

吴雨泓,陈碧华,吴欢,等. 炎症性肠病子代患病的性别差异及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 819-827.
WU Y H, CHEN B H, WU H, et al. Effects and mechanisms of sex differences on the prevalence of inflammatory bowel disease in offspring [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 819-827.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.001

炎症性肠病子代患病的性别差异及其机制研究

吴雨泓^{1,2,3}, 陈碧华^{1,2,3}, 吴欢^{1,2,3}, 刘瀚文^{1,2,3}, 欧阳璞玉^{1,2,3},
孟轩夷^{1,3,4*}, 陈红兵^{1,3,4}

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学食品学院, 南昌 330047;
3. 南昌大学江西省食物过敏重点实验室, 南昌 330047; 4. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047)

【摘要】 目的 探讨炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 小鼠子代中患 IBD 是否存在性别差异。
方法 将 BALB/c 雌鼠随机分为正常对照组 (Naïve 组) 和 DSS 模型组 (DSS 组), Naïve 组小鼠自由饮用高压灭菌水, DSS 组连续饮用 2% 葡聚糖硫酸钠溶液 (dextran sodium sulfate, DSS), 7 d 后更换为自由饮用高压灭菌水 10 d, 共进行 3 ~ 4 个循环, 同时与健康雄鼠合笼构建 IBD 母鼠模型。待幼鼠出生后 8 周, 将幼鼠分为 Con 组和 IBD 组, Con 组自由饮用高压灭菌水 7 d, IBD 组饮用 3% DSS 溶液 7 d 构建 IBD 模型。造模期间通过每日监测小鼠体重、粪便一致性以及便血情况进行疾病活动指数评分; 观察结肠组织的病理切片、杯状细胞和黏液层变化; 酶联免疫吸附法检测结肠中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-33 和 IL-10 的含量; 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 测定结肠中紧密连接蛋白和 MUC-2 mRNA 表达水平。结果 与 IBD 雌性小鼠相比, IBD 雄性小鼠疾病活动指数评分更高、结肠显著缩短, 结肠中出现大量炎性浸润、隐窝异常和杯状细胞缺失的现象, 闭合蛋白 (occludin, OCLN) 的 mRNA 相对表达量显著降低, IL-6、IL-33 水平显著升高、IL-10 水平显著下降。结论 IBD 小鼠的子代中雄鼠比雌鼠的结肠炎症症状更严重, 主要与肠道上皮屏障功能严重受损有关。

【关键词】 炎症性肠病; 结肠炎; 炎症反应; 上皮屏障; 肠道屏障

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0819-09

Effects and mechanisms of sex differences on the prevalence of inflammatory bowel disease in offspring

WU Yuhong^{1,2,3}, CHEN Bihua^{1,2,3}, WU Huan^{1,2,3}, LIU Hanwen^{1,2,3}, OUYANG Puyu^{1,2,3},
MENG Xuanyi^{1,3,4*}, CHEN Hongbing^{1,3,4}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi
Province Key Laboratory of Food Allergy, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
4. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Corresponding author: MENG Xuanyi. E-mail: mengxuanyi@ncu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate whether there are sex differences in inflammatory bowel disease (IBD) among the offspring of mice with IBD. **Methods** BALB/c female mice were randomly divided into Naïve and DSS groups. The mice in the Naïve group drank autoclaved water freely, and the DSS group freely drank 2% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days before it was replaced with autoclaved water for 10 days. A total of 3 ~ 4 cycles were applied, and the IBD female mice were paired with healthy male mice in cages. When the pups were 8 weeks old, they were divided into the

[基金项目] 国家自然科学基金 (32102092), 江西省自然科学基金 (20224BAB215009)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32102092), the Jiangxi Provincial Natural Science Foundation (20224BAB215009)。

[作者简介] 吴雨泓, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食物过敏和炎症性肠病。Email: wuyuhong@email.ncu.edu.cn

[通信作者] 孟轩夷, 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 食物过敏和炎症性肠病。Email: mengxuanyi@ncu.edu.cn

Con group and IBD group. The Con group drank autoclaved water freely for 7 days, and the IBD group drank 3% DSS for 7 days. During the modeling period, disease activity index was scored by monitoring body weight, fecal consistency, and the presence of blood in stool every day. Pathological sections were taken to observe changes in goblet cells and the mucus layer of colon tissues. The concentrations of interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-33, and IL-10 in the colon were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Real-time quantitative PCR was used to determine the mRNA expression levels of tight-junction proteins and MUC-2 in the colon. **Results** Compared with female IBD mice, male IBD mice had higher DAI scores, significantly shorter colons, larger amounts of inflammatory infiltrate, more crypt abnormalities, and a higher absence of goblet cells in the colon; their relative mRNA expression of occludin mRNA was significantly reduced, levels of IL-6 and IL-33 were significantly increased, and level of IL-10 was significantly decreased. **Conclusions** The symptoms of colitis in the offspring of IBD mice were more severe in male than in female mice, a result that was mainly attributed to the more severely impaired intestinal epithelial barrier function in males.

【Keywords】 inflammatory bowel disease; colitis; inflammatory response; epithelial barrier; gut barrier

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

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一类由基因易感个体对细菌产生异常黏膜免疫反应而引起的消化道疾病, 主要包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)^[1-3]。目前, IBD 的发病机制尚不明确, 可能影响发病的主要因素有遗传、环境、肠道菌群失调以及黏膜免疫功能障碍^[4-6]。肠黏膜屏障作为与外部环境相互作用的主要部位, 由生物屏障、化学屏障、上皮屏障和免疫屏障 4 部分组成^[2,5], 肠道屏障结构和功能的完整性可以有效预防细菌、有害物质的入侵^[7]。越来越多的证据表明, IBD 与肠道上皮屏障缺陷和过度炎症反应密切相关^[7-9]。上皮屏障缺陷的起始阶段是肠道屏障和黏膜稳态的破坏^[10-11]。结肠中粘液的主要成分是杯状细胞分泌的粘蛋白-2 (MUC-2), 主要功能是为肠道提供保护层^[2,12]。然而, IBD 会导致杯状细胞减少甚至缺失以及紧密连接蛋白表达异常, 从而导致保护层破坏屏障功能进一步丧失。

中青年是患 IBD 的高发人群, 其中女性的发病率明显高于男性, 大部分 IBD 女性患者处于生育高峰期^[1,13]。阳性家族史是患 IBD 的最强风险因素, 若父母一方患 IBD, 其后代 IBD 的发病风险比普通人群高 2 ~ 13 倍^[14]。流行病学调查发现, 与患 IBD 的父亲相比, 患 IBD 的母亲疾病遗传率可能更高^[13]。2017 年一项关于 IBD 母亲后代健康结果的队列研究发现, 与非 IBD 母亲的后代相比, IBD 母亲后代患 IBD 的风险更高^[15], 出生后 1 周菌群多样性降低, 并在未来 3 个月内表现出肠道菌群组成的差异^[13], 可见肠道菌群在 IBD 发病机制中的重要作用^[1,16]。因此, 除了遗传因素的影响, IBD 后代易患 IBD 的主要因素是肠道菌群失调, 进而导致肠道屏

障功能的紊乱^[17]。尽管 IBD 母亲后代患 IBD 的风险更高, 但是 IBD 母亲后代患 IBD 的风险是否同样存在性别差异尚不清楚。

本研究拟用葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 构建溃疡性结肠炎小鼠, 探讨其子代中患 IBD 是否存在性别差异, 并阐明影响子代患 IBD 的可能影响机制, 对进一步了解 IBD 母亲的妊娠结果和改善 IBD 后代的健康状况提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 5 周龄 BALB/c 小鼠雌性 20 只、雄性 10 只, 体重 16 ~ 18 g, 由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK (浙) 2019-0001】。饲养于温度 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 相对湿度 55% $\pm$ 5%, 12 h 开灯/关灯循环, 自由摄食饮水的环境, SPF 级饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供, 适应 1 周后开始实验, 饲养于江西省药物研究所【SYXK (赣) 2021-0004】。本研究经南昌大学第二附属医院医学研究伦理委员会审查批准 (20210311-028)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DSS (MW36000-50000) (MP Biomedicals 公司, 美国); 4% 多聚甲醛 (广州硕谱生物科技有限公司); 苏木素-伊红 (Hematoxylin and eosin, HE) 染色液套装、阿尔辛蓝过碘酸雪夫 (periodic acid schiff and alcian blue, AB-PAS) 染色液套装 (皮诺飞生物科技有限公司, 中国); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 (西陇科学有限公司, 中国); 吐温-20 (Solarbio 公司, 中国); 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-1 β 和 IL-33 试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 美国); 逆转

录试剂盒、PCR 试剂盒(诺唯赞生物科技股份有限公司,中国)。

4 ℃ 冰箱(中科美菱公司,型号:YC-260L,中国);电子天平(A&D Company Limited 公司,型号:LK-120A,日本);多功能酶标仪(Bio-Rad 公司,型号:Mode 1860,美国);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司,型号:Sorvall ST16R,美国);超纯水机(Milipore 公司,型号:Millipore,德国);旋涡混合器(其林贝尔仪器制造有限公司,型号:D1008E,中国);组织脱水机(Leica,型号:TP1020,德国);包埋机(Thermo,型号:HistoStar,美国);切片机(Leica,型号:RM2235,德国);光学显微镜(JEOL 公司,型号:JSM-6701F,日本)。

1.2 方法

1.2.1 IBD 母鼠模型的构建

将雌性小鼠随机分为 2 组,正常对照组(Naïve 组, $n = 10$)和 DSS 模型组(DSS 组, $n = 10$),并在造模的第 10 天将雌鼠和雄鼠按照 2:1 的比例进行合笼、交配,待幼鼠出生直至断奶。Naïve 组的小鼠在整个实验过程中自由饮用高压灭菌水。DSS 组小鼠先连续饮用含 2% DSS 的高压灭菌水 7 d 后,换成自由饮用高压灭菌水 10 d 进行缓解,共进行 3 ~ 4 个循环直至幼鼠出生后断奶。每天监测小鼠的体重、粪便以及便血情况,进行疾病活动指数(disease activity index,DAI)评分,待造模结束后取肠道组织进行苏木素-伊红(HE)染色,判断 IBD 母鼠造模情况。

1.2.2 子代 IBD 模型的构建

待 24 只幼鼠出生后断奶,将雄鼠和雌鼠分开饲养至 8 周龄,雄鼠和雌鼠随机分为 4 组,包括对照雄鼠组(Con-1 组, $n = 6$)、IBD 雄鼠模型组(IBD-1 组, $n = 6$)、对照雌鼠组(Con-2 组, $n = 6$)和 IBD 雌鼠模型组(IBD-2 组, $n = 6$)。Con-1 组和 Con-2 组的小鼠在整个实验过程中自由饮用高压灭菌水。IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠连续饮用含 3% DSS 的高压灭菌水 7 d。

1.2.3 DAI 评分

参照文献方法^[18],每日观察和检测小鼠体重、粪便一致性以及便血情况,按照表 1 标准进行 DAI 评分。DAI 评分为体重损失、粪便一致性和便血情况评分的总和。

1.2.4 脾指数和结肠长度测量

小鼠处死后取出脾进行称重,按照脾重量(mg) ×

表 1 IBD 疾病活动指数评分标准

Table 1 IBD disease activity index scoring criteria		
参数 Parameter	描述 Description	评分 Score
体重损失/% Weight loss/%	无 None	0
	1% ~ 5%	1
	5% ~ 10%	2
	10% ~ 20%	3
	> 20%	4
粪便一致性 Fecal consistency	正常 Nomal	0
	软但成型 Soft but soft	1
	松散 Loose	2
	水样便 Watery stool	3
便血 Bloody stools	严重腹泻 Severe diarrhea	4
	无 None	0
	肉眼看到便上有血 Visible blood in the stool	2
	大量血便 Large amount of blood in the stool	3
	肛周出血 Perianal bleeding	4

10/体重(g)来计算脾指数。结肠的测量是从盲肠到肛门的长度,收集 1 ~ 2 cm 远端结肠组织立即放入 4%多聚甲醛溶液中进行固定,用于组织切片的制作,其余结肠组织立即转移至-80 ℃冰箱中储存用于后续实验。

1.2.5 HE、AB-PAS 染色以及组织学评分

结肠组织在 4%多聚甲醛溶液中固定 24 ~ 48 h 后,进行石蜡包埋切片,分别用 HE 染色和 AB-PAS 染色后观察拍照。随后使用 HAN 等^[16]描述的方法进行结肠组织学评分(表 2),结肠组织学评分为炎性浸润、腺体和上皮细胞的损伤程度、病变深度和受影响范围的评分总和。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR,PT-qPCR) 检测紧密连接蛋白表达水平

TRIzol 法提取小鼠结肠组织总 RNA 并测定浓度,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录操作,在 NCBI 网站查找相应的引物序列,筛选后送入上海生工进行合成,具体引物序列如表 3 所示。以上实验结果重复 3 次以上。

1.2.7 结肠组织中细胞因子测定

取小鼠结肠组织,按 1:9 加入生理盐水进行匀浆,4 ℃条件下 1350 r/min 离心 10 min,收集上清,按照试剂盒说明书测定细胞因子 IL-6、IL-10、IL-1 β 和 IL-33 的含量。

1.3 统计学分析

实验处理每组设置 3 个平行样本,最终用平均

表 2 结肠组织学评分

Table 2 Histopathology scoring system for colonic sections				
炎症浸润 Inflammatory infiltration	黏膜损伤 Mucosal injury	隐窝损伤 Crypt injury	病变范围 Extent of disease	评分 Score
无 None	无 None	无 None	无 None	0
轻度 Mild	黏膜层 Mucous layer	近基底膜 1/3 破坏 Proximal basement membrane 1/3	1% ~ 25%	1
中度 Moderate	黏膜及黏膜下层 Mucosa and submucosa	近基底膜 2/3 破坏 Proximal basement membrane 2/3	26% ~ 50%	2
重度 Severe	黏膜全层 Whole layer of mucosa	仅上皮层 Epithelial layer	51% ~ 75%	3
-	-	全层破坏 Full layer failure	76% ~ 100%	4

表 3 RT-qPCR 相关引物序列

Table 3 RT-qPCR related primer sequences		
引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Upstream primers(5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primers(5'-3')
MUC-2	GGCTGTATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
OCLN	TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA	CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG
CLDN-2	CAACTGGTGGGCTACATCCTA	CCCTTGGAAAAGCCAAACCG
ZO-1	CGAGGCATCATCCCAAATAAGAAC	TCCAGAAAGTCTGCCCGATCAC

值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示。使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件分析所有数据。使用 Student's *t* 检验(单因素两组间比较)或 Two-way ANOVA(双因素比较)检验确定统计显著性。当 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 IBD 母鼠造模情况评价

如图 1 所示,与 Naïve 组相比,DSS 组母鼠的 DAI 评分从造模后第 6 天开始显著增加(图 1A),在母鼠合笼前和造模结束时 DSS 组母鼠的结肠显著缩短($P < 0.05, P < 0.01$,图 1B),从结肠代表图可以看到两组的结肠长度存在显著性差异(图 1C),且组织出现炎症浸润、隐窝异常以及杯状细胞缺失的现象(图 1D,1E),说明 IBD 母鼠模型造模成功。

2.2 子代 IBD 小鼠体重变化及 DAI 评分

体重下降百分比和 DAI 评分是评价结肠炎症状严重程度的常用指标^[19]。实验结果显示,IBD-1 组小鼠在造模第 4 天出现体重显著降低($P < 0.0001$),而 IBD-2 组小鼠从第 2 天就已出现体重显著减轻($P < 0.05$)(图 2A)。如图 2B 所示,与 Con-1 组和 Con-2 组相比,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠的 DAI 评分显著升高,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠分别在造模第 5 天和第 6 天均出现精神变差、肛周出血的情况,说明 IBD-1 组和 IBD-2 组造模成功,且 IBD-1

组小鼠处于严重的结肠炎状态。

2.3 小鼠结肠长度和脾系数变化

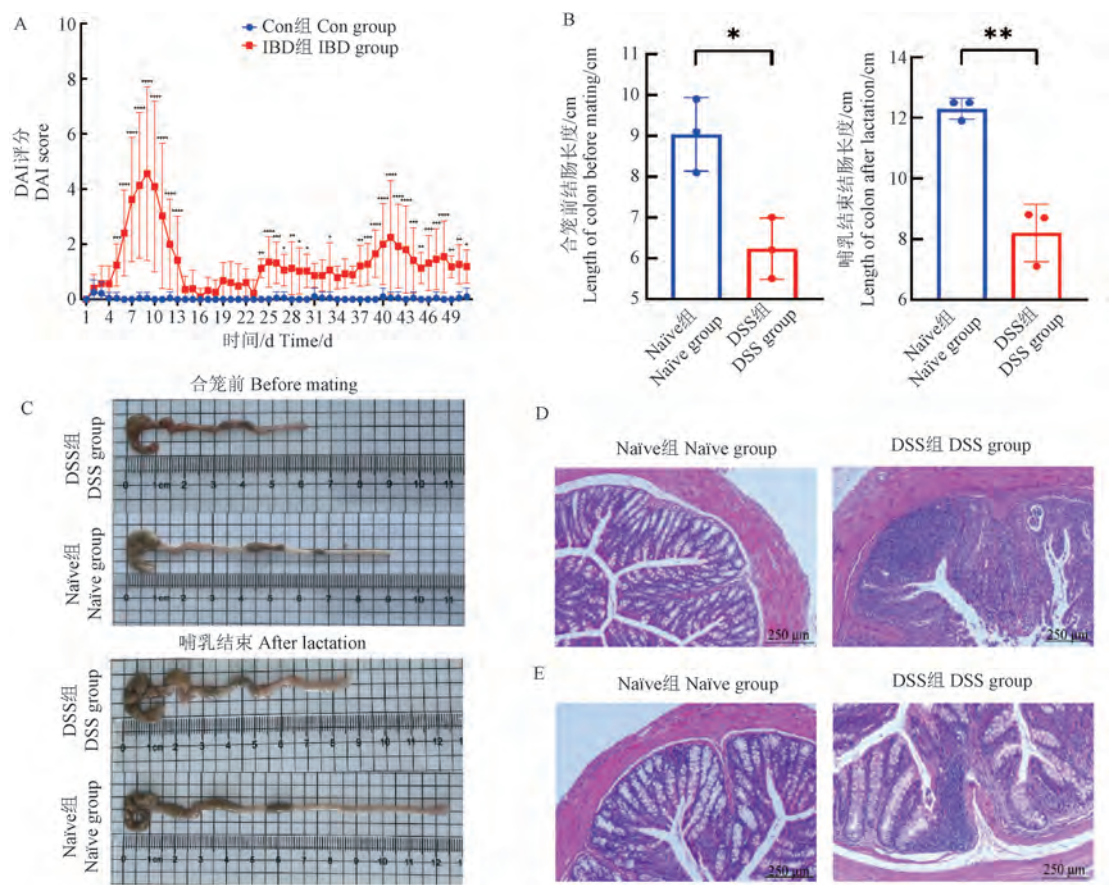
结肠长度的变化可以反映肠道的炎症程度和对肠道组织的损伤程度^[19~20],而脾指数的增加也与炎症程度相关。如图 3 所示,与 Con-1 组和 Con-2 组相比,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠的结肠长度均显著缩短($P < 0.0001$)、脾系数则显著升高($P < 0.0001, P < 0.05$);但与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠结肠长度缩短更严重。综上所述,IBD-1 组小鼠的结肠炎症状更为严重。

2.4 小鼠结肠组织病理学改变

如图 4A 所示,Con-1 组和 Con-2 组小鼠结肠组织形态正常,粘膜隐窝结构完整,可见大量杯状细胞,上皮细胞整齐且排列紧密,无炎症细胞浸润。相比之下,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠结肠组织中腺体排列紊乱,隐窝大小形状异常,且存在隐窝、杯状细胞缺失、炎症细胞浸润的情况。与 IBD-2 组相比,IBD-1 组小鼠结肠上皮表面、隐窝结构严重受损,并出现大量杯状细胞缺失、炎症细胞浸润。组织学评分结果显示,与 Con-1 组和 Con-2 组相比,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠的结肠组织学评分显著升高(图 4B)。以上结果表明,IBD-1 组小鼠结肠组织病理损伤更为严重。

2.5 小鼠杯状细胞、粘蛋白的分布情况

进一步对小鼠结肠组织切片进行 AB-PAS 染

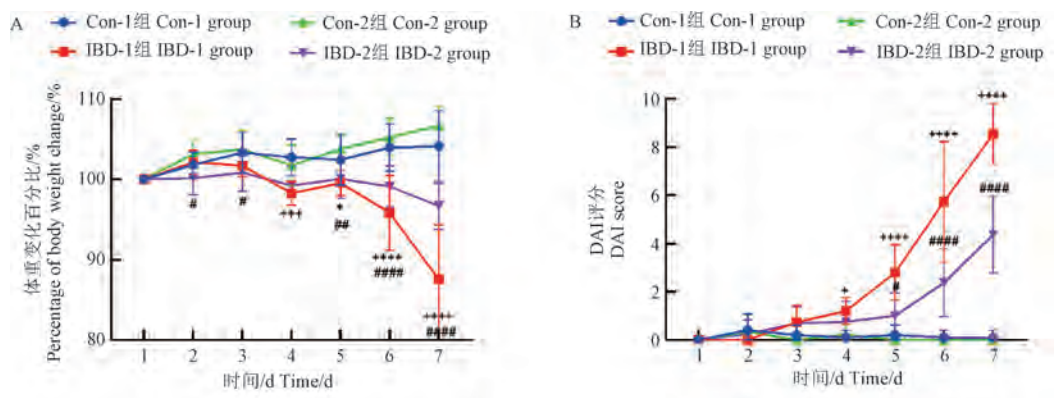


注:A;DAI 评分;B:结肠长度;C:结肠长度代表图;D:合笼前结肠组织 HE 染色;E:哺乳结束结肠组织 HE 染色;与 Naive 组相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001,*****P* < 0.0001。

图 1 母鼠 IBD 造模情况评价

Note. A. DAI score. B. Colon length. C. Representative picture of colon length. D. Colonic HE staining before mating. E. Colonic HE staining after lactation. Compared with Naive group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

Figure 1 Evaluation of IBD modeling in female mice

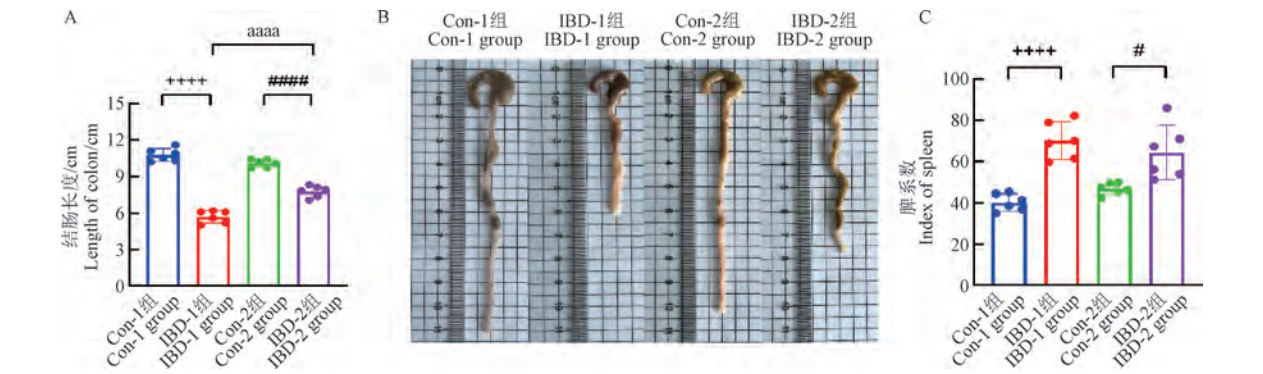


注:与 Con-1 组相比,+*P* < 0.05,+++*P* < 0.001,++++*P* < 0.0001;与 Con-2 组相比,#*P* < 0.05,###*P* < 0.01,####*P* < 0.0001。(下图同)

图 2 结肠炎小鼠造模情况评价

Note. Compared with Con-1 group, +*P* < 0.05, +++*P* < 0.001, *****P* < 0.0001. Compared with Con-2 group, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01, ####*P* < 0.0001. (The same in the following figures)

Figure 2 Evaluation of colitis mouse modeling

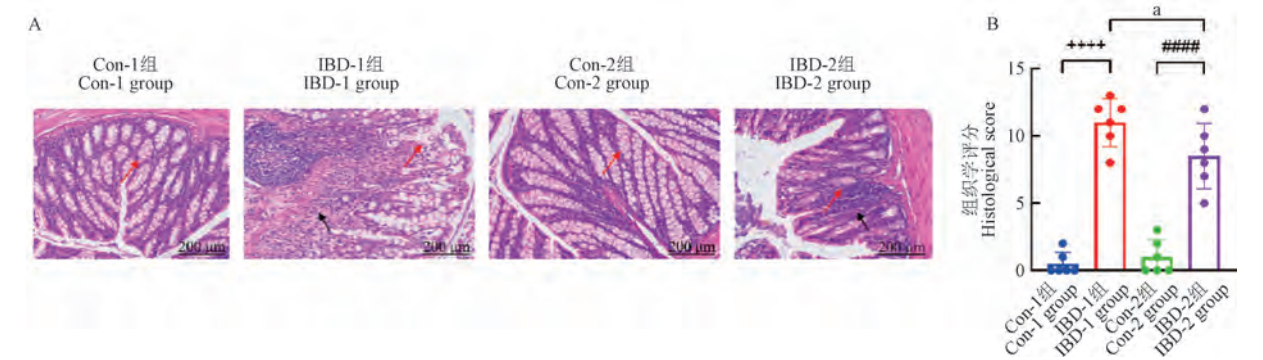


注:与 IBD-1 组相比, $^{aaaa}P < 0.0001$ 。

图 3 小鼠结肠长度和脾系数变化情况

Note. Compared with IBD-1 group, $^{aaaa}P < 0.0001$.

Figure 3 Changes of colon length and spleen index in mice



注:黑色箭头:炎症细胞浸润;红色箭头:杯状细胞;与 IBD-1 组相比, $^aP < 0.05$ 。(下同)

图 4 小鼠结肠组织病理学变化

Note. Black arrows. Inflammatory cell infiltration. Red arrows. Cup cells. Compared with IBD-1 group, $^aP < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Histopathological changes of colon in mice

色,如图 5A 所示,Con-1 组和 Con-2 组小鼠隐窝内存在大量的杯状细胞并且粘蛋白在杯状细胞中含量丰富,黏液层分布完整均匀。与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠的杯状细胞缺失严重,肠上皮黏液层明显受损、未见明显的粘蛋白,更易受到肠道中抗原和致病微生物的侵袭和破坏。

由杯状细胞分泌的 MUC-2 是结肠黏液屏障的主要组成成分,对于维持黏液屏障结构与功能的完整性具有重要意义^[21]。DSS 诱导小鼠肠道炎症后,杯状细胞衰竭。与 Con-1 组和 Con-2 组小鼠相比,IBD 组小鼠 MUC-2 mRNA 相对表达量均呈下降的趋势(图 5B)。

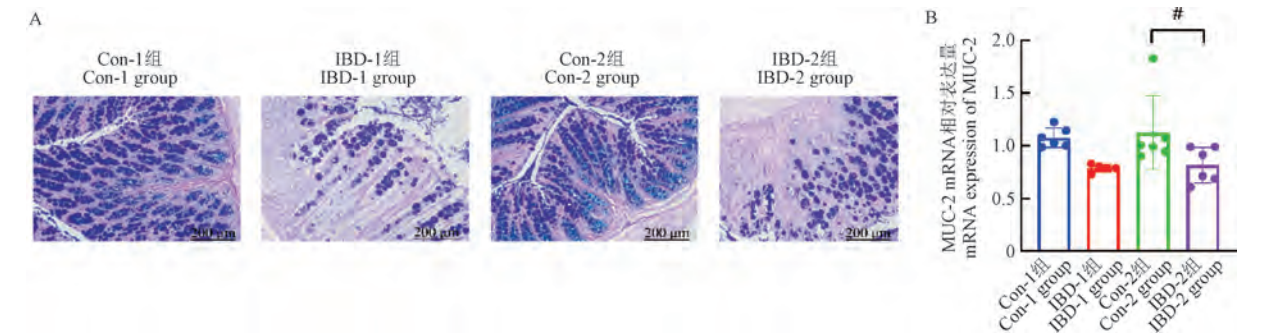


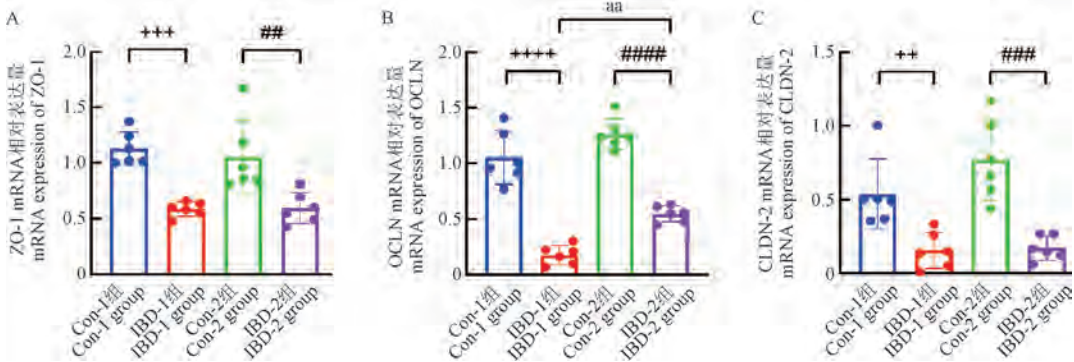
图 5 小鼠肠道屏障的变化情况

Figure 5 Change of intestinal barrier in mice

2.6 肠道组织中紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的变化

紧密连接蛋白是构成肠上皮细胞间紧密连接结构的重要组成部分,表达不足会导致肠道黏膜屏障功能受损^[21-22]。在确定子代雄鼠的结肠炎症状更为严重后,进一步探究子代小鼠肠道屏障相关蛋

白的表达情况。通过 RT-qPCR 测定了小鼠结肠中 ZO-1 (图 6A)、OCLN (图 6B) 和 CLDN-2 (图 6C) mRNA 相对表达量。与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠 OCLN mRNA 相对表达量显著下降,CLDN-2 mRNA 相对表达量存在下降的趋势,说明 IBD-1 组小鼠肠道上皮屏障功能受损相对严重。



注:与 Con-1 组相比,++ $P < 0.01$; 与 IBD-1 组相比,aa $P < 0.01$ 。(下图同)
图 6 结肠炎小鼠结肠中紧密连接蛋白的 mRNA 表达水平
Note. Compared with Con-1 group, ++ $P < 0.01$. Compared with IBD-1 groups, aa $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 6 mRNA expression levels of tight junction proteins in colitis mice

2.7 肠道组织中免疫因子的含量

小鼠结肠组织中 IL-6、IL-1 β 、IL-10 和 IL-33 的含量如图 7 所示。与 Con-1 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠结肠组织中 IL-6、IL-1 β 和 IL-33 含量均显著升高

($P < 0.0001, P < 0.05, P < 0.0001$)。与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠结肠中 IL-6、IL-33 含量显著升高、IL-10 含量显著降低($P < 0.05$),说明 IBD-1 组小鼠处于更严重的炎症状态。

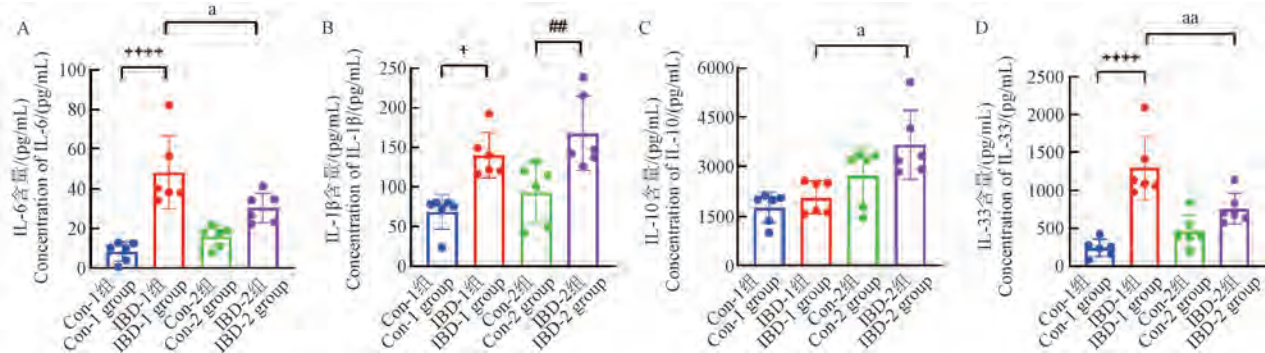


图 7 结肠炎小鼠结肠组织中免疫因子的含量
Figure 7 Concentration of immune factors in colitis mice

3 讨论

随着对 IBD 研究的深入,发现 IBD 在流行病学、临床病程和疾病结果方面均存在性别差异,这可能是多因素相互作用的结果。其中,性激素在 IBD 发病过程中的波动可能会导致 IBD 存在性别差异。雌激素不仅可以抑制炎症,还可以减少炎症浸润和组织学损伤。雌二醇治疗可显著提高结肠长

度^[23]。因此,性别差异可能会诱发表型变化。DSS 诱导的结肠炎模型是目前应用最广泛的 IBD 模型之一,其发病特征与人体类似,表现为体重减轻、血性腹泻、形成溃疡、上皮细胞缺失和中性粒细胞浸润^[11]。本实验结果显示,与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠 DAI 评分、脾系数显著增加,结肠长度显著缩短,结肠黏膜层有大范围的炎症细胞浸润,隐窝数量减少,肠上皮细胞损伤严重,这表明 IBD

小鼠的子代中雄性小鼠比雌性小鼠的结肠炎症状更为严重。

黏液层作为肠道屏障的重要组成部分,是防止细菌和毒素与肠道上皮细胞直接接触的第一道防线^[7,11,24]。肠道杯状细胞分泌的粘蛋白具有保护肠黏膜、润滑黏膜表面和防止致病菌黏附的作用,而杯状细胞和粘蛋白的减少是诱导 IBD 的关键因素^[25]。研究发现 IBD-1 组小鼠结肠组织中出现大量杯状细胞缺失和粘蛋白耗竭的现象,无法形成紧密的黏液层结构,从而导致肠道黏液屏障严重破坏。除此之外,紧密连接蛋白是肠道上皮细胞屏障的另一重要组成部分,对上皮细胞通透性起决定性作用^[26]。研究表明,肠道屏障中紧密连接蛋白的破坏会促进细菌和内毒素穿透黏膜^[27],激活免疫细胞产生各种炎症因子,进而导致炎症损伤和肠道屏障的免疫失衡,最终导致结肠上皮通透性降低^[26,28]。本研究发现 IBD-1 组小鼠肠道中的紧密连接蛋白 OCLN mRNA 相对表达量显著下降,CLDN-2 mRNA 相对表达量同样存在下降的趋势,证实子代 IBD 小鼠的肠道屏障功能受损,其中以雄性小鼠更为显著。

免疫细胞因子主要包括促炎因子和抗炎因子^[29],其中促炎因子 IL-6 在 IBD 发病机制中的作用已被广泛研究^[30-31],被认为是 IBD 发展过程中反映结肠损伤的关键指标^[9,32-33]。不仅如此,结肠来源的促炎因子 IL-33 被认为是 IBD 发病机制的关键启动子^[34],是连接上皮损伤和结肠炎的关键致病因素,在炎症黏膜中特异性增强^[35],能够特异性诱导关键致病细胞因子同时抑制 IL-10 的分泌^[34,36],具有促进炎症的作用。研究结果发现 IBD-1 组小鼠结肠中 IL-6、IL-33 水平显著升高,IL-10 水平显著降低,证实了 IBD-1 组小鼠结肠损伤严重,肠道上皮屏障严重破坏,炎症状态增强,最终导致 IBD-1 组小鼠结肠炎加剧。

综上所述,本研究发现 IBD 子代中小鼠结肠炎存在性别差异。与雌性小鼠相比,雄鼠患结肠炎的症状更为严重,这可能是由于子代雄性小鼠的炎症反应和肠道上皮屏障功能变化更敏感导致的。在今后的研究中,应更加关注 IBD 子代的雄性个体,阐明 IBD 子代在不同性别中的发病机制,为缓解和治疗 IBD 儿童提供理论基础和干预方法。

参 考 文 献(References)

[1] BRONDFIELD M N, MAHADEVAN U. Inflammatory bowel disease in pregnancy and breastfeeding [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(8) : 504-523.

[2] 侯晓婷, 孟欢, 薛佳辰, 等. 关于炎症性肠病发病机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9) : 138-148.
HOU X T, MENG H, XUE J C, et al. Research progress in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9) : 138-148.

[3] 陈碧华, 吴雨泓, 吴欢, 等. 食物过敏与炎症性肠道疾病关联性的研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(1) : 294-304.
CHEN B H, WU Y H, WU H, et al. Advances in the relationship between food allergy and inflammatory bowel disease [J]. Food Sci, 2023, 44(1) : 294-304.

[4] MENG X, DUNSMORE G, KOLEVA P, et al. The profile of human milk metabolome, cytokines, and antibodies in inflammatory bowel diseases versus healthy mothers, and potential impact on the newborn [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(4) : 431-441.

[5] ZHOU F, ZHANG G D, TAN Y, et al. NOD-like receptors mediate homeostatic intestinal epithelial barrier function; promising therapeutic targets for inflammatory bowel disease [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2023, 16: 17562848231176889.

[6] LÊ A, SELLE A, AUBERT P, et al. Maternal prebiotic supplementation impacts colitis development in offspring mice [J]. Front Nutr, 2022, 9: 988529.

[7] LI M, GE Q, DU H, et al. Potential mechanisms mediating the protective effects of *Tricholoma matsutake*-derived peptides in mitigating DSS-induced colitis [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(19) : 5536-5546.

[8] RAMOS G P, PAPADAKIS K A. Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94(1) : 155-165.

[9] ZHANG L, YAO X, MA M, et al. Protective effect of l-theanine against DSS-induced colitis by regulating the lipid metabolism and reducing inflammation via the NF-κB signaling pathway [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(47) : 14192-14203.

[10] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402(10401) : 571-584.

[11] HOFFMANN M, SCHWERTASSEK U, SEYDEL A, et al. A refined and translationally relevant model of chronic DSS colitis in BALB/c mice [J]. Lab Anim, 2018, 52(3) : 240-252.

[12] 刘伟, 刘又前, 蒋翠花, 等. 基于 Notch 信号通路研究白头翁汤对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护作用 [J]. 中草药, 2023, 54(16) : 5257-5266.
LIU W, LIU Y Q, JIANG C H, et al. Protective effect of Baitouweng Decoction on intestinal mucus barrier in mice with ulcerative colitis based on Notch signaling pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(16) : 5257-5266.

[13] TORRES J, HU J, SEKI A, et al. Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice [J]. Gut, 2020, 69(1) : 42-51.

[14] 何瑶, 李玥, 谭莅, 等. 炎症性肠病妊娠期管理的专家共识意见 [J]. 协和医学杂志, 2019, 10(5) : 465-475.
HE Y, LI Y, TAN B, et al. Expert consensus on management of

- inflammatory bowel disease during pregnancy [J]. Med J Peking Union Med Coll Hosp, 2019, 10(5): 465–475.
- [15] JØLVING L R, NIELSEN J, BECK-NIELSEN S S, et al. The association between maternal chronic inflammatory bowel disease and long-term health outcomes in children—a nationwide cohort study [J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23(8): 1440–1446.
- [16] HAN Y, SONG M, GU M, et al. Dietary intake of whole strawberry inhibited colonic inflammation in dextran-sulfate-sodium-treated mice via restoring immune homeostasis and alleviating gut microbiota dysbiosis [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(33): 9168–9177.
- [17] COBURN L A, GONG X, SINGH K, et al. L-arginine supplementation improves responses to injury and inflammation in dextran sulfate sodium colitis [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33546.
- [18] CHEN B, WU Y, WU H, et al. Establishment of food allergy model in dextran sulfate sodium induced colitis mice [J]. Foods, 2023, 12(5): 1007.
- [19] LAROUH H, INGERSOLL S A, LIU H C, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipo complexes with medium-chain-length fatty acids in the colon [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32084.
- [20] LEI F, ZENG F, YU X, et al. Oral hydrogel nanoemulsion co-delivery system treats inflammatory bowel disease via anti-inflammatory and promoting intestinal mucosa repair [J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 275.
- [21] PENG Y, YAN Y, WAN P, et al. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 136: 96–108.
- [22] CHANG Y, DENG Q, ZHANG Z, et al. Glucagon-like peptide 2 attenuates intestinal mucosal barrier injury through the MLCK/pMLC signaling pathway in a piglet model [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 3015–3032.
- [23] 邵小娟, 刘凯军, 何雨琴, 等. 炎症性肠病性别差异机制的研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(3): 241–246.
- SHAO X J, LIU K J, HE Y Q, et al. Advances of gender difference mechanism in inflammatory bowel disease [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2021, 30(3): 241–246.
- [24] 韩菲菲, 杨莎莎, 赵霞, 等. 抗菌肽 LL-37 对患结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护功能 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 67–73.
- HAN F F, YANG S S, ZHAO X, et al. Protective effect of antibacterial peptide LL-37 on intestinal mucosal barrier in mouse with colitis [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(9): 67–73.
- [25] 王怡如, 周唯, 蒋笑影, 等. 美沙拉秦干预下 IBD 小鼠结肠组织的转录组分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 7–16.
- WANG Y R, ZHOU W, JIANG X Y, et al. RNA-seq based gene expression profiling of colon tissue from a mesalazine-treated mouse model of inflammatory bowel disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 7–16.
- [26] WANG J, ZHAO H, LV K, et al. Pterostilbene ameliorates DSS-induced intestinal epithelial barrier loss in mice via suppression of the NF- κ B-mediated MLCK-MLC signaling pathway [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(13): 3871–3878.
- [27] BERGSTROM K S, XIA L. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis [J]. Glycobiology, 2013, 23(9): 1026–1037.
- [28] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(7): 417–432.
- [29] 周欣欣, 刘茜茜, 任珍, 等. 溃疡性结肠炎动物模型的特点及应用分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 896–904.
- ZHOU X X, LIU X X, REN Z, et al. Characteristics and application analysis of animal models of ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 896–904.
- [30] GÜNALTA Y S, KUMAWAT A K, NYHLIN N, et al. Enhanced levels of chemokines and their receptors in the colon of microscopic colitis patients indicate mixed immune cell recruitment [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 132458.
- [31] ISHIGAKI S, KONDO Y, OTA Y, et al. Successful treatment of refractory enteritis and arthritis with combination of tumour necrosis factor and interleukin-6 inhibition in patients with ulcerative colitis [J]. Mod Rheumatol Case Rep, 2023, 8(1): 33–36.
- [32] HU S, LI S, LIU Y, et al. Aged ripe Puerh tea reduced oxidative stress-mediated inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by regulating intestinal microbes [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(36): 10592–10605.
- [33] KATSANDEGWAZA B, HORSNELL W, SMITH K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9344.
- [34] PUSHPARAJ P N, LI D, KOMAI-KOMA M, et al. Interleukin-33 exacerbates acute colitis via interleukin-4 in mice [J]. Immunology, 2013, 140(1): 70–77.
- [35] GUNDERSEN M D, LARSEN K B, JOHNSEN K M, et al. Hypo-osmotic stress induces the epithelial alarmin IL-33 in the colonic barrier of ulcerative colitis [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 11550.
- [36] ZHU J F, XU Y, ZHAO J, et al. IL-33 protects mice against DSS-induced chronic colitis by increasing both regulatory B cell and regulatory T cell responses as well as decreasing Th17 cell response [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 1827901.

宋琦,杜志欣,杨丽萍,等. 恐惧应激对妊娠期大鼠胎盘葡萄糖转运体表达水平的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 828-835.

SONG Q, DU Z X, YANG L P, et al. Impact of maternal stress during pregnancy on placental glucose transporters [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 828-835.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.002

恐惧应激对妊娠期大鼠胎盘葡萄糖转运体表达水平的影响

宋琦,杜志欣,杨丽萍*,侯俊林,赵佳佳,吴永叶,王耀辉,李笑琳

(河南中医药大学中医学院,郑州 450046)

【摘要】 目的 探讨孕期恐惧应激对胎盘葡萄糖营养物转运体 (glucose transporter, GLUT) 表达的影响,为孕期应激致胎损理论提供证据。方法 将 20 只 Wistar 孕鼠,随机分为对照组和模型组,每组 10 只。其中,模型组采取旁观电击法造模持续 19 d,对照组正常饲养。实验结束后记录胎产数量、胎盘与胎鼠重量,计算胎盘效率。透射电镜观察胎盘细胞形态学变化。生物信息学分析筛选孕期恐惧应激胎盘的差异基因,进行基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。蛋白质免疫印迹法 (Western Blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR)、免疫组化法检测葡萄糖转运蛋白 1 (glucosetransporter 1, GLUT1)、葡萄糖转运蛋白 3 (GLUT3)、葡萄糖转运蛋白 6 (GLUT6) 和葡萄糖转运蛋白 7 (GLUT7) 表达水平。结果 与对照组相比,模型组胎产数量和胎盘效率显著降低;模型组胎盘微绒毛稀疏短少,线粒体及内质网肿胀;GSEA 分析发现,模型组胎盘基因显著富集在细胞葡萄糖稳态;Western Blot、Real-time PCR 和免疫组化结果表明,模型组胎盘中 GLUT1、GLUT6 以及 GLUT7 表达均下降。结论 孕期恐惧应激暴露导致不良胎产结局,可能与胎盘中 GLUT1、GLUT6、GLUT7 三种关键葡萄糖转运体降低有关。

【关键词】 恐惧应激;胎盘;葡萄糖;转运体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0828-08

Impact of maternal stress during pregnancy on placental glucose transporters

SONG Qi, DU Zhixin, YANG Liping*, HOU Junlin, ZHAO Jiajia, WU Yongye, WANG Yaohui, LI Xiaolin

(Henan University of Chinese Medicine School of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: YANG Liping. E-mail: bioylp@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of fear-induced stress during pregnancy on the expression of glucose transporters (GLUT) in the placenta, providing evidence for the theory of fetal damage caused by fear-induced stress during pregnancy. **Methods** Twenty pregnant Wistar rats were randomly divided into a control group and a model group of 10 rats each. In the model group, a fear-induced stress model was established using the modified bystander electroshock method for 20 days. After the experiment, the number of offspring and the weights of the placenta and fetal rats were measured, and the placental efficiency was calculated. Transmission electron microscopy was used to observe the morphological changes of placental cells. Bioinformatics analysis was performed to screen for differential genes in placentas affected by pregnancy stress-phobia, and gene set enrichment analysis was performed. Protein immunoblotting (Western Blot), Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and immunohistochemistry were used to detect the expression levels of GLUT1, GLUT3, GLUT6, and GLUT7 proteins and genes. **Results** The placental

[基金项目] 国家自然科学基金 (81973596)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81973596).

[作者简介] 宋琦,女,在读硕士研究生,研究方向:儿童情志病病因学及其中医药防治研究。Email: 15515678212@163.com

[通信作者] 杨丽萍,女,教授,博士生导师,研究方向:儿童情志病病因学及其中医药防治研究。Email: bioylp@126.com

efficiency was significantly reduced in the model group compared with that in the control group. The result of transmission electron microscopy in the model group showed that the placental microvilli were sparse and short and that the mitochondria and endoplasmic reticulum were swollen. Gene set enrichment analysis revealed that placental genes were significantly enriched in cellular glucose homeostasis in the model group compared with those in the control group. The result of Western Blot, Real-time PCR, and immunohistochemistry indicated a decrease in both the protein and gene expression levels of GLUT1, GLUT6, and GLUT7 in the placenta of pregnant rats. **Conclusions** Prenatal exposure to fear-induced stress may lead to adverse pregnancy outcomes. These adverse outcomes are potentially associated with reduced levels of three key GLUTs in the placenta: GLUT1, GLUT6, and GLUT7.

