

石玉姣,杨晨光,乔文博,等. 复合因素诱导射血分数保留心力衰竭大鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 275-285.

SHI Y J, YANG C G, QIAO W B, et al. Establishment and evaluation of a rat model of heart failure with a preserved ejection fraction induced by combined factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 275-285.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.001

复合因素诱导射血分数保留心力衰竭大鼠模型的建立及评价

石玉姣¹, 杨晨光¹, 乔文博¹, 刘永成¹, 刘思雨¹, 董国菊^{1,2*}

(1. 中国中医科学院西苑医院心血管内科, 北京 100091; 2. 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091)

【摘要】 目的 通过复合因素建立射血分数保留心力衰竭(HFpEF)大鼠模型, 评估其特征, 并探讨心肌应变参数与心肌肥厚及纤维化的相关性。**方法** 8只WKY大鼠和8只自发性高血压大鼠(SHR)作为对照组, 给予普通饲料至实验结束。32只SHR大鼠平均分SHR+S组、SHR+F组、SHR+SF组及SHR+复合组, 分别给予高盐饲料、高脂饲料、高盐-脂饲料、高盐-脂-糖饲料联合腹腔注射链脲霉素30周。造模结束后, 测量心重/体重(HW/BW)、收缩压(SBP)及舒张压(DBP); 行超声心动图测量左心室(LV)舒张末内径(LVIDd)、LV前壁厚度(LVAWd)、LV后壁厚度(LVPWd)、LV射血分数(LVEF)、等容舒张时间(IVRT)、LV舒张早期二尖瓣流入峰值速度(E)/二尖瓣环运动速度(e'); 斑点追踪超声心动图测量全纵向应变(GLS)及应变率(GLSr)、全径向应变(GRS)及应变率(GRSr)、全周向应变(GCS)及应变率(GCSr); 血清学检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、葡萄糖(GLU)及糖化血清蛋白(GSP), ELISA法检测血清B型利钠肽(BNP)、血管紧张素II(Ang II)及半乳糖凝集素3(Gal-3); 心肌进行苏木精-伊红(HE)及Masson染色观察心肌细胞及纤维化, 并计算心肌细胞横截面面积(CSA)及胶原体积分数(CVF); 此外, 分析心肌应变参数和CSA及CVF的相关性。**结果** 与对照组比较, 各模型组, 尤其是SHR+复合组的HW/BW、SBP、DBP、血清指标(TC、TG、LDL-C、GLU、GSP、BNP、Ang II及Gal-3)和超声心动图参数(LVIDd、LVAWd、LVPWd、IVRT及E/e')显著升高; 斑点追踪超声心动图参数GLS、GLSr、GRS、GRSr、GCS及GCSr的绝对值显著下降; 心肌组织HE及Masson染色提示明显心肌细胞肥大及纤维化, 并且CSA及CVF显著增加($P < 0.05$)。相关性分析显示, GLSr、GCS及GCSr与CSA密切相关; GLS、GLSr和GCSr与CVF密切相关($P < 0.01$)。**结论** 本研究模拟高血压及糖脂代谢紊乱诱导的HFpEF大鼠模型在病因、临床表现及心肌病理改变上复刻了HFpEF的基本特征, 可能是代谢综合征相关HFpEF的可靠动物模型。此外, 心肌应变参数与心肌肥厚及纤维化密切相关, 可能间接反应心肌细微病变和功能障碍。

【关键词】 射血分数保留心力衰竭; 大鼠; 心肌应变; 心肌肥厚; 心肌纤维化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)03-0275-11

Establishment and evaluation of a rat model of heart failure with a preserved ejection fraction induced by combined factors

SHI Yujiao¹, YANG Chenguang¹, QIAO Wenbo¹, LIU Yongcheng¹, LIU Siyu¹, DONG Guojun^{1,2*}

(1. Department of Cardiovascular Internal Medicine, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China; 2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China)

Corresponding author: DONG Guojun. E-mail: 13691393589@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82074423), 中国中医科学院科技创新重大攻关项目(CI2021A00903)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82074423), the Major Innovation Project of the China Academy of Traditional Chinese Medicine(CI2021A00903)。

【作者简介】 石玉姣, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合心血管疾病基础与临床相关研究。

Email: shiyujiaojiao123@126.com

【通信作者】 董国菊, 女, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合心血管疾病基础与临床相关研究。

Email: 13691393589@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the characteristics of a rat model of heart failure with a preserved ejection fraction (HFpEF) induced by combined factors, and to investigate the correlation of myocardial strain parameters to myocardial hypertrophy and fibrosis. **Methods** Eight WKY rats and eight spontaneously hypertensive rats (SHR) served as control groups and were fed normal feed until the end of the experiment. Thirty-two SHR rats were equally divided into SHR + S, SHR + F, SHR + SF, and SHR + Combined groups, and fed high-salt, high-fat, high-salt-fat, or high-salt-fat-sugar feed, respectively, in combination with intraperitoneal injection of streptozotocin for 30 weeks. After modeling, the heart weight/body weight (HW/BW) ratio, systolic blood pressure (SBP), and diastolic blood pressure (DBP) were measured. Echocardiography was performed to measure the left ventricular (LV) end-diastolic internal diameter (LVIDd), LV anterior wall thickness (LVAWd), LV posterior wall thickness (LVPWd), LV ejection fraction (LVEF), isovolumetric diastolic time (IVRT), and peak early diastolic passive filling velocity (E)/early diastolic mitral annular velocity (e'). Speckle tracking echocardiography was conducted to determine the global longitudinal strain (GLS) and strain rate (GLSr), global radial strain (GRS) and strain rate (GRSr), as well as the global circumferential strain (GCS) and strain rate (GCSr). Serum was collected and analyzed for triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), glucose (GLU), and glycated serum protein (GSP). ELISA were used to measure serum B-type brain natriuretic peptide (BNP), angiotensin II (Ang II), and galectin-3 (Gal-3). Myocardial tissue was subjected to HE and Masson staining for cardiomyocytes and myocardial fibrosis, and the cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) and collagen volume fraction (CVF) were calculated. Additionally, the correlation of myocardial strain parameters to CSA and CVF was analyzed. **Results** Compared with the control group, in model groups, especially the SHR + combined group, HW/BW, SBP, DBP, serum indexes (TC, TG, LDL-C, GLU, GSP, BNP, Ang II, and Gal-3) and echocardiographic parameters (LVIDd, LVAWd, LVPWd, IVRT, and E/e') were significantly up-regulated. Absolute values of speckle-tracking echocardiographic parameters (GLS, GLSr, GRS, GRSr, GCS, and GCSr) were decreased considerably. HE and Masson staining of myocardial tissues suggested marked cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis, and significant increases were observed in CSA and CVF ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that GLSr, GCS, and GCSr were strongly linked to CSA, and GLS, GLSr, and GCSr were strongly linked to CVF ($P < 0.01$). **Conclusions** A rat model of HFpEF induced by hypertension and dysregulation of glucolipid metabolism replicated the basic characteristics of HFpEF in terms of etiology, clinical features, and myocardial pathological changes, and might be a reliable animal model of metabolic syndrome-related HFpEF. Moreover, myocardial strain indices were closely related to myocardial hypertrophy and fibrosis and might indirectly reflect subtle myocardial lesions and dysfunction.

【Keywords】 heart failure with preserved ejection fraction; rat; myocardial strain; myocardial hypertrophy; myocardial fibrosis

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

心力衰竭(heart failure, HF)是多种心血管疾病的终末期表现。射血分数保留心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)约占 HF 人群的 50%,其发病率和死亡率随着人口老龄化及高血压、糖尿病、高血脂症等合并病的流行而逐年增加^[1-2]。HFpEF 是一种复杂的异质性综合征,与多种诱因相关,具有不同的表型表现(左心室(left ventricle, LV)舒张功能障碍、右心功能障碍、心房颤动、肺动脉高压、血管硬化、内皮功能障碍和骨骼肌无力等),并且涉及多种分子机制(心脏肥大、纤维化、炎症、氧化应激、线粒体和代谢缺陷等)^[3-4]。这种复杂性和异质性限制了临床前模型的开发,阻碍了对疾病机制的探索,并且给新药开发带来了挑战。因此,当务之急是建立一个可靠的

HFpEF 动物模型,以获得对潜在病理生理机制的新认识,并促进有效治疗策略的开发。

目前,还没有完善的 HFpEF 临床前模型。尽管基于单一危险因素诱导的 HFpEF 动物模型已经取得了一定的进展,但 HFpEF 与多种因素相关,因此不存在“一刀切”的动物模型^[5]。代谢综合征(metabolic syndrome, MetS)是 HFpEF 的一个主要合并症,在 HFpEF 患者中的发生率为 85%^[6]。因此,有必要建立一个复合 MetS 的 HFpEF 动物模型,并探索其病理生理学改变。斑点追踪超声心动图(speckle tracking echocardiography, STE)是一种可反应心肌细微变化的高度敏感技术。研究表明,左心室心肌应变和应变率间接反应压力超负荷诱导的心肌重塑及糖尿病心肌病大鼠早期心肌纤维

化^[7-8]。然而,关于 STE 是否可协助判断 HFpEF 心肌的细微变化,尚缺乏证据。因此,本研究旨在利用复合因素建立 MetS 相关的 HFpEF 大鼠模型,评价其心脏结构和功能改变及心肌病理变化;并且探索 STE 参数与心肌细胞肥厚和纤维化的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 SPF 级,4 周龄,180 ~ 200 g,雄性自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和 8 只 SPF 级,4 周龄,180 ~ 200 g,雄性 Wistar Kyoto (WKY)大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养环境:22 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 70%,12 h 光照和黑暗循环,自由饮食水,饲养于中国中医科学院西苑医院动物实验中心【SYXK(京)2018-0018】。本实验获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会的批准(2021 XLC008-3)。

1.1.2 主要试剂与仪器

链脲霉素(streptozotocin, STZ, 德国 Merck Millipore 公司,批号 S0130);甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、葡萄糖(glucose, GLU)、糖化血清蛋白(glycated serum protein, GSP)试剂盒(上海罗氏诊断有限公司,批号分别为 625307、643365、590644、613975、618474);血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)试剂盒(北京欣博盛生物科技有限公司,批号 20220209BX);B 型利钠肽(B-type brain natriuretic peptide, BNP)及半乳糖凝集素 3(galectin-3, Gal-3)试剂盒(北京华英生物技术研究,批号分别为 20220217、20221118)。Vevo 3100 型高分辨率小动物彩色超声多普勒成像系统和超声数据分析 Vevo LAB 软件(德国 Fujifilm VisualSonics 公司);ROCHE/E601 型全自动生化检测仪(瑞士罗氏仪器有限公司);A6 型全自动生化检测仪(北京松上技术有限公司);BX53 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 株式会社);Digital Camera 6.0 Viewer 型图像处理系统(北京睿智奥恒视觉科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

40 只 SHR 大鼠被平均分为 SHR 组、SHR + 高

盐(SHR + S)组、SHR + 高脂(SHR + F)组、SHR + 高盐脂(SHR + SF)组、SHR + 复合组,每组 8 只。WKY 组及 SHR 组作为对照组。所有大鼠适应性饲养 4 周后开始实验。

1.2.2 HFpEF 模型建立及取材

WKY 组和 SHR 组给予普通饲料至实验结束。SHR + S 组、SHR + F 组及 SHR + SF 组分别给予高盐饲料(4%氯化钠 + 96%普通饲料)^[9]、高脂饲料(10%猪油 + 5%蛋黄粉 + 1%胆固醇 + 0.2%丙基硫氧嘧啶 + 83.8%普通饲料)^[10]、高盐-脂饲料(4%氯化钠 + 10%猪油 + 5%蛋黄粉 + 1%胆固醇 + 0.2%丙基硫氧嘧啶 + 79.8%普通饲料)饲养 30 周。SHR + 复合组根据课题组建立复合 MetS 的 HFpEF 大鼠模型方式^[11-13],给予高脂-盐-糖饲料(包括 4%氯化钠 + 10%猪油 + 5%蛋黄粉 + 1%胆固醇 + 0.2%丙基硫氧嘧啶 + 20%蔗糖 + 59.8%普通饲料)饲养 30 周,并且在高脂-盐-糖饲料喂养 16 周后,腹腔注射新鲜制备的 STZ 溶液 8 周(25 mg/kg,每周 1 次)。所有饲料购自北京科奥协力饲料有限公司。造模结束后,所有大鼠禁食 24 h,清醒状态下测量血压及体重(body weight, BW);在麻醉状态下(吸入 2% ~ 2.5%异氟烷)进行超声心动图检查,收集血液样本;留取心脏组织,测量心脏重量(heart weight, HW),并计算心脏的脏器系数(HW/BW)。

1.2.3 血压测量

将动物置于测量笼内,采用尾套血压系统测量收缩压(systolic blood pressure, SBP)及舒张压(diastolic blood pressure, DBP)。每个时间点测量 3 次,计算平均值。

1.2.4 常规超声心动图检查

在乳头肌水平获得 LV 短轴 M 型超声图像,测量 LV 舒张末内径(LV end-diastolic internal diameter, LVIDd)、LV 前壁厚度(LV end-diastolic anterior wall thickness, LVAWd)、LV 后壁厚度(LV end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)及 LV 射血分数(LV ejection fraction, LVEF)。在短轴切面,将动物头部向下倾斜旋转,同时倾斜探头角度,获得心尖四腔心、脉冲多普勒及组织多普勒超声图像,测量等容舒张时间(isovolumic relaxation time, IVRT)、LV 舒张早期二尖瓣流入峰值速度(E)及二尖瓣环运动速度(e'),并计算 E/e'。所有数据由不知道实验分组的超声医生测量,取连续 3 个心动周期的平均值。

1.2.5 斑点追踪超声心动图检查

将存储的超声图像导入 EchoPAC 超声工作站后进行脱机分析。至少采集 3 次 LV 长轴和短轴视图,用于斑点追踪分析。使用长轴视图测量全纵向应变(global longitudinal strain, GLS)和应变率(GLS rate, GLSr);使用短轴视图测量全径向应变(global radial strain, GRS)和应变率(GRS rate, GRSr)、全周向应变(global circumferential strain, GCS)和应变率(GCS rate, GCSr)。在手动勾画心内膜边界后,软件自动将感兴趣的区域分成 6 个部分,并相应地计算应变和应变率值。所有数据均由不知道实验分组的超声医生测量,结果取连续 3 个心动周期的平均值。

1.2.6 血清学检测

从腹主动脉采集血样,离心后获得血清,储存在-80 ℃冰箱中。用酶比色法检测血清 TC、LDL-C,用比色法测定血清 TG,用己糖激酶终点法检测血清 GLU,用硝基四氮唑蓝法测定血清 GSP。根据使用说明书,使用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked sandwich immunoassay, ELISA)测量血清 BNP、Ang II 和 Gal-3 浓度。

1.2.7 组织学检测

心脏组织取出后,生理盐水清洗,10%中性甲醛溶液在室温下固定 24 h,经过一系列的乙醇脱水,用石蜡包埋,使用显微切片机切成 5 μm 的切片。病理切片进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin

stain, HE)染色和马松(Masson)染色,并用扫描仪扫描获取数字图像。HE 染色观察心肌细胞,并测量心肌细胞横截面面积(cardiomyocyte cross-sectional area, CSA),取每个切片 3 个独立视野 60 个心肌细胞的平均值。Masson 染色后心肌组织呈红色,原纤维呈蓝色,用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF),取 LV 每个切面前壁、后壁、侧壁和室间隔 4 个独立视野的平均值。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。所有数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,事后多重比较使用最小显著差异法。使用 Pearson 相关分析心肌应变参数与 CSA 及 CVF 的相关性,相关系数(r)正值代表正相关,负值代表负相关, r 绝对值大于 0.5 表明变量间存在强相关。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 模型大鼠的心重/体重和血压情况

与 WKY 组比较,所有模型组的 HW/BW、SBP 及 DBP 显著升高($P < 0.01$);与 SHR 组比较,SHR + F 组及 SHR + SF 组的 HW/BW 仍显著升高($P < 0.01$),SHR + 复合组的 HW/BW 及 SBP 仍然显著升高($P < 0.05$);并且 SHR + 复合组的各项指标上升趋势高于其他模型组,表明 SHR + 复合组心脏质量指数及血压明显升高。见表 1。

表 1 模型大鼠的心重/体重及血压情况($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 HW/BW and blood pressure in model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	心重/体重 HW/BW	收缩压/mmHg SBP/mmHg	舒张压/mmHg SDP/mmHg
WKY 组 WKY group	3.09 ± 0.29	125.63 ± 11.02	79.00 ± 10.62
SHR 组 SHR group	3.32 ± 0.23	199.88 ± 16.16	144.25 ± 27.67
SHR + S 组 SHR + S group	3.64 ± 0.29 ^{▲▲}	204.38 ± 6.76 ^{▲▲}	153.75 ± 24.97 ^{▲▲}
SHR + F 组 SHR + F group	3.85 ± 0.62 ^{▲▲**}	208.13 ± 14.58 ^{▲▲}	155.63 ± 10.76 ^{▲▲}
SHR + SF 组 SHR + SF group	3.91 ± 0.07 ^{▲▲**}	212.50 ± 14.61 ^{▲▲}	157.25 ± 22.80 ^{▲▲}
SHR + 复合组 SHR + Combined group	4.35 ± 0.56 ^{▲▲**}	219.88 ± 27.40 ^{▲▲*}	163.25 ± 25.14 ^{▲▲}

注:与 WKY 组相比,▲▲ $P < 0.01$;与 SHR 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with WKY group, ▲▲ $P < 0.01$. Compared with SHR group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.2 模型大鼠的糖脂代谢情况

与 WKY 组及 SHR 组比较,SHR + F 组的 TC、TG 及 LDL-C 显著升高($P < 0.01$);SHR + SF 组及 SHR + 复合组的 TC、TG、LDL-C、GLU 及 GSP 显著

升高($P < 0.05$),并且 SHR + 复合组的各项指标上升趋势高于其他模型组。因此,SHR + 复合组表现出明显的高脂血症特征及血糖代谢紊乱。见表 2。

表 2 模型大鼠糖脂代谢情况($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Glycolipid metabolism in model rats($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	甘油三酯/(mmol/L) TC/(mmol/L)	总胆固醇/(mmol/L) TG/(mmol/L)	低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL-C/(mmol/L)	葡萄糖/(mmol/L) GLU/(mmol/L)	糖化血清蛋白/(μ mol/L) GSP/(μ mol/L)
WKY 组 WKY group	0.89 $\pm$ 0.16	0.27 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.08	3.30 $\pm$ 0.60	157.55 $\pm$ 13.45
SHR 组 SHR group	0.89 $\pm$ 0.17	0.34 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.07	4.22 $\pm$ 0.58	163.91 $\pm$ 10.56
SHR + S 组 SHR + S group	0.92 $\pm$ 0.29	0.35 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.11	4.44 $\pm$ 0.81	164.67 $\pm$ 9.22
SHR + F 组 SHR + F group	2.57 $\pm$ 0.27 ^{▲▲**}	1.21 $\pm$ 0.19 ^{▲▲**}	0.81 $\pm$ 0.25 ^{▲▲**}	4.49 $\pm$ 1.26	183.31 $\pm$ 55.89
SHR + SF 组 SHR + SF group	2.11 $\pm$ 0.29 ^{▲▲**}	1.06 $\pm$ 0.26 ^{▲▲**}	1.05 $\pm$ 0.24 ^{▲▲**}	5.74 $\pm$ 2.17 ^{▲▲**}	186.11 $\pm$ 18.71 [▲]
SHR + 复合组 SHR + Combined group	2.83 $\pm$ 0.78 ^{▲▲**}	1.38 $\pm$ 0.25 ^{▲▲**}	1.18 $\pm$ 0.34 ^{▲▲**}	8.37 $\pm$ 1.23 ^{▲▲**}	377.15 $\pm$ 6.61 ^{▲▲**}

注:与 WKY 组相比,▲ $P < 0.05$ 。(下图/表同)

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

2.3 模型大鼠的心脏结构和功能

与 WKY 组比,SHR + S 组的 LVAWd、LVPWd 及 IVRT 显著升高($P < 0.01$),SHR + F 组及 SHR + SF 组的 LVAWd、LVPWd、IVRT 及 E/e' 显著升高($P < 0.05$)。与 WKY 组及 SHR 组比较,SHR + 复合组的 LVIDd、LVAWd、LVPWd、IVRT 及 E/e' 显著升高

($P < 0.05$),并且各项指标上升趋势高于其他模型组。此外,各模型组的 LVEF 值与 WKY 组及 SHR 组比较,无统计学意义。结果表明,各模型组大鼠射血分数保留,但存在不同程度的 LV 重构及舒张功能障碍,并且 SHR + 复合组表现出更加明显的 LV 室壁肥厚、舒张末内径增加及舒张功能障碍。见图 1,表 3。

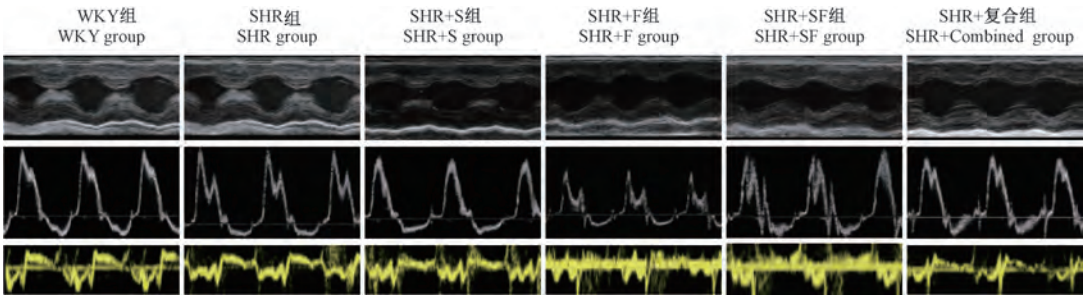


图 1 模型大鼠的心脏结构和功能

Figure 1 Cardiac structure and function in model rats

表 3 模型大鼠的心脏结构和功能($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Cardiac structure and function in model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	左心室舒张末内径/mm LVIDd/mm	左心室前壁厚度/mm LVAWd/mm	左心室后壁厚度/mm LVPWd/mm	左心室射血分数/% LVEF/%	等容舒张时间/ms IVRT/ms	E/e'
WKY 组 WKY group	6.58 $\pm$ 0.54	1.72 $\pm$ 0.17	1.71 $\pm$ 0.11	76.72 $\pm$ 4.40	23.35 $\pm$ 4.73	18.62 $\pm$ 4.90
SHR 组 SHR group	6.85 $\pm$ 0.34	1.96 $\pm$ 0.08	1.95 $\pm$ 0.10	78.86 $\pm$ 3.44	36.19 $\pm$ 3.96	20.73 $\pm$ 3.16
SHR + S 组 SHR + S group	6.84 $\pm$ 0.45	2.03 $\pm$ 0.21 ^{▲▲}	2.06 $\pm$ 0.26 ^{▲▲}	76.90 $\pm$ 9.80	37.38 $\pm$ 4.78 ^{▲▲}	20.30 $\pm$ 4.02
SHR + F 组 SHR + F group	6.88 $\pm$ 0.36	1.91 $\pm$ 0.15 [▲]	1.96 $\pm$ 0.19 ^{▲▲}	74.85 $\pm$ 8.36	38.49 $\pm$ 5.77 ^{▲▲}	23.68 $\pm$ 5.70 [▲]
SHR + SF 组 SHR + SF group	6.87 $\pm$ 0.29	1.96 $\pm$ 0.14 ^{▲▲}	1.94 $\pm$ 0.11 ^{▲▲}	75.35 $\pm$ 8.06	39.27 $\pm$ 3.50 ^{▲▲}	23.86 $\pm$ 4.65 [▲]
SHR + 复合组 SHR + Combined group	7.17 $\pm$ 0.44 ^{▲▲}	2.14 $\pm$ 0.07 ^{▲▲*}	2.20 $\pm$ 0.12 ^{▲▲**}	77.79 $\pm$ 5.49	43.91 $\pm$ 3.48 ^{▲▲**}	31.93 $\pm$ 2.86 ^{▲▲**}

2.4 模型大鼠的心肌应变

与 WKY 组比较,所有模型组的 GLS、GLSr、GRS、GRSr、GCS 及 GCSr 的绝对值显著下降($P < 0.05$)。与 SHR 组比较,SHR + S 组的 GCS 及 GCSr 的绝对值显著下降($P < 0.01$);SHR + F 组的 GRSr、GCS 及 GCSr 绝对值显著下降($P < 0.01$);SHR + SF 组的 GLS、GRSr、GCS 及 GCSr 绝

对值显著下降($P < 0.01$ 或 0.05);SHR + 复合组的 GLS、GLSr、GRSr、GCS 及 GCSr 的绝对值显著下降($P < 0.01$),并且下降趋势大于其他模型组。研究结果表明,各模型组大鼠存在 LV 心肌应变减退,并且 SHR + 复合组表现出更加明显的 LV 全纵向应变、径向应变及周向应变和应变率减退。见图 2,表 4。

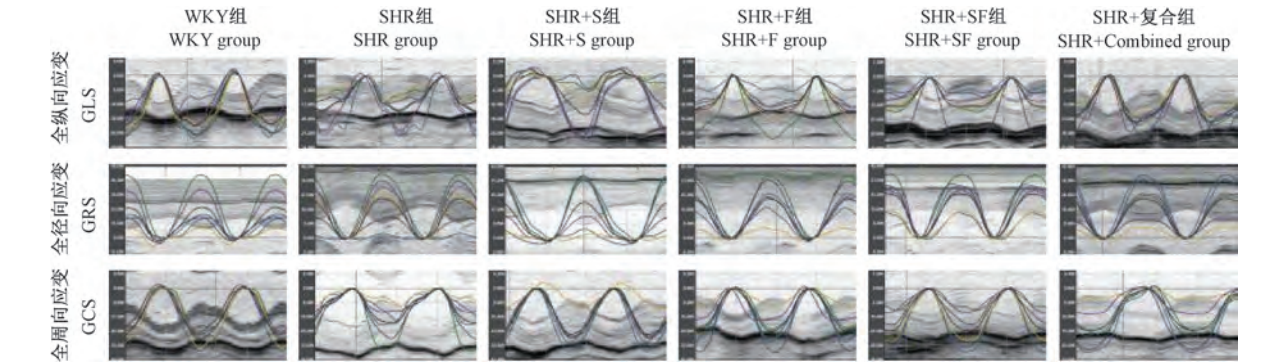


图 2 模型大鼠的心肌应变

Figure 2 Myocardial strain in model rats

表 4 模型大鼠的心肌应变($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Myocardial strain in model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	全纵向 应变/% GLS/%	全纵向 应变率/(1/s) GLSr/(1/s)	全径向 应变/% GRS/%	全径向 应变率/(1/s) GRSr/(1/s)	全周向 应变/% GCS/%	全周向 应变率/(1/s) GCSr/(1/s)
WKY 组 WKY group	-22.59 ± 4.31	-7.73 ± 2.25	28.44 ± 3.79	4.57 ± 0.60	-35.06 ± 2.92	-8.77 ± -1.31
SHR 组 SHR group	-19.74 ± 2.40	-6.44 ± 1.82	24.05 ± 5.84	4.10 ± 1.33	-28.54 ± 3.41	-6.70 ± 1.13
SHR + S 组 SHR + S group	-16.82 ± 3.16 ^{▲▲}	-5.09 ± 1.67 ^{▲▲}	23.81 ± 4.52 [▲]	3.80 ± 0.43 [▲]	-24.62 ± 1.70 ^{▲▲**}	-4.99 ± 0.56 ^{▲▲**}
SHR + F 组 SHR + F group	-16.99 ± 2.62 ^{▲▲}	-4.92 ± 1.16 ^{▲▲}	23.28 ± 3.60 [▲]	3.31 ± 0.35 ^{▲▲*}	-23.99 ± 2.66 ^{▲▲**}	-4.62 ± 0.81 ^{▲▲**}
SHR + SF 组 SHR + SF group	-14.17 ± 2.43 ^{▲▲**}	-4.70 ± 1.53 ^{▲▲}	22.17 ± 3.47 ^{▲▲}	3.27 ± 0.78 ^{▲▲*}	-22.72 ± 2.72 ^{▲▲**}	-4.25 ± 0.73 ^{▲▲**}
SHR + 复合组 SHR + Combined group	-12.58 ± 3.13 ^{▲▲**}	-3.32 ± 2.40 ^{▲▲**}	21.97 ± 2.98 ^{▲▲}	2.60 ± 0.40 ^{▲▲**}	-19.23 ± 2.55 ^{▲▲**}	-3.17 ± 0.51 ^{▲▲**}

2.5 模型大鼠的血清 BNP、Ang II 和 Gal-3 水平

与 WKY 组比较,所有模型组的 BNP、Ang II 及 Gal-3 显著升高($P < 0.05$)。与 SHR 组比较,SHR + F 组的 Gal-3 显著升高($P < 0.01$);SHR + SF 组及 SHR + 复合组的 Ang II、BNP 及 Gal-3 显著升高($P < 0.05$),并且 SHR + 复合组上升趋势高于其他模型组。研究结果间接表明,各模型组存在心肌肥厚及纤维化,但 SHR + 复合组的心肌病理改变程度可能更严重。见表 5。

2.6 模型大鼠的心肌肥厚及纤维化

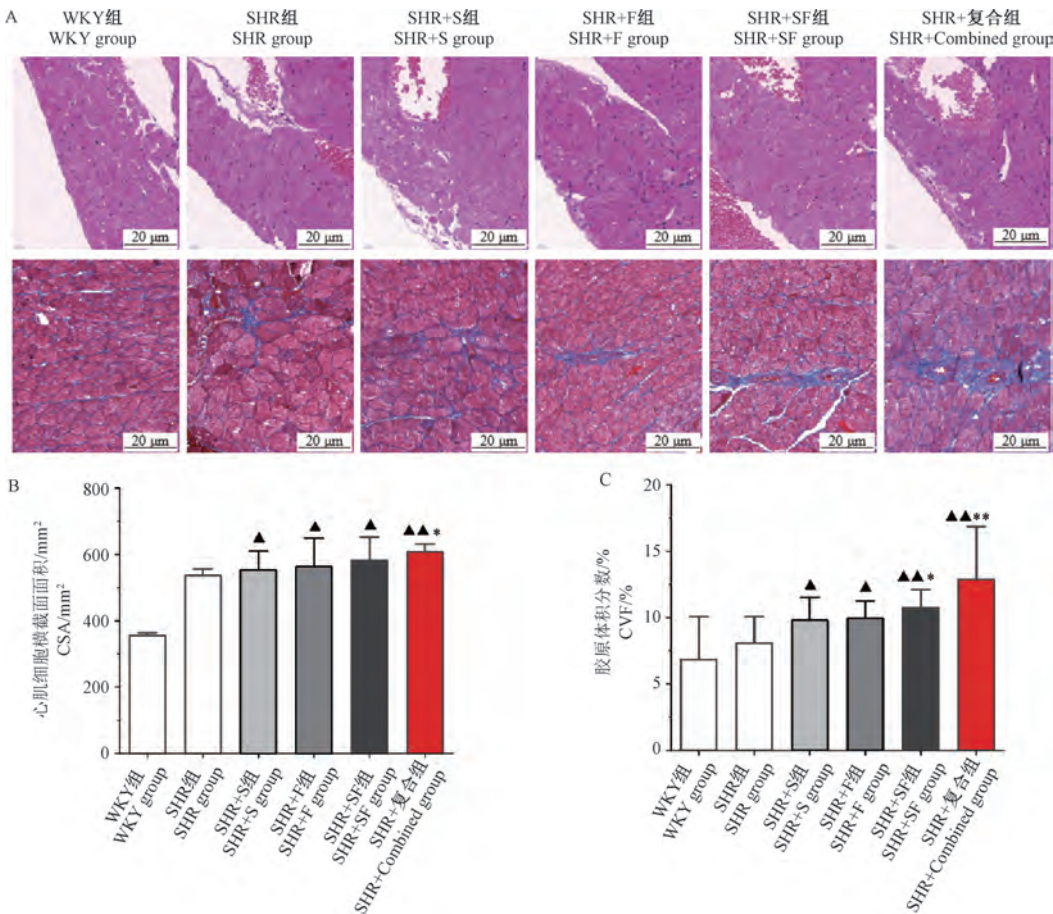
与 WKY 及 SHR 组比较,HE 染色显示,模型各

组心肌细胞增大及排列紊乱,并且存在炎细胞浸润;Masson 染色显示,模型各组心肌间隙增宽,胶原纤维沉积明显增加;SHR + 复合组比其余模型组的病理改变更加明显。量化分析显示,与 WKY 组比较,所有模型组的 CSA 及 CVF 均显著增加($P < 0.05$)。与 SHR 组比较,SHR + SF 组的 CVF 明显增加($P < 0.05$);SHR + 复合组的 CSA 及 CVF 明显增加($P < 0.05$),并且上升趋势高于其他模型组。研究结果表明,各模型组存在心肌细胞增大及心肌纤维化,并且 SHR + 复合组的程度更加明显。见图 3。

表 5 模型大鼠的血清 BNP、Ang II 和 Gal-3 水平($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 5 Serum BNP, Ang II and Gal-3 levels in model rats($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	BNP/(ng/L)	Ang II/(ng/L)	Gal-3/(μg/L)
WKY 组 WKY group	11.59 ± 0.79	68.30 ± 13.48	6.29 ± 0.15
SHR 组 SHR group	15.22 ± 2.29	128.47 ± 14.30	9.70 ± 1.11
SHR + S 组 SHR + S group	16.45 ± 0.65 ^{▲▲}	136.64 ± 4.84 ^{▲▲}	10.45 ± 1.31
SHR + F 组 SHR + F group	15.72 ± 1.19 ^{▲▲}	128.72 ± 13.05 ^{▲▲}	10.91 ± 2.27 ^{▲▲**}
SHR + SF 组 SHR + SF group	17.08 ± 1.39 ^{▲▲*}	154.55 ± 4.81 ^{▲▲**}	12.48 ± 0.84 ^{▲▲**}
SHR + 复合组 SHR + Combined group	18.04 ± 2.04 ^{▲▲**}	169.29 ± 8.24 ^{▲▲**}	19.89 ± 2.66 ^{▲▲**}



注:A:心肌 HE 染色及 Masson 染色;B:心肌细胞横截面面积;C:心肌胶原体积分数。

图 3 模型大鼠的心肌肥厚及纤维化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A. HE staining and Masson staining of myocardium. B. Myocardial CSA. C. Myocardial CVF.

Figure 3 Myocardial hypertrophy and fibrosis in model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.7 心肌应变参数与 CSA 及 CVF 相关性

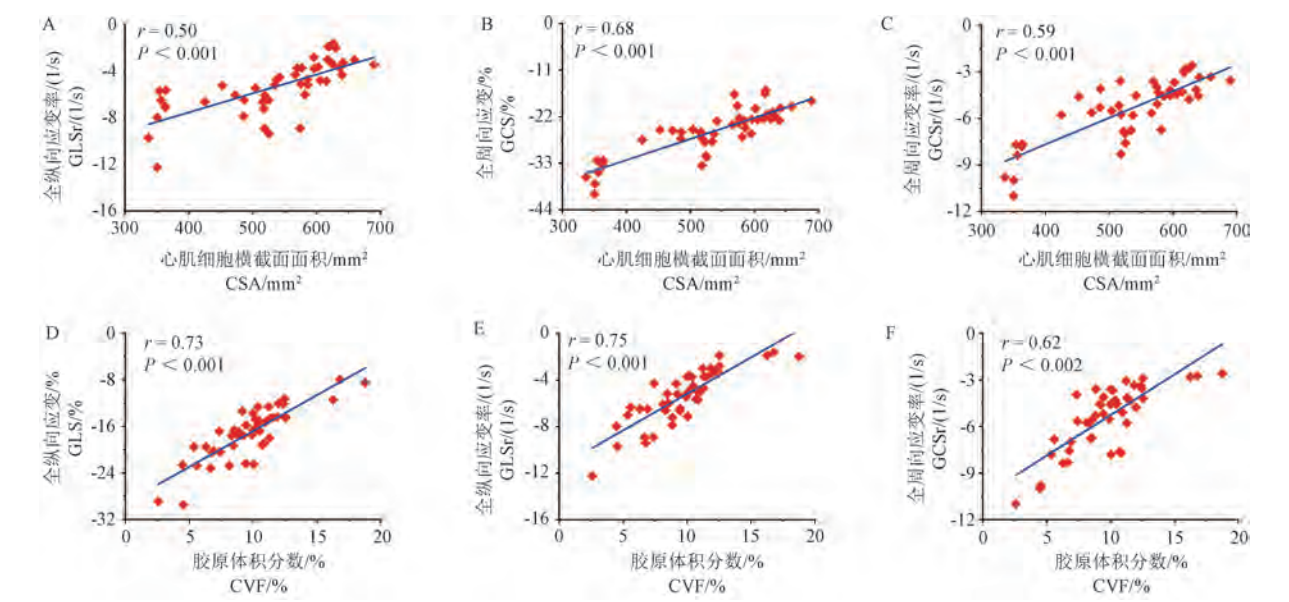
在未调整造模方式前, GLS、GLSr、GRSr、GCS 及 GCSr 均与 CSA 及 CVF 密切相关($P < 0.01$)。在调整造模方式之后, GLSr、GCS 及 GCSr 仍然与 CSA 密

切相关($P < 0.01$); GLS、GLSr 和 GCSr 与 CVF 密切相关, 尤其是 GLS 与 GLSr($P < 0.01$), 见表 6, 图 4。研究结果表明, 心肌应变参数可能间接反应心肌肥厚或纤维化。

表 6 心肌应变参数与 CSA 及 CVF 相关性

Table 6 Correlation of myocardial strain parameters with CSA and CVF

参数 Index	心肌细胞横截面积 CSA				胶原体积分数 CVF			
	未调整变量 Unadjusted variables		变量调整后 Adjusted variables		未调整变量 Unadjusted variables		调整变量后 Adjusted variables	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
全纵向应变 GLS	0.75	< 0.001	0.47	0.001	0.84	< 0.001	0.73	< 0.001
全纵向应变率 GLSr	0.71	< 0.001	0.50	< 0.001	0.85	< 0.001	0.75	< 0.001
全径向应变 GRS	-0.44	0.002	-0.22	0.133	-0.47	0.001	-0.29	0.051
全径向应变率 GRSr	-0.62	< 0.001	-0.27	0.072	-0.67	< 0.001	-0.44	0.002
全周向应变 GCS	-0.86	< 0.001	0.68	< 0.001	0.68	< 0.001	0.36	0.120
全周向应变率 GCSr	-0.82	< 0.001	0.59	< 0.001	0.78	< 0.001	0.62	< 0.001



注: A ~ C:全纵向应变率、全周向应变、全周向应变率与心肌细胞横截面积的相关性拟合线;D ~ F:全纵向应变、全纵向应变率、全周向应变率与心肌胶原体积分数的相关性拟合线。

图 4 GLS、GCS 及 GCSr 与 CSA 相关性和 GLS、GLSr 及 GCSr 与 CVF 相关性

Note. A ~ C. Fitted lines of correlation between GLSr, GCS, and GCSr with CSA. D ~ F. Fitted lines of correlation between GLS, GLSr, and GCSr with CVF.

Figure 4 Correlation of GLS, GCS, and GCSr with CSA and correlation of GLS, GLSr, and GCSr with CVF

3 讨论

HFpEF 与多种合并症相关,具有复杂的临床表现,并且存在多种病理生理学改变。因此,一个理想的临床前模型应该准确地复刻 HFpEF 患者的发病、临床表现和病理生理学特征。在过去十年中,高龄、高血压和糖脂紊乱等单因素诱导的 HFpEF 临床前模型已在基础研究中广泛运用。MARZAK 等^[14]

和 DANIAL 等^[15]通过以普通饲料饲养 SHR 大鼠 28 周和 36 周,分别建立了衰老或高血压相关 HFpEF 大鼠模型。ZHANG 等^[16]证实 Dahl 盐敏感大鼠在维持高盐饮食 7 周后出现了 HFpEF 相关心脏结构和功能异常。WU 等^[17]发现高脂饮食联合腹腔注射低剂量 STZ 可诱导糖尿病相关的 HFpEF 小鼠模型。但是单个危险因素不能准确模拟 HFpEF 的多合并症诱发的特征。MetS 是高血压、糖尿病和高脂

血症等多种代谢危险因素的组合,是 HFpEF 患者的一个主要合并症,与患者不良预后密切相关^[18]。因此,课题组基于上述单因素造模方法,以 SHR 大鼠为造模动物,给予高盐-脂-糖饮食联合腹腔注射 STZ 溶液建立 MetS 相关 HFpEF 大鼠模型,并发现其表现出明显的高血压及糖脂代谢紊乱,在病因层面复刻 HFpEF 多种合并症诱发的特点。

HFpEF 的主要病理变化为 LV 重构和舒张功能障碍^[19]。LV 舒张功能障碍通常表现为等容松弛时间延长及 LV 充盈压升高,即常规超声心动图参数 IVRT 和 E/e' 升高^[20]。本研究发现,SHR + 复合组表现出明显的 LV 增厚、内径增加及舒张功能障碍。此外,越来越多证据表明,在 HFpEF 患者中,尽管 LVEF 正常,但是心肌局部收缩功能已出现异常,即通过斑点追踪技术能够检测到心肌应变受损^[21]。心肌应变体现了心肌局部的变形能力,即心肌长度的变化值占心肌原长度的百分比。应变的正、负值分别表示心肌组织伸长(或增厚)及缩短(或变薄)。应变率则反映局部心肌拉伸或缩短的速度。根据心肌纤维的排列结构和运动方式,LV 心肌应变可分为长轴 GLS、短轴 GRS 及扭转 GCS^[22]。有研究报道,GLS 或 GLSr 异常可能提示 HFpEF 患者的早期亚临床心肌损伤,与 LV 舒张功能障碍、运动耐力下降及不良预后密切相关^[23-25]。本研究发现,SHR + 复合组大鼠的 LV 全纵向、径向及周向应变和应变率均异常。因此,该 MetS 相关的 HFpEF 大鼠模型明显模拟 HFpEF 患者 LV 结构重塑、舒张功能障碍及局部收缩功能障碍的临床特征。

HFpEF 患者心脏病变的病理生理机制复杂,其中,心肌肥大及纤维化是其发生心脏重构和功能障碍的主要原因^[26-27]。病理性心肌肥大是心脏对血流动力学压力升高的一种适应性反应,在 HFpEF 患者中的发生率约为 30% ~ 60%,与患者的全因死亡和 HF 住院独立相关^[28],组织学提示 LV 增厚和心肌细胞横截面积增大^[29]。心肌纤维化在 HFpEF 患者的发生率高达 93%^[30],是 HFpEF 患者心肌被动僵硬、顺应性降低和 LV 舒张功能障碍的主要原因,与 HFpEF 患者不良预后独立相关^[31-33],病理学提示胶原纤维在心肌间质大量沉积^[29]。本研究证实,SHR + 复合组大鼠的心脏脏器系数明显增大,血清肥厚及纤维化标志物显著升高,病理分析提示其心肌细胞增大及心肌间质胶原纤维沉积增加。由此可见,该 MetS 相关的 HFpEF 大鼠模型能明显模拟

HFpEF 患者心肌肥厚及纤维化的病理变化。当前复合因素诱导 HFpEF 模型中,运用 N-硝基精氨酸甲酯联合高脂肪饮食在 C57BL/6 小鼠中开发的 HFpEF 模型,偏向于独特的氧化剂/亚硝化失衡,并且不能模拟高血压、容量/盐负荷及 HFpEF 的其他相关病理生理学特征^[34]。其次,Zucker 糖尿病肥胖大鼠与自发性高血压心力衰竭大鼠杂交的 ZSF-1 大鼠往往直到老年才表现出显著的舒张压升高或利钠肽增加;并且其作为一种基因混合物,每种成分的效力都被稀释^[35]。与以上两种模型相比,本研究中复合因素诱导的 HFpEF 模型模拟了衰老、高血压的遗传易感性、长期糖脂代谢紊乱的多种复杂合并症诱发的特点,并且复刻了临床 HFpEF 心脏重构、舒张功能障碍及心肌肥厚和纤维化的病理变化。

临床上,常规检查无法早期识别 HFpEF 患者心肌局部微观结构和功能变化,只有在病变程度严重情况下,超声心动图才能识别室壁肥厚,心脏核磁才能识别心肌纤维化。与常规检查相比,STE 参数能间接识别心肌局部微观结构和功能变化。ZHANG 等^[36]证实 HFpEF 患者的心肌应变损伤与弥漫性心肌纤维化之间存在显著相关性。KAMMERLANDER 等^[37]证实 HFpEF 患者的 GLS 与细胞外体积分数显著相关。但是,以上研究均是通过心脏核磁间接评估患者心肌纤维化。本次研究发现,尽管在对多种造模方式调整后,GLSr、GCS 及 GCSr 仍然与心肌细胞肥大存在很大相关性;GLS、GLSr 及 GCSr 与心肌纤维化存在显著相关性。表明这些指标可能在 HFpEF 早期间接反应心肌肥大或纤维化。因此可以辅助判断 HFpEF 前期心肌细微病变,判断药物治疗效果,及评估患者的预后情况。

综上所述,本研究建立的 MetS 相关 HFpEF 大鼠模型,模拟了 HFpEF 的多种合并症诱因,复刻了 HFpEF 的 LV 重塑、舒张功能及局部收缩功能障碍的临床特点,体现了 HFpEF 心肌肥厚和纤维化的病理改变,可能是 HFpEF 可靠的临床前动物模型。此外,STE 参数与心肌细胞肥大及纤维化密切相关,可能间接反应心肌细微病变和功能障碍,对研究 HFpEF 患者心脏病变发展进程、危险分层及预后具有重要的指导价值。尽管如此,本研究仍存在以下缺陷:首先,样本量较少,在未来的研究中应该扩大样本量;其次,由于大鼠心率过快,可能影响脉冲及组织多普勒测量的准确性,导致对心脏舒张功能的评价受限,未来研究应该考虑此问题;最后,由于

HFpEF 涉及复杂的病理机制,本研究仅评价模型大鼠的宏观病理变化,尚未对相关分子机制进行探索,未来可能进行临床前或临床样本的多组学研究,以阐释其发病机制,并筛选出高效的生物标志物。

参 考 文 献(References)

[1] HEIDENREICH PA, BOZKURT B, AGUILAR D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American college of cardiology/american heart association joint committee on clinical practice guidelines [J]. Circulation, 2022, 145(18): e895-e1032.

[2] 王兴, 陈子琪, 李林, 等. 真武汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K-AKT 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 27-33, 57.

WANG X, CHEN Z Q, LI L, et al. Effect of Zhenwu decoction on cardiomyocyte apoptosis and the PI3K-AKT pathway in rats with congestive heart failure[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 27-33, 57.

[3] DESAI A S, LAM C S P, MCMURRAY J J V, et al. How to manage heart failure with preserved ejection fraction: practical guidance for clinicians [J]. JACC Heart Fail, 2023, 11(6): 619-636.

[4] ROH J, HILL J A, SINGH A, et al. Heart failure with preserved ejection fraction: heterogeneous syndrome, diverse preclinical models [J]. Circ Res, 2022, 130(12): 1906-1925.

[5] 陈会花, 章忱, 吕嵘. 舒张性心力衰竭实验动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 336-339.

CHEN H H, ZHANG C, LYU R. Advances in research of diastolic heart failure in experimental animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(3): 336-339.

[6] FERRARI R, BöHM M, CLELAND J G, et al. Heart failure with preserved ejection fraction: uncertainties and dilemmas [J]. Eur J Heart Fail, 2015, 17(7): 665-671.

[7] NIU P, LI L, YIN Z, et al. Speckle tracking echocardiography could detect the difference of pressure overload-induced myocardial remodelling between young and adult rats [J]. J R Soc Interface, 2020, 17(163): 20190808.

[8] QI Y, CHEN Z, GUO B, et al. Speckle-tracking echocardiography provides sensitive measurements of subtle early alterations associated with cardiac dysfunction in T2DM rats [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2023, 23(1): 266.

[9] CAO W, SHI M, WU L, et al. A renal-cerebral-peripheral sympathetic reflex mediates insulin resistance in chronic kidney disease [J]. EBioMedicine, 2018, 37: 281-293.

[10] ZHAO L, LIAO Q, ZHANG Y, et al. Ischemic postconditioning mitigates retinopathy in tree shrews with diabetic cerebral ischemia [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 6286571.

[11] XIONG S, SHI Y, LIU J, et al. Linggui qihua decoction inhibits atrial fibrosis by regulating TGF-β1/Smad2/3 signal pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2023,

2023; 3764316.

[12] SHI Y, LIU C, XIONG S, et al. Ling-Gui-Qi-Hua formula alleviates left ventricular myocardial fibrosis in rats with heart failure with preserved ejection fraction by blocking the transforming growth factor-β1/Smads signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116849.

[13] SHI Y, LIU C, YANG C, et al. A rat model of metabolic syndrome-related heart failure with preserved ejection fraction phenotype: pathological alterations and possible molecular mechanisms [J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10: 1208370.

[14] MARZAK H, AYME-DIETRICH E, LAWSON R, et al. Old spontaneously hypertensive rats gather together typical features of human chronic left-ventricular dysfunction with preserved ejection fraction [J]. J Hypertens, 2014, 32(6): 1307-1316.

[15] DANIAL P, DUPONT S, ESCOUBET B, et al. Pulmonary haemodynamic effects of interatrial shunt in heart failure with preserved ejection fraction: a preclinical study [J]. EuroIntervention, 2020, 16(5): 434-440.

[16] ZHANG W, ZHANG H, YAO W, et al. Morphometric, hemodynamic, and multi-omics analyses in heart failure rats with preserved ejection fraction [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3362.

[17] WU X, LIU H, BROOKS A, et al. SIRT6 mitigates heart failure with preserved ejection fraction in diabetes [J]. Circ Res, 2022, 131(11): 926-943.

[18] ZHOU Y, FU L, SUN J, et al. Association between metabolic syndrome and an increased risk of hospitalization for heart failure in population of HFpEF [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 698117.

[19] REDFIELD M M, BORLAUG B A. Heart failure with preserved ejection fraction: a review [J]. JAMA, 2023, 329(10): 827-838.

[20] SCHULZ A, SCHUSTER A. Visualizing diastolic failure: Non-invasive imaging-biomarkers in patients with heart failure with preserved ejection fraction [J]. EBioMedicine, 2022, 86: 104369.

[21] HE J, YANG W, WU W, et al. Clinical features, myocardial strain and tissue characteristics of heart failure with preserved ejection fraction in patients with obesity: a prospective cohort study [J]. EClinicalMedicine, 2023, 55: 101723.

[22] BIANCO C M, FARJO P D, GHAFFAR Y A, et al. Myocardial mechanics in patients with normal LVEF and diastolic dysfunction [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2020, 13(1): 258-271.

[23] D'ANDREA A, ILARDI F, D'ASCENZI F, et al. Impaired myocardial work efficiency in heart failure with preserved ejection fraction [J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2021, 22(11): 1312-1320.

[24] ITO H, ISHIDA M, MAKINO W, et al. Cardiovascular magnetic resonance feature tracking for characterization of patients with heart failure with preserved ejection fraction: correlation of global longitudinal strain with invasive diastolic functional indices [J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2020, 22(1): 42.

[25] HE J, YANG W, WU W, et al. Early diastolic longitudinal strain rate at MRI and outcomes in heart failure with preserved ejection fraction [J]. Radiology, 2022, 302(1): E5.

[26] TULETA I, FRANGOIANNIS N G. Fibrosis of the diabetic heart: clinical significance, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 176: 113904.

[27] NAGUEH S F. Heart failure with preserved ejection fraction: insights into diagnosis and pathophysiology [J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(4): 999–1014.

[28] YAMANAKA S, SAKATA Y, NOCHIOKA K, et al. Prognostic impacts of dynamic cardiac structural changes in heart failure patients with preserved left ventricular ejection fraction [J]. Eur J Heart Fail, 2020, 22(12): 2258–2268.

[29] MOHAMMED S F, HUSSAIN S, MIRZOYEV S A, et al. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction [J]. Circulation, 2015, 131(6): 550–559.

[30] HAHN V S, YANEK L R, VAISHNAV J, et al. Endomyocardial biopsy characterization of heart failure with preserved ejection fraction and prevalence of cardiac amyloidosis [J]. JACC Heart Fail, 2020, 8(9): 712–724.

[31] KANAGALA P, CHENG A S H, SINGH A, et al. Relationship between focal and diffuse fibrosis assessed by CMR and clinical outcomes in heart failure with preserved ejection fraction [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2019, 12(11): 2291–2301.

[32] SHI Y, LIU J, LIU C, et al. Diagnostic and prognostic value of serum soluble suppression of tumorigenicity-2 in heart failure with preserved ejection fraction; a systematic review and meta-analysis [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 937291.

[33] NITSCHKE C, KAMMERLANDER A A, BINDER C, et al. Native T1 time of right ventricular insertion points by cardiac magnetic resonance; relation with invasive haemodynamics and outcome in heart failure with preserved ejection fraction [J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2020, 21(6): 683–691.

[34] SCHIATTARELLA G G, ALTAMIRANO F, TONG D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction [J]. Nature, 2019, 568(7752): 351–356.

[35] MISHRA S, KASS D A. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(6): 400–423.

[36] ZHANG Y, ZHANG X, WANG Y, et al. Relationship between diffuse fibrosis assessed by CMR and depressed myocardial strain in different stages of heart failure [J]. Eur J Radiol, 2023, 164: 110848.

[37] KAMMERLANDER A A, DONÀ C, NITSCHKE C, et al. Feature tracking of global longitudinal strain by using cardiovascular MRI improves risk stratification in heart failure with preserved ejection fraction [J]. Radiology, 2020, 296(2): 290–298.

[收稿日期] 2023–07–23

傅泽铤,李仲豪,李伦宇,等. 抗阻运动对 SAMP8 小鼠骨骼肌 lncRNA 和 mRNA 基因表达谱的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 286-296.

FU Z T, LI Z H, LI L Y, et al. Effects of resistance exercise on long non-coding RNA and mRNA expression profiles of skeletal muscle in senescence accelerated-prone 8 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 286-296.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.002

抗阻运动对 SAMP8 小鼠骨骼肌 lncRNA 和 mRNA 基因表达谱的影响

傅泽铤¹, 李仲豪¹, 李伦宇¹, 刘洪政², 丁海丽^{1*}

(1. 成都体育学院运动医学与健康研究所, 成都 610041; 2. 贵阳市白云区第三中学, 贵阳 550014)

【摘要】 目的 利用 RNA-seq 技术比较运动组与对照组小鼠股四头肌中差异表达的 lncRNA 和 mRNA, 探讨抗阻运动作用于 SAMP8 小鼠的潜在调控机制。**方法** 12 只 28 周龄雄性 SAMP8 快速衰老小鼠分为模型组 (M 组)、抗阻运动组 (R 组), 每组 6 只; 另设 6 只同龄 SAMR1 抗衰老小鼠作对照组 (C 组)。R 组经递增负重爬梯运动训练 8 周。每 1 周测定相对抓力、每 2 周测转棒测试时间。取材后取右侧股四头肌进行苏木素-伊红 (HE) 染色观察其组织学变化; 并取左侧股四头肌进行 RNA-seq, 筛选出差异表达的 lncRNA (long non-coding RNA, lncRNA) 和 mRNA, 然后对这些基因进行基因本体 (Gene Ontology, GO)、京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。**结果** (1) 干预前, SAMP8 小鼠相比较于自然衰老的 SAMR1 小鼠表现出相对抓力以及加速转棒测试时长显著下降 ($P < 0.01$); 干预后, 与 M 组相比, R 组相对抓力以及转棒时长均出现显著增加 ($P < 0.01$)。 (2) HE 染色结果显示, M 组肌纤维横截面积与 C 组比较显著下降 ($P < 0.01$); R 组肌纤维横截面积与 M 组比较显著增加 ($P < 0.01$)。 (3) 通过差异表达分析, 相比于 M 组, R 组有 182 个表达水平上调和 218 个表达下调的 lncRNA 以及 454 个表达上调和 289 个表达下调的 mRNA。R 组与 M 组之间差异 lncRNA 的靶基因 KEGG 显著富集的通路有产生 IgA 的肠道免疫网络、NF- κ B、炎症性肠病等信号通路。**结论** (1) 本研究证明了抗阻运动能够改善 SAMP8 小鼠肌少症的骨骼肌机能, 利用 RNA-seq 分别鉴定出 M 组、R 组小鼠的差异 lncRNA 和 mRNA。这些差异基因可能是肌少症的潜在治疗靶点。 (2) 通过分析差异表达 lncRNA 的靶基因以及 mRNA 的生物学信息, 从而为进一步了解抗阻运动改善肌少症的机制提供了可能。

【关键词】 长非编码 RNA; SAMP8; 肌少症; 转录组; 抗阻运动

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0286-11

Effects of resistance exercise on long non-coding RNA and mRNA expression profiles of skeletal muscle in senescence accelerated-prone 8 mice

FU Zeting¹, LI Zhonghao¹, LI Lunyu¹, LIU Hongzheng², DING Haili^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金 (81904318), 四川省自然科学基金 (2023NSFSC0545), 四川省中央引导地方科技发展项目 (2022ZXD0062), 国家体育总局运动医学重点实验室 (2018YFF0300904), 运动医学四川省重点实验室 (2021-A030), 四川省科技创新创业苗子工程项目 (2023JDR0100)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81904318), Sichuan Natural Science Foundation (2023NSFSC0545), Sichuan Province Central Government Guides Local Science and Technology Development Project (2022ZXD0062), the Key Laboratory of Sports Medicine of the General Administration of Sport of China (2018YFF0300904), Key Laboratory of Sports Medicine of Sichuan Province (2021-A030), Sichuan Province Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Seedling Project (2023JDR0100).

【作者简介】 傅泽铤, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 运动与骨骼肌机能。Email: 464552452@qq.com

【通信作者】 丁海丽, 女, 教授, 博士, 研究方向: 运动生理, 运动与骨骼肌重塑。Email: dinghaili@cdsu.edu.cn

(1. Institute of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China;

2. Guiyang Baiyun District Third Middle School, Guiyang 550014, China)

Corresponding author: DING Haili. E-mail: dinghaili@cdu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the potential regulatory mechanism of resistance exercise in senescence accelerated-prone 8 mice (SAMP8) by evaluating the effects of exercise on the expression of long non-coding RNA (lncRNA) and mRNA in quadriceps muscles by RNA-sequencing (RNA-seq) technology. **Methods** Twenty-eight-week-old male SAMP8 mice were divided into a model group (M group) and resistance-exercise group (R group) ($n = 6$ mice per group). Another eight normally aging SAMR1 mice of the same age were used as the control group (C group). Mice in R group received 8 weeks of increasing weight climbing exercise training. Relative grip strength was measured every week and the rotarod test was performed every 2 weeks. Histological changes in the right quadriceps femoris were observed by hematoxylin-eosin staining and the left quadriceps was used for RNA-seq. Differentially expressed lncRNA and mRNA were screened and analyzed for enrichment by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses. Finally, key differentially expressed genes were analyzed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to verify the accuracy of the RNA-seq result. **Results** (1) Relative grip strength and rotarod test time were significantly decreased in M group compared with C group ($P < 0.01$), but were significantly increased after 8 weeks of Rgroup compared with M group ($P < 0.01$). (2) The cross-sectional area of the muscle fibers was significantly lower in M group compared with C group, as shown by HE staining ($P < 0.01$), while the cross-sectional area of the muscle fibers was significantly increased in the R group compared with M group ($P < 0.01$). (3) Differential expression analysis identified 182 upregulated and 218 downregulated lncRNA, and 454 upregulated and 289 downregulated mRNA between M group and R group. The KEGG pathways of lncRNA target genes that were differentially expressed between M group and R group were significantly enriched in intestinal immune network for IgA production, nuclear factor-kappa B signaling pathway, and inflammatory bowel disease. **Conclusions** (1) This study demonstrated that resistance exercise can improve skeletal muscle function in SAMP8 mice with sarcopenia. We identified lncRNA and mRNA that were differentially expressed as a result of resistance exercise, and which might be potential targets of sarcopenia therapy. (2) Furthermore, analyzing the biological functions of the target genes of the differentially expressed lncRNA and mRNA may further our understanding of the mechanism of resistance exercise for improving sarcopenia.

【Keywords】 long non-coding RNA; SAMP8; sarcopenia; transcriptome; resistance exercise

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

肌肉减少症是一种进行性和全身性骨骼肌疾病,涉及肌肉质量和功能的加速丧失,是降低老年人生活质量、活动能力的一个重要原因,也是导致死亡的因素之一^[1]。2010年,欧洲老年肌肉衰减症工作组(European Working Group on Sarcopenia in Older People, EWGSOP)首次提出了广泛使用的肌少症综合诊断标准,并建议在诊断肌少症时应同时评估肌肉质量、肌肉力量和肌肉功能^[2]。2018年,EWGSOP2(the European Working Group on Sarcopenia in Older People again)修订了肌少症的定义。在修订版中,低肌肉力量(肌肉功能最可靠的指标)取代低肌肉质量成为肌少症的主要参数^[3]。老年男性每年肌肉力量的下降速度为3.0%~4.0%,女性则为2.5%~3.0%^[4]。此外,与年轻人相比,老年人的快肌纤维减少了10%~40%^[5],由于快肌纤维主要负责大强度的体力活动或运动,快

肌纤维数量的减少会导致老年人肌力减弱从而引发肌少症。因此,寻找治疗肌少症行之有效的替代疗法对其来说尤为重要。近些年的研究表明,运动干预可预防、延缓或逆转肌少症,其中抗阻运动已被公认为减少衰老过程中骨骼肌质量、力量损失的最有效的策略之一。抗阻运动可促进肌肉肥大,提高力量和身体机能,包括显著改善单个肌纤维和整个骨骼肌的大小^[6]、力量^[7]、肌肉质量和身体表现^[8]。

近年来,许多研究揭示了非编码RNA(non-coding RNA, cRNA)在肌少症发生和发展中的作用^[9]。lncRNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度>200 nt的RNA转录本,许多与肌少症相关的人类SNP(single nucleotide polymorphism)位于lncRNA位点内,这表明lncRNA可能参与了肌少症的发生发展^[10]。但是现在仍没有研究通过lncRNA

表达谱讨论抗阻运动对于 SAMP8 小鼠肌少症的作用机制。基于此,本文以 SAMP8 小鼠为研究对象,采用负重爬梯作为干预手段,使用 RNA-seq (RNA-sequencing) 技术分别筛选出模型组以及抗阻运动组小鼠股四头肌中差异表达的 lncRNA 和 mRNA。然后,利用生物信息学对差异表达的基因进行分析,探索其潜在的生物学功能以及相关的信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 12 周龄健康雄性 SAMR1 小鼠 (31.79 ± 2.60 g) 6 只, SAMP8 小鼠 (35.41 ± 3.37 g) 16 只均购自北京大学医学部【SCXK(京)2021-0013】。动物饲养和训练均于成都体育学院动物实验中心【SYXK(川)2023-0211】, 实验室室温控制在 $20 \sim 25$ °C, 8:00 开灯, 20:00 关灯, 湿度 40% ~ 70%, 用标准 SPF 级全价固体营养饲料和经过滤的温开水喂养, 保证小鼠自由进食进水, 每日清洁饲养笼及动物房。本动物实验经成都体育学院学术委员会实验动物伦理委员会审批(成体伦理(2021)39号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

HE 染料(武汉赛维尔生物科技有限公司); 伊红(珠海贝索生物技术有限公司); 4% 多聚甲醛(Biosharp); 苏木素(珠海贝索生物技术有限公司); Ribo-Zero rRNA 去除试剂盒(Epicentre, Madison, WI, USA); TruSeq 链总 RNA 文库制备试剂盒(Illumina)。小动物抗阻负重爬梯(成都体育学院); 小鼠抓力测定仪(YLS-13A); 小鼠转棒仪(Ugo Basile 数字转棒仪 47750); 光学显微镜(Olympus, BX53); BioAnalyzer 2100 系统(美国加利福尼亚州圣克拉拉市安捷伦科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及运动方案

在标准环境下饲养 SAMR1 小鼠与 SAMP8 小鼠至 28 周龄。将 SAMR1 小鼠(6 只)纳入对照组(C 组), SAMP8 小鼠 12 只按数字表法随机分为: 模型组(M 组)、抗阻运动组(R 组), 抗阻运动组进行 8 周负重爬梯^[11], 采用自主研制爬梯(倾斜 85°, 梯高 1 m, 阶梯间隔 2 cm, 专利号 ZL201821692962.8)。负重由体重的 50% 开始^[12], 适应性训练 3 d, 休息 2 d。正式训练的第 1、2 周负重为体重 50%, 第 3 周开始

每周增加 15%, 直至增加到 100%, 锻炼至第 8 周^[12-13]。4 次为 1 组, 每天 3 组, 每周一、周三、周五进行, 每次训练时间为 40 ~ 50 min。每次爬到梯顶休息 1 min, 组间休息 2 min。每次实验后需检查动物是否健康, 训练期间每周称量并记录小鼠体重。

1.2.2 行为学指标监测

全程观察各组小鼠精神状态、活动情况、毛色等, 记录体重, 每周 1 次。抓力测试: 每周测 1 次, 采用小鼠抓力测定仪测试各组小鼠抓力, 测量 3 次, 取平均值, 并计算相对抓力(平均抓力/体重)。转棒测试: 运动干预前测量 1 次, 之后每 2 周 1 次, 采用小鼠转棒仪, 参数设置为: 300 s, 从 4 r/min 升至 40 r/min, 记录小鼠转棒测试直至掉落的时间。

1.2.3 动物取材

末次运动干预后, 禁食 24 h(自由进水), 小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉, 断颈处死, 迅速取双侧股四头肌。随后用冰冷生理盐水漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 剔除结缔组织, 分段备用。右侧股四头肌使用中性甲醛固定 24 h, 以备苏木素-伊红(HE)染色; 左侧股四头肌置于 -80 °C 冰箱保存, 用于后续转录组测序。

1.2.4 HE 染色观察骨骼肌组织形态学

4% 多聚甲醛固定, 经洗涤、脱水、透明、透蜡、包埋、切片(约 4 μ m)、透明、封片等操作, 获得 HE 染色的骨骼肌切片, 采集 200 倍显微图像, 每组采集 3 张, 用 IPP 6.0 图像分析系统计算每张图像股四头肌肌纤维横截面积。

1.2.5 转录组测序及数据分析

(1) 总 RNA 提取: 取 M 组和 R 组小鼠的股四头肌组织, 采用 TRIzol 提取总 RNA。(2) 测序文库构建和转录组测序: 测序实验采用建库试剂盒进行文库构建, 委托北京百迈客生物科技有限公司完成。根据说明书要求, 使用 Ribo-Zero rRNA 去除试剂盒去除核糖体 RNA, 使用 TruSeq 链总 RNA 文库制备试剂盒构建 RNA 文库。使用 BioAnalyzer 2100 系统通过定量和质量控制对测序文库进行评估。RNA-Seq 测序在 Illumina-HiSeq 平台上进行, 选用 Illumina Hiseq 4000 测序器获取转录组数据。(3) 用 edgeR 软件进行表达差异显著性分析。(4) lncRNA 靶基因预测: 通过 lncRNA 与蛋白编码基因的表达相关性(Co-expression)预测 lncRNA 的靶基因。然后, 对差异 lncRNA 的靶基因进行进一步的功能富集分析。(5) 基因本体(Gene Ontology, GO)

和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析用于研究显著表达差异基因的作用。采用 Goseq 软件进行 GO 分析; KOBAS (2.0) 软件进行 KEGG pathway 富集分析, 以预测差异表达 lncRNA 的靶基因以及差异表达 mRNA 的功能。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。数据采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 Tukey's 事后检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 抗阻运动对小鼠行为学影响

与 C 组相比, M 组小鼠表现出自主活动减少, 毛发干枯暗淡, 出现明显掉毛现象, 抓取时易激惹等衰老体征; R 组与 M 组相比有明显改善, 自主活动增加, 掉毛现象有所改善。

相对抓力结果显示: 相较于 SAMR1 小鼠, SAMP8 小鼠在干预前出现相对抓力下降 ($P <$

0.01) (图 1A, 表 1); 8 周的抗阻运动后, R 组与 M 组相比, 其相对抓力显著增加 ($P < 0.01$), M 组小鼠的相对抓力进一步下降。对 8 周抗阻运动后的相对抓力结果分析表明, M 组小鼠相对抓力随时间出现了进行性下降, R 组相对抓力表现相对平稳 (图 1B, 表 1)。

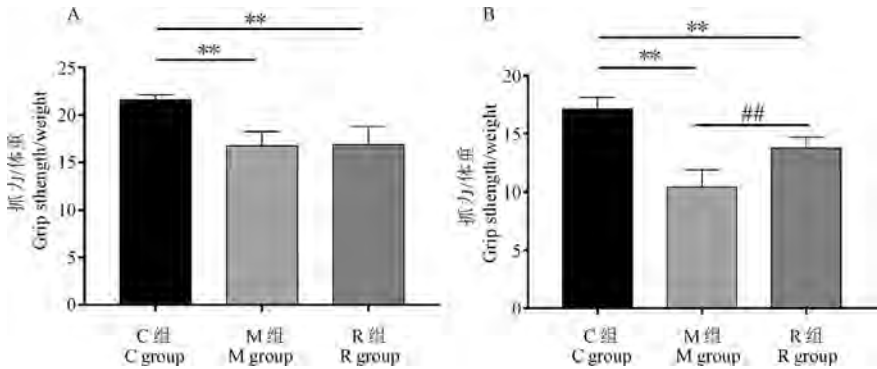
表 1 抗阻运动对小鼠四肢相对抓力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of resistance exercise on relative grip strength in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

时间/周 Time/weeks	C 组 C group	M 组 M group	R 组 R group
28	21.61 ± 0.54	16.73 ± 1.55**	16.88 ± 1.91**
29	21.62 ± 1.32	13.65 ± 2.60**	16.54 ± 0.88**##
30	20.99 ± 1.59	12.10 ± 2.33*	15.31 ± 0.99**##
31	19.08 ± 0.31	11.82 ± 1.44**	14.71 ± 2.25**##
32	19.00 ± 1.20	11.00 ± 0.86**	13.05 ± 2.26**##
33	19.62 ± 1.50	10.85 ± 1.03**	13.98 ± 0.88**##
34	18.10 ± 2.56	10.30 ± 0.92**	13.40 ± 1.57**##
35	17.12 ± 1.01	10.40 ± 1.48**	13.75 ± 0.96**##

注: 与 C 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 M 组相比, ## $P < 0.01$ 。(下同)

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



注: A: 抗阻运动前小鼠的相对抓力; B: 抗阻运动后小鼠的相对抓力。
图 1 抗阻运动对小鼠抓力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Relative grip strength of mice before resistance exercise. B. Relative grip strength of mice after resistance exercise.

Figure 1 Changes in relative grip strength of mice before and after resistance exercise ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

转棒测试结果显示: 相较于 SAMR1 小鼠, SAMP8 小鼠在干预前表现出转棒时长缩短 ($P < 0.01$) (图 2A), 8 周的抗阻运动后, R 组转棒时长相较于 M 组显著延长 ($P < 0.01$), 而 M 组小鼠转棒时长进一步缩短。对 8 周抗阻运动后的转棒测试结果分析显示, M 组小鼠转棒时长出现进行性缩短, R 组转棒时长缩短进程得以缓解 (图 2B)。

2.2 抗阻运动对骨骼肌组织形态的影响

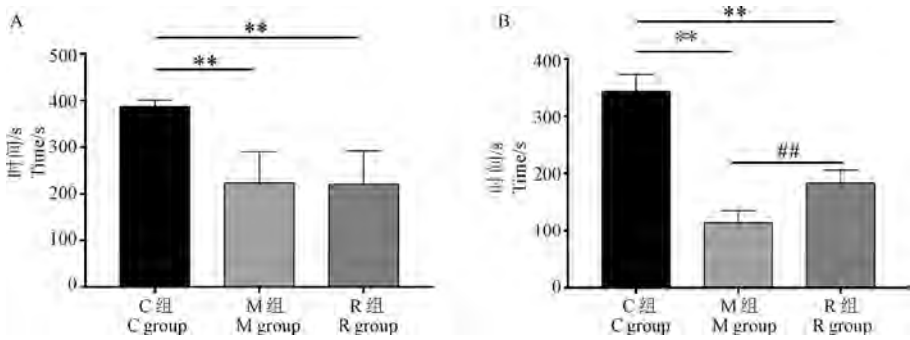
HE 染色结果显示: C 组骨骼肌肌纤维呈多边形

或不规则圆形、排列紧密; M 组骨骼肌肌纤维呈不规则圆形; R 组骨骼肌呈多边形, 排列紧密 (图 3A)。抗阻运动干预后, R 组肌纤维向粗大肌纤维转变, 肌纤维横截面积有一定程度增加, 较 M 组明显增大 ($P < 0.01$), 但仍旧小于同龄 C 组小鼠 (图 3B)。

2.3 差异基因分析结果

2.3.1 LncRNA 的差异表达分析

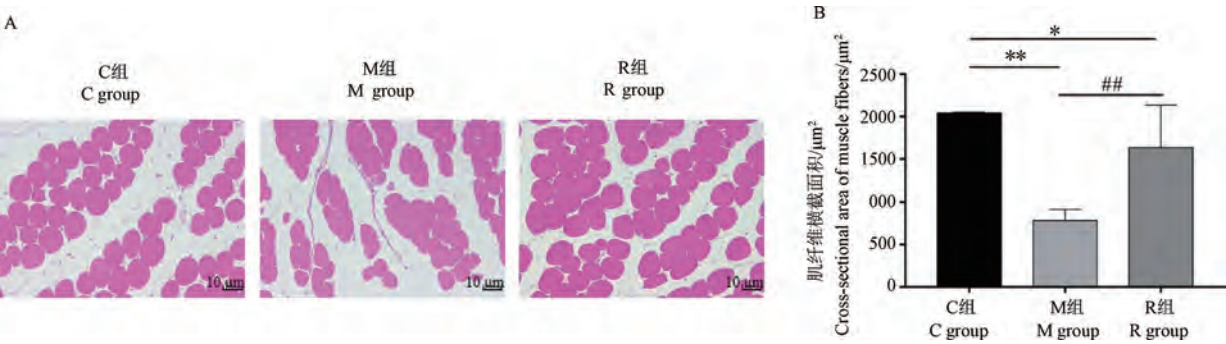
使用火山图以及聚类分析图显示 M 组、R 组的差异 lncRNA。图 4A 展示了在 M 组与 R 组的比较



注:A:抗阻运动前小鼠的转棒测试;B:抗阻运动后小鼠的转棒测试。
图 2 抗阻运动对小鼠转棒测试影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Rotarod test of mice before resistance exercise. B. Rotarod test of mice after resistance exercise.

Figure 2 Changes in rotarod test of mice before and after resistance exercise($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注:A:HE 染色;B:肌纤维横截面积柱形图。
图 3 抗阻运动后小鼠肌纤维横截面积的变化

Note. A. HE staining. B. Histogram of cross-sectional area of muscle fibers.

Figure 3 Changes in muscle fibers cross-sectional area of mice after resistance exercise

中,有 182 个表达上调和 218 个表达下调的 lncRNA,这些差异基因的展示以 $|\log_2FC| \geq 1.5$ 且 $P < 0.05$ 为筛选标准。图 4B 使用层次聚类分析展示差异 lncRNA 在每个样本中的 TPM 值,根据 $\log_{10}(TPM + 1)$ 值聚类,红色部分为高表达 lncRNA,绿色部分为低表达 lncRNA。

2.3.2 mRNA 的差异表达分析

此外,对 M 组、R 组的 mRNA 进行了差异表达分析。图 5 显示的是差异 mRNA 的火山图以及聚类分析图。图 5A 展示了在 M 组与 R 组的比较中,发现了 454 个表达上调和 289 个表达下调的 mRNA;图 5B 显示的是差异 mRNA 在每个样本中的层次聚类分析图,红色部分为高表达 mRNA,绿色部分为低表达 mRNA。

2.4 GO 富集分析

2.4.1 差异 lncRNA 靶基因 GO 富集分析

在得到 M 组以及 R 组之间的差异表达 lncRNA 后,根据 lncRNA 与其靶基因间的表达相关性,对每组差异表达 lncRNA 的靶基因的集合进行了 GO 富

集分析。富集在生物过程(biological process, BP)上的主要是多生物过程、免疫系统过程、细胞杀伤;富集在细胞组分(cell component, CC)上的主要是胞外区、胞外区部分、细胞外基质;富集在分子功能(molecular function, MF)上的主要是核苷酸交换因子活性、结构分子活性、酶调节剂活性(图 6)。

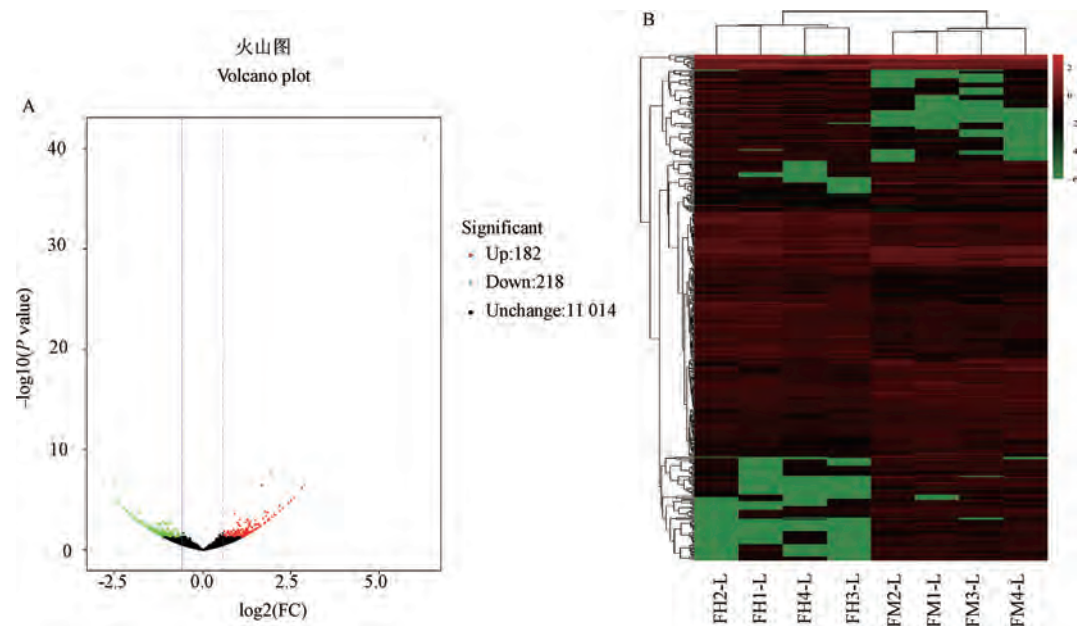
2.4.2 差异 mRNA 靶基因 GO 富集分析

在得到 M 组以及 R 组之间的差异表达 mRNA 后,对每组差异表达 mRNA 的集合进行了 GO 富集分析。富集在 BP 上的主要是生长、繁殖、生物黏附;富集在 CC 上的主要是细胞连接、胶原三聚体、细胞外基质;富集在 MF 上的主要是翻译调节因子活性、受体活性、蛋白结合转录因子活性(图 7)。

2.5 KEGG 通路富集分析

2.5.1 lncRNA 候选靶基因 KEGG 分析

M 组与 R 组之间差异 lncRNA 的靶基因的 KEGG 显著富集的通路有产生 IgA 的肠道免疫网络、哮喘、NF- κ B 信号通路、炎症性肠病、原发性免疫缺陷、同种异体排斥反应、移植物抗宿主病、I 型糖

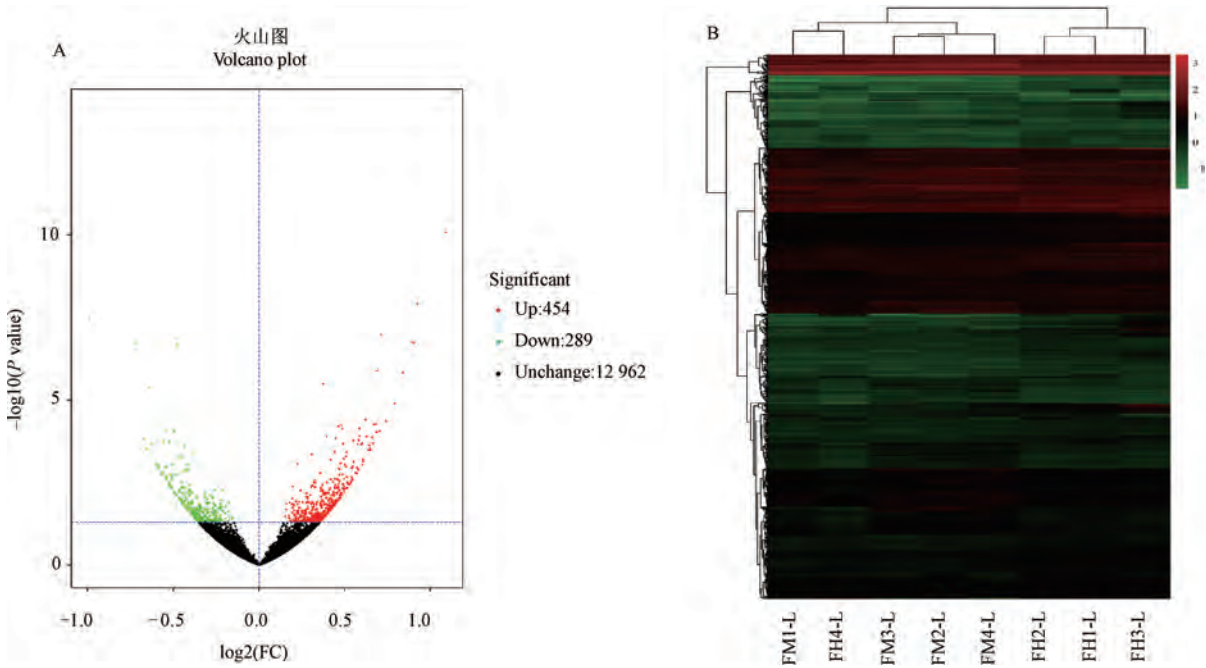


注:A:火山图;B:热图。

图 4 差异 lncRNA 火山图和聚类图

Note. A. Volcano plot. B. Heatmap.

