癌的发生发展 [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9): 865-869.
LAI X Y, LIU L, CHEN Y. Current research progress on the gut microbiome and colorectal cancer [J]. Chin J Pract Intern Med, 2018, 38(9): 865-869.

[13] 吴昊, 于小红, 王焕君, 等. 雷公藤对右旋葡聚糖硫酸钠诱导的溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 387-396.
WU H, YU X H, WANG H J, et al. Effect of *Tripterygium wilfordii* on intestinal flora in mice with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(2): 387-396.

[14] 徐航宇, 王彦礼, 王敦方, 等. 高通量测序技术研究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. 药学报, 2017, 52(11): 1673-1682.
XU H Y, WANG Y L, WANG D F, et al. Effect of Huangqin Tang on the gut microbiota in rats with ulcerative colitis model determined by high-throughput sequencing [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(11): 1673-1682.

[15] MELGAR S, KARLSSON A, MICHAËLSSON E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288(6): G1328-G1338.

- [16] JACKSTADT R, SANSOM O J. Mouse models of intestinal cancer [J]. J Pathol, 2016, 238(2): 141–151.
- [17] PAPANIKOLAOU A, WANG Q S, PAPANIKOLAOU D, et al. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2000, 21(8): 1567–1572.
- [18] NEUFERT C, BECKER C, NEURATH M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. Nat Protoc, 2007, 2(8): 1998–2004.
- [19] ICAZA-CHÁVEZ M E. Gut microbiota in health and disease [J]. Rev Gastroenterol Mex, 2013, 78(4): 240–248.
- [20] MAHOWALD M A, REY F E, SEEDORF H, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(14): 5859–5864.
- [21] MILLAN B, PARK H, HOTTE N, et al. Fecal microbial transplants reduce antibiotic-resistant genes in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(12): 1479–1486.
- [22] BROWN E M, KE X, HITCHCOCK D, et al. *Bacteroides*-derived sphingolipids are critical for maintaining intestinal homeostasis and symbiosis [J]. Cell Host Microbe, 2019, 25(5): 668–680. e7.
- [23] 韦忠红. Sennoside A 影响肠道微生物的组成平衡损伤结肠黏膜屏障促进结肠癌发展 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2019.
- WEI Z H. Sennoside A upsets the balance of intestinal microbial composition and damages colonic mucosal barrier [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2019.
- [24] SHIMBORI C, DE PALMA G, BAERG L, et al. Gut bacteria interact directly with colonic mast cells in a humanized mouse model of IBS [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2105095.
- [25] DILLON S M, LEE E J, KOTTER C V, et al. Gut dendritic cell activation links an altered colonic microbiome to mucosal and systemic T-cell activation in untreated HIV-1 infection [J]. Mucosal Immunol, 2016, 9(1): 24–37.
- [26] LUKENS J R, GURUNG P, VOGEL P, et al. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease [J]. Nature, 2014, 516(7530): 246–249.
- [27] QUEIPO-ORTUÑO M I, SEOANE L M, MURRI M, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e65465.
- [28] PAL D, NASKAR M, BERA A, et al. Chemical synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Ruminococcus gnavus* [J]. Carbohydr Res, 2021, 507: 108384.
- [29] SUN Y, CHEN Q, LIN P, et al. Characteristics of gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis in Shanghai, China [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 369.
- [30] UNVER N, MCALLISTER F. IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 41: 10–17.
- [31] HODGE D R, HURT E M, FARRAR W L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer [J]. Eur J Cancer, 2005, 41(16): 2502–2512.
- [32] GRIVENNIKOV S, KARIN E, TERZIC J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer [J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 103–113.
- [33] GALIZIA G, ORDITURA M, ROMANO C, et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery [J]. Clin Immunol, 2002, 102(2): 169–178.
- [34] YOSHIMOTO S, LOO T M, ATARASHI K, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome [J]. Nature, 2013, 499(7456): 97–101.
- [35] HUYCKE M M, ABRAMS V, MOORE D R. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(3): 529–536.
- [36] ZHANG Z, CAO H, SONG N, et al. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 138: 111237.
- [37] LANG M, BAUMGARTNER M, ROŻAŁSKA A, et al. Crypt residing bacteria and proximal colonic carcinogenesis in a mouse model of Lynch syndrome [J]. Int J Cancer, 2020, 147(8): 2316–2326.

[收稿日期] 2023-09-11

谈宇权,张君宇,杨梦,等. 异丙肾上腺素诱导慢性心衰模型不同方案的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 161-167.

TAN Y Q, ZHANG J Y, YANG M, et al. Comparison of different regimens in isoprenaline-induced chronic heart failure models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 161-167.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.003

异丙肾上腺素诱导慢性心衰模型不同方案的比较

谈宇权,张君宇,杨梦,王菲,钟森杰,李琳,胡志希*

(湖南中医药大学中医诊断研究所,长沙 410208)

【摘要】 目的 比较 3 种不同方案制备的动物模型,探索稳定、可靠且重复性好的小鼠慢性心力衰竭模型。**方法** 将 25 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组:正常组(ZC 组)、实验 A 组(MA 组)、B 组(MB 组)和 C 组(MC 组)。实验组采取不同制备方案连续注射 ISO,其中 MA 组和 MB 组为浓度递减造模法,MA 组(第 1 天 10 mg/kg,第 2 天 5 mg/kg、第 3 ~ 30 天 2.5 mg/(kg·d);皮下注射 30 d);MB 组(第 1 天 20 mg/kg、第 2 天 10 mg/kg、第 3 ~ 14 天 5 mg/(kg·d);皮下注射 14 d);MC 组(浓度恒定 7.5 mg/(kg·d),腹腔注射 28 d),构建慢性心衰动物模型。在注射结束后的第 2 天,计算各组小鼠存活率和成模率情况。通过心脏超声检测心功能,并用 ELISA 测定血清中 NT-pro BNP、IL-6、TNF- α 水平。**结果** 在第 30 天注射结束后,各实验组虽都能有效诱导慢性心力衰竭,但发现 7.5 mg/kg 浓度 MC 组的造模情况最稳定,更适合后续开展中医药相关的心衰研究。**结论** ISO 制备小鼠慢性心衰模型以恒定 7.5 mg/(kg·d),连续腹腔注射 28 d 为最佳方案。

【关键词】 异丙肾上腺素;慢性心衰;射血分数保留型心衰;模型制备

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0161-07

Comparison of different regimens in isoprenaline-induced chronic heart failure models

TAN Yuquan, ZHANG Junyu, YANG Meng, WANG Fei, ZHONG Senjie, LI Lin, HU Zhixi*

(Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine,
Changsha 410208, China)

Corresponding author: HU Zhixi. E-mail: 515800272@qq.com

【Abstract】 Objective To compare animal models of chronic heart failure (CHF) prepared by three different protocols, to establish a stable, reliable, and reproducible mouse model of CHF. **Methods** Twenty-five male C57BL/6J mice were divided randomly into four groups: a blank group, model A group (MA group), model B group (MB group), and model C group (MC group). The model groups adopted different preparation protocols for continuous injection of isoprenaline. The MA group and MB group were dose-decreasing models: MA group: subcutaneous injection of 10 mg/kg on day 1, 5 mg/kg on day 2, 2.5 mg/(kg·d) on days 3 ~ 30, total 30 days; and MB group: subcutaneous injection of 20 mg/kg on day 1, 10 mg/kg on day 2, 5 mg/(kg·d) on days 3 ~ 14, total 14 days. The MC group used a constant dose of intraperitoneal injection of 7.5 mg/(kg·d) for 28 days. The day after the final injection, the survival and model-formation

【基金项目】 国家自然科学基金(82274412),湖南省自然科学基金(2020JJ4062,2020JJ5408),湖南省教育厅项目(21A0230,21B0361),湖南省学位与研究生教育教改项目(2020JGZX012),湖南省教育改革课题(HNJG-2021-0594)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82274412), Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ4062, 2020JJ5408), Hunan Provincial Department of Education Project (21A0230, 21B0361), Hunan Province Degree and Graduate Education Reform Project (2020JGZX012), Education Reform in Hunan Province (HNJG-2021-0594).

【作者简介】 谈宇权,男,在读硕士研究生,研究方向:心血管疾病证本质与诊治规律研究。Email:871611007@qq.com

【通信作者】 胡志希,男,教授,博士生导师,研究方向:心血管疾病证本质与诊治规律研究。Email:515800272@qq.com

rates for each group of mice were calculated. Cardiac function was measured by cardiac ultrasound and serum levels of N-terminal pro B-type natriuretic peptide, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α were measured. **Results** CHF was successfully induced in all the model groups after all injections at the end of the fourth week. However, comprehensive test result showed that the MC model was the most stable. **Conclusions** An isoprenaline-induced mouse model of CHF using constant intraperitoneal injection of 7.5 mg/(kg·d) for 28 days may be the most suitable model for subsequent research on traditional Chinese medicine.

【**Keywords**】 isoprenaline; chronic heart failure; HFpEF; model preparation

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

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF, 简称心衰)是由多种因素影响心脏结构和功能,引起心室充盈和(或)射血功能受损,进展至终末期的临床危急重症。CHF 将成为全球致死和致残的首要原因,目前我国约有 850 万 CHF 患者,患病率和死亡率逐年递增,严重威胁人类的健康^[1]。因此,研究慢性心衰的病理改变及相应机制具有重大意义,而制备与人类临床病症特点相似且稳定可靠的 CHF 动物模型是实验关键^[2]。

目前建立心衰动物模型的方法多种多样,如高盐饮食诱导、药物损伤以及手术造模等方式^[3-4]。其中,关于异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)制备心衰动物模型报道相对较多,是通过兴奋心脏 β 受体,加快心率和促进心肌收缩,加重心脏负荷形成心衰。具有操作便捷、周期短、成本较低等优势^[5-7],但造模情况受到多种因素(药物浓度、注射方式、造模时间)的影响^[8]。如 WANG 等^[9]采取剂量递减造模方式,用递减浓度 ISO 皮下注射 30 d 制备 CHF;郭淑贞团队用递减浓度 ISO 皮下注射 14 d 制备^[10-12];WAN 等^[13]用递增浓度 ISO 灌胃 21 d 制备 CHF;WU 等^[14]用恒定浓度 ISO 腹腔注射 28 d 制备 CHF。杜冰玉等^[15]对 ISO 诱导 CHF 大鼠的制备方法进行优化研究,有效降低动物死亡率。

ISO 制备心衰模型尚无明确且较稳定的实验方案,仍缺乏客观的评价标准。因此,在前期研究基础上^[16-19],通过查阅国内外使用 ISO 诱导心衰小鼠模型的文献,选取 3 种常用的制备方法进行研究。以存活率、成模率以及心力衰竭状态为依据,寻找安全有效的 CHF 模型制备方法,为后续慢性 CHF 的相关研究提供可靠的模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究选用 25 只 8 ~ 9 周龄 SPF 级 C57BL/6

雄性小鼠,体重 20 ~ 24 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养环境:昼夜各半循环照明,相对湿度 50% $\pm$ 5%,环境温度 22 ~ 24 $^{\circ}\text{C}$,饲养期间各组小鼠自由进食、饮水,饲养于 SPF 级湖南中医药大学动物实验室【SYXK(湘)2019-0009】。所有操作均经过湖南中医药大学医学伦理委员会监管和批准实施(LL2022030202)。

1.1.2 主要试剂与仪器

盐酸异丙肾上腺素(HY-B0468, MedChemExpress);异氟烷(产品批号:兽药字 031217015,河北金达福药业有限公司);小鼠 ELISA Kit 试剂盒(NT-pro BNP、IL-6、TNF- α ,江苏晶美生物科技有限公司);Masson 染色和 HE 染色试剂盒(Wellbio 公司,中国);4%多聚甲醛组织固定液(Sigma 公司,美国)。

小动物呼吸麻醉机(R550 型,瑞沃德生命科技有限公司,中国);小动物高频彩色超声系统(Vevo 2100 型,VISUALSONICS,加拿大);台式低温高速离心机(H1650R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国);超低温冰箱(Forma 900 系列,Thermo 公司,美国);SUNRISE 酶标仪(Rayto RT-6100 型,中国)。

1.2 方法

1.2.1 宏观表征采集

造模期间每天观察并记录小鼠状态,观察小鼠的饮食、毛发色泽、活动状态、体温、二便等一般行为学体征。

1.2.2 分组及模型制备

25 只 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后,按照随机数字表分成正常组(ZC 组)共 6 只,实验 A 组(MA 组)、实验 B 组(MB 组)、实验 C 组(MC 组)共 19 只,使用耳标钳进行耳号标记。根据实验方案,分别采取皮下和腹腔的方式,注射量 0.1 mL/20 g,实验组注射不同浓度 ISO 诱导小鼠心力衰竭模型,

ZC 组注射等容积量的生理盐水。各组具体情况如下：(1)ZC 组：生理盐水，皮下和腹腔注射 30 d；(2)MA 组^[9]：第 1 天 10 mg/kg、第 2 天 5 mg/kg、第 3 ~ 30 天 2.5 mg/(kg·d)，皮下注射 30 d；(3)MB 组^[10-11]：第 1 天 20 mg/kg、第 2 天 10 mg/kg、第 3 ~ 14 天 5 mg/(kg·d)；皮下注射 14 d；(4)MC 组^[14]：恒定 7.5 mg/(kg·d)；腹腔注射 28 d。同室常规饲养，每周称体重，记录小鼠死亡情况并计算死亡率。各组分别于注射结束后第 2 天，做心脏超声检测小鼠心功能指数。

1.2.3 心脏超声检测

给药结束后行超声检测，小鼠鼻腔吸入 2% 异氟烷进行全身麻醉，将麻醉后小鼠仰卧固定，胸部用脱毛膏备皮后涂抹耦合剂。然后将高频探头置于胸骨旁乳突肌水平心室短轴切面采集图像。使用高分辨率小动物超声系统评价各实验组小鼠的心脏结构及心功能，测量左室收缩末期内径 (LVIDs)、左室舒张末期内径 (LVIDd)，分别计算射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS)。每只动物采样 3 次，记录 3 个心动周期的平均值。参照制备射血分数保留型心衰 (heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF) 的实验研究，实验组小鼠以 EF < 65%、FS < 30% 作为成模标准^[6,10-11,20]。

1.2.4 血清中 NT-pro BNP、IL-10、TNF-α 含量测定

首先每只小鼠取血 0.5 mL，常温静置血样 4 ~ 6 h。再通过离心机 4 ℃、3000 r/min，离心 15 min 后，分离血清。最后使用酶联免疫吸附法 (ELISA) 法测定血清中 NT-pro BNP、IL-10 及 TNF-α 炎症因子含量。

1.2.5 组织病理学检测

完成心功能检测后，分离心脏，用生理盐水洗净血液，剪取心脏组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中。将每颗心脏都包埋在石蜡中并切成 4 μm 厚的切片，贴于载玻片后烤片。使用 Masson 和 HE 试剂盒对切片进行染色，1% 盐酸乙醇分化，乙醇梯度脱水，中性树

胶封片。在 Leica 显微镜 (100 倍、200 倍) 下拍照，并观察小鼠心脏组织形态学和胶原纤维沉积情况。

1.3 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 9 软件处理，计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；符合正态分布采用 *t* 检验，不符合正态分布采用非参数检验；各组间样本均数的比较采用单因素方差分析，*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组小鼠的状态比较

2.1.1 各实验组小鼠的一般情况

各实验组中均未出现小鼠死亡，MA 组小鼠状态较好，而 MB 组和 MC 组的一般状态较差。参照成模标准，MA 组、MB 组和 MC 组因心功能 (EF、FS) 未达标的小鼠数量分别为 4 只、2 只和 1 只，成模率分别是 33%、66% 和 86%。

2.1.2 各实验组小鼠宏观表征结果

实验过程中，各组小鼠均顺利存活。与 ZC 组相比，从实验第 14 天开始，不同剂量的实验组小鼠普遍出现精神状态不佳，口唇发紫，蜷卧聚堆，抓取反抗力度减弱、活跃度及自主活动减少等心力衰竭表现。

2.2 各组小鼠心脏结构及心功能比较

2.2.1 超声心动图比较

如图 1 所示，与 ZC 组相比，各实验组 LVIDs、LVIDd 出现明显增厚，提示心室腔扩大。MC 组较 MA、MB 组增厚更显著，心衰程度更重。

2.2.2 彩超心功能结果

与 ZC 组相比，各实验组的 EF、FS、LVEDV、LVESV、SV、LVIDs 和 LVIDd 数值都出现不同程度改变，差异具有显著性 (*P* < 0.01)。与 MA 组相比，MB 组的 LVIDd 明显增厚 (*P* < 0.05)，MC 组的 LVIDs 明显增厚、心脏射血分数 EF 值大幅下降，差异具有显著性 (*P* < 0.05) (表 1)。

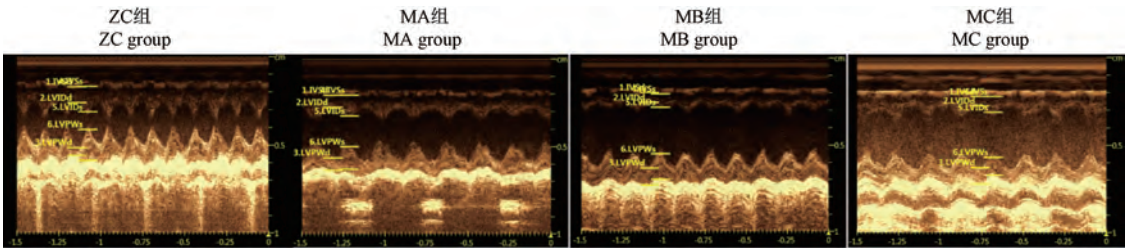


图 1 各组小鼠心脏彩超
Figure 1 Color Doppler ultrasound of mouse heart in each group

2.3 各组小鼠血清 ELISA 检测

ELISA 检测结果显示,与 ZC 组相比,实验组小鼠血清中的 NT-pro BNP、IL-6、TNF- α 都出现不同程度的升高,具有显著性差异($P < 0.01$)。与 MC 组相比,MA 组、MB 组的 NT-pro BNP、IL-6、TNF- α 水平远低于 MC 组,具有显著性差异($P < 0.01$)。与 MA 组相比,MB 组细胞因子的变化程度不明显,两组之间无统计学意义(图 2)。

2.4 病理学检测结果

2.4.1 HE 染色结果

经苏木精-伊红(HE)染色,发现 ZC 组心肌细胞分布均匀、肌纤维结构形态清晰、排列有序、细胞外

基质较少、蓝染的细胞核密度适中;MA 组和 MC 组心肌细胞体积明显增大、肥厚,肌纤维形态不规则,部分断裂,排列紊乱,伴有明显局部胶原纤维增生。而 MB 组心肌纤维化程度较轻,细胞外基质有胶原沉积而不明显,少量细胞核略增大(图 3)。

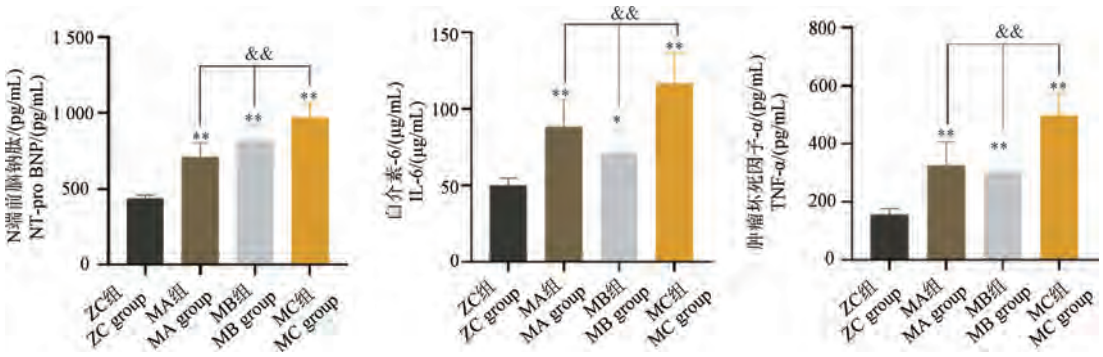
2.4.2 Masson 染色结果

经 Masson 染色后,心肌纤维和胶原纤维分别呈红色和蓝色。ZC 组心肌纤维排列整齐,仅见少量蓝色胶原纤维分布。与 ZC 组相比,各实验组均有不同程度的心肌细胞减少,肌纤维排列紊乱,甚至断裂、融合呈波浪状,并出现大量蓝色胶原纤维增生(见图 4)。

表 1 各组小鼠心功能相关指标的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of related indicators of cardiac function in mice in each group($\bar{x} \pm s$)				
指标 Index	ZC 组 ZC group	MA 组 MA group	MB 组 MB group	MC 组 MC group
<i>n</i>	6	6	6	7
舒张末期左室内径/mm LVIDd/mm	2.24 $\pm$ 0.46	3.04 $\pm$ 0.45 **	3.50 $\pm$ 0.13 **#	3.30 $\pm$ 0.30 **
收缩末期左室内径/mm LVIDs/mm	0.89 $\pm$ 0.13	1.89 $\pm$ 0.43 **	2.22 $\pm$ 0.57 **	2.38 $\pm$ 0.30 **#
射血分数/% EF/%	91.76 $\pm$ 4.97	74.62 $\pm$ 8.31 **	69.81 $\pm$ 16.59 **	60.27 $\pm$ 10.67 **#
缩短分数/% FS/%	58.83 $\pm$ 9.46	38.22 $\pm$ 6.96 **	36.63 $\pm$ 15.51 **	27.82 $\pm$ 6.85 **
舒张末期左室容积/mL LVEDV/mL	0.03 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.03 **	0.11 $\pm$ 0.01 **	0.09 $\pm$ 0.03 **
收缩末期左室容积/mL LVESV/mL	0	0.02 $\pm$ 0.01 **	0.03 $\pm$ 0.02 **	0.04 $\pm$ 0.01 **
心搏量/mL SV/mL	0.03 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02 **	0.08 $\pm$ 0.02 **	0.06 $\pm$ 0.02 **

注:与 ZC 组比, ** $P < 0.01$;与 MA 组相比, # $P < 0.05$ 。(下同)
Note. Compared with ZC group, ** $P < 0.01$. Compared with MA group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)



注:与 ZC 组相比, * $P < 0.05$;与 MC 组相比, && $P < 0.01$ 。
图 2 各组小鼠血清中的 NT-pro BNP、IL-6、TNF- α 柱状图($\bar{x} \pm s$)
Note. Compared with ZC group, * $P < 0.05$. Compared with MC group, && $P < 0.01$.
Figure 2 Histogram of NT-pro BNP, IL-6, TNF- α in the serum of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

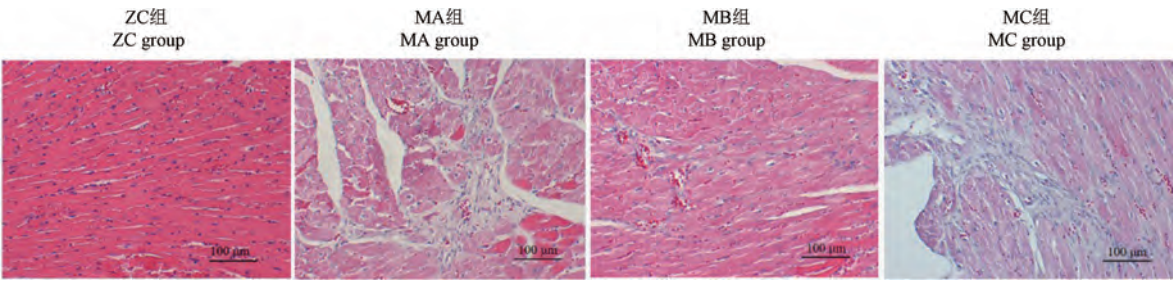


图 3 各组小鼠心脏 HE 染色
Figure 3 HE staining of mouse hearts in each group

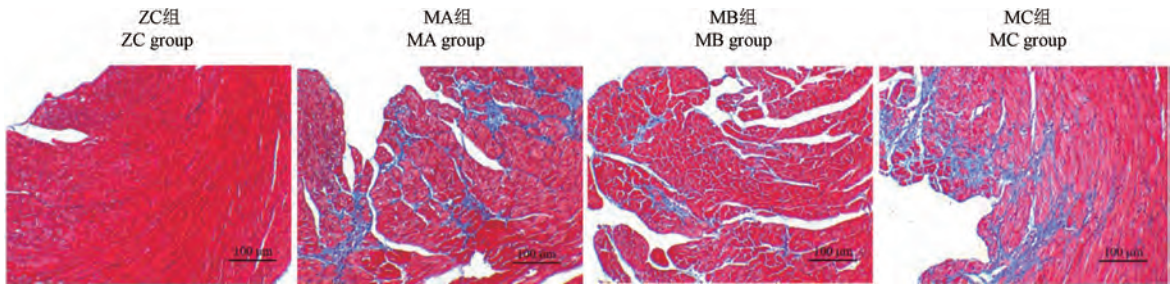


图 4 各组小鼠心脏 Masson 染色
Figure 4 Masson staining of mouse hearts in each group

3 讨论

心力衰竭是临床常见的危急重症,具有高患病率、高发病率和高病死率的特点,当前已成为心血管领域的研究热点。而稳定的心力衰竭动物模型是探究其发病机制和治疗对策的必要条件^[1,4,21]。目前,主动脉弓缩窄术造模和高盐饮食喂养是心衰模型常见的制备方法,其模型结果可靠且稳定,虽能够较好地模拟心衰病的病理特征和结构,但具有造模周期长,成本较高和操作难度大等缺点。

阿霉素和异丙肾上腺素都是药物制备心衰模型的方法,具有操作便捷、成本较低等优势。其中阿霉素具有较强的心脏毒性,引起实验动物死亡率^高;相反,异丙肾上腺素作为心脏β受体兴奋剂,通过促进心肌收缩形成心衰,其死亡率^{较低}。国内外学者使用 ISO 制备心衰模型制备方法大不相同,如 WANG 等^[9]和郭淑贞团队均选择浓度递减型和皮下注射的造模方法,但初始 ISO 浓度和造模时间不同^[10-12];还有学者采取浓度递增和灌胃的方式造模,而 WU 等^[14]使用恒定浓度 ISO 腹腔注射 28 d;此外,谭亚芳等^[22]选用 18 周龄老年 C57BL/6J 小鼠,恒定 30 mg/kg ISO 浓度皮下注射 14 d 制备射血分数降低型心衰 (heart failure with reduced ejection fraction, HF_rEF)。可见制备心衰小鼠受到多种因素的影响,尚无实验证实哪种方案为 ISO 复制心衰模

型的最佳方案。

本实验各组小鼠心衰状态评价,超声心动图可以观测心脏结构和功能变化, LVEF 能够评估心室收缩功能,判断心衰的严重程度; NT-pro BNP 是临床心衰患者常用的生物标志物,其水平与心衰的严重程度呈正相关。心脏彩超提示,各组小鼠 EF 值均大于 60%,判断心衰模型 HF_pEF。与 MA 组相比, MB 组和 MC 组的射血分数降低明显,心衰程度更重; ELISA 和病理切片提示,与 ZC 组相比,实验组 NT-pro BNP 均大于 450 pg/mL,符合心力衰竭的诊断标准;虽然 MA 组和 MB 组的 NT-pro BNP、TNF-α、IL-6 水平之间无统计学意义,但病理提示 MB 组纤维化程度较轻,推断心肌纤维化程度与炎症反应作用时间有关, MB 组的造模时间较短,尚未形成大面积的纤维化;较 MA 组和 MB 组, MC 组的炎症反应更剧烈,心肌纤维化程度更重。

综合各组情况,发现 MC 组小鼠成模率较高,心脏衰竭程度较 MA、MB 两组更明显。由此推断,以恒定 7.5 mg/(kg·d) 浓度 ISO,连续腹腔注射 28 d 为诱导慢性心衰模型的最优方案。未来仍需进一步改进实验^[23-26]: (1) 样本量少,需进行大样本的实验研究; (2) 组别设置少,仅选取 3 种 ISO 制备方案,存在一定局限性,可将 MC 组的 ISO 剂量增加至 30 mg/kg,进一步探索不同浓度 ISO 对小鼠成模率和死亡率的影响; (3) 没有设计缓释微渗泵在皮下

释放 ISO 的组别。团队未来将继续完善和改进心衰模型的制备方案,为慢性心衰的相关研究以及构建“病证结合”动物模型奠定坚实基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2021》要点解读[J].中国全科医学,2022,25(27):3331-3346.
MA L Y, WANG Z W, FAN J, et al. An essential introduction to the annual report on cardiovascular health and diseases in China (2021) [J]. Chin Gen Pract, 2022, 25(27): 3331-3346.
- [2] 钟森杰,李静,李琳,等.心衰病证动物模型的研究现状述评[J].中国中医急症,2021,30(1):179-181,188.
ZHONG S J, LI J, LI L, et al. Review on the research status of animal model of heart failure syndrome [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2021, 30(1): 179-181, 188.
- [3] 石峰,李文杰.心力衰竭动物实验研究进展[J].中华中医药学刊,2014,32(7):1600-1603.
SHI F, LI W J. Review of heart failure in animal experiment [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(7): 1600-1603.
- [4] 张倩,卫晓红,陈洁,等.慢性心力衰竭常用动物模型的研究进展及其在中医药研究中的应用[J].中国中药杂志,2023,48(3):614-624.
ZHANG Q, WEI X H, CHEN J, et al. Advances in animal models of chronic heart failure and its applications in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(3): 614-624.
- [5] 王晓燕,李七一,严士海.异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型实验研究[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(8):31-34.
WANG X Y, LI Q Y, YAN S H. Establishment of model of isoprenaline-induced chronic heart failure in rats [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2017, 19(8): 31-34.
- [6] 黄淑敏,廖晓倩,范星宇,等.基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用[J].中国中药杂志,2022,47(20):5556-5563.
HUANG S M, LIAO X Q, FAN X Y, et al. Protective effect of Shenfu Injection on rats with chronic heart failure based on HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Chin Mater Med, 2022, 47(20): 5556-5563.
- [7] 刘景艳,朱亮,蔡月琴,等.不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌梗死大模型建立影响的比较研究[J].中国实验动物学报,2020,28(5):651-658.
LIU J Y, ZHU L, CAI Y Q, et al. A comparative study on the effects of different factors on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy model in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 651-658.
- [8] NICHTOVA Z, NOVOTOVA M, KRALOVA E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(2): 141-151.
- [9] WANG X, HUANG T, XIE H. CTRP12 alleviates isoproterenol induced cardiac fibrosis via inhibiting the activation of P38 pathway [J]. Chem Pharm Bull, 2021, 69(2): 178-184.
- [10] 王青,苏聪平,张惠敏,等.芪参颗粒中獐牙菜苷对过量异丙肾上腺素致小鼠心力衰竭的保护作用[J].天津中医药大学学报,2019,38(5):468-472.
WANG Q, SU C P, ZHANG H M, et al. Protective effect of sweroside on heart failure induced by excessive isoproterenol in mice [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2019, 38(5): 468-472.
- [11] 张惠敏,任莹璐,柳金英,等.穿心莲内酯干预异丙肾诱导的心力衰竭小鼠的效应及其机制研究[J].天津中医药大学学报,2018,37(3):221-224.
ZHANG H M, REN Y L, LIU J Y, et al. Pharmacological effects and mechanisms of andrographolide on isoproterenol induced heart failure in mice [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2018, 37(3): 221-224.
- [12] 杨鸣,王达洋,龚媛媛,等.气阴两虚型心衰病证结合小鼠模型的构建与评价[J].中国中医急症,2015,24(12):2076-2078,2092.
YANG M, WANG D Y, GONG A Y, et al. The construction and evaluation of the qi and Yin deficiency pattern of hart failure mouse model [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2015, 24(12): 2076-2078, 2092.
- [13] WAN S, CUI Z, WU L, et al. Ginsenoside Rd promotes omentin secretion in adipose through TBK1-AMPK to improve mitochondrial biogenesis via WNT5A/ Ca^{2+} pathways in heart failure [J]. Redox Biol, 2023, 60: 102610.
- [14] WU D, HU Q, XIONG Y, et al. Novel H_2S -NO hybrid molecule (ZYZ-803) promoted synergistic effects against heart failure [J]. Redox Biol, 2018, 15: 243-252.
- [15] 杜冰玉,尹燕燕,岳昭娣,等.异丙肾上腺素诱导慢性心衰模型的方法优化[J].中国实验动物学报,2023,31(5):583-589.
DU B Y, YIN Y Y, YUE Z D, et al. Method optimization of an isoproterenol-induced chronic heart failure model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 583-589.
- [16] 杨梦,胡思远,李琳,等.基于“以方测证”探讨异丙肾上腺素诱导慢性心衰小鼠模型的中医证型及证候本质[J/OL].中药药理与临床,1-20[2024-01-08].<https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20230920.005>.
YANG M, HU S Y, LI L, et al. Based on the “prescription test” the TCM syndrome types and syndrome nature of a mouse model of isoproterenol-induced chronic heart failure were discussed [J/OL]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 1-20[2024-01-08].<https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20230920.005>.
- [17] 钟森杰,李静,杨梦,等.基于中西医病因特点的射血分数保留性心力衰竭小动物模型建立分析[J].湖南中医药大学学报,2023,43(3):391-399.
ZHONG S J, LI J, YANG M, et al. Modeling the small animal with HFpEF based on etiological characteristics of Chinese and

- western medicine [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2023, 43(3): 391-399.
- [18] 廖晓倩, 黄淑敏, 范星宇, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨参附注射液调控自噬对慢性心力衰竭大鼠的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(21): 5908-5914.
- LIAO X Q, HUANG S M, FAN X Y, et al. Protective effect of Shenfu Injection on regulation of autophagy in rats with chronic heart failure based on PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(21): 5908-5914.
- [19] 王梓仪, 张倩, 郭瑾, 等. 基于铁死亡介导的氧化应激探讨慢性心力衰竭大鼠的发病机制及参附注射液的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(19): 5285-5293.
- WANG Z Y, ZHANG Q, GUO J, et al. Pathogenesis of chronic heart failure in rats based on ferroptosis-mediated oxidative stress and intervention effect of Shenfu injection [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(19): 5285-5293.
- [20] 钟森杰, 熊霞军, 张倩, 等. 主动脉弓缩窄术建立心力衰竭大鼠模型的病理过程观察与非靶向代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 117-124.
- ZHONG S J, XIONG X J, ZHANG Q, et al. Pathological process observation and non-targeted metabolomics analysis of heart failure rat model established by transverse aortic constriction [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(9): 117-124.
- [21] BAUERSACHS J, DE BOER R A, Lindenfeld J, et al. The year in cardiovascular medicine 2021: heart failure and cardiomyopathies [J]. Eur Heart J, 2022, 43(5): 367-376.
- [22] 谭亚芳, 黄昭龙, 祁建勇, 等. 通冠胶囊对气虚血瘀致心衰的保护作用实验研究 [J]. 中国中医急症, 2022, 31(4): 573-575, 587.
- TAN Y F, HUANG Z L, QI J Y, et al. Experimental study on the protective effect of Tongguan capsules on heart failure caused by qi deficiency and blood stasis [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2022, 31(4): 573-575, 587.
- [23] 胡宇驰, 侯家玉. 知母、黄芩对小鼠实验性心肌梗厚及应激反应能力的影响 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 369-374.
- HU Y C, HOU J Y. Effect of Zhimu and Huangqi on cardiac hypertrophy and response to stimulation in mice [J]. Chin J Chin Mater Med, 2003, 28(4): 369-374.
- [24] 张鹤萍, 钱海超, 熊杰, 等. 阿托伐他汀对异丙肾上腺素诱导的心力衰竭小鼠胞浆内钙火花影响的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(16): 1569-1574.
- ZHANG H P, QIAN H C, XIONG J, et al. The effect of atorvastatin on cytoplasmic calcium Sparks in isoproterenol-induced heart failure mice model [J]. J Clin Exp Med, 2017, 16(16): 1569-1574.
- [25] 何芮, 丁畅, 何丽, 等. MiR-1 改善异丙肾上腺素诱导的小鼠心力衰竭 [J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(14): 1357-1364.
- HE R, DING C, HE L, et al. Intravenous delivery of a microRNA-1 agomir improves isoproterenol-induced heart failure in mice [J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(14): 1357-1364.
- [26] ZHOU J, DUAN X, WANG J, et al. Valsartan regulates PI3K/AKT pathways through lncRNA GASL1 to improve isoproterenol-induced heart failure [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 1447399.

[收稿日期] 2023-01-11

王珠环,张尔馨,郑沁薇,等. NLRP3 敲除小鼠溃疡性结肠炎模型的建立与分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 168-176.

WANG Z H, ZHANG E X, ZHENG Q W, et al. Establishment and analysis of NLRP3^{-/-} mouse models of ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 168-176.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.004

NLRP3 敲除小鼠溃疡性结肠炎模型的建立与分析

王珠环¹,张尔馨^{1,2},郑沁薇³,郝微微^{1,3*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院,上海 201203;2. 上海市中医药研究院脾胃病研究所,上海 200032;3. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海 200437)

【摘要】 目的 采用不同浓度 DSS 及给药时间诱导 NLRP3^{-/-} 小鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型,并分析与评价其优劣性,为 UC 发病机制的研究和治疗药物研发提供更贴切临床的动物模型。**方法** SPF 级 48 只雄性 NLRP3^{-/-} 小鼠随机分组,每组 12 只小鼠(空白组、2.5% 7 d 组、3% 7 d 组和 3% 5 d 组),采用不同浓度 DSS 和给药时间相结合诱导 UC 小鼠模型,观察和评价小鼠的体重、DAI 评分、HE 染色、结肠长度及相关指标 (IL-6、TNF- α 和紧密连接蛋白 (ZO-1)) 的表达水平评价造模的效果。**结果** (1)DSS 各小组在不同浓度及给药时间均能诱导 UC 模型;(2)随着浓度梯度增加及给药时间延长,NLRP3^{-/-} 小鼠的体重减轻越显著、粪便潜血呈阳性越明显、DAI 评分越高,甚者出现死亡;(3)经 HE 染色发现,NLRP3^{-/-} 小鼠肠黏膜屏障组织病理损伤随 DSS 给药时间增长或浓度增高而加重;(4)采用免疫组织化学方法检测炎症因子及紧密连接蛋白,相对于空白组、模型组的炎症因子 (TNF- α 及 IL-6) 的表达水平均有所升高,而紧密连接蛋白水平表达 (ZO-1) 较空白组有所降低。**结论** (1) NLRP3^{-/-} 小鼠在 2.5% DSS 7 d、3% DSS 7 d 和 3% DSS 5 d 条件下均可诱导 UC 模型;(2)结合 DAI 评分、HE 染色和相关指标检测以及小鼠生存率,NLRP3^{-/-} 小鼠在 3% DSS 5 d 条件下诱导 UC 模型更贴切 UC 临床表现,更有利于后期药物干预。

【关键词】 溃疡性结肠炎;NLRP3^{-/-} 小鼠;葡聚糖硫酸钠 (DSS);动物模型;建模评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0168-09

Establishment and analysis of NLRP3^{-/-} mouse models of ulcerative colitis

WANG Zhuhuan¹, ZHANG Erxin^{1,2}, ZHENG Qinwei³, HAO Weiwei^{1,3*}

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Spleen and Stomach Disease Research Institute of Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine,
Shanghai 200032, China; 3. Yueyang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital
Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)
Corresponding author: HAO Weiwei. E-mail: hwwwork@163.com

【Abstract】 Objective To induce an NLRP3^{-/-} mouse model of ulcerative colitis (UC) using different concentrations of dextran sulfate sodium (DSS) and different administration times, and to analyze and evaluate the advantages and disadvantages of the preparations to provide a more suitable animal model for the study of UC pathogenesis in humans and the development of therapeutic drugs. **Methods** Forty-eight male NLRP3^{-/-} specific-pathogen-free mice

【基金项目】 国家自然科学基金 (81874450, 81403362), 上海市中医优势病种培育建设项目 (ZY (2018-2020)-ZYBZ-03), 上海市中医诊疗模式创新试点建设项目 (ZY (2018-2020)-FWTX-6028)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81874450, 81403362), Shanghai Traditional Chinese Medicine Advantage Disease Cultivation and Construction Project (ZY (2018-2020)-ZYBZ-03), Shanghai Traditional Chinese Medicine Diagnosis and Treatment Model Innovation Pilot Construction Project (ZY (2018-2020)-FWTX-6028).

【作者简介】 王珠环,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治脾胃病。Email:1532644639@qq.com

【通信作者】 郝微微,女,主任医师,博士,研究方向:中医药防治胃肠病。Email:hwwwork@163.com

were divided randomly into blank, 2.5% 7 d, 3% 7 d, and 3% 5 d groups ($n = 12$ mice per group). UC mouse models were induced using combinations of different concentrations and administration times of DSS. Body weight, DAI (disease activity index) score, hematoxylin and eosin (HE) staining, colon length, and related indicators (interleukin IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and tight junction protein (ZO-1)) were observed and evaluated. **Results** (1) UC membrane type was induced in each group with different concentrations and administration times. (2) Mouse body weight decreased, the fecal occult blood became more positive, the DAI score increased, and more mice died with increasing DSS concentration and administration time. (3) Longer administration time and higher concentration of DSS were also associated with more severe damage to the intestinal mucosa, as shown by HE staining. (4) Immunohistochemistry showed that the inflammatory factors TNF- α and IL-6 were increased in the model group compared with the blank control group, while expression of ZO-1 was decreased compared with the blank group. **Conclusions** (1) Administration of 2.5% or 3% DSS for 7 days or 3% DSS for 5 days can induce UC in NLRP3^{-/-} mice. (2) The combination of DAI score, HE staining, the detection of related indicators, and mouse survival rate indicated that NLRP3^{-/-} mice treated with 3% DSS for 5 days produced the most suitable UC model to study the clinical manifestations and drug treatment of UC.

[Keywords] ulcerative colitis; NLRP3^{-/-} mice; dextran sulfate sodium; animal models; modeling evaluation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 分为克罗恩病 (crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 两种。溃疡性结肠炎是一种慢性、非特异性肠道疾病,易反复发作,其临床特征以腹痛、腹泻、黏液和便血等为主要表现,病程迁延难愈,值得注意的是 UC 具有癌变倾向^[1-8]。尽管 UC 的病因和发病机制尚未明确,目前研究表明,肠道菌群和环境因素在 UC 的疾病发展过程中扮演重要角色,且有基因易感体性倾向,其中肠黏膜屏障的受损占至关重要的地位^[9-11]。免疫系统调节导致的肠道持续性不可控性炎症,影响肠道黏膜屏障的完整性,致使肠黏膜难以康复的溃疡和炎症增生等病理变化。

NLRP3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体主要由 3 部分组成: NLRP3 蛋白、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和 pro-caspase-1 蛋白。越来越多的研究表明 NLRP3 炎症小体异常活化是结肠炎性损伤的重要机制之一, NLRP3/Caspase-1 是参与 UC 炎症反应的信号传导通路, NLRP3 炎症小体活性在维持肠道内环境稳定和调节肠道炎症反应发挥重要作用^[12-13]。根据动物模型研究发现,当小鼠的 NLRP3 表达缺失或沉默时,小鼠表现出对 DSS (dextran sulfate sodium, DSS)/TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution) 更敏感,其肠道屏障完整性更容易被破坏,肠上皮细胞增殖减弱和肠黏膜屏障受损更严重^[14], NLRP3 炎症小体的激活机制在自身免疫性疾病及遗传环境介导的黏膜免疫反应中扮演重要角色^[15-17]。因此,建立精确且真实 NLRP3^{-/-} 小鼠 UC 模型反映人类疾病发生

和发展的动物疾病模型,对于探究该疾病的发病机制、病情进展及评估治疗药物等具有至关重要的作用。

溃疡性结肠炎动物模型的建立方法有很多种,例如化学刺激法、免疫法、复合肥法、基因修饰法等。根据建模分类方式的不同,可将其划分为自发模型、细菌感染模型及中医辨证模型等^[18]。目前 UC 的动物疾病模型建立研究主要采用自由饮用葡聚糖硫酸钠 (DSS) 方法,根据现有研究所述, DSS 诱导建立 UC 模型的发生机制是其在肠道内生成的具有强烈负电荷的硫酸基团,从而破坏肠黏膜屏障完整性、加剧肠上皮通透性,进一步恶化肠道出血的抗凝作用^[19]。DSS 诱导建立溃疡性结肠炎所呈现出来的疾病症状、结肠外部形态学和病理组织学改变均与人类 UC 疾病临床症状较为相似。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究使用动物均为 SPF 级 NLRP3^{-/-} 雄雌性 3 对种鼠, 8 周龄, 体重 20 ± 2 g, 购自上海南方模式生物科技股份有限公司【SCXK (沪) 2019-0002】, 原代小鼠交配成功交配繁殖第 5 代, 分别筛选出 8 周龄纯合子 48 只雄性小鼠, 皆已收集尾巴活检进行基因分型验证。动物实验室屏障内温度控制 $22 \sim 25$ $^{\circ}\text{C}$, 湿度保持在 50%, 每天 12 h 光照明暗交替; 饲养环境内饲料、饮水均符合卫生标准, 垫料、鼠笼、水瓶均定期高压灭菌, 饲养于上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物中心【SYXK (沪) 2018-

0040】。所有研究的实验方案和实验动物均符合对实验动物的公平性、安全性和道德伦理原则等要求,经上海中医药大学附属岳阳动物实验伦理委员会审核通过(YYLAC-2020-081-1)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DSS(相对分子量为:36 000 ~ 50 000,购于美国 MP Bio 公司,由上海益启生物科技有限公司提供,货号:SR01636);粪便隐血试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号 BA-2020B,上海);苏木素-伊红染色(HE)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司;批号 C0105,上海);DEPC 水(Sangon Biotech 公司,批号:D723BA0056,上海);10%中性福尔马林固定液(购于雷根生物公司,批号:DF0111,上海);单克隆抗 TNF- α 和 ZO-1 兔多克隆抗体购自 Proteintech 公司(批号分别为:60291-1-Ig 和 21773-1-AP,上海);白细胞 IL-6 抗体购自 GeneTex 公司(美国)(批号:GTX110527,上海);免疫显色试剂(基因科技(上海)股份有限公司,批号:GK500705,上海)。

TG16W 微型离心机(北京天根生化科技有限公司,中国),5417R 型离心机(Eppendorf,德国),X85-2S 恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司,中国),HERA safe KS12 型超净工作台(Thermo Fisher,美国),IX71/BX53 型显微镜(Olympus,日本),TP1020 自动脱水机(Leica,德国),TEC-2601 摊片机(上海精密仪器仪表有限公司,中国),MX-S 涡旋混匀仪(Scilogex,美国),EG1150H + C 石蜡包埋机(Leica,德国),RM2235 切片机(Leica,德国),SIM-F140 制冰机(SANYO,日本),超低温冰箱(Eppendorf,德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模干预和观察指标

48 只 SPF 级雄性 NLRP3^{-/-}小鼠随机分为空白组、3% 7 d 组、2.5% 7 d 组和 3% 5 d 组,每组 12 只小鼠,实验从 D0 开始给药造模,24 h 后记为 D1,以此类推。空白组小鼠予自由饮水,DSS 各组小鼠予自由饮用相应浓度配液,每日更换新鲜配置的 DSS 溶液,并记录每日剩余水、饲料及各组小鼠体重、粪便性质、皮毛发色和生存情况等。

1.2.2 粪便隐血(OB)检测与 DAI 评分

根据粪便隐血试剂盒说明操作,记录其颜色变化结果。按照参考疾病活动指数(disease activity index,DAI)评分^[20-22]规则改进后进行评分(表 1)。

表 1 疾病活动指数评分(DAI)

Table 1 Evaluation of disease activity index (DAI)			
分数 Score	体重下降/% Weight loss/%	粪便性状 Stool consistency	粪便潜血试验 Fecal occult blood test
0	0	正常粪便 Normal feces	-
1	1 ~ 5		1+
2	6 ~ 10	软烂便 Loose stools	2+
3	11 ~ 15		3+
4	>15	溏薄样便 Diarrhea	4+

注:正常粪便:坚硬、黑褐色及颗粒状;溏薄或稀烂便指欠成形的软便,不黏附肛周;水样或蛋花便指稀糊便,常粘附于肛周。
Note. Normal feces. Hard, dark brown, and granular. Loose or loose stools refer to unformed soft stools that do not adhere to the perianal area. Water like or egg shaped stool refers to loose stool, often adhering to the anal area.

1.2.3 取材和冻存组织

在无菌操作台上取血,处死小鼠后打开其腹腔,剖取肛门至盲肠末端的结肠组织,展开观察结肠形态并测量结肠长度(肛门至盲肠末端的长度),采用免疫组织化学法染色检测的结肠组织中炎症因子及紧密连接蛋白分子表达水平。

1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色

组织病理学改变是将动物结肠组织经 HE 染色后,光学显微镜下观察结肠结构破坏、炎性细胞浸润等情况并进行综合评分,从而评估造模效果。按照使用说明设置脱水程序,将组织切成 4 μm 的切片,行 HE 染色,电子显微镜下观察结肠炎症细胞浸润和肠上皮黏膜屏障受损的情况。

1.2.5 免疫组织化学法染色

采用 SP 两步法检测结肠黏膜 TNF- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 (interleukin-6, IL-6) 和 ZO-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 的表达,具体步骤按试剂盒说明书操作。在细胞核或细胞质中发现棕黄色或褐色颗粒状物,此类群细胞会被视作阳性,并计算各组阳性表达率。

1.3 统计学分析

对所有实验所得数据进行统计分析,采用的分析软件为 SPSS 25.0、Image 和 GraphPad Prism 9.0,所有计量资料均进行正态性及方差齐性检验,以确保数据的质量。若数据符合或近似符合正态分布趋势,则计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间均数比较采用检验(SNK),两样本均数比较则采用两独立样本的 t 检验,针对多组间差异

比较即采用单因素方差分析(ANOVA);若数据不符合正态分布,两组间数据比较采用两独立样本 Wilcoxon 检验,针对多个测量因素和重复采集的数据,可以采用多因素重复测量方差分析来进行统计分析。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验前各组小鼠精神状态及大便性状均良好。造模期间空白组小鼠情况良好,各组小鼠的 DSS 摄入量均达到溃疡性结肠炎成模剂量的最低阈值,DSS 组小鼠呈现渐进性精神萎靡、弓背蜷缩、皮毛易脱落且欠光泽、便质软便或便血等。在造模后期,3% 7 d 组小鼠情况较 2.5% 7 d 组小鼠差,3% 5 d 组小鼠疾病情况较 2.5% 7 d 组稍良好,较 3% 7 d 组第 5 天的 小鼠 UC 整体疾病状态相差不多。

2.2 存活情况

造模结束时,3% 7 d 组小鼠在第 7 天时脱落 1 只,空白组、2.5% 7 d 组及 3% 5 d 组小鼠存活率为 100%。

2.3 体重变化

建模实验期间,空白组小鼠体重持平;DSS 组小鼠前 3 d 体重保持平稳,第 4 天开始各组小鼠体重下降。随造模时间的延长、或 DSS 浓度增加时,3% 7 d 组整体疾病状态较差,体重率下降严重超 20%;2.5% 7 d 组整体症状较 3% 7 d 组小鼠的体重下降率及疾病状态良好,认为具有统计学意义(见图 1)。

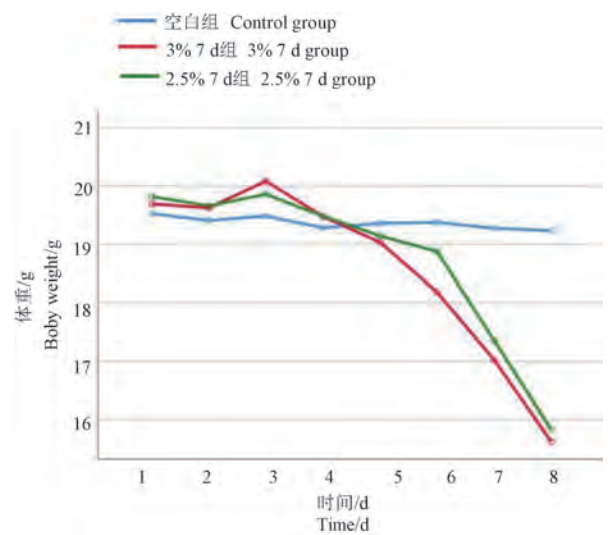


图 1 各组 NLRP3^{-/-}小鼠体重的每日变化比较
Figure 1 Comparison of daily changes in body weight of NLRP3^{-/-} mice in each group

2.4 DAI 指数评分

采用便隐血试剂盒(匹拉米洞半定量检测法)测定潜血情况。实验第 3 天起,3% 7 d 组及 3% 5 d 组小鼠呈现不同程度粪便潜血阳性、大便性状软,2.5% 7 d 组出现 1 只小鼠粪便潜血弱阳性。造模第 5 天和造模第 7 天时 DAI 评分空白组和各 DSS 模型组相比,各 DSS 模型组小鼠 DAI 评分呈上升趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),具有显著性差异(表 2)。

表 2 造模各组 NLRP3^{-/-}小鼠 DAI 评分比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Comparison of DAI scores of NLRP3 ^{-/-} mice in each group of modeling($\bar{x} \pm s, n = 12$)		
组别 Groups	第 5 天 D5	第 7 天 D7
空白组 Control group	0.25 ± 0.39	0.25 ± 0.29
3% 7 d 组 3% 7 d group	3.31 ± 0.30 *	3.89 ± 0.22 *
2.5% 7 d 组 2.5% 7 d group	2.72 ± 0.40 *#	3.81 ± 0.33 *
3% 5 d 组 3% 5 d group	3.00 ± 0.40 *	3.00 ± 0.40 *

注:与空白组相比,* $P < 0.001$;与 3% 5 d 组相比,# $P < 0.05$ 。(下同)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.001$. Compared with the 3% 5 d group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

2.5 结肠长度

结肠长度缩短是溃疡性结肠炎的重要特征。DSS 各组小鼠结肠长度均明显短于空白组($P < 0.001, P < 0.05$),各组结肠长度缩短差异具有统计学意义(见图 2)。

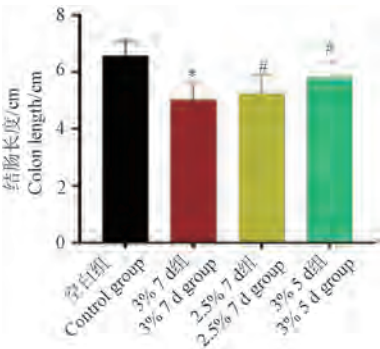


图 2 各组小鼠的结肠长度比较
Figure 2 Comparison of colon length between each model group and the control group

2.6 组织病理学观察结果

结肠组织病理学变化是溃疡性结肠炎模型建立成功的金标准。HE 染色显示:空白组小鼠结肠黏膜屏障及腺体完整、隐窝结构正常,无溃疡、坏

死、炎细胞浸润、黏膜下层水肿等;3% 7 d 组 NLRP3^{-/-}小鼠的结肠黏膜缺损最严重、腺体不完整、隐窝消失、大量炎细胞浸润、黏膜下层水肿、且溃疡面形成呈不可恢复;2.5% 7 d 组较 3% 7 d 组的病理特征较轻,可观察到部分腺体、隐窝及结肠

黏膜完整,但可观察到炎症细胞浸润、黏膜下水肿、部分溃疡面形成;3% 5 d 组 NLRP3^{-/-}小鼠符合 UC 的病理表现,其黏膜屏障受损程度、炎细胞浸润、溃疡面形成等病理介于 3% 7 d 组和 2.5% 7 d 组之间(见图 3)。

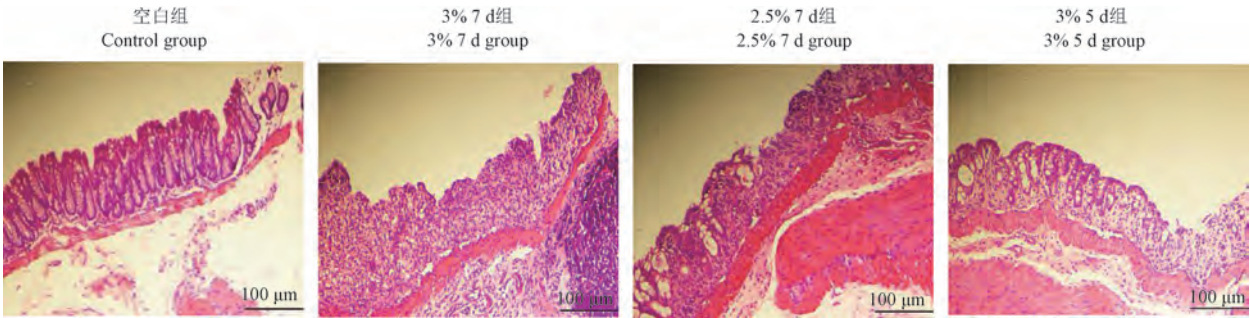


图 3 各组小鼠病理学 HE 染色比较

Figure 3 Comparison of pathological HE staining between each model group and control group

2.7 免疫组织化学法检测相关指标

异常炎症反应信号通路介导的炎性细胞、促炎细胞因子已成为 UC 动物模型造模评价的指标。在 DSS 诱导的 UC 模型中,TNF-α 增多致黏附蛋白和杯状细胞粘蛋白损伤结肠黏膜屏障使溃疡形成,导致肠上皮细胞的凋亡、减缓肠黏膜溃疡的修复、促进 C 反应蛋白的释放加重炎症的程度^[23-25];IL-6 释

放从而促进局部炎症反应,同时 ZO-1 是维持肠黏膜屏障功能的紧密连接蛋白,其相关异常表达均与肠黏膜屏障受损直接相关^[26]。本次实验在 DSS 发生 UC 过程中,相对于空白组,模型组结肠组织中的炎症因子的表达水平均有所升高,而紧密连接蛋白水平表达较空白组有所降低;空白组及各模型组的免疫组织化学的阳性表达率(图 4,图 5)。

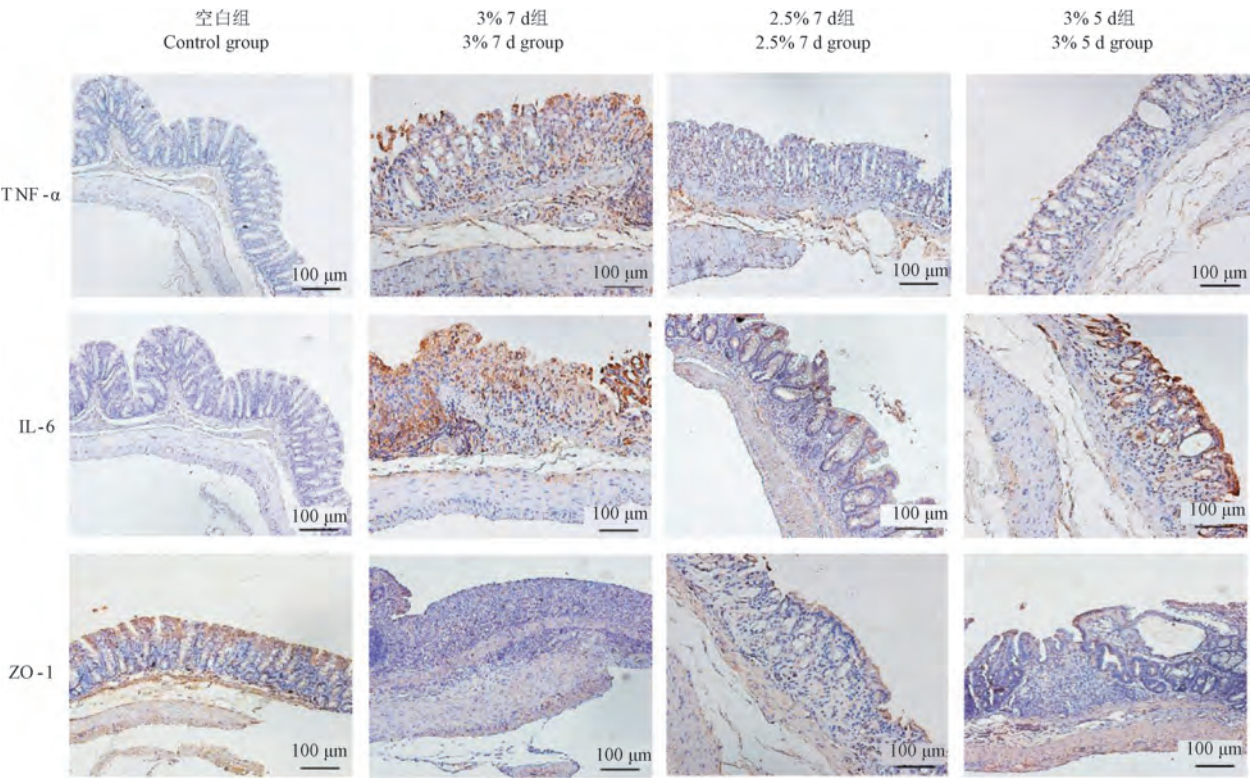


图 4 免疫组织化学法检测结肠组织中 TNF-α、IL-6 和 ZO-1

Figure 4 Immunohistochemical detection of TNF-α, IL-6 and ZO-1 in colon tissue

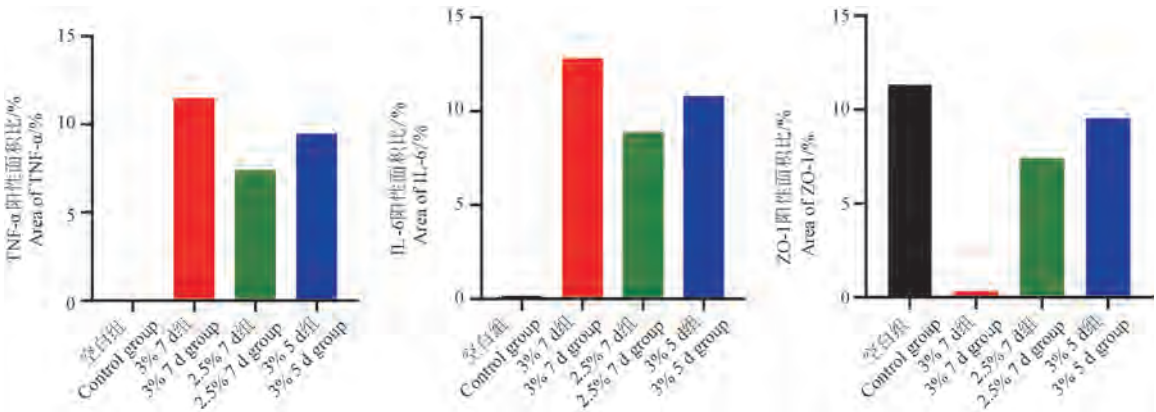


图5 各组结肠组织中(TNF-α、IL-6 和 ZO-1)免疫组织化学的阳性面积表达率

Figure 5 Positive area expression rate of immunohistochemistry (TNF-α、IL-6 和 ZO-1) in each group of colon tissues

3 讨论

3.1 DSS-UC 小鼠模型的建立和评价标准

OHKUSA^[27]于1985年利用DSS建立UC仓鼠模型,其诱导结肠炎症的肠上皮形态损伤和症状类似UC在人体中的表现,其典型特征是结肠发生透壁性坏死和广泛的炎性细胞浸润、溃疡等。在DSS模型中,硫酸化多糖破坏肠上皮细胞损伤和黏膜层,致肠腔内细菌、其他抗原和促炎物质进入黏膜或黏膜下层从而引发炎症反应^[28]。

DAI评分以实验动物的体重、大便秘性状改变及隐血作为指标,在造模前后不同时间段进行评估^[29],而UC疾病模型成功的金标准是结肠病变以黏膜和黏膜下层溃疡和炎细胞浸润程度。上皮屏障的完整性是肠黏膜屏障的重要防线,紧密连接蛋白(tight junction, TJ)是肠黏膜屏障最主要组成部分,结肠黏膜屏障中MUC-2的含量可以作为结肠黏膜完整及修复程度的重要生物蛋白指标。紧密连接蛋白(TJ)主要由:带状闭合蛋白(ZOs)、闭合蛋白(Claudins)、咬合蛋白(Occludin)、连接黏附分子(JAM)等组成^[30-33],其中ZO-1是最早发现与紧密连接相关的蛋白,其表达缺失与肠黏膜屏障受损直接相关^[34]。增加结肠组织MUC-2水平的表达能促进ZO-1、Occludin、Claudin-1分泌,从而促使黏膜屏障的修复,维持肠黏膜屏障的稳态^[35]。UC患者多见肠上皮细胞紧密连接的基因及蛋白表达水平下降,肠上皮黏膜屏障受损,释放大炎症因子,最终加速UC的发生与发展^[36]。

3.2 不同浓度DSS-NLRP3^{-/-}小鼠造模

参考既往文献,小鼠采用自由饮水和灌胃两种模式均能成功诱导UC模型,目前采用DSS诱导UC

模型的浓度主要为3%和5%,多项研究显示DSS浓度对UC模型的成功建立起着决定性的作用^[37-38]。NLRP3^{-/-}小鼠已被证明在DSS诱导的结肠炎模型易诱导炎症和结肠黏膜组织受损,NLRP3^{-/-}小鼠给予DSS 1.5% 7 d和2.5% 7 d皆可成功复制UC模型^[39]。ZAKI等^[40]评估年龄和性别匹配的NLRP3^{-/-}小鼠建立UC模型,在自由饮用浓度为3%及4% DSS后,4% DSS溶液建立的UC模型下的小鼠疾病表现更严重,死亡率更高。既往采用DSS在5% 7 d成功建立不同品系老鼠UC模型基础上^[41-44],曾多批次构建3% 7 d和3% 6 d的NLRP3^{-/-}小鼠UC模型,NLRP3小鼠在造模实验期间或后期药物干预阶段逐渐出现死亡情况,甚者全部死亡,无法实现药物干预,故开展建立不同浓度下NLRP3^{-/-}小鼠稳定UC模型的探索。本研究分别设置2.5% 7 d组和3% 7 d组诱导NLRP3^{-/-}小鼠UC模型,在UC原有评价造模指标基础上增加对炎症因子及紧密连接蛋白表达水平的测定。造模后第3天,3% 7 d组和3% 5 d组小鼠表现出疾病症状,逐渐呈现不同程度的弓背蜷卧、毛发脱落、色泽暗淡、皮肤松软、大便稀软/烂、或肉眼血便,潜血测试即刻呈阳性;2.5% 7 d组小鼠粪便潜血多数呈阳性,但无精神萎靡及肉眼血便。造模后第5天,3% 7 d组、3% 5 d组较2.5% 7 d组NLRP3^{-/-}小鼠呈现出更加典型的UC疾病状态,病理学研究、炎症因子及紧密连接蛋白表达水平也支持此观点。

3.3 不同给药时间DSS NLRP3^{-/-}小鼠造模

在本研究中发现,NLRP3^{-/-}小鼠在DSS 3% 7 d、2.5% 7 d和3% 5 d条件下可诱导UC模型,NLRP3^{-/-}小鼠在3% 7 d条件下,小鼠的整体疾病状态较严重,且出现一例死亡;相较之下,2.5% 7 d组

NLRP3^{-/-}小鼠构建的 UC 比 3% 7 d 组和 3% 5 d 组的 NLRP3^{-/-}小鼠疾病较轻, 3% 5 d DSS 组较于 2.5% 7 d 组和 3% 7 d 组条件下的疾病症状、病理学检测及免疫化学检测所得模型的状态、病理更为接近人类 UC。通过从 DSS 梯度浓度及给药时间的横向及纵向不同方面着手进行多批次实验, 提示 NLRP3^{-/-}小鼠在 3% 5 d 条件下能稳定构建 UC 模型。

3.4 NLRP3^{-/-}小鼠 UC 造模引发的思考

NLRP3 已被证实参与维持肠道稳态和预防结肠炎, NLRP3 敲除后的小鼠更容易出现严重的结肠炎病症。笔者团队前期探索 NLRP3^{-/-}小鼠自由饮用 DSS 溶液构建 UC 模型发现, 2.5% 7 d 和 3% 7 d DSS 溶液建立的 UC 模型小鼠疾病死亡率较 3% 5 d 更高。在后期给药干预治疗时, 小鼠的疾病症状极少得到缓解, 出现极高的死亡率。NLRP3^{-/-}小鼠分别自由饮用 2.5% 7 d、3% 5 d 及 3% 7 d 的 DSS, 每组 10 只。药物干预结束后 2.5% 7 d 组死 3 只、3% 5 d 组死 1 只及 3% 7 d 组死 6 只。结合上述实验结果, 后续采用 NLRP3^{-/-}小鼠 3% 5 d DSS 自由饮用造模, 经后期药物治疗后, 症状得以缓解, 且无小鼠脱落。结合笔者团队既往在 NLRP3^{-/-}小鼠建立 UC 模型的探索, 动物模型的成功构建与临床的病症相符合的基础上, 需要考虑模型的稳定性, 有助于后期药物干预及疾病发病机制的研究, 深入探索疾病发展规律及防治措施, 积极探索更为客观的指标。溃疡性结肠炎的病因机制尚未完全明确, 部分学者先后以不同品系鼠建立 UC 的动物模型, 亦有通过研究遗传学因素发现 UC 模型存在某些基因易感性, 遗传因素的影响占有一定比例, 动物模型并不能完全符合人类复杂的 UC 病症, 为 NLRP3 基因敲除小鼠建立的 UC 模型可为寻找靶点基因进行针对性研究治疗提供参考。DSS 自由饮水的 UC 造模时动物的饮用量无法精确操控可能对造模效果造成的影响值得思考, 进一步调整 DSS 浓度和时间探索建立慢性反复发作的 NLRP3 基因敲除小鼠模型, 这些难题仍值得研究。

综上, 笔者认为 NLRP3^{-/-}小鼠在 3% DSS 溶液 5 d 条件下建立的 UC 模型为最佳, 既可为 NLRP3 炎症小体在 UC 的发生机制及防治提供稳定性模型, 又可在该模型基础上进行相关基因敲除模型的建立探索, 为攻克溃疡性结肠炎贡献力量。

参 考 文 献 (References)

[1] UNGARO R, COLOMBEL J F, LISSOOS T, et al. A treat-to-

target update in ulcerative colitis: a systematic review [J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(6): 874–883.