[Keywords] fear stress; placenta; glucose; transporter
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

妊娠期是胎儿生长发育的关键时期,然而这一时期孕妇易受到多种应激的影响,其中恐惧应激发生率高达 85%^[1]。孕期恐惧应激会出现胎儿生长受限、胎儿窘迫、流产等不良妊娠结局^[2]。既往研究大多聚焦在下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA)^[3],但最新研究发现,胎盘功能不全不是不良妊娠结局的主要原因之一^[4]。胎盘是母体和胎儿进行营养物质交换的重要场所^[5],通过营养物转运体将营养物质从母体输送给胎儿,保证妊娠的顺利进行^[6]。葡萄糖作为三大营养物质之一,在胎儿的宫内生长发育中发挥重要作用。胎儿主要通过葡萄糖营养物转运体(glucose transporter, GLUT)从母体摄取葡萄糖来维持正常的营养供给,而 GLUT 表达异常可能导致胎儿生长受限、先兆子痫的发生^[7]。以上研究均提示胎盘 GLUT 的表达与胚胎发育以及妊娠结局密切相关,而孕期恐惧应激导致不良妊娠结局是否与胎盘 GLUT 的表达有关尚未见文献报道。

鉴于此,本实验拟从胎盘 GLUT 出发,探讨孕期恐惧应激致胎损的机制,为临床寻找情志疾病的治疗靶点、不良胎产结局的精准治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 11 周龄 Wistar 大鼠,雌性 25 只、雄性 10 只,体重 190 ± 20 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2019-0001】。饲养于河南中医药大学动物实验研究中心【SYXK(豫)2021-0015】。饲养环境:室温控制在 22 ~ 23 ℃,湿度为 50% ± 10%,12 h/12 h 光/暗交替。本研究经河南中医药大学动物伦理委员会批准(DWLL2019 03027),实验过程严格遵循“3R”原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒测促肾上腺皮质激素(ACTH)、糖皮质激素(GC)、去甲肾上腺素(NE)(江苏酶免实业有限公司,货号为 MM-0565R2、MM-21058R1、MM-0556R2);RIPA 裂解液、RNA 提取液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、β-肌动蛋白(β-actin)(Servicebio,货号分别为 G2002、G3013、G2026、GB12001);GLUT1、GLUT3、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔(Servicebio,货号分别为 GB113495、GB11294、GB25301);GLUT6、GLUT7(abcam,货号为 ab119272,ab122604)。

电击交流敞箱(自制);场景恐惧系统(Thermo,德国);RT-6100 型酶标仪(Rayto,美国);EMUC7 型全自动超薄切片机(Lca,德国);JEM-1400 型透射电子显微镜(日本电子株式会社);CFX 型实时荧光定量聚合酶链式反应仪(Bio-Rad,美国);DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪(北京六一仪器厂,中国);显微镜(日本奥林巴斯株式会社);血糖仪(鱼跃,中国)。

1.2 方法

1.2.1 恐惧应激大鼠模型的建立及分组

将 25 只雌鼠、10 只雄鼠,按 2:1 的比例进行合笼受孕,随后将 20 只孕鼠按随机数字表法分为对照组和模型组,每组 10 只。采用课题组前期改良版旁观电击法进行恐惧应激模型制备^[8]。模型制备持续 19 d,每天每次 30 min。具体实验如下:电击交流敞箱分 9 个小室,每个小室隔板上有若干小孔。中间 3 个为电击室,其余 6 个为旁观室。将电击鼠(可以是不受孕的雌鼠也可以是完成交配的雄鼠)放入电击室,模型组孕鼠放入旁观室。电击室底部有通电铁丝,旁观室内有供孕鼠攀爬的细铁架。造模时,电击鼠受到电击后出现惨叫、颤抖、逃逸、二便失常等危险信号,旁观室的孕鼠通过嗅觉、视觉、听觉感受恐惧信息后迅速攀爬铁丝。对照组仅放入

旁观室,不予电击鼠电击刺激。胎鼠和胎盘沿袭母鼠分组进行后续实验。

1.2.2 恐惧应激孕鼠模型评价

(1)场景恐惧实验检测孕鼠的恐惧情绪:场景恐惧实验分为训练期和测试期。测试第 1 天将两组孕 19 d 大鼠放入场景恐惧箱中,让其适应 2 min。适应性训练,程序包括:持续 30 s 的噪音刺激(1 kHz、80 dB),2 s 的光刺激(310 Lux)以及 2 s 的电刺激(0.5 mA),间隔 30 s,程序循环 4 次,共耗时 6 min,训练结束,放回笼中。24 h 后进行测试,重复第 1 天的实验步骤,区别在于不给予电刺激,只给予同样强度的噪音和光刺激,追踪孕鼠在相同环境下后 4 min 的不动时间,记为冻结时间,将冻结时间和冻结百分比作为评价恐惧情绪的指标。

(2)ELISA 检测孕鼠血清 ACTH、GC 和 NE 含量:两组孕 20 d 大鼠分别随机选取 6 只,目内眦静脉采血,静置 1 h 后,以 3500 r/min 4 ℃离心 15 min,取上清,采用 ELISA 试剂盒检测孕鼠血清内 ACTH、GC 和 NE 的含量,操作过程严格遵循试剂盒说明书。

1.2.3 样品取材及处理方法

孕 21 d 大鼠麻醉后,迅速剥离胎盘和胎鼠,记录产仔数和胎盘、胎鼠重量,胎盘效率 = 胎鼠重量(g)/胎盘重量(g);然后每组随机挑选 3 个胎盘,切成 1 mm³ 组织块,生理盐水清洗后,放入 2%戊二醛固定,用于后续透视电镜观察;每组再随机选取 3 个胎盘放入 4%多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,切片,用于后续免疫组化检测;剩余胎盘液氮速冻,保存在 -80 ℃冰箱中,用于后续提取 RNA 和蛋白质;胎鼠每组随机挑选 10 只取血,用血糖试纸吸取胎鼠血液,测血糖值。

1.2.4 生物信息学分析恐惧应激胎盘测序数据

根据课题组前期研究从 NCBI 的 SRA 数据库(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>)下载恐惧应激胎盘测序数据(登录号为 PRJN A837736)^[9],获得基因的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(fragments per kilobase per million, FPKM),再将 FPKM 的 RNA-seq 数据转换成每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本(transcripts per million reads,TPM)并进行 log₂ 转化。

通过 R 包“clusterProfiler”进行 GSEA 的分析,并筛选出与胎盘营养物转运相关条目,分析结果通过“ggplot2”包进行可视化分析。R 语言“limma

conductor”包对芯片数据进行差异分析,“ggplot2”包根据绘制火山图,同时使用“ComplexHeatmap”包绘制基因矩阵热图。

1.2.5 Western Blot 检测胎盘内 GLUT1、GLUT3、GLUT6 以及 GLUT7 蛋白表达情况

每组随机挑选 3 个胎盘充分研磨后裂解,于 4 ℃ 14 000 r/min 离心 12 min 后取上清,通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将剩余的蛋白液与 5 × Loding Buffer 按 4:1 的比例混匀后加热 5 min,使其充分变性。然后配置浓缩胶,电泳,转膜,封闭。加入一抗(GLUT1、GLUT3、GLUT6、GLUT7 1:2000)4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜后进行二抗孵育 1 h,并再次洗膜。配置发光液并进行显影。扫描的胶片去色后,使用 Image J 2.14 软件进行分析。

1.2.6 Real-time PCR 检测胎盘组织中 GLUT1、GLUT3、GLUT6 和 GLUT7 mRNA 表达水平

每组随机取出 3 个胎盘组织,用 TRIzol 法提取总 RNA,进行逆转录后扩增并进行实时 PCR 检测。设定 PCR 反应条件:95 ℃,10 min 进行预变性,之后 95 ℃,15 s 变性,60 ℃,30 s 退火,共进行 40 个循环,最后 65 ℃逐步升温至 95 ℃,每升温 0.5 ℃,采集 1 次荧光信号。进行反应后上机检测,最后记录保存扩增曲线和熔解曲线,并通过 2^{-ΔΔCt} 法计算基因 mRNA 的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	片段长度/bp Fragment length/bp
GAPDH-F	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
GAPDH-R	GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	
GLUT1-F	CTGGACCTCAAACCTCATCCTG	210
GLUT1-R	TCCTCAGGTGTCTTGTGCTCT	
GLUT3-F	TCAGGATGTACAGGAGAAGCAG	187
GLUT3-R	ATCGTGGCATAGATGGGCTC	
GLUT6-F	CTGTGGAGATCGTGACGCTTG	229
GLUT6-R	TTAGTGAGGACGAAGGCTGTGAG	
GLUT7-F	GGAGGTATTCTGTCATCTTTGGAGTC	215
GLUT7-R	GCAGCCTCCTTAGAGCTTGTCT	

1.2.7 免疫组化检测胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6、GLUT7 蛋白表达情况

将两组胎盘组织进行石蜡包埋、切片、脱蜡、抗原修复,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,3%双氧水溶液,室温避光孵育 25 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,BSA 封闭 30 min 后,加入一抗(GLUT1、GLUT6、

GLUT7 1 : 500, GLUT3 1 : 800) 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后加入二抗, 室温孵育 60 min, DAB 显色, 镜下观察出现棕黄色阳性终止染色, 水洗, 苏木素复染 3 min, 脱水封片, 高倍镜(400 倍) 镜下观察。

1.3 统计学分析

所有数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并通过 SPSS 21.0 软件进行数据分析。数据服从正态分布且满足方差齐性, 两组采用独立样本 *t* 检验, 符合正态分布且不符合方差齐性检验两组采用校正 *t* 检验; 不符合正态分布且符合方差齐性检验两组采用 Mann-Whitney U 检验。 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 恐惧应激模型制备

在场景恐惧实验中, 与对照组相比, 模型组孕鼠冻结时间与冻结时间百分比均显著提高 (*P* < 0.01, 图 1); ELISA 实验中, 模型组 ACTH、GC、NE 含量均显著提高 (*P* < 0.01, 图 2), 以上结果表明恐惧应激模型制备成功。

2.2 孕期恐惧应激对胎儿一般情况的影响

与对照组相比, 模型组产仔数下降 (*P* < 0.01), 胎鼠重量、胎盘重量均显著降低 (*P* < 0.001); 胎盘效率下降 (*P* < 0.01)。见图 3, 表 2。

2.3 孕期恐惧应激对胎盘结构的影响

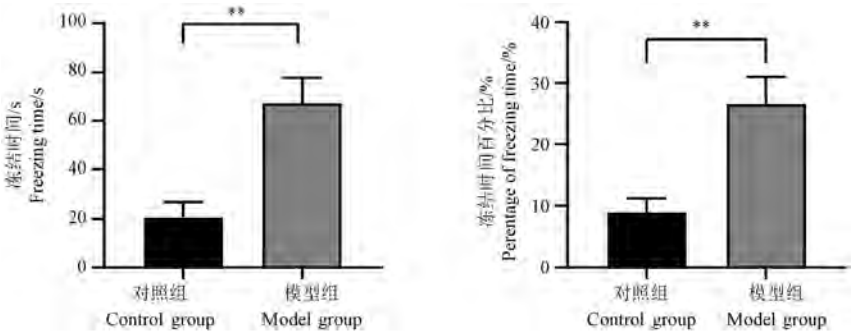
透视电镜观察到对照组胎盘滋养层细胞微绒毛组织数量丰富、排列紧密、线粒体形状多呈圆形或杆状, 内质网致密。模型组胎盘微绒毛稀疏短少、大片脱落、分布杂乱、线粒体及内质网肿胀, 胞质内空泡状结构增多。见图 4。

2.4 孕期恐惧应激对胎盘基因富集的影响

火山图与热图结果显示, 模型组胎盘中发现 998 个差异表达基因, 筛选标准为 | log2FC | > 0.5 且 *P* < 0.05。GSEA 分析结果显示, 模型组胎盘基因显著富集在细胞葡萄糖稳态。这提示孕期恐惧应激可能影响了胎盘的葡萄糖转运。见图 5。

2.5 孕期恐惧应激对胎鼠血糖的影响

检测胎鼠随机血糖发现, 模型组胎鼠血中葡萄糖含量显著低于对照组 (*P* < 0.01)。见图 6。



注: 与对照组相比, ** *P* < 0.01。(下同)
图 1 恐惧应激对孕鼠恐惧情绪的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

Figure 1 Effects of gestational fear stress on fear emotion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

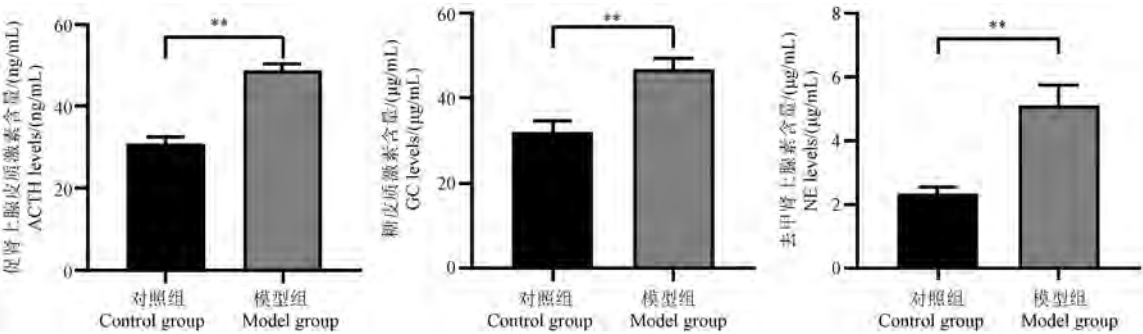


图 2 恐惧应激对孕鼠 ACTH、GC 和 NE 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 2 Effects of gestational fear stress on ACTH, GC and NE levels ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

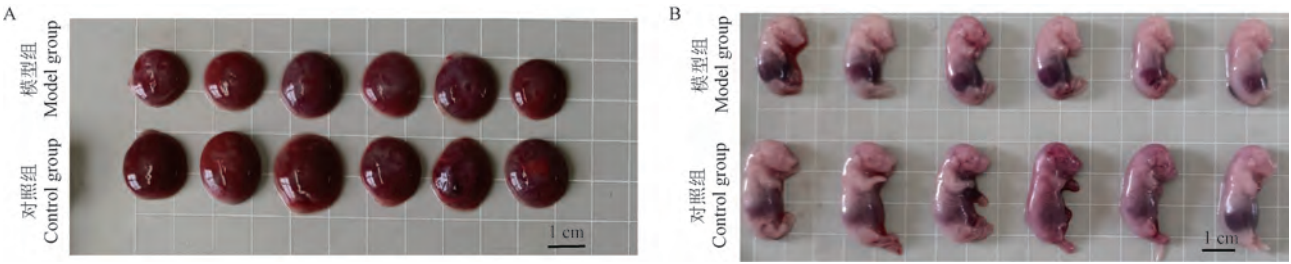


图 3 孕期恐惧应激对胎盘、胎鼠的影响

Figure 3 Effects of gestational fear stress on the placenta and fetal rats

表 2 孕期恐惧应激对胎儿一般情况的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of prenatal fear stress on the general condition of the fetus($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	胎产数量/个 Number of pregnancies/number	胎鼠重量/g Fetal rat weight/g	胎盘重量/g Placenta weight/g	胎盘效率/% Placenta efficiency/%
对照组 Control group	13.89 ± 1.27	5.84 ± 0.30	0.55 ± 0.05	10.77 ± 1.14
模型组 Model group	10.60 ± 2.27**	3.63 ± 0.43***	0.45 ± 0.05***	8.16 ± 1.34**

注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。
Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$.

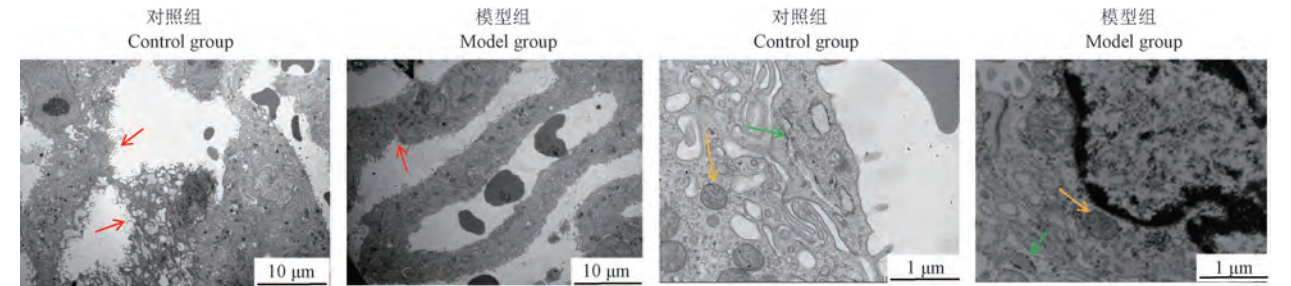
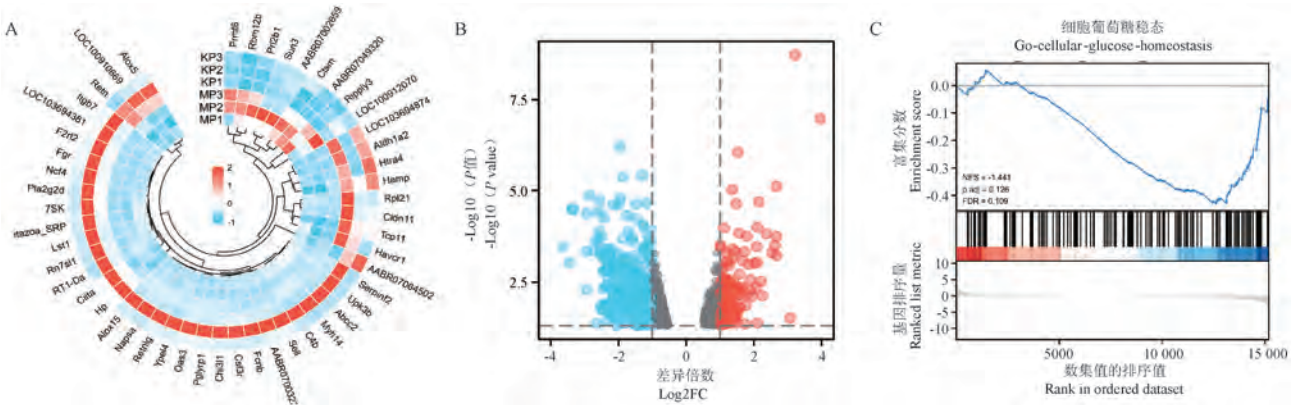


图 4 孕期恐惧应激对胎盘微结构的影响

Note. Red arrow. Microvillus. Yellow arrow. Mitochondria. Green arrow. Endoplasmic reticulum.

Figure 4 Effects of gestational fear stress on placental microstructure



注: A: 热图; B: 火山图; C: GSEA 分析。

图 5 孕期恐惧应激对胎盘基因富集的影响

Note. A. Heatmap. B. Volcano plot. C. Gene set enrichment analysis.

Figure 5 Effects of gestational fear stress on placental gene enrichment

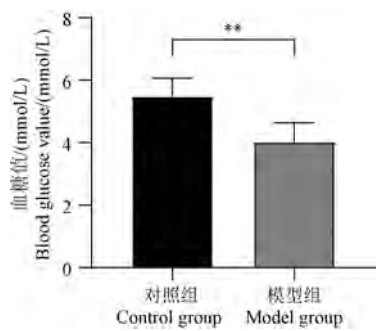


图 6 孕期恐惧应激对胎鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 6 Effects of gestational fear stress on fetal rat blood glucose($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.6 孕期恐惧应激对胎盘葡萄糖转运体的影响

2.6.1 孕期恐惧应激对胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6 以及 GLUT7 基因表达水平的影响

Real-time PCR 实验结果显示,与对照组相比,模

型组中 GLUT1、GLUT6 以及 GLUT7 的基因表达水平均明显下降($P < 0.01$),GLUT3 无显著性差异。见图 7。

2.6.2 孕期恐惧应激对胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6 以及 GLUT7 蛋白表达水平的影响

Western Blot 实验结果显示,与对照组相比,模型组中 GLUT1、GLUT6 以及 GLUT7 的蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01$),GLUT3 无显著性差异。见图 8。

2.6.3 孕期恐惧应激对胎盘葡萄糖转运体蛋白表达的影响

免疫组化结果显示 GLUT1、GLUT3、GLUT6、GLUT7 阳性表达呈棕黄色。模型组胎盘组织中 GLUT1 阳性表达显著低于对照组 ($P < 0.01$), GLUT3 在对照组和模型组中阳性表达无显著性差异,模型组胎盘组织中 GLUT6、GLUT7 阳性表达均明显低于对照组($P < 0.01$)。具体结果见图 9。

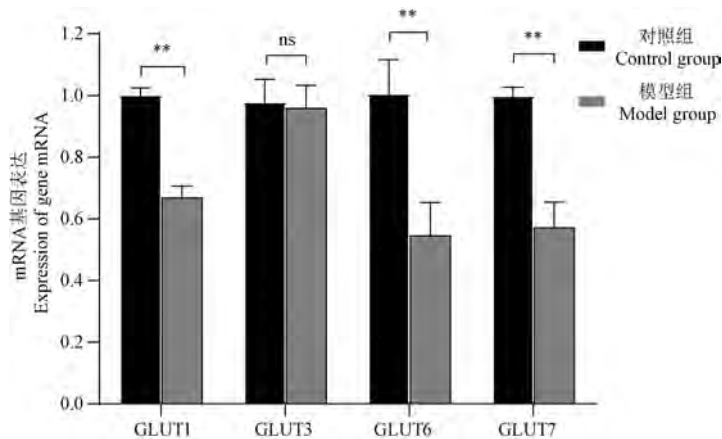


图 7 孕期恐惧应激对胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6 和 GLUT7 基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 7 Effects of gestational fear stress on placental GLUT1, GLUT3, GLUT6 and GLUT7 gene expression($\bar{x} \pm s, n = 3$)

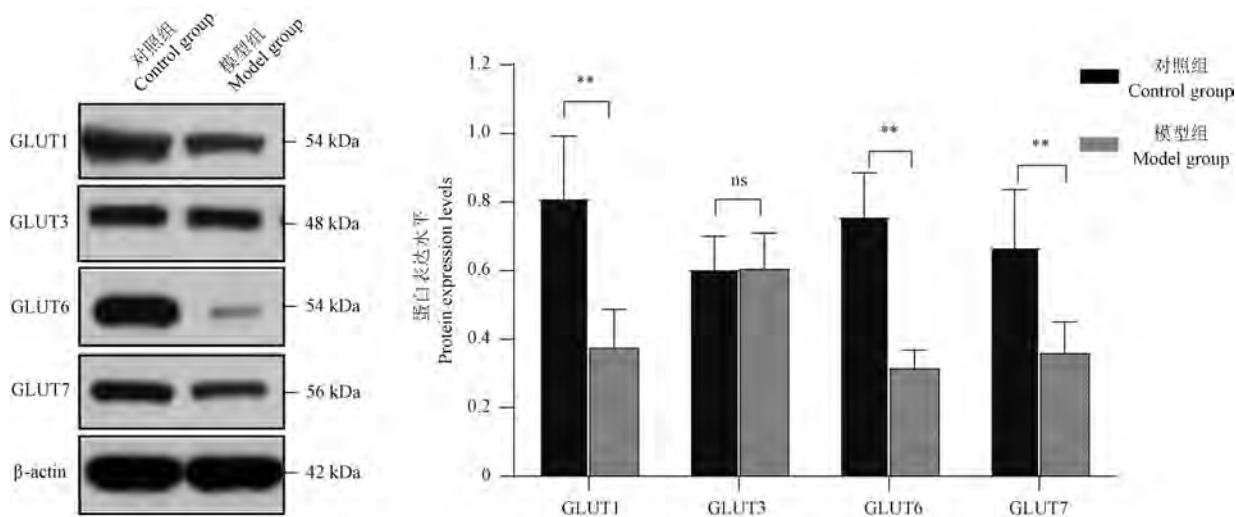
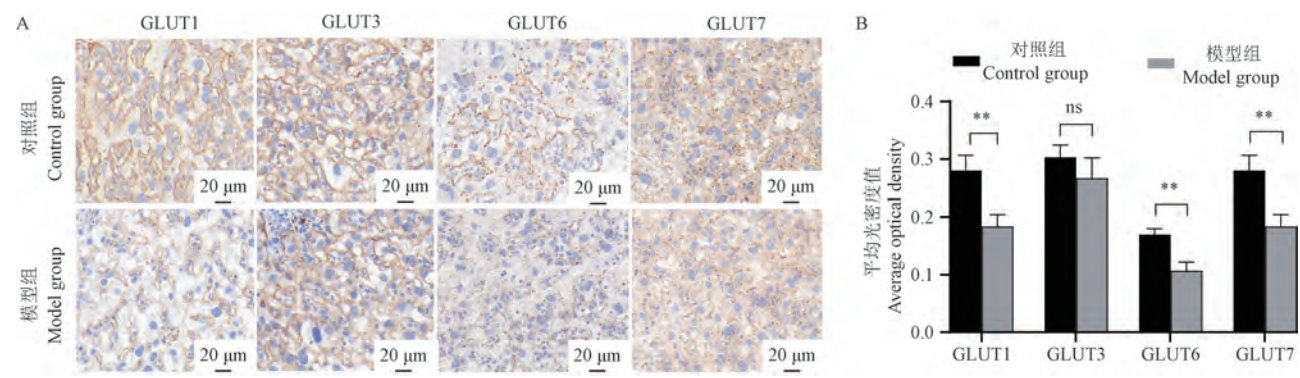


图 8 孕期恐惧应激对胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6 和 GLUT7 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 8 Effects of gestational fear stress on placental GLUT1, GLUT3, GLUT6, and GLUT7 protein expression($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注:A:胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6 和 GLUT7 蛋白表达(免疫组化法);B:胎盘免疫组化定量分析 GLUT1、GLUT3、GLUT6 和 GLUT7 平均光密度的结果。

图 9 孕期恐惧应激对胎盘 GLUT1、GLUT3、GLUT6 和 GLUT7 蛋白表达的影响
Note. A. Expression of GLUT1, GLUT3, GLUT6 and GLUT7 protein on placental (immunohistochemistry). B. Quantitative and analysis of the average optical density values of GLUT1, GLUT3, GLUT6 and GLUT7 on placental by immunohistochemistry.

Figure 9 Effects of gestational fear stress on placental GLUT1, GLUT3, GLUT6 and GLUT7 protein expression

3 讨论

临床研究^[10]以及实验研究^[11]均表明孕期应激是胎儿发育不良的重要潜在因素,大量的研究已证实孕期恐惧应激会导致胎儿生长受限、先兆子痫等不良妊娠疾病的出现^[12-13]。在本研究中,孕期恐惧应激出现胎产数量、胎儿和胎盘重量均显著下降的现象。这些现象提示孕期恐惧应激是导致不良胎产结局的重要因素之一。胎盘作为连接胎儿与母体的重要器官,在整个妊娠期间发挥着重要作用^[14]。胎盘异常是发生早产、死胎等不良妊娠结局的危险因素^[15]。电镜实验结果发现胎盘滋养层细胞表面微绒毛大片脱落,分布紊乱;线粒体肿胀,部分线粒体嵴断裂,甚至出现破裂、融合现象;粗面内质网出现肿胀,部分成空泡状结构。这些形态学的改变提示恐惧应激孕鼠胎盘组织出现了异常改变,而胎盘这种结构的异常可能会影响营养物质交换进而造成不良胎产结局。

葡萄糖是胎儿氧化代谢的主要底物,是胎儿正常生长和发育必须的能量物质。本研究测试了胎鼠血糖,结果显示孕期恐惧应激胎鼠血糖显著降低。同时对课题组前期胎盘测序数据进行分析,发现孕期恐惧应激影响胎盘的细胞葡萄糖稳态。细胞葡萄糖稳态即细胞内外葡萄糖浓度的平衡状态,而葡萄糖的转运是维持细胞葡萄糖稳态的关键过程之一^[16]。胎盘葡萄糖转运体可将葡萄糖从母体侧转运至胎儿侧,是胚胎获取葡萄糖的唯一途径,其数量与转运能力改变可以直接影响胎儿葡萄糖的供给。胎盘葡萄糖转运体可分为 3 个亚类:Ⅰ类

转运蛋白包括 GLUT1、GLUT2、GLUT3、GLUT4 以及 GLUT14,Ⅱ类转运蛋白包括 GLUT5、GLUT7、GLUT9 和 GLUT11,Ⅲ类转运蛋白包括 GLUT6、GLUT8、GLUT10 和 GLUT13^[17]。其中 GLUT1、GLUT3 与妊娠结局和胚胎发育密切相关^[18]。GLUT1 位于合体滋养层的微绒毛膜和基底膜上,被认为是主要的胎盘葡萄糖转运蛋白。GLUT3 仅限于在母体面的合体滋养层的微绒毛膜,但对葡萄糖有较高的亲和性。LÜSCHER 等^[19]发现先兆子痫胎盘中 GLUT1 在合体滋养层细胞中基因表达和功能呈下调趋势,GANGULY 等^[20]发现 GLUT3 敲除小鼠会导致早期流产或晚期宫内生长受限。MAIRESSE 等^[21]发现孕期应激 GLUT1 和 GLUT3 表达趋势相反,这可能与 GLUT1 下降而适应性增加 GLUT3 有关。本研究孕期恐惧应激胎盘中 GLUT1 表达水平显著下降,GLUT3 表达并无显著性差异,且存在 GLUT1 和 GLUT3 趋势不一致。GLUT6 和 GLUT7 作为葡萄糖转运蛋白家族的成员,表达水平下降时,对葡萄糖的转运产生显著影响,进而造成糖尿病、癌症等疾病的发生^[22-23]。本研究发现孕期恐惧应激 GLUT6 和 GLUT7 表达水平均显著下降,提示孕期恐惧应激影响了胎盘 GLUT6 和 GLUT7 的葡萄糖转运能力。

综上所述,孕期恐惧应激导致不良妊娠结局,这可能与胎盘 GLUT1、GLUT6、GLUT7 这 3 种关键葡萄糖转运体降低有关。本研究揭示了胎盘中葡萄糖转运蛋白在孕期恐惧应激致不良妊娠结局中的重要作用,为临床治疗提供潜在的药物靶点,为相关孕期应激导致的不良妊娠结局提供新的研究思路。

参 考 文 献(References)

[1] DAL MORO A P M, SOECKI G, DE FRAGA F S, et al. Fear of childbirth: prevalence and associated factors in pregnant women of a maternity hospital in southern brazil [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2023, 23(1): 632.

[2] JIANG Y, ZHANG T, YANG L, et al. Downregulation of FTO in the hippocampus is associated with mental disorders induced by fear stress during pregnancy [J]. Behav Brain Res, 2023, 453: 114598.

[3] RINNE G R, HARTSTEIN J, GUARDINO C M, et al. Stress before conception and during pregnancy and maternal cortisol during pregnancy: A scoping review [J]. Psychoneuroendocrinology, 2023, 153: 106115.

[4] KYLLO H M, WANG D, LORCA R A, et al. Adaptive responses in uteroplacental metabolism and fetoplacental nutrient shuttling and sensing during placental insufficiency [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2023, 324(6): E556-E568.

[5] REYNOLDS L P, MCLEAN K J, MCCARTHY K L, et al. Nutritional regulation of embryonic survival, growth, and development [J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1354: 63–76.

[6] KYLLO H M, WANG D, LORCA R A, et al. Adaptive responses in uteroplacental metabolism and fetoplacental nutrient shuttling and sensing during placental insufficiency [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2023, 324(6): E556-E568.

[7] SIBIAK R, OZEGOWSKA K, WENDER-OZEGOWSKA E, et al. Fetomaternal expression of glucose transporters (GLUTs)-biochemical, cellular and clinical aspects [J]. Nutrients, 2022, 14(10): 2025.

[8] 侯俊林, 杨丽萍, 万海娇, 等. 恐伤孕鼠对其血浆 ACTH、GC 含量及仔鼠发育情况的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1537–1539.
HOU J L, YANG L P, WAN H J, et al. Effects of fear impaired pregnant rats on plasma ACTH and GC content and development of offspring rats [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(4): 1537–1539.

[9] WALSH K, MCCORMACK C A, WEBSTER R, et al. Maternal prenatal stress phenotypes associate with fetal neurodevelopment and birth outcomes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(48): 23996–24005.

[10] VETROVOY O, STRATILOV V, LOMERT E, et al. Prenatal hypoxia-induced adverse reaction to mild stress is associated with depressive-like changes in the glucocorticoid system of rats [J]. Neurochem Res, 2023, 48(5): 1455–1467.

[11] VETROVOY O, STRATILOV V, LOMERT E, et al. Prenatal hypoxia-induced adverse reaction to mild stress is associated with depressive-like changes in the glucocorticoid system of rats [J]. Neurochem Res, 2023, 48(5): 1455–1467.

[12] 侯俊林, 杨丽萍, 郑军, 等. 6 ~ 14 岁情志、认知障碍儿童流体智力与母亲孕期心理应激的相关性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 5(6): 464–465.
HOU J L, YANG L P, ZHENG J, et al. Correlation between fluid intelligence and maternal psychological stress during pregnancy in 6 to 14-year-old children with affective and cognitive disorders. [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 5(6): 464–465.

[13] 李新民, 杨丽萍, 万海娇, 等. 恐伤孕鼠所产 80 日龄仔鼠认知发育与海马区多巴胺、二羟苯乙酸的相关性 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 10–14.
LI X M, YANG L P, WAN H J, et al. Correlation between cognitive development and levels of dopamine and 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid in the hippocampus in 80-day-old neonatal rats born of fear-impaired pregnant rats [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(11): 10–14.

[14] GALL A R, AMOAH S, KITASE Y, et al. Placental mediated mechanisms of perinatal brain injury: Evolving inflammation and exosomes [J]. Exp Neurol, 2022, 347: 113914.

[15] 许佳欢, 别亚男, 陈千晴, 等. 两种造模方法建立小鼠先兆子痫模型比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 34–41.
XU J H, BIE Y N, CHEN Q Q, et al. A comparative study of the establishment of mouse pre-eclampsia models [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 34–41.

[16] GALLI A, ARUNAGIRI A, DULE N, et al. Cholesterol redistribution in pancreatic β -cells: a flexible path to regulate insulin secretion [J]. Biomolecules, 2023, 13(2): 224.

[17] ILLSLEY N P, BAUMANN M U. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(2): 165359.

[18] STANIROWSKI P J, LIPA, BOMBA-OPON D, et al. Expression of placental glucose transporter proteins in pregnancies complicated by fetal growth disorders [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2021, 123: 95–131.

[19] LÜSCHER B P, MARINI C, JOERGER-MESSERLI M S, et al. Placental glucose transporter (GLUT)-1 is down-regulated in preeclampsia [J]. Placenta, 2017, 55: 94–99.

[20] GANGULY A, MCKNIGHT R A, RAYCHAUDHURI S, et al. Glucose transporter isoform-3 mutations cause early pregnancy loss and fetal growth restriction [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(5): E1241-E1255.

[21] MAIRESSE J, LESAGE J, BRETON C, et al. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(6): E1526-E1533.

[22] SEKI T, YANG Y, SUN X, et al. Brown-fat-mediated tumour suppression by cold-altered global metabolism [J]. Nature, 2022, 608(7922): 421–428.

[23] JOOST H G, THORENS B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review) [J]. Mol Membr Biol, 2001, 18(4): 247–256.

[收稿日期] 2023–09–05

杨清诚,赵娇,杨仁鑫,等. 急性臭氧暴露对大鼠肺泡灌洗液中外泌体 miRNA 表达谱的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 836-845.

YANG Q C, ZHAO J, YANG R X, et al. Effect of acute ozone exposure on miRNA expression profile of exosomes in alveolar lavage fluid of rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 836-845.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.003

急性臭氧暴露对大鼠肺泡灌洗液中外泌体 miRNA 表达谱的影响

杨清诚^{1,2}, 赵娇^{1,2}, 杨仁鑫^{1,2}, 闫战功^{1,2}, 裴著革^{2*}, 刘晓华^{2*}

(1. 天津体育学院运动健康学院 天津市运动生理学与运动医学重点实验室, 天津 301617;

2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050)

【摘要】 目的 明确急性臭氧暴露后大鼠肺泡灌洗液来源的外泌体中微小 RNA (microRNA, miRNA) 表达谱的变化, 并分析其与肺损伤的潜在关系。方法 将成年雄性 Wistar 大鼠放入气体染毒舱内分别暴露于 0、0.5 和 2 ppm 臭氧 6 h。实验结束后 24 h 麻醉大鼠, 收集肺泡灌洗液并提取外泌体。采用 miRNA-seq 技术检测外泌体中差异表达的 miRNA, 使用 miRDB 数据库对组间差异表达 Top 10 miRNA 进行靶基因预测, 并对靶基因进行 Gene Ontology 功能富集和 KEGG Pathway 分析。利用 qRT-PCR 方法对表达丰度较高且组内均一性较好的差异表达 miRNA 进行验证。结果 与 0 ppm 组相比, 0.5 ppm 组大鼠肺泡灌洗液中外泌体 miRNA 有 8 个上调、55 个下调, 而 2 ppm 组中有 32 个上调、61 个下调。与 0.5 ppm 组相比, 2 ppm 组大鼠肺泡灌洗液中外泌体 miRNA 有 90 个上调、74 个下调。差异表达 Top 10 miRNA 的靶基因主要参与调控 DNA 结合、杂环化合物结合和影响转录等方面, 并与癌症、MAPK、PIK3-AKT、TNF、ErbB、线粒体自噬和 FoxO 等信号通路密切相关。qRT-PCR 结果表明测序结果基本可靠。结论 急性臭氧暴露可导致大鼠肺泡灌洗液中外泌体 miRNA 表达谱发生变化, 差异 miRNA 可能参与了臭氧暴露所致的肺组织炎症、肺损伤等病理进程。

【关键词】 臭氧; 急性暴露; 外泌体; miRNA; 肺泡灌洗液

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2024) 07-0836-10

Effect of acute ozone exposure on miRNA expression profile of exosomes in alveolar lavage fluid of rats

YANG Qingcheng^{1,2}, ZHAO Jiao^{1,2}, YANG Renxin^{1,2}, YAN Zhangong^{1,2}, XI Zhuge^{2*}, LIU Xiaohua^{2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Exercise Physiology and Sports Medicine, Institute of Sport, Exercise & Health,

Tianjin University of Sport, Tianjin 301617, China; 2. Institute of Environmental and Operational Medicine,

Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China)

Corresponding author: XI Zhuge. E-mail: zhugexi2003@sina.com; LIU Xiaohua. E-mail: liuxiaohua1992@sina.com

【Abstract】 **Objective** To clarify the changes in the microRNA (miRNA) expression profile of rat alveolar lavage-fluid-derived exosomes after acute ozone exposure and analyze its potential relationship with lung injury. **Methods** Adult male Wistar rats were exposed to 0 ppm, 0.5 ppm, and 2 ppm ozone for 6 h in a gas exposure chamber. After 24 h, the rats were anesthetized, the alveolar lavage fluid was collected, and exosomes were extracted. Differentially expressed

【基金项目】 国家重点研发计划项目 (2017YFC0211600, 2017YFC0211603)。

Funded by National Key Research and Development Plan (2017YFC0211600, 2017YFC0211603)。

【作者简介】 杨清诚, 在读硕士研究生, 研究方向: 环境与健康。Email: 1085747283@qq.com

【通信作者】 刘晓华, 女, 副研究员, 研究方向: 环境与健康。Email: liuxiaohua1992@sina.com;

裴著革, 男, 研究员, 研究方向: 环境毒理学。Email: zhugexi2003@sina.com。

* 共同通信作者

miRNAs in exosomes were detected by miRNA-seq technology. miRDB databases were used to predict the target genes of the top 10 differentially expressed miRNAs among the groups, and Gene Ontology function enrichment and KEGG Pathway analyses were performed on the target genes. The differentially expressed miRNAs with high expression abundance and good uniformity were verified by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with the findings in the 0 ppm group, there were 8 up-regulated and 55 down-regulated miRNAs in the 0.5 ppm group, and 32 up-regulated and 61 down-regulated miRNAs in the 2 ppm group. Compared with the findings in the 0.5 ppm group, 90 exosomal miRNAs were up-regulated and 74 were down-regulated in the 2 ppm group. The target genes of top 10 differentially expressed miRNAs were mainly involved in regulating DNA binding, heterocyclic compound binding, and affecting transcription, and were closely related to cancer, MAPK, PIK3-AKT, TNF, ErbB, mitophagy, and FoxO signaling pathways. The qRT-PCR showed that the sequencing result were basically reliable. **Conclusions** Acute ozone exposure can lead to changes in the expression profile of exosomal miRNA in the alveolar lavage fluid of rats. Differentially expressed miRNAs may be involved in pathological processes, such as lung tissue inflammation and lung injury, caused by ozone exposure.

【Keywords】 ozone; acute exposure; exosomes; miRNA; bronchoalveolar lavage fluid
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来,臭氧污染在我国引起了广泛的关注^[1]。研究表明,长期接触臭氧会引起肺损伤、气道炎症和多种呼吸系统疾病,如慢性阻塞性肺病等^[2]。臭氧会导致呼吸道上皮细胞损伤,诱导炎症因子的产生,激活 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 等通路,并诱导氧化应激^[3]。慢性臭氧暴露可引起小鼠细支气管扩张,肺泡间隙增大,出现细支气管周围纤维化和肺气肿^[4],导致大鼠持续的肺损伤和肺部炎症^[5]。降低人体肺功能,增加个体患肺气肿的风险^[6]。急性臭氧暴露导致大鼠和小鼠的肺损伤,引起小鼠气道炎症反应^[7-8],同样可诱导人体肺部炎症,降低人体肺功能^[9]。

外泌体是一种细胞外脂质双层囊泡,大小为 30 ~ 150 nm,几乎所有类型细胞都分泌外泌体,在血液、尿液、支气管肺泡灌洗液、腹水和脑脊液中均可检测到。外泌体可携带脂质、蛋白质、核酸和多种非编码 RNA,并将其运送到靶细胞中,在细胞间通讯中发挥关键作用。miRNA 作为非编码 RNA 广泛存在于多种生物中,可调节靶 mRNA 的表达水平进而参与细胞生理进程,外泌体 miRNA 是外泌体中的重要生物标志物,相较于外泌体中其他物质,外泌体 miRNA 对疾病的反应更灵敏^[10],更有潜力成为疾病的生物标志物。

肺组织作为臭氧首先接触的靶器官,目前关于臭氧暴露对肺组织释放的外泌体 miRNA 的影响,以及臭氧暴露通过影响外泌体介导肺毒性的研究较少。因此,本研究提取大鼠肺泡灌洗液中的外泌体,对外泌体中的差异 miRNA 进行测序和验证,旨在为揭示臭氧对肺部的毒性作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 30 只,SPF 级,7 ~ 8 周龄,体重 270 ~ 290 g,由北京维通利华实验动物科技有限公司提供【SCXK(京)2021-0006】。饲养于军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所【SYXK(军)2019-0002】。动物在温度 24 ~ 26 $^{\circ}$ C,湿度 50% ~ 70%,12 h 明暗循环,自由摄取食物和水的条件下适应性喂养 1 周。本研究对动物所做处理均由环境医学与作业医学研究所实验动物福利伦理委员会审查和批准(IACUC of AMMS-04-2020-041)。

1.1.2 主要试剂与仪器

miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(KR211,天根,中国),miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒(FP411,天根,中国),引物(华大基因,中国)。

动物气体染毒舱(HRH-CSED-K,慧荣和,中国),臭氧发生器(HMJ-CY-2,海美钜,中国),臭氧检测仪(1003AH CA,DASIBI,美国),透射电子显微镜(Tecnai G2 Spirit 120KV,FEI,美国),可视化纳米颗粒示踪分析仪(ZetaviewPMX 110,Particle Metrix,德国)。

1.2 方法

1.2.1 分组

大鼠随机分为 0 ppm 组、0.5 ppm 组和 2 ppm 组,每组 10 只。大鼠置于动物气体染毒舱中,该设备可实时监测内部温度、湿度、压差、氧气浓度、二

氧化碳浓度以及污染气体浓度,臭氧由臭氧发生器产生。臭氧检测仪可实时监测臭氧浓度,暴露时使用的臭氧浓度分别为 0、0.5 和 2 ppm,暴露 6 h,暴露时舱内温度为 20 ~ 23 ℃,湿度为 50% ~ 80%,暴露后禁食不禁水。

1.2.2 肺泡灌洗液中外泌体提取和鉴定

暴露结束后 24 h 用 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠。将气管暴露,于大鼠气管上斜切一个开口,将灌洗针插入气管并使用手术线结扎,随后注射器吸收 3 mL 生理盐水,缓慢注射和吸取 3 次。收集灌洗液用于后续实验。

泡灌洗液于 1733 r/min 下离心 5 min,去除灌洗液中的细胞,随后将上清转移到聚碳酸酯管中,3466 r/min 离心 10 min,去除细胞碎片,取上清转移到新的聚碳酸酯管中,7750 r/min 离心 30 min,去除脱落的微囊泡,继续取上清液,使用 0.22 μm 膜过滤器过滤,24 507 r/min 离心 2 h,将得到的外泌体用 1 × PBS 洗涤 1 次,24 507 r/min 离心 2 h,外泌体在 PBS 中重悬,使用透射电子显微镜和纳米颗粒追踪分析技术(Nanoparticle Tracking Analysis,NTA)对外泌体进行鉴定。其余外泌体于-80 ℃保存备用。

1.2.3 总 RNA 提取

样本加入 TRIzol 吹打混匀,加入裂解液的样品在室温放 5 min,加入氯仿 200 μL,剧烈震荡 15 s,静置 3 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,将上层转移至新管,加入 0.5 倍体积无水乙醇,混匀,将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 s,向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 去蛋白液 RD,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 s,弃废液;向吸附柱 CR3 中加入 500 μL 漂洗液 RW,室温静置 2 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 s,弃废液,重复加入 500 μL 漂洗液 RW,室温静置 2 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 s,弃废液,4 ℃,12 000 r/min 离心 2 min,去除残余液体。室温通风片刻,将吸附柱 CR3 转入一个新的 1.5 mL 离心管中,加 RNase-Free ddH₂O,室温放置 2 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 2 min,置于-80 ℃备用;使用 NanoDrop ND-1000 测量总 RNA 准确浓度以及蛋白质污染情况,使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样本完整性。

1.2.4 miRNA 文库构建及测序分析

使用 NEB Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina 生成测序文库,用 Agilent Bioanalyzer 2100 进行文库质量测定,混合好不同样品的测序文

库,通过 0.1 mol/L NaOH 变性生成单链 DNA,在 Illumina flow cell 上捕获,原位扩增为簇,并在 Illumina NextSeq 500 测序上进行 51 个循环测序。

测序分析:Illumina NextSeq 500 产生的测序数据为原始数据,经测序质量控制后将预处理过滤步骤产生的整理数据比对到参考基因组中所有 miRNA 前体和成熟体序列比对,统计 miRNA 表达水平,使用 RPM 标准化。采用 edgeR 进行组间的差异表达分析,设置阈值为 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1.5$,且 $P < 0.05$ 来筛选差异表达 miRNA。

1.2.5 miRNA 靶基因预测及功能分析

使用 miRDB 数据库对组间差异表达 Top 10 miRNA 进行靶基因预测,对差异 miRNA 靶基因进行 GO 功能显著性富集分析、靶基因 Pathway 显著性富集分析。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

以总 RNA 1 μg 为模板,使用天根生物的 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒和 miRNA 荧光定量检测试剂盒进行反转录和 qRT-PCR 实验,引物见表 1,每个模板的 Ct 值使用 Applied Biosystems Step One 加 Real-time PCR 系统测定。计算 ΔCt 和 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值,分析目标基因的相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequence

基因 Genes		序列(5'-3') Sequence(5'-3')
rno-miR-15a-3p	F	GAGGCCATATTGTGCTGCCTCA
rno-miR-3065-5p	F	GGCCCTCAACAAAATCACTGATGCT
rno-miR-188-5p	F	CATCCCTTGCATGGTGGAGGG
rno-miR-34a-3p	F	GGGGAATCAGCAAGTATACTGCCCTA
rno-miR-33-3p	F	CCCCAATGTTTCCACAGTGCATCA
rno-let-7g-3p	F	CTGTACAGGCCACTGCCTTGC
rno-miR-324-5p	F	CGCATCCCCTAGGGCATTGGTGT
rno-miR-130b-5p	F	GGACTCTTTCCTGTTGCACTACT
rno-miR-466b-3p	F	CGGGCATACATACACACACATACAC
rno-miR-122-5p	F	GCGTGGAGTGTGACAATGGTGTTTG
rno-miR-184	F	GCTGGACGGAGAACTGATAAGGGT
rno-miR-16-3p	F	GCCCGACCAATATTATTGTGCTGCTT
rno-miR-196a-5p	F	GGCCTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG
rno-miR-193b-5p	F	GGGGGGTTTTGAGGGCGAGA
rno-miR-298-5p	F	CAGAGGAGGGCTGTTCTTCCC
rno-miR-130a-3p	F	GCCAGTGCATGTTAAAGGGCAT
rno-miR-138-1-3p	F	CGGCTACTTCACAACCCAGGG
rno-miR-664-3p	F	GCGCTATTCACTTACTCCCCAGCCTA
rno-miR-29c-3p	F	GGGCTAGCACCATTGTGAAATCGGTTA
rno-miR-138-5p	F	GCTGGTGTGTGAATCAGGCCG
rno-miR-208a-3p	F	GCGCCATAAGACGAGCAAAAAGC
rno-miR-202-3p	F	GCCAGAGGTATAGCGCATGGGAAA
U6	F	CTCGCTTCGGCAGCACA
	R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析,计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数比较使用独立样本检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肺泡灌洗液外泌体鉴定

透射电镜结果如图 1 所示,0 ppm 组、0.5 ppm

组和 2 ppm 组的囊泡为 30 ~ 150 nm 的圆形双层膜小囊泡,大小不一致,囊泡形态均为杯托状小囊泡。粒径分析如图 2 所示,3 组囊泡粒径范围主要集中在 80 ~ 200 nm,符合外泌体粒径范围要求,上述结果与以往大鼠肺泡灌洗液外泌体形态报道基本相符^[11],此外,0 ppm 组外泌体浓度为每毫升 3.7×10^{10} 个,0.5 ppm 组外泌体浓度为每毫升 2.7×10^{10} 个,2 ppm 组外泌体浓度为每毫升 6.0×10^{10} 个。

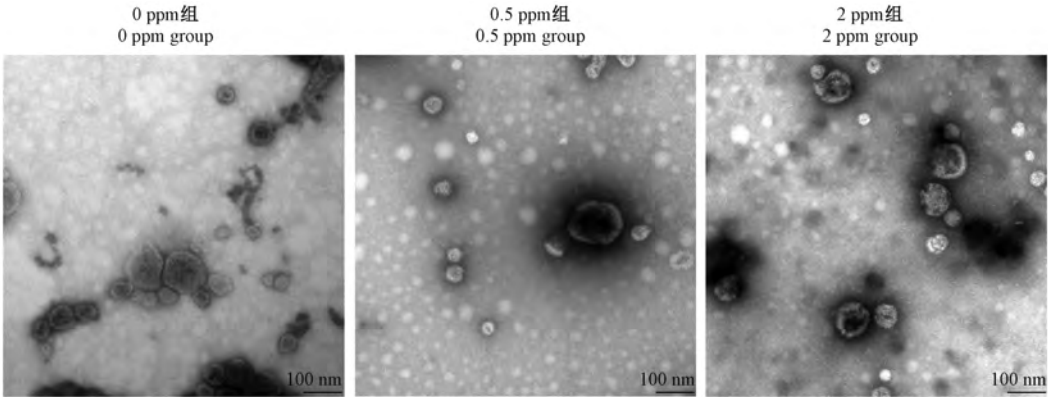


图 1 外泌体电镜图
Figure 1 Electron microscope of exosomes

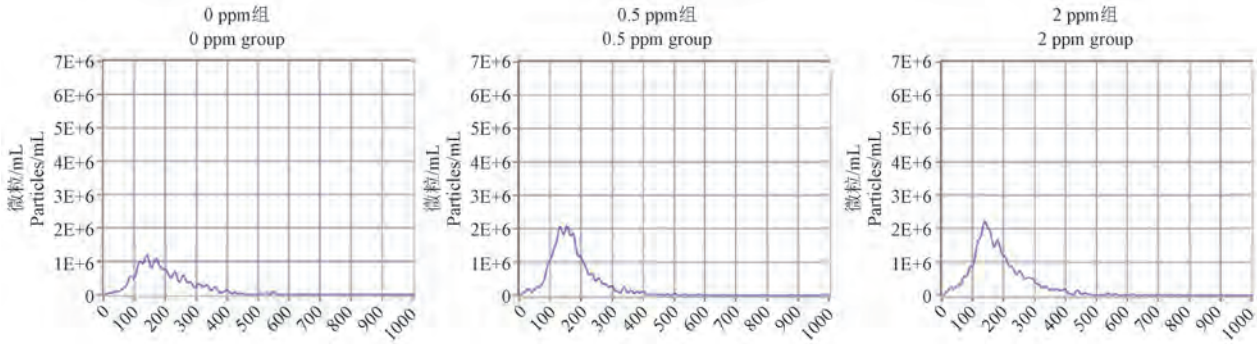


图 2 外泌体粒径分析
Figure 2 Exosome particle size analysis

2.2 差异性表达 miRNA 筛选

使用 $\log_2(\text{FoldChange})$ 和 $-\log_{10}P$ value 两个条件筛选得到差异表达 miRNA 并绘制火山图(图 3)。与 0 ppm 组相比,0.5 ppm 组上调的 miRNA 有 8 个,下调 55 个;而 2 ppm 组上调的 miRNA 有 32 个,下调 61 个。与 0.5 ppm 组相比,2 ppm 组上调的 miRNA 有 90 个,下调 74 个。该研究结果表明,臭氧暴露对大鼠肺泡灌洗液来源的外泌体 miRNA 表达水平有显著影响。

2.3 靶基因预测及 Gene Ontology 富集分析

使用 miRDB 数据库对组间显著性差异上、下调

的 Top 10 miRNA 进行靶基因预测,对靶基因进行 Gene Ontology 富集分析(图 4)和 KEGG 富集分析。与 0 ppm 组相比,0.5 ppm 组和 2 ppm 组上调的 miRNA 的靶基因共同富集于多细胞生物发育、解剖结构发育、系统发育和生物过程的积极调节等生物学过程中,富集在胞内细胞器、核质、核部分和细胞器等部位,共同富集功能为序列特异性双链 DNA 结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、结合和 DNA 结合转录因子活性等,下调的 miRNA 靶基因主要富集在多细胞生物发育生物学过程中,富集在细胞核、细胞器、胞内细胞器和胞质等部位,共同富集功能为

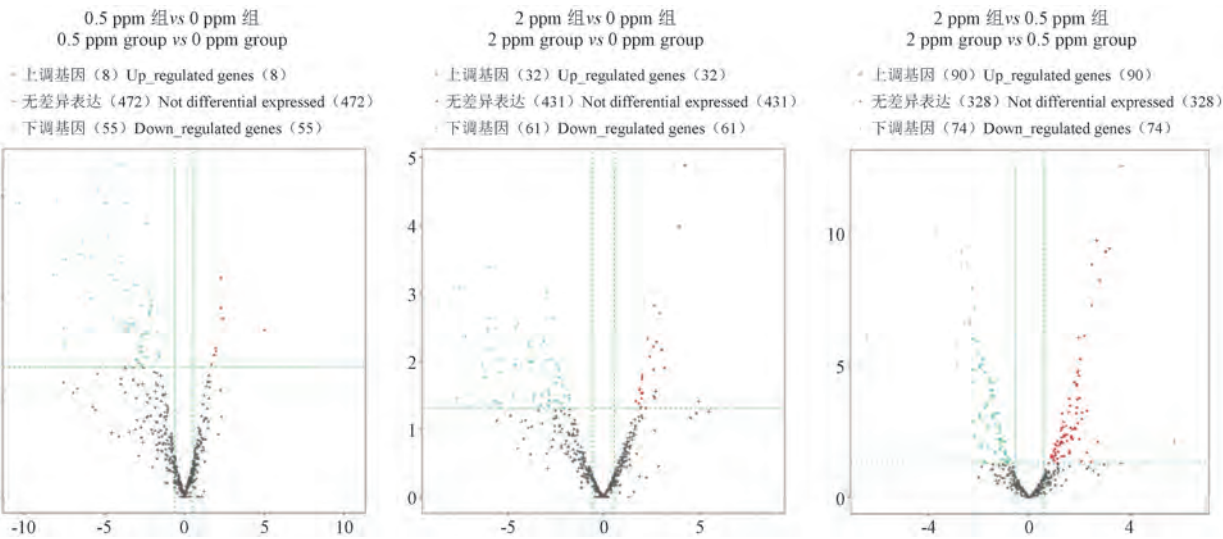


图 3 外泌体差异 miRNA 火山图

Figure 3 Volcano diagram of exosome differential miRNA

序列特异性双链 DNA 结合、RNA 聚合酶 II 调控区 DNA 结合、转录调控因子活性和转录调控区 DNA 结合等。0.5 ppm 组上调 miRNA 的靶基因单独富集于多细胞生物发育和单细胞系统发育等生物学过程中,富集功能为杂环化合物结合和有机化合物结合等,下调 miRNA 的靶基因富集于细胞代谢过程和核酸模板转录等生物学过程中,富集功能为双链 DNA 结合、DNA 结合和杂环化合物结合等。2 ppm 组上调 miRNA 的靶基因单独富集于发育过程的调控和解剖结构形态发生等生物学过程中,富集功能 RNA 聚合酶 II 调控区 DNA 结合、离子结合和转录调节剂活性等,下调 miRNA 的靶基因富集于发育过程、神经系统发育和解剖结构形态发生等生物学过程,富集功能为 DNA 结合转录因子活性和蛋白结合等。