Figure 4 Volcano plot and heatmap of differentially lncRNA



注:A:火山图;B:热图。

图 5 差异 mRNA 火山图和聚类图

Note. A. Volcano plot. B. Heatmap.

Figure 5 Volcano plot and heatmap of differentially mRNA

尿病、Th1 和 Th2 细胞分化、疟疾(图 8)。

2. 5. 2 mRNA KEGG 分析

KEGG 分析显示,M 组与 R 组差异 mRNA 显著

富集的通路有粘多糖生物合成、咖啡因代谢、氧化磷酸化、TNF 信号通路、非酒精性脂肪肝、ErbB 信号通路、mTOR 信号通路、黏着斑(图 9)。

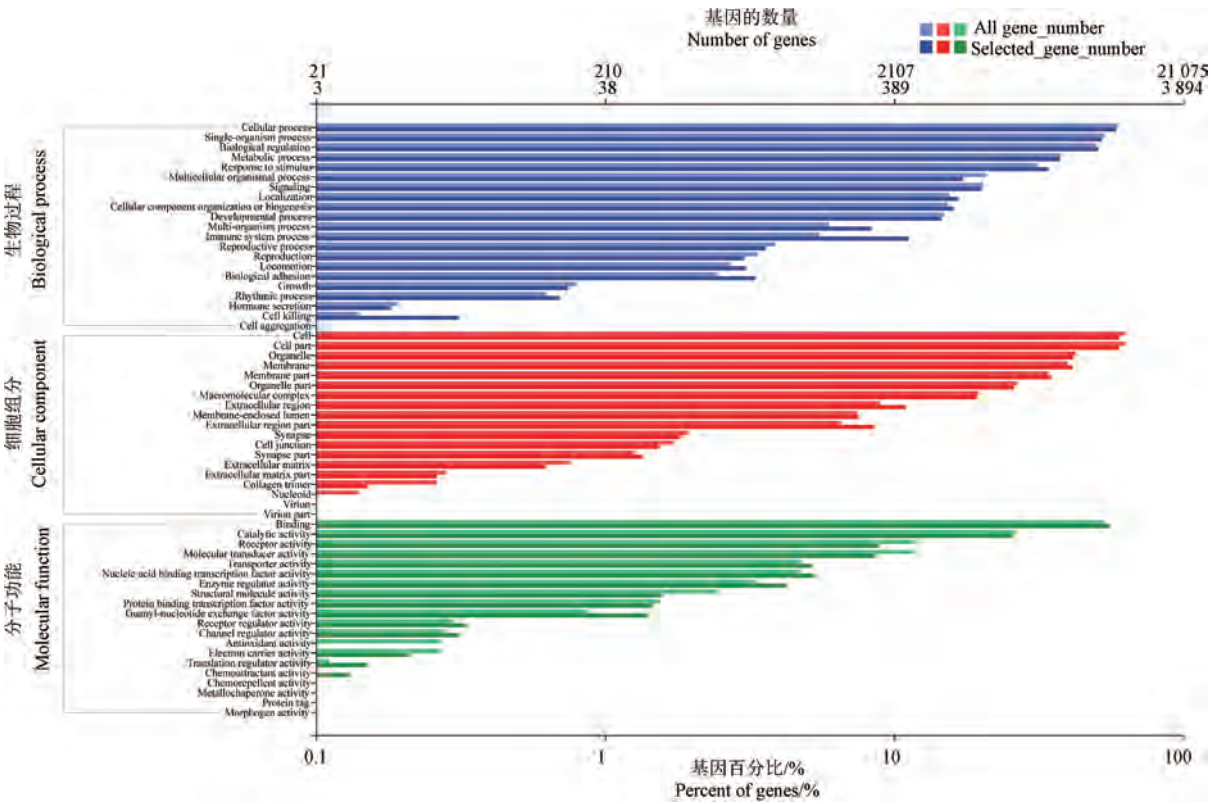


图 6 差异 lncRNA 候选靶基因的 GO 富集柱状图

Figure 6 GO enrichment histogram of candidate target genes of differential lncRNA

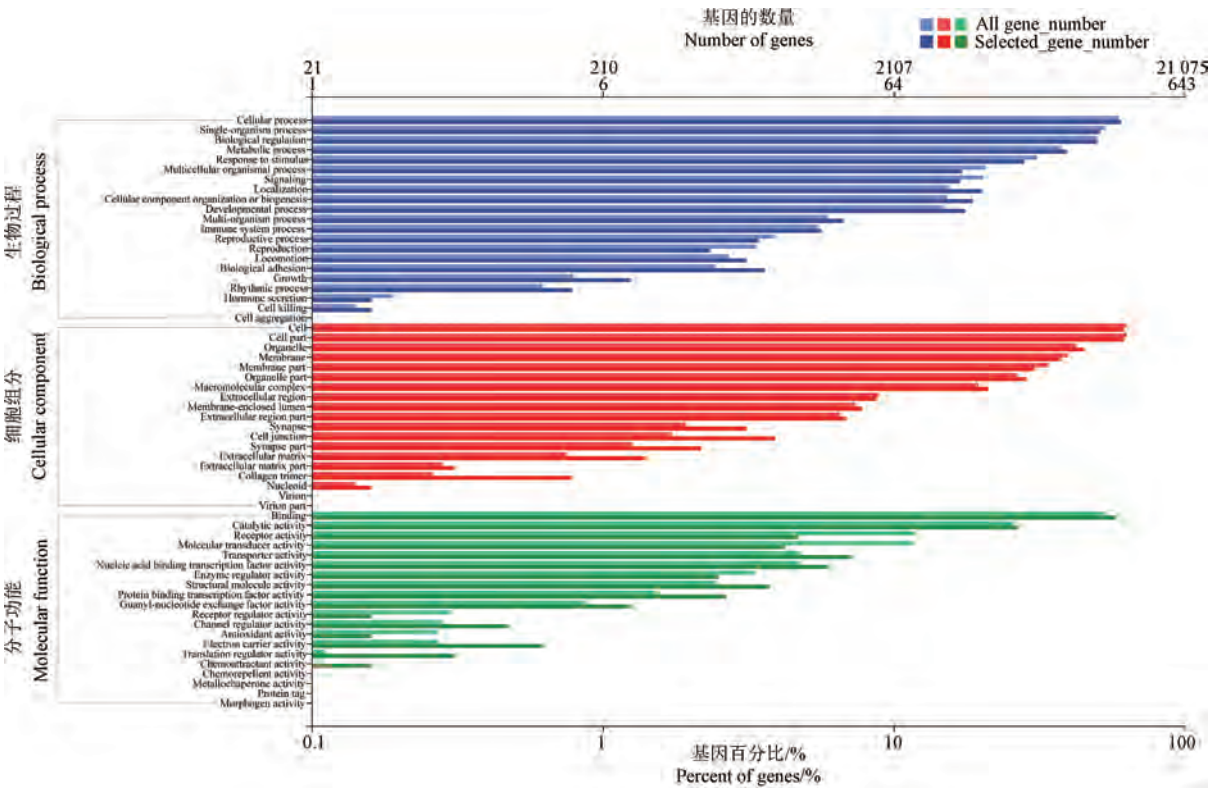


图 7 差异 mRNA 的 GO 富集柱状图

Figure 7 GO enrichment histogram of differential mRNA

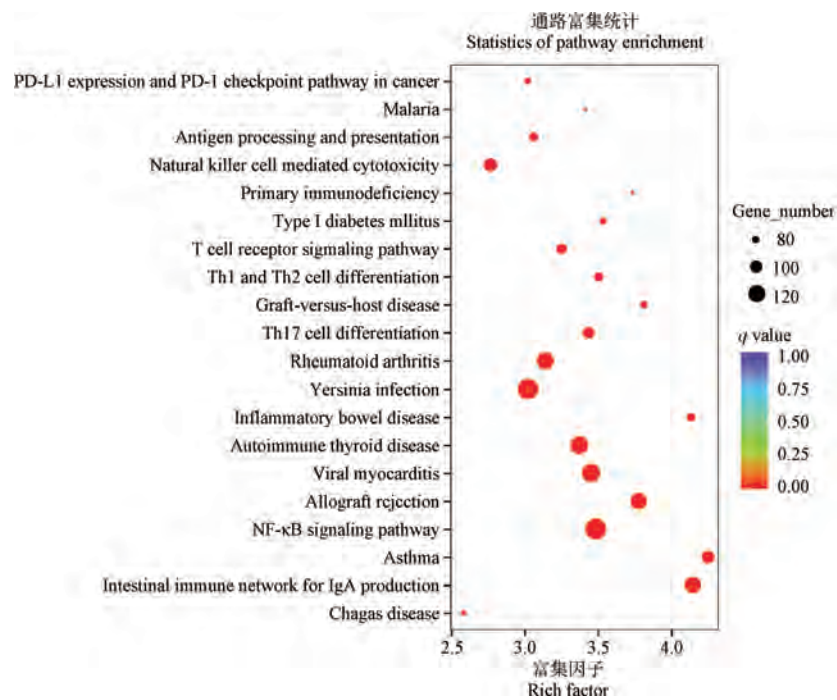


图 8 差异 lncRNA 候选靶基因的 KEGG 富集散点图

Figure 8 KEGG enrichment scatter plot of candidate target genes of differential lncRNA

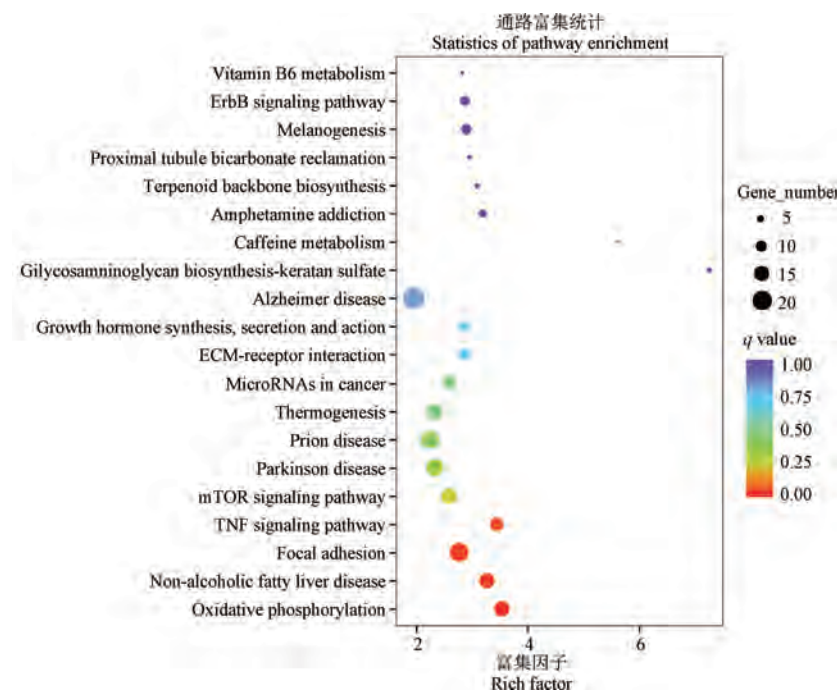


图 9 差异 mRNA 的 KEGG 富集散点图

Figure 9 KEGG enrichment scatter plot of differential mRNA

3 讨论

SAM 品系是一种近交小鼠品系,可分为加速衰老近交系 (senescence accelerated-prone, SAMP) 和抗衰老近交系 (senescence accelerated resistant,

SAMR), 常被用作衰老加速和衰老相关疾病的动物模型。同龄的 SAMR1 小鼠与正常小鼠的生理指标相似, 常用于 SAMP8 小鼠的正常对照^[14]。SAMP8 作为 SAMP 品系中的优势种, 经常被用作肌少症研究的模型。与同龄 SAMR1 对照组相比, SAMP8 的

骨骼肌质量和收缩力下降最严重^[15]。GUO 等^[16]调查了 SAMP8 小鼠腓肠肌的肌肉质量和结构及功能特性,发现其最大的肌肉质量出现在第 7 个月,随后有下降的趋势。本研究发现,与同龄的 SAMR1 小鼠相比,SAMP8 小鼠自主活动减少,毛发干枯无光泽暗淡,出现明显掉毛现象,其外形特征与衰老小鼠相似。此外,行为学结果表明 SAMP8 小鼠的相对抓力、转棒时间显著下降;形态学结果显示其肌纤维横截面积显著降低,与以往研究结果一致,表明 SAMP8 小鼠可作为肌少症研究对象。

2021 年国际衰弱和肌肉减少症研究会议工作组(International Conference of Frailty and Sarcopenia Research, ICFSR)推荐运动可作为肌少症患者临床管理的重要组成部分,也推荐有氧运动、抗阻运动、综合训练、高强度间歇训练等多种运动方式可用来改善肌少症^[17]。ZENG 等^[18]的研究发现,骨骼肌老化的特征是线粒体受损或肿胀、肌丝排列紊乱或纤维结构不规则,而进行 12 周有计划的抗阻训练可以增加肌少症大鼠肌纤维横截面积,改善肌纤维的受损结构和线粒体功能。2 个月的中等强度抗阻训练能够提升老年女性的骨骼肌质量;体重指数、体脂百分比、体脂量也发生显著下降^[19]。本研究中,进行 8 周抗阻训练可显著提高 SAMP8 小鼠的肌肉量(肌纤维横截面积),并且改善 SAMP8 小鼠的肌肉耐力和肌肉力量。这表明,抗阻运动可延缓 SAMP8 小鼠肌少症的进程及改善其骨骼肌机能。

差异 lncRNA 靶基因 GO 富集分析结果显示抗阻运动主要在生物学过程、细胞成分等方面发挥生物学功能,其中细胞过程、节律过程、免疫系统过程等 GO terms 与肌少症相关的测序研究结果一致^[20-22],提示可能是抗阻运动改善肌少潜在的作用途径。且节律紊乱、免疫衰老与肌少症之间的关系,以及择时运动、运动改善免疫衰老是近年来研究的重点^[23-24]。lncRNA 靶基因显著表达差异的 KEGG 通路显示,NF- κ B 信号通路、炎症性肠病、原发性免疫缺陷、Th1 和 Th2 细胞分化这些 KEGG 通路在与肌少症相关的 RNA-seq 研究结果一致^[20,25-27],表明可能是运动改善肌少症的潜在作用机制。有证据显示炎症因子的表达能诱导 NF- κ B 转录的活化参与骨骼肌的萎缩。除此之外,NF- κ B 通路能够上调泛素-蛋白酶体途径活性,加速骨骼肌蛋白的降解;该通路在杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、多种癌症、神

经损伤和机械卸载中的骨骼肌萎缩发病机制中起着关键作用^[28]。肌-肠轴近年来受到广泛关注,超过三分之一的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者患有肌少症,此外,肠道菌群在平衡各种疾病条件下的促炎和抗炎反应中起重要作用,并与营养状况相关^[29]。肠道菌群紊乱(通常以 IBD 为特征)可能会改变免疫反应和宿主代谢,促进慢性炎症状态,且上调与肌少症相关的分子途径^[25]。未来的研究可以聚焦在炎性通路上进行更深入的研究。

在 mRNA 差异表达分析中,一共发现了 454 个表达上调和 289 个表达下调的 mRNA,GO 富集分析表明,抗阻训练与骨骼肌再生和修复过程有关,其相关基因靶标参与细胞因子产生的调控,细胞间连接和细胞生长。肌肉修复的初始阶段的特征是受损组织的坏死和炎症反应的激活^[30]。细胞因子是炎症反应的关键介质,协调炎症微环境和卫星肌肉细胞之间的平衡,在肌肉再生中起积极作用。KEGG 分析表明,粘多糖生物合成、咖啡因代谢、氧化磷酸化等信号通路被富集。其中,糖胺聚糖生物合成在某些老年性炎性肌病,例如包涵体肌炎(sporadic inclusion body myositis, sIBM)中被发现显著富集^[31]。蛋白聚糖(proteoglycan, PG)是一种由核心蛋白和糖胺聚糖链组成的大分子,也是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的关键组成部分。在其他慢性肌病中,ECM 的异常聚集会导致骨骼肌纤维化,进而导致肌萎缩^[32]。在与 ECM 异常聚集相关的 DMD 中,可以发现尿苷二磷酸葡萄糖醛酸、二磷酸腺苷葡萄糖、硫酸软骨素等蛋白聚糖的合成发生增加^[33]。另外的研究也表明从 DMD 动物模型 mdx 小鼠的骨骼肌卫星细胞中发现多种蛋白聚糖增加,成纤维细胞中则不存在^[34]。这提示后续可以从纤维化肌肉中的胶原组织以及纤维化如何反过来导致骨骼肌功能破坏研究肌少症的分子机制。此外,咖啡因代谢提示肌少症与营养摄入密切相关,男性摄入适量咖啡因有助于预防肌少症^[35]。

综上,8 周的抗阻运动能有效提升 SAMP8 小鼠的相对抓力、转棒时间等行为学指标,利用 RNA-seq 分别鉴定出 M 组、R 组的 SAMP8 小鼠股四头肌中的差异 lncRNA 和 mRNA。这些差异基因可能是肌少症的潜在治疗靶点。此外,还分析了差异表达 lncRNA 的靶基因以及 mRNA 的生物学信息,为进一步了解抗阻运动改善肌少症的机制提供了可能。

参 考 文 献(References)

- [1] CRUZ-JENTOFT A J, SAYER A A. Sarcopenia [J]. *Lancet*, 2019, 393(10191): 2636–2646.
- [2] CRUZ-JENTOFT A J, BAEYENS J P, BAUER J M, et al. Sarcopenia; European consensus on definition and diagnosis; report of the European working group on sarcopenia in older people [J]. *Age Ageing*, 2010, 39(4): 412–423.
- [3] CRUZ-JENTOFT A J, BAHAT G, BAUER J, et al. Sarcopenia; revised European consensus on definition and diagnosis [J]. *Age Ageing*, 2019, 48(4): 601.
- [4] MITCHELL W K, WILLIAMS J, ATHERTON P, et al. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 260.
- [5] VERDIJK L B, KOOPMAN R, SCHAART G, et al. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(1): E151–E157.
- [6] KIM H, SUZUKI T, SAITO K, et al. Effects of exercise and tea catechins on muscle mass, strength and walking ability in community-dwelling elderly Japanese sarcopenic women: a randomized controlled trial [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2013, 13(2): 458–465.
- [7] BAMMAN M M, HILL V J, ADAMS G R, et al. Gender differences in resistance-training-induced myofiber hypertrophy among older adults [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003, 58(2): 108–116.
- [8] DA BOIT M, SIBSON R, MEAKIN J R, et al. Sex differences in the response to resistance exercise training in older people [J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(12): e12834.
- [9] 傅泽铤, 李伦宇, 官孝天, 等. lncRNA 介导的 ceRNA 网络在肌肉减少症中作用机制的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(9): 1694–1701.
- FU Z T, LI L Y, GUAN X T, et al. Progress in mechanism of lncRNA-mediated ceRNA network in sarcopenia [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(9): 1694–1701.
- [10] LI Y, MENG X, LI G, et al. Noncoding RNAs in muscle atrophy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1088: 249–266.
- [11] 赵永军, 戴玉洲, 陈彩珍, 等. 耐力、抗阻运动对骨骼肌衰减症小鼠腓肠肌细胞自噬相关基因表达的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(5): 449–455.
- ZHAO Y J, DAI Y Z, CHEN C Z, et al. The alteration of autophagy-related gene in gastrocnemius muscle of mice with sarcopenia after endurance exercise and resistance exercise [J]. *Chin J Phys Med*, 2016, 35(5): 449–455.
- [12] LEE S, FARRAR R. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat [J]. *J Exerc Physiol*, 2003, 6: 80–87.
- [13] 田鹏, 师捷璇, 马娇, 等. 不同运动方式对青年期和老年期 SAMP8 小鼠胫骨前肌氧化应激影响的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2020, 35(12): 1416–1421.
- TIAN P, SHI J X, MA J, et al. Study of different exercises on oxidative stress in anterior tibial muscle of young and aged SAMP8 mice [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2020, 35(12): 1416–1421.
- [14] TAKEDA T. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research [J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(2): 105–110.
- [15] DERAIVE W, EIJNDE B O, RAMAEKERS M, et al. Soleus muscles of SAMP8 mice provide an accelerated model of skeletal muscle senescence [J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(7): 562–572.
- [16] GUO A Y, LEUNG K S, SIU P M, et al. Muscle mass, structural and functional investigations of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8) [J]. *Exp Anim*, 2015, 64(4): 425–433.
- [17] IZQUIERDO M, MERCHANT R A, MORLEY J E, et al. International exercise recommendations in older adults (ICFSR): expert consensus guidelines [J]. *J Nutr Health Aging*, 2021, 25(7): 824–853.
- [18] ZENG Z, LIANG J, WU L, et al. Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through akt/mTOR and akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 583478.
- [19] HUANG W Y, WU C E. Interventions to improve body composition, upper and lower extremity muscle strength, and balance ability of older female adults: an intervention study [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(8): 4765.
- [20] CHAI S, WAN L, WANG J L, et al. Systematic analysis of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in the femur and muscle of ovariectomized rats [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2019, 19(4): 422–434.
- [21] SHU H, HUANG Y, ZHANG W, et al. An integrated study of hormone-related sarcopenia for modeling and comparative transcriptome in rats [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1073587.
- [22] ZHENG Y, LIU T, LI Q, et al. Integrated analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) and mRNA expression profiles identifies lncRNA PRKG1-AS1 playing important roles in skeletal muscle aging [J]. *Aging*, 2021, 13(11): 15044–15060.
- [23] 张燕, 曲波, 丁海丽. 有氧和抗阻运动对 SAMP8 小鼠免疫功能的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 319–326.
- ZHANG Y, QU B, DING H L. Effects of aerobic and resistance exercise on immune functions in SAMP8 mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 319–326.
- [24] CHOI Y, CHO J, NO M H, et al. Re-setting the circadian clock using exercise against sarcopenia [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3106.
- [25] NARDONE O M, DE SIRE R, PETITO V, et al. Inflammatory bowel diseases and sarcopenia: the role of inflammation and gut microbiota in the development of muscle failure [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 694217.
- [26] LIANG J, ZHANG H, ZENG Z, et al. MicroRNA profiling of different exercise interventions for alleviating skeletal muscle

atrophy in naturally aging rats [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2023, 14(1): 356–368.

[27] XU Z, YOU W, CHEN W, et al. Single-cell RNA sequencing and lipidomics reveal cell and lipid dynamics of fat infiltration in skeletal muscle [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(1): 109–129.

[28] LI H, MALHOTRA S, KUMAR A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy [J]. J Mol Med, 2008, 86(10): 1113–1126.

[29] PICCA A, PONZIANI F R, CALVANI R, et al. Gut microbial, inflammatory and metabolic signatures in older people with physical frailty and sarcopenia; results from the BIOSPHERE study [J]. Nutrients, 2019, 12(1): 65.

[30] KARALAKI M, FILI S, PHILIPPOU A, et al. Muscle regeneration: cellular and molecular events [J]. In Vivo, 2009, 23(5): 779–796.

[31] MURAKAMI A, NODA S, KAZUTA T, et al. Metabolome and transcriptome analysis on muscle of sporadic inclusion body myositis [J]. Ann Clin Transl Neurol, 2022, 9(10): 1602–1615.

[32] GIOVARELLI M, ARNABOLDI F, ZECCHINI S, et al. Characterisation of progressive skeletal muscle fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy: an *in vivo* and *in vitro* study [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8735.

[33] HASLETT J N, SANODOU D, KHO A T, et al. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(23): 15000–15005.

[34] BRANDAN E, GUTIERREZ J. Role of skeletal muscle proteoglycans during myogenesis [J]. Matrix Biol, 2013, 32(6): 289–297.

[35] BAGHERI A, HASHEMI R, HESHMAT R, et al. Patterns of nutrient intake in relation to sarcopenia and its components [J]. Front Nutr, 2021, 8: 645072.

[收稿日期] 2023-10-13

一种用于相位对比 X 射线成像应用的遗体乳腺癌组织模拟器

随着乳腺 X 射线成像技术的进步,需要可靠的成像模拟器捕捉临床早期癌变和癌症病例中的细节,同时消除模拟器而引起的伪影。本研究介绍了一种从遗体乳腺组织制作的乳腺组织成像模拟器,适用于透射和折射增强成像系统。具体方法是在裸鼠体内正位植入人类癌细胞瘤,并植入固定组织,同时保持原始肿瘤/脂肪组织界面,得到的人-鼠组织混合模拟器被安装在透明丙烯酸盒中,用于吸收和折射 X 射线成像。此外还进行了数字乳腺层析成像。最终呈现了模拟器的衰减成像和折射成像,以确认该模拟器适用于两种成像模式。

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(6): 427-432, <https://doi.org/10.1002/ame2.12340>)

徐菲,刘健萍,董世访,等. 母体炎性暴露对子代小鼠受 IRBP 抗原诱导的葡萄膜炎的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32 (3): 297-306.

XU F, LIU J P, DONG S F, et al. Impact of embryonic uveitis exposure on response of mouse offspring to interphotoreceptor retinoid-binding protein-induced experimental autoimmune uveitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 297-306.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.003

母体炎性暴露对子代小鼠受 IRBP 抗原诱导的葡萄膜炎的影响

徐菲¹,刘健萍²,董世访³,皇辉¹,龚心怡¹,胡开娇¹,陈飞兰^{1*}

(1. 重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016;2. 中国人民解放军陆军特色医学中心病理科,重庆 400042;3. 重庆医科大学附属儿童医院儿研所,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,重庆 400014)

【摘要】目的 探讨母体葡萄膜炎暴露对子代小鼠受光感受器间视黄醇结合蛋白(interphotoreceptor retinoid-binding protein,IRBP)诱导的实验性自身免疫性葡萄膜炎(experimental autoimmune uveitis,EAU)免疫效应的影响。**方法** 从本课题组前期获得的受双亲 EAU 暴露的子代 C57BL/6J 小鼠眼球的 RNA 测序转录组数据中,筛选免疫相关差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs)。利用基因本体论(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)的富集分析,确定这些免疫相关的差异表达基因生物学途径。通过蛋白质互作网络(protein-protein interaction networks,PPI)分析交集基因以此鉴定出枢纽基因。进一步通过荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR,qPCR)确定筛选出的异常表达的枢纽基因是否也在受母体葡萄膜炎影响的子代小鼠中差异表达,最后通过视网膜抗原 IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 诱导受母体活动期炎症影响的子代以评价母体葡萄膜炎对子代患葡萄膜炎的易感性以及相关免疫效应的影响。**结果** 从受双亲葡萄膜炎影响的子代小鼠眼球组织中鉴定出 72 个免疫相关差异基因。这些基因主要富集参与 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路以及 B 细胞受体信号通路等。进一步进行 PPI 网络互作分析,筛选出 proteasome 26S subunit, ATPase 5 (Psmc5)、proteasome 26S subunit, ATPase 3 (Psmc3)、proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4 (Psmc4) 和 proteasome 26S subunit, non-ATPase 8 (Psmc8) 这 4 个枢纽基因。qPCR 检测证实受母体葡萄膜炎影响的子代小鼠中也上调表达这 4 个枢纽基因。而且与健康子代相比,150 μ g IRBP 抗原诱导可增加受活动期炎症影响的子代 EAU 临床表现的严重程度和病理组织学损伤($P = 0.0087, P = 0.0410$);另外,受母体活动期炎症影响的子代在 IRBP 诱导的 EAU 中脾 T 细胞增殖功能增强,其血清中产生的细胞因子 IL-17 和 IL-6 增加($P = 0.0450, P = 0.0300$)。**结论** 母体活动性炎症暴露加剧子代小鼠受 IRBP 诱导的 EAU 疾病的严重性,增强抗原特异性 T 细胞增殖以及血清中 IL-17、IL-6 的产生,可能与受影响的子代上调表达的 4 个枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 相关。

【关键词】 实验性自身免疫性葡萄膜炎;胚胎炎性暴露;子代;枢纽基因;炎症严重程度

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0297-10

Impact of embryonic uveitis exposure on response of mouse offspring to interphotoreceptor retinoid-binding protein-induced experimental autoimmune uveitis

【基金项目】 国家自然科学基金(81670843),重庆医科大学未来医学青年创新团队发展支持计划(W0164)。

Funded by the National Natural Science Foundation Project (81670843), Chongqing Medical University Program for Youth Innovation in Future Medicine (W0164).

【作者简介】 徐菲,女,在读硕士研究生,研究方向:母本葡萄膜炎对子代的影响。Email:xfel163com@163.com

【通信作者】 陈飞兰,女,研究员,博士,研究方向:葡萄膜炎免疫遗传学及疾病动物模型。Email:cf1761219@163.com

XU Fei¹, LIU Jianping², DONG Shifang³, HUANG Hui¹, GONG Xinyi¹, HU Kaijiao¹, CHEN Feilan^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Pathology, Army Medical University, Chongqing 400042, China; 3. Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Corresponding author: CHEN Feilan. E-mail: cfl761219@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of embryonic inflammatory exposure on the response of mouse offspring to interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)-induced experimental autoimmune uveitis (EAU). **Methods** RNA transcriptome sequencing data from eyeballs of C57BL/6J mouse offspring born to mothers with active EAU were used to screen immune-associated differentially expressed genes in the eyes of the exposed offspring. Gene fragments overlapping in the two datasets were screened using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses to identify biological pathways associated with the gene fragments. Hub genes were identified from these intersecting genes by protein-protein interaction network analysis. EAU models of maternal uveitis were established by immunization with IRBP₆₅₁₋₆₇₀, and expression levels of the pivotal genes in the offspring exposed to inflammation by maternal uveitis were examined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction. EAU severity, T lymphocyte proliferation, and serum cytokines were detected to investigate the immune effect in offspring from mothers with an active inflammation response to IRBP induction. **Results** Microarray analysis identified 72 immune-related differentially expressed genes in exposed samples compared with the findings in control samples. These genes were mainly enriched in Toll-like receptor signaling, mitogen-activated protein kinase signaling, and B cell receptor signaling pathways. Protein-protein interaction network interaction analysis screened out four hub genes, Psmc5, Psmc3, Psmd4, and Psmd8, and mRNA levels of these four genes were increased in the adult offspring from mothers with active uveitis compared with the findings in healthy offspring. In addition, the group induced with 150 μg IRBP showed an increase in the severity of clinical and pathological outcomes in offspring with EAU affected by active inflammation, compared with the healthy offspring group ($P = 0.0087$, $P = 0.0410$). Meanwhile, T cell proliferation in the offspring was enhanced during the inflammatory activity stage and secretion of the inflammatory cytokines interleukin (IL)-17 and IL-6 was increased ($P = 0.0450$, $P = 0.0300$). **Conclusions** Psmc5, Psmc3, Psmd4, and Psmd8 may be important genes exacerbating uveitis in offspring of mothers with active uveitis, associated with increased T cell proliferation and production of IL-17 and IL-6.

【Keywords】 experimental autoimmune uveitis; embryonic inflammatory exposure; offspring; pivotal gene; inflammation severity

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

葡萄膜炎 (uveitis) 是一类世界性的致盲性眼病,也是我国最常见的眼内炎症性疾病,其炎症主要累及眼组织内的葡萄膜、视网膜、视网膜血管和玻璃体等。非感染性葡萄膜炎作为我国最主要的葡萄膜炎类型之一,占有葡萄膜炎的 43.6%。其平均发病年龄为 35.4 岁,以 30 ~ 39 岁最多,由此可见工作年龄和生育年龄人群是非感染性葡萄膜炎高危年龄群^[1]。家族聚集性研究发现,患葡萄膜炎的母亲其所生孩子在一定年龄时也会患上葡萄膜炎^[2-3]。而且,流行病学调查结果显示,患葡萄膜炎的儿童越来越多,越来越幼龄化^[4]。

近年来,研究发现孕妇孕期健康对后代健康和疾病风险的形成具有重要作用。母体免疫激活会

影响子代成年后多种疾病的发生,如自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD)、注意力缺陷多动障碍 (attention deficit and hyperactivity disorder, ADHD)、图雷氏综合征 (Tourette syndrome, TS) 等^[5]。另外,母亲孕期受到的急性或慢性炎症刺激,也可通过炎症细胞信号通路和表观遗传学机制将影响传递给胎儿。本课题组前期研究发现,在 B10R III 小鼠和 C57BL/6J 小鼠中,双亲发生实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experience autoimmune uveitis, EAU) 可增加子代鼠患葡萄膜炎的易感性^[6-7]。但母体孕期葡萄膜炎是否能影响成年子代对视网膜抗原诱导的葡萄膜炎并不清楚。

由此,本课题组从前期受双亲 EAU 影响的

C57BL/6J 小鼠子代 RNA 转录组测序数据中筛选出与免疫相关的差异表达基因,通过基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析,京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 和蛋白质互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI) 分析,筛选出可能参与子代易感性的 4 个上调表达的枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8,随后研究人员通过荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time PCR, qPCR),证实受母体孕期葡萄膜炎影响的子代上调表达这 4 个枢纽基因,进一步发现受影响的子代在 150 μg /200 μL 免疫剂量下产生更严重的葡萄膜炎,血清中细胞因子 IL-17、IL-6 增加,由此提示母体葡萄膜炎可能通过上调免疫相关基因加剧成年子代受视网膜抗原诱导的葡萄膜炎严重程度,可为葡萄膜炎危险因素预测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 ~ 12 周 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 48 只 (雌性 27 只,雄性 21 只),体重约为 25 g,购自重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2022-0010】,饲养于重庆医科大学实验动物中心屏障环境系统【SYXK(渝)2022-0016】。实验动物可自由采食和饮水,维持 12 h/12 h 明暗交替照明,湿度 30% ~ 70%,温度保持在 22 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 。本研究中的所有程序都遵循重庆医科大学医学研究伦理委员会动物使用声明中关于动物护理和使用的指导方针,经过重庆医科大学医学研究伦理委员会批准 (IACUC:2021064)。

1.1.2 主要试剂与仪器

IRBP₆₅₁₋₆₇₀ (LAQGAYRTAVDLESLASQLT, 强耀生物科技有限公司,中国),结核菌素 (*Mycobacterium tuberculosis*, TB, Sigma, 美国),完全弗氏佐剂 (Freund's adjuvant complete, CFA, Sigma, 美国),百日咳毒素 (*Bordetella pertussis*, PTX, List, 美国),MTT (Solarbio, 中国),ELISA 试剂盒 (mouse IL-17A/F heterodimer DuoSet ELISA; mouse IL-6 quantikine ELISA kit; mouse TNF- α DuoSet ELISA, R&D systems, 美国),qPCR 相关试剂 (RNA 提取液;引物;逆转录试剂盒等,武汉赛维尔生物科技有限公司,中国)。LS 裂隙灯显微镜检查仪 (上邦医疗设备有限公司,中国),双目间接检眼镜检查系统

(Keeler, 英国),酶标仪 (Crystal, 美国),酶联免疫检测仪 (Bio-Tek, 美国),荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国),超微量分光光度计 (Thermo, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 EAU 模型的建立

为诱导母本 EAU,取溶解于 PBS 的人 IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 多肽溶液与包含 2.5 mg/mL 结核菌素的完全弗氏佐剂按 1 : 1 比例混合,充分乳化后,将包含 150 μg 人 IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 多肽的 200 μL 乳化剂注射至 3 只 8 ~ 12 周龄 C57BL/6J 雌鼠,分 4 点皮下注射至小鼠背部两侧和尾根部两侧,随后腹腔注射 1 μg 的百日咳毒素 (母本免疫组, MG),同时设立正常未免疫 IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 的健康对照 (HG)。MG 于免疫后第 15 天出现炎症临床表现后,将免疫后的雌鼠与健康雄鼠按 3 : 2 进行合笼交配。同时,以未经抗原免疫健康双亲所产同日龄的健康子代作为对照。实验重复 3 次。次日早上开始检查雌性小鼠的阴栓,以出现阴栓作为孕期第 1 天。为研究母本 EAU 对子代 EAU 易感性和严重性的影响,分别对 8 ~ 12 周的母本 EAU 炎症活动期子代小鼠和健康子代小鼠皮下注射 150 μg IRBP₆₅₁₋₆₇₀,该 IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 乳化在含有 2.5 mg/mL 结核分枝杆菌的 200 μL CFA 中,同时腹腔注射 0.5 μg PTX,得到炎症活动期子代组 (EG) 和健康子代组 (CG)。子代 EAU 模型实验重复 3 次,每次 EG 和 CG 各 3 只。

1.2.2 临床及组织学检查

子代小鼠免疫后自第 8 ~ 9 天起使用裂隙灯和眼底镜检查眼前端和眼底临床症状,每周检查 2 ~ 3 次。母本 EAU 小鼠于免疫后第 72 天取材。取抗原诱导的 EG 和 CG 小鼠在炎症高峰期 (免疫后的 27 d) 摘取眼球组织。眼球组织放置于 4% 戊二醛缓冲液中固定 60 min 后,再浸泡于 10% 中性福尔马林中固定 24 h。将固定后的眼球进行脱水、透明、石蜡包埋、切片以及苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色、光学显微镜下观察。采用双盲法参照 CASPI^[8] 报道的方法进行病理组织学的炎症评分。

1.2.3 T 淋巴细胞增殖实验

子代免疫后第 27 天,取 EG 和 CG 小鼠的脾和淋巴结。通过尼龙羊毛柱富集脾和淋巴结中的抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APC) 和 T 细胞。然后,分别将 1×10^5 个 APC 细胞和 4×10^5 个 T 细胞加入 96 孔板中,再向上述体系添加含 IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 的完全培养基,使体系最终浓度分别为

0、10、20 $\mu\text{g/mL}$ ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中孵育 72 h。然后加入 MTT，使用酶联免疫检测仪检测 490 nm 处 OD 值。

1.2.4 细胞因子检测

母本免疫后 72 d 收集其外周血血清，使用酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒检测细胞因子 IL-6 的产生，并取健康小鼠血清作为对照。此外，收集子代免疫后第 27 天，EG 和 CG 小鼠的外周血血清，使用酶标仪检测 IL-17、IL-6 以及 TNF- α 的表达。细胞因子的 ELISA 检测步骤严格按照说明书操作，大致分为以下步骤：包被一抗、样品稀释、加入待测样本、孵育二抗、辣根过氧化物酶孵育、A/B 显色剂孵育、终止显色、酶标仪检测 (450 nm 和 540 nm)。

1.2.5 荧光定量聚合酶链反应 (qPCR)

为了验证枢纽基因的表达，在 Applied Biosystems Bio-rad CFX 96 Real-Time PCR 检测系统上，采用 qPCR (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 预变性，95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 变性，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 退火/延伸共 40 个循环，从 65 ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ ，每升温 0.5 $^{\circ}\text{C}$ ，采集 1 次荧光信号生成熔解曲线)。方法对 4 个基因和 Cel-miR-39-3P 外源控制基因进行了 3 次表达。引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法测定相对基因表达量。

表 1 qPCR 引物

Table 1 Primers used for qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5' -3') Primer sequence (5' -3')
Cel-miR-39-3p	F: ACACTCCAGCTGGGTCACCGGTGTAAATC
	R: CTCAACTGGTGTCTGAGTCGGCAA TTCAGTTGAGCAAGCTGA
Psmc5	F: GGTGCCAGACTCAACCTACGA
	R: CAAACAGCTCCCTCACCATTC
Psmc3	F: CCTGCCGTACTTGTCTCCA
	R: GCATCCACCAACCAATCACT
Psmc4	F: CTCGGATGACGCCCTACTGA
	R: GACGTCATAGTCATCTCTCTCTT
Psmc8	F: CCTCAATCTCTCTTCTGCTAT
	R: GCTTTCCGCAGGGATGTTT

1.2.6 RNA 测序数据

数据来自本课题组前期的双亲免疫 500 μg IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 的 C57BL/6J 小鼠炎性后代眼球组织 RNA 测序 (RNA-seq) 结果^[6]。利用 R 软件包 DESeq2 (version 1.32.0) 进行差异分析 (将 $|\log_2(\text{FC})| > 2$ 且 $P < 0.05$ 的基因鉴定为 DEGs)，筛选数据中与免疫相关的差异基因，进一步对交集基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。最后进行 PPI

网络互作分析，包括度数 (DEGREE)、最大集团中心性 (maximum group centrality, MCC)、最大邻域分量 (maximum neighborhood component, MNC)、边缘渗透分量 (edge penetration component, EPC)、最大邻域分量的密度 (density of maximum neighborhood component, DMNC)，使用 Cytohubba 3.10.1 软件对 PPI 中的关键基因进行分析，根据基因的节点度和相互作用网络筛选出枢纽基因。

1.3 统计学分析

实验重复 2 ~ 3 次，以保证数据的准确性。数据的统计分析采用 SPSS 17.0，并以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 的形式呈现。实验组和对照组小鼠的临床及组织病理学评分通过 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis 检验进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 免疫相关差异基因的筛选

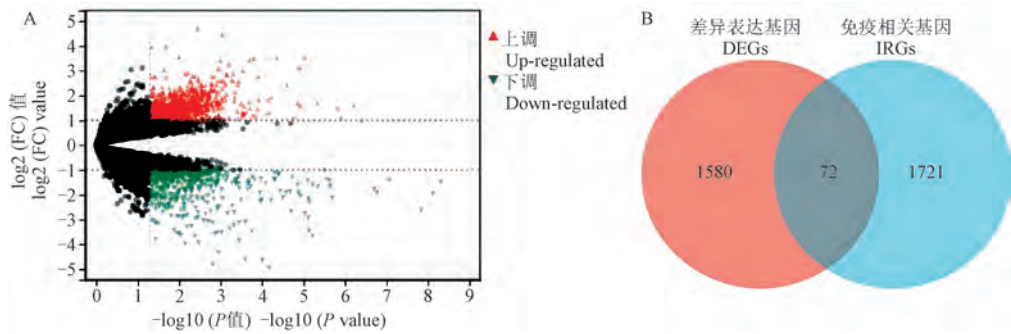
首先分析了来自先前双亲 C57BL/6J 小鼠 EAU 子代的眼球转录组测序数据集与健康双亲所生的健康子代样本之间的差异基因^[6]，根据两 (组) 样品之间表达水平的相对高低，确定出差异基因中表达上调和下调基因。如图 1 所示，与 HG 样本相比，双亲 EAU 子代眼球样本中共鉴定出 1652 个差异基因，其中包括 1108 个上调基因和 544 个下调基因 (图 1A)；其中与免疫相关的基因有 72 个 (图 1B)。

2.2 GO 和 KEGG 途径富集分析

对选取的 72 个交集基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。从 GO 分析中提取的生物过程 (biological process, BP) 结果显示，DEGs 主要富集于细胞趋化作用、趋化因子产生的活化以及趋化因子产生的调控等方面 (图 2A)；前 3 个富集的细胞组分 (cellular component, CC) 分别是蛋白酶体、内肽酶体和分泌颗粒管腔 (图 2B)；分子功能 (molecular function, MF) 分析显示，前 3 位富集的功能分别是荷尔蒙活性、趋化因子结合、细胞因子活性 (图 2C)。进一步对 72 个交集基因进行了 KEGG 通路富集分析。结果表明，这些基因显著富集于 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路以及 B 细胞受体信号通路等关键通路 (图 2D)。

2.3 PPI 网络和枢纽基因分析

为深入分析交集基因涉及的关键生物学通路，利用 STRING 数据库和 Cytoscape 构建了 PPI 网络，



注:A:差异表达基因;红色:上调基因;绿色:下调基因;B:差异表达基因与免疫相关基因的交集;DEGs:差异表达基因;IRGs:免疫相关基因。

图 1 双亲 EAU 子代小鼠差异表达基因火山图以及 DEGs 和 IRGs 交集基因

Note. A. Differentially expressed genes. Red. Up-regulated genes. Green. Down-regulated genes. B. Intersection of differentially expressed genes and immune-related genes. DEGs. Differentially expressed genes. IRGs. Immune-related genes.

Figure 1 Volcano map of differentially expressed genes as well as DEGs and IRGs intersecting genes in the offspring of parental EAU

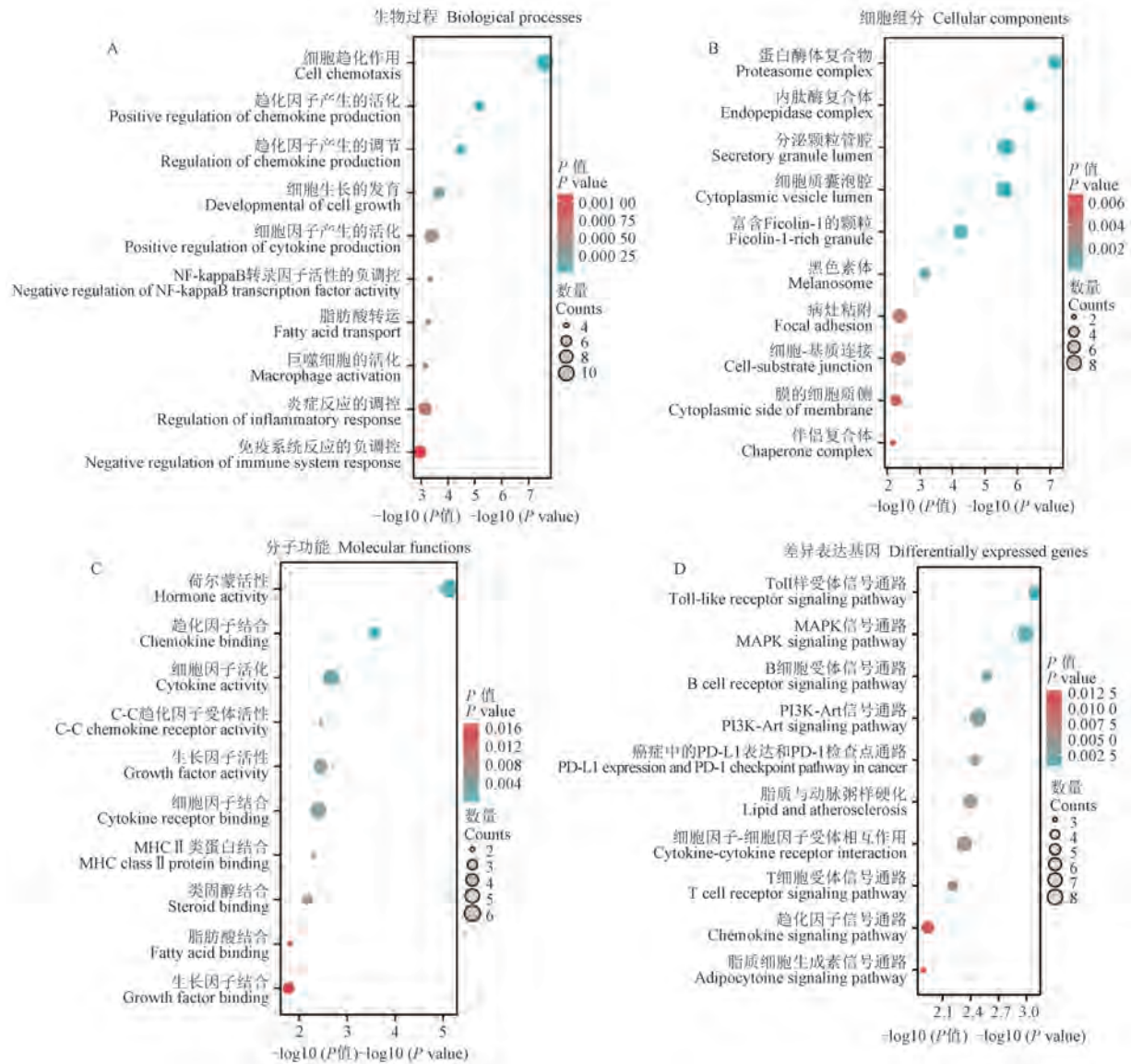
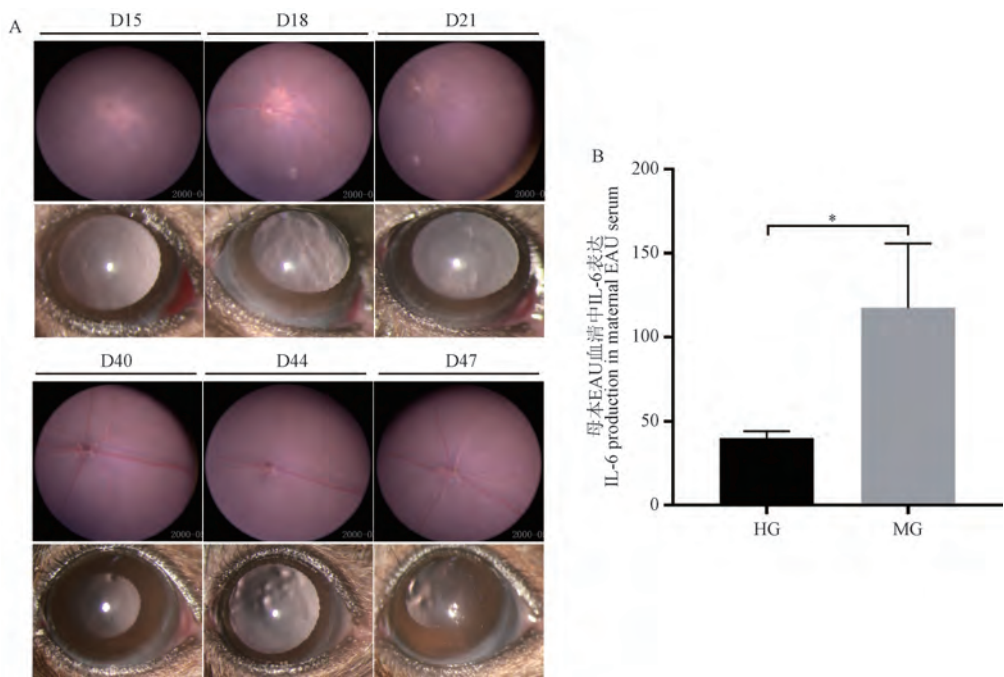


图 2 双亲 EAU 子代小鼠差异表达基因富集分析

Figure 2 Enrichment of differentially expressed genes in the offspring of parental EAU

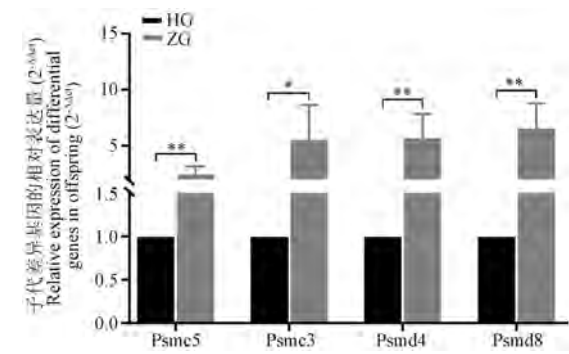


注:A;母本 EAU 的临床表现;D15 ~ D47 为免疫后天数(D15;免疫后第 15 天);B;母本 EAU 血清中 IL-6 的表达;与 HG 相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 4 母本 EAU 的临床表现($n = 6$)和血清中 IL-6 表达($n = 3$)

Note. A. Clinical manifestations of maternal EAU. D15 to D47 are the number of days after immunization (D15. Day 15 after immunization). B. Expression of IL-6 in serum of maternal EAU. Compared with HG, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Clinical manifestations ($n = 6$) and serum expression of IL-6 in maternal EAU ($n = 3$)



注;与 HG 相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 qPCR 法验证 RNA-seq 测序差异表达基因情况($n = 4$)

Note. Compared with HG, ** $P < 0.01$.

Figure 5 qPCR to verify RNA-seq sequencing differentially expressed genes($n = 4$)

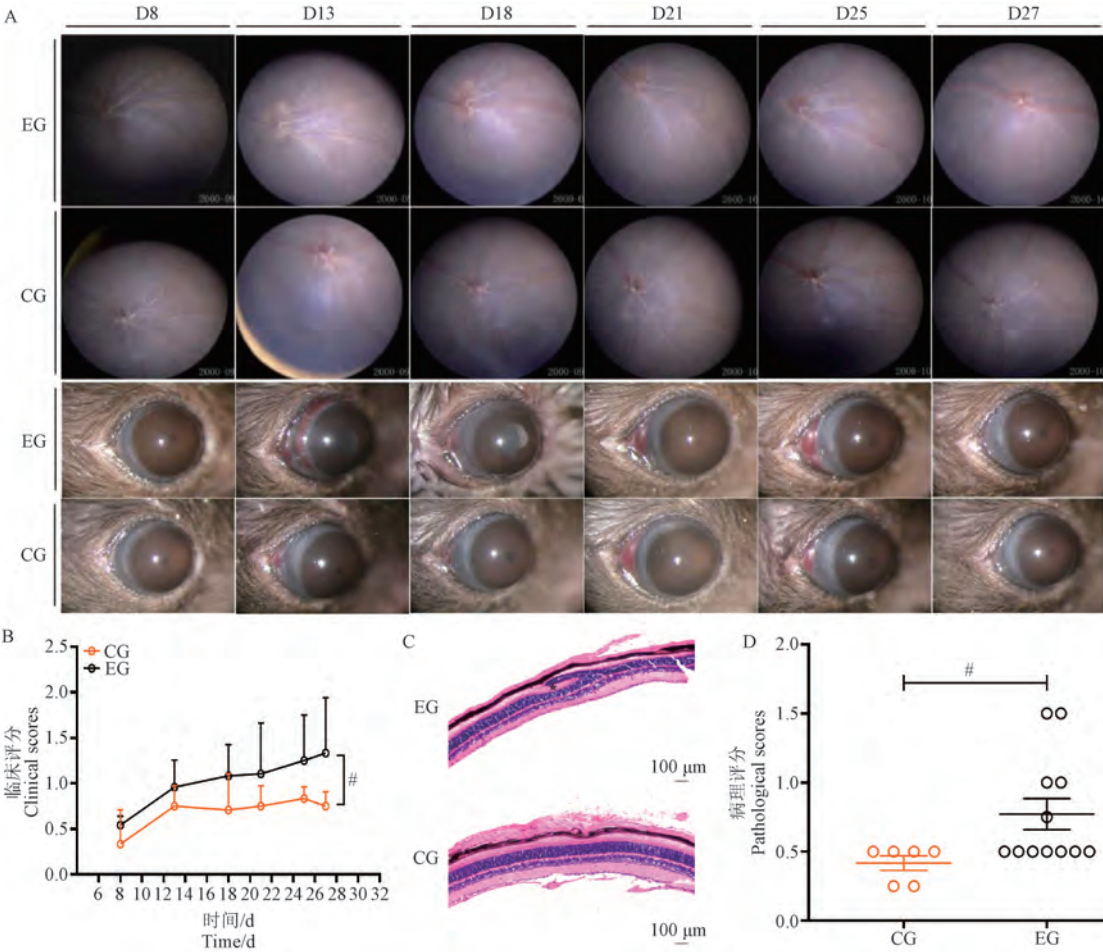
显著高于正常对照组($P = 0.0247$)。此外,如图 6C 病理组织学所示,EG 小鼠出现明显视网膜折叠或损伤,视盘血管和玻璃体腔中,可见散在的炎性细胞浸润,而 CG 小鼠眼底只有极少数的炎性细胞浸润。图 6D 显示,EG 小鼠组织病理学评分也显著性升高($P = 0.0410$)。

2.7 母本活动期炎症所孕子代产生 IRBP 特异性 T 细胞增殖增强反应

于 150 μg IRBP 免疫后第 27 天炎症高峰期取材,收集 EG 和 CG 小鼠 APC 细胞和 T 淋巴细胞,分别进行含 IRBP 或不含 IRBP 体外共培养。结果显示,EG 小鼠 T 细胞的增殖能力显著高于 CG 小鼠,且其增殖能力随 IRBP 浓度增加而增强(图 7, $P = 0.0002$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$)。以上结果提示,母本 EAU 可通过影响子代小鼠的视网膜抗原特异的 T 细胞增殖而调控对子代葡萄膜炎的严重程度。

2.8 母本活动性炎症所孕子代诱导的 EAU 产生更多的细胞因子 IL-17 和 IL-6

为了评估炎症活动期子代外周血细胞因子的产生情况,在抗原免疫后第 27 天,离心收集免疫后的 EG 和 CG 小鼠外周血血清,使用 ELISA 法检测炎症高峰期小鼠血清中细胞因子产生。结果显示,与 CG 相比,EG 小鼠血清中效应性 Th17 细胞特异性细胞因子 IL-17 和 APC 相关细胞因子 IL-6 显著性升高(图 8, $P = 0.0450$, $P = 0.0300$),TNF- α 并无显著性差异($P = 0.5730$)。以上结果表明,母本 EAU 可能通过增加子代鼠 EAU 中细胞因子 IL-17

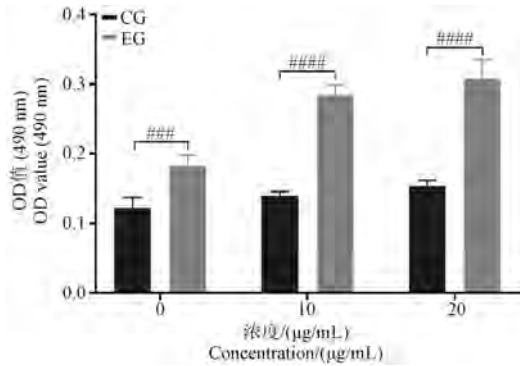


注:A:子代小鼠的临床表现;B:子代小鼠的临床评分($n = 6$);C:子代小鼠的病理组织学表现;D:子代小鼠的病理组织学评分(n (CG) : n (EG) = 6:10);五角星表示视网膜折叠或损伤;与 CG 相比, $^{\#}P < 0.05$ 。(下图同)

图 6 免疫 150 μg IRBP 子代小鼠的 EAU 炎症反应

Note. A. Clinical manifestations of offspring mice. B. Clinical scores of offspring mice ($n = 6$). C. Histopathological appearance of offspring mice. D. Histopathological scores of offspring mice (n (CG) : n (EG) = 6:10). Pentagrams show retinal folding or damage. Compared with CG, $^{\#}P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 6 Inflammation response of offspring mice immunized with 150 μg IRBP



注:与 CG 相比, $^{###}P < 0.001$, $^{####}P < 0.0001$ 。
图 7 免疫 150 μg IRBP 子代小鼠的 T 细胞增殖($n = 3$)
Note. Compared with CG, $^{###}P < 0.001$, $^{####}P < 0.0001$.

Figure 7 T-cells proliferation of offspring mice immunized with 150 μg IRBP ($n = 3$)

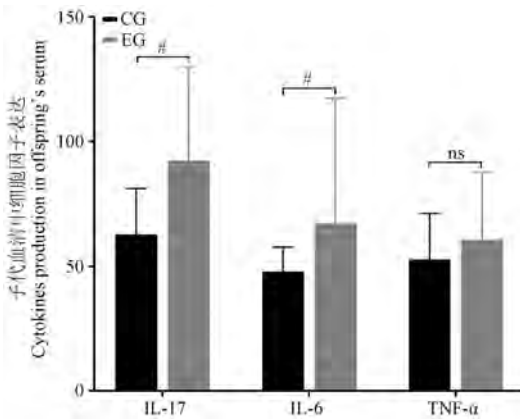


图 8 免疫 150 μg IRBP 子代小鼠血清中炎症细胞因子的表达($n = 3$)

Figure 8 Expression of inflammatory cytokines in serum of 150 μg IRBP ($n = 3$)

和 IL-6 的产生,从而增加对母本 EAU 严重性的影响。

3 讨论

在本研究中,利用 R 语言对先前双亲 EAU C57BL/6J 小鼠子代 RNA 转录组数据进行深入挖掘,通过 GO、KEGG 以及 PPI 网络互作分析,筛选出参与亲本葡萄膜炎影响子代的 4 个枢纽基因: Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8,可能通过调控 Toll 样受体信号通路、MAPK 信号通路以及 B 细胞受体信号通路等途径来发挥作用。此外,本文进一步研究了胚胎期葡萄膜炎暴露对新生 C57BL/6J 小鼠患葡萄膜炎的影响。数据表明,这 4 个基因在受母本葡萄膜炎影响的炎症活动期子代小鼠(ZG)中上调表达。此外,与 CG 小鼠相比,150 μ g IRBP₆₅₁₋₆₇₀ 诱导的受母本 EAU 影响的炎症活动期 EG 小鼠葡萄膜炎的严重程度增强。

与先前报道的研究结果相符^[6],本研究在炎症后代免疫后 27 d 的血清中检测到参与亲本葡萄膜炎影响子代发生发展的枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 的显著上调。这 4 个基因一直是神经退行性疾病(阿尔茨海默症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、脊髓灰质炎等)或癌症(直肠癌、肺癌、乳腺癌等)等领域广泛关注的基因。近期研究发现, Psmc5 和 Psmc3 蛋白酶体基因通过产生变体扰动 T 细胞 I 型干扰素(interferon, IFN)信号传导通路,在蛋白酶体相关自身炎症综合征(proteasome-associated autoinflammatory syndrome, PRAAS)致病^[9]、神经发育障碍发病机制等方面起促进作用^[10]。此外, Psmc5 可以调节多种途径,包括上皮间充质转化、缺氧和免疫反应等, Psmc5 还与 CD8⁺ T 细胞和 B 细胞的水平呈负相关,可以促进巨噬细胞和中性粒细胞的浸润^[11]。一项关于年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的研究发现,控制蛋白质相互作用时空顺序的 Hsp90 与 Psmc4 和 Psmc8 相互作用,以调节 AMD 进展过程中错误折叠蛋白的降解。 Psmc4 通过编码蛋白,招募核因子 κ B 抑制因子 α (NF- κ B inhibitor alpha, I κ B- α)进而活化 B 细胞核因子 kappa 轻链增强子(nuclear factor-kappa B, NF- κ B),以诱导细胞衰老^[12]。而 Psmc8 作为 19S 蛋白酶体调节复合体亚基,主要参与能量代谢、DNA 复制、蛋白质合成等生物过程。研究发现, Psmc8 的过表达可显著增强卵

巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[13]。本文结果与之前的报道一致^[6-7],即暴露于母本活动性炎症的子代小鼠在视网膜抗原刺激下可产生更严重的炎症反应:视盘和玻璃体腔中出现大量炎症细胞浸润以及明显的特异性 T 细胞增殖。

EAU 是一种由 T 细胞介导的针对神经视网膜细胞,尤其是光感受器细胞的自身免疫反应。Th17 是介导自身免疫性葡萄炎的主要致病性 T 细胞,并且由 Th17 细胞产生的高水平 IL-17 被认为是致病性的关键。研究证明, IRBP₁₆₁₋₁₈₀ 诱导的 B10R Ⅲ小鼠 EAU 模型,表现出以 Th17 细胞及其分泌细胞因子 IL-17 为主的免疫反应特征。并且 B10R Ⅲ双亲葡萄膜炎可能通过 T 细胞和 IL-17 的产生,增加后代对 EAU 的易感性^[7]。而本文在免疫 150 μ g 抗原的子代小鼠血清中发现 IL-17 细胞因子水平升高,这和之前的研究结果一致^[7],说明 Th17 细胞在胚胎期炎症暴露中受到了影响,并可能因此增加了子代小鼠患葡萄膜炎的严重程度。IL-6 是一种由巨噬细胞和 T 细胞产生的多效性细胞因子,被认为是包括葡萄膜炎在内的自身免疫性疾病的重要介质^[14]。IL-6 在生理情况下水平非常低,但在系统性红斑狼疮、白塞氏病相关性葡萄膜炎、类风湿关节炎等炎症期间,IL-6 的水平显著增加^[15-16]。而本文在母本 EAU 体内和 150 μ g 免疫的子代小鼠体内都发现了 IL-6 细胞因子明显增加,即 IL-6 参与了胚胎炎症暴露增加小鼠患葡萄膜炎严重程度这一过程,并将炎症传递给胎儿。

综上所述,参与双亲葡萄膜炎影响子代葡萄膜炎发生发展相关的 4 个枢纽基因 Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 还影响了受母本活动性炎症暴露的子代小鼠,导致子代小鼠在视网膜抗原诱导下产生更严重的葡萄炎。因此, Psmc5、Psmc3、Psmc4、Psmc8 有望成为预测葡萄膜炎的可能危险因素,为探讨母本患葡萄膜炎对子代的影响提供理论证据。

参 考 文 献(References)

- [1] YANG P, ZHONG Z, DU L, et al. Prevalence and clinical features of systemic diseases in Chinese patients with uveitis [J]. Br J Ophthalmol, 2021, 105(1): 75-82.
- [2] JULIÁN K, TERRADA C, QUARTIER P, et al. Uveitis related to juvenile idiopathic arthritis: familial cases and possible genetic implication in the pathogenesis [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2010, 18(3): 172-177.
- [3] DUSEK J, URBANOVA I, STEJSKAL J, et al. Tubulointerstitial nephritis and uveitis syndrome in a mother and her son [J]. Pediatr Nephrol, 2008, 23(11): 2091-2093.

[4] SHSKONEN M, HIRN I, PESÄLÄ R, et al. Prevalence, incidence and epidemiology of childhood uveitis [J]. Acta Ophthalmol, 2021, 99(2): e160-e163.

[5] HAN V X, PATEL S, JONES H F, et al. Maternal immune activation and neuroinflammation in human neurodevelopmental disorders [J]. Nat Rev Neurol, 2021, 17(9): 564-579.

[6] LIU J, YIN G, HU K, et al. Parental uveitis causes elevated hair loss in offspring of C57BL/6J mice [J]. Exp Eye Res, 2022, 219: 109056.

[7] YIN G, ZENG W, HU K, et al. Parental uveitis influences offspring with an increased susceptibility to the experimental autoimmune uveitis [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1053.

[8] CASPI R R. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse [J]. Curr Protoc Immunol, 2003, 15: 1-20.

[9] PAPENDORF J J, EBSTEIN F, ALEHASHEMI S, et al. Identification of eight novel proteasome variants in five unrelated cases of proteasome-associated autoinflammatory syndromes (PRAAS) [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1190104.

[10] EBSTEIN F, KÜRY S, MOST V, et al. PSMC3 proteasome subunit variants are associated with neurodevelopmental delay and type I interferon production [J]. Sci Transl Med, 2023, 15(698): eabo3189.

[11] HE Z, YANG X, HUANG L, et al. PSMC5 promotes proliferation and metastasis of colorectal cancer by activating epithelial-mesenchymal transition signaling and modulating immune infiltrating cells [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 657917.

[12] XING C, LIU X F, ZHANG C F, et al. Hsp90-associated DNA replication checkpoint protein and proteasome-subunit components are involved in the age-related macular degeneration [J]. Chin Med J, 2021, 134(19): 2322-2332.

[13] LI X, LI X, HU Y, et al. PSMD8 can serve as potential biomarker and therapeutic target of the PSMD family in ovarian cancer: based on bioinformatics analysis and *in vitro* validation [J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 573.

[14] LIN P. Targeting interleukin-6 for noninfectious uveitis [J]. Clin Ophthalmol, 2015, 9: 1697-1702.

[15] NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. Interleukin 6: from bench to bedside [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(11): 619-626.

[16] TAKEUCHI M, KARASAWA Y, HARIMOTO K, et al. Analysis of Th cell-related cytokine production in behçet disease patients with uveitis before and after infliximab treatment [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2017, 25(1): 52-61.

[收稿日期] 2023-11-28

《中国实验动物学报》2024 年征订启事

《中国实验动物学报》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。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。

开设栏目:研究论著和研究快报。

读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,140 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,合 600 元。邮发代号:2-748。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

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

韦梦晨,范胜涛,吴海婷,等. 核定位人源 α -突触核蛋白转基因小鼠的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 307-316.
WEI M C, FAN S T, WU H T, et al. Establishment of the human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mice [J]. Acta
Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 307-316.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.004

核定位人源 α -突触核蛋白转基因小鼠的建立

韦梦晨, 范胜涛, 吴海婷, 张艺薇, 王子鸥, 黄璋琼*

(北京协和医学院 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

【摘要】 目的 建立一种核定位人源 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 转基因小鼠, 并探究人源 α -syn 核输入对小鼠行为的影响。**方法** 构建 hSNCA-NLS 和 EGFP 的慢病毒载体, 利用显微注射法建立转基因小鼠模型, 通过 PCR 和 Western Blot 方法鉴定转基因首建鼠及其子代基因型和蛋白表达情况。采用免疫荧光鉴定人源 α -syn 在小鼠脑组织中的共定位情况, 同时采用旷场、转棒、O 迷宫实验评价转基因小鼠的行为改变情况。**结果** hSNCA-NLS 基因成功插入小鼠基因组中, 人源 α -syn 成功表达, 并且有明显的核定位现象。进一步研究发现, 核定位人源 α -syn 转基因小鼠在 2 月龄时开始表现出了运动功能障碍, 发生了星形胶质细胞增生和炎症反应, 于 9 月龄时表现出了明显的焦虑样症状, γ -氨基丁酸 (GABA) 基因表达减少, 这些表现一直持续到小鼠 12 月龄。**结论** 成功构建了核定位人源 α -syn 转基因小鼠, 小鼠表现出明显的运动功能障碍和焦虑样症状。该模型的成功建立可以为研究 α -syn 核定位现象在帕金森病中的作用提供一定的研究基础。

【关键词】 人源 α -突触核蛋白; 小鼠; 核定位; 转基因; 运动功能障碍

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0307-10

Establishment of the human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mice

WEI Mengchen, FAN Shengtao, WU Haiting, ZHANG Yiwei, WANG Ziou, HUANG Zhangqiong*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College, Kunming 650118, China)

Corresponding author: HUANG Zhangqiong. E-mail: hzhq2013@163.com

【Abstract】 Objective To establish a human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mouse model and investigate the effects of α -synuclein nuclear localization on the behavior of mice. **Methods** Human α -synuclein nuclear localization signal and EGFP lentiviral vectors were constructed. Transgenic mice were created with the microinjection method. Using PCR and Western Blot method to identify the genotypes and protein expression of the transgenic founder mice and their offsprings. The immunofluorescence was used to examine the localization of human α -synuclein in the mouse brain tissue. The behavioral changes of the transgenic mice were evaluated by the open field test, rotarod test, and O maze test. **Results** The hSNCA-NLS gene was successfully inserted into the mouse genome, the human α -syn was successfully expressed, and the human α -syn has localized with the nuclear. Further studies found that human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mice had significant motor dysfunction, astrocyte proliferation and inflammatory response at 2 months of age and exhibited significant anxiety-like symptoms and reduced expression of the γ -aminobutyric acid (GABA) gene at 9 months of age, which persisted until 12 months of age. **Conclusions** A human α -synuclein nuclear localization signal transgenic mouse model has been successfully established. The mice exhibit significant motor dysfunction and

【基金项目】 云南省技术创新人才培养对象项目 (202105AD160018, 202005AD160006), 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-043), 国家自然科学基金联合基金项目 (U2202214), 科技创新 2030-重大专项 (2023ZD0406306)。

Funded by Technology Innovation Talents Project of Yunnan Province (202105AD160018, 202005AD160006), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2021-I2M-1-043), Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U2202214), Scientific and Technological Innovation 2030 (2023ZD0406306).

【作者简介】 韦梦晨, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 药理学及人类疾病转基因动物模型建立。Email: 1633494575@qq.com

【通信作者】 黄璋琼, 女, 主任技师, 研究方向: 药理学及人类疾病转基因动物模型建立。Email: hzhq2013@163.com

anxiety-like symptoms. The successful establishment of this model provides a foundation for studying the role of α -syn nuclear localization in Parkinson's disease.

[Keywords] human α -synuclein; mouse; nuclear localization; transgenic; motor dysfunction

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是世界上常见的神经系统退行性疾病,60 岁以上老人的发病率约为 1%^[1],PD 的主要临床特征表现为运动功能障碍,如静止性震颤、肌肉僵直和运动迟缓,病理特征表现为中脑黑质致密部和其他神经系统区域神经元的丢失,路易体和路易神经突的存在^[2]。而路易体主要是由 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn) 构成^[3], α -syn 在生理状态下作为单体存在,参与调节突触功能和可塑性,囊泡转运和神经递质释放^[4],但当与其他蛋白质相互作用或在某些特定的应激诱导条件下时, α -syn 可能聚集或发生构象变化^[5]形成纤维体或者多聚体,使 α -syn 成为毒性蛋白。因此,了解清楚 α -syn 的结构和功能及其在帕金森病形成和发展过程中的作用对帕金森病的研究起着至关重要的作用。而以往针对 α -syn 的研究主要集中于其定位在细胞质中的研究^[4-8],而细胞核中 α -syn 的功能研究并不多^[9]。在特定条件下, α -syn 会出现向细胞核聚集的现象^[10],而且也在路易体痴呆患者死后的尸体组织中检测到了很明显的 α -syn 核定位的现象^[11]。有研究表明, α -syn 在细胞核中能够与组蛋白发生相互作用,从而调节自己的构象及聚集特性^[12],通过抑制组蛋白的乙酰化促进神经毒性^[13]。除此之外, α -syn 还能够与细胞核中的双链 DNA 作用,并促进 α -syn 纤维的形成,从而形成 PD 的病理性标志^[14]。编码 α -syn 的基因 SNCA 在发生 G51D 突变时会在哺乳动物细胞和初级神经元中产生明显的核定位现象^[15],也有研究发现 SNCA 基因发生 A53T、A30P 突变时, α -syn 会在细胞核中聚集加剧毒性,同时 α -syn 的核定位还会加速细胞的死亡^[13],这表明 α -syn 的核定位可能与 PD 密切相关。因此,本研究旨在通过构建 hSNCA-NLS 和 EGFP 的慢病毒载体,利用显微注射法建立核定位人源 α -syn 转基因小鼠,并初步探究核定位人源 α -syn 对小鼠的行为影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雌性 60 只(供体,超

排),雄性 15 只(供体),7 ~ 8 周龄,体重 20 ~ 23 g;SPF 级 ICR 小鼠,雌性 40 只(受体),雄性 20 只(结扎),7 ~ 8 周龄,体重 21 ~ 25 g;购自中国医学科学院医学生物学研究所小动物部【SCXK(滇)K2022-0002】。小鼠饲养在由中国医学科学院医学生物学研究所小动物部提供的温度 20 ~ 24 ℃,湿度 30% ~ 70% 屏障环境中【SYXK(滇)K2022-0006】,自由进水和进食,采用昼夜 12 h 间断照明。实验经中国医学科学院医学生物学研究所实验动物伦理委员会审核批准(DWSP202209 006),实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予动物人道关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)购自宁波三生物技术有限公司;鼠尾基因型快速鉴定试剂盒(货号: D7283 M)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 5 × (货号: P0015 L)购自碧云天生物技术有限公司;RIPA 裂解液(货号: CW2333)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: CW0014 S)购自康为科技有限公司;人源 α -syn 单克隆抗体 α -synuclein (MJFR1) (货号: ab138501)、DAPI(货号: ab104139)购自英国 Abcam;GFAP 鼠单克隆抗体(货号: G3893)、RNA 提取试剂 TRIzol reagent(货号: T9424)和 TEMED(货号: 17919)购自美国 Sigma;预染蛋白 Marker(货号: MP102-02)购自诺唯赞生物科技股份有限公司;聚丙烯酰胺凝胶(货号: 1610183)购自美国 Bio-Rad;qPCR 试剂盒(货号: PM160A)、GoScript 反转录系统(货号: PRA5000)购自美国 Promega;氯仿(货号: 865-49-6)、过硫酸铵(货号: 7727-54-0)购自国药集团化学试剂有限公司;磁珠(货号: P3031300)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;BSA(货号: 4240GR500)、脱脂奶粉(1172GR500)、Tris-base(货号: 1115GR500)、甘氨酸(1275KG001)购自德国 BioFRoxx;蛋白酶抑制剂(货号: P2714)、M2 培养液、磷酸酶抑制剂(货号: 4906845001)购自德国 Millipore,EDTA 抗原修复液(货号: SL1860)购自北京酷来搏科技有限公司;4%多聚甲醛固定液(货号:

G1101)、1 × PBS、(货号:G4202)、环保型脱蜡透明液(货号:G1128)购自塞维尔生物科技有限公司;即用型麻醉剂(货号:M2910)购自南京爱贝生物科技有限公司;无水乙醇(货号:32061)、异丙醇(货号:67-63-0)购自西陇科学股份有限公司;594 波长免疫荧光兔二抗(货号:A-11001)购自美国 Invitrogen; Western Blot 800 nm 近红外鼠源荧光二抗(货号:926-32210)、Western Blot 800 nm 近红外兔源荧光二抗(926-32211)、Western Blot 700 nm 近红外鼠源荧光二抗(926-68070)和 Western Blot 700 nm 近红外兔源荧光二抗(926-68071)购自美国 Licor。

荧光定量 PCR 仪、电泳槽、转膜仪和 Western Blot 电泳仪购自美国 Bio-Rad; SMART 小动物行为学检测系统购自深圳瑞沃德公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体的构建及小鼠超排、显微注射及移植

哺乳动物基因表达慢病毒载体 pLV-hSNCA-NLS 和空载体 pLV-EGFP,使用的是 EF1A 启动子,人 SNCA 的 cDNA 为表达基因,由云舟生物技术有限公司构建及包装,病毒滴度为 1.37×10^9 TU/mL。以 7 ~ 8 周龄 ICR 雌性小鼠为假孕鼠,7 ~ 8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠为供体鼠。超数排卵:第 1 天腹腔注射 10 IU PMSG,48 h 后注射 hCG。将超排卵后的 C57BL/6J 雌性小鼠与 C57BL/6J 雄性小鼠交配,见栓后从输卵管中收集受精卵。注射 hCG 后 24 ~ 25 h 后,将 pLV-hSNCA-NLS 和 pLV-EGFP 注射到原核明显的受精卵中,注射完毕后置于 37 ℃ 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。直至受精卵发育至 2-细胞期,移植到 0.5 dpc 的假孕 ICR 雌性小鼠输卵管中,移植后饲养于屏障环境。

1.2.2 转基因鼠的鉴定

(1)PCR 基因鉴定

获得首建鼠后与野生型小鼠杂交,获得的子代鼠经 PCR、Western Blot 和免疫荧光鉴定为阳性后即为核心定位人源 α-syn 转基因小鼠。鉴定首建鼠和子代鼠的上下游引物序列见表 1。实验前用 75%乙醇冲洗剪刀和镊子,取约 0.5 cm 的鼠尾尾尖置于配制好的 100 μL 消化液中,将样品置于 55 ℃ 水浴,孵育 15 min。之后将样品置于 95 ℃ 水浴,孵育 5 min 最后向上述样品中加入 100 μL 的 Stop Solution,涡旋混匀。配制 20 μL 的 PCR 体系:ddH₂O 8 μL,引物混合物 1 μL,模板 1 μL,PCR Master Mix 10 μL,

PCR 反应参数设置为 94 ℃ 起始变性 3 min,循环参数为 94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,35 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因名称 Gene name	引物 Primer
SNCA	F:5'-TGTGGCTGCTGCTGAGAAAACC-3' R:5'-TTCCTTCTCTGTGGGGCTCCTTC-3'
EGFP	F:5'-CCTCGTGACCACCTGACCTAC-3' R:5'-GATGTTGCCGTCCTCCTGAAGTC-3'

(2)Western Blot

处死小鼠后取小鼠脑组织于 1.5 mL 的 Ep 管中,将 Ep 管置于冰上,之后加入磁珠和 RIPA 裂解液进行研磨提取组织中的蛋白,待研磨结束后,将样本置于冰上静置 20 min,之后 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,取上清用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。蛋白浓度统一调整为 3 μg/μL。之后加 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸 10 min,待用。配制 SDS-PAGE 胶,上样,80 V 电压跑 30 min 后将电压调至 120 V 继续跑 60 min,之后用半干转仪进行转膜,5% BSA 室温封闭 60 min 后,4 ℃ 抗体过夜孵育, TBST 洗膜每次 10 min,共 3 次,之后用 Western Blot 鼠或兔源荧光二抗室温孵育 60 min, TBST 洗膜每次 10 min,共 3 次,Odyssey 红外激光扫描系统进行显影。

(3)免疫荧光

先用麻醉剂将小鼠深度麻醉,然后用 4%多聚甲醛对小鼠进行灌注,取出脑组织后用 4%多聚甲醛对组织固定 48 h,脱水机脱水处理,包埋处理后切片厚度为 4 μm。切好的片子 65 ℃ 烘箱烤片,常规脱蜡水化,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,EDTA 抗原修复液微波炉煮沸进行抗原修复 25 min,抗原修复结束后将切片放至室温,山羊血清室温封闭 60 min 后,滴加相应一抗,4 ℃ 过夜孵育,孵育结束后先将切片取出置于室温,放至与环境温度相同,PBS 洗 3 次,每次 5 min,后滴加相应荧光二抗,DAPI 封片后用 Panoramic MIDI 病理切片扫描仪获取图片。

1.2.3 行为学实验

(1)旷场实验

实验开始前 2 d 每天抚摸小鼠 1 ~ 2 min。在正式实验当天,提前 2 h 将小鼠放置在实验区域内,让小鼠适应周围环境。先用 75%乙醇清洁实验箱,然后在软件中设置好相应的参数,记录好动物的编

号、日期、状态等信息等,75%乙醇挥发完后正式开始实验。先将实验动物从饲养笼中轻轻取出,将实验动物迅速放置于实验箱的中央区域,并立即离开,打开动物行为学分析软件,自动记录动物在箱体内的活动,实验时间为 5 min。每只小鼠测试完毕后用 75%乙醇清洁实验箱,待乙醇完全挥发后开始下一只小鼠的测试。

(2)O 迷宫实验

将实验动物由 O 迷宫的开放区域放置于 O 迷宫上,并立即离开,打开动物行为学分析软件,自动记录动物在箱体内的活动,实验时间为 5 min。

(3)转棒实验

在正式实验前 1 h,每只小鼠训练 5 min,使其能够在转棒仪上停留。仪器设置为总转动时长为 5 min,前 2 min 为匀加速运动,初始速度为 5 r/min,加速至 40 r/min,后 3 min 为匀速运动,转速 40 r/min。将小鼠放置在旋转杆上,启动仪器,记录每只小鼠于转棒上停留的时间,小鼠休息 30 min 后再次进行测试,共测 3 次,取 3 次的平均值为小鼠停留在转棒上的时间。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)

处死小鼠后取小鼠脑组织于 1.5 mL 的 Ep 管中,将 Ep 管置于冰上,之后加入磁珠和 1 mL TRIzol 进行研磨提取组织中的 RNA,待研磨结束后,置于冰上静置 10 min,之后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 2 min,取 800 μL 上清至新的离心管中并加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡,静置 5 min 后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min。离心后分为 3 层,用枪头吸取 400 μL 上清至新的 Ep 管中,之后加入 600 μL 异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置 10 min 后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,即可看见 RNA 沉淀。用 1 mL 75%的

乙醇洗涤 RNA 沉淀,之后于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 2 min,重复两次,充分洗涤 RNA 沉淀,最后用移液枪除去乙醇溶液,并将 Ep 管盖打开,干燥 15 min 后,加入 20 μL DEPC 水充分溶解,测定 RNA 浓度,本实验将每个 RNA 样本浓度统一调整为 1000 ng/μL, qPCR 引物信息见表 2。用逆转录试剂盒按照说明书进行逆转录,获取 cDNA。20 μL 逆转录体系为:RNA 5 μL、Mix 4 μL、ddH₂O 11 μL。逆转录程序设置为:退火 25 ℃ 5 min、延伸 42 ℃ 60 min、酶失活 70 ℃ 15 min。然后按照 qPCR 试剂盒说明书进行荧光定量,20 μL 的 qPCR 反应体系为:Mix 10 μL,引物混合物 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 8 μL。qPCR 程序设置为 95 ℃ 预变性 30 s, 循环参数为 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 95 ℃ 15 s, 35 个循环后 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s。最后采集荧光信号, 进行统计分析。

1.3 统计学分析

所有行为学图像与数据均采用 SMART V3.0 行为学视频分析系统监控捕获,实验数据的统计采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,应用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析,实验组 and 对照组之间的比较采用非配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性,图像采用 Adobe Illustrator 2020 软件处理和排版。

2 结果

2.1 哺乳动物基因表达慢病毒载体构建结果

将设计好的 hSNCA-NLS 质粒和 EGFP 空质粒送云舟生物技术有限公司进行哺乳动物基因表达慢病毒载体 pLV-hSNCA-NLS 和空载体 pLV-EGFP 的构建和包装,构建完成的载体图谱结果见图 1。

表 2 qPCR 引物序列
Table 2 qPCR primer sequences

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
GAPDH	5'-TTCAACGGGCACAGTCAAGGC-3'	5'-GACTCCACGACATACTCAGCACCC-3'
IL-1α	5'-GTCTGGGAGGAGACGACTCTAA-3'	5'-GTTTCTGGCAACTCCTTCAGC-3'
IL-1β	5'-ATGCCACCTTTTGACAGTGAT-3'	5'-ATGTGCTGCTGCGAGATTTG-3'
IL-6	5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTC-3'	5'-TTGCTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
IFN-γ	5'-GAGGAACTGGCAAAAGGATGCTG-3'	5'-GCTGATGGCCTGATTGTCTTTC-3'
NF-κB	5'-ACAACTATGAGATGAACTCCGGG-3'	5'-GATAGCACTGGGCTGTCTCC-3'
NOS2	5'-GACGAGACGGATAGGCAGAGATTG-3'	5'-AACTCTTCAAGCACCTCCAGGAAC-3'
GABA	5'-TTCAGTGGTTGTAGCAGAAGATGG-3'	5'-TCAAGTGAAGTGAGTCGTCATAAC-3'

2.2 小鼠促排、受精卵注射及移植结果

共超排小鼠 60 只,获得胚胎数量 1560 个,其中注射胚胎 1200 个,共使用了 40 只受体鼠,每只鼠移植 30 个胚胎,这 40 只受体鼠中,29 只怀孕,怀孕率为 72. 50%,共生出 132 只仔鼠,其中 59 只阳性鼠,32 雄 27 雌,阳性率为 44. 70%,共建了 10 个 line(其中 EGFP 转基因鼠 5 个 line,人源 α -syn 转基因小鼠 5 个 line)。

2.3 首建鼠和子代鼠基因型和蛋白鉴定结果

为了验证核定位人源 α -syn 转基因小鼠模型构建是否成功,对首建鼠和出生后 14 d 的子代鼠进行鼠尾 DNA 鉴定,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2A 所示,对照组 EGFP 转基因小鼠在 232 bp 处有一条明亮的条带,实验组核定位人源 α -syn 转基因小鼠在 232 bp 和 290 bp 处有两条明亮的条带,此结果与预期位置相符;证实已把目的基因整合到小鼠基因组中;并可以稳定传代。为了进一步验证人源 α -syn 在小鼠体内的表达是否具有全身性,取小鼠

的心脏、肝、脾、肺、肾、脑组织通过 Western Blot 检测了人源 α -syn 在小鼠体内的表达情况,结果发现人源 α -syn 在小鼠各组织部位均能广泛地表达,如图 2B 所示。

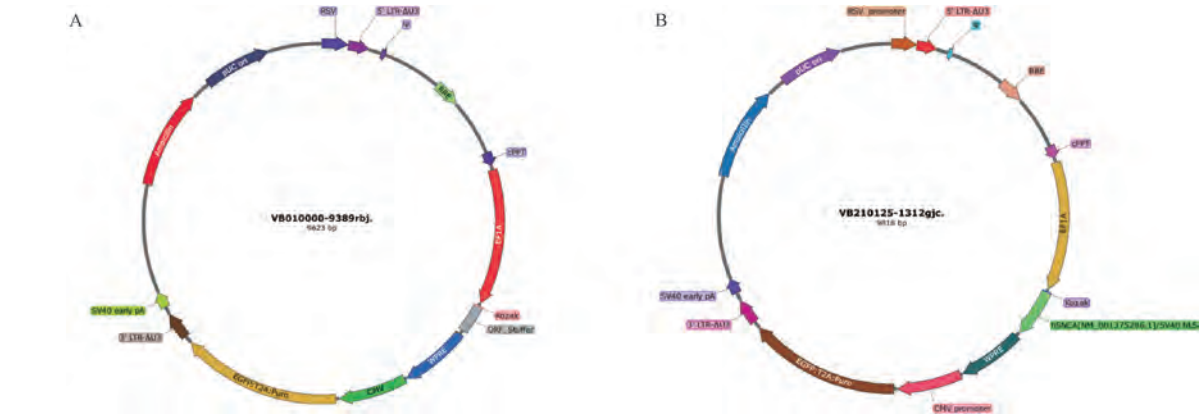
2.4 人源 α -syn 与细胞核出现了明显的共定位现象

小鼠脑组织切片的免疫荧光实验结果显示,体内表达的人源 α -syn 与细胞核有明显的共定位(见图 3)。

PCR 基因型鉴定结果、Western Blot 蛋白鉴定结果和免疫荧光共定位结果共同表明转基因小鼠构建成功。

2.5 核定位人源 α -syn 转基因小鼠出现运动功能障碍

将鉴定为阳性的 15 只子代核定位人源 α -syn 小鼠设置为实验组,15 只 EGFP 小鼠设置为对照组,分别于出生后 1、2、3、6、9、12 月龄时进行旷场实验(图 4A)和转棒实验(图 4B),结果发现实验组小

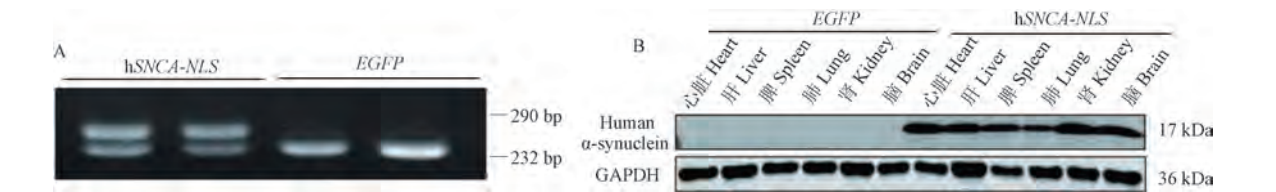


注:A:EGFP 慢病毒载体图谱;B:hSNCA-NLS 慢病毒载体图谱。

图 1 慢病毒载体图谱

Note. A. EGFP lentiviral vector schematic. B. hSNCA-NLS lentiviral vector schematic.