[2] WANG Y, DING Y, DENG Y, et al. Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis-associated cancer [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(2): e000609.

[3] PORTER R J, KALLA R, HO G T. Ulcerative colitis: recent advances in the understanding of disease pathogenesis [J]. F1000Res, 2020, 9: 1–13.

[4] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6: 74.

[5] 张海明, 梁凤霞, 杨胜兰, 等. 基于 NLRP3 炎症小体探讨中医药防治溃疡性结肠炎的机制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(7): 524–528.

ZHANG H M, LIANG F X, YANG S L, et al. Mechanism of Chinese herbal medicine treatment of ulcerative colitis via nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2021, 29(7): 524–528.

[6] DU L, HA C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2020, 49(4): 643–654.

[7] 李炜, 黄菊芳, 罗茂权, 等. 中西医结合治疗溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. 大众科技, 2021, 23(10): 90–93.

LI W, HUANG J F, LUO M Q, et al. Research progress of integrated traditional Chinese and western medicine in the treatment of ulcerative colitis [J]. Pop Sci Technol, 2021, 23(10): 90–93.

[8] WEI S C, SOLLANO J, HUI Y T, et al. Epidemiology, burden of disease, and unmet needs in the treatment of ulcerative colitis in Asia [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(3): 275–289.

[9] DHUPPAR S, MURUGAIYAN G. miRNA effects on gut homeostasis: therapeutic implications for inflammatory bowel disease [J]. Trends Immunol, 2022, 43(11): 917–931.

[10] ADOLPH T E, ZHANG J. Diet fuelling inflammatory bowel diseases: preclinical and clinical concepts [J]. Gut, 2022, 71(12): 2574–2586.

[11] EVA R, DIRK H. Intestinal epithelial cell metabolism at the interface of microbial dysbiosis and tissue injury [J]. Mucosal Immunol, 2022, 15(4): 595–604.

[12] 刘慧泽, 吴本升, 陈玉根, 等. NLRP3 炎症小体与溃疡性结肠炎及中医药调控的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(34): 3862–3867.

LIU H Z, WU B S, CHEN Y G, et al. Research progress of NLRP3 inflammatory corpuscles and ulcerative colitis and regulation of traditional Chinese medicine [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 30(34): 3862–3867.

[13] 闫曙光, 许小凡, 李倩, 等. 基于 Notch/NF-κB/NLRP3 信号通路的巨噬细胞活化与溃疡性结肠炎的研究进展 [J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(10): 1174–1178.

YAN S G, XU X F, LI Q, et al. Progress in the study of macrophage activation and ulcerative colitis from the Notch/NF-

- KB/NLRP3 signaling pathway [J]. J Central South Univ Med Sci, 2019, 44(10): 1174–1178.
- [14] DUNCAN J A, GAO X, HUANG M T, et al. Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome [J]. J Immunol, 2009, 182(10): 6460–6469.
- [15] ZONG S, YE Z, ZHANG X, et al. Protective effect of Lachnum polysaccharide on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Food Funct, 2020, 11(1): 846–859.
- [16] PU Z, LIU Y, LI C, et al. Using network pharmacology for systematic understanding of geniposide in ameliorating inflammatory responses in colitis through suppression of NLRP3 inflammasome in macrophage by AMPK/Sirt1 dependent signaling [J]. Am J Chin Med, 2020, 48(7): 1693–1713.
- [17] HUANG M, WANG Q, LONG F, et al. Jmjd3 regulates inflammasome activation and aggravates DSS-induced colitis in mice [J]. FASEB J, 2020, 34(3): 4107–4119.
- [18] 何育佩, 杜正彩, 侯小涛, 等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(2): 423–433.
- HE Y P, DU Z C, HOU X T, et al. Research progress of animal models of ulcerative colitis [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2020, 22(2): 423–433.
- [19] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHAPPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. Curr Protoc Immunol, 2014, 104: 15.25.1–15.25.14.
- [20] TIAN M, MA P, ZHANG Y, et al. Ginsenoside Rk3 alleviated DSS-induced ulcerative colitis by protecting colon barrier and inhibiting NLRP3 inflammasome pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85: 106645.
- [21] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238–249.
- [22] EWTRA M, BRENSINGER C M, TOMOV V T, et al. An optimized patient-reported ulcerative colitis disease activity measure derived from the Mayo score and the simple clinical colitis activity index [J]. Inflamm Bowel Dis, 2014, 20(6): 1070–1078.
- [23] ARAKI Y, MUKAISYO K, SUGIHARA H, et al. Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Oncol Rep, 2010, 24(4): 869–874.
- [24] 沈雁, 钟继红, 徐磊, 等. 盐酸小檗碱对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 表达的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(8): 1094–1098.
- SHEN Y, ZHONG J H, XU L, et al. Effects of berberine hydrochloride on the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-10 of colon tissue in mice with ulcerative colitis [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(8): 1094–1098.
- [25] KOSLER S, STRUKELJ B, BERLEC A. Lactic acid bacteria with concomitant IL-17, IL-23 and TNF- α binding ability for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2017, 18(4): 318–326.
- [26] KUO W T, SHEN L, ZUO L, et al. Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression [J]. Gastroenterology, 2019, 157(5): 1323–1337.
- [27] OHKUSA T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora [J]. Jpn J Gastro Enterol, 1985, 82(5): 1327–1336.
- [28] KIESLER P, FUSS I J, STROBER W. Experimental models of inflammatory bowel diseases [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2015, 1(2): 154–170.
- [29] 孙载鑫, 李欣, 武喜健, 等. UC 模型大鼠造模方法建立和探讨 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(12): 1717–1719.
- SUN Z X, LI X, WU X J, et al. Establishment and discussion on modeling method of UC model rats [J]. J Qiqihar Med Univ, 2015, 36(12): 1717–1719.
- [30] 黄晓燕, 王萌, 郑超伟, 等. 基于 MUC-2 及 CXCR-4 变化探讨四君子汤干预溃疡性结肠炎临床研究 [J]. 光明中医, 2019, 34(3): 378–380, 448.
- HUANG X Y, WANG M, ZHENG C W, et al. A clinical research of sijunzi decoction in the intervention of ulcerative colitis based on the change of MUC2 and CXCR-4 [J]. Guangming J Chin Med, 2019, 34(3): 378–380, 448.
- [31] HAMMER A M, MORRIS N L, EARLEY Z M, et al. The first line of defense: the effects of alcohol on post-burn intestinal barrier, immune cells, and microbiome [J]. Alcohol Res, 2015, 37(2): 209–222.
- [32] TURNER J R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(11): 799–809.
- [33] 张冰, 谢晶日, 孙涛. 肠愈宁对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 claudin-1, ZO-1, occludin 蛋白表达的影响 [J]. 中华全科医学, 2021, 19(9): 1447–1450, 1577.
- ZHANG B, XIE J R, SUN T. Effects of Changyuning Decoction on protein expression of claudin-1, ZO-1 and occludin in colonic tissue of rats with ulcerative colitis [J]. Chin J Gen Pract, 2021, 19(9): 1447–1450, 1577.
- [34] BARBOZA JUNIOR M S, SILVA T M, GUERRANT R L, et al. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases [J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32(12): 1499–1504.
- [35] 苏晓兰, 姚梦茜, 陈琳, 等. 清热化湿调枢方对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎模型小鼠肠黏膜屏障及相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63(16): 1566–1572.
- SU X L, YAO M X, CHEN L, et al. Effect of Qingre Huashi Tiaoshu recipe on intestinal mucosal barrier and expression of related proteins in mice with colitis induced by dextran sodium sulfate [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(16): 1566–1572.
- [36] STANGE E F, SCHROEDER B O. Microbiota and mucosal defense in IBD: an update [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(10): 963–976.
- [37] 侯丽萍, 赵红玲, 张雪坤. 米格列醇和阿卡波糖分别联合二

- 甲双胍对老年 2 型糖尿病患者疗效对比 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1): 207-208.
- HOU L P, ZHAO H L, ZHANG X K. Comparison of therapeutic effects of miglitol and acarbose combined with metformin on elderly patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(1): 207-208.
- [38] 赵珊, 王鹏程, 王秋红, 等. 小鼠葡聚糖硫酸钠急性溃疡性结肠炎模型的建立和评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(2): 42-45.
- ZHAO S, WANG P C, WANG Q H, et al. The establishment and evaluation of acute ulcerative colitis in mice induced with DSS [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2016, 18(2): 42-45.
- [39] RUIZ P A, MORÓN B, BECKER H M, et al. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate DSS-induced colitis; role of the NLRP3 inflammasome [J]. Gut, 2017, 66(7): 1216-1224.
- [40] ZAKI M H, BOYD K L, VOGEL P, et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis [J]. Immunity, 2010, 32(3): 379-391.
- [41] 苑致维, 张尔馨, 郑沁薇, 等. 青黛对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 TGF- β /Smad 信号通路相关因子表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 63-67.
- YUAN Z W, ZHANG E X, ZHENG Q W, et al. Effects of indigo naturalis on TGF- β /Smad signaling pathway related factors in colonic tissues of rats with ulcerative colitis [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2022, 29(2): 63-67.
- [42] 郝微微, 温红珠, 马贵同, 等. 人参皂苷 Rg1 对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠凝血功能的调节作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(5): 238-242.
- HAO W W, WEN H Z, MA G T, et al. Ginsenoside-Rg1 regulates blood coagulation in DSS-induced colitis mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2013, 21(5): 238-242.
- [43] 朱世敏, 郝微微, 唐志鹏, 等. 靛玉红对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜细胞因子含量的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(6): 370-372.
- ZHU S M, HAO W W, TANG Z P, et al. Effect of indirubin on cytokines in colonic mucosa of DSS-induced colitis in mice [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2011, 19(6): 370-372.
- [44] 郝微微, 温红珠, 李佳, 等. 靛玉红对溃疡性结肠炎小鼠 CD4CD25Treg 细胞 Foxp3 表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(12): 82-84.
- HAO W W, WEN H Z, LI J, et al. Influence of Indirubin on Foxp3 expression of CD4CD25 regulatory T cells in ulcerative colitis mice [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2011, 45(12): 82-84.

[收稿日期] 2023-07-19

图像引导放射治疗小鼠原位肝癌模型的建立

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上第七大常见癌症, 占原发性肝癌病例的 75% ~ 85%。目前, 由于最近的技术发展, 放射疗法被认为是 HCC 有效的治疗选择。然而, 对于 HCC 的分次方法、分次剂量、放射疗法与其他疗法的组合或治疗时间表, 尚未达成一致, HCC 放疗也没有标准方案。因此, 需要一个稳定的临床前模型来促进相关的临床研究。本研究在小动物治疗前和治疗期间, 采用 X-RADSmART 小动物图像引导放射治疗系统。该系统能够根据器官位置的变化修改治疗条件, 使照射区域与目标区域非常相似, 从而提高治疗的准确性。其益处在于可以使用三维 CT 成像精确评估体内肿瘤的位置、形状和大小。使用这些信息, 可以创建精确的放射治疗计划, 允许 X 射线靶向肿瘤的位置并从各个角度进行照射。总的来说, 这项研究为基于放射治疗的 HCC 综合治疗领域提供了可靠的建模技术。通过注射建立了原位 HCC 小鼠模型, 利用 MRI 技术模拟 HCC 的临床诊断, 进行精确放射治疗以确定肿瘤的位置, 然后用小动物精密 X 射线机结合 CT 勾画和治疗靶区, 并通过治疗后分析肿瘤大小和肿瘤组织内的凋亡来证实治疗的有效性。

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): 419-426. <http://doi.org/10.1002/ame2.12335>)。

杨宗统,徐东川,刘瑾,等. 基于非靶向代谢组学和肠道菌群探究经典名方泻白散对过敏性哮喘大鼠的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 177-189.

YANG Z T, XU D C, LIU J, et al. Protective effect of Xiebaisan on allergic asthma in rats based on non-targeted metabolomics and intestinal bacterial flora [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 177-189.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.005

基于非靶向代谢组学和肠道菌群探究经典名方 泻白散对过敏性哮喘大鼠的保护作用

杨宗统^{1,2}, 徐东川², 刘瑾², 李晓晶², 张会敏², 王雯慧^{1*}, 隋在云^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 山东省中医药研究院中药药理研究所, 济南 250014)

【摘要】 目的 本研究拟从宿主-肠道菌群-代谢的角度探讨泻白散保护过敏性哮喘大鼠可能的微观机制。**方法** 将 SPF 级 SD 大鼠分为正常对照组(NC 组)、过敏性哮喘模型组(M 组)和泻白散组(Xiebaisan 组)。通过卵清白蛋白(OVA)诱导建立大鼠过敏性哮喘模型;HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化;取结肠内容物进行 16S rDNA 高通量测序,观察肠道菌群结构与功能的变化;采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法(UHPLC-Q-TOF/MS)分别进行血清样本和肺组织样本非靶向代谢组学检测。**结果** HE 染色显示:与 NC 组相比,Xiebaisan 组可以在一定程度上改善哮喘大鼠肺部组织形态结构;16S rDNA 高通量测序结果显示:M 组肠道菌群多样性降低,与 M 组相比,Xiebaisan 组肠道菌群多样性增加,肠道微生态得以改善;血清非靶向代谢组学检测结果显示:Xiebaisan 组能够调节氨基酸代谢、mTOR 等通路,且部分回调 M 组引起的差异代谢物表达;肺组织样本非靶向代谢组学检测结果显示,Xiebaisan 组能够调节碳代谢、血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 等信号通路,且部分回调 M 组引起的差异代谢物表达。**结论** 泻白散可能通过改善肺组织形态结构、肠道菌群的多样性以及调控 mTOR 通路、血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 等信号通路影响氨基酸代谢、碳代谢等途径发挥对过敏性哮喘大鼠的保护作用。

【关键词】 泻白散;过敏性哮喘;肠道菌群;非靶向代谢组学;保护机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0177-13

Protective effect of Xiebaisan on allergic asthma in rats based on non-targeted metabolomics and intestinal bacterial flora

YANG Zongtong^{1,2}, XU Dongchuan², LIU Jin², LI Xiaojing², ZHANG Huimin², WANG Wenhui^{1*}, SUI Zaiyun^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Corresponding author: WANG Wenhui. E-mail: wwh777@126.com; SUI Zaiyun. E-mail: zy_505@163.com

【基金项目】 山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1301), 山东省中医药科技项目(2021Q126), 山东省重点研发计划(2016GSF202013), 齐鲁医派中医学学术流派传承项目。

Funded by the Major Science and Technology Innovation Project in Shandong Province (2018CXGC1301), Shandong Province Traditional Chinese Medicine Technology Project (2021Q126), Key R&D Plan of Shandong Province (2016GSF202013), Qilu School of Traditional Chinese Medicine Academic School Inheritance Project.

【作者简介】 杨宗统,男,在读博士研究生,助理研究员,研究方向:中药免疫药理及药效学研究。Email:YangZT2021@163.com

【通信作者】 王雯慧,教授,博士生导师,研究方向:动物黏膜免疫学、黏膜免疫病理学与动物疾病病理学。

Email:wwh777@126.com;

隋在云,研究员,硕士生导师,研究方向:中药及其有效成分作用机制及安全性评价研究。

Email:zy_505@163.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To explore the possible mechanism of Xiebaian in protecting against allergic asthma in rats from the perspective of host intestinal flora metabolism. **Methods** SPF SD rats were divided into normal group (NC group), model group (M group), and Xiebaian group. The allergic asthma rat model was established by ovalbumin. Changes in lung histopathology were observed by HE staining. Colon contents were harvested for 16S rDNA high-throughput sequencing to assess changes in the intestinal flora structure and function. Serum and lung tissue samples were collected for non-targeted metabolomics by Ultra-high performance liquid-time-of-flight mass spectrometer. **Results** HE staining showed some improvement of lung histomorphology in asthmatic rats in the Xiebaian group compared with that in the M group. 16S rDNA high-throughput sequencing showed that the diversity of intestinal flora was decreased in the M group and increased in the Xiebaian group compared with the M group, the microecosystem of intestinal was improved. Non-targeted metabolomics of serum showed regulation of amino acid metabolism and the mTOR pathway in the Xiebaian group, and partially reversed differential metabolite expression in the M group. Non-targeted metabonomics of lung tissue samples showed regulation of carbon metabolism, vascular smooth muscle and cAMP signaling pathways in the Xiebaian group, and partially reversed differential metabolite expression in the M group. **Conclusions** The protective effects of Xiebaian on allergic asthma in rats may be related to improvement of the morphological structure of lung tissue, the diversity of intestinal flora, and regulation of mTOR, vascular smooth muscle contraction, and cAMP pathways, which affect amino acid and carbon metabolism.

[Keywords] Xiebaian; allergic asthma; intestinal bacterial flora; non-targeted metabolomics; protective mechanisms

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

当前社会随着人们生活质量的改善,环境的清洁程度也有了大幅度的提升,过于清洁的环境,导致人们的免疫能力得不到应有的锻炼,因此过敏性疾病的发病率也随之提高,过敏性哮喘尤为明显。过敏性哮喘是哮喘中最常见的一种类型,是由 Th2 淋巴细胞和固有淋巴样细胞介导的慢性气道炎症,机体发病时产生 IL-4、IL-5 和 IL-13 等 II 型细胞因子^[1-2],是典型的 II 型炎症反应,主要特征为气道高反应性、气道重塑、大量嗜酸性粒细胞浸润和杯状细胞粘液分泌增加^[3-4]。

泻白散出自于宋代名医钱乙所著的《小儿药证直诀》,组方为:桑白皮、地骨皮、甘草、粳米,煎七分,食前服;据原书记载,既可治疗肺实热证,也可治疗肺虚热证;2018 年国家中医药管理局公布了中药经典名方目录,泻白散名列其中^[5-7]。泻白散在临床诊疗中常用于感染性咳嗽、哮喘等气道疾病,目前在过敏性哮喘治疗中也常有使用,但其具体的保护作用机制并不清楚。

肠道菌群是定植于人体肠道的正常微生物,与机体具有共生关系,种类丰富、数量多。有证据表明,超过 50 种疾病与肠道菌群失调有关,例如许多传染病、过敏性疾病、胃肠道恶性肿瘤、肝病和代谢紊乱等^[8]。传统中药由于给药方式多为口服,因此其发挥作用是否与调节肠道菌群相关,也是目前中药研究讨论的热点^[9]。代谢组学是新兴的组学技

术之一,对于已定性、定量的代谢物通过生物信息学分析可得出显著差异性代谢产物及其参与的生物学过程,这对疾病的发生发展机制的探究以及药物的作用机制阐述奠定了坚实基础。本研究应用非靶向代谢组学和肠道菌群分析从宿主-肠道菌群-代谢的角度探究泻白散对过敏性哮喘大鼠模型的保护作用机制,为泻白散治疗哮喘的临床应用提供实验数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,160 ~ 200 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养期间各组大鼠自由饮食饮水,每 12 h 明暗交替,湿度控制在 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25 ℃,饲养于山东省食品药品检验研究院动物实验室【SYXK(鲁)2018-0013】。所有涉及动物的实验程序均经山东省中医药研究院实验动物福利与伦理委员会批准(SDZYY20181201005)。

1.1.2 药物

泻白散药物:桑白皮购自亳州京皖饮片有限公司,产品批号:190901,产自亳州;地骨皮购自浙江中医药大学饮片厂,产品批号:191101,产自甘肃;甘草

购自四川中药饮片厂,产品批号:190704,产自新疆。所需药材均由山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定为正品。

1.1.3 主要试剂与仪器

氢氧化铝凝胶(40 mg/mL)购自美国 Thermo 公司,批号:UJ289214;卵清白蛋白购自美国 Sigma 公司,批号:1003004472。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Sparkjade, EC0001);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(Sparkjade, EE0012);Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs, M0531S);Phusion® High-Fidelity DNA polymerase(New England Biolabs, M0530S);DNA 纯化回收试剂盒(TianGen, DP214);建库试剂盒(Illumina, E7370L);乙腈(Fisher Chemical, 4L A955-4);乙酸铵(Fluka, 17836-50G);甲醇(Fisher Chemical, 4L A452-4);氨水(Sigma, 221228-500ML)。

高速冷冻离心机(VELOCITY 18R;Dynamica, 德国);微孔板分光光度计(EPOCH;BioTek, 美国);电子天平(BSA224S-C;W Sartorius, 德国);封闭式自动组织脱水机(Excelsior AS;ThermoFisher Scientific, 美国);组织包埋机(HistoStar;ThermoFisher Scientific, 美国);轮转式切片机(531CM-Y43;Leica, 德国);Bio-rad T100 梯度 PCR 仪(T100;Bio-Rad, 美国);基因测序仪(Novaseq 6000;Illumina, 美国);液-质联用仪 Agilent 1290 Infinity LC/AB Triple TOF 6600;Agilent/AB SCIEX, 美国);色谱柱(ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm ; Waters, 美国) 2.1 mm $\times$ 100 mm。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及给药

30 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周之后,按体重随机均等分为正常对照组(NC 组)、过敏性哮喘(Bronchial asthma)模型组(M 组)和泻白散组(Xiebaisan 组)。M 组和 Xiebaisan 组大鼠在适应性饲养 1 周后于第 7 天和第 14 天均腹腔注射药液 1 mL(OVA 1 mg + 氢氧化铝凝胶 10 mg),NC 组注射生理盐水。从第 21 天开始每天喷雾 1% OVA,连续喷雾激发 2 周,每次 30 min,NC 组喷雾生理盐水。从雾化期开始时(第 21 天)给药,参考本课题组前期实验,泻白散用药剂量为 11.3 g/kg。雾化前 30 min, Xiebaisan 组大鼠灌胃给予泻白散,NC 组和 M 组灌胃给予生理盐水。

1.2.2 泻白散水提物的制备

称取泻白散各单味药饮片:炒桑白皮(30 g)、地骨皮(30 g)、炒甘草(3 g),加入 10 倍量水,浸泡 1 h,加热回流提取 1 h,滤过,再加 8 倍量水加热回流提取 1 h,滤过,合并两次滤液,浓缩至 2 g/mL(1 mL 含 2 g 原药材)。

1.2.3 样本采集及处理

所有大鼠在第 36 天取材,麻醉前 12 h 禁食不禁水,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,麻醉后剖开腹部,充分暴露腹主动脉,取血 5 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 3000 r/min 离心 10 min,取上清液置于液氮中保存。取左肺上叶置于 4%的多聚甲醛中固定,右肺上叶置冻存管中冻存于液氮中,备用。取肠道内容物:用无菌解剖刀,在无菌状态下取出整个肠道;在无菌操作台内切取结肠部位,用无菌手术刀挖取内容物,立即放在冰上进行分装并标记;分装好后立即进行液氮速冻,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 肺组织形态学观察

将固定充分的左肺上叶进行常规脱水、包埋、切片,HE 染色后于显微镜下观察。

1.2.5 肠道内容物 16S rDNA 扩增子测序

采用 CTAB 方法从结肠内容物中提取总 DNA,并对 DNA 的纯度和浓度进行检测。通过 16S rDNA 扩增子测序(16S rDNA amplicon sequencing)方法,检测各组大鼠肠道菌群变化情况,实验方法参考前期研究基础处理^[10]。

1.2.6 UHPLC-Q-TOF/MS 血清和肺组织样本非靶向代谢组学分析

采用 UHPLC-Q-TOF/MS 技术对血清和肺组织样本分别进行代谢物提取、质谱分析和数据处理,实验方法参考前期研究基础处理^[10]。

1.3 统计学分析

所有数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别大鼠肺组织病理变化

各组大鼠肺组织 HE 染色结果如图 1 所示,NC 组大鼠支气管及肺泡结构完整,肺内支气管为单层纤毛柱状上皮结构,肺泡腔呈空泡状薄壁结构,肺泡间隔正常,炎症细胞浸润少见;M 组大鼠可见明

显的肺泡塌陷,间隔增宽,部分肺泡扩张,肺泡间实变区较正常肺泡间隔面积明显扩大,支气管腔狭窄,粘膜上皮中杯状细胞增多,且支气管周围出现大量的炎性细胞浸润;与 M 组相比,Xiebaisan 组大鼠支气管有少量炎症细胞浸润,管腔内分泌物很少,肺泡间隔较 M 组明显减小。说明 Xiebaisan 组可以在一定程度改善哮喘大鼠肺部组织形态结构。

2.2 不同组别大鼠肠道菌群多样性分析

通过 16S rDNA 测序方法对各个组别收获的肠道内容物进行菌群多样性分析。本次实验各组间 PcoA 分析(图 2A)显示 M 组与 NC 组和 Xiebaisan 组在主坐标 1(PC1)上相距较远(图 2B),说明 M 组与 NC 组和 Xiebaisan 组间菌群组成有较大差异。另外对各组数据进行 Alpha 多样性分析,绘制大鼠肠道菌群的 Shannon 指数(图 2C)和 Chao1 指数(图 2D)箱线图,显示出 M 组 Shannon 指数和 Chao1 指数均显著降低($P < 0.001$),且 Xiebaisan 组与 M 组相比,菌群多样性指标 Shannon 指数和 Chao1 指数均有所回调,表明 M 组降低肠道菌群多样性,泻白散能改善 M 组肠道菌群多样性。属水平菌群 STAMP 差异分析(图 2E,2F)表明 M 组增加了 *g_Romboutsia* 和 *g_Candidatus Saccharimonas* 丰度,降低了 *g_Hgcclade* 菌、*g_Peptococcus*、*g_Achromobacter*

的丰度,Xiebaisan 组能够显著降低 *g_Romboutsia* 丰度,上调 *g_Collinsella*、*g_Jeotgalicoccus*、*g_Altererythrobacter*、*g_Spirochaeta*2 等的丰度。

2.3 不同组别大鼠血清样本非靶向代谢组学分析

本次实验 UHPLC-Q-TOF/MS 的 QC 样本相关性(皮尔森)均高于 0.9(图 3A,3B)。质量控制实验表明,本次实验的仪器分析系统稳定性较好,可用于后续分析。

本次大鼠血清样本非靶向代谢组学正离子(Pos)模式下鉴定出代谢物 609 种,负离子(Neg)模式下鉴定出代谢物 384 种。本次实验 PCA 分析结果(图 3C,3D)表明正、负离子模式下,NC 组、M 组和 Xiebaisan 组代谢特征是能够进行区分,且各自组内样本无明显离散点,组内平行性好。对 M 组与 NC 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析(图 3E,3F),模型评价指标 Q^2 分别为 0.894 和 0.827;对 Xiebaisan 组与 M 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析(图 3G,3H),模型评价指标 Q^2 分别为 0.883 和 0.894,表明 OPLS-DA 分析模型较好,可用于后续分析。结合统计学 T-Test 筛选的 P 值和多维统计学 OPLS-DA 分析得到的 VIP 值,以 $P < 0.05$,VIP > 1 作为显著性差异代谢物筛选的标准。M 组与 NC 组显著差异代谢物共有 175 种(Pos 150 种,Neg 25 种),

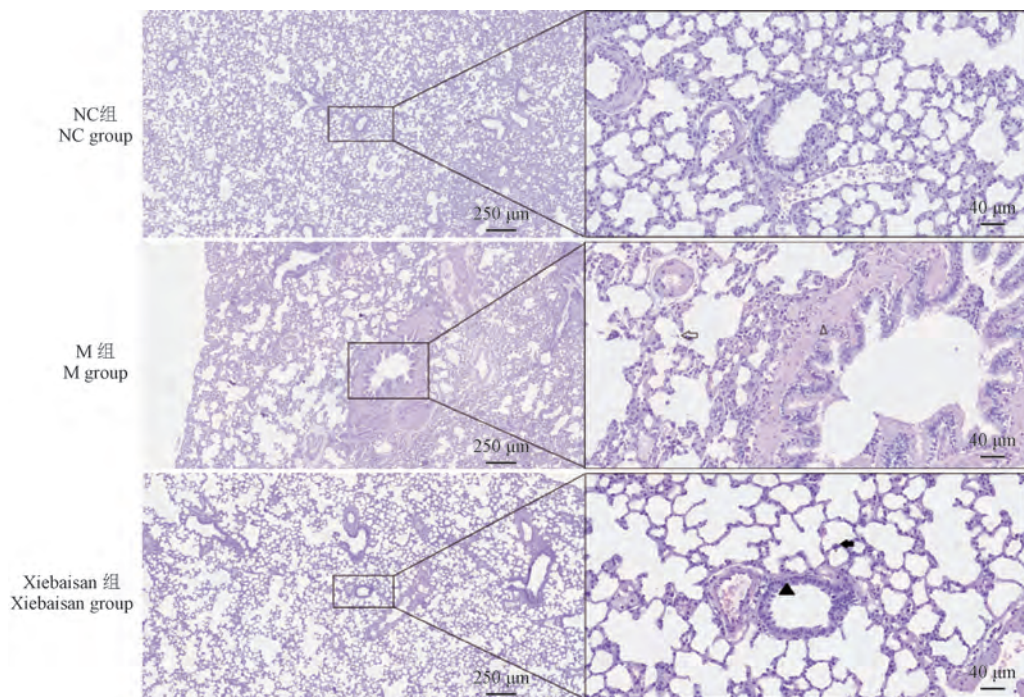
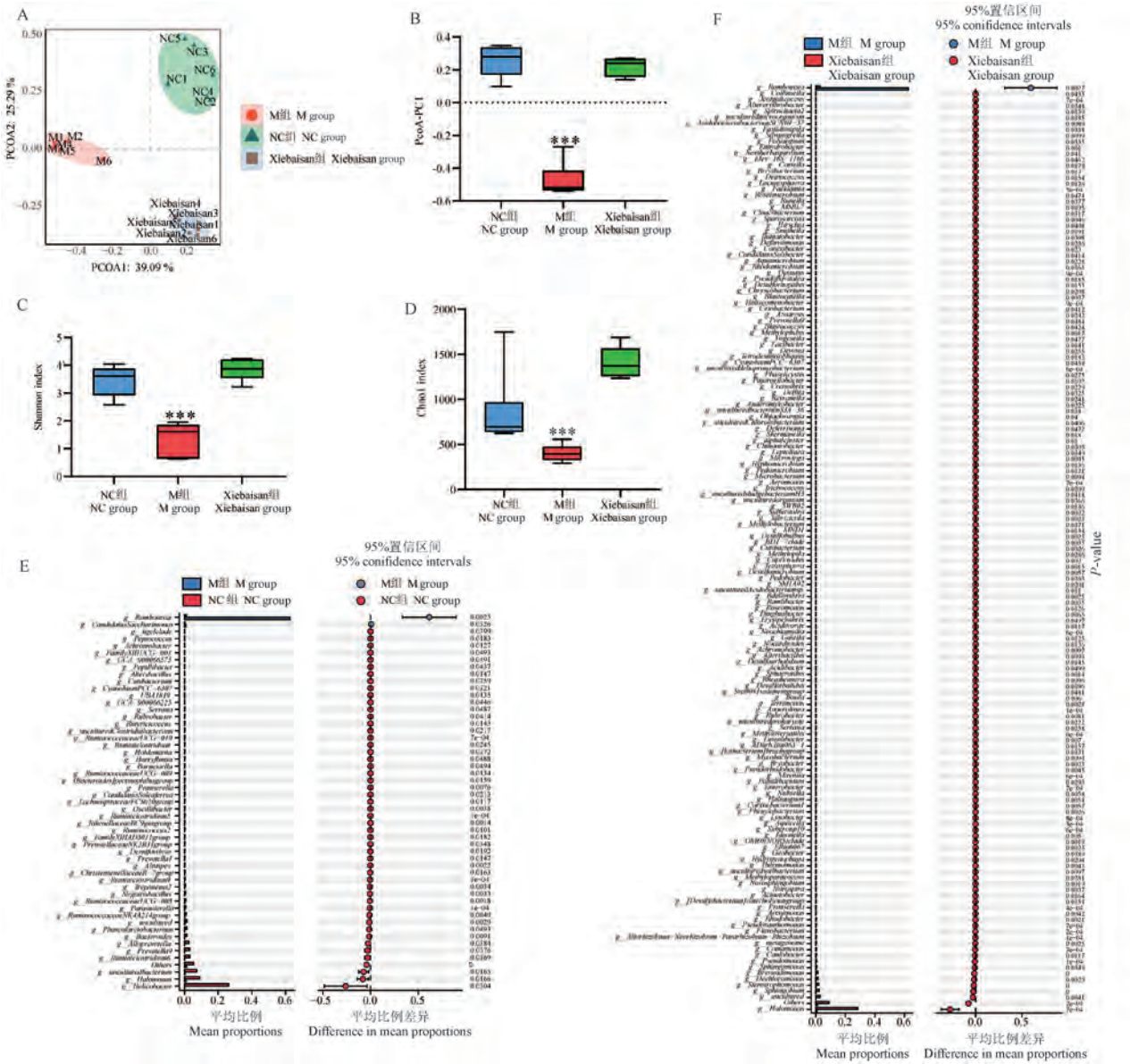


图 1 不同组大鼠肺组织病理学

Figure 1 Pathology of lung tissue of rats in different groups



注:A:每组样本的PcoA分析;B:PcoA中的PC1分析;C:Shannon指数分析;D:Chao1指数分析;E:M组与NC组STAMP差异分析;F:Xiebaisan组与M组STAMP差异分析;与M组相比,*** $P < 0.001$ 。

图2 大鼠肠道菌群的多样性($\bar{x} \pm s, n = 6$)

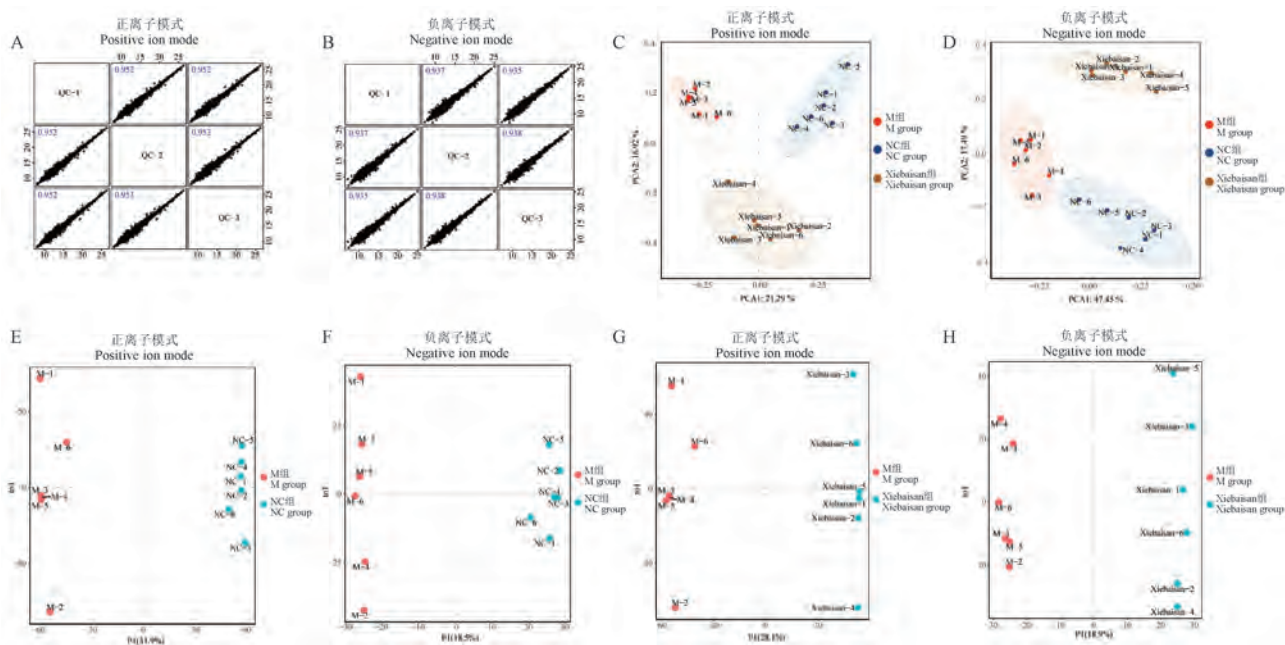
Note. A. PcoA analysis of samples in each group. B. PC1 analysis in PcoA. C. Shannon index analysis. D. Chao1 index analysis. E. Analysis of STAMP difference between M group and NC group. F. Analysis of STAMP difference between Xiebaisan group and M group. Compared with M group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Diversity of intestinal flora in rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表1为筛选出的大鼠血清样本M组与NC组显著差异代谢物排名前10的代谢物列表。Xiebaisan组与M组显著差异代谢物共有180种(Pos有154种,Neg有26种),表2为大鼠血清样本Xiebaisan组与M组显著差异代谢物排名前10的代谢物。

对鉴定到的代谢物进行KEGG通路富集分析,结果显示:M组与NC组显著差异代谢物KEGG功能富集主要在蛋白质消化与吸收、碳代谢、氨基酸

的生物合成、氨酰基转运RNA生物合成、ABC转运体等信号通路(图4A)。Xiebaisan组与M组显著差异代谢物KEGG功能富集主要在蛋白质消化与吸收、ABC转运体、氨基酸的生物合成、氨酰基转运RNA生物合成、矿物质吸收等信号通路(图4B)。其中在蛋白质消化与吸收通路中,发现两个比较组在该通路共有8个显著差异代谢物,对这8个代谢的表达量分析(图4C),结果显示泻白散能够逆转



注:A,B:正、负离子模式下血清 QC 样品的相关性分析;C,D:正、负离子模式下血清样品 PCA 分析;E,F:正、负离子模式下 M 组和 NC 组血清样品的 OPLS-DA 分析;G,H:正、负离子模式下 M 组和 Xiebaian 组血清样本的 OPLS-DA 分析。

图 3 血清样品的非靶向代谢组学

Note. A, B. Correlation analysis of serum QC samples in positive and negative ion mode. C, D. PCA analysis of all serum samples in positive and negative ion mode. E, F. OPLS-DA analysis of serum samples in M group and NC group in positive and negative ion mode. G, H. OPLS-DA analysis of serum samples in M group and Xiebaian group in positive and negative ion mode.

Figure 3 Non targeted metabolomics of serum samples

表 1 M 组与 NC 组血清样本中差异显著的代谢物 (Top10)

Table 1 Metabolites with significant difference in serum samples from M group and NC group (Top10)

序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时间/s RT/s	代谢物编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	L-赖氨酸 L-lysine	1.544	7.904	0.004	147.113	433.004	C00047	[M + H] ⁺
2	氨基丁酸 Aminobutyric acid	9.783	7.163	0.008	104.071	393.451	C00334	[M + H] ⁺
3	磷酸肌酸 Phosphocreatine	1.347	5.589	0.010	212.043	394.914	C02305	[M + H] ⁺
4	O-琥珀酰-L-高丝氨酸 O-succinyl-L-homoserine	1.625	3.199	0.000	202.086	279.567	C01118	[M + H-H ₂ O] ⁺
5	琥珀酰胆碱 Succinylcholine	2.384	2.823	0.001	144.982	191.255	C07546	[M] ⁺
6	DL-苯丙氨酸 DL-phenylalanine	1.953	0.233	0.048	166.086	291.596	C00079	[M + H] ⁺
7	菲啶 Phenanthridine	1.826	0.290	0.000	180.099	337.572	C06975	[M + H] ⁺
8	高水苏碱 Homostachydrine	12.526	0.313	0.000	158.118	337.606	C08283	[M + H] ⁺
9	葫芦巴碱 Trigonelline	11.883	0.402	0.000	138.055	350.976	C01004	[M + H] ⁺
10	亚胺唑 Imibenconazole	4.744	0.418	0.002	125.000	264.829	C18468	[M + H-C ₁₀ H ₈ C ₁₂ N ₄ S] ⁺

注:倍数变化:代谢物的变化次数,大于 1 表示上调,小于 1 表示下调;P 值:代谢产物的统计分析值, $P < 0.05$ 为显著差异代谢产物。(下表同)
Note. Fold change. Change times of metabolites in comparison group, more than 1 indicates up regulation, less than 1 indicates down regulation. P value. Statistical analysis value of metabolites in comparison group, $P < 0.05$ is a significant difference metabolite. (The same in the following tables)

表 2 Xiebaisan 组与 M 组血清样本差异显著的代谢物 (Top10)

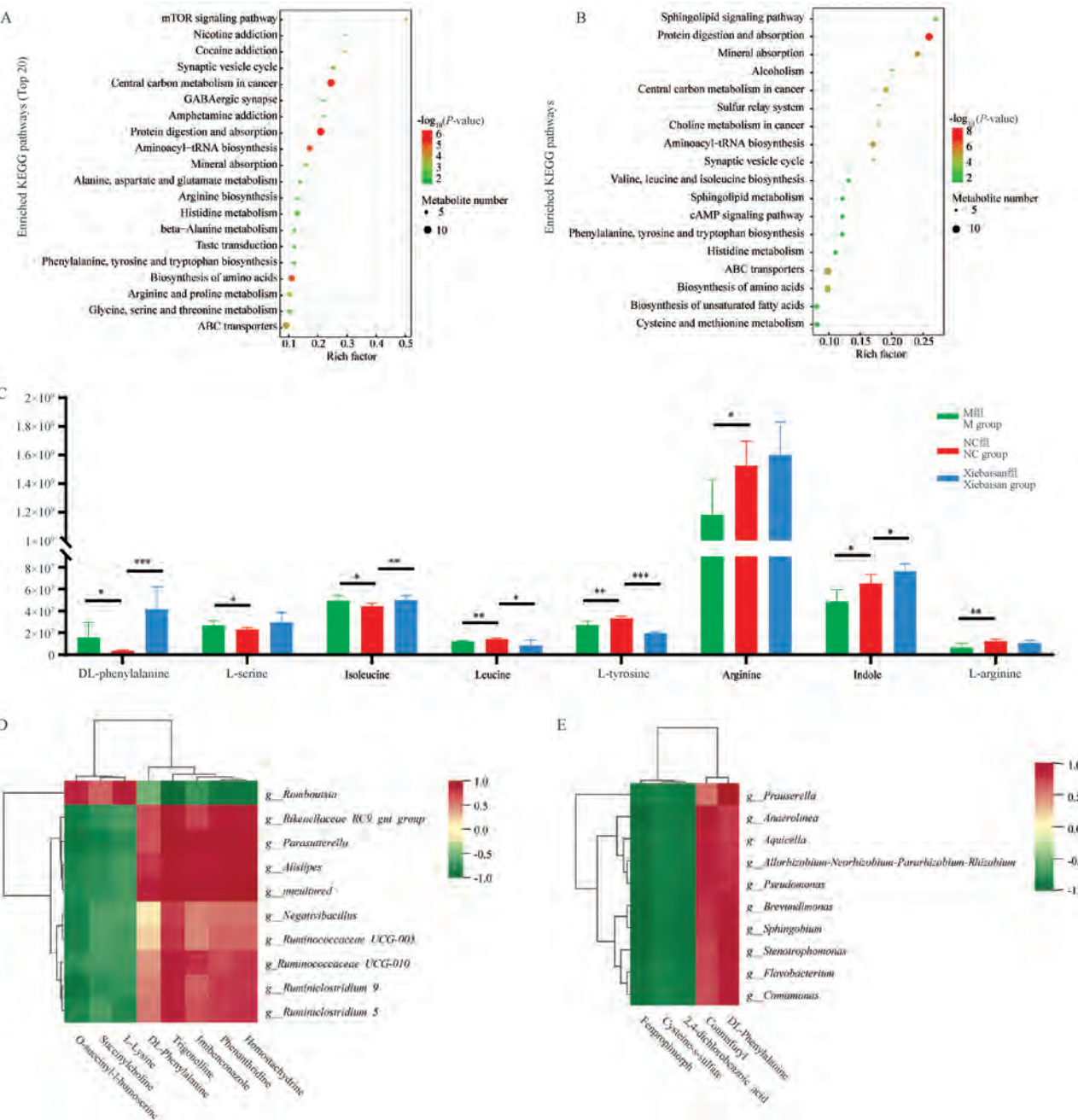
Table 2 Metabolite with significant difference in serum samples between Xiebaisan group and M group (Top10)								
序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时 间/s RT/s	代谢物 编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	DL-苯丙氨酸 DL-phenylalanine	4.319	11.171	0.001	166.086	291.596	C00079	[M + H] +
2	托品碱 Tropine	1.280	5.186	0.002	142.123	486.404	C00729	[M + H] +
3	异戊乙净 Dimethametryn	1.902	4.581	0.026	256.170	57.118	C18537	[M + H] +
4	克鼠灵 Coumafuryl	1.639	3.821	0.021	137.071	166.796	C18599	[M + H - C ₉ H ₆ O ₃] +
5	顺-4-羟基-D-脯氨酸 Cis-4-hydroxy-D-proline	1.477	3.670	0.026	114.055	376.091	C03440	[M + H - H ₂ O] +
6	L-赖氨酸 L-lysine	1.706	0.094	0.003	147.113	433.004	C00047	[] M + H] +
7	半胱氨酸-S-硫酸盐 Cysteine-S-sulfate	1.601	0.111	0.000	199.977	41.640	C05824	[M-H] -
8	右泛醇 Dexpanthenol	1.203	0.217	0.002	206.139	162.209	C05944	[M + H] +
9	丁苯吗啉 Fenpropimorph	1.679	0.244	0.000	304.284	236.319	C18787	[M + H] +
10	2,4-二氯苯甲酸 2,4-dichlorobenzoic acid	1.487	0.245	0.000	188.950	57.874	C06670	[M-H] -

6 个显著差异代谢物的表达。

对血液代谢组差异代谢物 (Top10) 和前述差异菌群 (Top10) 做皮尔森相关性分析 (相关性阈值 0.8, $P = 0.05$) 发现, 在 M 组和 NC 组中 (图 4D), *g_Romboutsia* 与血液代谢物 L-赖氨酸、琥珀酰胆碱、O-琥珀酰-L-高丝氨酸呈正相关, 与血液代谢物高水苏碱、菲啶、亚胺唑、葫芦巴碱、DL-苯丙氨酸呈负相关; *g_Rikenellaceae RC9 gut group*、*g_Parasutterella*、*g_Alistipes*、*g_uncultured*、*g_Ruminococcaceae UCG-010*、*g_Ruminiclostridium 9*、*g_Ruminiclostridium5* 与血液代谢物高水苏碱、菲啶、亚胺唑、葫芦巴碱、DL-苯丙氨酸呈正相关, 与血液代谢物 L-赖氨酸、琥珀酰胆碱、O-琥珀酰-L-高丝氨酸呈负相关; *g_Negativibacillus*、*g_Ruminococcaceae UCG-005* 与血液代谢物高水苏碱、菲啶、亚胺唑、葫芦巴碱呈正相关, 与血液代谢物 L-赖氨酸、琥珀酰胆碱、O-琥珀酰-L-高丝氨酸呈负相关。在 Xiebaisan 组和 M 组中 (图 4E), *g_Prauserella*、*g_Anaerolinea*、*g_Aquicella*、*g_Allorhizobium-Neorhizobium-Rhizobium*、*g_Pseudomonas*、*g_Brevundimonas*、*g_Sphingobium*、*g_Stenotrophomonas*、*g_Flavobacterium*、*g_Comamonas* 与血液代谢物 DL-苯丙氨酸、香豆素类呈正相关, 与血液代谢物 2,4-二氯苯甲酸、S-磺基-L-半胱氨酸、丁苯吗啉呈负相关。

2.4 不同组别大鼠肺组织样本非靶向代谢组学分析

同血清样本非靶向代谢分析, 大鼠肺组织样本非靶向代谢组学的 QC 样本相关性 (皮尔森) 均高于 0.9 (图 5A, 5B)。质量控制实验表明, 本次实验的仪器分析系统稳定性较好, 可用于后续分析。肺组织样本非靶向代谢组学正离子 (Pos) 模式下鉴定出代谢物 881 种, 负离子 (Neg) 模式下鉴定出代谢物 872 种。本次实验 PCA 分析结果 (图 5C, 5D) 表明正、负离子模式下, NC 组、M 组和 Xiebaisan 组代谢特征是能够进行区分, 且各自组内样本无明显离散点组内平行性好。对 M 组与 NC 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析 (图 5E, 5F), 模型评价指标 Q² 分别为 0.991 和 0.993; 对 Xiebaisan 组与 M 组正、负离子模式下检出的代谢物分别进行 OPLS-DA 分析 (图 5G, 5H), 模型评价指标 Q² 分别为 0.779 和 0.552, 表明 OPLS-DA 分析模型可用于后续分析。同血清样本非靶向代谢组, 以 $P < 0.05$, VIP > 1 作为显著性差异代谢物筛选的标准。M 组与 NC 组显著差异代谢物共有 348 种 (Pos 有 146 种, Neg 有 202 种), 表 3 为大鼠肺组织样本 M 组与 NC 组显著差异代谢物排名前 10 的代谢物列表。Xiebaisan 组与 M 组显著差异代谢物共有 93 种 (Pos 有 49 种, Neg 有 44 种), 表 4 为大鼠肺



注:A,B;M组与NC组、Xiebaishan组与M组血清样品差异代谢产物KEGG途径富集分析;C:M组与NC组、Xiebaishan组与M组的血清样品在蛋白质消化和吸收途径中相同差异代谢产物表达量分析;D,E:分别为M组与NC组、Xiebaishan组与M组差异菌群与血清差异代谢物相关性分析;与M组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下同)

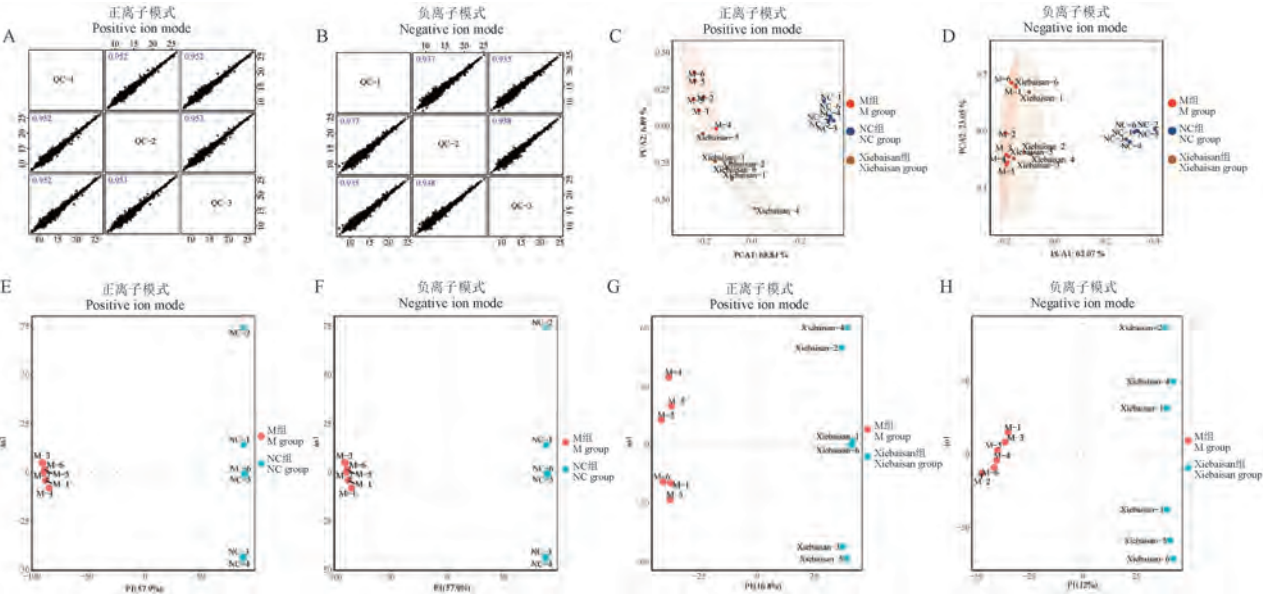
图4 血清样品中非靶向代谢组差异代谢产物的功能富集分析、表达分析、与差异菌群的相关性分析

Note. A, B. Enrichment analysis of KEGG pathway of differential metabolite in serum samples from M group vs NC group, xiebaishan group vs M group. C. The serum samples of M group vs NC group and Xiebaishan group vs M group have the same differential metabolite expression in protein digestion and absorption pathway. D, E. Correlation analysis between M group vs NC group, Xiebaishan group vs M group in differential genera and blood differential metabolite. Compared with M group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Functional enrichment analysis, expression analysis and differential genera of non targeted metabonomic differential metabolites in serum samples

组织样本 Xiebaishan 组与 M 组显著差异代谢物排名前 10 的代谢物列表。

对鉴定到的代谢物进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示: M 组与 NC 组显著差异代谢物富集



注:A,B:正、负离子模式下肺组织 QC 样品的相关性分析;C,D:正、负离子模式肺组织样品 PCA 分析;E,F:正、负离子模式下 M 组和 NC 组肺组织样品的 OPLS-DA 分析;G,H:正、负离子模式下 M 组和 Xiebaian 组肺组织样品的 OPLS-DA 分析。

图 5 肺组织样本的非靶向代谢组学

Note. A, B. Correlation analysis of lung tissue QC samples in positive and negative ion mode. C, D. PCA analysis of all lung tissue samples in positive and negative ion mode. E, F. OPLS-DA analysis of lung tissue samples in M group and NC group in positive and negative ion mode. G, H. OPLS-DA analysis of lung tissue samples in M group and Xiebaian group in positive and negative ion mode.

Figure 5 Non targeted metabolomic analysis of lung tissue samples

表 3 M 组和 NC 组肺组织样本中差异显著的代谢物 (Top10)

Table 3 Metabolites with significant difference in lung tissue samples from M group and NC group (Top10)

序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时间/s RT/s	代谢物 编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	光色素 Lumichrome	7.875	93.810	0.000	241.071	44.924	C01727	[M-H] ⁻
2	二甲基甘氨酸 Dimethylglycine	1.666	5.809	0.000	104.069	216.983	C01026	[M+H] ⁺
3	芦荟素 Aloesin	1.173	3.074	0.000	393.099	381.238	C08994	[M-H] ⁻
4	1-硬脂酰-2-花生酰-SN-甘油 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-SN-glycerol	2.994	3.017	0.000	627.531	159.882	C00165	[M+H-H ₂ O] ⁺
5	乙酰肉碱 Acetylcarnitine	19.915	2.564	0.000	204.124	293.970	C02571	[M+H] ⁺
6	鸢尾黄酮 Irisxanthone	10.201	0.000	0.000	435.099	23.390	C10067	[M-H] ⁻
7	诺氟沙星 Norfloxacin	6.701	0.000	0.000	259.099	29.588	C06687	[M-H-C ₂ H ₃ O ₂] ⁻
8	氢溴酸高乌甲素 Lappaconitine	3.373	0.006	0.018	535.262	225.803	C08694	[M+H-CH ₃ O ₂] ⁺
9	蓖麻油酸 Ricinoleic acid	7.048	0.008	0.000	279.231	71.257	C08365	[M-H-H ₂ O] ⁻
10	甘油磷酸 Glycerophosphate	2.544	0.009	0.000	343.019	422.942	C02979	[2M-H] ⁻

表 4 Xiebaisan 组和 M 组肺组织样本差异显著的代谢物(Top10)

Table 4 Metabolite with significant difference in lung tissue samples between Xiebaisan group and M group(Top10)								
序号 Serial No	名称 Name	变量投影 重要度 VIP	差异倍数 Fold change	P 值 P value	质荷比 m/z	保留时 间/s RT/s	代谢物 编号 KEGG ID	加合物 Adduct
1	D-葡萄糖胺-6-磷酸 D-glucosamine-6-phosphate	1. 792	3. 434	0. 018	260. 052	405. 200	C00352	[M + H] ⁺
2	棕榈酰-L-左旋肉碱 L-palmitoylcarnitine	13. 530	2. 212	0. 000	400. 341	165. 511	C02990	[M + H] ⁺
3	N,N-二甲基-L-精氨酸 N,N-dimethyl-L-argininium	9. 450	2. 203	0. 031	203. 150	527. 838	C03626	[M + H] ⁺
4	2'-脱氧胞苷 2'-deoxycytidine	5. 864	1. 931	0. 019	250. 080	203. 5320	C00881	[M + Na] ⁺
5	肌苷 Inosine	1. 174	1. 929	0. 039	267. 072	207. 859	C00294	[M-H] ⁻
6	氧化谷胱甘肽 Glutathione disulfide	3. 068	0. 203	0. 048	611. 141	537. 339	C00127	[M-H] ⁻
7	异麦芽糖 Isomaltose	1. 308	0. 549	0. 010	221. 065	375. 109	C00252	[M-H-C ₄ H ₈ O ₄] ⁻
8	玄参苷 Harpagoside	2. 810	0. 612	0. 015	529. 155	380. 592	C09783	[M + Cl] ⁻
9	蜜二糖 Melibiose	3. 701	0. 616	0. 0023	365. 104	382. 829	C05402	[M + Na] ⁺
10	1,2-双十六酰基-sn-甘油-3- 磷酸胆碱 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3- phosphocholine	1. 822	0. 627	0. 0258	732. 550	107. 903	C00157	[M-H] ⁻

(图 6A)在碳代谢、蛋白质消化与吸收、氨基酸的生物合成、ABC 转运体、嘌呤代谢等信号通路。Xiebaisan 组与 M 组显著差异代谢物富集(图 6B)在碳代谢、ABC 转运体、氨基酸的生物合成、不饱和脂肪酸生物合成、乙醛酸酯和二羧酸酯代谢途径等信号通路。其中在碳代谢通路中,发现两个比较组在该通路共有 3 个显著差异代谢物,对这 3 个代谢物的表达量分析(图 6C),结果显示泻白散能够逆转 3 个显著差异代谢物的表达。

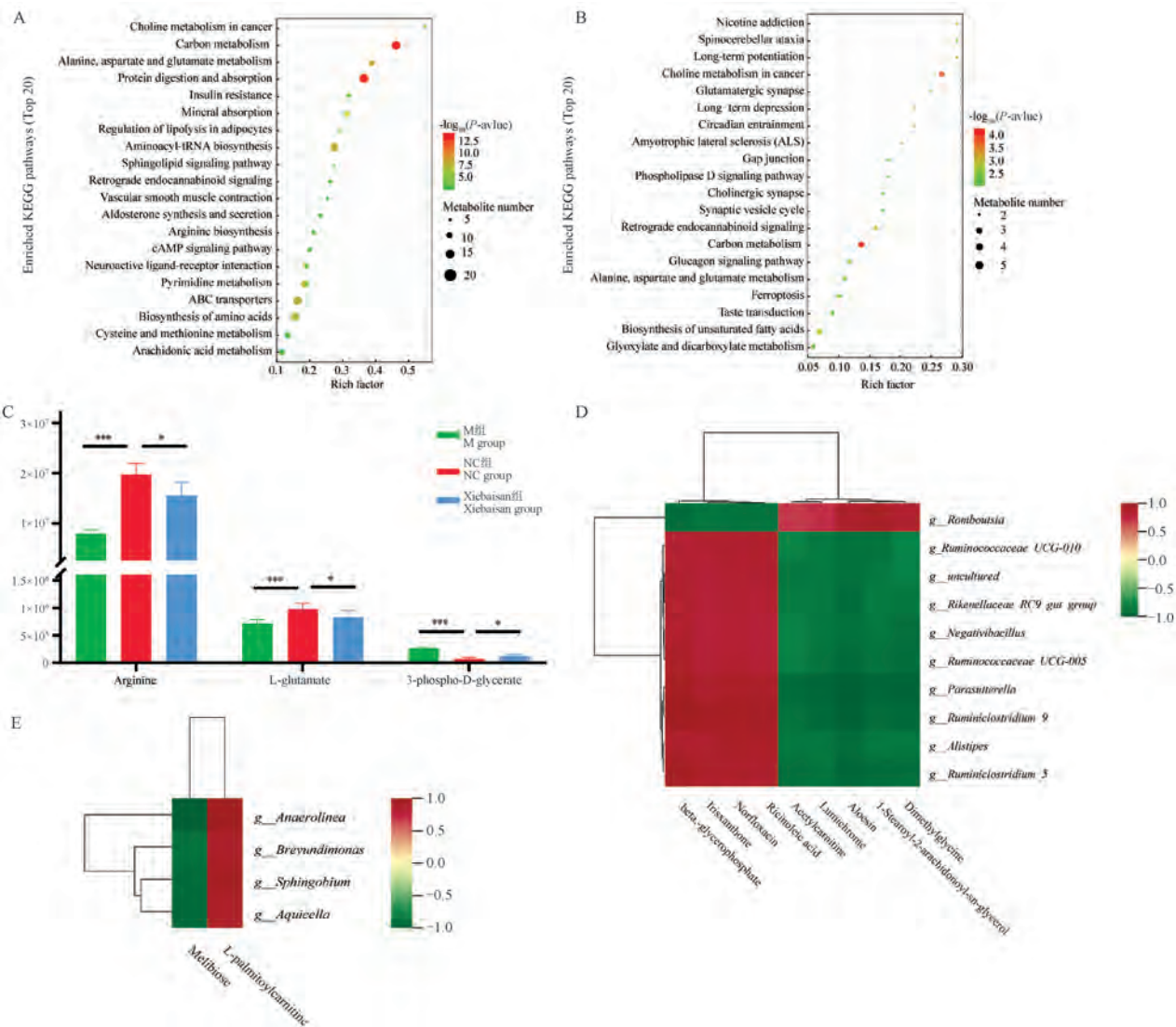
对差异菌群(Top10)和肺组织代谢组差异代谢物(Top10)做皮尔森相关性分析(相关性阈值 0. 8, $P = 0. 05$)发现,在 M 组和 NC 组中(图 6D),*g_ Romboutsia* 与肺组织代谢物维生素 B16,1-硬脂酰-2-花生酰-SN-甘油、芦荟素、光色素、乙酰肉碱呈正相关,与肺组织代谢物蓖麻油酸、诺氟沙星、鸢尾黄酮、β-甘油磷酸盐呈负相关;*g_ Ruminococcaceae UCG-010*、*g_ uncultured*、*g_ Rikenellaceae RC9 gut group*、*g_ Negativibacillus*、*g_ Ruminococcaceae UCG-005*、*g_ Prauserella*、*g_ Ruminiclostridium 9*、*g_ Alistipes*、*g_ Ruminiclostridium5* 与肺组织代谢物维生素 B₁₆、1-硬脂酰-2-花生酰-SN-甘油、芦荟素、光色素、乙酰肉碱呈负相关,与肺组织代谢物蓖麻油酸、诺氟沙

星、鸢尾黄酮、β-甘油磷酸盐呈正相关。在 Xiebaisan 组和 M 组中(图 6E),*g_ Anaerolinea*、*g_ Brevundimonas*、*g_ Sphingobium*、*g_ Aquicella* 与肺组织代谢物 L-棕榈酰呈正相关,与肺组织代谢物蜜二糖呈负相关。

3 讨论

目前世界哮喘人口约有 3 亿,最高发病率达到 18%,预计到 2025 年,哮喘患病人数将再增加 1 亿^[11-12]。现代科学研究较为常用的哮喘动物模型有小鼠、豚鼠、大鼠等。其中过敏性哮喘小鼠的炎症介导形式更倾向于过敏性肺炎;豚鼠致敏后,有报道其变态反应主要由 IgG 介导,而大鼠的致敏过程与人类哮喘过程中变态反应进程相似^[13]。本文选用 SD 大鼠,采用卵清白蛋白(OVA) + 氢氧化铝凝胶来建立过敏性哮喘模型,肺组织切片 M 组大鼠可见明显的肺泡塌陷,且支气管周围出现大量的炎性细胞浸润说明模型建立成功,可进行后续实验。

肠道菌群是疾病预防和治疗的重要靶标,参与维持机体健康与疾病^[14]。肠道微生态在机体免疫耐受的形成及维持中发挥着重要作用,并受饮食、感染以及抗生素和药物使用等多种因素的影响。



注:A,B;分别为 M 组与 NC 组、Xiebaian 组与 M 组肺组织样品差异代谢产物 KEGG 途径富集分析;C:M 组与 NC 组、Xiebaian 组与 M 组的肺组织样品在蛋白质消化和吸收途径中相同差异代谢产物表达量分析;D,E;分别为 M 组与 NC 组、Xiebaian 组与 M 组差异菌群与肺组织差异代谢物相关性分析。

图 6 肺组织样本中非靶向代谢组差异代谢产物的功能富集分析、表达分析与差异菌群的相关性分析

Note. A, B. Enrichment analysis of KEGG pathway of differential metabolite in lung tissue samples from M group vs NC group, Xiebaian group vs M group. C. The lung tissue samples of M group vs NC group and Xiebaian group vs M group have the differential metabolite expression in the carbon metabolism pathway. D, E. Correlation analysis between M group vs NC group, Xiebaian group vs M group in differential genera and lung tissue differential metabolite.