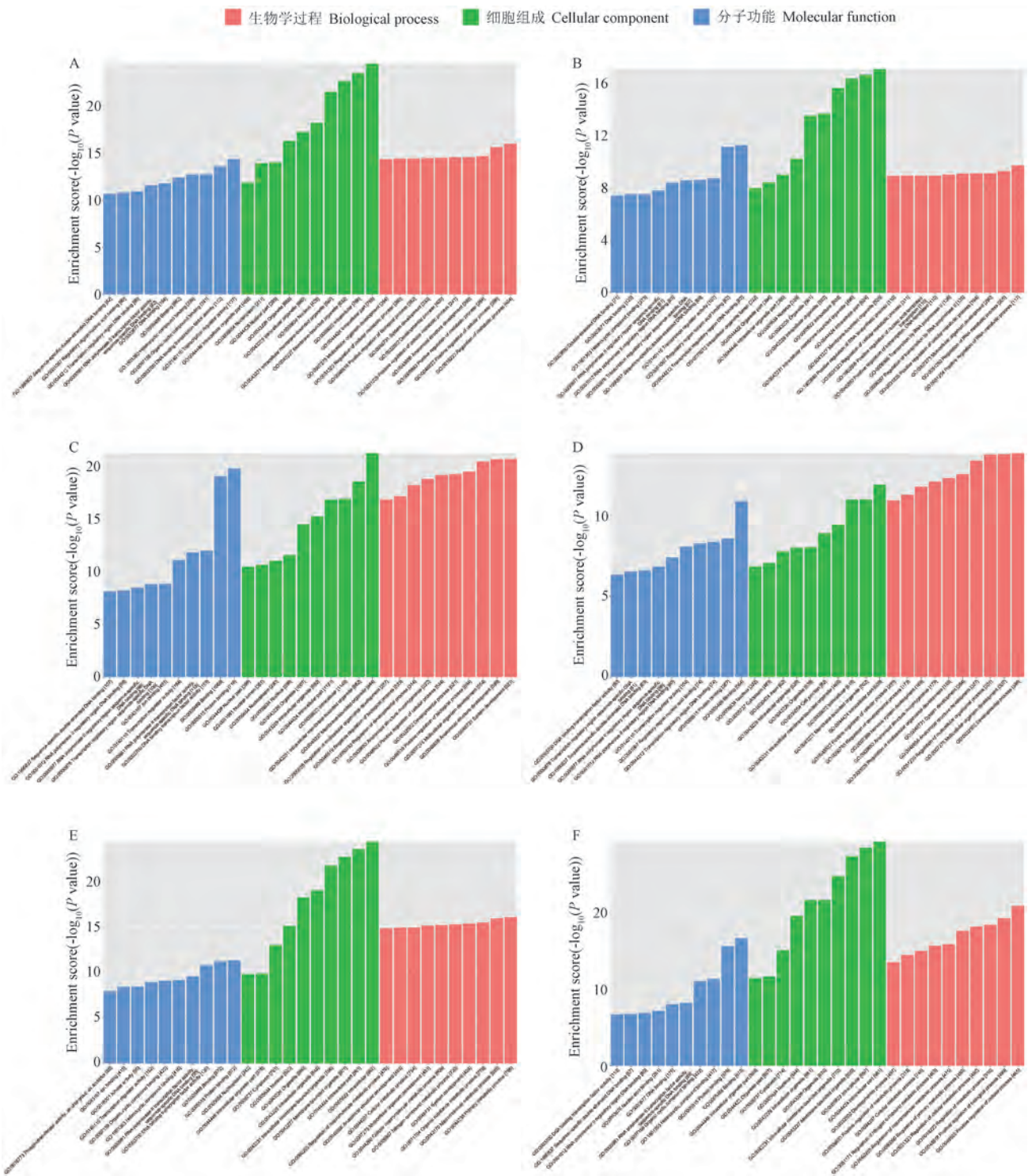
2.4 靶基因 KEGG Pathway 富集分析

KEGG 富集分析显示(图 5),与 0 ppm 组相比,0.5 ppm 组和 2 ppm 组上调的 miRNA 的靶基因共同富集于癌症中的转录失调、黏着斑和癌症中的胆碱代谢通路,下调的 miRNA 的靶基因共同富集于动物有丝分裂、前列腺癌和癌症中的胆碱代谢通路。此外,0.5 ppm 组上调的 miRNA 的靶基因单独富集于动物自噬、mTOR 信号通路、谷氨酸突触、安非他命成瘾、轴突引导、TGF-β 信号通路和心律失常性右室心肌病通路,下调的 miRNA 的靶基因富集于肾细胞癌、Ras 信号通路、ErbB 信号通路、内分泌阻力、雌激素信号通路、T 细胞受体信号通路和 B 细胞受

体信号通路。2 ppm 组上调的 miRNA 的靶基因单独富集于癌症通路、前列腺癌、TNF 信号通路、内分泌阻力、PIK3-AKT 信号通路、乳腺癌和癌症中的蛋白聚糖通路,下调的 miRNA 的靶基因富集于癌症通路、内分泌抵抗、小细胞肺癌、MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用和 FoxO 信号通路。上述结果表明,臭氧暴露后大鼠肺泡灌洗液中的 miRNA 表达变化可能影响癌症、免疫和炎症相关疾病。

2.5 外泌体差异表达 miRNA 的验证

与 0 ppm 组相比,在 0.5 ppm 组和 2 ppm 组中选取表达丰度较高且组内均一性较好的 miRNA 进行 qRT-PCR 验证,在 0.5 ppm 组较 0 ppm 组和 2 ppm 组较 0 ppm 组中各选取了 10 个差异 miRNA。如图 6 所示,与 0 ppm 组相比,0.5 ppm 组外泌体 rno-miR-33-3p、rno-let-7g-3p、rno-miR-3065-5p、rno-miR-188-5p、rno-miR-34a-3p、rno-miR-15a-3p 相对表达量均显著上升($P < 0.01$),rno-miR-193b-5p 和 rno-miR-16-3p 相对表达量均显著下降($P < 0.01$)。如图 7 所示,与 0 ppm 组相比,2 ppm 组外泌体 rno-miR-138-1-3p、rno-miR-664-3p、rno-miR-298-5p、rno-miR-130a-3p、rno-miR-138-5p、rno-miR-29c-3p 和 rno-miR-324-5p 相对表达量均显著上升($P < 0.01$),rno-miR-16-3p、rno-miR-202-3p 和 rno-miR-208a-3p 相对表达量均显著下降($P < 0.01$)。以上结果与 miRNA-Seq 趋势基本一致,表明本实验结果具有较高可靠性。

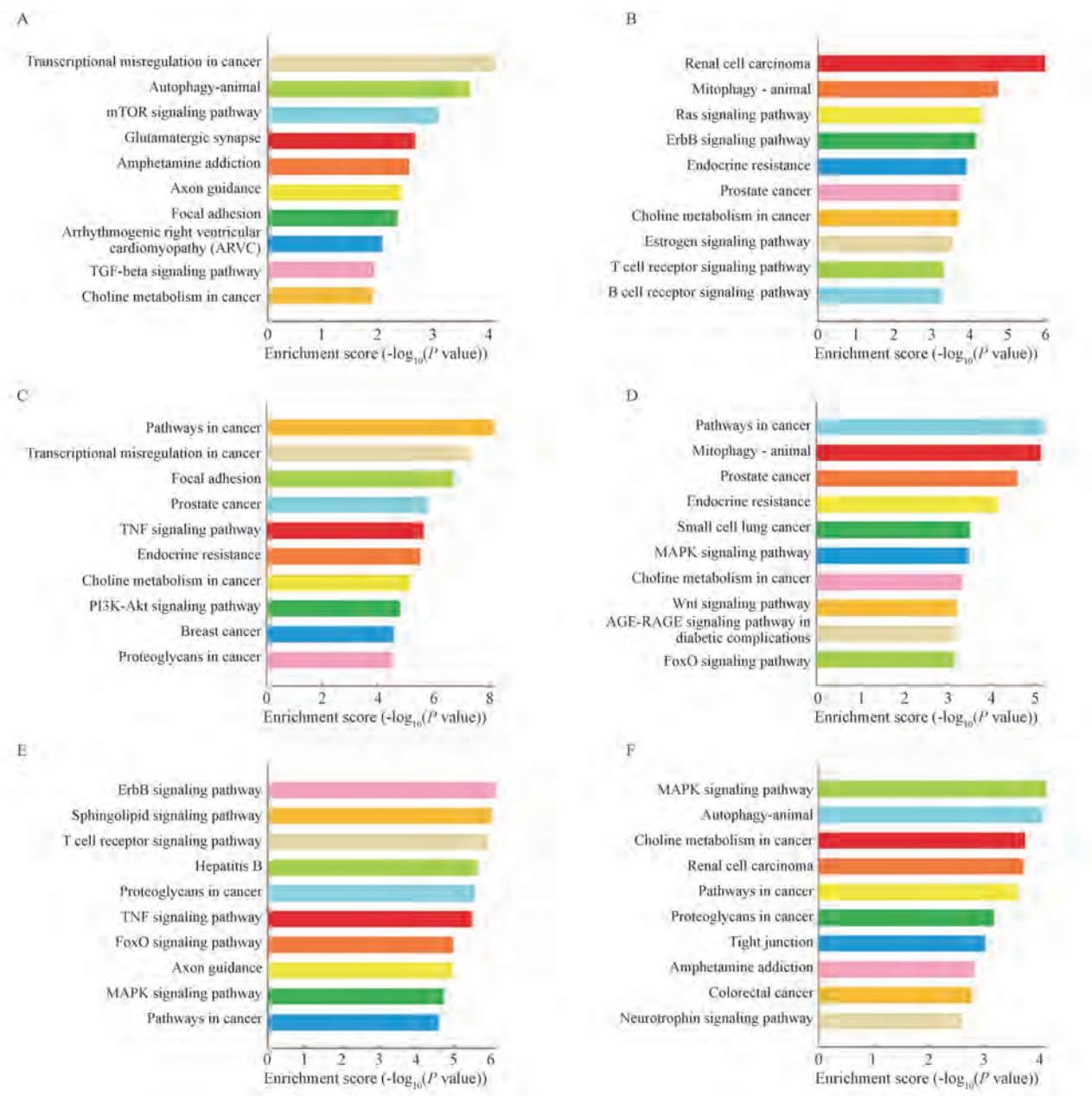


注:A:0.5 ppm 组 *vs* 0 ppm 组上调 miRNA 靶基因;B:0.5 ppm 组 *vs* 0 ppm 组下调 miRNA 靶基因;C:2 ppm 组 *vs* 0 ppm 组上调 miRNA 靶基因;D:2 ppm 组 *vs* 0 ppm 组下调 miRNA 靶基因;E:2 ppm 组 *vs* 0.5 ppm 组上调 miRNA 靶基因;F:2 ppm 组 *vs* 0.5 ppm 组下调 miRNA 靶基因。

图 4 靶基因 GO 富集分析

Note. A. 0.5 ppm group *vs* 0 ppm group up-regulated miRNA target genes. B. 0.5 ppm group *vs* 0 ppm group down-regulated miRNA target genes. C. 2 ppm group *vs* 0 ppm group up-regulated miRNA target genes. D. 2 ppm group *vs* 0 ppm group down-regulated miRNA target genes. E. 2 ppm group *vs* 0.5 ppm group up-regulated miRNA target genes. F. 2 ppm group *vs* 0.5 ppm group down-regulated miRNA target genes.

Figure 4 GO enrichment analysis of target genes



注: A: 0.5 ppm 组 *vs* 0 ppm 组上调 miRNA 靶基因; B: 0.5 ppm 组 *vs* 0 ppm 组下调 miRNA 靶基因; C: 2 ppm 组 *vs* 0 ppm 组上调 miRNA 靶基因; D: 2 ppm 组 *vs* 0 ppm 组下调 miRNA 靶基因; E: 2 ppm 组 *vs* 0.5 ppm 组上调 miRNA 靶基因; F: 2 ppm 组 *vs* 0.5 ppm 组下调 miRNA 靶基因。

图 5 靶基因 KEGG 富集分析

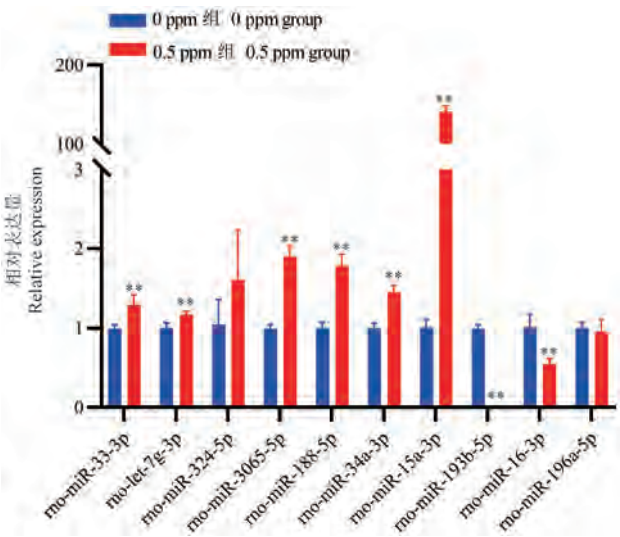
Note. A. 0.5 ppm group *vs* 0 ppm group up-regulated miRNA target genes. B. 0.5 ppm group *vs* 0 ppm group down-regulated miRNA target genes. C. 2 ppm group *vs* 0 ppm group up-regulated miRNA target genes. D. 2 ppm group *vs* 0 ppm group down-regulated miRNA target gene. E. 2 ppm group *vs* 0.5 ppm group up-regulated miRNA target genes. F. 2 ppm group *vs* 0.5 ppm group down-regulated miRNA target genes.

Figure 5 KEGG enrichment analysis of target genes

3 讨论

本研究首先对吸入臭氧 Wistar 大鼠肺泡灌洗液中外泌体进行提取和鉴定,通过超速离心法提取外泌体,使用透射电镜发现提取的外泌体形态为圆盘杯托状小囊泡,是典型的外泌体特征,通过粒径

分析发现,提取的外泌体符合外泌体粒径范围,认为本研究通过超速离心法提取的外泌体质量可靠。miRNA 是外泌体中携带重要成分之一,可通过结合靶细胞中靶基因 3' UTR 区域的方式负调控靶基因的表达。本研究借助生物信息学分析外泌体 miRNA 差异表达情况,结果显示,臭氧暴露后,0.5



注:与 0 ppm 组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 6 0.5 ppm 组部分差异 miRNA 相对表达水平

Note. Compared with 0 ppm group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 6 Relative expression of some differentially expressed miRNAs in 0.5 ppm group

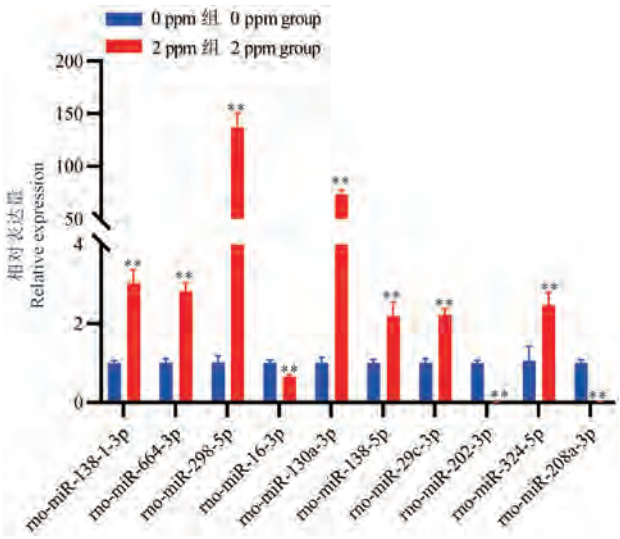


图 7 2 ppm 组部分差异 miRNA 相对表达水平

Figure 7 Relative expression of some differentially expressed miRNAs in 2 ppm group

ppm 组与 0 ppm 组相比 8 个 miRNA 上调,55 个下调;而 2 ppm 组与 0 ppm 组相比 32 个 miRNA 上调,61 个下调;2 ppm 组与 0.5 ppm 组相比有 90 个 miRNA 上调,74 个下调,通过 miRDB 数据库预测靶基因,GO 和 KEGG 富集分析靶基因的分子功能和参与的通路,发现臭氧暴露后肺泡灌洗液外泌体中 miRNA 可能调控双链 DNA 结合、离子结合和杂环化合物结合等分子功能,参与系统发育和细胞代谢

等生物学过程,可能通过 MAPK 信号通路、PIK3-AKT 信号通路、TNF 信号通路和 ErbB 信号通路等影响肺损伤的发生和发展。外泌体 miRNA 参与臭氧诱导的肺损伤在小鼠中已有报道^[12],急性臭氧暴露刺激小鼠肺部和气管分泌外泌体增加,肺泡灌洗液外泌体 miRNA 表达改变,促进促炎巨噬细胞的激活。SMITH 等^[13]在急性臭氧暴露小鼠肺泡灌洗液中发现了 miRNA 表达谱的变化以及小鼠气道炎症标志物增加。

为进一步探索肺损伤可能的 miRNA 标志物,本研究对表达丰度较高且组内均一性较好的差异 miRNA 进行 qRT-PCR 验证,发现差异表达的 miRNA 与 miRNA-Seq 趋势基本一致,表明本研究结果具有较高可靠性。臭氧可以影响 miRNA 的表达来调控肺部疾病,如下调 miR-15a-5p 表达,激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路,上调 T 细胞的 Th1/Th2 比值来促进哮喘。本研究发现,急性臭氧暴露后 0.5 ppm 组和 2 ppm 组与 0 ppm 组相比,差异表达的 miRNA 的靶基因参与了 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 TNF 等信号通路,可能通过调控肺组织炎症等方式参与肺损伤过程。与 0 ppm 组相比,0.5 ppm 组 rno-miR-34a-3p、rno-miR-15a-3p 和 rno-miR-3065-5p 等相对表达量上升,rno-miR-193b-5p 和 rno-miR-16-3p 相对表达量下降,这些差异 miRNA 与肺损伤、炎症和癌症等疾病相关。miR-34a-3p 在急性肺损伤大鼠中减轻病理损伤,抑制细胞凋亡,氧化应激和炎症^[14],急性臭氧暴露后大鼠肺泡灌洗液中 miR-34a-3p 表达上调可能在肺组织发挥保护性作用。miR-193b-5p 在小鼠中可促进肺损伤,破坏肺部的病毒防御^[15-16],PM2.5 刺激同样可引起人肺癌细胞外泌体 miR-193b-5p 表达下调^[17]。综上,与 0 ppm 组相比 0.5 ppm 组的差异 miRNA 可能在肺组织中抑制肺损伤、降低炎症和氧化应激。与 0 ppm 组相比,2 ppm 组 rno-miR-138-1-3p、rno-miR-138-5p 和 rno-miR-298-5p 等 miRNA 相对表达量上升,rno-miR-202-3p 和 rno-miR-208a-3p 等相对表达量下降,差异 miRNA 与炎症、哮喘、肺纤维化和癌症等疾病相关。JIN 等^[18]研究发现,PM2.5 干预可上调人支气管上皮细胞 BEAS-2B 中的 circ_0038467,circ_0038467 通过 ceRNA 机制下调 miR-138-1-3p,进一步促进 BEAS-2B 的炎症反应和细胞死亡。本研究中 miR-138-1-3p 表达上调,提示其可能在臭氧暴露后发挥抑制炎症功能。此外,

上调 miRNA 中 miR-298-5p 和 miR-138-5p 同样抑制炎症,在小鼠肺内皮细胞中,miR-298-5p 可直接与 IL-6 mRNA 的 3' UTR 结合,从而降低 IL-6 的表达水平^[19],miR-138-5p 可减轻肺部炎症反应^[20]。与 0.5 ppm 组类似,2 ppm 组外泌体差异 miRNA 发挥抑制炎症的作用。WEI 等^[21]研究发现,miR-29c-3p 表达增高可抑制哮喘的发展,在小鼠体内,臭氧可诱导 lncRNA PVT1 表达上调,PVT1 通过竞争内源性结合机制降低 miR-29c-3p 的表达水平,激活 PI3K/Akt 信号通路,促进 ASMC 恶性增殖,加重哮喘。此外,急性臭氧暴露后显著上升的 miR-130a-3p 可在小鼠体内可抑制博来霉素诱导的肺纤维化^[22],miR-324-5p 可靶向 AJUBA 抑制肺纤维化的进展^[23]。过表达 miR-138-5p 可减轻肺泡巨噬细胞焦亡^[20],抑制肺动脉高压^[24],提示臭氧暴露大鼠 BALF 中外泌体可能有抑制肺纤维化和肺动脉高压的作用。提示与 0 ppm 组相比,2 ppm 组的差异 miRNA 可能抑制肺组织中炎症、肺纤维化和肺动脉高压等疾病的发展。

综上所述,本研究提取了急性臭氧暴露大鼠肺泡灌洗液中的外泌体,并对其进行了鉴定,同时筛选了外泌体中的差异 miRNA 并对其靶基因预测和分析,使用 qRT-PCR 实验对差异 miRNA 进行验证。研究发现急性臭氧暴露后肺泡灌洗液中差异 miRNA 可通过多种途径保护肺组织,可以抑制肺组织炎症和氧化应激,还与抑制哮喘和肺纤维化密切相关。本研究构建了急性臭氧暴露大鼠肺泡灌洗液外泌体 miRNA 表达谱,对其中的关键 miRNA 进行了分析和验证,为探索臭氧对肺部的毒性作用的详细机制提供了依据,但受限于样本量较少等限制,仍需要进一步的实验验证。

参 考 文 献(References)

- [1] ZHENG D, HUANG X, GUO Y. Spatiotemporal variation of ozone pollution and health effects in China [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(38): 57808–57822.
- [2] CAO X, XUE F, CHEN H, et al. MiR-202-3p inhibits the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells by targeting RRM2 [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(24): 1374.
- [3] WIEGMAN C H, LI F, RYFFEL B, et al. Oxidative stress in ozone-induced chronic lung inflammation and emphysema: a facet of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1957.
- [4] MICHAUDEL C, FAUCONNIER L, JULÉ Y, et al. Functional and morphological differences of the lung upon acute and chronic ozone exposure in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 10611.
- [5] MILLER D B, SNOW S J, HENRIQUEZ A, et al. Systemic metabolic derangement, pulmonary effects, and insulin insufficiency following subchronic ozone exposure in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 306: 47–57.
- [6] WANG M, AARON C P, MADRIGANO J, et al. Association between long-term exposure to ambient air pollution and change in quantitatively assessed emphysema and lung function [J]. *JAMA*, 2019, 322(6): 546–556.
- [7] 李宁, 杨虎, 方振, 等. 急性臭氧暴露对大鼠肺部细胞遗传毒性的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(2): 97–100, 192.
LI N, YANG H, FANG Z, et al. Effects of acute ozone exposure on genotoxicity of lung cells in rats [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2019, 35(2): 97–100, 192.
- [8] TOVAR A, SMITH G J, THOMAS J M, et al. Transcriptional profiling of the murine airway response to acute ozone exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 173(1): 114–130.
- [9] DEVLIN R B, DUNCAN K E, JARDIM M, et al. Controlled exposure of healthy young volunteers to ozone causes cardiovascular effects [J]. *Circulation*, 2012, 126(1): 104–111.
- [10] ZHANG J, LI S, LI L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(1): 17–24.
- [11] SONG M, ZHANG X, GAO Y, et al. RNA sequencing reveals the emerging role of bronchoalveolar lavage fluid exosome lncRNAs in acute lung injury [J]. *Peer J*, 2022, 10: e13159.
- [12] CARNINO J M, LEE H, SMITH L C, et al. Microvesicle-derived miRNAs regulate proinflammatory macrophage activation in the lung following ozone exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2022, 187(1): 162–174.
- [13] SMITH G J, TOVAR A, KANKE M, et al. Ozone-induced changes in the murine lung extracellular vesicle small RNA landscape [J]. *Physiol Rep*, 2021, 9(18): e15054.
- [14] YUAN J, ZHANG Y. Sevoflurane reduces inflammatory factor expression, increases viability and inhibits apoptosis of lung cells in acute lung injury by microRNA-34a-3p upregulation and STAT1 downregulation [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 322: 109027.
- [15] DOS SANTOS C C, AMATULLAH H, VASWANI C M, et al. Mesenchymal stromal (stem) cell therapy modulates miR-193b-5p expression to attenuate sepsis-induced acute lung injury [J]. *Eur Respir J*, 2022, 59(1): 2004216.
- [16] VASWANI C M, VARKOUHI A K, GUPTA S, et al. Preventing occludin tight-junction disruption via inhibition of microRNA-193b-5p attenuates viral load and influenza-induced lung injury [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(9): 2681–2701.
- [17] WANG Y, ZHONG Y, SUN K, et al. Identification of exosome miRNAs in bronchial epithelial cells after PM_{2.5} chronic exposure [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 215: 112127.
- [18] JIN X, WANG L, YANG M. circ_0038467 promotes PM_{2.5}-induced bronchial epithelial cell dysfunction [J]. *Open Med*, 2021, 16(1): 854–863.

[19]

VLACIL A K, VOLLMEISTER E, BERTRAMS W, et al. Identification of microRNAs involved in NOD-dependent induction of pro-inflammatory genes in pulmonary endothelial cells [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0228764.

[20]

LIU F, YANG Y, PENG W, et al. Mitophagy-promoting miR-138-5p promoter demethylation inhibits pyroptosis in sepsis-associated acute lung injury [J]. Inflamm Res, 2023, 72(2): 329–346.

[21]

WEI Y, HAN B, DAI W, et al. Exposure to ozone impacted Th1/Th2 imbalance of CD⁴⁺ T cells and apoptosis of ASMCs underlying asthmatic progression by activating lncRNA PVT1-miR-15a-5p/miR-29c-3p signaling [J]. Aging, 2020, 12(24): 25229–25255.

[22]

SU S, ZHAO Q, HE C, et al. MiR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program [J]. Nat Commun, 2015, 6: 8523.

[23]

XU P, ZHANG J, WANG M, et al. hnRNPL-activated circANKRD42 back-splicing and circANKRD42-mediated crosstalk of mechanical stiffness and biochemical signal in lung fibrosis [J]. Mol Ther, 2022, 30(6): 2370–2387.

[24]

RIBEUZ H L, COURBOULIN A, GHIGNA M R, et al. In vivo miR-138-5p inhibition alleviates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and normalizes pulmonary KCNK3 and SLC45A3 expression [J]. Respir Res, 2020, 21(1): 186.

[收稿日期] 2024-01-02

肠道微生态与肠病关系的研究进展

肠道微生态是由多达 $10^{13} \sim 10^{14}$ 种微生物聚集在营养丰富的肠道中共同构成了具有复杂且相对平衡的富有多样化特征的微生物群。肠道微生物参与物质代谢和宿主生理活动,抑制病原微生物的生长。肠上皮细胞和黏液层与共生微生物共同构成肠上皮黏膜屏障维持肠道微生态稳态。肠道微生态失衡对多种系统疾病有重要影响,尤其是炎性肠道疾病。根据世界卫生组织分类,炎性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis)和克罗恩病(Crohn’s disease)。本文总结归纳了目前肠道微生物在肠上皮黏膜屏障中的变化以及不同治疗方法干预后肠道微生物的变化。

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*, 2022, 5(4): 297–310. doi: 10.1002/ame2.12262)。

蒋波, 田莎, 李涛, 等. 石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 846–855.
JIANG B, TIAN S, LI T, et al. Experimental study of the inhibition of gigantol on corneal neovascularization in rats by alkali burn [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 846–855.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.004

石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管的实验研究

蒋波^{1,2}, 田莎¹, 李涛¹, 李春霞³, 周晓东^{1*}

(1. 复旦大学附属金山医院眼科, 上海 201508; 2. 上海中医药大学, 上海 201203;
3. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院眼科, 上海 200082)

【摘要】目的 探讨石斛酚抑制碱烧伤大鼠角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的作用。方法 构建 SD 大鼠角膜碱烧伤模型, 随机分成正常对照组、模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组, 每组各 10 只。低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组分别于伤后第 1 天结膜下注射 2.5 mg/0.05 mL、5 mg/0.05 mL 石斛酚, 2 mg/0.05 mL 阿柏西普。伤后第 3、7、14 天, 观察并计算角膜新生血管占全角膜面积的百分比、角膜混浊评分并测量角膜厚度。碱烧伤第 14 天, 处死全部大鼠, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色和免疫组化观察角膜组织中 VEGF 和 CD34 蛋白表达水平, 以及通过 ELISA 检测各组 VEGF、IL-1 β 、TNF- α 的蛋白含量。结果 碱烧伤后第 7、14 天, 低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜新生血管面积占全角膜面积百分比均显著低于模型对照组 (所有 $P < 0.05$)。碱烧伤后第 14 天, 高浓度石斛酚组角膜混浊评分显著小于模型对照组 ($P < 0.05$), 模型对照组、低浓度石斛酚组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$)。但是, 高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度与正常对照组相比较, 均无显著性差异 (所有 $P > 0.05$)。此外, 低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜组织中 VEGF、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达均显著低于模型对照组 (所有 $P < 0.01$)。结论 结膜下注射石斛酚对碱烧伤大鼠角膜新生血管有抑制作用, 并能促进角膜水肿的吸收。

【关键词】 石斛酚; 阿柏西普; 碱烧伤; 角膜新生血管; VEGF

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847 (2024) 07-0846-10

Experimental study of the inhibition of gigantol on corneal neovascularization in rats by alkali burn

JIANG Bo^{1,2}, TIAN Sha¹, LI Tao¹, LI Chunxia³, ZHOU Xiaodong^{1*}

(1. Department of Ophthalmology, Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China;
2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Ophthalmology, Shanghai Hospital of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China)
Corresponding author: ZHOU Xiaodong. E-mail: xdzhou_2013@163.com

【Abstract】Objective To investigate the inhibition of gigantol on corneal neovascularization (CNV) in rats after corneal alkali burn. Methods Animal models of corneal alkali burn were made with SD rats, which were divided into normal control group, model control group, low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group, with 10 rats in each group. The rats in low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group were treated with 2.5 mg/0.05 mL gigantol, 5 mg/0.05 mL gigantol, and 2 mg/0.05 mL

【基金项目】上海市金山区医药卫生科技创新资金项目 (2022-WS-14), 上海市虹口区第二轮“国医强优”三年行动计划 (2022-2024) (HKGYQYXM-2022-13)。

Funded by Shanghai Jinshan District Medical and Health Science and Technology Innovation Funding Program (2022-WS-14), “National Medicine Strong and Excellent” Three-Year-Action Plan of Shanghai Hongkou District (2022-2024) (HKGYQYXM-2022-13)

【作者简介】蒋波, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 眼部化学烧伤。Email: jb19811119@sina.com

【通信作者】周晓东, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 近视相关的基础研究。Email: xdzhou_2013@163.com

afilibercept by subconjunctival injection after modeling. The CNV, corneal opacity score, and thickness of the cornea were observed and compared on the 3rd, 7th, and 14th days after alkali burn. The ratio of CNV area to corneal area was calculated. On the 14th day, all rats were sacrificed. Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry were used to detect the expression of CD34 and VEGF. The protein expression of VEGF, IL-1 β , and TNF- α was detected by ELISA.

Results On the 7th and 14th days after alkali burn, the percentages of CNV to total corneal area in low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group were significantly smaller than those in model control group (all $P < 0.05$). On the 14th day, the corneal opacity score was lower in high-concentration gigantol group than model control group ($P < 0.05$). The corneal thickness in model control group and low-concentration gigantol group were significantly greater than that in normal control group (all $P < 0.001$). However, the corneal thickness in high-concentration gigantol group and aflibercept group were not significantly different from that in normal control group (all $P > 0.05$). In addition, the protein expression of VEGF, IL-1 β , and TNF- α in corneal tissues in low-concentration gigantol group, high-concentration gigantol group and aflibercept group were significantly lower than that in model control group (all $P < 0.01$). **Conclusions** Gigantol administration by subconjunctival injection can inhibit the formation of CNV in rats after alkali burn and promote absorption of the corneal edema.

【Keywords】 gigantol; aflibercept; alkali burn; corneal neovascularization; VEGF

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

角膜碱性烧伤是临床常见的眼部外伤,可引起角膜上皮脱落、角膜云翳或斑翳的形成,甚至角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的形成,导致角膜透明度下降,影响患者的视功能,严重者还将导致角膜溃疡或角膜穿孔。在角膜损伤以及修复的病理过程中, CNV 发挥着重要的作用,抑制 CNV 的产生是预后的关键。研究证实,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在 CNV 形成的过程中起到了非常重要的作用,可以促进血管内皮细胞迁移、增殖,诱导新生血管形成,应用抗 VEGF 药物可以有效抑制 CNV 的形成^[1]。石斛酚是一种从石斛中提取出的联苄类化合物,能抑制 VEGF 表达,减少视网膜新生血管的形成^[2-3],但石斛酚对角膜新生血管的研究尚未有报道。本研究通过结膜下注射不同剂量的石斛酚,观察其对碱性烧伤诱导的 CNV 模型的抑制作用,为角膜碱性烧伤的治疗提供进一步的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 50 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 200 ~ 220 g,购于上海吉辉实验动物饲养有限公司【SCXK(沪)2022-0009】。昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 60%,温度控制在 22 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,饲养于上海市公共卫生临床中心动物实验室【SYXK(沪)2020-0019】。本研究已在上海市公卫临床中心获得动物伦理审查批准(2023-A044-01 号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

石斛酚(成都普思生物科技有限公司),阿柏西普眼内注射液(EYLEA,拜耳公司,德国),VEGF、IL-1 β 、TNF- α ELISA 检测试剂盒(上海优选生物科技有限公司),VEGF 抗体、CD34 抗体、山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司)。裂隙灯显微镜照相系统(Topcon SL-D7,日本),光学相关断层扫描仪(蔡司 Cirrus-HD 4000,德国)。

1.2 方法

1.2.1 制作大鼠角膜碱性烧伤动物模型

造模前,通过裂隙灯显微镜检查大鼠角膜等眼前节结构正常,排除眼前节及眼附属器病变。将大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组,每组各 10 只,取每组大鼠的右眼构建角膜碱性烧伤模型。麻醉成功后,在 1 mol/L NaOH 溶液中浸泡直径 3 mm 的圆形滤纸片,持续 1 min,然后将滤纸片蘸去多余的液体,放置于大鼠角膜中央部位烧灼 30 s,然后快速用生理盐水冲洗角膜和结膜囊 1 min,以去除残留的 NaOH 溶液。裂隙灯下观察见角膜中央明显混浊水肿,周边角膜隐约透见前房和虹膜即为造模成功。排除角膜感染、角膜穿孔和前房严重积血的大鼠。

1.2.2 药物干预

低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组于造模后当日结膜下注射药物进行干预,距角膜缘 1 mm 处分 4 个象限进行注射。低浓度石斛酚组结膜下注射石斛酚 2.5 mg/0.05 mL,高浓度石斛酚组结膜下注射石斛酚 5 mg/0.05 mL,阿柏西普组结

膜下注射阿柏西普 2 mg/0.05 mL。4 组大鼠于造模当日开始给予左氧氟沙星滴眼液滴眼每日 3 次,预防感染。

1.2.3 角膜拍照和计算 CNV 面积

每组大鼠于碱烧伤后第 3、7、14 天麻醉后,通过裂隙灯显微镜观察 CNV 生长范围、角膜水肿程度以及前房有无出血等情况并进行拍照。通过 Image J 1.53 t 软件计算角膜新生血管面积占全角膜面积百分比。

1.2.4 角膜混浊评分

裂隙灯显微镜下观察角膜混浊程度并评分,参照 Holland 角膜混浊评分标准^[4]:0 分:角膜透明,前房内虹膜和瞳孔清晰可见;1 分:角膜轻度混浊,可见虹膜纹理和瞳孔;2 分:角膜混浊较重,虹膜纹理不清;3 分:角膜混浊明显,虹膜纹理不清,但隐约可见瞳孔;4 分:角膜完全混浊,虹膜和瞳孔看不清。

1.2.5 角膜厚度测量

每组大鼠分别于碱烧伤后第 3、7、14 天麻醉后,使用眼前段相干光断层扫描仪进行水平扫描,测量角膜中央厚度。

1.2.6 苏木素-伊红(HE)染色与免疫组织化学检测

于造模后第 14 天,将大鼠处死后,取完整角膜,用无菌剪刀沿角膜中央将角膜平均剪成两份:一份角膜标本保存在-80℃冰箱中行 ELISA 备用;另一份角膜标本在 4% 多聚甲醛溶液中浸泡固定 24 h,取出后石蜡包埋,石蜡块 4 μm 厚度进行切片,HE 染色观察角膜组织各层结构。切片脱蜡至水,抗原修复,置于 3% H₂O₂ 溶液,室温孵育 25 min,水洗 3 次,分别滴加一抗(VEGF 1:400、CD34 1:50),4℃孵育过夜,分别滴加二抗(山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG),室温孵育 30 min,DAB 显色,复染细胞核,脱水封片,于高倍显微镜下观察切片并拍照。

1.2.7 ELISA

将保存在-80℃冰箱中的角膜组织标本通过 ELISA 测定 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白含量。将角膜组织进行剪碎,裂解后研磨离心,取上清液置于 Ep 管中,按照 ELISA 试剂盒的操作说明书来进行 ELISA 检测,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值,计算样品浓度。

1.3 统计学分析

用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析及处理,检验均设置检验水准 α 为 0.05。服从正态分布且

方差齐性数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,反之则用中位数(下四分位数 ~ 上四分位数)[M(Q25 ~ 75)]的方式进行描述。首先对各个评价指标按分组情况进行数据组间分布的正态性检验,然后采用单因素方差分析(One-way ANOVA)方法进行多组间数据比较,若方差齐性,则通过 LSD 方法进行两组间比较;若方差不齐,则使用 Tamhane's T2 检验进行两组间事后检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜下观察 CNV

通过裂隙灯显微镜观察 CNV,正常对照组大鼠角膜透明、无 CNV 生长,角膜缘血管无扩张,前房和虹膜清晰可见。大鼠角膜碱烧伤后第 3 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组均可见角膜基质水肿混浊明显,角巩膜缘处可见血管充血扩张,模型对照组、低浓度石斛酚组可见少许新生血管呈毛刷状生长。碱烧伤后第 7 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组均可见角膜新生血管,由角膜缘向角膜中间蔓延,模型对照组、低浓度石斛酚组新生血管生长致密,高浓度石斛酚组、阿柏西普组新生血管相对较稀疏,且生长缓慢;模型对照组 3 例大鼠出现前房积血。碱烧伤后第 14 天,模型对照组新生血管面积较广泛,CNV 生长致密,部分 CNV 长入角膜瞳孔区,角膜依旧混浊,虹膜、前房不清;高浓度石斛酚组、阿柏西普组新生血管分布稀疏,角膜轻度水肿,虹膜可见;低浓度石斛酚组较高浓度石斛酚组、阿柏西普组新生血管的长度、范围以及数量均略重(见图 1)。

2.2 CNV 面积占全角膜面积的百分比

应用 Image J 1.53 t 软件分别于碱烧伤后第 3、7、14 天,测量各组 CNV 面积和全角膜面积,并计算两者的比率,结果如表 1 所示:碱烧伤后第 3 天,高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组(所有 $P < 0.01$);碱烧伤后第 7 天,低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组(所有 $P < 0.05$);碱烧伤后第 14 天,低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组(所有 $P < 0.01$)。低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组之间 CNV 面积百分比相比较均不具有显著性差异(所有 $P > 0.05$)。

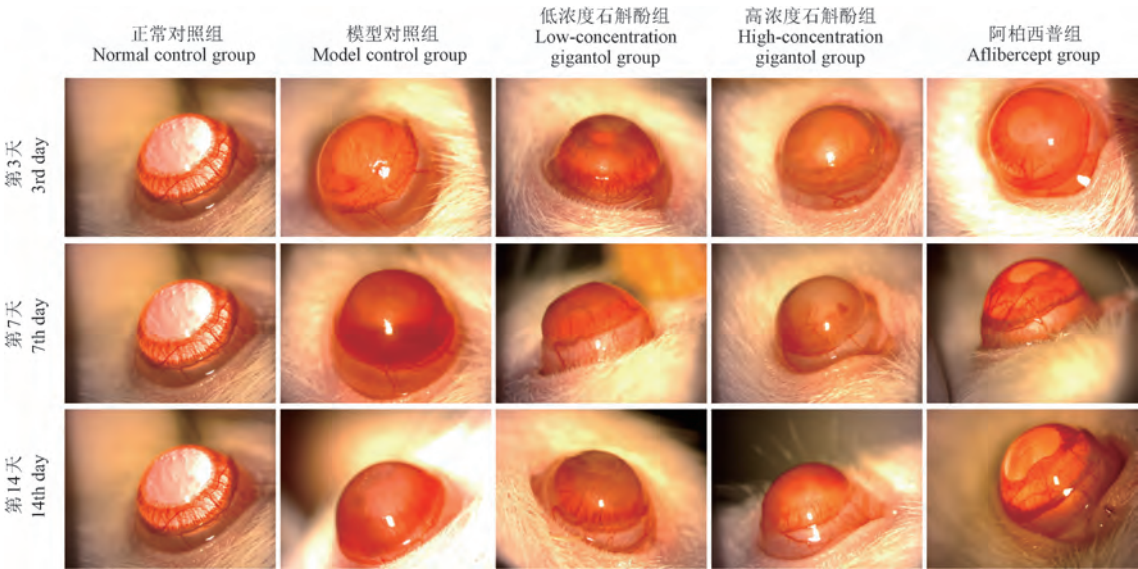


图 1 大鼠角膜碱烧伤后 CNV 情况
Figure 1 CNV after corneal alkali burn in rats

表 1 碱烧伤大鼠 CNV 占全角膜百分比($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Percentage of CNV to total cornea after alkali burn in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	第 3 天 3rd day	第 7 天 7th day	第 14 天 14th day
模型对照组 Model control group	17.70 ± 4.57	25.61 ± 11.42	33.57 ± 18.85
低浓度石斛酚组 Low-concentration gigantol group	13.78 ± 5.11	14.75 ± 12.11 *	16.33 ± 10.43 **
高浓度石斛酚组 High-concentration gigantol group	9.69 ± 5.11 **	11.30 ± 3.75 **	10.93 ± 5.97 ***
阿柏西普组 Aflibercept group	9.16 ± 2.76 **	12.57 ± 5.19 **	11.80 ± 9.40 ***

注:与模型对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下表同)
Note. Compared with model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following tables)

2.3 角膜混浊评分

碱烧伤后第 3 天和第 7 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组各组间角膜混浊评分相比较均不具有显著性差异 ($P > 0.05$);碱烧伤后第 14 天,高浓度石斛酚组角膜混浊评分显著低于模型对照组 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.4 OCT 测量角膜厚度

通过 OCT 测量各组大鼠不同时间点的角膜厚度见图 2。碱烧伤后第 3 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$);碱烧伤后第 7 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$),高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度均显著小于模型对照组 (所有 $P < 0.01$);碱

烧伤后第 14 天,模型对照组、低浓度石斛酚组角膜厚度均显著高于正常对照组 (所有 $P < 0.001$);高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度与正常对照组均不具有显著性差异 (所有 $P > 0.05$);高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜厚度显著均小于模型对照组 (所有 $P < 0.001$) (表 3)。

2.5 常规病理切片观察

正常对照组大鼠角膜透明,各层结构清晰完整,HE 染色未见角膜新生血管长入。碱烧伤后第 14 天,模型对照组可见角膜层间较多新生血管,管腔内粘附较多红细胞,并可见大量炎性细胞浸润;低浓度石斛酚组可见角膜基质散在炎性细胞浸润及新生血管;高浓度石斛酚组、阿柏西普组可见角膜各层结构尚规则,基质层水肿较轻,层间可见少量炎性细胞浸润,新生血管较少 (见图 3)。

表 2 碱烧伤大鼠角膜混浊评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Corneal copity score after alkali burn in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	第 3 天 3rd day	第 7 天 7th day	第 14 天 14th day
模型对照组 Model control group	2.30 ± 0.48	2.90 ± 0.74	3.10 ± 0.88
低浓度石斛酚组 Low-concentration gigantol group	2.20 ± 0.42	2.60 ± 0.70	2.40 ± 0.97
高浓度石斛酚组 High-concentration gigantol group	2.30 ± 0.48	2.40 ± 0.97	2.10 ± 1.10 *
阿柏西普组 Aflibercept group	2.40 ± 0.52	2.70 ± 0.82	2.20 ± 1.03

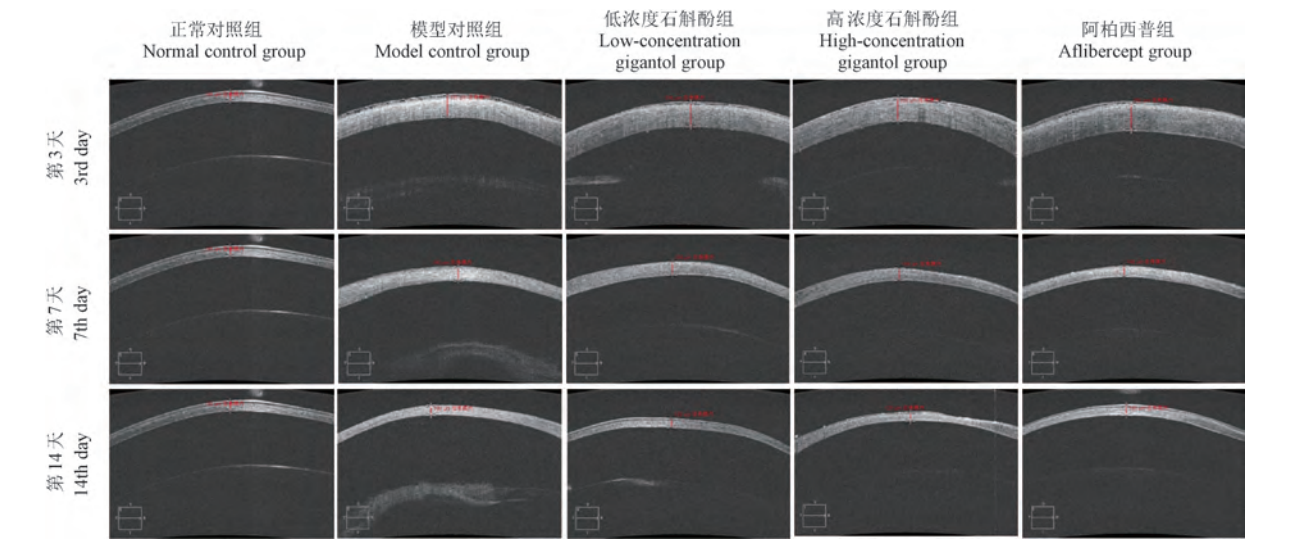


图 2 大鼠角膜碱烧伤后角膜厚度

Figure 2 Corneal thicknes after corneal alkali burn in rats

表 3 碱烧伤大鼠不同时间点角膜厚度($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu\text{m}$)

Table 3 Corneal thickness at different time points after alkali burn($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu\text{m}$)

组别 Groups	第 3 天 3rd day	第 7 天 7th day	第 14 天 14th day
正常对照组 Normal control group	129.60 ± 7.11	129.60 ± 7.11	129.60 ± 7.11
模型对照组 Model control group	336.80 ± 19.12 ^{###}	182.00 ± 20.68 ^{###}	149.20 ± 10.16 ^{###}
低浓度石斛酚组 Low-concentration gigantol group	313.60 ± 42.00 ^{###}	177.20 ± 13.73 ^{###}	144.80 ± 9.58 ^{###}
高浓度石斛酚组 High-concentration gigantol group	318.80 ± 25.16 ^{###}	156.80 ± 11.12 ^{### ***}	134.40 ± 5.40 ^{***}
阿柏西普组 Aflibercept group	326.80 ± 29.52 ^{###}	160.40 ± 12.29 ^{### **}	135.20 ± 8.39 ^{***}

注:与正常对照组相比,### $P < 0.001$ 。(下表同)
Note. Compared with normal control group, ### $P < 0.001$. (The same in the following tables)

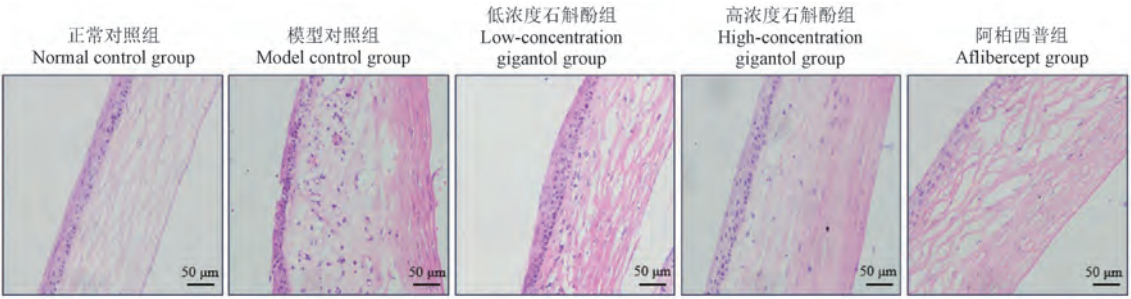


图 3 碱烧伤后第 14 天角膜组织 HE 染色图

Figure 3 HE staining of corneal tissues of rats in each group on 14th day after alkali burn

2.6 免疫组化检测角膜组织中 VEGF 与 CD34 蛋白的表达

正常对照组大鼠 VEGF 蛋白在角膜上皮细胞胞质呈弱阳性表达,CD34 蛋白在角膜上皮层、角膜基质层均表达不明显。碱烧伤第 14 天,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜组织中 VEGF 蛋白和 CD34 蛋白均表达增强,呈棕黄色或棕褐色颗粒分布。VEGF 蛋白主要定位于角膜上皮细胞、基质层炎症细胞胞质以及新生血管管壁,CD34 蛋白主要定位于角膜基质层新生血管内皮细胞,呈强阳性表达,角膜上皮细胞胞质以及炎症细胞呈阳性表达。其中模型对照组 VEGF 和 CD34 蛋白表达最强,CNV 致密,染色面积广泛;低

浓度石斛酚组 CNV 较多,VEGF 和 CD34 蛋白表达较强,但与模型对照组相比略低;高浓度石斛酚组、阿柏西普组可见较稀疏的 CNV,VEGF 和 CD34 蛋白表达与模型对照组和低浓度石斛酚组相比明显偏低(图 4)。

2.7 ELISA 检测各组大鼠角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白含量

碱烧伤后第 14 天,通过 ELISA 检测各组碱烧伤大鼠角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白含量。结果如下:模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达均显著高于正常对照组(所有 $P < 0.01$),低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜

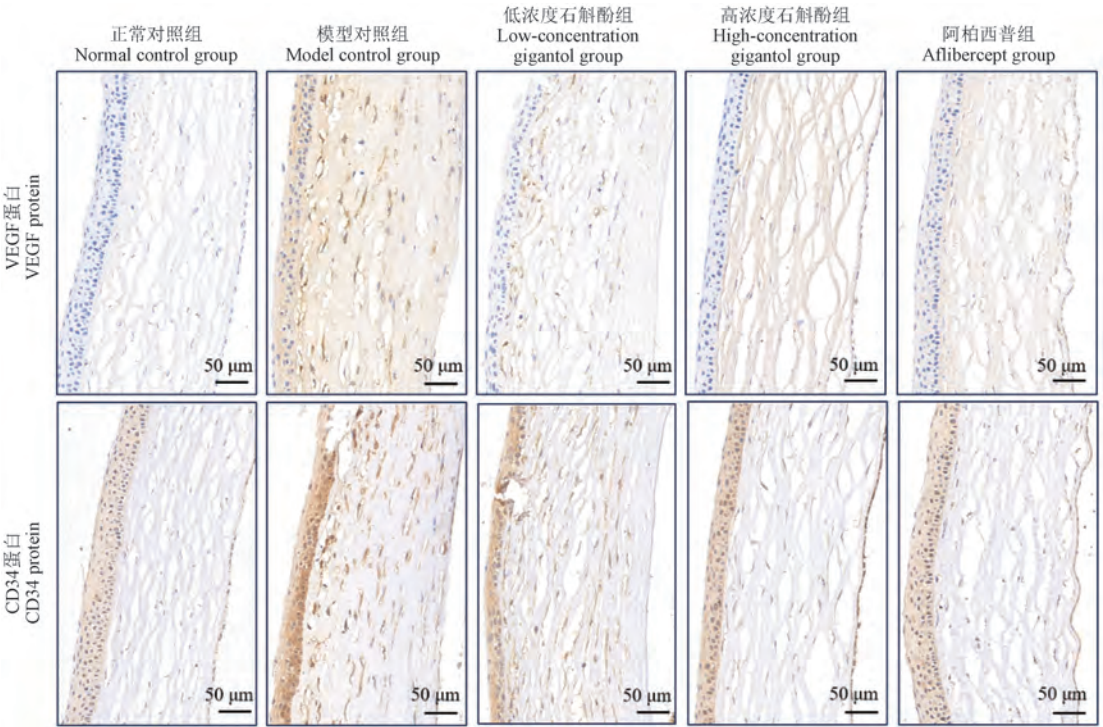


图 4 角膜碱烧伤后第 14 天角膜组织中 VEGF 与 CD34 蛋白表达

Figure 4 Expression of VEGF and CD34 protein in the corneal tissues on 14th day after corneal alkali burn

中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达均显著低于模型对照组(所有 $P < 0.01$)(表 4)。

2.8 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达与 CNV、角膜混浊评分和角膜厚度的相关性分析

将角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 蛋白表达量与 CNV、角膜混浊评分和角膜厚度分别进行 Pearson 相关分析后显示:VEGF 与 CNV 呈显著正相关($r = 0.530, P < 0.001$),与角膜混浊评分无显著相关

($r = 0.037, P = 0.823$),与角膜厚度呈显著正相关($r = 0.484, P = 0.002$);IL-1β 与 CNV 呈显著正相关($r = 0.468, P = 0.002$),与角膜混浊评分无显著相关($r = 0.236, P = 0.143$),与角膜厚度呈显著正相关($r = 0.383, P = 0.015$);TNF-α 与 CNV 呈显著正相关($r = 0.434, P = 0.005$),与角膜混浊评分呈显著正相关($r = 0.455, P = 0.003$),与角膜厚度呈显著正相关($r = 0.502, P = 0.001$)。

表 4 碱烧伤大鼠角膜组织中 VEGF、IL-1β、TNF-α 的蛋白含量($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)
Table 4 Protein levels of VEGF, IL-1β, and TNF-α in corneal tissues of alkali burned rats($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

组别 Groups	VEGF 蛋白 VEGF protein	IL-1β 蛋白 IL-1β protein	TNF-α 蛋白 TNF-α protein
正常对照组 Normal control group	99.43 ± 8.90	71.89 ± 7.79	170.40 ± 12.74
模型对照组 Model control group	180.68 ± 13.58 ^{###}	128.80 ± 14.52 ^{###}	304.61 ± 17.28 ^{###}
低浓度石斛酚组 Low-concentration giganol group	162.76 ± 9.93 ^{### **}	105.91 ± 8.57 ^{### **}	269.87 ± 11.23 ^{### **}
高浓度石斛酚组 High-concentration giganol group	141.17 ± 12.74 ^{### **}	88.99 ± 8.30 ^{### **}	237.92 ± 18.73 ^{### **}
阿柏西普组 Aflibercept group	135.13 ± 13.32 ^{### **}	87.81 ± 10.75 ^{### **}	242.95 ± 18.74 ^{### **}

注:与正常对照组相比,^{##} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with normal control group,^{##} $P < 0.01$.