Figure 1 Lentiviral vector schematic

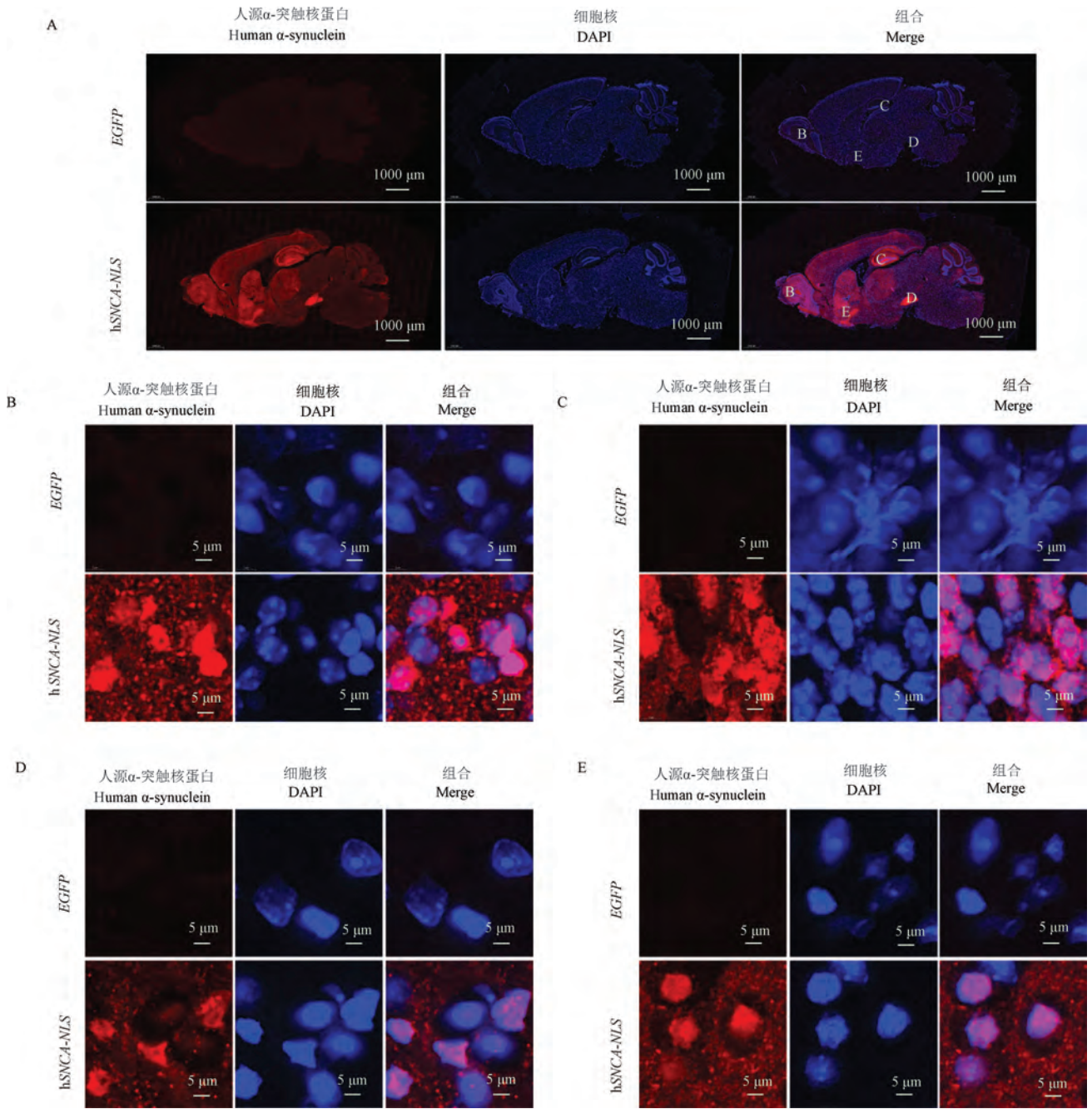


注:A:PCR 鉴定 EGFP 和核定位人源 α -syn 转基因小鼠的凝胶电泳分析结果;B:Western Blot 检测 EGFP 和核定位人源 α -syn 转基因小鼠各个组织中人源 α -syn 表达水平。

图 2 EGFP 和核定位人源 α -syn 转基因小鼠基因型分析和 Western Blot 蛋白鉴定结果

Note. A. Electrophoresis analysis of EGFP and nuclear localization of human α -synuclein transgenic mice with PCR. B. Western Blot analysis was performed to detect the expression levels of human α -synuclein in various tissues of the transgenic mice.

Figure 2 Genotyping analysis and protein identification results of the EGFP and nuclear localization of human α -synuclein transgenic mice



注:A:人源 α -syn 在整个脑区的表达,其中 B、C、D、E 分别代表嗅球、海马、中脑、伏隔核,图 B、C、D、E 则为局部放大共定位图;B:人源 α -syn 在嗅球的共定位;C:人源 α -syn 在海马的共定位;D:人源 α -syn 在中脑的共定位;E:人源 α -syn 在伏隔核的共定位。

图 3 人源 α -syn 在各个脑区的定位情况

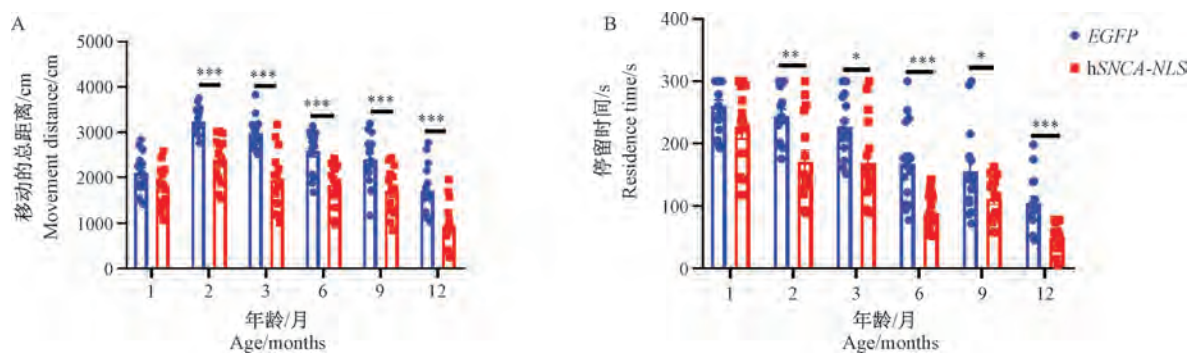
Note. A. Expression of human α -synuclein in the entire brain region, where B, C, D, E represent the olfactory bulb, hippocampus, midbrain, ventral tegmental area respectively, picture B, C, D, E are partial enlarged co-localization view. B. Co-localization of human α -synuclein in the olfactory bulb. C. Co-localization of human α -synuclein in the hippocampus. D. Co-localization of human α -synuclein in the midbrain. E. Co-localization of human α -synuclein in the ventral tegmental area.

Figure 3 Localization of human α -synuclein in various brain regions

鼠于 2 月龄时便表现出运动能力的显著性差异,表明核定位人源 α -syn 转基因小鼠较早出现了运动功能障碍,并且这种行为的异常一直持续到小鼠 12 月龄。

2.6 核定位人源 α -syn 转基因小鼠出现焦虑样症状

将鉴定为阳性的 15 只子代核定位人源 α -syn 小鼠设置为实验组,15 只 EGFP 小鼠设置为对照



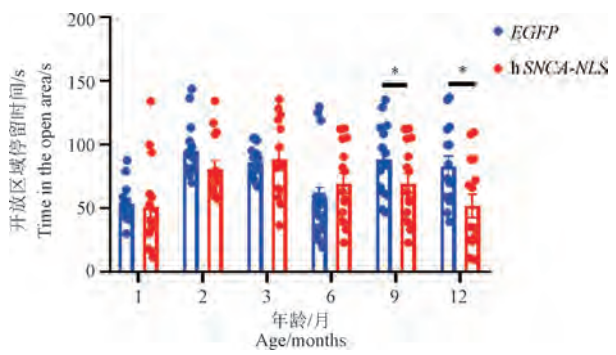
注:A:不同年龄段小鼠在旷场中移动距离;B:不同年龄段小鼠在转棒上停留时间;与 EGFP 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下同)

图 4 核定位人源 α -syn 小鼠运动功能出现障碍($n = 15$)

Note. A. Movement distance of mice at different age in the open field. B. Residence time of mice at different age on the rotating rod. Compared with EGFP group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Impaired motor function in nuclear localization of human α -synuclein mice($n = 15$)

组,分别于 1、2、3、6、9、12 月龄时进行 O 迷宫实验,发现小鼠于 9 月龄时表现出焦虑样症状的显著性差异,且一直持续到 12 月龄,如图 5 所示。



注:不同年龄段小鼠在 O 迷宫中开放区域停留时间。
图 5 核定位人源 α -syn 小鼠出现焦虑样症状($n = 15$)
Note. Residence time of mice at different age in the open area of the O maze.

Figure 5 Anxiety-like symptoms in nuclear localization of human α -synuclein mice($n = 15$)

2.7 核定位人源 α -syn 转基因小鼠脑组织中发生了星形胶质细胞增生和炎症反应

取测完行为学的两组小鼠脑组织进行检测,发现核定位人源 α -syn 转基因小鼠于 2 月龄时星形胶质细胞标志物胶质纤维状酸性蛋白(GFAP)表达量开始出现显著性差异,且这种显著性差异一直持续到小鼠 12 月龄,如图 6A 所示。由于在病理条件下,星形胶质细胞会产生炎性细胞因子^[16],因此设计了炎性细胞因子引物进一步验证小鼠脑组织中是否发生了炎症反应,结果发现核定位人源 α -syn 转基因小鼠脑组织中的炎症因子在 2 月龄时开始有

显著性差异,且这种显著性差异也一直持续到小鼠 12 月龄,如图 6B 所示。

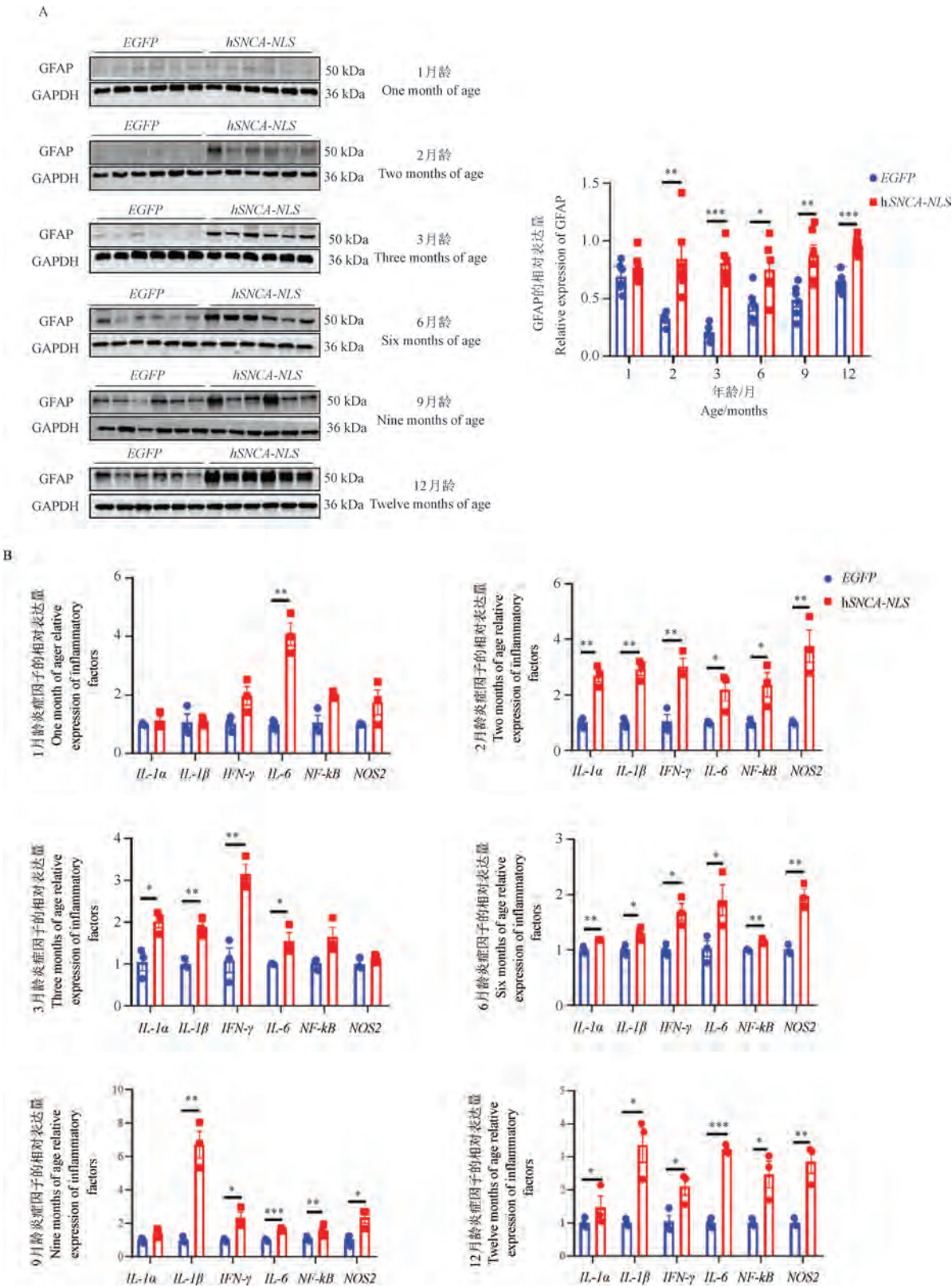
2.8 核定位人源 α -syn 转基因小鼠 GABA 基因表达减少

由于核定位人源 α -syn 转基因小鼠在行为学测试中表现出焦虑样症状,于是设计了小鼠情绪因子 γ -氨基丁酸(GABA)的引物进行检测,发现小鼠体内 GABA 基因的表达式的确在小鼠 9 月龄时表现出显著性差异,且这种显著性差异一直持续到小鼠 12 月龄,如图 7 所示。

3 讨论

近年来 α -syn 在细胞核中核定位现象在越来越多的神经退行性疾病患者的组织中被发现^[11],可是 α -syn 核定位与 PD 等神经退行性疾病有什么关系这个问题尚未有答案,于是研究人员便试图通过设计一种核定位人源 α -syn 转基因小鼠来尝试回答这个问题。首先,通过慢病毒载体将其注射到小鼠的受精卵中,建立了核定位人源 α -syn 转基因小鼠模型,之后通过 PCR、Western Blot 和免疫荧光技术验证了该模型建立成功。这为之后研究 α -syn 核定位在 PD 发生发展过程中的作用和机理奠定了一定的研究基础。

在子代鼠成长到 1 个月时,开始对其进行行为学检测,发现实验组小鼠于 2 月龄时便出现了明显的运动功能障碍,并且持续到 12 月龄,这一结果与之前关于内源性 α -syn 在细胞核中的积累可导致小鼠在 2 月龄时出现运动功能障碍的结果一致^[17],而仅用过表达 α -syn 的转基因小鼠进行行为学检测的

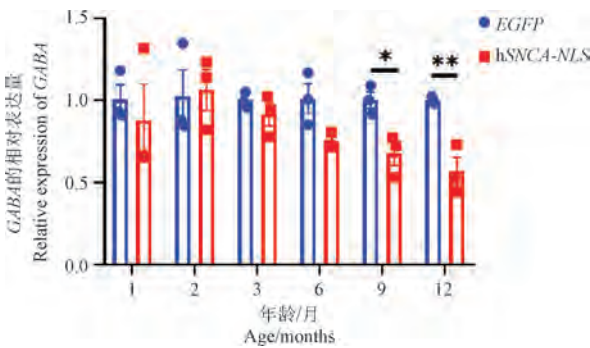


注:A;不同年龄段小鼠脑组织中 GFAP 检测结果($n = 6$);B;不同年龄段小鼠脑组织中炎症因子检测结果($n = 3$)。

图 6 人源 α -syn 核输入激发了星形胶质细胞增生和炎症反应

Note. A. Result of GFAP in brain tissue of mice at different age($n = 6$). B. Result of inflammatory factors in brain tissue of mice at different age($n = 3$).

Figure 6 Nuclear input of human α -synuclein triggers astrocyte proliferation and inflammatory response



注:不同年龄段小鼠脑组织中 GABA 检测结果。

图 7 γ -氨基丁酸 mRNA 的检测($n = 3$)

Note. Result of GABA in brain tissue of mice at different age.

Figure 7 Detection of γ -aminobutyric acid mRNA levels($n = 3$)

实验结果显示:小鼠于 14 个月时才表现出运动功能障碍^[18]。之前建立的 α -syn 相关转基因小鼠出现运动功能障碍时间均有所不同,但是,最早出现运动功能障碍也是在 α -syn 相关转基因小鼠 6 月龄时表现出来的^[19],与这些研究结果相比,在人源 α -syn 后面加入核定位信号之后,核定位人源 α -syn 转基因小鼠在 2 月龄便出现运动功能障碍,这提示 α -syn 核定位会加速小鼠出现运动功能障碍,可以用此模型做有关小鼠运动功能障碍方面的研究。Western Blot 结果表明,与 EGFP 小鼠相比,GFAP 在核定位人源 α -syn 小鼠 2 月龄时表达上调,之前的研究认为,星形胶质细胞及小胶质细胞参与的神经炎症与 PD 的发生发展密切相关^[20-21],于是采用 qPCR 技术检测了验证炎症因子 IL-1 α 、IL-1 β 、INF- γ 、IL-6、NF- κ B 和 NOS2 的表达情况,结果表明,在 GFAP 表达水平上升的同时,这些炎症因子的表达水平也明显增高,这个时间点与小鼠运动功能障碍出现的时间点相吻合,提示核定位的人源 α -syn 诱导的神经炎症可能参与到小鼠的运动功能障碍中,具体的影响机制有待下一步研究。更有趣的是,在 9 月龄时,核定位人源 α -syn 转基因小鼠表现出焦虑样行为,并一直持续到 12 月龄,qPCR 结果表明,与情绪有关的 GABA 基因在 9 月龄时表达水平下降,这提示小鼠的焦虑样行为可能与 GABA 基因表达下调有关,但是需要进一步进行研究确认。

总之,用携带人源 α -syn 核定位信号的慢病毒载体构建了人源 α -syn 核定位的转基因鼠,最终人源 α -syn 在小鼠的各个组织中广泛表达,成功与细胞核共定位,在行为学检测中表现出明显的运动功能障碍和焦虑样症状,从行为学表现等方面很好地模拟了人 PD 的行为学表现,因为其具有出现运动

功能障碍的时间较早的特征,所以该转基因鼠模型可以作为一种研究与 PD 有关的运动功能障碍的新的动物模型。由于 α -syn 可以通过多种途径发挥毒性作用,造成神经细胞凋亡和坏死^[22],而 α -syn 在细胞核中发挥毒性作用究竟哪些分子参与了损伤的形成,这些分子又是通过何种机制发挥的作用,都十分复杂,有待于进一步的研究证实。

参 考 文 献 (References)

[1] SAMII A, NUTT J G, RANSOM B R. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2004, 363(9423) : 1783-1793.

[2] GOEDERT M, SPILLANTINI M G, DAVIES S W. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases [J]. Curr Opin Neurobiol, 1998, 8(5) : 619-632.

[3] SPILLANTINI M G, SCHMIDT M L, LEE V M, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies [J]. Nature, 1997, 388(6645) : 839-840.

[4] CABIN D E, SHIMAZU K, MURPHY D, et al. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein [J]. J Neurosci, 2002, 22(20) : 8797-8807.

[5] LUK K C, SONG C, O' BRIEN P, et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(47) : 20051-20056.

[6] LASHUEL H A, OVERK C R, OUESLATI A, et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target [J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(1) : 38-48.

[7] XILOURI M, BREKK O R, STEFANIS L. Autophagy and alpha-synuclein: relevance to Parkinson's disease and related synucleinopathies [J]. Mov Disord, 2016, 31(2) : 178-192.

[8] TEKIRDAG K, CUERVO A M. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: joint by a chaperone [J]. J Biol Chem, 2018, 293(15) : 5414-5424.

[9] JIANG P, GAN M, YEN S H, et al. Proaggregant nuclear factor (s) trigger rapid formation of α -synuclein aggregates in apoptotic neurons [J]. Acta Neuropathol, 2016, 132(1) : 77-91.

[10] CHEN V, MONCALVO M, TRINGALI D, et al. The mechanistic role of alpha-synuclein in the nucleus: impaired nuclear function caused by familial Parkinson's disease SNCA mutations [J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(18) : 3107-3121.

[11] KOSS D J, ERSKINE D, PORTER A, et al. Nuclear alpha-synuclein is present in the human brain and is modified in dementia with Lewy bodies [J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1) : 98.

[12] GOERS J, MANNING-BOG A B, MCCORMACK A L, et al. Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones [J]. Biochemistry, 2003, 42(28) : 8465-8471.

[13] KONTOPOULOS E, PARVIN J D, FEANY M B. Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity [J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(20) :

3012–3023.

[14] CHERNY D, HOYER W, SUBRAMANIAM V, et al. Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of alpha-synuclein *in vitro* and is associated with the mature fibrils; an electron microscopy study [J]. J Mol Biol, 2004, 344(4): 929–938.

[15] FARES M B, AIT-BOUZIAD N, DIKIY I, et al. The novel Parkinson’s disease linked mutation G51D attenuates *in vitro* aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(17): 4491–4509.

[16] MIYAZAKI I, ASANUMA M. Neuron-astrocyte interactions in Parkinson’s disease [J]. Cells, 2020, 9(12): 2623.

[17] GEERTSMA H M, SUK T R, RICKE K M, et al. Constitutive nuclear accumulation of endogenous alpha-synuclein in mice causes motor impairment and cortical dysfunction, independent of protein aggregation [J]. Hum Mol Genet, 2022, 31(21): 3613–3628.

[18] LAM H A, WU N, CELY I, et al. Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein [J]. J Neurosci Res, 2011, 89(7): 1091–1102.

[19] ROSHANBIN S, ANISZEWSKA A, GUMUCIO A, et al. Age-related increase of alpha-synuclein oligomers is associated with motor disturbances in L61 transgenic mice [J]. Neurobiol Aging, 2021, 101: 207–220.

[20] BARTELS T, DE SCHEPPER S, HONG S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases [J]. Science, 2020, 370(6512): 66–69.

[21] BOOTH H D E, HIRST W D, WADE-MARTINS R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson’s disease pathogenesis [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(6): 358–370.

[22] MAVROEIDI P, XILOURI M. Neurons and *Glia* interplay in α -synucleinopathies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4994.

[收稿日期] 2023-08-21

《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!

赖碧玉,洪梦颖,李兴,等. 乙酸灌肠联合束缚夹尾应激诱导肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 317-328.

LAI B Y, HONG M Y, LI X, et al. Preparation of a rat model of diarrheal irritable bowel syndrome induced by an acetic acid enema combined with binding tail-clamping stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 317-328.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.005

乙酸灌肠联合束缚夹尾应激诱导肝郁 脾虚型腹泻型肠易激综合征 大鼠模型的制备

赖碧玉¹,洪梦颖¹,李兴²,何永嘉¹,陈瑶¹,李新伍¹,石佳¹,田子寒¹,
李丹²,聂晶³,余畅^{2*}

(1. 湖南中医药大学研究生院,长沙 410208;2. 长沙市中医医院(长沙市第八医院)针灸康复科,
长沙 410100;3. 中南大学,长沙 410083)

【摘要】 目的 建立理想的大鼠肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征 (diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 的造模方法,为 IBS-D 伴焦虑抑郁状态的临床研究提供动物模型基础。**方法** 本研究共用 60 只大鼠:(1) 首先将 20 只大鼠随机分为空白组、3%乙酸灌肠组、4%乙酸灌肠组、5%乙酸灌肠组,造模及观察期结束后,通过腹泻相关指数、结肠病理组织学等观察不同造模浓度引起的腹泻状态及结肠损伤程度。(2) 评估出较优造模浓度后,将另外 40 只大鼠随机分为对照组(a组)、单纯乙酸灌肠组(b组)、乙酸+束缚组(c组)、乙酸+束缚+夹尾组(d组),分别予以不同干预,共干预 8 d。干预结束后对大鼠一般情况、腹泻相关指数、旷场实验(open-field test, OFT)评分、结肠病理组织学等指标进行评价。**结果** (1) 与空白组比较,4%乙酸灌肠组干预后第 1~3 天粪便性状评分升高($P < 0.001$),干预后第 4~7 天粪便性状评分逐渐降低,1 周后,与空白组相比,粪便性状评分无显著性差异($P > 0.05$),体重相对较低($P < 0.01$),粪便含水量升高($P < 0.001$);与空白组相比,5%乙酸灌肠组体重较低($P < 0.001$),粪便性状评分、粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.01$);3%乙酸灌肠组与空白组相比,无显著性差异($P > 0.05$)。结肠病理组织显示,与空白组相比,4%乙酸灌肠组黏膜结构完整,有少量炎症细胞浸润,病理组织评分无显著性差异($P > 0.05$),5%乙酸灌肠组有中量-大量炎症细胞浸润,病理组织评分升高($P < 0.01$)。(2) 与 a 组比较,b 组体重较低($P < 0.001$),粪便性状评分、粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.01$),与 a 组及 b 组比较,c 组和 d 组,体重较低($P < 0.001$),粪便性状评分、粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.01$),结肠运转时间减少($P < 0.01$);与 c 组相比,d 组粪便含水量较高($P < 0.001$)。在 OFT 评分方面,与 a 组及 b 组相比,c 组及 d 组 OFT 评分在总距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$);与 c 组相比,d 组在 OFT 评分总距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$)。结肠病理组织显示,4 组黏膜结构均完整,有不同程度的炎症细胞浸润,病理组织评分上,与 a 组及 b 组相比,c 组和 d 组较高($P < 0.05$)。**结论** 4%乙酸浓度为 IBS-D 造模适宜浓度,叠加束缚后,能更好地模拟 IBS-D 腹泻、内脏高敏感特征性状态,叠加夹尾后能成功制备出肝郁脾虚型 IBS-D 模型。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征;4%乙酸灌肠;慢性束缚;夹尾应激;造模

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0317-12

【基金项目】 湖南省自然科学基金项目 (2021JJ70066), 湖南省中医药科研计划项目 (B2023108, 2020143), 国家级大学生创新训练项目 (202110541024), 湖南中医药大学 2022 年度校级科研项目 (2022XYLH088)。

Funded by Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ70066), Traditional Chinese Medicine Research Project of Hunan Province (B2023108, 2020143), National Innovative Training Program for College Students (202110541024), Hunan University of Chinese Medicine 2022 University-Level Scientific Research Project (2022XYLH088)。

【作者简介】 赖碧玉,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸治病的临床机理研究。Email:1494029288@qq.com

【通信作者】 余畅,女,博士,主任医师,研究方向:针灸治病的临床机理研究。Email:shechang159@163.com

Preparation of a rat model of diarrheal irritable bowel syndrome induced by an acetic acid enema combined with binding tail-clamping stress

LAI Biyu¹, HONG Mengying¹, LI Xing², HE Yongjia¹, CHEN Yao¹, LI Xinwu¹, SHI Jia¹,
TIAN Zihan¹, LI Dan², NIE Jing³, SHE Chang^{2*}

(1. School of Graduate, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Department of Rehabilitation, Changsha Chinese Medicine Hospital / Eighth Hospital of Changsha City, Changsha 410100, China; 3. Central South University, Changsha 410083, China)

Corresponding author: SHE Chang. E-mail:shechang159@163.com

[Abstract] Objective To establish an ideal modeling method for diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) with anxiety and depression in rats, and to provide a basis for the clinical study of IBS-D. **Methods** 60 rats were used in this study. (1) At first, 20 rats were randomly divided into blank, 3% acetic acid enema, 4% acetic acid enema, and 5% acetic acid enema groups. After the modeling and observation period, the diarrhea status and the degree of colon injury caused by different modeling concentrations were observed by diarrhea related index and colon histopathology. (2) After the optimal modeling concentration was assessed, 40 rats were randomly divided into control(a), acetic acid enema(b), acetic acid + binding(c), and acetic acid + binding + tail clip(d) groups and correspondingly treated for 8 days. After the treatments, the general condition, diarrhea-related index, open field test (OFT) score, and colonic histopathology of rats were evaluated. **Results** (1) Compared with the blank group, the fecal trait score of 4% acetic acid enema group was increased on days 1 to 3 after intervention ($P < 0.001$), and gradually decreased on days 4 to 7 after intervention. After 1 week, there was no significant difference between the fecal trait score and that of the blank group ($P > 0.05$). Body weight was lower ($P < 0.01$), fecal water content was higher ($P < 0.001$). Compared with blank group, body weight of the 5% acetic acid enema group was decreased ($P < 0.001$), the fecal trait score and diarrhea index were increased ($P < 0.01$). No significant difference was found between 3% acetic acid enema and blank groups. The pathological colon tissue showed that, compared with the blank group, the mucosal structure of the 4% acetic acid enema group was complete with a small amount of inflammatory cell infiltration, and the pathological tissue score showed no significant difference ($P > 0.05$), whereas the 5% acetic acid enema had a medium to large amount of inflammatory cell infiltration, and the pathological tissue score was increased ($P < 0.01$). (2) Compared with group a, group b had lower body weight ($P < 0.001$), and higher fecal trait score, fecal water content and diarrhea index ($P < 0.01$). Compared with a and b groups, the body weight of c and d groups was lower ($P < 0.001$), the fecal traits score, fecal water content, and diarrhea index were increased ($P < 0.01$), and the colon running time was decreased ($P < 0.01$). Compared with group c, Fecal water content in group D was higher ($P < 0.001$). In the OFT score, compared with a and b groups, the OFT distance, standing times, and upright times in c and d groups were lower ($P < 0.05$). Compared with c, the OFT distance, standing times, and upright times in d group were lower ($P < 0.05$). The pathological tissue of colon showed that the mucosal structure of the four groups was complete, and there were different degrees of inflammatory cell infiltration. The pathological tissue scores of groups c and d were higher than those of groups a and b ($P < 0.05$). **Conclusions** The 4% acetic acid concentration is appropriate for IBS-D modeling. After superposition and binding, the IBS-D diarrhea and internal hypersensitivity characteristic state can be better simulated. After superposition of a tail clip, the IBS-D model of liver stagnation and spleen deficiency can be established successfully.

[Keywords] diarrheal predominant irritable bowel syndrome; 4% acetic acid enema; chronic bondage; tail-clamping stress; molding

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

腹泻型肠易激综合征 (diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 是以反复发作的腹痛、腹泻为主要特征的临床常见功能性疾病^[1]。建立符合临床特征的动物模型是动物实验的基础,也

是探索发病机制和治疗方案的重要一环。乙酸灌肠联合慢性束缚在 IBS-D 造模中应用广泛,可以较好地模拟 IBS-D 腹泻症状及内脏高敏感状态^[2],但当药物剂量、浓度难以统一或者束缚刺激阈值及周期未达时,难以稳定诱导 IBS-D 模型^[3],而现有文献研究尚无统一标准,因此对此进行探索完善十分重要。另外除腹泻和高敏感状态外,目前在临床上,IBS-D 患者常伴有焦虑、抑郁等情志方面的改变,肝郁脾虚型 IBS-D 最为常见,因此建立符合肝郁脾虚型 IBS-D 模型值得探索^[4]。有研究发现,夹尾应激常被应用于肝郁造模中^[5]。本研究在乙酸灌肠基础上,同时联合束缚、夹尾等应激方法诱导肝郁脾虚型 IBS-D 模型,探讨各项具体操作、存在问题及应对方法,为建立客观、可靠且重复性好的肝郁脾虚型 IBS-D 模型提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠共 60 只,体重 210 ± 10 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养环境:温度 $20 \sim 25$ °C,湿度 50% ~ 70%,自由饮食饮水,昼夜交替 12 h/12 h,饲养于湖南斯莱克景达实验动物基地【SYXK(湘)2019-0017】。本实验研究经长沙市中医医院(长沙市第八医院)伦理委员会批准(2019 005),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

石蜡油(20191002, 500 ± 25 mL,武昌炎威医疗科技有限公司);磷酸缓冲生理盐水(Phosphate buffer saline, PBS)(MA0015-Nov-05H,每瓶 500 mL,大连美仑);异氟烷(兽药字 031217015,河北金达福药业有限公司);苏木素-伊红(HE)染色液(S191003,武汉市皮诺飞生物科技有限公司);乙酸(10000218)、无水乙醇(10009228)、中性树胶(10004160)、二甲苯(10023418)、正丁醇(10005218)均购自国药集团化学试剂有限公司。

电热鼓风干燥箱(101A-3,上海光地仪器设备有限公司);脱水机(JT-12S,武汉俊杰电子有限公司);包埋机(JB-L5,武汉俊杰电子有限公司);切片机(RM2016,德国 Leica);显微镜(E100,日本 Nikon);扫描仪(Pannoramic SCAN II,济南丹吉尔电子有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 阶段(1)构建 IBS-D 模型,对不同乙酸灌肠浓度进行观察

选用 20 只 SD 大鼠,适应性饲养 7 d 后随机分为空白组、3%乙酸灌肠组、4%乙酸灌肠组、5%乙酸灌肠组,每组 5 只。操作:第 1 天分组进行乙酸灌肠,灌肠前禁食不禁水 8 h,使用透明束缚笼将大鼠固定,在大鼠肛门处涂抹石蜡润滑后插入硅胶管(连有注射器),于约距肛门 8 cm 处,向内注入不同浓度乙酸 1 mL,按组分别予以 3%乙酸灌肠(乙酸 3 mL + 0.01 mol/L PBS 97 mL)、4%乙酸灌肠(乙酸 4 mL + 0.01 mol/L PBS 96 mL)、5%乙酸灌肠(乙酸 5 mL + 0.01 mol/L PBS 95 mL),3 组分别灌肠后,轻柔缓慢将导尿管拔出,并压迫大鼠肛门后将其尾巴抬高 60 s,后用 0.01 mol/L PBS 1 mL 冲洗结肠,放回笼中自由活动进食水,观察 1 周。1 周后评估出适宜的乙酸灌肠浓度进行 IBS-D 造模。

1.2.2 阶段(2)构建 IBS-D 模型,对不同应激造模因素观察

选用 40 只 SD 大鼠,适应性饲养 7 d 后随机分为对照组(a组)、4%乙酸灌肠组(b组)、4%乙酸灌肠 + 束缚组(c组)、4%乙酸灌肠 + 束缚 + 夹尾组(d组)。b 组操作:分别于第 1、5 天进行 4%乙酸灌肠,具体同阶段(1)灌肠操作,除灌肠期外其他时间大鼠自由进食及活动;c 组操作:第 1、5 天进行 4%乙酸灌肠,于非灌肠日将大鼠每日束缚 1 h(放置于自制束缚笼,限制大鼠的肢体但不影响呼吸);d 组操作:第 1、5 天进行 4%乙酸灌肠,除灌肠外的时间大鼠每天束缚 1 h,在束缚 1 h 后,于大鼠尾端 3 ~ 5 cm 处使用夹子夹持其尾巴 5 min,以上操作结束后将大鼠放回笼内任其自由活动。4 组干预总时长皆为 8 d。造模第 8 天进行模型评价,以大鼠一般状态变化、粪便性状评分、粪便含水量及腹泻指数高于空白组为造模成功标准^[6]。对照组于第 1、5 天予 0.9%氯化钠溶液灌肠,灌肠操作同阶段(1)灌肠操作。

1.2.3 取材

两阶段分别在干预结束后和观察结束后,使各组大鼠吸入流速 0.7 L/min、浓度 1.5%的异氟烷麻醉,处死后打开腹腔,于距大鼠肛门 6 cm 处取其结肠 5 cm,纵向剖开结肠并采用 PBS 清洗,之后放入 4%多聚甲醛中固定,用于结肠组织形态及病理观察。

1.2.4 观察指标及方法

(1)一般状态及粪便性状评分:实验过程中每天记录各组大鼠的一般状况(体重、精神、皮毛色泽、活动度、反应力、存活情况、排便情况),每日记录大鼠粪便性状评分。采用 Bristol 粪便性状评分标准^[7]:1 分:坚果状、分散的硬块;2 分:团块状、成型正常;3 分:香肠状、表面有裂缝;4 分:香肠状、表面光滑柔软;5 分:团块状、软且边缘清楚;6 分:糊状或泥浆状、边缘模糊不清;7 分:水样便、无固状物。

(2)粪便含水量及腹泻指数:粪便含水量:两阶段干预结束时(阶段(1)为灌肠后 1 周,阶段(2)为干预第 8 天),分别收取大鼠新鲜粪便,记录电子秤所称此时的重量,为粪便湿重。然后将粪便放入烘干箱,烘干至粪便重量稳定不变,此为粪便干重。粪便含水量 = $[(\text{湿重} - \text{干重}) \div \text{湿重}] \times 100\%$ ^[8]。于同一时间点记录大鼠的粪便粒数及稀便数(污迹数)后,计算大鼠腹泻指数,腹泻指数 = $[\text{稀便数} \div (\text{粪便粒数} + \text{稀便数})] \times \text{平均稀便级}$ 。稀便级:按照稀便直径分为四级:< 1 cm 为一级,1 ~ 2 cm 为二级,2 ~ 3 cm 为三级,> 3 cm 为四级。平均稀便级 = 稀便级数总和 $\div$ 稀便数^[9]。

(3)结肠运转时间:阶段(2)干预结束后(第 8 天),大鼠麻醉后,将直径 3 mm 玻璃小球放入大鼠直肠(距离肛门 3 cm)内。待大鼠苏醒后,使其放在铺有干净滤纸的笼内,任其自由进食。自大鼠苏醒后开始计时,记录排出玻璃小球的时间^[10]。

(4)旷场实验评分:阶段(2)干预结束后(第 8 天)将大鼠放入自制旷场箱中,自制旷场箱用木板做成,箱体高约 40 cm,将底面边长为 100 cm 的正方形平均划分为 25 个方格,大鼠于实验环境中适应 10 min 后放入旷场箱正中方格内,观察并记录 5 min 内大鼠经过交叉点次数、直立次数及总运动距离^[5]。

(5)结肠粘膜屏障完整性评价及病理学评分:两阶段干预结束后,将取得的结肠放入多聚甲醛固定液中固定,进行包埋、脱水、切片、染色,光镜下观察并进行结肠病理组织评价炎症分级。结肠病理损伤程度评分^[11]:炎性细胞浸润:固有层无或少量炎性细胞浸润:0 ~ 1 分;固有层大量炎性细胞浸润:2 ~ 3 分;固有层大量炎性细胞且延伸至黏膜下层:4 ~ 5 分;炎性细胞沿黏膜下层透壁扩展:6 ~ 7 分。组织结构的完整性:损伤小,组织结构完整,肠壁正常无增厚:0 ~ 1 分;隐窝脓肿,隐窝炎,肠壁增厚,占整个视野的 2/5:2 ~ 3 分;隐窝结构改变,隐

窝缺失,肠壁增厚,占整个视野的 3/5:4 ~ 5 分;UC 结构改变,黏膜层大量细胞坏死,肠壁增厚,占整个视野的 4/5 或充满整个视野:6 ~ 7 分。结肠组织病理损伤评分 = (炎性细胞浸润 + 组织结构的完整性)/2。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,先进行正态分布检验,呈正态分布的数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;方差不齐时多组间采用 Games-Howell 分析,两两比较采用 Dunnett's *T* 检验。数据不符合正态分布时,则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 阶段(1)不同乙酸浓度造模大鼠情况

2.1.1 一般状态、体重及粪便性状评分比较

干预 1 周后,空白组一般情况良好,精神状态良好、反应灵敏、活动度正常、皮毛光泽、粪便成型。与空白组相比,3%乙酸灌肠组一般情况良好,仅有部分大鼠在灌肠当天及第 1 天出现腹泻症状,其后粪便成型,体重与空白组无显著性差异($P > 0.05$);4%乙酸灌肠组精神较萎靡、反应力下降、活动度减少,在灌肠后 1 ~ 3 d 出现不同程度的腹泻,水样、糊样便,与空白组相比,第 1 ~ 3 天粪便性状评分升高($P < 0.001$),但第 4 天开始总体各项情况趋向恢复正常,粪便成型,体重增长幅度较大,粪便性状评分降低,1 周后,粪便性状评分与空白组无显著性差异($P > 0.05$);5%乙酸灌肠组皮毛无光泽、精神萎靡、反应力明显下降、活动度差,体重 1 周内有所下降现象,总体增长缓慢,与空白组相比,具有显著性差异($P < 0.001$),粪便性状评分升高($P < 0.01$)。见图 1。

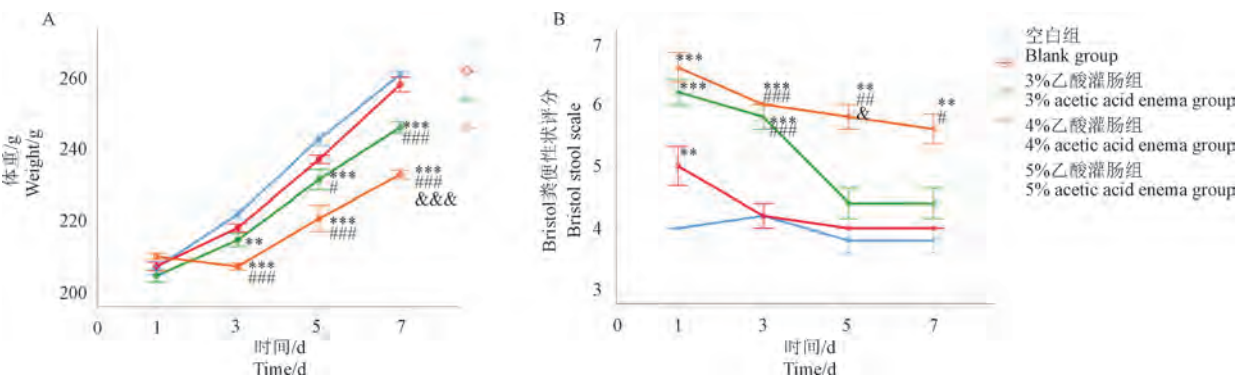
2.1.2 粪便含水量、腹泻指数比较

干预 1 周后,与空白组比较,4%乙酸灌肠组及 5%乙酸灌肠组粪便含水量增加($P < 0.001$),5%乙酸灌肠组腹泻指数升高($P < 0.001$),3%乙酸灌肠组与空白组无显著性差异($P > 0.05$)。见图 2。

2.1.3 结肠病理组织学观察

1 周后解剖肉眼结肠观察,空白组及 3%乙酸灌肠组结肠无明显变化,4%乙酸灌肠组结肠轻度充血,5%乙酸灌肠组结肠明显充血,个别有糜烂现象。

光镜下结肠病理观察,空白组及 3%乙酸灌肠

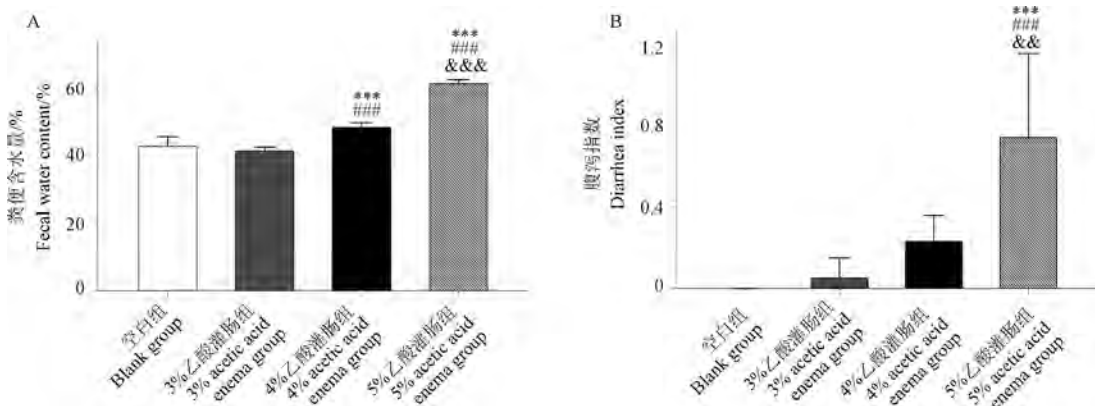


注:与空白组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与3%乙酸灌肠组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与4%乙酸灌肠组相比, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ 。(下同)

图1 阶段(1)各组大鼠体重及粪便性状评分比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the 3% acetic acid enema group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with the 4% acetic acid enema group, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Stage(1) comparison of body weight and fecal traits scores of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:与4%乙酸灌肠组相比, && $P < 0.01$ 。(下同)

图2 阶段(1)各组大鼠粪便含水量、腹泻指数比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Compared with the 4% acetic acid enema group, && $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Stage(1) comparison of fecal water content and diarrhea index of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组两组结肠黏膜上皮较完整,细胞排列规整,未见肠黏膜上皮细胞坏死脱落,固有层腺体亦无萎缩,黏膜下层未见明显改变,间质无水肿。4%乙酸灌肠组轻度炎症,黏膜上皮细胞排列欠规则,轻度间质水肿,固有层腺体稍萎缩,有少量炎性细胞浸润;5%乙酸灌肠组固有层中量到大量中性粒细胞浸润,黏膜上皮细胞坏死脱落,固有层腺体萎缩减少,间质中度-重度水肿,其病理组织损伤评分高于其他3组($P < 0.01$)(见图3)。综合各组指标及结肠病理,4%乙酸灌肠组可出现较持续性的腹泻,且无器质性损伤,为适宜浓度。另外通过观察4%乙酸灌肠组腹泻状态只能持续3d左右,因此后续对于灌肠频次进行测定,发现每3d灌肠1次为理想灌肠频次,

且结直肠组织无器质性改变。

2.2 阶段(2)叠加应激因素造模大鼠情况

2.2.1 一般状态、体重及粪便性状评分比较

阶段(2)干预结束后(第8天),a组一般情况良好,精神状态良好,反应灵敏,活动度正常,皮毛光泽,粪便成型。b组一般情况良好,反应较灵敏,活动度正常,体重较a组降低($P < 0.001$),粪便大部分成型,粪便性状评分与a组相比,具有显著性差异($P < 0.01$);与a组及b组相比,c组及d组体重降低($P < 0.001$),粪便性状评分升高($P < 0.001$)。见图4。

2.2.2 粪便含水量、腹泻指数及结肠运转时间比较

阶段(2)干预结束后(第8天),与a组相比,b

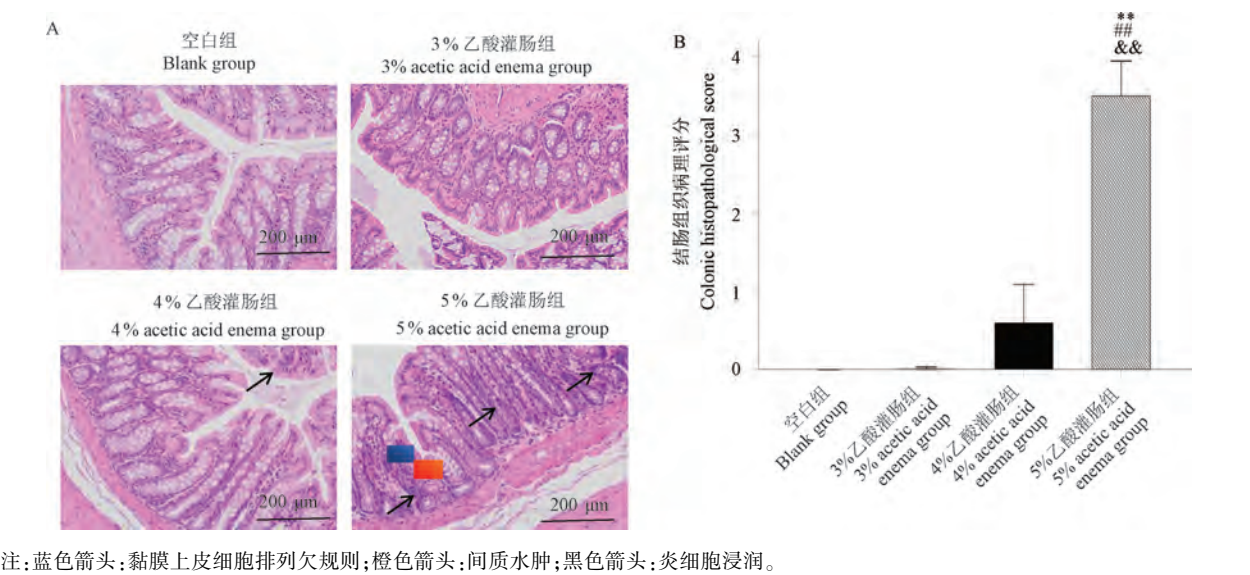
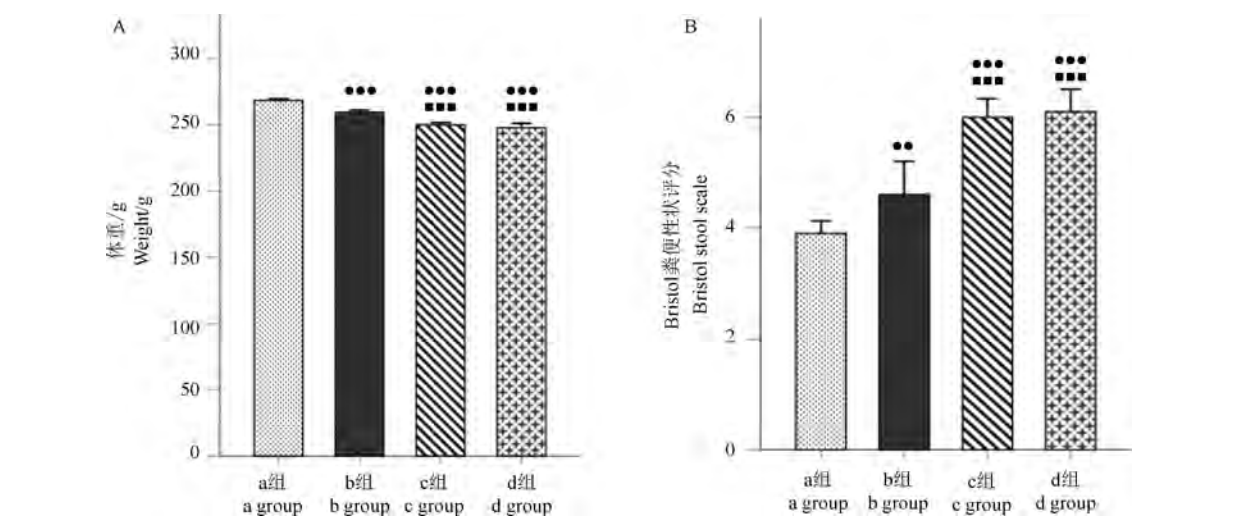


图3 阶段(1)各组结肠组织 HE 染色及组织病理评分比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Blue arrow. Irregular arrangement of mucosal epithelial cells. Orange arrow. Interstitial edema. Black arrow. Inflammatory cell infiltration.

Figure 3 Stage(1) HE staining and histopathologic score of colon tissues were compared among all groups($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注: 与 a 组相比, $\bullet\bullet P < 0.01$, $\bullet\bullet\bullet P < 0.001$; 与 b 组相比, $\blacksquare\blacksquare\blacksquare P < 0.001$ 。(下图同)

图4 阶段(2)各组大鼠体重、粪便性状评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with a group, $\bullet\bullet P < 0.01$, $\bullet\bullet\bullet P < 0.001$. Compared with b group, $\blacksquare\blacksquare\blacksquare P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Stage(2) comparison of body weight and fecal traits scores of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组的粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.001$),结肠运转时间减少($P < 0.05$);与 a 组及 b 组比较,c 组和 d 组的粪便含水量升高($P < 0.001$),腹泻指数升高($P < 0.01$),结肠运转时间减少($P < 0.01$);与 c 组相比,d 组的粪便含水量较高($P < 0.001$)。见图 5。

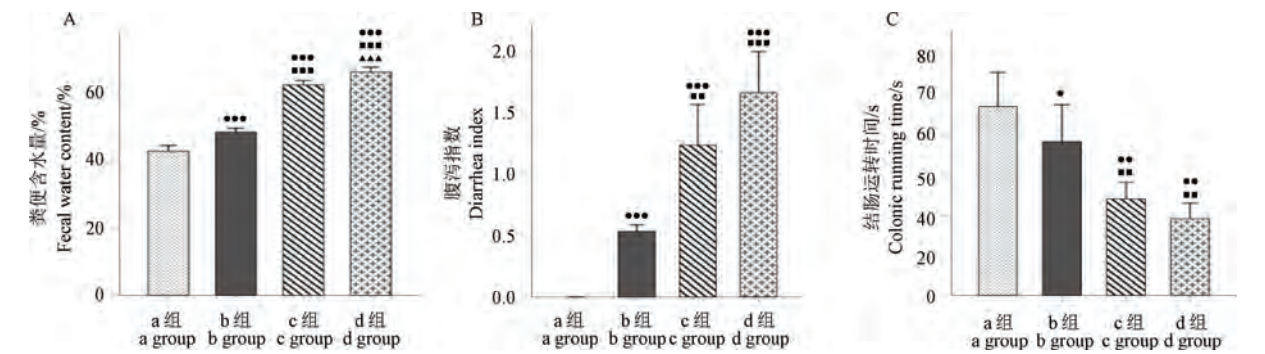
2.2.3 旷场实验(OFT)评分比较

阶段(2)干预结束后(第 8 天),与 a 组相比,b 组旷场实验总距离、站立次数、直立次数均减少

($P < 0.01$);与 a 组及 b 组相比,c 组及 d 组旷场实验距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$)。与 c 组相比,d 组旷场实验距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$)。见表 1。

2.2.4 结肠病理组织学观察

4 组结肠黏膜上皮均完整,a 组细胞排列规整,黏膜及黏膜下层未见明显改变,但其余 3 组均有不同程度的炎症细胞浸润。与 a 组相比,c 组、d 组其病理组织损伤评分较高($P < 0.05$)。见图 6。



注:与 a 组相比,● $P < 0.05$;与 b 组相比,■ $P < 0.01$;与 c 组相比,▲ $P < 0.001$ 。(下图/表同)

图 5 阶段(2)各组大鼠粪便含水量、腹泻指数、结肠运转时间比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

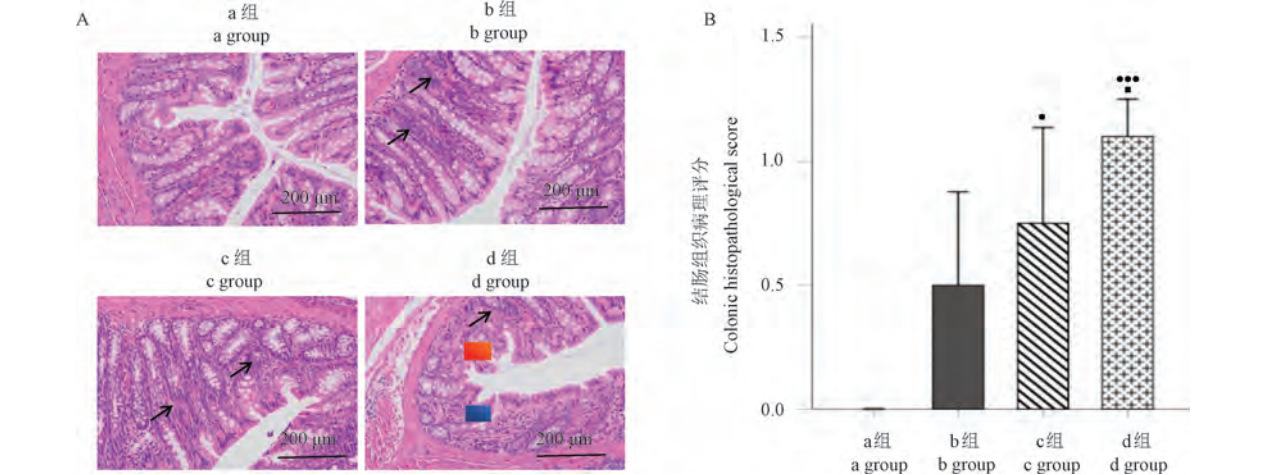
Note. Compared with a group, ● $P < 0.05$. Compared with b group, ■ $P < 0.01$. Compared with c group, ▲ $P < 0.001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 5 Stage(2) comparison of fecal water content, diarrhea index and colon running time of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 1 阶段(2)各组大鼠旷场实验各指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
Table 1 Stage(2) comparison of indexes in open field experiment of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
组别 Groups	OFT 总距离/cm OFT total distance/cm	OFT 交叉点/个 OFT intersections/pcs	OFT 直立次数/次 OFT upright times /times	
a 组 a group	41.80 ± 6.40	15.50 ± 3.20	28.70 ± 6.71	
b 组 b group	32.80 ± 5.80●●	8.50 ± 2.12●●	23.70 ± 4.54●●	
c 组 c group	22.50 ± 3.43●●■	7.20 ± 1.98●●■	17.40 ± 3.16●●■	
d 组 d group	16.50 ± 4.55●●■▲	4.50 ± 2.91●●■▲	11.40 ± 3.30●●■▲	

注:与 b 组相比,■ $P < 0.05$;与 c 组相比,▲ $P < 0.05$ 。(下图/表同)

Note. Compared with b group, ■ $P < 0.05$. Compared with c group, ▲ $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)



注:蓝色箭头:黏膜上皮细胞排列欠规则;橙色箭头:间质水肿;黑色箭头:炎细胞浸润。

图 6 阶段(2)各组结肠组织 HE 染色及组织病理评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Blue arrow. Irregular arrangement of mucosal epithelial cells. Orange arrow. Interstitial edema. Black arrow. Inflammatory cell infiltration.

Figure 6 Stage(2) HE staining and histopathologic score of colon tissues were compared among all groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

IBS 是临床上最常见的功能性胃肠病之一,我

国普通人群 IBS 总体患病率为 1.4% ~ 11.5%^[1]。其中 IBS-D 发病率最高^[12]。IBS-D 的发病机制并未完全阐明,目前研究表明,多与脑肠互动异常、胃肠

动力异常、内脏高敏感性、肠道微生物失调、胃肠道感染与低度炎症、肠黏膜通透性增加等因素相关^[13]。其中,内脏高敏感性在制备动物模型时,也常作为 IBS-D 的特征性指标^[3,14]。

IBS-D 动物模型的造模方法包括母婴分离法、束缚应激、番泻叶灌胃、化学物质刺激、理化因素刺激等^[15],虽然造模方法多样且各有优点,但造模操作复杂、周期长、成本高,因而存在很多的局限性。而乙酸灌肠相对而言操作简单、造模周期短、成本较低,在模拟肠道功能性腹泻及肠道低度炎症方面较有优势,并且对肠道黏膜的通透性、肠道动力以及高敏感性也有影响,因此被广泛应用于 IBS-D 模型的研究^[16-17]。另外许多研究表明^[3,18-19],应用多因素联合法制备 IBS-D 动物模型比较成熟,也较为接近临床的典型表现,其中常将乙酸灌肠与束缚应激联合造模,两者在复制动物模型内脏高敏感性及功能性腹泻方面较为成功^[2,16]。

另外,近年来发现,IBS-D 患者中,除胃肠道症状外,多伴有精神心理问题,其中高发生率的焦虑抑郁状态已成为 IBS 的显著危险因素^[20-21]。IBS-D 在传统医学中也属于“郁证”范畴^[22-23]。精神心理障碍易影响肠道动力,诱发内脏高敏感,引发肠道低度炎症,并且引起肠道菌群的变化^[24]。因此,肝郁脾虚证成为临床上 IBS-D 多发的证型^[25]。本研究加入了夹尾应激这一诱导肝郁状态的方法^[5,26]。采用乙酸灌肠、束缚、夹尾 3 者联合诱导 IBS-D 大鼠模型,观察总结实验中各方面的问题,探索脾虚肝郁型 IBS-D 模型的较优造模方式,为后期相关研究奠定实验基础。

3.1 不同浓度的乙酸灌肠后大鼠临床指标的差异

基于文献研究发现,乙酸灌肠制备腹泻型肠易激综合征模型时,应用浓度 3% ~ 5%^[2,15,27],因此本实验前期设立空白组、3%乙酸灌肠组、4%乙酸灌肠组、5%乙酸灌肠组,通过对大鼠的一般情况、粪便性状评分、稀便次数及腹泻指数等观察,发现 4%浓度的乙酸符合 IBS-D 的临床特点,可引起大鼠功能性腹泻症状。有研究表明,过低乙酸浓度腹泻症状不明显且不能维持内脏高敏感,过高则易使大鼠结肠组织粘连甚至死亡^[18],这与本研究中低浓度 3%引起腹泻症状不明显,较高浓度 5%则引起结肠病理中重度炎症甚至黏膜充血坏死的结果相符。

除浓度这一关键造模因素外,动物种类、试剂用量、试剂停留肠道时间、灌肠频次等与造模也密

切相关。在浓度探索过程中,对以下 3 个方面进行了文献梳理及实验观察:(1)模型动物选择:有研究结果显示,在 IBS 动物模型中,SD 雄性成年大鼠为常用实验动物^[19]。雄性大鼠相比于雌性大鼠可减少激素对实验结果的影响,成年大鼠体型相对完善,耐受程度较好,死亡率较低^[28]。(2)乙酸试剂应用:文献研究中乙酸灌肠常用量为 1 ~ 1.5 mL,停留肠道的时间为 30 ~ 60 s,结束后采用 PBS 或磷酸盐等稀释并冲洗^[6,29]。因此,本实验采用 1 mL 4%乙酸灌肠,停留肠道 60 s 后使用 PBS 冲洗,与既往的研究报道一致。(3)灌肠频次:既往研究^[2,30]认为采用连续灌肠与不连续灌肠对造模结果有差别,不连续灌肠往往要结合其他应激方法才能引起持续性腹泻,连续灌肠引起腹泻明显,但频繁灌肠可能对大鼠肠道黏膜产生机械性损害及药物过度刺激,本研究中的联合实验过程中采用了每隔 3 d 进行一次灌肠,结果显示可引起较稳定腹泻症状,避免了过往研究中不连续灌肠的腹泻不持续性,以及连续灌肠对肠道黏膜的损害。

3.2 束缚方法之间的差异

近年来,常采用应激反应联合其他方法制备 IBS-D 动物模型,例如束缚、夹尾、昼夜颠倒、强光及闪烁灯照射、电击、声波刺激等多种方法联合交替^[31],但许多方法实行难度大,难以统一且重复性差。而慢性束缚应激方法相对简单,个体差异性可控,成功率高,常作为主要的造模变量^[18]。束缚操作方面,有使用软带、纤维绳、网状绷带等进行捆绑束缚,但软带、绳子等会引起大鼠挫折应激,绷带则弹性过大,易挣脱达不到束缚刺激量^[18,32]。在对多种束缚装置及材料实验后,本实验中最终创新采用 350 mL 的矿泉水空瓶进行束缚,该装置瓶口符合大鼠头颈部大小,可供呼吸的同时起到束缚作用,瓶身与大鼠身体相合,瓶底剪开后呈半开口,用胶带将大鼠固定,防止挣脱,整个设计达到束缚要求,可引起应激,且装置简单、操作便易。

束缚时长及频次方面,本实验除乙酸和夹尾外,每天束缚 1 h,持续 1 周。在 HOU 等^[6]建立的经典 IBS-D 大鼠模型中,发现急性束缚 1 h,大鼠结肠运动增强,大肠加速排空,排便量增加^[30]。近年来的实验中,束缚时长有 1 ~ 3 h 的不同,频次有每天 1 ~ 2 次的差别^[30,33-35]。但研究发现当时长与频次增加,刺激量并不会增加,大鼠反而容易对环境适应,从而达不到应激目的,也耗费时间和人力^[36]。

因此,本实验中,考虑束缚还结合了乙酸、夹尾,采用束缚时长 1 h,非乙酸灌肠期间即加入束缚,最少持续 1 周,模型稳定,达到标准成果,用时短,可操作性强。

3.3 夹尾在肝郁模型中的应用

中医认为 IBS-D 的病因与情志密切相关,病机主要为肝气疏泄失职,气郁太过则犯脾,继则脾失运化而致泄泻^[3],肝脾脾虚型 IBS-D 为临床最常见。在肝郁模型中,有研究发现,夹尾法(13.25%)和束缚法(12.04%)是最常用的情志刺激造模法^[23]。束缚法可使大鼠的学习记忆减退,表现出焦虑、抑郁状态,与临床肝郁脾虚患者很相似^[37]。而夹尾刺激作为在肝郁造模中选择最多的方法,所产生的应激可使下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)兴奋增高,并出现焦虑抑郁情况^[38]。而本实验中,将两者结合,每日束缚 1 h 后夹尾 5 min,既可使内脏敏感性增高又是肝郁证造模的方法^[21]。其中夹尾时长选择 5 min,除考虑叠加了束缚这一致郁因素,也避免了长时间高强度夹尾引起大鼠过于激怒不安,以及对胃黏膜及尾部皮肤刺激过度产生炎症^[39]。

3.4 模型评价指标

在既往研究中,对于肝郁脾虚型 IBS-D,研究者主要从 3 个方面进行评价^[3,23]:(1)一般状态观察:皮毛、反映度、心理状态;(2)肝郁症状,常参考内脏敏感性增加、糖水偏爱度增加,高架十字迷宫、旷场实验水平等实验观察指标;(3)脾虚症状评价:饮食减少,体重增长不明显,大便不成型等状态,大便频次、腹泻指数等指标进行脾虚症状的评价^[40-41]。而本实验所采用的指标与既往报道^[42]一致,对大鼠一般状态进行观察,脾虚腹泻状态选择了粪便性状评分、粪便含水量、稀便率及腹泻指数等,稀便率和腹泻指数被认为是腹泻评价的金指标,内脏高敏感状态采用结肠运转时间进行评定,内脏敏感性越高,结肠运转时间越短,肝郁状态则用旷场实验进行了观察,大鼠运动总距离及直立次数可以反应大鼠的兴奋或抑郁程度^[5]。结果显示,乙酸联合束缚夹尾的腹泻指征以及肝郁指征最为明显,且与其他组有差异,这与既往研究^[41]中束缚夹尾可引起肝郁症状一致,也说明采用的指标较为合理。

4 小结

本次实验证实了此造模方案的可行性,同时对

灌肠浓度、频次、束缚方法、材料、时长、夹尾方式进行了探讨,探索出可行性强、成功率较高的肝郁脾虚型 IBS-D 动物造模方案。既往研究报道中也表明,乙酸灌肠联合心理应激(慢性束缚应激、夹尾刺激)是最常用的造模方法,符合肝郁久犯脾,可致脾虚的情志致病的方法^[23];也有研究表明,此造模方法可表现出内脏敏感性、抑郁和肝郁脾虚等多种特征^[41],其中乙酸灌肠能模拟 IBS-D 腹痛及腹泻症状,夹尾及束缚应激可以造成大鼠内脏高敏性,且能模拟肝郁脾虚证型症状,因此,此联合方法可模拟临床肝郁脾虚型 IBS-D 的典型特征。

本研究也存在一些不足之处:首先 IBS-D 临床诊断要求症状至少出现 6 月,近 3 月内每月至少有 3 d 出现症状^[43],而动物造模的观察周期不足,无法判断造模结束后的腹泻状态,是否会引起长期持续规律发作的腹泻,因此在观察时长上可以进一步延长;其次,在肝郁脾虚型模型评价上,对于肝郁方面的评价,除旷场实验、强迫游泳、糖水实验外,可以结合一些理化指征,如 5-HT、木糖醇等去评价,尽可能更加客观^[5];最后,在 IBS-D 中医证型制备方面尚不成熟,缺乏客观的评价标准,除肝郁脾虚证型外,对于其他证型方面也需要进一步研究和探索。

综上所述,4% 乙酸浓度为 IBS-D 造模适宜浓度,叠加束缚后,能更好地模拟 IBS-D 腹泻、内脏高敏感特征性状态,当叠加夹尾后,不仅腹泻和内脏高敏感状态更加稳定,还能诱导出明显的焦虑抑郁状态,更符合目前 IBS-D 的临床状态。

参 考 文 献(References)

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020 年中国肠易激综合征专家共识意见 [J]. 中华消化杂志, 2020, 40(12): 803-818.
Functional Gastrointestinal Diseases Collaboration Group, Chinese Society of Gastroenterology, Gastrointestinal Dynamics Group, Chinese Society of Gastroenterology. Chinese expert consensus of irritable bowel syndrome in 2020 [J]. Chin J Dig, 2020, 40(12): 803-818.
- [2] 安钰,白殿卿,付健,等. 乙酸灌肠加束缚应激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其评价 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(15): 1548-1551.
AN Y, BAI D Q, FU J, et al. Establishment and evaluation of a rat IBS model induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress [J]. World Chin J Dig, 2009, 17(15): 1548-1551.
- [3] 王宁,纪昌春,万鹏,等. 病证结合模式下腹泻型肠易激综

- 合征实验动物模型的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(4): 533-538.
- WANG N, JI C C, WAN P, et al. Research progress on experimental animal model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome combining disease and syndrome [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2021, 40(4): 533-538.
- [4] 张成明, 刘力, 王捷虹, 等. 腹泻型肠易激综合征脾虚肝郁证论治探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4): 858-861.
- ZHANG C M, LIU L, WANG J H, et al. Treatment of diarrhea-type irritable bowel syndrome of liver depression and spleen deficiency type [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(4): 858-861.
- [5] 王凤, 张会永, 杨关林. 肝郁证动物模型研究进展及实验应用现状 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 68-73.
- WANG F, ZHANG H Y, YANG G L. Research progress and analysis of problems in application of animal model of liver depression syndrome in various diseases [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(10): 68-73.
- [6] HOU Q, HUANG Y, ZHU Z, et al. Tong-Xie-Yao-Fang improves intestinal permeability in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome rats by inhibiting the NF- κ B and Notch signalling pathways [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 337.
- [7] LEWIS S J, HEATON K W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(9): 920-924.
- [8] 杨易陈, 周子娴, 薛婷, 等. 电针对腹泻型肠易激综合征大鼠内脏敏感性及其结肠 NGF、TrkA、TRPV1 表达的影响 [J]. 中国针灸, 2022, 42(12): 1395-1402.
- YANG Y C, ZHOU Z X, XUE T, et al. Effect of electroacupuncture on visceral sensitivity and colonic NGF, TrkA, TRPV1 expression in IBS-D rats [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2022, 42(12): 1395-1402.
- [9] 周干南, 胡芝华, 汪亚先, 等. 小鼠腹泻模型的制备与腹泻指数的应用 [J]. 中草药, 1994, 25(4): 195-196, 199.
- ZHOU G N, HU Z H, WANG Y X, et al. An inquiry into preparing diarrhea model of mice and application of diarrhea index [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1994, 25(4): 195-196, 199.
- [10] 史先芳, 尚精娟, 徐晖. 艾灸对肠易激综合征模型大鼠 IL-1 β 、IL-10 和 CGRP 表达的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2021, 55(5): 462-465.
- SHI X F, SHANG J J, XU H. Influence of moxibustion on IL-1 β , IL-10 and CGRP expression in irritable bowel syndrome model rats [J]. J Harbin Med Univ, 2021, 55(5): 462-465.
- [11] OFICJALSKA K, RAVERDEAU M, AVIELLO G, et al. Protective role for caspase-11 during acute experimental murine colitis [J]. J Immunol, 2015, 194(3): 1252-1260.
- [12] 温艳东, 李保双, 王彦刚, 等. 消化系统常见病肠易激综合征中医诊疗指南(基层医生版) [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3518-3523.
- WEN Y D, LI B S, WANG Y G, et al. Clinical practice guideline of TCM for common digestive system diseases: irritable bowel syndrome (Edition for primary physician) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(7): 3518-3523.
- [13] 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.
- [14] VAN DIEST S A, STANISOR O I, DE JONGE W J, et al. Visceral hypersensitivity in IBS: from bench to bedside [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011, 53(2): S34-S35.
- [15] 张薇, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 肠易激综合征内脏高敏动物模型的研究现状 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5655-5658.
- ZHANG W, ZHENG Q H, JIANG Y L, et al. Research status on animal models of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5655-5658.
- [16] 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.
- [17] 旺建伟, 胥风华, 殷越, 等. 痛泻要方对多因素复制肠易激综合征大鼠作用的方证相关研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 553-559.
- WANG J W, XU F H, YIN Y, et al. Effects of Tongxie Yaofang Formula on multiple factors-induced rat model of irritable bowel syndrome based on the theory of correlation between formula and syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(2): 553-559.
- [18] 林雨康, 陈涛, 李幸展, 等. 腹泻型肠易激综合征动物模型研究进展 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32(1): 133-136.
- LIN Y K, CHEN T, LI X Z, et al. Research progress in animal model of diarrhea irritable bowel syndrome [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 32(1): 133-136.
- [19] 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.
- [20] 黄丹, 梁列新, 方秀才, 等. 精神心理因素对腹泻型肠易激

- 综合征患者生命质量的影响 [J]. 中华消化杂志, 2015, 35(9): 599-605.
- HUANG D, LIANG L X, FANG X C, et al. Effect of psychological factors on quality of life in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Chin J Dig, 2015, 35(9): 599-605.
- [21] PINTO-SANCHEZ M I, FORD A C, AVILA C A, et al. Anxiety and depression increase in a stepwise manner in parallel with multiple FGIDs and symptom severity and frequency [J]. Am J Gastroenterol, 2015, 110(7): 1038-1048.
- [22] 王艳玲, 苏晓兰, 闫思萌, 等. 桂芍欢苓汤联合匹维溴铵治疗腹泻型肠易激综合征临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 3(1): 105-108.
- WANG Y L, SU X L, YAN S M, et al. Clinical observation on the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome with Guishao huanling decoction and pinaverium bromide [J]. World J Integr Tradit West Med, 2017, 3(1): 105-108.
- [23] 任培培, 汪龙德, 刘俊宏, 等. 腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的研究方法 [J]. 中医研究, 2019, 32(6): 49-52.
- REN P P, WANG L D, LIU J H, et al. Research method of rat model of diarrhea irritable bowel syndrome with liver depression and spleen deficiency combined with disease and syndrome [J]. Tradit Chin Med Res, 2019, 32(6): 49-52.
- [24] 许东, 王承党, 李晓青, 等. 腹泻型肠易激综合征合并心理异常对肠道症状的影响 [J]. 中华消化杂志, 2018, 38(9): 603-608.
- XU D, WANG C D, LI X Q, et al. Impact of comorbid psychological disorders on intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Chin J Dig, 2018, 38(9): 603-608.
- [25] 刘康毅. 腹泻型肠易激综合征中医证候规律及临床特征调查 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2015.
- LIU K Y. Investigation on TCM syndrome regularity and clinical characteristics of diarrhea irritable bowel syndrome [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2015.
- [26] WOUTERS M M, VAN WANROOY S, NGUYEN A, et al. Psychological comorbidity increases the risk for postinfectious IBS partly by enhanced susceptibility to develop infectious gastroenteritis [J]. Gut, 2016, 65(8): 1279-1288.
- [27] 李慧, 田耀洲, 张训兵, 等. 熄风化湿方对腹泻型肠易激综合征大鼠内脏高敏感性的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 704-707.
- LI H, TIAN Y Z, ZHANG X B, et al. Effect of Xifeng Huashi recipe on visceral hypersensitivity in rats with diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2019, 35(6): 704-707.
- [28] 管洁, 邓娜, 蔺晓源, 等. 腹泻型肠易激综合征及其中医病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(5): 73-78.
- GUAN J, DENG N, LIN X Y, et al. Study advances in animal models of IBS-D and TCM combination of disease and syndrome [J]. Inf Tradit Chin Med, 2023, 40(5): 73-78.
- [29] 祝姗姗, 王娇娇, 邹玲, 等. 基于多个 miRNAs 调节 NF- κ B 信号通路探讨艾灸干预腹泻型肠易激综合征模型大鼠的抗炎机制研究 [J]. 中国针灸, 2022, 42(6): 654-662.
- ZHU S S, WANG J J, ZOU L, et al. Anti-inflammation effect of moxibustion for rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome based on multiple miRNAs regulating NF- κ B signal pathway [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2022, 42(6): 654-662.
- [30] 丁晓洁, 孙喜灵, 于晓飞, 等. 乌梅丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群和炎症因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1296-1299, 1345.
- DING X J, SUN X L, YU X F, et al. Effect of Wumei pill on intestinal flora and inflammatory factors in rats with diarrhea-type irritable bowel syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, 46(6): 1296-1299, 1345.
- [31] 赵义红, 王菲, 娄静. 小檗碱对腹泻型肠易激综合征大鼠肠屏障功能、炎症反应及 NF- κ B p65 的影响 [J]. 华西药学期志, 2019, 34(6): 592-596.
- ZHAO Y H, WANG F, LOU J. Effect of berberine on the intestinal barrier function, inflammatory response and NF- κ B p65 in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. West Chin J Pharm Sci, 2019, 34(6): 592-596.
- [32] 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.
- [33] 崔国艳, 丁境文, 刘正江, 等. 利福昔明对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群的影响 [J]. 长治医学院学报, 2020, 34(1): 28-30, 60.
- CUI G Y, DING J W, LIU Z J, et al. The effectiveness of Rifaximin on intestinal microflora in irritable bowel syndrome in rats [J]. J Changzhi Med Coll, 2020, 34(1): 28-30, 60.
- [34] 曹佳男, 刘霞, 刘涛, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 5-HT 及 5-HT_{3R} 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(10): 1493-1497.
- CAO J N, LIU X, LIU T, et al. Effect of moxibustion on colon 5-HT and 5-HT_{3R} in diarrhea predominant irritable bowel syndrome rats [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(10): 1493-1497.
- [35] 张杰, 李红, 王进海, 等. 肠道微生态对腹泻型肠易激综合征的影响及其作用机制探讨 [J]. 世界临床药物, 2019, 40(5): 340-346.
- ZHANG J, LI H, WANG J H, et al. The effect and mechanism of intestinal microbiota in the pathogenesis of diarrhea type

- irritable bowel syndrome [J]. *World Clin Drugs*, 2019, 40(5): 340–346.
- [36] 蒋慧灵, 郑倩华, 赵映, 等. 结直肠扩张法诱导大鼠内脏高敏感模型制作概述 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 528–534.
- JIANG H L, ZHENG Q H, ZHAO Y, et al. Establishment of a rat colorectal distension-induced model of visceral hypersensitivity [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 528–534.
- [37] 李晓红, 莫兴夏, 陈秋霞, 等. 5-羟色胺与其受体亚型在肝郁脾虚证大鼠的表达及逍遥散的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(11): 2593–2597.
- LI X H, MO X X, CHEN Q X, et al. Expressions of 5-hydroxytryptamine and its receptor subtypes in rats with liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome and effects of Xiaoyao Powder [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(11): 2593–2597.
- [38] 刘昊, 李文静, 王馨媛, 等. 基于数据挖掘的功能性消化不良动物模型的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(4): 478–491.
- LIU H, LI W J, WANG X A, et al. Analysis of the application characteristics of functional dyspepsia animal models based on data mining [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(4): 478–491.
- [39] 石敬依, 周滔, 蔡文君, 等. 基于中医证型的功能性消化不良动物模型的研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(17): 1923–1928.
- SHI J Y, ZHOU T, CAI W J, et al. Research progress of animal models of functional dyspepsia based on TCM syndrome types [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2021, 30(17): 1923–1928.
- [40] 黄辰, 李瑛, 赵妍, 等. 脾虚证动物模型评价方法评述 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(2): 433–437, 447.
- HUANG C, LI Y, ZHAO Y, et al. Review of animal model evaluation method of liver-stagnation and spleen-deficiency [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2018, 45(2): 433–437, 447.
- [41] 叶晓梅, 王东明, 袁康瑞, 等. 药对枳实-白芍配伍比例对肝郁脾虚型肠易激综合征大鼠的药效学研究 [J]. *广东医科大学学报*, 2019, 37(6): 619–622, 626.
- YE X M, WANG D M, YUAN K R, et al. Pharmacodynamics of Zhishi-Baishao pair in rats with spleen deficiency-type irritable bowel syndrome [J]. *J Guangdong Med Univ*, 2019, 37(6): 619–622, 626.
- [42] 郭军雄, 许小敏, 刘雨娟, 等. 腹泻型肠易激综合征“肝郁脾虚证”病证结合大鼠模型的动态评估 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(11): 2590–2592.
- GUO J X, XU X M, LIU Y J, et al. Dynamic assessing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats with liver stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(11): 2590–2592.
- [43] DROSSMAN D A. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features and Rome IV [J]. *Gastroenterology*, 2016, 19: S0016-S0085.