Figure 6 Functional enrichment analysis, expression analysis and differential genera of non targeted metabonomic differential metabolites in lung tissue samples

对 NC 组、M 组和 Xiebaian 组肠道菌群进行分析,发现 M 组的肠道菌群组成及丰度与其他两组差别明显。特别是属水平菌群差异分析,M 组能显著增加 *g_Romboutsia* 丰度。Xiebaian 组肠道菌群测序结果表明,与 M 组相比,Xiebaian 组能够显著提高菌群丰度及菌群物种多样性。属水平菌群差异分析也表明,Xiebaian 组能显著下调 *g_Romboutsia* 丰

度。泻白散组方中有甘草成分,已有研究报道,甘草水提物对肠道菌群有明显影响,可改善小鼠菌群丰度^[15],与本次实验结果相类似。中医理论有“肺与大肠相表里”的说法,现代基础研究也表明肠道和肺之间存在重要的“串扰机制”即“肠肺轴”,二者之间存在相互联系和调控的作用,一方面,呼吸系统疾病会改变肠道菌群的数量和多样性;另一方

面,肠道菌群的变化也会影响肺部疾病的发展过程^[16-18],本实验结果也发现类似情况。

基于液-质联用的非靶向代谢组学是新兴的系统生物学研究工具之一。非靶向代谢组学通过对样本代谢物进行定性、定量分析,刻画样本、疾病或个体的分子表型,进而系统地分析样本特性、疾病机制或个体特征。传统中药认为对于实物的认知要从整体出发,整体观是中医辨证的核心思想,因此代谢组学整体反应性的特点与中药治疗疾病的多环节、多靶点、协同起效的整体观念的研究角度相一致^[19]。血液样本中的代谢成分来源于机体的各个组织及器官,可反映机体的整体状态。M 组与 NC 组相比,血液样本中差异代谢物功能主要集中在氨基酸代谢(蛋白消化与吸收、氨基酸生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等),同时 mTOR 信号通路也有显著富集。蛋白消化与吸收通路曾被报道与哮喘的发生相关^[20]。mTOR 是细胞生长和增殖的重要调节因子也是经典的自噬信号通路,其与哮喘的相关研究也有报道,mTOR 信号通路的上调会导致免疫反应失衡^[21]。

Xiebaisan 组与 M 组相比,血液样本中差异代谢物功能主要集中在氨基酸代谢(蛋白消化与吸收、氨基酸生物合成、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等通路)。对 NC 组、M 组和 Xiebaisan 组中涉及蛋白消化与吸收通路的共同差异代谢物进行定量分析后发现,Xiebaisan 组逆转了 8 个共有差异代谢物中的 6 个代谢物的表达,改善共有差异代谢物的表达,使之趋向于正常。同时 Xiebaisan 组与 M 组相比,差异代谢物 KEGG 通路分析未能显著富集到 mTOR 信号通路,说明泻白散也可能通过影响 mTOR 信号通路的表达来改善哮喘。

肺组织样本的代谢组学则显示出 NC 组、M 组和 Xiebaisan 组中(M 组与 NC 组、Xiebaisan 组与 M 组)差异代谢物均有显著富集在碳代谢相关通路。对此通路共同差异代谢物进行定量分析后,发现 Xiebaisan 组逆转了 3 个共有差异代谢物的表达,使之表达趋向于正常。另外 M 组与 NC 组相比,差异代谢物还富集到血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 信号通路,而这两条通路与哮喘的发生密切相关^[22-23]。同时 Xiebaisan 组未能显著富集到这两条信号通路,表明泻白散也可能通过影响血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 信号通路来改善哮喘。

综上所述,泻白散治疗 OVA 致敏大鼠过敏性哮

喘的作用机制可能为:(1)减少肺组织炎细胞浸润,改善肺组织形态结构;(2)改善肠道菌群丰度及物种多样性,特别是显著降低过敏性哮喘组中 *Romboutsia* 菌丰度,来发挥肠免疫作用;(3)影响氨基酸代谢、碳代谢等代谢途径发挥保护作用;(4)可能通过调控 mTOR 通路、血管平滑肌收缩信号通路和 cAMP 等信号通路发挥对过敏性哮喘大鼠的保护作用。

参 考 文 献(References)

- [1] 郑炜东,曲妮妮. 麻杏石甘汤调控过敏性哮喘中辅助 T 淋巴细胞机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(4): 30-35.
ZHENG W D, QU N N. Mechanism research on maxing Shigan Decoction regulation on helper T lymphocytes in allergic asthma [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(4): 30-35.
- [2] 崔晏文,王丽慧,杜春仙,等. 过敏性哮喘急性发作患者血清淀粉样蛋白 A 的表达与影响因素分析[J]. 医学新知, 2022, 32(3): 201-207.
CUI Y W, WANG L H, DU C X, et al. The levels and impacting factors of serum amyloid A in the acute exacerbation of allergic asthma [J]. New Med, 2022, 32(3): 201-207.
- [3] 刘彦邑,孟晓明,胡成穆,等. 酸离子敏感通道 1a 在炎症性疾病中的研究进展[J]. 药科学报, 2020, 55(6): 1119-1124.
LIU Y Y, MENG X M, HU C M, et al. Research progress of ASIC1a in inflammatory diseases [J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(6): 1119-1124.
- [4] 耿胜男,罗鑫,程梦,等. 虎杖苷改善幼鼠过敏性哮喘的作用及机制[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(10): 34-38.
GENG S N, LUO X, CHENG M, et al. Study on the effect and mechanism of polydatin in improving allergic asthma in young mice [J]. Asia Pac Tradit Med, 2022, 18(10): 34-38.
- [5] 于澎,熊金璐,宋来辉,等. 泻白散中桑白皮的尊古炮制及现代工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2383-2386.
YU P, XIONG J L, SONG L H, et al. Study on the ancient processing and modern technology of Sang Bai in Xiebai powder [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(10): 2383-2386.
- [6] 李玉丽,蒋屏,孙梦林,等. 经典名方泻白散的古今文献综述[J]. 中医药学报, 2019, 47(6): 17-22.
LI Y L, JIANG P, SUN M L, et al. Ancient and modern literature review of Xiebai San [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2019, 47(6): 17-22.
- [7] 李璐,杨一帆,杨彪,等. 泻白散处方演变历史及方剂开发的研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1920-1926.
LI L, YANG Y F, YANG B, et al. Evolution history of Xiebai Powder prescription and research progress of prescription development [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(8): 1920-1926.

- [8] PICKARD J M, ZENG M Y, CARUSO R, et al. Gut microbiota; role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease [J]. Immunol Rev, 2017, 279(1): 70–89.
- [9] ZHANG B, LIU K, YANG H, et al. Gut microbiota; the potential key target of TCM's therapeutic effect of treating different diseases using the same method-UC and T2DM as examples [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 855075.
- [10] 杨宗统, 孙铁锋, 李晓晶, 等. 基于肠道菌群和短链脂肪酸代谢探讨不同饮食条件下高脂血症大鼠发病机制 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1314–1323.
- YANG Z T, SUN T F, LI X J, et al. Pathogenesis of hyperlipidemia in rats under various dietary conditions based on intestinal flora and short-chain fatty acid metabolism [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1314–1323.
- [11] 司秀影, 赵宝珠, 李鹤然, 等. 中医药调控哮喘 Th17/Treg 细胞失衡的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 98–102.
- SI X Y, ZHAO B Z, LI H R, et al. Research progress of traditional Chinese medicine regulating Th17/treg cell imbalance in asthma [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(7): 98–102.
- [12] COLLABORATORS G2CRD. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. Lancet Respir Med, 2017, 5(9): 691–706.
- [13] 吕天宜, 李得民, 杨道文, 等. 卵清蛋白(OVA)致敏联合烟熏法建立咳嗽变异型哮喘豚鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 1–7.
- LYU T Y, LI D M, YANG D W, et al. Establishment of a cough variant asthma guinea pig model induced by cigarette smoke exposure and OVA sensitization [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 1–7.
- [14] 沈红, 伍城颖, 龙芳, 等. 从肠道菌群调控角度探讨中药汤剂中多糖组分存在的意义 [J]. 药学报, 2022, 57(12): 3480–3486.
- SHEN H, WU C Y, LONG F, et al. Meanings of polysaccharides in traditional Chinese medicines decoction from the viewpoint of its gut microbiota regulation effects [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(12): 3480–3486.
- [15] 徐鹏程, 栾英桥, 张丹, 等. 甘草水提取物对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(2): 228–232.
- XU P C, LUAN Y Q, ZHANG D, et al. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* decoction on intestinal flora in mice [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2018, 34(2): 228–232.
- [16] MARSLAND B J, TROMPETTE A, GOLLEWITZER E S. The gut-lung axis in respiratory disease [J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(2): S150–S156.
- [17] HE Y, WEN Q, YAO F, et al. Gut-lung axis: the microbial contributions and clinical implications [J]. Crit Rev Microbiol, 2017, 43(1): 81–95.
- [18] 费婉婉, 鹿振辉, 黄星, 等. 基于“肺与大肠相表里”探讨肠道菌群与肺结核关系的研究进展 [J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(5): 500–504.
- FEI W W, LU Z H, HUANG X, et al. Research progress on the correlation of gut microbiota with and pulmonary tuberculosis based on the theory of exterior and interior of lung and large intestine [J]. Chin J Antituberc, 2022, 44(5): 500–504.
- [19] 张帆, 胡勋秀, 李丁香, 等. 非靶向血液代谢组学研究糖尿病大鼠发生发展及银杏叶提取物干预的作用机制 [J]. 药学报, 2021, 56(4): 1127–1136.
- ZHANG F, HU X X, LI D X, et al. *Ginkgo biloba* extract ameliorates streptozotocin-induced diabetes in rats as measured by non-targeted metabolomics [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(4): 1127–1136.
- [20] TANG W, DONG M, TENG F, et al. TMT-based quantitative proteomics reveals suppression of SLC3A2 and ATP1A3 expression contributes to the inhibitory role of acupuncture on airway inflammation in an OVA-induced mouse asthma model [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111001.
- [21] HUANG X, YU H, XIE C, et al. Louki Zupa Decoction attenuates the airway inflammation in acute asthma mice induced by ovalbumin through IL-33/ST2-NF- κ B/GSK3 β /mTOR signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 1520–1532.
- [22] LIU Y, LIU Z, WANG K. The Ca²⁺-activated chloride channel ANO1/TMEM16A: an emerging therapeutic target for epithelium-originated diseases? [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1412–1433.
- [23] PACINI E S A, SATORI N A, JACKSON E K, et al. Extracellular cAMP-adenosine pathway signaling: a potential therapeutic target in chronic inflammatory airway diseases [J]. Front Immunol, 2022, 13: 866097.

[收稿日期] 2023-04-17

郑建华,陈菁青,董巧燕,等. 慢性束缚肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 190-201.

ZHENG J H, CHEN J Q, DONG Q Y, et al. Construction and evaluation of a mouse model of chronic restraint intestinal stress injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 190-201.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.006

慢性束缚肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价

郑建华,陈菁青,董巧燕,法云智*,邱业峰*

(军事医学研究院实验动物中心,北京 100071)

【摘要】 目的 结合社会心理应激导致炎症性肠病、肠易激综合征等一系列疾病的特点,建立实验性慢性束缚小鼠肠道应激损伤模型,为探讨慢性束缚应激诱导胃肠病的致病机制以及防治措施奠定基础。**方法** 18 只雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠,适应 7 d 后,根据体重按随机数字表法分为 2 组,对照组及慢性束缚应激组。对小鼠进行束缚应激,每天 3 h,连续束缚 14 d,建立肠道损伤模型。通过观察体重、肠道组织病理形态变化、检测紧密连接蛋白表达、肠上皮细胞凋亡以及炎症细胞因子 mRNA 表达水平等指标对模型进行评价。**结果** 慢性束缚应激 14 d,小鼠表现为体重减轻,十二指肠绒毛高度变短、隐窝结构异常、绒毛/隐窝比下降;结肠黏膜炎性细胞浸润、隐窝结构不规则。蛋白免疫印迹、免疫组化和免疫荧光染色结果显示,慢性束缚应激后小鼠十二指肠和结肠紧密连接蛋白 Occludin, Claudin-1 表达显著下降 ($P < 0.05$);肠上皮细胞凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 的表达显著增加 ($P < 0.05$)。此外,肠道炎症因子和趋化因子 mRNA 表达结果显示,慢性束缚应激 14 d 显著提高了小鼠十二指肠 *IL-1 β* 、*IL-6*、*MCP-1*、*TNF- α* 、*IL-10* 基因的表达 ($P < 0.05$);慢性束缚应激 14 d 显著提高了小鼠结肠 *IL-1 β* 、*IL-6*、*MCP-1* 的表达 ($P < 0.001$)。**结论** 利用小鼠行为限制装置对小鼠连续束缚 14 d,导致应激小鼠肠道组织结构异常、肠屏障功能障碍、肠上皮细胞凋亡,引发肠道炎症反应,表明慢性束缚应激肠道损伤小鼠模型构建成功。

【关键词】 慢性束缚应激;肠道应激损伤;肠道屏障;模型评价;细胞凋亡;炎症反应

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0190-12

Construction and evaluation of a mouse model of chronic restraint intestinal stress injury

ZHENG Jianhua, CHEN Jingqing, DONG Qiaoyan, FA Yunzhi*, QIU Yefeng*

(Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Corresponding author: QIU Yefeng. E-mail: qiuyefeng2001@163.com; FA Yunzhi. E-mail: fyzc2004@163.com

【Abstract】 Objective Given that psychosocial stress can contribute to a series of diseases, such as inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome, we aimed to establish an experimental chronic restraint mouse intestinal stress injury model as a basis for exploring the pathogenic mechanism of chronic restraint stress-induced gastrointestinal diseases, and for developing preventive and curative measures. **Methods** Eighteen male SPF-grade BALB/c mice were acclimatized for 7 days and then divided into a control group and a chronic restraint stress group according to body weight, using a randomized numerical table method. The mice were subjected to restraint stress for 3 hours per day for 14 days to establish an intestinal injury model. The model was evaluated by observing body weight, pathological changes in intestinal histomorphology, expression of tight junction proteins, apoptosis of intestinal epithelial cells, and mRNA expression levels

【基金项目】 军队实验动物专项科研课题(SYDW-KY[2021]06)。

Funded by the Specialized Scientific Research Projects for Military Laboratory Animals (SYDW-KY[2021]06).

【作者简介】 郑建华,男,在读硕士研究,研究方向:实验动物模型创制研究。Email:zjhcbm0311@163.com

【通信作者】 法云智,男,硕士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:fyzc2004@163.com;

邱业峰,男,博士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:qiuyefeng2001@163.com。

* 共同通信作者

of inflammatory cytokines. **Results** After 14 days of chronic restraint stress, model mice showed weight loss, shortened duodenal villus height, abnormal crypt structure, a decreased villus/crypt ratio, colonic mucosal inflammatory cell infiltration, and irregular crypt structure. Protein immunoblotting, immunohistochemistry, and immunofluorescence staining showed that the expression levels of the duodenal and colonic tight junction proteins Occludin and Claudin-1 were significantly decreased in mice after chronic restraint stress ($P < 0.05$), while expression levels of the apoptotic protein cleaved-caspase-3 in intestinal epithelial cells were significantly increased ($P < 0.05$). Regarding the mRNA expression levels of intestinal inflammatory factors and chemokines, chronic restraint stress for 14 days significantly increased the gene expression levels of interleukin (*IL*)-1 β , *IL*-6, monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP*-1), tumor necrosis factor- α , and *IL*-10 in the duodenum of mice ($P < 0.05$), and significantly increased the gene expression levels of *IL*-1 β , *IL*-6, and *MCP*-1 in the colon ($P < 0.001$). **Conclusions** The use of a behavioral restriction device to restrain mice continuously for 14 days led to abnormal intestinal tissue structure, intestinal barrier dysfunction, and intestinal epithelial cell apoptosis, and triggered an intestinal inflammatory response in the stressed mice, indicating successful establishment of a mouse model of intestinal injury by chronic restraint stress.

[Keywords] chronic restraint stress; intestinal stress injury; intestinal barrier; model evaluation; apoptosis; inflammatory response

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

随着生活节奏的加快,人们在工作、生活和教育方面所承受的压力也在不断增加^[1]。应激反应是机体受到内外环境刺激时产生的非特异性反应^[2],参与肠易激综合征、功能性胃肠病、焦虑及抑郁等诸多身心疾病的发生发展^[3],对部队作战能力生成和维持构成了重大威胁,是非战斗减员的主要原因^[4-5]。有调查研究表明,25%的美国人口受到高水平的压力,而 50%的参与者报告在过去一年中经历了重大的压力事件^[6],我国成人抑郁障碍终生患病率高达 6.8%^[7]。据报道,慢性应激源不仅是重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)等精神疾病,也包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)等肠道疾病的危险因素。临床报告显示,胃肠道症状可能使抑郁症复杂化,抑郁症患者胃肠道疾病恶化的风险更高^[8],胃肠道疾病的风险增加,可能会导致精神障碍,如抑郁和焦虑、精神分裂症、痴呆和自闭症等^[9]。此外,应激在诱发心血管疾病、脑损伤、皮肤和胃肠道疾病中的作用先前已被记载^[10]。长期应激可能导致免疫功能下降、糖尿病、冠心病、肾衰竭和高血压等疾病的发生^[11],应激在功能性腹胀、肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)、炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)等肠道疾病发展中起关键作用^[12-14]。IBS 是全科医生最常遇到的胃肠道疾病之一^[15],各国普通人群肠易激综合征患病率差异较大,大洋洲国家为 11% ~ 17%,非洲国家为 10%,亚洲国家为 5% ~ 10%,此外,有研究表明我国 IBS 患病率为 1.4% ~ 11.5%^[16-18]。应激是机

体在生存竞争中的一种本能的防御机制,但长期慢性应激则会引起全身多系统多部位病理表现^[19-20]。

束缚应激最初是由 Bonfils 在 1993 年提出的^[21],在许多研究中,其已被广泛用于模拟心理应激^[6,21]。有研究表明,持续数周的束缚应激刺激可导致实验动物的大脑异常、肠道功能障碍和生态失调^[9]。肠屏障的破坏可导致肠通透性增加、肠道微生物群组成的变化和炎症增加,这种肠道内稳态的失调可以促进癌的发生^[22-23]。此外,越来越多的证据表明,束缚应激损伤肠道并引起如 IBD、IBS 等疾病^[6]。慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)导致肠损伤的发病机制复杂,目前尚不清楚。IBD 是一种慢性致残性胃肠道疾病,目前认为是由过度活跃的免疫系统攻击胃肠道引起,导致溃疡和炎症。然而,束缚应激诱导 IBD 的发病机制尚不清楚^[6],一种可能的解释是肠屏障损伤,即应激源可能会损伤肠道屏障,导致细菌移位和局部或全身炎症反应等后果^[10,24]。免疫调节功能障碍在炎症性肠病等慢性炎症性疾病的发病机制中起着重要作用,但其潜在的机制仍不清楚^[25]。

目前能够复制精神心理应激的动物模型中,较为成熟的是 CRS 模型,以往研究表明,CRS 对动物脑、心脏、肝、肾、胃肠等的损伤有加重作用,能够引起多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[10-11,26]。CRS 是一种生理应激源,主要用于神经科学研究,如建立大鼠或小鼠的抑郁模型,慢性束缚应激动物模型在研究抑郁症方面日趋成熟,然而,CRS 诱导肠屏障损伤研究较少。

已有研究证明,束缚 4 h、1 d 或 4 d 血浆皮质酮水平显著上升,炎症因子及紧密连接蛋白未见显著性差异^[27-28],而长时间束缚应激导致胃肠破坏和肠粘膜通透性增加^[10,21,29],CRS 可影响大鼠的肠道屏障功能,如粘液损伤和肠道通透性增加、细菌过度生长和营养物质渗漏^[30]。然而,目前对 CRS 条件下肠道损伤的了解还不够全面。多数 CRS 相关研究中,着重于抑郁症模型构建研究,肠道损伤评价指标单一,聚焦于肠损伤的研究较少,因此,需要一种应激强度足够、肠应激损伤明显的小鼠慢性束缚肠应激损伤动物模型,为慢性肠道疾病发病机制的进一步研究奠定实验基础。本研究中,利用小鼠行为限制装置对小鼠进行束缚应激,每天 3 h,连续束缚 14 d,构建慢性束缚应激肠道损伤小鼠模型,并对造模结果进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只雄性 7 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,体重 21 ~ 23 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。所有小鼠饲养于本单位实验动物中心 SPF 级屏障环境中【SYXK(军)2022-0022】,恒温在 23 ± 2 °C,相对湿度 40% ~ 60%,明暗交替时间 12 h/12 h,自由采食和饮水。所有器材、垫料、饲料等均在使用前进行高压灭菌处理。所有实验操作符合动物福利伦理,并通过军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准(IACUC-DWZX-2022-049)。

1.1.2 主要试剂与仪器

TRIgent 试剂盒(货号:MF034-05)与 qRT-PCR Mix(货号:MF787-01)均购自北京聚合美生物科技有限公司;逆转录试剂盒(货号:RR047A)购自 TaKaRa BIO;基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;HE 染液套装(货号:G1003)、EDTA (PH9.0)抗原修复液(货号:G1203)、组织自发荧光淬灭剂(货号:G1221)、抗荧光淬灭封片剂(货号:G1401)、DAPI 染色试剂(货号:G1012)、牛血清白蛋白 BSA(货号:GC305010)、CY3 标记山羊抗兔 IgG(货号:GB111402)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;Occludin(货号:#91131)、Cleaved Caspase-3(货号:#9661)抗体购于 Cell Signaling Technology 公司;Claudin-1 抗体(货号:37-4900)购于 Invitrogen 公

司;ZO-1(货号:21773-1-AP)抗体购于 Proteintech 公司;ECL 超敏发光液(加强型)(货号:HXP1868),BCA 蛋白定量试剂盒(货号:LOT:HX351691)均购于北京华兴博创基因技术有限公司; β -actin(货号:ab8227)抗体购于 abcam;DAB 显色试剂盒(20X)(货号:ZLI-9018)、酶标山羊抗兔 IgG 聚合物(货号:PV-6001)购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, C1000 Touch™;美国);组织匀浆机(Roche MagNALyser Instrument, #03358968001;德国);核酸蛋白定量仪(NanoPhotometre, N50-Touch;德国);标准规格酶标仪(Bio-Rad, #1681130;美国);全波长酶标仪(SpectraMax ABS plus;美国);ChemiDoc 成像系统(Bio-Rad, ChemiDoc Imaging System;美国);病理石蜡切片机(Leica, RM2016;德国);组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5;中国);显微镜以及成像系统(Nikon, NIKON DS-U3;日本);明场、荧光 FISH 数字病理扫描仪(Leica, Aperio VERSA;德国);正置光学显微镜(Nikon, Nikon Eclipse E100;日本)。

1.2 方法

1.2.1 分组

所有实验小鼠适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法,将小鼠分为对照组(Ctrl group)和慢性束缚应激组(CRS group),每组 9 只,对照组和慢性束缚应激组小鼠均饲养于实验动物中心屏障环境中,在每天 9:00 ~ 12:00 将慢性束缚应激组小鼠置于自制行为限制装置中束缚 3 h,持续 14 d。

1.2.2 组织样本采集

实验结束后,小鼠禁食 6 h,称重后用 1%戊巴比妥钠,按照 5 μ L/g 小鼠体重剂量腹腔注射进行麻醉,并断颈处死。解剖后分别采集小鼠十二指肠和结肠组织置于预冷的 PBS 缓冲液中冲洗,用滤纸吸干水分,置于液氮冷冻,转移至 -80 °C 保存,用于后续分子指标的检测。另剪取一小块十二指肠和结肠置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,生理盐水洗涤 3 次,保存于 70%乙醇用于后续的组织切片制作。为减少个体差异,采集的各类组织均选择固定部位。

1.2.3 组织切片及 HE 染色

将固定好的组织进行梯度 75%、85%、90%、95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡与包埋,切片(厚度 5 μ m)、粘片与烘片。并进行苏木素-伊红(HE)染色,镜下观察拍照,用 Image J 软件测量十

二指肠绒毛长度,隐窝深度,并根据评分标准对结肠病理切片进行评分,病理组织学评分见表 1^[31]。

1. 2. 4 RNA 提取及反转录

将约 50 mg 组织加入 1 mL TRIpure 后低温匀浆裂解,加入 200 μ L 氯仿震荡 15 s,室温静置 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min,取上层含 RNA 的水相 500 μ L 加入 500 μ L(等体积)异丙醇,颠倒混匀,并于室温静置 10 min,进行 RNA 沉淀;4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 1 mL 0.1%(v/v)DEPC 水配制的 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,该步骤重复 2 次以提高 RNA 的质量;4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,室温干燥 1 ~ 2 min,DEPC 水溶解 RNA,使用 NanoPhotometer-N50-Touch 分光光度计对 RNA 浓度和质量测定并记录,根据反转录试剂盒说明书的方法,取 2 μ g 总 RNA,在去除基因组 DNA 后,进行逆转录反应得到 cDNA。

1. 2. 5 实时荧光定量聚合酶链式反应分析

实时定量聚合酶链式反应使用 SYBRGreen 染料法,反应体系 12.5 μ L,循环参数包括 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,扩增 40 个循环,应用熔解曲线程序进行连续荧光测量。以 β -actin 为内参基因,使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 进行计算目标基因的相对表达水平,引物序列见表 2。

1. 2. 6 蛋白免疫印迹分析

使用 RIPA buffer 加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂后,提取小鼠十二指肠、结肠总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测得蛋白浓度,每个样本取 30 μ g 总蛋白加入蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸变性后上样,恒压 120 V,电泳 1 h 分离不同分子量蛋白质,恒流 200 mA,湿转 60 min 将 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。封闭液室温封闭 1 h 后,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(β -actin 抗体的稀释比为 1 : 5000,其他抗体稀释比均为 1 : 2000),PBST 洗涤 3 次,每次 6 min,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(抗体稀释比均为 1 : 5000),室温孵育 1.5 h,PBST 洗涤 3 次,每次 6 min,后用 ECL 超敏发光液显影曝光拍照,将得到的目的蛋白条带用 Image J 软件进行光密度分析并统计灰度值。

1. 2. 7 免疫荧光染色

石蜡切片脱蜡,用 EDTA 抗原修复液(pH = 8.0)中火 8 min,停火 8 min,中低火 7 min 进行修复。自然冷却后脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min,3% BSA 封闭 30 min,滴加一抗湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,晃动洗涤 3 次,每次 5 min,滴加二抗,避光室温孵育 50 min,DAPI 避光室温孵育 10 min 复染细胞核,淬灭组织自发荧光。抗荧光淬灭封片剂

表 1 病理组织学评分表
Table 1 Pathohistology score sheet

评分 Score	溃疡/个 Ulcers/ number	上皮细胞变化 Epithelial cell changes	炎性浸润 Inflammatory infiltrate	淋巴结/个 Lymph nodes/ number
0	0	正常 Normal	无 None	0
1	1	杯状细胞缺失 Goblet cells deletion	隐窝周围浸润 Peri-cryptic infiltration	1
2	2	杯状细胞大面积缺失 Large deletion of goblet cells	黏膜肌层出现浸润 Infiltration of the muscular layer of the mucosa	2
3	3	隐窝缺失 Crypt deletion	黏膜肌层普通浸润,黏膜增厚 Generalized infiltration of the muscular layer of the mucosa with thickening of the mucosa	3
4	> 3	隐窝大面积缺失或息肉再生 Large deletion of crypt or polyp regeneration	黏膜下层浸润 Infiltration of submucosal layer	4

表 2 qRT-PCR 引物序列表
Table 2 Sequence list of qRT-PCR primers

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer(5'→3')
β -actin	GGCTGTATTCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-1 β	GCAACTGTTCCTGAACCTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF- α	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
MCP-1	TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
IL-10	AGCCTTATCGGAAATGATCCAGT	GGCCTTGTAGACACCTTGGT

封片,采集图像:DAPI 激发波长 330 ~ 380 nm,发射波长 420 nm;使用 Niko 正置荧光显微镜对结果进行观察和拍照。

1.2.8 免疫组化

将结肠、十二指肠组织石蜡切片充分脱蜡,100%、95%、90%、80%、70%梯度乙醇依次复水,切片浸泡在柠檬酸盐缓冲液中微波加热修复,3%过氧化氢稀释液消除内源性过氧化物酶的活性;羊血清封闭液 37 ℃ 孵育 30 min,一抗 4 ℃ 过夜孵育,PBS 洗涤,滴加二抗 37 ℃ 温箱孵育 30 min;PBS 洗涤,DAB 显色及苏木精复染,脱水后中性树脂封片保存拍照。

1.3 统计学分析

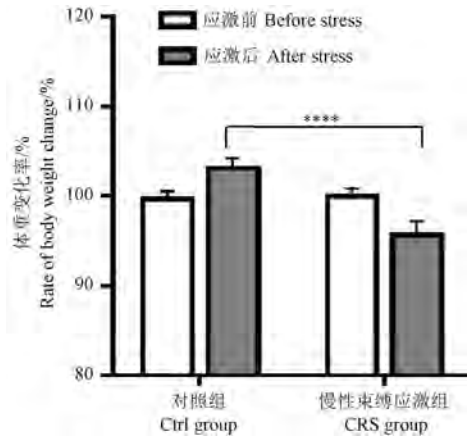
数值用平均值 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,统计分析用 SPSS 26.0 软件进行,组间的比较分析用配对 *t* 检验进行检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。使用 GraphPad Prism 9.0 绘图。

2 结果

2.1 慢性束缚应激对体重及肠道组织病理学变化的影响

与对照组相比,慢性束缚应激显著降低了小鼠体重($P < 0.0001$) (见图 1),这与先前的研究结果

一致^[31-33]。苏木素-伊红(HE)染色结果发现,慢性束缚应激小鼠十二指肠绒毛均出现缩短和脱落现象(图 2A),绒毛高度显著缩短,绒毛高度与隐窝深度比值均显著降低($P < 0.0001$) (图 2B ~ 2D);此外,与对照组相比,慢性束缚应激小鼠结肠表现出结肠黏膜炎性细胞浸润、隐窝结构异常的现象,病



注:与对照组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 慢性束缚应激对小鼠体重变化的影响($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 9$)

Note. Compared with Ctrl group, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figure)

Figure 1 Effect of chronic restraint stress on body weight changes in mice ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 9$)

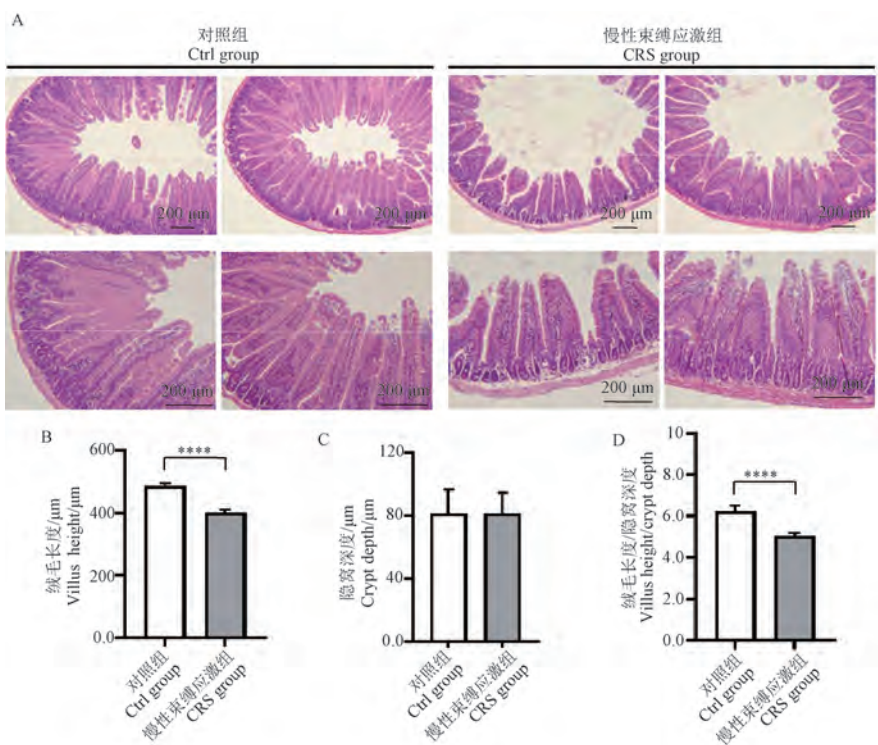


图 2 慢性束缚应激对小鼠十二指肠黏膜形态的影响(HE 染色, $n = 3$)

Figure 2 Effect of chronic restraint stress on duodenal morphology in mice (HE staining, $n = 3$)

理组织学评分显著升高($P < 0.05$),出现一定程度的病理损伤(图3)。

2.2 慢性束缚应激对肠道紧密连接蛋白表达的影响

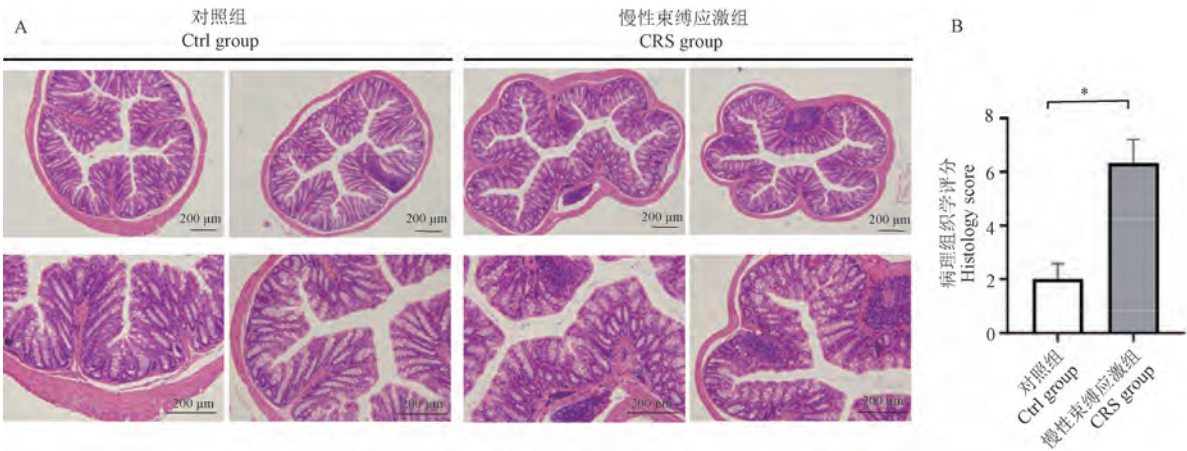
为探究慢性束缚应激对肠道屏障功能的影响,测定了肠道组织代表性紧密连接蛋白的表达。如图4所示,慢性束缚应激显著降低小鼠十二指肠紧密连接蛋白 Occludin、Claudin-1 的表达($P < 0.01$)。免疫荧光结果显示,慢性束缚应激能降低十二指肠组织紧密连接蛋白 Occludin 的原位表达(图5)。如图6所示,慢性束缚应激显著降低小鼠结肠紧密连接蛋白 Occludin 的表达($P < 0.05$)。

2.3 慢性束缚应激对肠道组织炎性细胞因子表达的影响

为探究慢性束缚应激对肠道炎症反应的影响,测定了具有代表性的炎性细胞因子和趋化因子。慢性束缚应激显著提高小鼠十二指肠炎性细胞因子和趋化因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $MCP-1$ 、 $IL-10$ mRNA 的表达($P < 0.05$)(图7A)。慢性束缚应激显著提高小鼠结肠炎性细胞因子和趋化因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $MCP-1$ mRNA 的表达($P < 0.001$)(图7B)。

2.4 慢性束缚应激诱导肠上皮细胞的凋亡

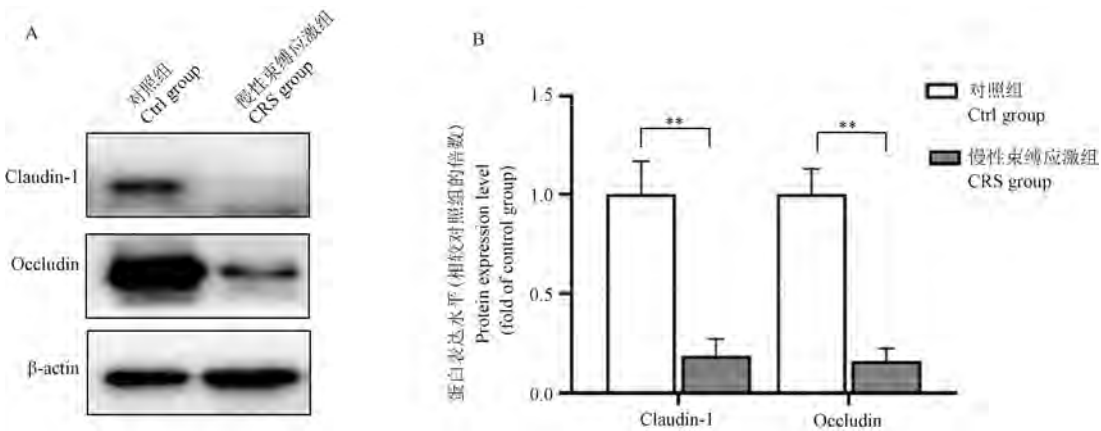
如图8,为了观察肠上皮细胞凋亡情况,通过免疫组化,观察到慢性束缚应激小鼠十二指肠上皮细



注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)
图3 慢性束缚应激对小鼠结肠形态的影响(HE染色, $n = 3$)

Note. Compared with Ctrl group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

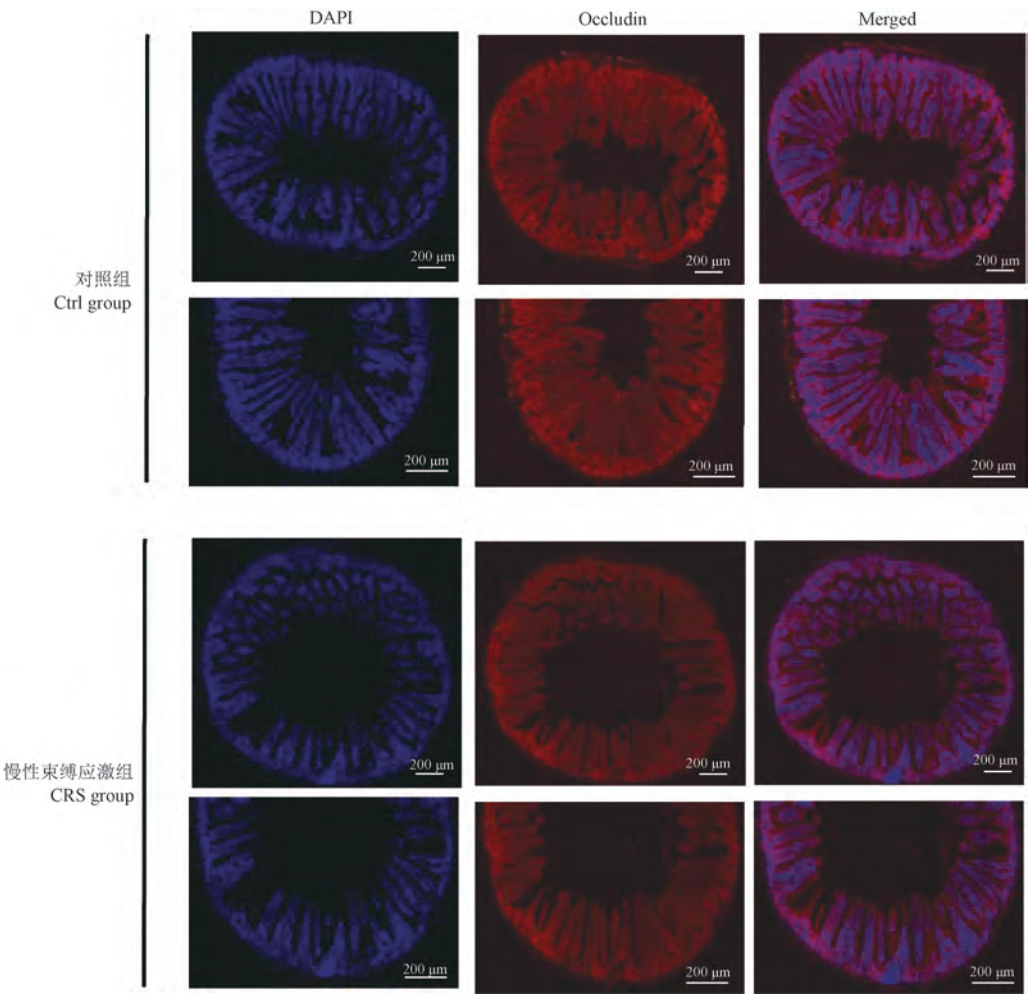
Figure 3 Effect of chronic restraint stress on colonic morphology in mice (HE staining, $n = 3$)



注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。
图4 慢性束缚应激对小鼠十二指肠紧密连接蛋白表达的影响($n = 4$)

Note. Compared with Ctrl group, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of chronic restraint stress on the expression of duodenal tight junction proteins in mice ($n = 4$)



注:免疫荧光法检测小鼠十二指肠组织紧密连接蛋白 Occludin;DAPI 染出来的细胞核在激发光下为蓝色,阳性表达为 CY3 荧光素标记的 红光。

图 5 慢性束缚应激对小鼠十二指肠紧密连接蛋白 Occludin 表达的影响($n = 3$)

Note. Immunofluorescence assay for mouse duodenal tissue tight junction protein Occludin. DAPI-stained nuclei are blue in excitation light and positively expressed as CY3 fluorescein-labeled red.

Figure 5 Expression of duodenum restraint stress on the expression of colonic tight junction protein Occludin in mice ($n = 3$)

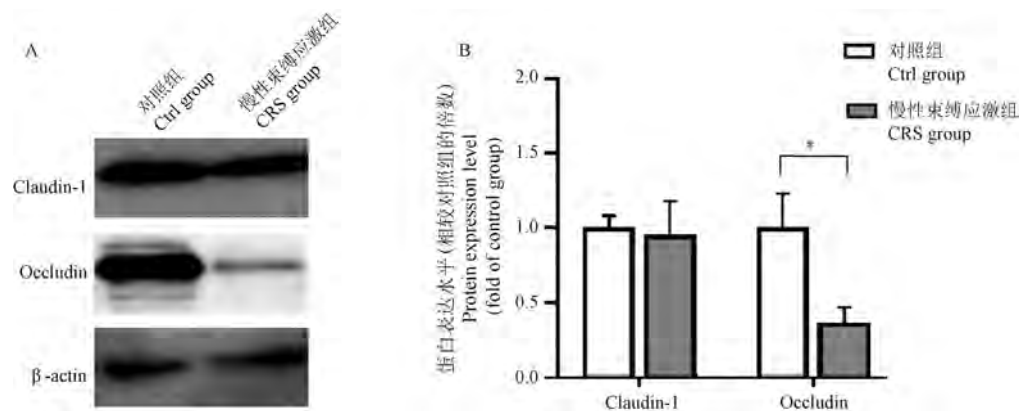
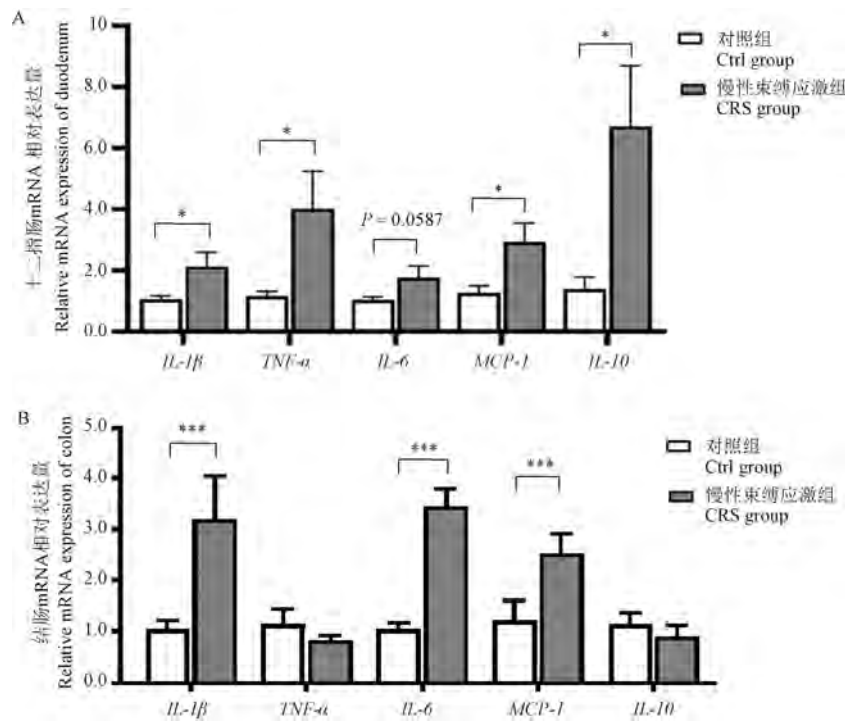


图 6 慢性束缚应激对小鼠结肠紧密连接蛋白表达的影响($n = 4$)

Figure 6 Expression of chronic restraint stress on the expression of colonic tight junction protein in mice ($n = 4$)



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图7 慢性束缚应激对小鼠十二指肠和结肠炎性细胞因子基因表达的影响($n = 6$)

Note. Compared with Ctrl group, *** $P < 0.001$.

Figure 7 Effect of chronic restraint stress on the expression of inflammatory cytokines in the duodenum and colon of mice ($n = 6$)

胞凋亡增加;免疫组化结果显示,慢性束缚应激能够显著增加小鼠十二指肠凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 的表达($P < 0.05$) (图 8A,8B)。慢性束缚应激能够增加小鼠结肠凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 的表达趋势(图 8C,8D)。

3 讨论

本研究结合社会心理应激导致 IBD、IBS 等一系列疾病的特点,模拟社会心理应激环境,建立了 CRS 小鼠肠道应激损伤模型,并观察到该模型小鼠肠组织出现病理损伤,导致肠屏障功能障碍,主要表现为十二指肠绒毛脱落、绒毛高度缩短、绒毛高度/隐窝深度比值降低、肠绒毛受损,以及肠组织紧密连接蛋白的表达水平降低等。CRS 促使肠上皮细胞凋亡相关蛋白增加。此外,通过对 CRS 小鼠肠道炎症水平的监测,发现 CRS 可导致肠道组织炎性细胞因子表达升高,炎性细胞浸润,出现一定程度的炎症反应。

CRS 与多种胃肠道疾病的发病机制有关^[19-20]。有研究表明,社会心理应激改变了大脑和肠道之间的相互作用,并可能加剧一系列疾病,包括 IBD 和

IBS^[30,34]。环境(束缚应激)因素是 IBD 发作的关键触发因素^[30],这种现象所涉及的机制尚未完全阐明。临床和实验研究的证据表明,心理应激对肠道敏感性、蠕动性、分泌和通透性有显著影响^[30,34]。IBS 是一种应激敏感性疾病,同时也是一种慢性疾病,严重降低患者的生活质量和工作效率,据报道,IBS 影响 7% ~ 21% 的普通人群^[34-36]。在大多数患者中,IBS 是一种慢性复发性疾病,其症状可能随时间而变化。一项系统回顾显示,在对临床 IBS 患者的长期随访中,2% ~ 18% 恶化,30% ~ 50% 不变,12% ~ 38% 改善^[36]。在 IBS 的动物模型和患者中,慢性应激会破坏胃肠动力,增加内脏疼痛感知,并损害肠道屏障功能。慢性应激可通过升高血浆糖皮质激素水平,改变肠-脑轴调节,促进促炎细胞因子的产生,从而改变胃肠、认知和情绪通路^[23]。

紧密连接(tight junction, TJ)的存在保证了半透性屏障的功能,TJ 在维持肠道通透性中起关键作用^[24],而 TJ 蛋白是粘膜屏障的重要部分^[37]。本研究结果与猜想的一致,在 CRS 小鼠模型中,小鼠十二指肠和结肠组织均出现紧密连接蛋白 Occludin 的表达显著降低,十二指肠 Claudin-1 的表达显著降

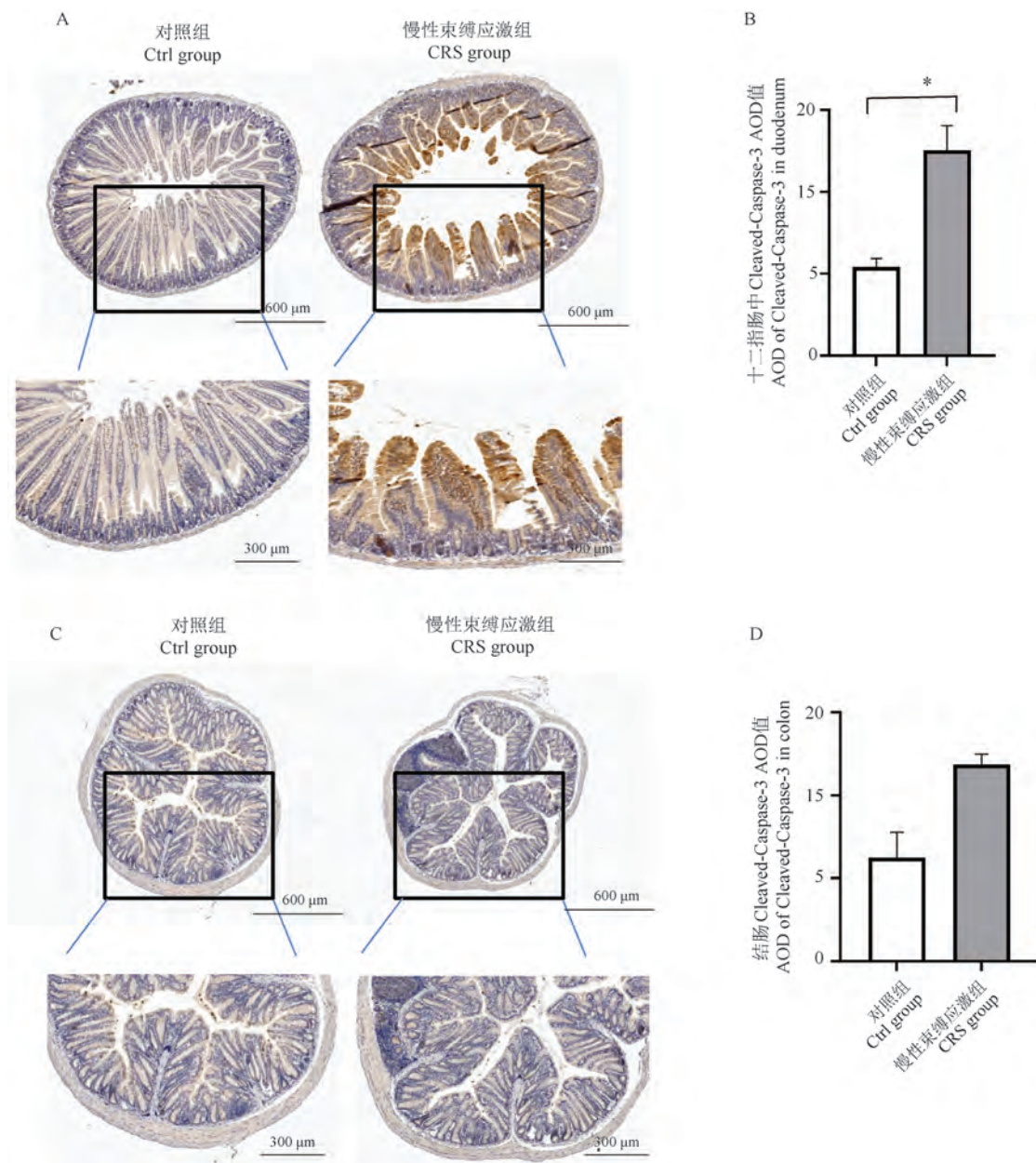


图 8 慢性束缚应激对小鼠十二指肠、结肠促凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达的影响($n = 3$)

Figure 8 Effect of chronic restraint stress on the expression of pro-apoptotic protein Cleaved-Caspase-3 in mouse duodenum and colon ($n = 3$)

低。Claudin-1、ZO-1 和 Occludin 是肠组织 TJ 的重要结构蛋白,其表达增加可降低肠通透性并保护肠屏障^[23]。应激可导致肠道屏障功能丧失、肠道通透性增加^[38]。CRS 可以模拟 IBS 患者腹泻症状、内脏超敏反应、肠粘膜屏障通透性降低、免疫调节功能障碍和生态失调的病理状态^[13,23]。本研究中,发现 14 d CRS 也可导致小鼠的肠粘膜以及肠屏障损伤,具体表现为十二指肠绒毛高度变短、隐窝结构异常、绒毛/隐窝比下降;结肠黏膜出现炎性细胞浸润,隐窝结构不规则。此外,肠道是机体营养吸收

的主要场所,肠屏障受损、功能障碍会影响营养物质的消化吸收,伴随身体不适厌食,这可能是小鼠暴露于 CRS 引起体重减轻的原因^[39]。有研究表明,CRS 处理后小鼠的体重减轻以及食物摄入减少^[30,33,40],CRS 和慢性不可预知温和应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 联合处理 3 周后,小鼠的摄食量明显减少,体重减轻^[41]。在本研究中也发现 CRS 模型小鼠体重出现了显著的降低。

束缚应激可诱导结肠炎动物模型中炎症的发展,对 IBD 啮齿动物模型的研究揭示了应激对肠道

炎症的显著影响^[20]。通过大量的研究发现,应激与肠道炎症和黏膜屏障损伤密切相关^[42]。束缚应激加重实验性结肠炎小鼠中结肠粘膜损伤的程度,慢性应激可驱动原发性肠道炎症,*IL-6* 和 *TNF- α* 显著上调^[36],且有研究表明束缚应激升高血浆 *IL-6* 水平^[43]。此外,慢性应激可通过引发炎症反应中涉及的组分(如 *TNF- α*)的产生而改变紧密连接蛋白表达^[30]。束缚应激使结肠组织中 *IL-1 β* 和 *TNF- α* 水平升高,*IL-5*、*IL-10* 和 *IL-22* 水平降低,暴露于束缚应激的小鼠炎性细胞因子 iNOS、*TNF- α* 和 *IL-1 β* 的表达水平显著增加^[6]。本研究发现,CRS 能够显著提高小鼠十二指肠和结肠炎性细胞因子及炎症标志物基因的表达,研究结果与前期报道一致^[6,30,36,43]。虽然已经证明束缚应激会加重肠道炎症,但其分子机制仍不清楚。有研究表明,氧化应激是 IBD 的病因之一^[10],束缚应激可在大鼠中诱导全身性氧化损伤^[20],慢性应激和高基础水平的应激激素都会导致外周疾病的发展,如肠道炎症^[11,44]。*IL-1 β* 是一种由巨噬细胞分泌的促炎细胞因子,与其他促炎细胞因子(如 *TNF- α* 和 *IL-6*)协同作用,以诱导 IBD 炎症,研究发现,*IL-10* 缺陷小鼠在自发性结肠炎发病前 *IL-1 β* 分泌增加^[45]。慢性束缚应激后基因表达显著上升的 *TNF- α* 是一种重要的促炎因子,*TNF- α* 作为肿瘤坏死因子(TNF)核心家族成员,是肠道上皮细胞增殖和凋亡的主要促炎因子,同时也是 IBD 中重要的调节因子^[30]。严重的炎症反应过程不仅可促使肠道出现较为明显的应激损伤,还会对动物长期的机体性能产生影响。

细胞凋亡可诱导上皮屏障损伤,肠上皮细胞凋亡是引起肠屏障功能障碍和免疫紊乱的重要机制^[46]。细胞凋亡是一种免疫沉默形式的细胞死亡,是抑制肠道进一步炎症的重要过程,且肠上皮细胞易受坏死性凋亡的影响^[47]。束缚应激可通过多种损伤途径损伤肠道,增加氧化应激,加重纤维化,增强炎症,甚至促进细胞凋亡^[11]。*Caspase 3* 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,能被凋亡信号活化,对凋亡相关蛋白进行专一性切割,从而失去抗凋亡活性,转变为促凋亡蛋白^[48-50]。有研究表明,应激诱导的妊娠猪中观察到肠组织中 Cleaved-*Caspase-3* 水平的显著增加,束缚应激后,妊娠猪肠道细胞增殖与凋亡的平衡被打破,束缚应激诱导妊娠猪肠道组织中 *Caspase-3* 表达相应增加,表明细胞凋亡增加损害了妊娠猪的肠粘膜屏障^[1]。高果糖

可加重束缚应激对肠粘膜屏障的损伤,降低肠道消化吸收能力,导致潘氏细胞缺陷,抑制抗菌肽的表达,增加肠道细胞凋亡^[51],氧化损伤诱导和触发细胞凋亡可引起分子损伤^[52]。此外,束缚应激诱导小鼠十二指肠上皮细胞的凋亡性细胞死亡,Cleaved-*Caspase-3* 阳性细胞显著增加^[9]。本研究结果发现,CRS 小鼠模型肠道 Cleaved-*Caspase-3* 的蛋白水平显著增加。以上结果提示,激活凋亡信号通路,促进肠道上皮细胞的凋亡,是 CRS 引起肠道屏障功能障碍的可能原因之一。

CRS 作为一种非损伤性刺激,既能较好地模拟人类产生应激及其导致身心疾病的过程,也能够适应应激状态由急性转入慢性的发展趋势^[53]。已构建的模型中,急性和慢性束缚实验有时间强度和束缚强度不同,时间强度有每天 1、2、3、6 h 等,应激强度的选择有连续 1、3、7、14、21 和 28 d 等^[10,21,30,40-41]。有研究证明,束缚 4 h、1 d 或 4 d 血浆皮质酮水平显著上升,炎症因子及紧密连接蛋白未见显著性差异^[27-28],而长时间束缚应激导致胃肠破坏和肠粘膜通透性增加^[10,21,29]。此外,研究表明长期束缚应激(> 14 d)多数用于构建 MDD 相关动物模型^[8,38,41,54],且长期 CRS 后机体产生了适应机制^[15,55],而多数研究的 CRS 模型缺少评价或肠道损伤的评价指标单一,聚焦于肠损伤的研究较少,且缺乏合适的动物模型一直是研究肠道疾病损伤机制的障碍。因此,需要一种应激强度足够、肠应激损伤明显的动物模型。构建小鼠慢性束缚肠应激损伤动物模型,通过一系列指标的检测,结果显示,CRS 可导致应激小鼠肠道组织结构异常、肠屏障功能障碍、肠上皮细胞凋亡,引发肠道炎症反应,提示 CRS 肠道损伤小鼠模型构建成功,但具体致病机制有待进一步深入揭示。

参 考 文 献(References)

- [1] XU W, LU J, CHEN Y, et al. Impairment of CRH in the intestinal mucosal epithelial barrier of pregnant *Bama* miniature pig induced by restraint stress [J]. *Endocr J*, 2021, 68(4): 485-502.
- [2] MOLINA-TORRES G, RODRIGUEZ-ARRASTIA M, ROMAN P, et al. Stress and the gut microbiota-brain axis [J]. *Behav Pharmacol*, 2019, 30(2-3): 187-200.
- [3] FISCHER I C, SHANAHAN M L, HIRSH A T, et al. The relationship between meaning in life and post-traumatic stress symptoms in US military personnel: a meta-analysis [J]. *J Affect Disord*, 2020, 277: 658-670.
- [4] PEREIRA A. Combat trauma and the diagnosis of post-traumatic

- stress disorder in female and male veterans [J]. *Mil Med*, 2002, 167(1): 23-27.
- [5] 夏锋, 冯正直. 军事应激研究进展与类战争身心应激模型建立的思考 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(24): 2335-2340.
- XIA F, FENG Z Z. Progress of military stress and thinking on establishment of a model of combat-like psychosomatic stress [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2017, 39(24): 2335-2340.
- [6] LIN R, WANG Z, CAO J, et al. Role of melatonin in murine "restraint stress"-induced dysfunction of colonic microbiota [J]. *J Microbiol*, 2021, 59(5): 500-512.
- [7] LU J, XU X, HUANG Y, et al. Prevalence of depressive disorders and treatment in China: a cross-sectional epidemiological study [J]. *Lancet Psychiatry*, 2021, 8(11): 981-990.
- [8] LI C C, YE F, XU C X, et al. Effect of *Radix Polygalae* extract on the colonic dysfunction in rats induced by chronic restraint stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 294: 115349.
- [9] CHUANG D J, PETHAPERUMAL S, SIWAKOTI B, et al. Activating transcription factor 3 protects against restraint stress-induced gastrointestinal injury in mice [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3530.
- [10] KOH S J, KIM J W, KIM B G, et al. Restraint stress induces and exacerbates intestinal inflammation in interleukin-10 deficient mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28): 8580-8587.
- [11] WANG T, GAO L, YANG Z, et al. Restraint stress in hypertensive rats activates the intestinal macrophages and reduces intestinal barrier accompanied by intestinal flora dysbiosis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1085-1110.
- [12] WILLIAMS C L, VILLAR R G, PETERSON J M, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94(3): 611-621.
- [13] CHEN Q, ZHANG H, SUN C Y, et al. Evaluation of two laboratory model methods for diarrheal irritable bowel syndrome [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 5.
- [14] KUGE T, GREENWOOD-VAN MEERVELD B, SOKABE M. Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: reversal by wood creosote [J]. *Life Sci*, 2006, 79(9): 913-918.
- [15] MASERE C, NAKADE Y, ZHENG J, et al. Chronic restraint stress has no more stimulatory effects on colonic motility in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 453(3): 147-150.
- [16] 冯文林, 伍海涛, 洪睦铿, 等. 中国国内肠易激综合征流行病学调查研究的现状 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(8): 685-687, 691.
- FENG W L, WU H T, HONG M K, et al. Current status of the epidemiological investigation of irritable bowel syndrome in China [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2017, 41(8): 685-687, 691.
- [17] 李晓青, 常敏, 许东, 等. 中国肠易激综合征流行病学调查现状分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(8): 734-739.
- LI X Q, CHANG M, XU D, et al. The current status of the epidemiological study of irritable bowel syndrome in China [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 22(8): 734-739.
- [18] 李彦楠, 杨丽旋, 赵钟辉, 等. 《2020 年中国肠易激综合征专家共识意见》解读 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(10): 1151-1155.
- LI Y N, YANG L X, ZHAO Z H, et al. Interpretation of expert consensus on irritable bowel syndrome in China in 2020 [J]. *Chin J Clin*, 2021, 49(10): 1151-1155.
- [19] BHATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(2): 329-354.
- [20] ISRAELI E, HERSHCIOVICI T, BERENSHTEIN E, et al. The effect of restraint stress on the normal colon and on intestinal inflammation in a model of experimental colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(1): 88-94.
- [21] ZHANG Y, W U S, LIU Y, et al. Acute cold water-immersion restraint stress induces intestinal injury and reduces the diversity of gut microbiota in mice [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 706849.
- [22] PENG Z, PENG S, LIN K, et al. Chronic stress-induced depression requires the recruitment of peripheral Th17 cells into the brain [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 186.
- [23] ZHANG Z, SHAO S, ZHANG Y, et al. Xiaoyaosan slows cancer progression and ameliorates gut dysbiosis in mice with chronic restraint stress and colorectal cancer xenografts [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 132: 110916.
- [24] SCUDERI S A, CASILI G, LANZA M, et al. Efficacy of a product containing xyloglucan and pea protein on intestinal barrier function in a partial restraint stress animal model [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2269.
- [25] WU W, SUN M, ZHANG H P, et al. Prolactin mediates psychological stress-induced dysfunction of regulatory T cells to facilitate intestinal inflammation [J]. *Gut*, 2014, 63(12): 1883-1892.
- [26] 马如飞. 束缚应激加重挤压伤大鼠肠道损伤及内质网应激蛋白的表达变化 [D]. 石家庄: 河北医科大学; 2016.
- MA R F. Restraint stress aggravates intestinal injury and changes of endoplasmic reticulum stress protein expression in rats with crush injury [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University; 2016.
- [27] LANGLOIS L D, ODDOUX S, AUBLÉ K, et al. Effects of glutamine, curcumin and fish bioactive peptides alone or in combination on intestinal permeability in a chronic-restraint stress model [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7220.
- [28] LEE C Y. Chronic restraint stress induces intestinal inflammation and alters the expression of hexose and lipid transporters [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(6): 385-391.
- [29] ZHAO Y, WANG C, YANG T, et al. Chlorogenic acid alleviates chronic stress-induced intestinal damage by inhibiting the

- P38MAPK/NF- κ B pathway [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71 (24): 9381–9390.
- [30] LI C C, GAN L, TAN Y, et al. Chronic restraint stress induced changes in colonic homeostasis-related indexes and tryptophan-kynurenine metabolism in rats [J]. J Proteomics, 2021, 240: 104190.
- [31] KHAN S, WALIULLAH S, GODFREY V, et al. Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(567): eaay6218.
- [32] YU J, LIU T, GUO Q, et al. Disruption of the intestinal mucosal barrier induced by high fructose and restraint stress is regulated by the intestinal microbiota and microbiota metabolites [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(2): e0469822.
- [33] CHIBA S, NUMAKAWA T, NINOMIYA M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 39(1): 112–119.
- [34] QIN H Y, CHENG C W, TANG X D, et al. Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(39): 14126–14131.
- [35] SEBASTIÁN DOMINGO J J. Síndrome del intestino irritable [J]. Med Clin (Barc), 2022, 158(2): 76–81.
- [36] CHEY W D, KURLANDER J, ESWARAN S. Irritable bowel syndrome: a clinical review [J]. JAMA, 2015, 313(9): 949–958.
- [37] XU X, HU H, ZENG H, et al. Sinisan ameliorates colonic injury induced by water immersion restraint stress by enhancing intestinal barrier function and the gut microbiota structure [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 598–609.
- [38] LIU Q F, KIM H M, LIM S, et al. Effect of probiotic administration on gut microbiota and depressive behaviors in mice [J]. Daru, 2020, 28(1): 181–189.
- [39] ZHANG W, JIAO L, LIU R, et al. The effect of exposure to high altitude and low oxygen on intestinal microbial communities in mice [J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0203701.
- [40] DENG Y, ZHOU M, WANG J, et al. Involvement of the microbiota-gut-brain axis in chronic restraint stress: disturbances of the kynurenine metabolic pathway in both the gut and brain [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1–16.
- [41] QIAO Y, ZHAO J, LI C, et al. Effect of combined chronic predictable and unpredictable stress on depression-like symptoms in mice [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(15): 942.
- [42] BILTZ R G, SAWICKI C M, SHERIDAN J F, et al. The neuroimmunology of social-stress-induced sensitization [J]. Nat Immunol, 2022, 23(11): 1527–1535.
- [43] NUKINA H, SUDO N, AIBA Y, et al. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice [J]. J Neuroimmunol, 2001, 115(1/2): 46–52.
- [44] MEENA A S, SHUKLA P K, RAO R, et al. TRPV6 deficiency attenuates stress and corticosterone-mediated exacerbation of alcohol-induced gut barrier dysfunction and systemic inflammation [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1093584.
- [45] LU Q, YANG M F, LIANG Y J, et al. Immunology of inflammatory bowel disease: molecular mechanisms and therapeutics [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 1825–1844.
- [46] LIU L, LIANG L, YANG C, et al. Extracellular vesicles of *Fusobacterium nucleatum* compromise intestinal barrier through targeting RIPK1-mediated cell death pathway [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1–20.
- [47] PATANKAR J V, BECKER C. Cell death in the gut epithelium and implications for chronic inflammation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(9): 543–556.
- [48] MCKENNA Z J, FENNEL Z J, BERKEMEIER Q N, et al. Exercise in hypobaric hypoxia increases markers of intestinal injury and symptoms of gastrointestinal distress [J]. Exp Physiol, 2022, 107(4): 326–336.
- [49] CHENG E H, KIRSCH D G, CLEM R J, et al. Conversion of Bcl-2 to a bax-like death effector by caspases [J]. Science, 1997, 278(5345): 1966–1968.
- [50] MCKENNA Z J, BELLOVARY B N, DUCHARME J B, et al. Circulating markers of intestinal barrier injury and inflammation following exertion in hypobaric hypoxia [J]. Eur J Sport Sci, 2023, 23(10): 2002–2010.
- [51] YU J, LIU T, GAO Z, et al. *Akkermansia muciniphila* colonization alleviating high fructose and restraint stress-induced jejunal mucosal barrier disruption [J]. Nutrients, 2022, 14 (15): 3164.
- [52] MAZZON E, CUZZOCREA S. Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294 (5): G1268-G1280.
- [53] WANG B, CHEN D, JIANG R, et al. TIP60 buffers acute stress response and depressive behaviour by controlling PPAR γ -mediated transcription [J]. Brain Behav Immun, 2022, 101: 410–422.
- [54] LI J, LI Y, DUAN W, et al. Shugan granule contributes to the improvement of depression-like behaviors in chronic restraint stress-stimulated rats by altering gut microbiota [J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(9): 1409–1424.
- [55] UEYAMA T, SAIKA M, KOREEDA C, et al. Water immersion-restraint stress induces expression of immediate-early genes in gastrointestinal tract of rats [J]. Am J Physiol, 1998, 275(2): G287-G295.

张静远,姜晓龙,崔淑芳. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建裸鼹鼠 HIF-1 α 基因敲除质粒及其功能验证 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 202-209.