3 讨论

在角膜损伤愈合过程中,坏死的细胞会释放各种内源性因子,趋化炎症细胞迅速迁移进入受损的组织,进而产生过度的免疫炎症反应,导致角膜新生血管形成、基质纤维化、角膜溃疡等不良后果的发生^[5-6]。IL-1β 在炎症反应早期即可合成和释放,可以趋化多种炎症细胞来发挥作用,与碱烧伤后角膜炎症反应呈正相关^[7-9]。TNF-α 是一种主要由激活的巨噬细胞、单核细胞分泌的多能性炎症因子,在角膜烧伤反应中可以增加炎症细胞因子的水平,加重炎症反应,引起角膜组织进行性坏死、导致角膜溃疡的发生^[10-11]。徐小芹^[12]发现碱烧伤组大鼠角膜和房水中 IL-1、TNF-α 的蛋白表达量均显著高于对照组。张雷等^[13]也发现碱烧伤模型组大鼠房水中 IL-1、TNF-α 的蛋白表达量均显著高于正常对照组。在本实验中,碱烧伤后第 14 天角膜组织中 IL-1β、TNF-α 的表达明显升高,进一步证实了 IL-1β、TNF-α 在碱烧伤后角膜炎症反应中发挥了重要作用。同时,多种细胞生长因子在角膜损伤及修复过程中也起到了重要作用,如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、VEGF、转化生长因子

(transforming growth factors,TGF)等,可促进角膜上皮细胞的迁移、增殖,加速角膜上皮修复、角膜基质纤维化,但同时还可以促进 CNV 的形成^[14-16],尤其是 VEGF 在 CNV 的形成过程中起到了至为关键的作用。VEGF 是血小板源性生长因子基因家族的成员,通过与内皮细胞表面受体 VEGFR-1、VEGFR-2 结合,激活细胞内酪氨酸激酶,触发一系列的信号通路,引起角膜缘血管扩张、血管渗透性增强,促使血管内皮细胞迁移至角膜基质中并繁殖,导致新生血管形成^[17-19]。既往研究已证实,在角膜碱烧伤后新生血管的发生、发展中,VEGF 发挥了重要作用^[20-21]。本实验中,碱烧伤后 14 d 角膜组织高表达 VEGF,且与角膜新生血管面积呈正相关。CD34 是由糖蛋白组成的抗原,被认为是重复性好、稳定性高、较理想的血管内皮标记物,主要表达于微血管的内皮细胞内,是新生血管计数的良好指标^[22-23]。张慧等^[24]报道,碱烧伤后第 14 天,角膜中 CD34 表达增加。在本研究中,碱烧伤后第 14 天,通过免疫组化检查结果发现,与正常对照组角膜相比较,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜中的 CD34 染色增加,表达增强,与张慧等^[24]研究结果相似。

石斛是我国传统珍贵药材,具有益气养阴、清热明目等功效。石斛酚是一种从石斛中提取出的酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤等生物活性^[25],此外,石斛酚对视网膜新生血管也有抑制作用。张梅等^[2]发现石斛酚通过抑制醛糖还原酶(aldehyde reductase, AR)通路和氧化应激反应,从而抑制视网膜 VEGF 的表达,减少新生血管形成。YU 等^[26]研究亦发现石斛酚能减少视网膜新生血管的生成,考虑与石斛酚通过阻断 Erk1/2 介导的视网膜内皮细胞和小胶质细胞中 HIF1 α 的激活,降低 VEGF 表达,抑制了 VEGFR2 受体及其下游信号通路的激活有关。阿柏西普是一种同源二聚体糖蛋白,不仅结合 VEGF-A,还可以结合血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),因此具有较强的抑制新生血管形成的功能,且生物活性持久^[27-28],临床广泛应用于老年性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻塞等眼底疾病的治疗^[29]。本实验中,观察到在角膜碱烧伤后第 14 天,ELISA 和免疫组化检测均发现:与正常对照组相比,模型对照组、低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组角膜组织中 VEGF 蛋白均表达明显增强,其中低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组和阿柏西普组 VEGF 蛋白阳性表达较模型对照组偏低,而且,碱烧伤第 3、7、14 天,低浓度石斛酚组、高浓度石斛酚组、阿柏西普组 CNV 面积百分比均显著小于模型对照组,证明结膜下分别注射石斛酚和阿柏西普均能够降低 VEGF 的表达,抑制 CNV 的形成,因此,在碱烧伤角膜修复过程中,抑制 VEGF 表达是抑制新生血管生成的关键所在。

相干光断层扫描(optical coherence tomography, OCT)是一种非接触的光学诊断技术,可用于活体眼组织显微结构观察,临床多应用于眼底黄斑和视盘等相关疾病的诊断,除此之外,OCT 在眼前节疾病中的应用越来越广泛,如观察圆锥角膜、角膜移植、屈光手术中角膜瓣、干眼等。前期研究发现,通过 OCT 观察眼化学伤治疗前后角膜厚度的变化,可以清晰、直观地显示角膜水肿消退、瘢痕化形成的过程^[30-31]。在本实验中,通过 OCT 测量碱烧伤大鼠在不同时间点的角膜厚度,结果发现在碱烧伤后第 3 天各组角膜明显水肿、厚度增加,碱烧伤第 7 天各组角膜水肿较前减轻,碱烧伤第 14 天,模型对照组、低浓度石斛酚组角膜较正常对照组角膜增厚,表明仍存在不同程度角膜水肿,高浓度石斛酚组、阿柏

西普组角膜厚度与正常对照组无显著性差异。而且碱烧伤第 14 天,高浓度石斛酚组的角膜混浊评分也显著低于模型对照组,因此,石斛酚和阿柏西普在抑制角膜新生血管形成的同时,还减轻了角膜水肿的程度,促进了角膜混浊的减退,对角膜损伤的修复产生了积极促进作用,推测可能的机制是由于这两种药物通过抑制 IL-1、TNF- α 的表达,激活角膜内的 Na⁺/K⁺ ATP 酶的“泵”功能,促使角膜基质的水分泵入前房;同时,这两种药物抑制了角膜新生血管的生成,导致毛细血管渗透性降低,从而减少了角膜基质内液体的积聚。

角膜碱烧伤后,抑制角膜新生血管的生成是预后的关键。在本研究中,首次通过结膜下注射石斛酚观察碱烧伤后 CNV 及炎症因子的表达,证实石斛酚与经典抗 VEGF 药物阿柏西普具有相当的效果,均可以减少碱烧伤引起的 CNV 的面积,促进角膜水肿的吸收,且高浓度石斛酚较低浓度石斛酚具有更好的效果,这为探索碱烧伤提供了新的治疗方法和思路,但石斛酚最佳的有效浓度以及是否呈剂量依赖性仍需进一步的研究。同时,通过 OCT 观察角膜厚度、角膜水肿在不同实验阶段的变化,为探索碱烧伤预后提供了更合理、更方便、更无创的检测手段。

参 考 文 献(References)

- [1] 龚雨婷,王林农. 角膜新生血管抗血管内皮生长因子治疗新途径[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2022, 22(4): 409-412.
GONG Y T, WANG L N. New approaches to anti-vascular endothelial growth factor treatment for corneal neovascularization [J]. Chin J Ophthalmol Otorhinolaryngol, 2022, 22(4): 409-412.
- [2] 张梅,李春霞,韦芳,等. 石斛酚对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞的保护作用[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(2): 209-213.
ZHANG M, LI C X, WEI F, et al. Protective effect of gigantolon human retinal microvascular endothelial cells induced by high glucose [J]. Int Eye Sci, 2019, 19(2): 209-213.
- [3] 俞越,李春霞,史春. 石斛提取物与糖尿病视网膜病变相关研究进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2021, 31(3): 215-217, 223.
YU Y, LI C X, SHI C. Advances in research on extracts of dendrobium and diabetic retinopathy [J]. Chin J Chin Ophthalmol, 2021, 31(3): 215-217, 223.
- [4] HOLLAND E J, CHAN C C, WETZIG R P, et al. Clinical and immunohistologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model [J]. Cornea, 1991, 10(5): 374-380.
- [5] WATAKE A, MURAKAMI A, EBIHARA N. The expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in corneal

- fibroblasts by alarmins from necrotic corneal epithelial cells [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2018, 62(1): 92–100.
- [6] FUKUDA K, ISHIDA W, MIURA Y, et al. Cytokine expression and barrier disruption in human corneal epithelial cells induced by alarmin released from necrotic cells [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2017, 61(5): 415–422.
- [7] WEI J, JIANG H, GAO H, et al. Blocking mammalian target of rapamycin (mTOR) attenuates HIF-1 α pathways engaged-vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1570–1577.
- [8] 石玉荣, 吴军录, 权文强, 等. IL-1 β 促进肺癌细胞增殖的作用机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(1): 20–24.
- SHI Y R, WU J L, QUAN W Q, et al. Study on mechanisms of IL-1 β promoted lung cancer cells proliferation [J]. *Chin J Immunol*, 2017, 33(1): 20–24.
- [9] SOTOZONO C, HE J, MATSUMOTO Y, et al. Cytokine expression in the alkali-burned cornea [J]. *Curr Eye Res*, 1997, 16(7): 670–676.
- [10] CHENG L, YU H, YAN N, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α target genes contribute to retinal neuroprotection [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 20.
- [11] 付馨余, 邹文进, 喻谦, 等. 多西环素对碱烧伤大鼠角膜组织中 IL-1 和 TNF- α 表达的影响 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34(10): 915–917.
- FU X Y, ZOU W J, YU Q, et al. Effects of doxycycline on IL-1 and TNF- α in rat alkali burn corneas [J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2014, 34(10): 915–917.
- [12] 徐小芹. 角膜碱烧伤大鼠接受多西环素干预后的细胞凋亡情况及角膜和房水中 IL-1、TNF- α 、HIF-1 α 的表达 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(17): 2313–2315, 2319.
- XU X Q. Effect of doxycycline intervention on the apoptosis as well as the IL-1, TNF- α and HIF-1 α expression in cornea and aqueous humor in rats with corneal alkali burn [J]. *J Hainan Med Univ*, 2017, 23(17): 2313–2315, 2319.
- [13] 张雷, 李康, 武斌. 米诺环素对大鼠角膜碱烧伤炎症反应调控的机制研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(21): 2256–2259.
- ZHANG L, LI K, WU B. Regulation mechanism of minocycline on inflammatory reactions of rats corneal alkali burn [J]. *J Clin Exp Med*, 2019, 18(21): 2256–2259.
- [14] YU F S, YIN J, XU K, et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 81(2/3): 229–235.
- [15] LJUBIMOV A V, SAGHIZADEH M. Progress in corneal wound healing [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 17–45.
- [16] 王晓杰, 惠琦, 金子, 等. 生长因子在眼的发育及眼部疾病调控中的作用 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(5): 613–625.
- WANG X J, HUI Q, JIN Z, et al. Roles of growth factors in eye development and ophthalmic diseases [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2022, 51(5): 613–625.
- [17] SUGIMOTO M, TSUKITOME H, OKAMOTO F, et al. Clinical preferences and trends of anti-vascular endothelial growth factor treatments for diabetic macular edema in Japan [J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(2): 475–483.
- [18] 王利然, 杨丽红, 宁文华, 等. 长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 143–149.
- WANG L R, YANG L H, NING W H, et al. Research progress of long non-coding RNA involvement in angiogenesis [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 143–149.
- [19] 李维纳, 林超群, 阳昇, 等. 阿柏西普对小鼠角膜碱烧伤后新生血管的抑制效果及机制探讨 [J]. *现代医药卫生*, 2022, 38(1): 35–39.
- LI W N, LIN C Q, YANG S, et al. The inhibitory effect and mechanism of Aflibercept on corneal neovascularization after alkali burn in mice [J]. *J Mod Med Health*, 2022, 38(1): 35–39.
- [20] ZHANG Q Y, TAO S Y, LU C, et al. Osthole: a traditional Chinese medicine for ocular anti-angiogenic therapy [J]. *Ophthalmic Res*, 2020, 63(5): 483–490.
- [21] 宋东宇, 高明宏, 李冬梅. 人脐带间充质干细胞移植治疗角膜碱烧伤的实验研究 [J]. *国际眼科杂志*, 2023, 23(5): 717–722.
- SONG D Y, GAO M H, LI D M. Experimental study of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of alkali-burned cornea [J]. *Int Eye Sci*, 2023, 23(5): 717–722.
- [22] 王培红, 李凌菡, 周永莹, 等. 甘草甜素对小鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的抑制作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(12): 2034–2038.
- WANG P H, LI L H, ZHOU Y Y, et al. Inhibition of Glycyrrhizin on acute alkali burn induced corneal neovascularization in mice [J]. *Int Eye Sci*, 2020, 20(12): 2034–2038.
- [23] 邹志康, 吴共发, 邱丽波, 等. 吡非尼酮抑制大鼠角膜急性碱烧伤后新生血管的实验研究 [J]. *中华眼科医学杂志(电子版)*, 2018, 8(5): 216–222.
- ZOU Z K, WU G F, QIU L Z, et al. The study of the inhibiting effect of pirfenidone on rat corneal neovascularization by acute alkali burn [J]. *Chin J Ophthalmol Med Electron Ed*, 2018, 8(5): 216–222.
- [24] 张慧, 单伟. 阿柏西普对碱烧伤大鼠角膜新生血管的抑制作用 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40(2): 120–124.
- ZHANG H, SHAN W. Inhibitory effect of Aflibercept on corneal neovascularization in rats with alkali burns [J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2020, 40(2): 120–124.
- [25] CHEN Y, ZHAO T, HAN M, et al. Gigantol protects retinal pigment epithelial cells against high glucose-induced apoptosis, oxidative stress and inflammation by inhibiting MTDH-mediated NF- κ B signaling pathway [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2024, 46(1): 33–39.
- [26] YU Z, ZHANG T, GONG C, et al. Erianin inhibits high

- glucose-induced retinal angiogenesis via blocking ERK1/2-regulated HIF-1 α -VEGF/VEGFR2 signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34306.
- [27] AVERY R L, CASTELLARIN A A, STEINLE N C, et al. Systemic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept, bevacizumab, and ranibizumab [J]. Retina, 2017, 37(10): 1847-1858.
- [28] PAPADOPOULOS Z. Aflibercept: a review of its effect on the treatment of exudative age-related macular degeneration [J]. Eur J Ophthalmol, 2019, 29(4): 368-378.
- [29] 张国明, 田娅. 阿柏西普在眼科疾病治疗中的应用 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(1): 1-5.
- ZHANG G M, TIAN Y. Advances in application of Aflibercept for treatment of ocular diseases [J]. Recent Adv Ophthalmol, 2020, 40(1): 1-5.
- [30] 蒋波, 李涛, 王智, 等. 眼部化学灼伤 36 例治疗分析 [J]. 中国实用眼科杂志, 2016, 34(12): 1317-1319.
- JIANG B, LI T, WANG Z, et al. Analysis of treatment effect on 36 cases with ocular chemical injuries [J]. Chin J Pract Ophthalmol, 2016, 34(12): 1317-1319.
- [31] 蒋波, 李涛, 余曼, 等. 眼碱烧伤后干眼表现及转化生长因子- β 表达的研究 [J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2019, 41(11): 801-807.
- JIANG B, LI T, SHE M, et al. Study of manifestations of dry eye and TGF- β expression after ocular alkali burn [J]. Chin J Ocul Trauma Occup Eye Dis, 2019, 41(11): 801-807.
- [收稿日期] 2023-11-30

《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!

刘书华,周丹,陈洪毅,等. 基于超声诊断对中老年食蟹猴心脏结构和功能的基础研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32 (7): 856-866.

LIU S H, ZHOU D, CHEN H Y, et al. Basic research on cardiac structure and function of middle-aged and elderly cynomolgus monkey hearts based on ultrasound diagnosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 856-866.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.005

基于超声诊断对中老年食蟹猴心脏结构和功能的基础研究

刘书华¹, 周丹², 陈洪毅¹, 李韵峰¹, 黄忠强¹, 关雅伦¹, 吴昌林¹,
李雪娇¹, 李舸¹, 张钰^{1*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广州 510663; 2. 深圳市人民医院, 广东 深圳 518000)

【摘要】目的 针对 10 岁以上中老年食蟹猴开展心脏结构和功能基础研究, 为研究老年疾病动物选择提供基础数据。方法 本研究选取 144 只 10 岁以上中老年食蟹猴作为研究对象, 分为 10 ~ 15 岁组雌性 37 只、雄性 66 只, 16 ~ 20 岁组雌性 21 只、雄性 20 只, 通过一般指标 (身体质量指数、血压、心率)、血液生化指标 (血糖、血脂和离子指标)、心脏结构和功能指标比较分析, 获得中老年食蟹猴心脏结构和功能相关基础数据。结果 10 ~ 15 岁组和 16 ~ 20 岁组, 一般指标比较, 随着年龄增加, 雌猴和雄猴血压和心率升高, 雄猴血压变化具有显著性差异。两组血液生化指标比较, 随着年龄增加, 雌猴和雄猴血糖、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、血钙、血钠、血钾都显示升高, 其中, 血糖、甘油三酯 (雄)、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇 (雄)、低密度脂蛋白胆固醇 (雄)、血钙、血钠、血钾变化具有显著性差异; 乳酸脱氢酶显示下降, 具有显著性差异。两组心脏收缩功能比较, 随着年龄增加, 雌猴和雄猴左房前后内径都下降, 具有显著性差异; 雌猴室间隔收缩末径, 左心室舒张和收缩末径显示减小, 左心室舒张末容积, 左心室收缩末容积, 左心室质量指数下降, 具有显著性差异, 雄猴变化不显著。两组心脏舒张功能比较, 随着年龄增加, 雄猴二尖瓣舒张晚期速度下降, 具有显著性差异; 雌猴左室侧壁舒张早期速度升高, 具有显著性差异。对雌猴和雄猴代谢指标与心脏结构和功能指标进行相关性分析, 结果雌猴代谢指标与心脏结构和功能指标的相关性较弱, Γ 绝对值最高不超过 0.39, 雄猴代谢指标与心脏结构和功能指标的相关性相对较强, Γ 值绝对值最高达到 0.66。结论 基于超声诊断结合代谢指标对食蟹猴心脏功能进行研究, 建立中老年食蟹猴心脏结构和功能相关指标基础数据, 随着年龄的增加, 食蟹猴的血糖、血脂指标升高, 心脏收缩和舒张功能有下降趋势, 与中老年人群变化相似, 为开展心脏功能相关的老年性疾病研究动物选择提供数据支撑。

【关键词】中老年食蟹猴; 心脏结构和功能指标; 血液生化指标; 一般指标

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847 (2024) 07-0856-11

Basic research on cardiac structure and function of middle-aged and elderly cynomolgus monkey hearts based on ultrasound diagnosis

LIU Shuhua¹, ZHOU Dan², CHEN Hongyi¹, LI Yunfeng¹, HUANG Zhongqiang¹, GUAN Yalun¹,
WU Changlin¹, LI Xuejiao¹, LI Ge¹, ZHANG Yu^{1*}

【基金项目】国家重点研发计划项目 (2021YFF0702200), 广东省省级科技计划项目 (2009A081000002, 2008A08003), 广州市科技计划项目 (202206010084)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2021YFF0702200), Guangdong S&T programme (2009A081000002, 2008A08003), Science and Technology Projects in Guangzhou (202206010084)。

【作者简介】刘书华, 女, 学士, 助理研究员, 研究方向: 实验动物学研究。Email: 99455649@qq.com

【通信作者】张钰, 女, 研究员, 研究方向: 实验动物学研究。Email: zhangyu@gdlami.com

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China;
2. Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518000, China)
Corresponding author: ZHANG Yu. E-mail: zhangyu@gdlami.com

【Abstract】 Objective To conduct basic research on the structure and function of the heart in cynomolgus monkeys older than 10 years to provide data for animal selection in elderly disease research. **Methods** A total of 144 cynomolgus monkeys > 10 years old were selected as research subjects, including 37 females and 66 males in the 10 ~ 15 years group, and 21 females and 20 males in the 16 ~ 20 years group. Basic data on cardiac structure and function in middle-aged and elderly cynomolgus monkeys were obtained through comparative analysis of general indicators (body mass index, blood pressure, and heart rate), blood biochemical indicators (blood glucose, blood lipids, and ion indicators), and cardiac structure and function indicators. **Results** General indicators for the 10 ~ 15 years and 16 ~ 20 years groups were compared. As age increased, the blood pressure and heart rate of female and male monkeys increased, and there was a significant difference in blood pressure changes between male monkeys. A comparison of two sets of blood biochemical indicators showed that, as age increased, blood glucose, triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, blood calcium, blood sodium, and blood potassium increased, while lactate dehydrogenase decreased, in female and male monkeys. Among these, blood glucose, triglycerides (males), total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (males), low-density lipoprotein cholesterol (males), blood calcium, blood sodium, blood potassium, and lactate dehydrogenase showed significant changes. A comparison of cardiac contractile function between the two groups showed that, as age increased, the anterior and posterior diameters of the left atrium significantly decreased in both female and male monkeys. Female monkeys showed a significant decrease in the interventricular septal end systolic diameter, left ventricular end diastole and systolic diameters, left ventricular end diastolic and systolic volumes, and left ventricular mass index, while no significant changes were seen in male monkeys. A comparison of diastolic function between the two groups showed that, as age increased, the late diastolic velocity of the mitral valve decreased significantly in male monkeys, while the early diastolic velocity of the left ventricular sidewall increased significantly in female monkeys. Correlation analysis was conducted between the metabolic indicators and the cardiac structure and function indicators of female and male monkeys. The correlations between metabolic indicators and cardiac structure and function indicators were weak in female monkeys, for which the maximum absolute Γ value did not exceed 0.39. However, the correlations between metabolic indicators and cardiac structure and function indicators were relatively strong in male monkeys, for which the maximum absolute Γ value reached 0.66. **Conclusions** Based on ultrasound analysis combined with metabolic indicators, the heart function of cynomolgus monkeys was studied, and basic data related to the structure and function of the heart in middle-aged and elderly cynomolgus monkeys were obtained. As age increased, blood glucose and lipid indicators increased in cynomolgus monkeys, while cardiac systolic and diastolic functions show a downward trend, similar to changes in middle-aged and older adult human populations. These data provide support for animal selection in research on age-related diseases related to heart function.

【Keywords】 middle-aged and elderly cynomolgus monkeys; cardiac structure and function indicators; blood biochemistry indicators; general indicators
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着我国进入老龄化社会,加强衰老机制的基础性研究以及老年慢性病和共病诊疗技术等应用性研究,提升老年重大疾病防治水平是落实《国家积极应对人口老龄化中长期规划》的重要措施^[1]。心血管疾病一直是全球死亡的主要原因。非人灵长类动物在解剖结构和生理功能上与人高度相似,在代谢性、神经退行性等老年性疾病的研究中具有优势。10 岁以上实验猴身体机能与中老年人接近,本研究前期结果显示,给予食蟹猴饮食的干预,表

现出与人相似的代谢性疾病特征,导致心脏结构和功能异常。本文基于 10 岁以上中老年实验猴种群,开展心脏功能相关基础数据采集,为利用食蟹猴开展心血管等老年性疾病研究提供数据支撑。
超声心动图是一种无创成像技术,通常用于评估心脏结构和功能,包括测量心室大小和心室壁厚度,评估瓣膜的结构和功能、收缩和舒张功能以及心脏的血流模式。在临床应用中,超声心动图常用于评估心脏健康状况。老年性疾病研究中,心血管

疾病死亡的危险因素与血压、低密度脂蛋白胆固醇、空腹血糖、身体质量指数 (body mass index, BMI) 等因素有关,已有的食蟹猴基础数据报道,大多集中在血液生化、血常规等指标^[2-3];先前的一些研究报道了恒河猴的正常超声心动图参考范围^[4-5],但针对中老年食蟹猴的代谢指标与心脏结构和功能相关性尚未见相关报道。因此,本研究将利用超声心动图对健康中老年食蟹猴进行检查,获得基础数据范围,结合代谢指标获得中老年食蟹猴心脏功能相关基础研究数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级 10 岁以上食蟹猴 144 只,按年龄和性别进行分组,其中,10 ~ 15 岁组:37 只雌性,年龄 11.38 ± 1.53 岁,体重 3.68 ± 1.21 kg,66 只雄性,年龄 12.46 ± 1.81 岁,体重 7.73 ± 1.43 kg;16 ~ 20 岁组:21 只雌性,年龄 19.83 ± 1.51 岁,体重 3.93 ± 0.76 kg,20 只雄性,年龄 18.26 ± 1.70 岁,体重 7.58 ± 1.90 kg。饲养环境温度为 $18 \sim 26$ °C,相对湿度为 40% ~ 70%,自然采光。动物分别来自从化区华珍动物养殖场【SCXK(粤)2020-0028】和来宾市新桂生物科技有限公司【SCXK(桂)2023-0004】生产繁殖区,BMI、血压、心率及心脏超声等检测分别在其生产区中完成。血生化检测在广东省实验动物监测所【SYXK(粤)2021-0122】完成,本研究动物实验获得广东省实验动物监测所动物实验动物使用与管理委员会批准(IACUC2021147)。

1.1.2 主要试剂与仪器

血液生化指标检测试剂——血糖 (glucose, GLU)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TCHO)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、血钙 (calcein, Ca)、血钠 (natrium, Na)、血钾 (kalium, K)、血磷 (phosphorus, P)、血氯 (chlorine, Cl) (广州科方生物技术股份有限公司,批号:240105、230517、230505、230719、230726、231017、230616、231011、240117、231218、231226)

A6 + 体重秤 (凯丰,中国),HEM-6310F 自动电子血压计 (欧姆龙,中国),3100 型全自动生化分析

仪 (Hitachi,日本),M90 SCI 高分辨率动物超声诊断系统 (迈瑞动物医疗,中国),Vivid iq 便携式心脏彩色多普勒超声诊断仪 (GE HealthCare,美国)。

1.2 方法

1.2.1 BMI

动物测量前禁食 12 h,麻醉后用电子秤称量体重,测量单位为 kg,随后,将动物以自然侧卧姿势置于操作台,身体保持舒展、伸直,用皮尺贴近动物背部,并保持与动物脊椎在同一水平面,测量从头顶到尾根的长度,即为动物冠臀长度,测量 3 次取平均值,测量单位为 cm。 $BMI = \text{体重} / \text{冠臀长度}^2$ (单位: kg / m^2)。

1.2.2 血压 (blood pressure, BP) 及心率 (heart rate, HR)

测定时间为 9:00 ~ 12:00,动物麻醉后约 10 min,取仰卧姿势,待呼吸平稳后进行血压和心率测量。测量时,将电子血压计袖带卷绑于大腿,同时,保证血压计与心脑在同一水平面上,开始测定,记录心率、收缩压 (systolic blood pressure, SBP) 和舒张压 (diastolic blood pressure, DBP),每只动物测量 2 次取平均值,测量单位为 mmHg。

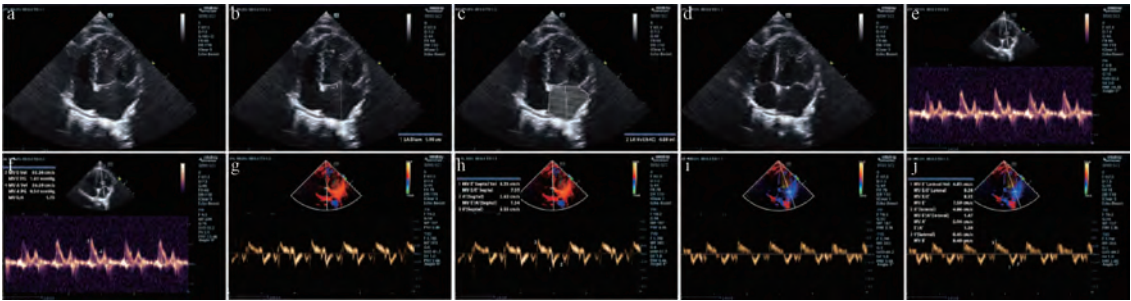
1.2.3 血生化

动物采血前禁食 12 h,使用促凝真空采血管收集动物静脉血 3 mL,全血样本在室温下静置 2 h 后,水平转离心机 3000 r/min 离心 10 min,收集血清暂存于 -80 °C 冰箱,随后干冰运输至广东省实验动物监测所检测。利用全自动生化分析仪检测心脏功能相关生化指标,包括:GLU、TG、TCHO、HDL-C、LDL-C、LDH、Ca、Na、K、P、Cl。

1.2.4 心脏超声

动物麻醉后,利用超声诊断仪开展经胸二维、脉冲波多普勒、组织多普勒超声心动图扫描。当图像可清晰显示左心室轮廓时,采集胸骨旁左室长轴及标准心尖四腔心切面,心尖二腔心切面,心尖三腔心切面二维图像,记录连续 3 个完整心动周期的动态图像,同时,开展二尖瓣环室间隔侧和左室侧壁组织多普勒测量并保存图像 (图 1)。

所有心脏结构和功能参数均从 3 个连续的心脏周期中获取,并计算平均值。通过对胸骨旁长轴 2D 图像测量室间隔舒张末径 (interventricular septum thickness at enddiastole, IVSd)、室间隔收缩末径 (interventricular septum thickness at endsystole, IVSs)、左心室舒张末径 (left ventricular internal



注:a:左心房二维结构图;b:左心房内径二维测量图;c:左心房容积二维测量图;d:二尖瓣二维结构图;e:二尖瓣脉冲多普勒图;f:二尖瓣脉冲多普勒测量图;g:室间隔侧组织多普勒图;h:室间隔侧组织多普勒测量图;i:左室外侧壁组织多普勒图;j:左室外侧壁组织多普勒测量图。

图 1 食蟹猴超声心动图采集

Note. a. Left atrium two-dimensional structure diagram. b. Left atrium diameter two-dimensional measurement diagram. c. Left atrium volume two-dimensional measurement diagram. d. Mitral valve two-dimensional structure diagram. e. Mitral valve pulse Doppler image. f. Mitral valve pulse Doppler measurement diagram. g. Interventricular septum tissue Doppler image. h. Interventricular septum tissue Doppler measurement diagram. i. Left ventricular lateral wall tissue Doppler image. j. Left ventricular lateral wall tissue Doppler measurement diagram.

Figure 1 Collection of echocardiography images of cynomolgus monkeys

diameter in diastole, LVIDd)、左心室收缩末径(left ventricular internal diameter in systole, LVIDs)、左心室后壁舒张末径(left ventricular posterior wall thickness in diastole, LVPWd)、左心室后壁收缩末径(left ventricular posterior wall thickness in systole, LVPWs), 计算左心室舒张末容积(end diastolic volume, EDV)、左心室收缩末容积(end systolic volume, ESV)、每搏量(stroke volume, SV)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室质量(left ventricular mass, LVMass)。通过对胸骨旁长轴测量左心房前后内径(left atrial diameter, LAD)、左心房容积(left atrial volume, LAV)、计算左房容积指数(left atrial volume index, LAVI)。通过脉冲波多普勒记录四腔心二尖瓣血流速度, 包括二尖瓣舒张早期速度(mitral valve E-wave velocity, MV-E)、二尖瓣舒张晚期速度(mitral valve A-wave velocity, MV-A)。通过组织多普勒在心尖四腔二尖瓣环和侧壁心肌节段中记录心肌速度, 包括室间隔舒张早期峰值速度 e' (septal early diastolic velocity, Sep- e')、侧壁舒张早期峰值速度 e' (lateral early diastolic velocity, Lat- e'), 计算E/A和E/ e' 。体表面积= $11.8 \times \text{体重}^{2/3} / 10\,000$ 。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad 8.0 软件进行统计分析, 每组数值用 Normality and lognormality tests 进行正态分布检验, 满足条件($P > 0.10$), 用独立样本 t 检验, 进行各组间差异性分析, 当方差不齐($F < 0.05$), 用

Welch 校正, 进行差异性分析; 不满足条件($P < 0.10$), 用独立样本非参数检验进行各组间差异性分析。分析值用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义, 并获得 95% 置信区间上限和下限范围。采用多变量分析法对食蟹猴代谢指标(BMI、SBP、DBP、HR、GLU、TG、TCHO、HDL-C、LDL-C)和超声心动图变量进行相关性(Γ 值)分析, 获得相关系数 r 。 $r < 0.3$ 弱相关, $0.3 \leq r < 0.5$ 中等相关, $r \geq 0.5$ 强相关。

2 结果

2.1 中老年食蟹猴一般指标比较分析

年龄对中老年雌性食蟹猴中的一般指标无显著性影响, 但对雄性食蟹猴的 SBP 和 DBP 有显著性影响。雄性食蟹猴中, 16 ~ 20 岁组($n = 20$)的 SBP 和 DBP 分别比 10 ~ 15 岁组($n = 66$)的高 26.50% 和 50.90%(表 1, 表 2)。

2.2 中老年食蟹猴血液生化指标比较分析

血液生化测量指标中, 年龄对中老年雌性食蟹猴的 GLU、TCHO、LDH、Na、K、Ca 有显著性影响, 其中, 16 ~ 20 岁组($n = 21$)的 GLU、TCHO、Na、K、Ca 分别比 10 ~ 15 岁组($n = 37$)的高 46.70%、13.10%、6.30%、11.00%、9.40%, LDH 则比 10 ~ 15 岁组($n = 37$)的低 37.40%(表 3)。而年龄对中老年雄性食蟹猴的 GLU、TG、TCHO、HDL-C、LDL-C、LDH、Na、K、Ca 有显著性影响, 其中, 16 ~ 20 岁组($n = 20$)的 GLU、TG、TCHO、HDL-C、LDL-C、Na、K、Ca 分别比 10 ~ 15 岁组($n = 66$)的高 52.20%、

表 1 中老年食蟹猴一般指标测量值比较

组别 Groups	Table 1 Comparison of general index measurement values in middle-aged and elderly cynomolgus monkeys			
	10 ~ 15 岁组(<i>n</i> = 37)		16 ~ 20 岁组(<i>n</i> = 21)	
	10 ~ 15 years group(<i>n</i> = 37)		16 ~ 20 years group(<i>n</i> = 21)	
	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]
身体质量指数/(kg/m ²)	24.30 ± 1.42	21.42 ~ 27.17	24.48 ± 1.09	22.61 ~ 26.75
BMI/(kg/m ²)				
收缩压/mmHg	112.60 ± 3.23	105.90 ~ 119.40	123.30 ± 4.77	113.30 ~ 133.20
SBP/mmHg				
舒张压/mmHg	61.54 ± 2.61	56.24 ~ 66.84	70.05 ± 3.78	62.16 ~ 77.94
DBP/mmHg				
心率/bmp	174.70 ± 3.82	167.00 ~ 182.50	177.40 ± 4.51	168.00 ~ 186.80
HR/bmp				

注: #:95%置信区间上下限;与 10 ~ 15 岁组相比, ** *P* < 0.01。(下表同)
Note. #: 95% confidence interval upper and lower limits. Compared with 10 ~ 15 years group, ** *P* < 0.01. (The same in the following tables)

表 2 中老年食蟹猴血液生化指标测量值比较

组别 Groups	Table 2 Comparison of measurement values of blood biochemical indicators in middle-aged and elderly cynomolgus monkeys			
	10 ~ 15 岁组(<i>n</i> = 66)		16 ~ 20 岁组(<i>n</i> = 20)	
	10 ~ 15 years group(<i>n</i> = 66)		16 ~ 20 years group(<i>n</i> = 20)	
	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]
身体质量指数/(kg/m ²)	38.67 ± 1.01	36.66 ~ 40.68	35.39 ± 1.45	32.25 ~ 38.44
BMI/(kg/m ²)				
收缩压/mmHg	111.90 ± 4.93	102.10 ~ 121.80	141.60 ± 7.50 **	125.90 ~ 157.20
SBP/mmHg				
舒张压/mmHg	54.34 ± 3.19	47.97 ~ 60.71	82.00 ± 5.80 **	69.85 ~ 94.15
DBP/mmHg				
心率/bmp	156.70 ± 3.48	149.80 ~ 163.70	160.60 ± 6.31	147.40 ~ 173.80
HR/bmp				

表 3 雌性中老年食蟹猴血液生化指标测量值比较

组别 Groups	Table 3 Comparison of measurement values of blood biochemical indicators in middle-aged and elderly female cynomolgus monkeys			
	10 ~ 15 岁组(<i>n</i> = 37)		16 ~ 20 岁组(<i>n</i> = 21)	
	10 ~ 15 years group(<i>n</i> = 37)		16 ~ 20 years group(<i>n</i> = 21)	
	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]
血糖/(mmol/L)	3.34 ± 0.24	2.86 ~ 3.82	4.90 ± 0.27 **	4.33 ~ 5.47
GLU/(mmol/L)				
甘油三酯/(mmol/L)	0.74 ± 0.08	0.58 ~ 0.90	0.81 ± 0.07	0.65 ~ 0.96
TG/(mmol/L)				
总胆固醇/(mmol/L)	3.06 ± 0.13	2.80 ~ 3.32	3.46 ± 0.14 *	3.17 ~ 3.75
TCHO/(mmol/L)				
高密度脂蛋白/(mmol/L)	1.28 ± 0.07	1.14 ~ 1.42	1.26 ± 0.06	1.13 ~ 1.29
HDL-C/(mmol/L)				
低密度脂蛋白/(mmol/L)	1.33 ± 0.08	1.16 ~ 1.50	1.37 ± 0.10	1.18 ~ 1.57
LDL-C/(mmol/L)				
乳酸脱氢酶/(U/L)	631.10 ± 49.61	530.50 ~ 731.70	394.90 ± 39.81 **	311.80 ~ 477.90
LDH/(U/L)				
血钠/(mmol/L)	141.50 ± 2.00	137.40 ~ 145.50	150.40 ± 0.88 **	148.60 ~ 152.20
Na ⁺ /(mmol/L)				
血钾/(mmol/L)	5.16 ± 0.16	4.83 ~ 5.48	5.73 ± 0.19 *	5.35 ~ 6.12
K ⁺ /(mmol/L)				
血磷/(mol/L)	1.35 ± 0.06	1.22 ~ 1.48	1.27 ± 0.07	1.12 ~ 1.41
P/(mol/L)				
血钙/(mol/L)	2.33 ± 0.05	2.23 ~ 2.43	2.55 ± 0.05 **	2.45 ~ 2.65
Ca/(mol/L)				
血氯/(mmol/L)	104.00 ± 1.19	101.60 ~ 106.40	104.60 ± 0.46	103.60 ~ 105.60
Cl/(mmol/L)				

注:与 10 ~ 15 岁组相比, * *P* < 0.05。(下表同)
Note. Compared with 10 ~ 15 years group, * *P* < 0.05. (The same in the following tables)

87.30%、27.20%、14.90%、20.90%、8.40%、34.60%、17.00%，LDH 则比 10 ~ 15 岁组 ($n = 66$) 的低 41.1% (表 4)。

2.3 中老年食蟹猴心脏超声结构和功能比较分析

心脏超声结构和功能指标中,年龄对中老年雌性食蟹猴的 IVSs、LVIDd、LVIDs、EDV、ESV、LVMI、LAD、Sep-e'、E/e' 有显著性影响,其中,16 ~ 20 岁组 ($n = 21$) 的 IVSs、LVIDd、LVIDs、EDV、ESV、LVMI、LAD、E/e' 分别比 10 ~ 15 岁组 ($n = 37$) 的低 10.80%、7.30%、8.80%、19.30%、24.00%、17.30%、29.50%、16.80%, Sep-e' 则比 10 ~ 15 岁组 ($n = 37$) 的高 15.3% (表 5)。而对中老年雄性食蟹猴的 LAD、MV-A、E/A 有显著性影响,其中,16 ~ 20 岁组 ($n = 20$) 的 LAD、E/A 分别比 10 ~ 15 岁组 ($n = 66$) 的低 16.90%、23.30%, MV-A 则比 10 ~

15 岁组 ($n = 66$) 的高 24.60% (表 6)。

2.4 中老年食蟹猴代谢与心脏超声结构和功能相关性研究

对食蟹猴代谢指标 (BMI、SBP 和 DBP、HR、GLU、TG、TCHO、HDL-C、LDL-C) 和超声心动图变量进行相关性 (Γ 值) 分析。结果表明,雌猴代谢指标与心脏结构和功能指标的相关性较弱, Γ 值绝对值最高不超过 0.39。与心脏收缩功能有中等相关性的指标主要有 BMI、SBP 和 DBP、TCHO、HDL-C、LDL-C;与心脏舒张功能相关指标主要有 SBP 和 DBP、HR (表 7)。雄猴代谢指标与心脏结构和功能指标的相关性相对较强, Γ 值绝对值最高达 0.66。与心脏收缩功能有较高相关性的指标主要有 SBP、TCHO、HDL-C,具有中等相关性的指标主要有 BMI、DBP、HR、TG;与心脏舒张功能都是弱相关 (表 8)。

表 4 雄性中老年食蟹猴血液生化指标测量值比较

Table 4 Comparison of measurement values of blood biochemical indicators in middle-aged and elderly male cynomolgus monkeys

组别 Groups	10 ~ 15 岁组 ($n = 66$) 10 ~ 15 years group ($n = 66$)		16 ~ 20 岁组 ($n = 20$) 16 ~ 20 years group ($n = 20$)	
	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]
血糖/(mmol/L) GLU/(mmol/L)	3.16 ± 0.15	2.86 ~ 3.46	4.81 ± 0.22**	4.35 ~ 5.27
甘油三酯/(mmol/L) TG/(mmol/L)	0.55 ± 0.04	0.48 ~ 0.62	1.03 ± 0.15**	0.71 ~ 1.35
总胆固醇/(mmol/L) TCHO/(mmol/L)	2.13 ± 0.07	2.00 ~ 2.27	2.71 ± 0.14**	2.41 ~ 3.00
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL-C/(mmol/L)	0.87 ± 0.04	0.78 ~ 0.95	1.00 ± 0.06*	0.88 ~ 1.11
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL-C/(mmol/L)	0.86 ± 0.04	0.78 ~ 0.93	1.04 ± 0.08*	0.87 ~ 1.21
乳酸脱氢酶/(U/L) LDH/(U/L)	542.70 ± 38.69	465.50 ~ 620.00	319.60 ± 15.23**	287.70 ~ 351.40
血钠/(mmol/L) Na/(mmol/L)	138.60 ± 1.34	135.90 ~ 141.20	150.20 ± 2.05**	145.90 ~ 154.50
血钾/(mmol/L) K/(mmol/L)	4.39 ± 0.12	4.15 ~ 4.64	5.91 ± 0.24**	5.41 ~ 6.40
血磷/(mol/L) P/(mol/L)	1.38 ± 0.06	1.26 ~ 1.51	1.44 ± 0.07	1.29 ~ 1.59
血钙/(mol/L) Ca/(mol/L)	2.18 ± 0.03	2.11 ~ 2.25	2.55 ± 0.06**	2.42 ~ 2.67
血氯/(mmol/L) Cl/(mmol/L)	102.30 ± 0.74	100.80 ~ 103.80	103.10 ± 0.79	101.40 ~ 104.70

3 讨论

本研究利用超声心动图并结合代谢指标对中老年食蟹猴一般指标、血液生化指标、心脏结构和功能指标进行比较研究,获得 10 ~ 15 岁组 ($n = 103$) 和 16 ~ 20 岁组 ($n = 41$) 食蟹猴繁殖群的各指标平均值和 95% 置信区间变化上限和下限,以及代谢与心脏结构和功能相关系数,为食蟹猴开展老年

性疾病研究提供数据支撑。

一般指标中,BMI 是衡量身体肥胖程度的重要指标,而肥胖是诱发心血管疾病的重要因素^[6],BMI 值 ≥ 40 常作为食蟹猴肥胖评价的指标之一,本研究 10 岁以上食蟹猴 BMI 平均值 ≤ 40 且无显著性差异,说明研究的食蟹猴 BMI 在正常值范围内,而且雄猴 BMI 显著高于雌猴,与之前关于食蟹猴 BMI 的报道相似^[7]。在血压测定中,雌猴和雄猴 SBP 和

表 5 雌性中老年食蟹猴心脏超声结构和功能的比较研究

Table 5 Cardiac ultrasonic structure and function measurements and reference values of middle-aged and elderly female cynomolgus monkeys

组别 Groups	10 ~ 15 岁组(<i>n</i> = 37)		16 ~ 20 岁组(<i>n</i> = 21)	
	10 ~ 15 years group(<i>n</i> = 37)		16 ~ 20 years group(<i>n</i> = 21)	
	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]
室间隔舒张末径/mm IVSd/mm	4.74 ± 0.13	4.47 ~ 5.00	4.65 ± 0.13	4.38 ~ 4.91
室间隔收缩末径/mm IVSs/mm	6.60 ± 0.13	6.34 ~ 6.86	5.89 ± 0.12 **	5.64 ~ 6.13
左心室舒张末径/mm LVIDd/mm	13.62 ± 0.31	12.99 ~ 14.25	12.63 ± 0.29 *	12.03 ~ 13.24
左心室收缩末径/mm LVIDs/mm	8.06 ± 0.21	7.62 ~ 8.50	7.35 ± 0.21 *	6.92 ~ 7.78
左心室后壁舒张末径/mm LVPWd/mm	4.46 ± 0.13	4.20 ~ 4.72	4.49 ± 0.11	4.26 ~ 4.72
左心室后壁收缩末径/mm LVPWs/mm	5.85 ± 0.15	5.54 ~ 6.16	5.84 ± 0.16	5.50 ~ 6.17
左心室舒张末容积/mL EDV/mL	4.88 ± 0.29	4.28 ~ 5.48	3.94 ± 0.22 *	3.48 ~ 4.40
左心室收缩末容积/mL ESV/mL	1.21 ± 0.09	1.03 ~ 1.40	0.92 ± 0.07 *	0.77 ~ 1.07
每搏量/mL SV/mL	3.67 ± 0.26	3.14 ~ 4.18	3.02 ± 0.17	2.67 ~ 3.63
左心室射血分数/% LVEF/%	74.41 ± 1.49	71.38 ~ 77.44	76.76 ± 0.96	74.76 ~ 78.75
短轴缩短率/% FS/%	40.54 ± 1.31	37.90 ~ 43.19	41.83 ± 0.89	39.98 ~ 43.69
左心室质量/g LVMass/g	8.56 ± 0.41	7.74 ~ 9.38	7.60 ± 0.34	6.89 ~ 8.31
左心室质量指数/(g/m ²) LVMI/(g/m ²)	31.60 ± 1.47	28.62 ~ 34.57	26.13 ± 1.11 **	23.88 ~ 28.38
左心房前后内径/mm LAD/mm	13.69 ± 0.49	12.69 ~ 14.68	9.65 ± 0.24 **	9.16 ~ 10.14
左心房容积/mL LAV/mL	1.58 ± 0.12	1.34 ~ 1.82	1.66 ± 0.12	1.42 ~ 1.91
左房容积指数/(mL/m ²) LAVI/(mL/m ²)	5.82 ± 0.46	4.89 ~ 6.76	5.65 ± 0.37	4.88 ~ 6.42
二尖瓣舒张早期速度/(m/s) MV-E/(m/s)	0.67 ± 0.03	0.61 ~ 0.73	0.66 ± 0.05	0.55 ~ 0.76
二尖瓣舒张晚期速度/(m/s) MV-A/(m/s)	0.59 ± 0.03	0.52 ~ 0.65	0.64 ± 0.04	0.57 ~ 0.71
二尖瓣舒张早期与二尖瓣舒张晚期速度比 E/A	1.20 ± 0.06	1.09 ~ 1.31	1.09 ± 0.12	0.84 ~ 1.33
室间隔舒张早期峰值速度 e'/(m/s) Sep-e'/(m/s)	0.072 ± 0.003	0.066 ~ 0.078	0.083 ± 0.005 *	0.073 ~ 0.093
侧壁舒张早期峰值速度 e'/(m/s) Lat-e'/(m/s)	0.087 ± 0.004	0.080 ~ 0.094	0.098 ± 0.006	0.085 ~ 0.110
室间隔舒张早期与侧壁舒张早期峰值速度比 E/e'	9.75 ± 0.52	8.69 ~ 10.81	8.11 ± 0.52 *	7.02 ~ 9.20

DBP 均随年龄增长而增加,雄猴血压增加趋势更为显著。先前报道也表明食蟹猴血压随年龄呈现上升趋势,但本研究的测量值相对较高,食蟹猴血压测定需要麻醉,可能与麻醉深度和血压测定位置相关^[8]。

在血生化指标检测中,本研究结果中老年食蟹

猴随着年龄增加,血糖血脂指标 GLU、TCHO、TG、LDL-C、HDL-C 均升高,用高脂高糖高胆固醇干预食蟹猴,在喂养 3 个月就显示血糖血脂 GLU、TCHO、TG、LDL-C、HDL-C 升高的变化,已报道在衰老过程中,葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT) 转移葡萄糖的能力受损,导致空腹血糖和葡萄糖水平

表 6 雄性中老年食蟹猴心脏超声结构和功能的比较研究

Table 6 Cardiac ultrasonic structure and function measurements and reference values of middle-aged and elderly male cynomolgus monkeys

组别 Groups	10 ~ 15 岁组(<i>n</i> = 66)		16 ~ 20 岁组(<i>n</i> = 20)	
	10 ~ 15 years group(<i>n</i> = 66)		16 ~ 20 years group(<i>n</i> = 20)	
	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]	$\bar{x} \pm s$	95% CI [#]
室间隔舒张末径/mm IVSd/mm	5.45 ± 0.13	5.18 ~ 5.71	5.08 ± 0.07	4.93 ~ 5.23
室间隔收缩末径/mm IVSs/mm	6.54 ± 0.23	6.09 ~ 6.99	6.45 ± 0.12	6.20 ~ 6.69
左心室舒张末径/mm LVIDd/mm	17.80 ± 0.35	17.11 ~ 18.49	18.02 ± 0.48	17.02 ~ 19.02
左心室收缩末径/mm LVIDs/mm	11.16 ± 0.28	10.61 ~ 11.71	11.11 ± 0.29	10.50 ~ 11.72
左心室后壁舒张末径/mm LVPWd/mm	5.05 ± 0.12	4.81 ~ 5.29	4.96 ± 0.12	4.72 ~ 5.20
左心室后壁收缩末径/mm LVPWs/mm	5.99 ± 0.20	5.58 ~ 6.39	6.41 ± 0.15	6.08 ~ 6.73
左心室舒张末容积/mL EDV/mL	9.88 ± 0.47	8.95 ~ 10.82	10.00 ± 0.67	8.58 ~ 11.42
左心室收缩末容积/mL ESV/mL	3.01 ± 0.20	2.62 ~ 3.40	2.81 ± 0.18	2.43 ~ 3.19
每搏量/mL SV/mL	6.88 ± 0.34	6.20 ~ 7.56	7.19 ± 0.56	6.02 ~ 8.35
左心室射血分数/% LVEF/%	69.72 ± 1.19	67.35 ~ 72.09	71.59 ± 1.13	69.22 ~ 73.97
短轴缩短率/% FS/%	37.26 ± 0.96	35.35 ~ 39.17	38.25 ± 0.93	36.31 ~ 40.20
左心室质量/g LVMass/g	15.03 ± 0.51	14.00 ~ 16.06	14.16 ± 0.38	13.17 ~ 15.16
左心室质量指数/(g/m ²) LVMI/(g/m ²)	32.54 ± 0.98	30.57 ~ 34.5	31.47 ± 0.81	29.78 ~ 33.16
左心房前后内径/mm LAD/mm	14.78 ± 0.40	13.99 ~ 15.57	12.28 ± 0.28**	11.70 ~ 12.86
左心房容积/mL LAV/mL	2.91 ± 0.10	2.70 ~ 3.12	2.96 ± 0.16	2.62 ~ 3.30
左房容积指数/(mL/m ²) LAVI/(mL/m ²)	6.36 ± 0.23	5.89 ~ 6.82	6.62 ± 0.37	5.84 ~ 7.39
二尖瓣舒张早期速度/(m/s) MV-E/(m/s)	0.65 ± 0.02	0.62 ~ 0.69	0.63 ± 0.20	0.56 ~ 0.74
二尖瓣舒张晚期速度/(m/s) MV-A/(m/s)	0.57 ± 0.02	0.52 ~ 0.62	0.71 ± 0.04*	0.63 ~ 0.79
二尖瓣舒张早期与二尖瓣舒张晚期速度比 E/A	1.20 ± 0.04	1.11 ~ 1.28	0.92 ± 0.04**	0.84 ~ 0.99
室间隔舒张早期峰值速度 e'/(m/s) Sep-e'/(m/s)	0.071 ± 0.003	0.065 ~ 0.077	0.075 ± 0.006	0.062 ~ 0.088
侧壁舒张早期峰值速度 e'/(m/s) Lat-e'/(m/s)	0.091 ± 0.004	0.084 ~ 0.098	0.092 ± 0.006	0.079 ~ 0.105
室间隔舒张早期与侧壁舒张早期峰值速度比 E/e'	9.83 ± 0.38	9.07 ~ 10.58	9.44 ± 0.79	7.78 ~ 11.09