[收稿日期] 2023-05-21

潘蕊,喻崑,张海亮,等. 不同方法建立小鼠肝癌原位移植瘤模型差异性的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 329-336.

PAN R, YU K, ZHANG H L, et al. Different transplantation models of hepatocellular carcinoma in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 329-336.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.006

不同方法建立小鼠肝癌原位移植瘤模型 差异性的探讨

潘蕊^{1,3,4}, 喻崑¹, 张海亮^{1,4}, 郑永仁⁵, 赵笑雨¹, 唐钧泽¹, 吴健铭¹, 程欣^{1,2,4*}

(1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 昆明 650500; 3. 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 昆明 650500; 4. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 昆明 650500; 5. 云南中医药大学科学技术处, 昆明 650500)

【摘要】 目的 比较肿瘤细胞注射和肿瘤组织块移植方法建立小鼠肝癌原位模型的差异, 为小鼠肝癌原位模型的建立提供技术参考。方法 取健康雄性 KM 小鼠, 随机分为 4 组: A 组注射小鼠肝癌 H22 细胞; B 组注射腹水型肝癌 H22 细胞; C 组采用小鼠肝癌组织块移植法; D 组肝部注射生理盐水作为假手术组。定期观察各组小鼠活动情况、体重变化。记录 4 组小鼠的生存时间。观察各组小鼠肝部成瘤状况、肿瘤程度、与腹腔脏器粘连程度和转移情况, 并进行 B 超成像, 检测血清中甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP)、异常凝血酶原 (des-gamma-carboxyprothrombin, DCP) 的浓度及苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理学变化。结果 A 组、B 组、C 组小鼠造模操作时间分别为 (3.36 ± 0.44) min、(3.30 ± 0.41) min、(5.68 ± 0.65) min。建模第 25 天, A 组、B 组、C 组小鼠成瘤率均 100.0%, A 组腹腔重度粘连率为 40.0%, B 组腹腔重度粘连率为 60.0%, C 组与 D 组均未出现重度腹腔粘连。A 组、B 组、C 组小鼠腹水出现率分别为 40.0%、100.0%、0.0%; 腹壁瘤出现率分别为 30.0%、60.0%、0.0%。B 组小鼠还存在肝转移情况 (40.0%)。B 超成像、血清 AFP 和 DCP 水平检测、组织病理学检查结果显示, 与 D 组小鼠相比, A 组、B 组、C 组小鼠肝边缘均不光滑, 回声欠均匀, 可见稍低回声包块; 保持 AFP、DCP 高分泌; 存在大量炎症细胞与肿瘤细胞。结论 在第 25 天时, 3 种方法均可以建立肝癌原位移植模型, 其中, 相较于肝癌组织块移植, 肿瘤细胞注射具有操作简单、肝内存在多个转移结节的特点。而肝癌组织块移植相较于肿瘤细胞注射, 则具有对腹腔等脏器影响较小等特点。

【关键词】 肝癌; 原位移植; 动物模型; B 超成像

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0329-08

Different transplantation models of hepatocellular carcinoma in mice

PAN Rui^{1,3,4}, YU Kun¹, ZHANG Hailiang^{1,4}, ZHENG Yongren⁵, ZHAO Xiaoyu¹,
TANG Junze¹, WU Jianming¹, CHENG Xin^{1,2,4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. the Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in University of Yunnan Province, Kunming 650500, China; 3. College of Chinese Materia Medica and Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Kunming 650500, China; 4. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Kunming 650500, China; 5. Science and Technology Office, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Corresponding author: CHENG Xin. E-mail: chengxin920@126.com

【基金项目】 云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项重点项目 (202001AZ070001-008), 云南省科技厅生物医药重大科技专项 (202002AA100007), 云南省科技人才平台计划 (202105AG070012), 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210ZD2207, 202210SS2205, 202210SS2206), 国家中医药管理局“十二五”重点学科-傣药学。

Funded by Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Yunnan University of Chinese Medicine Applied Basic Research Joint Project (202001AZ070001-008), Major Scientific and Technological Projects for Biomedical Industry of Yunnan Provincial Science and Technology Department (202002AA100007), Yunnan Province Science and Technology Talent Platform Plan (202105AG070012), Yunnan Province Key Laboratory of Dai Medicine and Yi Medicine Open Project (202210ZD2207, 202210SS2205, 202210SS2206), Key Discipline of Twelfth Five-Year Plan of State Administration of Traditional Chinese Medicine-Dai Pharmacy.

【作者简介】 潘蕊, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型。Email: panrui428@163.com

【通信作者】 程欣, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 纳米医药、药理等。Email: chengxin920@126.com

[Abstract] Objective To explore the otherness of orthotopic injection of cell suspensions and transplantation of tumor tissue blocks to establish orthotopic implantation models of hepatocellular carcinoma in mice, and to provide a technical reference for the establishment of an orthotopic implantation model. **Methods** Healthy KM mice were divided into four groups: group A, direct injection of H22 cells; group B, direct injection of H22 ascitic cells; group C, transplantation of tissues; and group D, direct injection of saline. Activity and weight changes were observed regularly in each group and survival times were recorded. Liver tumor formation, tumor size, abdominal organ adhesion degree, and metastasis were observed in all groups. B-ultrasound imaging was performed, concentrations of alpha fetoprotein (AFP) and abnormal prothrombin (DCP) were detected, and liver histopathological changes were detected by hematoxylin and eosin staining. **Results** Mice molding operation time in groups A, B, and C were (3.36 ± 0.44) min, (3.30 ± 0.41) min, and (5.68 ± 0.65) min, respectively. After modeling for 25 days, the rates of model formation in groups A, B, and C were all 100.0%. Severe abdominal adhesions occurred in 40.0% of mice in group A and 60.0% in group B, but in no mice in group C or D. Ascites occurred in 40.0%, 100.0%, and 0.0% and abdominal wall tumors in 30.0%, 60.0%, and 0.0% of mice in groups A, B, and C, respectively, while 40.0% of mice in group B also had liver metastasis. B-ultrasound imaging, detection of serum AFP and DCP levels, and histopathological result showed smooth liver margins, uneven echo and slightly lower echo mass, maintained high AFP and DCP secretion, and large numbers of inflammatory cells and tumor cells in mice in groups A, B, and C. **Conclusions** At day 25, all three methods can thus be used to establish orthotopic transplantation models of HCC. Among these, injection of cell suspensions demonstrated the advantage of simplicity in operation and the presence of multiple metastatic nodules within the liver, compared to transplantation of tumor tissue. Conversely, transplantation of tumor tissue showed the advantage of causing less impact on the abdomen and other organs when compared to injection of cell suspensions.

[Keywords] liver cancer; orthotopic transplantation; animal model; B-ultrasound imaging

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

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 是发生在消化系统中肝部的一种恶性肿瘤,也是我国最常见的恶性肿瘤之一,依据美国癌症协会数据显示,全球 PLC 年新发和死亡病例分别位居恶性肿瘤的第 6 位和第 3 位^[1]。2020 年肝癌在我国癌症新发病类型中排第 5,死亡病例中位列第 2。肝癌作为恶性肿瘤,致死率较高,已成为严重威胁我国人群健康的主要公共卫生问题之一^[2]。肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是 PLC 中最为常见的类型,约占 75% ~ 85%,HCC 常起源于肝硬化,其与慢性肝病密切相关^[3]。其次胆管细胞癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 是第二常见的原发性肝恶性肿瘤,起源于胆管上皮^[4]。肝癌动物模型一直是肝癌临床与基础研究工作的重要工具,目前有 2 种常用的模型,即皮下移植模型和原位移植模型。皮下移植模型,是将肝癌细胞悬液或组织接种到动物的腋下或背部皮下,具有操作简便、操作过程中不易导致动物死亡、易于观测肿瘤生长变化、很少发生局部浸润与远处转移,在肝癌皮下移植小鼠模型中,无法检测到腹水生成、肝转移等,不能完全模拟肝癌的自然生长环境与生物学特征,导致药物治疗效果出现假阳性^[5-6];原位移植模型,是采用手术

法直视下对肝进行接种,其能更准确地模拟人类肝癌的自然发展过程,因而常用于实验研究^[7]。本研究进行 3 种小鼠原位肝癌模型建立 (注射肝癌 H22 细胞悬液、注射肝癌 H22 腹水细胞、移植小鼠肝癌组织块),同时对小鼠的术后状态、肝部成瘤情况、肿瘤大小、腹腔脏器粘连程度及转移情况、B 超成像、血清生化、HE 染色观察肝组织等进行了研究分析,旨在比较肿瘤细胞注射和肿瘤组织块移植方法建立小鼠肝癌原位模型的差异,为研究肝癌的生长、侵袭、转移和药物治疗提供有用的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 80 只,4 周龄,体重 18 ~ 22 g,由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供【SCXK (京) 2019-0010】。饲养于云南中医药大学实验动物中心【SYXK (滇) K2022-0004】。实验和饲养条件严格按照 SPF 级实验动物的规范要求,实验期间小鼠自由饮水、摄食。室温 22 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 70%,12 h 光照与 12 h 黑暗交替的养

殖环境。本研究所涉及的所有动物实验,均经过云南中医药大学实验动物伦理委员会的审批(R-062022082)。

1.1.2 细胞

小鼠肝癌 H22 细胞株、腹水型肝癌 H22 细胞株均由云南中医药大学药剂实验室提供。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(上海达特希尔生物科技有限公司,2227147);青霉素-链霉素(双抗)(上海达特希尔生物科技有限公司,2233204);PBS 磷酸缓冲液(上海达特希尔生物科技有限公司,2237244);甲胎蛋白(AFP)ELISA 科研试剂盒(翰科生物科技有限公司,202305);小鼠脱- γ -羧基凝血酶原(DCP)ELISA 科研试剂盒(翰科生物科技有限公司,202305)。PN 5190-1509 型 100 μ L 微量注射器(Agilent);医用缝合线(扬州市金环医疗器械厂);医用缝合针(上海小昱医疗器械有限公司);柳叶型烙铁(SIENIU);4750E 二氧化碳培养箱(美国 NUAIRE 公司);Vetus 7 型彩色多普勒超声诊断仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原位肝癌模型的建立

(1)注射肝癌 H22 细胞悬液法:该方法定义为 A 组,随机取 20 只小鼠。调整 H22 细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,制备成单细胞悬液。用异氟烷麻醉后,在小鼠腹部用脱毛膏脱毛,并对腹部进行消毒,将四肢固定在无菌手术台后,再次对腹部进行消毒,切开正中肌层、暴露肝部,将肝外翻。微量注射器取 H22 细胞悬液 100 μ L,于肝左叶接种 H22 细胞,驻针约 5 s,缓慢拔出针头,用电烙铁止血后,再用酒精棉签擦拭肝,依次缝合小鼠皮下层、皮层,解绑小鼠,观察至其恢复正常呼吸后移至鼠笼。

(2)注射腹水型肝癌 H22 细胞法:该方法定义为 B 组,随机取 20 只小鼠。取腹水型肝癌 H22 细胞调整密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$,采用与注射肝癌 H22 细胞悬液法同样方法进行接种,观察小鼠恢复正常呼吸后移至鼠笼。

(3)小鼠肝癌组织块移植法:该方法定义为 C 组,随机取 20 只小鼠。小鼠皮下瘤的建立,取腹水型肝癌 H22 细胞调整密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取 200 μ L 该腹水细胞接种至小鼠右前肢背部。接种后第 7 天,在小鼠接种部位可摸到质硬的肿瘤小块,无菌条件下将其切成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,并放入生理

盐水中备用。采用与注射肝癌 H22 细胞悬液法同样方法暴露肝,并用眼科镊刺一隧道,植入肿瘤块,依次缝合小鼠皮下层、皮层,解绑小鼠,观察至其恢复正常呼吸后移至鼠笼。

(4)假手术组:该组定义为 D 组,随机取 20 只小鼠,采用与注射肝癌 H22 细胞悬液法同样方法进行手术操作,但不进行注射细胞,仅注射生理盐水 100 μ L。

1.2.2 小鼠原位肝癌模型的筛选

(1)术后小鼠一般情况:在建模后,每 2 d 观察小鼠的饮水、进食、精神行为状态,并称重。

(2)成瘤观察:接受原位移植瘤手术后第 25 天,随机处死各组 10 只小鼠,观察成瘤情况,统计各组小鼠的成瘤率。

(3)生存期考察:A 组、B 组、C 组、D 组各剩余 10 只小鼠留作生存期考察,使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制生存曲线图。小鼠存活率(%)=(此组小鼠存活只数/此组小鼠总数) $\times 100\%$ 。

(4)腹腔脏器粘连程度的分级判定:在参考文献^[8]的基础上改进,设立等级分级法。0 级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间无粘连;Ⅰ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间有轻微粘连;Ⅱ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间有粘连,可分离且出血少;Ⅲ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间有较多粘连,不易分离且出血较多;Ⅳ级:肝肿瘤组织与其他内脏组织之间或与腹壁之间紧密粘连,强行分离可致内脏器官撕裂。0 ~ Ⅱ级为轻度粘连;Ⅲ ~ Ⅳ级为重度粘连。

(5)肿瘤转移情况判断:观察是否产生腹水,检查腹腔、脾、肾、胃、肠、肺等脏器是否有肉眼可见肿瘤转移。

(6)超声检查:各组在接受原位移植瘤手术后第 25 天进行超声检查,采用 Vetus 7 型彩色多普勒超声诊断仪,使用频率为 FH 9.0 的 L 12-4 s 探头,进行超声成像。

(7)血清 AFP、DCP 水平检测:采用酶联免疫法分析测定术后第 25 天各组小鼠 AFP、DCP 水平。

(8)病理形态观察:切除各组小鼠肝部肿瘤组织,多聚甲醛固定,用石蜡进行包埋,制片,HE 染色,最终通过光学显微镜观察各组小鼠肝组织情况。

1.3 统计学分析

整理数据,使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方

差分析,计算结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 肝癌原位移植模型建立

在采用 A 组、B 组、C 组 3 种方法制备肝癌原位移植模型时,对 3 种方法所需的手术时间、死亡动物数进行了比较,提前准备好细胞或肿瘤块、固定好小鼠后开始计时,至缝合结束,为整个手术时间。A 组制备方法和 B 组制备方法完成 1 只小鼠的手术时间为 2 ~ 3 min, C 组制备方法则需要 5 ~ 6 min,在时间上 A 组、B 组制备方法比 C 组缩短了 1 倍。主要原因是 A 组、B 组制备方法只需在暴露的肝部缓慢注射细胞即可,不会造成肝部大量出血。而 C 组制备方法需要在肝部划开较深隧道,在整个操作过程中易导致肝部大量出血,止血时间较长,导致操作难度提高。在整个手术过程中, C 组制备方法由于失血过多,导致 1 只小鼠死亡,且肿瘤易脱落到腹腔,手术时间为 (5.68 ± 0.65) min, A 组和 B 组制备方法动物均存活,手术时间分别为 (3.36 ± 0.44) min、 (3.30 ± 0.41) min,与 C 组制备方法比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 小鼠体重变化

术中 C 组 1 只小鼠失血过多导致死亡。术后 A、B、C、D 组小鼠均全部存活,小鼠状态良好,术后伤口愈合良好且未出现伤口感染等情况。每 2 d 对小鼠进行称重并记录,如图 1 所示, A 组小鼠前 13 d 体重变化平稳,第 13 ~ 25 天体重大幅度增加;在种

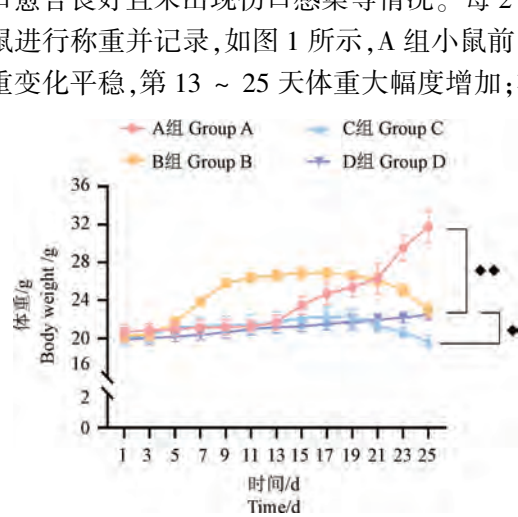
瘤第 25 天,小鼠体重达到最高,为 (31.8 ± 1.6) g,推测腹水的生成增加了小鼠体重。B 组小鼠在肿瘤第 17 天,小鼠体重达到最高,为 (26.9 ± 0.6) g,随后小鼠体重下降。C 组小鼠 20 d 内体重幅度小,增长较慢,第 21 天起体重呈下降趋势。推测 B 组、C 组小鼠后期体重下降原因:小鼠一般情况发生恶化,导致进食量减少,体重下降。D 组小鼠 25 d 内体重平稳增加。第 25 天时, A 组、C 组与 D 组小鼠体重相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), B 组与 D 组小鼠体重相比,无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 小鼠活动状态

建模后各组小鼠未受到明显影响,进食、活动如常。A 组小鼠在造模第 20 天毛发毛躁、无光泽、精神状态较萎靡、腹部肿大明显、活动减少; B 组小鼠第 12 天腹部肿大明显,第 18 天起进食量减少,随着时间推移,腹部肿胀程度增加,行动变得更加迟缓,更喜欢静止在饲养箱中某个角落,生命垂危; C 组小鼠较 A 组、B 组活跃,毛发也较有光泽,腹部未观察到肿胀; D 组小鼠最活跃,进食、饮水正常。

2.4 小鼠生存时间

如图 2 所示, D 组小鼠一直存活; A 组小鼠最长活到 37 d, 平均生存时间 (32.47 ± 3.79) d; B 组小鼠最长活到 30 d, 平均生存时间 (27.40 ± 1.89) d; C 组小鼠最长活到 38 d, 平均生存时间 (35.20 ± 2.73) d。但 A 组、B 组、C 组 3 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。



注:与 D 组相比,◆ $P < 0.05$,♦♦ $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Figure 1 各组小鼠体重变化图
Note. Compared with group D, ◆ $P < 0.05$, ♦♦ $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Body weight change of mice in each group

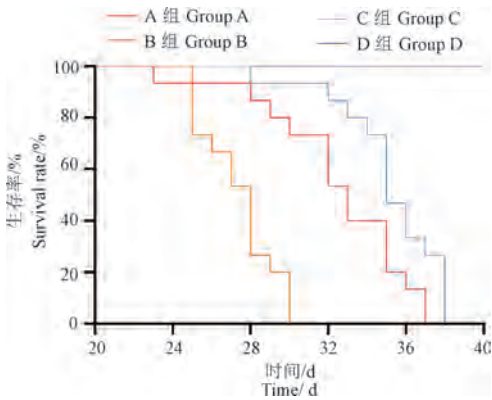


Figure 2 各组小鼠生存曲线
Figure 2 Survival rate of mice in each group

2.5 小鼠腹腔脏器粘连程度

各组小鼠腹腔粘连程度统计见表 1。A 组、B 组、C 组小鼠腹腔轻度粘连率分别为 60.0%、40.0%、100.0%;腹腔重度粘连率分别为 40.0%、60.0%、0.0%。D 组未出现轻、重度腹腔粘连。

表 1 各组小鼠腹腔粘连等级比较($n = 10, \%$)

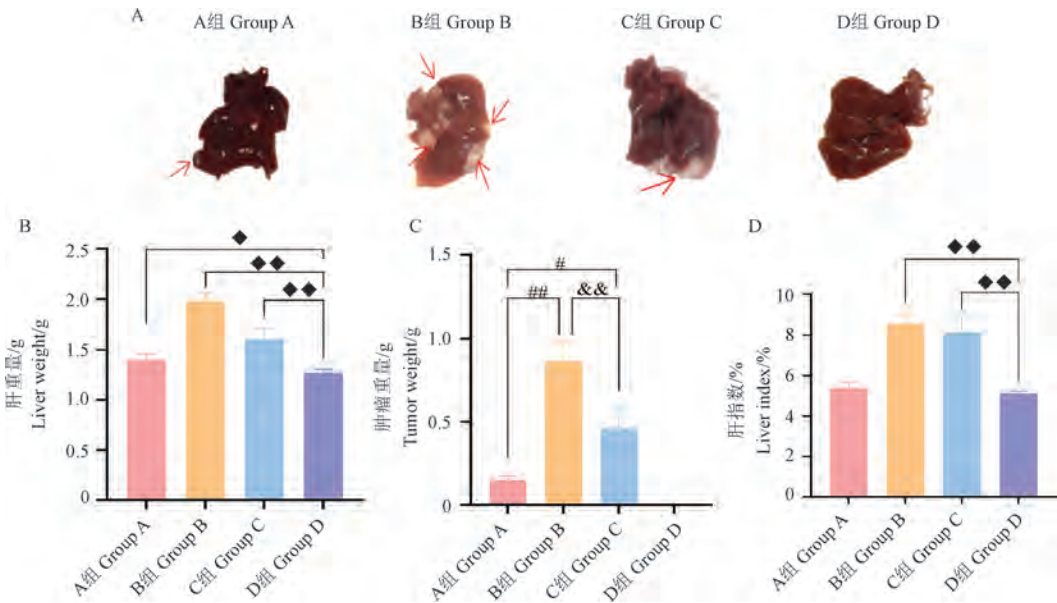
Table 1 Comparison of abdominal adhesion grade among the four groups($n = 10, \%$)

分组 Groups	0 级 Grade 0	I 级 Grade I	II 级 Grade II	III 级 Grade III	IV 级 Grade IV
A 组 Group A	0(0.0%)	0(0.0%)	6(60.0%)	3(30.0%)	1(10.0%)
B 组 Group B	0(0.0%)	0(0.0%)	4(40.0%)	4(40.0%)	2(20.0%)
C 组 Group C	0(0.0%)	3(30.0%)	7(70.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)
D 组 Group D	10(100.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)

2.6 小鼠肝样本肉眼观察及肝部肿瘤成瘤情况

接种后第 25 天对各组小鼠进行解剖,观察肝移植瘤的成瘤情况。A 组、B 组、C 组小鼠成瘤率均 100.0%。如图 3A 所示,4 组肝部外观有较大差异。A 组肝部表面较光滑,瘤块呈白色且分布较分散、不规则;B 组瘤体呈白色且巨大,并且其他肝叶也出现大片分散瘤体;C 组瘤形状相对规则,呈白色的椭圆;D 组肝表明光滑,质软,肝表面无疑似瘤块。如图 3B ~ 3D 所示,A 组小鼠的肝部平均重量为 (1.3985 ± 0.0652) g、肿瘤平均重量为 (0.1505 ± 0.0241) g、肝指数为 5.3751% ± 0.2998%;B 组小鼠的肝部平均重量为 (1.9601 ± 0.0950) g、肿瘤平均重量为 (0.8652 ± 0.0112) g、肝指数为 8.5530% ±

0.4860%;C 组小鼠的肝部平均重量为 (1.6045 ± 0.1123) g、肿瘤平均重量为 (0.4591 ± 0.1276) g、肝指数为 8.1617% ± 0.7594%;D 组小鼠的肝部平均重量为 (1.2722 ± 0.0365) g、肝指数为 5.1181% ± 0.1125%。A 组、B 组、C 组与 D 组小鼠肝重量相比具有显著性差异 ($P < 0.05$);A 组、B 组、C 组间肿瘤重量具有显著性差异 ($P < 0.05$);B 组、C 组与 D 组小鼠肝指数相比,具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。如表 2,在剖检时发现,A 组小鼠出现腹水 (40.0%) 和腹壁瘤 (30.0%);B 组小鼠出现腹水 (100.0%) 和腹壁瘤 (60.0%);C 组小鼠未出现上述现象。A 组、B 组可能存在肿瘤细胞从注射孔溢漏的情况,因此用电烙铁进行止血,尽量避免早期腹水的形成及腹



注:A:各组小鼠肝原位瘤;红色箭头:肿瘤结节;B:各组小鼠肝重量;C:各组小鼠肿瘤重量;D:各组小鼠肝指数;与A组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与B组相比, && $P < 0.01$ 。

图 3 不同造模方法成瘤情况

Note. A. Liver orthotopic tumor in each group. Red arrows. Cancer nodules. B. Liver weight of mice in each group. C. Tumor weight of mice in each group. D. Liver index of mice in each group. Compared with group A, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with group B, && $P < 0.01$.

Figure 3 Tumor formation by different molding methods

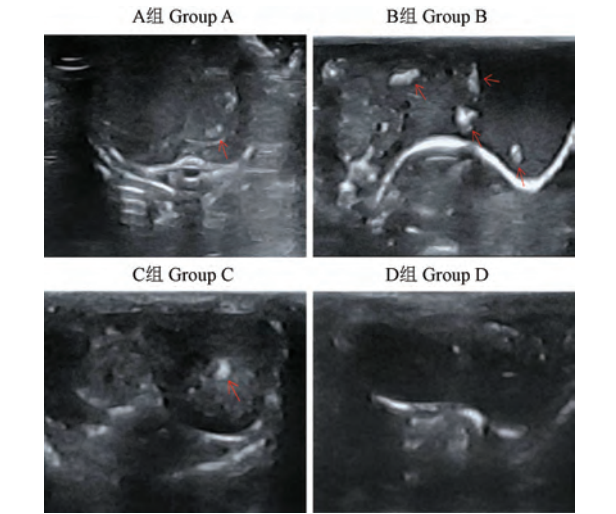
壁瘤的生成。A 组、B 组小鼠还发现肝内多个肿瘤结节,此外 B 组还发现腹水瘤细胞从肝转移至胃、肠情况,可能是肿瘤细胞通过脉管系统形成的肝转移现象^[9]。

表 2 各组小鼠肿瘤情况比较($n = 10, \%$)

Table 2 Comparison of tumor status of mice in each group($n = 10, \%$)			
分组 Groups	腹水出现率 Occurrence rate of ascites	腹壁瘤出现率 Incidence of abdominal wall tumor	肝转移率 Liver metastasis rate
A 组 Group A	4(40.0%)	3(30.0%)	0(0.0%)
B 组 Group B	10(100.0%)	6(60.0%)	4(40.0%)
C 组 Group C	0(0.0%)	0(0.0%)	0(0.0%)

2.7 小鼠肝 B 超成像

如图 4 所示,D 组小鼠肝表面光滑,包膜较完整,形态大小正常,回声较均匀;A 组、B 组、C 组小鼠肝边缘均不光滑,内部回声欠均匀,于肝内探及稍低回声包块。对 A 组、B 组、C 组小鼠进行解剖,均发现小鼠肝部可见肿瘤结节,多呈结节状突起,色泽苍白。结合 B 超成像结果以及大体解剖观察,确认造模成功,3 种造模方式均可成功移植。



注:红色箭头:疑似肿瘤结节。

图 4 各组小鼠 B 超成像图

Note. Red arrows. Suspected cancer nodules.

Figure 4 Ultrasound imaging of mice in each group

2.8 小鼠血清 AFP、DCP 浓度的比较

如表 3 所示,血清 AFP、DCP 水平在肝癌模型小鼠中呈高表达。A 组、B 组、C 组小鼠血清中的 AFP、DCP 浓度与 D 组小鼠相比显著升高($P < 0.01$)。

A 组、B 组、C 组小鼠血清中的 AFP 浓度分别是 D 组小鼠的 13.97、18.60、14.41 倍;A 组、B 组、C 组小鼠血清中的 DCP 浓度分别是 D 组小鼠的 5.79、8.38、6.06 倍。A 组、C 组两组小鼠血清中 AFP、DCP 浓度比较无显著性差异($P > 0.05$)。B 组小鼠血清中 AFP、DCP 浓度高于 A 组、C 组,且具有显著性差异($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠血清 AFP、DCP 水平($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Comparison of tumor status of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)		
组别 Groups	AFP/($\mu\text{g/L}$)	DCP/(ng/mL)
A 组 Group A	136.566 $\pm$ 13.726 ^{&&◆◆}	83.061 $\pm$ 15.000 ^{&&◆◆}
B 组 Group B	181.842 $\pm$ 16.575 ^{◆◆}	120.168 $\pm$ 24.460 ^{◆◆}
C 组 Group C	140.836 $\pm$ 3.595 ^{&&◆◆}	86.824 $\pm$ 15.630 ^{&&◆◆}
D 组 Group D	9.774 $\pm$ 1.767	14.338 $\pm$ 3.632

2.9 小鼠肝组织病理形态

如图 5 所示,D 组小鼠肝组织内肝叶结构正常,肝细胞核完整,肝细胞排列整齐,细胞着色正常,无肿瘤样或炎症细胞浸润现象。A 组、B 组、C 组 3 组小鼠肝组织分界不清晰,肿瘤细胞形态各异如:多边形、类圆形或其他形态、大小不同、排列不规则。大的肿瘤灶内部分区域可见片状坏死组织。综合病理切片结果与前述大体解剖观察和 B 超成像结果,提示 3 种造模方式均可成功。

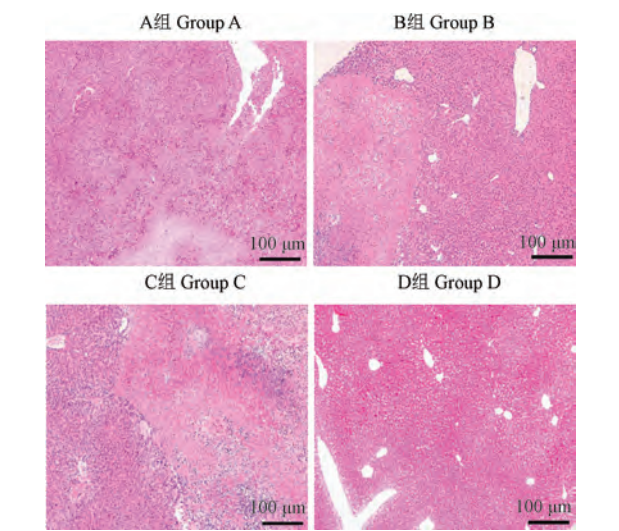


图 5 各组小鼠肝组织的 HE 染色

Figure 5 HE staining of liver tissues of mice in each group

3 讨论

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,病死率居我国恶性肿瘤的第 2 位,已严重威胁人们的生命安全。肝癌治疗近几年在多学科共同努力下有了很大的进展,但仍存在一定的局限性,如肝癌发展迅速、存在肝内转移、术后复发等隐患^[2,10]。因此,深入研究肝癌发生、转移机制,寻找抗肝癌新方法刻不容缓。

建立肝癌模型是深入研究肝癌的基础与保障。肝癌模型的建立方法有:化学诱导模型^[11]、基因工程小鼠模型^[12]、移植瘤模型^[13]。最常用的方法为移植瘤法,异位移植法操作简单、成瘤时间短、易于观察,一直作为首选方法。然而,肿瘤原发器官微环境会影响肿瘤细胞的生物学特征^[14]。异位移植瘤模型无法模拟肿瘤细胞在人体中迁移、侵袭行为^[15]。原位移植模型可以更好地模拟肿瘤细胞与宿主组织相互作用的情况,包括肿瘤侵袭、血管生成、免疫应答等,可以更准确评价药物、理解肿瘤生物学行为。本文分别通过注射肝癌 H22 细胞悬液、注射腹水型肝癌 H22 细胞、移植小鼠肝癌组织块 3 种不同的方法构建肝原位模型,同时设立肝部注射生理盐水的假手术组,对这 4 组小鼠进行观察,对比一般情况、肝部成瘤情况、肿瘤大小、腹腔脏器粘连程度及转移情况,并对比 3 组原位模型小鼠与假手术组的 B 超成像结果、AFP 与 DCP 水平、病理学差异。各组小鼠一般状况和生存情况结果表明,注射肝癌 H22 细胞悬液小鼠在观察的 25 d 内体重逐渐上升,观察至 34 d 仍有 40% 的小鼠存活;注射腹水型肝癌 H22 细胞组前 17 d 体重逐渐增加,随后体重逐渐下降,观察至 30 d 小鼠无一存活;移植肝癌组织块组小鼠前 20 d 体重变化幅度小,随后体重下降,观察至 36 d 仍有 40% 的小鼠存活;注射生理盐水组小鼠在观察的 25 d 内体重平稳,观察至 40 d 小鼠成活率仍为 100%。各组成瘤情况、腹腔脏器粘连程度及转移情况结果表明,注射肝癌 H22 细胞悬液组、注射腹水型肝癌 H22 细胞组、移植小鼠肝癌组织块组成瘤率均为 100.0%;腹腔脏器重度粘连率分别为 40.0%、60.0%、0.0%;注射腹水型肝癌 H22 细胞组还出现胃肠转移等现象;注射生理盐水组小鼠并未出现上述情况。肝癌 H22 细胞悬液注射法和腹水型肝癌 H22 细胞注射法具有操作简单、存活率高等优点。肝癌组织块移植法具有转移少、

腹腔粘连程度轻等优点。在目前肝癌临床诊断实践中,主要采取影像学检查结合 AFP 检测。AFP 在肝癌细胞中呈高表达,可作为肝癌诊断的辅助手段,但 AFP 灵敏度较低^[16-17]。多项肿瘤标志物指标联合检测可以通过综合考虑多个指标的阳性率,提高肝癌诊断的有效性与准确性。特别是在 AFP 呈阴性情况下,可以联合 DCP 提高肝癌诊断的灵敏性。因此本研究联合 B 超成像、血清 AFP、DCP 水平、组织切片等结果,显示上述 3 种方法均可在短时间内成功建立肝癌原位瘤小鼠模型。

综上所述,注射肝癌 H22 细胞悬液、注射腹水型肝癌 H22 细胞、移植小鼠肝癌组织块 3 种方法均可成功建立肝癌原位模型,其中,相较于肝癌组织块移植,肿瘤细胞注射具有操作简单、肝内存在多个转移结节的特点;而肝癌组织块移植相较于肿瘤细胞注射,则具有对腹腔等脏器影响较小等特点,这些可为肝癌的发病机制、病因、临床表现等相关研究提供可靠的动物模型,对肝癌预防、诊断和治疗相关动物模型的选择提供一定的参考依据。

参 考 文 献(References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] COLOTTA F, ALLAVENA P, SICA A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(7): 1073-1081.
- [4] LIESHOUT R, FARIA A V S, PEPPELENBOSCH M P, et al. Kinome profiling of cholangiocarcinoma organoids reveals potential druggable targets that hold promise for treatment stratification [J]. Mol Med, 2022, 28(1): 74.
- [5] 孔丽娟, 郝智慧, 王成, 等. 裸鼠肺癌原位模型的建立及肿瘤对裸鼠生理功能的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(10): 920-925.
KONG L J, HAO Z H, WANG C, et al. Establishment of orthotopic lung cancer model in nude mice and effects of tumor on physiological function of nude mice [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2019, 36(10): 920-925.
- [6] GREENLEE J D, KING M R. A syngeneic MC38 orthotopic mouse model of colorectal cancer metastasis [J]. Biol Methods Protoc, 2022, 7(1): bpac024.
- [7] STEWART E. Orthotopic implants in mice [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2226: 215-222.
- [8] 毛璐婧, 张娜娜, 刘昊, 等. 适用于微创消融治疗研究的小鼠胰腺癌原位模型建立方法及比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2): 127-134.
MAO L J, ZHANG N N, LIU H, et al. Establishment and comparison of mouse pancreatic cancer orthotopic model for

minimally invasive ablation therapy study [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(2): 127-134.

[9] 罗晓琴, 丁冠茗, 郑旭, 等. 小鼠肝癌原位移植性肿瘤动物模型的改良 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 16-22. LUO X Q, DING G M, ZHENG X, et al. Improved mouse model of orthotopic transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 16-22.

[10] CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S, FISHER P B, SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC): epidemiology, etiology and molecular classification [J]. Adv Cancer Res, 2021, 149: 1-61.

[11] 周文斌, 郑越, 尚佳, 等. 二乙基亚硝胺诱导肝细胞癌模型鼠肠道微生态研究 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(4): 438-453. ZHOU W B, ZHENG Y, SHANG J, et al. Intestinal microecology in mice bearing diethylnitrosamineinduced primary hepatocellular carcinoma [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2022, 51(4): 438-453.

[12] 李文新. 基因工程融合蛋白疫苗的衍生化及肝癌转移动物模型的建立与鉴定 [D]. 西安: 第四军医大学; 2009. LI W X. Derivatization of fusion protein and establishment and identification of animal model on human metastatic hepatocellular carcinoma [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University; 2009.

[13] ZHAO G J, XU L X, CHU E S, et al. Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47): 7087-7092.

[14] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. Cancer Res, 2019, 79(18): 4557-4566.

[15] 马雪曼, 王笑民, 于明薇, 等. 小鼠 lewis 肺癌原位移植瘤和异位皮下移植瘤模型的对比研究 [J]. 实用癌症杂志, 2018, 33(4): 523-526. MA X M, WANG X M, YU M W, et al. Comparative study of imagable lewis lung carcinoma between orthotopic and ectopic murine models [J]. Pract J Cancer, 2018, 33(4): 523-526.

[16] 朱嫦琳, 陈展泽, 李启欣. 基于决策曲线分析评估血清异常凝血酶原和甲胎蛋白在原发性肝癌中的诊断价值 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(19): 2524-2529. ZHU C L, CHEN Z Z, LI Q X. Diagnostic value of PIVKA-II and AFP in patients with primary hepatocellular carcinoma based on decision curve analysis [J]. J Pract Med, 2021, 37(19): 2524-2529.

[17] 陈琳, 张恒, 江斌. 血清 AFP、GGTI II、AFU 和 DCP 联合检测对肝癌的诊断价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2022, 14(8): 1283-1286, 1291. CHEN L, ZHANG H, JIANG B. The diagnostic value of combined detection of serum AFP, GGT II, AFU and DCP in liver cancer [J]. J Mol Diagn Ther, 2022, 14(8): 1283-1286, 1291.

[收稿日期] 2023-08-21

施佳君,杨钦钦,富丹婷,等. 冠心宁片抑制 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路改善阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠心肌细胞焦亡[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 337-346.

SHI J J, YANG Q Q, FU D T, et al. Guanxinning tablet ameliorates cardiomyocyte pyroptosis in rats with dilated cardiomyopathy by inhibiting the NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 337-346.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.007

冠心宁片抑制 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路改善 阿霉素诱导的扩张型心肌病 大鼠心肌细胞焦亡

施佳君¹,杨钦钦¹,富丹婷¹,郑纯威¹,张燕²,陈宇^{1*}

(1. 浙江省中医药研究院实验动物中心,杭州 310007;

2. 嘉兴市中医医院,浙江 嘉兴 314000)

【摘要】 目的 研究冠心宁片(Guanxinning, GXN)对扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)的保护作用,并从 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路深入探讨其对心肌细胞焦亡的作用机制。**方法** 随机将大鼠分为 GXN 低剂量组、GXN 高剂量组、地高辛组、模型对照组和正常对照组,通过阿霉素(doxorubicin, DOX)累积注射 17.5 mg/kg 诱导大鼠 DCM 模型,同时连续给药 10 周。超声心动图检测心功能指标,ELISA 检测血清 IL-1 β 和 IL-18 水平,RT-PCR 法检测心肌组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、NF- κ B、TXNIP、IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达,免疫组化、免疫荧光染色和 Western Blot 检测 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GSDMD、GSDMD-NT 的蛋白表达及 TUNEL 染色结果,透射电镜观察心肌细胞显微结构的变化。**结果** 与正常对照组比,模型对照组的 IVSs、IVSd、LVPWs、FS、SV、EF 和 HR 显著降低,LVIDs、ESV 及血清 IL-1 β 、IL-18 显著增加,NLRP3、ASC、Caspase-1、NF- κ B、TXNIP、IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达均显著增加,NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GSDMD-NT 的蛋白表达及 TUNEL 染色面积明显增加,显微结构明显改变。与模型对照组相比,冠心宁片可显著增加 IVSs、SV、FS、EF 和 HR,显著降低 LVIDs、ESV 和血清 IL-1 β 、IL-18 水平,降低心衰大鼠的 NLRP3、ASC、Caspase-1、NF- κ B、TXNIP、IL-1 β 、IL-18 的 mRNA 和 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、GSDMD-NT 的蛋白水平及 TUNEL 染色面积,显微结构明显改善。**结论** 冠心宁片可以有效改善阿霉素诱导的扩张型心肌病,可能是通过抑制 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路改善扩张型心肌病大鼠的心肌细胞焦亡实现的。

【关键词】 冠心宁片;扩张型心肌病;心肌细胞焦亡;NLRP3;Caspase-1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0337-10

Guanxinning tablet ameliorates cardiomyocyte pyroptosis in rats with dilated cardiomyopathy by inhibiting the NLRP3/ASC/ Caspase-1 pathway

SHI Jiajun¹, YANG Qinqin¹, FU Danting¹, ZHENG Chunwei¹, ZHANG Yan², CHEN Yu^{1*}

(1. Department of Experimental Animals, Zhejiang Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2. Jiaxing Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiaxing 314000, China)

Corresponding author: CHEN Yu. E-mail: blow2000@163.com

【基金项目】 嘉兴市科技计划项目(2019AY32023),浙江省中医药科技计划项目(2024ZR006)。

Funded by Jiaxing Science and Technology Plan Program(2019AY32023), Zhejiang Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project(2024ZR006)。

【作者简介】 施佳君,女,硕士,实验师,研究方向:实验动物与比较药理。Email:xsrsjj1992@126.com

【通信作者】 陈宇,男,硕士,高级实验师,研究方向:动物医学。Email:blow2000@163.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of Guanxinning (GXN) tablet on dilated cardiomyopathy (DCM), and to explore its effect and mechanism in pyroptosis of cardiomyocytes via the NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway. **Methods** Rats were divided into GXN low-dose, GXN high-dose, digoxin, model control, and normal control groups. The DCM model was induced by multiple intraperitoneal injections of 17.5 mg/kg doxorubicin (DOX). The drug was administered at the same time as the model was established for 10 weeks. After the last administration, echocardiography was used to assess cardiac function indexes. After sacrificing the rats, serum was collected to measure IL-1 β and IL-18 levels. RT-PCR was used to detect mRNA expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, NF- κ B, TXNIP, IL-1 β , and IL-18. Immunohistochemistry and immunofluorescence staining and Western Blot were used to assess NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , and IL-18, GSDMD and GSDMD-NT protein, and TUNEL staining result. Changes in the microstructure of cardiomyocytes were observed by transmission electron microscopy. **Results** Compared with the normal control group, IVSs, IVSd, LVPWs, FS, SV, EF, and HR of the model control group were significantly reduced, LVIDs, ESV, and serum IL-1 β and IL-18 were significantly increased, NLRP3, ASC, Caspase-1, NF- κ B, TXNIP, IL-1 β and IL-18 mRNA expression was significantly increased, and NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and GSDMD-NT protein expression and the TUNEL staining area were increased significantly, and the microstructure of cardiomyocytes changed significantly. Compared with the model control group, GXN significantly increased IVSs, SV, FS, EF, and HR, significantly reduced LVIDs, ESV, and the serum levels of IL-1 β and IL-18, and reduced NLRP3, ASC, Caspase-1, NF- κ B, TXNIP, IL-1 β , and IL-18 mRNA expression, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and GSDMD-NT protein expression, and the TUNEL staining area. Additionally, the microstructure was improved significantly. **Conclusions** GXN alleviates cardiomyocyte pyroptosis in rats with DCM by inhibiting the NLRP3/ASC/Caspase-1 pathway.

[Keywords] Guanxinning tablet; dilated cardiomyopathy; cardiomyocyte pyroptosis; NLRP3; Caspase-1

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

以阿霉素(doxorubicin, DOX)为代表的蒽环类抗癌药物抗瘤谱较广,对多数肿瘤均有明显的效果,其剂量依赖的心脏毒性极大地限制了其临床使用^[1],长期使用的患者后期常出现扩张型心肌病、心肌细胞死亡和不良心脏重塑,最终进展为心力衰竭^[2]。现有的研究表明 DOX 介导的心脏毒性主要集中在氧化应激、线粒体功能障碍、心肌细胞坏死^[3]。其中,心肌细胞坏死可影响 DOX 诱导的心脏毒性的发生和发展,主要包括凋亡、自噬、焦亡、坏死性死亡、铁死亡^[4]。虽然仅有少数几种药物可以预防 DOX 诱导的心脏毒性,但是并未获批,因此找到安全有效的替代方案显得尤为关键。

传统中药中多种活性成分和多个靶点相互作用,对 DOX 诱导的心脏毒性有显著的保护作用,且副作用小。冠心宁片是经丹参和川芎改进工艺后提取制成的新剂型,前期研究表明冠心宁片具有显著的抗氧化和抗炎、保护血管内皮、舒张血管、抗动脉粥样硬化及安全抗血栓、抗心肌细胞凋亡等多途径多靶点的药效作用^[5-9]。且前期亦对冠心宁片改善阿霉素诱导模型大鼠心肌细胞焦亡机制进行了初步的探究^[10],因此,本实验通过血清学、蛋白组学和电镜进一步检测心肌细胞焦亡指标,从 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路深入研究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体重 180 ~ 200 g,购买自杭州医学院【SCXK(浙)2019-0002】,将其饲养于浙江省中医药研究院 SPF 级实验室【SYXK(浙)2019-0010】,温度:22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,湿度:50% ~ 70%,光照:150 ~ 200 Lx,12 h 明暗交替(7:30 ~ 19:30);噪音:< 50 dB,自由饮食饮水。本动物实验经浙江省中医药研究院实验动物伦理委员会审查通过(浙中研动物伦理审字第[2022]014号),并于实验期间,遵循 3R 原则并给予人道主义关怀。

1.1.2 实验药物

GXN 浸膏粉(正大青春宝),淡棕色粉末,国药准字 Z20150028;地高辛(Digoxin)片(赛诺菲制药),白色片剂,国药准字 H33021738;盐酸多柔比星(瀚晖制药),橙红色粉针剂,国药准字 H33021980。

1.1.3 主要试剂与仪器

TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒(RR820A)、PrimeScript[™] RT Master Mix 试剂盒(RR036A)购于日本 TaKaRa 公司;PCR 引物来源于生工生物;ELISA 试剂盒购于南京建成;IL-18

(10663-1-AP)、Caspase-1 (22915-1-AP)、Alpha Actinin(11313-2-AP)兔多抗购自 Proteintech; IL-1 β (AF5103)、ASC(DF6304)抗体购自 affinity; GSDMD (A18281) 抗 体 购 自 ABclonal; GSDMD-NT (ab215203)抗体购自 abcam; β -actin (bs-0061R) 抗体购自 BOISS; TUNEL 试剂盒购自杭州浩克生物技术有限公司。

小动物超声仪(深圳迈瑞);全波长酶标仪(Gene Company Limited);免疫组化扫描仪(宁波江丰生物);免疫荧光扫描仪(3D HISTECH);Tecnai G2 spirit 120 kV 冷冻透射电子显微镜(美国 FEI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立与给药

将 30 只雄性 SD 大鼠随机分成 GXN 低剂量组、GXN 高剂量组、地高辛组、正常对照组和模型对照组。阿霉素的剂量参考文献^[10],造模各组每次腹腔注射 2.5 mg/kg 阿霉素,持续 7 次,5 d 为 1 个周期,累积浓度达到 17.5 mg/kg^[10]。同时 GXN 灌胃治疗,其人体推荐用药量为每天 12 片。每片含药量为 0.38 g,每日服药剂量约为 0.076 g/kg。人与大鼠剂量换算后大鼠的等效剂量约为 0.5 g/kg,参考文献^[7]决定将 0.6 g/(kg·d)作为本实验的低剂量,与等效剂量接近,低剂量的 2 倍 1.2 g/(kg·d)作为本实验的高剂量,参考文献^[11]地高辛组灌胃剂量为 0.05 mg/(kg·d),按 1 mL/100 g 体重灌胃,正常对照组和模型对照组给予等量纯水,连续 10 周。实验中,心超显示心室腔扩大,射血分数和短轴缩短率降低表明扩张型心肌病模型成功。

1.2.2 一般状态记录

观察各组大鼠的精神状态,并持续关注状态的改变并记录。

1.2.3 心超检测

异氟烷麻醉大鼠,将超声仪切到大鼠左室长轴,于二尖瓣腱索处切 M 超并记录图像,并测量大鼠舒张末室间隔厚度(IVSd)、收缩末左室后壁厚度(LVPWs)、收缩末室间隔厚度(IVSs)、收缩末期左室内径(LVIDs),计算左室射血分数(EF)、收缩末容积(ESV)、短轴缩短率(FS)、每搏输出量(SV)和心率(HR)等指标,选取任意 3 个均匀连续心动周期测量得到平均值,检测大鼠心脏结构和功能的改变。

1.2.4 血清炎症因子检测

ELISA 试剂盒测定血清中焦亡通路中的炎症因子白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-18(IL-18)水平。

1.2.5 mRNA 表达检测

用 TRIzol 试剂提取心肌组织的总 RNA ,逆转录成 cDNA ,并进行 RT-qPCR 反应。以 β -actin 为内参,通过 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算核因子- κ B(NF- κ B)、硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、NOD 样 3 受体蛋白(NLRP3)、半胱天冬蛋白酶(Caspase-1)、IL-1 β 、IL-18 的相对表达量,各引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
NF- κ B	F: TGTGTTGGAGGACTTGCTGAGG
	R: AGTGCTGCCTTGCTGTCTTGAG
TXNIP	F: CCAGACCAAAGTGCTCACTCAGAAG
	R: GAGACTCTTGCCACGCCATGATG
NLRP3	F: GAGCTGGACCTCAGTGACAATGC
	R: AGAACCAATGCGAGATCCTGACAAAC
ASC	F: CTCTGTATGGCAATGTGCTGAC
	R: GAACAAGTTCTTGCAGGTCAG
Caspase-1	F: AAACACCCACTCGTACACGCTCTTG
	R: AGGTCAACATCAGCTCCGACTCTC
IL-1 β	F: AATCTCACAGCAGCATCTCGACAAG
	R: TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC
IL-18	F: CGACCGAACAGCCAACGAATCC
	R: GTCACAGCCAGTCTCTTACTTCAC

1.2.6 免疫组化和免疫荧光检测焦亡相关蛋白的表达

所有固定好的组织常规石蜡包埋,切成 4 μ m 薄片,脱蜡、脱水,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,加相应的合适浓度的一抗孵育,之后加二抗孵育。免疫组化后续 DAB 显色,复染细胞核,脱水封片后扫描。免疫荧光后续信号放大,标记完抗体后再修复进入 TUNEL 标记,微波修复,配试剂工作液以及孵育,DAPI 复染细胞核,封片后扫描,使用 Case Viewer 观察并采集图像进行统计。

1.2.7 Western Blot 检测心肌组织中焦亡相关蛋白的表达

利用蛋白提取试剂盒提取心肌组织总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量,具体步骤按试剂盒操作说明进行。Western Blot 检测心肌组织焦亡相关蛋白 GSDMD、GSDMD-NT 及内参的表达。

1.2.8 透射电镜检测

将心肌组织按电镜要求取材、固定、脱水、渗透、包埋、聚合后,用超薄切片机切片,染色,上机。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0、Image J、Image-Pro Plus 6.0 软

件对数据和图片进行统计分析,用平均值 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示所有数据,运用单因素方差分析及 t 检验评价实验结果,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性以 $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 GXN 对大鼠一般状况影响

正常对照组大鼠健康有劲,毛光亮致密,状态

良好,血色鲜红;造模各组前 5 周并未见明显异常,第 6 周开始出现萎靡症状,第 8 周开始出现明显的腹水及腹泻,至第 10 周状态虚弱,血色略紫,毛色黄涩,腹水鼓胀。其中以模型对照组最为明显,GXN 低、高剂量组状态稍好,腹水也相对减少(图 1)。腹水可能是腹腔注射造模,药物引起的腹腔炎症导致的,可能静脉给药更为合适。实验期间,模型对照组大鼠死亡 1 只,其余均未死亡。

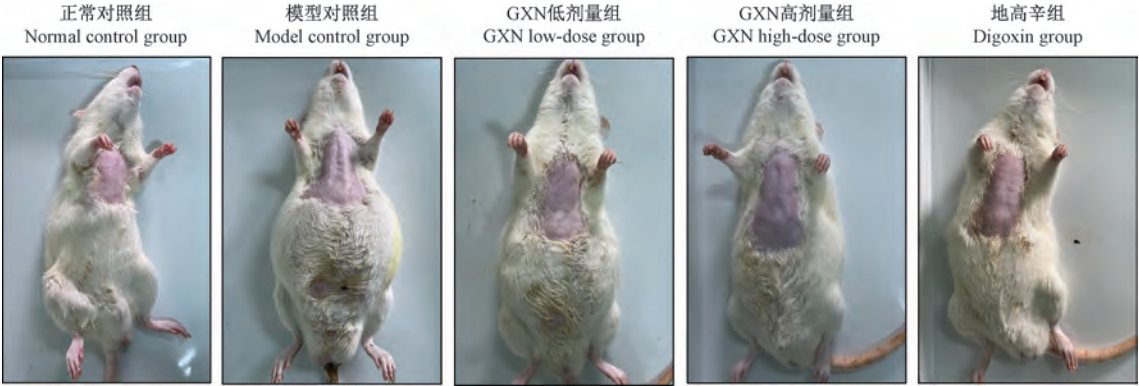


图 1 10 周大鼠的一般状况

Figure 1 General condition of rats at 10 weeks

2.2 GXN 对大鼠心脏超声指标的影响

通过分析大鼠超声心动 M 型图可知,阿霉素给药后模型对照组较正常对照组 IVSd、IVSs、LVPWs 明显缩短($P < 0.01, P < 0.05$),通过计算可知模型组的 SV、FS、EF 和 HR 较正常对照组显著减小($P < 0.01, P < 0.05$),模型对照组的 LVIDs、ESV 较正常对照组显著增加($P < 0.05$)(图 2,图 3),扩张型心肌病造模成功。GXN 低剂量组 IVSs、SV 和 HR 较

模型对照组明显升高($P < 0.05$);GXN 高剂量组较模型对照组 IVSd、IVSs、FS 和 EF($P < 0.01, P < 0.05$)显著增加,LVIDs、ESV($P < 0.01$)显著降低;地高辛组较模型对照组 IVSd、IVSs、LVIDs、FS 和 EF($P < 0.05$)显著增加,而 LVIDs、ESV($P < 0.05$)显著降低(图 2,图 3)。这提示了模型对照组出现明显的心脏结构破坏,影响了心功能,GXN 给药后心脏的结构和功能得到了明显的改善,与地高辛组相当。

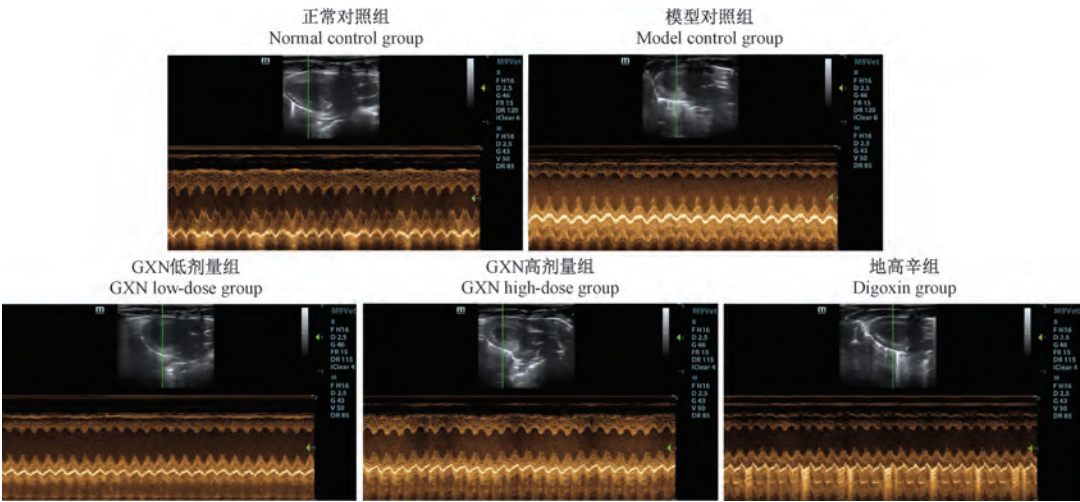
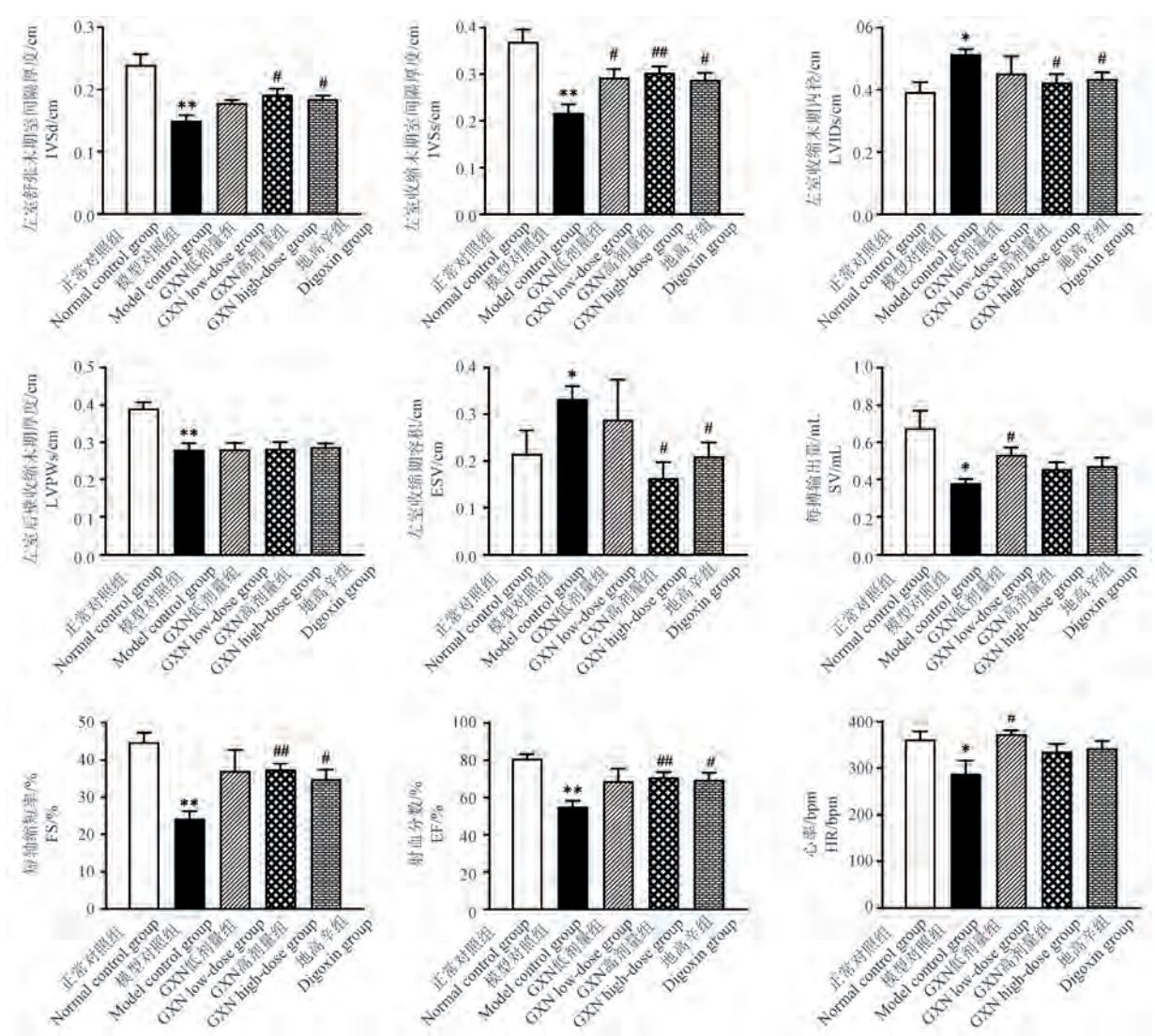


图 2 各组大鼠超声心动 M 型图

Figure 2 M type echocardiography of each group



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型对照组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。(下图同)

图3 GXN对DCM大鼠超声心动图指标的影响

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

Figure 3 Effect of GXN on echocardiogram indexes in rats with DCM

2.3 GXN对DCM大鼠血清IL-1β和IL-18的影响

通过ELISA检测发现模型对照组血清中的炎症因子IL-1β和IL-18较正常对照组明显升高($P < 0.01$);而GXN低、高剂量组和地高辛组的IL-1β和IL-18较模型对照组均显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)(图4)。这提示GXN能降低血清中IL-1β和IL-18的释放。

2.4 GXN对DCM大鼠心肌组织中焦亡基因表达的影响

与正常对照组相比,模型对照组的焦亡相关基因ASC、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18、NF-κB和

TXNIP的mRNA水平均显著升高($P < 0.01$),GXN低、高剂量组和地高辛组给药后焦亡相关基因mRNA水平较模型对照组有相当程度的降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)(图5)。该结果表明GXN对焦亡的抑制已经在基因层面得到体现。

2.5 GXN对DCM大鼠心肌组织中焦亡相关蛋白表达的影响

与正常对照组相比,模型对照组心肌上ASC斑点生成明显增加且出现了明显的焦亡细胞,给予GXN后心肌组织上ASC斑点的生成和焦亡细胞明显减少(图6)。通过荧光强度分析,模型对照组较正常对照组ASC、Caspase-1和TUNEL的荧光强度

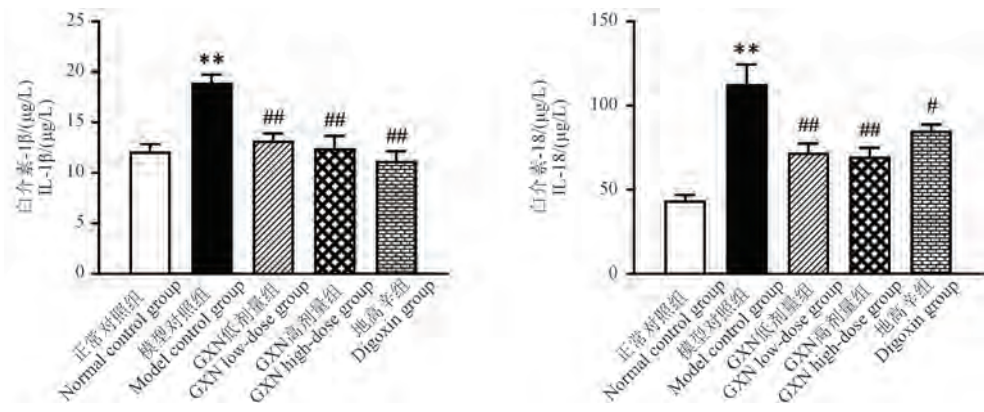


图 4 GXN 对 DCM 大鼠血清 IL-1 β 和 IL-18 的影响

Figure 4 Effect of GXN on serum IL-1 β and IL-18 in rats with DCM

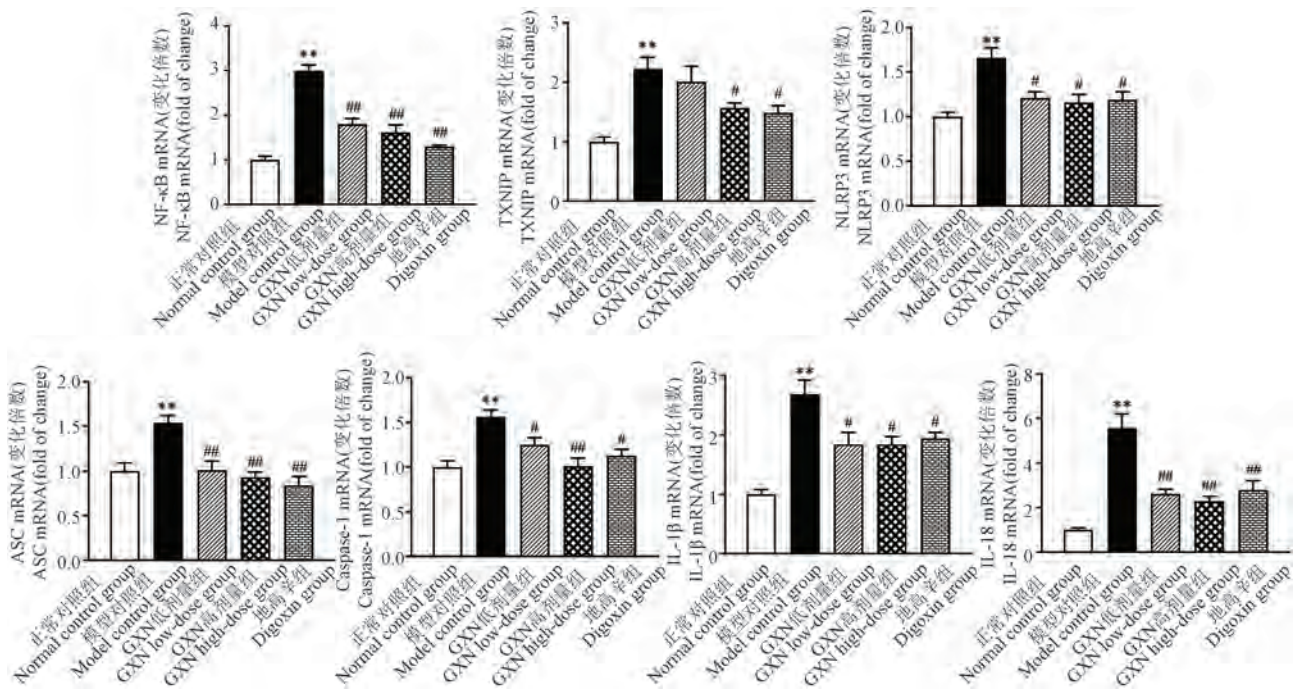


图 5 GXN 对 DCM 大鼠心肌组织焦亡基因表达的影响

Figure 5 Effect of GXN on pyrogenic gene expression in myocardial tissue in rats with DCM

显著增加 ($P < 0.01$), GXN 低、高剂量组的荧光强度均明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$) (图 7)。这些结果均提示模型对照组出现了心肌细胞焦亡, GXN 给药后焦亡减少。

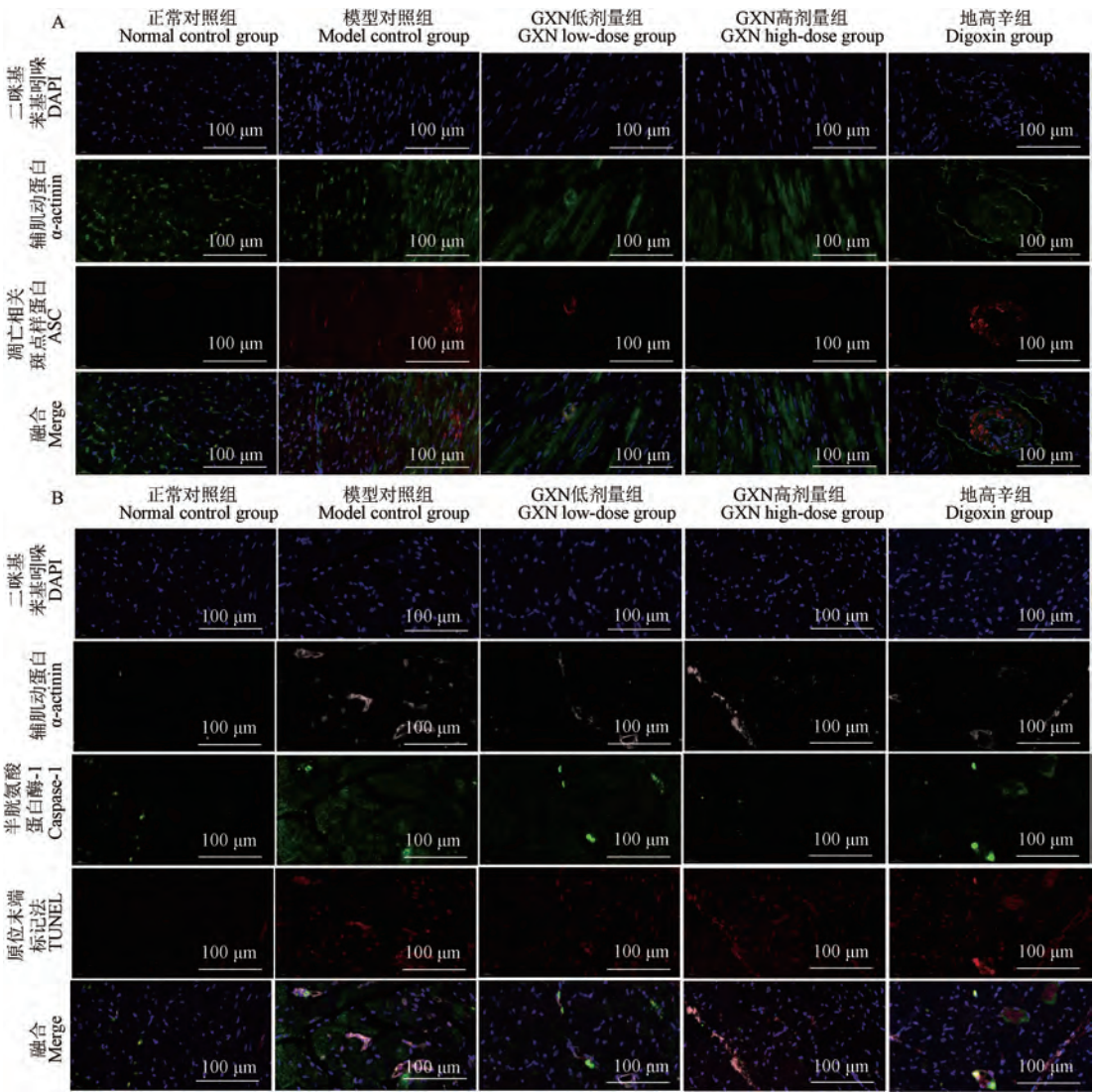
与正常对照组相比, 模型对照组心肌组织 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的表达显著增加 ($P < 0.01$), GXN 给药后较模型对照组明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$) (图 8)。

与正常对照组相比, 模型对照组心肌组织 GSDMD 的蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$),

GSDMD-NT 明显增加 ($P < 0.01$), GXN 给药后 GSDMD 的蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$), GSDMD-NT 明显下降 ($P < 0.01, P < 0.05$) (图 9)。

2.6 DCM 大鼠心肌细胞显微结构变化

与正常对照组相比, 模型对照组细胞浓缩凝聚, 出现炎症反应, 肌节断裂, 核固缩, 细胞质呈空泡状, 内容物流失, 出现焦亡小体, 线粒体损伤, 形态改变, GXN 给药后以上症状出现了明显的改善 (图 10)。



注:A:ASC 免疫荧光染色;B:Caspase-1 和 TUNEL 免疫荧光染色。

图 6 免疫荧光染色图

Note. A. Immunostaining of ASC. B. Immunostaining of Caspase-1 and TUNEL.