ZHANG J Y, JIANG X L, CUI S F. Construction of HIF-1 α gene knockout plasmid and functional verification in naked mole rats based on CRISPR/Cas9 system [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 202-209.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.007

基于 CRISPR/Cas9 系统构建裸鼹鼠 HIF-1 α 基因敲除质粒及其功能验证

张静远,姜晓龙,崔淑芳*

(海军军医大学基础医学院实验动物学教研室,上海 200433)

【摘要】 目的 利用簇状规则间隔回文重复序列 (CRISPR)/Cas9 基因编辑系统构建质粒并敲除裸鼹鼠皮肤成纤维 (NSF skin fibroblasts, NSF) 细胞 HIF-1 α 基因,为研究裸鼹鼠的耐低氧机制及缺氧相关疾病的发生发展机制提供体外细胞模型。**方法** 针对裸鼹鼠 HIF-1 α 基因的 1 ~ 4 号外显子区域设计 4 对 sgRNA 序列,并成功构建表达质粒。筛选得到最优 sgRNA 后,转染 HEK-293T 细胞收集上清液测定病毒滴度。前期用 pLenti-Cas9 (blast) 病毒感染 NSF 细胞,后用制备的 HIF-1 α -sgRNA 病毒感染表达 Cas9 蛋白的 NSF 细胞。经药筛后观察荧光表达,同时提取细胞 gDNA 和蛋白。通过 T7E1 酶和 Western Blot 检测 NSF 细胞中 HIF-1 α 基因变化及蛋白表达情况。**结果** Sanger 测序显示,所设计的 sgRNA 成功插入到 pX459 和 pKLV2-U6-sgRNA2 载体上,序列验证正确,重组质粒构建成功;T7E1 酶切实验成功切除 3 条带,sgRNA 的打靶效率为 54%,Western Blot 结果表明,经药筛后的裸鼹鼠 NSF 细胞 HIF-1 α 基因敲除成功,蛋白水平显著降低 ($P = 0.0019$);且未发现 HIF-1 α 敲除细胞形态的明显变化,基因敲除对细胞增殖能力无明显影响。**结论** 成功构建靶向裸鼹鼠 HIF-1 α 基因的 CRISPR/Cas9 质粒,且质粒靶向敲除 HIF-1 α 基因功能验证成功,将有利于裸鼹鼠耐低氧机制研究,并为人类缺氧相关疾病防治提供理论依据。

【关键词】 裸鼹鼠;HIF-1 α ;基因敲除;CRISPR/Cas9 系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0202-08

Construction of HIF-1 α gene knockout plasmid and functional verification in naked mole rats based on CRISPR/Cas9 system

ZHANG Jingyuan, JIANG Xiaolong, CUI Shufang*

(Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Corresponding author: CUI Shufang. E-mail: youngstar_sf@163.com

【Abstract】 Objective To construct plasmids and knock out HIF-1 α gene expression in an naked mole rat skin fibroblasts (NSF) cell line using CRISPR/Cas9 genomic editing technology, to provide an *in vitro* cell model for studying the mechanism of hypoxia tolerance and the occurrence and development of hypoxia-related diseases in naked mole rats. **Methods** We designed four pairs of single guide RNA (sgRNA) sequences targeting exons 1 ~ 4 of the NSF HIF-1 α gene and successfully constructed an expression plasmid. The plasmid with the optimal sgRNA was identified and transfected into 293T cells, and the supernatant was used for detecting the virus titer. Lentivirus particles carrying sgRNAs

【基金项目】 全军实验动物专项 (SYDW[2018]18, SYDW[2018]17), 上海市军民融合发展专项 (2020-jmrh1-kj9)。

Funded by Military Experimental Animal Project (SYDW[2018]18, SYDW[2018]17), Shanghai Military-Civilian Integration Development Project (2020-jmrh1-kj9)。

【作者简介】 张静远,女,助教,硕士,研究方向:实验动物学。Email:457541734@qq.com

【通信作者】 崔淑芳,女,教授,研究方向:实验动物资源开发与疾病动物模型研究。Email:youngstar_sf@163.com

of HIF-1 α were transfected into NSF cells which express Cas9 protein, based on a previous protocol. After transfection, fluorescence signals were observed under a fluorescence microscope, and HIF-1 α expression in NSF cells was detected by Western Blot and T7 endonuclease 1 (T7E1) analysis. **Results** Sanger sequencing showed that the designed sgRNA was successfully inserted into pX459 and pKLV2-U6-sgRNA2 vectors, demonstrating successful construction of a recombinant plasmid for transfection. T7E1 digestion successfully removed three bands and the target efficiency of sgRNA was 54%. Western Blot showed that the HIF-1 α gene was successfully knocked out and its protein level was significantly reduced in NSF cells from naked mole rats ($P = 0.0019$). There were no obvious morphological changes in HIF-1 α -knockout cells under the microscope, and gene knockout had no obvious effect on cell proliferation. **Conclusions** We successfully constructed an HIF-1 α -knockout cell line using CRISPR/Cas9 technology, to provide an experimental basis for further studies of the biological function of HIF-1 α , as well as the mechanism of hypoxia tolerance in naked mole rats. The result also provide a theoretical foundation for the prevention and treatment of hypoxia-related diseases.

[Keywords] naked mole rat; HIF-1 α ; gene knockout; CRISPR/Cas9 technology
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

裸鼹鼠 (naked mole rat) 是已知寿命最长的啮齿类动物,最长寿命超过 30 年,其生活方式类似于蚂蚁为洞穴群居生物,每个社会群体可多达 300 多个社会成员^[1]。裸鼹鼠的这种生活方式使其可以在低氧、高二氧化碳的环境中生存。这种环境对于人和大多数哺乳动物而言都是致命的,会导致缺氧和高碳酸血症的发生^[2-3]。而裸鼹鼠表现出独特的生理特征,可抵抗生活在这种环境中的不利影响。其在缺氧环境中的优秀表现,吸引了很多学者的目光,也逐渐成为缺氧性病症研究的模式生物^[4]。

在生命体中约 1.0% ~ 1.5% 的基因组受缺氧的转录调控,缺氧诱导因子 (HIF)-1 α 是调节这些基因的转录因子,也是目前发现的唯一在特异性低氧状态下发挥活性的转录因子^[5]。基因编辑技术是一项可对生物基因组进行定向改造的新技术,是研究基因功能的有利手段^[6]。随着对基因编辑技术的不断探索,CRISPR/Cas9 系统逐渐取代早期的 TALEN 和 ZFN 技术,其以特异性强、基因编辑设计流程简化被广泛应用于多种物种的精确修饰^[7-9]。因此,本文以裸鼹鼠皮肤成纤维细胞 (NSF) 为研究对象,通过 CRISPR/Cas9 系统对 HIF-1 α 进行敲除,为裸鼹鼠耐低氧机制研究以及 HIF-1 α 在缺氧相关疾病的深入研究提供体外细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和载体

裸鼹鼠皮肤成纤维细胞由本实验室保存;主要载体 pX459-CRISPR-puro、pLenti-cas9-blast、pLenti-sgRNA、psPAX2、pMD2. G 均为实验室前期留存的载体。

1.1.2 主要试剂与仪器

细胞培养所需胎牛血清 (FBS)、青霉素/链霉素、DMEM (低糖)、0.25% 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态购自天根生化科技 (北京) 有限公司,DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 3000 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;抗体购自美国 Proteintech 公司,嘌呤霉素、杀稻瘟菌素购自美国 Sigma 公司,引物合成及测序委托上海生工生物工程有限公司进行。三气培养箱 (Esco,新加坡)、倒置荧光显微镜 (Leica,德国)、低温高速离心机 (Eppendorf,德国)、电泳仪及转膜系统 (Bio-Rad,美国)、凝胶成像系统 (天能,中国)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 的设计和合成

针对裸鼹鼠 HIF-1 α 基因序列及蛋白功能结构域,使用 CRISPR 在线设计工具,靶向 Exon1、Exon2、Exon3、Exon4 设计了 4 对 sgRNA 引物,分别为 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4 (见表 1),分别在其两端加上 BsmI 酶切位点。将序列送上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 sgRNA 筛选

将 pX459-CRISPR-puro 载体进行 BsmI 核酸内切酶酶切,胶回收后得到线性载体,分别与退火完成的 oligos 进行连接,然后将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,经涂板过夜培养后挑取 3 个单克隆菌落摇菌扩增,部分菌液测序鉴定,其他菌液进行质粒抽提,将重组质粒命名为 pX459-CRISPR-puro-sgRNA1、pX459-CRISPR-puro-sgRNA2、pX459-CRISPR-puro-sgRNA3、pX459-CRISPR-puro-sgRNA4,利用电化学转染的方法,按照 Neon 电转说明书进行

表 1 CRISPR/Cas9 敲除 HIF-1α 基因 sgRNA 引物序列

Table 1 CRISPR/Cas9 knocks out the sgRNA primer sequence of HIF-1α gene	
名称 Items	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
sgRNA1-F	CACCGCTCTTTGCTTCGCCGAGATCTGG
sgRNA1-R	AAACCCAGATCTCGGCGAAGCAAAGAGC
sgRNA2-F	CACCGGCCCTGGATGGCTTTGTTATGG
sgRNA2-R	AAACCCATAACAAAGCCATCCAGGGCC
sgRNA3-F	CACCGAGAAAAGTCTTGCTATCTAGAGG
sgRNA3-R	AAACCTCTAGATAGCAAGACTTTTCTC
sgRNA4-F	CACCGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGG
sgRNA4-R	AAACCCAGACATATCCACCTCTTTTGGC

电转,工作模式为 program 1,转染质粒用量为 1 μg,后利用嘌呤霉素筛选阳性细胞。

在 sgRNA 敲除靶点两端设计特异性检测引物(见表 2),对目的片段进行扩增,按照胶回收试剂盒对目的片段进行回收,退火之后进行 T7E1 酶切实验,分别加入 NEB buffer2 2.5 μL、T7E1 酶 1 μL、蒸馏水 2 μL,按照 37 ℃ 1 h、75 ℃ 5 min 进行反应,利用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切效果。通过 Image J 软件分析电泳条带灰度值,并按照公式 $f_{cut} = (b + c)/(a + b + c)$ 和 $indel(\%) = [1 - (1 - f_{cut})^{1/2}] \times 100$ 计算打靶效率,其中 a 是未被酶切条带灰度值,b 和 c 是酶切条带灰度值。

表 2 引物信息
Table 2 Primer information

名称 Items	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
HIF-1α-F-sg1	CATGTTTGTGCTCCCTTTTCG
HIF-1α-R-sg1	ATGCAGCCAGGCAAACTATT
HIF-1α-F-sg2	ACACAGGAAAAATAGATGCTGTAG
HIF-1α-R-sg2	CATTTCTCATGGTCACACGG
HIF-1α-F-sg3	GCTCATGTACTTAGCTGGGCA
HIF-1α-R-sg3	GGCTTCAGGATATATCATTCTGTTC
HIF-1α-F-sg4	GTGGGAGGTTTATTTTCAGCTATGC
HIF-1α-R-sg4	CTGACGTGGAAACCTAAGCCA

1. 2. 3 pLenti-sgRNA 重组表达载体的构建与鉴定

将 pLenti-sgRNA 载体进行 *BsmI* 核酸内切酶酶切,胶回收后得到线性载体,与优选的退火 sgRNA 双链 oligos 进行连接,然后将连接产物转化至 DH5α 感受态细胞,经涂板过夜培养后挑取 3 个菌落进行单克隆摇菌扩增,部分菌液测序鉴定,其他菌液进行质粒抽提,将重组质粒命名为 pLenti-sgRNA。

1. 2. 4 慢病毒包装

取对数生长期、汇合度为 70% ~ 80% 的 HEK-293T 细胞,分别将载体 pLenti-Cas9 (blast)、重组质

粒 pLenti-sgRNA 各 1 μg 和慢病毒包装质粒 psPAX2 (0.75 μg)、pMD2.G (0.25 μg) 加入到 Opti-MEM 培养基 (125 μL) 和 P3000 (5 μL) 的混合液中,充分混匀制成质粒混合液备用。将 Lipofectamine 3000 (10 μL) 加入到 Opti-MEM 培养基 (240 μL) 中,充分混匀制成 Lipofectamine 3000-Opti-MEM 混合液备用。将两种混合液按照体积 1 : 1 充分混匀,于室温静置 10 min。然后将静置后的混合液缓按照每孔 250 μL 的体积缓慢滴加到处于对数生长期、汇合度为 70% ~ 80% 的 293T 细胞培养孔中。轻柔混匀之后,于二氧化碳细胞培养箱静置培养。48 h 后收集上清液,超速离心后用 0.22 μmol/L 滤器过滤,测定病毒滴度,立即使用或 -80 ℃ 保存。

1. 2. 5 裸鼯鼠 NFS 细胞杀稻瘟菌素、嘌呤霉素筛选浓度测定及慢病毒感染

从二氧化碳培养箱中取出处于对数生长期、汇合度为 70% 的裸鼯鼠 NFS 细胞,PBS 洗 1 次,加入适量 0.25% 胰酶消化,室温条件下进行离心,然后加入细胞培养基进行重悬,充分混匀后进行细胞计数。将细胞按照 10^4 个/孔的浓度均匀铺板,于培养箱中静置培养 24 h。第 2 天按照 0.5、1.0、1.2、2.0、3.0、4.0、8.0 μg/mL 的浓度梯度配置含稻瘟菌素和嘌呤霉素新鲜完全培养基并进行换液,每个浓度设置 3 个复孔,继续培养 48 h,选择能够完全杀死 NFS 细胞的浓度作为杀稻瘟菌素的最适浓度。

培养 NSF 细胞,取对数生长期的 NSF 细胞接种于六孔板,待细胞融合度约 30% 时,加入适量 pLenti-Cas9 (blast) 慢病毒颗粒进行感染 24 h,之后进行杀稻瘟菌素筛选。将筛选获得的阳性细胞传代后,分别加入适量 pLenti-sgRNA 慢病毒颗粒再次感染,24 h 后换嘌呤霉素筛选培养基继续培养观察,72 h 后根据蓝色荧光蛋白表达情况,收集细胞提取细胞总蛋白。

1. 2. 6 细胞总蛋白的提取及 Western Blot 检测

弃去细胞培养液,用 4 ℃ PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次,使用 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 冰上静置 30 min。使用细胞刮刀收取细胞,于 4 ℃,12 000 r/min 条件下离心 15 min,留取上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒对提取的蛋白浓度进行定量分析,加入 5 × Loading buffer 100 ℃ 煮沸 5 min,之后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,恒流 200 mA 转至孔径为 0.22 μmol/L 的 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1.5 h。分别加入特异性抗 HIF-1α 抗体

(1 : 1000) 与抗 GAPDH 抗体 (1 : 5000), 于 4 ℃ 条件下静置 12 h, 然后使用 TBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 10 min, 然后于室温条件下静置 1.5 h, 再次进行 TBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 10 min, 最后通过化学发光显影系统观察蛋白的表达情况。

1.2.7 NSF 细胞 HIF-1 α 基因敲除及脱靶的鉴定
利用 sgRNA 敲除靶点两端设计特异性检测引物, 使用基因组试剂盒提取 NSF 细胞基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增, 产物进行 Sanger 测序, 并与参考序列进行对比。

1.2.8 CCK8 检测细胞增殖活性
根据 CCK8 试剂盒说明书所示, 使用 DMEM 将细胞 (野生型/基因敲除) 分别稀释至每毫升 2×10^4 个, 充分混匀后按照每孔 100 μ L 的体积接种到 96 孔培养板中, 空白孔只加 DMEM, 每组设置 3 个复孔, 于二氧化碳培养箱静置培养过夜后, 按照每孔 10 μ L 的体积加入 CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后通过酶标仪检测在 450 nm 波长处的吸光度 (OD₄₅₀)。

1.3 统计学分析
采用 Image J 1.52p 软件进行灰度分析, 向软件

中导入 Western Blot 条带图片, 并将其转化为灰度图片, 消除图片背景影响后选定区域进行灰度值测定, 然后将目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值。数据用 Graphpad Prism 9 进行绘图及单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 pX459-CRISPR-puro-HIF1 α -sgRNA 质粒鉴定和 sgRNA 筛选

针对 HIF-1 α 基因序列, 设计 4 对 sgRNA 序列 (sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4), 测序结果与所设计的 sgRNA 序列一致, 说明 pX459-CRISPR-puro-sgRNA1、pX459-CRISPR-puro-sgRNA2、pX459-CRISPR-puro-sgRNA3、pX459-CRISPR-puro-sgRNA4 和 pLenti-HIF1 α -sgRNA 重组质粒构建成功 (见图 1)。T7E1 酶切实验琼脂糖凝胶电泳结果显示, HIF-1 α -sg1、HIF-1 α -sg2、HIF-1 α -sg3、HIF-1 α -sg4 引物扩增后的 PCR 产物长度分别为 468、411、401、459 bp, 其中, HIF-1 α -sg2 的靶向片段经 T7E1 酶切后, 得到两条小片段, 大小分别为 220 bp 和 170 bp, 符合设

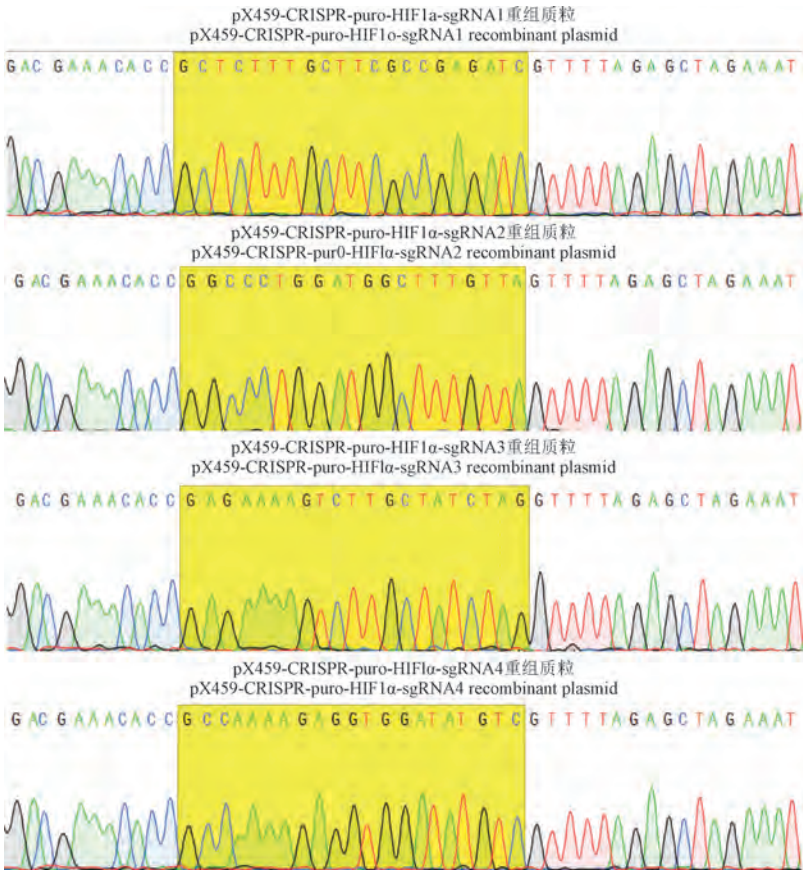


图 1 pX459-CRISPR-puro-HIF1 α -sgRNA 重组质粒
Figure 1 pX459-CRISPR-puro-HIF1 α -sgRNA recombinant plasmid

计预期。利用灰度分析和相关计算公式得出 sgRNA2 的打靶效率分别为 54%, 为 4 个 sgRNA 中最佳引物(见图 2)。

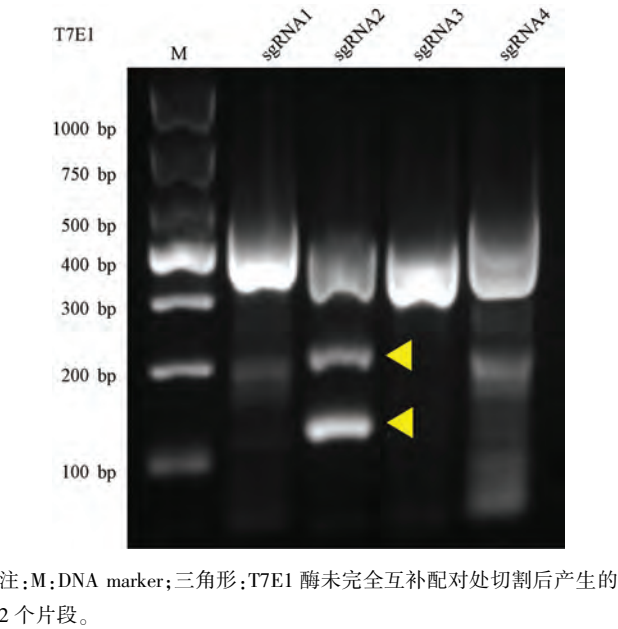


图 2 T7E1 酶切实验结果

Note. M. DNA marker. Triangular. Two fragments produced after cleavage where the T7E1 enzyme is not fully complemented by the pair.

Figure 2 T7E1 enzyme digestion experiment results

2.2 杀稻瘟菌素和嘌呤霉素筛选浓度测定

使用不同浓度的杀稻瘟菌素和嘌呤霉素完全培养基对裸鼹鼠 NFS 细胞药筛 48 h,对照组细胞保持良好的生长状态,但当嘌呤霉素浓度大于 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 以及杀稻瘟菌素浓度大于 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞达到完全死亡的状态。因此,分别选取 2.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为嘌呤霉素和杀稻瘟菌素作为裸鼹鼠 NFS 细胞最佳筛选浓度。

将筛选得到的 sgRNA2,退火连接到经 *BsmI* 限制性核酸内切酶切割形成的线性化 pLenti 表达载体上,挑选转染重组 pLenti 质粒成功的耐药阳性克隆菌株,通过菌液 PCR 鉴定为阳性克隆后,提取阳性克隆质粒并进行 Sanger 测序,如图 3 所示,sgRNA2 序列准确插入表达质粒,表明 pLenti-sgRNA2 表达载体构建成功。将质粒 pLenti-sgRNA2 与慢病毒包装质粒 psPAX2、pMD2. G 共转染 HEK-293T 细胞,分别于 24、48 h 进行 BFP 荧光观察,并收集细胞上清,超速离心收集病毒(见图 4)。

2.3 NSF 细胞 pLenti-sgRNA 慢病毒感染效果

利用 Lenti-Cas9-puro 慢病毒颗粒感染 NSF 细胞后,进行 BSD 筛选。筛选成功后将细胞按 1 : 2 传代,感染 pLenti-sgRNA2 慢病毒,24 h 后进行 puro 筛

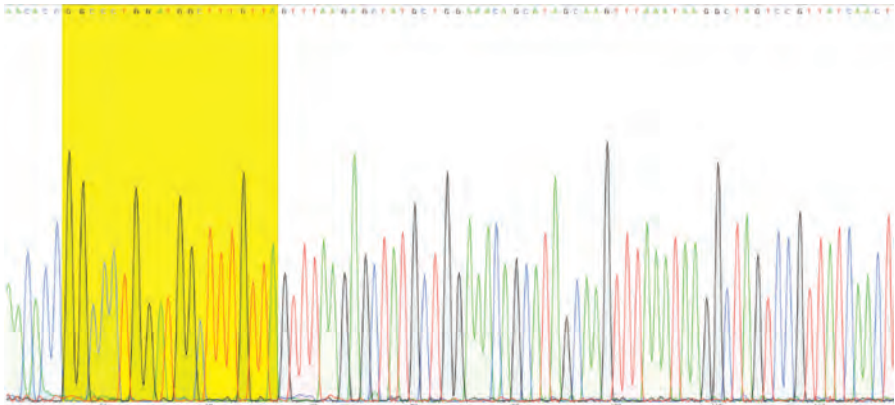


图 3 pLenti-sgRNA2 重组质粒

Figure 3 pLenti-sgRNA2 recombinant plasmid

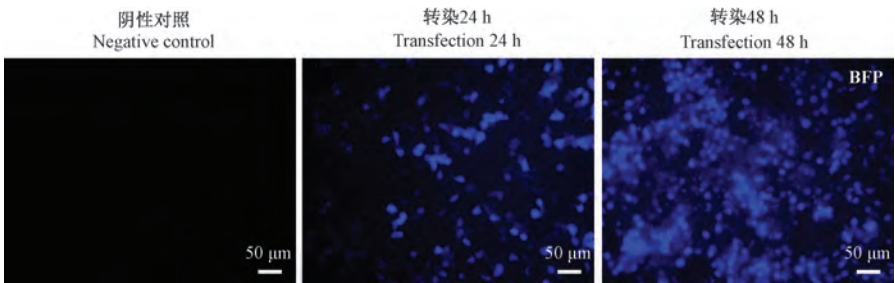


图 4 plenti-sgRNA 质粒阳性 293T 细胞

Figure 4 Plenti-sgRNA plasmid positive 293T cells

选,72 h 后,在荧光显微镜下观察到 80% 以上的 NSF 细胞能表达蓝色荧光蛋白,表明慢病毒能高效感染 NSF 细胞(见图 5)。

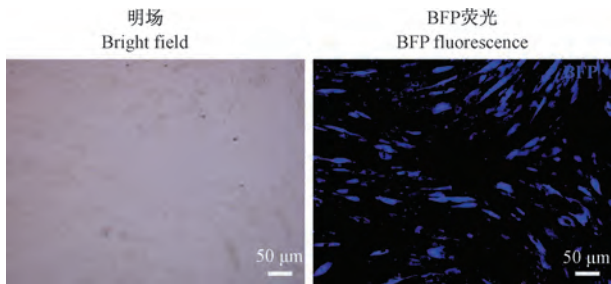


图 5 plenti-sgRNA2 阳性感染细胞图片
Figure 5 plenti-sgRNA2 positive infected cells

2.4 Western Blot 检测 NSF 细胞中 HIF-1α 表达

将经 pLenti-sgRNA2 慢病毒感染后的 NSF 细胞,加入 2.0 μg/mL 嘌呤霉素连续筛选 48 h,将出现抗嘌呤霉素的阳性细胞 1 : 2 传代,获得 NSF-HIF-1α KO1、NSF-HIF-1α KO2,分别提取 NSF-WT

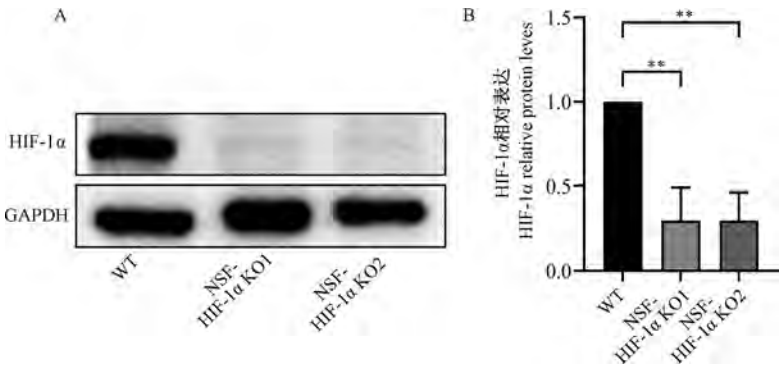
及 NSF-HIF-1α KO1、NSF-HIF-1α KO2 细胞蛋白,通过 Western Blot 检测 HIF-1α 蛋白表达水平,结果显示,与对照组相比,实验组 pLenti-sgRNA2 混合细胞中 HIF-1α 的表达明显减少,说明成功得到了 HIF-1α 敲除的 NSF 细胞(见图 6)。

2.5 NSF 细胞基因组 DNA HIF-1α 基因检测

为进一步验证基因组 DNA 突变,利用在敲除靶点两端设计敲除检测引物 HIF-1α-sg2(见表 3),提取 NSF-HIF-1α KO1、NSF-HIF-1α KO2 细胞 DNA,通过 PCR 鉴定后纯化产物并测序,可见在 sgRNA 靶点处出现明显重叠峰,说明有效突变产生(见图 7)。

2.6 敲除 HIF-1α 对 NSF 细胞增殖活性的影响

利用 CCK8 试剂盒检测野生型 NSF 细胞和 NSF-HIF-1α-KO1、NSF-HIF-1α-KO2 细胞的增殖情况。结果显示,NSF 细胞对照组和 HIF-1α 敲除组细胞的 OD₄₅₀ 无显著性差异(见图 8),表明 HIF-1α 基因敲除后对 NSF 细胞增殖活性无显著影响。



注:A;WT 细胞、NSF-HIF-1α KO1 细胞、NSF-HIF-1α KO2 细胞 HIF-1α 蛋白 Western Blot 结果;B:Image J 灰度分析,相对定量统计;与 WT 组相比,** $P < 0.01$ 。

图 6 NSF 细胞中 HIF-1α 蛋白表达水平($n = 3$)

Note. A. WT cells, NSF-HIF-1α KO1 cells, NSF-HIF-1α KO2 cell HIF-1α protein expression. B. Image J grayscale analysis, relative quantitative statistical chart. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 6 HIF-1α in NSF cells protein expression level($n = 3$)

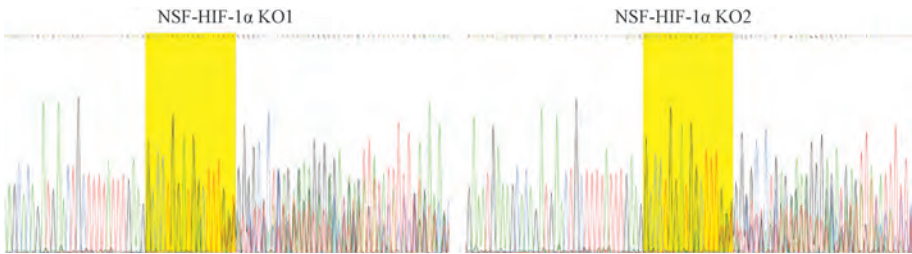


图 7 HIF-1α 基因敲除 NSF 细胞测序峰图

Figure 7 Sequencing peak map of HIF-1α gene knockout NSF cells

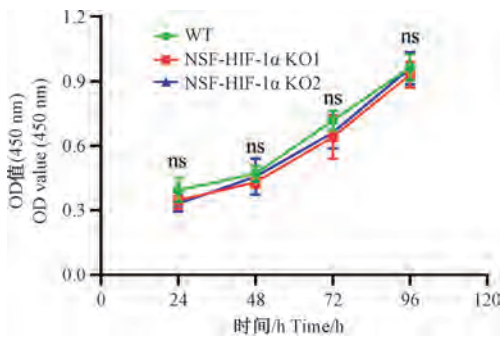


图 8 HIF-1 α 基因敲除对 NSF 细胞增殖活性的影响

Figure 8 Effect of HIF-1 α gene knockout on the proliferation activity of NSF cells

3 讨论

缺氧或低氧水平是影响人类许多疾病病理的重要微环境,包括肿瘤、糖尿病、衰老和心脑血管疾病等^[10-13]。缺氧诱导因子(HIF)在维持氧稳态方面起着重要作用,其通过诱导细胞向缺氧代谢表的特定遗传转换,促进细胞在缺氧条件下的适应和存活^[14]。HIF 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基共同组成异二聚体,其活性主要由 HIF-1 α 亚基的稳定性决定^[15]。在常氧条件下,HIF-1 α 组成性降解,而在低氧条件下,它的结构稳定并转移到细胞核中,协调基因表达。因此,在缺氧条件下,HIF-1 α 可准确地感知氧浓度的降低,进而调节细胞内稳态^[16]。裸鼹鼠由于独特的生存环境,使其具备超强的低氧耐受能力,前期研究也发现裸鼹鼠组织中保持着高水平的 HIF-1 α 蛋白的表达和积累,同时,缺氧相关病理现象的消失也使其成为耐低氧机制研究的理想模型^[17]。皮肤是裸鼹鼠抵御外界损伤的第一道防线,是最大的器官,而皮肤成纤维细胞是组成皮肤的重要细胞和结构成分。为了进一步探究 HIF-1 α 在裸鼹鼠耐低氧特性中的调控机制,本研究利用 CRISPR/Cas9 技术,体外敲除裸鼹鼠皮肤成纤维细胞中 HIF-1 α 基因,为 HIF-1 α 相关机制以及缺氧相关疾病的研究提供全新的细胞模型。

CRISPR/Cas9 系统是基于 gRNA 识别序列位点,利用 Cas9 蛋白靶向进行切割来实现基因编辑。自 1987 年 Crispr/Cas9 系统的问世,基因编辑进入了一个新时代^[18]。低成本、高效、简便和广适用性,使其在动植物、细菌以及病毒等不同领域得到了快速发展,也为生命科学研究提供了极大的便利^[9]。在 CRISPR/Cas9 基因编辑研究领域中,皮肤成纤维细胞成为应用较为广泛的细胞种类之一。

SHANDILYA 等^[19]使用 CRISPR/Cas9 技术对 HSF-1 和 Na/K-ATP 酶 α 1 亚基的编辑,从而降低了体外牛皮肤成纤维细胞对热休克的抵抗能力。罗洪等^[20]基于 CRISPR/Cas9 系统建立 DNA 结合抑制因子 3 基因敲除人皮肤成纤维细胞系。冯新宇等^[21]利用 CRISPR/Cas9 系统敲除绵羊皮肤成纤维细胞 Wnt2 基因以进一步研究。本研究基于 CRISPR/Cas9 系统,利用慢病毒转染技术首次实现对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞的基因编辑。慢病毒转染是转染技术不断进步和发展的良好产物,与电穿孔和脂质体转染不同,通过慢病毒载体将外源基因带入并整合到宿主基因组中,在大大提高转染效率的同时降低细胞损伤^[22]。本实验成功构建了靶向 HIF-1 α 慢病毒表达载体,通过 HEK-293T 细胞分别制备 Cas9 和 gRNA 病毒,经感染,构建了稳定表达 Cas9 的 NSF 细胞。随后将 gRNA 转入表达 Cas9 蛋白的 NSF 细胞中,构建了 HIF-1 α 敲除的 NSF 细胞模型。经嘌呤霉素筛选获得 HIF-1 α 敲除的混合细胞库,进一步利用 Western Blot 检测显示混合细胞株的 HIF-1 α 蛋白表达与未转染组的 NSF 细胞相比显著降低,提示 HIF-1 α 基因成功敲除。

本研究成功构建了靶向 NSF 细胞 HIF-1 α 基因的 CRISPR/Cas9 质粒,并顺利敲除了 NSF 细胞中的 HIF-1 α 基因,为后续利用 CRISPR/Cas9 系统构建基因编辑裸鼹鼠动物模型奠定了实验基础。同时,也为 HIF-1 α 下游靶基因筛选和机制研究提供了细胞模型。

参 考 文 献(References)

[1] GRAHAM R J, MEGAN S, ROCHELLE B. Naked Mole-Rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age [J]. eLife, 2018, 7: e31157.

[2] ZIONS M, MEEHAN E F, KRESS M E, et al. Nest carbon dioxide masks GABA-dependent seizure susceptibility in the naked mole-rat [J]. Curr Biol, 2020, 30(11): 2068-2077.

[3] 肖邦, 赵善民, 林丽芳, 等. 裸鼹鼠不同组织中低氧相关基因的表达 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(5): 400-404, 410.

XIAO B, ZHAO S M, LIN L F, et al. Comparative effects of hypoxia on autophagy and apoptosis of naked mole rat fibroblasts [J]. Lab Anim Comp Med, 2014, 34(5): 400-404, 410.

[4] PARK T J, REZNICK J. Extreme physiology extreme tolerance to hypoxia, hypercapnia, and pain in the naked mole-rat [J]. J Muscle Res Cell Motil, 2023, 44(2): 61-72.

[5] WANG G L, JIANG B H, RUE E A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92

(12): 5510–5514.

[6] DONOHOUE P D, BARRANGOU R, MAY A P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-cas systems [J]. Trends Biotechnol, 2018, 36(2): 134–146.

[7] GUPTA S K, SHUKLA P. Gene editing for cell engineering: trends and applications [J]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37(5): 672–684.

[8] LAHR W S, SIPE C J, SKEATE J G, et al. CRISPR-Cas9 base editors and their current role in human therapeutics [J]. Cytotherapy, 2023, 25(3): 270–276.

[9] ZHU Y. Advances in CRISPR/Cas9 [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 9978571.

[10] SHARMA A, SINHA S, SHRIVASTAVA N. Therapeutic targeting hypoxia-inducible factor (HIF-1) in cancer: cutting gordian knot of cancer cell metabolism [J]. Front Genet, 2022, 13: 849040.

[11] WIGERUP C, PÅHLMAN S, BEXELL D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer [J]. Pharmacol Ther, 2016, 164: 152–169.

[12] WU Q, YOU L, NEPOVIMOVA E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 77.

[13] YU B, WANG X, SONG Y, et al. The role of hypoxia-inducible factors in cardiovascular diseases [J]. Pharmacol Ther, 2022, 238: 108186.

[14] XIA Y, CHOI H K, LEE K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2012, 49: 24–40.

[15] GRADIN K, MCGUIRE J, WENGER R H, et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(10): 5221–5231.

[16] KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(5): 1469–1480.

[17] 杨文静, 崔淑芳. 普通级封闭群裸鼠种群的建立及其生物学特性的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 518–522.

YANG W J, CUI S F. Establishment of a closed colony of conventional naked mole-rats and progress in research of their biological characteristics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 518–522.

[18] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5429–5433.

[19] SHANDILYA U K, SHARMA A, SODHI M, et al. Editing of *HSF-1* and *Na/K-ATPase* $\alpha 1$ subunit by CRISPR/Cas9 reduces thermal tolerance of bovine skin fibroblasts to heat shock *in vitro* [J]. Anim Biotechnol, 2023, 34(8): 3626–3636.

[20] 罗洪, 陈美桦, 王林旭, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统建立 DNA 结合抑制因子 3 基因敲除人皮肤成纤维细胞系 [J]. 军事医学, 2023, 47(7): 493–499.

LUO H, CHEN M H, WANG L X, et al. Construction of inhibitor of DNA binding 3 gene knockout human skin fibroblast cell line based on CRISPR/Cas9 system [J]. Mil Med Sci, 2023, 47(7): 493–499.

[21] 冯新宇, 袁超, 郭婷婷, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除绵羊皮肤成纤维细胞 Wnt2 基因的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(2): 52–55.

FENG X Y, YUAN C, GUO T T, et al. Knockout of Wnt2 in the primary cell of sheep skin fibroblast via the CRISPR/Cas9 system [J]. Anim Husb Vet Med, 2018, 50(2): 52–55.

[22] PERRY C, RAYAT A C M E. Lentiviral vector bioprocessing [J]. Viruses, 2021, 13(2): 268.

[收稿日期] 2023-05-09

石鑫,张敬坡,陈虎,等. WNK2 通过抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路延缓肝细胞癌的增殖和侵袭 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 210-218.

SHI X, ZHANG J P, CHEN H, et al. WNK2 delays the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma by inhibiting the ERK1/2/ROS/SHP2 signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 210-218.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.008

WNK2 通过抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路延缓肝细胞癌的增殖和侵袭

石鑫*, 张敬坡, 陈虎, 王威, 闫丙政

(河北医科大学第一医院肝胆胰外科, 石家庄 050000)

【摘要】目的 探讨 WNK2 对肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路的影响,并探讨其在 HCC 细胞增殖和迁移中的作用。**方法** 将 WNK2-mimic 和 sh-RNA WNK2 以及相应的阴性对照转染 HepG2 细胞,采用 BALB/c 裸鼠皮下成瘤实验检测 WNK2 对肝细胞癌增殖能力的影响;采用 Western Blot 检测瘤组织中 WNK2、p40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达;使用 SHP2 抑制剂 PHPS1 进行处理之后,采用 Western Blot 检测 HepG2 细胞中 WNK2、p40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达;使用细胞划痕实验和 Transwell 检测 HepG2 细胞的迁移能力和侵袭能力;采用单克隆增殖实验和 CCK-8 检测 HepG2 细胞的增殖能力。**结果** 与 sh-NC 组相比,sh-RNA WNK2 组裸鼠的瘤体体积显著增大 ($P < 0.01$);而与 NC-mimic 组相比,WNK2-mimic 组裸鼠的瘤体体积显著减小 ($P < 0.01$);Western Blot 结果显示,与 sh-NC 组相比,sh-RNA WNK2 组 WNK2 的表达显著降低 ($P < 0.01$),p40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达显著升高 ($P < 0.01$);而与 NC-mimic 组相比,WNK2-mimic 组 WNK2 的表达显著升高 ($P < 0.01$),p40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达显著降低 ($P < 0.01$);在体外实验当中,相对于 sh-NC 组,sh-RNA WNK2 组中 WNK2 的表达显著降低 ($P < 0.01$),p40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达显著升高 ($P < 0.01$);相对于 sh-NC + PHPS1 组,sh-RNA WNK2 + PHPS1 组中 WNK2 的表达显著降低 ($P < 0.01$),而 p40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达则被逆转并且与 sh-NC + PHPS1 组不具有显著性差异 ($P > 0.05$);细胞划痕实验和 Transwell 结果显示,相对于 sh-NC 组,sh-RNA WNK2 组 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力显著升高 ($P < 0.01$);sh-NC + PHPS1 组和 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力显著降低并且不具有显著性差异 ($P > 0.05$);单克隆增殖实验结果显示,相对于 sh-NC 组,sh-RNA WNK2 组 HepG2 细胞的增殖能力显著升高 ($P < 0.01$),而 sh-NC + PHPS1 组和 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组 HepG2 细胞的增殖能力显著降低并且不具有显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** WNK2 可以抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路,从而抑制 ERK1/2/AKT 信号通路,延缓 HCC 的增殖和迁移。

【关键词】 肝细胞癌;WNK2;ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路;增殖;侵袭

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0210-09

WNK2 delays the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma by inhibiting the ERK1/2/ROS/SHP2 signaling pathway

SHI Xin*, ZHANG Jingpo, CHEN Hu, WANG Wei, YAN Bingzheng

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Corresponding author: SHI Xin. E-mail: shixin2008@sina.cn

【基金项目】 河北省卫计委医学科学研究重点课题计划 (20210956)。

Funded by the Key Project of Medical Science Research of Hebei Health and Family Planning Commission (20210956).

【作者简介】 石鑫, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 肝胆胰疾病的微创治疗。Email: shixin2008@sina.cn

[Abstract] Objective To investigate the effect of WNK2 on the ERK1/2/ROS/SHP2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma (HCC) and to explore its role in cell proliferation and migration in HCC. **Methods** HepG2 cells were transfected with WNK2-mimic, sh-RNA WNK2, and corresponding negative control. The effect of WNK2 on the proliferation of HCC was examined by subcutaneous tumorigenesis assay in BALB/c nude mice. The expressions of WNK2, p40, gp90, p-SHP2, p-AKT, and p-ERK1/2 in tumor tissues were detected by Western Blot. After treatment with SHP2 inhibitor PHPS1, the expressions of WNK2, P40, gp90, p-SHP2, p-AKT, and p-ERK1/2 in HepG2 cells were detected by Western Blot. The migration ability and invasion ability of HepG2 cells were detected by cell scratch assay and Transwell. The proliferation ability of HepG2 cells was detected by monoclonal proliferation assay. **Results** Compared with the sh-NC group, the tumor volume of nude mice in the sh-RNA WNK2 group was significantly increased ($P < 0.01$); Compared with the NC-mimic group, the tumor volume of nude mice in the WNK2-mimic group was significantly reduced ($P < 0.01$). Western Blot result showed that compared with the sh-NC group, the expression of WNK2 in the sh-RNA WNK2 group was significantly decreased ($P < 0.01$), while the expressions of p40, gp90, p-SHP2, p-AKT and p-ERK1/2 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the NC-mimic group, the expression of WNK2 was significantly increased in the WNK2-mimic group ($P < 0.01$), and the expressions of p40, gp90, p-SHP2, p-AKT, and p-ERK1/2 were significantly decreased ($P < 0.01$). *In vitro* experiment, compared with the sh-NC group, the expression of WNK2 was significantly decreased in the sh-RNA WNK2 group ($P < 0.01$), while the expressions of p40, gp90, p-SHP2, p-AKT and p-ERK1/2 were significantly increased in the sh-RNA WNK2 group ($P < 0.01$). Compared with the sh-NC + PHPS1 group, the expression of WNK2 was significantly decreased in the sh-RNA WNK2 + PHPS1 group ($P < 0.01$), while the expressions of p40, gp90, p-SHP2, p-AKT, and p-ERK1/2 were reversed and had no significant differences compared with the sh-NC + PHPS1 group ($P > 0.05$). The cell scratch assay and Transwell result showed that the migration and invasion ability of HepG2 cells in the sh-RNA WNK2 group was significantly increased compared with the sh-NC group ($P < 0.01$). The migration and invasion ability of HepG2 cells in the sh-NC + PHPS1 group and sh-RNA WNK2 + PHPS1 group were significantly decreased with no significant difference ($P > 0.05$). The result of the monoclonal proliferation experiment showed that the proliferation capacity of HepG2 cells in the sh-RNA WNK2 group was significantly increased compared with the sh-NC group ($P < 0.01$), while the proliferation ability of HepG2 cells in the sh-NC + PHPS1 group and sh-RNA WNK2 + PHPS1 group was significantly decreased with no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** WNK2 can inhibit the ERK1/2/ROS/SHP2 signaling pathway, thereby inhibiting ERK1/2/Akt signaling and delaying the proliferation and migration of HCC.

[Keywords] hepatocellular carcinoma; WNK2; ERK1/2/ROS/SHP2 signaling pathway; proliferation; invasion

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

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球癌症相关死亡的第四大常见原因^[1]。HCC 的危险因素包括慢性乙型肝炎、丙型肝炎和代谢性肝病等^[2-4]。早期 HCC 可以通过局部消融、手术切除或肝移植来治愈。具体的治疗方法与肿瘤特征、潜在肝功能障碍的严重程度以及年龄有关^[4-5]。而对于处于中期和晚期的患者,使用免疫治疗法被证明是一种有效治疗方法。

外源性信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 是一种重要的丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路中的成员。这是一种在细胞内被激活的激酶,可以响应细胞外的多种信号,包括生长因子、细胞因子和应激信号等。ERK1/2 在细胞中发挥着多种重要的生物学功能,主要涉及细胞增

殖、分化、存活和转移等过程。在癌症中,ERK1/2 信号通路常常被发现异常激活,从而促进癌细胞的增殖、侵袭和转移^[6-7]。同时,有研究发现 ERK1/2 信号可以促进氧化应激^[8-9]。

含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase 2, SHP2) 是一种广泛表达的细胞内酶。SHP-2 已被证明参与肿瘤细胞中的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)/ERK1/2 和磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号级联反应。ERK1/2/AKT 信号通路的激活可以促进基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达,从而抑制细胞的凋亡^[10-11]。有研究表明,当氧化应激水平升高时,SH-2 的表达会被促进^[12]。SHP-2 可以通过促进 ERK1/2/AKT 信号通路来促进肿瘤细胞的成熟^[13]。

WNK 赖氨酸缺陷型蛋白激酶 2 (WNK lysine-

deficient protein kinase 2, WNK2) 是一种细胞质丝氨酸-苏氨酸激酶, 属于蛋白激酶超家族。WNK 激酶在调控氧化应激水平、细胞周期进展、代谢适应、抗细胞凋亡、侵袭和转移中起重要作用^[14]。WNK2 的表观遗传沉默作用已在胶质瘤、脑膜瘤和胰腺导管腺癌中已经被证实^[15-16]; 有研究发现, WNK2 可以通过抑制 ERK1/2 的激活从而抑制 HCC 的发展^[17]。

因此, 本次研究主要是探索 WNK2 对 HCC 恶性功能的影响, 并且探究其具体的作用机制, 为 HCC 患者的免疫治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 (nude mice), 体重 17 ~ 19 g, 购自河南斯克贝斯生物科技有限公司【SCXK(豫)2020-0005】。饲养于河北省人民医院动物中心【SYXK(冀)2020-005】。饲养期间各组裸鼠自由饮水, 饲喂无菌饲料。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定 50%, 温度控制在 25℃。所有操作均符合河北医科大学实验伦理学要求(20230520)。

1.1.2 细胞

人 HCC 细胞系 HepG2 (CL-0103)。

1.1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清 (164210-50)、DMEM 培养基 (PM150410) 以及青霉素-链霉素 (PB180120) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (中国); Lipofectamine 3000 购自赛默飞世尔科技有限公司 (L3000015, 美国); WNK2 (Abcam, ab239037, 1 : 1000)、P40 (ab203826, 1 : 1000)、gp90 (ab243894, 1 : 1000)、p-SHP2 (ab62322, 1 : 1000)、p-AKT (ab38449, 1 : 1000)、p-ERK1/2 (ab17942, 1 : 1000)、GAPDH (ab128915, 1 : 10000)、HRP 抗兔 IgG 抗体 (ab288151, 1 : 2000) 购自 Abcam (英国); RIPA 裂解液购自碧云天公司 (P0013K, 中国); sh-RNA WNK2 购自广州锐博生物科技有限公司 (中国), 序列为 CAAGGACAATGGAGCCATA; 慢病毒由擎科生物技术有限公司包装合成 (中国); WNK2 过表达质粒由上海吉凯基因科技有限公司提供 (中国), PHPS1 购自 MCE (HY-112368, 美国)。Transwell 小室 3450 购自美国 Corning 公司,

Multiskan™ FC 酶标仪 51119180ET 以及 iBright CL1500 成像系统购 A44114 自赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染

将 HepG2 细胞复苏后, 于 DMEM 培养基中进行培养, 加入 10% 胎牛血清以及 1% 的青霉素-链霉素, 然后置于 37℃、5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中进行培养。在细胞传代两次后, 取对数生长期的细胞进行实验, 将 HepG2 细胞以 1×10^5 个/孔的密度培养于 6 孔板, 等到 HepG2 细胞的汇合度达到 60% 时, 将 sh-RNA WNK2 和 WNK2 过表达质粒以及相应的阴性对照使用 Lipofectamine 3000 按操作说明分别转染进 HepG2 细胞中, 转染 6 h 后, 换完全培养基进行培养, 将其分为 sh-NC 组、sh-RNA WNK2 组、NC-mimic 组和 WNK2 mimic 组, 然后将一批 sh-NC 组、sh-RNA WNK2 组的 HepG2 细胞中加入 PHPS1 (SHP2 抑制剂, 30 μ mol/L)^[18], 作为 sh-NC + PHPS1 组和 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组。

1.2.2 裸鼠皮下成瘤

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 胰酶消化后使用 PBS 清洗, 细胞悬液浓度为 2×10^5 /mL, 将细胞悬液注射进裸鼠的皮下, 在接种时, 注意针头刺入皮下距离 1 cm 左右, 在皮下左右滑动, 以利于 HepG2 细胞接种成团, 减少注射后细胞悬液从针眼溢出, 将裸鼠分为 sh-NC 组、sh-RNA WNK2 组、NC-mimic 组和 WNK2-mimic 组, 每周 2 次测量其体积, 裸鼠在接种 30 d 后处死。

1.2.3 细胞划痕实验

将各组的 HepG2 细胞分别置于条件相同的培养基中培养, 然后接种于 6 孔板中并培养直至融合度达到 100%。使用新的 20 μ L 移液器吸头在培养皿底部用记号笔慢慢地划出 3 个平行的直线划痕。由此产生的间隙距离被认为等于尖端末端的外径。在 0 h 和 48 h 测量细胞划痕, 使用 Image J 对划痕数值进行测量分析。

1.2.4 Transwell 实验

迁移实验: 将不含 FBS 的 DMEM 培养基中的 8×10^3 个细胞添加到插入物的上室中。侵袭实验: 将不含 FBS 的 DMEM 培养基中的 5×10^4 个细胞添加到预涂有基质胶的上室中。将含有 20% FBS 的 DMEM 培养基放置在下腔室中。将细胞孵育 8 h 进行迁移测定, 将细胞孵育 20 h 进行侵袭测定。然后, 固定细胞并用 0.1% 结晶紫染色, 并用棉签去除

非侵入细胞。然后对细胞数量进行测定。

1.2.5 单克隆增殖实验

取生长状态良好的 HepG2 细胞,待细胞在 6 孔板中的汇合度达到 80%时,常规消化细胞,重悬细胞沉淀,进行细胞计数,调整细胞数量为 1.0×10^5 个,取 200 μL 细胞悬液接种平皿,补加细胞培养液至 6 mL;放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵化箱常规培养 2 周;当出现肉眼可见的克隆大于 50 个时终止培养,弃去培养基;每孔加入 5 mL 甲醇固定 15 min,弃去固定液,每孔加入吉姆萨染液染色 20 min,自来水冲洗,空气干燥;对每孔拍照,存档;使用 Image J 软件打开图片,进行细胞计数。

1.2.6 Cell Counting Kit-8 (CKK-8)

将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化稀释,用细胞计数板计数细胞,用完全培养液制备密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬浮液,每孔 100 μL 接种到 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中。在细胞贴壁后,分别培养 24 h 和 48 h。用 100 μL 新鲜完全培养基代替旧培养基,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂。平板在黑暗中孵育 2 h,在酶标仪 450 nm 处检测细胞活力。重复实验 3 次,进行统计分析并绘图。

1.2.7 Western Blot

将各组的肿瘤组织和 HepG2 细胞使用 RIPA 进行裂解,提取蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,总蛋白通过 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。封闭后加入一抗 WNK2 (ab239037, 1 : 1000)、P40 (ab203826, 1 : 1000)、gp90(ab243894, 1 : 1000)、p-SHP2 (ab62322, 1 : 1000)、p-AKT (ab38449, 1 : 1000)、p-ERK1/2 (ab17942, 1 : 1000)、GAPDH (ab128915, 1 : 10000),再加入二抗 HRP 抗兔 IgG 抗体(ab288151, 1 : 2000),加入 ECL 显色液,曝光显影,使用 Image J 对蛋白条带的灰度值进行分析。

1.3 统计学分析

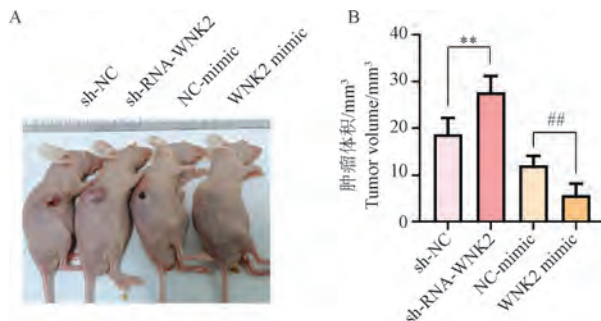
使用 SPSS 25.0 和 GraphPad prism 9.0 用于数据分析和处理。测量数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$),并采用 χ^2 检验分析多组间比较,独立样本 t 检验分析两组比较。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 WNK2 抑制 HCC 的发展

裸鼠皮下成瘤实验结果显示,相对于 sh-NC 组, sh-RNA WNK2 组裸鼠在 30 d 时肿瘤的体积显著增大,具有显著性差异 ($P < 0.01$);而相对于 NC-

mimic 组, WNK2 mimic 组的肿瘤的体积显著减小 ($P < 0.01$), WNK2 mimic 组较 NC-mimic 组差异具有显著性,说明 WNK2 可以抑制 HCC 的发展(见图 1)。



注:与 sh-NC 组相比, ** $P < 0.01$;与 NC-mimic 组相比, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 裸鼠皮下成瘤实验结果 ($n = 6$)

Note. Compared with the sh-NC group, ** $P < 0.01$; Compared with the NC-mimic group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Results of subcutaneous tumor formation assay in nude mice ($n = 6$)

2.2 WNK2、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 在裸鼠肿瘤中的表达

采用 Western Blot 法检测裸鼠肿瘤中 WNK2、P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达。相对于 sh-NC 组, sh-RNA WNK2 组 WNK2 的表达显著降低 ($P < 0.01$), P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达显著升高,具有显著性差异 ($P < 0.01$);而相对于 NC-mimic 组, WNK2-mimic 组 WNK2 的表达显著升高 ($P < 0.01$), P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达显著降低,具有显著性差异 ($P < 0.01$)。说明了 WNK2 可以抑制肿瘤中 P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达(见图 2)。

2.3 WNK2、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 在 HepG2 细胞中的表达

采用 Western Blot 法检测转染成功的 HepG2 细胞中 WNK2、P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达。相对于 sh-NC 组, sh-RNA WNK2 组中 WNK2 的表达显著降低 ($P < 0.01$), P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达显著升高,具有显著性差异 ($P < 0.01$);相对于 sh-NC + PHPS1 组, sh-RNA WNK2 + PHPS1 组中 WNK2 的表达显著降低 ($P < 0.01$),而 p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达则被逆转并且 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组较 sh-NC + PHPS1 组无显著性差异 ($P > 0.05$),说明

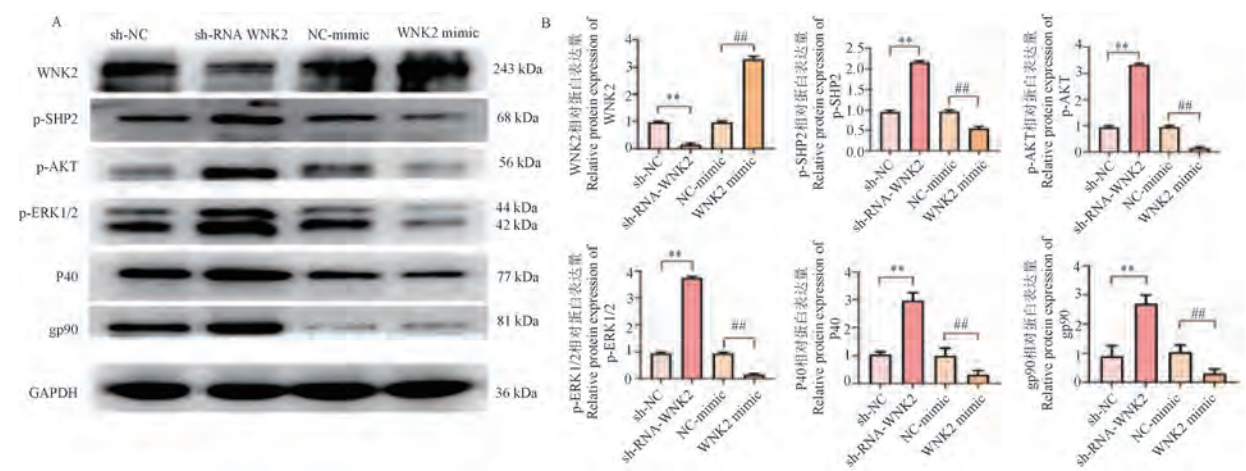


图 2 Western Blot 检测 WNK2、P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 在裸鼠肿瘤中的表达($n = 6$)

Figure 2 Expression of WNK2, P40, gp90, p-SHP2, p-AKT, and p-ERK1/2 in nude mice tumors detected by Western Blot($n = 6$)

了 WNK2 可以抑制 HepG2 细胞当中 p-SHP2 的表达,进而抑制 P40、gp90、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达(见图 3)。

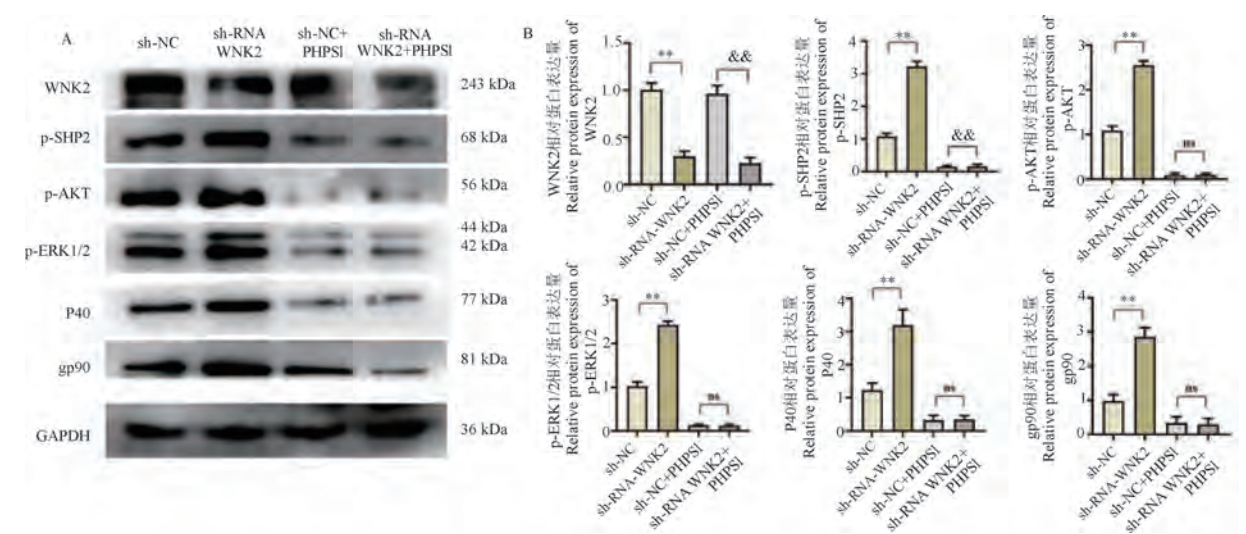
2.4 WNK2 可以通过抑制 SHP2 的表达从而影响 HCC 的迁移能力

细胞划痕实验结果显示,相对于 sh-NC 组,sh-RNA WNK2 组 HepG2 细胞的迁移能力显著升高,具有显著性差异($P < 0.01$);sh-NC + PHPS1 组和 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组 HepG2 细胞的迁移能力显著降低并且不具有显著性差异($P > 0.05$)。说明了

WNK2 可以通过抑制 SHP2 的表达从而抑制 HCC 的迁移能力(见图 4)。

2.5 WNK2 可以通过抑制 SHP2 的表达进而影响 HCC 的迁移和侵袭能力

Transwell 实验结果显示,相对于 NC 组,sh-RNA WNK2 组 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力显著升高,具有显著性差异($P < 0.01$);NC + PHPS1 组和 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力显著降低并且 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组较 NC + PHPS1 组不具有显著性差异($P > 0.05$)。说



注:与 sh-NC + PHPS1 组相比, $ < 0.01. (下图同)

图 3 Western Blot 检测 WNK2、P40、gp90、p-SHP2、p-AKT 和 p-ERK1/2 在 HepG2 细胞中表达($n = 3$)

Note. Compared with the sh-NC + PHPS1 group, $ < 0.01. (The same in the following figures)

Figure 3 Expression of WNK2, P40, gp90, p-SHP2, p-AKT, and p-ERK1/2 in HepG2 cells detected by Western Blot($n = 3$)

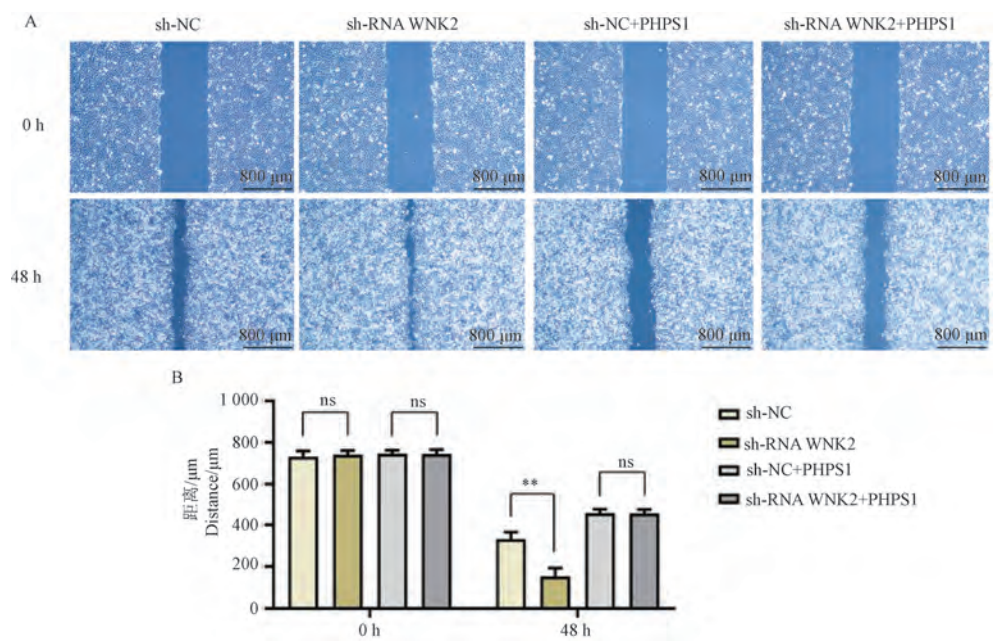


图 4 细胞划痕实验结果($n = 3$)
Figure 4 Cell scratch assay results($n = 3$)

明了 WNK2 可以通过抑制 SHP2 的表达进而抑制 HCC 的迁移和侵袭能力 (见图 5)。

2.6 WNK2 可以通过抑制 SHP2 的表达进而影响 HCC 的增殖能力

相对于 sh-NC 组, sh-RNA WNK2 组 HepG2 细胞的单克隆数量和 48 h 的 OD 值显著升高, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 而 sh-NC + PHPS1 组和 sh-

RNA WNK2 + PHPS1 组 HepG2 细胞的单克隆数量和 48 h 的 OD 值显著降低并且 sh-RNA WNK2 + PHPS1 组较 NC + PHPS1 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。说明 WNK2 可通过抑制 SHP2 的表达来抑制 HCC 的增殖(图 6, 图 7)。WNK2 可以通过抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路的活化从而延缓肝细胞癌的增殖和迁移(见图 8)。

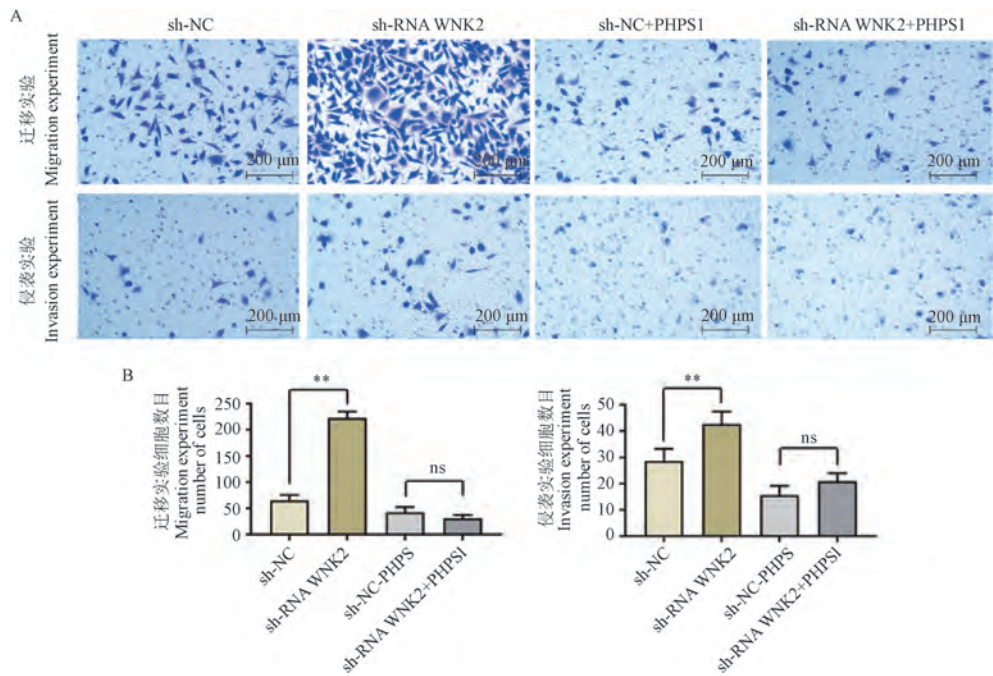


图 5 Transwell 实验结果($n = 3$)
Figure 5 Transwell experiment results($n = 3$)

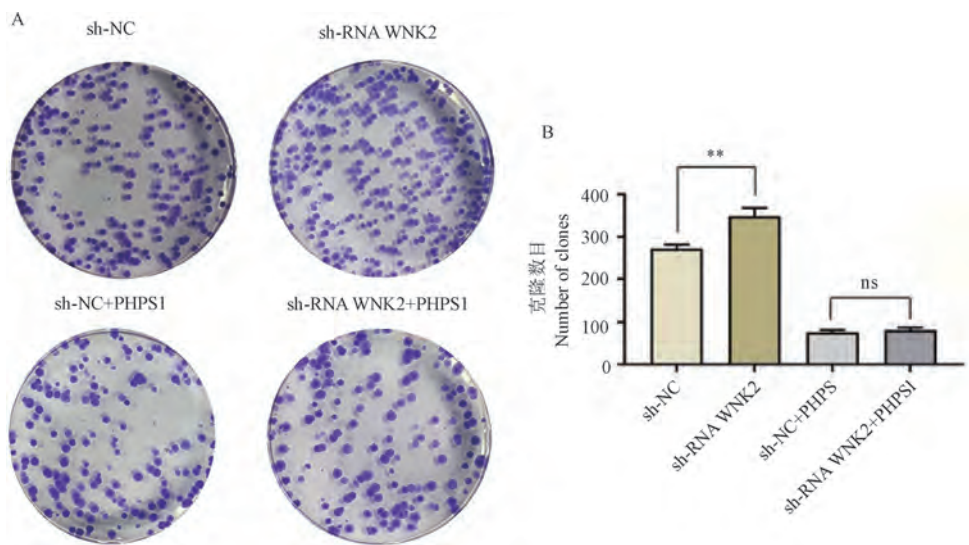


图 6 单克隆增殖实验结果($n = 3$)

Figure 6 Monoclonal proliferation experiment results($n = 3$)

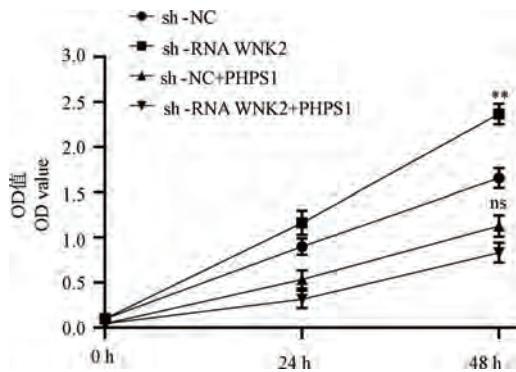


图 7 CCK-8 结果($n = 3$)

Figure 7 CCK-8 results($n = 3$)

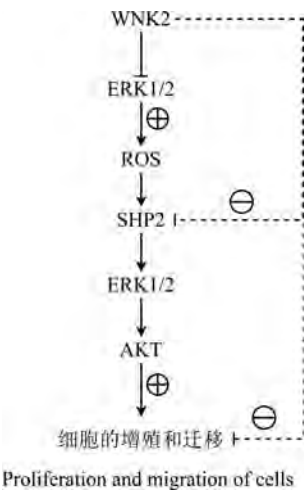


图 8 WNK2 可以通过抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路的活化从而延缓肝细胞癌的增殖和迁移

Figure 8 WNK2 can inhibit the ERK1/2/ROS/SHP2 signaling pathway, thereby delaying the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma

3 讨论

HCC 是全球癌症相关死亡的原因之一,每年约有 80 万例。并且 80% 的 HCC 发生在肝病和肝硬化患者中^[19]。近年来,由于手术治疗、现代影像技术和个性化治疗方案的不断改进,肝癌的治疗有了很大的提高。然而,肝癌患者的预后仍然不尽如人意。HCC 预后不良的主要原因是肝癌早期诊断困难、肝癌易复发和转移。研究表明,多种分子在 HCC 的发生和发展中起着关键作用。因此,需要找到可靠的生物标志物来诊断 HCC 并制定新的策略来有效治疗 HCC 患者。

WNK2 作为一个抑癌基因,WNK2 驻留在染色体 9q22.31 上,属于丝氨酸/苏氨酸激酶亚家族,其催化赖氨酸处于非规范位置^[14]。有相关研究表明,WNK2 可以调节氧化应激水平^[20],负调节肿瘤细胞的侵袭和迁移能力。并且 WNK2 失活对 HCC 的影响依赖于 ERK1/2 途径,说明了 WNK2 可以抑制 HCC 细胞中的 ERK1/2 信号传导,从而抑制 HCC 的迁移和增殖能力^[21]。有研究表明,ERK1/2 可以通过促进 P40 和 gp90 的表达从而促进氧化应激的水平^[9]。BALB/c 裸鼠皮下成瘤实验结果表明,WNK2 缺失可以显著增大裸鼠肿瘤的体积,WNK2 过表达会显著减小肿瘤的体积,单克隆增殖实验和 CCK-8 结果说明了 WNK2 受抑制可以促进 HCC 细胞的增殖能力,表明了 WNK2 可以抑制 HCC 的生长;侵袭和转移是 HCC 最重要的表现,可能是 HCC 预后不良相关的主要原因。在本研究中,细胞划痕实验和

Transwell 实验结果显示, WNK2 受抑制可以促进 HCC 细胞的迁移和侵袭能力, 表明了 WNK2 可以抑制 HCC 的迁移和侵袭。

SHP2 由人 PTPN11 基因编码, 是一种普遍表达的非受体蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPase), 包含两个 N 末端 Src 同源性 2 (SH2) 结构域、一个催化蛋白-酪氨酸磷酸酶 (PTPase) 结构域和一个 C 末端尾。SHP2 对于调节细胞增殖、分化、凋亡和运动、胚胎发育以及造血细胞发育的多种细胞信号通路至关重要^[22-23]。有研究表明, 当氧化应激水平升高时可以特异性促进 SHP-2 的表达^[12]。SHP2 的 SUMOylation 通过促进 SHP2-gab1 复合物的形成来促进 ERK 的激活, 从而加速 HCC 的发展^[24]。ERK1/2/AKT 信号通路的激活可以促进肿瘤细胞的存活和生长, 抑制细胞凋亡^[25]。因此, 通过体内与体外的 Western Blot 实验结果推测, WNK2 过表达可以通过调控氧化应激水平抑制 HCC 中 SHP2、ERK1/2 和 AKT 的磷酸化以及 P40 和 gp90 的表达, WNK2 受抑制可以通过调控氧化应激水平促进 HCC 中 SHP2、ERK1/2 和 AKT 的磷酸化以及 P40 和 gp90 的表达, 并且在加入了 SHP2 抑制剂 PHPS1 后 WNK2 的表达没有受到影响, 而 p-SHP2、p-ERK1/2、p-AKT、P40 和 gp90 的表达都被显著抑制, 说明了 WNK2 可以通过调控氧化应激水平抑制 SHP2 从而抑制 ERK1/2 和 AKT 的活化。而且单克隆增殖实验和 CCK-8 结果显示, SHP2 抑制剂 PHPS1 会抑制 WNK2 缺失所造成的肝细胞的增殖能力增强的现象。细胞划痕实验和 Transwell 实验结果显示 SHP2 抑制剂 PHPS1 会抑制 WNK2 缺失所造成的肝细胞的迁移和侵袭能力增强的现象。因此, 推测 WNK2 可以通过调控 ERK1/2 信号通路进而抑制氧化应激水平, 再通过抑制 SHP2 进而抑制 ERK1/2 和 AKT 的活化, 从而抑制 HCC 的发展。

综上所述, WNK2 可以通过抑制 ERK1/2/ROS/SHP2 信号通路的活化, 从而抑制 ERK1/2/AKT 信号通路, 进而延缓 HCC 的增殖和迁移。

参 考 文 献 (References)

- [1] GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study [J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4): 524-548.
- [2] EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [3] ZUO L, TAN T, WEI C, et al. HOXB13 expression is correlated with hepatic inflammatory activity of patients with hepatic fibrosis [J]. J Mol Histol, 2020, 51(2): 183-189.
- [4] TANG A, HALLOUCH O, CHERNYAK V, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis [J]. Abdom Radiol, 2018, 43(1): 13-25.
- [5] HAJARIZADEH B, GREBELY J, DORE G J. Epidemiology and natural history of HCV infection [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9): 553-562.
- [6] ZOU J, LEI T, GUO P, et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 759-770.
- [7] ZHU H, CHEN Y, ZHANG J, et al. Knockdown of TRIM37 promotes apoptosis and suppresses tumor growth in gastric cancer by inactivation of the ERK1/2 pathway [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 5479-5491.
- [8] WU Q, QI B, DUAN X, et al. MicroRNA-126 enhances the biological function of endothelial progenitor cells under oxidative stress via PI3K/Akt/GSK3 β and ERK1/2 signaling pathways [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2021, 21(1): 71-80.
- [9] WON K J, LEE H M, LEE C K, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-2 is positively involved in platelet-derived growth factor-signaling in vascular neointima formation via the reactive oxygen species-related pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2011, 115(2): 164-175.
- [10] WöRMANN SM, SONG L, AI J, et al. Loss of P53 function activates JAK2-STAT3 signaling to promote pancreatic tumor growth, stroma modification, and gemcitabine resistance in mice and is associated with patient survival [J]. Gastroenterology, 2016, 151(1): 180-193.
- [11] ZHU M, ZHANG B, ZHANG J, et al. Study on the effect and mechanism of huaji Jianpi Decoction on simple obesity [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 5494224.
- [12] WANG Y C, WU D W, WU T C, et al. Dioscin overcome TKI resistance in EGFR-mutated lung adenocarcinoma cells via down-regulation of tyrosine phosphatase SHP2 expression [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(1): 47-56.
- [13] LIU X, LI Y, ZHANG Y, et al. SHP-2 promotes the maturation of oligodendrocyte precursor cells through Akt and ERK1/2 signaling *in vitro* [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21058.
- [14] ALVES A L V, COSTA A M, MARTINHO O, et al. WNK2 inhibits autophagic flux in human glioblastoma cell line [J]. Cells, 2020, 9(2): 485.
- [15] JIA Y, WANG Y, ZHANG C, et al. Upregulated CBX8 promotes cancer metastasis via the WNK2/MMP2 pathway [J]. Mol Ther Oncolytics, 2020, 19: 188-196.
- [16] LI F, LIANG Z, JIA Y, et al. MicroRNA-324-3p suppresses the aggressive ovarian cancer by targeting WNK2/RAS pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12030-12044.