升高,循环葡萄糖显著增加。同时,脂肪酸代谢功能异常,导致高胆固醇、高甘油三酯血症和低密度脂蛋白胆固醇升高,又会导致血栓形成并增加心血管疾病的风险^[9]。

在心脏结构和功能指标中,本研究的结果显示,中老年食蟹猴随着年龄增加,在心脏收缩功能

方面,雌猴和雄猴 LAD 下降,雌猴 IVSs、LVIDd、LVIDs、EDV、ESV、LVMI 下降,雄猴变化不明显;在心脏舒张功能方面,雄猴 MV-A 上升、E/A 下降;雌猴 Sep-e' 上升,E/e' 下降。临床数据报道表明,衰老会促进心房、心室、瓣膜、心肌、心包、心脏传导系统和脉管系统的结构和功能变化,左心房与年龄相

表 7 雌猴代谢指标与心脏结构和功能相关系数(*r*)

Table 7 Correlation coefficient (*r*) between metabolic indexes and cardiac structure and function in female cynomolgus monkeys

相关系数 Correlation coefficient	身体质量 指数 BMI	收缩压 SBP	舒张压 DBP	心率 HR	血糖 GLU	甘油三酯 TG	总胆固醇 TCHO	高密度 脂蛋白 HDL-C	低密度 脂蛋白 LDL-C
室间隔舒张末径/mm IVSd/mm	0.06	0.05	0.15	0.12	0.13	0.15	-0.15	-0.18	-0.07
室间隔收缩末径/mm IVSs/mm	0.27 [#]	0.00	0.01	-0.11	-0.18	0.01	-0.13	0.12	-0.12
左心室舒张末径/mm LVIDd/mm	0.29 [#]	0.17	0.19	-0.09	-0.19	-0.04	-0.30	-0.03 [#]	-0.30 [#]
左心室收缩末径/mm LVIDs/mm	0.19	0.19	0.13	0.14	-0.14	-0.07	-0.14	-0.03	-0.06
左心室后壁舒张末径/mm LVPWd/mm	0.17	-0.02	0.06	-0.18	-0.04	-0.10	-0.11	-0.11	-0.01
左心室后壁收缩末径/mm LVPWs/mm	0.17	0.03	0.13	-0.21	0.00	0.13	-0.24	-0.22	-0.15
左心室射血分数/% LVEF/%	-0.02	-0.07	0.03	-0.27 [#]	0.01	0.08	-0.08	0.00	-0.18
短轴缩短率/% FS/%	0.03	-0.06	0.04	-0.27	-0.01	0.04	-0.11	0.04	-0.24
左心室舒张末容积/mL EDV/mL	0.35 ^{##}	0.12	0.15	-0.13	-0.19	-0.02	-0.31 [#]	-0.04	-0.29 [#]
左心室收缩末容积/mL ESV/mL	0.20	0.16	0.10	0.14	-0.14	-0.09	-0.11	0.02	-0.03
每搏量/mL SV/mL	0.33 ^{##}	0.09	0.14	-0.20	-0.18	0.01	-0.33 [#]	-0.06	-0.32 [#]
左心房前后内径/mm LAD/mm	0.01	-0.12	-0.14	-0.07	-0.26	-0.11	-0.28 [#]	0.04	-0.18
左心房容积/mL LAV/mL	0.13	0.23	0.14	0.09	0.00	-0.02	-0.39 ^{##}	-0.37 ^{##}	-0.28 [#]
左房容积指数/(mL/m ²) LAVI/(mL/m ²)	-0.21	0.20	0.15	0.25	0.05	0.00	-0.35 ^{##}	-0.39 ^{##}	-0.17
二尖瓣舒张早期速度/(m/s) MV-E/(m/s)	0.08	0.05	0.01	0.47 ^{##}	0.09	-0.04	-0.21	-0.10	-0.23
二尖瓣舒张晚期速度/(m/s) MV-A/(m/s)	0.23	0.31 [#]	0.31 [#]	0.40 ^{##}	0.03	0.05	-0.18	-0.18	-0.12
二尖瓣舒张早期与二尖瓣舒 张晚期速度比 E/A	-0.14	-0.21	-0.22	0.11	0.18	-0.07	-0.01	0.01	-0.04
室间隔舒张早期峰值 速度 e'/(m/s) Sep-e'/(m/s)	-0.09	0.21	0.26 [#]	0.37 ^{##}	0.14	0.21	0.02	-0.05	-0.08
侧壁舒张早期峰值 速度 e'/(m/s) Lat-e'/(m/s)	-0.05	0.12	0.14	0.23	0.10	0.10	0.00	0.12	-0.23
室间隔舒张早期与侧壁舒 张早期峰值速度比 E/e'	0.16	-0.17	-0.27 [#]	0.07	-0.07	-0.21	-0.16	0.03	-0.14

注:相关系数为行列对应两个参数之间的相关性,[#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01。(下表同)
Note. Correlation coefficient represents the correlation between the two parameters corresponding to the row and column, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01. (The same in the following tables)

关的主要变化是直径(体积)增加,而左心室的主要变化是心室壁厚增加和心室舒张末径减小^[10]。随着年龄增长,左心室舒张功能会逐渐下降,而收缩功能、心输出量和心肌收缩力则不受年龄影响^[11];室间隔厚度、左室后壁厚度、左房内径都有所增加,E/A 比下降,EF、FS 则无明显变化^[12]。本研究中老年

表 8 雄猴代谢指标与心脏结构和功能相关系数(*r*)

Table 8	Correlation coefficient (<i>r</i>) between metabolic indexes and cardiac structure and function in male cynomolgus monkeys								
相关系数 Correlation coefficient	身体质量 指数 BMI	收缩压 SBP	舒张压 DBP	心率 HR	血糖 GLU	甘油三酯 TG	总胆固醇 TCHO	高密度 脂蛋白 HDL-C	低密度 脂蛋白 LDL-C
室间隔舒张末径/mm IVSd/mm	0.28 [#]	0.41 ^{##}	0.26	0.07 [#]	-0.22	0.09	0.33 ^{##}	0.55 ^{##}	0.09
室间隔收缩末径/mm IVSs/mm	0.28 ^{##}	0.56 ^{##}	0.38	0.06	-0.04	0.24 [#]	0.50 ^{##}	0.66 ^{##}	0.22 [#]
左心室舒张末径/mm LVIDd/mm	0.11	-0.13	-0.08 [#]	-0.22	-0.01	0.02	-0.09	-0.15	-0.01
左心室收缩末径/mm LVIDs/mm	0.07	-0.20	-0.13	-0.20	0.02	-0.02	-0.04	-0.15	0.07
左心室后壁舒张末径/mm LVPWd/mm	0.24 [#]	0.36 ^{##}	0.35	-0.01	-0.08	0.19	0.17	0.28 ^{##}	0.01
左心室后壁收缩末径/mm LVPWs/mm	0.32 ^{##}	0.52 ^{##}	0.47	-0.05	0.06	0.37 ^{##}	0.46 ^{##}	0.53 ^{##}	0.22 [#]
左心室射血分数/% LVEF/%	0.01	0.16	0.13	0.03	-0.03	0.09	-0.04	0.04	-0.13
短轴缩短率/% FS/%	0.02	0.14	0.11	0.00	-0.06	0.08	-0.05	0.05	-0.13
左心室舒张末容积/mL EDV/mL	0.13	-0.14	-0.09 [#]	-0.23	-0.03	0.02	-0.11	-0.18	0.00
左心室收缩末容积/mL ESV/mL	0.05	-0.23	-0.17 [#]	-0.26	-0.03	-0.03	-0.04	-0.15	0.08
每搏量/mL SV/mL	0.15	-0.07	-0.03	-0.18	-0.03	0.04	-0.12	-0.16	-0.04
左心房前后内径/mm LAD/mm	0.30 [#]	0.24	0.14	0.00 [#]	-0.27	0.02	0.18	0.49 ^{##}	-0.05
左心房容积/mL LAV/mL	0.10	-0.09	-0.04 ^{##}	-0.32	-0.01	0.04	-0.13	-0.19	-0.02
左房容积指数/(mL/m ²) LAVI/(mL/m ²)	-0.31 ^{##}	-0.23	-0.18 ^{##}	-0.30	0.03	-0.05	-0.17	-0.25 [#]	-0.06
二尖瓣舒张早期速度/(m/s) MV-E/(m/s)	-0.07	0.01	-0.01	-0.06	-0.18	-0.05	-0.10	-0.17	0.02
二尖瓣舒张晚期速度/(m/s) MV-A/(m/s)	0.04	0.17	0.27	0.09	0.00	-0.02	-0.04	-0.11	-0.01
二尖瓣舒张早期与二尖瓣舒 张晚期速度比 E/A	-0.03	-0.20	-0.29 [#]	-0.20	-0.21	-0.08	-0.12	-0.08	-0.01
室间隔舒张早期峰值 速度 e'/(m/s) Sep-e'/(m/s)	0.08	0.12	0.17	0.13	-0.16	-0.12	-0.25 [#]	-0.25 [#]	-0.16
侧壁舒张早期峰值 速度 e'/(m/s) Lat-e'/(m/s)	0.03	0.04	0.14	0.08	-0.17	-0.07	-0.18	-0.19	-0.14
室间隔舒张早期与侧壁舒 张早期峰值速度比 E/e'	-0.10	-0.10	-0.14	-0.13	0.02	0.07	0.13	0.04	0.20

年食蟹猴心脏结构和功能数据变化差异不大,与临床数据比较也显示一定的相似变化,在雌性猴中,心室舒张和收缩末径均减小,雌性和雄性猴 E/A 比都有下降趋势,EF、FS 无明显变化。但是,左心房直径下降有待进一步研究。衰老心脏会产生代谢异常,而代谢的异常又会导致心脏受损,两者之间有

着密不可分的关系。在本研究中,通过心功能和代谢指标间的多元线性回归分析,食蟹猴心脏功能变化与血糖血脂升高相关性较弱,自然繁殖食蟹猴群体由代谢引起的心脏功能变化进程相对较慢。

参 考 文 献 (References)

[1] 新华社. 中共中央国务院印发《国家积极应对人口老龄化中

长期规划》[EB/OL]. (2019-11-21) [2024-06-14].
https://www.gov.cn/xinwen/2019-11/21/content_5454347.htm.

Xinhua. The State Council People's Republic of China issued China unveils plan for tackling aging population [EB/OL]. (2019-11-21) [2024-06-14]. https://english.www.gov.cn/policies/latestreleases/201911/21/content_WS5dd69153c6d0bcf8c4c1792b.html.

[2] 潘东升, 刘芳, 苗玉发, 等. Beagle 犬和食蟹猴血清生化 and 血液学指标的测定 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 19-21.

PAN D S, LIU F, MIAO Y F, et al. Determination of serum biochemical and hematological indices in healthy Beagle dogs and cynomolgus monkeys [J]. Drug Eval Res, 2011, 34(1): 19-21.

[3] 宋怀燕, 阎铭杰. 恒河猴血生化正常值测试的研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 1993, 3(1): 51-54.

SONG H Y, YAN M J. Study on the test of normal blood biochemical values in *Macaca mulatta* [J]. Chin J Comp Med, 1993, 3(1): 51-54.

[4] 黄鹤, 唐红, 延东娥, 等. 超声心动图评价快速起搏实验恒河猴心功能 [A]. 2006 和谐开发中国西部声学学术交流会议论文集 [C]; 2006.

HUANG H, TANG H, YAN D E, et al. Evaluation of cardiac function in high rate paced *Macaca mulatta* [A]. 2006 harmonious development western China acoustics academic exchange conference proceedings [C]; 2006.

[5] UEDA Y, DULER L M M, ELLIOT K J, et al. Echocardiographic reference intervals with allometric scaling of 823 clinically healthy rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 348.

[6] 贾铭, 彭菊意, 刘星宇, 等. 心血管代谢性共病危险因素的 Meta 分析 [J]. 预防医学, 2023, 35(9): 790-795.

JIA M, PENG J Y, LIU X Y, et al. Risk factors for cardiometabolic multimorbidity: a Meta-analysis [J]. Prev Med, 2023, 35(9): 790-795.

[7] WU D, YUE F, ZOU C, et al. Analysis of glucose metabolism in cynomolgus monkeys during aging [J]. Biogerontology, 2012, 13(2): 147-155.

[8] BROWNLEE R D, KASS P H, SAMMAK R L. Blood pressure reference intervals for Ketamine-sedated *Rhesus* macaques (*Macaca mulatta*) [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2020, 59(1): 24-29.

[9] XIE S, XU S C, DENG W, et al. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 114.

[10] GALDERISI M, COSYNS B, EDVARDSEN T, et al. Standardization of adult transthoracic echocardiography reporting in agreement with recent chamber quantification, diastolic function, and heart valve disease recommendations: an expert consensus document of the European Association of Cardiovascular Imaging [J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2017, 18(12): 1301-1310.

[11] OBAS V, VASAN R S. The aging heart [J]. Clin Sci, 2018, 132(13): 1367-1382.

[12] 张延平. 心功能各参数指标与年龄增长的关系 [J]. 吉林医学, 2007, 28(17): 1900-1901.

ZHANG Y P. Relationship between cardiac function parameters and age growth [J]. Jilin Med J, 2007, 28(17): 1900-1901.

[收稿日期] 2023-11-15

杨明,王朝平,雷志强,等. 川芎挥发油治疗心绞痛的网络药理学研究及实验验证 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 867-878.

YANG M, WANG C P, LEI Z Q, et al. Network pharmacological study and experimental validation of Rhizoma Chuanxiong volatile oil in the treatment of angina pectoris [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 867-878.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.006

川芎挥发油治疗心绞痛的网络药理学研究及实验验证

杨明^{1,2,3}, 王朝平¹, 雷志强⁴, 刘波¹, 张华¹, 罗晶^{1,2,3*}

(1. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学 中国教育部现代中医药制剂重点实验室, 南昌 330004; 3. 江西中医药大学 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 南昌 330004; 4. 江西中医药大学 临床医学院, 南昌 330004)

【摘要】 目的 基于网络药理学研究川芎挥发油抗心绞痛的作用机制,并用动物实验加以验证。方法 通过水蒸气蒸馏法、气相色谱-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、口服利用度 (oral bioavailability, OB) 筛出挥发油成分;使用 Pubchem、SwissTarget、DisGeNET、DrugBank 数据库和 R 语言分别获取挥发油成分的靶点、心绞痛的靶点和交集靶点;蛋白质-蛋白质相互作用通过 String 数据库完成;使用 R 语言的 ClusterProfiler 包对交集靶点进行基因本体分析 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书分析 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析,并通过 Cytoscape 构建中药-成分-靶点-通路网络;借助 AutoDock vina 1.2.3、Pymol 3.0、Discovery Studio 2016 软件进行分子对接,分析关键靶点和主要挥发油成分的亲和力。最后,通过动物实验进一步验证川芎挥发油对心绞痛的治疗效果。结果 网络药理学研究共得到 10 个挥发油成分和 22 个关键靶点,这些靶点与神经递质、突触膜上的受体、物质代谢等生物过程以及神经活性配体-受体相互作用、视黄醇代谢、药物代谢-细胞色素 P450 等通路密切相关;分子对接结果表明 3-butylidenephthalide、Alpha-selinene、Trans-ligustilide 等挥发油成分与多个关键靶点结合发挥治疗作用。动物实验表明川芎挥发油通过调节射血分数 (ejection fraction, EF)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS)、左室收缩末内径 (left ventricular internal diameter in systole, LVIDs) 和每搏输出量 (stroke volume, SV) 水平以及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性,促进受损心肌细胞中 ADRA1A、CHRM5 蛋白的表达,改善心肌纤维状态,减小细胞间隙,减少炎症细胞浸润表现出保护心肌的作用。结论 川芎挥发油具有有效保护受损心肌组织,治疗心绞痛的作用。

【关键词】 川芎;挥发油;心绞痛;网络药理学;动物实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0867-12

Network pharmacological study and experimental validation of Rhizoma Chuanxiong volatile oil in the treatment of angina pectoris

YANG Ming^{1,2,3}, WANG Chaoping¹, LEI Zhiqiang⁴, LIU Bo¹, ZHANG Hua¹, LUO Jing^{1,2,3*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Preparations, Ministry of Education, Nanchang 330004, China; 3. Jiangxi University of Chinese Medicine, State Key Laboratory of Innovative Drugs and Pharmaceutical Equipment with High Efficiency, Energy Saving and Consumption Reduction, Nanchang 330004, China; 4. Jiangxi University of Chinese Medicine, Clinical Medical College, Nanchang 330004, China)

Corresponding author: LUO Jing. E-mail:luojingjz@163.com

[基金项目] 江西中医药大学博士科研启动基金 (2022WBZR001), 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ211236)。

Funded by the Jiangxi University of Chinese Medicine Doctoral Research Initiation Fund Project (2022WBZR001), Science and Technology Research Program of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ211236).

[作者简介] 杨明,男,博士生导师,教授,研究方向:中药新剂型、新技术、新工艺研究。Email:yangming16@126.com

[通信作者] 罗晶,女,硕士生导师,副教授,研究方向:中药分析。Email:luojingjz@163.com

[Abstract] Objective Network pharmacology and animal experiments were performed to study and verify the therapeutic effect of Rhizoma Chuanxiong volatile oil on angina pectoris. **Methods** Volatile oil components were screened using steam distillation, gas chromatography-mass spectrometry, and oral bioavailability. Targets of these components were identified using Pubchem, SwissTarget, DisGeNET, and DrugBank databases as well as R language. Angina pectoris-related targets and intersection targets were obtained. Protein-protein interactions were analyzed using the STRING database. The ClusterProfiler package in R was used to analyze the gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment of the intersecting targets, and Cytoscape was used to construct herbal-component-target-pathway networks. Molecular docking analysis was conducted using AutoDock Vina 1.2.3, Pymol 3.0, and Discovery Studio 2016 software to evaluate the affinity between key targets and the main volatile oil components. Finally, the therapeutic effect of Rhizoma Chuanxiong volatile oil on angina pectoris was verified by animal experiments. **Results** In total, 10 volatile oil components and 22 key targets were identified. They were closely related to neurotransmitters, receptors on synaptic membranes, material metabolism, neuroactive ligand-receptor interaction, retinol metabolism, and drug metabolism-cytochrome P450 pathways. The molecular docking result showed that 3-butyldenephthalide, alpha-selinene, trans-ligustilide, and other volatile oil components combined with several key targets play therapeutic roles. Animal experiments showed that the volatile oil of Rhizoma Chuanxiong can regulate the ejection fraction, fractional shortening, stroke volume, and left ventricular internal diameter in systole and the activities of lactate dehydrogenase, creatine kinase and aspartate aminotransferase; promote the expression of ADRA1A and CHRM5 proteins in damaged cardiomyocytes; improve the state of myocardial fibers; reduce intercellular space; and reduce inflammatory cell infiltration. **Conclusions** The volatile oil of *Ligusticum wallichii* can effectively protect damaged myocardial tissue and thus has a role in treating angina pectoris.

[Keywords] Rhizoma Chuanxiong; volatile oil; angina pectoris; network pharmacology; animal experiment

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

心绞痛是当冠状动脉供血不足加重时,引起心肌急剧、短暂缺血缺氧引起的综合征。根据发病机理及症状表现不同,可以将心绞痛简单地分为稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛,其中不稳定型心绞痛中包含血管痉挛性心绞痛亦称变异型心绞痛。调查研究显示我国心血管患病人数约为 3.3 亿,其中冠心病心绞痛患者约为 1139 万,患病率和死亡率逐步升高^[1-3],冠心病心绞痛给患者、家庭以及社会带来了严重负担,防治心绞痛刻不容缓。目前临床上多采用 β 受体阻滞剂、钙通道阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂等药物防治心绞痛,效果虽十分显著,但仍不足以较好地控制心绞痛,同时部分患者在使用药物后会出现不良反应^[4-5]。

川芎为伞形科植物川芎的干燥根茎,归肝、胆、心包经,具有活血行气、祛风止痛的功能^[6]。中医常用于治疗胸痹心痛、胸胁刺痛、跌扑肿痛、月经不调、经闭痛经、癥瘕腹痛、头痛、风湿痹痛等病症^[7]。川芎挥发油已被证明是川芎的主要活性成分之一,是川芎发挥药效的重要物质基础^[8],川芎挥发油含有大量苯酚类、萜烯醇和脂肪酸等化合物,具有抗炎、抗氧化、抗血栓、舒张血管等广泛的药理学活性。

本文通过网络药理学研究,分析川芎的挥发油活性成分,从分子化合物的层面挖掘出其干预心绞

痛疾病的靶点及靶点涉及的生物功能及通路,为阐明川芎挥发油成分干预心绞痛或保护心血管的作用机制提供思路与方向;再通过动物实验验证川芎挥发油对心绞痛的治疗作用,为川芎挥发油的临床研究及应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,8 周龄,体重 180 g 左右,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】,动物饲养于江西中医药大学实验动物中心【SYXK(赣)2023-0004】,按照每天每只大鼠 12 g 饲料喂食,饲养环境相对湿度 50%,室温控制在 20 ~ 22 °C,12 h 光照,12 h 黑暗,实验期间自由饮水,实验前 12 h 禁食。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会伦理审批(JZSYDWLL-20201220)。

1.1.2 主要试剂与仪器

川芎(产地四川彭州,2020011001);盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司,H31021344);硝酸甘油气雾剂(山东京卫制药有限公司,批号:20190517);蓖麻油聚氧乙烯醚(北京索

莱宝科技有限公司, 20191030); 丙三醇(天津市福晨化学试剂厂, 20170802); 乳酸脱氢酶(LDH, 20191009)、肌酸激酶(CK, 20190905)、谷草转氨酶(AST/GOT, 20190909)试剂盒(深圳雷杜生命科学股份有限公司); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(Ba1012)、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(Ba1086)、ECL 化学发光检测试剂盒(Ba1059)(百仟度生物科技有限公司); CHRM5(ab186830)、ADRA1A(ab127123)、CHRM3(ab87199)、 β -actin(ab227387)、Western Blot 试剂盒(英国 Abcam); HRP-Goat anti Rabbit(美国 KPL, 074-1506); HRP-Goat anti Mouse(美国 KPL, 074-1806)。Agilent7890A 气象色谱-5975C 质谱联用仪(美国 Agilent 公司); 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); 分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); 马尔文粒度仪(英国马尔文公司); 电导率仪(雷磁上海仪电科学仪器股份有限公司); pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); 乌氏粘度计(上海宝山启航玻璃仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 川芎挥发油成分及其靶点的筛选

取川芎破碎, 使用水蒸气蒸馏法提取, 经脱水、过滤最终得到川芎挥发油样品。采用气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)对川芎挥发油的化学成分进行测定。根据 GC-MS 的检测结果, 以匹配度超过 90% 为阈值, 筛选出峰面积较大的成分作为川芎挥发油的有效成分。

将质谱数据的 CAS 号作为关键词, 通过 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、TCMSP(<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 和 SwissADME(<http://www.swissadme.ch/>) 数据库获取挥发油成分的详细信息以及 SMILES 编号; 将 SMILES 编号作为关键词输入 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 选择物种为“Homo sapiens”, 预测挥发油成分的靶点, 并汇总整理, 删除重复值。结合 DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>) 和 DisGeNET(<http://www.disgenet.org/>) 数据库, 使用“angina pectoris”作为搜索词, 这里的筛选条件为 Gene-Disease Association Score(Score_{gda}) > 0, 对得到的数据加以筛选和去重, 最终得到心绞痛相关靶点。

通过 R 语言的 VennDiagram 包^[9]对川芎挥发油靶点和心绞痛靶点进行处理, 得出川芎挥发油与心

绞痛相关的潜在靶点。

1.2.2 潜在靶点的生物信息学分析及分子对接

通过 String(<https://cn.string-db.org/>) 数据库对多个潜在靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI) 网络分析, 设置物种为“Homo sapiens”。结果导入 Cytoscape 3.9.0 软件^[10]进行网络拓扑分析, 阐明潜在靶点间的相互作用。

使用 R 语言的 ClusterProfiler 包^[11]对潜在靶点基因本体分析(gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书分析(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析, 设置分析阈值($P < 0.05$), 并对结果可视化。使用 Cytoscape 3.9.0 软件, 构建川芎挥发油成分-靶点-通路网络, 并对网络进行分析。

通过 PDB(<http://www.pdb.org/>) 和 PubChem 数据库获取潜在靶点的晶体结构数据以及挥发油成分的结构数据, 设置对接参数, 使用 AutoDock vina 1.2.3^[12]、Pymol 3.0^[13]、Discovery Studio 2016^[14]进行分子对接及结果可视化, 使用 R 语言的 Pheatmap 包^[15]绘制结合能热图。

1.2.3 动物模型准备

盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, ISO) 被用作诱导大鼠心肌缺血损伤的模型药物^[3]。长期食用川芎挥发油会产生副作用和肾毒性^[16], 实验采用川芎挥发油微乳喷雾剂经鼻给药, 具有吸收更快、生物利用度高、可有效避免肝首过效应、增加难溶性成分的溶解性、有效提高药稳定性的特点^[17-18]。

1.2.4 川芎挥发油微乳喷雾剂的制备

前期对挥发油微乳的微乳基质进行了筛选, 得到的处方比例, 油相: 蓖麻油聚氧乙烯醚(Cremophor EL, CEL) 19.6%、丙三醇 9.8%、挥发油 5.88%; 水相: 水 64.72%。

称取以上处方的油相及水相, 将 CEL 和丙三醇充分混合均匀, 接下来在混合相中逐滴加入川芎挥发油, 并用磁力搅拌器不断搅拌, 转速为 350 r/min, 温度设置为 30 °C, 搅拌 5 min 之后, 缓慢滴入水相, 搅拌 30 min 后停止, 即得透明均一的微乳。将微乳经 0.22 μ m 滤膜滤过, 分装至 5 mL 聚乙烯塑料瓶中, 即得川芎挥发油微乳喷雾剂(Rhizoma chuanxiong volatile oil microemulsion spray, CXVO)。CXVO 的粒径(41.77 ± 0.19) nm, 电导率为(53.64 ± 0.32) us/cm, pH = 6.42。

1.2.5 实验分组与给药

大鼠适应性饲养 1 周后随机分为空白组 (Control group)、模型组 (Model group)、CXVO 组 (CXVO group) 和硝酸甘油组 (NG group)。实验开始前,实验组按照 10 mg/kg 的剂量腹腔注射 ISO 造模,空白组腹腔注射等量生理盐水,每天 1 次,共 2 d。随后,硝酸甘油组用 8 mg/kg 的 NG 处理, CXVO 剂根据前期实验结果设置低、中和高 (Low, Medium and High) 组,给药剂量分别为 74、149、297 mg/kg (CXVO 给药剂量换算生药量分别为 4.4、8.8、17.5 mg/kg) 3 个剂量进行实验,给药时将 CXVO 稀释至对应浓度后每只大鼠分别给予喷雾剂 5 喷,约每喷 126 mg,空白组给等量蒸馏水。硝酸甘油、CXVO 以及蒸馏水均通过鼻腔吸嗅给药,实验持续 2 周。

1.2.6 血流动力学检测

给药第 2、7、14 天后,进行超声心电图检测,记录 1、5、15、30 min 的 EF、FS、LVIDs、SV、心率 (heart rate, HR) 和左室舒张末内径 (left ventricular end diastolic diameter, LVIDd) 等数据^[5],系统评价各组实验大鼠的心脏结构及左心室功能。

1.2.7 组织病理学检查

血流动力学检测后,立即腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,摘取心脏,将心脏处理后用全自动染色封片机蜡至水后进行苏木精-伊红 (HE) 染色并观察心肌细胞形态变化和损伤程度。

1.2.8 酶联免疫吸附分析

大鼠腹主动脉采血,在 4 ℃ 下 3000 r/min 离心 15 min 后取上清液得血清。按照相应 ELISA 试剂盒的说明书进行实验,在 450 nm 波长下使用酶标仪测定吸光度 (absorbance, OD) 值,并以标准品浓度和 OD 值绘制标准曲线,计算各血清样品中 CK、LDH 与 AST 的含量。

1.2.9 Western Blot 分析

取冷冻心肌组织混合 10 倍组织体积的组织蛋白提取液匀浆,后低温离心,取上清,即为总蛋白溶液;经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转移至经甲醇活化的 PVDF 膜;分别加入 ADRA1A、CHRM3 和 CHRM5 蛋白的一抗 4 ℃ 过夜, TBST 洗 3 次,每次 5 min,加二抗孵育 30 min, TBST 在室温下摇床上洗 4 次,每次 5 min;滴加 ECL 混合溶液,于暗室下进行化学发光检测;使用 Image J 1.53 软件检测各待测蛋白的表达情况,用 β -actin 作内标物。

1.3 统计学分析

利用 IBM SPSS 21.0 统计软件对各组实验数据进行分析处理,超声心动图的各指标采用一般线性的重复度量进行统计分析,血清生化指标等采用比较均值单因素统计分析,当 $P < 0.05$ 时,认为具有统计学意义,数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有统计分析均使用 GraphPad Prism 8.0 进行。

2 结果

2.1 川芎挥发油成分的筛选

经过 GC-MS 分析鉴定,最终得到 10 个匹配度超过 90% 且相对峰面积较大的挥发油成分,如图 1 和表 1 所示。利用 SwissADME 网站对这 10 种挥发油成分进行虚拟分析,预测 OB,如表 1 所示。

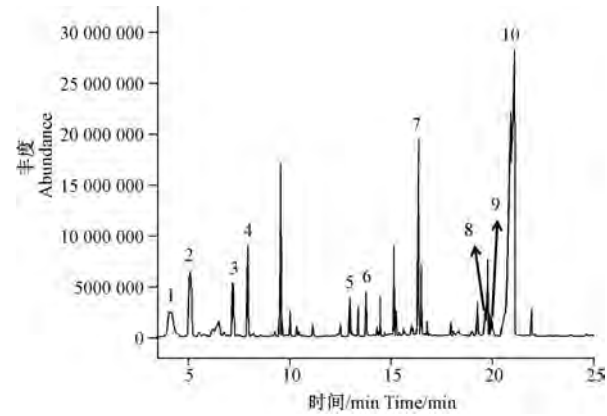


图 1 川芎挥发油成分的 GC-MS 图谱

Figure 1 GC-MS spectrum of the components of Rhizome Chuanxing volatile oil

2.2 川芎挥发油治疗心绞痛的潜在靶点

通过 SwissTargetPrediction 网站共收集到挥发油成分靶点 396 个,在 DrugBank 数据库和 DisGeNET 数据库中收集到心绞痛相关靶点 401 个。使用 R 语言得到川芎挥发油治疗心绞痛的 22 个潜在靶点,如图 2。

2.3 潜在靶点的 PPI 网络

在 PPI 网络中共有 22 个节点和 101 条边,见图 3A。使用 NetworkAnalyzer 计算发现靶点 CYP3A4、CYP1A2、ADRA2A、CYP1A1、AHR、ADRA1D 和 VEGFA 等靶点的相互作用最强, Degree 值均超过中位数 9。对 PPI 网络进行聚类分析得到了两个子网络,代表了蛋白质之间的功能相关性,见图 3B。同时,根据聚类分析发现靶点 CYP1A1 和 CHRM2 是两个子网络中的种子节点。以上提示这些靶点可能对心绞痛的治疗至关重要。

表 1 川芎挥发油的活性成分

Table 1 Active components of Rhizoma Chuanxiong volatile oil

编号 NO.	Mol 编号 Mol ID	面积百分比/% Area percent/%	化合物 Compound	物质数字识别号码 CAS	匹配度 Qual	口服利用度/% OB/%
1	MOL000125	2.3312	α-蒎烯 Alpha-pinene	80-56-8	91	46.25
2	MOL001296	6.0435	桉烯 Sabinene	3387-41-5	91	45.15
3	MOL000202	2.6566	γ-松油烯 Gamma-terpinene	99-85-4	94	33.02
4	MOL000264	3.8424	萜品油烯 Terpinolene	586-62-9	96	29.62
5	MOL001752	1.0238	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-methoxy-4-vinylphenol	7786-61-0	90	38.39
6	MOL002107	1.1042	苯戊酮 Valerophenone	1009-14-9	91	42.58
7	MOL002112	5.9641	α-芹子烯 Alpha-selinene	473-13-2	99	31.81
8	MOL002111	1.3064	3-正丁烯基苯酞 3-butylidenephthalide	551-08-6	98	42.44
9	MOL002184	1.0350	6-丁基-1,4-环庚二烯 6-butyl-1,4-cycloheptadiene	22735-58-6	90	31.69
10	MOL002201	22.2508	反式川芎内酯 Trans-ligustilide	1000365-98-8	96	51.30

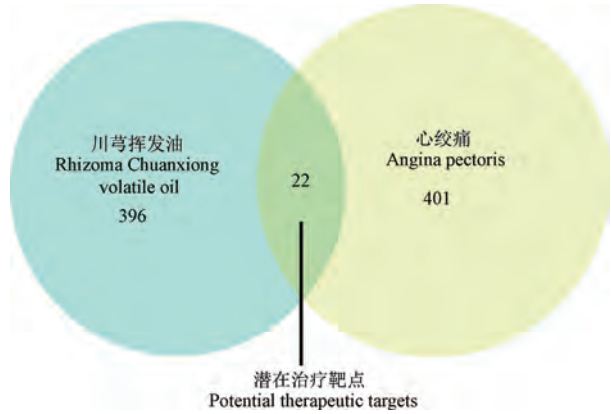


图 2 川芎挥发油治疗心绞痛的关键靶点

Figure 2 Key target of Rhizome Chuanxiong volatile oil in the treatment of angina pectoris

2.4 潜在靶点的 GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集分析共得到 491 个结果($P < 0.05$),包括 413 个生物过程(biological process, BP)、21 个细胞成分(cellular component, CC)和 57 个分子功能(molecular function, MF),见图 4。GO 分析结果表明,CXVO 可广泛作用于突触膜、突触膜复合体和肌膜等的受体,与神经递质和酶相互作用,从而参与代谢、信号传导、调节 G 蛋白偶联受体信号通路等生物过程,发挥抗心绞痛的作用。

KEGG 分析共得到 21 条通路信息($P < 0.05$)。结果表明神经活性配体-受体相互作用、视黄醇代

谢、化学致癌-DNA 加合物、药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 对异生素的代谢等通路的显著性最大,见图 4。这些途径具有调节代谢、神经递质、酶活性等作用。

2.5 构建川芎-挥发油成分-靶点-通路网络关系图

将挥发油成分、关键靶点、通路结果导入 Cytoscape 3.9.0 软件中,构建川芎-挥发油成分-靶点-通路网络,从整体层面揭示川芎挥发油抗心绞痛的作用是多成分、多靶点、多通路共同作用的结果,见图 5。图中随着节点颜色的加深,节点的 Degree 值越大,说明该节点在网络结构中越重要。

2.6 川芎挥发油成分与潜在靶点的对接

通过 AutoDock vina 1.2.3 计算的 22 个潜在靶点和 10 个挥发油成分之间的自由结合能均 < -3 Kcal/mol,结果见图 6A,表明这些蛋白与挥发油成分能较好的自由结合。其中 Alpha-selinene 和 CHRM5、CYP2A6、Trans-ligustilide 和 CYP1A1 的结合能 < -9.0 Kcal/mol,推测它们的结合构象可能是最稳定的。成分 3-butylidenephthalide、Alpha-selinene、Trans-ligustilide 和多个蛋白的自由结合能 < -8.0 Kcal/mol,推测这 3 个挥发油成分可能在治疗心绞痛的过程中发挥主要作用。选取部分结合能 < -8.5 Kcal/mol 的结果进一步研究。使用 Pymol 3.0 对结合构象进行 3D 可视化,Discovery Studio 2016 被用于分析结合构象的受体-配体的相

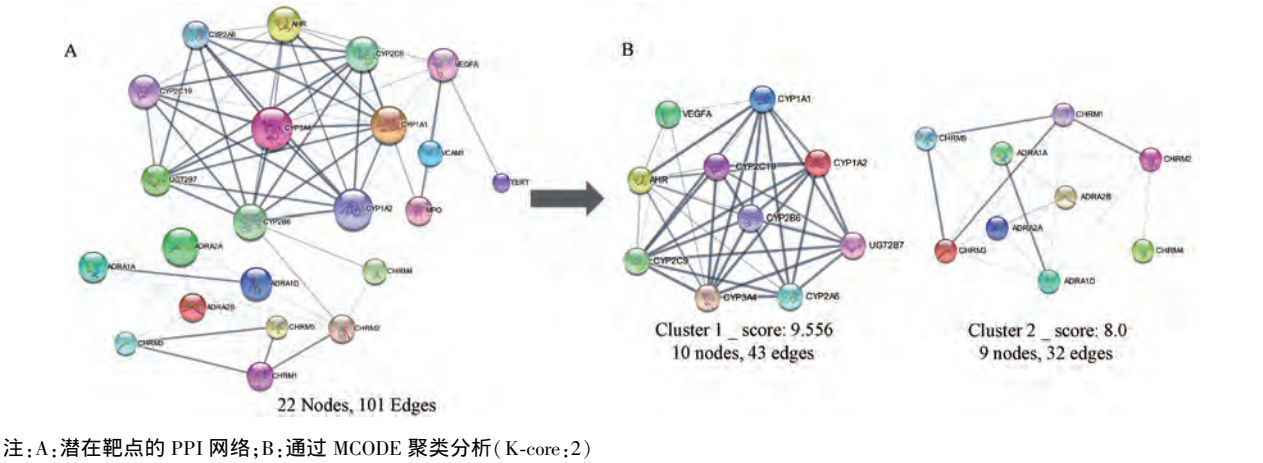


图 3 蛋白-蛋白相互作用网络分析

Note. A. PPI network of potential targets. B. MCODE clustering analysis (K-core: 2).

Figure 3 Protein-protein interaction network analysis

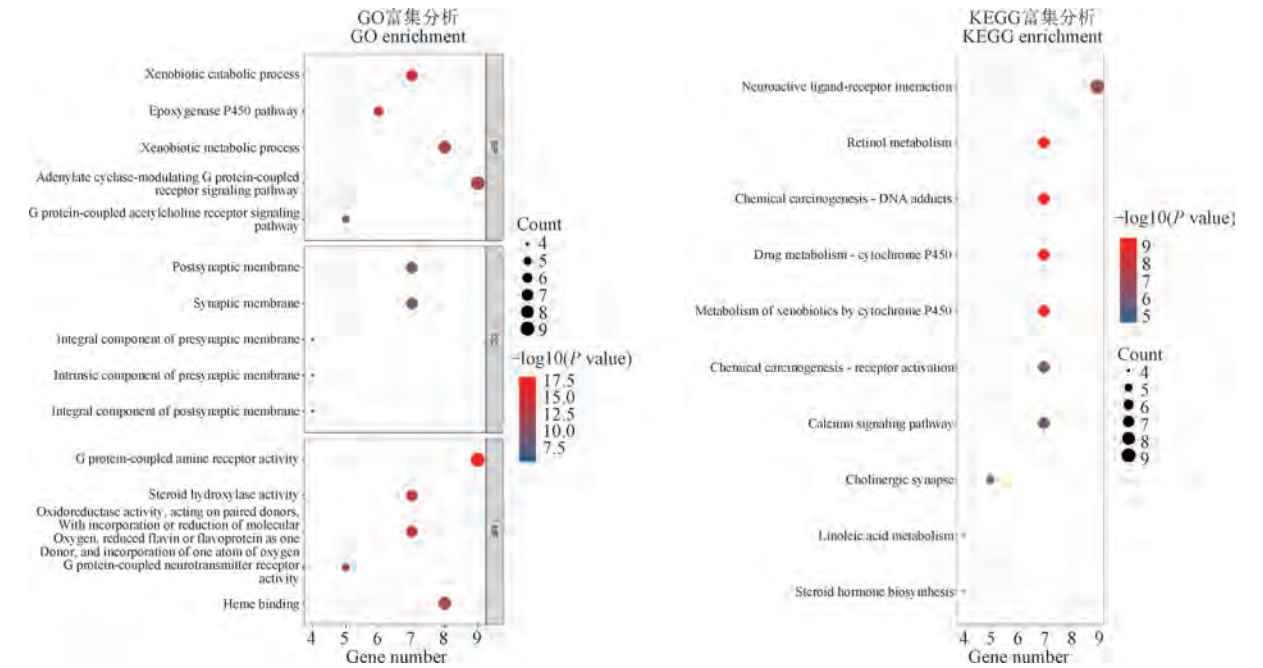


图 4 GO 和 KEGG 富集分析结果

Figure 4 GO and KEGG enrichment analysis results

相互作用并展示 2D 结果,见图 6B。由图可知大部分挥发油成分与蛋白主要是通过范德华力、疏水作用相互作用相结合,除此之外还存在氢键、 π - π 堆积等相互作用。

2.7 川芎挥发油可有效改善心脏的血流动力学指数

分析给药第 2、7、14 天超声心动图各指标的变化(见图 7)。与空白组相比,模型组的 EF 与 FS 明显增高($P < 0.01$),LVIDs 明显降低($P < 0.01$)。与模型组相比,第 7 天与第 14 天各给药组的 EF 与 FS 均显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),且随着给药

时间的增加,EF 与 FS 整体呈下降趋势。第 7 天 CXVO 高剂量组的 LVIDs 增加明显($P < 0.01$),第 14 天 CXVO 低剂量组的 LVIDs 明显增高($P < 0.05$);第 14 天 149 mg/kg 组的 SV 明显降低($P < 0.05$)。上述结果表明,川芎挥发油可有效改善血流动力学相关指数。

2.8 川芎挥发油可有效保护心肌组织

对心肌组织切片 HE 染色后,观察其病理学变化,见图 8。空白组心肌纤维排列整齐,呈椭圆形或短圆柱状,细胞质丰富、染色稍疏松、无炎性细胞浸润。相较于空白组,模型组心肌组织形态明显改

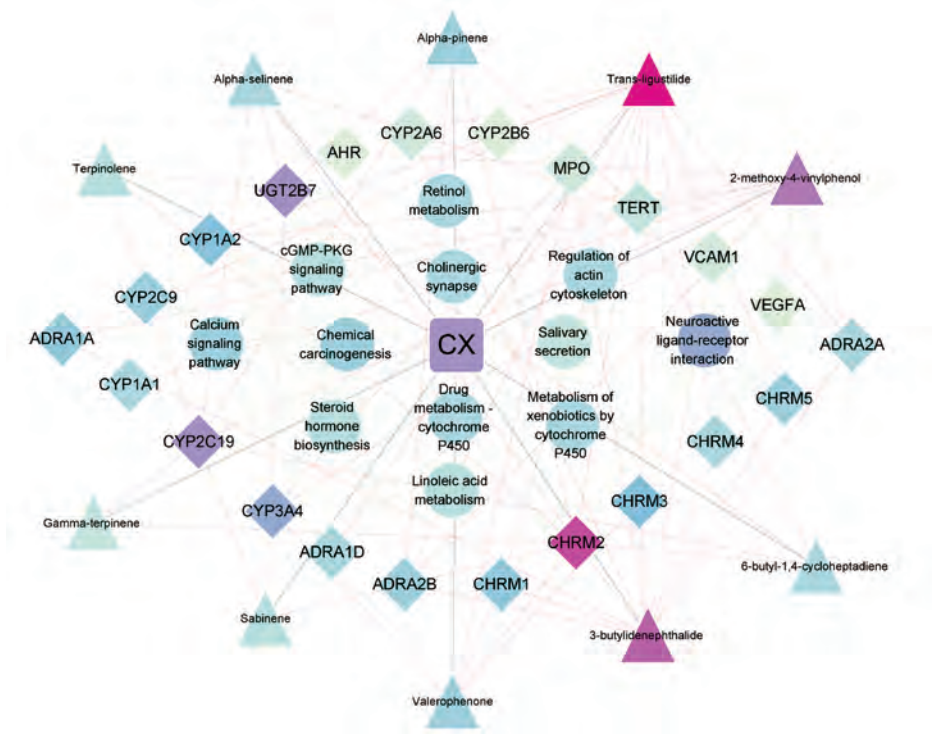
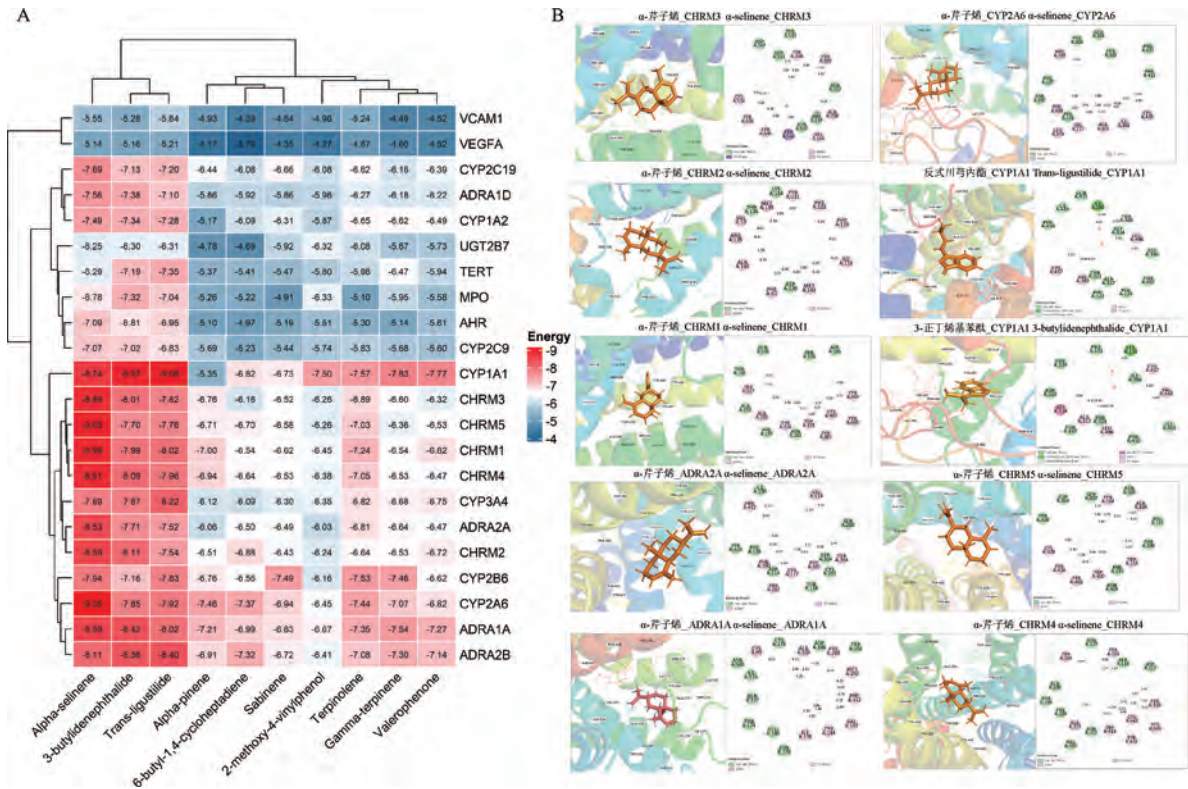


图 5 川芎-挥发油成分-靶点-通路网络图
Figure 5 Network diagram of Rhizoma Chuanxiong-component-target-path

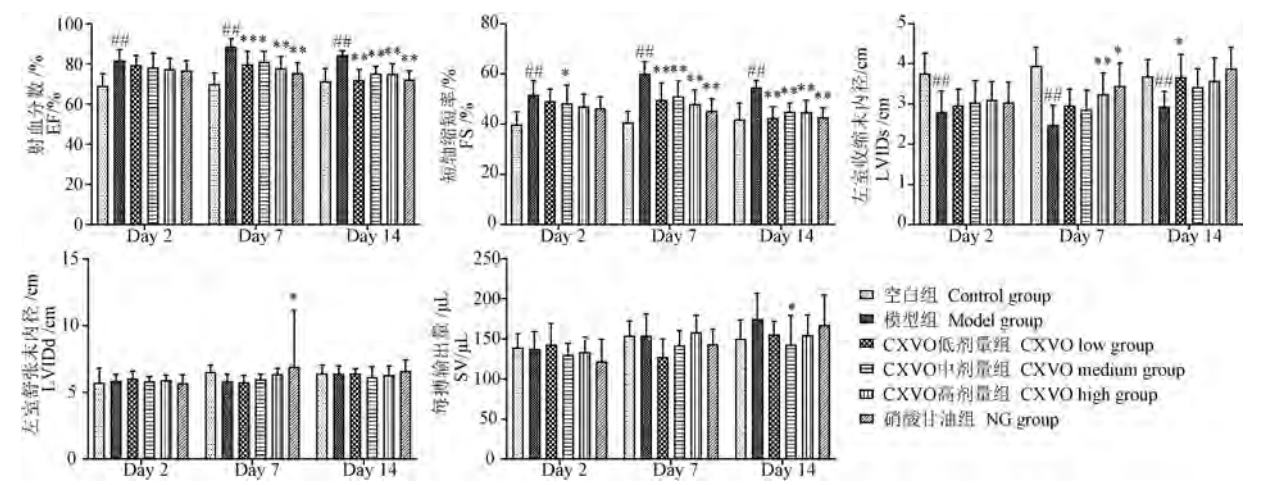


注：A：结合能热图；B：部分对接结果图。

图 6 分子对接结果

Note. A. Heatmap of binding energies. B. Partial docking results.