Figure 6 Immunostaining figure

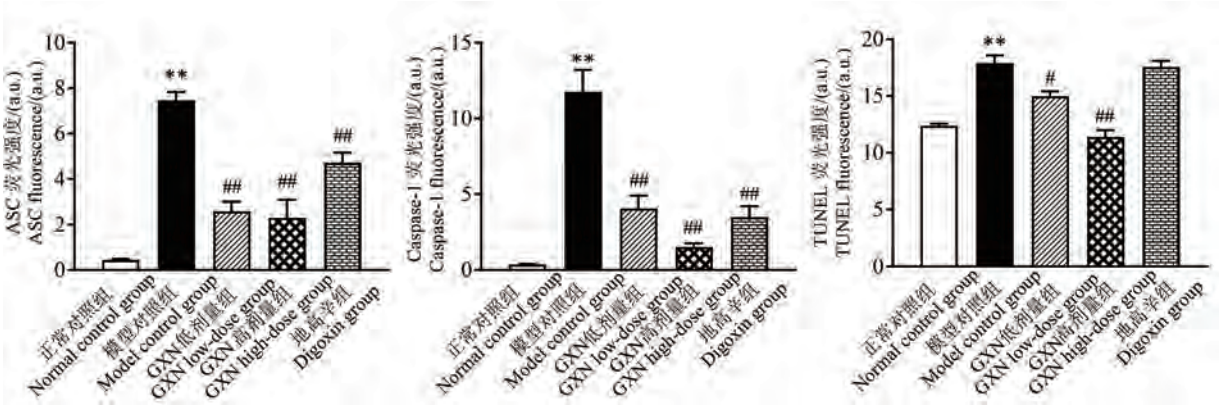


图 7 ASC、Caspase-1 和 TUNEL 荧光强度分析

Figure 7 Fluorescence analysis of ASC, Caspase-1 and TUNEL

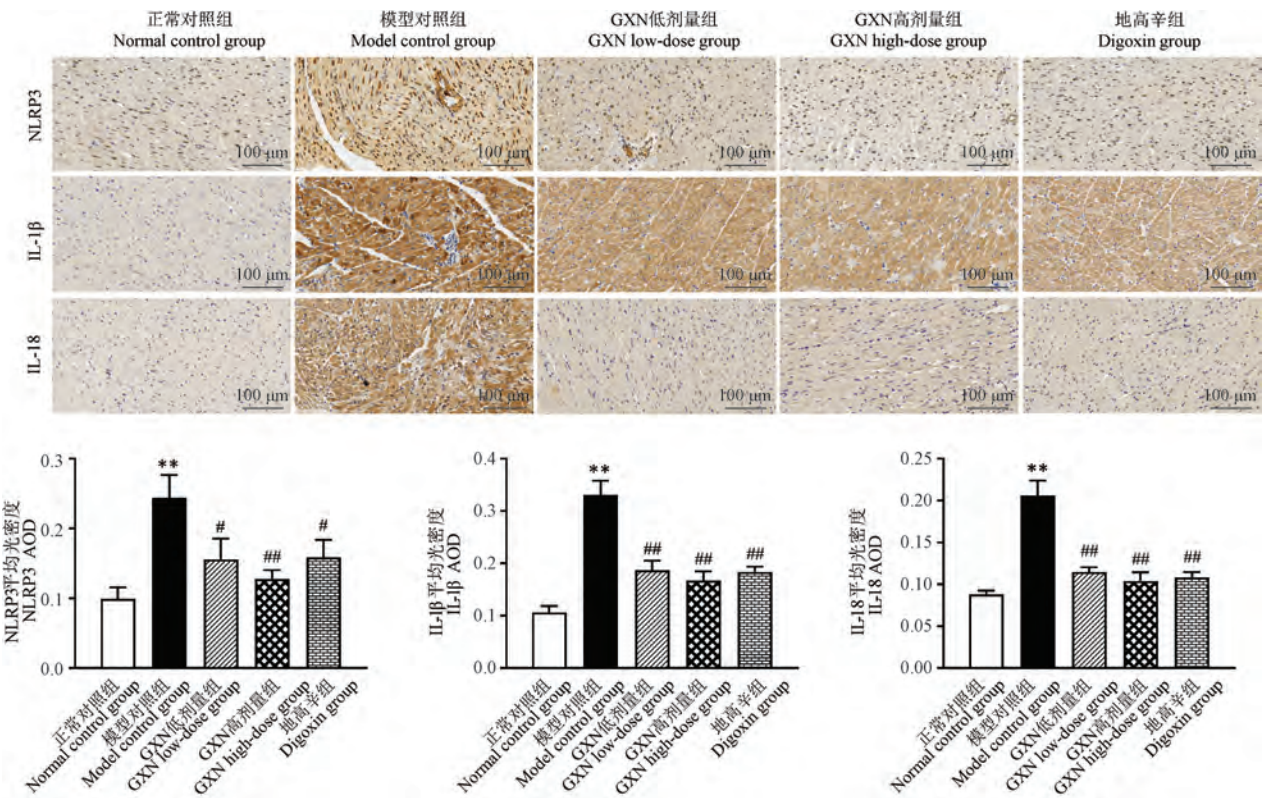


图 8 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的免疫组化染色及分析

Figure 8 Immunohistochemical staining and analysis of NLRP3, IL-1 β and IL-18

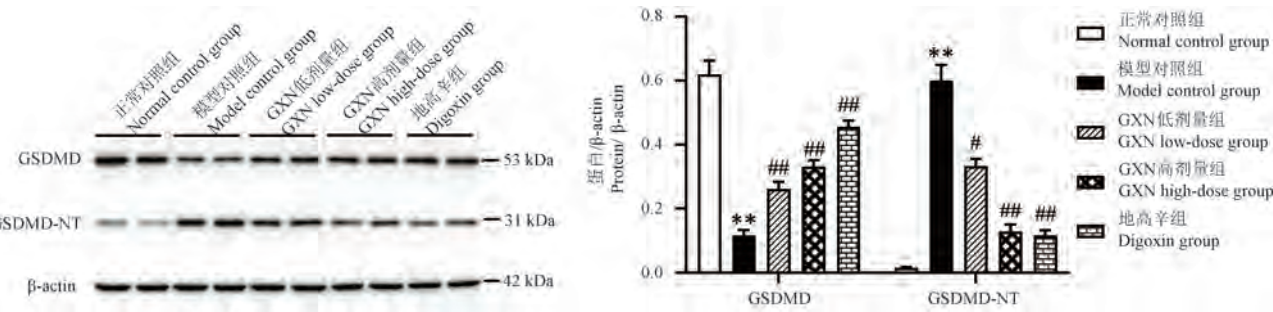


图 9 GSDMD 和 GSDMD-NT 蛋白条带和相对含量

Figure 9 Protein bands and relative protein content of GSDMD and GSDMD-NT

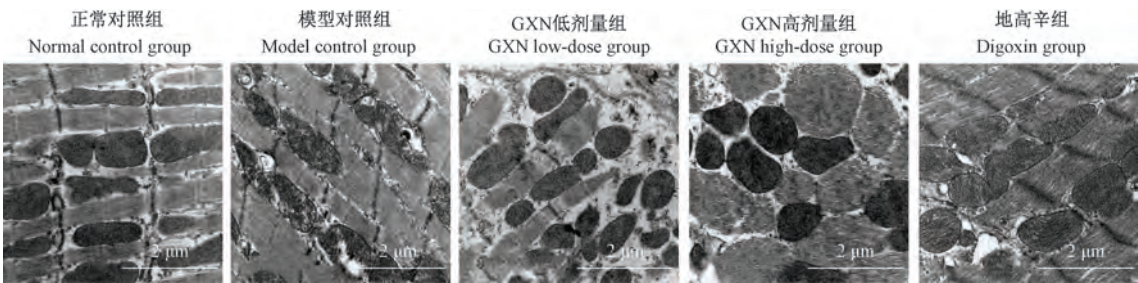


图 10 心肌细胞透射电镜图 (23 000 $\times$)

Figure 10 Cardiomyocyte transmission electron microscopy (23 000 $\times$)

3 讨论

扩张型心肌病是一种心室舒缩功能受损为特征且区别于异常负荷和冠状动脉疾病,重则表现为心力衰竭,影响生活质量^[12]。扩张型心肌病和心衰是现代医学名称,但在中医古籍中仍有相关记载,《备急千金要方》中孙思邈认为“心衰则伏”,《医述》中程杏轩提出“心主血脉,爪甲不华,则心衰矣”。在中医学范畴中,心衰属心痹、心水、心胀,治疗需要遵循活血利水、补益心气^[13]。活血补气类中药在心衰的临床治疗中显示了良好的疗效,能明显缓解心气虚症状,改善心脏功能。冠心宁片处方来源于中国中医科学院西苑医院郭士魁先生的经验方-冠心 2 号方,由丹参和川芎二味药组成,以行气为要,二者为伍,动静结合,使人体血气运行通畅^[5]。现代药理学显示,冠心宁片中富含的酚酸类物质能抗炎抗氧化、改善心肌能量代谢和抗动脉粥样硬化等多种功效,尤其在心血管治疗中疗效显著^[14]。

阿霉素作为临床上多种肿瘤治疗方案的一线抗肿瘤药物,其剂量依赖的心脏毒性导致其临床使用受到了严格的限制。在动物实验中,累积给药心脏出现心肌病变,逐步进展为心力衰竭^[15]。本实验中,模型对照组 IVSd、IVSs、LVPWs、SV、FS、EF 和 HR 显著减小,LVIDs、ESV 显著增加,表明该大鼠模型出现了明显的结构改变和功能损伤,冠心宁片给药组的这些指标明显改善,表明冠心宁片能保护阿霉素诱导的心肌损伤。

多种心血管疾病的产生与炎症反应和心肌细胞死亡密切相关,而细胞焦亡似乎是连接二者的纽带,并且在多种心血管疾病的心肌中得到验证^[16-17]。已有文献研究显示,长期使用阿霉素的患者心肌出现炎症反应,进而出现细胞焦亡^[18]。现有的研究表明,阿霉素可能通过氧化应激诱导活性氧的产生^[9],参与阿霉素诱导的 NLRP3 炎症小体的激活^[19]。而 NLRP3 的激活可能通过 NF- κ B 活化和 TXNIP 过表达,NF- κ B 激活促进 NLRP3 炎症小体与 ASC 的相互作用,使 Caspase-1 活性增强,一方面可 GSDMD 并释放 GSDMD-NT,该结构域寡聚使细胞膜产生膜孔,细胞渗透压改变,导致细胞膨胀并最终溶解,另一方面促进 IL-18 和 IL-1 β 前体释放活性的 IL-18 和 IL-1 β 加重炎症反应,从而诱导细胞焦亡^[20-23]。RT-qPCR 结果显示模型对照组的焦亡相

关的 mRNA 表达明显增加,GXN 给药组的这些指标又有所降低。且 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-18 和 IL-1 β 在蛋白水平上的表达与基因水平一致,血清中 IL-18 和 IL-1 β 水平亦一致。显微结构显示,GXN 给药组的细胞浓缩凝聚、核固缩、胞浆崩解、焦亡小体增多等都得到了明显改善。

本研究表明,GXN 能显著改善阿霉素诱导的心肌损伤,改善 DCM 大鼠心脏功能,可能是通过抑制 NLRP3/ASC/Caspase-1 通路减缓心肌细胞焦亡实现的。

参 考 文 献 (References)

- [1] KCIUK M, GIELECIŃSKA A, MUJWAR S, et al. Doxorubicin-an agent with multiple mechanisms of anticancer activity [J]. Cells, 2023, 12(4): 659.
- [2] LI H, ZHANG M, WANG Y, et al. Daidzein alleviates doxorubicin-induced heart failure via the SIRT3/FOXO3a signaling pathway [J]. Food Funct, 2022, 13(18): 9576-9588.
- [3] WU L, WANG L, DU Y, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as therapeutic targets in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(1): 34-49.
- [4] SCHIRONE L, D'AMBROSIO L, FORTE M, et al. Mitochondria and doxorubicin-induced cardiomyopathy: a complex interplay [J]. Cells, 2022, 11(13): 2000.
- [5] 陈民利, 寿旗扬, 潘永明, 等. 冠心宁片对气滞血瘀大鼠抗血小板聚集和保护血管内皮作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(5): 586-589.
CHEN M L, SHOU Q Y, PAN Y M, et al. Inhibitive and protective effects of guanxinling tablets on platelet aggregation and vascular endothelium in qi stagnation and blood stasis rats [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2005, 10(5): 586-589.
- [6] LING Y, SHI J, MA Q, et al. Vasodilatory effect of guanxinling tablet on rabbit thoracic aorta is modulated by both endothelium-dependent and-independent mechanism [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 754527.
- [7] 齐月寒, 马全鑫, 徐松涛, 等. 冠心宁片通过 PI3K/AKT 信号通路抑制慢性心力衰竭小鼠心肌细胞凋亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 33-39.
QI Y H, MA Q X, XU S T, et al. Guanxinling inhibits myocardial cell apoptosis in mice with chronic heart failure, possibly via the phosphoinositol 3-kinase/AKT signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 33-39.
- [8] YANG Q, FANG M, TU J, et al. Guanxinling Tablet inhibits the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet GPIIb/IIIa for antithrombosis without increased bleeding risk [J]. Chin J Nat Med, 2022, 20(8): 589-600.
- [9] YANG Q, XU Y, SHEN L, et al. Guanxinling tablet attenuates coronary atherosclerosis via regulating the gut microbiota and their

- metabolites in Tibetan minipigs induced by a high-fat diet [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 7128230.
- [10] 施佳君, 杨钦钦, 富丹婷, 等. 冠心宁片改善大鼠心肌细胞焦亡机制探究 [J]. *浙江中医杂志*, 2022, 57(11): 791-794.
- SHI J J, YANG Q Q, FU D T, et al. Study on the mechanism of Guanxinling Tablet in improving focal death of myocardial cells in rats [J]. *Zhejiang J Tradit Chin Med*, 2022, 57(11): 791-794.
- [11] 王瑞峰. 强心苷类正性肌力药联合左西孟旦治疗扩张型心肌病患者的疗效及心功能分析 [J]. *实用中西医结合临床*, 2021, 21(9): 58-59.
- WANG R F. Effect and cardiac function analysis of cardioside positive inotropic drugs combined with levosimendan in the treatment of patients with dilated cardiomyopathy [J]. *Pract Clin J Tradit Chin West Med*, 2021, 21(9): 58-59.
- [12] ORPHANOU N, PAPATHEODOROU E, ANASTASAKIS A. Dilated cardiomyopathy in the era of precision medicine: latest concepts and developments [J]. *Heart Fail Rev*, 2022, 27(4): 1173-1191.
- [13] 黄佳. 谭晓文中医辨证治疗心衰的临床经验 [J]. *内蒙古中医药*, 2022, 41(8): 67-69.
- HUANG J. Tan Xiaowen's clinical experience in the differentiation of TCM in the treatment of heart failure [J]. *Inn Mong J Tradit Chin Med*, 2022, 41(8): 67-69.
- [14] 杨钦钦, 陈民利. 中药酚酸类物质通过调节肠道菌群防治心血管病的研究进展 [J]. *中成药*, 2022, 44(12): 3920-3926.
- YANG Q Q, CHEN M L. Research progress of phenolic acids in traditional Chinese medicine on the prevention and treatment of cardiovascular diseases by regulating intestinal flora [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(12): 3920-3926.
- [15] 李小茜, 何建成. 充血性心力衰竭中医证候动物模型研究思考 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 831-836.
- LI X Q, HE J C. Thinking of study on animal model of TCM syndrome of congestive heart failure [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(6): 831-836.
- [16] HABIMANA O, SALAMI O M, PENG J, et al. Therapeutic implications of targeting pyroptosis in cardiac-related etiology of heart failure [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 204: 115235.
- [17] ZHANG P, TOU F, ZHAN Y, et al. Oxidative stress and pyroptosis in doxorubicin-induced heart failure and atrial fibrillation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 4938287.
- [18] ZENG C, DUAN F, HU J, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101523.
- [19] ZHENG D, LIU J, PIAO H, et al. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1039241.
- [20] LUO T, ZHOU X, QIN M, et al. Corilagin restrains NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis through the ROS/TXNIP/NLRP3 pathway to prevent inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1652244.
- [21] TOLDO S, MEZZAROMA E, BUCKLEY L F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 236: 108053.
- [22] JOSHI S, KUNDU S, PRIYA V V, et al. Anti-inflammatory activity of carvacrol protects the heart from lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by inhibiting pyroptosis via NLRP3/Caspase1/Gasdermin D signaling axis [J]. *Life Sci*, 2023, 324: 121743.
- [23] 葛子硕, 徐志猛, 李萍. NLRP3 炎症小体介导的心肌细胞焦亡及中药干预研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(20): 5210-5217.
- GE Z S, XU Z M, LI P. Advances in research on cardiomyocyte pyroptosis mediated by NLRP3 inflammasome and traditional Chinese medicine intervention [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2021, 46(20): 5210-5217.

[收稿日期] 2023-05-19

王亚恒,马嘉昕,雷雨,等. 心肌纤维化特殊染色方法比较与优化 [J]. 中国实验动物学报,2024,32(3):347-354.

WANG Y H, MA J X, LEI Y, et al. Comparison and optimization of special staining methods for observation of myocardial fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 347-354.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.008

心肌纤维化特殊染色方法比较与优化

王亚恒^{1,2}, 马嘉昕^{1,2}, 雷雨^{1,2}, 张连峰^{1,2,3,4}, 吕丹^{1,2,3,4*}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家卫生健康委比较医学重点实验室, 北京 100021;

2. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021;

3. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家人类疾病动物模型资源库, 北京 100021;

4. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家动物模型技术创新中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 对目前已有心肌纤维化染色方法进行优化, 弥补目前心肌纤维常用染色方法在定量分析中存在的胶原纤维漏读及误读等问题, 为心肌纤维化半定量及诊断提供参考。**方法** 利用实验室前期构建的心肌组织特异性 cTnT^{R141W} 基因突变致扩张型心肌病转基因小鼠模型, 制备心脏组织石蜡切片, 分别进行马松三色 (Masson's trichrome, Masson) 染色法、天狼星红 (picric sirius red, PSR) 染色法、天狼星红-品红 (van Gieson, VG) 染色法、天狼星红-固绿 (sirius red/fast green staining, SR/FG) 染色法染色, 利用 Image J 2.1.0 软件对胶原纤维面积进行定量比较, 并从染液浓度、染色时间、酸性溶液预染 3 个方面对 SR/FG 染色法进行优化, 对后续的胶原纤维定量分析进行应用验证。**结果** 4 种特染方法均可实现胶原纤维的分布观察, 其中, 优化后的 SR/FG 染色法, 即 0.1% 天狼星红-苦味酸酸性溶液预染 5 min, 随后于 0.1% 天狼星红-苦味酸与 0.04% 固绿的混合液中染色 1 h, 在软件识别中具有更低的漏读率和遗失率。**结论** 本文优化后的 SR/FG 染色法较其他传统胶原纤维特染方法, 胶原纤维与心肌组织着色鲜亮、颜色对比明显、稳定性佳、方便快捷, 更适用于后续胶原纤维占比定量分析应用。

【关键词】 心肌纤维化; 特殊染色方法; 天狼星红-固绿; 定量分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024) 03-0347-08

Comparison and optimization of special staining methods for observation of myocardial fibrosis

WANG Yaheng^{1,2}, MA Jiaxin^{1,2}, LEI Yu^{1,2}, ZHANG Lianfeng^{1,2,3,4}, LYU Dan^{1,2,3,4*}

(1. Key Laboratory of Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China; 3. National Center of Technology Innovation for animal model, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China; 4. National Human Diseases Animal Model Resource Center, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

Corresponding author: LYU Dan. E-mail: lvd@cnilas.org

【Abstract】 Objective The existing dyeing methods of myocardial fibrosis were optimized to make up for the problems of missing and misreading of collagen fibers in the quantitative analysis of the current common dyeing methods of myocardial fibers, and to provide a reference for the semi-quantitative and diagnosis of myocardial fibrosis.

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2022-I2M-1-020), 中央高校基本科研业务费 (3332023054)。

Funded by Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Innovation Fund for Medical Sciences (2022-I2M-1-020), Special Research Fund for Central Universities, Peking Union Medical College (PUMC) (3332023054).

【作者简介】 王亚恒, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病相关动物模型创制。Email: wangyaheng@cnilas.org

【通信作者】 吕丹, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 心血管相关动物模型创制, 发病机制及基因功能分析。Email: lvd@cnilas.org

Methods Paraffin sections of cardiac tissue were prepared using a transgenic mouse model of cardiomyopathy with a specific laboratory-constructed cTnT^{R141W} gene mutation. Four staining method were performed for comparative observations: Masson's trichrome(Masson) staining, picrosirius red(PSR) staining, van Gieson(VG) staining, and Sirius red/fast green(SR/FG) staining. Image J 2.1.0 software was used to quantitatively compare the areas of collagen fibers. SR/FG was optimized from three aspects: dye concentration, staining time, and acid solution prestaining, and the quantitative analysis of collagen fibers was then verified. **Results** The collagen fiber distribution was observed by the four staining method, among which SR/FG was notable. It involved prestaining with a 0.1% Sirius red-picric acid acidic solution for 5 min, adjusting the concentration of the dye solution to 0.1% Sirius red-picric acid and 0.04% fast green mixture, and incubating the sections in the mixed staining solution for 1 h. This method exhibited the lowest incidence of missed readings and loss in determining the proportion of collagen fibers. **Conclusions** Compared with other traditional collagen fiber staining method, the optimized SR/FG technique described in this paper produces bright coloring of collagen fibers and myocardial tissue, obvious color contrast, and high stability, convenience, and speed. It is suitable for subsequent quantitative analysis and determination of the collagen fiber proportion.

【Keywords】 myocardial fibrosis; special staining; sirius red/fast green staining; quantitative analysis

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

心肌纤维化是多数心血管疾病发生发展的重要病理学基础,贯穿心脏损伤的始终,也是心力衰竭、心律失常、心源性猝死等不良事件的独立危险因素^[1-3]。据报道,心肌纤维化多发生在缺血性和非缺血性心力衰竭、遗传性心肌病、I/II 型糖尿病和衰老等疾病中^[4-5],心肌纤维化可导致房颤、心律失常、心衰甚至猝死^[6-7]。因此,尽早评估诊断心肌纤维化,采取有效的治疗方案延缓或者阻止心肌纤维化的发展,对改善患者生活质量、提高患者生存率具有重要意义。

针对心肌纤维化的检测手段有多种,包括心内膜组织活检、超声心动图、核医学显像、心血管核磁共振成像以及血清胶原纤维标记物检测等,但是病理学检测仍然是心肌纤维化诊断的金标准^[8-9]。而特殊染色是病理学检测中常用的检测方法,主要包括:胶原纤维染色、网状纤维染色、弹性纤维染色、神经元纤维染色、色素染色等^[10]。针对不同的检验目的,可采用上述一种或多种检测手段。特殊染色因无需复杂的实验条件,操作相对简单,试剂经济,而应用广泛。

心肌纤维化可表现为胶原纤维过量沉积,心脏组织中胶原浓度显著升高或胶原成分发生改变。心肌纤维特殊染色可用于胶原纤维和肌纤维的鉴别染色,苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色无法以不同颜色将其很好的进行区分,所以特殊染色技术常为 HE 染色的补充手段^[11-12],以了解特殊物质在标本中的分布、含量、性状的变化,为研究者探索疾病发生、发展机制提供参考。心肌纤维特殊染色方法可用于检测胶原纤维的分布及定量评

价,目前心肌纤维化病理染色的常用鉴定方法有:马松三色(Masson's trichrome, Masson)染色法、天狼星红(picric sirius red, PSR)染色法、天狼星红-品红(van Gieson, VG)染色法、天狼星红-固绿(sirius red/fast green, SR/FG)染色法。然而目前常用的特染方法在软件分析中,存在胶原位置难辨识及定量误差大等问题。这种定量误差可能是胶原纤维与心肌组织颜色反差小,甚至相近导致的,软件在识别过程中,出现不同程度的漏读和遗失,影响心肌纤维化程度的正确评估。

本研究使用经典的心肌组织特异性 cTnT^{R141W} 基因突变致扩张型心肌病转基因小鼠模型,利用该小鼠典型的心肌纤维化表型,对目前实验室常用的 4 种特染方法,在染色流程、染色效果及后续定量分析这 3 个方面进行横向比较,从而筛选在软件辨识更具有优势的方法,随后对该法进一步优化,从操作便捷性、时效性及后续软件辨识度上改进。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 月龄雌性 SPF 级 cTnT^{R141W} 阳性小鼠 6 只(小鼠品系为 C57BL/6J, 体重 25 ~ 28 g),为本课题组利用前期于中国医学科学院医学实验动物研究所【SCXK(京)2019-0011】成功构建的心肌组织特异性 cTnT^{R141W} 基因突变致扩张型心肌病转基因小鼠模型,该小鼠表现为全心扩大、室壁变薄、心肌细胞肥大、间质纤维化、心肌收缩力下降,可作为心肌纤维化研究的模型工具动物^[13-15]。动物饲养于中国

医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房内【SYXK(京)2019-0014】。动物饲养温度为 22 ~ 25 ℃,相对湿度保持在 50%左右,光暗循环条件(昼夜明暗交替 12 h/12 h)。所有小鼠均给予标准饲料、自由进食水。本动物实验已经过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用及管理委员会的审批(IACUC ZLF18004)。

1. 1. 2 主要试剂与仪器

试剂配置:(1)2.5%重铬酸钾溶液:重铬酸钾 2.5 g、醋酸 5 mL、蒸馏水 95 mL;(2)马松三色复合染液:酸性品红 1 g、丽春红 2 g、橘黄 G 2 g、0.25%醋酸 300 mL;(3)5%磷钨酸溶液:5 g 磷钨酸溶于 100 mL 蒸馏水中;(4)0.1%亮绿溶液:亮绿 0.1 g、0.2%醋酸溶液 100 mL;(5)0.1%天狼星红溶液:0.1 g 天狼星红溶于 100 mL 饱和苦味酸溶液中;(6)0.1%固绿溶液:0.1 g 固绿溶于 100 mL 饱和苦味酸溶液中;(7)0.04%固绿溶液:0.04 g 固绿溶于 100 mL 饱和苦味酸溶液中;(8)0.1%(天狼星红、固绿)溶液:0.1 g 天狼星红、0.1 g 固绿溶于 100 mL 饱和苦味酸溶液中;(9)0.1%天狼星红-0.04%固绿溶液:0.1 g 天狼星红、0.04 g 固绿溶于 100 mL 饱和苦

味酸溶液中;(10)天狼星红-品红溶液:1%酸性品红水溶液 10 mL,苦味酸饱和水溶液 90 mL;(11)0.2%醋酸溶液:0.2 mL 醋酸溶于 100 mL 蒸馏水中。

重铬酸钾(Innochem,中国,Cat NO. A82760);丽春红(生工,中国,Cat NO. A100860);磷钨酸(Innochem,中国,Cat NO. A40091);橙黄 G(TCI,日本,Cat NO. 1936-15-8);亮绿 SF(生工,中国,Cat NO. A610007-0025);饱和苦味酸溶液(台山市化工厂,中国);酸性品红(生工,中国,Cat NO. A610469-0100);固绿(生工,中国,Cat NO. A610452-0025);天狼星红(生工,中国,Cat NO. A606358-0025);醋酸(Sigma,德国,MKCH6563)。切片扫描机(Pannoramic 250 FLASH,3DHIESTECH,匈牙利);石蜡切片机(徕卡 RM2235,德国)。

1. 2 方法

小鼠安乐死并摘取心脏,甲醛溶液固定并进行石蜡包埋,修整好的蜡块置于石蜡切片机上连续切片,厚度为 6 μm。采用 4 种传统的心肌胶原特染方法进行染色,通过切片扫描、视图软件截图及胶原面积占比定量统计,经横向比较,最终筛选出在软件识别及定量分析中最优方法(图 1)。

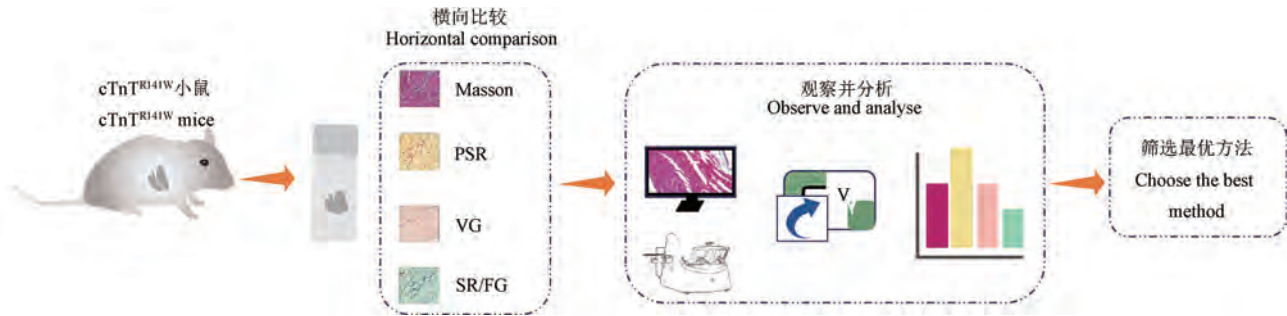


图 1 传统心肌胶原特染方法横向比较方案

Figure 1 Horizontal comparison scheme of the traditional myocardial collagen special staining method

1. 2. 1 Masson 染色法

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃烘箱中烘烤 30 min,常规脱蜡至水后置于提前预热的 50 ~ 60 ℃的重铬酸钾溶液(2.5%)中浸泡至少 1 h;流水冲洗切片至看不清黄色;丽春红染液染色 12 ~ 15 min,随后置醋酸溶液(0.2%)中沾洗 3 ~ 5 次;5%磷钨酸溶液分化数分钟,于镜下观察至纹理清晰时终止;亮绿溶液染色 15 ~ 20 min(镜下观察着色情况终止);入无水乙醇中止,二甲苯中透明 3 次,每次 15 min,中性树脂封片。

1. 2. 2 PSR 染色法

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃烘箱中烘烤 30

min,切片入二甲苯中脱蜡,随后置于 100%无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、75%乙醇、50%乙醇中,流水冲洗 3 ~ 5 min;置于 0.1%天狼星红-苦味酸染液中孵育 1 h,100%无水乙醇中脱水 20 s 左右,二甲苯中透明 3 次,每次 15 min,中性树脂封片。

1. 2. 3 VG 染色法

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃烘箱中烘烤 30 min,切片入二甲苯中脱蜡,随后置于 100%无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、75%乙醇、50%乙醇中,流水冲洗 3 ~ 5 min;切片浸入 0.1%天狼星红-品红溶液中孵育 1 h;100%无水乙醇中脱水 20 s,二甲苯中透明 3 次,每次 15 min,中性树脂封片。

1.2.4 SR/FG 染色法

(1)SR/FG 顺序法

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃ 烘箱烘烤 30 min, 切片入二甲苯中脱蜡, 随后置于 100% 无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇中, 流水冲洗 3 ~ 5 min; 切片浸入 0.1% 天狼星红染色液中孵育 1 h; 切片入 0.2% 醋酸溶液中洗涤 3 ~ 5 次; 置于 0.1% 固绿染色液中孵育 1 h; 于 100% 无水乙醇脱水 20 s, 二甲苯中透明 3 次, 每次 15 min, 中性树脂封片。

(2)SR/FG 直接法

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃ 烘箱烘烤 30 min, 切片入二甲苯中脱蜡, 随后置于 100% 无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇中, 流水冲洗 3 ~ 5 min; 0.1% 天狼星红和 0.04% 固绿染色液中孵育 1 h; 100% 无水乙醇脱水 20 s, 二甲苯中透明 3 次, 每次 15 min, 中性树脂封片。

(3)SR/FG 直接法(固绿预染)

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃ 烘箱烘烤 30 min, 切片入二甲苯中脱蜡, 随后置于 100% 无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇中, 流水冲

洗 3 ~ 5 min; 切片浸入 0.04% 固绿溶液中孵育 5 min, 0.2% 醋酸溶液中冲洗 3 ~ 5 min; 0.1% SR/FG 染色液中孵育 1 h; 100% 无水乙醇脱水 20 s, 二甲苯中透明 3 次, 每次 15 min, 中性树脂封片。

(4)SR/FG 直接法(天狼星红预染)

文献中对 SR/FG 染色方法的报道, 条件各异, 其差异可大致分为染色顺序、染液配置浓度、酸性溶液预染。通过阅读总结文献, 综合筛选, 本实验室选择了 3 种 SR/FG 染色方法, 从染色时效性、试剂成本等方面进行综合比较和筛选(图 2)。为了探索更为有效规范的方法, 研究人员对文章中报道的方法从染色顺序、染液配置浓度、酸性溶液预染进行了优化, 具体方法如下:

将石蜡切片置于 50 ~ 60 ℃ 烘箱烘烤 30 min, 切片入二甲苯中脱蜡, 随后置于 100% 无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇中, 流水冲洗 3 ~ 5 min; 0.1% 天狼星红溶液中预适应 5 min; 0.1% 天狼星红和 0.04% 固绿染色液中孵育 1 h; 100% 无水乙醇脱水 20 s, 二甲苯中透明 3 次, 每次 15 min, 中性树脂封片。

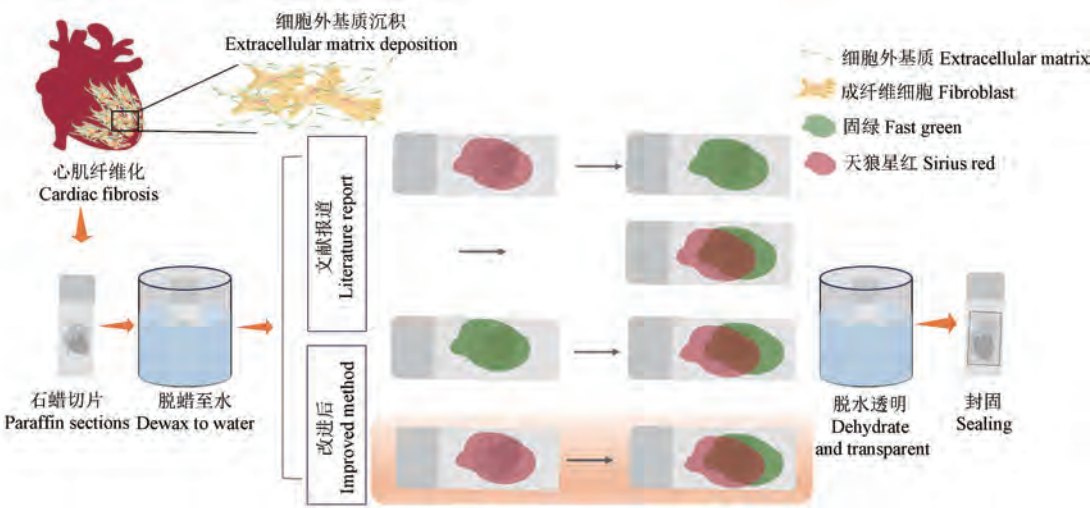


图 2 SR/FG 的优化方案

Figure 2 Optimization scheme of SR/FG

1.2.5 胶原面积占比定量分析

染色后心脏切片置于切片扫描机扫描后, 经 CaseViewer 2.4 视图软件观察胶原纤维分布情况, 针对连续切片样本的相同部位进行截图, 每张切片分别选取 10 个不重复视野。随后应用 Image J 2.1.0 软件分别计算胶原纤维面积和肌纤维面积, 胶原面积占比计算公式为: 胶原面积占比 = (胶原

纤维面积/肌纤维面积) × 100%。4 种染色方法所得的胶原面积占比分数, 用 Graphpad Prism 9.0 进行统计分析。

1.3 统计学分析

采用单一因素方差进行分析, 以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据使用 Graphpad Prism 9.0 进行统计分析。P < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种心肌胶原特染方法比较

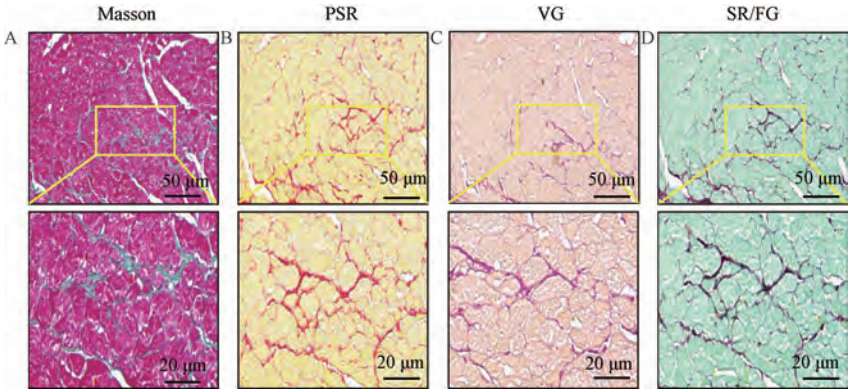
4 种染色方法均能较好地显示出胶原纤维的沉积,位置基本一致,且纤维排布紧密清晰。Masson 染色中,丽春红使胞质、肌纤维、红细胞呈现出红色,亮绿复染使病变的胶原纤维呈蓝绿色(图 3A)。天狼星红是一种强酸性染料,与胶原分子特异性吸附,结合紧密^[16],PSR 染色结果显示胶原纤维呈红色,肌纤维呈黄色(图 3B)。VG 染色为 2 种阴离子染料混合,染色结果显示胶原纤维呈鲜红色,肌纤维呈黄色或橘黄色(图 3C)。SR/FG 染色中,固绿属于酸性染料,常常与天狼星红联合用于显示胶原纤维^[17-19],嗜酸性的胶原纤维与酸性染料固绿结合

呈红色,与呈现绿色的肌纤维对比鲜明,从而使肌纤维和胶原纤维区分开(图 3D)。

对 4 种染色方法胶原面积占比定量分析比较时发现,SR/FG 染色的纤维化面积最高(3.59%),其次是 Masson 染色(3.14%)、PSR 染色(2.92%)、VG 染色(1.89%)。在 SR/FG 染色中,红色显示为胶原纤维,在绿色背景的肌纤维衬托下,两种颜色对比鲜明,用 Image J 2.1.0 软件分析处理时,软件的识别度更高,漏读和遗失率更低。

2.2 常用 SR/FG 染色方法比较及筛选

本课题组选用文献中报道的其中 3 种方法进行重复,结果显示 3 种方法均能显示胶原纤维的沉积(图 4)。采用 SR/FG 顺序法,0.1% 天狼星红染液孵育 1 h 后,随后用 0.1% 固绿孵育 1 h,在绿色肌纤



注:展示位置为小鼠心肌左室区域。
图 3 4 种心肌胶原特染切片扫描截图($n = 3$)

Note. Display is the left ventricular region of the mouse myocardium.

Figure 3 Screenshot of four myocardial collagen stained sections($n = 3$)

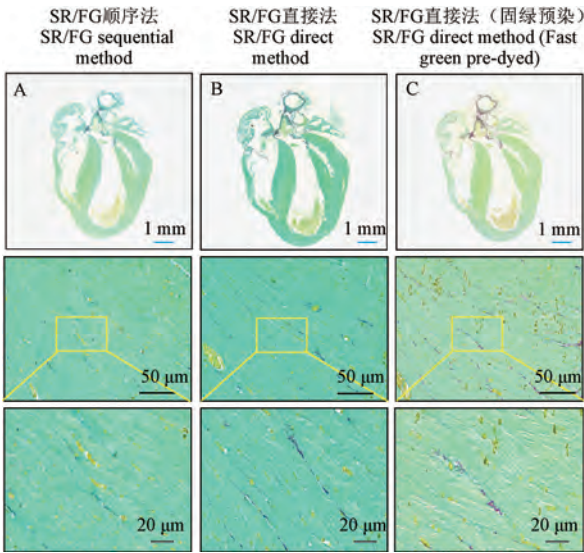


图 4 3 种 SR/FG 染色效果比较($n = 3$)
Figure 4 Comparison of the staining effects of the three SR/FG stainings($n = 3$)

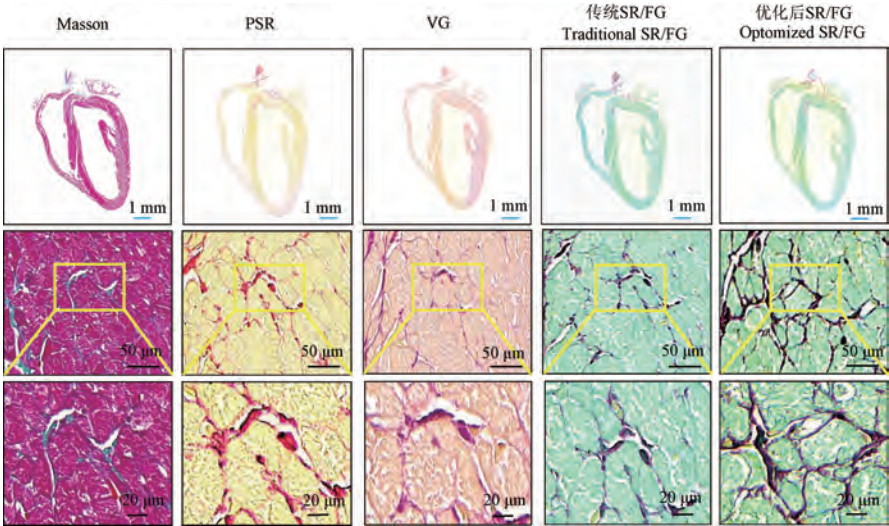
维背景的衬托下,红色胶原纤维颜色对比度较低且染色时间长(图 4A)。采用 SR/FG 直接法,将 0.1% 天狼星红和 0.1% 固绿染液混合在一起染色 1 h,该方法天狼星红和固绿染液浓度一致,但红绿颜色不够分明,较难区分肌纤维与胶原纤维位置(图 4B)。采用 SR/FG 直接法(固绿预染),将 0.1% 天狼星红和 0.04% 固绿染液混合后染色 1 h,但在混合染色之前需将切片放入 0.04% 固绿酸性溶液中预染 5 min,该方法绿色肌纤维背景相对 SR/RG 顺序法和 SR/FG 直接法稍浅,红色胶原纤维对比更凸显(图

4C),且该方法总体染色时间更短。

2.3 SR/FG 染色法的优化

随后研究人员从染色流程、实验时效性、试剂成本及后续软件识别度等方面,对上述 SR/FG 直接法(固绿预染)进行优化。

石蜡切片放入 0.1% 天狼星红苦味酸溶液中预染 5 min;同时降低固绿染液浓度至 0.04%,即采用 0.1% 天狼星红/0.04% 固绿混合液进行染色,染色时间为 1 h。结果显示,红色胶原纤维在绿色肌纤维背景衬托下,颜色更凸显(图 5)。

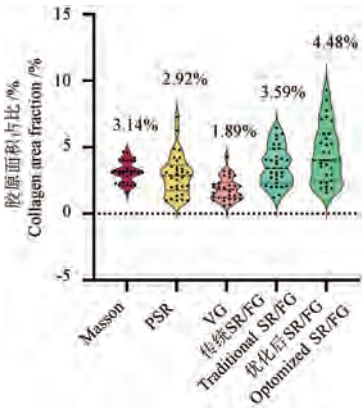


注:切片放大区域为小鼠心肌左室区域。

图 5 5 种心肌胶原特染切片扫描截图($n = 3$)

Note. Magnified area of the slice is the left ventricular region of mouse myocardium.

Figure 5 Comparison of the staining effects of the five SR/FG stainings ($n = 3$)



注:组织切片扫描截图,每张切片选取 10 个视野。

图 6 5 种心肌胶原特染法与优化后的 SR/FG 方法胶原面积占比定量分析比较($n = 3$)

Note. Screenshots of tissue sections are scanned, and ten fields of view are selected for each section.

Figure 6 Comparison of the proportion of collagen area in five traditional myocardial collagen special staining methods and the optimized SR/FG method($n = 3$)

相较于 4 种传统的心肌胶原特染方法,优化之后的 SR/FG 染色法,胶原位置软件辨识度最高,其对连续切片相同部位心肌胶原面积占比定量值最高(图 6),此外,经优化之后的染色方法试剂成本降低,染色时间缩短,更适宜推广应用。

3 讨论

在器官纤维化过程中,胶原沉积增加是组织病理学改变的重要特征之一,胶原纤维的增生和排列重构导致其在组织中的总面积占比显著增加,这一比例的变化通常被用作评估纤维化严重程度的一个指标。目前常用的心肌胶原特染方法包括:Masson 染色法、PSR 染色法、VG 染色法、SR/FG 染色法,旨在观察胶原的分布、排列以及纤维化面积。利用软件对切片胶原纤维面积进行定量分析,其基本原理是利用阈值分割或其他自动/半自动图像分割方法区分正常心肌组织与纤维化区域,纤维化区

域通常具有比正常心肌更高的信号强度,而颜色深浅(或更准确地说是灰度级)直接影响了软件识别和量化目标区域的能力。Masson 染色法中,肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝绿色;PSR 染色法中,肌纤维呈黄色,胶原纤维呈红色;VG 染色法中,肌纤维呈浅粉色,胶原纤维呈红色,几种颜色对比都不够鲜明,软件在识别过程中,存在胶原位置难辨识的问题,具有不同程度的漏读和遗失,进而限制了后续胶原纤维定量分析的准确度。

本文运用心肌组织特异性 $cTnT^{R141W}$ 基因突变致扩张型心肌病转基因小鼠模型的经典心肌纤维化表型,观察对比了 4 种特殊染色方法在评价心肌纤维化中特点差异。选取同一组织样本进行连续切片,针对连续切片样本的相同部位进行截图,每张切片分别选取 10 个不重复视野,应用 Image J 2.1.0 软件分别计算胶原纤维面积和肌纤维面积。结果显示 4 种染色方法均能体现胶原的分布。Masson 染色法中肌纤维和胶原纤维的染色对比度相较于 PSR 染色法、VG 染色法更大,在进行定量分析时,胶原面积占比更高,然而该法所需染料种类较多,包括丽春红、橘黄 G、重铬酸钾、磷钨酸、亮绿等,且染色时程长,操作较为繁琐。而 SR/FG 染色法中,肌纤维呈绿色,胶原纤维呈红色,红绿色作为一组经典的反差色,搭配在一起会造成极强的视觉反差,衬得红色更红,绿色更绿,颜色对比鲜明。用软件进行定量分析时,系统对切片纤维化区域的识别度在 4 种特染方法中最高,能更大程度避免 Image J 2.1.0 软件在进行图像分析时的漏读或识别不准确的情况,更好地评价心肌纤维化程度。

然而,目前所报道的关于天狼星红与固绿共染的特殊染色法,实验条件各不相同,缺乏规范化方法。通过阅读文献,可以将其差异归纳总结为以下方面:酸性溶液预染、染液浓度、染色时间、染色顺序(直接法/顺序法)。本实验室经过摸索,对 SR/FG 染色法进行了如下改良:切片预先放入 0.1% 天狼星红-苦味酸酸性溶液中短时间预染,降低固绿染液浓度至 0.04%,以降低绿色背景,凸显红色胶原纤维,随后采用天狼星红及固绿混合液直接法进行染色。

对比传统的 SR/FG 染色法,经过以上改良染出的效果颜色对比更加鲜明,更有利于计算机图像分析软件如 Image J 2.1.0 进行精确的量化评估,同时还能大大节省染色时间,提高染色效率。另外,该

染色方法简易、试剂成本低、特异性好、操作简易快捷,具有一定的推广应用价值。需注意的是,行 SR/FG 染色的组织切片不宜太薄,一般为 $6\text{ }\mu\text{m}^{[20]}$,否则组织成分太少不宜着色,切片染色结束后,直接入 100% 无水乙醇迅速脱水 20 s,否则时间过长会脱色,影响染色整体效果。不同组织与染料的化学性结合度有一定差异,因此不同实验室可根据实验室条件和实验目的,进行方法的优化和调整。另外,研究者可根据实验目的,选择是否复染苏木素,如果同时结合苏木素定位细胞核,可使心肌结构立体有层次,有助于深入分析疾病及心肌结构改变情况。

本文对 4 种心肌纤维特殊染色方法进行了观察比较,并对其中的传统 SR/FG 染色法进行了优化,为探索更为高效且规范化的心肌纤维特殊染色提供了实验室数据,同时为行业内方法学的标准化和规范化提供依据。

参 考 文 献(References)

- [1] PUA C J, LOO G, KUI M, et al. Impact of diabetes on myocardial fibrosis in patients with hypertension: the REMODEL study [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2023, 16(7): 545–553.
- [2] PARK S, RANJBARVAZIRI S, LAY F D, et al. Genetic regulation of fibroblast activation and proliferation in cardiac fibrosis [J]. *Circulation*, 2018, 138(12): 1224–1235.
- [3] WENG L, YE J, YANG F, et al. TGF- β 1/SMAD3 regulates programmed cell death 5 that suppresses cardiac fibrosis post-myocardial infarction by inhibiting HDAC3 [J]. *Circ Res*, 2023, 133(3): 237–251.
- [4] DíEZ J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension [J]. *J Clin Hypertens*, 2007, 9(7): 546–550.
- [5] HUMERES C, FRANGOGIANNIS N G. Fibroblasts in the infarcted, remodeling, and failing heart [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4(3): 449–467.
- [6] ZHANG M, ZHANG B, WANG X, et al. LncRNA CFAR promotes cardiac fibrosis via the miR-449a-5p/LOXL3/mTOR axis [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2023, 66(4): 783–799.
- [7] GIBB A A, LAZAROPOULOS M P, ELROD J W. Myofibroblasts and fibrosis: mitochondrial and metabolic control of cellular differentiation [J]. *Circ Res*, 2020, 127(3): 427–447.
- [8] 吴限,黎明江,李莎. 心肌纤维化病理染色鉴定方法的综合评价 [J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(9): 34–37.
WU X, LI M J, LI S. Comprehensive assessment of authenticating method of pathological staining in cardiac fibrosis [J]. *J Med Res*, 2017, 46(9): 34–37.
- [9] 曾敏,王华. 心肌纤维化的诊治现状及展望 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2023, 15(3): 64–71.
ZENG M, WANG H. Current status and perspectives on the diagnosis and therapeutics of myocardial fibrosis [J]. *Chin J*

Front Med Sci (Elect Vers), 2023, 15(3): 64–71.

[10] 赵娜. Masson 染色在宫颈微小浸润性鳞状细胞癌诊断中的应用 [D]. 郑州: 郑州大学; 2016.

ZHAO N. The application of Masson to diagnose microinvasive squamous cell carcinoma [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2016.

[11] 张哲, 王伟, 商建峰, 等. 胶原纤维特殊染色法在心肌纤维化诊断中的应用比较 [J]. 诊断病理学杂志, 2016, 23(8): 578–580, 585.

ZHANG Z, WANG W, SHANG J F, et al. Comparison between special staining methods of collagen fibers in diagnosis of cardiac fibrosis [J]. Chin J Diagn Pathol, 2016, 23(8): 578–580, 585.

[12] 孙洋, 赵红. 形态学检验方法在心肌组织样本中的应用 [J]. 解剖学报, 2017, 48(2): 225–229.

SUN Y, ZHAO H. Use of morphology inspection methodology in the myocardial tissue samples [J]. Acta Anat Sin, 2017, 48(2): 225–229.

[13] LU D, MA Y, ZHANG W, et al. Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the cTnT^{R141W} dilated cardiomyopathy transgenic mice [J]. Hypertension, 2012, 60(1): 81–89.

[14] LU D, WANG J, LI J, et al. Meox1 accelerates myocardial hypertrophic decompensation through Gata4 [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(2): 300–311.

[15] FENG J, DONG W, QUAN X, et al. The changes of the cardiac structure and function in cTnTR141W transgenic mice [J]. Int J Cardiol, 2008, 128(1): 83–90.

[16] 沈蕾, 陈莉, 李昊, 等. 苦味酸-天狼猩红染色和 MASSON 染色评价心脏纤维化的比较 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2012, 12(2): 118–120.

SHEN Q, CHEN L, LI H, et al. Comparison of Picric Sirius red staining and MASSON staining in evaluation of cardiac fibrosis [J]. Mol Cardiol Chin, 2012, 12(2): 118–120.

[17] SEGNANI C, IPPOLITO C, ANTONIOLI L, et al. Histochemical detection of collagen fibers by Sirius red/fast green is more sensitive than van gieson or Sirius red alone in normal and inflamed rat colon [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144630.

[18] HALLER S T, DRUMMOND C A, YAN Y, et al. Passive immunization against marinobufagenin attenuates renal fibrosis and improves renal function in experimental renal disease [J]. Am J Hypertens, 2014, 27(4): 603–609.

[19] IPPOLITO C, SEGNANI C, ERREDE M, et al. An integrated assessment of histopathological changes of the enteric neuromuscular compartment in experimental colitis [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(2): 485–500.

[20] 罗灿峤, 莫木琼, 钟觉民. 天狼星红苦味酸染色法和 MASSON 染色法在显示大鼠肾脏胶原纤维的比较应用 [J]. 临床医学工程, 2009, 16(8): 15–16.

LUO C J, MO M Q, ZHONG J M. Comparative study on collagen fiber staining between Sirius red in saturated carbazotic acid staining and MASSON trichrome staining on rat kidney specimen [J]. Clin Med Eng, 2009, 16(8): 15–16.

[收稿日期] 2023–12–07

王浩田,刘佳,黄健,等. 透视引导下犬椎体成形术穿刺模型建立和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 355-361.
WANG H T, LIU J, HUANG J, et al. Establishment and evaluation of a canine vertebral augmentation puncture model under fluoroscopic guidance [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 355-361.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.009

透视引导下犬椎体成形术穿刺模型建立和评价

王浩田,刘佳,黄健,齐军强,许国华*

(海军军医大学第二附属医院脊柱外科,上海 200003)

【摘要】 目的 通过对犬脊柱解剖形态的测量及分析,建立透视下犬椎体成形术穿刺模型,并通过术后影像学分析,评估该模型建立方法的有效性和安全性。**方法** 测量 6 只 12 ~ 24 月龄犬腰椎标本形态及其参数:L1 ~ L7 椎体高度、椎体基底宽度、椎间盘上缘距椎体最狭部距离、脊椎乳突垂直线距椎间盘上缘距离、横突中点与椎间盘下缘垂直距离,以明确犬椎体解剖特点,确定骨水泥注射的最佳位置、注射方向以及注射深度后,对 6 只健康比格犬(体重 20 ~ 25 kg)L4、L5、L6 椎体建立椎体成形术用穿刺模型。术后 4 周处死后行影像学检查,主要观测指标包括:手术时间、术后植入骨水泥分布、椎管及椎体前缘完整性。**结果** 通过犬解剖观测,椎体高度从 L1 ~ L5 逐渐增大,从 L5 ~ L7 逐渐减小,椎体基底部宽度从 L1 ~ L7 逐渐增大。脊椎乳突垂直线距椎间盘上缘距离呈 L1 ~ L7 逐渐增加趋势(1.9 ~ 4.0 mm)。横突根部中点和椎间盘下缘的距离由 L1 ~ L5 逐渐增加(4.7 ~ 6.9 mm),L4、L5、L6 节段每只犬横突根部中点和椎间盘下缘的距离之间($P = 0.925$)无统计学意义。以脊椎横突根部中点为穿刺点,置入向和水平面呈 20° ~ 30°,头倾方向 5° ~ 15°,穿刺深度 1.2 ~ 1.5 cm。若向椎体尾侧穿刺,穿刺针尾的倾角度为 30° ~ 35°,进针深度为 1.5 ~ 1.8 cm,可以构建犬椎体穿刺手术模型。共成功制作 15 个犬椎体穿刺手术模型,单节段平均手术时间 22.7 ± 4.6 min (15 ~ 30 min)。术中 1 个椎体节段出现脊髓损伤导致下肢瘫痪、大小便失禁等症状,2 个椎体骨皮质破裂,未出现麻醉或感染导致死亡。术后 4 周的 Micro-CT 三维重建均显示骨水泥在犬椎体松质骨内分布,新生骨组织包裹植入材料,无渗漏,无椎管及椎体前壁破损等并发症。**结论** 在犬 L4 ~ L6 解剖基础上,以横突根部中点为骨性标志,可以成功建立一种安全可靠的犬椎体成形术用穿刺模型。

【关键词】 椎体成形术;椎体穿刺;动物模型;脊椎横突;穿刺入路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0355-07

Establishment and evaluation of a canine vertebral augmentation puncture model under fluoroscopic guidance

WANG Haotian, LIU Jia, HUANG Jian, QI Junqiang, XU Guohua*

(Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China)

Corresponding author: XU Guohua. E-mail: xuguohuamail@163.com

【Abstract】 Objective To establish a fluoroscopic percutaneous vertebral augmentation model in dogs by measuring and analyzing canine spinal anatomy. We also assessed the effectiveness and safety of this modeling method by postoperative radiological analysis. **Methods** Morphological measurements were taken in six dogs, aged approximately 12 ~ 24 months, and the following parameters of the lumbar vertebrae were determined: height of the L1 ~ L7 vertebrae, width of the vertebral base, distance from the upper edge of the intervertebral disc to the narrowest part of the vertebra, distance from the vertical line of the spinous process to the upper edge of the intervertebral disc, and vertical distance from the midpoint of the transverse process to the lower edge of the intervertebral disc. These measurements were obtained to clarify the

【基金项目】上海市 2020 年度“科技创新行动计划”实验动物研究领域项目(201409003700)。

Funded by Guidelines for Project Application in the Field of Laboratory Animal Research of Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan in 2020 (201409003700).

【作者简介】王浩田,男,硕士,研究方向:脊柱外科。Email:wht0709@126.com

【通信作者】许国华,男,教授,博士生导师,研究方向:脊柱微创、脊髓损伤、骨再生材料。Email:xuguohuamail@163.com

anatomical characteristics of the canine vertebrae and determine the optimal location, direction, and depth for bone-cement injection. A percutaneous vertebral augmentation model was subsequently established in the L4, L5, and L6 vertebrae of six healthy Beagle dogs, weighing 20 ~ 25 kg. The dogs were euthanized 4 weeks post-surgery and examined radiologically. Primary observations included the surgical duration, postoperative distribution of the implanted bone cement, and integrity of the vertebral canal and anterior edge of the vertebrae. **Results** Anatomical observation of the canine vertebrae revealed that the vertebral height increased gradually from L1 ~ L5 and then decreased from L5 ~ L7. The width of the vertebral base increased consistently from L1 ~ L7. The distance from the vertical line of the spinous process to the upper edge of the intervertebral disc showed an increasing trend from L1 ~ L7 (1.9 ~ 4.0 mm). The distance between the midpoint of the base of the transverse process and the lower edge of the intervertebral disc increased gradually from L1 ~ L5 (4.7 ~ 6.9 mm). There was no significant difference in the distance between the midpoint of the base of the transverse process and the lower edge of the intervertebral disc in the L4, L5, and L6 segments among the dogs ($P = 0.925$). The midpoint of the root of the transverse process of the spine was taken as the puncture point, and the insertion direction and horizontal plane were at an angle of $20^\circ \sim 30^\circ$, with a head tilt of $5^\circ \sim 15^\circ$ and a puncture depth of 1.2 ~ 1.5 cm. If the puncture was directed towards the caudal side of the vertebra, the angle of the needle tail was $30^\circ \sim 35^\circ$, with a penetration depth of 1.5 ~ 1.8 cm. This technique allowed the successful construction of a canine vertebral puncture surgical model. A total of 15 canine vertebral puncture surgical models were successfully created, with an average surgery time of 22.7 ± 4.6 min (15 ~ 30 min) per vertebral segment. During surgery, one vertebral segment experienced spinal cord injury resulting in paralysis of the hind limbs and bowel and bladder incontinence. Two vertebral cortical bones fractured, but there were no deaths due to anesthesia or infection. Four weeks post-surgery, micro-computed tomography-based three-dimensional reconstructions consistently showed bone cement distributed within the trabecular bone of the canine vertebrae, with newly formed bone tissue enveloping the implanted material. There was no leakage, and no complications such as damage to the vertebral canal or the anterior wall of the vertebrae. **Conclusions** A safe and reliable canine vertebral augmentation puncture model can be successfully established based on the anatomy of the canine lumbar vertebrae (L4 ~ L6) and using the midpoint of the base of the transverse process as a bony landmark.

[Keywords] vertebral augmentation; vertebral body puncture; animal model; transverse process of the spine; puncture approach

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

经皮椎体成形术 (percutaneous vertebroplasty, PVP) 是在影像学引导下将骨水泥经皮注入因骨质破坏而脆弱的椎体内的一种脊柱微创手术。通过骨水泥的注入,填充了椎体内病理性空隙,以强化椎体及固定骨折椎体,能达到及时止痛改善症状的目的,具有近期疗效好的特点^[1]。常用的可注射骨水泥主要有 2 大类:聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethyl methacrylate, PMMA) 骨水泥和磷酸钙骨水泥 (calcium phosphate cement, CPC)。然而 PMMA 骨水泥存在缺乏抗菌活性、机械性能缺陷、大量放热、残余单体毒性等问题^[2-3], CPC 在机械性能和骨诱导性等方面存在缺陷^[4]。为改善这些缺陷,一些新型骨水泥被研究^[5],为验证植入材料的疗效和安全性,恰当的动物模型是生物实验研究的关键。建立一个可靠、有效、重复性好的动物模型,有助于新型骨水泥的研发以及基础研究的推进^[6]。比格犬性情温顺、来源稳定可靠,体型、体重在不同个体中差异小^[7],在骨骼方面更接近于人,且对手术的耐受

能力强。因此,本文对比格犬脊柱的解剖学特点进行分析后,探索透视引导下的犬椎体成形术穿刺入路,以期对相关研究提供可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级健康 12 ~ 24 月龄的比格犬 6 只 (体重 20 ~ 25 kg,雌雄各 3 只),购买于上海交大农生实验实习场有限公司【SCXK(沪)2022-0005】,经 X 线检查排除脊柱的先天性畸形和病犬及孕犬,动物饲养于上海交大农生实验实习场有限公司【SYXK(沪)2023-0014】,单笼喂养,室内温度 16°C 、湿度 60% ~ 90%,12 h 光照/12 h 无光照环境条件下适应性饲养 1 周,术前 12 h 禁食、6 h 禁水。手术器械进行高温高压消毒。本动物实验在上海交大农生实验实习场有限公司动物实验中心完成并经过审批 (IACUC20200601)。

1.1.2 主要试剂与仪器

丙烯酸树脂骨水泥 (Tecres 公司, 意大利), 手动电钻 (Medtronic 公司, 美国), 骨水泥穿刺针 (上海凯利泰医疗科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 观察动物解剖

仔细观察犬的大体解剖, 寻找最佳穿刺进针点。观察犬 L2 ~ L7 椎体的大小及形态特点, 归纳乳突、横突、椎间孔之间的关系。行 Micro-CT, 观察是否有可用于穿刺定位的明显骨性标志 (图 1)。

1.2.2 麻醉及椎体穿刺模型建立

在进行比格犬脊柱穿刺手术时, 严格遵循了手术前禁食 12 h、禁水 6 h 的操作规程, 选择犬前肢桡静脉, 根据动物体重给予 5% 戊巴比妥钠 4 mg/kg 麻醉, 手术区域脱毛以确保清洁。将犬置于 DR 台上, 利用定位板分别行俯卧位及左侧位定位成像。本研究利用 6 只比格犬 L4 ~ L6 椎体, 通过后外侧入路进行穿刺。

以 L6 穿刺为例, 定位板下 DR 正位先确定 L6 椎体形态、大小, 以及 L6 棘突、乳突、横突根部并进行标记, 侧位片确定 L6 横突根部背侧缘落于椎体的位置及距棘突的距离, 再次确认横突中点位置并与正位片进行比较调整, 分别对上述位置进行标记。犬俯卧位于操作台上, 常规消毒铺单, 根据正侧位提示用 10 cm 腰穿刺针行初步穿刺, 触碰到骨性结构时停止。行 DR 正侧位确认穿刺点、穿刺角度, 穿刺深度。效果满意后, 用 11 号尖刀做 2 mm 皮肤切口, 椎骨穿刺针沿确认的进针点、角度、深度进针

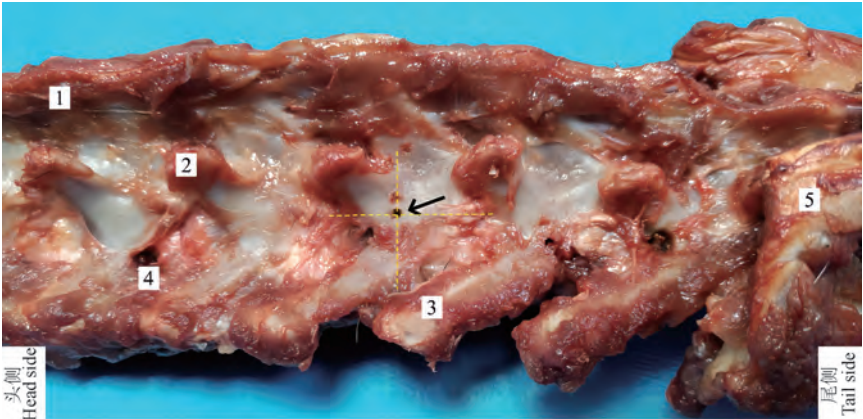
至骨性结构, 并少许突破骨皮质, 再次行 DR 正侧位确认进针点及角度, 并进行微调。将穿刺针敲入合适深度 (1.5 cm), 取出穿刺针针芯, 从穿刺针外管中置入引导针, 探查四壁完整后移除穿刺针外管。在引导针下插入工作套管并敲入骨皮质 2 mm, 使用手钻经工作通道钻入椎体内进行扩髓。钻头深度为 1.3 ~ 1.7 cm。再次探查四壁完整性, 骨水泥粉剂和液剂充分混合好后, 将骨水泥填充器内杆拔出, 把骨水泥装入注射器中, 连接填充器进行骨水泥装填。骨水泥呈“拉丝”状态时, 将骨水泥填充器经工作通道插入椎体内, 缓慢推入 0.5 mL 骨水泥, 同时关注犬呼吸、心率等情况。等待 5 ~ 10 min 待水泥固化, 取出所有器械。透视观察骨水泥位置满意后, 缝合切口 (图 2)。

1.2.3 术后处理

手术后, 将犬放回饲养笼, 术后即刻开始连用 3 d 抗生素 (青霉素钠每天 800 000 单位)。术后第 1 天禁食、禁水, 自第 2 天起开放食、水。观察实验动物进食及尿便情况, 手术切口情况, 肢体活动情况、死亡情况。若术后出现严重并发症 (大小便失禁、下肢瘫痪) 则使用空气栓塞法处死取材, 取得的比格犬椎体将被去除周围肌肉韧带后浸泡在 4% 多聚甲醛细胞固定液中。

1.2.4 主要观察指标

(1) 手术时间: 麻醉开始到缝合完毕。(2) 影像扫描: 进行 Micro-CT 扫描, 观察分析注射位置、椎体通道、骨水泥分布和剂量、椎管及椎体前缘完整性。(3) 术后是否出现严重并发症。

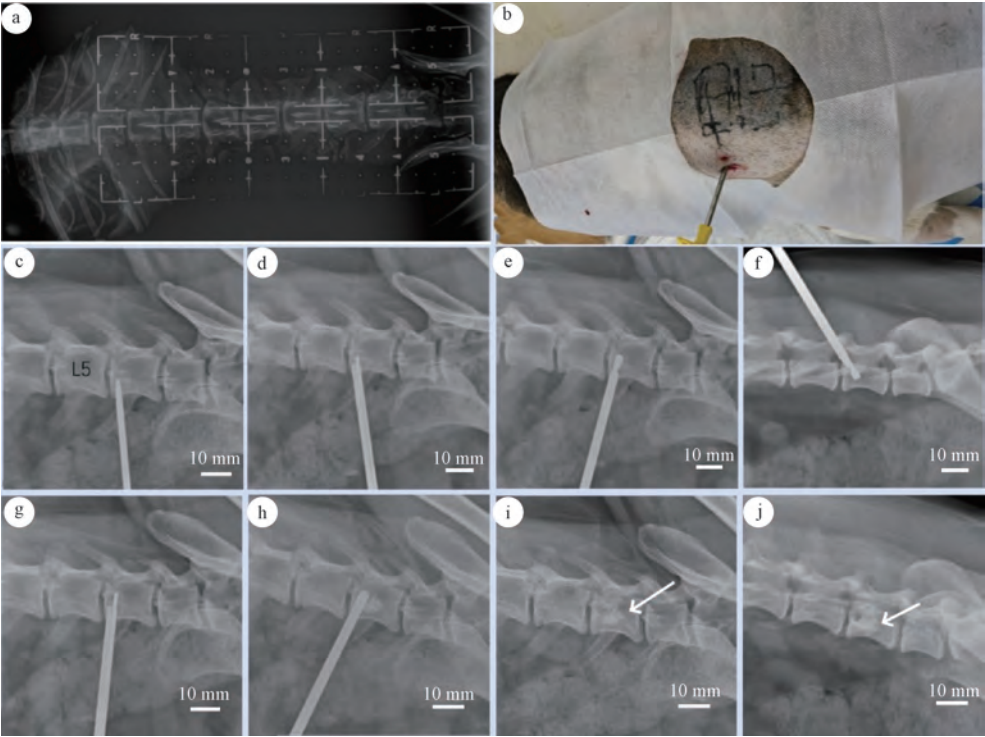


注: 1: 棘突; 2: 乳突; 3: 横突; 4: 椎间孔; 5: 髂骨; 黑色箭头为本研究使用的后外侧入路穿刺点。

图 1 犬椎体大体图

Note. 1. Spinous process. 2. Mastoid. 3. Transverse process. 4. Intervertebral foramen. 5. Ilium. Black arrow indicates the posterior lateral entry point used in this study for needle puncture.

Figure 1 Gross anatomy of a canine vertebra



注:a:定位板下正位透视,确定穿刺节段、椎体骨性标志、穿刺点;b:做好标记后消毒铺巾,开始穿刺;c:穿刺针进针,冲破椎体皮质骨;d:导丝探查,四壁完整;e:正位,扩髓器扩开松质骨达满意深度;f:侧位,扩髓器扩开松质骨;g:导丝再次探查,四壁完整;h:正位,置入导管,逐渐注射骨水泥(聚甲基丙烯酸甲酯),观察骨水泥的注入情况,防止进入椎管;i:正位,拔除导管,观察骨水泥的分布;j:侧位,观察骨水泥的分布;白色箭头:骨水泥。

图 2 犬椎体成形术操作过程

Note. a. Locating the intervertebral level, vertebral bone landmarks and puncture site under fluoroscopy. b. After disinfection and draping, needle puncture is performed. c. Needle advancement through the vertebral cortical bone. d. Guidewire placement and confirmation of intact walls. e. Midline, dilator opening of cancellous bone to a satisfactory depth. f. Lateral, dilator opening of cancellous bone. g. Guidewire re-confirmation of intact walls. h. Midline, placement of catheter and gradual injection of polymethylmethacrylate bone cement while monitoring distribution and preventing epidural spread. i. Midline, removal of catheter and observation of bone cement distribution. j. Lateral, observation of bone cement distribution. White arrows. Bone cement.

Figure 2 Procedure of vertebroplasty in dogs

1.3 统计学分析

数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,利用 SPSS 26.0 软件进行处理。单因素方差分析/LSD 多重比较分析差异显著性, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 犬的解剖

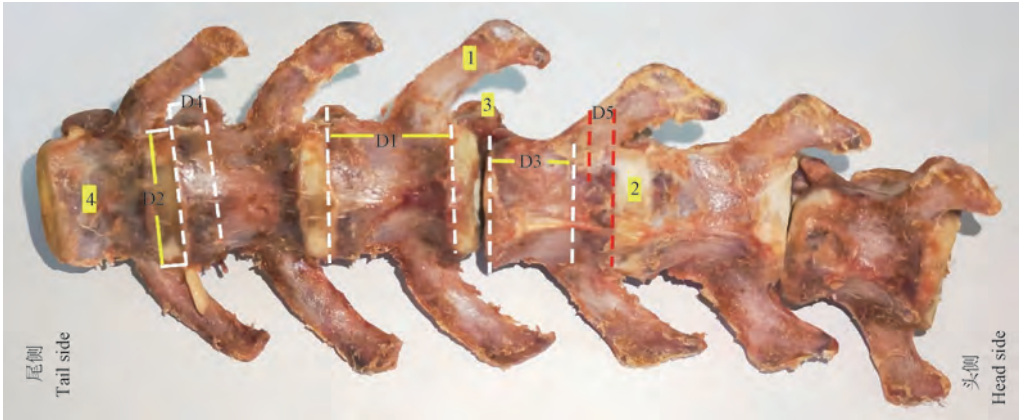
犬的腰椎共有 7 个,单个腰椎椎体宽度由两侧向中间凹陷处逐渐变窄,呈现出哑铃状的形态,其中椎间盘呈白色且凸出,横突向前向下生长。值得注意的是,犬的 L1 ~ L7 相似,但在高度上却存在一定的差异,其中 L7 节段最小且被骨盆覆盖,而 L5 节段则最大。腰椎整体的椎体高度呈现出“中间大两头小”的特征。6 只比格犬腰椎具体测量参数(图

3,表 1)。进一步行单个犬椎体 Micro-CT 发现,椎体两侧宽大且松质骨较多,中间狭部骨松质相对较少(图 4)。

进一步通过统计分析,6 只犬脊柱 L4 ~ L6 的 D5 无统计学意义($F = 0.078, P = 0.925$),即犬 L4 ~ L6 横突根部中点与椎间盘下缘垂直距离相对变化不大,个体差异小,因此犬 L4 ~ L6 横突根部中点可作为椎体穿刺的安全可靠的骨性标志。

2.2 手术结果

采用椎体高度和基底宽度均较大的 L4、L5、L6 节段椎体为模型节段。利用 6 只比格犬共成功制作 15 个犬椎体穿刺手术模型,单节段平均手术时间 22.7 ± 4.6 min (15 ~ 30 min)。穿刺定位点为横突根部中线与乳突根部和横突根部凹陷线的交点。穿刺角度为与水平呈 30°。向头的倾角度为 10°穿



注:1:横突;2:椎间盘;3:乳突;4:L7 椎体;D1:椎体高度;D2:椎体基底部宽度;D3:椎间盘上缘与椎体最狭部距离;D4:椎间盘上缘与脊椎乳突中点垂直线的距离;D5:横突根部中点与椎间盘下缘垂直距离。(下表同)

图 3 犬腰椎解剖图

Note. 1. Transverse process. 2. Intervertebral disc. 3. Mastoid. 4. L7 vertebral body. D1. Vertebral body height. D2. Width of vertebral body base. D3. Distance between the upper edge of intervertebral disc and the narrowest part of vertebral body. D4. Distance between the upper edge of intervertebral disc and the midpoint of vertical line through transverse process. D5. Vertical distance between midpoint of transverse process base and lower edge of intervertebral disc. (The same in the following tables)

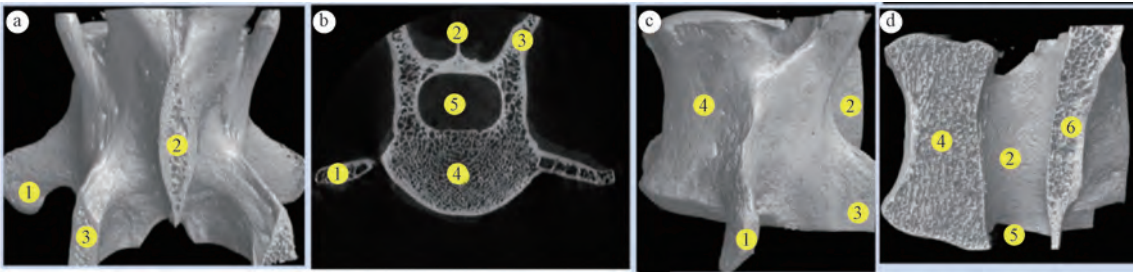
Figure 3 Anatomy of canine lumbar vertebrae

表 1 比格犬腰椎测量参数($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Measurement parameters of the lumbar spine in beagle dogs($\bar{x} \pm s$)

项目 Items	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
D1/mm	14.6 ± 0.7	15.0 ± 1.1	16.5 ± 1.3	17.4 ± 1.2	17.7 ± 1.5	15.8 ± 1.5	11.6 ± 1.2
D2/mm	16.2 ± 1.1	17.0 ± 0.9	17.7 ± 1.3	17.8 ± 1.6	18.0 ± 1.7	18.3 ± 1.2	18.1 ± 1.6
D3/mm	8.9 ± 0.7	9.2 ± 0.6	9.7 ± 0.9	9.4 ± 0.8	9.8 ± 0.8	8.1 ± 0.7	5.8 ± 0.8
D4/mm	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.3	3.0 ± 0.4	4.0 ± 0.4
D5/mm	4.7 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.7 ± 0.2	6.8 ± 0.5	6.9 ± 0.3	6.8 ± 0.4	4.1 ± 0.3

注:L:腰椎。
Note. L. Lumbar vertebrae.



注:a:正位;b:横截面;c:侧位;d:矢状面;1:横突;2:棘突;3:乳突;4:椎体;5:椎管;6:椎板。

图 4 犬椎体 Micro-CT 结果

Note. a. Midline. b. Cross section. c. Lateral. d. Sagittal plane. 1. Transverse process. 2. Spinous process. 3. Mastoid. 4. Vertebral body. 5. Spinal canal. 6. Lamina.

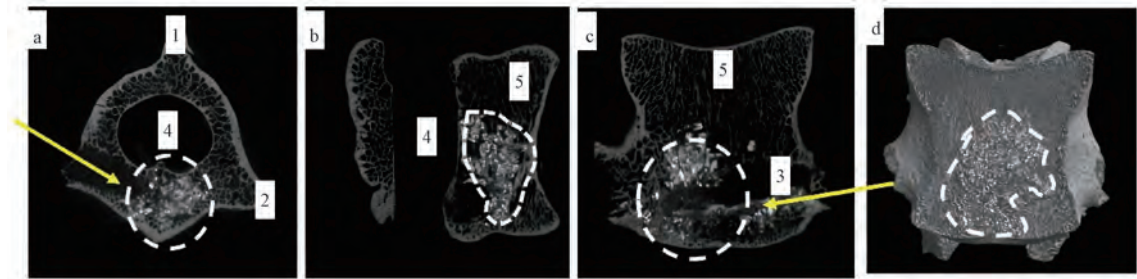
Figure 4 Micro-CT results of dog vertebral bodies

刺深度为 1.4 cm,注射骨水泥 0.6 mL。通过术后 Micro-CT 影像观察骨水泥分布(图 5),本研究采用的穿刺入路能够理想地将骨水泥注射到椎体目标位置,骨水泥在椎体内骨松质内弥散分布均匀,椎管前壁及椎体前缘完整性,无骨水泥渗漏。18 个椎体穿刺模型构建中,1 个椎体节段出现脊髓损伤导

致下肢瘫痪、大小便失禁等症状,2 个椎体骨皮质破裂,未出现麻醉或感染导致死亡。

2.3 技术要点

后外侧入路是将犬处于俯卧位,横突根部中点作为头尾定位线,乳突根部与横突根部中点凹陷处作为背腹定位线,两线相交的点即为穿刺定位点。



注:1:棘突;2:横突;3:穿刺路径;4:椎管;5:椎体;虚线内为骨水泥在椎体内的分布。

图 5 PMMA 注射后 Micro-CT 结果

Note. 1. Spinous process. 2. Transverse process. 3. Puncture path. 4. Spinal canal. 5. Vertebral body. Dashed line indicates the distribution of bone cement within the vertebral body.

Figure 5 Micro-CT results after PMMA injection in dogs

穿刺的最佳角度为与水平呈 $20^{\circ} \sim 30^{\circ}$ 。如果向椎体侧头侧穿刺,穿刺针头的倾斜角度为 $5^{\circ} \sim 15^{\circ}$,进针深度为 1.2 ~ 1.5 cm。如果向椎体尾侧穿刺,穿刺针尾的倾斜角度为 $30^{\circ} \sim 35^{\circ}$,进针深度为 1.5 ~ 1.8 cm。穿刺的深度受犬椎体大小的影响。此入路穿过皮下肌肉组织,提供更直接的手术路径,直接接近目标区域,减少了手术过程中损伤神经血管或者破坏更多骨质的风险,并且能够减少对周围组织的损伤,这有助于减少手术后的疼痛和恢复时间。最重要的是犬椎体穿刺后外侧入路可以提供更准确的穿刺定位点,使操作者能够清晰地在 DR 上观察和操作目标区域,并且安全角度阈值大,这有助于准确定位、精确操作和安全操作。该入路的缺点是学习曲线较长。

3 讨论

椎体成形术要求对通道置入位置和方向非常精确。至今已在大型动物(如羊、猪)中成功实施并进行了建模^[6,8]。然而手术过程复杂、价格昂贵,难以被广泛应用是大型动物椎体成形术实验的痛点。使用犬等中小型动物作为模型,可以有效降低成本。这种方法不仅能够缩短麻醉和手术时间,而且在需要进行大样本实验的椎体成形手术研究中非常实用。犬作为科学实验动物具有诸多优点,包括费用低廉、实验结果可靠等。与人类相比,犬的腰椎解剖结构相似,使得犬在研究脊柱相关问题时成为理想的实验动物。此外,犬的手术操作与外科临床实践基本相似,术后进食、抗感染等方面也相对容易控制。综合以上优点,犬在科学实验中可以作为一种比较理想的动物模型。因此,在相关文献报道中经常被用于骨科实验^[9-15]。然而,由于犬椎体

较小且中间狭窄,通过传统后路经椎弓根或侧路水平入路易造成骨皮质破裂而损伤周围重要神经和血管。既往有在超声引导下犬尸体腰丛不同入路的比较^[16],本研究先对犬大体标本进行测量,然后通过透视及 Micro-CT 分析建立最佳穿刺入路,最后采用比格犬活体而非尸体建模,其目的是验证穿刺后可注射骨水泥在椎体中的弥散。若穿刺损伤血管或破坏骨皮质造成骨水泥渗漏,在活体模型中可作为安全性评价指标。另外,在穿刺过程中,穿刺针接触骨皮质后需再次确定穿刺点位置,若穿刺点不满意需及时调整。调整中穿刺针是否对周围重要神经或血管造成损伤也在安全性范围之内。

有研究以犬为模型比较不同骨水泥的力学特性,方法是取 L4 和 L6 椎体为实验部位,于肋下缘腋前线处至腹股沟中点上方 2 cm 做长 8 cm 的左腹部斜切口,切开腹内、外斜肌、腹横筋膜,经腹膜外将腹膜连同腹腔脏器牵向右侧,到达腰椎椎体前方,用小骨刀在椎体凿出骨缺损,将实验材料填充植入^[17]。该方法虽不借助任何辅助设备,但开放手术创伤大,手术部位较深,在一定程度上影响骨水泥注射的部位、深度及弥散程度,手术感染风险高,恢复慢。另外,大量肌肉剥离和软组织损伤是否影响目标位置周围血供,进而影响实验效果有待进一步验证。尽管有其他关于犬椎体成形的相关研究,但都未对穿刺方法及要点进行描述^[18-19]。本研究构建的犬椎体穿刺模型能够精确定位到目标椎体,穿刺部位、角度、深度明确,对周围肌肉、血管、神经损伤小,术后感染风险低、恢复快,且可行相邻椎体穿刺,为研究可注射型骨植入材料提供了可靠的穿刺方法。为达到精确及微创要求,有在 CT 引导下进行 PVP 注射放疗药物的报道^[20],因此,本模型为犬

骨肿瘤穿刺活检及放疗药物实验也提供了安全有效的穿刺方法。

研究结果显示,成年犬椎体偏小,导致注射空间受限,因此 12 ~ 24 月龄比格犬进行骨水泥注射时需特别注意注射量不宜超过 0.8 mL。透视下通道注射骨水泥存在操作困难的风险,容易导致操作失败,需要谨慎对待。由于犬的横突根部更靠近于椎体的头侧,所以这种方法更适合向椎体头侧进行穿刺。如果穿过椎体中间的狭部并对椎体尾侧进行穿刺,容易造成椎体狭部骨皮质破裂和神经根的损伤。

本研究针对犬椎体成形术中核心环节“穿刺技术”进行了分析,明确比格犬 L4 ~ L6 椎体横突根部中点骨性结构,采用后外侧入路可以成功建立一种安全可靠的犬椎体成形术用穿刺模型。此模型减少了血管和神经的损伤,术中出血少,感染风险低,手术时间短,具有微创的优势。

参 考 文 献(References)

- [1] CLARK W, BIRD P, GONSKI P, et al. Safety and efficacy of vertebroplasty for acute painful osteoporotic fractures (VAPOUR): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2016, 388(10052): 1408–1416.
- [2] SZCZĘŚNY G, KOPEC M, POLITIS D J, et al. A review on biomaterials for orthopaedic surgery and traumatology: from past to present [J]. *Materials*, 2022, 15(10): 3622.
- [3] DÍEZ-PASCUAL A M. PMMA-based nanocomposites for odontology applications: a state-of-the-art [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10288.
- [4] XU H, ZHU L, TIAN F, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of injectable strontium-modified calcium phosphate cement for bone defect repair in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 568.
- [5] 向刚刚, 童猛, 曹鹏, 等. 新型骨水泥研究进展 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2023, 31(6): 83–88.
- XIANG G G, TONG M, CAO P, et al. Advances in the research of novel bone marrow [J]. *J Tradit Chin Orthoped Traumat*, 2023, 31(6): 83–88.
- [6] SCHIMANDLE J H, BODEN S D. Spine update. Animal use in spinal research [J]. *Spine*, 1994, 19(21): 2474–2477.
- [7] 陈心培, 张瑜, 梁卓, 等. 比格犬与杂种犬右心室快速起搏至房颤模型比较 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(6): 605–607, 633.
- CHEN X P, ZHANG Y, LIANG Z, et al. Beagle dog model and mongrel dog model of rapid right ventricle pacing induced-atrial fibrillation [J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2014, 35(6): 605–607, 633.
- [8] YANG D, YAN Y, LIU X, et al. Characterization of an α -calcium sulfate hemihydrates/ α -tricalcium phosphate combined injectable bone cement [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2018, 1(3): 768–776.
- [9] 肖文德, 周初松, 靳安民, 等. 犬腰椎峡部裂模型的建立与

评价 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2006, 10(8): 126–128.