[17] ZHOU S L, ZHOU Z J, HU Z Q, et al. Genomic sequencing identifies WNK2 as a driver in hepatocellular carcinoma and a risk factor for early recurrence [J]. J Hepatol, 2019, 71 (6) : 1152–1163.

[18] HELLMUTH K, GROSSKOPF S, LUM C T, et al. Specific inhibitors of the protein tyrosine phosphatase Shp2 identified by high-throughput docking [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105 (20) : 7275–7280.

[19] NAKAMICHI N, MURAKAMI-KOJIMA M, SATO E, et al. Compilation and characterization of a novel WNK family of protein kinases in Arabidopsis thaliana with reference to circadian rhythms [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66 (11) : 2429–2436.

[20] BHUIYAN M I H, YOUNG C B, JAHAN I, et al. NF-κB signaling-mediated activation of WNK-SPAK-NKCC1 cascade in worsened stroke outcomes of ang II-hypertensive mice [J]. Stroke, 2022, 53 (5) : 1720–1734.

[21] JUN P, HONG C, LAL A, et al. Epigenetic silencing of the

kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-grade specific [J]. Neuro Oncol, 2009, 11 (4) : 414–422.

[22] 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.

[23] 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.

[24] YU M, XU C, ZHANG H, et al. The tyrosine phosphatase SHP2 promotes proliferation and oxaliplatin resistance of colon cancer cells through AKT and ERK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 563 : 1–7.

[25] DENG R, ZHAO X, QU Y, et al. Shp2 SUMOylation promotes ERK activation and hepatocellular carcinoma development [J]. Oncotarget, 2015, 6 (11) : 9355–9369.

[收稿日期] 2023-08-04

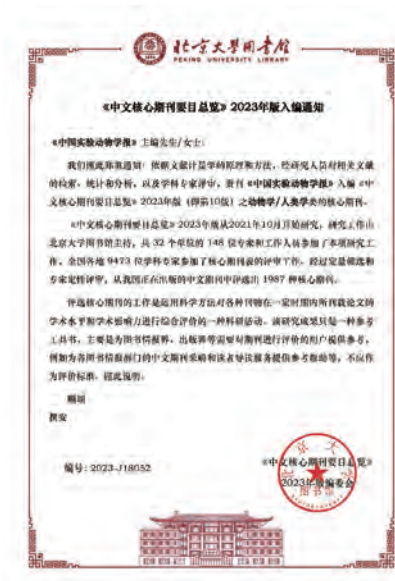
《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

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

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

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



顾乐盈,杨妞妞,于康英,等. 白芷在神经病理性疼痛中对 MrgprD-TRPA1 通路的调控作用分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 219-229.

GU L Y, YANG N N, YU K Y, et al. Analysis of the regulatory effect of *Angelica dahurica* on the MrgprD-TRPA1 pathway in neuropathic pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 219-229.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.009

白芷在神经病理性疼痛中对 MrgprD-TRPA1 通路的调控作用分析

顾乐盈¹,杨妞妞²,于康英¹,孟雅琴¹,宋绍征^{1*}

(1. 无锡太湖学院健康与护理学院基础医学系,江苏 无锡 214000;

2. 扬州大学医学院,江苏 扬州 225009)

【摘要】 目的 本研究拟通过建立坐骨神经慢性缩窄损伤 (chronic constriction injury, CCI) 小鼠模型,分析和探讨白芷在神经病理性疼痛中的镇痛效果及其对 MrgprD-TRPA1 信号通路的调控作用。**方法** 无菌外科手术结扎缠绕 30 只小鼠坐骨神经制备 CCI 小鼠模型; VonFrey 实验检测白芷对小鼠机械刺激疼痛行为学变化,热辐射实验评估白芷对小鼠热痛觉过敏情况; Western Blot、免疫荧光、RT-PCR 检测白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 蛋白表达水平、DRG 阳性神经元数量、MrgprD 和 TRPA1 mRNA 水平的影响; 通过对 HEK293 细胞分别单转染和共转染 MrgprD、TRPA1 质粒后的钙成像实验,分析荧光信号强度差异性。**结果** 共成功制备了 25 只 CCI 小鼠模型,造模率达到 83.33% (25/30); 白芷灌胃的 CCI 小鼠机械性阈值和缩足潜伏时间均显著大于对照组 ($P < 0.05$); 白芷灌胃的 CCI 小鼠中 MrgprD 和 TRPA1 蛋白表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 白芷灌胃的 CCI 小鼠 DRG 中 MrgprD 和 TRPA1 阳性神经元的数量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 白芷灌胃的 CCI 小鼠中 MrgprD 和 TRPA1 mRNA 相对表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 共转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒的 HEK293 细胞中荧光强度显著高于单转染和对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 本研究通过探究白芷在 CCI 小鼠模型中镇痛的效果,证明了 MrgprD-TRPA1 是神经病理性疼痛的重要作用靶点,揭示了白芷可以通过调控 MrgprD-TRPA1 信号转导通路来抑制神经病理性疼痛程度,这为后续开发新型临床镇痛药物及镇痛机制的深入研究奠定了基础。

【关键词】 小鼠; 白芷; 神经病理性疼痛; MrgprD; TRPA1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0219-11

Analysis of the regulatory effect of *Angelica dahurica* on the MrgprD-TRPA1 pathway in neuropathic pain

GU Leying¹, YANG Niuniu², YU Kangying¹, MENG Yaqin¹, SONG Shaozheng^{1*}

(1. Department of Basic Medicine, School of Health and Nursing, Wuxi Taihu University, Wuxi 214000, China;

2. School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Corresponding author: SONG Shaozheng. E-mail: ssz0610@163.com

【Abstract】 Objective To analyze and explore the analgesic effect of *Angelica dahurica* in neuropathic pain and its regulatory effect on the Mas-related G-protein coupled receptor member D (MrgprD)-transient receptor potential ankyrin 1

【基金项目】 江苏省高校自然科学基金 (20KJB360007), 江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师项目 (苏教师函[2021]11号), 国家自然科学基金青年项目 (81904212)。

Funded by Jiangsu Provincial Natural Science Foundation for Higher Education Institutions (20KJB360007), Outstanding Young Backbone Teachers Project of the “Blue Project” in Jiangsu Province’s Universities (Su Teacher’s Letter [2021] No. 11), National Natural Science Foundation Youth Program (81904212).

【作者简介】 顾乐盈, 硕士, 讲师, 研究方向: 慢性疼痛及中药镇痛机制研究。Email: 523724655@qq.com

【通信作者】 宋绍征, 博士, 副教授, 研究方向: 生物医药。Email: ssz0610@163.com

(TRPA1) signaling pathway, using a mouse model of sciatic nerve chronic constriction injury (CCI). **Methods** A CCI mouse model was prepared by sterile surgical ligation and wrapping of the sciatic nerve in 30 mice. Pain-related behavioral changes induced by mechanical stimulation were detected by the VonFrey method, and the thermal hyperalgesic effects of *Angelica dahurica* were evaluated by thermal radiation experiments. The effects of *Angelica dahurica* on the protein expression levels MrgprD and TRPA1, the number of dorsal root ganglion (DRG) positive neurons, and mRNA levels of MrgprD and TRPA1 in mice were detected by Western Blot, immunofluorescence, and reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively. Differences in fluorescence signal intensity in HEK293 cells after single transfection and co-transfection with MrgprD and TRPA1 plasmids, respectively, were analyzed by calcium imaging experiments. **Results** A total of 25 CCI mouse models were successfully prepared, with a modeling rate of 83.33% (25/30). The mechanical threshold and foot retraction latency were significantly higher in CCI mice treated with *Angelica dahurica* compared with the control group ($P < 0.05$). Expression levels of MrgprD and TRPA1 proteins were significantly lower in CCI mice treated with *Angelica dahurica* than in the control group ($P < 0.05$). The number of MrgprD- and TRPA1-positive neurons in the DRG was significantly lower group ($P < 0.05$) and the mRNA levels of MrgprD and TRPA1 were also significantly lower in CCI mice treated with *Angelica dahurica* than in the control group ($P < 0.05$). The fluorescence intensity was significantly higher in HEK293 cells co-transfected with MrgprD and TRPA1 plasmids than in single-transfected and blank control cells ($P < 0.05$). **Conclusions** This study demonstrated that the MrgprD-TRPA1 pathway is an important target for neuropathic pain, and indicated that *Angelica dahurica* can inhibit neuropathic pain by regulating this signal transduction pathway. These result provide a foundation for further research on the development of new clinical analgesic drugs and analgesic mechanisms.

[Keywords] mouse; *Angelica dahurica*; neuropathic pain; MrgprD; TRPA1

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

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NPP) 属于一种慢性疼痛,是由于中枢或周围神经系统原发性和继发性受到损伤、功能障碍或短暂性紊乱而造成的疼痛^[1-3]。据有关数据统计分析显示,全球每年该疾病的发生率高达 6.9% ~ 10.0%,给人们的生命健康和生活质量带来了极大的威胁^[4-5]。因此,积极探究 NPP 的形成与调控机制,寻找合理有效的镇痛药物,对今后该病的防治具有重要的临床意义。有研究表明,NPP 发生机制与 G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 具有一定相关性^[6-8],其中 Mas 相关的 G 蛋白耦联受体 D (MrgprD) 是 GPCR 的一种亚型,主要表达于外周伤害性的感觉神经元上,能够感知外界环境中的机械、冷、热等刺激。在之前的研究中,发现 NPP 小鼠 MrgprD 的基因水平和蛋白水平表达都增多,功能也增强,行为学上 MrgprD 基因敲除小鼠在 NPP 的情况下对机械刺激更为敏感,证实了 MrgprD 与 NPP 的相关性^[9]。瞬时受体电位离子通道 A1 (transient receptor potentia vanilloid 1, TRPA1) 是一种温、触觉感受器,属于瞬间非选择性的受体电位阳离子通道,是 trp 通道家族的一员,能够被辣椒素、芥子油、弱酸、甲醛、加热或机体的内源性配体激活,从而使钙离子向细胞内流动,继而引发机体产生症状明显

的神经源性炎症和 NPP^[10]。近年来,有研究发现, MrgprD 可以通过 TRPA1 通路参与 NPP 的产生,这表明 MrgprD 与 TRPA1 在 NPP 产生的调控中密切相关^[11-12]。同时,也通过钙成像、电生理实验发现 TRPA1 阻断剂明显抑制 β -丙氨酸激活 MrgprD 引起的钙内流以及内向电流,验证了 MrgprD 可以通过 TRPA1 通路参与 NPP 的产生,这提示 MrgprD-TRPA1 是 NPP 研究中的重要途径^[9]。因此,在 NPP 的止痛治疗中,有必要着重考虑 MrgprD-TRPA1 通路在 NPP 调控中的形成机制。

中药一直是我国传统医学的瑰宝。白芷既是一种多年生高大草本的伞形科当归属植物,也是一味应用广泛、历史悠久的中药,始载于东汉《神农本草经》,有解表散寒、消肿排脓、祛风止痛、燥湿止带、宣通鼻窍等功效^[13]。目前,白芷在临床上作为镇痛中药的使用越来越广泛。庞心悦等^[14]研究发现,白芷水煎液和总挥发油对疼痛模型大鼠具有明显的镇痛功效;覃文玉等^[15]在醋酸致小鼠扭体实验中发现,应用白芷-川芎药能够明显降低小鼠扭体的次数,具有较好的镇痛作用;郭珺等^[16]研究发现白芷水提液能够抑制辣椒素、福尔马林及热辐射、热浴浸尾诱导的小鼠伤害性疼痛,也证明了白芷水提液具有良好的镇痛作用。以上相关研究提示,白芷

是可作为临床上镇痛治疗的一种有效物质,但是关于其缓解疼痛的具体作用机制尚不明确,尤其是基于 MrgprD-TRPA1 通路的白芷在 NPP 中的镇痛机制尚不清楚。

基于前期的研究基础,以及白芷在疼痛中的潜在作用,本研究拟通过建立坐骨神经慢性缩窄损伤(chronic constriction injury, CCI)小鼠模型,探讨和分析白芷是否能够通过 MrgprD-TRPA1 通路的调控来抑制 CCI 模型引起的坐骨神经痛,以期阐明白芷镇痛的具体机制和今后开发新型临床镇痛药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验所用 40 只小鼠均为 7 ~ 8 周龄清洁级 C57BL/6J 雄性小鼠,体重为 20 ~ 25 g,购于上海必凯科翼生物科技有限公司【SCXK(沪)2018-0006】。饲养于江南大学实验动物中心【SYXK(苏)2021-0056】。温度为 20 ~ 26 ℃,湿度为 40% ~ 70%,24 h 昼夜交替光照循环,自由饮水饮食,颗粒饲料。本实验由江南大学实验动物管理与动物福利伦理委员会审核批准(YXYLL-2019-078),涉及动物实验的相关工作均在江南大学实验动物中心完成。

1.1.2 主要试剂与仪器

白芷水提液(自制),1%戊巴比妥钠(Merck),TRPA1 单克隆抗体(Abcam),MrgprD 抗体(Abcam),TRIzol(美国英杰生命科技有限公司),DMEM(Gibco),胎牛血清(FBS,Gibco),青霉素-链霉素双抗(PS,Hyclone),D-hank's(Hyclone),胰蛋白酶(Dispise),神经生长因子(NGF,Sigma),层黏连蛋白(Sigma), β -alanine(Sigma),Fura-2(Sigma),Fl27(Sigma),实时荧光定量试剂盒(Roche),MrgprD 质粒、TRPA1 质粒、HEK293 细胞株均保存于本实验,生理盐水、丙酮、异丙醇、氯仿、氯化钠、氯化钾、氯化钙、SDS、甲醛、聚丙烯酰胺等均为国产分析纯,分别购自国药集团化学试剂有限公司、北京索莱宝科技有限公司等。

常规小鼠手术器械,VonFrey 丝测痛笔(Danmic),热辐射仪(Ugo basile),超净工作台(美国赛默飞科技有限公司),二氧化碳细胞培养箱(美国赛默飞科技有限公司),电子天平(上海佑科公司),冰冻切片机(德国徕卡公司),解剖显微镜(日

本尼康公司),IX51 Olympus 荧光倒置显微镜(Olympus),pH 酸度计(德国赛多利斯科学仪器有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(Roche),离心机(湖南凯达科学仪器有限公司),金属恒温水浴锅(中国金坛医疗仪器厂),蛋白质电泳仪(美国伯乐公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCI 小鼠模型的制备

将小鼠分为 4 组,每组 10 只,其中一组小鼠不作任何处理,其余组小鼠坐骨神经结扎,进行造模。首先将小鼠麻醉,侧卧位保定于动物实验台,通过无菌外科手术沿小鼠右侧的后肢根部中线处进行切开,分离坐骨神经使其暴露。然后在坐骨神经上使用外科手术缝合线仔细缠绕 3 次,基于小鼠腿部反射的力量进行神经结扎,每次结扎 1 mm 左右。最后,术后进行伤口缝合,将小鼠翻身至仰卧位,并保持该体位直至小鼠苏醒,转移至动物房鼠笼内精心照顾和饲养,整个手术过程注意小鼠保温^[4,9]。观察和记录第 1 ~ 10 天小鼠的机械刺激阈值和热辐射缩足潜伏期值变化情况,选择出现最具有显著性差异的 CCI 小鼠进行相关实验操作。

1.2.2 Von Frey 实验检测白芷对小鼠机械刺激疼痛行为学变化

将不作任何处理的小鼠设为正常组,将 CCI 造模成功的小鼠随机分为 3 组,其中将一组给予每只 100 μ L 0.1 mg/g 白芷水提液灌胃设为白芷组^[15]、将一组给予同体积纯水灌胃设为纯水组、将一组未给予任何药物设为空白组。各组小鼠分别进行编号,随机放置,检测前 30 min 将实验小鼠转移至检测的环境,以便适应该实验环境。使用 Von Frey 细丝(0.04 ~ 2 g)对小鼠缩足与否进行测定,首先将 50 cm $\times$ 100 cm 的钢丝网框网格抬高放置,然后将小鼠放置其上,使用 0.4 g Von Frey 细丝以垂直角度在小鼠足底中央处施压 3 s,观察小鼠是否发生缩足反应。若未缩足,则增加 Von Frey 细丝质量再次重复刺激小鼠足底;若缩足,则减少 Von Frey 细丝质量再次重复刺激小鼠足底。每只小鼠两次刺激时间间隔 20 s,记录小鼠恰好发生缩足反应时的 Von Frey 细丝质量,根据 Up-and-Down 法来计算各组小鼠后肢发生 50%缩足的阈值,并进行比较分析其差异显著性。

1.2.3 热辐射实验评估白芷对小鼠热痛觉过敏情况

所有实验小鼠均放置在相同的专用热辐射玻

璃板上,选择小鼠右侧后肢足部作为研究对象,使用 45 ℃ 热辐射源在各组小鼠的足底表面中心处进行照射,记录从开始照射到小鼠发生明显缩足现象的时间(缩足潜伏时间)。每只小鼠均进行 3 次检测,每次检测间隔时间为 5 min,比较和分析各组小鼠的缩足潜伏时间差异显著性。

1.2.4 Western Blot 检测白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 蛋白表达水平

将处理后的 4 组小鼠麻醉,无菌手术剖开皮肤,使腰骶脊柱分离,充分暴露出脊柱盖板,轻轻掀开盖板,置于冰上,沿着脊髓中央剪开脊柱,分别取出第 4 腰椎和第 5 腰椎的 DRG 神经元转移至洁净的 1.5 mL 离心管内,ISL 处理 24 h,PBS 清洗 2 次,使用 200 μL 蛋白裂解液置于冰上裂解 2 h,转移至 -80 ℃ 条件下保存 12 h 后,置于 4 ℃ 解冻,10 000 r/min 离心 30 min,取 200 μL 上清蛋白液转移至洁净的 0.5 mL 离心管内,加入 50 μL 5 × Loading Buffer,充分混匀,沸水浴 5 min,使蛋白质充分变性。按照常规分子生物学方法^[16]进行 5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳结束后,使用 PBS 将凝胶转移至预先经乙醇活化的 PVDF 膜上,以 100 V 恒定电压转膜 2 h。取下 PVDF 膜,使用超纯水洗涤 3 次,加入 5% 奶粉-TBS 封闭缓冲液(5% 奶粉,137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 0.1% Tween-20, pH = 7.6)进行室温孵育 2 h。使用 TBST 缓冲液(137 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 1% Tween-20, pH = 7.6)反复冲洗 PVDF 膜直至奶液完全去除干净,加入一抗(1 : 1000 稀释),混匀后,置于 4 ℃ 摇床孵育 4 h,再使用 TBST 缓冲液清洗 3 次,加入酶标二抗(1 : 250 稀释),混匀后,置于室温摇床孵育 2 h。取出 PVDF 膜,使用 PBS 洗涤 3 次,密闭晾干后,应用凝胶成像系统进行成像,使用 Image J 软件分析条带情况。

1.2.5 免疫荧光技术检测白芷对 DRG 中 MrgprD 和 TRPA1 阳性神经元数量变化

麻醉小鼠,仰卧位固定于小型动物手术台上,暴露小鼠腹部,无菌剪开皮肤以使心脏显露,应用甲醛灌注后,分离小鼠背根神经节(DRG)的神经元,置于含 4% 多聚甲醛的 24 孔细胞培养板内,浸泡 20 min,吸除多聚甲醛,加入 30% 蔗糖溶液,4 ℃ 过夜。取出 DRG 神经元,加入 OCT 溶液进行包埋后,应用冰冻切片机进行厚度 10 μm 切片。使用封闭缓冲液(10% FBS + 0.1% Triton X-100 + 0.02% 叠

氮化钠 + PBS)对制成的切片进行封闭,室温孵育 2 h。PBS 洗去封闭液,加入 MrgprD 和 TRPA1 一抗(1 : 400 稀释),4 ℃ 孵育 3 h。PBS 洗去一抗,加入荧光信号标记二抗(1 : 400 稀释),室温孵育 3 h。PBS 洗涤 3 次,封片,使用荧光倒置显微镜观察样本情况。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 的 mRNA 水平

麻醉小鼠,分离获取第 4 腰椎和第 5 腰椎 DRG 神经元,置于装有 1 mL TRIzol 的无酶离心管内,加入 200 μL 氯仿,研磨后,加入裂解液,充分混匀,4 ℃ , 10 000 r/min 离心 10 min。取 500 μL 上清液转移至另一洁净的离心管内,加入 500 μL 异丙醇,沉淀 RNA,4 ℃ , 10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清加入 500 μL,混匀后,4 ℃ , 10 000 r/min 离心 10 min,提取 RNA,加入 DEPC 水溶解、定量。按照实时荧光定量试剂盒操作说明进行 RT-PCR 检测,应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件进行荧光定量 PCR 的引物设计,然后由上海生工生物工程技术有限公司完成引物合成,引物序列详见表 1 所示。以小鼠 GAPDH 基因作为内参,检测各组中小鼠表达 MrgprD 和 TRPA1 的 mRNA 水平,并进行差异显著性统计分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增引物序列
Table 1 Primers sequences of Real-time fluorescence quantitative PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
MrgprD-F	TTTTCAGTGACATTCTCGCC
MrgprD-R	GCACATAGACACAGAAGGGAGA
TRPA1-F	GTCCAGGGCGTTGTCTATCG
TRPA1-R	CGTGATGCAGAGGACAGAGAT
GAPDH-F	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH-R	ACCACAGTCCATGCCATCAC

1.2.7 HEK293 细胞转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒后的钙成像实验

将 HEK293 细胞接种于层黏连蛋白和聚-d-赖氨酸包被的无菌玻璃盖片上进行培养,使用 50 μL 混合转染液稀释 0.8 μg 质粒 DNA,与细胞反复吹打混匀后,静置 15 min,然后将混合物转移至无菌的 24 孔细胞培养板内,置于 37 ℃、5% 饱和湿度的 CO₂ 培养箱内,培养 6 h 后更换新鲜培养液,再继续培养 24 h。转染类型分为 3 组,分别是单独转染 MrgprD 质粒组、单独转染 TRPA1 质粒组、共转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒组。在转染质粒培养后的 HEK293 细

胞中加入 Fura-2/F127 溶液(2 μ L Fura-2 + 2 μ L F127 + 2 mL HBSS),反复吹打混匀后,置于培养箱内孵育 30 min,进行钙离子成像实验^[17],使用 HCI imaging 软件记录产生的相关信号强弱,观察并保存实验结果。

1.3 统计学分析

使用 Excel 2010 记录相关实验数据,以 SPSS 20.0 统计软件作为数据处理与分析的工具,若数据资料符合正态分布,则计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,组间数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

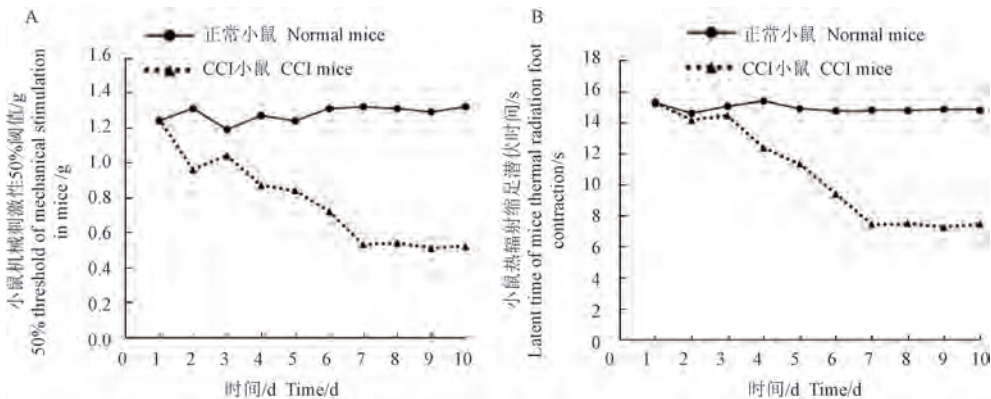


图1 CCI小鼠机械刺激性阈值和热辐射缩足潜伏时间变化曲线图

Figure 1 Changes in mechanical stimulation threshold and thermal radiation foot contraction latency time in CCI mice

2.2 白芷镇痛效果分析

经 Von Frey 实验检测,选择小鼠后肢发生 50% 缩足的阈值(g)作为参考指标,通过小鼠机械刺激疼痛行为学变化发现,应用白芷灌胃的 CCI 小鼠机械性阈值显著高于应用纯水灌胃的 CCI 小鼠和未进行灌胃的 CCI 小鼠(1.18 ± 0.11 vs 0.46 ± 0.06 , 0.53 ± 0.07 , $P < 0.05$),具有统计学意义;白芷灌胃的 CCI 小鼠阈值略低于正常小鼠,但是差异不具有显著性($P > 0.05$)。这一结果表明白芷在 CCI 小鼠模型的机械刺激性疼痛中能够起到很好的镇痛效果,且阈值接近于未进行 CCI 造模的正常小鼠(见图 2A)。经热辐射实验评估小鼠热痛觉情况显示,白芷灌胃的 CCI 小鼠缩足潜伏时间明显大于应用纯水灌胃的 CCI 小鼠和未进行灌胃的 CCI 小鼠(13.65 ± 0.14 vs 7.23 ± 0.76 , 7.42 ± 0.81 , $P < 0.05$),具有统计学意义;白芷灌胃的 CCI 小鼠缩足潜伏时间与正常小鼠相比,差异不具有显著性($P > 0.05$),略低于正常小鼠的缩足潜伏时间。这一结果表明白芷在 CCI 小鼠模型的热痛觉中有着较好

2 结果

2.1 CCI 小鼠模型的建立

共选择了 40 只小鼠作为研究对象,其中 10 只不作任何处理作为对照组,另外 30 只小鼠进行坐骨神经结扎处理制备 CCI 模型,其中成功造模小鼠有 25 只,因手术死亡小鼠 2 只,未成功造模小鼠 3 只,造模成功率为 83.33%(25/30)。造模后,从第 7 天开始,CCI 小鼠的机械刺激性疼痛阈值和热辐射缩足潜伏时间出现最显著的差异,其值降低至最低点(0.53 g 和 7.42 s),其在 7 ~ 10 d 基本维持平稳,如图 1 所示。

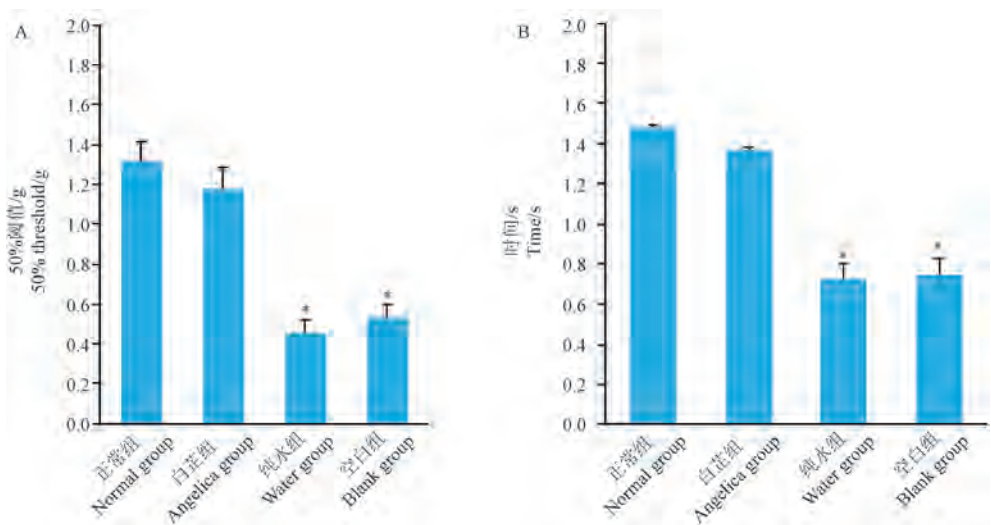
的镇痛效果,且小鼠缩足时间接近于正常小鼠(见图 2B)。

2.3 白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 蛋白表达水平的影响分析

如图 3 所示,以小鼠 Actin 蛋白作为内参,进行 Western Blot 检测实验,通过凝胶成像系统的 Image J 软件定量分析显示,白芷灌胃后的 CCI 小鼠中 MrgprD 蛋白表达水平明显低于纯水灌胃后的 CCI 小鼠(0.73 ± 0.11 vs 2.69 ± 0.23 , $P < 0.05$),差异具有显著性;白芷灌胃后的 CCI 小鼠中 TRPA1 蛋白表达水平也明显低于纯水灌胃后的 CCI 小鼠(0.42 ± 0.09 vs 2.03 ± 0.18 , $P < 0.05$),差异具有显著性。结果表明白芷能够显著降低 CCI 小鼠模型中 MrgprD 和 TRPA1 蛋白表达水平,使其表达水平接近且略高于未进行 CCI 造模的正常小鼠,差异不具有显著性($P > 0.05$)。

2.4 免疫荧光检测分析

甲醛灌注后,分离小鼠背根神经节的神元,经免疫荧光染色实验结果如图 4A 所示,应用 EGFP



注:A: Von Frey 实验检测白芷镇痛效果;B:热辐射实验评估白芷镇痛效果;与白芷组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 2 白芷在 CCI 小鼠模型中的镇痛效果差异分析

Note. A. The analgesic effect of *Angelica dahurica* was tested by the Von Frey experiment. B. Thermal radiation experiment was used to evaluate the analgesic effect of *Angelica dahurica*. Compared with Angelica group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Analgesic effect difference analysis of *Angelica dahurica* in CCI mouse model

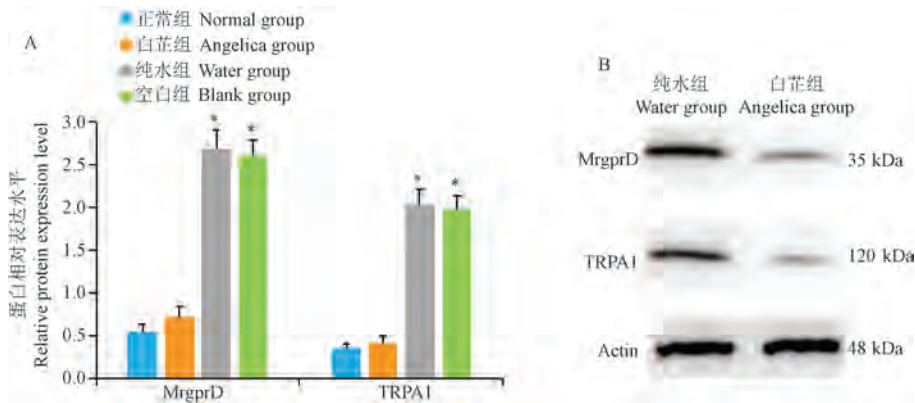


图 3 白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 蛋白表达水平的影响

Figure 3 Effect of *Angelica dahurica* on the expression levels of MrgprD and TRPA1 proteins in mice

标记在荧光倒置显微镜下可见小鼠 DRG 中 MrgprD 和 TRPA1 阳性神经元呈现绿色荧光信号,根据绿色荧光信号与 MrgprD 和 TRPA1 表达水平呈正相关可初步判断阳性神经元数量,使用 Image J 软件灌胃前后的神经元细胞进行标注,细胞计数。白芷灌胃后的 CCI 小鼠 DRG 中 MrgprD 和 TRPA1 阳性神经元的数量显著低于纯水灌胃后的 CCI 小鼠(654 ± 47 vs 1162 ± 63 , $P < 0.05$),差异具有显著性(见图 4B)。这一结果说明白芷能够显著降低 MrgprD 和 TRPA1 的表达水平,从而引起具有 EGFP 信号的神经元数量显著减少。

2.5 RT-qPCR 检测白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 mRNA 水平的影响

应用小鼠 GAPDH 基因作为 RT-PCR 检测的内参,计算各组小鼠中 MrgprD 和 TRPA1 的 mRNA 相对表达水平。根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行校准和归一化处理,其中 $\Delta\Delta CT$ 值 = (目标基因 CT 值 - 内参基因 CT 值) - (校准品 CT 值 - 内参基因 CT 值)。计算 MrgprD mRNA 的相对表达水平差异情况如图 5A 所示,应用白芷灌胃的 CCI 小鼠中 MrgprD mRNA 相对表达水平显著低于应用纯水灌胃的 CCI 小鼠和未进行灌胃的 CCI 小鼠(1.23 ± 0.12 vs 3.21 ± 0.24 ,

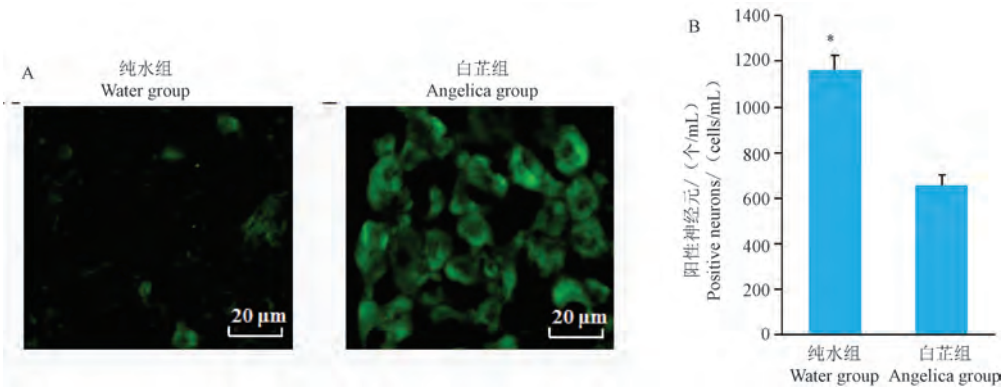


图 4 免疫荧光检测白芷对 NPP 模型(CCI)中 DRG 神经元的影响

Figure 4 Immunofluorescence detection of the effect of *Angelica dahurica* on DRG neurons in a neuropathic pain model (CCI)

2.96 ± 0.17, $P < 0.05$), 差异具有显著性;白芷灌胃的 CCI 小鼠中 MrgprD mRNA 相对表达水平略高于正常小鼠,但是差异不具有显著性($P > 0.05$)。计算 TRPA1 mRNA 的相对表达水平差异情况如图 5B 所示,用白芷灌胃的 CCI 小鼠中 TRPA1 mRNA 相对表达水平显著低于应用纯水灌胃的 CCI 小鼠和未进行灌胃的 CCI 小鼠(1.18 ± 0.09 vs $2.65 \pm 0.16, 2.57 \pm 0.14, P < 0.05$), 差异具有显著性;白芷灌胃的 CCI 小鼠中 TRPA1 mRNA 相对表达水平略高于正常小鼠,但是差异不具有显著性($P > 0.05$)。此外,各小鼠组内进行比较, MrgprD mRNA 相对表达水平普遍高于 TRPA1。这一结果表明白芷能够显著降低小鼠 DRG 神经元中的 MrgprD 和 TRPA1 mRNA 表达水平,使其表达水平接近于未进行 CCI 造模的正常小鼠。

2.6 HEK293 细胞转染后钙成像实验观察

分别在 HEK293 细胞中单独转染 MrgprD 质粒、单独转染 TRPA1 质粒、共转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒,进行钙离子成像实验并根据 HCI imaging 软件记录数据来计算荧光强度,当荧光比($\Delta F/F_0$) ≥ 0.4 时,表明细胞有反应,其中 F_0 指荧光的基线值, ΔF 指荧光的基线最大值。三个转染组的荧光强度差异显著性分析情况如图 6A 所示,共转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒的 HEK293 细胞中荧光强度显著高于单转染和对照组,差异具有显著性($P < 0.05$)。同时,共转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒的 HEK293 细胞经 β -alanine 和 Mustard oil 诱导引起其钙离子内流明显大于未转染质粒的细胞和仅仅单转染 MrgprD 质粒的细胞(如图 6B ~ 6D),从而导致该 HEK293 细胞的荧光信号强度较大。

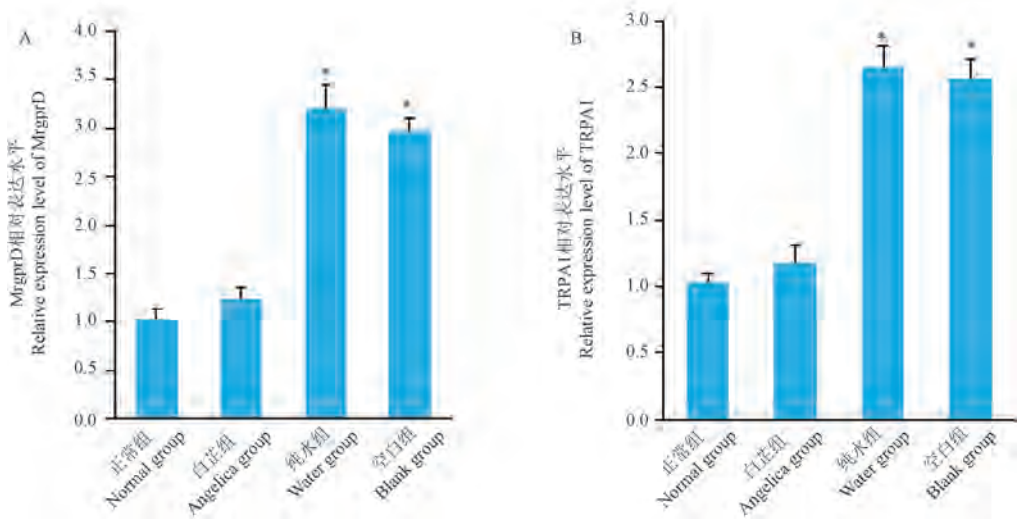
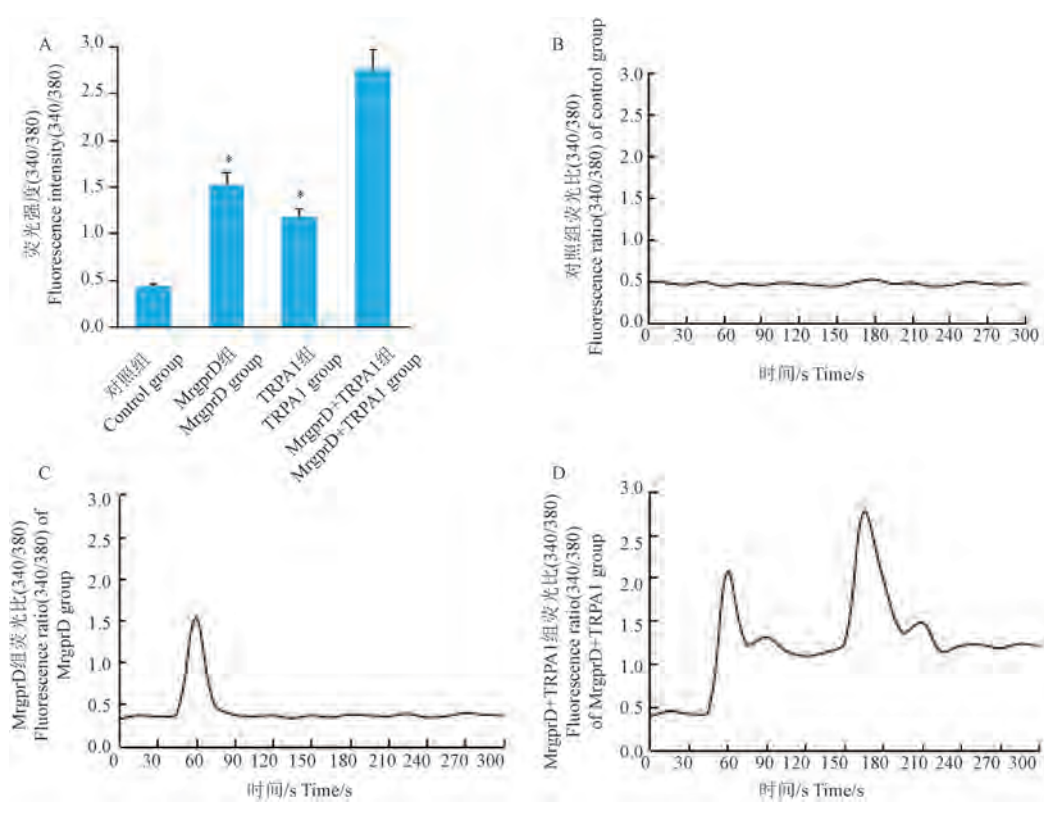


图 5 RT-PCR 检测白芷对小鼠 MrgprD 和 TRPA1 mRNA 水平的影响

Figure 5 Effect of *Angelica dahurica* on MrgprD and TRPA1 mRNA levels in mice detected by RT-PCR



注:A:HEK293 细胞转染后钙离子内流的荧光强度差异显著性分析;B ~ D:β-alanine 和 Mustard oil 诱导细胞钙成像反应;与 MrgprD + TRPA1 组相比,**P* < 0.05。

图 6 HEK293 细胞转染后钙离子内流的荧光强度比较

Note. A. Significance analysis of fluorescence intensity differences in calcium ion influx after transfection of HEK293 cells. B ~ D. β-alanine and Mustard oil induce cellular calcium imaging responses. Compared with MrgprD + TRPA1 group, **P* < 0.05.

Figure 6 Comparison of fluorescence intensity of calcium influx in HEK293 cells after transfection

3 讨论

疼痛是一种令人不愉快的感觉和情绪上的主观感受,常常伴有实质的或潜在的组织和细胞损伤,分为周围性和中枢性两种病理类型^[2,18]。1994 年,国际疼痛研究协会(International Association for the Study of Pain, IASP)将 NPP 定义为“疼痛开始于或起源于外周或中枢神经系统的损伤或功能不良”^[19]。本研究将 30 只小鼠分为 3 组,利用无菌外科手术,分别结扎缠绕小鼠坐骨神经,成功地制备了 25 只 CCI 小鼠 NPP 模型,CCI 造模率达到 83.33%,属于一种周围性 NPP,且 CCI 小鼠模型成功率高于王琛等^[4]、郭珺等^[16] 研究报道,为后续的相关疼痛研究提供了可靠的实验动物模型。

目前,由于 NPP 的病因复杂,临床上关于 NPP 的治疗现状并不能够令人满意,现有的临床药物很难充分有效地缓解疼痛^[20-21]。近年来,随着中医药研究的不断发展,中药止痛逐渐引起了人们的关

注。中药具有药效优良、资源丰富、不良反应发生率低、无成瘾性等优势,在临床上越来越受到重视^[13]。白芷作为一种多年生高大草本,味辛、气芳香、性温,主入阳明,其化学成分主要是香豆素及其衍生物,如欧前胡乙素、当归素、白芷毒素、白当归醚等,是目前临床常用的解热镇痛中药之一^[12-15]。有研究证明,在背部皮下注射蛋白脲诱导的兔高热模型中应用中药白芷,具有明显的解热镇痛作用^[22];在腹腔注射醋酸诱导的小鼠疼痛模型中,应用白芷灌胃后,小鼠扭体次数明显减少,热板实验的疼痛阈值明显升高;此外,还有高小坤^[23]通过白芷挥发油对热刺激疼痛小鼠模型的研究结果也表明,白芷具有较好的镇痛效果。本研究通过 Von Frey 和热辐射实验发现,应用白芷灌胃的 CCI 小鼠机械性阈值显著高于对照组 CCI 小鼠(*P* < 0.05),白芷灌胃的 CCI 小鼠缩足潜伏时间明显大于对照组 CCI 小鼠(*P* < 0.05),这一结果表明白芷在 CCI 小鼠模型的机械刺激性疼痛和热痛觉中具有较好

的镇痛效果,且机械刺激阈值和小鼠缩足时间均接近于未进行 CCI 造模的正常小鼠,上述这些研究结果与其他相关研究报道文献相一致^[12-15,22-23],进一步证明了白芷能够在 NPP 中发挥良好的镇痛作用。但是,关于白芷镇痛的具体机理目前尚不完全清晰。

全球的 NPP 发病率约 6.9% ~ 10.0%^[24],由于该疾病的临床发病率高且病因复杂,为了更好地防治这一疾病,针对 NPP 的机制有必要进行深入探究。有研究发现,疼痛的产生与 Mrgs 相关受体密切相关,其中 MrgprD 亚型主要在背根神经节神经元中表达,参与痛觉的敏感性调节^[25]。WANG 等^[7]的研究显示,表达 MrgprD 的不同模式伤害性神经元对大多数神经胶质细胞与神经元具有支配作用,从而引起机械和热刺激的兴奋性;CROZIER 等^[25]通过全细胞膜片钳技术研究 DRG 中 MrgprD 阳性神经元的结果显示,缺失 MrgprD 时,神经元兴奋性降低,机械刺激疼痛敏感性下降。此外,目前关于 MrgprD 的临床相关研究主要集中在与瘙痒发生机制领域,然而在 NPP 中 MrgprD 对疼痛产生发挥的作用尚不清楚。因此,本研究通过小鼠坐骨神经慢性压迫 (CCI) 模型研究白芷镇痛过程中 MrgprD 在 NPP 中的水平变化,经 Western Blot 和 RT-PCR 实验,结果显示白芷灌胃的 CCI 小鼠中 MrgprD 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$);经免疫荧光染色检测,白芷灌胃后的 CCI 小鼠 DRG 中 MrgprD 阳性神经元的数量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。这一研究结果与上述国内外其他文献报道相比,不同之处在于应用了免疫学和分子生物学检测技术对与疼痛相关的受体蛋白 MrgprD 表达水平进行了详细的探讨,且结果表明白芷能够显著降低小鼠 DRG 神经元中 MrgprD 表达水平,使其表达水平接近于未进行 CCI 造模的正常小鼠,从而引起具有 EGFP 信号的神经元数量显著减少。同时,这也暗示着 MrgprD 在 NPP 中具有重要的作用,为今后新型镇痛药物研制的靶点选择奠定了基础。

同时,还有大量研究发现 TRPA1 是一种重要的瞬时痛觉感受器电位阳离子通道蛋白,具有广泛的生理功能,可调节细胞内 Ca^{2+} 、传递感觉信息^[26-29]。TRPA1 是目前研究最广泛、机制最清楚的 TRPA 亚家族成员之一,最早于 2003 年在小鼠 DRG 中发现的,能够在温度低于 17 °C 时被激活,可以介导小鼠伤害性冷刺激反应^[30]。近年来,有研究表明 TRPA1 与 G 蛋白偶联受体关联性较大,MrgprD 通过

TRPA1 通路参与 NPP 的产生,MrgprD-TRPA1 轴共同调节细胞内信号,使细胞对外部环境干扰作出整体反应^[30-32]。王地均等^[30]应用荧光定量 PCR、免疫组化和钙成像实验进一步实验证明了 TRPA1 作为冷痛调控通路影响了 MrgprD 表达水平的变化。WILSON 等^[31]研究发现 TRPA1 是感觉神经元和培养细胞中 MrgprD 的下游靶标,是 MrgprD 介导疼痛信号转导和组胺依赖性瘙痒信号通路所必需的。TREVISANI 等^[32]也得出了 TRPA1 参与 MrgprD 信号调控 NPP 产生的类似研究结果。本研究中的结果显示,白芷灌胃后的 CCI 小鼠中 TRPA1 表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$),其降低幅度明显高于王地均等^[30]研究报道的数据资料。白芷灌胃后的 CCI 小鼠 DRG 中 TRPA1 阳性神经元的数量显著低于纯水灌胃后的 CCI 小鼠 ($P < 0.05$),且阳性神经元数量降低值也明显低于 WILSON 等^[31]研究中的阳性神经元。这一结果表明白芷能够显著降低小鼠 DRG 神经元中 TRPA1 表达水平,使其表达水平接近于未进行 CCI 造模的正常小鼠,从而引起具有 EGFP 信号的神经元数量显著减少,镇痛效果显著优于其他相关文献研究报道^[12,14,23,31-32],进一步说明了 TRPA1 在参与 MrgprD 介导 NPP 调控中发挥着重要的作用。

此外,本研究中通过转染 HEK293 细胞钙离子成像实验,结果显示共转染 MrgprD 和 TRPA1 质粒的 HEK293 细胞的钙离子内流和荧光强度显著高于分别单转染 MrgprD、TRPA1 及对照组 ($P < 0.05$)。这一结果提示 HEK293 细胞中 MrgprD 和 TRPA1 之间存在着功能偶联关系,MrgprD 信号的激活需要 TRPA1 的参与。分析原因可能是以往的研究大多认为 G 蛋白偶联受体和下游的 TRP 通道一起参与 NPP 的产生,MrgprD-TRPA1 轴是机体感知有害刺激的一种重要信号传导途径,TRPA1 借助于伤害性刺激传导与 MrgprD 密切联系,通过调控 MrgprD 在 DRG 神经元中的表达水平和促进钙离子内流来影响 NPP 的发生程度,结果证实了 β -alanine 诱导细胞中的 MrgprD 活化至少部分通过 GPCR 介导的 TRPA1 磷酸化来调节 TRPA1 相关功能,这也反向证明了 MrgprD 和 TRPA1 能够在 DRG 神经元上协同表达一致的现象^[10,33]。

综上所述,本研究成功建立了小鼠 CCI 模型,深入探究白芷在 CCI 小鼠模型中镇痛的效果及其机制,证明了 MrgprD-TRPA1 是 NPP 的重要作用靶

点,白芷可以通过调控 MrgprD-TRPA1 信号转导通路来抑制 NPP 程度,这为后续开发新型临床镇痛药物,探索中医药镇痛机制的研究奠定了基础。

参 考 文 献(References)

[1] PETROIANU G A, ALOUM L, ADEM A. Neuropathic pain: mechanisms and therapeutic strategies [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1072629.

[2] 张俊,黄琴,肖彩芝,等. 化疗药物诱导的神经病理性疼痛动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 402-409.

ZHANG J, HUANG Q, XIAO C Z, et al. Advances in animal models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 402-409.

[3] FIORE N T, DEBS S R, HAYES J P, et al. Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain [J]. Nat Rev Neurol, 2023, 19(4): 199-220.

[4] 王琛,陈鹏,林东升,等. 不同结扎材料对慢性压迫性损伤模型胶质细胞活化的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(8): 1207-1212.

WANG C, CHEN P, LIN D S, et al. Effects of different materials for partial sciatic nerve ligation on glial cell activation in rat models of chronic constriction injury [J]. J South Med Univ, 2020, 40(8): 1207-1212.

[5] ROSENBERGER D C, BLECHSCHMIDT V, TIMMERMAN H, et al. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy [J]. J Neural Transm, 2020, 127(4): 589-624.

[6] KUMARI P, YADAV A, PATEL M, et al. Targeting G protein coupled receptors for alleviating neuropathic pain [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2022, 193(1): 99-117.

[7] WANG H, ZYLKA M J. Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons [J]. J Neurosci, 2009, 29(42): 13202-13209.

[8] DUSSOR G, ZYLKA M J, ANDERSON D J, et al. Cutaneous sensory neurons expressing the Mrgprd receptor sense extracellular ATP and are putative nociceptors [J]. J Neurophysiol, 2008, 99(4): 1581-1589.

[9] WANG C, GU L, RUAN Y, et al. Pirt together with TRPV1 is involved in the regulation of neuropathic pain [J]. Neural Plast, 2018, 2018: 4861491.

[10] MARCOTTI A, FERNÁNDEZ-TRILLO J, GONZÁLEZ A, et al. TRPA1 modulation by *Sigma*-1 receptor prevents oxaliplatin-induced painful peripheral neuropathy [J]. Brain, 2023, 146(2): 475-491.

[11] SHINOHARA T, HARADA M, OGI K, et al. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine [J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 23559-23564.

[12] ZHOU F, METZNER K, ENGEL P, et al. Slack potassium channels modulate TRPA1-mediated nociception in sensory neurons [J]. Cells, 2022, 11(10): 1693.

[13] 王蕊,刘军,杨天宇,等. 白芷化学成分与药理作用研究进

展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(2): 123-128.

WANG R, LIU J, YANG D Y, et al. Research progress in chemical constituents and pharmacological action of *Angelica dahurica* [J]. Inf Tradit Chin Med, 2020, 37(2): 123-128.

[14] 庞心悦,景永帅,郑玉光,等. 白芷的化学成分及对神经系统疾病的治疗作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 690-691.

PANG X Y, JING Y S, ZHENG Y G, et al. Chemical constituents of *Angelica dahurica* and its therapeutic effect on nervous system diseases [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(9): 690-691.

[15] 覃文玉,杨丹淇,张源文,等. 白芷-川芎药对镇痛作用研究 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(1): 17-19.

QIN W Y, YANG D Q, ZHANG Y W, et al. Research on analgesic effects of Chuanxiong rhizoma-angelicae dahuricae *Radix* herb pair [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2021, 30(1): 17-19.

[16] 郭琨,陈丹,朱婵,等. 白芷水提液镇痛作用及其机理研究 [J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2019, 37(4): 103-110.

GUO J, CHEN D, ZHU C, et al. Analgesic effect and analgesic mechanism of *Angelica dahurica* extracts [J]. J Guangxi Norm Univ Nat Sci Ed, 2019, 37(4): 103-110.

[17] SONG S, LUO Y, LIU Z, et al. Double-gene copromoting expression analysis in tPA/GH transgenic goat mammary epithelial cells and thrombolytic activity of tPA *in vitro* [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 6484073.

[18] 李明珠,王文萍,金圣博. 奥沙利铂诱导的神经病理性疼痛大鼠模型研究及其在中医方面应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 278-285.

LI M Z, WANG W P, JIN S B. Rat model of neuropathic pain induced by oxaliplatin and its application in traditional Chinese medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 278-285.

[19] BIELEWICZ J, KAMIENIAK M, SZYMONIUK M, et al. Diagnosis and management of neuropathic pain in spine diseases [J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1380.

[20] PERGOLIZZI J V, GHARIBO C, MAGNUSSON P, et al. Pharmacotherapeutic management of trigeminal neuropathic pain: an update [J]. Expert Opin Pharmacother, 2022, 23(10): 1155-1164.

[21] BARON R, DICKENSON A H, CALVO M, et al. Maximizing treatment efficacy through patient stratification in neuropathic pain trials [J]. Nat Rev Neurol, 2023, 19(1): 53-64.

[22] 雷雨恬,黄婷,陈文莉,等. 不同等级川白芷有效成分含量及抗炎镇痛作用对比研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 105-110.

LEI Y T, HUANG T, CHEN W L, et al. Comparative study on the anti-inflammatory, analgesic effects and components contents of different grades of *Angelica dahurica* var. *formosana* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(1): 105-110.

[23] 高小坤. 白芷挥发油镇痛、镇静作用实验研究 [J]. 现代中

西结合杂志, 2013, 22(35): 3880-3882, 3888.

GAO X K. Experimental study on the analgesic and sedative effects of essential oil of *Radix Angelicae Dahuricae* [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2013, 22 (35): 3880 - 3882, 3888.

[24] HU X, DU L, LIU S, et al. A TRPV4-dependent neuroimmune axis in the spinal cord promotes neuropathic pain [J]. J Clin Invest, 2023, 133(5): e161507.

[25] CROZIER R A, AJIT S K, KAFTAN E J, et al. MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability [J]. J Neurosci, 2007, 27(16): 4492-4496.

[26] IANNONE L F, DE LOGU F, GEPPETTI P, et al. The role of TRP ion channels in migraine and headache [J]. Neurosci Lett, 2022, 768: 136380.

[27] LUO Y, SUTTLE A, ZHANG Q, et al. Transient receptor potential (TRP) ion channels in orofacial pain [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(6): 2836-2850.

[28] NAZLROĞLU M, ÖZ A, YLLDLZHAN K. Selenium and neurological diseases; focus on peripheral pain and TRP channels [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(6): 501-517.

[29] ZHANG H, CHEN H. TRPA1 involved in miR-141-5p-alleviated neuropathic pain induced by oxaliplatin [J].

Neuroreport, 2021, 32(3): 284-290.

[30] 王地均, 金香, 唐宗湘, 等. G 蛋白偶联受体 MrgprD 研究进展及对中医药研究的启示 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 419-423.

WANG D J, JIN X, TANG Z X, et al. Research progress of G protein coupled receptor MrgprD and its implications for the research of Chinese medicine [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(3): 419-423.

[31] WILSON S R, GERHOLD K A, BIFOLCK-FISHER A, et al. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch [J]. Nat Neurosci, 2011, 14(5): 595-602.

[32] TREVISANI M, SIEMENS J, MATERAZZI S, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(33): 13519-13524.

[33] RUAN Y, JIN X, JI H, et al. Water extract of *Notopterygium incisum* alleviates cold allodynia in neuropathic pain by regulation of TRPA1 [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 305: 116065.

[收稿日期] 2023-09-21

《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。



侯媛璐,赵茹茹,高磊,等. 复合感染脓毒症模型大鼠的炎症与凝血功能紊乱进程[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 230-237.

HOU Y L, ZHAO R R, GAO L, et al. Development of inflammation and coagulation disorders in sepsis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 230-237.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.010

复合感染脓毒症模型大鼠的炎症与凝血功能紊乱进程

侯媛璐¹, 赵茹茹¹, 高磊¹, 李奇峰^{1,2}, 姚政^{1,3}, 李明泓^{1,2*}

(1. 云南中医药大学基础医学院, 昆明 650500; 2. 云南省高校中医治法与中药药效关系研究
科技创新团队, 昆明 650500; 3. 云南省中西医结合慢病防治重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨脓毒症病程中凝血功能和炎症水平的改变。**方法** 通过改良盲肠结扎穿刺术(cecal ligation and puncture, CLP)构建复合感染脓毒症大鼠模型(multiple infection sepsis model, MIM), 将48只雄性SD大鼠随机分为空白组(Control组, $n = 8$)、假手术组(Sham组, $n = 8$)、复合感染脓毒症模型4 h(4 h组, $n = 8$)、8 h(8 h组, $n = 8$)、12 h(12 h组, $n = 8$)、16 h(16 h组, $n = 8$)组, 检测炎症指标和凝血相关指标。**结果** (1)所有脓毒症模型大鼠脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及白介素-6(interleukin-6, IL-6)含量较Sham组均显著升高($P < 0.001$), 且术后随时间延长, LPS及IL-6含量逐渐升高, 12 h后LPS无明显变化; (2)脓毒症模型病程中后期组(8 h及以后)凝血酶原时间(prothrombin time, PT)较Sham组明显延长($P < 0.01$); (3)与Sham组相比, 8 h组、12 h组、16 h组活化部分凝血酶原时间(activated partial thromboplastin time, APTT)时间显著延长($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且8 h后APTT逐渐延长接近Control组; (4)8 h后(不含8 h)纤维蛋白原(fibrinogen, Fbg)含量较Sham组显著增加($P < 0.01$); (5)脓毒症病程各时间段组均与Control组纤维蛋白降解产物(fibrin degradation products, FDP)具有显著性差异($P < 0.01$), 而与Sham组无显著性差异; (6)脓毒症病程各时间段组抗凝血酶-III(antithrombin-III, AT-III)较Sham组均显著降低($P < 0.01$), 且AT-III随病程呈下降趋势, 其中4 h组及8 h组与16 h组比存在显著性差异。**结论** MIM大鼠模型可较好地反映脓毒症病程中炎症与凝血紊乱的发展趋势与相互关系, 可更好的为探究脓毒症病程发展提供研究基础。

【关键词】 脓毒症; 疾病进程; 炎症; 凝血; 多器官功能衰竭

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)02-0230-08

Development of inflammation and coagulation disorders in sepsis

HOU Yuanlu¹, ZHAO Ruru¹, GAO Lei¹, LI Qifeng^{1,2}, YAO Zheng^{1,3}, LI Minghong^{1,2*}

(1. Basic Medicine College, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Research and Innovation Team in University of Yunnan Province on the Relationship between Treatment Methods and Efficacy of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 3. Yunnan Key Laboratory of Chronic Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Kunming 650500, China)

Corresponding author: LI Minghong. E-mail: lmh@ynutcm.edu.cn

【基金项目】 云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项(202001A2070001-032), 云南省教育厅科学研究基金(2023Y0441)。

Funded by Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Yunnan University of Chinese Medicine Joint Project on Applied Basic Research (202001A2070001-032), Yunnan Provincial Department of Education Scientific Research Fund (2023Y0441).