Figure 6 Results of molecular docking



注:与空白组相比,## $P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 7 川芎挥发油对大鼠心脏的 EF、FS、LVIDs、LVIDd 与 SV 的影响

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

Figure 7 Effect of Rhizoma Chuanxiong volatile oil on EF, FS, LVIDs, LVIDd and SV in rat heart

变,存在明显的心肌纤维肿胀、核染不均、排列紊乱、横纹模糊甚至断裂消失、间隙明显增宽,同时伴有一定程度的炎症。而硝酸甘油气雾剂和川芎挥发油微乳喷雾剂较明显逆转了心肌受损,且随着川芎挥发油浓度逐渐上升,心肌纤维状态改善逐渐显著,间隙减小,少有水腫,核染较为均匀,炎性细胞浸润减少。

2.9 川芎挥发油可显著降低心肌三酶活性

与空白组比较,模型组大鼠血清中 LDH、CK 和 AST 的活性均显著增强 ($P < 0.01$)。与模型组比较,硝酸甘油组和 CXVO 组的 LDH、CK 和 AST 的水

平显著性降低 ($P < 0.01$)。相较于硝酸甘油组,川芎挥发油组的 LDH、CK、AST 无显著性差异,其中 CXVO 低剂量和 CXVO 高剂量组的 LDH 活性要低于硝酸甘油组。结果见图 9。

2.10 川芎挥发油可显著促进 ADRA1A、CHRM3 靶蛋白的表达

结果见图 10,与空白组比较,模型组 CHRM3 蛋白与 ADRA1A 蛋白的表达显著下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),CHRM5 蛋白的表达虽有下降,但不具有显著性差异。与模型组比较,给药组 ADRA1A 蛋白的表达明显上升 ($P < 0.05$),CXVO 低剂量组的

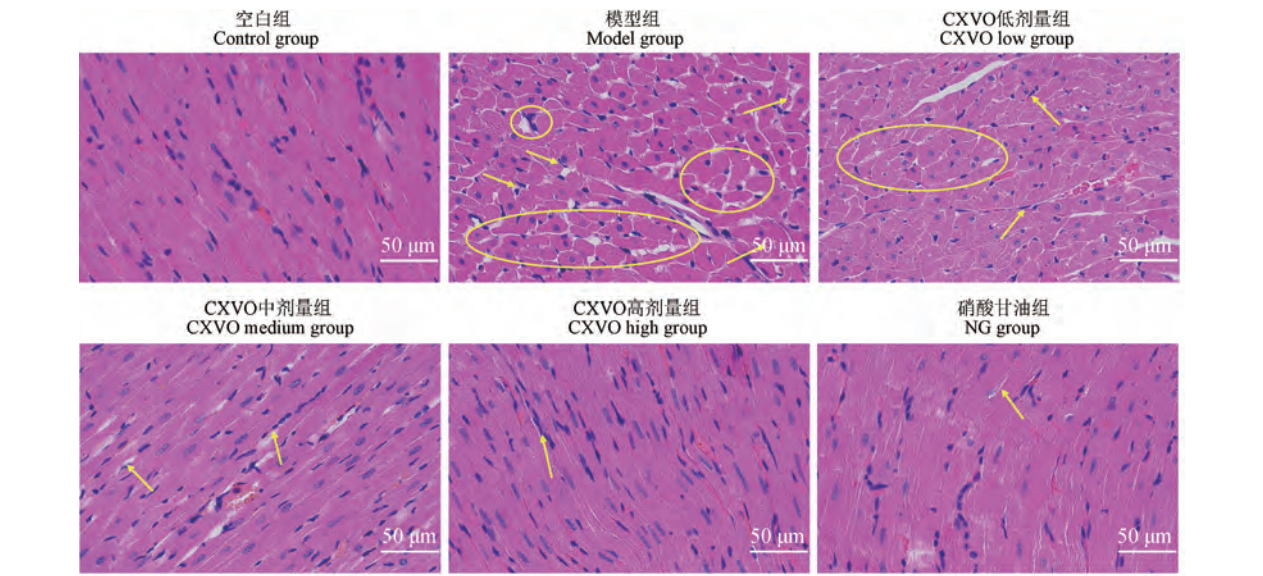


图 8 川芎挥发油对心肌组织的影响

Figure 8 Effect of Rhizoma Chuanxiong volatile oil on myocardial tissue

CHRM3 蛋白的表达中上升最为明显($P < 0.05$),其余组 CHRM3 蛋白的表达虽有上调但无统计学意义;对于 CHRM5 蛋白的表达,硝酸甘油组蛋白的表

达明显上升,且与模型组比较,具有统计学意义($P < 0.05$),但 CXVO 低剂量组和 CXVO 高剂量组的结果呈现不升反降的结果还有待下一步研究。

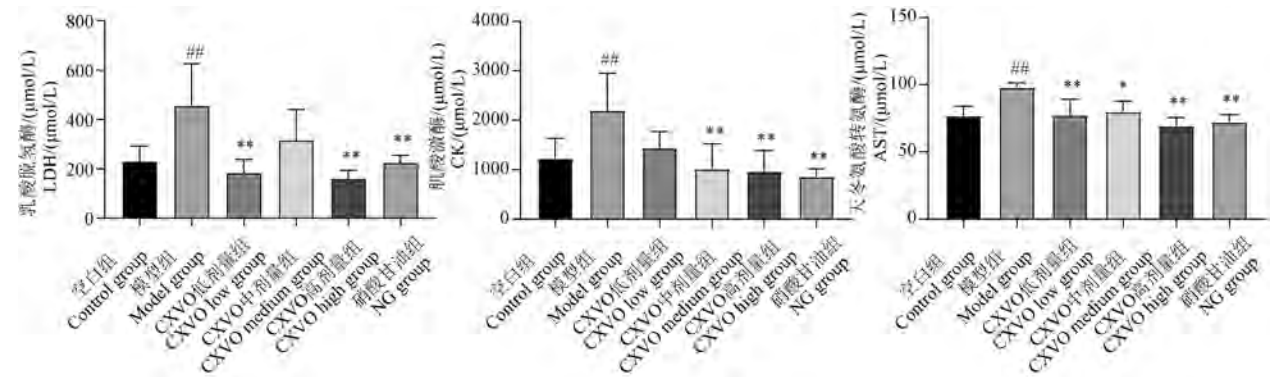


图 9 川芎挥发油对心肌三酶 LDH、CK 和 AST 活性的影响($n = 8$)

Figure 9 Effect of Rhizoma Chuanxiong volatile oil on myocardial three enzymes LDH, CK and AST($n = 8$)

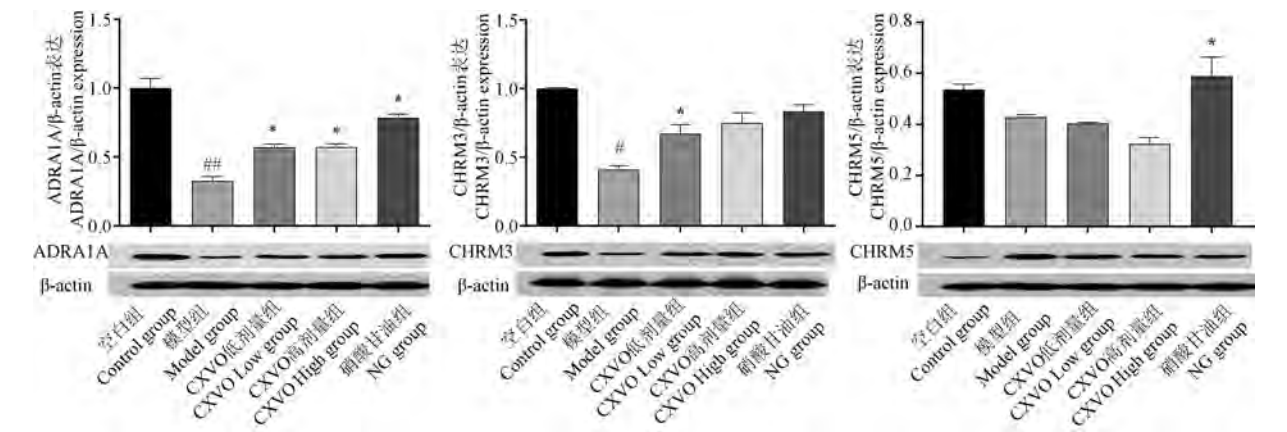


图 10 ADRA1A、CHRM3 和 CHRM5 的 Western Blot 分析($n = 8$)

Figure 10 Western Blot analysis of CHRM3, CHRM5 and ADRA1A expression($n = 8$)

3 讨论

心绞痛的诱因众多,分为多个类型,具有多种病理机制,难以有效防治。中药川芎常被用以治疗心脑血管疾病,具有活血祛瘀、行气开郁、祛风止痛的作用。川芎挥发油作为川芎的重要物质基础,含有多重活性成分,涉及多个靶点,具有广阔的应用前景,但作用机制不明确成为川芎挥发油广泛应用的障碍。本研究应用网络药理学和动物实验,从成分、靶点、通路多个层面探索川芎挥发油治疗心绞痛的作用机制。

通过网络药理学分析,发现川芎挥发油发挥治疗心绞痛作用的成分主要涉及反式川芎内酯、3-正丁烯基苯酚、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚等,这些活性成分具有抗炎、抗氧化损伤、舒张血管、抗心绞痛等作

用^[19-20]。Trans-ligustilide 被认为是川芎挥发油主要活性成分之一,可以通过减轻细胞损伤和内皮功能障碍,抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移来达到抗动脉粥样硬化的效果^[21];可有效降低血压,抑制由自发性高血压引起的血管内膜增厚以及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)在体内和体外的迁移^[22];同时可通过抑制细胞外 Ca^{2+} 内流舒张血管^[23]。研究发现 3-正丁烯基苯酚具有逆转冠状动脉粥样硬化患者颈动脉内膜增生,延缓斑块进展和稳定斑块的作用^[24];并且与硝酸甘油有协同作用,能引起大鼠主动脉环血管舒张;还能通过抑制细胞周期进展和诱导细胞凋亡而发挥抗血管增生的作用^[25];也有研究表明 3-正丁烯基苯酚是川芎挥发油中舒张血管平滑肌最有效的活性成分之一,可能是通过 Ca^{2+} 途径或调节 NO 对血管的舒张

作用来发挥其舒张血管的功能^[26],也可直接诱导 VSMC 上的细胞凋亡或抑制 VSMC 中胶原蛋白的表达来抑制动脉血管狭窄,同时可以增强血管介质中 VSMC 收缩蛋白的表达来减少静脉中的新生内膜,有效抑制血栓形成^[19]。在动物实验结果中,以上观点被有效证实,本研究发现川芎挥发油可以有效降低 EF、FS、SV 以及增加 LVIDs,表明川芎挥发油能够调节过强的心肌收缩能力,扩大心室室腔,增加心室收缩容积,缓解心功能过分亢进,能减少输出血量,增加心肌细胞供血量,缓解心肌缺血症状;同时,HE 染色病理切片和心肌三酶活性检测显示,川芎挥发油可显著降低 LDH、CK 和 AST 的活性,修复心肌损伤,减轻心肌细胞凋亡,减少炎性细胞浸润,保证细胞膜及线粒体膜的完整性,对 ISO 诱导的心绞痛具有显著的改善作用。

分析发现,川芎挥发油的活性成分主要作用于 CHRM2、CYP1A2、CHRM3、ADRA1A、CHRM1 等靶点,随后经神经活性配体-受体相互作用、视黄醇代谢、化学致癌-DNA 加合物、药物代谢-细胞色素 P450 等信号通路发挥炎症调控、钾钙离子调节、新陈代谢、信号传导等功能,对心绞痛的治疗具有重要作用^[27-30]。CHRM5 属于 G 蛋白偶联受体家族,广泛分布在全身,主要在副交感神经系统中表达,可介导各种细胞反应、调节钾通道,依靠乙酰胆碱可发挥抑制和兴奋作用。CHRM2 主要存在于心脏窦房结中,可影响 HR 和心脏功能,敲除 CHRM2 基因可抑制由迷走神经诱发的心动过缓^[31]。CHRM1 的活化能够促进 Akt 的磷酸化,而阻断和干扰 CHRM1 的表达能够抑制 Akt 的磷酸化^[32],磷酸化激活后的 Akt 导致 eNOS 活化,生成内源性一氧化氮(NO),发挥抗缺氧心肌细胞凋亡的作用,在心肌缺血再灌注损伤中发挥重要保护作用,且上调 p-Akt (Ser473)的表达水平,能明显提高缺氧时心肌细胞活力^[33]。CHRM5 广泛存在于血管内皮细胞中,是介导舒张血管作用的主要胆碱能受体,可以控制多巴胺的释放^[34],可兴奋心脏 β_1 受体,使心肌收缩力增强,心输出量增加,但对心率影响较小;当乙酰胆碱减少时,其介导的非神经性乙酰胆碱受体系统 (NNMRs) 功能下调,动脉壁 CHRM5 表达减少,使得 G-蛋白偶联乙酰胆碱受体信号传导途径受阻,影响一氧化氮合酶(NOS)活性和血清胆固醇的代谢,导致 NO 水平下降,削弱对炎性细胞和脂质浸润的抑制作用,引起动脉粥样硬化形成;而血清胆固醇可

加重内皮功能损伤,导致血小板源性生长因子、趋化因子等物质释放,促进 VSMC 细胞的迁移和增殖,进一步加重动脉粥样硬化形成^[22],从而形成恶性循环,并最终导致血管内弹力层破坏、VSMC 细胞大量减少^[35],最终血管失去弹性,在心肌供血不足的时候,引起心绞痛。CHRM3 主要分布在中枢和外周神经系统、心肌、平滑肌和外分泌腺中,可以调节 HR,平滑肌收缩和腺体分泌,激活 CHRM3 可以抑制心脏成纤维细胞增殖和胶原蛋白分泌保护心肌^[36]。ADRA1A 通过结合内源性肾上腺素、儿茶酚胺和去甲肾上腺素在交感神经系统中发挥重要作用,激活 ADRA1A 可有效预防和逆转心力衰竭^[37-38],ADRA1A 表达增加可以降低收缩压和动脉舒张压,同时抑制心室纤维化和心肌细胞凋亡^[37]。经动物实验发现,川芎挥发油对心肌细胞中 ADRA1A、CHRM5 蛋白的表达有促进作用,说明川芎挥发油可有效促进相关蛋白的表达来治疗心绞痛。

4 结论

本研究结合网络药理学与实验验证,探讨了川芎挥发油治疗心绞痛的机制,动物实验指出川芎挥发油可以调节 EF、FS、SV、LVIDs 指数以及 LDH、CK、AST 的活性,通过神经活性配体与受体的相互作用等通路促进 ADRA1A、CHRM5 蛋白的表达,进而保护心肌组织,发挥治疗心绞痛的作用。

参 考 文 献(References)

- [1] 曹洁, 高林. 血清可溶性凋亡相关因子及其配体对不同冠脉病变程度心绞痛患者心功能的评价 [J]. 中国临床研究, 2022, 35(3): 351-354, 376.
CAO J, GAO L. Serum soluble factor associated suicide and its ligand in evaluating cardiac function in patients with different degrees of coronary artery lesions of angina pectoris [J]. Chin J Clin Res, 2022, 35(3): 351-354, 376.
- [2] 吴宗贵, 马丽红, 段文慧, 等. 活心丸(浓缩丸)治疗冠心病慢性稳定性心绞痛(气虚血瘀证)多中心随机双盲临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(6): 672-679.
WU Z G, MA L H, DUAN W H, et al. Huoxin pills (concentrated pills) in treatment of chronic stable angina pectoris of coronary heart disease patients with qi deficiency and blood stasis syndrome: a multicenter double-blind randomized controlled trial [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(6): 672-679.
- [3] WU B, WANG G, XIN L, et al. Network pharmacology-based therapeutic mechanism of Kuanxiong aerosol for angina pectoris [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 261: 113079.
- [4] LIU Y, LI Z, SHEN D, et al. Adjuvant treatment of coronary

- heart disease angina pectoris with Chinese patent medicine: a prospective clinical cohort study [J]. *Medicine*, 2019, 98(33): e16884.
- [5] KODESH A, LEV E, LESHEM-LEV D, et al. Impact of calcium channel blockers on aspirin reactivity in patients with coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2022, 36(3): 467–473.
- [6] 李海刚, 胡晒平, 周意, 等. 川芎主要药理活性成分药理研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(11): 1302–1308.
- LI H G, HU S P, ZHOU Y, et al. Pharmacology progress on the main bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* hort [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2018, 23(11): 1302–1308.
- [7] 张晓娟, 张燕丽, 左冬冬. 川芎的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2020, 37(6): 128–133.
- ZHANG X J, ZHANG Y L, ZUO D D. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ligusticum chuanxiong* hort [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2020, 37(6): 128–133.
- [8] 杜旌畅, 谢晓芳, 熊亮, 等. 川芎挥发油的化学成分与药理活性研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(23): 4328–4333.
- DU J C, XIE X F, XIONG L, et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological activities of essential oil of *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2016, 41(23): 4328–4333.
- [9] CHEN H, BOUTROS P C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable venn and euler diagrams in R [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 35.
- [10] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, et al. Cytoscape automation: empowering workflow-based network analysis [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [11] WU T, HU E, XU S, et al. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. *Innovation*, 2021, 2(3): 100141.
- [12] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(8): 3891–3898.
- [13] YUAN S, STEPHEN CHAN H C, HU Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design [J]. *Wiley Interd Rev Comput Mol Sci*, 2017, 7(2): e1298.
- [14] PAWAR S S, ROHANE S H. Review on discovery studio: an important tool for molecular docking [J]. *Asian J Res Chem*, 2021, 14(1): 86–88.
- [15] HU K. Become competent in generating rna-seq heat maps in one day for novices without prior r experience [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2239: 269–303.
- [16] 张丽娟. 川芎挥发油软胶囊中试放大及药理毒理研究 [D]. 上海: 第二军医大学; 2014.
- ZHANG L J. Pilot scale-up and pharmacological and toxicological study of *Ligusticum chuanxiong* volatile oil soft capsule [D]. Shanghai: Second Military Medical University; 2014.
- [17] SHAH B, KHUNT D, MISRA M, et al. Formulation and *In-vivo* pharmacokinetic consideration of intranasal microemulsion and mucoadhesive microemulsion of rivastigmine for brain targeting [J]. *Pharm Res*, 2018, 35(1): 8.
- [18] 杨林, 贾梅, 甄英丽. 鼻腔给药系统研究进展 [J]. *西北国防医学杂志*, 2016, 37(10): 671–673.
- YANG L, JIA M, ZHEN Y L. Research progress of nasal drug delivery system [J]. *Med J Natl Defending Forces Northwest Chin*, 2016, 37(10): 671–673.
- [19] YANG H H, XU Y X, CHEN J Y, et al. N-butylidenephthalide inhibits the phenotypic switch of VSMCs through activation of AMPK and prevents stenosis in an arteriovenous fistula rat model [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7403.
- [20] 高娟, 苏刚, 刘骥飞, 等. 藁本内酯对缺血性脑卒中的神经保护作用研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2021, 40(9): 609–613.
- GAO J, SU G, LIU J F, et al. Advances in neuroprotective effects of ligustilide on ischemic stroke [J]. *Chin J N Drugs Clin Remedies*, 2021, 40(9): 609–613.
- [21] LU Q, QIU T Q, YANG H. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1/2/3): 136–140.
- [22] LUO Z, DENG H, FANG Z, et al. Ligustilide inhibited rat vascular smooth muscle cells migration via c-myc/MMP2 and ROCK/JNK signaling pathway [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(12): 3573–3583.
- [23] CAO Y X, ZHANG W, HE J Y, et al. Ligustilide induces vasodilatation via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release [J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 45(3): 171–176.
- [24] 王坤, 方庆娟, 武星, 等. 丁苯酞软胶囊对缺血性脑血管病患者颈动脉硬化抗炎症作用及斑块稳定性的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(7): 946–949.
- WANG K, FANG Q J, WU X, et al. Effect of butylphthalide soft capsule on the anti-inflammatory effect and plaque stability in patients with ischemic cerebrovascular disease and carotid atherosclerosis [J]. *J Hainan Med Univ*, 2017, 23(7): 946–949.
- [25] YE H J C, CINDROVA-DAVIES T, BELLERI M, et al. The natural compound n-butylidenephthalide derived from the volatile oil of *Radix Angelica sinensis* inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(2): 187–197.
- [26] CHAN S S, CHOI A O, JONES R L, et al. Mechanisms underlying the vasorelaxing effects of butylidenephthalide, an active constituent of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 537(1/2/3): 111–117.
- [27] SHARMA I, BEHL T, BUNGAU S, et al. Understanding the role of inflammasome in angina pectoris [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2020, 10: 2174.
- [28] BU W, ZHANG Z, OCANSEY D K W, et al. Research on natural products from traditional Chinese medicine in the

treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Transl Res, 2022, 14(3): 1952-1968.

[29] FORD T J, MIKHAIL P. Acetylcholine (Re) challenge: from diagnosis to targeted therapy [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2022, 15(1): 76-79.

[30] XU C M, KARBASIAFSHAR C, BRAGA K M S, et al. Differences in cellular metabolism and metabolic regulation between non-diabetic and diabetic human coronary artery endothelial cells [J]. FASEB J, 2022, 36(1): 1-5.

[31] MIYAUCHI M, KISHIDA I, SUDA A, et al. Association of the cholinergic muscarinic M2 receptor with autonomic nervous system activity in patients with schizophrenia on high-dose antipsychotics [J]. Neuropsychobiology, 2016, 74(1): 60-67.

[32] 张亮. 胆碱能受体 M1 活化促肝癌侵袭转移的作用及其机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学; 2017.

ZHANG L. Effect of cholinergic receptor M1 activation on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma and its mechanism [D]. Chongqing: Third Military Medical University; 2017.

[33] 楚冬海, 张振秋. 瓜蒌皮提取物基于 PI3K/Akt/NO 信号通路保护缺氧/复氧损伤心肌细胞的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 42-48.

CHU D H, ZHANG Z Q. Mechanism of trichosanthis pericarpium aqueous extract in protecting H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury via PI3K/Akt/NO signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(22): 42-48.

[34] ANNEY R J L, LOTFI-MIRI M, OLSSON C A, et al. Variation in the gene coding for the M5 muscarinic receptor (CHRM5) influences cigarette dose but is not associated with dependence to drugs of addiction: evidence from a prospective population based cohort study of young adults [J]. BMC Genet, 2007, 8: 46.

[35] 龙定超. CHRM5 在颅内动脉瘤中的表达及意义 [D]. 泸州: 泸州医学院; 2012.

LONG D C. Expression and significance of CHRM5 in intracranial aneurysms [D]. Luzhou: Luzhou Medical College; 2012.

[36] 肖云萍, 解宇浩, 张嘉琪, 等. 基于钙激活氯离子通道检测胞质内第二信使 Ca^{2+} [J]. 解剖学报, 2021, 52(2): 311-316.

XIAO Y P, XIE Y H, ZHANG J Q, et al. Establishment of calcium-activated chloride channel-based second messenger Ca^{2+} detection method [J]. Acta Anat Sin, 2021, 52(2): 311-316.

[37] HE L, HUANG C. MiR-19b and miR-16 cooperatively signaling target the regulator ADRA1A in Hypertensive heart disease [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91: 1178-1183.

[38] ZHANG J, SIMPSON P C, JENSEN B C. Cardiac $\alpha 1A$ -adrenergic receptors: emerging protective roles in cardiovascular diseases [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2021, 320(2): H725-H733.

[收稿日期] 2024-01-02

陈美安, 黄凤, 梁晓庆, 等. 兰香草对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠的防治作用及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32 (7): 879–888.

CHEN M A, HUANG F, LIANG X Q, et al. Preventive and therapeutic effects and mechanisms of *Caryopteris incana* in a rat model of primary dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 879–888.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.007

兰香草对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠 的防治作用及机制研究

陈美安*, 黄凤, 梁晓庆, 蓝小琪, 崔祥祥, 曾雪琪

(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

【摘要】 目的 探讨兰香草水煎液对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠的防治效果及其作用机制。方法 随机将 60 只健康 SPF 级 SD 雌性大鼠分为正常组、模型组、布洛芬组、兰香草高剂量组、兰香草中剂量组、兰香草低剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组采用寒冷刺激联合苯甲酸雌二醇以及缩宫素建立寒凝血瘀证原发性痛经大鼠模型。于造模第 5 天开始灌胃给药, 连续给药 10 d。观察记录大鼠症状表现, 测定大鼠扭体反应情况、血液流变学指标, 测定大鼠血清中血浆血栓素 B_2 (thromboxane B_2 , TXB_2)、6-酮前列环素 $F_{1\alpha}$ (6-Ketoprostacyclin $F_{1\alpha}$, 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$)、雌二醇 (estradiol, E_2) 和孕酮 (progesterone, PROG) 水平, 测定大鼠子宫组织中前列腺素 $F_{2\alpha}$ (prostaglandin $F_{2\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$)、前列腺素 E_2 (prostaglandin E_2 , PGE $_2$)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和钙离子 (calcium, Ca^{2+}) 水平, 以及计算子宫、卵巢脏器指数并观察其组织病理形态变化。结果 与正常组比较, 模型组大鼠出现明显寒凝血瘀证症状及扭体反应, 子宫、卵巢组织形态出现明显增生、炎症、水肿等病变, 血浆粘度、红细胞压积和全血粘度均明显升高 ($P < 0.01$), 血清中 TXB_2 、 E_2 水平和 E_2 /PROG 比值明显升高 ($P < 0.01$) 以及 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 和 PROG 水平明显降低 ($P < 0.01$), 子宫指数和卵巢指数均明显增高 ($P < 0.01$), 子宫组织中 PGF $_{2\alpha}$ 、 Ca^{2+} 水平和 PGF $_{2\alpha}$ /PGE $_2$ 比值明显升高 ($P < 0.01$) 以及 PGE $_2$ 、NO 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 兰香草水煎液可明显改善模型大鼠的症状表现和子宫、卵巢组织形态病变, 显著延长扭体反应潜伏时间和降低扭体次数 ($P < 0.01$), 显著降低血浆粘度、红细胞压积和全血粘度 ($P < 0.01$), 降低血清中 TXB_2 、 E_2 水平及 E_2 /PROG 比值和升高血清中 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 、PROG 水平, 降低子宫指数和卵巢指数 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 降低子宫组织中 PGF $_{2\alpha}$ 、 Ca^{2+} 水平及 PGF $_{2\alpha}$ /PGE $_2$ 比值 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) 和升高子宫组织中 PGE $_2$ 、NO 水平 ($P < 0.01$)。结论 兰香草水煎液可有效改善寒凝血瘀证原发性痛经大鼠的临床症状, 具有良好的防治效果, 其作用机制可能与大鼠血清中 TXB_2 、6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 、 E_2 、PROG 水平和子宫组织中 PGF $_{2\alpha}$ 、PGE $_2$ 、NO、 Ca^{2+} 水平有关。

【关键词】 兰香草; 寒凝血瘀证; 原发性痛经; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0879-10

Preventive and therapeutic effects and mechanisms of *Caryopteris incana* in a rat model of primary dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis syndrome

CHEN Meian*, HUANG Feng, LIANG Xiaoqing, LAN Xiaoqi, CUI Xiangxiang, ZENG Xueqi

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Corresponding author: CHEN Meian. E-mail: meianchen.2008985@163.com

[基金项目] 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (2022KY0296), 广西中医药大学自然科学基金项目 (2020MS004)。

Funded by the Project of Enhancing Young and Middle-Aged Teacher's Research Basis Ability in Colleges and Universities in Guangxi (2022KY0296), Natural Science Research Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2020MS004)。

[作者简介] 陈美安, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药、民族药药效物质基础与质量标准化研究。Email: meianchen.2008985@163.com

[Abstract] Objective To explore the preventive and therapeutic effects of *Caryopteris incana* decoction in a rat model of primary dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis syndrome. **Methods** Sixty healthy specific pathogen-free SD female rats were randomly divided into six groups of ten rats each: normal group, model group, ibuprofen group, *C. incana* high-dose group, *C. incana* medium-dose group, and *C. incana* low-dose group. All groups except the normal group were treated with cold stimulation combined with estradiol benzoate and oxytocin to establish a rat model of primary dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis syndrome. On the fifth day of modeling, the rats were intragastrically administered the study drugs for 10 days. Their symptoms were observed and recorded. The writhing response and hemorheological indices were measured. The serum levels of TXB₂, 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-Keto-PGF_{1α}), estradiol (E₂), and progesterone (PROG) were measured. Additionally, the levels of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandin E₂ (PGE₂), nitric oxide (NO), and calcium (Ca²⁺) in the uterine tissues were measured. The organ indices of the uterus and ovary were calculated, and histopathological changes were observed. **Results** Compared with the normal group, the rats in the model group showed obvious symptoms of cold coagulation and blood stasis syndrome and writhing reaction. The morphology of uterus and ovary showed obvious hyperplasia, inflammation, edema and other lesions. The plasma viscosity, packed cell volume and whole blood viscosity were significantly increased ($P < 0.01$). The serum levels of thromboxane B₂ and E₂ and the E₂/PROG ratio were significantly increased ($P < 0.01$), the levels of 6-Keto-PGF_{1α} and PROG were significantly decreased ($P < 0.01$). The uterine index and ovarian index were significantly increased ($P < 0.01$). The levels of PGF_{2α} and Ca²⁺ and the PGF_{2α}/PGE₂ ratio in uterine tissue were significantly increased ($P < 0.01$), while the levels of PGE₂ and NO were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, *Caryopteris incana* significantly improved the symptoms of model rats, improved the morphological lesions of the uterus and ovary, prolonged the latency time of the writhing reaction, and reduced the number of writhing episodes ($P < 0.01$); significantly reduced the plasma viscosity, packed cell volume, and whole blood viscosity ($P < 0.01$); significantly reduced the serum levels of TXB₂ and E₂ and the E₂/PROG ratio, increased the serum levels of 6-Keto-PGF_{1α} and PROG, and reduced the uterine and ovarian indices ($P < 0.01$, $P < 0.05$); significantly reduced the levels of PGF_{2α} and Ca²⁺ and the PGF_{2α}/PGE₂ ratio in uterine tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$); and significantly increased the levels of PGE₂ and NO in the uterine tissue ($P < 0.01$). **Conclusions** *Caryopteris incana* decoction can effectively improve the clinical symptoms of primary dysmenorrhea in rats with cold coagulation and blood stasis syndrome, and it has a good control effect. Its mechanism may be correlated with the levels of TXB₂, 6-Keto-PGF_{1α}, E₂, and PROG in serum and PGF_{2α}, PGE₂, NO, and Ca²⁺ in uterine tissue.

[Keywords] *Caryopteris incana*; cold coagulation and blood stasis syndrome; primary dysmenorrhea; rat

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

原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)为妇科临床常见疾病,虽无生殖器官病理性改变,但其发病高、疼痛频繁,严重影响了女性的学习、工作和生活。中医理论认为,原发性痛经主要分为寒凝血瘀、气滞血瘀、肝肾亏损、阳虚内寒、气血虚弱、湿热瘀阻 6 种证型,其中尤以寒凝血瘀证痛经最为多见^[1-2]。寒凝血瘀证痛经与中医“寒”有关,温经散寒、化瘀止痛是中医药治疗寒凝血瘀证痛经的重要疗法,而许多民族药或民间草药在妇科疾病的治疗上亦颇具疗效,也引起了众多科研工作者的广泛关注。

兰香草,为马鞭草科莸属植物兰香草(*Caryopteris incana*, *C. incana*)的全草或带根全草,在浙江、江苏、安徽、江西、湖北、湖南、福建、广东、广西等省均有分布。其味辛、气香、性微温,具有疏

风解表、祛寒除湿、散瘀止痛之功效^[3],中西部山区少数民族常用来治疗妇科疾病,如产后瘀滞腹痛、寒淤痛经、月经不调、崩漏、白带等^[4-5]。目前兰香草的药理及临床研究基础极为薄弱,迄今未见其治疗痛经方面的研究报道。

因此,在前期完成兰香草抗炎镇痛活性初步研究的基础上^[6-7],以兰香草为研究对象,根据受寒后引起体内血行不畅、血脉不通的症状,采用符合中医症候特点的冰水浴法致寒结合苯甲酸雌二醇致敏和缩宫素致痛^[8],从而建立寒凝血瘀证 PD 大鼠模型,从症状表现、扭体反应、血液流变学指标及相关生化指标等方面来评价兰香草水煎液对寒凝血瘀证 PD 大鼠的防治效果及明确其可能的作用机制,为兰香草药用价值的开发利用及临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康成熟雌性 SD 大鼠 60 只, 7 周龄, 未交配, 体重 180 ~ 220 g, 购自湖南斯莱克实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-004】, 饲养于广西中医药大学科学实验中心动物实验室【SYXK(桂)2019-001】。在温度为 22 ± 2 °C, 湿度为 50% ~ 60%, 明暗各 12 h 交替的日光灯照射及通风好的环境中饲养。饲养期间大鼠自由摄食和饮水, 饲喂普通维持饲料, 以保证营养充足。本研究经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准(DW20220106-245), 实验过程符合动物伦理指导原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

兰香草, 采自广西宜州, 经广西中医药大学药用植物教研室的朱意麟实验师鉴定为马鞭草科菀属植物兰香草的干燥全草, 阴干, 粉碎成粗粉; 苯甲酸雌二醇注射液(上海全宇生物科技(驻马店)动物药业有限公司, 批号: 210301); 缩宫素注射液(西安华兽动物药业有限公司, 批号: 220101); 布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司, 批号: 20220107); 血浆血栓素 B_2 酶联免疫试剂盒、6-酮前列环素 $F_{1\alpha}$ 酶联免疫分析试剂盒、雌二醇酶联免疫分析试剂盒、孕酮酶联免疫分析试剂盒、前列腺素 $F_{2\alpha}$ 酶联免疫分析试剂盒、前列腺素 E_2 酶联免疫分析试剂盒(均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司, 批号均为: 20220510); NO 酶联免疫分析试剂盒(合肥莱尔生物科技有限公司, 批号: 20220510); 钙含量检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 批号: G20220512K)。

AJ150 电子分析天平(瑞士梅特勒); HH-S 恒温水浴锅(江苏金坛市医疗仪器厂); 优普纯水仪(四川优普超纯科技有限公司); 3H16RI 智能高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); ZL9000 全自动血流变分析仪(北京众驰伟业科技发展有限公司); Infinite M200 PRO 全波长多功能酶标仪(帝肯(上海)贸易有限公司); Eclipse Ci-L 正置白光拍照显微镜(Nikon, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验药物的制备

取兰香草粗粉 2560 g, 加入 10 倍量水, 浸泡 1 h

后, 依次煎煮 3 次, 每次煎煮 1 h, 过滤, 合并 3 次滤液, 浓缩至 1000 mL, 得浓度为 2.56 g/mL 兰香草水煎液。

灌胃给药前, 用纯净水配成高(1.28 g/mL)、中(0.64 g/mL)、低(0.32 g/mL)三个不同浓度的兰香草溶液, 备用。

1.2.2 动物分组与造模

将常规适应性饲养 7 d 的雌性大鼠, 随机分为 6 组, 即正常组、模型组、布洛芬组、兰香草高剂量组(*C. incana* high-dose group)、兰香草中剂量组(*C. incana* medium-dose group)、兰香草低剂量组(*C. incana* low-dose group), 每组 10 只。除正常组外, 其余各组每日固定时间采用 0 ~ 1 °C 冰水浸泡大鼠, 每天 1 次, 每次 10 min, 连续 14 d; 同时, 除正常组外, 其余各组每日给大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇, 第 1、14 天注射 4 mg/kg, 其余每天注射 2 mg/kg; 在第 14 天末次给药 1 h 后腹腔注射缩宫素 20 IU/kg, 以制备寒凝血瘀证 PD 模型。以大鼠症状表现作为寒凝血瘀证造模成功的指标^[9-10]: 大鼠寒战、蜷缩不动、喜扎堆、朦胧欲睡、两眼无神、反应迟钝、呼吸微弱、体温下降、心跳减慢、弓背竖毛、毛色枯槁无光泽、爪甲紫暗、耳色暗红、唇周发黑、舌质紫暗、舌下脉络增粗增长、下腹部和肛周发黑、小便色清、大便湿软不成形; 以大鼠扭体反应作为 PD 造模成功的指标^[9-11]: 腹部收缩内凹, 躯干与后肢伸展, 臀部与一侧肢体内旋。以此指标为判断标准, 造模成功率为 100%。

1.2.3 给药干预

于造模第 5 天开始灌胃给药(温服), 兰香草水煎液按生药量计给予兰香草高剂量组(12.8 g/kg)、兰香草中剂量组(6.4 g/kg)、兰香草低剂量组(3.2 g/kg), 以兰香草每日服用生药量 50 g 计, 分别相当于 60 kg 成人每日临床用药的 15.4、7.7 和 3.85 倍; 布洛芬组给予布洛芬缓释胶囊 0.06 g/kg, 正常组和模型组给予纯净水, 灌胃 10 mL/kg, 连续给药 10 d。

1.2.4 一般情况观察

造模及给药治疗期间, 每日观察记录大鼠的精神状态、活动情况、皮毛变化、饮食量、饮水量、大小便、垫料、死亡及体重等情况。

1.2.5 扭体反应测定

于末次给药 1 h 后, 除正常组外, 其余各组腹腔注射缩宫素 20 IU/kg, 以公认的扭体反应(即腹部收缩内凹, 躯干与后肢伸展, 臀部与一侧肢体内

旋)^[11]为指标,观察 30 min 内的扭体潜伏时间及扭体次数,计算扭体反应抑制率。扭体反应抑制率 = (模型组扭体反应均数 - 试药组扭体反应均数)/模型组扭体反应均数 × 100%。

1.2.6 血液流变学测定

大鼠处死前禁食不禁水 12 h,采用吸入麻醉法用异氟烷麻醉大鼠,麻醉成功后将大鼠仰面固定在手术板上,腹主动脉取血约 2 mL 于肝素管中,轻轻震荡混匀,采用全自动血流变分析仪迅速检测大鼠的血液流变学指标。

1.2.7 血清中 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}、E₂ 和 PROG 含量测定

腹主动脉取血约 3 mL 于真空管中,室温静置约 30 min,3000 r/min,低温 4 ℃ 离心 10 min 后,分取血清,严格按照相关酶联免疫分析试剂盒说明书采用 ELISA 法测定大鼠血清中 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}、E₂ 和 PROG 含量。

1.2.8 子宫、卵巢组织脏器指数测定及其病理学观察

分别取出子宫、卵巢,剥离脂肪组织,以冰冻的 0.9%氯化钠注射液洗净血渍,滤纸吸干表面水分后,称重,计算子宫脏器指数和卵巢脏器指数。用 4%多聚甲醛分别固定子宫、卵巢,固定 24 h 后,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡切片包埋,进行苏木素-伊红(HE)染色,在光镜下观察组织形态及病变表现。脏器指数 = 脏器重量(g)/体重(g) × 100%。

1.2.9 子宫组织中 PGF_{2α}、PGE₂、NO 和 Ca²⁺含量测定

取子宫,以冰冻 0.9%氯化钠注射液洗净、拭干、称重,制成 10%子宫组织匀浆,以 3000 r/min,低温 4 ℃ 离心 10 min,取上清液,严格按照酶联免疫分析试剂盒说明书,采用 ELISA 法测定大鼠子宫组织中 PGF_{2α}、PGE₂ 和 NO 含量,以及严格按照钙含量检测试剂盒说明书,采用邻甲酚酞络合铜比色法测定 Ca²⁺含量。

1.3 统计学分析

计量数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计学处理,多组间比较使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况的影响

正常组大鼠精神状态佳,反应灵敏、活泼好动、

毛发整洁、柔顺、光亮且紧贴皮肤,饮食、饮水正常,大小便正常,粪质褐色坚硬,垫料干湿度适宜且无明显异臭味,体重持续增加。模型组大鼠从造模第 3 天开始逐渐精神欠佳,出现寒战、蜷缩不动、喜扎堆、朦胧欲睡、两眼无神、反应迟钝、呼吸微弱、体温下降、心跳减慢、弓背竖毛、毛色枯槁无光泽、爪甲紫暗、耳色暗红、唇周发黑、舌质紫暗、舌下脉络增粗增长、下腹部和肛周发黑、大小便量明显增多、小便色清、大便湿软不成形、垫料易潮湿且有明显异臭味,饮食、饮水量减少,体重下降等寒凝血瘀证症状;注射缩宫素后,出现明显扭体反应的痛经症状。与模型组比较,经给药治疗 10 d 后,兰香草高剂量组和兰香草中剂量组大鼠的寒凝血瘀证症状有明显改善;布洛芬组和兰香草低剂量组大鼠的寒凝血瘀证症状有一定程度改善但不明显。

2.2 对扭体反应的影响

结果如表 1 所示,与正常组比较,模型组大鼠出现明显扭体反应($P < 0.01$)。与模型组比较,兰香草高剂量组、兰香草中剂量组、兰香草低剂量组和布洛芬组均能显著延长大鼠扭体反应的潜伏时间($P < 0.01$),并能显著降低大鼠的扭体次数($P < 0.01$)。

2.3 对血液流变学的影响

结果如表 2 所示,与正常组比较,模型组大鼠血浆粘度、红细胞压积及全血粘度均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,布洛芬组可显著降低大鼠的红细胞压积及低切变率下全血粘度($P < 0.05$, $P < 0.01$);兰香草高剂量组和兰香草中剂量组均能显著降低大鼠的血浆粘度、红细胞压积及高、中、低切变率下全血粘度($P < 0.01$);兰香草低剂量组可显著降低大鼠的低切变率下全血粘度($P < 0.05$)。

2.4 对血清中 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}、E₂ 和 PROG 含量的影响

结果如表 3 所示,与正常组比较,模型组大鼠血清中 TXB₂、E₂ 水平及 E₂/PROG 比值明显升高($P < 0.01$),6-Keto-PGF_{1α} 和 PROG 水平明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,布洛芬组可显著降低大鼠血清中 E₂ 水平及 E₂/PROG 比值($P < 0.05$, $P < 0.01$);兰香草高剂量组和兰香草中剂量组均能显著降低大鼠血清中 TXB₂、E₂ 水平及 E₂/PROG 比值($P < 0.01$),并显著升高大鼠血清中 6-Keto-PGF_{1α} 和 PROG 水平($P < 0.01$);兰香草低剂量组可明显

表 1 兰香草水煎液对大鼠扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of *Caryopteris incana* decoction on writhing response in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	潜伏时间/min Latent time/min	扭体次数 Writhing frequency	扭体反应抑制率/% Inhibition rate of writhing response/%
正常组 Normal group	—	—	—
模型组 Model group	4.40 ± 0.67 ^{▲▲}	41.00 ± 4.42 ^{▲▲}	—
布洛芬组 Ibuprofen group	8.72 ± 1.20 ^{**}	13.30 ± 2.31 ^{**}	67.56
兰香草高剂量组 <i>C. incana</i> high-dose group	7.61 ± 1.07 ^{**}	16.50 ± 1.35 ^{**}	59.76
兰香草中剂量组 <i>C. incana</i> medium-dose group	7.81 ± 0.97 ^{**}	18.80 ± 2.44 ^{**}	54.15
兰香草低剂量组 <i>C. incana</i> low-dose group	6.69 ± 8.20 ^{**}	25.50 ± 3.63 ^{**}	37.80

注:与正常组相比, ^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with the normal group, ^{▲▲} $P < 0.01$. Compared with the model group, ^{**} $P < 0.01$. (The same in the following tables)

表 2 兰香草水煎液对大鼠血浆黏度、红细胞压积及全血黏度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of *Caryopteris incana* decoction on plasma viscosity, packet cell volume and whole blood viscosity in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	血浆粘度/ (m Pa·s) Plasma viscosity/ (m Pa·s)	红细胞压 积/(L/L) Packet cell volume (L/L)	全血粘度/(m Pa·s) Whole blood viscosity/(m Pa·s)		
			高切/(m Pa·s) High shear rates/(m Pa·s) (200/s)	中切/(m Pa·s) Medium shear rates/(m Pa·s) (50/s)	低切/(m Pa·s) Low shear rates/(m Pa·s) (1/s)
正常组 Normal group	1.59 ± 0.02	0.39 ± 0.02	4.08 ± 0.55	5.55 ± 0.96	21.76 ± 1.97
模型组 Model group	1.90 ± 0.07 ^{▲▲}	0.46 ± 0.01 ^{▲▲}	5.54 ± 0.50 ^{▲▲}	8.29 ± 0.76 ^{▲▲}	30.99 ± 2.03 ^{▲▲}
布洛芬组 Ibuprofen group	1.84 ± 0.07	0.43 ± 0.02 [*]	5.06 ± 0.66	7.71 ± 0.85	25.52 ± 1.74 ^{**}
兰香草高剂量组 <i>C. incana</i> high-dose group	1.63 ± 0.06 ^{**}	0.42 ± 0.02 ^{**}	4.69 ± 0.47 ^{**}	6.21 ± 0.78 ^{**}	23.14 ± 2.69 ^{**}
兰香草中剂量组 <i>C. incana</i> medium-dose group	1.67 ± 0.09 ^{**}	0.41 ± 0.02 ^{**}	4.50 ± 0.45 ^{**}	6.82 ± 1.05 ^{**}	26.13 ± 1.62 ^{**}
兰香草低剂量组 <i>C. incana</i> low-dose group	1.82 ± 0.07	0.44 ± 0.03	4.93 ± 0.46	7.32 ± 1.04	27.67 ± 2.14 [*]

注:与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 3 兰香草水煎液对大鼠血清中 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}、E₂ 和 PROG 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of *Caryopteris incana* decoction on the contents of TXB₂, 6-Keto-PGF_{1α}, E₂ and PROG in serum of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	TXB ₂ /(ng/mL)	6-Keto-PGF _{1α} /(pg/mL)	E ₂ /(pg/mL)	PROG/(ng/mL)	E ₂ /PROG
正常组 Normal group	5.42 ± 0.22	128.83 ± 7.40	45.20 ± 2.33	37.14 ± 1.91	1.22 ± 0.10
模型组 Model group	8.07 ± 0.32 ^{▲▲}	76.02 ± 4.05 ^{▲▲}	74.17 ± 4.16 ^{▲▲}	21.29 ± 1.52 ^{▲▲}	3.50 ± 0.29 ^{▲▲}
布洛芬组 Ibuprofen group	7.79 ± 0.34	78.94 ± 6.12	69.29 ± 4.36 [*]	23.07 ± 2.02	3.02 ± 0.23 ^{**}
兰香草高剂量组 <i>C. incana</i> high-dose group	6.02 ± 0.32 ^{**}	98.68 ± 4.97 ^{**}	50.43 ± 2.74 ^{**}	32.08 ± 2.12 ^{**}	1.58 ± 0.16 ^{**}
兰香草中剂量组 <i>C. incana</i> medium-dose group	6.58 ± 0.37 ^{**}	93.44 ± 4.78 ^{**}	55.23 ± 3.10 ^{**}	34.14 ± 1.38 ^{**}	1.62 ± 0.13 ^{**}
兰香草低剂量组 <i>C. incana</i> low-dose group	7.70 ± 0.35	81.47 ± 5.11	66.34 ± 4.06 ^{**}	23.93 ± 1.65 [*]	2.78 ± 0.27 ^{**}

降低大鼠血清中 E_2 水平及 E_2 /PROG 比值 ($P < 0.01$) 和显著升高大鼠血清中 PROG 水平 ($P < 0.05$)。

2.5 对子宫指数和卵巢指数的影响

结果如表 4 所显示,与正常组比较,模型组大鼠子宫指数和卵巢指数均明显增高 ($P < 0.01$)。与模

型组比较,兰香草高剂量组、兰香草中剂量组和布洛芬阳性组均能显著降低大鼠子宫指数和卵巢指数 ($P < 0.01$);兰香草低剂量组可显著降低大鼠子宫指数 ($P < 0.01$),但其对大鼠卵巢指数的影响无显著性差异。

表 4 兰香草水煎液对大鼠子宫指数和卵巢指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	子宫指数/(mg/g) Uterine index of rats/(mg/g)	卵巢指数/(mg/g) Ovarian index of rats/(mg/g)
正常组 Normal group	1.76 ± 0.23	0.31 ± 0.03
模型组 Model group	6.60 ± 0.76 ^{▲▲}	0.71 ± 0.09 ^{▲▲}
布洛芬组 Ibuprofen group	3.34 ± 0.45 ^{**}	0.56 ± 0.05 ^{**}
兰香草高剂量组 <i>C. incana</i> high-dose group	2.62 ± 0.14 ^{**}	0.42 ± 0.05 ^{**}
兰香草中剂量组 <i>C. incana</i> medium-dose group	3.12 ± 0.29 ^{**}	0.52 ± 0.05 ^{**}
兰香草低剂量组 <i>C. incana</i> low-dose group	3.99 ± 0.52 ^{**}	0.63 ± 0.07

2.6 对子宫组织中 $PGF_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、NO 和 Ca^{2+} 含量的影响

结果如表 5 所示,与正常组比较,模型组大鼠子宫组织中 $PGF_{2\alpha}$ 、 Ca^{2+} 水平及 $PGF_{2\alpha}$ / PGE_2 比值明显升高 ($P < 0.01$), PGE_2 、NO 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,布洛芬组可显著降低大鼠子宫组织中 $PGF_{2\alpha}$ 水平及 $PGF_{2\alpha}$ / PGE_2 比值 ($P < 0.01$) 和显著升高大鼠子宫组织中 PGE_2 水平 ($P < 0.01$);兰香草高剂量组和兰香草中剂量组均能显著降低大鼠子宫组织中 $PGF_{2\alpha}$ 、 Ca^{2+} 水平和 $PGF_{2\alpha}$ / PGE_2 比值 ($P < 0.01$),并能显著升高大鼠子宫组织中 PGE_2 、NO 水平 ($P < 0.01$);兰香草低剂量组可显著降低大鼠子宫组织中 $PGF_{2\alpha}$ 、 Ca^{2+} 水平及 $PGF_{2\alpha}$ / PGE_2 比值 ($P < 0.05, P < 0.01$) 和明显升高大鼠子宫组织中 NO 水平 ($P < 0.05$)。

2.7 对子宫、卵巢组织病理学变化的影响

结果如图 1 所示,正常组子宫组织可见内膜由单层柱状上皮和固有层构成,子宫内膜上皮为单层柱状上皮细胞,未见明显的变性以及增生;固有层子宫腺分布均匀,未见明显的扩张和增生;属于正常发情期变化。模型组子宫组织可见内膜上皮细胞呈高柱状,少量细胞坏死溶解,胞质空泡化(黑色箭头);固有层可见细胞坏死固缩,伴少量淋巴细胞浸润(蓝色箭头);子宫腺扩张,少量上皮细胞坏死,核固缩,胞质空泡化(绿色箭头)。布洛芬组子宫组

织可见少量内膜上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染(黑色箭头);子宫腺丰富,多量子宫腺扩张(蓝色箭头);固有层少量淋巴细胞浸润(绿色箭头)。兰香草高剂量组子宫组织可见少量内膜上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染(黑色箭头);固有层散在分布淋巴细胞(蓝色箭头);少量子宫腺扩张(绿色箭头)。兰香草中剂量组子宫组织可见内膜上皮呈高柱状,少量上皮细胞增生(黑色箭头);多量上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染(蓝色箭头);少量子宫腺扩张(绿色箭头);固有层可见散在分布的淋巴细胞(红色箭头)。兰香草低剂量组子宫组织可见内膜上皮呈高柱状,少量上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染;固有层散在分布淋巴细胞;多量子宫腺扩张,少量子宫腺上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染。子宫组织可见内膜上皮呈高柱状,少量上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染(黑色箭头);固有层散在分布淋巴细胞(蓝色箭头);多量子宫腺扩张(绿色箭头),少量子宫腺上皮细胞水样变性,胞质疏松淡染(红色箭头)。

结果如图 2 所示,正常组卵巢组织可见表面附有一层上皮,未见异常;实质分为皮质及髓质,皮质内有各级不同发育阶段的卵泡、黄体 and 闭锁细胞,各级细胞形态结构正常;卵泡间的基质富含梭形的基质细胞和网状纤维;髓质为疏松结缔组织;卵巢结构和形态发育正常,卵泡形态结构清晰,未见明

显的病理改变。模型组卵巢组织中少量卵泡内可见卵母细胞坏死,透明环崩解,形态不规则,伴少量巨噬细胞浸润;少量卵泡内可见少量卵泡颗粒细胞坏死,胞核固缩,未见卵母细胞;少量黄体细胞可见水样变性,胞质疏松淡染。卵巢组织中少量卵泡内可见卵母细胞坏死,透明环崩解,形态不规则,伴少

表 5 兰香草水煎液对大鼠子宫组织 PGF_{2α}、PGE₂、NO 和 Ca²⁺ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of *Caryopteris incana* decoction on the contents of PGF_{2α}, PGE₂, NO and Ca²⁺ in uterus of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	PGF _{2α} /(pg/mL)	PGE ₂ /(pg/mL)	PGF _{2α} /PGE ₂	NO/(μmol/L)	Ca ²⁺ /(μmol/g)
正常组 Normal group	80.42 ± 9.99	115.13 ± 5.89	0.70 ± 0.09	28.93 ± 2.30	13.17 ± 1.63
模型组 Model group	122.50 ± 8.42 ^{▲▲}	82.38 ± 6.48 ^{▲▲}	1.49 ± 0.12 ^{▲▲}	16.42 ± 1.81 ^{▲▲}	139.51 ± 12.56 ^{▲▲}
布洛芬组 Ibuprofen group	88.33 ± 6.69 ^{**}	107.01 ± 5.25 ^{**}	0.83 ± 0.09 ^{**}	16.68 ± 2.06	130.94 ± 6.64
兰香草高剂量组 <i>C. incana</i> high-dose group	94.67 ± 7.63 ^{**}	105.13 ± 5.10 ^{**}	0.90 ± 0.09 ^{**}	26.11 ± 3.01 ^{**}	56.59 ± 3.93 ^{**}
兰香草中剂量组 <i>C. incana</i> medium-dose group	87.58 ± 7.00 ^{**}	100.51 ± 4.17 ^{**}	0.87 ± 0.07 ^{**}	23.02 ± 2.94 ^{**}	73.47 ± 3.21 ^{**}
兰香草低剂量组 <i>C. incana</i> low-dose group	110.08 ± 6.74 [*]	89.51 ± 3.96	1.23 ± 0.09 ^{**}	19.99 ± 2.81 [*]	91.02 ± 5.11 ^{**}