- XIAO W D, ZHOU C S, JIN A M, et al. Establishment and evaluation of a canine lumbar spondylolysis model [J]. *Chin J Tiss Engin Res Clin Rehab*, 2006, 10(8): 126–128.
- [10] GANEY T, HUTTON W C, MOSELEY T, et al. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model [J]. *Spine*, 2009, 34(21): 2297–2304.
- [11] SUZUKI K, KAWAUCHI A, NAKAMURA T, et al. Histologic and electrophysiological study of nerve regeneration using a polyglycolic acid-collagen nerve conduit filled with collagen sponge in canine model [J]. *Urology*, 2009, 74(4): 958–963.
- [12] ELDER B D, VIGNESWARAN K, ATHANASIOU K A, et al. Biomechanical, biochemical, and histological characterization of canine lumbar facet joint cartilage [J]. *J Neurosurg Spine*, 2009, 10(6): 623–628.
- [13] 李开南, 汪学军, 兰海, 等. 聚-DL-乳酸生物降解腰椎融合器的设计及材料学特点 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(32): 6300–6304.
- LI K N, WANG X J, LAN H, et al. Design and material characteristics of poly-DL-lactic acid biodegradable lumbar interbody fusion cage [J]. *Chin J Tiss Engin Res Clin Rehab*, 2008, 12(32): 6300–6304.
- [14] 王亮, 罗卓荆, 冯林杰, 等. 椎弓根螺钉对幼犬腰椎发育的影响 [J]. *中华骨科杂志*, 2007, 27(5): 355–358.
- WANG L, LUO Z J, FENG L J, et al. The effect of pedicle screws on the development of lumbar vertebrae in young dogs [J]. *Chin J Orthopaed*, 2007, 27(5): 355–358.
- [15] 史国栋, 贾连顺, 袁文, 等. 犬腰骶神经根慢性压迫模型的建立及分子生物学分析 [J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28(11): 1205–1208.
- SHI G D, JIA L S, YUAN W, et al. Establishment and molecular biology analysis of chronic compression model of canine cauda equina nerve root [J]. *J Second Milit Med Univ*, 2007, 28(11): 1205–1208.
- [16] GRAFF S M, WILSON D V, GUIOT L P, et al. Comparison of three ultrasound guided approaches to the lumbar plexus in dogs: a cadaveric study [J]. *Vet Anaesth Analg*, 2015, 42(4): 394–404.
- [17] 赵苏鸣, 戴瑞茹, 黄健, 等. 犬急性骨水泥肺栓塞的实验研究 [J]. *介入放射学杂志*, 2012, 21(1): 55–60.
- ZHAO S M, DAI R R, HUANG J, et al. Experimental study of acute bone cement pulmonary embolism in dogs [J]. *J Intervent Radiol*, 2012, 21(1): 55–60.
- [18] TENG H J, ZHOU Y, FAN L J, et al. Effects of vertebral augmentation on cardiopulmonary function in experimental dogs [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2004, 7(32): 7316–7317.
- [19] 缪冬缪, 倪才方, 沈玉英, 等. 椎体成形术中聚甲基丙烯酸甲酯引起犬急性肺栓塞 [J]. *中国医学影像技术*, 2010, 26(1): 36–39.
- MIAO D L, NI C F, SHEN Y Y, et al. Acute pulmonary embolism in dogs caused by polymethyl methacrylate during vertebral augmentation surgery [J]. *Chin J Med Imag Technol*, 2010, 26(1): 36–39.
- [20] LU J, DENG J, ZHAO H, et al. Safety and feasibility of percutaneous vertebroplasty with radioactive ¹⁵³Sm PMMA in an animal model [J]. *Eur J Radiol*, 2011, 78(2): 296–301.

史晓伟,陈静静,余国彦,等. 猫棒束孢联合环磷酰胺对 H22 荷瘤小鼠的治疗作用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 362-368.

SHI X W, CHEN J J, YU G Y, et al. Therapeutic effects of *Isaria felina* combined with cyclophosphamide in hepatoma H22 tumor-bearing mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 362-368.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.010

猫棒束孢联合环磷酰胺对 H22 荷瘤小鼠的治疗作用

史晓伟¹,陈静静¹,余国彦¹,张艺尹¹,陈丽霞²,赵莉莉²,杨永明²,
王靖²,阎磊²,杨喜花^{1,2*}

(1. 山西医科大学公共卫生学院,太原 030001;2. 山西医科大学附属肿瘤医院实验动物中心,太原 030013)

【摘要】 目的 研究冬虫夏草来源的猫棒束孢(*Isaria felina*, IF)联合环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)对肝癌 H22 荷瘤小鼠的治疗作用。**方法** 建立 H22 荷瘤小鼠模型,随机分组,设正常对照组(NC group,蒸馏水)、模型对照组(MC group,蒸馏水)、CTX 组(CTX group, 25 mg/kg)、IF 组(IF group, 400 mg/kg)和 IF + CTX 组(IF + CTX group, IF 400 mg/kg + CTX 25 mg/kg),每组 5 只小鼠;蒸馏水、IF 灌胃给药,CTX 腹腔注射给药,连续给药 10 d。实验结束后,计算各组小鼠平均肿瘤体积和瘤重、抑瘤率、q 值、免疫器官脏器指数;检测血常规和血清细胞因子含量;观察肿瘤组织苏木精-伊红(HE)染色病理形态变化。**结果** 各给药组小鼠的肿瘤体积和重量均显著低于 MC 组($P < 0.05$)。CTX 组、IF 组、IF + CTX 组小鼠的抑瘤率分别为 49.3%、34.2%、72.8%,q 值为 1.09。IF + CTX 组白细胞(WBC)、淋巴细胞(Lymph)、血小板(PLT)数量显著高于 CTX 组($P < 0.05$)。MC 组小鼠的脾指数显著高于 NC 组,IF + CTX 组小鼠脾指数显著低于 MC 组($P < 0.05$)。MC 组小鼠的血清 IFN- γ 水平显著低于 NC 组,IF 组和 IF + CTX 组的 IFN- γ 水平显著高于 MC 组和 CTX 组($P < 0.05$)。MC 组肿瘤细胞生长状态良好,数量多,排列紧密;CTX 组、IF 组和 IF + CTX 组肿瘤组织可见肿瘤细胞排列松散,多处肿瘤细胞灶性坏死,坏死细胞核固缩碎裂。**结论** IF 和 CTX 联用对 H22 荷瘤小鼠有相加的抑瘤作用,可减轻小鼠的免疫功能抑制,具有免疫调节功能。

【关键词】 猫棒束孢;H22 荷瘤小鼠;联合给药;免疫调节

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0362-07

Therapeutic effects of *Isaria felina* combined with cyclophosphamide in hepatoma H22 tumor-bearing mice

SHI Xiaowei¹, CHEN Jingjing¹, YU Guoyan¹, ZHANG Yiyin¹, CHEN Lixia², ZHAO Lili², YANG Yongming²,
WANG Jing², YAN Lei², YANG Xihua^{1,2*}

(1. School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Experimental Animal Center, the Affiliated Cancer Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030013, China)

Corresponding author: YANG Xihua. E-mail: yangxihua@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effects of *Isaria felina* derived from *Cordyceps sinensis* combined with cyclophosphamide (CTX) in hepatoma H22 tumor-bearing mice. **Methods** An H22 tumor-bearing mouse

【基金项目】 山西省卫生健康委员会科研课题计划(2021072)。

Funded by the Health Commission of Shanxi Provincial Research Project(2021072).

【作者简介】 史晓伟,女,在读硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生学。Email:3058359880@qq.com

【通信作者】 杨喜花,女,硕士生导师,研究方向:肿瘤学。Email:yangxihua@126.com

model was established and mice were divided randomly into a normal control group (NC group, distilled water), model control group (MC group, distilled water), positive control group (CTX group, 25 mg/kg), *Isaria felina* group (IF group, 400 mg/kg), and combined administration group (IF + CTX group, IF 400 mg/kg + CTX 25 mg/kg), with 5 mice in each group. Distilled water and IF were administered by gavage, and CTX was administered by intraperitoneal injection. The administration cycle was 10 days. At the end of the experiment, the mean tumor volume and weight, tumor inhibition rate, q value, and immune organ index were calculated, and routine blood indexes and cytokine levels were determined. Histopathological changes in tumor tissues were observed by HE staining. **Results** The tumor volume and mass were significantly lower in mice in each treatment group compared with those in mice in the MC group ($P < 0.05$). The tumor inhibition rates in the CTX, IF, and IF + CTX groups were 49.3%, 34.2%, and 72.8%, respectively, and the q value was 1.09. The numbers of white blood cells, Lymph, and platelets were significantly higher in the IF + CTX group than in the CTX group ($P < 0.05$). The spleen index was significantly higher in the MC group compared with that in the NC group, and significantly lower in the IF + CTX group compared with that in the MC group ($P < 0.05$). Serum interferon- γ levels were significantly lower in the MC group than in the NC group, and were significantly higher in the IF and IF + CTX groups compared with those in the MC and CTX groups ($P < 0.05$). Pathologically, tumor cells in the MC group grew well and were numerous and closely arranged, while cells in the CTX, IF, and IF + CTX groups were arranged loosely, with focal necrosis and nuclear pyknosis of necrotic cells in many places. **Conclusions** The combination of IF and CTX has an additive anti-tumor effect on H22 tumor-bearing mice, which can alleviate immunosuppression and have an immunomodulatory function.

【Keywords】 *Isaria felina*; H22 tumor-bearing mice; combined administration; immunomodulation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝癌, 是全球第六大常见的肿瘤类型, 也是癌症相关死亡的第二大原因, 5 年生存率也只有 20%^[1-3]。化疗是肝癌治疗的主要方式之一, 环磷酰胺是应用最广泛的传统化疗药物之一, 抗癌谱广、疗效较好。但易产生免疫抑制、骨髓抑制、肝肾损伤等严重的毒副反应, 造成白细胞水平下降, 免疫力降低, 其应用受到限制^[4-6]。冬虫夏草 (*cordyceps sinensis*) 是中国传统名贵中药材, 也是国家二级保护药用真菌和功能性食品, 含有虫草素、虫草酸、虫草多糖、SOD 和氨基酸等多种生物活性物质, 具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、保肝护肾等广泛的药理作用^[7-8]。猫棒束孢 (*Isaria felina*, IF) 是从冬虫夏草虫草体中经菌种分离后培养得到的一种真菌, 具有类似冬虫夏草的功能。研究发现, 抗肿瘤中药和化疗药物联合治疗可增强化疗药物的疗效并降低不良反应和耐药性^[9]。因此, 中药和化疗药物联用对肝癌治疗有积极的作用。实验室前期研究发现猫棒束孢培养物对小鼠移植性肉瘤 S180、肝癌 H22 和 Lewis 肺癌均有显著的抑制作用^[10-12]。为进一步探索 IF 在体内抗肝癌作用, 本研究通过建立 H22 荷瘤小鼠模型, 研究 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用, 为 IF 的临床合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

25 只雌性 SPF 级 KM 小鼠, 4 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司【SCXK (京) 2019-0010】, 饲养在山西省肿瘤医院实验动物中心 SPF 级动物实验室【SYXK (晋) 2022-0003】。饲养环境: 12 h 昼夜交替, 温度为 22 ~ 24 ℃, 湿度 40% ~ 60%, 自由进食和饮水。本实验所有操作均经山西省肿瘤医院动物伦理委员会审批 (IACUC 2022040)。

1.1.2 细胞

小鼠 H22 肝癌细胞株, 由河北医科大学实验动物中心馈赠。

1.1.3 主要试剂与仪器

IF (山西省肿瘤医院实验动物中心自制, 批次: 20220806); 注射用 CTX (江苏盛迪医药有限公司, 批号: 1H491A); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素 (IFN- γ) (凡科维商城, 批号分别为: Aug 2022、Aug 2022)。BC-2800Vet 型兽用全自动血液细胞分析仪 (Mindray 公司); KDC-2044 型低速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司); JJ2000 型电子天平 (常

熟市双杰测试仪器厂);311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);Sun Rise 酶标仪(奥地利 Tecan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、给药及处理

用生理盐水将培养的 H22 细胞稀释成悬液(每毫升含 1×10^6 个细胞),对小鼠右前肢腋窝皮下进行接种(每只 0.1 mL),建立 H22 荷瘤小鼠模型^[13],24 h 后,随机分组,设正常对照组(NC group,蒸馏水)、模型对照组(MC group,蒸馏水)、CTX 组(CTX group,25 mg/kg)、IF 组(IF group,400 mg/kg)和 IF + CTX 组(IF + CTX group,IF 400 mg/kg + CTX 25 mg/kg),每组 5 只小鼠。蒸馏水、IF 灌胃给药,CTX 腹腔注射给药,每天 1 次,给药容量为 0.1 mL/10 g,连续给药 10 d,每天观察小鼠、称重,并用游标卡尺测量肿瘤直径,计算肿瘤体积。

1.2.2 小鼠抑瘤率及脏器指数计算

末次给药 24 h 后,称重小鼠,取血,一部分储存于 EDTA-K2 抗凝管中用于血液常规指标测定,一部分用于 IFN- γ 及 TNF- α 水平测定。颈椎脱臼法处死小鼠,完整剥离瘤块、脾、胸腺和肝,称重,分别计算抑瘤率、脾及胸腺指数。 $\text{肿瘤体积}/\text{mm}^3 = ab^2/2$ (a:长径;b:短径); $\text{抑瘤率}/\% = [1 - (\text{给药组平均瘤重}/\text{模型组平均瘤重})] \times 100\%$ 。

两药联合应用时可能表现为拮抗、相加或协同,可以通过计算 q 值来具体确定两药联合应用时相互间的作用^[14], $q = \text{EAB} / (\text{EA} + \text{EB} - \text{EA} \times \text{EB})$,EA 为 CTX 的抑瘤率,EB 为 IF 的抑瘤率,EAB 为联合用药组两药合用的抑瘤率,当 $q < 0.85$ 表示两药拮抗, $q = 0.85 \sim 1.25$ 表示两药作用相加,当 $q > 1.25$ 表示两药作用增强(或协同)。脏器指数 = 脏器重量(mg)/小鼠体重(g)。

1.2.3 血液常规指标测定

取“1.2.2”项下分装的小鼠血液,采用全自动血细胞分析仪测定各组小鼠血液中白细胞(white blood cell, WBC)、淋巴细胞(Lymph)、血小板(platelet, PLT)、红细胞(red blood cell, RBC)数量。

1.2.4 血清 IFN- γ 、TNF- α 水平测定

取“1.2.2”项下分装的小鼠血液,室温静置 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定小鼠血清中的 IFN- γ 、TNF- α 的含量。

1.2.5 HE 染色观察小鼠肿瘤组织病理学变化

将小鼠肿瘤组织固定于 4%多聚甲醛缓冲液中过夜,常规石蜡包埋、脱水、切片。取组织切片进行苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肿瘤组织形态学变化。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 28.0 软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布,以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

2 结果

2.1 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

接种 H22 瘤株第 3 天,所有荷瘤小鼠右腋窝处均出现瘤组织,并逐天增大,表明模型复制成功。在实验期间,所有荷瘤小鼠无自然死亡情况。肿瘤生长结果如表 1 所示,各给药组小鼠的肿瘤体积和重量均低于 MC 组,差异具有显著性($P < 0.05$);与 CTX 组相比,IF + CTX 组小鼠肿瘤体积减小,差异具有显著性($P < 0.05$)。CTX 组、IF 组、IF + CTX

表 1 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

Table 1 Effects of IF combined with CTX on growth of tumor in H22 tumor-bearing mice

组别 Groups	肿瘤体积/mm ³ Tumor volume/mm ³	平均瘤重/g Average tumor weight/g	抑瘤率/% Tumor inhibition rate/%
MC 组 MC group	1179.19 $\pm$ 146.94	0.98 $\pm$ 0.15	—
CTX 组 CTX group	515.31 $\pm$ 67.37 *	0.49 $\pm$ 0.15 *	49.3
IF 组 IF group	528.79 $\pm$ 73.78 *	0.64 $\pm$ 0.17 *	34.2
IF + CTX 组 IF + CTX group	341.91 $\pm$ 42.91 * Δ	0.27 $\pm$ 0.04 *	72.8

注:与 MC 相比, * $P < 0.05$;与 CTX 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。(下图同)
Note. Compared with the MC group, * $P < 0.05$. Compared with the CTX group, $\Delta P < 0.05$. (The same in the following figures)

组小鼠的抑瘤率分别为 49.3%、34.2%、72.8%。联合用药的 q 值为 1.09,表明联合用药疗效具有相加效应,提示 IF 对环磷酰胺的抑瘤效果有增效作用。

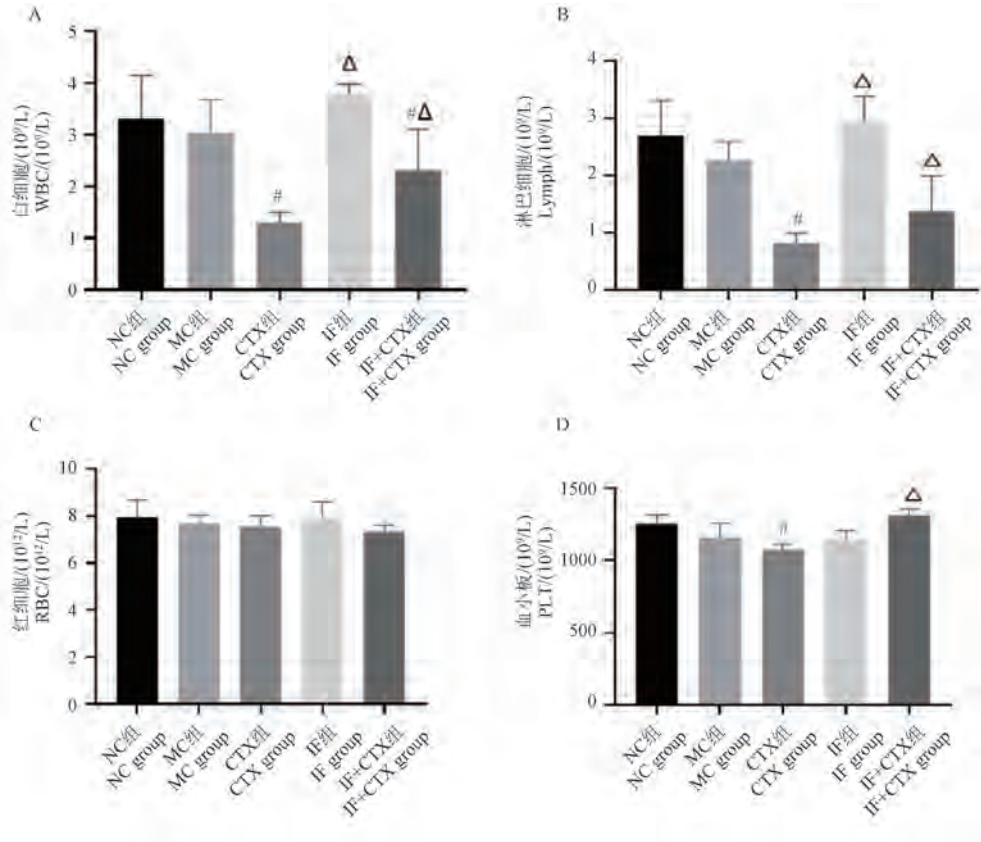
2.2 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠血细胞数量的影响

结果如图 1 所示:CTX 组小鼠的 WBC、Lymph、PLT 数量低于 NC 组,差异具有显著性($P < 0.05$)。IF + CTX 组的 WBC、Lymph、PLT 数量高于 CTX 组,

差异具有显著性($P < 0.05$)。各组小鼠 RBC 数量差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠免疫器官的影响

结果如图 2 所示,MC 组小鼠的胸腺指数低于 NC 组、脾指数显著高于 NC 组,差异具有显著性($P < 0.05$)。IF 组小鼠的胸腺指数高于 MC 组,差异具有显著性($P < 0.05$);CTX 组、IF + CTX 组脾指数低于 MC 组,差异均具有显著性($P < 0.05$)。



注:与 NC 组相比,[#] $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠血细胞数量的影响

Note. Compared with the NC group, [#] $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of IF combined with CTX on blood cell numbers of H22 tumor-bearing mice

2.4 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠血清细胞因子的影响

结果如图 3 所示,MC 组小鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 水平低于 NC 组,差异均具有显著性($P < 0.05$)。IF 组和 IF + CTX 组的 IFN- γ 水平高于 MC 组和 CTX 组,差异均具有显著性($P < 0.05$);IF 组和 IF + CTX 组的 TNF- α 水平与 MC 组和 CTX 组相比,无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 IF 联合 CTX 对肿瘤组织病理的影响

肿瘤组织病理学变化如图 4 所示,MC 组肿瘤

细胞生长状态良好,数量多,排列紧密,细胞核深染,核质比高,可见核分裂象,肿瘤间质内可见多量的粒细胞浸润,未见明显细胞坏死;CTX 组、IF 组和 IF + CTX 组肿瘤组织肿瘤细胞排列松散,多处可见肿瘤细胞灶性坏死,坏死细胞核固缩碎裂。

3 讨论

化疗是肝癌综合治疗的主要手段之一,但存在不良反应、耐药性、预后差、生存期短等问题。抗肿瘤中草药和化疗药物联合应用具有增效减毒的作

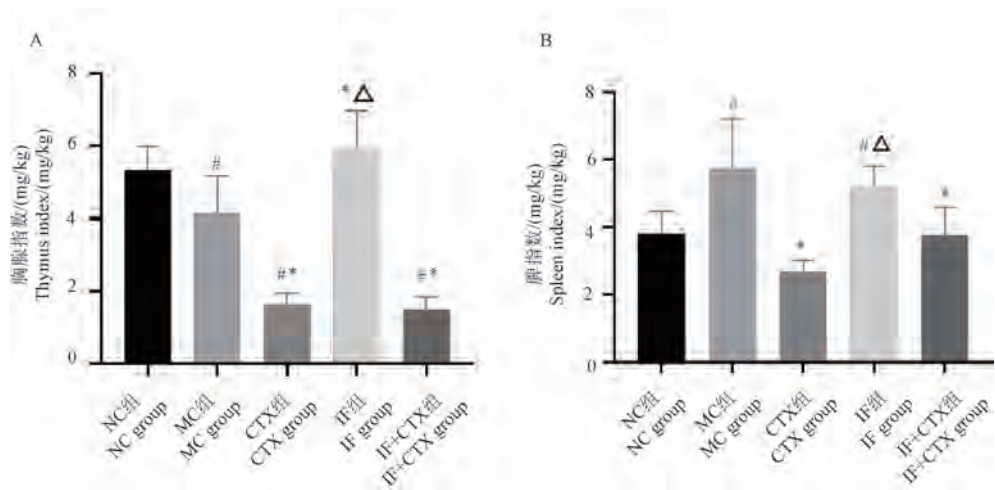


图 2 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠免疫器官指数的影响

Figure 2 Effects of IF combined with CTX on immune organ index in H22 tumor-bearing mice

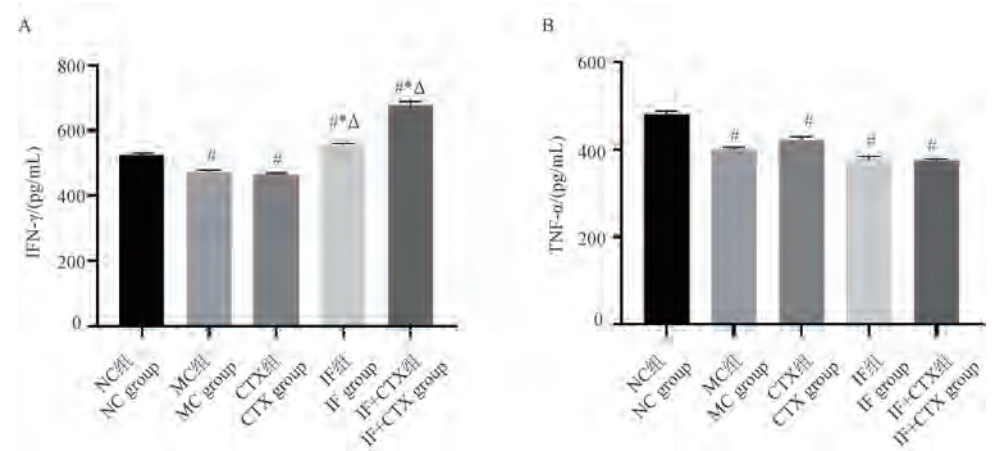


图 3 IF 联合 CTX 对 H22 荷瘤小鼠血清细胞因子的影响

Figure 3 Effects of IF combined with CTX on serum cytokines in H22 tumor-bearing mice

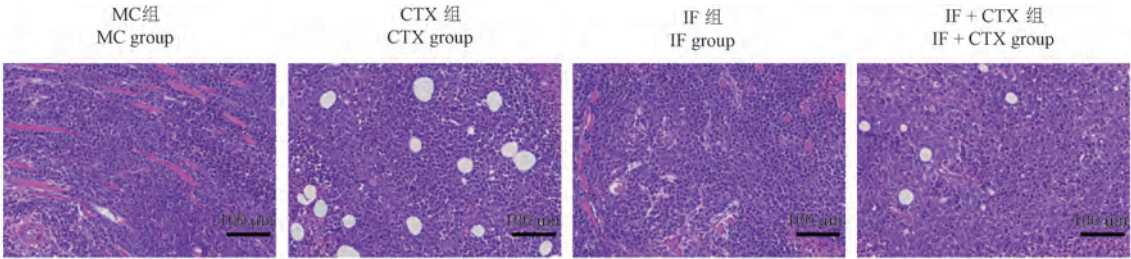


图 4 H22 小鼠肿瘤组织 HE 染色切片

Figure 4 HE stained sections of tumor tissues from H22 tumor-bearing mice

用,在临床上应用愈来愈广泛,已成为抗肿瘤药物研究的一大热点^[15-16]。肝癌 H22 细胞小鼠皮下移植瘤模型是筛选和评价抗肿瘤药物应用较广的模型之一,具有操作简单、周期短、成本低、成模率高、重复性好等优点^[17]。本实验以 H22 荷瘤小鼠为模型,初步探索了 IF 与 CTX 联合用药治疗肝癌的效

果。实验结果表明:CTX 组和 IF 组的抑瘤率分别为 49.3%、34.2%,而 IF + CTX 组的抑瘤率显著提高为 72.8%,符合抗肿瘤中草药有效性标准(抑瘤率 > 30%)的要求^[18],且 IF + CTX 组的 q 值为 1.09,在 0.85 ~ 1.15 内,表明两药联用时呈相加的抑瘤作用。CTX 组小鼠的 WBC、Lymph、PLT 数量明显降

低,提示荷瘤小鼠出现骨髓抑制;IF + CTX 组小鼠 WBC、PLT 相比 CTX 组显著升高,表明 IF 和 CTX 联用可以减小 CTX 所致的骨髓抑制毒性,改善免疫功能。

脾和胸腺是最主要的免疫器官。胸腺是 T 淋巴细胞产生、发育、分化和成熟的场所;脾是机体最大的外周免疫器官,胸腺指数和脾指数的大小直接反应机体免疫水平的高低^[19]。本实验中,IF 组的胸腺指数显著高于 MC 组和 CTX 组,表明 IF 可能通过增加免疫器官胸腺的重量,增强机体的免疫力,从而抑制肿瘤生长。MC 组小鼠可见脾明显肿大,这与小鼠荷瘤后免疫细胞转移并滞留在脾中有直接的关系,提示机体进入负免疫调节阶段^[20-21]。IF + CTX 组小鼠脾指数显著低于 MC 组,表明 IF 与 CTX 联用可改善荷瘤小鼠脾损伤,调节免疫功能。

IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子水平与机体免疫能力关系密切^[22]。IFN- γ 是参与抗肿瘤免疫最重要的细胞因子,主要由 Th1 细胞分泌,其表达水平升高代表激活了免疫应答指标^[23]。IFN- γ 能直接抑制肿瘤的生长,已被证明在调节抗肿瘤免疫反应以及抑制肿瘤生长方面发挥着重要的作用,并已在临床前、体外和体内以及恶性疾病免疫治疗的患者中进行了广泛的测试^[24]。TNF- α 是已知抑瘤作用最强的细胞因子,能直接杀伤肿瘤细胞并抑制肿瘤细胞增殖,但对正常细胞无明显的毒性^[25]。本研究显示,与 NC 组相比,MC 组小鼠血清 IFN- γ 、TNF- α 水平降低;与 MC 组相比,IF 组和 IF + CTX 组小鼠血清 IFN- γ 升高;与 CTX 组相比,IF 组和 IF + CTX 组小鼠血清 IFN- γ 水平升高。大部分研究显示环磷酰胺治疗 H22 荷瘤小鼠使 TNF- α 水平有所升高,而本研究中 CTX 组小鼠血清 TNF- α 水平略高于 MC 组,但无统计学意义,这可能与机体的免疫状态有关。本研究中 CTX 注射剂量相对较大,对小鼠造成的免疫损伤也较大,因此可能使小鼠血清 TNF- α 水平升高不显著。冬虫夏草可抑制 TNF- α 的表达,从而减缓肝纤维化的发生并改善肾和肠道的损伤^[26-27]。IF 组和 IF + CTX 组小鼠血清 TNF- α 水平与 MC 组相比有降低的趋势。推测 IF 可能通过升高 IFN- γ 细胞因子水平,调节机体免疫功能,发挥抗肿瘤作用。

本研究的不足在于 IF 联合 CTX 发挥相加增效作用的具体机制尚未明确,后续应开展更深入的研究来探索联合用药后肿瘤相关细胞通路的变化,为

IF 的临床应用提供更多理论基础。综上所述,IF 和 CTX 联用具有相加的抑瘤作用,可减轻机体免疫功能抑制,具有免疫调节功能。

参 考 文 献(References)

- [1] KANG K J, AHN K S. Anatomical resection of hepatocellular carcinoma: a critical review of the procedure and its benefits on survival [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23 (7): 1139-1146.
- [2] HAO X, SUN G, ZHANG Y, et al. Targeting immune cells in the tumor microenvironment of HCC: new opportunities and challenges [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 775462.
- [3] REN F, ZHANG Y, QIN Y, et al. Taraxasterol prompted the anti-tumor effect in mice burden hepatocellular carcinoma by regulating T lymphocytes [J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1): 264.
- [4] 庄雅云, 周成合, 王渝芳, 等. 氮芥类抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(17): 1281-1287.
ZHUANG Y Y, ZHOU C H, WANG Y F, et al. Advances of nitrogen mustard compounds in antitumor agents [J]. Chin Pharm J, 2008, 43(17): 1281-1287.
- [5] CAI Y, LIU X, HUANG W, et al. Synergistic antitumor effect of TRAIL and IL-24 with complete eradication of hepatoma in the CTGVT-DG strategy [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2012, 44 (6): 535-543.
- [6] LIU Y H, QIN H Y, ZHONG Y Y, et al. Neutral polysaccharide from *Panax notoginseng* enhanced cyclophosphamide antitumor efficacy in hepatoma H22-bearing mice [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 37.
- [7] YUE K, YE M, ZHOU Z, et al. The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review [J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65(4): 474-493.
- [8] ZHANG M, SUN X, MIAO Y, et al. *Cordyceps cicadae* and *Cordyceps gunnii* have closer species correlation with *Cordyceps sinensis*: from the perspective of metabonomic and MaxEnt models [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 20469.
- [9] 朱宏. 参芪扶正注射液配合化疗治疗恶性肿瘤的临床效果分析 [J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(1): 85-86.
ZHU H. Clinical analysis of Shenqi Fuzheng injection combined with chemotherapy in the treatment of malignant tumor [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2018, 12(1): 85-86.
- [10] 任宝生, 任连生, 张燕. 细棒束孢培养物对小鼠移植性肿瘤抑制作用的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2 (12): 699-702.
REN B S, REN L S, ZHANG H. Experimental study on the inhibitory action of *Isaria feline* culture on the transplantation tumor of mice [J]. World J Integr Tradit West Med, 2007, 2 (12): 699-702.
- [11] 杨喜花, 张燕, 任连生, 等. 猫棒束孢多糖对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌的抑制作用 [J]. 中国药物与临床, 2015, 15 (2): 185-186.
YANG X H, ZHANG H, REN L S, et al. Inhibitory effect of

- Corynebacterium felis* polysaccharide on S180 sarcoma and H22 liver cancer in mice [J]. Chin Remedies Clin, 2015, 15(2): 185–186.
- [12] YANG X, YANG Y, ZHAO L, et al. Enrichment of *Isaria felina* culture with selenium enhances its *in vivo* antitumor effects on H22 hepatoma *via* decreasing the expression of vegf [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2023, 23(14): 1689–1696.
- [13] 杨玉萍, 段永强, 梁建庆, 等. 基于 ERK 介导 C-Myc/PD-L1 协同作用探讨参芪抑瘤方联合顺铂对 H22 肝癌荷瘤小鼠的抑瘤机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(14): 2069–2073.
- YANG Y P, DUAN Y Q, LIANG J Q, et al. Study on the anti-tumor effect of Shenqi Yiliu decoction combined with cisplatin on H22 liver cancer-bearing mice [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 39(14): 2069–2073.
- [14] 刘永琦, 闫德祺, 李应东, 等. 参归丸对顺铂化疗 H22 荷瘤小鼠的减毒增效作用及其机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(6): 552–556.
- LIU Y Q, YAN D Q, LI Y D, et al. Attenuated and synergistic effects of *Angelica sinensis* and *Radix sophorae flavescentis* decoction on H22 tumor-bearing mice treated with cisplatin and its mechanism [J]. Cancer Res Prev Treat, 2014, 41(6): 552–556.
- [15] 黄天敏, 杨映霞, 张宏亮, 等. 蛭蝻提取物对环磷酰胺治疗肝癌的增效减毒作用 [J]. 中国药房, 2021, 32(1): 17–23.
- HUANG T M, YANG Y X, ZHANG H L, et al. Effect of increasing efficacy and decreasing toxicity of *Limax* extract on cyclophosphamide in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Chin Pharm, 2021, 32(1): 17–23.
- [16] 潘翠柳, 陆小莲, 吴捷梅, 等. 藤茶双氢杨梅树皮素联合环磷酰胺抗肿瘤作用研究 [J]. 广西中医药, 2020, 43(3): 65–68.
- PAN C L, LU X L, WU J M, et al. Study on synergistic effect of ampelopsin combined with cyclophosphamide in anti-tumor therapy [J]. Guangxi J Tradit Chin Med, 2020, 43(3): 65–68.
- [17] 王春玲, 张瑜, 文晓东, 等. 八月札乙醇提取物通过 PI3K/Akt 通路抑制 H22 细胞增殖并诱导其凋亡 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 73–77, 267–268.
- WANG C L, ZHANG Y, WEN X D, et al. Extract of *Akebia trifoliata* inhibits proliferation and induces apoptosis of H22 liver cancer mice cell via PI3K/akt signaling pathway [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(9): 73–77, 267–268.
- [18] 廖子君, 克俊, 韩军. 现代肿瘤治疗药理学 [M]. 北京: 世界图书出版社; 2002.
- LIAO Z J, KE J, HAN J. Modern tumor therapy pharmacology [M]. Beijing: World Book Publishing Press; 2002.
- [19] 刘艳之, 王艳, 刘凯丽, 等. 西黄丸对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(7): 754–761.
- LIU Y Z, WANG Y, LIU K L, et al. Inhibition and mechanism of Xihuang pill on mice bearing hepatoma H22 tumor [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2022, 27(7): 754–761.
- [20] 吕建敏, 龚金炎, 刘士旺. 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 216–223.
- LYU J M, GONG J Y, LIU S W. Anti-tumor activities of *Pleurotus geesteranus* fruit body powder on H22 tumor-bearing mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 216–223.
- [21] 董慧, 郑国强, 滕安国, 等. 荷瘤小鼠脾脏过度增大的机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(8): 940–943.
- DONG H, ZHENG G Q, TENG A G, et al. Mechanism of splenic excess augmentation in tumor-bearing mice [J]. Cancer Res Prev Treat, 2012, 39(8): 940–943.
- [22] 韩佳彤, 田菲, 林方圆, 等. 扶正散结方联合顺铂对腹水瘤小鼠免疫调节作用的研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2023, 42(3): 334–338.
- HAN J T, TIAN F, LIN F Y, et al. Effect of Fuzheng Sanjie Recipe on H22 liver ascitic tumor mice and its immunological regulation [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2023, 42(3): 334–338.
- [23] 吕长玲, 杜华钰, 周杰, 等. 美洲大蠊多肽 PAP-2 对 Balb/c 小鼠肝癌原位移植瘤免疫微环境的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(7): 994–998.
- LYU C L, DU H Y, ZHOU J, et al. Effect of *Periplaneta Americana* polypeptide PAP-2 on the immune microenvironment of Balb/c mice with epatocellular carcinoma *in situ* transplanted tumors [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(7): 994–998.
- [24] KURSUNEL M A, ESENDAGLI G. The untold story of IFN- γ in cancer biology [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016, 31: 73–81.
- [25] 李香颖, 林乐珍, 蓝焱焱, 等. 罗汉松实多糖对小鼠肝癌 H22 细胞移植瘤生长的影响及其机制 [J]. 山东医药, 2022, 62(36): 44–49.
- LI X Y, LIN L Z, LAN Y Y, et al. Effect of polysaccharide from PSP on growth of xenograft tumor in mouse liver cancer H22 cells [J]. Shandong Med J, 2022, 62(36): 44–49.
- [26] 崔兵兵, 李季, 刘可春, 等. 冬虫夏草多糖抑制肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 228–234.
- CUI B B, LI J, LIU K C, et al. Anti-hepatic fibrosis mechanism of *Cordyceps* polysaccharide [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(15): 228–234.
- [27] 窦婷, 杨静雯, 杨昊, 等. 冬虫夏草介导 SLC7A11/GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡抵抗放射性直肠炎研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 1882–1888.
- DOU T, YANG J W, YANG H, et al. Study of *Cordyceps sinensis*-mediated SLC7A11/GPX4/ACSL4 inhibition of ferroptosis against radiotherapy-induced proctitis [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(9): 1882–1888.

熊翱,魏小雨,彭艳,等. 小肠过表达 Ski 蛋白对扭体小鼠的抑炎镇痛作用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 369-377.
XIONG A, WEI X Y, PENG Y, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of small intestine Ski-overexpression on acetic acid-induced writhing mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 369-377.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.011

小肠过表达 Ski 蛋白对扭体小鼠的抑炎镇痛作用

熊翱^{1,2}, 魏小雨¹, 彭艳², 杨明¹, 杨钱冬¹, 罗飞^{1*}

(1. 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院骨科, 重庆 400038;
2. 陆军军医大学陆军特色医学中心野战外科研究部, 重庆 400042)

【摘要】 目的 研究小肠过表达鸟类癌基因(virus sloan-kettering institute, v-ski)的细胞内同源物(Ski)蛋白对醋酸致扭体小鼠的抑炎镇痛作用。**方法** 选取 8 周龄雄性 ICR 小鼠, 给予腹腔注射现配的 0.7% 醋酸溶液(0.1 mL/10 g)诱发扭体反应。实验小鼠分为假手术(sham)组、醋酸(acetic acid)组、醋酸(acetic acid) + 布洛芬(ibuprofen)组、醋酸(acetic acid) + 腺病毒空质粒(ad-EGFP)组、醋酸(acetic acid) + 腺病毒 ski 质粒(ad-ski)-1 组、醋酸(acetic acid) + 腺病毒 ski 质粒(ad-ski)-2 组和醋酸(acetic acid) + 柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)组, 每组 10 只。观察并记录第 1 次扭体出现的潜伏期, 同时记录 15 min 内的扭体次数。获取标记的小肠组织, 鉴定腺病毒转染效果, 检测促炎因子、疼痛生物标志物的蛋白表达量, 进一步分析核转录因子- κ B(NF- κ B)通路蛋白表达及其与 Ski 蛋白的结合情况。**结果** 腹腔注射 ad-ski 腺病毒后, 小肠成功过表达 Ski 蛋白。过表达的 Ski 蛋白延长了小鼠发生扭体的潜伏期, 同时减少了扭体反应的频率, 与布洛芬的效果相当($P > 0.05$)。与醋酸组比较, 过表达的 Ski 蛋白显著抑制了促炎因子和疼痛生物标志物的蛋白表达($P < 0.05$)。而且 NF- κ B p65 与 Ski 有复合物形成。**结论** 过表达 Ski 蛋白对醋酸引起的炎性疼痛有抑炎镇痛作用, 且与 Ski 调节 NF- κ B 信号通路有关。

【关键词】 Ski; 扭体实验; 白细胞介素- 1β ; 肿瘤坏死因子- α ; 神经生长因子; 酪氨酸蛋白激酶 A; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0369-09

Anti-inflammatory and analgesic effects of small intestine Ski-overexpression on acetic acid-induced writhing mice

XIONG Ao^{1,2}, WEI Xiaoyu¹, PENG Yan², YANG Ming¹, YANG Qiantong¹, LUO Fei^{1*}

(1. Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing 400038, China; 2. Research Institute of Surgery, Army Characteristic Medical Center of the Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400042, China)
Corresponding author: LUO Fei. E-mail:1388386917@163.com

【Abstract】 Objective To study the anti-inflammatory and analgesic effects of Ski protein overexpression on writhing in mice induced by acetic acid. **Methods** Eight-week-old male ICR mice were administered 0.7% acetic acid solution (0.1 mL/10 g) to induce a writhing reaction. The mice were divided into sham, acetic acid, acetic acid + ibuprofen, acetic acid + ad-EGFP, acetic acid + ad-ski-1, acetic acid + ad-ski-2, and acetic acid + sulfasalazine groups ($n = 10$

【基金项目】 重庆市研究生(博士)科研创新课题(CYB23292), 陆军军医大学优秀人才库重点扶持对象(XZ-2019-505-021)。

Funded by the Postgraduate (Doctor) Research Innovation Project of Chongqing (CYB23292), Key Supporters of the Excellent Talent Pool of the Army Medical University (XZ-2019-505-021).

【作者简介】 熊翱, 男, 博士, 研究方向: 骨科相关疾病的临床与基础, 创伤基础与临床。Email: 2528359578@qq.com

【通信作者】 罗飞, 男, 教授, 博士, 博士生导师, 骨科主任, 研究方向: 骨科疾病, 尤其擅长脊柱外科。Email: 1388386917@163.com

mice per group). The time to the first appearance of twisting and the number of twists within 15 min were recorded. Small intestine tissues were removed to identify the effect of adenovirus transfection and to detect protein expression levels of pro-inflammatory factors and pain biomarkers and protein expression of nuclear factor (NF)- κ B p65 and its binding with Ski protein. **Results** Ski protein was successfully overexpressed in small intestine after intraperitoneal injection of Ad-ski adenovirus. Overexpressed Ski protein delayed the start and decreased the frequency of writhing, comparable to ibuprofen ($P > 0.05$). Groups in which ski protein was overexpressed showed significantly inhibited protein expression of pro-inflammatory factors and pain biomarkers compared with the acetic acid group ($P < 0.05$). Moreover, NF- κ B p65 formed complexes with Ski. **Conclusions** Overexpression of Ski protein has anti-inflammatory and analgesic effects on acetic acid-induced inflammatory pain by inhibiting the expression of inflammatory factors and pain biomarkers, via regulation of the NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] Ski; writhing test; IL-1 β ; TNF- α ; nerve growth factor; tyrosine protein kinase A; mice

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

疼痛是一种与实际或潜在组织损伤相关的不愉快感觉和情绪情感体验及其经历^[1]。2021 年 COHEN 等^[2]将疼痛分为伤害性疼痛 (nociceptive pain, NCEP)、神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NPAP) 及伤害可塑性疼痛 (nociplastic pain, NPLP) 3 种类型。其中 NCEP 的机制依赖于外周神经, 引起 NCEP 的病因是直接或潜在的组织损伤^[3]。炎性疼痛是 NCEP 的一种, 包括炎性关节疼痛、腹部炎性疼痛、胸部炎性疼痛、盆腔炎性疼痛和创伤性炎症疼痛等。

炎性疼痛的治疗策略是针对抑炎镇痛而设计的。临床治疗药物采用非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti inflammatory drugs, NSAIDs)、皮质类固醇和阿片类药物等, 但长期使用止疼药存在许多安全问题^[4-5]。新型的抗神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 抗体 (如他尼珠) 治疗方法^[6], 也产生明显的副作用如感觉迟钝、感觉异常和关节伤害等, 尚未研制出安全有效的炎性疼痛缓解剂。所以对无副作用或副作用少的镇痛药物研究, 临床意义重大。

醋酸诱导扭体痛是评价天然药物和传统药物外周镇痛活性的成熟方法, 而且能够定性定量测量疼痛^[7]。从扭动频率的降低推断出干预扭体实验的药物镇痛效果^[7-8]。醋酸通过刺激小肠等组织释放疼痛介质诱导炎性疼痛, 导致扭体反应^[7]。而且已有报道, 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、NGF、酪氨酸蛋白激酶 A (tyrosine protein kinase A, TrkA) 和降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 是开发新型镇痛药物的重要靶点^[8]。

鸟类癌基因 Ski 蛋白 (cellular sloan-kettering institute, c-Ski) 是鸟类癌基因 (virus sloan-kettering institute, v-ski) 的细胞内同源物蛋白 (动物称 *c-ski* 或 c-Ski, 而人称 *ski* 或 Ski)。Ski 作为辅阻遏子, 可调控多种核因子的转录, 促进糖尿病伤口愈合, 下调急性伤口的 IL-1 β 和 TNF- α ^[9-10], 干预成纤维细胞增殖和凋亡^[10]。提高 Ski 表达后, 伤口炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 分泌显著减少, 而且, 转染 ad-ski 具有抑制 SD 大鼠原代滑膜细胞炎症反应^[11]。

本研究采用醋酸诱导 ICR 小鼠产生扭体反应, 应用布洛芬干预作为抑炎镇痛阳性对照, 柳氮磺胺吡啶作为抑制 NF- κ B 通路的阳性对照, 通过检测 ICR 小鼠扭体频率和小肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP、p-NF- κ B p65 (p-p65)、NF- κ B p65 (p65)、磷酸化核转录因子 κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α) 和 I κ B α 的蛋白表达, 探讨 Ski 的抑炎镇痛效果和可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄的 SPF 级雄性 ICR 小鼠, 18 ~ 22 g, 80 只, 购自中国人民解放军陆军特色医学中心【SCXK (渝) 2022-0004】, 将动物饲养在陆军军医大学陆军特色医学中心的标准实验室【SYXK (渝) 2022-0003】。饲喂普通维持饲料。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 通风良好, 温度 20 ~ 26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 42% ~ 62%, 动物可以自由进食和饮水。本研究中使用的所有程序均严格按照美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》进行。所有动物实验均由陆军军医大学 (第三军医大学) 实验动物福利

伦理审查委员会批准 (AMUWEC2018 1430)。

1.1.2 主要试剂与仪器

Ski 过表达 (Ski-overexpressing) 重组腺病毒 Adeno-MCMVSKI-3Flag-P2A-EGFP (ad-Ski) 和空白对照重组腺病毒 Adeno-MCSV-3Flag-P2A-EGFP (ad-EGFP) 购自和元生物技术 (上海) 有限公司, 布洛芬 (ibuprofen, 进口分装, 重庆西南制药三厂), 腺病毒空质粒 (ad-EGFP) 和腺病毒 ski 质粒 (ad-ski) 购自和元生物技术 (上海) 有限公司, 醋酸 (500 mL, 西安天正药用辅料有限公司), 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, NF- κ B 抑制剂^[12], 上海三维制药有限公司), 生理盐水 (100 mL, 0.9 g 氯化钠, 四川科伦药业股份有限公司), 兔抗 TNF- α 抗体 (Cell Signalling 公司, 美国), 兔抗 IL-1 β 抗体 (Cell Signalling 公司, 美国), 兔抗 NGF 抗体 (Abcam 公司, 美国), 鼠抗 Ski 抗体 (Santa Cruz 公司, 美国), 兔抗 Flag 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 TrkA 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 CGRP 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 NF- κ B p65 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 p-NF- κ B p65 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 中国香港), 兔抗 p-I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 兔抗 I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 兔抗 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), 抗鼠 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), 免疫印迹 (Western Blot) 实验系统和试剂 (Bio-Rad 公司, 美国), Western Blot 底物发光试剂盒 (Bio-Rad 公司, 美国)。手术器械 (眼科剪、眼科镊、组织剪、血管镊等)。

1.2 方法

1.2.1 Ad-Ski 的构建、扩增、纯化和转染

将人 ski cDNA (GenBank 登录号 NM_003036.3) 包装到腺病毒载体中。该病毒在人胚胎肾 293 (HEK293) 细胞中扩增, 由 Vivapure Adeno PACK 20 (Sartorius) 纯化, 并如参考文献^[10]所述滴定。按照试剂说明书介绍方法, 用 ad-EGFP 或 ad-ski 转染 ICR 小鼠腹腔小肠组织 48 h 后, 进行扭体实验。

1.2.2 醋酸致扭体实验

(1) 实验分组: ICR 小鼠分为假手术 (sham) 组、醋酸 (acetic acid) 组、醋酸 (acetic acid) + 布洛芬 (ibuprofen) 组、醋酸 (acetic acid) + 腺病毒空质粒 (ad-EGFP) 组 (2×10^8 IU)、醋酸 (acetic acid) + 腺

病毒 ski 质粒 (ad-ski)-1 组 (1×10^8 IU)、醋酸 (acetic acid) + 腺病毒 ski 质粒 (ad-ski)-2 组 (2×10^8 IU) 和醋酸 (acetic acid) + 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine) 组。每组 10 只。测定 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP、p-NF- κ B p65 (p-p65)、NF- κ B p65 (p65)、p-I κ B α 和 I κ B α 等分子生物学指标, 每组取 5 只动物完成。

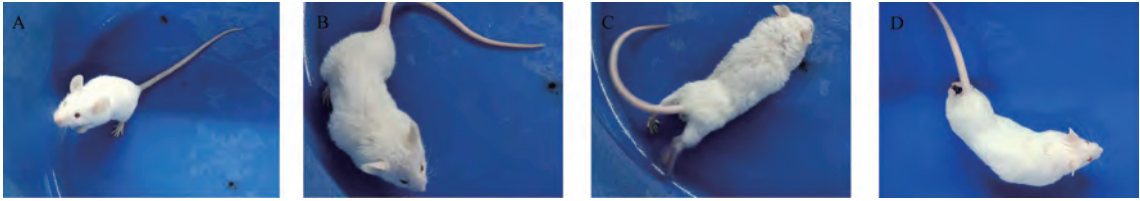
(2) 预处理各组 ICR 小鼠: 用 1.5% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 剪去腹部毛发, 消毒后铺带孔无菌手术巾, 开腹。采用可吸收缝合线在近盲肠处标记回肠。然后, 假手术组、醋酸组、醋酸 + 布洛芬组和醋酸 + 柳氮磺胺吡啶组小鼠在标记的回肠多点处被注入生理盐水 (总量控制在 0.1 mL/10 g), 腺病毒各组小鼠在回肠多点处被注入 0.1 mL/10 g 腺病毒 (1×10^8 IU 或 2×10^8 IU), 最后缝合腹腔。48 h 后, 醋酸 + 布洛芬组小鼠腹腔注入 0.1 mL/10 g 布洛芬溶液 (200 mg/kg), 醋酸 + 柳氮磺胺吡啶组以小鼠 100 mg/kg 的柳氮磺胺吡啶灌胃, 其余各组小鼠腹腔注入 0.1 mL/10 g 生理盐水。

(3) 0.7% 的醋酸溶液制备: 模型制备前 30 min, 配制 10% 醋酸 (用生理盐水) 10 mL, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰水盒中; 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后, 取 10% 醋酸 450 μ L 配制成 0.7% 醋酸溶液 (用生理盐水) 5 mL, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰水盒中; 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 min 后, 取 0.7% 醋酸溶液 5 mL 放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中热浴 3 min 后立即使用。

(4) 扭体模型制备: 各组 ICR 小鼠 (除假手术组外) 第 2 次预处理 30 min 后, 小鼠按 0.1 mL/10 g 的标准, 给予腹腔注射现配的 0.7% 醋酸溶液。室温需保持在 (25 ± 1) $^{\circ}$ C, 在观察盒 (24 $^{\circ}$ C) 里, 观察并记录小鼠第 1 次扭体出现的潜伏期, 同时记录 15 min 内的扭体次数。一次完整扭体反应的标准^[8]: ICR 小鼠出现腹部内凹, 躯干与后肢伸张、臀部高起等行为反应, 可记为完整扭体反应 1 次 (图 1)。15 min 后, 小鼠被安乐死, 取盲肠处回肠组织, 检测 Ski、Flag-Ski、IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP、NF- κ B p65 (p-p65)、p-NF- κ B 65 (p65)、p-I κ B α 和 I κ B α 等蛋白表达。观察并记录小鼠扭体反应时, 采用双盲法。

1.2.3 Western Blot 分析

根据标准程序^[13-14]进行 Western Blot 分析。将组织裂解物进行十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide



注:A:扭体前;B:腹部内凹;C:躯干与后肢伸张;D:臀部高起。

图 1 醋酸导致的完整扭体反应

Note. A. Before twisting. B. Depressed abdomen. C. Trunk and hind limbs stretched. D. High hips.

Figure 1 Writhing response induced by acetic acid

gel electrophoresis, PAGE), 电转移到聚偏氟乙烯 (PVDF)膜 (Millipore) 上,并用指定的抗体探测。抗体信息如下:(1)兔抗 TNF- α 抗体(1:1000),(2)兔抗 IL-1 β 抗体(1:1000),(3)兔抗 NGF 抗体(1:1000),(4)鼠抗 Ski 抗体(1:500),(5)兔抗 Flag 抗体(1:1000),(6)兔抗 TrkA 抗体(1:1000),(7)兔抗 CGRP 抗体(1:1000),(8)兔抗 NF- κ B p65 抗体(1:1000),(9)兔抗 p-NF- κ B p65 抗体(1:1000),(10)兔抗 p-I κ B α 抗体(1:1000),(11)兔抗 I κ B α 抗体(1:1000),(12)小鼠抗 β -actin 抗体(1:10 000)。一抗孵育结束,用 PBS(0.01 mol/L, pH = 7.2)洗涤膜后,用与一抗相应的辣根过氧化物酶结合的抗兔或抗鼠二级抗体孵育,并用化学发光底物检测,且感光在 X 线感光片上。在每个样品中测量 β -actin 表达以验证相等的蛋白质负载。

1.2.4 免疫沉淀

醋酸 + 腺病毒 ski 质粒-2 组的小肠组织在 IP 裂解/洗涤缓冲液 (ierce) 中冰上裂解 15 min,并添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂,获取蛋白裂解液并蛋白定量。根据 Crosslink Immunoprecipitation Kit 说明书进行实验:10 μ g 抗体 (IgG、Ski 或 p65 抗体)与蛋白 A/G 琼脂糖珠在 4 $^{\circ}$ C 交联 1 h,然后与 500 μ g 可溶性细胞裂解物在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤 4 次去除未结合蛋白。SDS-PAGE 后,将免疫沉淀蛋白转移到 PVDF 膜上,并用 Ski 或 NF- κ B p65 抗体进行检测。最后,使用 Western Blot 增强化学发光 (ECL) 试剂对 PVDF 膜进行可视化,且感光在 X 线感光片上。

1.3 统计学分析

所有独立实验的数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有指标数据运用 SPSS 15.0 先进行正态分布评估,符合正态分布的数据,使用配对样本双尾 t 检验进行统计分析。所有的统计分析结果, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。所有数据均使用医

学绘图软件 (GraphPad Prism V9.5.1.733) 和实验工作平台软件 (LabWorks 4.6) 进行分析。

2 结果

2.1 腹腔注射 ad-ski 腺病毒对小肠 Ski 蛋白的影响

腹腔注射 ad-ski 和 ad-EGFP 后,与醋酸组比较,醋酸 + 腺病毒 ski 质粒组 Ski 蛋白表达上调显著,醋酸 + 腺病毒空质粒组 Ski 蛋白表达无显著变化 (图 2)。标签蛋白 Flag-Ski,只在转染 ad-ski 的小肠标记组织有表达 (图 2)。

2.2 Ski 蛋白对小鼠扭体反应的影响

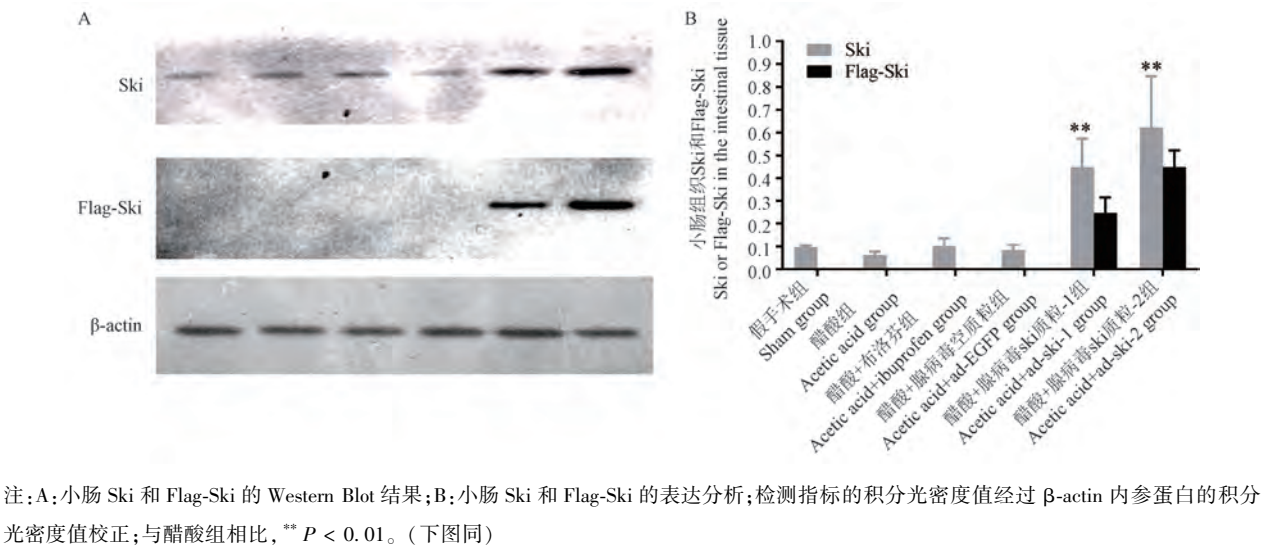
过表达 Ski 蛋白可减少扭体数 (图 3)。小鼠腹腔感染 2×10^8 IU 的 ad-ski 后,小鼠扭体反应的减少率为 54.12%,与标准药物布洛芬 (50.00%) 在 200 mg/kg 剂量下的作用效率相当。ad-ski 和布洛芬对醋酸诱发第 1 次扭体反应的时间 (潜伏期) 有延长 (图 3),与醋酸组相比,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 Ski 蛋白对扭体小鼠肠道组织疼痛介导因子的影响

与醋酸组比较,过表达的 Ski 蛋白显著抑制了小肠组织中 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA 和 CGRP 的蛋白表达 (图 4),且 Ski 蛋白过表达产生的对上述致痛生物标志物的抑制作用均与标准药物布洛芬具有类似的作用。

2.4 Ski 蛋白对 NF- κ B 信号通路的影响

Ski 蛋白过表达抑制了 p65 的蛋白表达,与布洛芬的抑制作用相同 (图 5A)。醋酸 + ad-ski-2 组小肠组织裂解后,分别用 IgG、Ski 或 NF- κ B p65 抗体进行了免疫沉淀反应,Ski 与 NF- κ B p65 蛋白有结合 (图 5B,5C)。醋酸 + 腺病毒 Ski 质粒组-2 组和醋酸 + 柳氮磺胺吡啶组小肠组织 p-p65、p65、p-I κ B α 、I κ B α 、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白相对表达量均低于醋酸组 ($P < 0.05$) (图 6)。

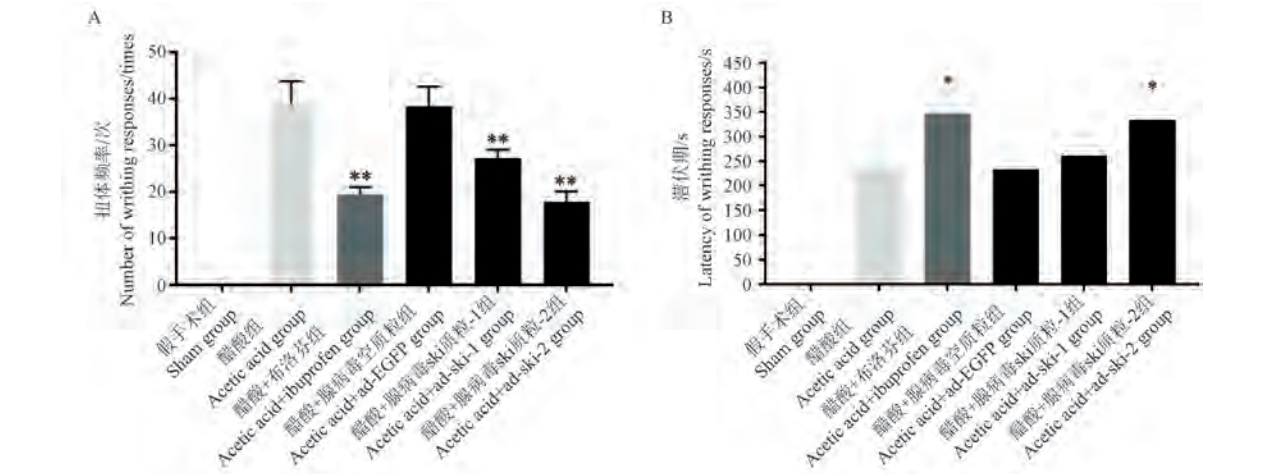


注:A:小肠 Ski 和 Flag-Ski 的 Western Blot 结果;B:小肠 Ski 和 Flag-Ski 的表达分析;检测指标的积分光密度值经过 β -actin 内参蛋白的积分光密度值校正;与醋酸组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 腺病毒转染后的小肠 Ski 和 Flag-Ski 的表达($\bar{x} \pm s$)

Note. A. Western Blot results of Ski and Flag-Ski in small intestine. B. Expression of Ski and Flag-Ski in small intestine. Integral optical density value of each detection index was corrected by the integral optical density value of the β -actin reference protein. Compared with acetic acid group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Expression of Ski and Flag-Ski in small intestine after adenovirus transfection($\bar{x} \pm s$)



注:A:各组的扭体频率;B:各组扭体反应发生的潜伏期;与醋酸组相比, * $P < 0.05$ 。(下同)

图 3 Ski 和布洛芬对醋酸诱导的 ICR 小鼠扭体反应潜伏期和次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

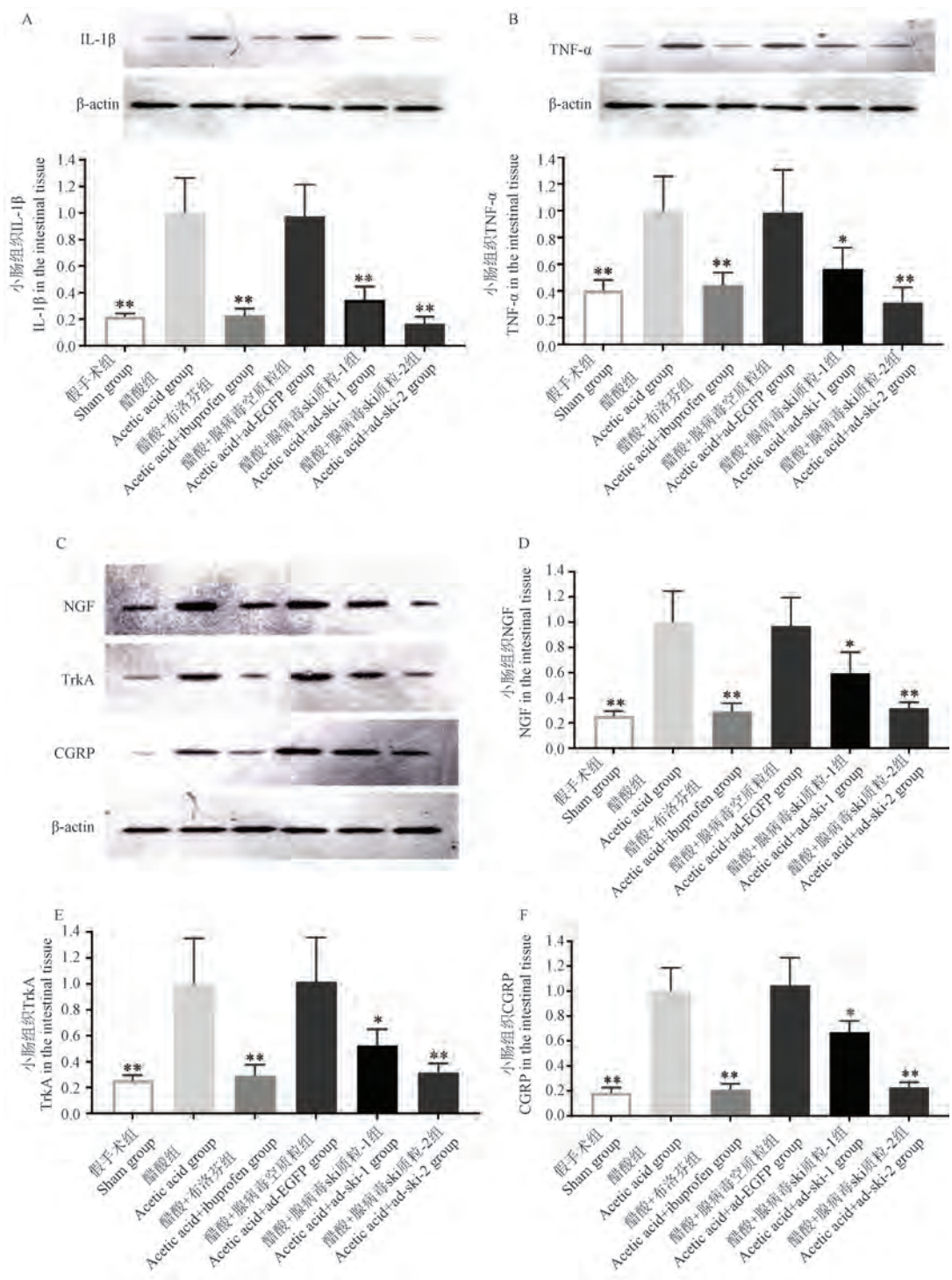
Note. A. Twisting frequency of each group. B. Latency of writhing reaction in each group. Compared with acetic acid group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of Ski and ibuprofen on writhing response of ICR mice induced by acetic acid($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

通过醋酸诱导的扭体反应对动物外周性炎性疼痛的模拟已得到广泛认可。该模型的优点是操作方便,对动物影响轻微;不必麻醉动物,避免麻醉药对模型的影响;行为反应出现即时、变化明显、利于定量。以上优点使该模型成为外周镇痛药评价

的最常规方法,特别适用于筛选非麻醉性镇痛药^[7]。炎性疼痛的致痛因素包括炎性因子(IL-1 β 、TNF- α)、疼痛的生物标志物(NGF、TrkA 和 CGRP)等炎症介质。炎性因子可以直接激活痛觉感受器引起疼痛^[15],NGF 在组织损伤后的痛觉致敏中发挥着重要的作用,通过与 TrkA 等高亲和力受体结合实现痛觉传递^[16],同时,疼痛与 CGRP 有关^[17]。

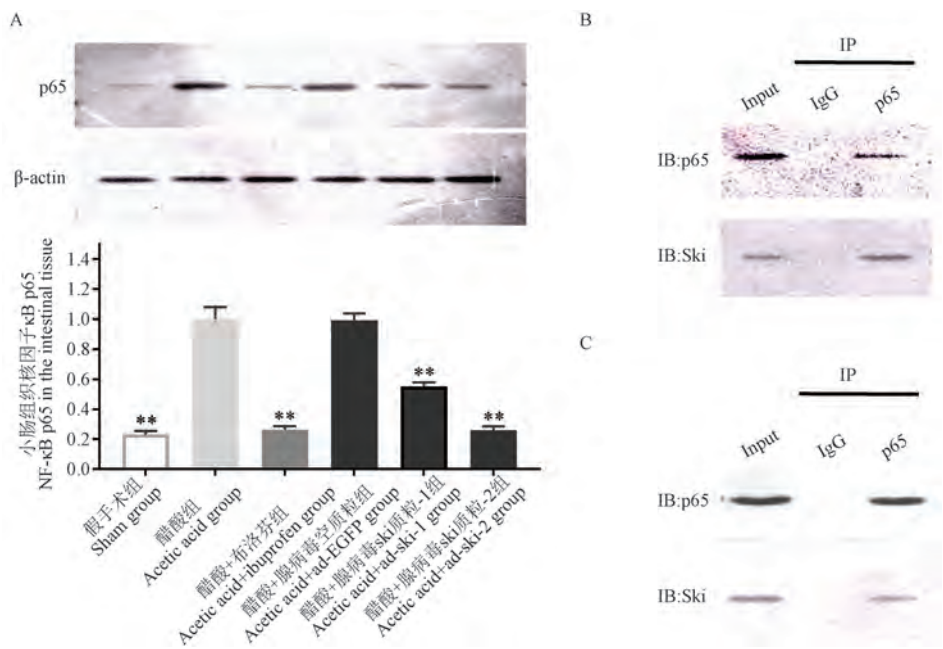


注:A:小肠 IL-1β 蛋白的 Western Blot 结果分析;B:小肠 TNF-α 蛋白的 Western Blot 结果分析;C:小肠 NGF、TrkA 和 CGRP 蛋白的 Western Blot 结果;D:小肠 NGF 蛋白的 Western Blot 结果分析;E:小肠 TrkA 蛋白的 Western Blot 结果分析;F:小肠 CGRP 蛋白的 Western Blot 结果分析。检测指标的积分光密度值经过 β-actin 内参蛋白的积分光密度值校正,醋酸组归一。

图 4 腺病毒转染后的小肠组织 IL-1β、TNF-α、NGF、TrkA 和 CGRP 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of IL-1β protein in small intestine. B. Western Blot analysis of TNF-α protein in small intestine. C. Western Blot of NGF, TrkA and CGRP protein in small intestine. D. Western Blot analysis of NGF protein in small intestine. E. Western Blot analysis of TrkA protein in small intestine. F. Western Blot analysis of CGRP protein in small intestine. The integral optical density value of each detection index was corrected by the integral optical density value of the β-actin reference protein, normalized by acetic acid.

Figure 4 Expression of IL-1β, TNF-α, NGF, TrkA and CGRP protein in small intestine after adenovirus ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

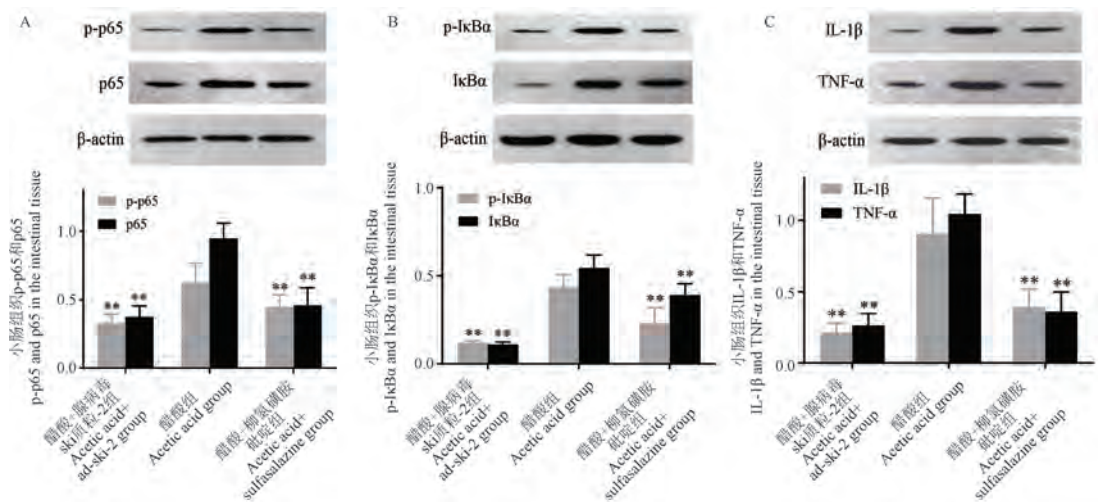


注:A:小肠 p65 蛋白的 Western Blot 结果分析,检测指标的积分光密度值经过内参指标校正;B:醋酸 + 腺病毒 Ski 质粒组-2 组小肠组织裂解液用 Ski 抗体进行免疫沉淀反应结果;C:醋酸 + 腺病毒 Ski 质粒组-2 组小肠组织裂解液用 p65 抗体进行免疫沉淀反应结果。

图 5 腺病毒转染小肠组织后 p65 蛋白表达及其与 Ski 蛋白的结合($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of NF-κB p65 (p65) protein in small intestine. Integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index. B. Immunoprecipitation reaction was performed using Ski antibody on small intestinal tissue lysate from the acetic acid + ad-ski-2 group. C. Immunoprecipitation reaction was performed using NF-κB p65 (p65) antibody on small intestinal tissue lysate from the acetic acid + ad-ski-2 group.

Figure 5 Expression of p65 protein and its binding to Ski protein after adenovirus transfection into small intestine tissue($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:A:小肠 p-p65 和 p65 蛋白的 Western Blot 结果和分析;B:小肠 p-IκBα 和 IκBα 蛋白的 Western Blot 结果和分析;C:小肠 IL-1β 和 TNF-α 蛋白的 Western Blot 结果和分析;每个检测指标的积分光密度值被 β-actin 内参指标的积分光密度值校正。

图 6 三组小鼠小肠组织 p-p65、p65、p-IκBα、IκBα、IL-1β 和 TNF-α 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of p-p65 and p65 protein of small intestine. B. Western Blot analysis of p-IκBα and IκBα proteins in small intestine. C. Western Blot analysis of IL-1β and TNF-α proteins in small intestine. Integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index.

Figure 6 Expression of p-p65, p65, p-IκBα, IκBα, IL-1β and TNF-α in small intestine tissue($\bar{x} \pm s, n = 5$)

本研究首先采用腺病毒预处理 ICR 小鼠腹腔回肠,过表达 Ski 蛋白。然后腹腔肠外注射醋酸引起炎性疼痛(外周性疼痛的一种)而导致扭体反应。实验观察到:Ski 不仅降低了 ICR 小鼠的扭体反应频率,而且降低了扭体小鼠小肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP 和 NF- κ B 通路蛋白的表达。Ski 和 NF- κ B p65 形成了复合物,说明 Ski 抑炎镇痛作用的发挥,可能是 Ski 通过调节 NF- κ B 信号通路完成的。

醋酸注入腹腔引发的疼痛,属于醋酸刺激损伤小肠而释放炎症和疼痛介质引起。炎症环境除了炎症因子直接刺激引起疼痛外,还促使 NGF 大量表达使神经末梢对痛觉更加敏感^[18]。NGF 与其功能性受体 TrkA 结合,引发 NGF 疼痛信号通路。NGF 除产生疼痛外,进一步强化“炎症环境”,诱发 IL-1 β 、TNF- α 等炎性介质的释放,可通过增加痛觉感受器兴奋性或直接激活伤害性感受器来导致外周敏化,从而诱导疼痛^[14]。Ski 抑制了醋酸诱导的 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP 和 NF- κ B 蛋白的高表达,减弱了致痛生物标志物诱导痛觉神经生长和痛觉敏感性,阻断痛觉传递^[16,19]。

Ski 具有促进创伤愈合和抑制瘢痕增生双重作用,且其双重作用与减轻炎症反应有密切关系,但作用机制尚不明确^[10]。有文献报道,转染 ad-ski 具有抑制 SD 大鼠原代滑膜细胞炎性反应,且 NF- κ B 的下游蛋白分子的表达发生了改变^[11]。本实验结果表明 Ski 蛋白抑制 NF- κ B 通路的作用与柳氮磺胺吡啶抑制 NF- κ B 通路^[12]的作用一致,下调了 p-p65、p65、p-I κ B α 、I κ B α 、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的表达。从现有结果推测 Ski 的抑制炎症因子和疼痛生物标志物蛋白的表达,与 Ski 抑制核 NF- κ B 的信号途径,阻碍 NF- κ B 的转录活性有关。

过表达 Ski 蛋白的抗炎和镇痛效果意义重大,因为 Ski 是内源性因子,从药物副作用方面来看,Ski 优于其他任何药物。但 Ski 作为治疗炎性疼痛的候选药物,用于临床还需进一步研究。要明确 Ski 镇痛和抗炎的详细分子机制等问题,比如 Ski 通过降低疼痛的生物标志物(NGF、TrkA 和 CGRP)蛋白的表达,从而减弱疼痛的详细分子机制。

Ski 蛋白通过抑制促炎因子的释放,削弱炎症环境和神经末梢对痛觉的敏感性以及痛觉传递,达到抑炎镇痛作用。而且这种抑炎镇痛作用,与 Ski 阻断 NF- κ B 信号通路途径有关。

参 考 文 献(References)

- [1] RAJA S N, CARR D B, COHEN M, et al. The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises [J]. Pain, 2020, 161(9): 1976–1982.
- [2] COHEN S P, VASE L, HOOTEN W M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances [J]. Lancet, 2021, 397(10289): 2082–2097.
- [3] 艾琳, 韩奕, 季然, 等. 疼痛治疗及镇痛靶点的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(7): 484–494.
AI L, HAN Y, JI R, et al. Research progress in pain treatment and analgesic targets [J]. Chin J Pain Med, 2023, 29(7): 484–494.
- [4] CHE AHMAD TANTOWI N A, LAU S F, MOHAMED S. *Ficus deltoidea* prevented bone loss in preclinical osteoporosis/osteoarthritis model by suppressing inflammation [J]. Calcif Tissue Int, 2018, 103(4): 388–399.
- [5] SHARMA V K, MAMONTOV E, TYAGI M. Effects of NSAIDs on the nanoscopic dynamics of lipid membrane [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862(2): 183100.
- [6] 张常建, 陈秀秀, 周丽君. 抗体治疗疼痛的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 8(2): 130–133.
ZHANG C J, CHEN X X, ZHOU L J. Research progress in antibody therapy for pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 8(2): 130–133.
- [7] LEE D, JU M K, KIM H. *Commiphora* extract mixture ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1477.
- [8] 熊翱, 魏小雨, 许建中, 等. 碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 643–652.
XIONG A, WEI X Y, XU J Z, et al. Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 643–652.
- [9] XIONG A, XIONG R P, LUO F. Ski ameliorates synovial cell inflammation in monosodium iodoacetate-induced knee osteoarthritis [J]. Heliyon, 2024, 10: e24471.
- [10] PENG Y, XIONG R P, ZHANG Z H, et al. Ski promotes proliferation and inhibits apoptosis in fibroblasts under high-glucose conditions via the FoxO1 pathway [J]. Cell Prolif, 2021, 54(2): e12971.
- [11] 熊翱. Ski 对碘乙酸单钠诱导的 SD 大鼠膝关节炎滑膜细胞炎症的抑制作用 [D]. 郑州: 郑州大学; 2022.
XIONG A. Inhibitory effect of Ski on synovial cell inflammation induced by monosodium iodoacetate in SD rats with knee osteoarthritis [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2022.
- [12] WAHL C, LIPTAY S, ADLER G, et al. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B [J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1163–1174.
- [13] 熊翱, 熊仁平, 彭艳, 等. 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维

样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

XIONG A, XIONG R P, PENG Y, et al. Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 436-446.