【作者简介】 侯媛璐, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治疾病机制研究。Email: 2575430824@qq.com

【通信作者】 李明泓, 男, 讲师, 研究方向: 中西医结合基础。Email: lmh@ynutcm.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate changes in coagulation function and inflammation levels during sepsis. **Methods** A rat model of sepsis was established using the multiple infection sepsis model (MIM) based on cecal ligation and puncture. Forty-eight male Sprague-Dawley rats were assigned randomly to the following groups: control group, sham group, 4 h sepsis group, 8 h sepsis group, 12 h sepsis group, and 16 h sepsis group ($n = 8$ per group). Inflammatory markers and coagulation-related indicators were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and coagulation analysis. **Results** (1) Lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-6 (IL-6) levels were significantly higher in the model rats at all time points compared with the sham group ($P < 0.001$). LPS and IL-6 levels increased gradually with disease progression, with no further changes in LPS after 12 hours. (2) Prothrombin time (PT) was significantly prolonged in the middle and late stages of the sepsis model, starting from 8, compared with the sham group ($P < 0.01$). (3) Partially activated prothrombin time (APTT) time was significantly prolonged in the 8, 12, and 16 h groups compared with the sham group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). APTT gradually lengthened from 8 h, but approached control levels thereafter. (4) Fibrinogen (Fbg) content was significantly higher in all sepsis groups, except for the 8 h group, compared with the sham group ($P < 0.01$). (5) Fibrin degradation products (FDP) differed significantly between the control and sham groups ($P < 0.01$), but not between the sham and sepsis groups. (6) Antithrombin-III (AT-III) levels decreased significantly throughout each stage of sepsis progression compared with the sham group ($P < 0.01$), and AT-III showed a downward trend with the course of disease, with significant differences among the 4, 8, and 16 h groups. **Conclusions** The MIM rat model can reflect the development of inflammatory and blood coagulation disorders and their relationship during the course of sepsis, and may thus provide a good foundation for further research into the disease course of sepsis.

[Keywords] sepsis; disease process; inflammation; coagulation; multiple organ failure

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

脓毒症(sepsis)是一种威胁生命的多器官功能障碍综合征,其特征是宿主对感染的反应失调^[1-3],往往发生于各种严重创伤、感染以及大型手术后,是临床常见并发症^[4]。在脓毒症发生发展的过程中,凝血功能紊乱是其重要的病理生理变化之一。脓毒症时,炎性反应介质超长释放引起机体过度炎症反应,凝血系统被激活^[5],而纤维蛋白溶解受到抑制^[6],随后产生大量微血栓,甚至导致弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)的形成,DIC诱发微循环障碍,加剧脓毒症多器官功能衰竭,导致死亡^[7-8]。KINASEWITZ等^[9]对2530例脓毒症患者进行荟萃分析的结果显示,炎症反应和凝血系统的改变与疾病的严重程度和病死率有很大的关系。有研究表明凝血功能障碍和炎症的一般标志物与急性生理学和慢性健康评估(APACHE)Ⅱ评分测量的脓毒症严重程度之间存在显著相关性,重症脓毒症的28 d生存期与炎症、内皮损伤和凝血酶生成减少以及抗凝因子的补充有关^[10]。然而,目前缺乏脓毒症病程与凝血功能紊乱发展间关系的时序性研究,故本研究将探讨脓毒症模型大鼠病情进展与凝血指标间的相互关系,以明晰脓毒症病程进展与凝血功能紊乱间的关系。

传统盲肠结扎穿刺(cecum ligation and puncture,

CLP)模型存在病程不均一性的问题,不利于探讨脓毒症病程发展过程中炎症与凝血功能的变化趋势,在前期的研究工作中,本课题组通过在动物腹腔放置带菌的复合感染支架,对CLP模型进行改良,建立了一种新的脓毒症动物模型——复合感染脓毒症模型(multiple infection sepsis model, MIM),MIM模型可使肠内容物不断渗漏,加剧术后感染水平、加深器官损伤程度、提高模型死亡率且模型死亡时间更为统一,更符合严重感染状态下机体过度反应而产生脓毒症多器官功能衰竭的临床实际^[11]。本研究利用MIM模型探讨脓毒症进程中凝血功能的改变,进一步评价随着病情深入时凝血功能指标的变化,为临床监测脓毒症患者血流动力学改变和为临床更及时的救治提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究选择48只体重在280~300 g的8周龄SPF级SD雄性大鼠,购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。温度20~26℃,湿度40%,每日12 h昼夜循环,无特殊病原菌环境中适应性饲养1周,饲养过程中以标准饲料进行喂养,自由饮水、摄食,饲养于云南中医药大学

医鉴甲楼观察室四【SYXK(滇)K2022-0004】。实验操作前室内温度约 23℃。待大鼠体重达到 300~320 g 时,开始实验,随机分为空白组(Control 组)、假手术组(Sham 组)、4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组,每组 8 只。本研究已通过云南中医药大学实验动物伦理委员会批准(R-06202320)。

1.1.2 主要试剂与仪器

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)试剂盒(泉州睿信, 20210812),白介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(泉州睿信, 20210813),凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定试剂盒(Siemens, 558078),活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)测定试剂盒(Siemens, 557667),纤维蛋白原(fibrinogen, Fbg)测定试剂盒(Siemens, 50862),全自动配套的凝血质控品、标准品(Siemens, S0009),纤维蛋白降解产物(fibrin degradation products, FDP)试剂盒(泉州睿信, RX302172R),抗凝血酶Ⅲ(antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ)试剂盒(泉州睿信, RX300315R)。

高速台式离心机(上海安亭 TGL-16G, 中国),血凝仪(Sysmex, CA620, 日本),多功能酶标仪(TECAN, InfiniteM200PRO, 瑞士),电子天平(Sartorius, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备

MIM 模型各组大鼠于术前 14 h 禁食不禁水。麻醉满意后固定于操作板,腹部中下部用碘伏棉签消毒,在距尿道口上方 1 cm 处,沿腹中线切开约 2.5 cm 的纵行切口,用钝性无菌解剖镊从腹腔拉出盲肠,避开血管分离盲肠末端肠系膜,用 3/0 型号手术缝合线在盲肠末端 1 cm 处结扎,将结扎部穿过复合感染模型支架中心部位用软管固定,轻提起结扎部分盲肠,用 21 G 针从上向下依次穿过三针六孔,每针旋转角度约 30°,两针之间上下间留出约 3 mm 的间隔。用无菌棉签从穿刺部位挤出少量粪便并擦去。抽取 0.6 mL 10% 鼠粪混悬液滴加在复合感染支架预先固定的两个棉球上,每个 0.3 mL。操作完成后,提起腹腔切口将复合感染支架连同盲肠放回腹腔并尽量将复合感染支架置于腹腔底部。最后逐层缝合切口。将切口缝合好的大鼠置于饲养笼中等待麻醉苏醒,术后给予大鼠正常饮食水。所有动物手术操作应在 20 min 内完成,保持一致性。Sham 组仅暴露盲肠,其余同 MIM 组。

1.2.2 血液样品采集

采用大鼠腹主动脉取血,4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组分别于造模结束后在 4、8、12、16 h 取血、Sham 组和 Control 组于造模结束后 16 h 取血。取血前先对大鼠称重,用异氟烷麻醉大鼠,待大鼠麻醉后,将大鼠四肢用绳子固定于操作台上,用消毒后的剪刀将大鼠腹部剪开,使用棉花球将肠道和筋膜钝性分离,暴露腹主动脉,使用 5 mL 的无菌注射器于腹主动脉分叉处平行进针,取血液 4.5 mL,将所采血液注入采血管中与抗凝剂混匀,3000 r/min,离心 20 min,离心后取上清,置于-80℃冷冻,用于后续实验。

1.2.3 凝血仪测定大鼠凝血功能相关指标

按照凝血仪说明书及所需试剂盒说明书步骤,分别对 Control 组、Sham 组、4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组大鼠采集好的血液中 PT, APTT 及 Fbg 进行测定。

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

检测 LPS、IL-6、FDP、AT-Ⅲ,严格按 ELISA 试剂盒的测定操作,分别对 Control 组、Sham 组、4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组大鼠采集好的血液进行检测。

1.3 统计学分析

收集并整理数据,Sham 组与所有组进行对比分析,4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组测定结果则分别进行组间对比。组间比较采用单因素方差分析。数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据统计分析使用 SPSS 26.0,所有图像制作使用 Graph Pad Prism 9.5。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

Sham 组:术后 4 h 所有大鼠麻醉苏醒,并且活动自如,能够正常饮食饮水,无嗜睡及蜷缩等精神萎靡状态,受到外界刺激后能够做出规避动作,但行动速度稍慢,眼角和鼻尖无异常分泌物,无其他不良症状出现。

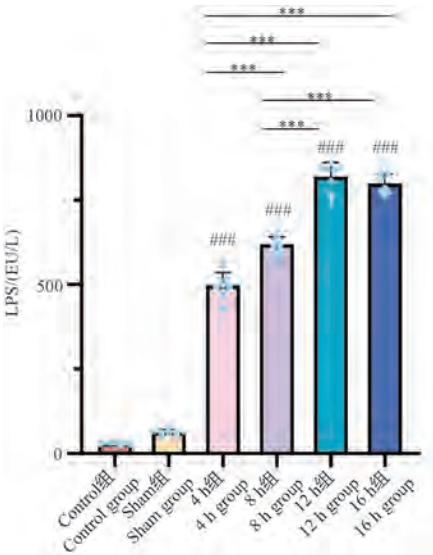
4 h 组:大鼠出现竖毛症状,状态较为活跃,尿量正常,开腹后观察到个别大鼠结扎处出现肿胀。8 h 组:大鼠出现发热、寒颤,聚集成堆,出现嗜睡现象,仅有个别大鼠进食饮水减少,尿液颜色变深,开腹后观察到盲肠结扎部位出现肿胀坏死,肠管轻微粘连。12 h 组:大鼠聚集成堆,活动力差,部分大鼠

眼角出现分泌物,无粪便排出,体温偏高,个别大鼠状态较差,出现闭眼、低头蜷缩,抓起后反抗力降低,打开腹腔,肠道粘连严重,结扎部位及置片部位部分被包裹,腹腔内出现少量积液,肝出现粘连。16 h 组:大鼠几乎不走动,少量饮水,竖毛严重,出现固体状浓缩尿,个别大鼠出现腹泻症状,体型呈现出消瘦状态。打开腹腔,出现大量液体,恶臭,结扎处坏死严重,肠道粘连严重,个别大鼠结扎处与肌层粘连,肠管水肿胀气,肠壁透明,内有大量液体,可见血管,肝颜色发生变化,血量减少。一般观察结果提示,随病程进展脓毒症模型大鼠炎症水平和多脏器损伤不断加剧。

2.2 感染与炎症

2.2.1 各组大鼠 LPS 测定结果

与 Control 组相比,Sham 组 LPS 含量对比无显著性差异($P > 0.05$);脓毒症 4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组的 LPS 含量与 Sham 组相比均显著上升($P < 0.001$);随脓毒症病情的发展,与 4 h 组相比,8 h 组、12 h 组、16 h 组 LPS 含量显著上升,与 8 h 组相比,12 h 组、16 h 组 LPS 含量显著上升,与 12 h 组相比,16 h 组 LPS 含量无明显差异;各组间 LPS 含量与前一组相比均显著上升($P < 0.001$),见图 1,说明感染不断加深。



注:与 Sham 组相比,### $P < 0.001$;模型各时间组间相比,*** $P < 0.001$ 。(下同)

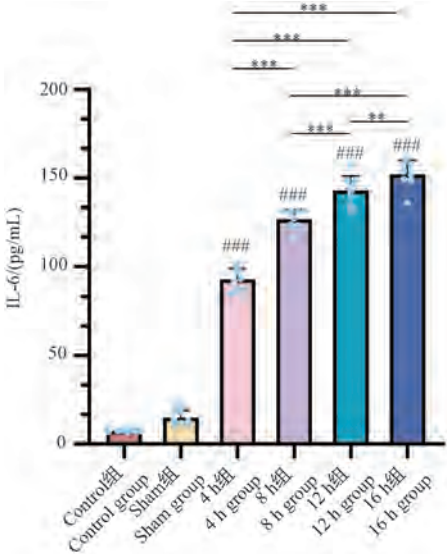
图 1 各组的 LPS 含量对比

Note. Compared with Sham group, ### $P < 0.001$. Comparison between groups at each time of the model, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of LPS content between groups

2.2.2 各组大鼠 IL-6 测定结果

与 Control 组相比,Sham 组 IL-6 含量无统计学意义($P > 0.05$);与 Sham 组相比,脓毒症 4 h 组、8 h 组、12 h 组、16 h 组 IL-6 含量显著上升($P < 0.001$);随脓毒症病情的发展,与 4 h 组相比,8 h 组、12 h 组、16 h 组 IL-6 含量显著上升($P < 0.001$),与 8 h 组相比,12 h 组、16 h 组 IL-6 含量显著上升($P < 0.001$),与 12 h 组相比,16 h 组 IL-6 含量明显上升($P < 0.01$),见图 2,说明炎症程度随时间进程的不断加深。



注:模型各时间组间相比,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 各组的 IL-6 含量对比

Note. Comparison between groups at each time of the model, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Comparison of IL-6 content between groups

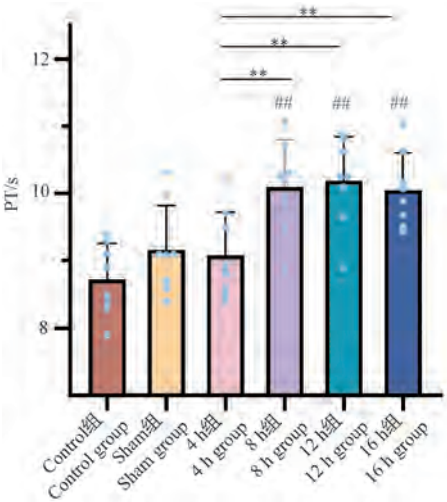
2.3 凝血指标

2.3.1 各组大鼠 PT 测定结果

与 Control 组相比,Sham 组 PT 没有明显差异。随脓毒症病情的发展,较 Sham 组,8 h 组、12 h 组、16 h 组 PT 时间均明显延长($P < 0.01$);与 4 h 组相比,8 h 组、12 h 组、16 h 组 PT 时间均明显延长($P < 0.01$),见图 3,说明脓毒症期间,随着凝血酶原时间延长,外源性凝血途径活性不断降低。

2.3.2 各组大鼠 APTT 测定结果

与 Control 组相比,Sham 组 APTT 时间有一定缩短($P < 0.05$),这可能是手术引起的;随病程发展,8 h 组 APTT 时间延长($P < 0.05$),12 h 组、16 h 组 APTT 时间明显延长($P < 0.01$);与 4 h 组相比,8 h 组 APTT 时间明显延长($P < 0.01$),12 h 组、16 h 组 APTT 时间显著延长($P < 0.001$),见图 4,说明脓毒



注:与 Sham 组相比, $^{##}P < 0.01$ 。(下同)

图 3 各组 PT 对比

Note. Compared with Sham group, $^{##}P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Comparison of PT between groups

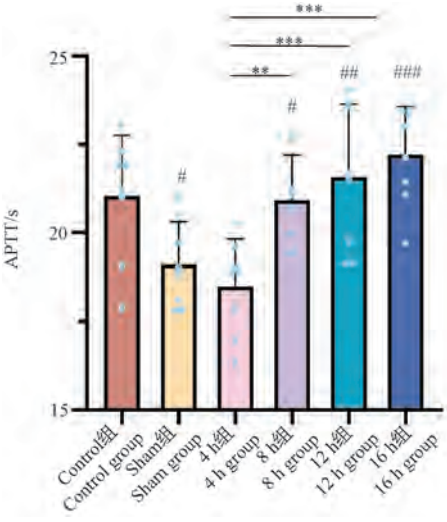


图 4 各组 APTT 对比

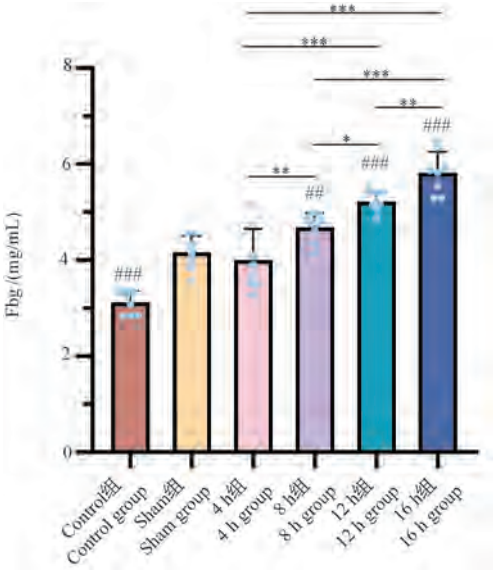
Figure 4 Comparison of APTT between groups

症期间部分活化凝血酶原时间延长,并随病情时间延长不断加深。

2.3.3 各组大鼠 Fbg 测定结果

与 Control 组相比,Sham 组 Fbg 含量显著升高 ($P < 0.001$);与 Sham 组相比,8 h 组 Fbg 含量明显升高 ($P < 0.01$),12 h 组、16 h 组 Fbg 含量显著升高 ($P < 0.001$);与 4 h 组相比,8 h 组、12 h 组、16 h 组 Fbg 含量变化与同 Sham 组比较相同;与 8 h 组相比,12 h 组 Fbg 含量升高 ($P < 0.05$),16 h 组 Fbg 含量显著升高 ($P < 0.001$);与 12 h 组相比,16 h 组

Fbg 含量明显升高 ($P < 0.01$),见图 5,说明脓毒症期间,血液呈高凝状态,并随病情时间延长而加重。



注:模型各时间组间相比, $^{*}P < 0.05$ 。

图 5 各组的 Fbg 含量对比

Note. Comparison between groups at each time of the model, $^{*}P < 0.05$.

Figure 5 Comparison of Fbg content between groups

2.3.4 各组大鼠 FDP 测定结果

与 Control 组相比,Sham 组 FDP 含量明显增高 ($P < 0.01$),与 Sham 组相比脓毒症病程各时间段组大鼠 FDP 含量无显著性差异 ($P > 0.05$),见图 6,说明脓毒症模型术后急性期,纤溶功能可能未受到影响。

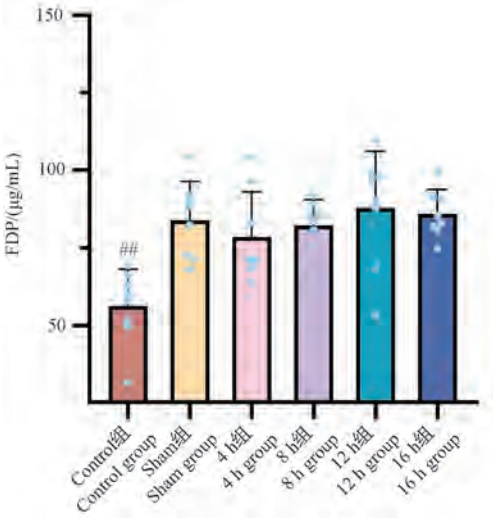


图 6 各组的 FDP 含量对比

Figure 6 Comparison of FDP content between groups

2.3.5 各组大鼠 AT-Ⅲ测定结果

与 Control 组相比 Sham 组血液中 AT-Ⅲ的含量显著升高($P < 0.001$);与 Sham 组相比,4 h 组、8 h 组、12 h 组和 16 h 组血液中 AT-Ⅲ的含量均显著降低($P < 0.001$),且随病情时间延长呈不断降低趋势;脓毒症病程各时间段组 AT-Ⅲ含量明显减少($P < 0.01$);与 4 h 组相比,16 h 组 AT-Ⅲ明显降低($P < 0.01$);与 8 h 组相比,16 h 组 AT-Ⅲ含量明显降低($P < 0.01$),见图 7,说明脓毒症大鼠凝血功能随病情紊乱程度不断加深。

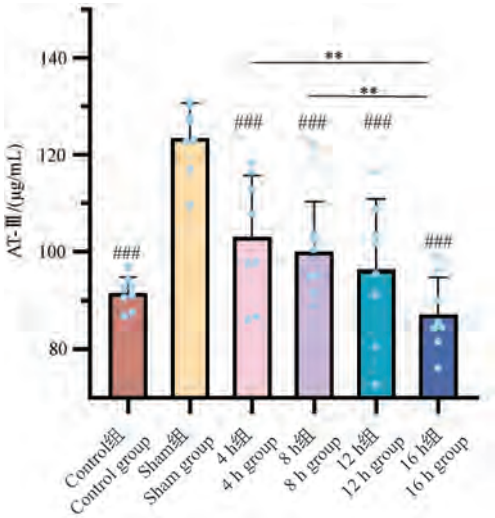


图 7 各组 AT-Ⅲ含量对比
Figure 7 Comparison of AT-Ⅲ content between groups

3 讨论

患有脓毒症时,内皮细胞放大免疫反应并激活凝血系统,既是炎症的靶标和来源,也是局部和全身免疫反应之间的联系。脓毒症发生炎症期间,中性粒细胞与内皮细胞相互作用,并在趋化因子的驱动下迁移到炎症部位消除病原体^[12],机体为响应免疫细胞产生的细胞因子,内皮表达粘附分子并产生血管活性化合物、炎性细胞因子和趋化因子;此外,炎性细胞因子还可通过靶向内皮细胞引起内皮损伤^[13],从而使血液从抗凝状态切换到促凝状态,这些反应有助于局部控制感染,但全身活化可导致微血管血栓形成、毛细血管通透性降低、低血压、组织缺氧,并最终导致组织损伤^[14],引发 DIC,诱发 MODS。

炎症反应与凝血功能紊乱二者可以产生相互促进的作用^[15]。伴随脓毒症发展的炎症因子风暴会引发凝血酶活化和血管内凝血病的发展,活化的

凝血酶诱导血小板活化,从而促进对炎症和感染的微血栓形成^[16],还可以促进 IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子细胞的活化^[17],炎症促进凝血,而凝血功能紊乱又进一步加剧炎症^[18],形成恶性循环。炎症因子与内毒素等炎性递质一起作用于血管内皮细胞,导致组织因子释放,从而启动外源性凝血系统^[19];血管内皮细胞激活并出现功能障碍^[20],内皮细胞损伤,启动内源性凝血系统;同时,生理性抗凝系统和纤溶系统受到不同程度的抑制,促凝和抗凝功能失衡,引发凝血功能障碍,血液处于高凝状态,最终引起 DIC^[21]。因此,探究脓毒症病程与凝血功能障碍的关系,利于更好地认识脓毒症炎症水平与凝血指标变化之间的相关性。

本研究采用在传统 CLP 模型基础上改良建立 MIM 模型作为动物模型。这是由于内毒素模型虽然技术上容易、可重复性高,但并不能完全再现人类脓毒症特征^[22];而被认为是最接近脓毒症临床表现的 CLP 模型^[23],模型动物腹腔感染灶容易被大网膜及周围组织包裹^[24],因而无法用于稳定研究脓毒症病程^[25]。本课题在 CLP 模型基础上改良的 MIM 模型可使肠内容物不断渗漏引发持续感染,经前期实验证明:相较于 CLP 模型,MIM 模型反应感染和炎症水平变异性更低,病程进展更为一致,模型的结构效度更好;术后感染表现更为剧烈、器官损伤程度更深、死亡率更高且组内死亡时间更为均一,模型的表面效度更好^[11]。因而 MIM 造模方法能获得病程进展更为均一的脓毒症模型动物,更适合研究脓毒症病程与凝血功能障碍进展的时序关系。

本研究采用 LPS、IL-6 作为感染和炎症的关键指标。其中,LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的一种脂多糖成分,白细胞对细菌的裂解可导致 LPS 释放,在脓毒症中 LPS 刺激多种炎症介质的释放^[26],引发“炎症因子风暴”,而 IL-6 是促炎因子中最重要的成员^[27]。在本研究中,Sham 组与 Control 组 LPS、IL-6 含量对比无统计学意义,可见手术操作不会造成明显的感染和炎症;LPS 及 IL-6 含量随脓毒症病情发展呈不断上升趋势,提示造模成功,且病情随时间进程不断加剧。

凝血相关指标结果表明,随着脓毒症病程的推进,8 h 及以后 PT 和 APTT 时间较 Sham 组明显延长,Fbg 快速升高,提示造模手术后内外源性凝血途径快速活化,组织因子凝血/抗凝途径明显紊乱,血

液高凝;Control 组与 Sham 组间对比 FDP 存在明显统计学意义,这提示 Sham 组造成的创伤(术后 16 h 检测)会引起纤溶作用增强,脓毒症病程各时间段组均与 Sham 组无显著性差异,提示脓毒症急性期过程中纤溶功能可能未受到明显影响,但是病程中大量生成的 FDP 也会干扰纤维蛋白多聚化,造成出血倾向,加重 DIC;Sham 组与 Control 组间对比 AT-Ⅲ明显升高,这提示手术造成的创伤激活了凝血系统,随着脓毒症病程的推进,8 h 及以后各组 AT-Ⅲ较 Sham 组均显著降低,且与 4 h 组、8 h 组相比,16 h 组 AT-Ⅲ存在显著性差异,呈现明显下降趋势,AT-Ⅲ的结果可以与 PT 和 APTT 及 Fbg 的结果相互印证,说明该脓毒症模型下,确实出现了明显的凝血/抗凝紊乱,这可能是由于脓毒症造成的多器官功能损伤,导致 AT-Ⅲ表达能力下降,进而导致机体抗凝功能下降,加重 DIC 的发展。

DIC 的特征在于血管内凝血的全身激活,凝血与纤维蛋白溶解失衡是其主要发病机制,全身微血栓形成和全身出血倾向是主要临床表现。临床结局通常是诱发多器官功能衰竭。作为脓毒症的常见并发症,DIC 显著增加脓毒症患者的死亡率^[28],因此判断病情进展情况,及时治疗、干预以改善结果对于脓毒症患者的预后十分重要。本研究通过对 MIM 模型大鼠 4、8、12、16 h 血液中的 LPS、IL-6、PT、APTT、Fbg、FDP 和 AT-Ⅲ进行联合检测发现:随着病情不断发展,感染与炎症水平不断升高,而凝血功能障碍也随之加重。凝血功能各指标提示在 MIM 术后 8 h 血液高凝,可能进入 DIC 高凝期;同时 AT-Ⅲ随病程发展持续降低,提示抗凝功能随病程发展不断下降,这是造成出血、多器官功能障碍等危症的重要风险因素。综上,采用 MIM 模型能够很好地模拟临床中脓毒症病情进展,而随着病情进展模型大鼠炎症水平持续升高,且在病程中后期开始表现出明显的凝血障碍和出血倾向,该研究结果可与临床脓症患者炎症因子和凝血指标关系的研究相互佐证^[29],为脓毒症炎症与凝血功能障碍的治疗及给药提供更加坚实的基础数据。

参 考 文 献(References)

[1] SHANKAR-HARI M, PHILLIPS G S, LEVY M L, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for Sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 775-787.

[2] SEYMOUR C W, LIU V X, IWASHYNA T J, et al. Assessment

of clinical criteria for Sepsis: for the third international consensus definitions for Sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 762-774.

[3] LI W, MA F, ZHANG L, et al. S-propargyl-cysteine exerts a novel protective effect on methionine and choline deficient diet-induced fatty liver via akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4690857.

[4] KOMOROWSKI M, CELI L A, BADAWI O, et al. The artificial intelligence clinician learns optimal treatment strategies for sepsis in intensive care [J]. Nat Med, 2018, 24(11): 1716-1720.

[5] 葛令清, 诸澎伟, 陆涛, 等. 脓毒症患儿凝血功能障碍的评判及预后的回顾性研究 [J]. 现代医药卫生, 2023, 39(1): 52-57.

GE L Q, ZHU P W, LU T, et al. Evaluation of coagulation function disorder and prognosis in children with sepsis: a retrospective study [J]. J Mod Med Health, 2023, 39(1): 52-57.

[6] IBA T, CONNORS J M, NAGAOKA I, et al. Recent advances in the research and management of sepsis-associated DIC [J]. Int J Hematol, 2021, 113(1): 24-33.

[7] LEVI M, SIVAPALARATNAM S. Disseminated intravascular coagulation: an update on pathogenesis and diagnosis [J]. Expert Rev Hematol, 2018, 11(8): 663-672.

[8] LEVI M. The coagulant response in sepsis and inflammation [J]. Hamostaseologie, 2010, 30(1): 10-12.

[9] KINASEWITZ G T, YAN S B, BASSON B, et al. Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569] [J]. Crit Care, 2004, 8(2): R82-R90.

[10] GYAWALI B, RAMAKRISHNA K, DHAMOON A S. Sepsis: the evolution in definition, pathophysiology, and management [J]. SAGE Open Med, 2019, 7: 2050312119835043.

[11] 段爽, 朱琰, 赵茹茹, 等. 复合感染脓毒症大鼠模型的构建和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1034-1041.

DUAN S, ZHU Y, ZHAO R R, et al. Construction and evaluation of rat models of multiple-infection sepsis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1034-1041.

[12] SHEN X F, CAO K, JIANG J P, et al. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(9): 1687-1697.

[13] HOTCHKISS R S, MOLDAWER L L, OPAL S M, et al. Sepsis and septic shock [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16045.

[14] DOLMATOVA E V, WANG K, MANDAVILLI R, et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications [J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(1): 60-73.

[15] 徐春苗. 炎症因子、凝血指标在恶性血液病脓症患者中的水平变化及临床意义分析 [J]. 中国医学工程, 2022, 30(4): 131-133.

XU C M. Level changes and clinical significance of inflammatory factors and coagulation indexes in patients with malignant hematological disease sepsis [J]. Chin Med Eng, 2022, 30

(4): 131-133.

[16] ASSINGER A, SCHROTTMAIER W C, SALZMANN M, et al. Platelets in *Sepsis*: an update on experimental models and clinical data [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1687.

[17] RITTIRSCH D, FLIERL M A, WARD P A. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(10): 776-787.

[18] ALLEN K S, SAWHENY E, KINASEWITZ G T. Anticoagulant modulation of inflammation in severe sepsis [J]. World J Crit Care Med, 2015, 4(2): 105-115.

[19] 温菲, 唐雯, 靳茜茜, 等. 内源性凝血在脓毒症凝血紊乱中的作用及研究进展 [J]. 青岛大学学报(医学版), 2018, 54(3): 375-378.

WEN F, TANG W, JIN Q Q, et al. The role and research progress of endogenous coagulation in coagulation disorder in sepsis [J]. J Qingdao Univ Med Sci, 2018, 54(3): 375-378.

[20] BATEMAN R M, SHARPE M D, JAGGER J E, et al. 36th international symposium on intensive care and emergency medicine; Brussels, Belgium. 15-18 March 2016 [J]. Crit Care, 2016, 20(2): 94.

[21] 李鑫, 马晓春. 脓毒症疗程中的抗凝治疗 [J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(11): 897-899.

LI X, MA X C. Anticoagulant therapy for sepsis [J]. Chin J Pract Intern Med, 2015, 35(11): 897-899.

[22] SEEMANN S, ZOHLES F, LUPP A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation [J]. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 60.

[23] PARKER S J, WATKINS P E. Experimental models of gram-negative sepsis [J]. Br J Surg, 2001, 88(1): 22-30.

[24] SONG L, ZOU Y, CAO Z. Comparison of two different models of sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats [J]. J Surg Res, 2018, 229: 277-282.

[25] SINGLETON K D, WISCHMEYER P E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat [J]. Eur Surg Res, 2003, 35(6): 486-491.

[26] JACOBI J. Pathophysiology of sepsis [J]. Am J Health Syst Pharm, 2002, 59(1): S3-S8.

[27] LUPU F, KINASEWITZ G, DORMER K. The role of endothelial shear stress on haemodynamics, inflammation, coagulation and glycocalyx during sepsis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(21): 12258-12271.

[28] 李晋, 王燕, 曾亚薇, 等. 脓毒症相关凝血功能紊乱与免疫反应相关机制的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33(12): 1519-1523.

LI J, WANG Y, ZENG Y W, et al. Advance in sepsis-related coagulation disorders and immunity response [J]. Chin Crit Care Med, 2021, 33(12): 1519-1523.

[29] 陈柳舟. 联合检测凝血指标及炎症因子对脓毒症患者病情严重程度及预后的判断价值 [D]. 大连: 大连医科大学; 2020.

CHEN L Z. The value of combined detection of coagulation indexes and inflammatory factors in judging the severity and prognosis of sepsis patients [D]. Dalian: Dalian Medical University; 2020.

[收稿日期] 2023-07-20

张佳河,祝旺,沈丹婷,等. 腹泻型肠易激综合征动物模型评价的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 238-247.
ZHANG J H, ZHU W, SHEN D T, et al. Research progress on animal models for the evaluation of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 238-247.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.011

腹泻型肠易激综合征动物模型评价的研究进展

张佳河¹, 祝旺¹, 沈丹婷¹, 杨希玲¹, 刘凤斌^{2,3}, 侯秋科^{3*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院白云医院, 广州 510405; 3. 广州中医药大学第一附属医院脾胃病科, 广州 510405)

【摘要】 肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是常见的功能性肠病之一, 其中腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant IBS, IBS-D) 占比最多, 发病机制复杂多样, 且缺少临床特效药。动物模型的制备是进一步研究疾病机制、评价临床药效以及药物开发的重要基础, 而模型制备和评价标准关乎研究的质量。本文通过查阅国内外文献及结合本课题组的前期建模经验, 基于 IBS-D 目前公认的发病机制出发, 从腹泻情况观察, 内脏敏感性测定, 肠道动力测定等方面系统总结 IBS-D 动物模型的评价方法, 以期为今后研究提供参考。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征 (IBS-D); 动物模型; 评价方式

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0238-10

Research progress on animal models for the evaluation of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

ZHANG Jiahe¹, ZHU Wang¹, SHEN Danting¹, YANG Xiling¹, LIU Fengbin^{2,3}, HOU Qiuke^{3*}

(1. the First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Baiyun Hospital, the First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
3. Department of Spleen and Stomach Disease, the First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Corresponding author: HOU Qiuke. E-mail: houqiuke@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Irritable bowel syndrome (IBS) is one of the most common functional gastrointestinal disorders, of which diarrhea-predominant IBS (IBS-D) accounts for the largest proportion. The pathogenesis of IBS-D is complicated and diverse, and there is currently a lack of clinically effective drugs. The establishment of animal models is an essential tool for further studies of the disease mechanisms, evaluation of clinical efficacy, and drug development, and the preparation and evaluation standards of models are important factors affecting the quality of the research. Based on the currently accepted pathogenesis of IBS-D and the previous modeling experience of our research group, this review systematically summarizes the evaluation method used in animal models of IBS-D in terms of diarrhea observation, visceral sensitivity tests, and intestinal motility tests, to provide a reference for future studies.

【Keywords】 diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D); animal model; evaluation method

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

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种临床常见的, 以反复腹痛、腹部不适伴排便习

惯和 (或) 大便性状改变为特征的胃肠功能紊乱性疾病^[1]。根据罗马 IV 标准^[2]将 IBS 分为便秘型、腹

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81804047, 82174303)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81804047, 82174303)。

【作者简介】 张佳河, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治脾胃病研究。Email: zjh1124183172@163.com

【通信作者】 侯秋科, 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 中西医结合脾胃消化系统疾病研究。Email: houqiuke@gzucm.edu.cn

泻型、混合型和不定型共 4 个亚型,其中腹泻型 IBS (diarrhea-predominant IBS, IBS-D) 在临床中最为常见,占总 IBS 发病患者的 23.3% ~ 65.0%^[3]。虽然该病发病率高,但由于致病因素复杂,发病机制尚不十分清楚,缺乏良好的生物学标志物,且存在多种、重叠、非特异性症状,给诊断带来困难。目前认为其生理病理机制与内脏高敏感、肠道动力异常、肠道菌群紊乱、肠脑轴异常、肠道低度炎症、精神心理、遗传等因素密切相关^[1],治疗手段十分有限,近 10 年来几乎没有新的技术和药物推向临床。患者常因反复发作的腹部症状而备受煎熬,严重影响患者的工作生活,并因长期寻医用药带来了沉重的经济负担^[4],从而进一步加重其精神心理压力及脑-肠互动紊乱等,形成恶性循环,因此有必要进行更多的动物实验以深入探讨 IBS-D 发病机理和开展新药研发。

早前已有文献从病因及中医病证结合角度^[5-6]对 IBS-D 动物造模方法做了归纳和比较,模型评价方法也多种多样,但缺乏专门对其详尽地系统整理。由于模型评价标准是判断动物模型制备质量的关键,其重要性不言而喻,因此本文针对 IBS-D 动物模型评价方法进行归纳总结,以期 IBS-D 的机制研究提供借鉴和参考。

1 腹泻症状评价方法

1.1 一般情况观察

一般情况是最基本的观察指标,能反映造模过程中动物的整体状态,主要包括行为活动、精神状态、饮食、体重、毛色毛质、粪便等。作为宏观指标,主观性强,可靠性低。正常状态下,动物活泼好动,精神良好,饮水进食量正常,体重平稳增加,皮毛光泽柔顺,粪便软硬度适中。成功造模后 IBS-D 动物模型出现静卧少动,精神倦怠,进食量减少,体重增长缓慢,毛色不均,毛糙散乱甚至脱落,排便量增多,粪便质稀,粘附肛周^[7],解剖时见粪便质软或呈稀烂便。

1.2 粪便情况观察

观察排便情况是评价 IBS-D 动物模型最直接的方法,可间接反映肠道动力、肠道黏膜通透性。通过观测排便的多少、粪便性状以及计算含水率等综合评价粪便量和质的变化。

1.2.1 粪便性状

粪便性状异常是 IBS-D 特点之一,根据 Bristol

粪便性状评分法^[7-12]共将粪便性状分为 7 种,根据性状赋予 1 ~ 7 分,性状 3、4 为正常粪便性状,腹泻倾向性状 5 ~ 7,王科凯等^[7]收集每只大鼠造模后 4 h 的粪便并进行分级评分,结果与空白组相比具有统计学意义。该评分法是评估大便形态最简单而有效的工具,见表 1。

表 1 Bristol 粪便性状分级

Table 1 Bristol stool form scale		
分型 Type	说明 Explanation	评分 Score
性状 1 Type 1	一颗颗硬球像坚果,难以排出 A hard ball like a nut that's hard to expel	1 分 1 mark
性状 2 Type 2	香肠状,但表面有凹凸 Sausage-shaped, but with a bumpy surface	2 分 2 mark
性状 3 Type 3	香肠状,但表面有裂纹 Sausage-shaped, but with surface cracks	3 分 3 mark
性状 4 Type 4	像香肠或蛇形,光滑且柔软 Like a sausage or serpentine, smooth and soft	4 分 4 mark
性状 5 Type 5	断边光滑的柔软块状,容易通过 Soft block with smooth broken edges, easy to pass through	5 分 5 mark
性状 6 Type 6	粗边蓬松块,糊状大便 Rough-edged fluffy lumps, mushy stools	6 分 6 mark
性状 7 Type 7	水状,无固体块,呈完全液体 Watery, no solid lumps, completely liquid	7 分 7 mark

1.2.2 粪便粒数

也称为粪点数,是通过计算一段时间内的排便颗粒数来评估判断肠道的转输情况。造模成功时,动物排便粒数会增多,但观察时长并未统一,周天然等^[13]和胡莹等^[9]分别收集了大鼠 4、12 h 的粪点数,也有学者认为 2 h 粪便粒数能较好地体现肠蠕动的快慢^[14]。该方法忽略了对大便性状的评价,常与大便积分、腹泻指数结合使用。

1.2.3 大便积分

该法将粪便粒数和性状融合一体,操作简便。具体方法是将动物单笼饲养,并记录一段时间的粪便粒数,并按“硬便 1 分,软便 2 分,不成形便 3 分”的标准进行评分,软硬便的判断标准是根据粪便能否在水中漂浮,漂浮者为硬便,下沉者为软便,最后比较分析各组每只动物的平均大便积分^[15-16]。

1.2.4 粪便面积

有学者用吸水性清洁滤纸收集并记录每只大鼠 4 h 粪便粒数,设置标尺,在固定高度对滤纸进行拍照,使用 Image J 软件处理后计算粪便面积,并通过 Spearman 相关系数发现粪便面积和粒数成正相关^[13]。该法将粪便粒数利用软件进一步量化,更为准确,并且可以存留照片资料以备数据核对,减少错误,具有创新性,但实用性和可操作性值得进一

步验证。

1.2.5 粪便含水率

粪便含水率是表征 IBS-D 肠道水分吸收与肠液分泌情况的重要指标之一^[8,11,17-20]。通过收集动物一定时间内排出的粪便,用精密电子天平称得质量为湿重,再将新鲜粪便用电热恒温干燥箱,在固定的温度和时间下烘干至质量不再变化,称出干重,粪便含水率(%) = (湿重 - 干重)/湿重 × 100%。该方法适用于成形大便的评价,相对客观,但收集时间过长会导致粪便水分挥发明显且涉及代谢笼选择问题,如非代谢笼易导致二便混杂,进而对含水率产生巨大影响,因此有学者认为收集粪便时间不宜过长^[18]。

1.2.6 腹泻指数

腹泻指数将稀便率、粪便粒数和稀便污迹直径相结合,可综合衡量模型的腹泻情况,能对模型即时粪便状态有明确的反映^[21],适用于评价不成形粪便,但操作方法^[12,18,22-24]较为繁琐:将大鼠分笼饲养,并在鼠笼下方垫清洁滤纸,每隔 1 h 换纸,记录 4 h 的腹泻指数。腹泻指数 = 稀便率(%) × 平均稀便级,其中腹泻率(%) = 每只大鼠的稀便数/粪便总数 × 100%,平均稀便级 = 每只大鼠所有稀便级数总和/每只大鼠的稀便数。以滤纸是否有污迹作为干稀便的区分标准,以粪便粒数之和为粪便总数,不能明确辨别粒数者以一堆计为 1 次。稀便级分 4 级,以每颗稀便浸染滤纸范围计算,具体分级如下:稀便污染直径小于 1 cm 为 1 级,1 ~ 1.9 cm 为 2 级,2 ~ 3 cm 为 3 级,大于 3 cm 为 4 级。

1.2.7 腹泻率

腹泻症状是肠低度炎症最直接的外在表现,该指标^[15,23]相对简单,是常用辅助指标之一,腹泻率(%) = 腹泻的动物数/该组动物总数 × 100%。

1.2.8 腹泻潜伏期

腹泻潜伏期指每只动物自造模开始到出现稀便所用时间(h),目前该指标很少应用^[23]。

2 内脏敏感性测定

内脏高敏感是指机体对外界刺激的承受能力下降、承受阈值降低,即疼痛过敏,是引起腹痛及腹部不适的主要病理基础,被认为是 IBS 发病的核心发病机制和生物学标志^[15],也是判断 IBS-D 造模成功与否的关键指标。

2.1 腹壁撤退反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR)

AWR 实验是目前最公认、应用最广泛的评价动物内脏敏感度的经典方法^[7-9,12,16-18,24-27]。该方法在直结肠球囊扩张(colonrectal distension, CRD)^[28]下观察并评价动物行为表现,简单易分辨、伤害小,不易影响后续实验。目前 AWR 操作方式标准不一,所采用的扩张方式、持续时间、气囊种类与制作方法、判断标准等均存在明显差异,进而影响了动物模型内脏高敏感性评估的准确性。有文献对大鼠 AWR 实验的操作方法^[29]及材质^[30]作出总结:为减少主观偏倚,操作者和评价者彼此独立,互不干扰。大鼠进行 12 ~ 24 h 的禁食不禁水后,麻醉大鼠,将大鼠固定于手术台,再把固定在 8F 导尿管前端的圆形乳胶气球涂上少许石蜡油,缓慢插入大鼠肛门 6 ~ 8 cm,用胶布将导管固定于大鼠尾巴根部。随后将大鼠放在透明塑料笼中,使其不能转身,待其苏醒平静后,用血压计按 10 mmHg 的速度匀速加压观察 3 分阈值(见表 2)时对应的压力值。重复测量 3 次,每次扩张持续 20 s,间隔时间不少于 4 min,取平均压力值作为大鼠的疼痛阈值来判断动物内脏敏感程度。

表 2 AWR 等级评分标准
Table 2 AWR rating scale

评分 Score	动物行为表现 Animal behaviour
0 分 0 mark	给予 CRD 时大鼠无行为反应 No behavioural response in rats given CRD
1 分 1 mark	大鼠变得不稳定,偶尔扭动头部 Rats become unstable and occasionally twist their heads
2 分 2 mark	腹背部肌肉轻微收缩,但腹部未抬离地面 Slight contraction of the abdominal and back muscles, but the abdomen is not lifted off the ground
3 分 3 mark	腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬离地面,骨盆不抬离 Stronger contraction of the abdominal and back muscles and lifting the abdomen off the floor, without lifting the pelvis off the floor
4 分 4 mark	腹部肌肉强烈收缩,腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面 Strong contraction of the abdominal muscles, arching the abdomen and lifting the abdomen and perineum off the ground

2.2 腹外斜肌放电实验

腹外斜肌放电实验是将针形电极插入大鼠腹股沟韧带上方、距中线 1.5 cm 的一侧腹外斜肌上^[15],用生理信号采集系统记录在不同 CRD 压力下大鼠腹外斜肌的放电活动^[20,31-32],减去基线波幅后得到肌肉放电幅值。与正常组相比,IBS-D 动物模型的肌电活动明显增强。AWR 和腹外斜肌放电实验均可以作为评价内脏敏感度的指标^[31],前者应用范围更广,使用工具易制备,评分标准易于观察分辨,操作方法也相对简单,但带有一定主观性;后者能观察腹部肌肉兴奋时产生的电生理变化,实验结果更为客观,缺点是对设备要求较高,需要运用高精尖仪器采集数据,而且为侵入性有创操作,可能会危害动物生命及造成额外致敏,使实验的不确定性因素增加。

2.3 避水应激实验(water avoid stress, WAS)

WAS 具有双重属性,既是一种模拟精神应激的造模方式^[5],也可作为 IBS-D 模型造模成功与否的评价方法,但应用较少。张文杰^[33]研究 IBS-D 模型在 WAS 下 1 h 的粪便粒数较正常组明显增多从而证实动物存在内脏高敏及其所致的结肠动力紊乱情况。

2.4 其他测定方法

AL-CHAER 等^[28]用手术暴露大鼠 L6-S1 脊髓节段,记录单个脊髓背角神经元在不同 CRD 压力下的电生理活动以验证大鼠的内脏高敏感,此方法反映的是中枢电生理,结果客观但流程复杂,需要精细操作且创伤性更大,不利于推广应用。刘珊珊^[34]运用离体肠管运动实验发现加入致痉剂 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的模型组离体小肠平均张力升高比值明显高于正常组,从而说明 IBS-D 大鼠具有内脏高敏感,该方法具有经济易行、实验条件易控制、重现性好、结果准确可靠的优点,但主要应用于观察药物对肠道运动和张力的影响,很少用于内脏高敏测定。

3 肠道动力测定

IBS-D 存在食管、胃肠乃至整个消化道的动力异常,但以肠道为主,胃肠动力快则腹泻,肠道痉挛则腹痛。

3.1 小肠推进率

小肠推进率是测定一定时间肠内标志物在小肠中的移动距离来评估小肠转运功能,肠内标志物

是不被消化吸收且易于观察的有色介质,包括墨汁、苯酚红、葡聚糖蓝等。现常用墨汁进行该实验^[27,32,35-36],YU 等^[32]用墨汁按 10 mL/kg 的用量对禁食 24 h 的大鼠进行灌胃,于 30 min 后处死大鼠,取出整段小肠。测量幽门至回盲部的长度,即小肠总长度;幽门至色素最前端的长度,即墨汁的推进距离,计算小肠推进率为墨汁的推进距离(cm)/小肠总长度(cm) × 100%。此方法需精准把握灌胃量和处死时间,且不能用力牵拉小肠,对操作要求高;灌胃后要处死大鼠,可重复性差,不能进行连续测量,容错率较低;活性炭、炭末等含炭类物质存在抑制胃肠蠕动功能的副作用,可诱导便秘,所以该实验影响因素较多,可能无法准确客观地反映动物小肠动力,因此既往有提出硫酸钡灌胃法^[37]作为新的检验方法。

3.2 首粒粪便排出时间

首粒粪便排出时间能反映整个胃肠道的转运功能,操作方法与小肠推进率类似,不同在于:用肠内标志物灌胃后,不处死大鼠,而是单笼饲养,并在鼠笼下铺张白纸^[35]以便于观察并记录排出首粒有色粪便的时间。该指标观察时间较长,也不能连续进行实验,优点在于不需要立即处死大鼠。程斌等^[17]用 0.2 mL 浓度为 3% 的苯酚红混悬液对禁食 12 h 的小鼠进行灌胃,记录 4 h 内从灌胃到首粒红便排出的时间。王阳等^[38]予大鼠 0.5 mL 墨汁灌胃后,记录大鼠首粒黑便的排出时间。钱宁等^[37]对比了活性炭和硫酸钡混悬液在测定首粒粪便排出时间差异,发现硫酸钡能使小鼠出现白色粪便,相比活性炭灌胃更便于区分观察,且不影响动物肠道蠕动功能。

此外,REED 等^[39]将小钢珠、钡餐和荧光透视技术相结合,建立一种全新的胃肠动力检测方法。该法有一套肠道转运评分方案:根据钢珠停留部位赋予每颗钢珠一个分值,停于胃内为 0 分,近端小肠 1 分,远端小肠 2 分,盲肠 3 分,结肠 4 分,排出体外 5 分,最后算出总分。DE PALMA 等^[40]发现植入了 IBS-D 患者粪便菌群的小鼠有着更高的转运分数,表明小鼠胃肠道蠕动加快。该实验被认为简单易重复、耗时短、费用低,值得推广。

3.3 结肠排珠实验

为衡量结肠转运能力的指标,将玻璃珠或小钢珠经肛门放入动物结直肠内计算其排出时间。该方法的优点在于可重复性高,能进行多次评估,对

动物伤害小。具体方法为^[22,27,35]:对大鼠进行 24 h 禁食不禁饮后麻醉,把一颗不带有润滑剂、提前预热至 37 ℃^[22]、直径约 3 ~ 6 mm 的玻璃珠或小钢珠置入距肛门口约 3 cm 的直肠内,单笼饲养,待大鼠能爬起活动、自由翻身后开始计时,观察并记录大鼠排出小球所用的时长。小球排出的时间越短,表明结肠蠕动力越强。

3.4 在体平滑肌运动实验

马晓玲等^[19]记录 IBS-D 大鼠餐后 1 h 空肠平滑肌运动波,分析计算运动波振幅和频率以评估肠道动力紊乱情况。该法利用肠道电生理评估,优缺点与腹外斜肌放电实验相似,但对模型创伤较大,应用较少。

4 组织病理学观察

IBS-D 缺乏任何可解释其症状的器质性病变,因此需要利用光学显微镜观察肠粘膜有无异常组

织病理学表现。目前常采用 HE 染色法^[7-8,17,21],主要观察结肠组织结构是否完整,有无炎症细胞浸润、水肿溃疡以及杯状细胞变化等情况,评价标准^[8]见表 3。对于成功造模的 IBS-D 动物,无菌剖腹后可见肠壁光滑,未见充血、水肿及溃疡,与其他组织器官无粘连;镜下肠黏膜组织无明显损伤迹象或仅呈现肠道低度炎症。张北华^[15]对比不同造模方式的差异,发现醋酸灌肠组部分结肠与腹腔组织粘连、增厚,近端结肠可见黏膜轻度充血,绒毛变钝,不符合 IBS-D 疾病的特点,可见不同方式诱导的 IBS-D 模型存在差异,而病理组织观察作为一种排除他性的检查,确保模型属于功能性疾病范畴。病理切片截取的肠道部位各异,有取距离肛门口约 4 ~ 5 cm^[8]、5 ~ 7 cm^[7]、10 cm 处^[21]的结肠组织,也有选择胃、回肠、十二指肠等其他部位^[13,32],而 IBS-D 发病以结直肠为主,部位不同是否对研究结果造成影响值得进一步探讨。

表 3 结肠病理组织炎症评价表
Table 3 Evaluation of inflammatory grade of colonic pathological tissue

评分 Score	镜下表现 Microscopic presentation
0 分 0 mark	无炎症,固有层无中性粒细胞浸润,间质无水肿 No inflammation, no neutrophilic infiltration in the lamina propria, no interstitial oedema
1 分 1 mark	轻度,固有层少量中性粒细胞浸润,轻度或无间质水肿 Mild, small neutrophilic infiltration of the lamina propria, mild or no interstitial oedema
2 分 2 mark	中度,固有层中等量粒细胞浸润,间质中度水肿 Moderate, moderate granulocytic infiltration of the lamina propria, moderate interstitial oedema
3 分 3 mark	重度,固有层有中量到大量中性粒细胞弥漫性浸润,严重间质水肿 Severe, with diffuse infiltration of moderate to large numbers of neutrophils in the lamina propria and severe interstitial oedema

5 生物学标志物检测

生物学标志物虽是客观指标,但因缺乏特异性仅作为辅助指标或药物干预后的疗效评价,因此需配合其他实验检测。

5.1 免疫相关指标

IBS-D 存在低度炎症,被认为是重要病理特征并由此引发肠道免疫功能异常。除病理组织观察可见低度炎症外,机体炎症介质、因子和免疫细胞的改变也反映疾病的变化发展。可检测结肠髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的表达变化^[41]评估结肠炎症的严重程度,还可检测其他血清或肠道免疫指标,如 IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IgA、IgG、CD4/CD8 比值等^[16,18,25]。肥大细胞(mast cell, MC)是肠道内广泛存在的炎症-免疫细胞,可观察肠 MC 数量变化以进一步评估免疫激活水平^[12,16,42]。此

外,有学者取脾和胸腺称重并计算两者指数作为动物的免疫指标,发现 IBS-D 大鼠胸腺和脾指数均升高^[25],免疫脏器指数(%) = 脏器重量(g)/体重(g) × 100%,该指数可结合炎症因子检测在免疫相关研究中运用^[16]。

5.2 脑肠肽

脑肠肽包括 5-HT、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、P 物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)等,广泛存在于人体中枢神经及胃肠道中,在脑肠轴双向调节中发挥桥梁作用,可引起肠道动力紊乱及高敏感^[9],检测脑肠肽在血清、结肠和脑组织中的变化可协助评估动物造模^[7,17,22,42]。肠道菌群中主要由大肠杆菌合成的色氨酸合成酶(tryptophan synthase, TRPA)可以间接反

映 5-HT 水平^[43]。此外,约 90% 5-HT 的分泌来自肠嗜络细胞(enterochromaffin cell, EC),也可通过免疫组化染色法观察模型肠道中的 EC 数量以衡量其活跃水平^[16]。

5.3 肠道通透性指标

D-乳酸是一种细菌发酵的代谢产物,可通过受损黏膜入血,因此检测血清 D-乳酸水平可反映肠黏膜受损程度和通透性的改变^[27,44]。还可以检测血清中二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的含量^[44]、结肠组织中紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1、CLDN1,水通道蛋白(aquaporin, AQP)的表达^[18,26]、FD4 渗透实验^[17]评价肠粘膜通透性。

5.4 肠道微生物

近年来“微生物-脑-肠轴”逐渐被研究者重视,肠道微生物作为肠脑互动的“中介”强调了在生物轴中的重要性。研究表明,IBS-D 发病与肠道益生菌的缺失和致病菌的聚集相关,研究结果虽存在矛盾但主要表现为双歧杆菌和乳酸杆菌丰度下降,肠杆菌丰度上升^[45-47]。此外,测序技术的发展使得真细菌群的作用得到关注,文献报道 IBS-D 患者肠道念珠菌属(*Candida*)丰度增加,球腔菌属(*Mycosphaerella*)、曲霉菌属(*Aspergillus*)、锁掷酵母菌属(*Sporidiobolus*)、潘多拉菌属(*Pandora*)被认为是区分 IBS-D 的生物标志物^[48]。肠道微生物受饮食、环境等多种因素影响,目前常作为 IBS-D 治疗靶点以探究菌群结构及丰度变化,尚未挖掘出公认的肠道微生物诊断标志物;菌群失调伴随着代谢产物的变化,如将肠道菌群(包括细菌和真菌)与其代谢物如短链脂肪酸、胆汁酸等相组合可能具备一定的诊断潜力,能否作为模型评价及疾病诊断的指标之一仍需开展更多研究。

5.5 其他生物学指标

研究发现 miR-144^[49]、miR-200a^[41]、miR-29a^[50]、miR-495^[51]等 miRNA 在调控肠道通透性和内脏高敏中起着重要作用,是一种潜在的生物学诊断标志物。IBS-D 大鼠背根神经节 pPKC γ 和 ERK1 基因表达较正常组明显增高,说明其参与了疼痛信号外周敏化机制^[52]。内脏高敏与肠神经胶质细胞(enteric glial cell, EGC)的活化相关,观察 EGC 超微结构及其分子标志物 GFAP、S100B 蛋白表达可评估 EGC 活化程度^[24,53]。Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)是胃肠动力的重要调控者,检测

C-kit 蛋白表达可反映 ICC 的数量变化,同时利用电镜观察 ICC 的形态和超微结构改变^[38]。

6 焦虑抑郁程度评价

IBS-D 是一种典型的肠脑互动紊乱性疾病,研究表明 IBS-D 与焦虑共病率高达 80%^[54],症状反复发作和加重与情绪密切相关。目前常采用旷场实验^[10-11,16,27]、糖水偏嗜实验^[10,25,36]、高架十字迷宫实验^[10-11,24,36,53]、悬尾实验^[16]、强迫游泳实验^[33]等行为学评价焦虑抑郁情况。

7 中医病证结合模型评价

中医药对本病的治疗取得了较好的疗效,可弥补西医的不足,其机制也值得深入探究。回顾文献发现^[6],研究者常通过中医病因造模直接制备对应证型,但辨证分型仍存在缺乏体系、主观性大、舌脉象在中医辨证中缺一不可却难以获得、模型缺少中医体质因素、方证效果存在重叠等问题。

7.1 肝郁脾虚证模型

肝郁脾虚证模型是最常见的病证结合模型,成模需同时评价脾虚和情志改变。因脾主肌肉主运化,脾虚则消瘦不思饮食,通过体重增长率下降、进食饮水量减少、毛发枯黄、精神倦怠等一般情况并结合抓力下降、粪便稀烂、含水率增高、血清或尿 D-木糖降低说明动物脾虚状态^[15],同时借鉴焦虑抑郁评价方法评估肝郁情况^[25]。此外,可使用痛泻要方这一经典公认的方药验证模型的准确性^[6]。

7.2 脾肾阳虚证模型

除观察动物饮食和体重下降、大便稀软、静卧少动、精神萎靡、毛色黯淡等宏观表征外,测肛温提示形寒肢冷,负重游泳实验、测握力反映动物腰膝酸软,倦怠乏力。同时结合 D-木糖、血清促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、血清皮质酮(cortisone, CORT)、尿 17-羟皮质类固醇(17-hydroxy corticosteroid, 17-OHCS)生物学指标,四神丸方药反证综合反映脾肾阳虚^[55-56]。

7.3 其他证型模型

其他如脾胃湿热证、脾胃虚寒证、寒热错杂证等模型制备较少^[6],文献常以宏观体征和动物行为学符合临床症状作为证型评价依据,无特异性指标,需进一步研究。

8 小结

目前,内脏高敏和腹泻被认为是 IBS-D 动物模

型具备的两大主要特征,因此 AWR、腹泻情况以及肠道动力学改变常作为核心评价指标。AWR 是评价肠道敏感性公认指标,国内外均广泛应用,可谓评价 IBS-D 模型制备成败的金标准,但操作方法仍需进一步规范。观察动物排便在模型评价中必不可少,粪便粒数、粪便含水率、腹泻指数是作为腹泻症状判定的主要指标。粪便粒数一定程度反映胃肠的转输速度,与粪便含水率相似,目前两者观察时间不存在统一性,时间过短过长都会对实验结果造成影响,需综合考虑动物的种类、习性、温度环境的影响,有必要探究最佳的观察时长和时间段。腹泻指数将粪便粒数、稀便率、污迹直径结合起来,评价较为全面,但操作繁琐,缺乏效率。肠道动力测定方面,墨汁是小肠推进率实验的最常用介质,首粒粪便排出时间和结肠排珠实验因操作简单、无精密设备等硬性要求,也常为研究者所选用。最后,利用病理组织观察以排除其他病理改变,并结合自身研究方向综合选择其他指标。

IBS-D 发病机制涉及神经、内分泌、消化、免疫等多个系统,范围广泛,造模和评价方式多种多样,至今尚未形成标准化的评价方式、统一方案以及制备成功标准,导致实验间的参考性和可重复性差,制定规范化的操作步骤以及开发和探究主观性较小、特异性高、便捷经济,易推广认可的模型评价指标仍任重道远。肠道菌群、脑肠轴等作为 IBS-D 的研究热点,从中找到简单易测、敏感性和特异性较高的生物学指标,以及参考中医以方测证的角度寻找出有效药物进行反证,这些都有利于 IBS-D 模型评价体系的构建与完善。由于 IBS-D 动物造模以运用 SD 大鼠为主^[5],本文主要从大鼠的角度描述相关评价方法的操作过程。文章通过对 IBS-D 动物模型评价操作方法及其当前应用情况进行了初步的归类汇总,并对其优缺点进行总结,以期为后续研究者选择 IBS-D 造模评价方法提供参考依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] FORD A C, SPERBER A D, CORSETTI M, et al. Irritable bowel syndrome [J]. *Lancet*, 2020, 396 (10263): 1675-1688.
- [2] MEARIN F, LACY B E, CHANG L, et al. Bowel disorders [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(6): 1393-1407.
- [3] XU X J, LIU L, YAO S K. Nerve growth factor and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D): a potential therapeutic target? [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016, 17(1): 1-9.
- [4] BLACK C J, FORD A C. Global burden of irritable bowel syndrome: trends, predictions and risk factors [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(8): 473-486.
- [5] 何宗卿, 经双双, 智沐君, 等. 基于数据挖掘的肠易激综合征动物模型应用特点分析 [J]. *中医研究*, 2022, 35(5): 70-77.
HE Z Q, JING S S, ZHI M J, et al. Analysis of application characteristics of animal model of irritable bowel syndrome based on data mining [J]. *Tradit Chin Med Res*, 2022, 35(5): 70-77.
- [6] 刘新明, 刘斯文, 刘书芹, 等. 病证结合的肠易激综合征动物模型研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2022, 42(1): 116-119.
LIU X M, LIU S W, LIU S Q, et al. Research progress in establishing IBS animal models by combining the disease with its syndromes [J]. *Jilin J Chin Med*, 2022, 42(1): 116-119.
- [7] 王科凯, 杨焱麟, 周彦妮, 等. 痛泻要方拆方对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响研究 [J]. *中国全科医学*, 2023, 26(5): 569-575.
WANG K K, YANG Y L, ZHOU Y N, et al. Efficacies of Tong-Xie-Yao-Fang disassembled recipes on brain-gut peptide in a rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Chin Gen Pract*, 2023, 26(5): 569-575.
- [8] 张薇, 赵映, 郑倩华, 等. 肠易激综合征内脏高敏模型不同制作方法的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 503-509.
ZHANG W, ZHAO Y, ZHENG Q H, et al. Methods for establishing rat models of irritable bowel syndrome visceral hypersensitivity [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(4): 503-509.
- [9] 胡莹, 郑依玲, 梅全喜, 等. 痛泻要方破壁饮片对腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响 [J]. *中药材*, 2020, 43(7): 1726-1731.
HU Y, ZHENG Y L, MEI Q X, et al. Effect of broken pieces of Tongxie Yaofang on brain-gut peptide in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *J Chin Med Mater*, 2020, 43(7): 1726-1731.
- [10] 吴帆, 李佳, 吴松, 等. “标本配穴”针刺法对腹泻型肠易激综合征焦虑模型大鼠焦虑样行为及肠道菌群的影响 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(8): 841-847.
WU F, LI J, WU S, et al. Effect of Biaoben acupoints combination needling on anxiety-like behavior and gut flora in model rats of irritable bowel syndrome with predominant diarrhea and anxiety [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 64(8): 841-847.
- [11] 侯雨君, 赵映, 蒋慧灵, 等. 联合法诱导内脏高敏感模型的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 343-349.
HOU Y J, ZHAO Y, JIANG H L, et al. Visceral hypersensitivity model of irritable bowel syndrome established by combined methods: a comparative study [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(3): 343-349.
- [12] TANG H Y, CHEN X Q, WANG H, et al. Acupuncture relieves the visceral pain of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats by regulating P2X4 expression [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(8): 5563-5573.