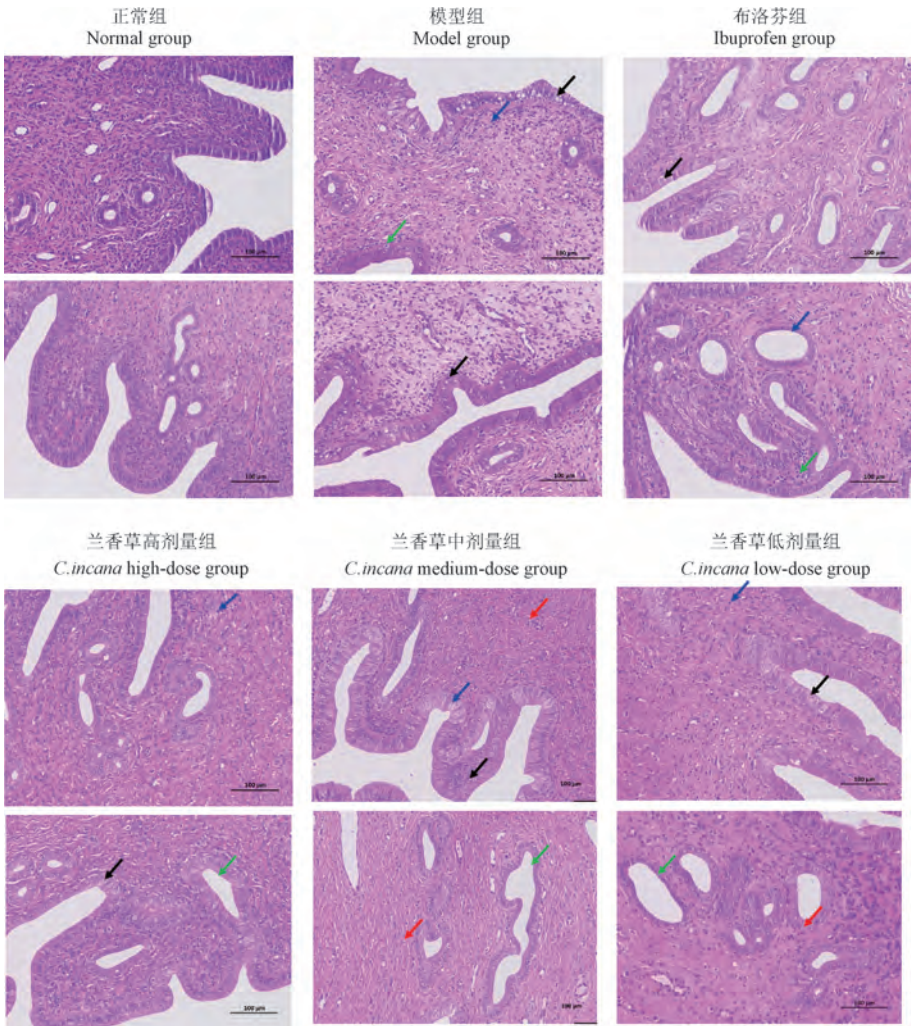


图 1 大鼠子宫病理形态观察图

Figure 1 Pathological observation on uterus of rat

量巨噬细胞浸润(黑色箭头);少量卵泡内可见少量卵泡颗粒细胞坏死,胞核固缩(红色箭头),未见卵母细胞;少量黄体细胞可见水样变性,胞质疏松淡染(蓝色箭头)。布洛芬组卵巢组织中可见少量黄体细胞可见水样变性,胞质疏松淡染(黑色箭头);少量卵泡未见卵母细胞(蓝色箭头)。兰香草低剂量组卵巢组织中少量卵泡内可见卵母细胞坏死,透明环崩解,形态不规则(黑色箭头);少量卵泡内可见少量卵泡细胞坏死,胞核碎裂(蓝色箭头),未见卵母细胞。

样变性,胞质疏松淡染(黑色箭头)。兰香草中剂量组卵巢组织中少量黄体可见黄体细胞水样变性,胞质疏松淡染(黑色箭头);少量卵泡未见卵母细胞(蓝色箭头)。兰香草低剂量组卵巢组织中少量卵泡内可见卵母细胞坏死,透明环崩解,形态不规则(黑色箭头);少量卵泡内可见少量卵泡细胞坏死,胞核碎裂(蓝色箭头),未见卵母细胞。

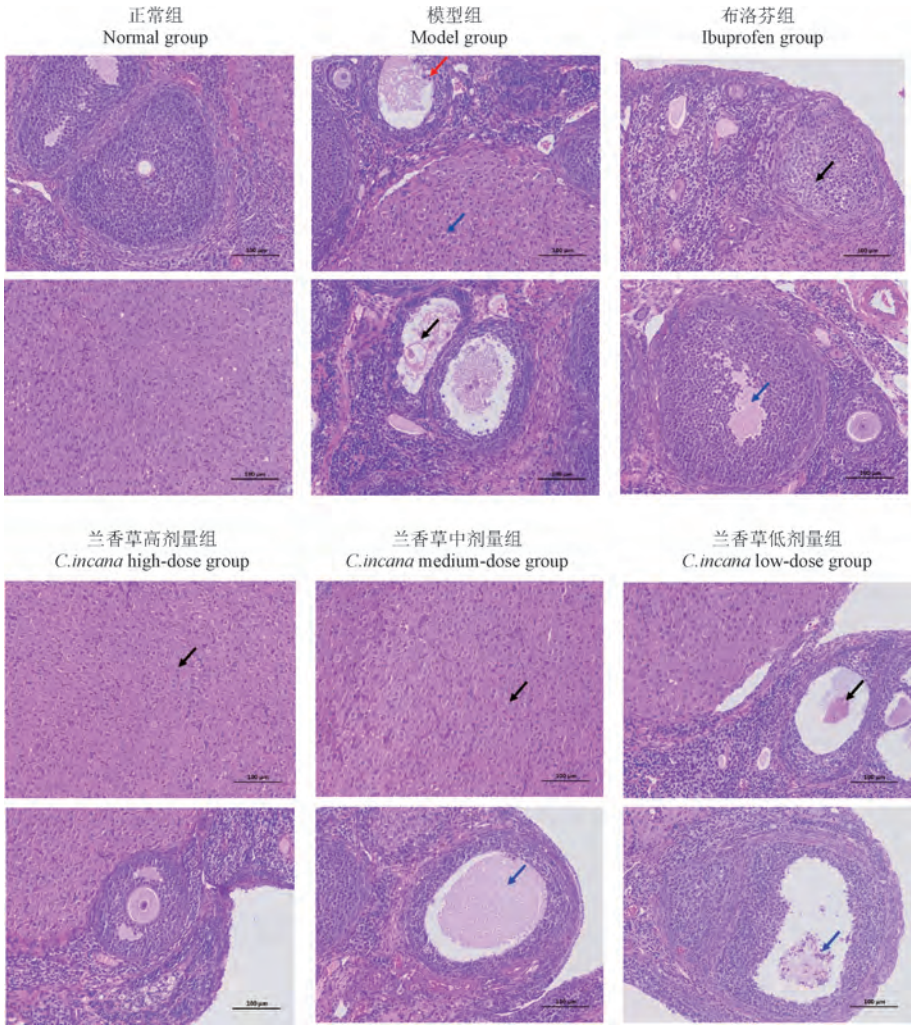


图 2 大鼠卵巢病理形态观察图

Figure 2 Pathological observation on ovary of rat

3 讨论

在现代动物实验研究中,建立理想的具有中医特色的证候动物模型是研究中医病因病机,阐明中药临床疗效、作用机理及物质基础的重要途径。中医认为“寒为阴邪而主收引,其性凝滞,不论外寒或内寒,均能致气血不畅,形成血瘀,导致不通则痛”。显然,制备寒凝血瘀证的模型最关键的病因是“寒”。本实验通过冰水浴寒冷刺激,诱导形成寒凝血

瘀证。同时给予致敏物质苯甲酸雌二醇可使大鼠子宫同步化,使大鼠处于同一动情期,并使子宫内膜增生,增强子宫平滑肌收缩及提高子宫对致痛物质缩宫素的敏感性;末次给药后给予缩宫素可使大鼠子宫产生强烈收缩,引起子宫组织缺血、缺氧,并促进 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的产生与释放^[12];根据苯甲酸雌二醇和缩宫素的共同作用诱导形成 PD。因此,通过“病症结合”制造出符合中医证候特点的寒凝血瘀证 PD 模型。造模后,模型组大鼠具有典型的寒凝血瘀证

临床症状表现,出现明显的扭体反应,表明造模成功。在造模第 5 天开始给予药物治疗,发现兰香草高剂量组、兰香草中剂量组和兰香草低剂量组均能显著改善大鼠的扭体反应,提示经过给药治疗后能有效缓解缩宫素所致 PD 大鼠的痛经症状,且止痛效果随着剂量的增加而增强。另外,由于注射了苯甲酸雌二醇以及“寒凝血瘀”病症的影响,解剖时肉眼观察可见模型组大鼠的子宫和卵巢明显增生、水肿,体积增大,且子宫壁很薄。通过组织病理形态观察,发现兰香草高剂量组和兰香草中剂量组可改善大鼠的子宫和卵巢组织形态的病变程度,其组织细胞的增生、炎症、水肿情况均有所缓解。

中医理论中的“血瘀证”与机体的血液流变学状态息息相关,血液流变学主要研究血液流动性、凝滞性和凝固性的变化。血瘀证时由于血液成分变化,血液流速减慢,将出现明显的血液流变学变化^[13]。在各种类型血瘀证中,血液流变学是一项重要的检测指标,其反映与血液黏滞性相关的常用检测指标有全血还原黏度、全血黏度、血浆黏度、红细胞压积等。本实验选择血浆黏度、红细胞压积及全血黏度 3 个指标考察大鼠的血液流变学变化,结果显示冰水浴引起模型大鼠的血液黏滞性增强,符合中医“寒凝血瘀”理论,进一步表明 PD 的寒凝血瘀证病理模型制备成功。而兰香草高剂量组和兰香草中剂量组可显著改善大鼠血液的高黏、浓状态,降低其黏度和浓度,从而改善其血液流变学特性。

目前,PD 的发病机制尚未完全明确。现代医学已公认子宫内膜和血内合成与释放前列腺素(prostaglandin, PG)的含量增加及其比例失调是导致 PD 的主要原因,其中研究最多的为 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 和 PGE_2 。异常升高的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 可与子宫螺旋小动脉壁上相应受体结合,引起子宫平滑肌痉挛性收缩,造成子宫血流减少,子宫缺血缺氧及酸性代谢产物堆积于子宫平滑肌内,从而诱发 PD^[12,14];对于非妊娠子宫, PGE_2 能松弛子宫平滑肌,抑制子宫收缩、促进血管扩张,拮抗 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的作用^[15-16]。可见,当 PD 发生时两者比值($\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$)就会增高,其比值越高,痛经越严重。其次,非妊娠子宫肌层合成具有血管活性的 PGs 主要是血栓烷 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 和前列腺素 I_2 (prostacyclin I_2 , PGI_2)。其中, TXA_2 由血小板释放,可刺激血管收缩及促进血小板聚集; PGI_2 由血管内皮细胞释放,可拮抗血小板聚集及扩张血管^[17]。正常生理状态下, $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 处

于平衡状态,当两者比例失衡时,即 TXA_2 水平升高, PGI_2 水平下降,可导致血小板聚集甚至血栓形成,血管痉挛收缩,血液循环障碍,血液处于高凝状态,属中医学“血瘀证”,从而进一步导致子宫血供流量减少,子宫平滑肌痉挛收缩,诱发与加重痛经。由于 TXA_2 和 PGI_2 半衰期短且在体内不稳定,因此大多选择考察二者的代谢产物 TXB_2 和 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 的含量,从而间接反映 TXA_2 和 PGI_2 的水平。最后,雌孕激素失衡也是导致 PD 的主要原因。 E_2 可刺激 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成与释放,从而引发痛经; E_2 还能使 Ca^{2+} 内流,促进子宫收缩,加重痛经。PROG 可松弛子宫平滑肌,扩张血管,同时可使 E_2 转化为雌酮,减少 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成与释放,从而缓解痛经^[12]。可见,若 E_2 水平升高,PROG 水平降低,则 E_2/PROG 比值增加,即雌孕激素失调,可诱发与加重痛经。此外,PD 的发生亦与机体内 NO、 Ca^{2+} 含量变化密切相关。NO 是一种具有多种生物功能的气体分子,可通过 NO-cGMP 途径表现为致痛和镇痛双重作用,参与外周及中枢水平的痛觉调节;含量减少时,产生致痛作用;含量增多时,起镇痛作用;NO 还是内皮舒张因子(endothelial relaxing factor, EDRF)的主要成分之一,具有扩张血管的作用,能够抑制血小板的黏附和聚集,减少 TXB_2 释放,抑制血栓形成,亦属“血瘀证”的主要测定指标。痛经时, Ca^{2+} 大量进入细胞内, Ca^{2+} 过多会引起细胞能量耗竭、细胞膜受损,导致子宫平滑肌痉挛性收缩,加重痛经^[18]。实验结果表明,兰香草高剂量组和兰香草中剂量组可显著下调血清中 TXB_2 、 E_2 水平及上调血清中的 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、PROG 水平,还可显著下调子宫组织中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 Ca^{2+} 水平及上调子宫组织中 PGE_2 、NO 水平,从而抑制子宫平滑肌收缩,扩张血管,改善血液循环,增加子宫供血量,达到有效缓解“血瘀”和“痛经”的作用。

综上,兰香草对寒凝血瘀证 PD 大鼠具有良好的防治效果,可有效改善寒凝血瘀证 PD 大鼠的临床症状,缓解痛经反应,改善血液黏滞性,增强血液流动性,其作用机制可能是通过调控大鼠血清中 TXB_2 、6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 E_2 、PROG 水平和子宫组织中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、NO、 Ca^{2+} 水平以共同达到有效缓解血瘀和痛经作用,而其他因素的影响,具体作用靶点及环节有待进一步验证和探讨。本研究结果为兰香草防治妇科疾病的深入研究及临床应用提供科学依据。

参 考 文 献(References)

- [1] 孙玉阳, 纪宏宇, 陈博, 等. 原发性痛经的发病机制及中医药治疗的研究进展 [J]. 中国药师, 2017, 20(1): 144-147.
SUN Y Y, JI H Y, CHEN B, et al. Research progress in pathogenesis and traditional Chinese medicine treatment of primary dysmenorrhea [J]. Chin Pharm, 2017, 20(1): 144-147.
- [2] 王艳英. 原发性痛经发病机制及治疗的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(7): 2447-2449.
WANG Y Y. Research progress of pathogenesis and treatment of primary dysmenorrhea [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2015, 30(7): 2447-2449.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社; 1982.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China [M]. Beijing: Science Press; 1982.
- [4] 赵春玲. 兰香草在宁夏的引种适应性研究 [J]. 宁夏农林科技, 2014, 55(1): 15-16.
ZHAO C L. A study of adaptability of common bluebeard herb in Ningxia [J]. Ningxia J Agric For Sci Technol, 2014, 55(1): 15-16.
- [5] 孙凌峰, 陈新, 刘秀娟, 等. 杉木根精油化学成分研究 [J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2000, 24(1): 45-49.
SUN L F, CHEN X, LIU X J, et al. Studies on chemical constituents of the essential oil from the root of *Cunninghamia lanceolata* [J]. J Jiangxi Norm Univ (Nat Sci Ed), 2000, 24(1): 45-49.
- [6] 陈美安, 黄健军, 贾智若, 等. 兰香草不同提取部位抗炎作用及其机制研究 [J]. 中药材, 2018, 41(12): 2921-2924.
CHEN M A, HUANG J J, JIA Z R, et al. Study on anti-inflammatory effects of different extracts of *Vanilla* and its mechanism [J]. J Chin Med Mater, 2018, 41(12): 2921-2924.
- [7] 陈美安, 莫晓方, 吴小燕. 兰香草水煎液急性毒性试验和止血抗炎镇痛作用 [J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(2): 74-78.
CHEN M A, MO X F, WU X Y. Acute toxicity, hemostatic, Anti-inflammatory and analgesic effects of water decoction of *Caryopteris incana* [J]. Chin J Vet Med, 2022, 58(2): 74-78.
- [8] 宋晓丹, 成秀梅, 周湘, 等. 寒凝血瘀证动物模型研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 267-274.
SONG X D, CHENG X M, ZHOU X, et al. Animal model of cold congeal and blood stasis syndrome: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(15): 267-274.
- [9] 翟凤婷, 王东梅, 王丹丹, 等. 基于 MAPK/ERK 信号通路探讨温经化瘀止痛法治疗寒凝血瘀证原发性痛经的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 66-74.
ZHAI F T, WANG D M, WANG D D, et al. Mechanisms of Wenjing Huayu Zhitong therapy for primary dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis syndrome based on MAPK/ERK signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(17): 66-74.
- [10] 王丹丹, 王东梅, 张英杰, 等. 基于神经生长因子探讨温经活血汤治疗寒凝血瘀证原发性痛经的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1468-1473.
WANG D D, WANG D M, ZHANG Y J, et al. Explore the mechanisms of Wenjing Huoxue Decoction in the treatment of primary dysmenorrhea with cold coagulation and blood stasis syndrome based on nerve growth factor [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(10): 1468-1473.
- [11] WEI Y, MA T Y, WANG H X, et al. Extracts of compound Muniziqi Granule suppressed uterus contraction and ameliorated oxytocin-induced primary dysmenorrhea [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 223: 33-40.
- [12] 李凤金, 雷易朋, 李贵森, 等. 五加生化胶囊治疗原发性痛经的作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 109-115.
LI F J, LEI Y P, LI G S, et al. Effect and mechanism of Wujia Shenghua capsule against primary dysmenorrhea [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(5): 109-115.
- [13] 郝剑, 邱研博, 魏蔚. 血瘀证动物模型客观化评价方法概述 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3323-3329.
HAO J, DI Y B, WEI W. Objective evaluation of blood-stasis syndrome animal models [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(6): 3323-3329.
- [14] FERRIES-ROWE E, COREY E, ARCHER J S. Primary dysmenorrhea: diagnosis and therapy [J]. Obstet Gynecol, 2020, 136(5): 1047-1058.
- [15] 徐莉莉, 宋晓琳, 张露芬, 等. 电针合谷穴对痛经大鼠扭体行为、PGE₂、PGF_{2α}、β-EP 含量的影响 [J]. 中国中医药科技, 2014, 21(5): 479-481.
XU L L, SONG X L, ZHANG L F, et al. Effects of electroacupuncture at Hegu point on writhing behavior, PGE₂, PGF_{2α} and β-EP content in dysmenorrhea rats [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol, 2014, 21(5): 479-481.
- [16] 马青, 师伟, 刘少玲, 等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠血清 E₂、P、PGE₂、PGF_{2α}、TXB₂ 及 6-Keto-PGF_{1α} 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1281-1284.
MA Q, SHI W, LIU S L, et al. Effect of warming meridian, removing blood stasis and relieving pain on serum E₂, P, PGE₂, PGF_{2α}, TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1α} in rats with primary dysmenorrhea of cold blood stasis syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(5): 1281-1284.
- [17] DENG Z Y, SHAN W G, WANG S F, et al. Effects of astaxanthin on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation in hyperlipidemic rats [J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 663-672.
- [18] CHEN W, KHALIL R A. Differential Ca²⁺ signaling of vasoconstriction in mesenteric microvessels of normal and reduced uterine perfusion pregnant rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 295(6): R1962-R1972.

马梦蝶,樊敏,徐松林,等. 红藻氨酸诱导大鼠癫痫发作及神经精神行为异常的性别差异 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32 (7): 889-900.

MA M D, FAN M, XU S L et al. Gender difference in epileptic seizure and neuropsychiatric behavior abnormalities induced by kainic acid in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 889-900.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.008

红藻氨酸诱导大鼠癫痫发作及神经精神行为异常的性别差异

马梦蝶^{1,2}, 樊敏^{1,2}, 徐松林^{1,2}, 郑强^{1,2}, 何帅^{1,2}, 葛金芳^{1,2*}

(1. 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; 2. 炎症免疫性疾病安徽省实验室, 合肥 230032)

【摘要】 目的 观察红藻氨酸(kainic acid, KA)诱导的癫痫大鼠模型神经精神行为表现,在此基础上比较不同性别大鼠在癫痫急性发作和缓解期感觉、运动及学习记忆行为学实验中表现的性别差异,并探讨其可能机制。方法 4 周龄健康 SD 大鼠随机分为对照组和模型组,每组 22 只,雌雄各半。腹腔注射 KA 诱导癫痫模型,观察各组大鼠癫痫发作潜伏期及 2 h 内发作次数,采用 Racine 等级标准评定癫痫急性发作等级,并记录皮层脑电图;采用旷场实验、平衡木行走、高架十字迷宫、Y 迷宫及新物体识别等行为学实验观察大鼠感觉、运动及学习记忆能力;ELISA 法检测海马组织中 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)水平,尼氏染色观察海马神经元损伤情况,Western Blot 检测海马区 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 蛋白表达。结果 雄性及雌性 SD 大鼠在接受 KA 腹腔注射后均表现出典型的癫痫发作行为,但与雄鼠相比,雌鼠癫痫急性发作的潜伏期显著缩短($P = 0.014$),2 h 内发作总次数显著减少($P = 0.019$),且癫痫发作达到 IV ~ V 级的时间早于雄性大鼠($P < 0.01$)。癫痫缓解期的行为学结果显示,与对照组比较,模型组大鼠在旷场实验中的总运动距离及中央区域运动距离增多,雌性模型大鼠的理毛次数显著减少($P < 0.01$)且与雄性模型大鼠比较具有显著性差异($P < 0.01$);在平衡木行走实验中完成任务所需时间及评分增加;在高架十字迷宫中雄性模型大鼠在封闭臂的探索次数增加;在 Y-迷宫及新物体识别实验中的新异臂/物体优先指数减少。与对照组比较,模型组大鼠海马神经元损伤,且海马 GABA 浓度及 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 的蛋白表达均显著下降,但无性别差异。结论 KA 腹腔注射可成功诱导大鼠癫痫模型,且不同性别大鼠在癫痫急性发作特点和缓解期感觉、运动行为学实验中的表现有所差异,但不同性别癫痫模型大鼠海马 GABA 浓度及突触可塑性相关蛋白表达无显著性差异。因而,导致 KA 诱导癫痫大鼠行为反应性别差异的机制有待深入探究。

【关键词】 癫痫;雌雄性别;学习记忆;红藻氨酸; γ -氨基丁酸;脑电图;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0889-12

Gender difference in epileptic seizure and neuropsychiatric behavior abnormalities induced by kainic acid in rats

MA Mengdie^{1,2}, FAN Min^{1,2}, XU Songlin^{1,2}, ZHENG Qiang^{1,2}, HE Shuai^{1,2}, GE Jinfang^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Inflammation and Immune Mediated Diseases Laboratory of Anhui Province, Hefei 230032, China)

Corresponding author: GE Jinfang. E-mail: gejinfang@ahmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the neuropsychiatric behavioral performance of kainic acid (KA)-induced epilepsy rats; investigate gender differences in acute seizure and behavioral performance tasks relating to sense, motor,

[基金项目] 安徽高校协同创新项目(GXXT-2020-062)。

Funded by the University Synergy Innovation Program of Anhui Province(GXXT-2020-062)。

[作者简介] 马梦蝶,女,在读硕士研究生,研究方向:神经药理学。Email: mmd18895678533@163.com

[通信作者] 葛金芳,女,博士,教授,博士生导师,研究方向:神经药理学。Email: gejinfang@ahmu.edu.cn

learning, and memory in the remission phase; and explore the potential neurobiological mechanisms of action. **Methods** Healthy SD rats aged 4 weeks were randomly divided into control and model groups, with 22 rats in each group (11 males and 11 females). An epileptic rat model was induced by intraperitoneal injection of KA. Seizure latency and frequency within 2 hours of KA injection were observed, seizure grade was assessed using the Racine grade standard, and a cortical electroencephalogram (EEG) was recorded. Behavioral performance was observed in a series of tasks including open field testing, balance beam walking, elevated plus maze, Y-maze, and novel object recognition. The level of GABA in the hippocampus was detected by ELISA, injury to hippocampal neurons was observed by Nissl staining, and the protein expression of synapsin-1 and synaptotagmin 1 in the hippocampus were detected by Western Blot. **Results** Both male and female rats presented typical epileptic behaviors after KA injection. However, compared with the effects in males, the latency of the first seizure ($P = 0.014$) and IV ~ V grading in female model rats were more pronounced ($P < 0.01$), and the frequency of epileptic seizures within 2 hours was significantly reduced ($P = 0.019$). In the open field testing, KA-induced epileptic rats presented more motor but fewer hedonic behaviors, as indicated by the decrease in total movement distance in the central area, compared with the control group. Moreover, grooming frequency was significantly reduced in the female model rats compared with not only that in the control but also that in male model rats ($P < 0.01$). The model rats spent more time completing and had a higher score in the balance beam walking task, indicating their poorer stability and balance. In the elevated plus maze, the exploration times of male model rats in the closed arm was increased. The preference index of rats for the novel arm or object decreased in the Y-maze and novel object recognition, suggesting impairments to their learning and memory abilities. Moreover, neuronal injuries were found in the hippocampus of the model rats that were accompanied with a decline in GABA concentration and protein expression of synapsin-1 and synaptotagmin 1, with no gender differences. **Conclusions** Intraperitoneal injection of KA successfully induced an epilepsy rat model. However, there was a gender difference in the characters of acute seizures and performance of sensory, motor, and learning memory during epileptic remission. There was no gender differences in the hippocampal GABA concentration or expression of synaptic plasticity-related proteins, and thus no evidence was found for the mechanisms underlying the gender differences.

[Keywords] epilepsy; male and female; learning and memory; KA; GABA; EEG; rats

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

癫痫是一种由神经元异常放电导致的慢性脑部疾病,长期发作可造成神经精神损伤,表现为感觉、运动及认知功能受损,且增加焦虑、抑郁等精神疾病的患病风险^[1],女性癫痫患者还可导致生殖内分泌功能紊乱等临床表现^[2]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)已将癫痫列为重点防治的神经精神疾病,并在“2022 ~ 2031 年癫痫和其他神经系统疾病跨部门全球行动计划”中提出:各成员国应尽可能加强对癫痫疾病的预防、治疗和照护^[3]。基于癫痫的不同发作类型,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了 26 种用于治疗临床癫痫的药物。然而,除了视力模糊、低血钙及恶心呕吐等不良反应外,具有细胞色素 P450 酶诱导特性的抗癫痫药物如卡马西平、苯妥英钠等,还可能通过引起高脂血症和/或加速合并用药的代谢而加重冠状动脉和脑血管疾病等合并疾病的病情。育龄期妇女服用广谱抗癫痫药物丙戊酸还可增加出生缺陷和胎儿发育障碍的风险^[4]。因此,深入了解癫痫的发病机

制,并充分关注性别、年龄等因素对癫痫发作和治疗的影响,是癫痫防治领域的重要科学问题。

随着研究的不断深入,脑内神经递质平衡失调在神经系统疾病发生机制中的作用备受关注。其中,抑制性 γ -氨基丁酸(gama aminobutyric acid, GABA)被喻为“指挥性神经递质”^[5],在包括癫痫在内的多种神经系统疾病中起重要作用。兴奋性/抑制性神经传递之间的不平衡,尤其是 GABA 浓度导致兴奋性毒性、癫痫发作和细胞死亡,已被认为是癫痫发生的重要机制^[6-7]。癫痫状态下脑内海马区 GABA 含量减少^[8-9],生酮饮食等多种方法可通过增加脑内 GABA 分泌,提高 GABA/谷氨酸比值从而抑制癫痫发生^[10]。新型抗癫痫药物氨己烯酸为 GABA 的结构类似物,可有效缓解婴儿痉挛症及难治性癫痫的临床症状。然而,氨己烯酸使用过程中出现的视野缺损等不良反应限制了其广泛的推广应用^[11]。因此,深入研究癫痫的发病机制及发作特点,可为癫痫的精准治疗药物研发提供有力支撑。

海马体是参与情绪及学习记忆等高级脑功能

调控的主要脑区之一。研究表明,癫痫可致海马神经元损伤^[12]及突触可塑性受损^[13]。突触可塑性相关蛋白 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 是调节学习记忆的重要蛋白。本课题组前期研究发现,抑郁症^[14]、糖尿病^[15]及阿尔茨海默病^[16]等多种模型动物均存在海马体中 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 的表达下调,且与这些模型动物的情绪及学习记忆功能障碍密切相关。研究表明,颞叶癫痫大鼠海马中 Synapsin-1 及 PSD95 等突触相关蛋白的表达在癫痫急性期显著下调、静默期升高、慢性期下降^[17],提示海马突触可塑性变化是癫痫的神经病理学改变之一。

研究表明,性别因素是影响癫痫发生、发展和治疗结局的重要因素。根据 2019 年 WHO 发布的全球疾病负担(global burden of disease, GBD)报告,男性特发性癫痫致死率为 2.09/100 000 人,女性则为 1.40/10 万人^[18]。在我国,新近发表的数据表明女性癫痫发病率高于男性^[19]。临床观察发现,颞叶癫痫的发作形式存在性别差异,其中先兆、偏侧化和泛化发作常发生于女性患者^[20],并且部分女性患者的癫痫发作会随月经周期的变化而波动^[21]。文献报道,雌激素、孕激素等内源性激素的分泌可影响癫痫的药物治疗,且不同性别对抗癫痫药物的代谢和生物利用度也有所差异^[22]。有研究表明,戊四唑诱导的癫痫大鼠不仅海马体、额叶皮质和脑干神经元变性及血管扩张数量显著高于健康大鼠,而且 GABA(A)受体等多种与突触可塑性调节有关的蛋白表达表现出性别差异^[23]。这些结果表明,性别差异是在癫痫发生机制研究及治疗药物研发过程中需要重点关注的科学问题之一。

本研究拟采用红藻氨酸(kainic acid, KA)腹腔注射的方法建立大鼠癫痫模型,比较不同性别大鼠癫痫行为、脑电图以及缓解期行为学改变的差别,在此基础上观察海马形态学改变及 GABA 浓度的变化,并采用 Western Blot 方法检测海马 Synapsin-1 及 Synaptotagmin 1 的蛋白表达改变,以期揭示 KA 诱导大鼠癫痫发作及长期神经精神损伤的性别差异,为癫痫的发病机制研究及治疗药物开发提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级 SD 大鼠,体重 100 ~ 120 g,雌雄

各 22 只,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供【SCXK(辽)2020-0001】,适应性饲养 2 周后开始实验,实验过程中维持室温 22 ~ 25 ℃、湿度 50% ~ 60%、昼夜明暗交替 12 h/12 h,自由饮食饮水。饲养于安徽医科大学实验动物中心【SYXK(皖)2020-001】。实验经安徽医科大学医学伦理委员会批准(LLSC20221102),严格遵守实验动物使用的 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

红藻氨酸(Med ChemExpress, HY-N2309), γ -氨基丁酸(GABA)ELISA 试剂盒(江莱生物公司, JL-T0731), Synapsin-1 (CST, 5297), Synaptotagmin 1 (CST, 14558), 尼氏染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, G1430), BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, P0010)。

全自动酶标仪(北京安泰格贸易有限公司, 中国), 电泳仪和凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国), 玻片扫描仪(3DHISTECH, 匈牙利), 脑电记录仪器(江苏博恩医疗科技有限公司, 中国), 行为学仪器(上海欣软信息科技有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠癫痫模型的建立、分组与实验设计

SD 大鼠 44 只,雌雄各半,随机分为对照组和模型组。适应性饲养 2 周后,参考文献^[24]方法,腹腔注射 KA(10 mg/kg)诱导癫痫模型。若 1 h 内未观察到 IV ~ V 级癫痫发作,则再次注射 KA(5 mg/kg)并每 30 min 注射 1 次,直到首次发现 IV ~ V 级癫痫发作。将 KA 注射 3.5 h 内每小时至少显示 1 次 IV ~ V 级癫痫发作的实验动物纳入实验。对照组腹腔注射等体积的生理盐水。具体实验流程如图 1 所示。

1.2.2 大鼠急性癫痫行为观察及发作等级评定

癫痫发作等级评定遵循 Racine 等级标准^[25]: 0 级:无抽搐行为; I 级:咀嚼或面部抽搐; II 级:点头或湿狗样抖动; III 级:单侧前肢阵挛; IV 级:双侧前肢阵挛; V 级:跌倒或失去平衡。达到 Racine 评分 IV ~ V 级的大鼠视为癫痫模型制造成功。分别记录各组大鼠潜伏期及 2 h 内发作次数。

1.2.3 大鼠皮层脑电记录

每组随机选取 3 只大鼠,适应性饲养 1 周后,麻醉后剃除头部毛发,固定于脑立体定位仪上,在离后囟前 4.5 mm,离矢状缝两侧 4.0 mm 用马克笔标记,选用 0.8 mm 的牙科钻钻孔并植入电极,缝合并

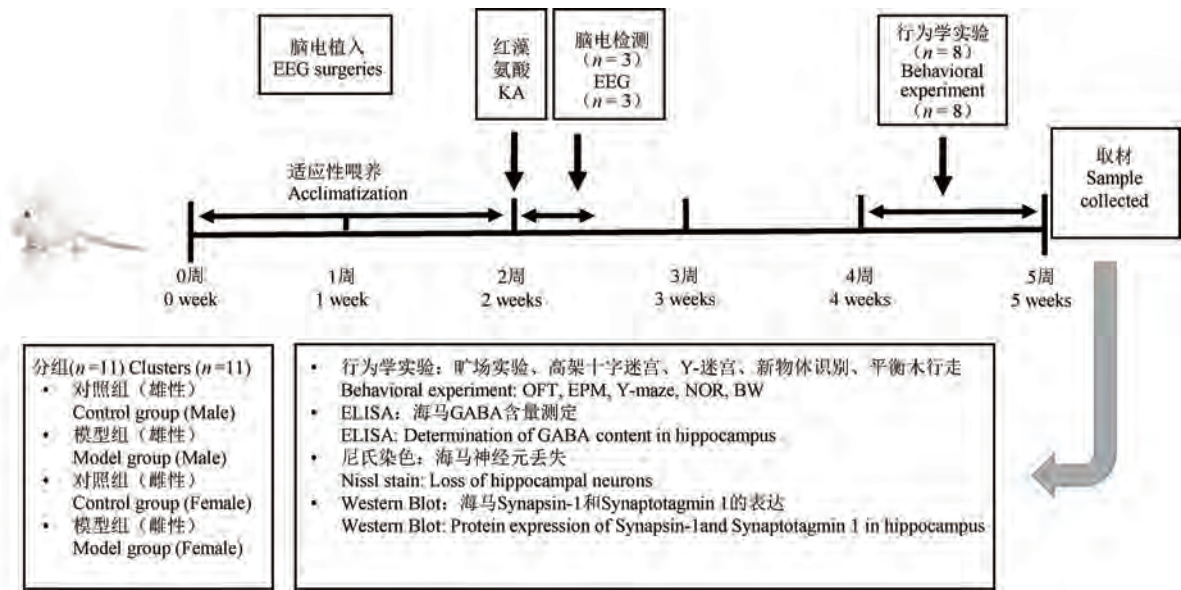


图 1 实验设计流程
Figure 1 Schema of the experimental design

用牙科水泥固定。手术 1 周后腹腔注射 KA 诱导癫痫模型,并连续监测 3 d 脑电变化。脑电信号采用 Matlab R2020b 和 Adobe Photoshop CS 6.0 处理。

1. 2. 4 癫痫缓解期大鼠感觉、运动及学习记忆行为观察

癫痫造模成功后 2 周,系统观察大鼠在癫痫缓解期的感觉、运动及学习记忆能力,每组 8 只。脑电图监测的大鼠不用于行为学实验。所有的行为学实验均在神经行为学实验室完成,由美国 Anymaze 4. 99z 软件记录分析。

(1)旷场实验(open field test, OFT):旷场实验是检测啮齿类动物感觉及一般运动能力的经典行为学范式^[26]。实验装置为 100 cm × 100 cm × 100 cm 的黑色正方体箱,其底面被等分为 16 个大小相等的正方形,正中心 4 格即为中央区域。将大鼠在同一位置面朝壁放入装置,观察其在 5 min 内的自由探索情况,记录并分析其在旷场内的总运动距离、中央区域运动距离和理毛次数。

(2)平衡木行走实验(beam walking test, BW):平衡木行走实验主要用于检测啮齿类动物的感觉、平衡及一般运动能力^[27]。实验装置为一根长 100 cm、宽 2.5 cm 的木条,一端连接于黑色方盒内,离地 100 cm。在为期 2 d 的通过平衡木训练后第 3 天正式实验。实验时将大鼠放在平衡木的另一端,记录大鼠在 60 s 内进入黑色方盒内的时间。若 60 s 内未能到达黑色方盒,时间则记录为 60 s。并根据以下评分标准进行评分^[27],0 分:穿过平衡木,不会跌

倒;1 分:穿过平衡木,且有小于 50% 的路程中出现脚滑现象(即跌倒机会少于 50%);2 分:穿过平衡木,但有大于 50% 的路程中出现脚滑现象(即跌倒机会大于 50%);3 分:能穿过平衡木,但瘫痪侧后肢不能帮助向前移动;4 分:不能穿过平衡木,但可坐在平衡木上面;5 分:将大鼠放在平衡木上会掉落。

(3)高架十字迷宫实验(elevated plus maze test, EPM):高架十字迷宫实验是检测啮齿类动物焦虑程度的经典行为学范式^[28]。实验装置由 2 个开放臂(50 cm × 10 cm)、2 个封闭臂(50 cm × 10 cm)和 1 个中央区(10 cm × 10 cm)组成,离地 50 cm。实验时将每只大鼠头朝开放臂放入中央区域自由探索 5 min,记录并分析其在开放臂和封闭臂的运动情况。

(4)Y-迷宫实验(Y-maze test):Y-迷宫是用于评估啮齿类动物学习记忆能力的常用方法之一^[16]。实验装置由 3 条相互连接的臂(50 cm × 10 cm × 20 cm)组成,将 3 臂随机分为新异臂、起始臂和熟悉臂。第 1 阶段,封闭新异臂,将大鼠从起始臂放入装置内自由探索 10 min。第 2 阶段,24 h 后,打开新异臂,将大鼠从起始臂放入,允许其在 3 个臂中自由探索 5 min,记录大鼠在 3 个臂中的停留时间并分析其对新异臂的优先指数:即大鼠对新异臂的探索时间与总时间的比值。

(5)新物体识别实验(novel object recognition test, NOR):新物体识别实验用于评估啮齿类动物的学习认知能力^[16]。实验装置为 100 cm × 100 cm × 100 cm 的黑色正方体箱,实验分两个阶段:第 1 阶

段箱内放置两个完全相同的物体,将大鼠放入场地自由探索 10 min;第 2 阶段为 24 h 后,将 1 个颜色形状均不相同的新物体替换其中 1 个旧物体,并保持其位置不变,记录大鼠在 5 min 内对新旧物体的探索行为。并按照以下公式计算大鼠的新物体识别指数:新物体识别指数 = 大鼠对新物体的探索时间 / (大鼠对新物体的探索时间 + 大鼠对旧物体的探索时间)。

1.2.5 样本采集

行为学实验结束后 24 h,充分麻醉大鼠后腹主动脉取血,离心分离血清后冻存于 -80 ℃ 冰箱中备用。取脑,冰上迅速分离海马组织,液氮速冻后保存在 -80 ℃ 冰箱。

1.2.6 ELISA 法检测海马组织中 GABA 含量

每组随机选取 3 只参与行为学实验的大鼠海马组织,裂解,BCA 法测定样品的蛋白质浓度,按照 GABA 试剂盒说明书要求检测并计算大鼠海马组织中 GABA 的含量。

1.2.7 尼氏染色

行为学结束后,随机取 3 只参与行为学实验的大鼠脑组织,将其在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,进行乙醇梯度脱水,透明,石蜡包埋,切片(厚度为 4 μm),按照尼氏染液试剂盒说明书要求染色,中性树脂封片,用玻片扫描仪扫描切片。

1.2.8 Western Blot 法检测各组大鼠海马组织中 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 的蛋白表达

每组随机选取 3 只参与行为学实验的大鼠海马组织,加入 RIPA 裂解液裂解,离心,取上清使用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度。各组等量蛋白样品加入 10% SDS-PAGE 凝胶,将蛋白分离,然后转移到 PVDF 膜上,经 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入相应一抗(Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 的一抗工作浓度为 1:1000),4 ℃ 孵育过夜。第 2 天经 TBST 洗涤后,加二抗室温孵育 1 h,超敏 ECL 显影液显影成像。使用 Image J2 (Fiji) 图像分析软件将结果进行蛋白条带的灰度值分析。

1.3 统计学分析

实验结果采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。每小时癫痫样放电次数和发作总次数的组间比较采用独立样本 *t* 检验。皮层场电位振动波幅、行为学、海马 GABA 浓度及突触相关蛋白表达水平的多组之间比较采用单因素方差分析后 LSD 方法两两比较,相关性分析采用 Pearson 检验。检测结果用

平均数 ± 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 KA 诱导大鼠癫痫急性发作的性别差异

腹腔注射 KA 后,雄性及雌性 SD 大鼠均表现出癫痫样行为,包括面部抽搐、咀嚼和湿狗样行为,随后进展为 IV ~ V 级癫痫行为(图 2A)。然而,如图 2B 所示,雌性大鼠比雄性大鼠更早出现癫痫行为,但是 2 h 内发作次数少于雄性大鼠,组间有统计学意义($P < 0.05$)。以每 10 min 为记录单位,观察 4 h 内模型大鼠癫痫发作最高等级,结果发现,KA 注射后 160 min 内,不同性别大鼠癫痫发作等级均随时间推进逐渐增高,但雌性大鼠(90 min)癫痫发作达到 IV ~ V 级的平均时间早于雄性大鼠(130 min)(图 2C)。脑电图检测结果显示(图 2D,2E),与对照组比较,不同性别模型组大鼠均出现大幅度的连续性棘波,并随着癫痫症状加重电位振动波幅逐渐升高,但不同性别之间发作期棘波幅度无显著性差异。

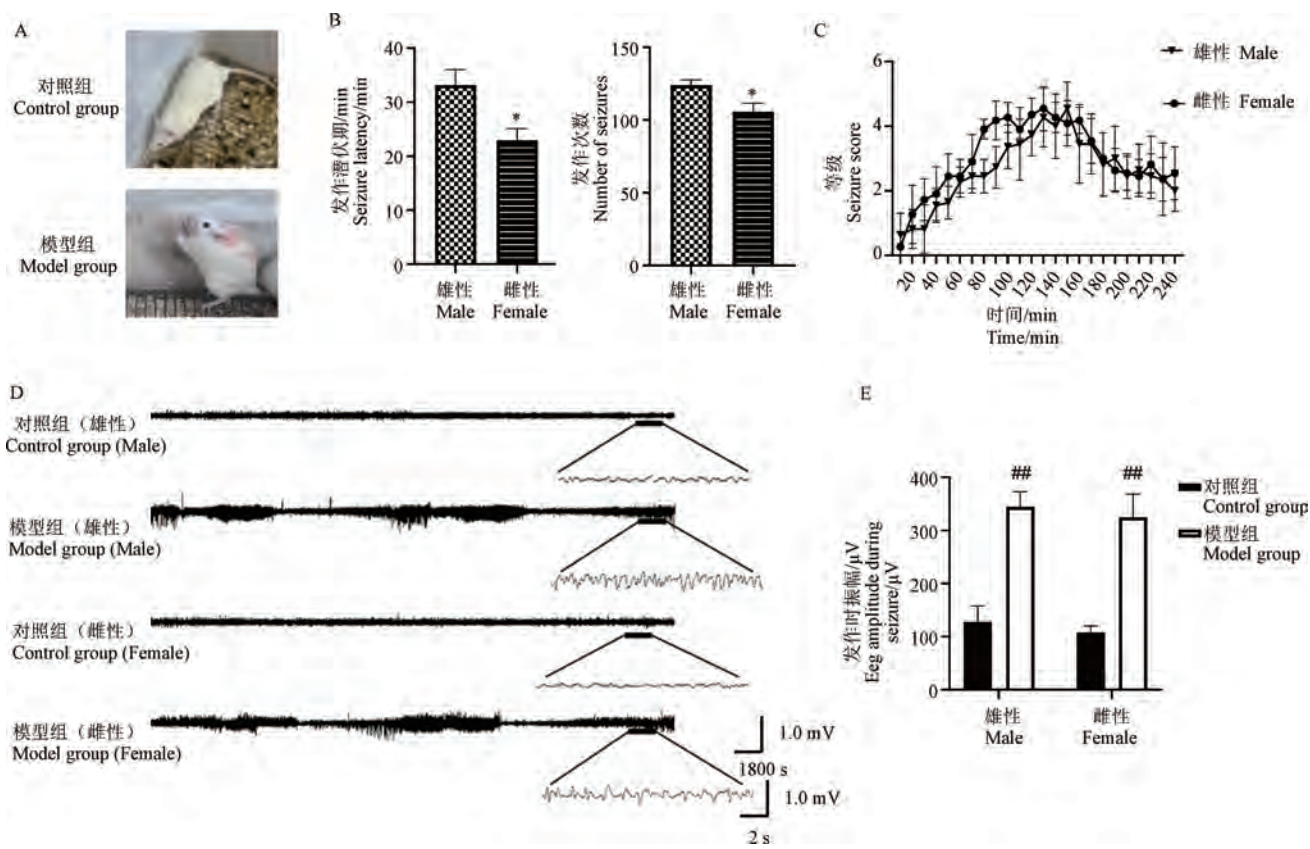
2.2 KA 诱导的不同性别癫痫模型大鼠在发作缓解期的感觉、运动及学习记忆能力变化

2.2.1 不同性别癫痫大鼠的 OFT 和 BW 结果比较

与对照组比较,KA 诱导的癫痫模型大鼠在 OFT 中的总运动距离($P < 0.05$,图 3A)及中央区域运动距离($P < 0.05$,图 3B)均显著增加。虽然模型大鼠的总运动距离无性别差异,但雌性模型大鼠在中央区域的活动距离显著高于雄性($P < 0.05$,图 3B);雌性模型组大鼠理毛次数较对照组显著减少($P < 0.01$,图 3C),并与雄性模型大鼠比较有统计学意义($P < 0.01$)。在 BW 中,与对照组比较,KA 诱导的癫痫模型大鼠评分等级及通过平衡木所需要的时间均显著增加($P < 0.05$,图 3D,3E),提示 KA 腹腔注射的模型大鼠在癫痫缓解期也存在感觉及平衡能力损伤,但不同性别间损伤程度无统计学意义,大鼠在 OFT 中的运动轨迹如图 3F 所示。

2.2.2 不同性别癫痫大鼠的 EPM 实验结果比较

如图 4 所示,虽然雌性癫痫模型大鼠在 EPM 开放臂的探索次数(图 4A)和停留时间(图 4B)有增加趋势,但对照组与模型组之间无统计学意义。雄性癫痫模型大鼠在封闭臂的探索次数显著高于对照组($P < 0.05$,图 4C),且其在封闭臂的停留时间也高于雌性模型大鼠($P < 0.05$,图 4D),大鼠在



注:A:典型癫痫发作;B:癫痫发作潜伏期和2 h 发作次数;C:KA 注射4 h 内每10 min 的最高等级;D:典型皮层脑电信号图;E:不同性别癫痫大鼠发作时的脑电振幅;与对照组相比,## $P < 0.01$;与雄性相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)

图2 KA 腹腔注射诱导大鼠癫痫急性发作的性别差异($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 11$)

Note. A. Epileptic seizure. B. Seizure latency and the number of seizures within 2 h. C. Highest grade of KA every 10 minutes after 4 h injection. D. Typical cortical electroencephalogram. E. Eeg amplitude during seizures in different gender epileptic rats. Compared with the control group, ## $P < 0.01$. Compared with the male group, * $P < 0.05$. (The same in the following figure)

Figure 2 Gender difference in the characters of acute epileptic seizures induced by KA in rats ($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 11$)

EPM 中的运动轨迹如图 4E 所示。

2.2.3 不同性别癫痫大鼠的 Y-迷宫和 NOR 实验结果比较

如图 5A 所示,与同性别的对照组比较,KA 诱导的雄性癫痫大鼠在 Y-迷宫中的新异臂优先指数显著下降,但雌性大鼠则无显著变化。不同性别的癫痫模型大鼠在 NOR 中的新物体识别指数均较同性别的对照组显著下降(图 5B),雌雄大鼠在 Y 迷宫和 NOR 中的运动轨迹如图 5C 和图 5D 所示。

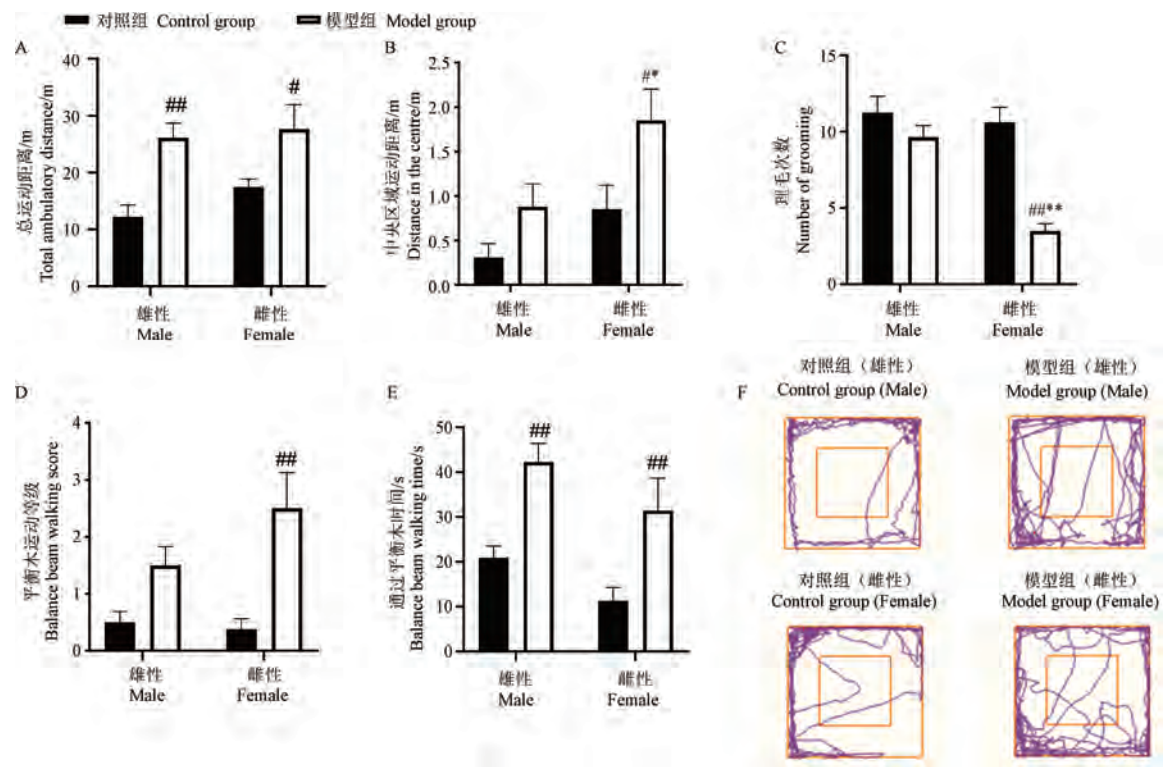
2.3 不同性别癫痫大鼠的海马组织形态及 GABA 含量的比较

ELISA 方法检测各组大鼠海马中 GABA 含量,结果如图 6A 所示,与对照组比较,KA 诱导的雄性及雌性癫痫模型大鼠海马 GABA 含量均显著降低($P < 0.05$),但不同性别模型大鼠的组间差别无统计学意义。Pearson 相关性分析结果表明,海马组织

中 GABA 浓度与大鼠在 OFT 实验中的总运动距离($r = -0.791, P < 0.01$,图 6B)和理毛次数($r = -0.861, P < 0.01$,图 6C),以及在 Y-迷宫中进入封闭臂的次数呈负相关($r = -0.686, P < 0.05$,图 6D)。尼氏染色结果提示,与对照组相比,模型组大鼠海马区尼氏小体数量明显减少、神经元丢失、细胞排列松散及结构不完整(图 6E)。

2.4 不同性别癫痫大鼠海马组织中突触相关蛋白表达的比较

图 7 所示,与对照组相比,KA 诱导的不同性别癫痫大鼠海马组织中 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 的蛋白表达均显著下降($P < 0.05$),但不同性别模型大鼠的组间无统计学意义。Pearson 相关性分析结果表明,海马 GABA 水平与 Synapsin-1($r = 0.562, P = 0.057$)和 Synaptotagmin 1($r = 0.568, P = 0.054$)的蛋白表达之间呈现一定的正相关关系。

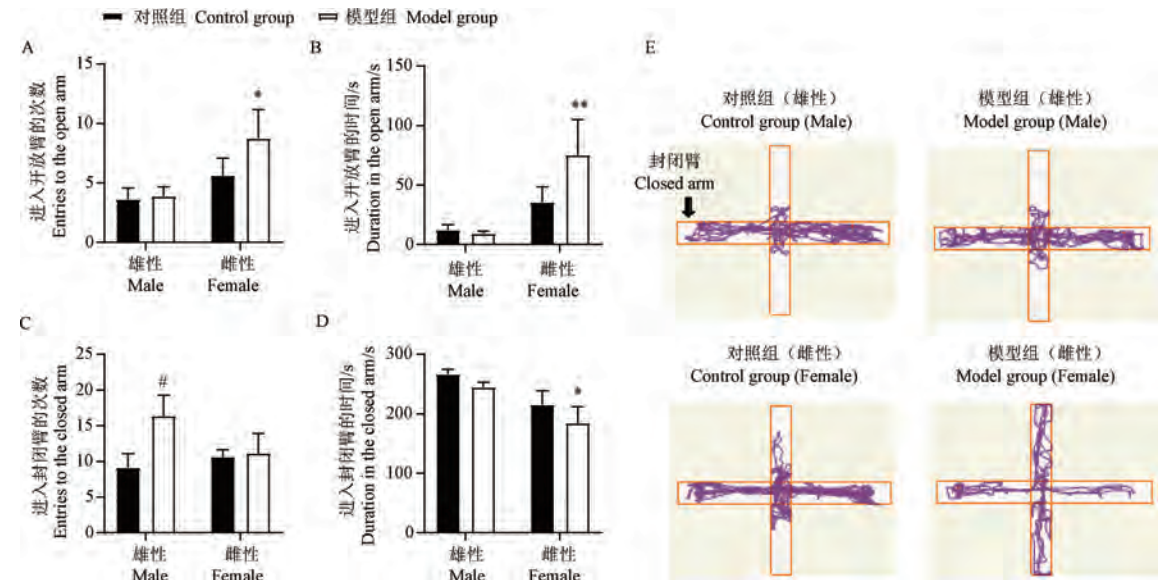


注:A:总运动距离;B:中央区域运动距离;C:理毛次数;D:平衡木运动等级;E:通过平衡木时间;F:行为学实验轨迹图;与对照组相比,[#]*P* < 0.05;与雄性相比,^{**} *P* < 0.01。(下图同)

图 3 KA 诱导的不同性别癫痫大鼠在 OFT 及 BW 中的表现($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

Note. A. Total ambulatory distance. B. Distance in the centre. C. Number of grooming. D. Balance beam walking score. E. Balance beam walking time. F. Typical trajectory. Compared with the control group, [#]*P* < 0.05. Compared with the male group, ^{**} *P* < 0.01. (The same in the following figure)

Figure 3 Gender difference in the behavioral performance of KA-induced epileptic rats in the OFT and BW ($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

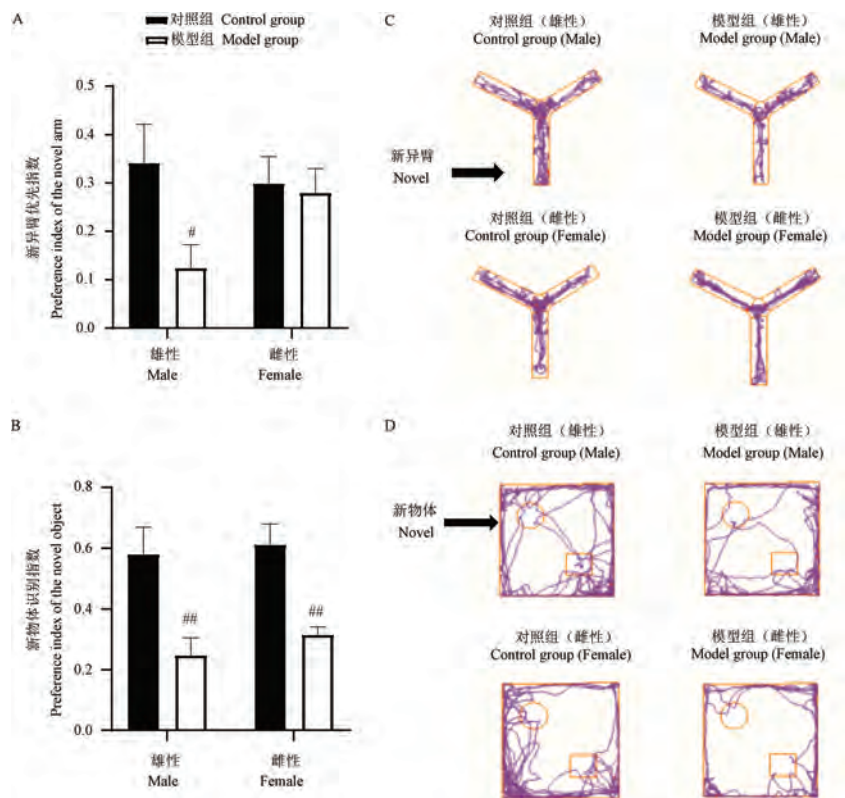


注:A:进入开放臂的次数;B:进入开放臂的时间;C:进入封闭臂的次数;D:进入封闭臂的时间;E:行为学实验轨迹图。

图 4 KA 诱导的不同性别癫痫大鼠在 EPM 中的表现($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

Note. A. Entries to the open arm. B. Duration in the open arm. C. Entries to the closed arm. D. Duration in the closed arm. E. Typical trajectory.