[14] XIONG A, XIONG R, YU J, et al. Aquaporin-4 is a potential drug target for traumatic brain injury via aggravating the severity of brain edema [J]. Burns Trauma, 2021, 9: tkaa050.

[15] MATSUDA M, HUH Y, JI R R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain [J]. J Anesth, 2019, 33(1): 131-139.

[16] PECCHI E, PRIAM S, GOSSET M, et al. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1): R16.

[17] KINNE R W, STUHLMÜLLER B, BURMESTER G R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(6): 224.

[18] KEELER J L, PATSALOS O, CHUNG R, et al. Short communication: Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and association with pro-inflammatory cytokines in acute and recovered anorexia nervosa [J]. J Psychiatr Res, 2022, 150: 34-39.

[19] LIAO L, ZHANG S, ZHAO L, et al. Acute synovitis after trauma precedes and is associated with osteoarthritis onset and progression [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(6): 970-980.

[收稿日期] 2023-10-29

《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。



王大伟,郭晶,边继春,等. 奥拉帕尼诱导乳腺癌 MCF-7 细胞衰老作用及其机制 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 378-384.

WANG D W, GUO J, BIAN J C, et al. Effect and mechanism of olaparib on senescence of MCF-7 breast cancer cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 378-384.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.012

奥拉帕尼诱导乳腺癌 MCF-7 细胞衰老作用及其机制

王大伟¹, 郭晶¹, 边继春¹, 王莎莎², 卢美超², 张岱州^{1,2}, 贾玉萍^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省药学院, 济南 250098)

【摘要】 目的 研究奥拉帕尼 (olaparib) 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞衰老作用的表现及其相关分子水平作用机制。**方法** 利用实时细胞分析 (real-time cell analysis, RTCA) 技术实时动态检测抗增殖和抗迁移活性; 应用衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 染色法观察诱导细胞衰老活性; 通过 qPCR 分析奥拉帕尼对衰老相关基因 p16、p21、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-8、纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)、磷酸酶和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)、p27、视网膜母细胞瘤基因 (retinoblastoma gene, RB1)、Ki67 和 E2F1 表达的影响; 根据 Western Blot 分析奥拉帕尼对衰老相关蛋白 p21、 γ H2AX、胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (insulin-like growth factor binding protein 3, IGFBP3)、cyclin D1、pRB 和 Ki67 表达的影响。**结果** 奥拉帕尼能够抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、迁移并诱导 MCF-7 细胞的衰老; 奥拉帕尼作用 96 h 的 MCF-7 细胞中 p16、p21、p27、CHOP、IL-6、IL-8、PAI-1、PTEN 和 RB1 的基因表达水平显著上调 ($P < 0.01$), Ki67 和 E2F1 的基因表达水平显著下调 ($P < 0.01$); MCF-7 细胞中 p21、 γ H2AX 和 IGFBP3 蛋白的表达水平显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), cyclin D1、pRB 和 Ki67 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 奥拉帕尼能够通过抗增殖、迁移和诱导细胞衰老产生抗乳腺癌 MCF-7 细胞作用。

【关键词】 奥拉帕尼; 乳腺癌; 衰老

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0378-07

Effect and mechanism of olaparib on senescence of MCF-7 breast cancer cells

WANG Dawei¹, GUO Jing¹, BIAN Jichun¹, WANG Shasha², LU Meichao², ZHANG Daizhou^{1,2}, JIA Yuping^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250098, China)

Corresponding author: JIA Yuping. E-mail: jiayupingygs@163.com

【Abstract】 Objective To study the cellular senescence and molecular mechanism of olaparib in MCF-7 breast cancer cells. **Methods** The effects of olaparib on the proliferation and migration of MCF-7 cells were detected dynamically by real-time cell analysis (RTCA) technology. The effects of olaparib on the Senescence was detected by using the senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal). Quantitative polymerase chain reaction was used to analyze the effects

【基金项目】 济南市“高校 20 条”资金项目 (2020GXRC043), 中央引导地方科技发展专项资金项目 (YDZX2021023), 复旦大学分子病毒学重点实验室开放课题项目 (FDMV-2021005)。

Funded by Jinan's "University 20" Project (2020GXRC043), the Central Government's Special Project for Guiding Local Science and Technology Development (YDZX2021023), the Open Project of the Key Laboratory of Molecular Virology of Fudan University (FDMV-2021005).

【作者简介】 王大伟, 在读硕士研究生, 研究方向: 抗肿瘤药物药理。Email: 2178239536@qq.com

【通信作者】 贾玉萍, 主任药师, 研究方向: 抗肿瘤药物药理。Email: jiayupingygs@163.com

of olaparib on the expression levels of genes encoding the senescence-associated factors p16, p21, C/EBP homologous protein, interleukin (IL)-6, IL-8, plasminogen activator inhibitor 1, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, p27, retinoblastoma gene, Ki67, and E2F1. The effects of olaparib on the expression levels of the senescence-associated proteins p21, γ H2AX, pRB, cyclin D1, insulin-like growth factor binding protein 3, and Ki67 were analyzed by Western Blot. **Results** Olaparib inhibited the proliferation and migration and induced the senescence of MCF-7 cells. Long-term (96 h) treatment with olaparib significantly up-regulated the gene expression levels of p16, p21, p27, C/EBP homologous protein, IL-6, IL-8, plasminogen activator inhibitor 1, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, and retinoblastoma protein ($P < 0.01$) and significantly down-regulated the gene expression levels of Ki67 and E2F1 ($P < 0.01$) in MCF-7 cells. Olaparib significantly increased protein expression levels of p21, γ H2AX, and insulin-like growth factor binding protein 3 in MCF-7 cells ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$) and significantly decreased cyclin D1, pRB, and Ki67 levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** Olaparib can inhibit proliferation and migration and induce senescence in MCF-7 breast cancer cells.

【Keywords】 olaparib; breast cancer; senescence

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

乳腺癌是女性最常发生的恶性肿瘤,是导致女性死亡的主要原因之一。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly (ADP-ribose) polymerases, PARPs)是具有多功能酶的大家族,在 DNA 修复中承担重要作用,奥拉帕尼是一种小分子口服 PARP 抑制剂,也是第一个显示无进展生存期(progression-free survival, PFS)优于标准疗法治疗乳腺癌基因(breast cancer gene, BRCA)突变的 PARP 抑制剂,2018 年被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗接受过蒽环类和紫杉烷类药物辅助治疗的 BRCA1/2 突变和人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)阴性转移性乳腺癌(metastatic breast cancer, MBC)患者^[1],2022 年被 FDA 和欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准用于治疗接受过局部治疗和辅助化疗的 BRCA1/2 突变和 HER2 阴性高危早期乳腺癌患者^[2]。

奥拉帕尼是靶向抑制 DNA 修复酶 PARP 的创新药物,可阻止肿瘤细胞利用 PARP 修复损伤 DNA,促进 DNA 双链断裂,从而导致肿瘤细胞的死亡^[3],另外奥拉帕尼也可诱导肿瘤细胞自噬^[4],抑制溶质载体家族成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)而促进 BRCA 野生型卵巢癌细胞的铁死亡^[5]。

细胞衰老在肿瘤抑制中发挥着非常重要的作用,衰老癌细胞的主要特征为增殖停滞,形态扁平 and β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)活性增大^[6]。目前尚未见奥拉帕尼诱导乳腺癌细胞衰老的相关研究报道,本文通过对奥拉帕尼诱导乳腺癌细胞衰老的研

究,进一步明确奥拉帕尼通过诱导乳腺癌细胞衰老抗乳腺癌的作用机制,为乳腺癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

乳腺癌 MCF-7 细胞购自中科院上海细胞库,用 DMEM 培养基培养(含 10% 胎牛血清,1 $\times$ 青霉素/链霉素双抗溶液),在 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养至对数生长期后用于实验。

1.1.2 主要试剂与仪器

奥拉帕尼(olaparib)购自 MCE 公司;Senescence β -Galactosidase Staining Kit 购自 CST 公司;DMEM 购自武汉塞维尔生物科技有限公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;胰蛋白酶-EDTA 消化液(不含酚红)、青链霉素混合液(100 $\times$)和 Tris 购自北京索莱宝科技有限公司;SPARKeasy Improved Tissue/Cell RNA Kit、SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser)和 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix (With ROX)购自山东思科捷生物技术有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;兔抗 Ki67 单抗购自 Abcam 公司;兔抗 p21、 γ H2AX、IGFBP3、cyclin D1、pRB、GAPDH 单抗和山羊抗兔多抗(二抗)购自 CST 公司。

3111 型水套式二氧化碳细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific, 美国),SpectraMax i3 型多功能酶标仪(Molecular Devices, 美国),xCELLigence RTCA DP Instrument(Agilent, 美国),QuantStudio 1 实时荧光定量 PCR 系统(Thermo Fisher Scientific, 美国),

BDS200 型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司,中国),JW-1032 型低速离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司,中国),SW-CJ-2FXS 型超净工作台(苏州净化设备有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 RTCA 技术测定抗增殖活性

向 E-Plate 检测板中加入 50 μL 培养基,然后放入 xCELLigence RTCA DP Instrument 中进行基线检测。取对数生长期 MCF-7 细胞用胰酶消化后计数,按照每孔 2 × 10⁴ cells 加入到 E-Plate 检测板中,室温放置 30 min,然后放入 xCELLigence RTCA DP Instrument 中,在 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜。取出 E-Plate 检测板加入 20 μmol/L 的奥拉帕尼,放回仪器中,设定程序每 5 min 采集 1 次数据,观察不同时间药物对 MCF-7 细胞增殖的影响,实验结束后获得完整的细胞增殖曲线。

1.2.2 RTCA 技术测定抗迁移活性

向 CIM-Plate 16 检测板中加入 30 μL 无血清培养基,置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中平衡 1 h。取对数生长期的 MCF-7 细胞用胰酶消化后计数,按照每孔 1 × 10⁴ cells 加入到预处理好的 CIM-Plate 16 板中室温放置 30 min 后,加入 20 μmol/L 的奥拉帕尼,然后放入 RTCA 仪器中,设定采集程序,每 5 min

检测 1 次,实时动态检测细胞迁移情况。

1.2.3 SA-β-gal 染色法测定诱导细胞衰老活性

MCF-7 细胞用 DMEM 培养基培养至对数生长期后按照每孔 5 × 10³ cells 加入到 96 孔板中置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜,然后加入 20 μmol/L 的奥拉帕尼,放回培养箱中连续培养 96 h,在 48 h 换液 1 次,然后根据 Senescence β-Galactosidase Staining Kit 说明书进行染色。

1.2.4 qPCR 测定基因表达

MCF-7 细胞用 DMEM 培养基培养至对数生长期后,按照每孔 2 × 10⁵ cells 加到 6 孔板中置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜,然后加入 20 μmol/L 的奥拉帕尼作用 96 h,设阴性对照孔。收集细胞按照 SPARKeasy Improved Tissue/Cell RNA Kit 说明书进行 RNA 提取,按照 SPARKscript II RT Plus Kit (With gDNA Eraser) 说明书制备 cDNA,然后用实时荧光定量 PCR 系统行 qPCR 检测,引物序列见表 1。扩增程序为: Hold Stage: Step1: + 1.6 ℃/s→94 ℃ (2 min); PCR Stage (40 cycles): Step1: + 1.6 ℃/s→94 ℃ (10 s); Step2: - 1.6 ℃/s→60 ℃ (30 s); Melt Curve Stage: Step1: + 1.6 ℃/s→95 ℃ (15 s); Step2: -1.6 ℃/s→60 ℃ (1 min); Step3: + 0.15 ℃/s→95 ℃ (1 s)。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence		
基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
p16	CTACTGAGGAGCCAGCGTCTAGG	AGAGTGGCGGGGTCGGCGCAGTT
p21	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA	CCAGGACTGCAGGCTTCCT
CHOP	CAGAACCCAGCAGAGGTCACA	GCTGTGCCACTTTCCTTTC
IL-6	CCCCTGACCAACCACAAAT	GCCCAGTGGACAGGTTTCTG
IL-8	GGTGCAGTTTTGCCAAGGAG	TTCCTTGGGGTCCAGACAGA
PAI-1	ACCGCAACGTGGTTTTCTCA	TTGAATCCCATAGCTGCTTGAAT
PTEN	TTTGAAGACCATAACCCACCAC	ATTACACCACTTCGTCCCTTTC
p27	CCGGTGGACCACGAAGAGT	GCTCGCCTCTTCCATGTCTC
RB1	CTCTCGTCAGGCTTGAGTTTG	GACATCTCATCTAGGTCAACTGC
Ki67	ACGCCTGGTTACTATCAAAAGG	CAGACCCATTTACTTGTGTTGGA
E2F1	CATCCCAGGAGGTCACTTCTG	GACAACAGCGGTTCTTGCTC
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAATATCC

1.2.5 Western Blot 测定蛋白表达

MCF-7 细胞用 DMEM 培养基培养至对数生长期后,按照每孔 2 × 10⁵ cells 加入到 6 孔板中置于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜,然后加入 20 μmol/L 的奥拉帕尼作用 96 h,设阴性对照孔。收集细胞提取蛋白后进行 SDS-PAGE 电泳,然后转印于 PVDF 膜,室温下封闭 2 h 后分别加入一抗 p21(1 : 1000)、γH2AX (1 : 1000)、IGFBP3 (1 : 1000)、

cyclin D1 (1 : 1000)、pRB (1 : 1000)、Ki67 (1 : 5000)和 GAPDH(1 : 1000)进行孵育过夜,然后用二抗(1 : 2000)孵育,用 ECL 显色液检测目的蛋白表达。

1.3 统计学分析

细胞增殖、迁移数据用 RTCA software pro 2.8.0 软件分析,SA-β-gal 阳性率用 Image J 2.14.0 软件分析,qPCR 数据由 QuantStudio Design & Analysis

software 1.5.1 分析, Western Blot 结果用 Image J 2.14.0 软件分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 奥拉帕尼对 MCF-7 细胞增殖的影响

RTCA 技术检测奥拉帕尼对 MCF-7 细胞增殖的实时动态影响如图 1 所示。奥拉帕尼在加入 E-Plate 检测板前,细胞增殖无明显变化;细胞增殖 18 h 后,给药组加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 的奥拉帕尼,对照组加入等体积的培养基后放入仪器中连续观察至 120 h。加入药物后开始一段时间药物对细胞的增殖无明显影响,加入药物 48 h 后,药物对细胞增殖的抑制作用逐渐增加,到实验结束时,与对照组相比,奥拉帕尼组细胞的增殖能力明显降低。

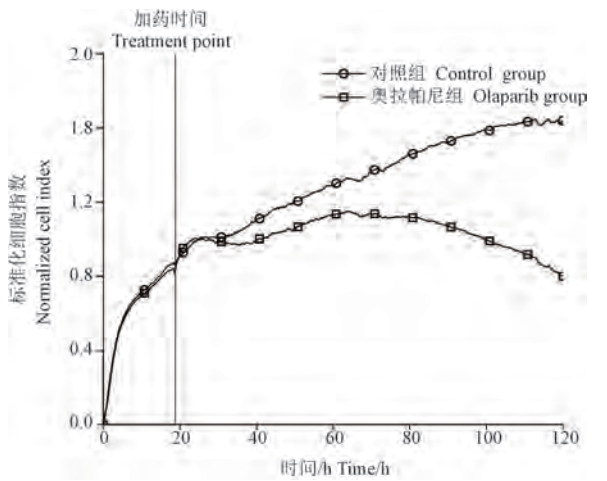


图 1 MCF-7 细胞在奥拉帕尼作用后不同时间的增殖曲线
Figure 1 Proliferation curve of MCF-7 cells at different time after olaparib treatment

2.2 奥拉帕尼对 MCF-7 细胞迁移的影响

利用 RTCA 技术研究了奥拉帕尼对 MCF-7 细胞迁移的实时动态影响,结果如图 2 所示。奥拉帕尼作用 MCF-7 细胞后,细胞迁移率低于对照组迁移率,在 15 h 之后迁移率明显降低,而对照组迁移率随着时间的延长逐渐增加。该结果表明,奥拉帕尼能够抑制 MCF-7 细胞的迁移,且随着时间的延长对细胞迁移的抑制作用逐渐增强。

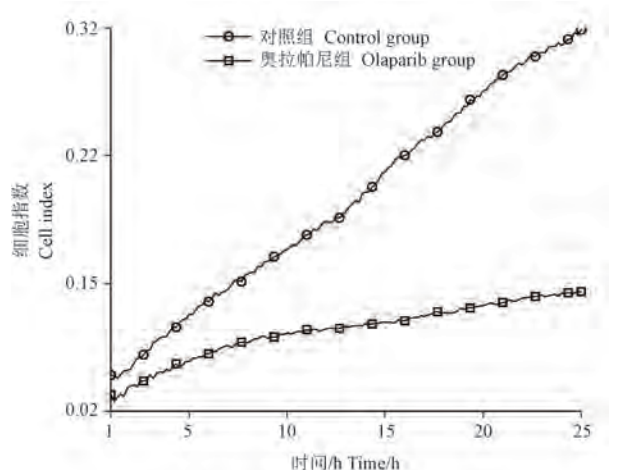
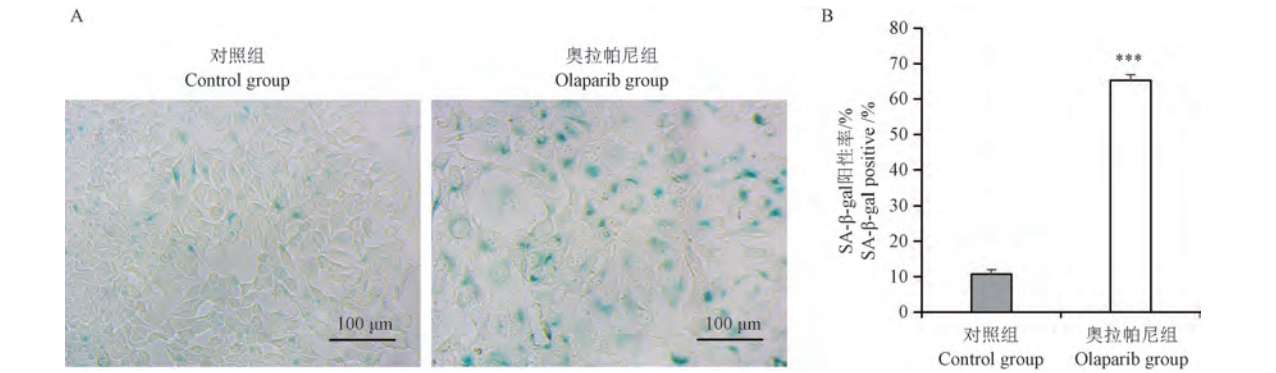


图 2 奥拉帕尼作用不同时间对 MCF-7 细胞迁移的影响
Figure 2 Effect of olaparib on the migration of MCF-7 cells at different time points

2.3 奥拉帕尼诱导 MCF-7 细胞衰老

SA- β -gal 染色结果显示,20 $\mu\text{mol/L}$ 奥拉帕尼作用 MCF-7 细胞 96 h 后,与阴性对照组相比,奥拉帕尼组细胞形态体积变大、细胞核增大且形状不规则,细胞数目低于对照组,见图 3A。对照组 SA- β -gal 染色阳性率为 10.7%,20 $\mu\text{mol/L}$ 奥拉帕尼处理



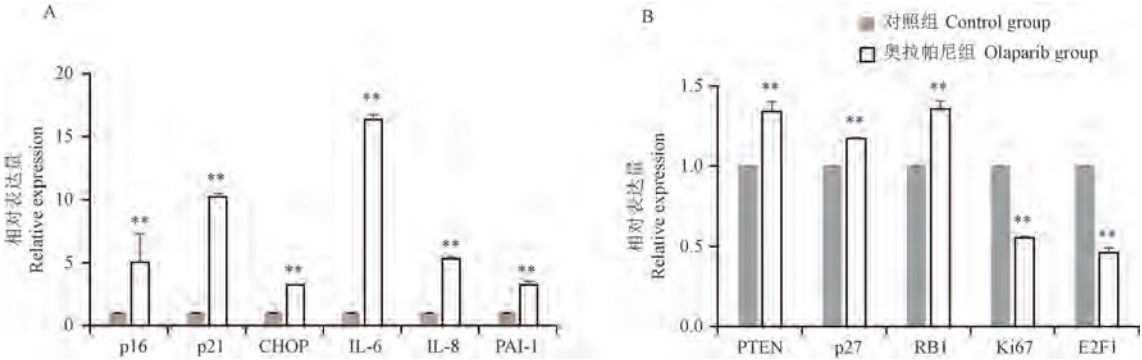
注: A: MCF-7 细胞 SA- β -gal 染色; B: SA- β -gal 阳性率分析; 与对照组相比, *** $P < 0.001$ 。
图 3 奥拉帕尼诱导 MCF-7 细胞衰老作用
Note. A. SA- β -gal staining on MCF-7 cells. B. Analysis of SA- β -gal positive rate. Compared with control group, *** $P < 0.001$.
Figure 3 Effect of Olaparib on the senescence of MCF-7 cells

组 SA-β-gal 染色阳性率为 65.3%,见图 3B。该结果说明 20 μmol/L 的奥拉帕尼作用 MCF-7 细胞 96 h 能够显著诱导 MCF-7 细胞衰老($P < 0.001$)。

2.4 奥拉帕尼对 MCF-7 细胞基因表达的影响

qPCR 检测结果如图 4 显示, p16、p21、p27、CHOP、IL-6、IL-8、PAI-1、PTEN 和 RB1 的基因表达水平明显上调,显著高于对照组相对应基因的表达

水平($P < 0.01$);Ki67 和 E2F1 基因表达水平明显下调,显著低于对照组相对应基因的表达水平($P < 0.01$)。该结果表明奥拉帕尼作用 MCF-7 细胞后促进了衰老相关基因 p16、p21、p27、CHOP、IL-6、IL-8、PAI-1、PTEN 和 RB1 的高表达,降低了细胞增殖活性指标核蛋白 Ki67 基因和细胞周期相关基因 E2F1 的表达,从而促进 MCF-7 细胞的衰老。



注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 4 qPCR 分析不同基因表达

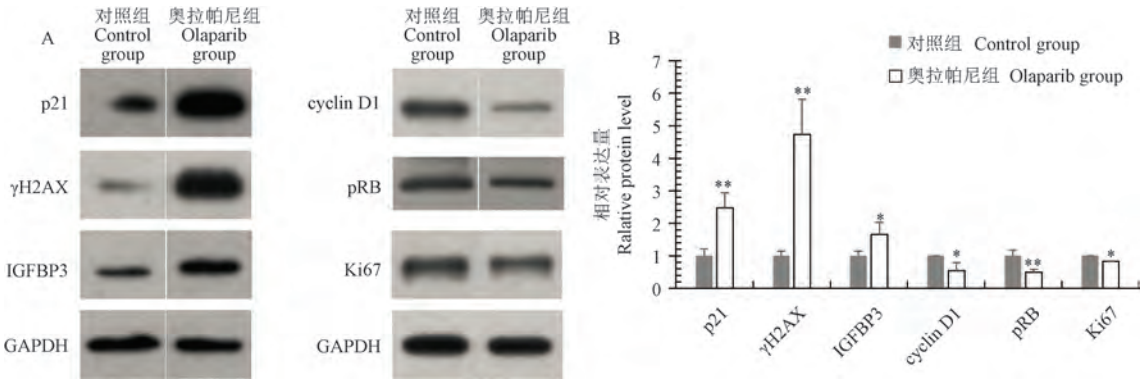
Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 4 qPCR analysis of different gene expression

2.5 奥拉帕尼对 MCF-7 细胞蛋白表达的影响

Western Blot 检测结果如图 5 所示,奥拉帕尼组的 p21、γH2AX 和 IGFBP3 蛋白表达明显升高,相对表达量显著高于对照组($P < 0.01$; $P < 0.01$; $P < 0.05$);cyclin D1、pRB 和 Ki67 蛋白表达明显降低,

相对表达量显著低于对照组($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.05$)。该结果表明奥拉帕尼作用 MCF-7 细胞后上调了 p21、γH2AX 和 IGFBP3 蛋白的表达,同时下调 cyclin D1、pRB 和 Ki67 蛋白的表达而促进 MCF-7 细胞的衰老,达到抑制 MCF-7 细胞生长的作用。



注:A:不同蛋白表达情况;B:蛋白相对表达量分析;与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 5 Western Blot 检测不同蛋白表达情况

Note. A. Expression of different proteins. B. Protein relative expression analysis. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Western Blot detection of different protein expression

3 讨论

PARP 抑制剂奥拉帕尼是首个利用合成致死理念设计获批并在临床上成功用于治疗乳腺癌、卵巢

癌的化合物^[7]。诱导肿瘤细胞衰老是抗肿瘤研究领域的热点之一,本文研究了奥拉帕尼诱导乳腺癌细胞衰老的作用及其可能的作用机制,为临床乳腺癌的治疗提供一种新策略,即通过诱导肿瘤细胞衰

老后再清除衰老肿瘤细胞进行乳腺癌的治疗。

本文利用 RTCA 技术研究了奥拉帕尼作用乳腺癌 MCF-7 细胞后对细胞增殖和迁移的实时动态情况,结果表明奥拉帕尼具有抑制 MCF-7 细胞增殖和迁移作用,并随时间的推移而逐渐增强。根据此结果,选取 96 h 作为测定奥拉帕尼诱导 MCF-7 细胞衰老作用的最佳时间。

细胞衰老具有代谢紊乱、大分子损伤、细胞周期停滞和衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)等主要特征^[8]。SA- β -gal 是目前应用最为广泛的细胞衰老标志物之一。SA- β -gal 主要贮存于细胞溶酶体,正常细胞内 pH = 4 时具有最大活性,而在衰老细胞中, pH = 6 时活性最强,且在细胞中大量积累,溶酶体膨胀,故常常将细胞 SA- β -gal 染色阳性作为细胞衰老阳性标志^[9]。本文 SA- β -gal 染色结果表明奥拉帕尼处理细胞 96 h 后能够显著诱导乳腺癌 MCF-7 细胞衰老。

奥拉帕尼能够抑制肿瘤细胞内的 PARP,使与 PARP 相关的 DNA 修复途径无法发挥修复作用,最终导致肿瘤细胞因难以修复自身受损的 DNA 而死亡。细胞 DNA 双链断裂后,组蛋白 H2AX 的第 139 位丝氨酸会发生磷酸化修饰形成 γ H2AX,是 DNA 双链断裂损伤的标志物^[10],先前研究显示奥拉帕尼作用后乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 γ H2AX 的表达量显著升高^[11]。CHOP 介导内质网应激和氧化应激^[12],衰老细胞中 CHOP 的表达水平显著升高^[13]。本文研究中,奥拉帕尼作用乳腺癌 MCF-7 细胞后 γ H2AX 蛋白表达水平显著增加,CHOP 基因表达水平显著上调,提示奥拉帕尼促进了 DNA 的双链断裂,通过 CHOP 介导的内质网应激和氧化应激途径诱导 MCF-7 细胞的衰老。

在细胞周期进程中,细胞周期蛋白(cyclins)家族各成员分别激活对应的细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)家族成员,进而使 RB 蛋白磷酸化为 pRB 而解除其对转录因子 E2Fs 的抑制,使 E2Fs 发挥作用而维持细胞周期的进程^[14]。p16 和 p21 是细胞周期的负调节因子,分别通过不同的调控路径调节细胞周期进程,具体表现为对 CDKs 不同成员的抑制,其中 p16 抑制 CDK4/6, p21 和 p27 则抑制 CDK2,进而抑制下游通路而抑制细胞周期^[15-16],PTEN 对细胞周期的抑制作用与 p27 密切相关。本文研究结果表明,奥拉帕尼处理后乳腺癌 MCF-7 细胞中 p16、p21、p27、RB1

和 PTEN 基因表达显著上调, E2F1 和 Ki67 基因表达显著下调; p21 蛋白表达显著升高, cyclin D1、pRB 和 Ki67 蛋白表达显著降低,提示奥拉帕尼可通过阻滞细胞周期进程诱导 MCF-7 细胞衰老。

SASP 包含生长因子、基质金属蛋白酶、炎症细胞因子和趋化因子等,在衰老细胞中表达升高, IGFBP3、PAI-1、IL-6 和 IL-8 等是 SASP 的典型成分^[8],本文研究结果表明奥拉帕尼诱导的衰老细胞中 PAI-1、IL-6 和 IL-8 基因表达水平显著上调, IGFBP3 蛋白表达水平显著升高。

本文研究结果表明,奥拉帕尼具有诱导乳腺癌 MCF-7 细胞衰老作用,同时阐明了一部分相关的作用机制,为 PARP 抑制剂通过诱导乳腺癌细胞衰老作用治疗乳腺癌的研究提供了新的思路。

参 考 文 献(References)

- [1] ROBSON M, IM S A, SENKUS E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation [J]. N Engl J Med, 2017, 377(6): 523-533.
- [2] TUTT A N J, GARBER J E, KAUFMAN B, et al. Adjuvant olaparib for patients with BRCA1- or BRCA2-mutated breast cancer [J]. N Engl J Med, 2021, 384(25): 2394-2405.
- [3] HOPKINS T A, SHI Y, RODRIGUEZ L E, et al. Mechanistic dissection of PARP1 trapping and the impact on *in vivo* tolerability and efficacy of PARP inhibitors [J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(11): 1465-1477.
- [4] ARUN B, AKAR U, GUTIERREZ-BARRERA A M, et al. The PARP inhibitor AZD2281 (Olaparib) induces autophagy/mitophagy in BRCA1 and BRCA2 mutant breast cancer cells [J]. Int J Oncol, 2015, 47(1): 262-268.
- [5] HONG T, LEI G, CHEN X, et al. PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer [J]. Redox Biol, 2021, 42: 101928.
- [6] ELZI D J, LAI Y, SONG M, et al. Plasminogen activator inhibitor 1-insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(30): 12052-12057.
- [7] MAIORANO B A, MAIORANO M F P, MAIELLO E. Olaparib and advanced ovarian cancer: Summary of the past and looking into the future [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1162665.
- [8] GORGOULIS V, ADAMS P D, ALIMONTI A, et al. Cellular senescence: defining a path forward [J]. Cell, 2019, 179(4): 813-827.
- [9] VALIEVA Y, IVANOVA E, FAYZULLIN A, et al. Senescence-associated β -galactosidase detection in pathology [J]. Diagnostics, 2022, 12(10): 2309.
- [10] KINNER A, WU W, STAUDT C, et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the

context of chromatin [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(17): 5678–5694.

[11]

CHUANG H C, KAPURIYA N, KULP S K, et al. Differential anti-proliferative activities of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in triple-negative breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 134(2): 649–659.

[12]

MARCINIAK S J, YUN C Y, OYADOMARI S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum [J]. Genes Dev, 2004, 18(24): 3066–3077.

[13]

IKEYAMA S, WANG X T, LI J, et al. Expression of the pro-apoptotic gene gadd153/chop is elevated in liver with aging and sensitizes cells to oxidant injury [J]. J Biol Chem, 2003, 278(19): 16726–16731.

[14]

KUMARI R, JAT P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 645593.

[15]

ZHAO R, CHOI B Y, LEE M H, et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16^{INK4a}) in cancer [J]. EBioMedicine, 2016, 8: 30–39.

[16]

ENGELAND K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(5): 946–960.

[收稿日期] 2023-10-19

《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。



张永龙,马唯刚,钱星羽,等. 脾虚证实验动物模型构建及评价方法的研究述评[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 385-396.

ZHANG Y L, MA W G, QIAN X Y, et al. Construction of experimental animal models and evaluation of spleen deficiency syndrome: a review [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 385-396.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.013

脾虚证实验动物模型构建及评价方法的研究述评

张永龙¹,马唯刚¹,钱星羽¹,赵素红¹,李姗姗¹,郭永明^{1,2},徐枝芳^{1,2},
潘兴芳^{1,2},邱继文^{1,3},郭义^{1,4},李忠正^{1,2*}

(1. 天津中医药大学实验针灸学研究中心,天津 301617;2. 天津中医药大学针灸推拿学院,天津 301617;
3. 天津中医药大学医学技术学院,天津 301617;4. 天津中医药大学,天津 301617)

【摘要】 中医症候实验动物模型的构建在中医药作用机理研究方面起到重要支撑作用,近年来脾虚证动物模型的构建和评价文献报道越来越多,但是构建方法标准不一,评价指标客观化不足,本文将从动物选取、模型建立、宏观表征、行为学实验、脾虚的客观指标等方面总结脾虚动物模型的构建和评价方法,以期脾虚证实验动物模型的构建提供理论指导,为脾虚动物模型平台的选取提供文献参考。

【关键词】 脾虚证;动物模型;评价方法;综述

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2024)03-0385-12

Construction of experimental animal models and evaluation of spleen deficiency syndrome: a review

ZHANG Yonglong¹, MA Weigang¹, QIAN Xingyu¹, ZHAO Suhong¹, LI Shanshan¹, GUO Yongming^{1,2},
XU Zhifang^{1,2}, PAN Xingfang^{1,2}, QIU Jiwen^{1,3}, GUO Yi^{1,4}, LI Zhongzheng^{1,2*}

(1. Experimental Acupuncture Research Center, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. School of Acupuncture and Tuina, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. School of Medical Technology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)
Corresponding author: LI Zhongzheng. E-mail: lizhzh2008@163.com

【Abstract】 The construction of experimental animal models plays an important supporting role in research into the mechanisms of action of Chinese medicines. There have been increasing reports of the construction and evaluation of animal models of spleen deficiency; however, the construction method have involved different standards and there has been insufficient objectification of the evaluation indexes. In this review, we summarize the construction and evaluation method of animal models of spleen deficiency from the aspects of animal selection, model establishment, macroscopic characterization, behavioral experiments, and objective indexes of spleen deficiency, with a view to providing theoretical guidance for the construction of experimental animal models of spleen deficiency and references for the selection of animal model platforms for spleen deficiency.

【Keywords】 spleen deficiency; animal models; evaluation methods; review

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

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(82174524)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China General Program (82174524).

【作者简介】张永龙,男,在读硕士研究生,研究方向:针灸推拿的作用机理研究。Email:1477037138@qq.com

【通信作者】李忠正,男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:针灸推拿的作用机理研究。Email:lizhzh2008@163.com

脾虚证是中医临床上常见的一类证候,包括脾气虚、脾阳虚等分型。脾虚一般表现为食欲不振、胃脘痛、胀气、神疲乏力、少气懒言、便溏等,也可出现机体物质代谢异常^[1-2]。现代生活水平的提升、生活节奏的加快以及精神压力增大等原因,使得脾虚证患者增加。目前临床上很多疾病存在脾虚证型,如功能性消化不良^[3]、溃疡性结肠炎^[4]、肠易激综合征^[5]、心脑血管疾病^[6]等。动物模型研究作为现代化实验手段广泛应用于中医药的研究,是分析中医基础理论和中医药疗效的重要方法。自从 20 世纪 70 年代末北京师范大学生物系消化生理科研组建立脾虚模型以来^[7],脾虚动物模型为中医基础实验提供了重要的平台支持。通过对中国知网、万方、维普三大中文数据库近年来的相关文献进行阅读,发现脾虚动物模型的实验研究工作取得了较丰富的经验,但缺乏系统的梳理和客观的评价,本文通过对脾虚动物实验的造模方法和评价标准进行分析,为客观评价脾虚证动物模型提供理论指导。

1 模型动物的选取

选择合适的实验动物是成功建立模型的基础,动物的种类、年龄、性别、性情特点等都需要考虑,本文对脾虚动物模型建立以来所选取的动物种类及造模方法进行汇总,并选取具有代表性的模型进

行总结(见表 1),共有 9 种动物用于建立脾虚模型:大鼠、小鼠、豚鼠、家兔、比格犬、巴马小型猪、恒河猴、驴、斑马鱼。

实验动物的选择是医学研究中首先要考虑的问题。因为实验动物选择的恰当与否关系到课题质量的高低、经费开支的多少、研究途径正确与否以及实验方法的简单与繁琐等问题,甚至会影响到课题的成败及研究结果的准确性。因此动物的选取应结合实验的经济性、可复制性及可操作性来综合考虑。

2 脾虚动物模型的建立

2.1 单因素模型

2.1.1 中药模型

《证治汇补·心痛选方》中:“服寒药过多,致脾胃虚弱,胃脘作痛。”因此多用番泻叶、大黄、小(大)承气汤等苦寒破气中药的水煎剂或浸泡剂来造成动物的脾虚模型。李婷婷等^[17]通过给小鼠灌胃大黄水煎液 0.02 mL/g,灌胃 7 d,以制备脾虚小鼠模型;肖怡等^[18]配置低、中、高 3 个浓度的大黄颗粒水溶液,每日给大鼠灌胃,连续 7 d,建立脾虚泄泻模型;刘岩等^[19]根据大黄苦寒泻下的特性,每日灌胃给予 2 g/mL 大黄水煎液,给药容积为 10 mL/kg,每天 2 次,连续灌胃给药 14 d,建立脾虚大鼠模型;

表 1 常用脾虚证模型实验动物种类

Table 1 Commonly used experimental animal species for the spleen deficiency syndrome model

作者 Author	年份 Year	动物 Animals	造模方法 Modelling methods
严智强等 ^[8] YAN Z Q, et al ^[8]	1982	家兔 Rabbit	大黄泻下;饥饿法 Rhubarb diarrhea; starvation method
刘学松等 ^[9] LIU X S, et al ^[9]	1989	大鼠 Rat	利血平 Reserpine
王淑兰等 ^[10] WANG S L, et al ^[10]	1990	驴 Donkey	小承气汤 Xiao Chengqi Tang
王玉良等 ^[11] WANG Y L, et al ^[11]	1995	豚鼠 Guinea pig	番泻叶 Folium sennae
曲长江等 ^[12] QU C J, et al ^[12]	2001	小鼠 Mice	大黄泻下;劳倦过度;复合因素 Rhubarb diarrhea; overwork; compound factors
王士维 ^[13] WANG S W ^[13]	2013	恒河猴 Rhesus monkey	大黄泻下 Rhubarb diarrhea
王佳等 ^[14] WANG J, et al ^[14]	2019	巴马小型猪 Bama minipig	饮食不节加劳倦过度 Poor diet combined with overwork
冯士彬等 ^[15] FENG S B, et al ^[15]	2019	比格犬 Beagle canine	番泻叶 Folium sennae
吴家虞等 ^[16] WU J Y, et al ^[16]	2023	斑马鱼 Zebrafish	番泻叶 Folium sennae

肖春萍等^[20]每天 8:00、16:00 给大鼠灌胃 2 次,共造模 10 d。番泻叶同样具有苦寒泻下的作用,周轲等^[21]分别在 12:00 和 24:00 各灌胃 1 次番泻叶浸液(0.2 g/mL),按体重以 10 μ L/g 计算用量,造模成功后,仍按上法持续灌胃番泻叶浸液至第 18 天;曹琰等^[22]用番泻叶灌胃的方法制备脾虚模型来研究苍术特色炮制品对脾虚证大鼠的药效;曹护群等^[23]、冯士彬等^[15]每天早、晚 2 次给实验犬灌服番泻叶药液,连续 7 d,实验犬表现出大便溏泄、食少纳呆、消瘦、体重减轻、神态萎靡和毛色无光泽等症状,可判定实验犬中医脾虚模型复制成功;YI 等^[24]用番泻叶提取物灌胃大鼠,剂量 10 g/kg,连续 10 d,使大鼠出现脾虚症状。阚甸嘉等^[25]根据耗气破气理论,将大黄、枳实、厚朴,按比例用冷水浸泡再煮沸冷却后给 Wistar 大鼠灌胃,用来建立脾气虚动物模型;陈小野等^[26-27]则在耗气破气基础上创造性的提出加入广豆根、旋覆花、槟榔等来更好建立模型。《明医杂著》中“近世论治脾胃者……所用之药又皆辛温燥热,助火消阴之剂,遂致胃火益旺,脾阴愈伤”,多用温热燥湿类药物会损伤脾阴。赵思达^[28]则利用伤阴药物附子、肉桂、吴茱萸这三味大辛大热之品,来造成大鼠脾阴虚,并通过理脾阴正方反证说明脾阴虚动物模型的可靠性。

2.1.2 西药模型

利用西药构建脾虚模型,常用药物有利血平、硝酸钴、环磷酰胺等,以利血平最为常用。刘学松等^[9]发现应用适量利血平可造成兔和大鼠脾虚,出现中医脾虚证的各种主要症候。徐诗画等^[29]以利血平(0.1 mg/kg)皮下注射的方法造成小鼠脾虚;王颖芳^[30]、赵竞业等^[31]、刘佳等^[32]也使用利血平模型来制备脾虚动物模型。王小荣^[33]在研究中一次性给大鼠肌肉注射 1%硝酸钴盐液 5 mL/kg,大鼠 2 d 后出现眯眼、蜷卧、少动、喜扎堆、食量减少、被毛蓬松失去光泽等症状,3 d 后部分大鼠出现便稀、肛周粪污等脾虚症状。张晓杰^[34]利用利血平和硝酸钴两种药物分别建立脾虚大鼠模型并互相对比,认为内源性乙酰胆碱的变化可能是中医脾虚的本质。赵金鑫等^[35]采用硝酸钴注射来建立脾虚模型。费文婷等^[36]用腹腔注射环磷酰胺的方法来建立免疫抑制-脾虚模型。

2.1.3 劳倦内伤法

《景岳全书·杂证谟》中:“脾胃之伤于外者,唯劳倦最能伤脾……。”故劳倦过度也能致脾虚形成。

目前劳倦法多采用力竭游泳或者负重游泳的方式。曲长江等^[12]通过单因素(劳倦法/大黄泻下)造模对比发现,两者都可造成脾虚;胡琳琳等^[37]则在力竭游泳的基础上剥夺实验动物 1/3 的睡眠时间,以制备脾虚证动物模型。

2.1.4 饮食偏酸法

《素问·生气通天论》中:“味过于酸,肝气以津,脾气乃绝……。”所以饮食偏酸会导致脾气虚弱。据此,彭成等^[38]用食用醋(pH = 3)1 mL/100 g,灌胃来诱发大鼠产生脾气虚症状;邬燕文^[39]通过每日 1 次,每次 10 mL/kg,连续 10 d,食醋灌胃方法制备大鼠醋酸脾虚模型。

2.1.5 饥饱失常法

《景岳全书》中:“凡失饥伤饱,损及脾胃,多令人胸膈痞闷,不能消化,饮食少思,日中无味,或噎气吞酸,神体困倦,此皆脾气受伤,中虚而然”。《素问·痹论》中:“饮食自倍,肠胃乃伤”。根据祖国医学传统理论可知过饥过饱都会损伤脾的功能造成脾虚。王小荣^[33]在研究过程中运用饥饱失常法,隔日喂食,单数日给食,给食日不限量,双数日禁食,禁食日给水不给食,6 d 后大部分大鼠出现眯眼、蜷卧、少动、喜扎堆、被毛蓬松无光泽,8 d 后出现肛周粪污、便稀,符合脾虚的症状。严智强等^[8]的实验通过对比发现,服生大黄组和饥饿组家兔形成脾虚证的时间较长;李发荣等^[40]对小鼠模型组每日给予半量饲料,正常饮水,共 7 d,以造成脾虚模型。

2.2 双因素模型

基于疾病的复杂性,临床中脾虚证往往以兼证形式出现,比如肝郁脾虚证、脾虚湿盛证等,有研究人员认为双因素模型能够更好的实现病证结合,使得模型更加稳定。

2.2.1 苦寒类中药加慢性束缚法

刘娅薇等^[41]用番泻叶-束缚夹尾法建立小鼠肝郁脾虚模型;郭军雄等^[42-44]同样采用慢性束缚应激加番泻叶水煎剂灌服二因素法复制“肝郁脾虚证”大鼠模型;潘晓鸥等^[45]用宽胶带束缚小鼠两前肢,每天 1 h,持续 2 周,从第 2 周开始灌胃给予小鼠番泻叶药液(6.5 g/kg),持续 1 周,每天 1 次,观察饮食、粪便及精神状态,观察到小鼠出现饮食减少、精神萎靡、消瘦、毛发蓬乱、粪便稀薄如水样等症状,表明肝郁脾虚模型造模成功。

2.2.2 苦寒类中药加劳倦刺激法

ZHENG 等^[46]每日用大黄水煎液来灌服大鼠,

10 g/kg, 并且每 3 d 对大鼠进行 1 次 10 min 的负重游泳来建立脾虚模型; 张毅靖等^[47]采取冰番泻叶加力竭游泳的方式来复制脾虚模型, 具体为除对照组外其他各组大鼠每日 9:00 给予冰番泻叶水煎液灌胃 1 次 (10 mL/kg); 除正常对照组外各组大鼠在 19:00 置于水桶中游泳, 每日游泳 1 次至力竭, 力竭后停止, 力竭标志为大鼠不再挣扎游动, 鼻尖沉入水中 5 s, 无法浮出水面, 造模持续 14 d。

2.2.3 苦寒破气药加饥饱失常法

谢慧臣等^[48]取厚朴、枳实、大黄共 5 kg, 比例为 5:3:4, 加入 10 倍水, 煮取浓缩至 6 g/mL, 每日以生药 10 g/kg 灌服苦寒破气方 1 次, 隔日喂饲 1 次, 且喂饲量为常规量的一半, 自由饮水, 共计 21 d, 建立大鼠脾气虚模型; 曾益宏^[49]对模型组大鼠灌饲小承气汤煎剂, 20 mL/kg, 隔日半量进食自由饮水, 造模 15 d 结束; 黄文婷等^[50]使用饥饱失常法并灌饲小承气汤, 隔日灌胃 1 次, 每次喂饲常规量饲料的半量, 自由饮水, 造模同时记录家兔体重、进食量的变化, 观察临床表现及大便的异常, 连续 18 d, 造脾虚家兔模型。

2.2.4 饮食失节法加劳倦法

朱昊如^[51]则利用饮食失节加劳倦法, 每天上午让大鼠在温水中进行 10 min 游泳, 并采取隔天饲喂的方式, 持续 4 周建立脾虚模型; 李茹超等^[52]采用“饮食不节 + 游泳疲劳”法复制气虚大鼠模型, 具体为隔日禁食、隔日少量给食及每日在鼠尾缠绕体重 7% 的铁丝负重游泳, 游至口鼻没入水中 3 ~ 4 s 捞出记为游泳总时长, 连续 4 周; 王红伟等^[53]也采取相同的方法至第 8 周复制出脾虚大鼠模型; 雷萍等^[54]对饮食失节加劳倦过度的方法进行了改进, (1) 饮食失节: 单日喂饲小鼠甘蓝, 自由饮水, 双日灌胃猪油 (0.2 mL/10 g), 自由进食、饮水。(2) 劳倦过度: 在上述处理单日, 将小鼠放入 27 °C 水池中, 游泳至力竭, 连续 14 d。

2.2.5 冰水灌胃加饮食不节

罗佳等^[55]根据张徐雯等^[56]研究的方法建立脾虚食积模型, 第 1 天小鼠自由进食, 每 4 h 以 10 mL/kg 灌胃 4 °C 冰水 1 次; 第 2 天小鼠禁食不禁水, 每 4 h 以 10 mL/kg 灌胃 4 °C 冰水 1 次; 第 3 天小鼠以 4 °C 冰氢氧化钠 (浓度 0.3 mol/L) 灌胃, 每只 0.1 mL 进行模型复制, 造模后小鼠出现精神萎靡、体型消瘦、毛色无光泽、蜷缩聚堆、大便溏软等脾虚症状。

2.2.6 寒热刺激加劳倦法

冯珂等^[57]对“脾主为卫”进行了阐释, 即脾胃的运化功能正常, 则正气充盈, 可抵御外邪入侵。李青敏等^[58]运用疲劳寒热刺激法进行造模, 大鼠游泳 30 min 后, 将水擦干放入 50 °C 的恒温箱中 15 min, 最后放入 -20 °C 的冰柜里 25 min, 每日 1 次, 连续 7 d。大鼠出现蜷缩、扎堆、背毛凌乱、无光泽、汗出明显、咳嗽、反应迟钝、懒动等脾虚症状。

2.3 多因素模型

多因素模型是将 3 种及以上的方法相互配合来制备脾虚模型, 相比于单因素和双因素模型可能更符合脾虚证的多病因性和久病至虚的特点, 趋向于多因素造模和长时间造模。琚婉君等^[59]根据文献经验采用灌服大黄法、游泳力竭法和饥饿法复合因素复制脾虚胃肠动力障碍大鼠模型; 巩子汉等^[60]用综合因素法 (苦寒泻下、饮食失节、劳倦过度法) 制成脾气虚证模型。董佳梓等^[61]以苦寒破气法 (小承气汤)、游泳力竭法及饥饱失常法三因素复合法复制脾虚证模型; 姜宇珺等^[62]采取饮食失节、番泻叶灌胃、力竭游泳, 并辅以湿冷垫料造成的脾虚湿困模型; 化敏等^[63]使用饮食不节、过度劳倦 (每天游泳至力竭) 及灌胃大黄的方式来制备脾虚模型; 詹菊等^[64]根据文献研究采用大黄苦寒泻下、饮食失节、劳倦过度联合法制备小鼠脾虚动物模型; 闫志强等^[65]采用分阶段造模的方式来复制脾虚模型: 第 1 阶段, 采用饮食失节法, 饱食 1 d, 再禁食 2 d, 不禁水, 持续 6 d, 复制脾气虚证模型; 第 2 阶段, 第 7 天自由采食, 利用苦寒泻下法, 即按照 100 g 体重 1.0 mL 的剂量灌服番泻叶提取液, 每天 1 次, 连续 14 d 复制脾阳虚证模型。

3 建模成功评价方法

3.1 证候积分及主观评价法

证候量化积分评价就是在模型建立过程中对各个症状不同阶段的表现进行赋分评价, 一定程度上增强了脾虚模型量化的客观性和合理性, 对脾虚模型的评价有了一个标准。由于实验动物的差异性以及脾虚症状的统一性, 研究人员根据动物造模后的表现制定了相关的模型评分标准, 见表 2。

可以看出, 虽然评分标准不统一, 且各有侧重点, 但脾虚动物临床表现相对一致, 如食少、体重下降、倦怠懒动、扎堆、毛发不泽甚至枯槁、大便异常等宏观表征, 为制定对应的评分标准提供依据, 同

表 2 常用脾虚证模型评分方法

Table 2 Commonly used spleen deficiency syndrome model scoring methods

作者 Author	年份 Year	动物 Animal	评分标准及分值 Scoring criteria and marks
凌嘉阳等 ^[66] LING J Y, et al ^[66]	2024	大鼠 Rat	0 分:体毛柔顺光滑有光泽;游泳耐力活动敏捷;粪便呈坚硬椭圆形;体重缓慢增加;肛温正常。1 分:体毛蓬松晦暗轻度发黄;游泳耐力下降;粪便呈柔软椭圆形;体重平均下降 0 ~ 10 g;肛温平均下降 0 ~ 2 ℃。2 分:体毛暗淡发黄无光泽;游泳耐力明显下降;粪便呈溏稀状态;体重平均下降 10 ~ 20 g;肛温平均下降 2 ~ 5 ℃。 0 points: Body hair soft, smooth and shiny; swimming endurance activity agile; feces in hard oval shape; body weight slowly increasing; anal temperature normal. 1 points: Body hair was fluffy and dull and mildly yellowed; swimming endurance decreased; feces were soft and oval; body weight decreased by an average of 0 ~ 10 g; anal temperature decreased by an average of 0 ~ 2 ℃. 2 points: Body hair was dull and yellow without luster; swimming endurance decreased significantly; feces were loose; body weight decreased by 10 ~ 20 g on average; anal temperature decreased by 2 ~ 5 ℃ on average.
谢慧臣等 ^[48] XIE H C, et al ^[48]	2023	大鼠 Rat	1 分:蜷缩少动扎堆;弓背眯眼嗜睡萎靡不振、毛发枯涩;饮食饮水减少;肛温下降。2 分:体重增长偏慢或下降,同比消瘦;肛门欠清洁,便溏、稀溏;游泳耐力下降。 1 points: Curling up and moving less in piles; arching back and squinting lethargy and shriveling of hair; eating and drinking less; decrease in anal temperature. 2 points: Slow or declining body weight gain, year-over-year dissipation of soul; lack of anal cleansing, loose, loose stools; decreased swimming endurance.
刘明江等 ^[67] LIU M J, et al ^[67]	2022	小鼠 Mice	主证:精神沉郁、倦怠懒动。次证:食少纳呆、畏寒扎堆、腹胀、便溏、体瘦毛焦或体毛脱落。具备主症 1 项及次症 2 项以上者,造模成功。 Primary symptoms: depressed spirit, tiredness and laziness. Secondary symptoms: poor appetite and dullness, fear of cold, abdominal distension, loose stools, thin body with scorched hair or loss of body hair. If one of the primary symptoms and two or more of the secondary symptoms are present, the modeling is successful.
冯士彬等 ^[15] FENG S B, et al ^[15]	2019	比格犬 Beagle canine	精神萎靡、乏力倦怠、闭目、喜扎堆、纳呆、腹泻甚或水样粪便、毛发疏松少泽、体重下降。 Depressed, tired and lethargic, eyes closed, like to pile up, dull, diarrhoea or even watery faeces, loose hair and less luster, weight loss.
王士维 ^[13] WANG S W ^[13]	2013	恒河猴 Rhesus monkey	0 分:无。2 分:轻度改变;摄食情况(食量、食欲、进食速度);排便情况(大便性状、腹泻面积、腹泻次数);精神活动情况(活动度、刺激反应、精神状况);外观毛发。4 分:中度改变;同上。6 分:重度改变;同上。其他临床症状:按病情从无到重分别赋分 0、9、18、27 分。 0 points: None. 2 points: Mild alterations; ingestion (amount of food, appetite, rate of eating); defecation (stool consistency, area of diarrhea, frequency of diarrhea); mental activity (activity level, stimulus response, mental condition); appearance of hair. 4 points: moderate alterations; same as above. 6 points: Severe alteration; same as above. Other clinical symptoms; 0, 9, 18 and 27 points were assigned according to the condition from none to severe, respectively.
钟意文等 ^[68] ZHONG Y W, et al ^[68]	2023	大鼠 Rat	主症:腹泻便溏,饮食减少。次症:肢体倦怠,拉尾抵抗活动降低;消瘦,体重减轻;毛色枯槁。符合主症 2 项、次症 2 项,可诊断为脾虚湿困证。 Primary symptoms: loose diarrhea; reduced diet. Secondary symptoms: body fatigue, pulling the tail to reduce resistance activity; emaciation, reduced body weight; withered fur. If two of the main symptoms and two of the secondary symptoms are met, it can be diagnosed as spleen deficiency and dampness disease.

时方便观察和记录动物的一般状态,如精神状态、活动状态、被毛外观、食欲、粪便情况等就可以对模型做出理性评价,评分升高代表造模成功。

3.2 理化指标及客观评价法

3.2.1 D-木糖测定

木糖测定是对口服一定量的 D-木糖后测定血液及尿液中 D-木糖的浓度,用以评价小肠的吸收能力。中医认为脾主运化,即运化水湿和水谷精微,现代医学认为水谷精微代表的就是小肠的消化吸收能力。同时,脾虚会导致消化吸收功能减弱。血

清和尿液中 D-木糖含量与小肠的吸收功能有关,所以为脾虚诊断的客观指标^[18,69-70]。因此通过对灌服 D-木糖后的动物血清 D-木糖^[18,21,48]和尿液 D-木糖^[48,69,71-72]含量进行测定,从而推断小肠的吸收功能是否正常。一般情况下脾虚程度越严重,D-木糖吸收率越低。

3.2.2 唾液淀粉酶活性

脾开窍于口,在液为唾。唾液淀粉酶(salivary alpha-amylase,sAA)是唾液中最丰富的蛋白,张善^[73]基于“脾主涎”理论发现脾气虚证患者的 sAA

活性比值显著低于健康人,并研究发现 sAA 活性比值可以较客观地展示脾气虚证的部分特征,研究人员历经数十年的研究证明该指标的可靠性^[74-77],其成果有目共睹,目前已经成为较为公认的脾虚指标之一^[70,78]。

3.2.3 炎症因子测定

脾虚病证的发生发展与炎症因子关系密切,其中 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- α 、IFN 等促进炎症反应,为促炎细胞因子,而 IL-4、IL-6、IL-11、IL-13、TGF- β 等为抗炎细胞因子^[79]。研究发现与对照组相比,脾虚模型组动物血清中促炎因子 IL-2、IL-6、IL-12、IL-17、INF- γ 等升高, TNF- α 下降;抗炎因子 IL-10、TGF- β 等下降^[17-18,21,67]。

3.3 结肠组织病变

脾虚会导致腹泻引起结肠发生微观变化,因此通过苏木精-伊红(HE)染色法观察结肠组织病理学变化也是评价脾虚模型是否成功建立的另一重要方法。镜下显示脾虚模型动物结肠黏膜层有炎性细胞浸润,黏膜水肿、充血明显,粘膜层不规则,杯状细胞增多等现象^[17,44,67]。

3.4 脏器指数测定

“四季脾旺不受邪”,相反脾虚会导致机体感染邪气使免疫功能降低^[80]。脾和胸腺是两个重要的免疫器官,其脏器指数可在一定程度上反映机体免疫功能的强弱。按以下公式计算胸腺指数和脾指数,进而推测脾虚模型是否成功。胸腺指数(mg/g) = 胸腺质量(mg)/体重(g),脾指数(mg/g) = 脾质量(mg)/体重(g)。脾虚动物胸腺及脾指数会呈现显著下降^[17,21,67,81]。

3.5 以方测证

“以方测证”属于逆向评测方法,选用治疗脾虚的方药来对模型进行验证,若脾虚症状缓解或者治愈则证明所建立的模型为脾虚模型^[82]。脾虚证的经典方剂有四君子汤、补中益气汤、参苓白术散等。刘俊兰^[83]用饮食失节与劳倦过度的复合因素建立脾气虚证大鼠模型,并利用补中益气汤加减方来反证模型复制成功;王明珠等^[84]用参苓白术散来验证脾虚证关节炎小鼠模型,结果缓解了脾虚证小鼠关节炎症状,说明了脾虚证模型的复制成功;姜楠等^[85]用以方测证的方法使用六君子汤等经典方药来检测糖代谢异常模型中是否出现了脾虚等证型。

4 讨论

通过上述内容不难看出,自从 20 世纪 70 年代

末北京师范大学生物系消化生理科研组建立脾虚模型以来^[7],脾虚模型的塑造已经建立了多种动物模型,造模方法越来越多样化、多元化,由最初的大黄泻下法发展到现在十几种造模方法,并越来越趋向于模拟证病结合的多因素诱导,模型的评价也由最初的症状评价发展到现在的症状评分表与多种生理生化实验室指标结合,逐渐趋于客观准确,观测手段日益丰富。

脾虚的动物模型研究已积累了一定的经验,可以为后续的研究提供一定的参考和借鉴,但也存在局限性:就动物选择而言,中医讲究“四诊合参”来进行疾病的诊断,由于动物模型自身的局限性满足“四诊”的要求比较困难,比如获取动物的舌脉信息并与脾虚症状相对应;猪、犬、驴、兔等动物体型较大操作有难度且实验周期长、成本较高。因此,考虑到模型的经济性、可操作性以及实验周期的长短,建议应选取更容易观测体征表象、体型小、成模率和存活率更高的大小鼠来进行。在造模方法选择方面,经历了从单因素造模到双因素造模和多因素造模的发展变化,但各有优缺点:单因素造模如苦寒泻下、饮食不节、劳倦过度法等虽然相对具有针对性,但是症状不典型、模型维持时间短,具有一定局限性;多因素造模症状比较典型、模型维持时间较长,更符合临床,但多因素也造成模型的针对性差,不可控因素增多,进而影响研究目的。另外,不同的证型有相同的造模方式,比如脾阳虚与脾气虚都有相同的造模方法^[86-87],如何明确最后复制的模型是气虚型还是阳虚型,因此相同方法所形成的模型具有不确定性;利血平模型所造成的也不是纯粹的脾虚模型,利血平可导致阴虚证、肝郁脾虚证、偏头痛、阳虚证抑郁症等^[31,88-90],因此单一西药所形成的模型不具有证型的单一性。结合本团队前期的实验和临床经验,建议使用多因素模型来造成脾虚症状,这样形成的模型更加符合中医脾虚形成过程复杂性、长期性的特点。

最后,脾虚模型的评分至关重要,现阶段宏观表征的评分是将脾虚的临床症状与动物体征一一对应,该过程包括动物精神、生活、行为状态,体现了中医整体观念和辩证诊断的特点,但是评分过程主观性太强^[87],评分标准各有侧重不尽统一,所以亟需建立脾虚模型的专家共识和统一的评分标准,并在评分过程中尽量采用现代化的观测手段^[91],比如使用合适的影像设备来获取动物舌象信息,寻找

稳定的特异性指标。根据中医理论“脾主肌肉”,本团队前期研究中也采用了悬空拉尾实验来对脾虚进行评分,使得评价更完善^[92];D-木糖排泄率和唾液淀粉酶活性为现阶段公认的检测脾虚的金指标,也符合“脾主运化”的功能和“在液为唾”的特点,建议联合这三者来进行评判,并采用对应的反证方剂来对模型进行验证,以减少主观因素的影响,形成更加精准化、客观化、科学化、标准化的操作过程,增强实验结果的可信度和模型的可靠性。

综上,中医证后的复杂性,决定了相关研究的困难性,也制约了对脾虚证实质的全面揭示^[93]。本文从模型构建与模型评价角度对脾虚动物模型进行概述,期望为脾虚动物模型的完善提供一定的借鉴。因此,为进一步明确脾虚证的实质,阐明脾虚的致病机制,必须要深入动物模型研究,结合中西医研究的特点,严格把控实验条件,不断完善脾虚证候模型评价的客观指标,建立规范、统一的中医证候定量评价标准,从而促进中医现代化的发展。

参 考 文 献(References)

[1] ZHANG Z, YANG S, LIN X, et al. Metabolomics of spleen-yang deficiency syndrome and the therapeutic effect of Fuzi Lizhong pill on regulating endogenous metabolism [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114281.

[2] 胡齐, 孙莹, 宋雅芳, 等. 四君子汤对脾虚大鼠线粒体氧化损伤及能量代谢的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35 (8): 1972-1976.

HU Q, SUN Y, SONG Y F, et al. Effects of sijunzi decoction on mitochondrial oxidative damage and energy metabolism of spleen deficiency rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35 (8): 1972-1976.

[3] 陈亮, 余求祥, 刘泽洲, 等. 健脾 I 号治疗脾虚型功能性消化不良的临床效果 [J]. 中国医药科学, 2022, 12 (13): 10-13, 61.

CHEN L, YU Q X, LIU Z Z, et al. Clinical effect of Jianpi No I Decoction in the treatment of functional dyspepsia due to spleen deficiency [J]. Chin Med Pharm, 2022, 12 (13): 10-13, 61.

[4] 徐伟超, 刘建平, 杜艳茹, 等. 京津冀地区溃疡性结肠炎的中医证候特征: 一项基于国家中医临床研究基地信息系统的真实世界研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (10): 2439-2441.

XU W C, LIU J P, DU Y R, et al. Characteristics of TCM syndrome of ulcerative colitis in Beijing-Tianjin-Hebei Region: a real-world study based on information system of national clinical research base of traditional Chinese medicine [J]. Chin Ind Econ, 2020, 31 (10): 2439-2441.

[5] 思璎璇, 温红珠, 卞慧, 等. 舒肠方治疗肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合征多中心随机双盲安慰剂对照研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43 (11): 1-10.

SI J L, WEN H Z, BIAN H, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study of bowel relief formula for the treatment of diarrhea-type irritable bowel syndrome due to liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Integrat Med, 2023, 43 (11): 1-10.

[6] 崔利荣. 参苓益智颗粒治疗轻中度血管性痴呆心脾两虚证的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2020.

CUI L R. Clinical study of Shenling Yizhi Granule in the treatment of deficiency of both heart and spleen in patients with mild to moderate vascular dementia [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2020.

[7] 北京师范大学生物系消化生理教研组. 脾虚证动物模型的建立及其实质的探讨 [J]. 北京师范大学学报 (自然科学版), 1979, 15 (1): 113.

Scientific Research Group of Digestive Physiology, Department of Biology, Beijing Normal University. Establishment of an animal model of spleen deficiency and discussion of its essence [J]. J Beijing Norm Univ (Nat Sci), 1979, 15 (1): 113.

[8] 严智强, 于书庄, 李君华. 虚证动物模型体表冷光信息的研究 [J]. 中医杂志, 1982, 23 (1): 70-72.

YAN Z Q, YU S Z, LI J H. Study on luminescence information of animal model with deficiency syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 1982, 23 (1): 70-72.

[9] 刘学松, 黄树明, 李织, 等. 利血平致动物脾虚模型机制的研究 [J]. 中国医药学报, 1989, 4 (5): 68-70.

LIU X S, HUANG S M, LI Z, et al. Study on the mechanism of spleen deficiency in animals caused by Lixueping [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 1989, 4 (5): 68-70.

[10] 王淑兰, 王安民, 杨畔农. 马属动物驴“脾气虚”证的实验研究 [J]. 中医杂志, 1990, 31 (3): 49-51.

WANG S L, WANG A M, YANG P N. Experimental study on the syndrome of “spleen deficiency” of Equus donkey [J]. J Tradit Chin Med, 1990, 31 (3): 49-51.

[11] 王玉良, 谢杰, 李显华, 等. 固本益肠片治疗实验性豚鼠脾虚型溃疡性结肠炎的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15 (2): 98-100.

WANG Y L, XIE J, LI X H, et al. Study of treating experimental ulcerative colitis of spleen deficiency type with “GubenYichang tablet” in Guinea pigs [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 1995, 15 (2): 98-100.

[12] 曲长江, 刘劲, 宫艳华, 等. 大黄泻下与劳倦过度单、复因素造模脾虚小鼠过氧化与抗氧化改变的比较研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9 (4): 213-215.

QU C J, LIU J, GONG Y H, et al. Comparative study on the change of peroxidation antioxidant in spleen deficiency mice modeled by rhubarb root laxation or over-exertion [J]. Chin J Integr Tradit West Med Gastro Spleen, 2001, 9 (4): 213-215.

[13] 王士维. 中国恒河猴脾虚证艾滋病动物模型先天免疫因子 MBL 和 α -防御素的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2013.

WANG S W. The research the status of changes in and correlation between Spleen-deficiency model innate immune factor Mannan-binding lectin (MBL) and α -defensin Chinese Rhesus

- Monkeys [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2013.
- [14] 王佳, 贾连群, 宋囡, 等. 健脾化痰祛瘀方对动脉粥样硬化巴马猪小肠线粒体呼吸链复合物及 ATP 活性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2677-2681.
- WANG J, JIA L Q, SONG N, et al. Effect of invigorating spleen and removing phlegm and eliminating blood stasis recipe on changes of mitochondrial respiratory chain complex and ATP activity in small intestine of AS Bama pigs [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(11): 2677-2681.
- [15] 冯士彬, 李成, 贺濛初, 等. 加味四君子汤对脾虚犬小肠紧密连接蛋白表达及 ERK/MAPK 通路的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2019, 34(6): 971-979.
- FENG S B, LI C, HE M C, et al. Effect of supplementary sijunzi decoction on the small intestinal tight junction proteins expression and ERK/MAPK pathway in spleen deficiency canines [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci), 2019, 34(6): 971-979.
- [16] 吴家虞, 张艳荣, 左文明, 等. 基于斑马鱼模型和网络药理学探讨金露梅水提物改善脾虚的作用机制 [J]. 青海科技, 2023, 30(2): 75-87.
- WU J Y, ZHANG Y R, ZUO W M, et al. Mechanism of aqueous extracts of *Potentilla fruticosa* in improving spleen deficiency based on zebrafish model and network pharmacology [J]. Qinghai Sci Technol, 2023, 30(2): 75-87.
- [17] 李婷婷, 苏韞, 龚红霞, 等. 归芪白术汤对脾虚小鼠免疫因子及水通道蛋白表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 805-808.
- LI T T, SU Y, GONG H X, et al. Effect of guiqi Baizhu Decoction on the expression of immune factors and aquaporin in mice with spleen deficiency [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 805-808.
- [18] 肖怡, 邓向亮, 傅南琳, 等. 脾虚型功能性腹泻大鼠模型的建立 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(96): 219-221.
- XIAO Y, DENG X L, FU N L, et al. Establishment of rat model of functional diarrhea with spleen deficiency [J]. World Latest Med Inf, 2019, 19(96): 219-221.
- [19] 刘岩, 刘志洋, 王馨怡, 等. 木香顺气丸对脾虚胃溃疡模型大鼠能量代谢和物质代谢的影响 [J]. 中成药, 2019, 41(10): 2495-2499.
- LIU Y, LIU Z Y, WANG X Y, et al. Effect of Muxiang Shunqi pill on energy metabolism and substance metabolism in rats with spleen deficiency gastric ulcer model [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(10): 2495-2499.
- [20] 肖春萍, 鞠艳娟, 孙金, 等. 基于肠道微生态的米泔水制苍术健脾止泻药效及其机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(2): 64-71.
- XIAO C P, JU Y J, SUN J, et al. Jianpizhixie effect and mechanism of *ATRACYLODIS RHIZOMA* processed with rice swill based on intestinal microecology [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2023, 39(2): 64-71.
- [21] 周轲, 牛淳, 刘文娟, 等. 电针百会穴对脾虚泄泻模型大鼠影响的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(3): 947-955.
- ZHOU K, NIU C, LIU W J, et al. Study on the effect of electric acupuncture at Baihui acupoint on rats with spleen-deficiency diarrhea [J]. Acta Vet Zootechnica Sin, 2022, 53(3): 947-955.
- [22] 曹琰, 刘产明, 朱月琴, 等. 孟河医派苍术特色炮制品对脾虚证大鼠的药效作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 739.
- CAO Y, LIU C M, ZHU Y Q, et al. Pharmacodynamic effect of special processed products of *Atractylodes lancea* from Menghe medical school on rats with spleen deficiency syndrome [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(9): 739.
- [23] 曹护群, 贺濛初, 舒迎霜, 等. 犬源复合益生菌对脾虚犬抗氧化及消化吸收功能的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(6): 1142-1151.
- CAO H Q, HE M C, SHU Y S, et al. Effects of canine-derived probiotics on anti-oxidant, digestive and absorptive functions of splenic Asthenia canines [J]. Acta Agric Univ Jiangxiensis, 2019, 41(6): 1142-1151.
- [24] YI Y L, LI Y, GUO S, et al. Elucidation of the reinforcing spleen effect of jujube fruits based on metabolomics and intestinal flora analysis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 847828.
- [25] 阚甸嘉, 滕静茹, 傅湘琦, 等. 用耗气破气理论塑造脾气虚动物模型 [J]. 吉林中医药, 1990, 2: 32-34.
- KAN D J, TENG J R, FU X Q, et al. Animal modeling of spleen qi deficiency using the theory of qi depletion and qi destruction [J]. Jilin Chin Med, 1990, 2: 32-34.
- [26] 陈小野, 周永生, 樊雅莉, 等. 脾气虚证动物模型规范化的初步研究 [J]. 中国医药学报, 2001, 16(4): 52-58.
- CHEN X Y, ZHOU Y S, FAN Y L, et al. Preliminary study on standardization of animal model of spleen-qi deficiency syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2001, 16(4): 52-58.
- [27] 陈小野. 脾气虚证动物模型初步规范化的造模方法和思路 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(1): 3-5.
- CHEN X Y. Method and thought on establishing primarily standardized animal model of the spleen qi deficiency syndrome [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2003, 9(1): 3-5.
- [28] 赵思达. 基于 cAMP/PKA 通路探讨理脾滋阴法干预脾阴虚大鼠脾失健运机理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2019.
- ZHAO S D. Based on cAMP/PKA pathway, the mechanism of regulating spleen and nourishing Yin to intervene spleen deficiency in rats with spleen Yin deficiency is studied [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2019.
- [29] 徐诗画, 罗浩轩, 项婷, 等. 脾虚内环境对诱导型肝癌小鼠胃组织中 oatp2a1、oatp2b1、oatp4a1、oatp1b2 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 5(10): 2358-2362.
- XU S H, LUO H X, XIANG T, et al. Effect of internal environment of spleen deficiency on expressions of oatp2a1, oatp2b1, oatp4a1 and oatp1b2 in gastric tissues of mice with induced liver cancer [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 5

- (10): 2358-2362.
- [30] 王颖芳. 慢性胃炎脾虚证患者基因差异表达图谱研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2006.
- WANG Y F. Study on differential gene expression patterns of chronic gastritis patients with spleen deficiency syndrome [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2006.
- [31] 赵竞业, 杨菁华, 张晓晨, 等. 肝郁脾虚外感小鼠模型的建立及评价 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3602-3607.
- ZHAO J Y, YANG J H, ZHANG X C, et al. Establishment and evaluation of mice model with liver stagnation and spleen deficiency infected by influenza virus [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(7): 3602-3607.
- [32] 刘佳, 郭文峰, 任理, 等. 四君子汤对脾气虚证模型大鼠小肠葡萄糖吸收功能作用的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(10): 1389-1393.
- LIU J, GUO W F, REN L, et al. Effect of sijunzi decoction on the intestinal glucose absorption in model rats of pi-qi deficiency syndrome; an experimental research [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2013, 33(10): 1389-1393.
- [33] 王小荣. 脾虚证与胰岛 A 细胞变化相关性研究——硝酸钴法脾虚证动物模型的研制 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2002.
- WANG X R. Study on correlation between spleen-Asthenia syndrome and islet a cells changes [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2002.
- [34] 张晓杰. 脾虚大鼠延脑网状核 VACHT 免疫组化研究 [J]. 医学研究通讯, 2003, 32(8): 39-40.
- ZHANG X J. The VACHT immunohistochemical study in nuclei reticulars of the vagus nerve of spleen deficiency rats [J]. J Med Res, 2003, 32(8): 39-40.
- [35] 赵金鑫, 赵瑞波. 选择性地破坏胰腺 A 细胞大鼠海马中 VACHT 蛋白表达的研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(1): 19-20.
- ZHAO J X, ZHAO R B. Study on expression of VACHT protein in hippocampal of rats having pancreatic A cells selectively destroyed [J]. J Qiqihar Med Coll, 2007, 28(1): 19-20.
- [36] 费文婷, 侯燕, 王玉杰, 等. 玛咖对免疫抑制-脾虚证小鼠能量代谢及免疫调节机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1874-1880.
- FEI W T, HOU Y, WANG Y J, et al. Energy metabolism and immune-enhancement effects and mechanisms of Maca on immunosuppression-spleen-deficiency mice [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(5): 1874-1880.
- [37] 胡琳琳, 高云芳, 何志仙. 三种脾虚证模型小鼠消化吸收功能改变的比较研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(9): 813-816.
- HU L L, GAO Y F, HE Z X. Comparative study on changes of digestive and absorptive functions in three different models of pi-deficiency syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2005, 25(9): 813-816.
- [38] 彭成, 罗光宇. 脾气虚脾不统血证候动物模型的研究思路 [J]. 中医杂志, 1996, 37(4): 241-242.
- PENG C, LUO G Y. Research ideas on animal model of spleen-qi deficiency and spleen-qi failure to control blood syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 1996, 37(4): 241-242.
- [39] 邹燕文. 醋酸脾虚证模型大鼠肠道菌群分析 [D]. 上海: 上海交通大学; 2009.
- WU Y W. Intestinal microflora analysis of pi-deficient rats induced by acetic acid [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University; 2009.
- [40] 李发荣, 宋建平, 徐文友, 等. 太白参对饥饿致“脾虚”小鼠的影响 [J]. 陕西中医, 2002, 23(2): 180-181.
- LI F R, SONG J P, XU W Y, et al. Effect of Taibai ginseng on “spleen deficiency” mice caused by hunger [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2002, 23(2): 180-181.
- [41] 刘娅薇, 吴仪, 惠华英, 等. 小鼠肝气乘脾泄泻模型的建立及痛泻要方的疗效 [J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 1023-1027.
- LIU Y W, WU Y, HUI H Y, et al. Establishment of a mouse model of Ganqichengpi diarrhea and the efficacy of Tongxieyaofang prescription [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2020, 26(4): 1023-1027.
- [42] 郭军雄, 汪斌, 马丽, 等. p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 709-715.
- GUO J X, WANG B, MA L, et al. Immunoregulatory effects of the p38 MAPK-signaling pathway in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 709-715.
- [43] 郭军雄, 许小敏, 马丽, 等. 基于 p38 MAPK/MSK1/CREB 转导通路研究痛泻要方对肝郁脾虚型 D-IBS 大鼠痛觉敏化的干预作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(5): 508-514.
- GUO J X, XU X M, MA L, et al. Intervention effect of Tongxie Yaofang on pain sensitization in D-IBS rats with liver depression and spleen deficiency based on p38 MAPK/MSK1/CREB transduction pathway [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(5): 508-514.
- [44] 郭军雄, 马丽, 康万荣, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚型 D-IBS 大鼠结肠组织 p38 MAPK 信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 1-8.
- GUO J X, MA L, KANG W R, et al. Effect of Tongxie Yaofang on p38 MAPK pathway associated protein and its target gene expression in colon tissues of D-IBS rats with liver-stagnation and spleen-deficiency [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(4): 1-8.
- [45] 潘晓鸥, 赵燕, 赵远桥, 等. 石斛碱对肝郁脾虚型肠易激综合征小鼠 GFAP、NGF、BDNF 表达及内脏敏感性的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1186-1190.
- PAN X O, ZHAO Y, ZHAO Y Q, et al. Effects of dendrobine on visceral sensitivity associated GFAP, NGF, BDNF expressions in mice with irritable bowel syndrome of liver Qi-Stagnation & Spleen-Deficiency Pattern [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(5): 1186-1190.
- [46] ZHENG X F, TIAN J S, LIU P, et al. Analysis of the restorative effect of Bu-Zhong-yi-qi-Tang in the spleen-qi deficiency rat

- model using $^1\text{H-NMR}$ -based metabonomics [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(2): 912-920.
- [47] 张毅靖, 甘剑峰, 王永福, 等. 健脾祛湿膏对脾虚腹泻大鼠结肠 P38 MAPK 信号通路相关蛋白及细胞因子的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 186-189.
- ZHANG Y J, GAN J F, WANG Y F, et al. Effects of Jianpi qushi ointment on P38 MAPK signal pathway related proteins and cytokines in colon of rats with spleen deficiency diarrhea [J]. J Chin Med Mater, 2021, 44(1): 186-189.
- [48] 谢惠臣, 冉云, 张云, 等. 生品与麸炒苍术对脾虚证大鼠小肠吸收转运相关蛋白载体的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(14): 47-56.
- XIE H C, RAN Y, ZHANG Y, et al. Effects of raw and bran-fried Cangzhu on protein carriers related to absorption and transportation in small intestine of rats with spleen deficiency [J]. Chin J Exper Form, 2023, 29(14): 47-56.
- [49] 曾益宏. 脾虚证与线粒体基因多态性及胃泌素和 ATP 酶的相关性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2007.
- ZENG Y H. Research on the relevant between spleenashenic syndrome and mitochondria gene polymorphism, gastrin, ATPase [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2007.
- [50] 黄文婷, 王继红. 基于 MLCK 信号通路探讨一指禅推法对脾虚家兔胃肠传输功能的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(6): 208-210.
- HUANG W T, WANG J H. Exploring effect of pushing manipulation with one finger on gastrointestinal transmission function in rabbits with spleen deficiency based on MLCK signal pathway [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2022, 49(6): 208-210.
- [51] 朱吴如. 基于衰老分子机制探讨脾虚证-补中益气汤相关的生物学基础 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2020.
- ZHU H R. Exploring the biological basis of the spleen deficiency syndrome associated with tonifying Zhong Yi Qi Tang based on the molecular mechanism of aging [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2020.
- [52] 李茹超, 魏楠楠, 路荣荣, 等. 基于 PI3K/AKT 通路探讨防己黄芪汤对气虚水负荷模型大鼠胃肠道水通道蛋白的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 810-813.
- LI R C, WEI N N, LU R R, et al. Effects of Fangji Huangqi Tang on gastrointestinal water channel proteins based on PI3K/AKT pathway in rats modeled as qi deficiency and water loading [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(4): 810-813.
- [53] 王红伟, 刘旺根, 丁瑞敏. 黄芪建中汤对脾虚大鼠血液成分及细胞免疫功能的影响 [J]. 河南中医药学刊, 2002, 17(6): 16-17.
- WANG H W, LIU W G, DING R M. Effect of Huangqi Jianzhong Decoction on blood components and cellular immune function in rats with spleen deficiency [J]. Henan J Traditi Chin Med Pharmacy, 2002, 17(6): 16-17.
- [54] 雷萍, 韩晓伟, 徐铭, 等. 灰树花多糖对白念珠菌肠道感染脾虚小鼠 TLR2/MyD88/NF- κ B 通路基因早期转录的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2933-2937.
- LEI P, HAN X W, XU M, et al. Effect of Grifola frondosa polysaccharide on early transcription of genes in TLR2/MyD88/NF- κ B pathway in spleen deficiency mice infected by *Candida albicans* transmitted through intestine [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(12): 2933-2937.
- [55] 罗佳, 孙强, 马祖兵, 等. 红曲发酵炮制前后对脾虚食积证小鼠的胃肠调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 108-114.
- LUO J, SUN Q, MA Z B, et al. Gastrointestinal regulation of red yeast rice on mice with syndrome of food retention due to spleen deficiency before and after fermentation [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(22): 108-114.
- [56] 张徐雯, 周驰, 王晓彤, 等. 白术散加减对胃寒型功能性消化不良小鼠胃肠功能的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(4): 435-439.
- ZHANG X W, ZHOU C, WANG X T, et al. Effect of modified Baizhu Powder on gastrointestinal functions in mouse models with stomach-cold functional dyspepsia [J]. Acta Acad Med Sin, 2015, 37(4): 435-439.
- [57] 冯珂, 纪立金. 浅谈“脾主为卫” [J]. 山东中医杂志, 2012, 31(9): 627-629, 695.
- FENG K, JI L J. Talking about “the spleen is the guardian” [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2012, 31(9): 627-629, 695.
- [58] 李青敏, 李忠正, 郭永明, 等. 不同次数推拿疗法对卫气虚大鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. 江苏中医药, 2017, 49(9): 75-77.
- LI Q M, LI Z Z, GUO Y M, et al. Experimental study on the effect of different times of chiropractic therapy on immune function in rats with Wei-Qi deficiency [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2017, 49(9): 75-77.
- [59] 琚婉君, 郭蕾, 陈少丽, 等. 补中益气汤改善脾虚型胃肠动力障碍大鼠代谢组学研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(5): 69-73, 271-272.
- JU W J, GUO L, CHEN S L, et al. Metabolomics study of Buzhong Yiqi Decoction improving gastrointestinal motility disorder in rats with spleen deficiency [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(5): 69-73, 271-272.
- [60] 巩子汉, 段永强, 杨晓轶, 等. 四君子汤对大鼠学习记忆能力的影响机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(10): 1333-1336.
- GONG Z H, DUAN Y Q, YANG X Y, et al. Influence mechanism of Sijunzi Decoction on learning and memory ability of rats [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(10): 1333-1336.
- [61] 董佳梓, 薛亚楠, 魏云涛, 等. 电针“足三里”对脾虚大鼠心肌细胞 AMPK-线粒体通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(6): 522-528.
- DONG J Z, XUE Y N, WEI Y T, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli on AMPK-mitochondria pathway in cardiac cells of rats with spleen deficiency [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(6): 522-528.
- [62] 姜宇璐, 张北雪, 马善鹏, 等. 4 种不同来源的苍术和白术对偏于实证的脾虚大鼠药效学比较研究 [J]. 中华中医药学