- [13] 周天然, 张瑶, 逯晓旭, 等. 慢性束缚应激腹泻型肠易激综合征大鼠模型的改良与评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 163-168.
- ZHOU T R, ZHANG Y, LU X X, et al. Improvement and evaluation of rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome induced by chronic restrain stress [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(1): 163-168.
- [14] 安荣, 韩佩玉, 徐秋颖, 等. 肠易激综合征动物模型的建立及评价 [J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(5): 434-439.
- AN R, HAN P Y, XU Q Y, et al. Establishment and evaluation of animal model of irritable bowel syndrome [J]. J Xinxiang Med Univ, 2016, 33(5): 434-439.
- [15] 张北华. IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2013.
- ZHANG B H. Establishment and evaluation of a rat model of IBS-D with liver depression and spleen deficiency syndrome [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2013.
- [16] 张北华, 王微, 王风云, 等. 痛泻要方干预腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚证模型大鼠的效应评价 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4341-4346.
- ZHANG B H, WANG W, WANG F Y, et al. Effects of Tongxie Yaofang in treating IBS-D rats with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency [J]. Chin Archives Tradit Chin Med, 2018, 33(10): 4341-4346.
- [17] 程斌, 黄琴, 王军蒙, 等. 乙酸联合束缚应激诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 153-160.
- CHENG B, HUANG Q, WANG J M, et al. Preparation of a mouse model of irritable bowel syndrome with diarrhea induced by acetic acid combined with restraint stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 153-160.
- [18] 李雪梅. 电针调节肠粘膜状态改善腹泻型肠易激综合征大鼠结肠低度炎症的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2021.
- LI X M. Study on electroacupuncture regulating intestinal mucosa to improve low-grade colon inflammation in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2021.
- [19] 马晓玲, 夏提古丽·阿不利孜, 石磊岭, 等. 慢性束缚应激联合特殊饮食制备腹泻性肠易激综合征 (IBS-D) 大鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 12-17.
- MA X L, XIATIGULI A B L Z, SHI L L, et al. Establishment of diarrhea-predominant of irritable bowel syndrome (IBS-D) model rats by chronic restraint stress and a specialized diet [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(7): 12-17.
- [20] JIA M, LU X, WANG Z, et al. Effects of Fengliao-Changweikang in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats and its mechanism involving colonic motility [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2018, 24(3): 479-489.
- [21] 张北华, 王微, 王风云, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠模型不同造模方法的比较研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(5): 1092-1095.
- ZHANG B H, WANG W, WANG F Y, et al. Research of different modeling methods of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Chin Archives Tradit Chin Med, 2018, 36(5): 1092-1095.
- [22] 任培培, 王森蕾, 赵丽, 等. 平胃胶囊对肝郁脾虚腹泻型肠易激综合征大鼠脑肠肽的影响 [J]. 华西药学杂志, 2021, 36(3): 262-267.
- REN P P, WANG M L, ZHAO L, et al. Effect of Pingwei capsule on cerebral enteric peptide in irritable bowel syndrome rats with liver stagnation and spleen deficiency [J]. West Chin J Pharm Sci, 2021, 36(3): 262-267.
- [23] 胡瑞, 唐方. 肝脾不调所致腹泻型肠易激综合征的动物模型研究 [J]. 中医杂志, 2010, 51(6): 547-550.
- HU R, TANG F. Study on making the animal model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome due to liver-spleen disharmony [J]. J Tradit Chin Med, 2010, 51(6): 547-550.
- [24] HOU Y, ZHAO Y, JIANG H, et al. Maintenance of intestinal homeostasis in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by electroacupuncture through submucosal enteric glial cell-derived S-nitrosoglutathione [J]. Front Physiol, 2022, 13(5): 917579.
- [25] 柴玉娜, 黄育生, 唐洪梅, 等. 疏肝健脾法肠激安方对 IBS-D 大鼠免疫功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 93-98.
- CHAI Y N, HUANG Y S, TANG H M, et al. Effect of Shugan Jianpi method (changji' an fomulation) on IBS-D immune function [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(21): 93-98.
- [26] 祝赫, 柴玉娜, 张毅靖, 等. 肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠黏膜超微结构及 ZO-1、CLDN1 表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(7): 905-911.
- ZHU H, CHAI Y N, ZHANG Y J, et al. Effects of changji' an formula on ultrastructure of colonic mucosa and levels of ZO-1 and CLDN1 in model rats with IBS-D [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(7): 905-911.
- [27] 赵丽. 腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群和肠道屏障功能的变化及相关分子机制的研究 [D]. 兰州: 兰州大学; 2020.
- ZHAO L. Changes in intestinal flora and intestinal barrier function in diarrhea-predominant IBS rats and related molecular mechanisms [D]. Lanzhou: Lanzhou University; 2020.
- [28] AL-CHAER E D, KAWASAKI M, PASRICHA P J. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [29] 陈颖, 赵妍, 罗丹妮, 等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 89-93.
- CHEN Y, ZHAO Y, LUO D N, et al. A summary of measurement methods for abdominal withdrawal reflex test [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 89-93.
- [30] 赵妍, 周思远, 罗丹妮, 等. 气囊对腹壁撤退反射实验结果的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 50-54.
- ZHAO Y, ZHOU S Y, LUO D N, et al. Effect of air bag on the

- outcome of abdominal withdrawal reflex test [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(8): 50–54.
- [31] 林国威, 张睿, 林春. 慢性内脏痛觉敏化模型的两行为学评价指标比较 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2007, 13(3): 153–156.
- LIN G W, ZHANG R, LIN C. Comparison of two behavioral indexes in a model of chronic visceral hypersensitivity [J]. *Chin J Pain Med*, 2007, 13(3): 153–156.
- [32] YU Z C, CEN Y X, WU B H, et al. Berberine prevents stress-induced gut inflammation and visceral hypersensitivity and reduces intestinal motility in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(29): 3956–3971.
- [33] 张文杰. 基于 PI₃K/AKT 通路探讨肠安菌泰对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠的作用机制 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2021.
- ZHANG W J. Mechanism research of Chang-An-Jun-Tai decoction on IBS-D rats with liver depression and spleen deficiency based on PI3K/AKT pathway [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2021.
- [34] 刘珊珊. 舒肝健脾复方对内脏高敏感模型大鼠的治疗作用及机制 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2006.
- LIU S S. Effect and mechanism of shugan Jianpi decoction on the model of visceral hypersensitivity rats [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2006.
- [35] ZIELIŃSKA M, CHEN C, MOKROWIECKA A, et al. Orally administered novel cyclic pentapeptide P-317 alleviates symptoms of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(2): 244–254.
- [36] 周子娴, 马惠芳, 杨易陈, 等. 电针对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠动力学及相关蛋白表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2022, 47(7): 611–616.
- ZHOU Z X, MA H F, YANG Y C, et al. Effect of electroacupuncture on colonic motility and RhoA and ROCK protein expression in IBS-D rats [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(7): 611–616.
- [37] 钱宁, 巫全胜, 赵菊花, 等. 一种新的小鼠肠道传输功能的检测方法 [J]. *实验动物科学*, 2007, 24(3): 60–62.
- QIAN N, WU Q S, ZHAO J H, et al. A new examining method of intestinal transmission function of mice [J]. *Lab Anim Sci*, 2007, 24(3): 60–62.
- [38] 王阳, 鲍晓蕾, 郎轶萱, 等. 实验性腹泻型肠易激综合征模型大鼠 Cajal 间质细胞改变对胃肠动力及 VIP 和 CGRP 水平的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(6): 1293–1296.
- WANG Y, BAO X L, LANG Y X, et al. Cajal mesenchymal cells in rats, a model of experimental diarrheal irritable bowel syndrome [J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41(6): 1293–1296.
- [39] REED D E, PIGRAU M, LU J, et al. Bead study: a novel method to measure gastrointestinal transit in mice [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26(11): 1663–1668.
- [40] DE PALMA G, LYNCH M D, LU J, et al. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(379): eaaf6397.
- [41] HOU Q, HUANG Y, ZHANG C, et al. MicroRNA-200a targets cannabinoid receptor 1 and serotonin transporter to increase visceral hyperalgesia in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2018, 24(4): 656–668.
- [42] 裴文婧, 谢春娥, 李军祥, 等. 痛泻安肠方对腹泻型肠易激综合征小鼠内脏高敏及肠道菌群的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2023, 31(1): 37–44.
- PEI W J, XIE C E, LI J X, et al. Effect of Tongxie Anchang Decoction on visceral hypersensitivity and gut microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome mice [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2023, 31(1): 37–44.
- [43] 安荣. 基于“脑肠菌轴”探讨痛泻要方治疗 IBS 模型大鼠新机制 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2016.
- AN R. Exploration of the novel therapeutic mechanism of tong-xie-yao-fang against IBS rats based on the “brain-gut-enteric microbiota axis” [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2016.
- [44] 吴帆, 唐丽娜, 王华, 等. 标本配穴针灸对 IBS-D 大鼠肠黏膜机械屏障的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(3): 756–760.
- WU F, TANG L N, WANG H, et al. Effect of specimen-matched acupuncture on the mechanical barrier of intestinal mucosa in IBS-D rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(3): 756–760.
- [45] LIU H N, WU H, CHEN Y Z, et al. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: a systematic review and meta-analysis [J]. *Dig Liver Dis*, 2017, 49(4): 331–337.
- [46] PITTAYANON R, LAU J T, YUAN Y, et al. Gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome-a systematic review [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(1): 97–108.
- [47] 占凯, 吴皓萌, 郑欢, 等. IBS-D 大鼠肠道菌群-短链脂肪酸代谢轴变化特点及丁酸钠干预作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(9): 16–24.
- ZHAN K, WU H M, ZHENG H, et al. Alterations in gut microbiota-short-chain fatty acid axis in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and the effect of sodium butyrate [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(9): 16–24.
- [48] HONG G, LI Y, YANG M, et al. Gut fungal dysbiosis and altered bacterial-fungal interaction in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: an explorative study [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(11): e13891.
- [49] HOU Q, HUANG Y, ZHU S, et al. MiR-144 increases intestinal permeability in IBS-D rats by targeting OCLN and ZO1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2256–2268.
- [50] ZHU H, XIAO X, SHI Y, et al. Inhibition of miRNA-29a regulates intestinal barrier function in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by upregulating ZO-1 and CLDN1 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 155.
- [51] FEI L, WANG Y. MicroRNA-495 reduces visceral sensitivity in mice with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome through

suppression of the PI3K/AKT signaling pathway via PKIB [J]. IUBMB Life, 2020, 72(7): 1468–1480.

[52] 黄适, 刘鹏, 林春李, 等. 肝郁脾虚型肠易激综合征大鼠 pPKC γ 和 ERK1 基因在背根神经节的表达研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(1): 19–22.

HUANG S, LIU P, LIN C L, et al. Liver-depression and spleen-deficiency syndrome of irritable bowel rats pPKC γ and ERK1 gene expressions in dorsal root Ganglia [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(1): 19–22.

[53] 张薇. 针刺缓解肠易激综合征大鼠内脏高敏的肠道胶质细胞活化机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2021.

ZHANG W. The role of acupuncture on enteric glial cells in visceral hypersensitivity rats with irritable bowel syndrome [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2021.

[54] KIBUNE NAGASAKO C, GARCIA MONTES C, SILVA LORENA S L, et al. Irritable bowel syndrome subtypes: clinical

and psychological features, body mass index and comorbidities [J]. Rev Esp Enferm Dig, 2016, 108(2): 59–64.

[55] 苏晓兰, 刘倩, 韩博宇, 等. 病证结合脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠模型的建立与评价 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(3): 245–251.

SU X L, LIU Q, HAN B Y, et al. Establishment and evaluation of disease-pattern rat model with IBS-D and spleen-kidney Yang deficiency [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2021, 44(3): 245–251.

[56] 韩博宇. 脾肾阳虚证 IBS-D 大鼠模型的建立与生物学基础的探索 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2019.

HAN B Y. Exploration of the establishment and biological basis of the IBS-D rat model of spleen and kidney Yang deficiency evidence [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2019.

[收稿日期] 2023-04-18

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

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

李蒙蒙,杨龙,杨莉芳,等. 鸽子在动物机器人领域的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 248–253.

LI M M, YANG L, YANG L F, et al. Research advances in the use of pigeon animal robots [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 248–253.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.012

鸽子在动物机器人领域的研究进展

李蒙蒙,杨龙,杨莉芳,刘玉怀,万红,尚志刚*

(郑州大学电气与信息工程学院,河南省脑科学与脑机接口技术重点实验室,郑州 450001)

【摘要】 鸽子具有集群和归巢习性,善于长途负重与持续飞行,导航和空间认知能力卓越,近年来被广泛应用于动物机器人研究。鸽子机器人通过对鸽子脑内特定的神经靶点施加神经信息干预以实现运动行为控制。本文根据鸽脑内的分层多级神经调控靶点分布,分别对基于感觉系统、动机和情绪系统或皮层以及中脑运动区的鸽子机器人研究进展进行分类综述,以期为进一步利用鸽子机器人开展空间感知、侦察勘测和反恐搜救等应用研究提供参考和指导。

【关键词】 鸽子;动物机器人;刺激调控;鸽子机器人

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0248-06

Research advances in the use of pigeon animal robots

LI Mengmeng, YANG Long, YANG Lifang, LIU Yuhuai, WAN Hong, SHANG Zhigang*

(School of Electrical and Information Engineering, Henan Key Laboratory of Brain Science and Brain Computer Interface Technology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Corresponding author: SHANG Zhigang. E-mail: zhigang_shang@zzu.edu.cn

【Abstract】 Pigeons show flocking and homing behaviors, which require characteristics including long-distance weight-bearing and continuous flight, with excellent navigation and spatial cognitive abilities. Pigeons have been widely used in animal robot research in recent years. Pigeon robots achieve motor behavior control by applying neural information intervention to specific neural targets in the pigeon's brain. This review summarizes research progress in pigeon robots based on the sensory system, motivation and emotional system or cortex and midbrain motor area respectively, according to the distribution of hierarchical multi-level neural regulatory targets in the pigeon's brain, with the aim of providing reference and guidance for further applied research into the use of pigeon robots in space perception, reconnaissance, and anti-terrorism search and rescue.

【Keywords】 pigeon; animal robot; stimulus control; pigeon robot

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

动物机器人是指基于对动物感知、运动、决策机制的相关研究,借助神经信息调控手段干预动物运动行为的动物-机器混合系统^[1]。近年来,动物机器人在科学验证和应用需求的牵引下得到快速发展,成为当前热门的研究领域。其中,鸽子机器人以其在长途飞行与集群调控等方面的独特优势和

巨大前景而备受关注。2007 年,山东科技大学苏学成等^[2]成功研制出世界上首例“机器人鸟”,并实现了对鸽子机器人的起飞和转向调控。此后,南京航空航天大学、韩国首尔大学、郑州大学和黄淮学院等国内外团队也陆续开展了鸽子机器人的相关研究,取得了可喜的成绩。本文对近年来国内外关于

【基金项目】 国家自然科学基金(62301496),国家资助博士后研究人员计划项目(GZC20232447),河南省科技攻关项目(232102210098)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (62301496), National Postdoctoral Researcher Program (GZC20232447), Key Scientific and Technological Projects of Henan Province (232102210098).

【作者简介】 李蒙蒙,男,博士,讲师,研究方向:脑机接口和动物机器人研究。Email:limengmeng@zzu.edu.cn

【通信作者】 尚志刚,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:脑机接口和动物机器人研究。Email:zhigang_shang@zzu.edu.cn

鸽子在动物机器人领域的研究进行阐述与分析。

1 鸽子在动物机器人研究中的优势

鸽子 (*Columba livia*) 英文名 Pigeon, 是鸟纲 (*Aves*) 鸽形目 (*Columbiformes*) 鸠鸽科 (*Columbidae*) 动物, 在世界上分布广泛, 遍布亚洲中部和南部、欧洲中部和南部、非洲北部等广大地区, 并被引入了北美洲和中美洲。作为较为常见的实验动物, 鸽子在动物机器人研究中具有分布广泛, 易于饲养; 活动范围大, 具有集群和归巢习性; 能量消耗小, 善于长途负重与持续飞行; 导航能力强, 空间认知能力卓越; 隐蔽性能好, 军用价值高等优势, 使得以鸽子为载体的动物机器人在执行户外远距离与集群飞行任务中具有独特的价值, 在空间感知、侦察勘测和反恐搜救等领域表现出良好的应用前景^[3]。

2 鸽子机器人研究进展

以鸽子为模式动物开展的动物机器人研究, 通过筛选鸽子脑内分层多级神经系统中相关的神经靶点施加神经信息干预, 以实现对其运动行为控制。这些靶点通常涉及从感觉输入到运动输出的多个系统, 包括感觉系统、动机和情绪系统、皮层以及中脑运动区等(见表 1)。其中, 感觉系统接收整合身体内外部的感觉信息, 动机和情绪系统融合上述信息进行运动动机规划, 皮层制定运动策略, 中脑运动区将经过协调组织的运动指令输出到各个功能核团, 各系统通过分工协作共同支持运动行为的执行。根据上述分层多级系统的分布式序贯处理原则, 按照调控刺激施加位置进行划分, 大致可将鸽子机器人分为以下三类(见表 1)。

2.1 基于感觉系统刺激调控的鸽子机器人

感觉可以诱导运动动机的产生, 因此, 早期的鸽子机器人研究在感觉系统中寻找刺激靶点以实现对其运动控制。苏学成等^[4]在鸽子的上纹状体入口部 (*hyperstriatum accessorium*, HA) 和上纹状体背部 (*hyperstriatum dorsal*, HD) 等具有躯体感觉功能的位点施加电刺激(见表 2), 发现多批次被试鸽子普遍表现出的反应是急切地用喙梳理羽毛。这些探索在原理上证明了在脑内特定位点“注入电信号”实现运动控制的可行性, 但其中诱导出的简单运动行为并不足以满足对于鸽子机器人行为调控的需求, 研究者们因此将焦点转移到其他神经系统寻求突破。

2.2 基于动机和情绪系统或皮层刺激调控的鸽子机器人

动机和情绪系统对运动行为的决定、发起及过程控制起着关键性影响, 而皮层作为情绪主观感受的处理中枢也与运动行为密切相关。在鸽脑对应运动选择与决策功能的动机和情绪系统或皮层中, 相应的刺激靶点包括丘脑腹前背中核 (*dorsalis intermedius ventralis anterior*, DIVA)、古纹状体后部 (*posterior pallial amygdala*, PoA) 以及导水管周围灰质 (*periaqueductal gray*, PAG) 等区域(见表 2), 在这些位点施加电刺激, 可以诱发动物的运动动机或虚拟情绪, 实现鸽子机器人的运动行为调控。

2.2.1 以 DIVA 为刺激调控靶点的鸽子机器人

鸽子的 DIVA 是将感觉信息上传到皮层的中继核团。苏学成等^[2]最早在 2007 年以 DIVA 为刺激靶点实现了鸽子机器人的运动控制, 后续又基于 DIVA 内的电信号刺激, 实现了鸽子机器人的多种类型运动控制^[4]。2015 年, 该团队继续结合多模式电刺激系统在 DIVA 施加双相脉冲, 进一步丰富了以 DIVA 为靶点的鸽子机器人调控研究^[5]。2016 年, 该团队又通过计算包括双侧 DIVA 在内的不同脑区间的距离与深度差, 开发了多脑区微电极同步植入方法以便于开展鸽子机器人的多靶点刺激调控, 有效减少了植入误差^[6]。随后开发的适应室外自由飞行的鸽子机器人, 继续以 DIVA 为靶点并基于定位信息实现了飞行转向行为调控^[7]。2021 年, 郑州大学王振龙团队开发了多位点生物-机器接口装置, 并结合 DIVA 核团靶点刺激实现了鸽子机器人系统的简单路径连续导航^[8]。2022 年, 石勇等^[9]在多通道刺激器上加载了在线监测系统, 结合 DIVA 核团的适时刺激对鸽子机器人进行远程导航控制, 为进一步优化鸽子机器人的控制策略提供了依据。

2.2.2 以 PoA 为刺激调控靶点的鸽子机器人

鸽子的 PoA 在情绪调节中起着至关重要的作用, 被认为是鸟类杏仁核的一部分。在苏学成等^[2]的研究中, PoA 被证明与控制鸽子的起飞和向前飞行有关, 且 PoA 靶点刺激模式的差异会引发鸽子的不同行为响应, 包括快速行走、被迫起飞等^[4]。2021 年, 郑州大学王振龙团队考虑 PoA 核团刺激诱发的回避行为调控效应以及多位点联合植入, 开展了鸽子机器人系统构建和功能验证^[8]。进一步地, 该团队在 2022 年又采用多种方法对鸽子 PoA 核团的

表 1 鸽子机器人研究进展

Table 1 Advances in research of pigeon robot

类型 Type	年份 Year	研究机构 Research institutions	调控靶点 Control targets	文献 References
基于感觉系统刺激调控的鸽子机器人 Pigeon robot based on stimulus control at sensory system	2012	SDUST	HA、HD	[4]
	2007	SDUST	DIVA、PoA	[2]
	2012	SDUST	DIVA、PoA、PAG	[4]
基于动机和情绪系统或皮层刺激调控的鸽子机器人 Pigeon robot based on stimulus control at motivation and emotional system or cortex	2015	SDUST	DIVA、PAG	[5]
	2016	SDUST	DIVA	[6]
	2017	SDUST	DIVA、PAG	[7]
	2021	ZZU	DIVA、PoA	[8]
		SDUST	DIVA	[9]
	2022	ZZU	PoA	[10]
		SDUST	PAG	[11]
	2012	NUAA	ICo、ToS、SGP	[12]
	2014	NUAA	ICo、ToS	[13]
	2015	NUAA	ICo、FRM、LoC	[14]
	2017	SNU	FRM	[15]
基于中脑运动区刺激调控的鸽子机器人 Pigeon robot based on stimulus control at midbrain motor area		SDUST	ICo	[16]
	2018	ZZU	FRM	[17]
	2019	ZZU	FRM	[18–20]
		SNU	FRM	[21]
	2020	NUAA	FRM	[22]
		SNU	RT、OM、TN、TSM、AV	[23]
		HHU	FRM	[24]
		ZZU	SGP	[25]
	2022	NUAA	FRM	[26]
		ZZU	SGP	[27]
		HHU	FRM	[28]
	2023	NUAA	FRM	[29]
		HHU	FRM	[30]

注:SDUST: 山东科技大学; NUAA: 南京航空航天大学; SNU: 韩国首尔大学; ZZU: 郑州大学; HHU: 黄淮学院; HA: 上纹状体入口部; HD: 上纹状体背部; DIVA: 丘脑腹前背中核; PoA: 古纹状体后部; PAG: 导水管周围灰质; ICo: 丘间核; ToS: 半环隆枕区; LoC: 蓝斑核; FRM: 中脑内侧网状结构; RT: 中脑圆形核; OM: 枕中脑束; TN: 带状核; TSM: 中脑的中脑束; AV: 原纹状体腹侧部; SGP: 脑室纤维膜周围灰质。
Note. SDUST. Shandong University of Science and Technology. NUAA. Nanjing University of Aeronautics and Astronautics. SNU. Seoul National University. ZZU. Zhengzhou University. HHU. Huanghuai University. HA. Hyperstriatum accessorium. HD. Hyperstriatum dorsal. DIVA. Dorsalis intermedius ventralis anterior. PoA. Posterior pallial amygdala. PAG. Periaqueductal gray. ICo. Nucleus intercollicularis. ToS. Torus semicircularis. LoC. Locus ceruleus. FRM. Formatio reticularismedialis mesencephali. RT. Nucleus rotundus. OM. Tractus occipito-mesencephalicus. TN. Nucleus taeniae. TSM. Tractus septo-mesencephalicus. AV. Archistriatum ventral. SGP. Substantia griseaet fibrosa periventricularis.

结构和功能进行了深入研究,探索了其不同子区对应电刺激诱发的多样化行为响应差异,为基于 PoA 靶点刺激的鸽子机器人运动行为调控提供了依据^[10]。

2.2.3 以 PAG 为刺激调控靶点的鸽子机器人

作为边缘中脑区之一,鸽子的 PAG 与许多脑区存在双向联系,参与运动行为、情绪和动机的调节与控制。苏学成等^[4]研究发现,在 PAG 靶点施加电刺激能够导致明确的主动逃避行为。后续研究表明,对 PAG 的刺激成功诱发了鸽子机器人从静止状态向前运动的行为^[5]。在室外飞行鸽子机器人研究中,PAG 靶点在刺激诱导向前运动和起飞行为中的作用再次被成功应用^[7]。2022 年,常铭等^[11]设

计了面向鸽子机器人的可充电便携式表面肌电采集系统,并结合 PAG 核团电刺激参数与鸽子肌电放电幅度及频率响应的相关分析,证明了 PAG 在鸽子运动控制中的重要作用,为进一步探索鸽子机器人的运动控制机制提供了便利。

上述研究以鸽脑内动机和情绪相关的 DIVA、PoA 和 PAG 等核团为刺激靶点,成功诱导出鸽子的起飞、前进、左转、右转和连续转向(盘旋)等运动行为,为早期的鸽子机器人运动行为调控研究开辟了道路,但鸽脑动机、情绪系统和皮层中包含的核团繁多、环路复杂,且一些相关的神经机制仍缺乏更深入的研究,因此导致调控效果的精确性、稳定性

和可靠性等仍有待提升。

2.3 基于中脑运动区刺激调控的鸽子机器人

在鸽子脑中负责运动过程集中调度的中脑运动区施加刺激,可以实现对运动行为的直接调控,其中典型的刺激靶点包括丘间核 (nucleus intercollicularis, ICo)、中脑内侧网状结构 (formatio reticularismedialis mesencephali, FRM)、脑室纤维膜周围灰质 (substantia grisea et fibrosa

periventricularis, SGP) 等,此外还有如半环隆枕区 (torus semicircularis, ToS)、蓝斑核 (locus ceruleus, LoC) 以及中脑圆形核 (nucleus rotundus, RT)、枕中脑束 (tractus occipito-mesencephalicus, OM)、带状核 (nucleus taeniae, TN)、中脑的中脑束 (tractus septo-mesencephalicus, TSM) 和原纹状体腹侧部 (archistriatum ventral, AV) 等核团在内的众多候选位点 (见表 2)。

表 2 鸽子机器人相关刺激靶点具体位置信息

Table 2 Specific location information of related stimulation targets in pigeon robot		
类型 Types	调控靶点 Control targets	具体位置 Specific location
基于感觉系统刺激调控的鸽子机器人 Pigeon robot based on stimulus control at sensory system	HA	AP 7.50–14.50, ML 0.50–4.00, DV 0.00–2.00
	HD	AP 8.25–14.25, ML 2.00–4.00, DV 1.00–2.50
基于动机和情绪系统或皮层刺激调控的鸽子机器人 Pigeon robot based on stimulus control at motivation and emotional system or cortex	DIVA	AP 6.00–7.00, ML 1.50–2.50, DV 7.00–8.00
	PoA	AP 8.75–9.00, ML 0.25–1.50, DV 9.50–10.00
	PAG	AP 3.50–4.50, ML 0.50–1.25, DV 7.00–8.75
	ICo	AP 2.00–4.00, ML 2.00–5.50, DV 6.50–7.50
	ToS	AP 3.50, ML 4.00–5.50, DV 6.50–7.25
基于中脑运动区刺激调控的鸽子机器人 Pigeon robot based on stimulus control at midbrain motor area	LoC	AP 1.00–2.75, ML 1.00–3.00, DV 8.50–10.00
	FRM	AP 3.00–4.25, ML 0.75–2.00, DV 7.50–8.25
	RT	AP 5.25–7.00, ML 1.75–3.75, DV 7.25–9.25
	OM	AP 0.25–8.00, ML 1.00–7.00, DV 7.50–8.50
	TN	AP 5.75–7.50, ML 4.00–6.00, DV 7.50–8.50
	TSM	AP 4.00–10.00, ML 0.00–3.50, DV 6.00–10.00
	AV	AP 5.25–7.50, ML 5.00–8.00, DV 6.00–8.50
	SGP	AP 1.50–4.75, ML 4.00–5.50, DV 6.00–8.25

注: AP: 前囟前后; ML: 中缝左右; DV: 颅骨硬脑膜平面向下; HA: 上纹状体入口部; HD: 上纹状体背部; DIVA: 丘脑腹前背中核; PoA: 古纹状体后部; PAG: 导水管周围灰质; ICo: 丘间核; ToS: 半环隆枕区; LoC: 蓝斑核; FRM: 中脑内侧网状结构; RT: 中脑圆形核; OM: 枕中脑束; TN: 带状核; TSM: 中脑的中脑束; AV: 原纹状体腹侧部; SGP: 脑室纤维膜周围灰质。
Note. AP. Anteroposterior. ML. Mediolateral. DV. Dorsoventral. HA. Hyperstriatum accessorium. HD. Hyperstriatum dorsal. DIVA. Dorsalis intermedius ventralis anterior. PoA. Posterior pallial amygdala. PAG. Periaqueductal gray. ICo. Nucleus intercollicularis. ToS. Torus semicircularis. LoC. Locus ceruleus. FRM. Formatio reticularismedialis mesencephali. RT. Nucleus rotundus. OM. Tractus occipito-mesencephalicus. TN. Nucleus taeniae. TSM. Tractus septo-mesencephalicus. AV. Archistriatum ventral. SGP. Substantia grisea et fibrosa periventricularis.

2.3.1 以 ICo 为刺激调控靶点的鸽子机器人

鸽子的 ICo 类似于哺乳动物的下丘,与飞行运动有关。2012 年,戴振东团队在鸽子中脑电刺激诱导运动的初步研究中发现,ICo 靶点的电刺激可以诱发鸽子的扇翅行为,这对调控鸽子的飞行运动以及构建鸽子机器人具有重要意义^[12],并因此被成功应用于户外飞行调控^[13]。后来,该团队的进一步研究证实了 ICo 在鸽子运动行为调控中的作用,发现 ICo 靶点刺激还与鸽子的起飞反应密切相关^[14]。2018 年,山东科技大学团队详细描述了通过微电刺激控制鸽子机器人沿预定直线前进和后退的过程,发现 ICo 核团更适合作为诱导鸽子机器人“前进”行为的命令刺激靶点^[16]。

2.3.2 以 FRM 为刺激调控靶点的鸽子机器人

鸽子 FRM 是中脑网状结构的内侧部分,被认为

参与了运动功能执行,是目前鸽子机器人调控研究中最受关注的核团。2015 年,戴振东团队发现 FRM 内的电刺激主要引起了鸽子的身体侧向移动和转向行为,为后续一系列以 FRM 为刺激调控靶点的鸽子机器人研究奠定了基础^[14]。2017 年和 2020 年,首尔大学团队分别基于全植入式和手持式神经刺激控制器,通过在 FRM 植入的深度电极施加电刺激诱发出鸽子的转向转圈行为,验证了其在鸽子机器人远程导航控制中的可行性^[15,21]。2018 ~ 2019 年,郑州大学团队以 FRM 为刺激靶点开展了一系列研究,在基于神经信号记录、轨迹偏差反馈、网络通信等的行为调控方面积累了宝贵的经验,为鸽子机器人的实际应用提供了非常有价值的参考^[17–20]。2020 ~ 2023 年,戴振东团队基于预编程控制算法,分别结合分层刺激、闭环调控、分级控制等策略对

以 FRM 为刺激靶点的鸽子机器人持续开展深入优化研究^[22,26,29]。2021 ~ 2023 年,黄淮学院团队聚焦 FRM 核团,开发出的分布式远程刺激器、轻量级无线刺激器及埋入式柔性刺激器,有助于突破鸽子机器人在远距离、稳定性和隐蔽性方面的应用限制^[24,28,30]。

2.3.3 以 SGP 为刺激调控靶点的鸽子机器人

鸽子的 SGP 核团位于中脑,但被认为与其恐惧情绪有关。2012 年,戴振东团队研究表明,SGP 靶点的电刺激诱发了鸽子的羽毛倒伏反应^[12]。2022 年,郑州大学尚志刚团队通过对比鸽子强直性不动和视觉变化刺激实验中 SGP 脑区的神经响应,证实了其在恐惧情绪编码中的作用,并成功实现了基于 SGP 靶点电刺激的户外自由飞行鸽子机器人飞行方向控制^[25]。2023 年,郑州大学尚志刚和王振龙团队合作利用免疫组化和电刺激方法探索了 SGP 的结构和功能分布,揭示了恐惧情绪介导的 SGP 在鸽子逃避行为调节中的作用,为鸽子机器人的闭环调控提供了新的候选核团和实现思路^[27]。

2.3.4 以中脑运动区其他核团为刺激调控靶点的鸽子机器人

鸽子的中脑结构相对复杂,许多核团与运动行为之间呈现典型的多对多关系,即一个核团可能对应多种行为,而相同的行为也可以通过对多个不同核团的刺激分别实现,这表明中脑运动区相关核团在调控鸽子行为中可能具有协同作用,也进一步催生了以此类核团为刺激靶点的相关研究。ToS 核团位于中脑侧室腔下方,戴振东团队发现 ToS 靶点的电刺激可以成功诱导鸽子的扇翅行为^[12],并将这一效应用于预设飞行范围的鸽子机器人运动行为调控中^[13]。LoC 核团接受来自脊髓的传入,被认为与鸽子的扇翅行为相关。2015 年,戴振东团队首次基于 LoC 内的电刺激诱导出鸽子的起飞行为,再次验证了鸽子中脑多区域与不同行为间的复杂关系^[14]。2021 年,韩国首尔大学团队选取鸽子中脑运动区内的多个核团开展刺激实验,结果表明,刺激 RT、OM 和 TN 等核团能够诱导鸽子的左右身体转动,而刺激 TSM 和 AV 核团则可诱导鸽子的扇翅和起飞行为,这项研究使鸽子中脑相关核团与运动功能的关系逐渐明晰,为鸽子机器人研究中调控靶点的多样化提供了坚实的实验证据^[23]。

基于中脑内运动相关位点的刺激调控可以有效避开脑中信息整合判断与运动规划决策的上行

复杂过程,显著减少调控过程中可能引入的干扰,因此在近年来广受关注。但由于中脑相关核团分布稠密且定位困难,其中涉及的深层调控机理探索、合理刺激模式设计和精确刺激参数设定等问题尚待研究。

3 结语

鸽子机器人融合了鸽子本身的自主智能、能量自补给和高度灵活性优势,以及微控制系统的高度精准性和可控性优势,因此在鸟类脑结构和功能研究,空间感知、侦察勘测和反恐搜救应用等方面具有巨大的科研和实践价值。本文分别介绍了近年来基于感觉系统、动机和情绪系统或皮层以及中脑运动区的鸽子机器人研究,并对相关研究进展进行了总结与讨论。尽管近年来该领域研究在调控靶点多样化、参数多模化、环境复杂化、对象群体化和系统多功能化等方面不断取得突破,促使鸽子机器人在更精准、更远程、更稳定的发展趋势中稳步前进,但上述神经系统在鸽子机器人应用中的神经机理仍有待进一步的深入研究。在未来研究中,应继续深入探明这些系统以及其中关键核团与运动行为之间的关系,以期在核团定位方面促进鸽子机器人的精准控制。此外,鸽子机器人运动行为相关神经信息在各神经网络中是如何被编码和传递的,也需要更精细的解读,这对于更好地解码运动神经信息,阐明多核团间的神经交互,揭示运动行为的分层多级调控机理,以模拟鸽子自发神经活动进行刺激信号仿真编码,并制定合理的协同化、序贯化调控方案具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

- [1] 方轲,梅皓,宋逸,等. 动物机器人:研究基础、关键技术与发展预测 [J]. 科学通报, 2022, 67(21): 2535-2552.
FANG K, MEI H, SONG Y, et al. Animal robots: research foundation, key technologies and development forecasts [J]. Chin Sci Bull, 2022, 67(21): 2535-2552.
- [2] 苏学成,槐瑞托,刘小峰,等. 机器人鸟的一种制导方法: CN200710013769.7 [P]. 2007-09-26.
SU X C, HUAI R T, LIU X F, et al. A guidance method for robot birds: CN200710013769.7 [P]. 2007-09-26.
- [3] 肖远鹏,刘新玉. 动物机器人及其潜在军事应用价值 [J]. 国防科技, 2020, 41(6): 22-27.
XIAO Y P, LIU X Y. Animal robots and their potential military application value [J]. Natl Def Sci Technol, 2020, 41(6): 22-27.
- [4] 苏学成,槐瑞托,杨俊卿,等. 控制动物机器人运动行为的脑机制和控制方法 [J]. 中国科学:信息科学, 2012, 42

- (9): 1130–1146.
- SU X C, HUAI R T, YANG J Q, et al. Brain mechanism and methods for robo-animal motor behavior control [J]. *Sci Sin Informationis*, 2012, 42(9): 1130–1146.
- [5] YANG J, HUAI R, WANG H, et al. A robo-pigeon based on an innovative multi-mode telestimulation system [J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 26(1): S357–S363.
- [6] HUAI R, YANG J, WANG H. The robo-pigeon based on the multiple brain regions synchronization implanted microelectrodes [J]. *Bioengineered*, 2016, 7: 213–218.
- [7] YANG J, HUAI R, WANG H, et al. Global positioning system-based stimulation for robo-pigeons in open space [J]. *Front Neurobot*, 2017, 11: 40.
- [8] ZHOU Z, LIU D, SUN H, et al. Pigeon robot for navigation guided by remote control: system construction and functional verification [J]. *J Bionic Eng*, 2021, 18(1): 184–196.
- [9] 石勇, 于志豪, 颜瑞, 等. 面向动物机器人刺激器的光伏电池在线监测系统研究与应用 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2022, 39(5): 974–981, 990.
- SHI Y, YU Z H, YAN R, et al. Research and application of photovoltaic cell online monitoring system for animal robot stimulator [J]. *J Biomed Eng*, 2022, 39(5): 974–981, 990.
- [10] TIAN X, SHI Y, ZHANG Y, et al. The role of posterior pallial amygdala in mediating motor behaviors in pigeons [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 367.
- [11] 常铭, 许孟华, 杨建宏, 等. 面向动物机器人的新型可充电表面肌电信号采集系统设计与应用 [J]. *现代电子技术*, 2022, 45(24): 136–140.
- CHANG M, XU M H, YANG J H, et al. Design and application of novel rechargeable sEMG acquisition system for animal robots [J]. *Modern Electron Tech*, 2022, 45(24): 136–140.
- [12] 董满收, 蔡雷, 王浩, 等. 电刺激家鸽中脑诱导运动的初步研究 [J]. *生物学杂志*, 2012, 29(4): 33–35.
- DONG M S, CAI L, WANG H, et al. A preliminary study on motion eliciting by electrically stimulating midbrain of pigeon [J]. *J Biol*, 2012, 29(4): 33–35.
- [13] 邵静丹. 鸽子机器人户外飞行调控工具的开发与应用 [D]. 南京: 南京航空航天大学; 2014.
- SHAO J D. Development and application of remote control equipment on pigeon pigeon-robots flying outdoors [D]. Nanjing: Nanjing University of Aeronautics and Astronautics; 2014.
- [14] CAI L, DAI Z, WANG W, et al. Modulating motor behaviors by electrical stimulation of specific nuclei in pigeons [J]. *J Bionic Eng*, 2015, 12(4): 555–564.
- [15] SEO J, CHOI G, PARK S, et al. Wireless navigation of pigeons using polymer-based fully implantable stimulator: A pilot study using depth electrodes [A]. *Proceedings of 2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* [C]; 2017.
- [16] WANG H, YANG J, LV C, et al. Intercollicular nucleus electric stimulation encoded “walk forward” commands in pigeons [J]. *Anim Biol*, 2018, 68(2): 213–225.
- [17] 卢俊杉. 鸽子穿戴式神经信号检测与刺激闭环调控系统设计 [D]. 郑州: 郑州大学; 2018.
- LU J S. The design of wearable neural signal detection and stimulation closed-loop control system for pigeon [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2018.
- [18] 王宏昌. 基于轨迹偏差反馈的鸽子飞行控制器研制 [D]. 郑州: 郑州大学; 2019.
- WANG H C. Development of pigeon flight controller based on trajectory deviation feedback [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2019.
- [19] ZHAO K, WAN H, SHANG Z, et al. Intracortical microstimulation parameters modulate flight behavior in pigeon [J]. *J Integr Neurosci*, 2019, 18(1): 23–32.
- [20] YANG L, LI M, WAN H, et al. The wearable behavior control system for robo-animal [A]. *Proceedings of 2019 38th Chinese Control Conference* [C]; 2019.
- [21] SHIM S, YUN S, KIM S, et al. A handheld neural stimulation controller for avian navigation guided by remote control [J]. *Biomed Mater Eng*, 2020, 30(5-6): 497–507.
- [22] WANG H, WU J, FANG K, et al. Application of robo-pigeon in ethological studies of bird flocks [J]. *J Integr Neurosci*, 2020, 19(3): 443–448.
- [23] JANG J, BAEK C, KIM S, et al. Current stimulation of the midbrain nucleus in pigeons for avian flight control [J]. *Micromachines*, 2021, 12(7): 788.
- [24] HUANG A, WANG D, LIU X. A long-range neural stimulator for pigeon-robots [A]. *Proceedings of 2021 IEEE 5th Advanced Information Technology, Electronic and Automation Control Conference* [C]; 2021.
- [25] YANG L, MA Z, LI M, et al. Creating virtual fear to control the locomotion behavior of pigeon robots using micro-stimulation [A]. *Proceedings of 2022 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems* [C]; 2022.
- [26] 王浩, 王绍康, 邱兆成, 等. 户外鸽子生物机器人的设计及初步应用 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2022, 39(6): 1209–1217.
- WANG H, WANG S K, QIU Z C, et al. Design and preliminary application of outdoor flying pigeon-robot [J]. *J Biomed Eng*, 2022, 39(6): 1209–1217.
- [27] XU W, YANG L, WANG Z, et al. Stratum griseum periventriculare-mediated fear emotion regulates motor behavior in pigeons [J]. *J Bionic Eng*, 2023, 20(5): 2228–2239.
- [28] LIU X, SU Z, GAO Q, et al. Wireless-controlled cubic neural stimulator for free-moving animals [J]. *R Soc Open Sci*, 2023, 10(3): 221116.
- [29] FANG K, MEI H, TANG Y, et al. Grade-control outdoor turning flight of robo-pigeon with quantitative stimulus parameters [J]. *Front Neurobot*, 2023, 17: 1143601.
- [30] 苏振岭, 王东云, 齐小敏, 等. 面向动物机器人的柔性埋入式神经刺激器研制 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2023, 40(2): 327–334.
- SU Z L, WANG D Y, QI X M, et al. Development of a flexible embedded neurostimulator for animal robots [J]. *J Biomed Eng*, 2023, 40(2): 327–334.

何瑞芬,杨永秀,梁晓磊. 卵巢储备功能减退动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 254-259.

HE R F, YANG Y X, LIANG X L. Research progress on animal models of diminished ovarian reserve [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 254-259.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.013

卵巢储备功能减退动物模型研究进展

何瑞芬¹, 杨永秀^{2*}, 梁晓磊^{2*}

(1. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000;

2. 兰州大学第一医院妇产科, 甘肃省妇科肿瘤重点实验室, 兰州 730000)

【摘要】 卵巢储备功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)由于女性卵巢内剩余的卵母细胞数量和/或质量下降,导致卵巢功能减退,是卵巢功能下降的早期阶段,包括与高龄相关的生理性 DOR 和病理因素导致的病理性 DOR。DOR 可进展为早发性卵巢功能不全、卵巢早衰,对女性健康产生深远影响,而目前仍无有效方法逆转卵巢功能衰退。人类卵巢资源的有限性和医学伦理的要求,使得必须通过建立合适的动物模型去探究卵巢功能衰退的分子机制,寻找其预测及治疗靶点。本文总结目前常用的 DOR 啮齿类动物造模方法,为相关基础研究提供参考。

【关键词】 卵巢储备;动物模型;啮齿类动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0254-06

Research progress on animal models of diminished ovarian reserve

HE Ruifen¹, YANG Yongxiu^{2*}, LIANG Xiaolei^{2*}

(1. the First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Key Laboratory for Gynecologic Oncology Gansu Province, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: LIANG Xiaolei. E-mail: liangxl07@lzu.edu.cn; YANG Yongxiu. E-mail: yxyanglzu@163.com

【Abstract】 Diminished ovarian reserve (DOR) is associated with a reduced quantity and/or quality of retrieved oocytes, usually leading to low numbers of retrieved oocytes and poor reproductive outcomes. DOR may potentially progress to premature ovarian insufficiency and premature ovarian failure, which have adverse impacts on women's health. There is currently no effective clinical treatment to rescue ovarian function. The limited availability of human ovarian tissues and medical ethics issues mean that animal models are crucial for improving our understanding of the molecular pathogenesis of DOR and identifying preventive and therapeutic targets. This review thus aims to summarize the techniques and strategies used to establish rodent models of DOR, to provide a reference for future studies.

【Keywords】 ovarian reserve; animal model; rodent animal

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

随着女性生育年龄的推迟,肿瘤治疗生存率的提高,加之社会压力、环境污染等因素的影响,卵巢储备功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)成

为女性寻求辅助生殖治疗的重要原因之一。DOR 是由于卵母细胞质量和/或质量的下降导致的卵巢功能不足。由于定义的不统一,DOR 的发病率约为

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81960278)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81960278).

【作者简介】 何瑞芬,女,硕士,研究方向:卵巢储备功能减退机制研究。Email:Herflanzhou@163.com

【通信作者】 梁晓磊,男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:生殖内分泌疾病致病机制研究。Email:liangxl07@lzu.edu.cn;

杨永秀,女,博士,教授,博士生导师,研究方向:妇科肿瘤、妇科内分泌疾病机制研究。Email:yxyanglzu@163.com。

* 共同通信作者

10% ~ 35%^[1]。卵母细胞的质量和数量与年龄呈负相关,随着年龄增长而出现的卵巢功能下降称为生理性 DOR (physiologic DOR) 或高龄相关的 DOR (age-related DOR, AR-DOR);在生理性衰老基础上,病理因素的参与使得卵巢衰老加速而过早的发生卵巢功能下降称为病理性 DOR (pathologic DOR)^[2-3]。国内外对 DOR 的诊断尚未形成统一标准,其诊断有赖于对卵巢储备功能的评价,常用指标有抗苗勒管激素 (anti-Müllerian Hormone, AMH)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、窦卵泡计数 (antral follicular count, AFC)^[4]。

DOR 具有隐匿性和渐变性,可能进展为早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI)、卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF),对女性远期健康产生影响,如因雌激素缺乏而罹患心血管疾病、骨质疏松等慢性疾病的风险增加^[5]。目前,DOR 发生的分子机制仍不清楚,多数患者的发病原因不能完全明确,建立合适的动物模型进行临床前研究,对机制探究和治疗开发尤为重要。已知卵巢功能下降与多个因素相关,如年龄、遗传、免疫、代谢、环境、生活方式,以及包括手术、放化疗在内的医源性因素等^[6]。DOR、POI、POF 的动物模型也多基于上述影响因素而建立。本文就目前报道的啮齿类动物模型建立方法进行文献汇总,以期开展相关基础研究提供参考。

1 年龄因素

随年龄增长卵母细胞的数量和质量逐渐下降,发生 AR-DOR,即卵巢的生理性老化。通过计数第 2、6、12、18 月龄雌鼠的卵泡数量,探究 C57BL/6 小鼠整个生殖周期中卵泡耗损进展,发现 2 月龄性成熟后,各级卵泡数随年龄增长均出现明显减少^[7]。有研究利用 32 周龄 (相当于人类 35 岁左右) 自然衰老的 C57BL/6 雌鼠建立了 AR-DOR 模型,与 12 周龄的对照组相比,老年雌鼠产崽数明显减少,血清 AMH、E₂ 显著下降,次级卵泡和窦卵泡数量明显减少^[3]。自然衰老模型的建立无需干预,方法简单便捷,可用于研究卵巢生理性衰老进展及抗衰老治疗等研究。

2 遗传因素

遗传是 DOR 发生的重要病因,多伴有家族史。目前发现多种基因参与 DOR 的发生,包括 FMR1、

GDF9、BMP15、BRCA1/2、AMHR2、HMGB2 等^[8]。FMR1 与卵巢功能的减退存在明显的相关性,LU 等^[9]建立了携带人 FMR1 前突变序列的转基因小鼠模型,该模型小鼠出现人类 POI 相似表型,表现为生育力降低,生长卵泡数量显著减少,血清 FSH、LH 及 17 β -E₂ 水平发生改变。该研究发现模型小鼠卵巢中 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化都发生了改变,Akt/mTOR 通路可能为潜在的治疗靶点。随着现代生物技术的快速发展,遗传修饰动物模型在制作周期、费用支出及技术要求等方面已无明显劣势,对于研究特定基因在整体动物中的表达调控规律,理解疾病发生机制、预测治疗靶点具有极大促进作用,是科学研究的重点方向。

3 医源性因素

3.1 化学治疗

化疗是恶性肿瘤治疗的主要方法之一,卵巢对化疗毒性非常敏感,常导致卵巢功能损伤。利用化疗药物的生殖毒性建立卵巢损伤模型应用广泛,环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 和顺铂是临床上常用的抗肿瘤药物,可通过影响颗粒细胞和卵母细胞 DNA 合成,消耗卵巢储备,造成卵巢功能减退。环磷酰胺具有广谱抗癌作用,是常用的烷化剂代表药物之一。6 ~ 8 周龄 C57BL/6 小鼠单次腹腔注射 70 mg/kg 的 CTX,14 d 后,与对照组相比,CTX 组小鼠 FSH 水平增加 3 倍,E₂ 水平下降约 30%,原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡分别下降约 50%、51%、66%,闭锁卵泡增加 58%^[10]。CTX 造模时剂量的选择和给药方式存在差异。在小鼠模型中,单次腹腔注射时 CTX 剂量 70 ~ 200 mg/kg,连续多次腹腔注射时常见剂量有 10、50 mg/kg 不等,连续给药 14 d 左右,也可采用首次大剂量单次注射 + 后续小剂量连续注射的方式^[11-13]。另外也有研究采用 CTX 联合白消安造模,单次腹腔注射和连续腹腔注射均可^[14-15]。该方法操作简单、耗时短、成功率高、应用广泛。

顺铂 (cisplatin) 作为单独或联合化疗的基础药物,广泛应用于多种癌症治疗。有研究探究了顺铂建立 SD 大鼠 POF 模型的最佳剂量,腹腔注射不同剂量 (0.5、1、1.5、2、3、4 mg/kg) 的顺铂,连续注射 10 d,观察大鼠的一般健康状况和卵巢功能的改变,结果显示 1.5 mg/kg 连续注射 10 d 可建立理想的 POF 大鼠模型。该研究中高剂量顺铂影响大鼠一般状况,在注射第 7 天大鼠出现进食减少,行动缓

慢,出现稀便、水样便或血便,在干预结束时只有一半的大鼠存活^[16]。

综上,化疗诱导建立卵巢功能减退模型简单易操作,模型性状稳定,成功率高,应用广泛,常用于卵巢化疗损伤机制和卵巢损伤的预防治疗等相关研究。但应注意化疗药物毒副作用严重,可影响其他系统功能,建模过程中动物容易死亡。因此,建模时需掌握合适的给药剂量及持续时间,过程中注意观察动物的一般状况变化。

3.2 放射治疗

卵巢是对射线最为敏感的器官之一,全身照射或盆腔靶向照射均可损伤卵巢卵泡,加速生殖衰老。NMRI 小鼠接受不同剂量 X 或 γ 射线(0.02、0.1、0.5、2、8 Gy)的单次全身照射,从 0.1 Gy 开始就可观察到原始卵泡的减少^[17]。全身照射同样会损害其他系统,对研究造成干扰。为此,有研究建立了靶向照射大鼠模型,该研究对盆腔照射靶区进行 CT 定位,避开重要脏器,给予单侧局部照射后,Wistar 大鼠卵巢重量减轻,动情周期和激素水平发生改变,卵泡减少,该模型对于研究放疗引起的卵巢损伤更有针对性^[18]。射线照射造模方法简单、耗时短、成功率高,对卵巢的损伤呈剂量依赖性。但对仪器设备的要求较高,靶向照射需要专业人员协助,且射线可能对实验人员存在潜在健康威胁,需要做好防护,在一定程度上限制了其广泛应用。

3.3 其他生殖毒性药物

雷公藤常用于自身免疫疾病的治疗,随着临床的广泛应用,其生殖毒性日益受到关注。大鼠腹腔注射不同剂量(25、50、75 mg/kg)的雷公藤多苷,连续注射 15 d 后,三组 SD 大鼠血清 FSH 水平增高,卵泡闭锁增加,卵泡数目减少,有剂量依赖趋势^[19]。该模型构建方法简单、耗时较短,卵巢损伤程度有剂量依赖趋势,提示可用来构建相似的 DOR 模型。

4 免疫因素

DOR 的发生与多种自身免疫疾病相关,如桥本甲状腺炎、Addison 病、类风湿关节炎、系统系红斑狼疮等。卵巢是常见的自身免疫攻击靶点,在查找 DOR 病因时自身免疫因素时常被考虑,特别是在存在抗卵母细胞抗体、自身免疫疾病或活检中出现淋巴细胞性卵巢炎时^[20]。建立免疫性 DOR 动物模型有助于探究自身免疫、炎症应答在 DOR 发生中的病理机制,寻找有效干预措施。

ZP3 是一种透明带糖蛋白,是精卵结合的初级受体。BALB/c 小鼠接种 ZP3 进行主动免疫,可导致卵巢炎症,使卵泡进行性耗竭,生育力下降,诱发卵巢功能障碍^[21]。在该模型的建立过程中,需注意 ZP3 的注射需要弗氏佐剂乳化,多选择小鼠前后足垫或尾根部皮下多点注射,根据研究需求可进行多次加强免疫。用 ZP3 建立免疫型卵巢功能下降模型,该方法技术成熟、操作相对简单、耗时较短,已广泛应用于自身免疫性 DOR/POI/POF 的相关研究中。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,是一种有效的免疫刺激物。BALB/c 小鼠尾静脉连续注射 LPS 7 d 后,血清 FSH 浓度显著升高, E_2 浓度降低^[22]。LV 等^[23]通过腹腔注射 LPS,同样成功建立了 POI 模型,表现为 C57BL/6N 小鼠发情周期延长、原始卵泡数减少和血清激素水平改变。该研究同时评估了卵巢炎症水平,结果显示 LPS 促进 IL-1 β 的表达和产生。需要注意的是 LPS 作为重要的内毒素,可引起全身系统性炎症反应,在急性肺损伤、脓毒症等其他炎症模型中亦被经常运用。

此外,也可用小鼠自体卵巢组织进行主动免疫建立免疫型 DOR 模型,该方法需要提取卵巢组织,操作过程较为繁琐,限制了其在相关研究中应用。此外,还可采用切除胸腺的方法建立免疫型 DOR 模型。胸腺是 T 细胞分化、发育、成熟的场所,与机体免疫功能密切相关。新生小鼠切除胸腺后发生自身免疫性卵巢炎,表现为卵巢发育迟缓,卵巢萎缩,卵泡减少,导致小鼠生育力下降^[24]。但切除胸腺同时可导致其他腺体也出现自身免疫性炎症,发生免疫功能紊乱,因此该方法在单一的卵巢功能研究中的应用并不多见。

5 代谢因素

典型半乳糖血症是由于缺乏 1-磷酸-半乳糖尿苷基转移酶而导致的一种罕见的先天性半乳糖代谢障碍。POI 是半乳糖血症女性最常见的长期并发症,表现为高促性腺激素性、低雌激素性不孕^[25]。利用 D-半乳糖(D-galactose)建立 POI 动物模型技术成熟,产前母体暴露或产后子代自身暴露均可诱发卵巢功能损伤,产前母体暴露常用饮食添加的方式给予干预,子代自身暴露采取饮食添加或连续腹腔内注射均可。ROSTAMI DOVOM 等^[26]对 D-半乳糖诱导 POI 的研究进行了系统综述,纳入 14 项研究,

根据暴露时间将其分为产前($n = 4$)和产后($n = 10$)。结果表明,产前和产后 D-半乳糖暴露影响不同阶段卵泡的发育,产前暴露时,半乳糖毒性主要影响原始卵泡和初级卵泡,而产后暴露主要影响窦前卵泡和窦卵泡。总的来说,该造模方法操作简单,但造模耗时较长,产前暴露在母体妊娠时便给予干预,子代小鼠饲养时间需要根据研究目的选择;即便是产后暴露,腹腔注射需连续 42 d 左右,饮食干预则需 70 ~ 80 d。此外,各研究中 D-半乳糖的干预剂量存在较大差异。因此,利用 D-半乳糖建模时需要根据研究目的选择合适的暴露方式、暴露时间及暴露剂量。

6 环境因素

越来越多研究表明,环境中的某些化学物质能够引起生殖功能损害。去氧乙烯基环己烯(4-vinylcyclohexene diepoxide, VCD)就是一个很好的例子。VCD 是环境低浓度的有害化学物质,作为橡胶轮胎、增塑剂、阻燃剂和杀虫剂化学合成过程中的副产品释放到环境中。4 周龄 C57BL/6J 小鼠给予不同剂量 VCD(40、80、120 和 160 mg/kg),连续腹腔注射 15 d,观察小鼠卵泡数量和 AMH 变化,结果显示暴露于 80 ~ 160 mg/kg 剂量的 VCD 显著减少了原始卵泡数量,120 ~ 160 mg/kg 时次级卵泡和窦卵泡也显著减少,血清 AMH 水平 80 ~ 160 mg/kg 剂量下显著下降。该研究评估了高剂量组(160 mg/kg,连续 15 d)在不同时间卵巢功能的变化,结果显示 VCD 暴露 15 d 后,小鼠卵巢原始卵泡和初级卵泡显著减少,相当于卵巢功能下降的初期。25 d 还有少量处于发育阶段的次级卵泡,35 d 时成熟卵泡几乎完全耗竭。在 45 d 时小鼠的发情周期出现紊乱。45 d 时血清中 FSH 明显升高,在 35 d 之前 E_2 水平组高于对照组,但在 45 d 后 E_2 水平下降,105 d 时 E_2 水平显著下降,几乎检测不到,卵巢功能衰竭。因此,VCD 对卵泡影响的最佳观察时间为干预结束后 30 d 以内,其诱导的卵巢损伤呈现剂量-时间依赖性^[27]。

VCD 可选择性地损伤原始和初级卵泡,随着时间延长,成熟卵泡在自然周期中的不断损耗,进入募集的卵泡越来越少,紧接着出现卵巢功能衰竭,呈现出卵巢功能减退的动态变化过程。而且 VCD 不影响包括肝和脾在内的其他外周组织,也不影响大脑炎症标志物^[28]。因此,通过控制造模时间的长

短,该模型不仅可用来研究代表卵巢功能下降不同阶段的 DOR、POI、POF,还可用于研究围绝经期的生理变化及相关并发症。虽然 VCD 建模周期较长,但其成功率高,且相对安全稳定。

7 生活方式

众所周知,吸烟对妇女的生殖健康有不利影响,暴露在香烟烟雾中会加速卵巢储备的衰减,导致卵巢储备功能减退和更年期的提前^[29]。Foster 团队探究了香烟烟雾对 C57BL/6 小鼠卵巢卵泡的影响,利用烟雾暴露系统将小鼠全身暴露于香烟烟雾,每天 2 次,每周 5 d,比较不同暴露周数(4、8、9、17 周)后卵泡数目的变化,发现在暴露 4 周后原始卵泡显著减少;在暴露 8 周后原始卵泡和总卵泡数均显著减少,卵巢重量也明显下降。因此,香烟烟雾暴露 8 周足以引起原始卵泡和总卵泡数的减少^[30-31]。将 Wistar-Albino 大鼠暴露于香烟烟雾,每天 2 次,连续暴露 45 d 后,卵巢各级卵泡数均明显下降^[32]。因此,DOR 动物模型也可以通过香烟烟雾暴露建立。需要说明的是,以上大小鼠研究中均未观察香烟烟雾对激素和动情周期的影响,需相关研究对该部分数据加以补充。

近年研究发现,焦虑、抑郁等负面情绪与卵巢储备功能下降密切相关。SD 大鼠、C57BL/6 小鼠在慢性不可预见应激(chronic unpredictable stress, CUS)诱导下出现卵巢功能下降,表现为卵泡数减少,发情周期紊乱,血清 FSH 水平升高、 E_2 和 AMH 水平降低,成功建立了心理应激诱导的 DOR/POI 模型^[33-34]。有研究评估了长期高密度饲养环境诱导的应激对卵巢储备的影响,将 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠按不同饲养密度饲养 10 周,发现饲养密度越高的小鼠皮质酮水平越高,AMH 水平越低,原始卵泡和初级卵泡越低^[35]。一般认为,应激反应下皮质酮的分泌增加。因此,有研究者利用皮质酮,连续给药 21 d,同样成功构建了心理应激诱导的 SD 大鼠 POI 模型^[36]。利用皮质酮建立心理因素的卵巢功能损伤模型,相比慢性应激诱导操作简单、耗时短,但两者的损伤机制是否完全一致需要进一步证实。

8 结语

DOR 是卵巢功能下降的早期阶段,尽早发现、治疗 DOR 对延缓卵巢功能进一步衰退具有重要意义。

义。DOR 动物模型的建立使得有机会全面阐明其发生机制,寻求最佳治疗方法。目前,构建卵巢功能衰退动物模型已取得一定进展,但仍有一些局限。首先,大多研究忽略了 DOR、POI、POF 模型的差异,造模过程中不注重模拟卵巢功能从轻度下降到卵巢功能完全衰竭的动态进展。其次,各研究中模型构建成功的评价指标不尽相同,导致各研究结果的普适性不强。最后,自然衰老、基因修饰、免疫、代谢,以及化放疗诱导的造模方式基于单一的病因学,只能模拟单一病因的卵巢功能减退;VCD、慢性应激、香烟烟雾诱导更有可能模拟特发性的卵巢功能减退,其中 VCD 造模方法成熟,诱导的卵巢损伤呈现剂量-时间依赖性,能动态地模拟卵巢衰退的不同阶段,在机制研究和防治研究中可能具有广阔应用前景。

参 考 文 献(References)

[1] JIAO Z, BUKULMEZ O. Potential roles of experimental reproductive technologies in infertile women with diminished ovarian reserve [J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(10): 2507-2517.

[2] PASTORE L M, CHRISTIANSON M S, STELLING J, et al. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR [J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(1): 17-23.

[3] LIU H, JIANG C, LA B, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells improved the reproductive function of age-related diminished ovarian reserve in mice through Ampk/FoxO3a signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 317.

[4] PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion [J]. Fertil Steril, 2020, 114(6): 1151-1157.

[5] PIEDADE K C, SPENCER H, PERSANI L, et al. Optimizing fertility in primary ovarian insufficiency: case report and literature review [J]. Front Genet, 2021, 12: 676262.

[6] STUENKEL C A, GOMPEL A, DAVIS S R, et al. Approach to the patient with new-onset secondary amenorrhea: is this primary ovarian insufficiency? [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(3): 825-835.

[7] LLIBEROS C, LIEW S H, ZAREIE P, et al. Evaluation of inflammation and follicle depletion during ovarian ageing in mice [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 278.

[8] MOISEEVA A V, KUDRYAVTSEVA V A, NIKOLENKO V N, et al. Genetic determination of the ovarian reserve: a literature review [J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 102.

[9] LU C, LIN L, TAN H, et al. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice [J].

Hum Mol Genet, 2012, 21(23): 5039-5047.

[10] LI Q, AN X, MAN X, et al. Transcriptome analysis reveals that cyclophosphamide induces premature ovarian failure by blocking cholesterol biosynthesis pathway [J]. Life Sci, 2019, 239: 116999.

[11] LUAN Y, EDMONDS M E, WOODRUFF T K, et al. Inhibitors of apoptosis protect the ovarian reserve from cyclophosphamide [J]. J Endocrinol, 2019, 240(2): 243-256.

[12] ZHAO Y T, YIN H, HU C, et al. *Tilapia* skin peptides restore cyclophosphamide-induced premature ovarian failure via inhibiting oxidative stress and apoptosis in mice [J]. Food Funct, 2022, 13(3): 1668-1679.

[13] LI J, YU Q, HUANG H, et al. Human chorionic plate-derived mesenchymal stem cells transplantation restores ovarian function in a chemotherapy-induced mouse model of premature ovarian failure [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 81.

[14] SALVATORE G, DE FELICI M, DOLCI S, et al. Human adipose-derived stromal cells transplantation prolongs reproductive lifespan on mouse models of mild and severe premature ovarian insufficiency [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 537.

[15] BAHREHBAR K, REZAZADEH VALOJERDI M, ESFANDIARI F, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells improved premature ovarian failure [J]. World J Stem Cells, 2020, 12(8): 857-878.

[16] LI D, CHEN Y, QI L, et al. Differentially expressed genes in cisplatin-induced premature ovarian failure in rats [J]. Anim Reprod Sci, 2013, 137(3-4): 205-213.

[17] PUY V, BARROCA V, MESSIAEN S, et al. Mouse model of radiation-induced premature ovarian insufficiency reveals compromised oocyte quality: implications for fertility preservation [J]. Reprod Biomed Online, 2021, 43(5): 799-809.

[18] HE L, LONG X, YU N, et al. Premature ovarian insufficiency (POI) induced by dynamic intensity modulated radiation therapy via P13K-AKT-FOXO3a in rat models [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 7273846.

[19] LIU T E, ZHANG L, WANG S, et al. *Tripterygium* glycosides induce premature ovarian failure in rats by promoting p53 phosphorylation and activating the serine/threonine kinase 11-p53-p21 signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(1): 12-18.

[20] SZELIGA A, CALIK-KSEPKA A, MACIEJEWSKA-JESKE M, et al. Autoimmune diseases in patients with premature ovarian insufficiency-our current state of knowledge [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2594.

[21] O'LEARY S, LLOYD M L, SHELLAM G R, et al. Immunization with recombinant murine cytomegalovirus expressing murine zona pellucida 3 causes permanent infertility in BALB/c mice due to follicle depletion and ovulation failure [J]. Biol Reprod, 2008, 79(5): 849-860.

[22] HE F, LIU Y, LI T, et al. microRNA-146 attenuates lipopolysaccharide induced ovarian dysfunction by inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13

(5): 11611–11623.

[23] LV S J, HOU S H, GAN L, et al. Establishment and mechanism study of a primary ovarian insufficiency mouse model using lipopolysaccharide [J]. Anal Cell Pathol, 2021, 2021: 1781532.

[24] NISHIZUKA Y, SAKAKURA T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice [J]. Science, 1969, 166(3906): 753–755.

[25] ABIDIN Z, TREACY E. Insights into the pathophysiology of infertility in females with classical galactosaemia [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5236.

[26] ROSTAMI DOVOM M, NOROOZZADEH M, MOSAFFA N, et al. Induced premature ovarian insufficiency by using D galactose and its effects on reproductive profiles in small laboratory animals: a systematic review [J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 96.

[27] CAO L B, LEUNG C K, LAW P W, et al. Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure [J]. Life Sci, 2020, 262: 118543.

[28] VAN KEMPEN T A, MILNER T A, WATERS E M. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause [J]. Brain Res, 2011, 1379: 176–187.

[29] RICHARDSON M C, GUO M, FAUSER B C, et al. Environmental and developmental origins of ovarian reserve [J]. Hum Reprod Update, 2014, 20(3): 353–369.

[30] TUTTLE A M, STÄMPFLI M, FOSTER W G. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure [J]. Hum Reprod, 2009, 24(6): 1452–1459.

[31] GANNON A, STÄMPFLI M, FOSTER W. Cigarette smoke exposure leads to follicle loss via an alternative ovarian cell death pathway in a mouse model [J]. Toxicol Sci, 2012, 125(1): 274–84.

[32] KOLE E, OZKAN S O, ERALDEMIR C, et al. Effects of melatonin on ovarian reserve in cigarette smoking: an experimental study [J]. Arch Med Sci, 2020, 16(6): 1376–1386.

[33] FU X Y, CHEN H H, ZHANG N, et al. Effects of chronic unpredictable mild stress on ovarian reserve in female rats: feasibility analysis of a rat model of premature ovarian failure [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1): 532–540.

[34] GAO L, ZHAO F, ZHANG Y, et al. Diminished ovarian reserve induced by chronic unpredictable stress in C57BL/6 mice [J]. Gynecol Endocrinol, 2020, 36(1): 49–54.

[35] KIM J, YOU S. High housing density-induced chronic stress diminishes ovarian reserve via granulosa cell apoptosis by angiotensin II overexpression in mice [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8614.

[36] MIAO M, GAO M, LI T, et al. Tandem mass tag-based proteomic analysis reveals the treatment mechanism of Bushen Huoxue Formula on psychological stress-induced premature ovarian insufficiency [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 258: 112870.

[收稿日期] 2023-08-22

刘怡端,刘翼骁,韩欣园,等. 5 × FAD 转基因小鼠在阿尔茨海默病研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 260–274.

LIU Y D, LIU Y X, HAN X Y, et al. Advances in the application of 5 × FAD transgenic mice in Alzheimer's disease research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 260–274.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.014

5 × FAD 转基因小鼠在阿尔茨海默病研究中的应用进展

刘怡端¹,刘翼骁²,韩欣园²,肖依彤²,叶田园^{3*}

(1. 山东中医药大学康复医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学中医学院, 济南 250355;
3. 山东中医药大学中医药创新研究院, 济南 250355)

【摘要】 5 × FAD 转基因小鼠 (transgenic mice with five familial Alzheimer's disease) 是携带 5 个家族性基因突变的 APP/PS1 转基因小鼠, 其中与 β-淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 相关的突变为 K670N/M671L (Swedish)、1716V (Florida) 和 V717I (London), 与早老素-1 (presenilin 1, PS1) 相关的突变为 M146L 和 L286V。5 × FAD 小鼠在 1.5 月龄时脑内已有大量的 β-淀粉样蛋白 (β-amyloid, Aβ), 2 月龄时开始出现神经炎症斑 (neuritic plaque, NP)。5 × FAD 小鼠的病理表型包括淀粉样斑块聚集、神经元丢失、神经胶质细胞增生和记忆功能障碍等。5 × FAD 小鼠的生物学特性可能涉及脑内 Aβ 斑块的形成变化、Tau 蛋白过度磷酸化、突触功能障碍、神经炎症反应、线粒体功能障碍、血脑屏障损伤、神经元损伤、内质网应激和眼部病变等。作为阿尔茨海默病的经典动物模型, 5 × FAD 转基因小鼠在早期即可模拟 AD 患者晚期的神经病理过程及行为学表现, 被广泛应用于 AD 发病机制研究和 AD 新药开发。本文对 5 × FAD 转基因小鼠模型的模型构建、生物学背景、生物学特性及 AD 防治药物的研发应用进行总结, 以期对 5 × FAD 转基因小鼠在 AD 研究中的应用提供参考与借鉴作用。

【关键词】 阿尔茨海默病; 5 × FAD 转基因小鼠; 学习记忆; 认知功能

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0260-15

Advances in the application of 5 × FAD transgenic mice in Alzheimer's disease research

LIU Yiduan¹, LIU Yixiao², HAN Xinyuan², XIAO Yitong², YE Tianyuan^{3*}

(1. College of Rehabilitation Medicine, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Chinese Medicine Innovation Research Institute, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Corresponding author: YE Tianyuan. E-mail: yetianyuan2013@163.com

【Abstract】 Transgenic 5 × FAD mice are APP/PS1 transgenic mice carrying five familial Alzheimer's disease (AD) gene mutations. Beta-amyloid precursor protein (amyloid precursor protein, APP) expression is related to the K670N/M671L (Swedish), 1716V (Florida), and V717I (London) mutations, and presenilin 1 (PS1) is affected by the M146L and L286V mutations. 5 × FAD mice express high levels of β-amyloid in the brain at 1.5 months old, and neuritic plaques began to appear at 2 months old. The pathological phenotypes of 5 × FAD mice include amyloid plaque

【基金项目】 国家自然科学基金 (82205078), 山东省自然科学基金 (ZR2021QH157), 山东省中医药科技项目 (2021Q079), 山东中医药大学大学生研究训练计划项目 (S202210441014, S202310441012, S202310441013)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82205078), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QH157), Shandong Province Traditional Chinese Medicine Technology Project (2021Q079), Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Shandong University of Traditional Chinese Medicine (S202210441014, S202310441012, S202310441013)。

【作者简介】 刘怡端, 女, 在读本科生, 研究方向: 运动康复。Email: lyd152341@163.com

【通信作者】 叶田园, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药理研究。Email: yetianyuan2013@163.com

aggregation, neuronal loss, gliosis, and memory dysfunction, while their biological characteristics include changes in the formation of brain β -amyloid plaques, hyperphosphorylation of Tau protein, synaptic dysfunction, neuroinflammatory response, mitochondrial dysfunction, blood-brain barrier injury, neuronal injury, endoplasmic reticulum stress, and eye lesions. As a classic animal model of AD, $5 \times$ FAD transgenic mice can simulate the neuropathological process and behavioral manifestations of late-stage AD in humans, and these mice are thus widely used in research into the pathogenesis of AD and the development of new drugs. In this review, we summarize the model construction, biological background, and biological characteristics of $5 \times$ FAD transgenic mice, and the development and application of drugs for the prevention and treatment of AD, to provide references for the application of $5 \times$ FAD transgenic transgenic mice in AD research.

【Keywords】 Alzheimer’s disease; $5 \times$ FAD transgenic mice; learning and memory; cognitive function
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 作为一种神经退行性疾病,严重威胁着 65 岁及以上人群^[1],AD 患者主要存在记忆减退、认知障碍等症状,同时伴有焦虑、抑郁等神经精神症状。根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 的最新数据显示,2050 年全球患有痴呆症的患者预计将达到 1.39 亿^[2]。据估计,2023 年 65 岁及以上痴呆患者的治疗及护理费用约为 3450 亿美元,预计 2050 年将略低于 1 万亿美元^[3],阿尔茨海默病给社会带来的负担正在日益增加^[4-6]。

AD 的发病机制包括脑内淀粉样蛋白沉积^[7]和 Tau 蛋白异常磷酸化^[8]、神经炎症^[9]、氧化应激 (oxidative stress, OS)^[10]、线粒体功能障碍 (mitochondrial dysfunction, MD)^[11]、钙稳态失调^[12]和神经胶质功能障碍^[13]等,但其发病机制尚不明确,同时缺乏系统完整的病理及生理学研究,仍无理想防治药物,因此,急需稳定可靠的动物模型来用于研究治疗 AD。根据现有的 AD 发病机制研究进展及基因型分类,目前常用的 AD 转基因小鼠模型有 10 种 (表 1),包括 PDAPP、TG2576、APP23、

表 1 常用的 AD 转基因小鼠模型
Table 1 Commonly used classification of transgenic AD mouse models

AD 小鼠模型 Mouse models of AD	突变基因 Mutant gene	启动子 Promoter	认知记忆损伤 Cognitive and memory dysfunction	病理变化 Pathological change	缺点 Disadvantages	应用 Application	
APP 单 转基因 小鼠 APP single transgenic mice	PDAPP	APP ^{V717F}	PDGF	MWM: ≥ 4 月龄 ^[15-16] MWM: ≥ 4 months of age ^[15-16]	A β 沉积: 6 ~ 9 月龄, Tau 异常磷酸化: 14 月龄 ^[17] A β deposition: 6 ~ 9 months of age, Tau abnormal phosphorylation: 14 months of age ^[17]	识别记忆缺陷的出现晚于空间学习记忆缺陷, Tau 病理出现较晚且无 NFTs Appearance of recognition memory deficit was later than that of spatial learning memory deficit, and the appearance of Tau pathology was later without NFTs	神经退行性变和斑块形成机制的研究 Studies on the mechanisms of neurodegeneration and plaque formation
	TG2576	APP ^{K670N/M671L}	PrP	MWM: 9 ~ 10 月龄, Y 迷宫: 10 月龄 ^[18] MWM: 9 ~ 10 months of age, Y maze: 10 months of age ^[18]	A β 沉积: 9 ~ 10 月龄 ^[18] A β deposition: 9 ~ 10 months of age ^[18]	识别记忆的缺陷较晚, A β 沉积出现时间较晚, 无 Tau 病理和 NFTs Defects of recognition memory were late, the time of A β deposition was late, and there was no Tau pathology and NFTs	早期 AD 研究为 A β 斑块清除以及星形胶质细胞参与 AD 发生等 Early studies on AD include A β plaque clearance and the involvement of astrocytes in the development of AD
	APP23	APP ^{K670N/M671L}	Thy-1	MWM: 3 月龄, BM: 12 月龄 ^[19] MWM: 3 months of age, BM: 12 months of age ^[19]	A β 沉积: 14 ~ 18 月龄 ^[20] , Tau 异常磷酸化: 6 月龄 ^[21] A β deposition: 14 ~ 18 months of age ^[20] , Tau abnormal phosphorylation: 6 months of age ^[21]	非空间性学习记忆缺陷和 A β 沉积出现较晚 Non-spatial learning and memory deficits and A β deposition appear late	-

续表 1

AD 小鼠模型 Mouse models of AD	突变基因 Mutant gene	启动子 Promoter	认知记忆损伤 Cognitive and memory dysfunction	病理变化 Pathological change	缺点 Disadvantages	应用 Application	
APP 双转 基因 小鼠 APP double transgenic mouse	TgCRND8	APP ^{K670N/M671L} APP ^{V717F}	PrP	MWM:6 月龄 ^[22] ,Y 迷宫和 T 迷宫:6、9 月龄 ^[23] MWM: 6 months of age ^[22] , Y maze and T maze: 6 and 9 months of age ^[23]	Ab 沉积:3 月龄 ^[22] Ab deposition: 3 months of age ^[22]	无 Tau 病理和 NFTs No Tau pathology and NFTs	AD 短期研究 Short-term studies in AD
	J20	APP ^{K670N/M671L} APP ^{V717F}	PDGF	-	无 Ab 沉积,存在 Ab 突触毒性 ^[24] There was no Ab deposition and Ab synaptic toxicity was present ^[24]	不表现识别记忆功能障 碍,无 Ab 沉积,无 Tau 病 理和 NFTs There was no recognition memory dysfunction, no Ab deposition, no Tau pathology, and no NFTs	AD 相关的血管样变 与神经炎性变的研究 Study on vasoid and neuroinflammatory changes associated with AD
	APP/ PS1	APP ^{K670N/M671L} PS1 ^{L166P}	PrP	RAWM:3 月龄 ^[25] , MWM:6 月龄 ^[26-27] RAWM: 3 months of age ^[25] , MWM: 6 months of age ^[26-27]	Ab 沉 积: 2.5 月龄 ^[28] Ab deposition: 2.5 months of age ^[28]	空间学习记忆障碍和识 别记忆障碍的进展相对 缓慢,不表现交替任务 障碍 Spatial learning and recognition memory impairments progress relatively slowly and do not exhibit alternating task impairments	人/鼠基因同系物研 究,神经退行性变化 的神经生物学研究 Human/mouse gene homolog studies, neurobiological studies of neurodegenerative changes
APP/PS 转基因 小鼠 APP/PS transgenic mice	TG2576 + PS1 (M146L)	APP ^{K670N/M671L} PS1 ^{M146L}	PrP	Y 迷 宫: 12 ~ 14 周龄 ^[29] Y maze: 12 ~ 14 weeks of age ^[29]	Ab 沉 积: 23 周龄 ^[30] Ab deposition: 23 weeks of age ^[30]	认知记忆损伤进展相对 缓慢,Ab 沉积出现较晚 Progression of cognitive memory impairment was relatively slow, and Ab deposition appeared late	-
	APP/PS1 KI	-	Endoge- nous	RAWM:9 月龄 ^[31] RAWM: 9 months of age ^[31]	Ab 沉积:6 月龄 ^[32] Ab deposition: 6 months of age ^[32]	认知障碍出现较晚,没有 Tau 病理和 NFTs Cognitive impairment appeared late, no Tau pathology, NFTs	-
	5 × FAD	APP ^{K670N/M671L} APP ^{I716V} APP ^{V717I} PS1 ^{M146L} PS1 ^{L286V}	Thy-1	BM:3 月龄 ^[33] Y 迷 宫:4 ~ 5 月龄 ^[34] BM: 3 months of age ^[33] , Y maze: 4 ~ 5 months of age ^[34]	Ab 沉积:2 月龄 ^[34] Ab deposition: 2 months of age ^[34]	Tau 病理和 NFTs 的存在 仍有争议 Tau pathology and the existence of NFTs remain controversial	神经元内 Ab ₄₂ 诱导 的神经变性和淀粉样 斑块形成的相关研究 Studies related to Ab ₄₂ -induced neurodegeneration and amyloid plaque formation in neurons
APP/PS/Tau 转基 因小鼠 APP/PS/Tau transgenic mice	3 × Tg-AD	APP ^{K670N/M671L} PS1 ^{L146V} Tau ^{P301L}	Thy-1	MWM: 6 月 龄, NOR:9 ~ 11 月龄, BM:12 月龄 ^[35] MWM: 6 months of age, NOR: 9 ~ 11 months of age, BM: 12 months of age ^[35]	Ab 沉 积: 12 月 龄 ^[35] , Tau 异常磷 酸化:12 月龄 ^[36] Ab deposition: 12 months of age ^[35] , Abnormal phosphorylation of Tau: 12 months of age ^[36]	与 AD 病理特征最为接 近,但外源性基因表达稳 定性较差、造模较困难且 造价高 It is most similar to the pathological characteristics of AD, but the exogenous gene expression stability is poor, the modeling is difficult and the cost is high	与突触功能障碍和 AD 相关的斑块和神 经缠结病理的研究 Studies of plaque and neurotangle pathology associated with synaptic dysfunction and AD

TgCRND8、J20、APP/PS1、TG2576 + PS1 (M146L)、APP/PS1 KI、5 × FAD 和 3 × Tg-AD 小鼠^[14]。

AD 疾病复杂, 尽管还没有理想的模型, 然而与上述模型相比, 5 × FAD 模型具有明显优势, 重现了 AD 淀粉样蛋白病理的主要特征且认知记忆损害及病理变化出现时间相对较早, 成为早发性 AD 的理想模型。同时该模型对 $A\beta_{42}$ 的产生有着极高水平的累积效应, 可用于研究神经元内 $A\beta_{42}$ 诱导的神经变性和淀粉样斑块形成等相关领域。5 × FAD 小鼠模型涵盖了与 AD 相关的几乎所有神经病理特征: 淀粉样斑块、胶质细胞增生、神经传递缺陷、突触丧失和神经退行性病变, 唯一缺失的是 Tau 异常磷酸化, 至今仍存在争议。同 AD 患者一样, 5 × FAD 小鼠的 AD 样病理可分为 3 个阶段: 2 月龄左右的无症状期, 其特征是存在淀粉样斑块和出现胶质样增生; 6 月龄左右的症状期, 其特征是出现大量的淀粉样蛋白病理、神经炎症、显著的认知缺陷和神经传递障碍; 9 月龄左右的症状晚期, 其特征是出现突触和神经元损失。因此本文将围绕 5 × FAD 小鼠展开论述, 为 5 × FAD 转基因小鼠在 AD 研究中的应用提供参考与借鉴作用。

1 5 × FAD 转基因小鼠

1.1 5 × FAD 转基因小鼠的生物学背景

目前, 研究者通过对已存在的 AD 转基因小鼠相杂交、基因敲入等制备了双转或多转基因小鼠, 其病理学变化接近人类患者, 并可对 AD 多种相关因素的相互作用进行研究。

为了更快地促进 $A\beta_{42}$ 产生、建立 AD 淀粉样蛋白模型, 国内外相关的研究团队和学者一直在探索建立多转基因 AD 动物模型, 通过在 APP/PS1 转基因模型小鼠中引入人类基因 5 个家族性 AD 的突变位点繁育而成的转基因小鼠为最近较新的 AD 模型小鼠^[34], 品系全称为 B6. Cg-Tg (APP^{SwFlon}, PSEN1 * M146L * L286V) 6799Vas/Mmjax, 也有文献称其为 5 × FAD、Tg-5 × FAD、5XFAD 或 Tg6799, 该小鼠具有 AD 相关的 5 个突变位点, 其中与 β -淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 相关的突变为 K670N/M671L (Swedish)、L716V (Florida) 和 V717I (London), 与早老素 1 (presenilin 1, PS1) 相关的突变为 M146L 和 L286V。这两个转基因的表达受到 Thy1 启动子神经特异性元件的调控, 在神经元中特异性过表达^[37]。在 B6/SJL 杂交背景下

5 × FAD 小鼠可作为半合子保持 10 代以上, 并稳定地表达 APP 和 PS1 基因^[34]。

1.2 5 × FAD 转基因小鼠的生物学特性

1.2.1 5 × FAD 转基因小鼠的行为学特征

Morris 水迷宫实验 (Morris water maze, MWM) 主要用于测试实验动物对空间位置感和方向感 (空间定位) 的学习记忆能力^[38]。与同月龄野生型 (wild type, WT) 小鼠相比, 5 月龄的 5 × FAD 小鼠游泳速度显著降低^[39], 6 月龄的 5 × FAD 小鼠检测期逃避潜伏期显著延长^[40]、目标象限停留时间显著减少^[41], 11 月龄雄性 5 × FAD 小鼠的目标象限停留时间百分比显著下降^[42], 12 月龄 5 × FAD 小鼠学期的逃避潜伏期和检测期的目标象限停留时间显著延长^[43], 说明 5 × FAD 小鼠的空间学习记忆能力下降。

GIRARD 等^[44]使用一种新开发的自动化设备——嗅觉 H 迷宫 (olfactory H-maze, OHM), 比较 2、4 和 6 月龄 5 × FAD 小鼠与其野生型同窝的表现, 发现 4 和 6 月龄 5 × FAD 小鼠在延迟的交替任务 (alternation task, ALT)、延迟的非交替任务 (non-alternation task, N-ALT)、延迟的反转任务 (reversal task, REV) 均表现出前额叶皮层依赖学习能力的下降。

Y 迷宫 (Y-maze, YM) 可用于评估小鼠的短期记忆, 是由啮齿动物天生的好奇心驱动以探索先前未曾探视过的区域, 通过小鼠探索迷宫的三个臂来评估其自发交替能力以及空间学习记忆能力。与 WT 对照组相比, 2 月龄雌性 5 × FAD 小鼠自发交替百分比显著下降^[45], 11 月龄雄性 5 × FAD 小鼠的新臂进入次数显著下降^[42], 说明 5 × FAD 小鼠的短期记忆能力降低。

旷场实验 (open field test, OFT) 又称敞箱实验, 是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。与 WT 对照组相比, 6 月龄和 12 月龄 5 × FAD 小鼠的运动距离显著增加, 总休息时间也相应减少^[46]。

新物体识别实验 (novel object recognition, NOR) 用于检测啮齿类动物的学习记忆能力。与 WT 对照组相比, 3 月龄雄性 5 × FAD 小鼠的逃避潜伏期从第 2 天开始显著升高^[33]。5 月龄 5 × FAD 小鼠的雌性比雄性新物体识别时间更短^[47]。在检测期, 12 月龄的 5 × FAD 小鼠的新物体识别时间和新物体偏爱指数均显著降低, 6、12 月龄的 5 × FAD 小鼠的辨别指数显著减少^[48]。

巴恩斯迷宫实验 (Barnes maze test, BM) 被广泛

用于测试在较小压力下的空间学习和记忆能力。与 WT 对照组相比,3 月龄的雄性 $5 \times \text{FAD}$ 小鼠检测期目标象限停留时间显著减少^[33],5 ~ 6 月龄 $5 \times \text{FAD}$ 小鼠在训练期和检测期潜伏期均显著增加^[49]。

T 迷宫实验(T maze test, TM)可用来评估自发交替行为,是检测啮齿类动物空间工作记忆的一种经典行为学方法。与 WT 对照组小鼠相比,5 ~ 6 月龄 $5 \times \text{FAD}$ 小鼠的错误次数显著上升^[41]。

采用高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)实验分析小鼠焦虑样行为,与杂合 $5 \times \text{FAD}$ 小鼠相

比,2 月龄和 5 月龄的纯合 $5 \times \text{FAD}$ 小鼠开臂进入百分比显著增加,表明正常焦虑表型的丧失^[39]。

在转棒实验(rotarod test, RRT)中, OBLAK 等^[46]发现与 WT 对照组相比,6 月龄和 12 月龄 $5 \times \text{FAD}$ 小鼠转棒上停留时间更长,小鼠跌倒潜伏期延长。

以上研究结果表明, $5 \times \text{FAD}$ 转基因小鼠行为学异常改变最早可出现在 2 月龄,且雌性较同龄雄性更易发生,主要包括空间学习记忆能力、自主行为和紧张度、物体识别记忆能力、焦虑情绪和运动协调能力(表 2)。

表 2 $5 \times \text{FAD}$ 转基因小鼠的行为学特征

Table 2 Behavioral characteristics of $5 \times \text{FAD}$ transgenic mice

认知类型 Cognitive type	方法 Methods	月龄 Months	性别 Sex	对照小鼠 Control mice	检测时期 Period of detection	指标 Index	变化 Change
空间学习记忆 Spatial learning and memory	MWM	12 ^[43]	雌、雄 Female and male	WT	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↑
		11 ^[42]	雄 Male	WT	检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
		6 ^[40]	雌、雄 Female and male	WT	学习期 Learning period	逃避潜伏期 Escape latency	—
					检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
		6 ^[41]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
					检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
	YM	2 ^[45]	雌 Female	WT	检测期 Detection period	自发交替百分比 Percentage of spontaneous alternation	↓
					检测期 Detection period	自发交替百分比 Percentage of spontaneous alternation	↓
		11 ^[42]	雄 Male	WT	检测期 Detection period	自发交替百分比 Percentage of spontaneous alternation	↓
					检测期 Detection period	自发交替百分比 Percentage of spontaneous alternation	↓
	OHM	2 ^[44]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	延迟的交替任务 Alternation task	—
						延迟的非交替任务 Non-alternation task	↑
						延迟的反转任务 Reversal task	↓
						延迟的交替任务 Alternation task	↓
		4、6 ^[44]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	延迟的非交替任务 Non-alternation task	↓
						延迟的反转任务 Reversal task	↓
						延迟的交替任务 Alternation task	↓
						延迟的非交替任务 Non-alternation task	↓
自主行为和紧张度 Autonomic behavior and tension	BM	3 ^[33]	雄 Male	WT	检测期 Detection period	目标象限停留时间 Time in the target quadrant	↓
		5 ~ 6 ^[49]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
					检测期 Detection period	逃避潜伏期 Escape latency	↑
	TM	5 ~ 6 ^[41]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	错误次数 Number of errors	↑
					检测期 Detection period	错误次数 Number of errors	↑
	OFT	6、12 ^[46]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	运动距离 Moving distance	↑

续表 2

认知类型 Cognitive type	方法 Methods	月龄 Months	性别 Sex	对照小鼠 Control mice	检测时期 Period of detection	指标 Index	变化 Change
新异物体识别能力 New object recognition ability	NOR	5 ^[47]	雌、雄 Female and male	WT	适应期 Adaptation period	新物体识别时间 New object recognition time	-
			雌 Female	5 × FAD 雄 5 × FAD Male	检测期 Detection period	新物体识别时间 New object recognition time	↓
			雄 Male	WT	学习期 Learning period	潜伏期时间 Latency period	↓
		12 ^[48]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	新物体识别时间 New object recognition time	↓
						偏爱指数 Index of preference	↓
						开臂进入次数百分比 Percentage of open arm entry times	↑
焦虑情绪 Anxiety	EPM	2、5 ^[39]	雌、雄 Female and male	杂合子 Heterozygote	检测期 Detection period		
运动协调能力 Motor coordination ability	RRT	4、6、12 ^[46]	雌、雄 Female and male	WT	检测期 Detection period	转棒上停留时间 The time stayed on the rod	↑

注：↑：升高或增加；↓：降低或减少；-：无差异。（下表同）
Note. ↑. Increase or extension. ↓. Decrease or decrease. -. Indicates no difference. (The same in the following tables)

1.2.2 5 × FAD 转基因小鼠的病理特征

淀粉样蛋白斑块是 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 的沉积,是 AD 的典型病理特征。小 $A\beta$ 肽的生成并无天然毒性,而由大量极度聚集的 $A\beta$ 原纤维组成的淀粉样斑块则象征着异常的病理改变, $A\beta$ 寡聚物可诱导突触功能障碍^[50],进一步导致 AD 中神经元损伤和记忆丧失^[51]。 $A\beta$ 蛋白主要有两种亚型:可溶性 $A\beta_{40}$ 和不可溶性 $A\beta_{42}$ ^[52],在正常人中, $A\beta_{40}$ 比例较 $A\beta_{42}$ 高^[34]。APP、PS1 和早老素 2 (presenilin2, PS2) 基因的常染色体显性突变增加了 $A\beta_{42}$ 的产生^[53]。APP 转基因上的 FAD (flavine adenosine dinucleotide) 突变容易出现在 β -或 γ -分泌酶结合位点附近,导致 $A\beta$ 总量增加 (K670N/M671L 瑞典型突变^[54]) 或 $A\beta_{42}$ 增加 (I716V 佛罗里达型突变和 V717I 伦敦型突变^[55]),PSEN1 转基因 (γ -分泌酶的催化亚基) 上的 FAD 突变增加了 $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 比值。大多数 AD 转基因小鼠需要 6 ~ 12 月或更长时间才能形成淀粉样斑块^[56],但 5 × FAD 转基因小鼠神经元细胞内的 $A\beta_{42}$ 蛋白自 1.5 月龄起就会出现^[34]。5 × FAD 小鼠中雌性比雄性 APP 基因表达更多,可能是由于 Thy1 启动子中的雌激素相关部位用于驱动 APP 转基因表达,并产生更高水平的 $A\beta$ ^[57]。随着小鼠月龄增加, $A\beta_{42}$ 蛋白表达几乎呈线性增加,而 $A\beta_{40}$ 的增加通常较 $A\beta_{42}$ 滞后 2 ~ 3 个月^[34]。淀粉样蛋白病理变化始于大脑皮层的深层和亚皮层,随着小鼠月龄增加,皮层和海马上斑块扩散面积增大。2 月龄时皮层中形成致密的淀粉

样斑块,5 ~ 6 月龄 5 × FAD 小鼠皮层和海马中 $A\beta$ 斑块更加清晰^[49],6 月龄 5 × FAD 小鼠海马 DG 区 $A\beta$ 斑块显著增加^[58]。

AD 另一特征性病理改变——神经纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFTs),形成的主要原因是 Tau 蛋白的过度磷酸化^[59]。NFTs 是神经元细胞质和突起中直的、纤维状的、高度不溶的斑块,会导致神经元之间通信和信号处理的异常丢失,最终导致神经元凋亡^[59]。在 5 × FAD 小鼠的首次实验报道中缺乏 Tau 相关内容^[34],后期有研究通过 ELISA 法检测到 6 月龄 5 × FAD 小鼠皮层和血清中 p-Tau 蛋白水平显著升高^[40],甚至发现 5 × FAD 小鼠大脑中的 Tau 过度磷酸化比学习记忆障碍出现的更早^[60],但 MAAROUF 等^[61]的实验中 5 × FAD 小鼠没有出现 NFTs。因此有关 5 × FAD 小鼠 Tau 蛋白表型的病理研究至今仍存在争议,导致结果异质性的原因可能是动物的年龄、性别、遗传背景,以及方法学和分析等的差异,对此仍需进一步的研究证明。

脑萎缩 (brain atrophy, BA) 也是 AD 非常重要的病理特征之一,AD 患者神经元丢失导致相关大脑区域的严重萎缩,导致认知和记忆功能的进行性丧失,最终导致痴呆。采用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察小鼠大脑皮层和海马 DG 区组织结构,6 月龄 5 × FAD 转基因小鼠细胞核和神经元萎缩^[40]。6 月龄 5 × FAD 小鼠躯体感觉皮层的锥体细胞中的突触数量较 WT 小鼠显著减少^[62-63]。采用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 4 月龄小鼠脑组织超

微结构,发现 5 × FAD 小鼠大脑皮层中的突触数量减少,在大脑皮层和海马中的突触神经递质囊泡的数量也减少^[64],9 月龄 5 × FAD 转基因小鼠皮层第 5 层的神经元数量明显减少^[34]。基于设计的体视学方法对 12 月龄 5 × FAD 小鼠皮层进行计数,发现皮层第 5 层神经元数量明显减少^[65]。通过免疫荧光法 (immunofluorescence, IF) 检测 5 × FAD 小鼠皮层和海马 DG 区的电离钙结合适配器分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1) 高表达的小胶质细胞和胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 高表达的星形胶质细胞均呈现激活状态,细胞数量显著减少^[66]。

综合以上研究结果,5 × FAD 转基因小鼠早在 2 月龄时就会出现 Aβ 沉积,5 ~ 6 月龄时显著增多; 4 月龄时皮层中突触数量减少,6 月龄时显著减少; 6 月龄时出现神经元的萎缩,9 月龄时可观察到密集神经元丢失。这些研究表明,5 × FAD 转基因小鼠具有 AD 的典型病理特征 (表 3)。

1. 2. 3 5 × FAD 转基因小鼠的生理生化表型

突触标记物如突触素 (synaptophysin, SYP)、突触融合蛋白 (syntaxin, STX) 和突触后致密蛋白 95 (postsynaptic density-95, PSD-95) 的表达会随着小鼠月龄增加而降低。采用 ELISA 方法检测小鼠全脑匀浆中突触素水平,5 × FAD 转基因小鼠全脑匀浆中突触素水平在 4 月龄开始下降,9 月龄时约为对照组的 75%,12 月龄时突触标记物的水平显著降低^[34]。4 ~ 12 月龄的 5 × FAD 小鼠的皮层和海马中突触素和 PSD-95 显著减少^[33,48,68]。但也有研究称这两种标记物水平没有变化,可能是因为大多数研究只适用于 B6/SJL 混合背景的雄性小鼠,对照组小鼠通常从不同的供应商处购买。

细胞周期素依赖蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 在成人脑中发挥着包括学习和记忆形成等高级认知功能^[69]。CDK5 与 p25 蛋白 (CDK5R1) 结合后,CDK5 活性在神经系统疾病 (AD、PD 和 HD) 中失去控制,最终导致神经毒

表 3 5 × FAD 转基因小鼠的病理特征

Table 3 Pathological characteristics of 5 × FAD transgenic mice						
指标 Index	方法 Methods	对照 Control	月龄 Months	部位 Part	变化 Change	
Aβ 斑块 Aβ aggregation	IHC	WT	2 ^[34]	皮层 Cerebral cortex	↑	
	IHC	WT	5 ~ 6 ^[34]	海马和皮层 Hippocampus and cerebral cortex	↑	
	IHC	WT	6 ^[58]	海马 DG 区 Hippocampal DG areas	↑	
	MSD	WT	4、6、12 ^[46]	海马 Hippocampus	↑	
				全脑 Whole-brain	—	
p-Tau	ELISA	WT	6 ^[40]	皮层和血清 Cerebral cortex and serum	↑	
GFAP、Iba1	IF	WT	4 ^[66]	皮层和海马 DG 区 Cerebral cortex and hippocampal DG areas	↑	
神经元萎缩 Neuronatrophy	HE	WT	6 ^[40]	皮层和海马 DG 区 Cerebral cortex and hippocampal DG areas	↑	
树突长度 Dendritic length	BS	WT	4 ^[67]	海马 Hippocampus	↓	
树突棘数量 Number of dendritic spines	BS	WT	6、12 ^[48]	皮层 Cerebral cortex	↓	
	BS	6 月龄 5 × FAD 6 months old 5 × FAD	12 ^[48]	皮层 Cerebral cortex	↓	
突触数量 Number of synapses	BS	WT	6 ^[62-63]	躯体感觉皮层的锥体细胞 Pyramidal cells in the somatosensory cortex	↓	
突触神经递质囊泡 Synaptic neurotransmitter vesicles	TEM	WT	4 ^[64]	海马和皮层 Hippocampus and cerebral cortex	↓	
神经元数量 Number of neurons	BS	WT	12 ^[65]	皮层第五层	↓	
	Nissl	WT	9 ^[34]	Layer 5 of cerebral cortex	↓	

性^[70]。将小鼠的皮层匀浆进行 Western Blot 分析后发现,3 月龄 5 × FAD 小鼠皮层中的 p25 水平呈上升趋势,同时神经元内 Aβ 聚集物出现;9、12 月龄时 5 × FAD 小鼠皮层中的 p25 水平增加到同源野生型的 150%,同时出现显著的神经变性和大锥体神经元丢失。因此,p25 水平上升神经元丢失和神经元内 Aβ 聚集关系密切。

血液中脂质的组成包括甘油三酯(triglyceride, TAG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)。其中 LDL 和 TAG 水平升高会抑制神经元连接,促进大脑中淀粉样斑块的沉积^[71],与 AD 风险呈正相关^[72],而 HDL 水平与 AD 风险呈负相关^[73]。与雄性相比,雌性 5 × FAD 和 WT 小鼠的 LDL 水平更高、HDL 水平更低,雌性总胆固醇的显著差异仅存在于 4 ~ 12 个月的 5 × FAD 小鼠之间。4 月龄时,雄性 5 × FAD 和 WT 小鼠之间的总胆固醇没有显著性差异,6 月龄时 5 × FAD 小鼠的总胆固醇有降低趋势,12 月龄时 5 × FAD 小鼠的总胆固醇显著降低^[46]。

中枢神经系统(central nervous system, CNS)中的炎症称为神经炎症,是机体为防止大脑损伤而产生的保护性应激反应,在多种脑部疾病中发挥重要作用,抑制神经炎症可以保护神经元、减轻学习记忆障碍,但目前尚无有效的抗神经炎症治疗药物。与 WT 小鼠相比,6 月龄的 5 × FAD 小鼠大脑皮层中的白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)表达均显著升高,自 3 月龄起小鼠海马中 TNF-α、IL-1β 等神经炎症因子呈时间依赖性增加^[74],4 月龄 5 × FAD 小鼠额叶皮层的星形胶质细胞激活和 TNF-α 水平显著降低^[75],6 月龄 5 × FAD 小鼠海马相关危险因素(IL-1β、TNF-α、APOE、GFAP)表达显著增加^[58],6.5 月龄 5 × FAD 小鼠海马中炎症介质 TNF-α 和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白血病病毒整合基因-1(friend leukaemia integration-1, Fli-1)mRNA 水平显著增加^[76]。

微小 RNA-128(miR-128)是一种在神经系统中高表达的 miRNA,在神经系统的发育及正常生理功能的维持中发挥重要作用,其异常表达与阿尔茨海默病密切相关。采用实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 2 月龄(初始 AD 病理)、8 月龄(重度 AD 病理)和 12 月龄(慢性重度

AD 病理)的小鼠海马中 miR-128 表达水平变化,与对照组 WT 小鼠相比,8 月龄 5 × FAD 小鼠的 miR-128 水平显著下调,但在 2 或 12 月龄时没有变化^[77]。5 × FAD 小鼠模型尿液中外泌体(exosomes, Exos)miRNA 在 Aβ 斑块沉积前存在表达差异,是潜在的诊断早期 AD 的非侵袭性生物标志物,对于早期干预 AD 具有重要意义^[78]。

综合以上研究结果,在 5 × FAD 转基因小鼠脑内,与神经信号传导、神经系统发育、神经系统功能表达和神经炎症等密切相关的生理生化表型较 WT 小鼠发生显著改变(表 4)。

2 5 × FAD 小鼠的其他生物学改变

目前研究表明,5 × FAD 转基因小鼠的其他生物学特性可能涉及突触功能障碍(synaptic dysfunction)、神经炎症(neuroinflammatory, NI)、线粒体功能障碍及血脑屏障(blood brain barrier, BBB)损伤、神经元损伤(neuron damage)、内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和眼部病变等,下面进行详述。

2.1 5 × FAD 中的突触功能障碍

突触结构是学习和记忆的生物学基础,突触病理是 AD 和衰老的早期标志^[82-84],在 AD 患者的尸检样本中,突触损失比神经元死亡更常见^[85]。Aβ 驱动的神突触萎缩和突触丢失在 AD 早期开始,并直接引发记忆障碍。早期突触功能障碍会引起突触室损伤并最终导致突触丢失,与认知功能下降密切相关^[86-89]。

突触丢失和突触强度的改变被认为是 AD 认知障碍的基础,通过测量小鼠在虚拟现实任务中的突触功能发现,5 × FAD 小鼠海马的 CA1 区中间神经元与锥体细胞的突触连接存在缺陷^[90]。5 × FAD 小鼠海马突触中的线粒体和糖酵解功能选择性受损,而非突触的线粒体功能得以维持,证明了海马突触线粒体功能的破坏是 5 × FAD 小鼠模型早期病理的主要事件^[64]。KIMURA 等^[91]的研究表明,5 × FAD 小鼠从 6 月龄开始出现突触受损。5 × FAD 小鼠突触线粒体呈现分裂与融合之间的不平衡,即线粒体动力学紊乱,同时伴有线粒体自噬 Parkin 通路的激活以及自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3B-II(microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II, LC3B-II)的募集,证明 5 × FAD 小鼠出现显著的突触线粒体功能障碍^[92]。

表 4 5 × FAD 转基因小鼠的生理生化表型

Table 4 Physiological and biochemical phenotypes of 5 × FAD transgenic mice

生化指标 Biochemical phenotype	方法 Methods	月龄 Months	部位 Part	结果 Results
Aβ ₄₂	ELISA	4 ~ 9 ^[34]	全脑 Whole-brain	↑
Aβ ₄₀	ELISA	4 ~ 9 ^[34]	全脑 Whole-brain	↑
SYP	ELISA	4 ~ 9 ^[34]	全脑 Whole-brain	↓
突触融合蛋白 Syntaxin	Western Blot	4~12 ^[33,48,68]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↓
PSD-95	Western Blot	9,12 ^[34]	皮层 Cerebral cortex	↓
P25	Western Blot	4~12 ^[33,48,68]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↓
胆固醇 Cholesterol	血糖分析 Analysis of glucose	3,9,12 ^[46]	皮层 Cerebral cortex	↑
		4 ^[46]	非空腹血浆 Non-fasting plasma	—
		12 ^[46]	丘脑 Thalamus	↓
BACE1	Western Blot	6,9 ^[57,79-81]	半脑匀浆 Half brain homogenate	↑
		6 ^[40]	皮层 Cerebral cortex	↑
TNF-α	ELISA	4 ^[75]	额叶皮层 Frontal cortex	↑
APOE、GFAP	qPCR	6 ^[58]	海马 DG 区 Hippocampal DG areas	↑
IL-1β	Western Blot	qRT-PCR	皮层 Cerebral cortex	↑
		3 ^[74]	海马 Hippocampus	↑
Fli-1 mRNA	PCR	6,5 ^[76]	海马、皮层 Hippocampus, cerebral cortex	↑
IL-6	IHC		海马 Hippocampus	↑
miR-128	qRT-PCR	8 ^[77]	海马 Hippocampus	↓

2.2 5 × FAD 中的神经炎症反应

炎症通常伴随免疫系统的激活,且严重的炎症易发生在细胞外 Aβ 沉积物周围^[93]。在小胶质细胞、星形胶质细胞、神经元和认知层面,淀粉样蛋白能促进神经炎症细胞因子的合成,形成继发性炎症^[94],引起神经元损伤,以及学习记忆功能障碍^[95-96]。小胶质细胞控制着大脑的代谢平衡,包括促炎或抗炎细胞因子的分泌以及异常蛋白的吞噬^[97],在神经元可塑性和突触重塑中也起着至关重要的作用^[98]。星形胶质细胞是大脑中的第二种免疫细胞,其激活程度与 Aβ₄₂ 及淀粉样斑块的水平呈正比^[34]。活化的小胶质细胞和星形胶质细胞主要分布于 Aβ 沉积部位,Aβ 斑块会激活小胶质细胞并分泌促炎细胞因子和趋化因子。小胶质细胞的促炎激活是 AD 的标志之一^[99]。

髓样细胞 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2,TREM2) 上的触发受体在 AD 中具有抗炎及神经保护作用,主要表达在中枢神经系统的小胶质细胞上^[100-101]。TREM2 在 5 × FAD 小鼠海马中表达上调,而腺相关病毒 (adeno-associated virus,AAV) 介导的 TREM2 敲除显著增加了 5 × FAD 小鼠海马中的促炎细胞因子水平,加重了认知缺陷^[58]。3 月龄时雌性 5 × FAD 小鼠炎症介质和胶质细胞标志物的表达变化更为明显,且这种变化呈年龄依赖性增加,而雄性 5 × FAD 小鼠在 5 月龄

前没有明显趋势^[102]。因此,在 5 × FAD 小鼠模型中,3 月龄前给予抗炎剂将是最有效的。值得注意的是,有研究发现 5 × FAD 小鼠的核心体温升高,可能是应激或炎症诱导的高热反应^[46]。

2.3 5 × FAD 中的线粒体功能障碍

线粒体是细胞内普遍存在的细胞器,主要通过氧化磷酸化为生命活动提供能量。此外,线粒体也参与钙信号传导、细胞代谢调节及细胞凋亡调控^[103]。Aβ 寡聚体会诱导 Ca²⁺ 内流到神经元细胞,促进线粒体 Ca²⁺ 超载^[104]。在散发性 AD 小鼠模型中,合成膜蛋白中糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation endproducts, RAGE) 片段的治疗降低了皮层和海马中线粒体呼吸酶的活性^[105]。5 × FAD 小鼠大脑中氧化还原的线粒体复合物 I (NADH-泛醌氧化还原酶) 中 Fe-S 簇比例增加,释放铁和过氧化氢,过氧化氢的亚铁离子通过芬顿反应形成有毒的氢氧自由基,引发线粒体功能障碍^[106]。5 × FAD 小鼠在 9 月龄出现认知功能障碍伴随海马内突触的结构降解和线粒体的异常,其中线粒体功能损伤表现为海马中 ATP 水平和呼吸链复合物 I 活性的降低^[107]。通过超微结构分析发现在 5 × FAD 小鼠大脑皮层和海马的细胞质、突触中无嵴线粒体显著增加^[64],由于嵴是线粒体能量产生的机制,因此支持了 5 × FAD 小鼠线粒体代谢下降的观点,并进一步表明线粒体功能的改变可能驱动

早期 AD 的生物学缺陷。

2.4 5 × FAD 中的血脑屏障损伤

近年来,脑血管对 AD 病理生理的影响引起了人们的关注。脑血管功能障碍,如脑血流量减少和血脑屏障损伤,被认为是 AD 发病机制的早期和关键因素。血脑屏障将神经元从循环血液成分中分离出来,通过限制血源性溶质的被动扩散,以及主动向大脑输送营养物质,严格调节分子进出大脑的运输^[108-109]。血脑屏障完整性的丧失使血液中的神经毒性成分进入大脑,导致免疫反应和神经炎症,进而引发神经退行性变的多种途径^[110-111]。据报道,AD 在神经退行性变、痴呆和脑萎缩之前就会发生血脑屏障功能障碍^[112]。电子顺磁共振波谱(electron paramagnetic resonance, EPR)可用于检测 5 × FAD 小鼠模型血脑屏障损伤及神经元组织氧化还原状态的改变^[106]。阻断血脑屏障后的凝血酶原(prothrombin, PRO)及前动力蛋白受体 2(prokineticin receptor 2, PKR2)的升高可能导致 5 × FAD 小鼠的海马神经退行性病变,并使其物体识别能力下降^[74]。在 5 × FAD 模型中,血脑屏障功能障碍的证据包括血脑屏障中受体介导的 A β 清除受损^[113]、内皮细胞和星形胶质细胞之间的接触受损^[114]、血脑屏障完整性改变^[115]以及血脑屏障渗漏^[116]。

2.5 5 × FAD 中的神经元损伤

氧化应激可引起神经退行性疾病中的神经元损伤,对 AD 的早期发病和疾病进展有显著促进作用^[117-118]。在 AD 发展过程中,病理性 A β 和 Tau 积聚并错误定位到突触,会导致突触功能障碍和神经元损伤。神经元分泌 A β 以响应突触活动,A β 反过来会下调突触传递^[119],这种负反馈调节可以作为一种生理稳态机制来限制神经元活动的水平^[120]。研究表明,4 月龄前 5 × FAD 小鼠海马的神经元活性无显著变化,12 月龄起观察到皮层第 5 层锥体神经元损伤严重^[34]。5 × FAD 小鼠模型再现了人类 AD 特征的神经元损失,且海马和皮层区的神经元损失尤为明显,然而许多其他 AD 动物模型没有表现出任何神经元损伤。

2.6 5 × FAD 中的内质网应激

内质网应激主要发生在神经元,持续的应激可促进神经元的功能退化。大脑长时间暴露于过表达的转基因膜蛋白或淀粉样蛋白病理可能会诱导 5 × FAD 小鼠的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。通过 Western Blot 发现与 WT 小鼠

相比,5 × FAD 小鼠的 UPR 无变化,内质网应激标志物显著升高^[57]。理论上过表达的跨膜蛋白 APP 和 PS1 在内质网的积累会引发慢性 ERS 和 UPR 的激活^[57],但 5 × FAD 小鼠中没有发现 ERS,可能是因为 1.0 ~ 1.5 月龄 APP 和 PS1 转基因的初始表达阶段,ERS 水平被短暂恢复正常并持续到稳态机制重新平衡,以处理增加的蛋白质折叠负荷。尽管越来越多的证据表明,高水平的 A β 不会在 5 × FAD 转基因小鼠中诱导 UPR,但来自人类 AD 患者的组织学数据却支持这一假设,即在人类 AD 和其他神经退行性疾病中,UPR 在某些神经元中被激活^[121]。因此,未来的实验需要在 5 × FAD 大脑中转基因表达开始之前、期间和之后分别分析内质网应激蛋白水平。

2.7 5 × FAD 中的眼部病变

虽然与 AD 相关的病理改变大多发生在大脑,但其实眼睛也是受影响的器官之一。越来越多的患者会出现视力障碍、视野丧失、色觉异常、对比敏感性降低、视觉注意丧失、视觉记忆减退、运动视觉减弱以及眼球运动和固定障碍等视功能障碍症状。

3 月龄时 5 × FAD 小鼠视网膜血流动力学和氧指标、厚度和组织 A β_{42} 蛋白水平的同时改变与先前报道的人类 AD 的发现相一致,即在 5 × FAD 小鼠的视网膜和脑组织中均观察到 A β_{42} 水平的增加^[122]。5 × FAD 小鼠视网膜中存在神经元内淀粉样蛋白- β 寡聚物(oligomers of amyloid- β , A β O)^[123],A β O 被认为是 AD 突触毒性和淀粉样蛋白发生的关键,参与了体内外 A β 聚集的突触毒性和传播,其积累与视网膜 A β 斑块沉积呈负相关^[124]。利用视网膜厚度作为评价指标,5 × FAD 小鼠视网膜厚度明显低于同龄非转基因小鼠,A β 疫苗处理后的 5 × FAD 小鼠,不仅 A β 斑块减少,视网膜厚度也增加^[125]。总之,在发育和衰老过程中,5 × FAD 小鼠视网膜和视神经上的淀粉样前体蛋白、磷酸化淀粉样前体蛋白、 β 蛋白裂解酶、 γ 淀粉裂解酶、总 Tau 蛋白和磷酸化 Tau 蛋白的表达变化与大脑组织中的变化具有一致性。

3 5 × FAD 转基因小鼠在 AD 防治药物研发中的应用

由于 5 × FAD 转基因小鼠具有 AD 典型的认知行为学与病理特征,并参与 AD 的发病机制,其已被用于各类 AD 防治药物的研究中(表 5)。

表 5 5 × FAD 转基因小鼠在 AD 防治药物研发中的应用

Table 5 Application of 5 × FAD transgenic mice in the development of anti-AD drugs

药物种类 Drug types	治疗药物 Therapeutic	给药剂量 Administration dosage	给药方式 Administration mode	给药时长 Duration of administration	月龄 Month ages	方法 Methods	检测结果 Results
中药 Traditional Chinese medicine	棉花素 Gossypetin	10 mg/kg	灌胃 Gavage	91 d	1. 6 ^[45]	MWM	目标穿越次数 Number of target crossing
	蝉翼素 Pteryxin	16 mg/kg	皮下注射 Subcutaneous injections	7 d	12 ^[43]	MWM	目标象限停留时间 Time in the target quadrant
	丁香酚 Eugenol	30 mg/kg	灌胃 Gavage	30 d	11 ^[42]	MWM	目标象限停留时间 Time in the target quadrant
	姜黄素 Theracurmin	100, 300 and 1000 mg/kg	灌胃 Gavage	84 d	3 ^[33]	BM	目标象限停留时间 Time in the target quadrant
	PF	5 mg/kg	皮下注射 Subcutaneous injections	28 d	6 ^[41]	MWM	逃避潜伏期 Escape latency
	T4	5, 25 μg/kg	皮下注射 Subcutaneous injections	60 d	5 ^[126]	MWM	逃避潜伏期 Escape latency
	SLCP	100 mg/kg	灌胃 Gavage	60 d	6, 12 ^[48]	MWM	目标象限停留时间 Time in the target quadrant
	OABL	20 mg/kg	皮下注射 Subcutaneous injections	21 d	6 ^[40]	MWM	目标象限停留时间 Time in the target quadrant
	MOS	0. 12%, w/v	灌胃 Gavage	56 d	0. 5 ^[127]	MWM	逃避潜伏期 Escape latency
化学药 Chemical drugs	3NCP	10, 20 and 40 mg/kg	皮下注射 Subcutaneous injections	28 d	5 ~ 6 ^[49]	BM	错误次数 Total errors

4 总结

5 × FAD 转基因小鼠模型优势在于重现了 AD 相关淀粉样蛋白病理的主要特征, 具有许多其他 AD 动物模型所没有的神经元损伤, 可在小鼠模型早期模拟 AD 患者晚期的神经病理过程及行为学表现, 被认为是关于 AD 表型再现最详尽的模型之一。但其在解释 5 × FAD 表型及其与人类 AD 的关系时, 也存在一定劣势: 首先, 没有 AD 病例是由多个 FAD 突变引起的, 并且在 5 × FAD 小鼠中突变组合可能会对 APP 处理产生意想不到的影响; 其次, 5 × FAD 中 Aβ₄₂/Aβ₄₀ 的比值似乎高于人类 AD, 因此增加了 5 × FAD 中 Aβ₄₂ 毒性水平高于典型 AD 大脑的可能性; 最后, 小鼠是否存在神经原纤维缠结 (NFTs) 仍有争议。总的来说, 该模型概括了人类患者临床 AD 的众多特征, 在临床前评估新药物对 AD 的疾病治疗潜力方面仍然具有很好的前景。

参 考 文 献 (References)

[1] BURNS A, ILIFFE S. Alzheimer’s disease [J]. BMJ, 2009, 338: b158.

[2] 2022 Alzheimer’s disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement, 2022, 18(4): 700–789.

[3] 2023 Alzheimer’s disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement, 2023, 19(4): 1598–1695.

[4] FERRETTI L, MCCURRY S M, LOGSDON R, et al. Anxiety

and Alzheimer’s disease [J]. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2001, 14(1): 52–58.

[5] ISMAIL Z, SMITH E E, GEDA Y, et al. Neuropsychiatric symptoms as early manifestations of emergent dementia: provisional diagnostic criteria for mild behavioral impairment [J]. Alzheimers Dement, 2016, 12(2): 195–202.

[6] PIETRZAK R H, LIM Y Y, NEUMEISTER A, et al. Amyloid-β, anxiety, and cognitive decline in preclinical Alzheimer disease: a multicenter, prospective cohort study [J]. JAMA Psychiatry, 2015, 72(3): 284–291.

[7] TANZI R E, BERTRAM L. Twenty years of the Alzheimer’s disease amyloid hypothesis: a genetic perspective [J]. Cell, 2005, 120(4): 545–555.

[8] TROJANOWSKI J Q, LEE V M Y. Pathological tau: a loss of normal function or a gain in toxicity? [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(9): 1136–1137.

[9] GUERRIERO F, SGARLATA C, FRANCIS M, et al. Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link [J]. Aging Clin Exp Res, 2017, 29(5): 821–831.

[10] BONDA D J, WANG X, PERRY G, et al. Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention [J]. Neuropharmacology, 2010, 59(4/5): 290–294.

[11] WANG W, ZHAO F, MA X, et al. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer’s disease: recent advances [J]. Mol Neurodegener, 2020, 15(1): 30.

[12] CASCELLA R, CECCHI C. Calcium dyshomeostasis in Alzheimer’s disease pathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4914.

[13] STEVENSON R F, SAMOKHINA E, ROSSETTI I, et al.

- Neuromodulation of glial function during neurodegeneration [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 278.
- [14] WEBSTER S J, BACHSTETTER A D, NELSON P T, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 88.
- [15] HARTMAN R E, IZUMI Y, BALES K R, et al. Treatment with an amyloid-beta antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(26): 6213–6220.
- [16] DAUMAS S, SANDIN J, CHEN K S, et al. Faster forgetting contributes to impaired spatial memory in the PDAPP mouse; deficit in memory retrieval associated with increased sensitivity to interference? [J]. *Learn Mem*, 2008, 15(9): 625–632.
- [17] MORGAN D. Learning and memory deficits in APP transgenic mouse models of amyloid deposition [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(7): 1029–1034.
- [18] HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice [J]. *Science*, 1996, 274(5284): 99–102.
- [19] PRUT L, ABRAMOWSKI D, KRUCKER T, et al. Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze [J]. *Behav Brain Res*, 2007, 179(1): 107–110.
- [20] CALHOUN M E, WIEDERHOLD K H, ABRAMOWSKI D, et al. Neuron loss in APP transgenic mice [J]. *Nature*, 1998, 395(6704): 755–6.
- [21] STURCHLER-PIERRAT C, ABRAMOWSKI D, DUKE M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(24): 13287–13292.
- [22] CHISHTI M A, YANG D S, JANUS C, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24): 21562–21570.
- [23] HYDE L A, KAZDOBA T M, GRILLI M, et al. Age-progressing cognitive impairments and neuropathology in transgenic CRND8 mice [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 160(2): 344–355.
- [24] MUCKE L, MASLIAH E, YU G Q, et al. High-level neuronal expression of A β _{1–42} in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(11): 4050–4058.
- [25] DING Y, QIAO A, WANG Z, et al. Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(45): 11622–11634.
- [26] O'LEARY T P, BROWN R E. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 201(1): 120–127.
- [27] BERNARDO A, HARRISON F E, MCCORD M, et al. Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid-beta plaque load in transgenic mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(11): 1777–1791.
- [28] BLANCHARD V, MOUSSAOUI S, CZECH C, et al. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(1): 247–263.
- [29] TRINCHESE F, LIU S, BATTAGLIA F, et al. Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice [J]. *Ann Neurol*, 2004, 55(6): 801–14.
- [30] HOLCOMB L, GORDON M N, MCGOWAN E, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes [J]. *Nat Med*, 1998, 4(1): 97–100.
- [31] WEBSTER S J, BACHSTETTER A D, VAN ELDIK L J. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2013, 5(3): 28.
- [32] FLOOD D G, REAUME A G, DORFMAN K S, et al. FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased A beta 42 and A beta deposition without APP overproduction [J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(3): 335–348.
- [33] JIHYUN K, JAEHOON K, HUANG Z, et al. Theracurmin ameliorates cognitive dysfunctions in 5 × FAD mice by improving synaptic function and mitigating oxidative stress [J]. *Biomol Ther*, 2019, 27(3): 327–335.
- [34] OAKLEY H, COLE S L, LOGAN S, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(40): 10129–10140.
- [35] ODDO S, CACCAMO A, SHEPHERD J D, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction [J]. *Neuron*, 2003, 39(3): 409–421.
- [36] CHEN X, XU B, NIE L, et al. Flavanol-rich lychee fruit extract substantially reduces progressive cognitive and molecular deficits in a triple-transgenic animal model of Alzheimer disease [J]. *Nutr Neurosci*, 2021, 24(9): 720–734.
- [37] MOECHARS D, LORENT K, DE STROOPER B, et al. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice [J]. *EMBO J*, 1996, 15(6): 1265–1274.
- [38] 方松, 余化霖. Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2010, 4: 321–326.
- FANG S, YU H L. Advances in the study on hippocampus-related spatial learning and memory in Morris water maze [J]. *Inter J Pathol Clin Med*, 2010, 4: 321–326.
- [39] ZHANG C, ZHANG Y, SHEN Y, et al. Anesthesia/surgery induces cognitive impairment in female Alzheimer's disease transgenic mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(2): 505–518.
- [40] TANG J J, HUANG L F, DENG J L, et al. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of OABL, a sesquiterpene lactone in 5 × FAD Alzheimer's disease mice

- model [J]. Redox Biol, 2022, 50: 102229.
- [41] KONG Y, PENG Q, LV N, et al. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via activation of adenosine A₁ receptor [J]. Neurosci Lett, 2020, 730: 135016.
- [42] CHO E, YOUN K, KWON H, et al. Eugenitol ameliorates memory impairments in 5 × FAD mice by reducing Aβ plaques and neuroinflammation [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 148: 112763.
- [43] KIRIS I, SKALICKA-WOŹNIAK K, BAŞAR M, et al. Molecular effects of pteryxin and scopoletin in the 5 × FAD Alzheimer's disease mouse model [J]. Curr Med Chem, 2022, 29(16): 2937–2950.
- [44] GIRARD S D, BARANGER K, GAUTHIER C, et al. Evidence for early cognitive impairment related to frontal cortex in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2013, 33(3): 781–796.
- [45] WON J K, DOHYUN L, GON C D, et al. Gossypetin ameliorates 5 × FAD spatial learning and memory through enhanced phagocytosis against Aβ [J]. Alzheimer's Res Ther, 2022, 14(1): 158.
- [46] OBLAK A L, LIN P B, KOTREDES K P, et al. Comprehensive evaluation of the 5 × FAD mouse model for preclinical testing applications: a MODEL-AD study [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 713726.
- [47] SIL A, ERFANI A, LAMB N, et al. Sex differences in behavior and molecular pathology in the 5 × FAD model [J]. J Alzheimers Dis, 2022, 85(2): 755–778.
- [48] MAITI P, BOWERS Z, BOURCIER-SCHULTZ A, et al. Preservation of dendritic spine morphology and postsynaptic signaling markers after treatment with solid lipid curcumin particles in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's amyloidosis [J]. Alzheimers Res Ther, 2023, 13(1): 37.
- [49] ULLAH R, ALI G, KHAN A, et al. Cyclopentanone derivative attenuates memory impairment by inhibiting amyloid plaques formation in the 5 × FAD mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9559.
- [50] LI S, SELKOE D J. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble Aβ oligomers from Alzheimer's brain [J]. J Neurochem, 2020, 154(6): 583–597.
- [51] PARIHAR M S, BREWER G J. Amyloid-β as a modulator of synaptic plasticity [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 22(3): 741–763.
- [52] CHOW V W, MATTSO M P, WONG P C, et al. An overview of APP processing enzymes and products [J]. Neuromolecular Med, 2010, 12(1): 1–12.
- [53] JARRETT J T, BERGER E P, LANSBURY P T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Biochemistry, 1993, 32(18): 4693–4697.
- [54] MULLAN M, CRAWFORD F, AXELMAN K, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid [J]. Nat Genet, 1992, 1(5): 345–347.
- [55] ECKMAN C B, MEHTA N D, CROOK R, et al. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of Aβ₄₂(43) [J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(12): 2087–2089.
- [56] ERIKSEN J L, JANUS C G. Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration [J]. Behav Genet, 2007, 37(1): 79–100.
- [57] SADLEIR K R, POPOVIĆ J, VASSAR R. ER stress is not elevated in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Biol Chem, 2018, 293(48): 18434–18443.
- [58] WANG Y, LIN Y, WANG L, et al. TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment via PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer's disease mice [J]. Aging, 2020, 12(20): 20862–20879.
- [59] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 5541–5554.
- [60] KANNO T, TSUCHIYA A, NISHIZAKI T. Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5 × FAD mice [J]. Behav Brain Res, 2014, 274: 302–306.
- [61] MAAROUF C L, KOKJOHN T A, WHITESIDE C M, et al. Molecular differences and similarities between Alzheimer's disease and the 5 × FAD transgenic mouse model of amyloidosis [J]. Biochem Insights, 2013, 6: 1–10.
- [62] BACK M K, RUGGIERI S, JACOBI E, et al. Amyloid beta-mediated changes in synaptic function and spine number of neocortical neurons depend on NMDA receptors [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6298.
- [63] CROWE S E, ELLIS-DAVIES G C R. Spine pruning in 5 × FAD mice starts on basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons [J]. Brain Struct Funct, 2014, 219(2): 571–580.
- [64] ANDERSEN J V, SKOTTE N H, CHRISTENSEN S K, et al. Hippocampal disruptions of synaptic and astrocyte metabolism are primary events of early amyloid pathology in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 954.
- [65] JAWHAR S, TRAWICKA A, JENNECKENS C, et al. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Aβ aggregation in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(1): 196.e29–196.e40.
- [66] 郭哲, 李茜茜, 杨佳颖, 等. 藏药旺拉活性成分对 APP/PS1 转基因 5 × FAD 小鼠老年斑形成及炎症反应的影响 [J]. 中药材, 2022, 45(6): 1444–1450.
- GUO Z, LI X X, YANG J Y, et al. Effects of the active ingredients of Tibetan medicine wangla on senile plaques formation and inflammatory response in APP/PS1 transgenic 5 × FAD mice [J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(6): 1444–1450.
- [67] LUCERO E M, FREUND R K, SMITH A, et al. Increased KIF11/kinesin-5 expression offsets Alzheimer Aβ-mediated toxicity and cognitive dysfunction [J]. iScience, 2022, 25(11): 105288.

- [68] FLANIGAN T J, XUE Y, RAO S K, et al. Abnormal vibrissa-related behavior and loss of barrel field inhibitory neurons in 5 × FAD transgenics [J]. *Genes Brain Behav*, 2014, 13(5): 488–500.
- [69] SHAH K, LAHIRI D. Cdk5 activity in the brain-multiple paths of regulation [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127: 2391–2400.
- [70] CAMINS A, VERDAGUER E, FOLCH J, et al. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes [J]. *CNS Drug Rev*, 2006, 12(2): 135–148.
- [71] SAÍZ-VAZQUEZ O, PUENTE-MARTÍNEZ A, UBILLOS-LANDA S, et al. Cholesterol and Alzheimer's disease risk: a meta-meta-analysis [J]. *Brain Sci*, 2020, 10(6): 386.
- [72] IWAGAMI M, QIZILBASH N, GREGSON J, et al. Blood cholesterol and risk of dementia in more than 1.8 million people over two decades: a retrospective cohort study [J]. *Lancet Healthy Longev*, 2021, 2(8): e498–e506.
- [73] ZIMETTI F, ADORNI M P, MARSILLACH J, et al. Connection between the altered HDL antioxidant and anti-inflammatory properties and the risk to develop Alzheimer's disease: a narrative review [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6695796.
- [74] KIM S, MOON G J, KIM H J, et al. Control of hippocampal prothrombin Kringle-2 (pKr-2) expression reduces neurotoxic symptoms in five familial Alzheimer's disease mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(5): 998–1016.
- [75] BARANGER K, BONNET A E, GIRARD S D, et al. MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5 × FAD Mice and APP Trafficking *in vitro* [J]. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 163.
- [76] LI P, WU Y, HAMLETT E D, et al. Suppression of Fli-1 protects against pericyte loss and cognitive deficits in Alzheimer's disease [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(4): 1451–1464.
- [77] SHVARTS-SEREBRO I, SHEININ A, GOTTFRIED I, et al. miR-128 as a regulator of synaptic properties in 5 × FAD mice hippocampal neurons [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71: 2593–2607.
- [78] SONG Z, QU Y, XU Y, et al. Microarray microRNA profiling of urinary exosomes in a 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(3): 233–242.
- [79] SADLEIR K R, EIMER W A, KAUFMAN R J, et al. Genetic inhibition of phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α does not block A β -dependent elevation of BACE1 and APP levels or reduce amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e01643.
- [80] O'CONNOR T, SADLEIR K R, MAUS E, et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis [J]. *Neuron*, 2008, 60(6): 988–1009.
- [81] ZHAO J, FU Y, YASVOINA M, et al. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(14): 3639–3649.
- [82] GREENOUGH WILLIAM T, WEST ROGER W, DEVOOGD TIMOTHY J. Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat [J]. *Science*, 1978, 202(4372): 1096–1098.
- [83] AGNATI L F, BENFENATI F, SOLFRINI V, et al. Brain aging and neuronal plasticity [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, 673: 180–186.
- [84] MARTIN L J, PARDO C A, CORK L C, et al. Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques and amyloid deposits in the aging cerebral cortex [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(6): 1358–1381.
- [85] BERTONI-FREDDARI C, FATTORETTI P, SOLAZZI M, et al. Neuronal death versus synaptic pathology in Alzheimer's disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 635–638.
- [86] JADHAV S, CUBINKOVA V, ZIMOVA I, et al. Tau-mediated synaptic damage in Alzheimer's disease [J]. *Transl Neurosci*, 2015, 6(1): 214–226.
- [87] DEKOSKY S T, SCHEFF S W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity [J]. *Ann Neurol*, 1990, 27(5): 457–464.
- [88] SCHEFF S W, PRICE D A, ANSARI M A, et al. Synaptic change in the posterior cingulate gyrus in the progression of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 43(3): 1073–1090.
- [89] SCHEFF S W, PRICE D A, ANSARI M A, et al. Synaptic change in the posterior cingulate gyrus in the progression of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 43(3): 1073–1090.
- [90] DE LA PRIDA L M. Threaded structure of a pathological oblivion [J]. *Epilepsy Curr*, 2021, 21(6): 457–459.
- [91] KIMURA R, OHNO M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 33(2): 229–235.
- [92] WANG L, GUO L, LU L, et al. Synaptosomal mitochondrial dysfunction in 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150441.
- [93] MERAZ-RÍOS M A, TORAL-RÍOS D, FRANCO-BOCANEGRA D, et al. Inflammatory process in Alzheimer's disease [J]. *Front Integr Neurosci*, 2013, 7: 59.
- [94] LOPEZ-RODRIGUEZ A B, HENNESSY E, MURRAY C L, et al. Acute systemic inflammation exacerbates neuroinflammation in Alzheimer's disease: IL-1 β drives amplified responses in primed astrocytes and neuronal network dysfunction [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(10): 1735–1755.
- [95] PERRY V H, HOLMES C. Microglial priming in neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10(4): 217–224.
- [96] HANSEN D V, HANSON J E, SHENG M. Microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2): 459–472.
- [97] SUBHRAMANYAM C S, WANG C, HU Q, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 112–120.
- [98] JI K, AKGUL G, WOLLMUTH L P, et al. Microglia actively

- regulate the number of functional synapses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56293.
- [99] KATSUMOTO A, TAKEUCHI H, TAKAHASHI K, et al. Microglia in Alzheimer's disease; risk factors and inflammation [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 978.
- [100] JONSSON T, STEFANSSON H, STEINBERG S, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2): 107–116.
- [101] GUERREIRO R, WOJTAS A, BRAS J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2): 117–127.
- [102] ZAHRA M, ASHEEBO R, WANG W, et al. 5 × FAD mice display sex-dependent inflammatory gene induction during the prodromal stage of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2019, 70(4): 1259–1274.
- [103] GLANCY B, KANE D A, KAVAZIS A N, et al. Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease [J]. *J Physiol*, 2021, 599(3): 863–888.
- [104] SANZ-BLASCO S, CALVO-RODRIGUEZ M, CABALLERO E, et al. Is it all said for NSAIDs in Alzheimer's disease? Role of mitochondrial calcium uptake [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15(6): 504–510.
- [105] AVETISYAN A, BALASANYANTS S, SIMONYAN R, et al. Synthetic fragment (60-76) of RAGE improves brain mitochondria function in olfactory bulbectomized mice [J]. *Neurochem Int*, 2020, 140: 104799.
- [106] VESKOVIĆ A, NAKARADA Đ, PAVIČEVIĆ A, et al. *In vivo/ex vivo* EPR investigation of the brain redox status and blood-brain barrier integrity in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2021, 18(1): 25–34.
- [107] AN J, ZHOU Y, ZHANG M, et al. Exenatide alleviates mitochondrial dysfunction and cognitive impairment in the 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 370: 111932.
- [108] ZLOKOVIC B V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders [J]. *Neuron*, 2008, 57(2): 178–201.
- [109] ABBOTT N J, RÖNNBÄCK L, HANSSON E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(1): 41–53.
- [110] SWEENEY M D, SAGARE A P, ZLOKOVIC B V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3): 133–150.
- [111] TOHIDPOUR A, MORGUN A V, BOITSOVA E B, et al. Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 276.
- [112] MONTAGNE A, ZHAO Z, ZLOKOVIC B V. Alzheimer's disease: A matter of blood-brain barrier dysfunction? [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(11): 3151–3169.
- [113] STORCK S E, MEISTER S, NAHRATH J, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid-β(1-42) across the blood-brain barrier [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(1): 123–136.
- [114] PARK R, KOOK S Y, PARK J C, et al. Aβ1-42 reduces P-glycoprotein in the blood-brain barrier through RAGE-NF-κB signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(6): e1299.
- [115] KOOK S Y, HONG H S, MOON M, et al. Aβ1-42-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(26): 8845–8854.
- [116] PARK J C, BAIK S H, HAN S H, et al. Annexin A1 restores Aβ1-42-induced blood-brain barrier disruption through the inhibition of RhoA-ROCK signaling pathway [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 149–161.
- [117] BUTTERFIELD D A, BOYD-KIMBALL D. Oxidative stress, amyloid-β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2018, 62(3): 1345–1367.
- [118] CHEIGNON C, TOMAS M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 450–464.
- [119] KAMENETZ F, TOMITA T, HSIEH H, et al. APP processing and synaptic function [J]. *Neuron*, 2003, 37(6): 925–937.
- [120] REINHARD C, HÉBERT S S, DE STROOPER B. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function [J]. *EMBO J*, 2005, 24(23): 3996–4006.
- [121] SCHEPER W, HOOZEMANS J J. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(3): 315–331.
- [122] NATHANAEL M, SOPHIE L, BLAIR NORMAN P, et al. Retinal vascular physiology biomarkers in a 5 × FAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2413.
- [123] HABIBA U, MERLIN S, LIM J K H, et al. Age-specific retinal and cerebral immunodetection of amyloid-β plaques and oligomers in a rodent model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 76(3): 1135–1150.
- [124] SILVERMAN J M, GIBBS E, PENG X, et al. A rational structured epitope defines a distinct subclass of toxic amyloid-beta oligomers [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(7): 1591–1606.
- [125] SHIMAZAWA M, INOKUCHI Y, OKUNO T, et al. Reduced retinal function in amyloid precursor protein-over-expressing transgenic mice via attenuating glutamate-N-methyl-D-aspartate receptor signaling [J]. *J Neurochem*, 2008, 107(1): 279–290.
- [126] ZENG Y, ZHANG J, ZHU Y, et al. Triphenylborate improves cognitive deficits by reducing amyloid β and upregulating synapse-related proteins in a transgenic model of Alzheimer's Disease [J]. *J Neurochem*, 2015, 133(1): 38–52.
- [127] LIU Q, XI Y, WANG Q, et al. Mannan oligosaccharide attenuates cognitive and behavioral disorders in the 5 × FAD Alzheimer's disease mouse model via regulating the gut microbiota-brain axis [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 95: 330–343.