- 刊, 2020, 38(8): 142–146.
- JIANG Y J, ZHANG B X, MA S P, et al. Pharmacodynamic comparison of four different sources of Cangzhu (*Atractylodes rhizome*) and baizhu *Atractylodes macrocephala* on spleen deficiency syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(8): 142–146.
- [63] 化敏, 耿雪, 刘月程, 等. 炙甘草干预脾虚大鼠的血清代谢组学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(5): 1710–1716.
- HUA M, GENG X, LIU Y C, et al. Serum metabonomics study on the intervention of *Radix glycyrrhizae* preparata on rats with spleen deficiency [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(5): 1710–1716.
- [64] 詹菊, 杨忠兰, 王远敏, 等. 黔产苗药土党参趁鲜蒸制炮制工艺研究及炮制前后对小鼠脾虚动物模型的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(4): 1398–1407.
- ZHAN J, YANG Z L, WANG Y M, et al. Study on the processing technology of fresh steaming of miao medicine campanumoa javanica in Guizhou and its effect on spleen deficiency animal model in mice before and after processing [J]. World Sci Tech Modern Tradit Chin Med, 2023, 25(4): 1398–1407.
- [65] 闫志强, 翟少钦, 张邑帆, 等. 女黄扶正发酵物对脾虚大鼠肠道结构及免疫的影响 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(1): 120–125.
- YAN Z Q, ZHAI S Q, ZHANG Y F, et al. Effects of fermented nyuhuang fuzheng on the intestinal structure and immunity of rats with spleen deficiency [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci), 2022, 37(1): 120–125.
- [66] 凌嘉阳, 柏阳, 曲扬, 等. 基于药效学和代谢组学考察北苍术不同炮制品对脾虚大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7): 179–188.
- LING J Y, BO Y, QU Y, et al. Pharmacodynamic and metabolomics-based investigation of the effects of different concoctions of Bei Cangzhu on rats with spleen deficiency [J]. Chin J Exper Tradit Med Formul, 2024, 30(7): 179–188.
- [67] 刘明江, 王惠文, 赵昕, 等. 冷热应激对番泻叶诱导脾虚小鼠临床症状及免疫力的影响 [J]. 动物医学进展, 2022, 43(11): 52–57.
- LIU M J, WANG H W, ZHAO X, et al. Effects of cold and heat stresses on clinical symptoms and immunity of mice with spleen deficiency induced by folium sennae [J]. Prog Vet Med, 2022, 43(11): 52–57.
- [68] 钟意文, 张文彤, 陈雅茜, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 和粪便代谢组学探讨参苓白术散改善脾虚湿困型溃疡性结肠炎大鼠的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2): 840–847.
- ZHONG Y W, ZHANG W T, CHEN Y X, et al. Mechanism of Shenling Baizhu Powder on improving spleen deficiency with dampness retention-ulcerative colitis rats based on UPLC-Q-TOF/MS and fecal metabonomics [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(2): 840–847.
- [69] 毕克恩, 刘爱华, 蒋振英, 等. 尿中 D-木糖排泄率对小儿脾虚的诊断价值 [J]. 山东中医学院学报, 1983, 7(3): 68–69.
- BI K E, LIU A H, JIANG Z Y, et al. Diagnostic value of urine D-xylose excretion rate in children with spleen deficiency [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 1983, 7(3): 68–69.
- [70] 钟森杰, 李静, 李琳, 等. 脾气虚证的诊断标准及客观化研究述评 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(2): 421–423.
- ZHONG S J, LI J, LI L, et al. A review of diagnostic criteria and objective study of spleen-qi deficiency syndrome [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(2): 421–423.
- [71] 李岚其, 郭丽娜, 陈肖家, 等. 四君子汤对脾虚大鼠骨骼肌细胞色素 c 氧化酶 I、IV mRNA 及蛋白表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(4): 876–883.
- LI L Q, GUO L N, CHEN X J, et al. Effect of sijunzi decoction on skeletal muscle cytochrome c oxidase I, IV mRNA and protein expression in rats with spleen deficiency [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2022, 39(4): 876–883.
- [72] 陈丝, 宋囡, 崔馨月, 等. 香砂六君子汤对脾虚高脂血症模型大鼠胆固醇逆向转运的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(17): 1493–1498.
- CHEN S, SONG N, CUI X Y, et al. Effect of Xiangsha Liujunzi Decoction on reverse cholesterol transport of spleen deficiency and hyperlipidemia model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60(17): 1493–1498.
- [73] 张善. 脾虚患者唾液淀粉酶活性初步研究 [J]. 新中医, 1978, 10(3): 45–47.
- ZHANG S. Preliminary study on salivary amylase activity in patients with spleen deficiency [J]. J New Tradit Chin Med, 1978, 10(3): 45–47.
- [74] 周贤玲. 唾液淀粉酶活性与脾虚主要症状组合的关系研究 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2014.
- ZHOU X L. The study of the correlation of saliva amylase activity and main clinical symptom combination of spleen-asthenia patients [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2014.
- [75] 曾嘉. 脾气虚患者兼夹非脾虚症状对唾液淀粉酶活性比值的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2016.
- ZENG J. Effect of spleen-qi deficiency combined with non-spleen deficiency symptoms on salivary amylase activity ratio [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2016.
- [76] 林传权. 基于“脾主涎”理论探索脾气虚证本质研究的启示 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5370–5374.
- LIN C Q. Research revelation on exploring the essence of spleen qi deficiency syndrome based on the theory of “spleen controlling salivary secretion” [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5370–5374.
- [77] 谢海媚, 梁裕琪, 黄也, 等. 慢性非萎缩性胃炎及重症肌无力脾气虚证患者唾液淀粉酶活性比值上升的影响因素研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3648–3652.
- XIE H M, LIANG Y Q, HUANG Y, et al. Study on the influencing factors of the increasing salivary amylase activity ratio in patients with chronic non-atrophic gastritis and myasthenia gravis syndrome with spleen-deficiency [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(6): 3648–3652.
- [78] 尚芳红, 阳勇, 宋旭红, 等. 正交设计结合药效学实验优选

- 四君子汤颗粒水提及精制工艺 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4191-4200.
- SHANG F H, YANG Y, SONG X H, et al. Optimization of water extracting and refining procession of Sijunzi Decoction Granules by orthogonal design and pharmacodynamics test [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(16): 4191-4200.
- [79] 刘婧, 乔波, 谭周进. 中医脾气虚证现代实质研究进展 [J]. 山东中医药大学, 2022, 30(16): 693-700.
- LIU J, QIAO B, TAN Z J. Progress in modern research on substance of spleen qi deficiency in Chinese medicine [J]. Shandong Univer Tradit Chin Med, 2022, 30(16): 693-700.
- [80] 刘俊, 宗晨旭, 葛渭菲, 等. 基于免疫机制从“脾虚生痰湿”论治多发性抽动症的研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(11): 4286-4292.
- LIU J, ZONG C X, GE M F, et al. Study on the treatment of tourette syndrome based on immune mechanism from “spleen deficiency produces phlegm and dampness” [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(11): 4286-4292.
- [81] 李家生, 徐志昌, 陈慧婷, 等. 脾虚症并发白念珠菌感染小鼠血常规及血浆细胞因子的变化及秋泻灵颗粒治疗对其影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(12): 3044-3048.
- LI J S, XU Z C, CHEN H T, et al. Changes of blood routine and plasma cytokines in mice with spleen deficiency complicated with *Candida albicans* infection and the effect of Qiuxieling Granule treatment on them [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(12): 3044-3048.
- [82] 孟凡征, 李亚男, 赵金生, 等. “脾虚证”实质的现代研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(12): 2975-2977.
- MENG F Z, LI Y N, ZHAO J S, et al. Modern research progress on essence of spleen deficiency syndrome [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(12): 2975-2977.
- [83] 刘俊兰. 补脾益气法通过 cAMP/PKA 对脾气虚脾失健运大鼠胃肠激素的调控机理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2018.
- LIU J L. Study on the mechanism of regulating gastrointestinal hormones in rats with spleen deficiency and spleen deficiency through cAMP/PKA [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2018.
- [84] 王明珠, 黄琳, 李海昌, 等. 冰水潮湿诱发的脾虚对 DBA/1 小鼠胶原诱导型关节炎的影响及参苓白术散的“以方测证” [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(11): 6781-6784.
- WANG M Z, HUANG L, LI H C, et al. Effects of drinking ice water and high humidity induced spleen deficiency on CIA disease in DBA/1 mice and the “counter evidence” of Shenling Baizhu Powder [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(11): 6781-6784.
- [85] 姜楠, 蒲纪, 张冰冰, 等. 补益方剂反证糖代谢异常代谢综合征大鼠中医证型的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 95-98.
- JIANG N, PU J, ZHANG B B, et al. Syndrome identification of abnormal glucose metabolism in metabolic syndrome rat based on syndrome detecting from recipe used [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2015, 21(12): 95-98.
- [86] 曾梅艳, 彭彩云, 宋厚盼, 等. 脾阳虚证动物模型构建及模型评价的研究概述 [J]. 中医药导报, 2019, 25(16): 116-119.
- ZENG M Y, PENG C Y, SONG H P, et al. Research progress on animal model construction and model evaluation of spleen Yang deficiency syndrome [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(16): 116-119.
- [87] 王楷, 侯雨君, 宋玮, 等. 泄泻中医证候动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 823-829.
- WANG K, HOU Y J, SONG W, et al. Research progress on animal model construction and evaluation of different TCM syndromes of diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 823-829.
- [88] 温玉莹, 江涛, 陈艳芬, 等. 蒿甲虚热清颗粒对利血平和甲状腺素致阴虚模型小鼠的影响 [J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(3): 320-324.
- WEN Y Y, JIANG T, CHEN Y F, et al. Influence of Haojia Xureqing Granules on the model of Yin-deficiency syndrome in mice [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2018, 34(3): 320-324.
- [89] 王晶, 吴莎, 许永崧, 等. 芎附方对利血平致偏头痛模型小鼠的药效学研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2970-2973.
- WANG J, WU S, XU Y S, et al. Pharmacodynamics research of xiongfufu formula on migraine mice induced by reserpine [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(12): 2970-2973.
- [90] 刘志恒, 袁霞红, 刘林. 抑郁症动物模型及其在中医药研究运用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 109-114.
- LIU Z H, YUAN X H, LIU L. Progress on depressive animal models and their application in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 109-114.
- [91] 任志鑫, 王雨, 张冰, 等. 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 897-908.
- REN Z X, WANG Y, ZHANG B, et al. Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 897-908.
- [92] 钱星羽. 捏脊疗法干预幼龄厌食大鼠及调控下丘脑摄食中枢的效应与机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学; 2023.
- QIAN X Y. Effects and mechanisms of chiropractic intervention in young anorexic rats and modulation of hypothalamic feeding centre [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [93] 王轩宇, 阙华发. “脾虚证”的现代研究进展 [J]. 江西中医药, 2022, 53(2): 69-72.
- WANG X Y, QUE H F. Modern research progress of “spleen deficiency syndrome” [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2022, 53(2): 69-72.

张春鹏, 颜嘉宏, 张永华. 愤怒大鼠实验模型概述 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 397-403.

ZHANG C P, GAN J H, ZHANG Y H. Overview of experimental rat models of anger [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 397-403.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.014

愤怒大鼠实验模型概述

张春鹏, 颜嘉宏, 张永华*

(浙江中医药大学附属杭州市中医院, 杭州 310007)

【摘要】 愤怒这一负面情绪会对人体产生诸多影响。与愤怒情绪产生有关的脑部区域主要与中央灰质、杏仁核、下丘脑有关。近些年关于愤怒动物模型的研究逐渐增多, 愤怒机制的研究也不断深入。关于愤怒模型的研究大部分集中在中缝背核、下丘脑和海马区域, 相关的神经递质研究主要与 GABA 的表达和单胺类神经递质含量相关。本文通过检索愤怒有关的动物模型, 总结愤怒发生的脑内神经机制, 旨在为愤怒情绪的研究提供参考借鉴。

【关键词】 愤怒; 动物模型; 下丘脑; 前额区; 海马

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0397-07

Overview of experimental rat models of anger

ZHANG Chunpeng, GAN Jiahong, ZHANG Yonghua*

(Hangzhou TCM Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310007, China)

Corresponding author: ZHANG Yonghua. E-mail: zyh16916@163.com

【Abstract】 Anger is a negative emotion that can have many effects on the body. The brain regions associated with the production of anger are mainly related to the central gray matter, amygdala, and hypothalamus. There has recently been a gradual increase in research into relevant animal models and the mechanisms of anger. Most studies of anger models have focused on the mid-suture dorsal nucleus, hypothalamus, and hippocampal regions, and related neurotransmitter studies have mainly been related to GABA expression and monoamine neurotransmitter content. This review summarizes the neural mechanisms of anger in the brain based on animal models related to anger, with the aim of providing a reference for the study of angry emotions.

【Keywords】 anger; animal model; hypothalamus; prefrontal area; hippocampus

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

愤怒是情绪表达的方式之一。情绪是大脑活动与不同社会现实相互作用的产物, 由愤怒、厌恶、恐惧、快乐、悲伤和惊讶 6 种离散的基本情绪表现组成, 这些情绪可以是单独的, 也可以是混合的^[1-3]。愤怒是一种非常重要的情绪, 与其他负面情绪形成对比, 愤怒可以产生正面面对问题的反应^[4-5]。任何引起生物反应的内在或外在刺激都被称为压力^[6], 可引起愤怒的压力就非常普遍。当一个人的目标被阻止时, 就会产生愤怒的感觉^[7]。极端高

温、没有得到预期的奖励、受到不公平的对待、或一个人的目标、计划受到干扰或因某些原因未能实现, 这些都可能引起愤怒^[8]。缺乏愤怒控制会对心理健康产生负面影响^[9]。通常愤怒情绪可能会导致攻击性行为^[10], 愤怒控制管理可以减少愤怒, 但不能减少攻击性^[11], 缺乏愤怒控制会导致家庭暴力, 甚至会使人产生自杀倾向^[12-13]。愤怒的发生与大脑的神经活动有密切关系, 深入了解愤怒的神经机制对于愤怒控制的研究具有重要意义。

【基金项目】 中医药现代化专项项目 (2020zx013)。

Funded by Special Project on Modernization of Traditional Chinese Medicine (2020zx013).

【作者简介】 张春鹏, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 中医药防治情志疾病。Email: chunpengzhang@foxmail.com

【通信作者】 张永华, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治情志疾病。Email: zyh16916@163.com

愤怒发生的神经机制较为复杂,在已知的与愤怒发生的相关区域,包括杏仁核^[8,14-15],下丘脑^[16]和导水管周围灰色区域^[16],内侧前额叶皮层、腹内侧前额叶、前扣带皮层、后扣带皮层等^[17]。愤怒的发生,并不是脑内单独的区域活动产生的,而是单个或多个区域的活动引起的神经反应。动物模型是研究人类疾病的发病机制的重要研究工具^[18]。当愤怒应激发生时,大鼠会发生神经内分泌异常并影响其表现。了解愤怒压力的神经内分泌效应对进一步的实验研究和临床应用非常重要。因此,本文旨在对愤怒大鼠模型的神经内分泌方面进行综述,研究与愤怒发生有关的神经内分泌机制。

1 愤怒大鼠模型概述

目前动物的愤怒模型主要以大鼠为主。根据造模方式的不同大致可分为 3 类:(1)夹尾入侵法;(2)社会孤立与居民闯入者;(3)昼夜颠倒环境或慢性心理应激。

(1)夹尾入侵法在国内的应用最早见于须惠仁等^[19]的研究,使用纱布包裹尖端的止血钳夹大鼠尾部,令其与其他大鼠打斗,激怒其他大鼠,每天 4 次,每次 30 min。此模型的优势可快速(2 d)建立愤怒模型,但是研究者将同组大鼠饲养在同一笼中,可能造成夹尾鼠无法对笼内大鼠同等的攻击行为,无法控制实验条件的一致性。(2)SHENG 等^[20]在夹尾刺激的基础上引入社会隔离,建立社会隔离和居住者入侵的愤怒模型。此模型将大鼠单笼饲养进行社会隔离,这样可解决大鼠同笼饲养可能产生的模型偏差,并且单独的入侵刺激(夹尾大鼠),可保证实验条件的一致性。社会隔离和居住者入侵法是现行最常用的愤怒大鼠模型。(3)许丽等^[21]在社会隔离和居住者入侵法的基础上引进昼夜颠倒环境制作大鼠愤怒模型。此模型引入昼夜颠倒环境,类似于 CUMS 抑郁症模型,如长期造模可能引起实验动物出现抑郁情绪或睡眠障碍等其他疾病,应用时应注意时间的控制。愤怒的动物模型与抑郁症的动物模型类似,是以外部的应激刺激为主,使动物产生对抗心理从而引发愤怒的情绪。不同的是,愤怒模型造模时间一般较短且剧烈,延长造模时间可能会造成动物的抑郁情绪,影响模型的效果。

2 与愤怒发生相关的脑区域

杏仁核通常被认为与大脑情感的主要功能有

关^[22]。愤怒的发生与杏仁核相关区域的活动有密切关系,激活杏仁核可刺激愤怒的增加^[23],杏仁核病变会导致控制愤怒的能力下降^[24]。激素水平可影响杏仁核的活动,例如睾丸激素水平的增加影响杏仁核活动,诱导产生愤怒^[25-26]。杏仁核的内侧和中央核,在情绪表达中发挥重要的作用^[27-28],内侧杏仁核可影响竞争性攻击的发生,中央杏仁核可影响掠夺性攻击的发生^[29]。杏仁核的基底外侧核,在情绪学习和感知威胁中发挥作用^[30],同时基底外侧杏仁核可影响反应性攻击的发生^[31]。

杏仁核对中央灰质怒的反应有两条易化和一条抑制途径:杏仁内侧核通过终纹投射到内侧下丘脑,P 物质作用于内侧下丘脑的神经激肽-1 受体,内侧下丘脑投射到中央灰质的谷氨酸能纤维可使中央灰质的 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)兴奋从而产生防御性愤怒,易化下丘脑对中央灰质的愤怒调制;杏仁基底核以兴奋性氨基酸作为递质,直接作用于中央灰质的 NMDA,增强中央灰质的怒反应。杏仁中央核以脑啡肽为递质,作用于中央灰质的 μ 阿片受体,强力抑制中央灰质的防御性怒反应。此外,杏仁核延伸区域即后侧无名质与愤怒与攻击亦有相关联系^[32],直接刺激下丘脑穹隆周围区、腹内侧核及其邻近区域可产生怒的反应。

前额叶皮质是情绪中枢的重要组成部分,参与调节情绪和压力^[33],可抑制下丘脑和杏仁体引发的攻击行为^[34]。前额叶皮质可分为腹内侧区和背外侧区。背外侧区主要参与认知和执行功能,腹内侧区则主要与积极或消极情感相关^[35-37]。腹内侧前额叶皮层(ventromedial prefrontal cortex, vmPFC)是在控制愤怒方面起着关键作用的部位^[38]。经颅磁刺激与 vmPFC 有功能连接的内侧前额叶可降低愤怒情绪的表达。较高的 vmPFC 皮层活动与减少愤怒相关^[39]。与 vmPMC 相连的左前中额回在控制和减少愤怒方面发挥作用^[40]。此外,前扣带和岛叶同样在愤怒的发生中发挥重要作用^[41]。

3 愤怒相关神经递质调制

3.1 前额区 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平及中缝背核 5-HT、GABA 表达

脑组织中 5-HT 可参与愤怒的调控,并对愤怒导致的攻击有明显抑制作用^[42-43]。5-HT 是一种能产生愉悦情绪的单胺类神经递质,可参与情绪、认

知与行为的调节^[44-45],主要储存在中缝背核的突触囊泡内参与调节应激内分泌和行为反应^[46-47]。中缝背核的功能与动物的攻击、防御行为等情绪行为密切相关^[48-50]。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统中最重要的抑制性神经递质^[51],可影响前额叶皮质的功能,参与调节情绪^[52-53]。GABA 浓度升高可致前额叶皮质锥形神经元活动、兴奋性传递减少^[54]。5-HT 与 GABA 之间具有相互调节作用,5-HT 可抑制谷氨酸和 GABA 释放^[55]。王海娟^[56]在愤怒大鼠模型中观察到,中缝背核 5-HT 能神经元释放的 5-HT 显著减少、5-HT 浓度降低,经纤维投射至前额区的 5-HT 水平亦显著降低、前额区 5-HT 浓度降低,中缝背核 GABA 含量显著升高,中缝背核 GABA B 型受体 1 抗体(GABA type B receptor subunit 1, GABABR1)表达显著升高。刘小菊^[57]在愤怒大鼠模型中观察到相同的结果,并且还观察到大鼠前额区 5-HT 含量显著低于正常大鼠;使用免疫荧光法观察中缝背核 5-HT 能神经元与 GABABR1 的共表达,观察到 GABABR1 颗粒位于含 5-HT 颗粒的突触膜上,激活中缝背核 GABABR1 特异性受体,前额区 5-HT 含量显著性降低;抑制中缝背核 GABABR1 特异性受体,前额区 5-HT 含量则显著性升高。

3.2 愤怒相关神经递质与下丘脑

下丘脑是愤怒情绪从杏仁核到中央灰质传递的中间部分,下丘脑的活动影响愤怒情绪的传递。愤怒大鼠的中枢调制主要与下丘脑、额叶、海马中 5-羟色胺 2C(5-hydroxytryptamine 2C, 5-HT_{2C})、5-羟色胺 3B(5-hydroxytryptamine 3B, 5-HT_{3B})、GABAB 型受体 2(GABA B receptor 2, GABABR2)表达异常有关^[58]。神经递质 5-HT 与 5-HT₃ 受体的结合导致神经元中的兴奋性反应^[59]。突触前 5-HT₃ 受体介导或调节释放 GABA 和多巴胺(dopamine, DA)^[60-61]。李红华^[62]建立的郁怒大鼠模型,下丘脑、海马、顶区皮质、额区皮质中 5-HTR3B mRNA 及受体蛋白表达明显升高,高效液相-荧光检测法检测 5-HT 含量明显下降。葛庆芳等^[63]同样观察到愤怒大鼠模型下丘脑中 5-HT_{3BR} mRNA 和受体蛋白表达都明显下降。

5-HTR_{2C} 是 5-HT 受体的一个亚型,主要分布在中枢神经系统,在下丘脑、纹状体、额叶皮质、海马、杏仁核等调节 DA 释放^[64]。这种受体可显著调节情绪、焦虑和摄食^[65]。有研究观察到愤怒大鼠模

型中观察到,下丘脑中 5-HTR_{2C} mRNA 及其受体蛋白表达显著降低^[66-67]。柳新等^[68]在愤怒大鼠模型中发现,顶区皮质和额区皮质中 5-HTR_{2C} mRNA 及其受体蛋白表达呈现显著升高。崔维刚^[69]的研究结果与这些结果相同,并且观察到顶区皮质、额区皮质、海马脑区 5-HTR_{2C} mRNA 及其受体蛋白表达显著上升,但在下丘脑中显著降低。此外关于愤怒大鼠模型还有研究者观察到,下丘脑中 GABABR2 mRNA 及其受体蛋白表达下降^[70],胃泌素 mRNA 及其受体蛋白表达显著上升^[67]。

关于下丘脑内单胺类神经递质的变化,许丽等^[21]观察到 NE 和 DA 含量上升,5-HT 和肾上腺素(E)无明显改变;单胺类神经递质产物 3,4-二羟基苯乙酸(3,4-dihydroxyphenyl, DOPAC)、5-羟吲哚乙酸的含量明显升高,3-甲氧基-4-羟基苯乙醇和高香草酸的含量无明显改变。宗绍波等^[71]在愤怒大鼠模型下丘脑中观察到 NE 含量明显下降,额叶皮质、顶区皮质,下丘脑 DA 含量上升,下丘脑 5-HT 含量降低。余霞等^[72]在愤怒大鼠模型中,观察到下丘脑 DA、NE 含量上升,5-HT 含量下降。薛刚^[73]观察到愤怒大鼠模型下丘脑 NE、5-HT 含量下降;额叶皮质、顶区皮质、海马 DA 含量下降,而下丘脑 DA 含量则显著上升。对于在下丘脑区神经递质的含量会出现相反的结果,对比几种造模方法,推测不同的结果可能与造模的方法和大鼠的性别有关。

3.3 愤怒相关神经递质在海马区的表达

海马是学习和记忆的关键大脑区域,也与情绪功能和某些精神疾病有关^[74]。有研究发现,在愤怒和攻击诱发条件下,左海马和左海马旁回表现出活动增加^[75]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的神经刺激在应激反应中起重要作用^[76]。SUN 等^[77]在愤怒应激大鼠模型中发现,海马体和 CA3 区域中的 VEGFR2 阳性细胞数量减少,在海马体中 VEGF mRNA 表达量下降。

中枢神经递质为大脑的活动提供传递信号,在愤怒的发生和信号的传递中有重要意义。单胺类神经递质往往与精神和情绪变化有关,宗绍波等^[71]在愤怒大鼠模型中观察到海马区 DA 的含量下降。杨军平等^[78]发现愤怒大鼠模型海马区 5-HT 的代谢产物 DOPAC 含量亦存在上升,同时脑干组织中 NE、5-HT、DA、DOPAC 含量上升。王杰琼等^[79]观察到愤怒反应大鼠海马中 5-HTR_{2C} mRNA 和蛋白表达均增高。

GABA 为氨基酸类神经递质,参与调节情绪^[53]。杨军平等^[78]建立的愤怒大鼠模型中观察到,海马区 GABAA 型受体 $\alpha 2$ mRNA 表达下降。蔡洪信等^[80]观察到愤怒情绪模型大鼠海马 GABABR1、GABABR2 和腺苷酸环化酶表达水平降低。GABA 在脑部广泛分布,当愤怒发生时,GABA 可能同时在多个脑区出现异常。耿燕楠^[81]发现,在愤怒大鼠模型的顶区皮层、额区皮层、海马和下丘脑中 GABABR2 mRNA 及受体蛋白表达下降。

当愤怒发生时,海马的局部会发生异常。许莉莉等^[82]在愤怒大鼠模型中观察到,在海马 CA1 区中 GABABR1、GABABR2 和内向整流型钾通道(KIR)表达水平降低,在海马 CA3 区中 GABABR2 和 KIR 表达水平降低。殷慧敏^[83]在愤怒模型大鼠海马 CA3 区锥体细胞间隙变大,部分细胞缺失,排列不够整齐,额叶皮质细胞分布均变稀疏,多为椭圆形,与空白组相比,模型大鼠海马和额叶皮质的 VEGF 的表达和含量、VEGFR2 mRNA 和蛋白表达显著降低。

4 结语

本文通过检索动物的愤怒模型,综述了愤怒情绪的脑内神经机制。愤怒的发生与脑内多个区域有关,在愤怒模型的研究中,大部分研究集中在中缝背核、下丘脑和海马区域,影响情绪的杏仁核区域较少。在现阶段的研究中,愤怒相关的神经机制研究主要与 5-HT 受体和 GABA 受体的表达及单胺类神经递质的含量相关。在前额区 5-HT 含量和 GABABR1 受体表达影响愤怒的发生,在下丘脑中单胺类神经递质及 5-HTR3B、5-HTR2C 和 GABABR2 受体的表达在愤怒中发挥重要作用,在海马区单胺类神经递质和 GABABR1、GABABR2 受体的表达与愤怒的发生亦密切相关。但是愤怒的发生并不是脑部单一区域的活动,在愤怒的研究中应关注不同区域之间的相互影响,并且愤怒情绪也可能会引发或加重其他疾病的症状。免疫机制亦在愤怒的发生中发挥重要作用,在愤怒发生时,免疫与神经之间的相互作用和影响,也是将来需要探索的重要方向。愤怒情绪的研究有助于帮助了解情绪发生的机制和影响,希望本综述可以对愤怒情绪的机制研究提供有益信息。

参 考 文 献(References)

[1] WEKMAN P. What scientists who study emotion agree about

[J]. *Perspect Psychol Sci*, 2016, 11(1): 31-34.

[2] COWEN A, SAUTER D, TRACY J L, et al. Mapping the passions: toward a high-dimensional taxonomy of emotional experience and expression [J]. *Psychol Sci Public Interest*, 2019, 20(1): 69-90.

[3] BARRETT L F. Solving the emotion paradox: categorization and the experience of emotion [J]. *Pers Soc Psychol Rev*, 2006, 10(1): 20-46.

[4] CARVER C S, HARMON-JONES E. Anger is an approach-related affect: evidence and implications [J]. *Psychol Bull*, 2009, 135(2): 183-204.

[5] ZHAN J, REN J, SUN P, et al. The neural basis of fear promotes anger and sadness counteracts anger [J]. *Neural Plast*, 2018, 2018: 3479059.

[6] 徐小英, 胡慧美, 尹秋雄, 等. 水浸束缚应激模型在小鼠结肠损伤研究中的探索与实践 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(4): 492-500.

XU X Y, HU H M, YIN Q X, et al. Exploration and application of water immersion restraint stress model in the study of colonic injury in mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(4): 492-500.

[7] BERKOWITZ L. Towards a general theory of anger and emotional aggression: implications of the cognitive-neoassociationistic perspective for the analysis of anger and other emotions [M]. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates; 1993.

[8] BLAIR R J R. Considering anger from a cognitive neuroscience perspective [J]. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 2012, 3(1): 65-74.

[9] PRABHU P, SRINIVAS R, VISHWANATHAN K, et al. Factors influencing alcohol and tobacco addiction among patients attending a de-addiction centre, South India [J]. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2014, 4(2): 103-107.

[10] CHEREJI S V, PINTEA S, DAVID D. The relationship of anger and cognitive distortions with violence in violent offenders' population: a meta-analytic review [J]. *Eur J Psychol Appl Leg Context*, 2012, 4(1): 59-77.

[11] CHAMBERS J C, WARD T, ECCLESTON L, et al. The pathways model of assault: a qualitative analysis of the assault offender and offense [J]. *J Interpers Violence*, 2009, 24(9): 1423-1449.

[12] KHAN M M, HYDER A A. Suicides in the developing world: case study from Pakistan [J]. *Suicide Life Threat Behav*, 2006, 36(1): 76-81.

[13] BARON K G, SMITH T W, BUTNER J, et al. Hostility, anger, and marital adjustment: concurrent and prospective associations with psychosocial vulnerability [J]. *J Behav Med*, 2007, 30(1): 1-10.

[14] ALIA-KLEIN N, GAN G, GILAM G, et al. The feeling of anger: from brain networks to linguistic expressions [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 108: 480-497.

[15] CARLSON J M, GREENBERG T, MUJICA-PARODI L R. Blind rage? Heightened anger is associated with altered amygdala

- responses to masked and unmasked fearful faces [J]. *Psychiatry Res*, 2010, 182(3): 281–283.
- [16] GOUVEIA F V, HAMANI C, FONOFF E T, et al. Amygdala and hypothalamus: historical overview with focus on aggression [J]. *Neurosurgery*, 2019, 85(1): 11–30.
- [17] MURPHY F C, NIMMO-SMITH I, LAWRENCE A D. Functional neuroanatomy of emotions: a meta-analysis [J]. *Cogn Affect Behav Neurosci*, 2003, 3(3): 207–233.
- [18] 吴玥, 王珏, 冯婷婷, 等. 基于动物模型的药物筛选数据库的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(6): 778–786.
WU Y, WANG J, FENG T T, et al. Construction of a drug screening database based on animal models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(6): 778–786.
- [19] 须惠仁, 傅湘琦, 向丽华, 等. 肝郁证的动物实验研究——激怒刺激对大白鼠血液流变学的影响 [J]. *中医杂志*, 1991, 32(6): 44–47.
XU H R, FU X Q, XIANG L H, et al. Animal experimental study on the effect of irritation stimulation on the blood rheology of rats in liver depression syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 1991, 32(6): 44–47.
- [20] SHENG W Z, JIE G, LING X, et al. Impact of social isolation and resident intruder stress on aggressive behavior in the male rat [J]. *Neural Regen Res*, 2010, 5(15): 1175–1179.
- [21] 许丽, 刘晓伟, 董秋安, 等. 天麻钩藤饮对愤怒应激大鼠下丘脑内单胺类递质及其代谢产物含量的影响 [J]. *四川中医*, 2006, 24(6): 10–12.
XU L, LIU X W, DONG Q A, et al. Effect of Tian MaGouTeng Decoction on contents of monoamine neurotransmitter and their metabolite in hypothalamus of rats with anger stress [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2006, 24(6): 10–12.
- [22] SAGHIR Z, SYEDA J N, MUHAMMAD A S, et al. The amygdala, sleep debt, sleep deprivation, and the emotion of anger: a possible connection? [J]. *Cureus*, 2018, 10(7): e2912.
- [23] DERNTL B, WINDISCHBERGER C, ROBINSON S, et al. Amygdala activity to fear and anger in healthy young males is associated with testosterone [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(5): 687–693.
- [24] SCOTT S K, YOUNG A W, CALDER A J, et al. Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions [J]. *Nature*, 1997, 385(6613): 254–257.
- [25] BATRINOS M L. Testosterone and aggressive behavior in man [J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2012, 10(3): 563–568.
- [26] WAGELS L, VOTINOV M, KELLERMANN T, et al. Exogenous testosterone and the monoamine-oxidase A polymorphism influence anger, aggression and neural responses to provocation in males [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 156: 107491.
- [27] MOUSTAFA A A, GILBERTSON M W, ORR S P, et al. A model of amygdala-hippocampal-prefrontal interaction in fear conditioning and extinction in animals [J]. *Brain Cogn*, 2013, 81(1): 29–43.
- [28] SWANSON L W, PETROVICH G D. What is the amygdala? [J]. *Trends Neurosci*, 1998, 21(8): 323–331.
- [29] HALLER J. The role of central and medial amygdala in normal and abnormal aggression: a review of classical approaches [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 85: 34–43.
- [30] SILVA B A, GROSS C T, GRÄFF J. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization [J]. *Learn Mem*, 2016, 23(10): 544–555.
- [31] BUADES-ROTGER M, ENGELKE C, KRÄMER U M. Trait and state patterns of basolateral amygdala connectivity at rest are related to endogenous testosterone and aggression in healthy young women [J]. *Brain Imaging Behav*, 2019, 13(2): 564–576.
- [32] ZHU Z, MA Q, MIAO L, et al. A substantia innominata-midbrain circuit controls a general aggressive response [J]. *Neuron*, 2021, 109(9): 1540–1553.
- [33] JIA N, LI Q, SUN H, et al. Alterations of group I mGluRs and BDNF associated with behavioral abnormality in prenatally stressed offspring rats [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(5): 1074–1082.
- [34] DAVIDSON R J, PUTNAM K M, LARSON C L. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence [J]. *Science*, 2000, 289(5479): 591–594.
- [35] RAHM C, LIBERG B, WIBERG-KRISTOFFERSEN M, et al. Rostro-caudal and dorso-ventral gradients in medial and lateral prefrontal cortex during cognitive control of affective and cognitive interference [J]. *Scand J Psychol*, 2013, 54(2): 66–71.
- [36] KOENIGS M, GRAFMAN J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 201(2): 239–243.
- [37] TURRIZIANI P, SMIRNI D, ZAPPALÀ G, et al. Enhancing memory performance with rTMS in healthy subjects and individuals with Mild Cognitive Impairment: the role of the right dorsolateral prefrontal cortex [J]. *Front Hum Neurosci*, 2012, 6: 62.
- [38] ALIA-KLEIN N, GOLDSTEIN R Z, TOMASI D, et al. Neural mechanisms of anger regulation as a function of genetic risk for violence [J]. *Emotion*, 2009, 9(3): 385–396.
- [39] GILAM G, LIN T, RAZ G, et al. Neural substrates underlying the tendency to accept anger-infused ultimatum offers during dynamic social interactions [J]. *Neuroimage*, 2015, 120: 400–411.
- [40] ESHEL N, MARON-KATZ A, WU W, et al. Neural correlates of anger expression in patients with PTSD [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2021, 46(9): 1635–1642.
- [41] DENSON T F, PEDERSEN W C, RONQUILLO J, et al. The angry brain: neural correlates of anger, angry rumination, and aggressive personality [J]. *J Cogn Neurosci*, 2009, 21(4): 734–744.
- [42] ABU-AKEL A, SHAMAY-TSOORY S. Neuroanatomical and neurochemical bases of theory of mind [J]. *Neuropsychologia*, 2011, 49(11): 2971–2984.
- [43] FAVA M, VUOLO R D, WRIGHT E C, et al. Fenfluramine challenge in unipolar depression with and without anger attacks

- [J]. *Psychiatry Res*, 2000, 94(1): 9–18.
- [44] MOHAMMAD-ZADEH L F, MOSES L, GWALTNEY-BRANT S M. Serotonin: a review [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008, 31(3): 187–199.
- [45] OLIVIER B. Serotonin: a never-ending story [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 753: 2–18.
- [46] GASPAR P, LILLESAAER C. Probing the diversity of serotonin neurons [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367(1601): 2382–2394.
- [47] LOWRY C A. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. *J Neuroendocrinol*, 2002, 14(11): 911–923.
- [48] BANNAI M, FISH E W, FACCIDOMO S, et al. Anti-aggressive effects of agonists at 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus of mice [J]. *Psychopharmacology*, 2007, 193(2): 295–304.
- [49] FACCIDOMO S, BANNAI M, MICZEK K A. Escalated aggression after alcohol drinking in male mice: dorsal raphe and prefrontal cortex serotonin and 5-HT_{1B} receptors [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(12): 2888–2899.
- [50] VAN DER VEGT B J, LIEUWES N, VAN DE WALL E H, et al. Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats [J]. *Behav Neurosci*, 2003, 117(4): 667–674.
- [51] SAŁAT K, KULIG K, GAJDA J, et al. Evaluation of anxiolytic-like, anticonvulsant, antidepressant-like and antinociceptive properties of new 2-substituted 4-hydroxybutanamides with affinity for GABA transporters in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 110: 145–153.
- [52] NORTHOFF G, WITZEL T, RICHTER A, et al. GABA-ergic modulation of prefrontal spatio-temporal activation pattern during emotional processing: a combined fMRI/MEG study with placebo and lorazepam [J]. *J Cogn Neurosci*, 2002, 14(3): 348–370.
- [53] STAN A D, SCHIRDA C V, BERTOCCI M A, et al. Glutamate and GABA contributions to medial prefrontal cortical activity to emotion: implications for mood disorders [J]. *Psychiatry Res*, 2014, 223(3): 253–260.
- [54] LEWIS D A, HASHIMOTO T, VOLK D W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(4): 312–324.
- [55] ZHANG Q J, LIU X, LIU J, et al. Subthalamic neurons show increased firing to 5-HT_{2C} receptor activation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats [J]. *Brain Res*, 2009, 1256: 180–189.
- [56] 王海娟. 愤怒郁怒大鼠中缝背核 GABABR1 介导 GABA 调节下丘脑 5-HT 水平的机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2017.
- WANG H J. Study on the mechanism of GABA mediated by GABABR1 in nucleus raphes dorsalis accommodating 5-HT level in hypothalamic of anger-in and anger-out rats [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2017.
- [57] 刘小菊. 中缝背核 GABABR1 介导 GABA 调控愤怒、郁怒大鼠前额区 5-HT 水平的机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2017.
- LIU X J. The mechanism of the dorsal raphe nucleus GABABR1 mediated GABA regulating prefrontal cortex serotonin level in anger-out and anger-in male rats [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2017.
- [58] KWON C Y, SUH H W, KIM J W, et al. Anti-anger effects of herbal medicine: a mini-review of rat studies [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(3): 263–271.
- [59] HORJALES-ARAUJO E, DEMONTIS D, LUND E K, et al. Polymorphism in serotonin receptor 3B is associated with pain catastrophizing [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78889.
- [60] TURNER T J, MOKLER D J, LUEBKE J I. Calcium influx through presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates GABA release in the hippocampus: *in vitro* slice and synaptosome studies [J]. *Neuroscience*, 2004, 129(3): 703–718.
- [61] MCBRIDE W J, LOVINGER D M, MACHU T, et al. Serotonin-3 receptors in the actions of alcohol, alcohol reinforcement, and alcoholism [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2004, 28(2): 257–267.
- [62] 李红华. 经前舒颗粒对郁怒大鼠不同脑区 5-HTR3B 表达和 5-HT 含量的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2011.
- LI H H. Experimental study on 5-HTR3B expression levels and the content of 5-HT in different brain regions of model rats with anger-in [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2011.
- [63] 葛庆芳, 张惠云. 调肝方药对愤怒和郁怒情绪模型大鼠下丘脑 5-羟色胺 3B 受体表达的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2011, 9(8): 871–877.
- GE Q F, ZHANG H Y. Effects of Chinese herbal medicines for regulating liver qi on expression of 5-hydroxytryptamine 3B receptor in hypothalamic tissues of rats with anger emotion [J]. *J Integr Med*, 2011, 9(8): 871–877.
- [64] MASELLIS M, BASILE V, MELTZER H Y, et al. Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients [J]. *Neuropsychopharmacology*, 1998, 19(2): 123–132.
- [65] HEISLER L K, ZHOU L, BAJWA P, et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior [J]. *Genes Brain Behav*, 2007, 6(5): 491–496.
- [66] 高鹏, 张惠云. 调肝方药对愤怒、郁怒模型大鼠下丘脑 5-HTR2C 基因表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 120–124.
- GAO P, ZHANG H Y. Effects of Tiaogan Fangyao on expression of 5-HTR2C in hypothalamus of rats with anger-in/out constitution [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2011, 17(13): 120–124.
- [67] 徐月妹, 张岚, 肖茜, 等. 919 糖浆对肝郁气滞血瘀证模型大鼠脑胃 ghrelin 通路的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(5): 76–83.
- XU Y M, ZHANG L, XIAO Q, et al. Effects of 919 syrup on ghrelin pathway in hypothalamus and stomach in rats with liver-depression, qi-stagnation and blood-stasis syndrome [J].

- Shanghai J Tradit Chin Med, 2019, 53(5): 76–83.
- [68] 柳新, 薛玲. 经前平颗粒对愤怒模型大鼠皮质中 5-HTR2C 表达的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1248–1252.
- LIU X, XUE L. Effect of Jingqianping Granule on expression of 5-HTR2C in rat cerebral cortex with anger emotion [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2012, 27(5): 1248–1252.
- [69] 崔维刚. 调肝方药对愤怒和郁怒情绪模型大鼠不同脑区 5-HTR2C 表达水平的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2011.
- CUI W G. Expressions of 5-HTR2C in different brain regions of the model rats with anger-out or anger-in and effects of liver-regulating compound recipe [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2011.
- [70] 姜英凤, 薛玲. 经前平和经前舒颗粒对愤怒郁怒情绪模型大鼠下丘脑 γ 氨基丁酸 B₂ 受体表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 474–478.
- JIANG Y F, XUE L. Effect of jingqianping granules and jingqianshu granules on expression of hypothalamic γ -aminobutyric acid B₂ receptor in emotional rats models of anger-out and anger-in [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2011, 22(5): 474–478.
- [71] 宗绍波, 魏盛, 孙鹏, 等. 经前平颗粒对愤怒情绪模型大鼠不同脑区单胺类神经递质的影响及分析 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(11): 1615–1619.
- ZONG S B, WEI S, SUN P, et al. Effect of Jingqianping Granule on monoamine neurotransmitters in different brain regions of anger-out model rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(11): 1615–1619.
- [72] 余霞, 王建. 丹莪妇康煎膏对愤怒模型大鼠下丘脑多巴胺、去甲肾上腺素及 5-羟色胺含量的影响 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(14): 94–95.
- YU X, WANG J. Effects of Dan'e Fukang Decoction on the contents of dopamine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in hypothalamus of anger model rats [J]. Guide China Med, 2013, 11(14): 94–95.
- [73] 薛刚. 社会隔离及居住入侵法诱导大鼠愤怒郁怒情绪反应及其评价方法 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2011.
- XUE G. Establishment and evaluative of anger-out and anger-in induced by social isolation and resident intruder stress [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2011.
- [74] KNIERIM J J. The hippocampus [J]. Curr Biol, 2015, 25(23): R1116–R1121.
- [75] NIKOLIC M, PEZZOLI P, JAWORSKA N, et al. Brain responses in aggression-prone individuals: a systematic review and meta-analysis of functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies of anger- and aggression-eliciting tasks [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2022, 119: 110596.
- [76] GREENE J, BANASR M, LEE B, et al. Vascular endothelial growth factor signaling is required for the behavioral actions of antidepressant treatment: pharmacological and cellular characterization [J]. Neuropsychopharmacology, 2009, 34(11): 2459–2468.
- [77] SUN P, WEI S, WEI X, et al. Anger emotional stress influences VEGF/VEGFR2 and its induced PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Neural Plast, 2016, 2016: 4129015.
- [78] 杨军平, 王莹, 肖亮. 柴胡疏肝散调节“怒伤肝”大鼠信号传导通路机制 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3002–3005.
- YANG J P, WANG Y, XIAO L. The mechanism of Chaihu Shugan Powder regulating the signal transduction pathway in rats with “angry injury live” [J]. Int J Lab Med, 2018, 39(24): 3002–3005.
- [79] 王杰琼, 张惠云. 愤怒、郁怒反应模型大鼠海马 5-HTR2C 的基因表达 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3): 325–328.
- WANG J Q, ZHANG H Y. The expression of 5-HTR2C in the hippocampal of the anger-in and anger-out animal model [J]. Chin Pharmacol Bull, 2011, 27(3): 325–328.
- [80] 蔡洪信, 许莉莉, 田溪, 等. 白香丹胶囊对愤怒情绪模型大鼠海马 GABABR 和腺苷酸环化酶表达的影响 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1007–1010.
- CAI H X, XU L L, TIAN X, et al. Effect of Baixiangdan Capsule on expressions of GABABR adenylate cyclase in hippocampus of rats with anger-out emotion [J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 34(6): 1007–1010.
- [81] 耿燕楠. 经前平颗粒对愤怒情绪反应大鼠模型 γ -氨基丁酸 B₂ 受体表达的影响及真核表达载体的构建 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2011.
- GENG Y N. Effects of Jingqianping granules on γ -aminobutyric acid B₂ receptor expression in a rat model of anger emotional reaction and construction of eukaryotic expression vector [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2011.
- [82] 许莉莉, 蔡洪信, 高杰, 等. 白香丹胶囊对愤怒情绪模型大鼠海马 GABABR 和 KIR 表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 267–270.
- XU L L, CAI H X, GAO J, et al. Effect of baixiangdan capsule on expression of GABABR and KIR in hippocampus of anger-out rat models [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2012, 23(3): 267–270.
- [83] 殷慧敏. 白香丹胶囊对愤怒情绪模型大鼠海马、额叶脑区中 VEGF 及其受体(Flk-1)表达的影响 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2014.
- YIN H M. Influence of BXD capsule on VEGF and Flk-1 expression in hippocampus and frontal cortex of anger-out model rats [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2014.

贾新傲,唐玉娇. 肌少症小鼠模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 404-410.

JIA X A, TANG Y J. Research progress in mouse models of sarcopenia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 404-410.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.015

肌少症小鼠模型的研究进展

贾新傲^{1,2}, 唐玉娇^{1,3*}

(1. 吉林省中韩动物科学研究院, 长春 130600; 2. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 长春 130118; 3. 长春科技学院生命科学学院, 长春 130600)

【摘要】 通过对肌少症相关文献检索, 总结出肌少症小鼠造模方法与模型评价方案。对药物注射、衰老、肌肉萎缩和转基因 4 种造模方式的操作、优缺点、适用范围进行综述, 总结肌肉功能、肌肉力量、肌肉耐力 3 种肌少症小鼠模型的评价方式, 对比其优缺点, 以期对肌少症的后继研究提供参考。

【关键词】 肌少症; 动物模型; 骨骼肌衰老; 造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0404-07

Research progress in mouse models of sarcopenia

JIA Xinao^{1,2}, TANG Yujiao^{1,3*}

(1. Jilin Sino-Rok Institute of Animal Science, Changchun 130600, China; 2. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. College of Life Science, Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China)

Corresponding author: TANG Yujiao. E-mail: 149038681@qq.com

【Abstract】 We searched the literature related to sarcopenia to retrieve information on modeling method and model-evaluation schemes using sarcopenic mice. Here, we review the operation method, advantages and disadvantages, and application scopes of the four modeling method, including drug injection, aging, muscle atrophy, and transgenic mice, and summarize the method used to evaluate muscle function, muscle strength, and muscle endurance. We then compare their advantages and disadvantages, to provide a reference for subsequent research into sarcopenia.

【Keywords】 sarcopenia; animal model; skeletal muscle aging; modeling method

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

肌少症(sarcopenia)又称肌肉衰减综合征,最初定义仅考虑肌肉质量的损失,2018年欧洲老年人肌少症工作组将肌少症定义为老年常发性肌肉疾病,主要表现为肌肉力量降低、肌肉质量下降、肌肉功能减退^[1]。研究表明60岁以下人群的患病率为8%~36%,60岁以上的患病率为10%~27%,此疾病易导致老年人自理能力下降、跌倒、骨折、残疾甚至死亡^[2]。在老年人中更为普遍,但肌肉质量的下降从40岁就开始。国内外学者对于肌少症发

病机制进行了一系列研究,认为年龄^[3]、氧化应激^[4]、泛素-蛋白酶体系统^[5]、雷帕霉素信号通路^[6]、肌肉生长抑制素含量^[7]等均与肌少症的发生存在一定的关系。目前肌少症的发生机制尚无统一的定论,也有可能为多种因素联合,且无确切的治疗方法^[8],建模方法作为该研究的基础,需进行深入地研究,因此本文从模型建造的方法与评估方式进行归纳总结,综述其适用条件,以期对肌少症小鼠模型建立及评估提供思路。

【基金项目】 吉林省科学计划项目(20210202130NC)。

Funded by Jilin Provincial Department of Science and Technology(20210202130NC)。

【作者简介】 贾新傲,男,在读硕士研究生,研究方向:肌少症基础研究、功能性食品研究。Email:2549865189@qq.com

【通信作者】 唐玉娇,女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:食品科学功能探究及功能性食品开发及相关领域研究。

Email:149038681@qq.com

1 肌少症动物模型

肌少症建模常用动物有大鼠^[9]、小鼠^[10]、线虫^[11]、恒河猴^[12]、斑马鱼^[13]、猪^[14]、牛^[15]、果蝇^[16]等。但均存在一定的局限性,小鼠模型应用最为广泛,其原因在于小鼠衰老过程与人有相似之处,且研究成本低、时间短^[17]。根据不同的实验方式,将肌少症建模方法分为以下 4 类。

1.1 药物注射模型

药物注射指将诱导肌肉衰老的物质注射至动物体内,从而诱发肌少症,目前使用地塞米松与 D-半乳糖作为诱导剂的研究较多。

地塞米松(dexamethasone)是一种人工合成的糖皮质激素,具有抗炎、抗毒素、免疫抑制、抗过敏等作用^[18],长期大量注射地塞米松会导致骨骼肌蛋白降解,同时抑制骨骼肌蛋白合成而造成骨骼肌萎缩、肌肉质量减少、肌力减弱^[19]。LEE 等^[20]证明使用地塞米松对小鼠腹腔注射将导致其瘦肉组织占比下降、腓肠肌萎缩表明建模的可行性。此建模方法多采用幼龄小鼠,其引发的肌肉力量与功能的变化与人体相近,体重下降的表现与人体老年型肌少症有着些许不同^[21],且分子机制方面与自然衰老存在着不同^[22]。目前国内外对此方法的认可度较高,但需对给药剂量与时长进行探究。

D-半乳糖(D-galactose)是一种还原性糖,被用于小鼠衰老模型建立^[23]。王婧^[24]发现 D-半乳糖干预会导致小鼠肌肉力量下降,运动能力减弱等。除此之外,小鼠还表现出衰老的一系列症状^[25],其原理为 D-半乳糖影响功能性代谢,导致机体出现类似衰老的生理变化^[26]。此方法可逐渐增加衰老的程度,但对小鼠机体的恢复能力影响不大,如需研发肌少症治疗药物需对此点进行关注。

1.2 衰老模型

衰老是肌少症的主要影响因素^[27],因此衰老模型被广泛应用于肌少症的模型建立,目前较为常用的衰老模型建立主要通过运用自然衰老小鼠、快速老化小鼠、高脂喂养等方式。

自然衰老模型因其肌肉萎缩形态与老年人的形态最为接近,而且因其操作简单常被用于肌少症的研究。OH 等^[28]研究发现老年小鼠的肌肉力量、质量和纤维大小明显低于年轻小鼠,可判定为肌少症。小鼠预期寿命为 24 个月,15 月龄小鼠相当于人体 50 岁,而雌激素的缺乏会导致肌少症的发

生^[29]。因此 15 月龄以上的雄性小鼠为最优选择。

快速老化小鼠的生存期短,在老年期表现出与老年人一样的衰老特征,建模时长也需 6 ~ 8 个月。NOGUCHI 等^[30]将快速老化小鼠饲喂至 35 周龄,通过测定其肌肉质量、肌纤维横截面积及控制骨骼肌分解的蛋白水平证明其处于肌少症的患病状态。此模型被广泛应用于运动对肌少症的干预作用^[31]及新药物治疗肌少症的评估^[32]。

高脂喂养模型与其他衰老模型建立方法相比,时间相对较短,DOWLING 等^[33]对小鼠喂养高脂饲料 8 周,发现其体重升高,耐力下降,肌肉质量比下降。PERRY 等^[34]高脂喂养后同样发现其肌肉质量下降,同时其心脏的重量将会增加。除此之外长时间的高脂饲养将会对肝^[35]、肾^[36]等造成损伤,因此此方法使用较少。

1.3 肌肉萎缩模型

肌肉萎缩模型指通过去神经或固定关节导致的失神经性或废用性肌少症。此方法建模时间短,对设施要求低,但对实验人员的操作要求较高。

手术切除法是指通过切除小鼠腿部运动神经构建小鼠肌少症模型的方法,运动神经是控制骨骼肌生长发育的重要因素,去神经元会导致肌细胞形态和结构异常,从而导致肌无力,诱发肌少症。JEONG 等^[37]横断小鼠右后腿坐骨神经发现小鼠肌肉纤维萎缩,形态和结构紊乱。切除坐骨神经会导致血清指标血管生成素样蛋白增加,同时活性氧的含量减少^[38],这两种物质的含量与骨骼肌萎缩相关。由于小鼠体型过小,导致切除小鼠腿部神经的操作对手术者要求高,因此研究者多采用大鼠建模。

后肢卸载模型是航天事业为模拟失重状态开发的一种动物模型。方法为将鼠尾固定至金属转盘上,使小鼠后肢抬起,15 d 就会导致骨骼肌萎缩^[39]。但此模型导致的 I 型肌肉萎缩,与衰老导致 II 型肌肉萎缩并不一致,且对小鼠的恢复能力并没有影响^[40]。此模型在应对卧床、微重力或不活动状态下的肌少症效果良好。

固定关节模型是指模拟骨折后石膏固定关节而构建的废用性肌少症模型,用石膏绷带固定小鼠腿部导致小鼠腿部无法活动,从而诱发肌少症。BURKS 等^[41]用手术钉固定住小鼠腿部关节 21 d,发现固定后的肌肉减少是因为骨骼肌肌肉纤维的损失并不是肌肉纤维发生萎缩。固定关节可以很好的模仿患者患病在床的肌少症,但是其发病特征

与老年性肌少症特征有所区别,在对于老年形态的肌少症的研究中,此模型并不适用。

1.4 转基因模型

肌少症的发生与氧化应激、炎症、线粒体功能障碍密切相关。转基因模型通过控制基因表达,影响小鼠的肌肉含量,其优点在于与快速老化小鼠相比其建模时间更短。此方法包括基因敲除模型与基因过表达模型。

基因敲除模型是指将目的基因敲除或者其他基因替换目的基因从而构建小鼠模型,通过敲除小鼠体内白细胞介素 10,导致小鼠寿命变短老化速度加快,但问题在于小鼠会伴随小肠的炎症反应^[42]。AHN 等^[43]发现超氧化物歧化酶 1 的缺失会导致小鼠肌肉质量下降,其原因在于氧化应激将导致小鼠体内代谢失衡,从而减少骨骼肌蛋白质合成。视神经萎缩蛋白 1(opticatrophy 1,OPA1)和发动蛋白相关蛋白 1(dynamin-related protein1 1,DRP1)基因双敲除小鼠的腓肠肌与比目鱼肌都会出现质量减少

的症状^[44],同时使小鼠发生全身炎症反应、加快衰老导致寿命减少^[45]。

基因过表达模型是通过人为增加小鼠体内目的基因的表达,从而诱发肌少症。一些研究发现体内的炎症因子的过多积累会导致肌少症的发生,比如肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6^[46]、C-反应蛋白、白细胞介素-1 β 等。LI 等^[47]研究发现通过对小鼠的 TNF 基因进行替换会导致小鼠腓肠肌中 TNF- α 水平升高,与此同时小鼠的肌力下降,同时发现老年小鼠的胫骨前肌、比目鱼肌和腓肠肌的质量相比年轻小鼠低。YOSHIDA 等^[48]发现 Wnt/ β -catenin 信号通路激活会导致小鼠的肌肉发生萎缩,(前)肾素受体((pro)renin receptor,(P)RR)表达可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而导致小鼠的肌少症。通过抑制(P)RR 的表达可以改善老年性肌肉萎缩。研究人员可根据研究目的挑选不同的转基因小鼠模型。

根据表 1 可知,4 种建模方法各有优缺,研究者

表 1 肌少症建模方法及特点
Table 1 Modeling methods and characteristics of sarcopenia

建模方法 Modeling method		优势 Dominance	不足 Deficiency	适用型 Applicable	参考文献 Reference
药物注射模型 Drug injection model	地塞米松 Dexamethasone	耗时短,操作简便 Short time-consuming, simple operation	存在并发症,易死亡 There are complications, easy to death		[20-22]
	D-半乳糖 D-galactose	耗时短,操作简单 Short time-consuming, simple operation	新颖,报道较少 Novel, less reported		[24-26]
转基因模型 Transgenic model	基因敲除 Gene knock-out	成功率高,耗时短 High success rate, short time-consuming	技术复杂 Technical sophistication	老年型 Veteran form	[43-45]
	基因过表达 Gene overexpression	成功率高,耗时短 High success rate, short time-consuming	技术复杂 Technical sophistication		[47-48]
衰老模型 Aging model	自然衰老 Natural aging	成功率高,与人体相似 High success rate, similar to the human body	时间成本过高 High time cost		[28-29]
	快速衰老 Rapid aging model	耗时短 Short time-consuming	模型建造复杂 Model construction is complex		[30-31]
	高脂喂养 High fat diet	花费低,操作简单 Low cost, simple operation	导致并发症 Lead to complications	肥胖型 Obesity	[33-34]
肌肉萎缩模型 Muscle atrophy model	手术 Operation	造模时间短,成功率高 Modeling time is short, success rate is high	难度大,易感染 Difficult and susceptible to infection	神经缺失型 Nervous absence type	[37-38]
	后肢卸载 Hindlimb unloading	耗时短,费用低 Short time-consuming, low cost	需专业设备 Need professional equipment,	失用型 Lost-use type	[39-40]
	固定关节 Fixed joints	耗时短,费用低 Short time-consuming, low cost	需专业设备 Need professional equipment		[41]

应根据研究内容(病理生理学及其进展或评估治疗效果)、预算、设备和时间要求选用合适的建模方法。

2 肌少症模型评价方案

模型的成功构建是实验研究的第一步,在建造小鼠模型时失误将导致造模失败,影响后续研究;若用造模失败的小鼠进行研究,可能会导致实验与理论结果出现较大差距,甚至对后续的检测、研究、

开发产生极大影响,所以对小鼠模型进行评价是实验中极为重要的一步。肌少症的临床表现为肌肉质量下降、握力降低、步速下降等^[49],目前对小鼠肌少症的评价主要是从肌肉功能、质量和力量 3 个方向。腓肠肌是下肢活动的重要肌肉,对于其骨骼肌的研究多数用腓肠肌作为代表^[50],还可在此基础上测定其比目鱼肌、胫骨前肌等作为小鼠肌少症模型评判标准。常用的模型评价方案,见表 2。

表 2 小鼠肌力评测方法
Table 2 Mice muscle strength evaluation method

测评方法 Evaluation method	测量指标 Indicators of measurement	优势 Dominance	不足 Deficiency	参考文献 References
肌肉力量 Muscular strength	抓力仪 Grab force meter	简单,方便快捷,指标明确 Simple, convenient and quick, clear indicators	需进行训练 Need to be trained	[51-53]
	网格实验 Grid test	简单,价格低廉 Simple, low price	测试时间久 Test time is long	[54-55]
	强迫游泳 Forced swimming	简单,便捷,价格低廉 Simple, convenient and cheap	会造成小鼠死亡,血液获取困难 Cause death of mice, difficulty in obtaining blood	[56]
肌肉质量 Muscle mass	电子计算机断层扫描 Computed tomography	速度快,空间分辨率高 Fast speed and high spatial resolution	辐射剂量高,设备成本高 High radiation dose, high equipment cost	[57-58]
	双能 X 射线吸收法 Dual energy X-ray absorptiometry	精度高,时间短,辐射低 High precision, short time, low radiation	设备昂贵,技术难度高 Equipment is expensive, technical difficulty is high	[59-60]
	核磁共振 Magnetic resonance imaging	准确度高,无辐射,软组织分辨率高 High accuracy, no radiation, high soft tissue resolution.	耗时长,设备成本高 Takes a long time, the equipment cost is high	[61]
肌肉功能 Muscle function	转棒式疲劳仪 Rotary rod fatigue tester	操作简单,方便快捷,指标明确 Operation is simple, convenient and quick, the index is clear	需进行训练 Need to be trained	[62]
	跑步机 Treadmill	操作简单,使用方便快捷,指标明确 Operation is simple, convenient and quick to use, clear indicators	需进行训练 Need to be trained	[63]

2.1 肌肉力量

肌肉力量欧洲老年人肌少症工作组在 2019 年修订了肌少症的定义,将肌肉力量下降作为肌少症的重要评价标准^[1]。目前常用的小鼠肌力的评测方法有测定抓力、耐力等。测定抓力的方法有抓力仪测定实验^[50]、网格测试^[64]等。肌肉耐力的测定方法有强迫游泳实验、举重实验等。小鼠抓力仪测定肌力的方法为将小鼠放置于小鼠抓力仪上,水平向后拉动鼠尾,测定 3 次后取平均值或最大值记录小鼠抓力^[52],此方法分为测定前肢抓力与四肢抓力^[53]。网格测试操作步骤为将小鼠放置于网格间

距为 12 mm 的铁丝网中间后倒置铁丝网,记录小鼠在铁丝网上停留时间^[54],采用此种测试方法可测定小鼠的肌肉耐力与四肢抓力^[55]。强迫游泳实验是指将小鼠尾部绑上重物,放置于泳池内,在其 5 s 内无法浮出水面时记录其游泳时间^[56]。其中抓力因直观、简便在肌少症的模型检测方面较为常用,强迫游泳虽操作简单,但测试时易导致小鼠死亡。实验过程中需注意小鼠成长期间的体重变化,在实际操作中应排除体重带来的影响。

2.2 肌肉质量

目前双能 X 线吸收 (dual energy X-ray

absorptiometry, DXA)、计算机断层扫描 (computed tomography, CT)、磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI), 可用于评估肌肉质量 DXA 是临床中最常用的诊断方式, 这些影像学测定方法同样也适用于小鼠^[65]。VAN DER HEYDEN 等^[57]研究表明 CT 配合计算机算法可以准确的测定出小鼠的肌肉含量, PASETTO 等^[58]研究出无需造影剂采用 CT 扫描测定肌肉含量的方法可广泛用于小鼠肌肉含量测定。DXA 法可以在无创条件下测定小鼠的肌肉与脂肪含量^[59], 此方法对人体辐射小, 实验结果精确, 测试时间短^[60]。MRI 测定小鼠也是通过无创的方式进行, 对软组织分辨率高, 可以准确的测定肌肉含量^[61]。其中 CT 与 MIR 可以最直接、最准确地测量骨骼肌质量, 但使用方法成本较高。与人体不同, 小鼠还可以通过解剖的方式对肌肉质量进行测量。

2.3 肌肉功能

通过测量步行 4 或 6 m 所使用的时间可以测量小鼠的肌肉功能^[66], 可以采用小鼠转棒式疲劳仪、小鼠跑步机间接测量小鼠的步速, 小鼠跑步实验是指将小鼠放置于跑步机上, 每 2 min 增加 0.2 m/s 的速度直至小鼠在电网停留超过 10 s 记录跑步时间和距离^[67]。转棒式疲劳仪是通过测定小鼠在机器上掉落时的速度来测定小鼠步数^[63]。水迷宫法也可以在很大程度上反映肌肉功能, 多用来测量小鼠的学习记忆能力^[68], 也可做为评估肌少症小鼠的肌肉功能检测方法。

3 小结与展望

肌少症小鼠模型的建立对于研究肌少症的生理病理变化具有重大意义。肌少症小鼠模型的建立包括药物注射、衰老模型、转基因模型及骨骼肌萎缩模型等各有优缺点。需针对实验需求确定合适的建模方法。模型建造成功与否需要正确的评判标准, 目前的评价标准主要从肌肉力量、质量及功能 3 个方面出发。模型建造的研究有一定进展, 但对肌少症作用机制、治疗方案仍存在问题, 因此需对肌少症的造模方法进行进一步探究, 探究适用于各类型的造模方法, 并制定统一的评价标准。

参 考 文 献 (References)

[1] CRUZ-JENTOFT A J, BAHAT G, BAUER J, et al. Sarcopenia; revised European consensus on definition and diagnosis [J]. Age Ageing, 2019, 48(4): 601.
[2] PETERMANN-ROCHA F, BALNTZI V, GRAY S R, et al.

Global prevalence of sarcopenia and severe sarcopenia: a systematic review and meta-analysis [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2022, 13(1): 86-99.
[3] GUO M, YAO J, LI J, et al. Irisin ameliorates age-associated sarcopenia and metabolic dysfunction [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2023, 14(1): 391-405.
[4] FERRI E, MARZETTI E, CALVANI R, et al. Role of age-related mitochondrial dysfunction in sarcopenia [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5236.
[5] PARK J, CHO J, SONG E J. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment [J]. Arch Pharm Res, 2020, 43(11): 1144-1161.
[6] LE BACQUER O, COMBE K, PATRAC V, et al. 4E-BP1 and 4E-BP2 double knockout mice are protected from aging-associated sarcopenia [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(3): 696-709.
[7] ABATI E, MANINI A, COMI G P, et al. Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(7): 374.
[8] HARDEE J P, LYNCH G S. Current pharmacotherapies for sarcopenia [J]. Expert Opin Pharmacother, 2019, 20(13): 1645-1657.
[9] YAMAMOTO S, HONMA K, FUJII M, et al. SHRSP5/Dmcr rats fed a high-fat and high-cholesterol diet develop disease-induced sarcopenia as nonalcoholic steatohepatitis progresses [J]. Ann Anat, 2023, 249: 152104.
[10] TONG L, OZES B, MOSS K, et al. AAV1.NT-3 gene therapy in the SOD1KO mouse model of accelerated sarcopenia [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2023, 14(5): 2204-2215.
[11] GAFFNEY C J, POLLARD A, BARRATT T F, et al. Greater loss of mitochondrial function with ageing is associated with earlier onset of sarcopenia in *C. elegans* [J]. Aging, 2018, 10(11): 3382-3396.
[12] COLMAN R J, MCKIERNAN S H, AIKEN J M, et al. Muscle mass loss in *Rhesus* monkeys: age of onset [J]. Exp Gerontol, 2005, 40(7): 573-581.
[13] DAYA A, DONAKA R, KARASIK D. Zebrafish models of sarcopenia [J]. Dis Model Mech, 2020, 13(3): dmm042689.
[14] GARCIA-CONTRERAS C, VAZQUEZ-GOMEZ M, TORRES-ROVIRA L, et al. Characterization of ageing- and diet-related swine models of sarcopenia and sarcopenic obesity [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 823.
[15] DE BIASE D, PIEGARI G, PRISCO F, et al. Implication of the NLRP3 inflammasome in bovine age-related sarcopenia [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3609.
[16] DELRIO-LORENZO A, ROJO-RUIZ J, ALONSO M T, et al. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ decreases with age and correlates with the decline in muscle function in *Drosophila* [J]. J Cell Sci, 2020, 133(6): jcs240879.
[17] BAEK K W, JUNG Y K, KIM J S, et al. Rodent model of muscular atrophy for sarcopenia study [J]. J Bone Metab, 2020,

- 27(2): 97–110.
- [18] PRATIWI R, CHARLIE V, SAPTARINI N M, et al. A polymer-based indicator for detecting dexamethasone in herbal medicine using polymethylmethacrylate (PMMA) [J]. *Polymers*, 2023, 15(13): 2862.
 - [19] CÁMARA C I, CROSIO M A, JUAREZ A V, et al. Dexamethasone and dexamethasone phosphate; effect on DMPC membrane models [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 844.
 - [20] LEE H, KIM Y I, NIRMALA F S, et al. *Chrysanthemum zawadskii* Herbich attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy through the regulation of proteostasis and mitochondrial function [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 136: 111226.
 - [21] SHEN S, LIAO Q, LIU J, et al. Myricanol rescues dexamethasone-induced muscle dysfunction via a sirtuin 1-dependent mechanism [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10(2): 429–444.
 - [22] ZHOU J, CHONG S Y, LIM A, et al. Changes in macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and mitochondrial metabolism in murine skeletal and cardiac muscle during aging [J]. *Aging*, 2017, 9(2): 583–599.
 - [23] JI C, YANG Y, FU Y, et al. Improvement of *Ganoderma lucidum* water extract on the learning and memory impairment and its mechanism in d-galactose-induced aging mice [J]. *J Funct Foods*, 2022, 99: 105322.
 - [24] 王婧. D-半乳糖对肌肉衰减综合征的诱导效应和抗肌肉衰减因子研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心; 2019.
WANG J. Study on the induced effect of D- galactose on muscle attenuation syndrome and its anti-muscle attenuation factor [D]. Beijing: China Center for Disease Control and Prevention; 2019.
 - [25] 梁美婷, 王可欣, 吕思敏, 等. 黄芪果糖制剂对 D-半乳糖衰老模型小鼠肌肉与骨骼的影响 [J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2485–2489.
LIANG M T, WANG K X, LYU S M, et al. Effects of *Astragalus fructose* preparation on muscle and bone of D- galactose aging model mice [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(9): 2485–2489.
 - [26] 张梦. 杜仲提取物提取工艺研究及对肌少症模型小鼠的治疗作用和机制研究 [D]. 成都: 西华大学; 2021.
ZHANG M. Study on the extraction process of *Eucommia ulmoides* extract and its therapeutic effect and mechanism on sarcopenia model mice [D]. Chengdu: Xihua University; 2021.
 - [27] GHARPURE M, CHEN J, NERELLA R, et al. Sex-specific alteration in human muscle transcriptome with age [J]. *Geroscience*, 2023, 45(3): 1303–1316.
 - [28] OH H J, JIN H, LEE B Y. Hesperidin ameliorates sarcopenia through the regulation of inflammaging and the AKT/mTOR/FoxO3a signaling pathway in 22-26-month-old mice [J]. *Cells*, 2023, 12(15): 2015.
 - [29] YOH K, IKEDA K, HORIE K, et al. Roles of estrogen, estrogen receptors, and estrogen-related receptors in skeletal muscle; regulation of mitochondrial function [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1853.
 - [30] NOGUCHI M, KITAKAZE T, KOBAYASHI Y, et al. β -cryptoxanthin improves p62 accumulation and muscle atrophy in the soleus muscle of senescence-accelerated mouse-prone 1 mice [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2180.
 - [31] AOKI K, KONNO M, HONDA K, et al. Habitual aerobic exercise diminishes the effects of sarcopenia in senescence-accelerated mice Prone8 model [J]. *Geriatrics (Basel)*, 2020, 5(3): 48.
 - [32] ONISHI S, ISHINO M, KITAZAWA H, et al. Green tea extracts ameliorate high-fat diet-induced muscle atrophy in senescence-accelerated mouse prone-8 mice [J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195753.
 - [33] DOWLING P, GARGAN S, SWANDULLA D, et al. Fiber-type shifting in sarcopenia of old age: proteomic profiling of the contractile apparatus of skeletal muscles [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2415.
 - [34] PERRY R A Jr, BROWN L A, HAYNIE W S, et al. Cardiac hypertrophy in sarcopenic obese C57BL/6J mice is independent of Akt/mTOR cellular signaling [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 111: 122–132.
 - [35] MAO H, WANG W, XIANG X, et al. Analysis of metabolite distribution in rat liver of high-fat model by mass spectrometry imaging [J]. *Metabolites*, 2023, 13(3): 411.
 - [36] YANG Y, YU J, HUO J, et al. Protective effects of peanut skin extract on high-fat and high-fructose diet-induced kidney injury in rats [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2023, 32(8): 1091–1099.
 - [37] JEONG J S, KIM J W, KIM J H, et al. Korean red ginseng suppresses mitochondrial apoptotic pathway in denervation-induced skeletal muscle atrophy [J]. *J Ginseng Res*, 2024, 48(1): 52–58.
 - [38] ZHAO J, TIAN Z, KADOMATSU T, et al. Age-dependent increase in angiopoietin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(5): 1596–1609.
 - [39] OLIVEIRA J R S, MOHAMED J S, MYERS M J, et al. Effects of hindlimb suspension and reloading on gastrocnemius and soleus muscle mass and function in geriatric mice [J]. *Exp Gerontol*, 2019, 115: 19–31.
 - [40] BROOKS M J, HAJIRA A, MOHAMED J S, et al. Voluntary wheel running increases satellite cell abundance and improves recovery from disuse in gastrocnemius muscles from mice [J]. *J Appl Physiol*, 2018, 124(6): 1616–1628.
 - [41] BURKS T N, ANDRES-MATEOS E, MARX R, et al. Losartan restores skeletal muscle remodeling and protects against disuse atrophy in sarcopenia [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(82): 82ra37.
 - [42] DEEPA S S, BHASKARAN S, ESPINOZA S, et al. A new mouse model of frailty: the Cu/Zn superoxide dismutase knockout mouse [J]. *Geroscience*, 2017, 39(2): 187–198.
 - [43] AHN B, SMITH N, SAUNDERS D, et al. Using MRI to measure *in vivo* free radical production and perfusion dynamics in a mouse model of elevated oxidative stress and neurogenic atrophy [J]. *Redox Biol*, 2019, 26: 101308.

- [44] ROMANELLO V, SCALABRIN M, ALBIERO M, et al. Inhibition of the fission machinery mitigates OPA1 impairment in adult skeletal muscles [J]. *Cells*, 2019, 8(6): 597.
- [45] FAVARO G, ROMANELLO V, VARANITA T, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2576.
- [46] BIAN A L, HU H Y, RONG Y D, et al. A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF- α [J]. *Eur J Med Res*, 2017, 22(1): 25.
- [47] LI J, YI X, YAO Z, et al. TNF receptor-associated factor 6 mediates TNF α -induced skeletal muscle atrophy in mice during aging [J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(8): 1535–1548.
- [48] YOSHIDA N, ENDO J, KINOUCHI K, et al. (Pro) renin receptor accelerates development of sarcopenia via activation of Wnt/YAP signaling axis [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(5): e12991.
- [49] BILSKI J, PIERZCHALSKI P, SZCZEPANIK M, et al. Multifactorial mechanism of sarcopenia and sarcopenic obesity. role of physical exercise, microbiota and myokines [J]. *Cells*, 2022, 11(1): 160.
- [50] SMITH J A B, MURACH K A, DYAR K A, et al. Exercise metabolism and adaptation in skeletal muscle [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(9): 607–632.
- [51] WANG P, KANG S Y, KIM S J, et al. Monotropin improves dexamethasone-induced muscle atrophy via the AKT/mTOR/FOXO3a signaling pathways [J]. *Nutrients*, 2022, 14(9): 1859.
- [52] CHANG Y C, CHEN Y T, LIU H W, et al. Oligonol alleviates sarcopenia by regulation of signaling pathways involved in protein turnover and mitochondrial quality [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(10): e1801102.
- [53] TAKESHITA H, YAMAMOTO K, NOZATO S, et al. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42323.
- [54] SHANG G K, HAN L, WANG Z H, et al. Sarcopenia is attenuated by TRB3 knockout in aging mice via the alleviation of atrophy and fibrosis of skeletal muscles [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2020, 11(4): 1104–1120.
- [55] WANG Q Q, JING X M, BI Y Z, et al. Human umbilical cord wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells may attenuate sarcopenia in aged mice induced by hindlimb suspension [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9272–9281.
- [56] QIN Y, LI H, ZHANG Y, et al. Retigabine promotes ketamine's antidepressant effect in the forced swim test in male and female C57BL/6J mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2023, 230: 173590.
- [57] VAN DER HEYDEN B, VAN DE WORP W R P H, VAN HELVOORT A, et al. Automated CT-derived skeletal muscle mass determination in lower hind limbs of mice using a 3D U-Net deep learning network [J]. *J Appl Physiol*, 2020, 128(1): 42–49.
- [58] PASETTO L, OLIVARI D, NARDO G, et al. Micro-computed tomography for non-invasive evaluation of muscle atrophy in mouse models of disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0198089.
- [59] KISHI K, GOTO M, TSURU Y, et al. Noninvasive monitoring of muscle atrophy and bone metabolic disorders using dual-energy X-ray absorptiometry in diabetic mice [J]. *Exp Anim*, 2023, 72(1): 68–76.
- [60] COLE C L, BECK C A, ROBINSON D, et al. Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) as a longitudinal outcome measure of cancer-related muscle wasting in mice [J]. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0230695.
- [61] BAEK K W, KIM J S, PARK J S, et al. Validation of dual energy X-ray absorptiometry and nuclear magnetic resonance in the analysis of body composition in mice [J]. *J Bone Metab*, 2020, 27(4): 291–299.
- [62] CAMPOS F, ABRIGO J, AGUIRRE F, et al. Sarcopenia in a mice model of chronic liver disease: role of the ubiquitin-proteasome system and oxidative stress [J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(10): 1503–1519.
- [63] LEE H, LEE K S, JEONG J H, et al. Extract of *Alnus japonica* prevents dexamethasone-induced muscle atrophy in mice [J]. *J Funct Foods*, 2023, 101: 105419.
- [64] ADEBIYI O, ADIGUN K, FOLARIN O, et al. Administration of ethanolic extract of *Erythrophloeum ivorense* (a Chev.) stem bark to male Wistar rats alters brain areas involved in motor coordination, behavior, and memory [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112650.
- [65] ALBANO D, MESSINA C, VITALE J, et al. Imaging of sarcopenia: old evidence and new insights [J]. *Eur Radiol*, 2020, 30(4): 2199–2208.
- [66] LARSSON L, DEGENS H, LI M, et al. Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 427–511.
- [67] SAYER A A, CRUZ-JENTOFT A. Sarcopenia definition, diagnosis and treatment: consensus is growing [J]. *Age Ageing*, 2022, 51(10): afac220.
- [68] LEE I S, CHOI G Y, SREELATHA I, et al. Effect of sinapic acid on scopolamine-induced learning and memory impairment in SD rats [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(3): 427.