Figure 4 Gender difference in the behavioral performance of KA-induced epileptic rats in the EPM ($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

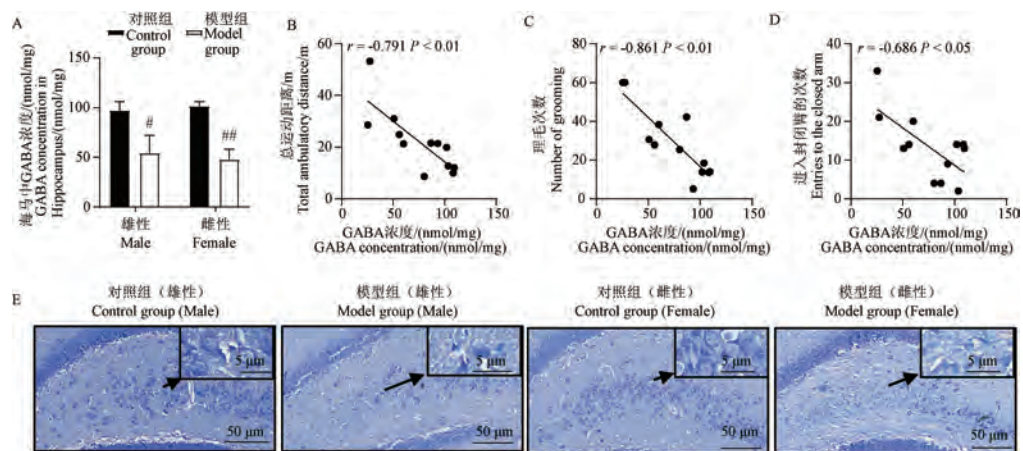


注:A:新异臂优先指数;B:新物体识别指数;C:Y-迷宫行为学实验轨迹图;D:NOR 行为学实验轨迹图。

图 5 KA 诱导的不同性别癫痫大鼠在 Y-maze 和 NOR 中的表现 ($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

Note. A. Preference index of the novel arm. B. Preference index of the novel object. C. Typical trajecctories in the Y-maze. D. Typical trajectories in the NOR.

Figure 5 Gender difference in the behavioral performance of KA-induced epileptic rats in the Y-maze and NOR ($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

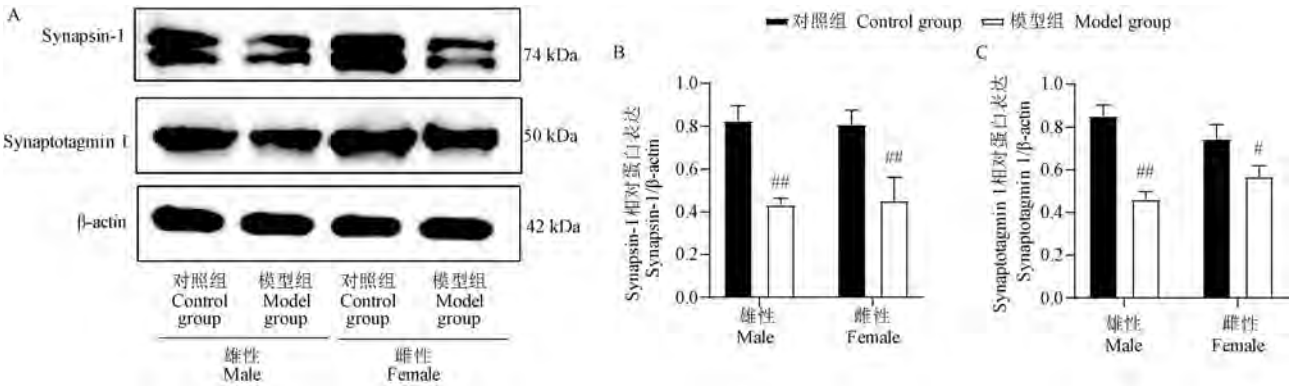


注:A:海马中 GABA 浓度;B:GABA 浓度与总运动距离的相关性;C:GABA 浓度与理毛次数的相关性;D:GABA 浓度与进入封闭臂次数的相关性;E:形态图。

图 6 KA 诱导的不同性别癫痫大鼠海马组织中 GABA 的含量变化及相关性分析

Note. A. GABA concentration in hippocampus. B. Correlation between GABA concentration and total ambulatory distance. C. Correlation between GABA concentration and the number of grooming. D. Correlation between GABA concentration and entries to the closed arm. E. Pathological morphogram.

Figure 6 Changes and correlation analysis of GABA content in hippocampal tissue of KA-induced epileptic rats of different genders



注:A:蛋白条带图;B:Synapsin-1 蛋白表达;C:Synaptotagmin 1 蛋白表达。

图 7 KA 诱导的不同性别癫痫大鼠海马组织中 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 的蛋白表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Note. A. Pattern of protein bands. B. Expression of Synapsin-1. C. Expression of Synaptotagmin 1.

Figure 7 Expression of Synapsin-1 and Synaptotagmin 1 in hippocampal tissues of KA-induced epileptic rats of different genders ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

3 讨论

癫痫是一种严重影响人类健康的神经系统疾病,具有顽固性、易复发和易致残的特点。建立模拟人类癫痫发作特点的动物模型是深入研究癫痫发生机制并开发有效治疗药物的坚实基础。红藻氨酸与谷氨酸(Glu)结构相类似,可作用于α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体,常作为动物实验中的癫痫诱导剂。文献报道,KA可诱导大鼠表现出典型癫痫行为,具体表现为从面部抽搐逐渐发展为前肢阵挛甚至跌倒^[25]。与此相一致,本研究结果表明,KA腹腔注射后雄性及雌性SD大鼠均表现出急性癫痫发作,同时伴有脑电图的棘波表现,进一步证实了KA诱导癫痫动物模型的高效性及可重复性。

除了癫痫发作特征及抗癫痫药物作用特点之外,性别也是临床抗癫痫治疗中必须重点考虑的因素^[3]。研究表明,性别因素不仅影响癫痫的发生以及发展过程,还影响患者对抗癫痫药物的治疗应答。黄体酮、雌二醇和睾酮等性激素可对癫痫行为产生显著影响,其中雄激素如睾酮在皮质酮的介导下增加癫痫易感性,黄体酮戒断引起的兴奋性升高增加了癫痫妇女围经期癫痫的发作频率^[29],17β-雌二醇通过抑制毒蕈碱受体的活性降低癫痫发作的敏感性^[30]。本研究结果表明,KA诱导的癫痫雌性大鼠比对应的雄性大鼠更早发生癫痫样行为、更早到达IV~V级发作,但2h内发作次数相对减少,提示KA诱导的癫痫大鼠在急性发作特点上存在一

定的性别差异,不同性别对癫痫刺激物的敏感性有所差异。

同时癫痫的长期发作,会引起患者运动及学习记忆障碍^[31]。本研究中,与对照组比较,模型组大鼠在癫痫缓解期焦虑抑郁样行为增多、平衡能力失调和学习记忆能力下降,具体表现为癫痫缓解期模型大鼠在OFT中的总运动距离及中央区域运动距离增多且雌性模型大鼠理毛次数减少;在BW中完成任务所需时间及评分增加;在EPM中雄性模型大鼠在封闭臂的探索次数增加;在Y-迷宫及NOR中的新异臂/物体优先指数减少。结合其他研究中癫痫会诱发抑郁焦虑行为并导致学习记忆能力下降的结果^[31],进一步证实癫痫大鼠在发作缓解期仍然存在感觉、运动和学习记忆能力的损伤。并且,不同性别模型大鼠在OFT运动距离、理毛次数及在EPM封闭臂停留时间中的差别,提示KA诱导的癫痫模型大鼠在缓解期情绪及运动行为损伤的具体表现也存在一定的性别差异。

动情周期不同阶段的激素水平波动可能是影响雌性动物行为表现的混杂因素^[32]。然而,人群研究结果表明,女性在月经周期的不同阶段认知表现并无差异^[33],对处在低雌激素水平月经周期阶段的女性补充雌激素并不提高其空间记忆能力,而不同性别受试者补充雌激素后可导致在空间学习任务中导航灵活性的变化^[34]。动物实验结果表明,处于动情周期不同阶段的C57BL/6J小鼠在旷场实验、旋棒实验中的表现相同,而BALB/cByJ小鼠则有所差异,提示动情周期时相对动物行为学的影响存在

种属差异。新近研究表明,虽然酒精成瘾存在性别差异,但动情周期并不影响雌性大鼠的行为表现^[35]。此外,文献报道,SD 大鼠海马位置细胞在整个动情周期中相对稳定^[36]。在本研究中,虽然没有监测雌性大鼠动情周期的动态变化,但在分组前的阴道图片检测提示存在同步化趋势,这与人群研究中观察到的长期同住女性月经周期同步化的现象一致^[37]。

文献报道,KA 诱导的癫痫模型存在海马神经元死亡和氧化应激等病理改变^[38]。其中海马 GABA 能神经元的损伤不仅是导致癫痫发作的神经生物学机制之一^[39],还在学习记忆活动中发挥重要作用^[40]。本研究中,KA 诱导的癫痫模型大鼠不仅表现出缓解期的感觉、运动及学习记忆能力下降,还伴有海马 GABA 水平下降,而且海马 GABA 水平与大鼠在 OFT 及 Y-迷宫实验中的表现密切相关,进一步证实海马 GABA 浓度下降及 GABA 能神经元损伤是导致癫痫发作及其导致的慢性脑损伤的主要神经生物学机制。

海马的突触可塑性是维持大脑结构和功能完整性的重要调节机制。研究表明,癫痫患者认知功能的降低与海马突触可塑性降低,尤其是 Synaptotagmin 1 的失活密切相关^[41]。本研究结果表明,KA 诱导的癫痫大鼠不仅海马体中 GABA 水平下降,且海马体中 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 蛋白表达降低,再次提示海马体结构和功能的改变是癫痫长期慢性脑损伤的主要神经生物学机制之一。Person 相关检验结果提示,大鼠海马 GABA 浓度与 Synapsin-1 和 Synaptotagmin 1 蛋白表达之间呈正相关关系。除去小样本量的影响,这些结果表明导致海马突触可塑性损伤的原因是复杂且多方面的,海马 GABA 水平下降并非是唯一原因。与此相一致,DOĞANYİĞİT 等^[23]认为,调节神经活素和 GluA1 相互作用的机制失衡是导致实验性癫痫模型突触可塑性损伤的机制之一,且相关调节蛋白的表达存在性别差异。虽然存在造模方法的区别,但这些结果提示癫痫发生机制的异质性特点。因此,在癫痫发病机制及治疗靶标的探索过程中需要充分考虑包括性别在内的众多影响因素,才能实现精准治疗和个体化治疗。

综上所述,本研究结果表明,KA 腹腔注射可诱导不同性别 SD 大鼠表现出急性癫痫发作及缓解期感觉、运动及学习记忆能力异常,且存在一定的性

别差异。虽然不同性别癫痫大鼠海马组织中 GABA 水平下降及突触可塑性相关蛋白表达均较对照组下降,这可能是导致癫痫发作及慢性神经精神损伤的可能机制,但这并不能完全解释癫痫发作的性别差异。导致癫痫发生和药物治疗性别差异的机制需要更加深入的动物实验和临床研究进一步探究。

本文仍存在一定的局限性,首先,本研究中只使用了一种癫痫模型,在未来的机制探索中需要采用更多类型的动物模型来验证本研究结果。其次,虽然本研究结果与人群结果部分一致,但鉴于种属差异性,需要开展更严谨的临床研究进一步探究癫痫发生的性别差异及潜在机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] 代梦瑶, 王玉, 周农. 成人癫痫患者认知情绪调节策略及其对生活质量的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(6): 976-981.
DAI M Y, WANG Y, ZHOU N. Cognitive emotion regulation strategies and its influence on quality of life in adult epileptics [J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(6): 976-981.
- [2] 石青. 丙戊酸钠、拉莫三嗪对癫痫大鼠动情周期、性激素水平和卵巢形态的影响 [D]. 银川: 宁夏医科大学; 2013.
SHI Q. Effects of sodium valproate and lamotrigine on estrous cycle, sex hormone level and ovarian morphology in epileptic rats [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University; 2013.
- [3] KANNER A M, BICCHI M M. Antiseizure medications for adults with epilepsy: a review [J]. JAMA, 2022, 327(13): 1269-1281.
- [4] GOTLIB D, RAMASWAMY R, KURLANDER J E, et al. Valproic acid in women and girls of childbearing age [J]. Curr Psychiatry Rep, 2017, 19(9): 58.
- [5] GROVER S, NARANG R K, SINGH S. GABA-transaminase: a key player and potential therapeutic target for neurological disorders [J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2024, 24(1): 57-67.
- [6] SARLO G L, HOLTON K F. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: a review [J]. Seizure, 2021, 91: 213-227.
- [7] OLIVEIRA R N, CARVALHINHO-LOPES P S, CARVALHO C P F, et al. Neuroprotective effects of platinum nanoparticle-based microreactors in bicuculline-induced seizures [J]. Behav Brain Res, 2024, 465: 114956.
- [8] LEVITE M, GOLDBERG H. Autoimmune epilepsy-novel multidisciplinary analysis, discoveries and insights [J]. Front Immunol, 2021, 12: 762743.
- [9] 苗静琨, 陈启雄, 吴小玫, 等. 石菖蒲 α -细辛醚对 Lithium-Pilocarpine 癫痫模型 GABA 系统的调控作用 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8): 1067-1071.
MIAO J K, CHEN Q X, WU X M, et al. Effect of α -asarone on regulation of GABA system in the Lithium-Pilocarpine model of

- epilepsy [J]. Chin Pharmacol Bull, 2011, 27 (8): 1067–1071.
- [10] QIAO Y N, LI L, HU S H, et al. Ketogenic diet-produced β -hydroxybutyric acid accumulates brain GABA and increases GABA/glutamate ratio to inhibit epilepsy [J]. Cell Discov, 2024, 10(1): 17.
- [11] GAILY E. Vigabatrin monotherapy for infantile spasms [J]. Expert Rev Neurother, 2012, 12(3): 275–286.
- [12] 党连荣. 海马硬化致颞叶癫痫的临床及磁共振成像诊断 [J]. 癫痫杂志, 2022, 8(4): 316–319.
- DANG L R. The clinic and Magnetic resonance imaging diagnostic in patients with temporal lobe epilepsy by hippocampal sclerosis [J]. J Epilep, 2022, 8(4): 316–319.
- [13] 李则龙, 刘澍玮, 杨洋, 等. 颞叶癫痫模型大鼠行为及海马突触蛋白的表达变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2023, 39(4): 384–392.
- LI Z L, LIU S W, YANG Y, et al. Changes in behavior and hippocampal synaptic protein expression in temporal lobe epilepsy model rats [J]. Chin J Neuroanat, 2023, 39(4): 384–392.
- [14] FANG K, LI H R, CHEN X X, et al. Quercetin alleviates LPS-induced depression-like behavior in rats *via* regulating BDNF-related imbalance of copine 6 and TREM1/2 in the hippocampus and PFC [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1544.
- [15] GAO X, WEI Y, SUN H, et al. Role of Bmal1 in type 2 diabetes mellitus-related glycolipid metabolic disorder and neuropsychiatric injury: involved in the regulation of synaptic plasticity and circadian rhythms [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(8): 4595–4617.
- [16] LIU S, FAN M, XU J X, et al. Exosomes derived from bone-marrow mesenchymal stem cells alleviate cognitive decline in AD-like mice by improving BDNF-related neuropathology [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 35.
- [17] 杨洋. GPER1 对颞叶癫痫大鼠海马突触可塑性调节的研究 [D]. 银川: 宁夏医科大学; 2020.
- YANG Y. The Research of GPER1 regulates synaptic plasticity in hippocampus of temporal epilepsy rats [D]. Yinchuang: Ningxia Medical University; 2020.
- [18] GBD EPILEPSY COLLABORATORS. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990 ~ 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet Neurol, 2019, 18(4): 357–375.
- [19] ZHENG G, LI F, CHEN Y, et al. An epidemiological survey of epilepsy in tropical rural areas of China [J]. Epilepsia Open, 2021, 6(2): 323–330.
- [20] JANSZKY J, SCHULZ R, JANSZKY I, et al. Medial temporal lobe epilepsy: gender differences [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004, 75(5): 773–775.
- [21] REDDY D S. The neuroendocrine basis of sex differences in epilepsy [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2017, 152: 97–104.
- [22] HOPHING L, KYRIAKOPOULOS P, BUI E. Sex and gender differences in epilepsy [J]. Int Rev Neurobiol, 2022, 164: 235–276.
- [23] DOĞANYIGIT Z, OKAN A, YILMAZ S, et al. Gender-related variation expressions of neuroplastin TRAF6, GluA1, GABA(A) receptor, and PMCA in cortex, hippocampus, and brainstem in an experimental epilepsy model [J]. Synapse, 2024, 78(2): e22289.
- [24] WEST P J, SAUNDERS G W, BILLINGSLEY P, et al. Recurrent epileptiform discharges in the medial entorhinal cortex of kainate-treated rats are differentially sensitive to antiseizure drugs [J]. Epilepsia, 2018, 59(11): 2035–2048.
- [25] QIN Z, SONG J, LIN A, et al. GPR120 modulates epileptic seizure and neuroinflammation mediated by NLRP3 inflammasome [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 121.
- [26] GAO X R, CHEN Z, FANG K, et al. Protective effect of quercetin against the metabolic dysfunction of glucose and lipids and its associated learning and memory impairments in NAFLD rats [J]. Lipids Health Dis, 2021, 20(1): 164.
- [27] SUN J, LI H, JIN Y, et al. Probiotic *Clostridium butyricum* ameliorated motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease via gut microbiota-GLP-1 pathway [J]. Brain Behav Immun, 2021, 91: 703–715.
- [28] CHEN X X, XU Y Y, WU R, et al. Resveratrol reduces glucolipid metabolic dysfunction and learning and memory impairment in a NAFLD rat model: involvement in regulating the imbalance of nesfatin-1 abundance and copine 6 expression [J]. Front Endocrinol, 2019, 10: 434.
- [29] VAN LUIJTELAAR G, ONAT F Y, GALLAGHER M J. Animal models of absence epilepsies: what do they model and do sex and sex hormones matter? [J]. Neurobiol Dis, 2014, 72: 167–179.
- [30] SCHARFMAN H E, MACLUSKY N J. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: a preclinical perspective [J]. Neurobiol Dis, 2014, 72: 180–192.
- [31] 韦理萍, 梁建平, 蔡伦. 癫痫相关性抑郁动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 113–116.
- WEI L P, LIANG J P, CAI L. Progress in research on animal models of epilepsy-associated depression [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 113–116.
- [32] VAN GOETHEM N P, RUTTEN K, VAN DER STAAY F J, et al. Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle [J]. Behav Brain Res, 2012, 232(2): 323–334.
- [33] GORDON H W, LEE P A. No difference in cognitive performance between phases of the menstrual cycle [J]. Psychoneuroendocrinology, 1993, 18(7): 521–531.
- [34] JOUE G, NAVARRO-SCHRÖDER T, ACHTZEHN J, et al. Effects of estrogen on spatial navigation and memory [J]. Psychopharmacology, 2024, 241(5): 1037–1063.
- [35] TOIVAINEN S, XU L, GOBBO F, et al. Different mechanisms underlie compulsive alcohol self-administration in male and female rats [J]. Biol Sex Differ, 2024, 15(1): 17.
- [36] TROPP J, FIGUEIREDO C M, MARKUS E J. Stability of hippocampal place cell activity across the rat estrous cycle [J].

Hippocampus, 2005, 15(2): 154–165.

[37] SIDDIQUI N I, CHINCHOLE S, KHAN S A, et al. Study of menstrual cycle synchrony in female medical students sharing common accommodation [J]. J Family Med Prim Care, 2023, 12(11): 2922–2926.

[38] AHN Y J, SHIN H J, JEONG E A, et al. Exendin-4 pretreatment attenuates kainic acid-induced hippocampal neuronal death [J]. Cells, 2021, 10(10): 2527.

[39] BAE S, LIM H K, JEONG Y, et al. Deep brain stimulation of the anterior nuclei of the thalamus can alleviate seizure severity and induce hippocampal GABAergic neuronal changes in a pilocarpine-induced epileptic mouse brain [J]. Cereb Cortex, 2022, 32(24): 5530–5543.

[40] TZILIVAKI A, TUKKER J J, MAIER N, et al. Hippocampal GABAergic interneurons and memory [J]. Neuron, 2023, 111(20): 3154–3175.

[41] HARPER C B, SMALL C, DAVENPORT E C, et al. An epilepsy-associated SV2A mutation disrupts synaptotagmin-1 expression and activity-dependent trafficking [J]. J Neurosci, 2020, 40(23): 4586–4595.

[收稿日期] 2023–09–06

《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。



郑涵文,刘昕玥,赵海燕,等. 基于网络药理学和实验验证探究酸枣仁复方治疗抑郁症的作用机制 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 901-912.

ZHENG H W, LIU X Y, ZHAO H Y, et al. Exploring the mechanism of action of sour jujube nut compound formula for depression based on network pharmacology and experimental validation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 901-912.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.009

基于网络药理学和实验验证探究酸枣仁复方治疗抑郁症的作用机制

郑涵文^{1,2},刘昕玥¹,赵海燕^{1,3},王佳音^{1,2},罗福龙⁴,范蓓¹,
Alberto Carlos Pires Dias⁵,王凤忠^{1*},王琼^{1,2*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;2. 西南医科大学附属中医医院中葡
中医药国际合作中心,四川 泸州 646000;3. 西南医科大学附属中医医院脾胃病科,
四川 泸州 646000;4. 首都医科大学宣武医院急诊科,北京 100053;
5. 葡萄牙米尼奥大学生物系中葡药食植物资源研究中心,葡萄牙 布拉加 4710-057)

【摘要】 目的 通过网络药理学技术预测酸枣仁复方(Ziziphi spinosae semen formula,ZSSF)对于抑郁症的关键作用靶点,并通过利血平诱导的抑郁斑马鱼模型验证酸枣仁复方治疗抑郁症的作用机制。方法 通过 TCMSPP 数据库检索酸枣仁复方的药物作用靶点,利用 UniProt 数据库对靶点名称进行校正。采用 GeneCards、OMIM、NCBI 数据库检索抑郁症相关靶点,并对 3 个数据库的靶点结果进行汇总去比重。利用 STRING 数据库预测了交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)信息,利用 Metascape 数据库构建进行富集研究,并利用微生信对 KEGG 和 GO 的富集结果实现了可视化。通过利血平诱导的斑马鱼抑郁模型进行行为学实验和 RT-qPCR 实验,验证酸枣仁复方对抑郁症的治疗作用。结果 筛选出抑郁症与酸枣仁复方的交集靶点 188 个,蛋白质-蛋白质相互作用结果显示,酸枣仁复方抗抑郁主要作用于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血清白介素 2(IL-2)、血清白介素 6(IL-6)、血清白介素 1 β (IL-1 β)、血清白介素 10(IL-10)等靶点,KEGG 通路富集分析表明,酸枣仁复方通过 TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、cGMP-PKG 信号通路等多种信号通路发挥其治疗抑郁症的作用。动物实验结果显示,与利血平组相比,酸枣仁复方高、中、低剂量组斑马鱼在声光刺激下的运动距离显著延长($P < 0.05$),运动速度显著增快($P < 0.01$)。RT-qPCR 结果显示,与利血平组相比,酸枣仁复方高、中、低剂量给药组斑马鱼脑组织中 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-1 β 、IL-10 mRNA 表达水平上调($P < 0.001$)。结论 酸枣仁复方通过多成分、多靶点发挥抗抑郁作用,且其抗抑郁作用可能与抑制炎症因子的表达有关。

【关键词】 网络药理学;酸枣仁复方;抑郁症;炎症因子

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2024)07-0901-12

Exploring the mechanism of action of sour jujube nut compound formula for depression based on network pharmacology and experimental validation

【基金项目】新疆建设兵团 NGHJG 项目(2023AA503),高端外国专家引进计划(G2022051012L),国家重点研发计划(2021YFD1600100),泸州市应用基础研究项目(2018LZXNYD-ZK32)。

Funded by NGHJG Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2023AA503), High-End Foreign Experts Introduction Program (G2022051012L), National Key Research and Development Program (2021YFD1600100), Luzhou Applied Basic Research Project (2018LZXNYD-ZK32).

【作者简介】郑涵文,女,硕士,研究方向:中药神经药理与航天医学。Email:zhenghanwen0524@163.com

【通信作者】王琼,女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理与航天医学。Email:luyiwangqiong@163.com;

王凤忠,男,博士,研究员,研究方向:农产品多维品质评价及综合利用研究。Email:wangfengzhong@sina.com。

* 共同通信作者

ZHENG Hanwen^{1,2}, LIU Xinyue¹, ZHAO Haiyan^{1,3}, WANG Jiayin^{1,2}, LUO Fulong⁴,
FAN Bei¹, Alberto Carlos Pires Dias⁵, WANG Fengzhong^{1*}, WANG Qiong^{1,2*}

- (1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of
Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Department of Spleen and Stomach Diseases,
the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;
4. Emergency Department, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; 5. Sino-PT
Research Center for Medicinal and Food Plant Resources, Department of Biology, University of Minho,
Braga 4710-057, Portugal)

Corresponding author: WANG Qiong. E-mail: luyiwangqiong@163.com;
WANG Fengzhong. E-mail: wangfengzhong@sina.com

【Abstract】 Objective In this study, we aimed to use network pharmacology techniques to predict the key targets of a prescription of Ziziphi spinosae semen formula (ZSSF) compound for depression, and to verify its mechanism of action using a zebrafish model of rifampicin-induced depression. **Methods** The drug targets of ZSSF were retrieved from the TCMSP database, and the target names were corrected using the UniProt database. Depression-related targets were identified using the GeneCards, OMIM, and NCBI databases. Protein-protein interaction information for the shared targets was predicted using the STRING database. The collected data were then analyzed using the Metascape database to determine GO and KEGG pathway enrichment, and the result were visualized using microbotics. Behavioral experiments and reverse-transcription quantitative PCR experiments were conducted to verify the therapeutic effects of ZSSF on a zebrafish depression model induced by risperdal. **Results** 188 targets were screened to find the interactions between depression and ZSSF. The protein-protein interaction result showed that ZSSF primarily targeted TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1 β , and IL-10 to produce its antidepressant effect. KEGG pathway enrichment analysis revealed that ZSSF exerted its effects on depression through various signaling pathways, including the TNF, PI3K-Akt, and cGMP-PKG signaling pathways. The result of the animal experiments showed that the treatment groups given high, medium, and low doses of ZSSF exhibited significant improvements in movement distance under acoustic and light stimulation compared with the model group ($P < 0.05$). The speed of movement of the treatment groups was also significantly faster ($P < 0.01$). Additionally, the mRNA expression levels of TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1 β , and IL-10 were up-regulated in the brain tissues of zebrafish in the high-, medium-, and low-dosage groups of ZSSF compared those in the model group ($P < 0.001$). **Conclusions** ZSSF exerts its antidepressant effect through multiple components and targets, and its antidepressant effects may be associated with its inhibition of inflammatory factors.

【Keywords】 network pharmacology; Ziziphi spinosae semen formula; depression; inflammatory factor
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抑郁症是一种慢性、复发性的情感问题综合症,具体表现为明显而持久的情绪低落,近年来其患病率呈上升趋势,在世界范围内造成了重大的经济负担^[1]。现今常见的抑郁症治疗方法主要有药物干预和心理干预两种,其中药物干预为主要的治疗方法^[2]。然而研究表明,氟西汀、氟伏沙明、瑞波西汀等现今常用的一线抗抑郁药物疗效低而且副作用明显^[3],因此开发疗效更高、副作用更小的新型抗抑郁药至关重要。

中医作为一种传统的补充医学,其方药已被证实对抑郁症及其临床并发症的治疗具有显著效果^[4]。四逆散作为《伤寒论》的经典方剂,被证实可

以通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、PI3K-Akt 信号通路 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K-Akt) 等信号通路的作用治疗抑郁症^[5-6]。一项研究也表明,《伤寒论》名方小柴胡汤及其类方均可以辩证治疗抑郁症^[7]。酸枣仁复方 (Ziziphi spinosae semen formula, ZSSF) 由酸枣仁、茯苓、当归、百合、玫瑰花五味中药配伍组成,具有宁心安神、抗抑郁的作用,是《金匱要略》经典方剂酸枣仁汤的类方。方中酸枣仁、茯苓、百合宁心安神,当归活血通络,玫瑰花疏肝解郁,五味药配伍既可宁心安神,又可疏解肝郁,针对抑郁症进行治疗。与化学药物相比,酸枣仁复方的

作用是由中药配伍的整体功能介导的。中药方剂具有成分复杂、多靶点的特点,为开发优质抗抑郁药物提供了可能,但是也存在无法阐明其作用机制的问题。网络药理学是以网络生物学和多方位药理学为基础,全面研究药物对病情的干预与作用,并遵循传统中药复方多成分、多渠道、多靶点地防治病情的基本原则^[8-9]。因此本研究将酸枣仁复方从网络药理学角度筛选抑郁症作用靶点,而后采用体内实验逐步证明了酸枣仁复方的作用机理,为后期研究提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

斑马鱼为中国农业科学院斑马鱼实验室自主孵化后养殖【SYXK(京)2023-0048】,种鱼共 20 条,10 条雄性、10 条雌性,为 3 ~ 5 个月大野生型 AB 成鱼,购自国家斑马鱼资源中心。饲养于购自上海海盛生物技术有限公司的水箱中,水箱采用循环水系统。体系水的氯化钾(KCl)值为 0.05 g/L、碳酸氢钠(NaHCO₃)值为 0.025 g/L、氯化钠(NaCl)值为 3.5 g/L、氯化钙(CaCl₂)值为 0.1 g/L。斑马鱼胚胎用 Holt 培养液(15 mmol/L NaCl、0.67 mmol/L KCl、0.03 mmol/L NaHCO₃、0.90 mmol/L CaCl₂, pH = 7.2)孵育。饲养环境:斑马鱼(胚胎)维持在 14 h 明/10 h 暗的光周期下,相对湿度 50% ~ 80%,温度控制在 28 ~ 32 ℃。所有动物实验均通过中国农业科学院农产品加工所实验动物伦理委员会审批(2023-0412),实验动物饲养和实验过程均遵循 3R 原则。

1.1.2 数据库与软件

TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、UniProt 数据库(<https://uniprot.org>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)、NCBI 数据库(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov>)、STRING 数据库(<http://string-db.org/>)、Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step>)、venny 2.1.0 软件、Cytoscape 3.9.1 软件。

1.1.3 主要试剂与仪器

北京市四方中药饮片有限公司购买的酸枣仁复方相关药材,经中国农业科学院农产品加工所中试实验室提取;利血平(上海源叶生物科技有限公司,Reserpine,纯度 ≥ 98%);盐酸氟西汀(美国

MCE 公司,Fluoxetine hydrochloride,纯度 ≥ 99.82%);二甲基亚砜(DMSO,北京酷来搏科技有限公司);RNA 萃取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司);cDNA 反转录试剂盒(普洛麦格(北京)生物技术有限公司);引物(擎科生物科技公司(中国,北京))。美国 MolecuLar Devices 公司提供的酶标仪;美国 Bio-Rad 公司提供的实时荧光定量 PCR 仪;德国 Eppendorf 公司提供的低温高速离心机和诺达思(北京)信息技术有限责任公司提供的斑马鱼行为轨迹跟踪系统。

1.2 方法

1.2.1 网络药理学

(1)酸枣仁复方活性成分和作用靶点筛选:在 TCMSP 数据库中筛选酸枣仁复方的活性化合物和靶点,采用 UniProt 数据库对靶点名称进行校正。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) ≥ 30%、药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 为标准,筛选酸枣仁复方的活性化合物成分和相关靶点,完成酸枣仁复方活性成分数据库构建。

(2)抑郁症与药物交叉靶点:使用关键词“depression”,采用 Genecards、OMIM、NCBI 数据库检索“Gene Map”,导出并合并相应数据,得到抑郁症相关靶点。然后通过 R4.1.0 软件获取抑郁症与酸枣仁复方之间的潜在靶点。采用 venny 2.1.0 绘制 Venn 图,获取药物成分和疾病的交集靶点。采用 Cytoscape3.9.1 构建成分靶点网络图。

(3)蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的绘制:将抑郁症和酸枣仁复方的潜在靶点引入 STRING 数据库,构建 PPI 网络。蛋白质类型设置为“Homo sapiens”。将隐藏的断开连接的节点从网络中移除,并将所需的最小交互分数设置为 0.900 的高置信度,以获得 PPI 数据。然后将 PPI 数据导入 Cytoscape 3.9.1 构建 PPI 图,并计算网络的拓扑参数。通过度中心性(degree centrality, DC)、接近中心性(closeness centrality, CC)和中间中心性(betweenness centrality, BC)3 个关键拓扑参数对核心目标进行过滤,这 3 个参数的值表明了网络中相关节点的重要性和影响力。截止值设为中位数。利用 Cytoscape 中的分子复合物检测算法(molecular complex detection, MCODE)插件对 PPI 网络进行过滤。其中,degree 设为 2, k-core 设为 2, max depth 设为 0.2, maximum depth 设为 100。

(4)GO 富集分析和 KEGG 通路分析:采用

Metascape 数据库进行富集分析, 微生信对 KEGG 和 GO 富集结果进行可视化。其中, 最小重叠设置为 3, P 值的截止值设置为 0.01, 最小富集设置为 1.5。GO 富集和 KEGG 通路分析项目按 $\log P$ 值升序排序, 并通过生物信息学服务器绘制相应的气泡图。将潜在靶点提交给 R4.1.0 软件, 通过 Bioconductor 平台绘制靶点的通路图。为了进行化合物、靶点和通路之间的可视化, 利用 Cytoscape 3.9.1 绘制药物成分靶点网络图, 并计算网络的拓扑参数。

1.2.2 实验验证

(1) 斑马鱼抑郁模型的建立及分组: 用 180 枚



图 1 实验流程

Figure 1 Flowchart of the experiment

(2) 斑马鱼声光刺激行为学: 斑马鱼在普通光照条件下适应 20 min。数据整合周期为 30 s。设置实验 100% 光照强度 (8000 Lux), 时长 20 min。斑马鱼在声音强度为 0 Hz 的条件下适应 20 min。数据整合周期为 30 s。设置实验 100% 声音强度 (440 Hz), 时长 20 min。

(3) 基因表达量测定: 末次行为学实验结束后, 将斑马鱼幼鱼处死后迅速断头, 于冰上截取脑部, 标记后置于液氮, 取材完成后于 -80°C 条件下保存组织。为确定酸枣仁复方对抑郁症的治疗作用, 行为学实验结束后 24 h 内按照 RT-qPCR 说明书流程从斑马鱼脑组织中提取总 RNA、反转录和实时荧光定量检测斑马鱼脑中炎症因子标志物如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血清白细胞介素 2 (IL-2)、血清白细胞介素 6 (IL-6)、血清白细胞介素 1 β (IL-1 β)、血清白细胞介素 10 (IL-10) 的表达量。引物序列如表 1 所示。

1.3 统计学分析

该实验统计学分析使用 SPSS 20.0 软件, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异统计显著性采用单因素方差分析表示, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 酸枣仁复方的靶点和活性成分

在 TCMSP 数据库通过 $\text{OB} \geq 30\%$ 、 $\text{DL} \geq 0.18$

斑马鱼胚胎进行实验研究, 将胚胎随机分为 6 组: 对照组、利血平组 (4 mg/L)、盐酸氟西汀组 (6 mg/L)、酸枣仁复方低剂量组 (3.0 mg/L)、酸枣仁复方中剂量组 (6.0 mg/L) 和酸枣仁复方高剂量 (12.0 mg/L) 组, 培养箱内发育 24 h 后进行实验。将胚胎置于 6 孔板中孵育, 每孔 30 枚胚胎, 重复 3 次。将利血平、氟西汀和酸枣仁复方提取物分别溶解于 1 mL DMSO, 为排除药物溶剂影响, 6 组分别加入同等含量的 DMSO。各组胚胎每天在固定时间进行换液, 每天 1 次, 连续 7 d, 建立利血平抑郁模型。实验第 7 天 20:00 前进行行为学检测, 实验流程见图 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR	
基因 Genes	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
β -actin	F: ATCTTGACTGAGCGCGTTAT
	R: TCATGGATGCCAGCAGACTC
TNF- α	F: ACCAGGCCTTTCTTCAGGT
	R: TTGCTCCGTAGGATTCAG
IL-2	F: CGACCTGACTCTCTACACGC
	R: CGGTTGCCTCGTATTCCTCA
IL-6	F: AGACCGCTGCCTGTCTAAA
	R: TTTGATGTCGTCACCAGGA
IL-10	F: CTTTAAAGCACTCCACAACCCAA
	R: CTTCGATTCACCATATCCCGCTT
IL-1 β	F: CATAAACACCTTCGAGTCCG
	R: TCTTTCCTGTCATCTCCACCA

的条件筛选出 44 个酸枣仁化学成分、27 个茯苓化学成分、81 个百合化学成分、65 个当归化学成分、222 个玫瑰花化学成分。酸枣仁复方活性成分基本信息见表 2。采用 Pubchem 检索酸枣仁复方成分结构, 将结构文件导入 SwissTargetPrediction 数据库预测成分靶点, 筛选出 439 个靶点。从 GeneCards 数据库中获得 15 686 个抑郁症靶点, 共获得 188 个药物-疾病交叉靶点作为进一步研究的潜在靶点 (见表 3)。

2.2 “药物-活性化合物-潜在目标”网络

在 Jvenn 服务器和 Bioinformatics 服务器上绘制

表 2 酸枣仁复方的活性成分基本信息表

Table 2 Basic information of the active ingredients of ZSSF

化合物编号 Mol-ID	化合物 Compound	来源 Source
MOL002039	类视黄醇 X 受体 RXR-alpha	百合 Lilium brownie var
MOL000449	孕酮受体 PGR	百合、茯苓、玫瑰花 Lilium brownie var, Poria cocos (Schw.), Rosa rugosa Thunb.
MOL000358	环加氧酶 1 PTGS1	百合、当归 Lilium brownie var, Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL000358	环加氧酶 2 PTGS2	百合、当归 Lilium brownie var, Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL009449	盐皮质激素受体抗体 NR3C2	百合 Lilium brownie var
MOL000358	热休克蛋白 HSP90AA1	当归 Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL000358	对氧磷酶 1 PON1	当归 Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL000358	人微管相关蛋白 MAP2	当归 Angelica sinensis (Oliv.) Diels
MOL001522	环加氧酶 1 PTGS1	酸枣仁 Semen Ziziphi spinosae
MOL001522	人类重组蛋白 1 CHRM1	酸枣仁、玫瑰花 Semen Ziziphi spinosae, Rosa rugosa Thunb
MOL001546	人类重组蛋白 3 CHRM3	酸枣仁、玫瑰花 Semen Ziziphi spinosae, Rosa rugosa Thunb
MOL001522	肾上腺素受体 α2A ADRα2A	酸枣仁 Semen Ziziphi spinosae
MOL000273	人盐皮质激素 NR3C2	茯苓 Poria cocos (Schw.)

抑郁症靶点和酸枣仁复方靶点的 Venn 图。如图 2A 所示,酸枣仁复方与抑郁症共有 188 个共同靶点,其中都是酸枣仁复方中化合物的靶点。由 5 种草药、35 种化合物、188 个靶点组成的“药物-活性化合物-潜在靶点”网络如图 2B 所示,可以看出,酸枣仁和百合中均有 8 个化合物、茯苓和玫瑰花中均有 7 个化合物、当归中有 3 个化合物。表明酸枣仁复方通过多种作用于不同靶点的化合物治疗抑郁症。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络

为了探索酸枣仁复方治疗抑郁症的潜在机制,基于 STRING 数据库构建了 PPI 拓扑网络。将 188 个交集靶点导入数据库,设置交互因子设为 0.9,隐藏游离靶点,保存蛋白交互信息文件并将其导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建 PPI 网络图,结果见图 3。利用该网络进行筛选,获得 10 个核心靶点,分别

为 TP53、AKT1、JUN、TNF、IL-6、IL-2、IL-1β、BCL-2、IL-10、IL-1A,见表 4。这些靶点主要为炎症因子,可作为酸枣仁复方治疗抑郁症的主要作用靶点。

2.4 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

通过 GO 富集分析,进一步深入研究酸枣仁复方在抗抑郁症中的分子机制。选择排名前 50 的靶点进行 GO 富集分析,并将其中前 50 个 $P < 0.05$ 的基因纳入 KEGG 富集分析,GO 富集分析得到了 3 个重要的结果:生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)(图 4A),酸枣仁复方的 BP 主要参与激素响应和无机物响应,CC 主要参与转录规则复合体, MF 主要包括转录因子结合。基于通路分类的结果显示,核心靶点涉及 PI3K-AKT 通路、TNF 通路和 cGMP-PKG 通路(图 4B)。

2.5 酸枣仁复方对模型斑马鱼光声刺激下运动距离和运动速度的影响

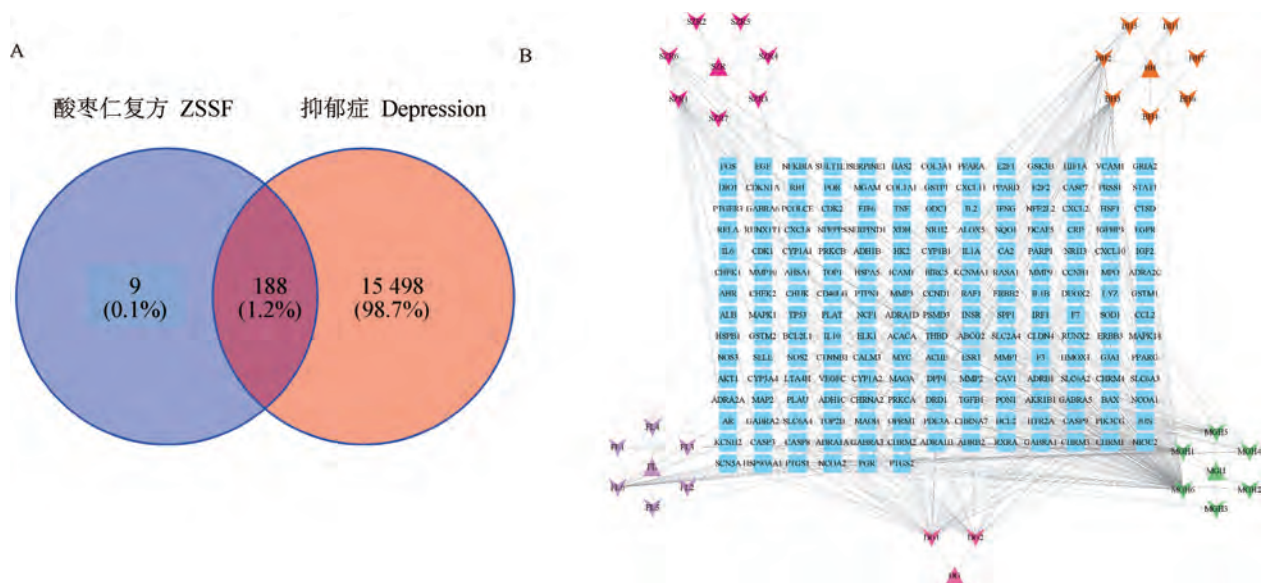
如图 5A,5B 所示,造模 7 d 后,在光照刺激下利血平组的移动距离以及移动速度相较对照组有明显下降($P < 0.01$)。与利血平组比较,氟西汀组、酸枣仁复方高中低剂量组的移动距离有明显恢复($P < 0.05, P < 0.01$);与利血平组比较,酸枣仁复方低中剂量组的运动速度显著降低($P < 0.05, P < 0.001$),而氟西汀组和酸枣仁复方高剂量组的运动速度无显著性差异。如图 5C,5D 所示,造模 7 d 后,在声音刺激下利血平组的移动距离以及移动速度相较对照组有明显下降($P < 0.01$)。与利血平组比较,氟西汀组、酸枣仁复方高中低剂量组的移动距离与移动速度有明显恢复($P < 0.01$)。如图 5E,5G 所示,利血平组在光照和声音刺激下的运动轨迹显著少于利血平组,提示利血平组对光照刺激和声音刺激反应不敏感,造模成功。氟西汀组、酸枣仁复方高中低剂量组的运动轨迹相较于利血平组而言显著增加,提示经酸枣仁复方治疗后抑郁症状减轻。如图 5F,5H 所示,利血平组在光照和声音刺激下的运动热图显示其运动频率呈现负表达,提示利血平组对光照刺激和声音刺激反应不敏感,造模成功。氟西汀组、酸枣仁复方低剂量组的运动热图相较于利血平组而言呈现正表达,提示经酸枣仁复方治疗后抑郁症状减轻。

2.6 酸枣仁复方对利血平幼鱼脑组织中炎症因子的影响

用 RT-qPCR 测定斑马鱼鱼脑中炎症因子标志

表 3 酸枣仁复方与抑郁症的潜在靶点
Table 3 Potential targets of ZSSF and depression

序号 ID	靶点名称 Target name	序号 ID	靶点名称 Target name	序号 ID	靶点名称 Target name	序号 ID	靶点名称 Target name
1	PTGS1	48	BAX	95	FOS	142	SERPINE1
2	CHRM1	49	CASP9	96	CDKN1A	143	COL1A1
3	SCN5A	50	JUN	97	EIF6	144	IFNG
4	PTGS2	51	CASP3	98	MMP9	145	ALOX5
5	RXRA	52	CASP8	99	MAPK1	146	IL1A
6	PDE3A	53	PRKCA	100	IL10	147	MPO
7	ADRA1A	54	TGFB1	101	EGF	148	NCF1
8	ADRA1B	55	PON1	102	RB1	149	ABCG2
9	SLC6A3	56	MAP2	103	TNF	150	HAS2
10	ADRB2	57	AKR1B1	104	IL6	151	GSTP1
11	SLC6A4	58	PLAU	105	AHSA1	152	NFE2L2
12	HSP90AA1	59	LTA4H	106	TP53	153	NQO1
13	MAOB	60	MAOA	107	ELK1	154	PARP1
14	CALM3	61	ADRB1	108	NFKBIA	155	AHR
15	DRD1	62	NOS2	109	POR	156	PSMD3
16	CHRM3	63	ESR1	110	ODC1	157	SLC2A4
17	ADRA2A	64	CHEK1	111	XDH	158	COL3A1
18	CA2	65	PPARG	112	TOP1	159	CXCL11
19	ADRA2C	66	PTPN1	113	RAF1	160	CXCL2
20	ADRA1D	67	DPP4	114	SOD1	161	DCAF5
21	OPRM1	68	MAPK14	115	HIF1A	162	NR1I3
22	NCOA2	69	GSK3B	116	STAT1	163	CHEK2
23	PGR	70	CDK2	117	RUNX1T1	164	INSR
24	AR	71	AKT1	118	CDK1	165	CLDN4
25	TOP2B	72	VEGFC	119	HSPA5	166	PPARA
26	ACHE	73	MMP2	120	ERBB2	167	PPARD
27	NCOA1	74	MMP1	121	ACACA	168	HSF1
28	KCNMA1	75	HMOX1	122	CYP1A1	169	CRP
29	NR3C2	76	CYP3A4	123	ICAM1	170	CXCL10
30	GABRA2	77	CYP1A2	124	IL1B	171	CHUK
31	GABRA3	78	ALB	125	CCL2	172	SPP1
32	CHRM2	79	CAV1	126	SELE	173	RUNX2
33	GABRA1	80	CTNNB1	127	VCAM1	174	E2F1
34	GRIA2	81	MYC	128	PTGER3	175	E2F2
35	GABRA6	82	CASP7	129	CXCL8	176	CTSD
36	GABRA5	83	F3	130	PRKCB	177	IGFBP3
37	ADH1B	84	GJA1	131	BIRC5	178	IGF2
38	ADH1C	85	MMP10	132	DUOX2	179	CD40LG
39	LYZ	86	PRSS1	133	HSPB1	180	IRF1
40	SLC6A2	87	SERPIND1	134	SULT1E1	181	ERBB3
41	PIK3CG	88	MMP3	135	MGAM	182	DIO1
42	KCNH2	89	F7	136	IL2	183	PCOLCE
43	CHRM4	90	NOS3	137	NR1I2	184	NPEPPS
44	HTR2A	91	RELA	138	CYP1B1	185	HK2
45	CHRNA2	92	EGFR	139	CCNB1	186	RASA1
46	CHRNA7	93	CCND1	140	PLAT	187	GSTM1
47	BCL2	94	BCL2L1	141	THBD	188	GSTM2



注:A:成分靶点-疾病靶点韦恩图;B:酸枣仁复方成分靶点网络图。

图2 酸枣仁复方治疗抑郁症的潜在作用靶点

Note. A. Component target-disease target of Venn diagram. B. Component target network diagram of ZSSF.

Figure 2 Potential targets of action of compound prescription of ZSSF in the treatment of depression

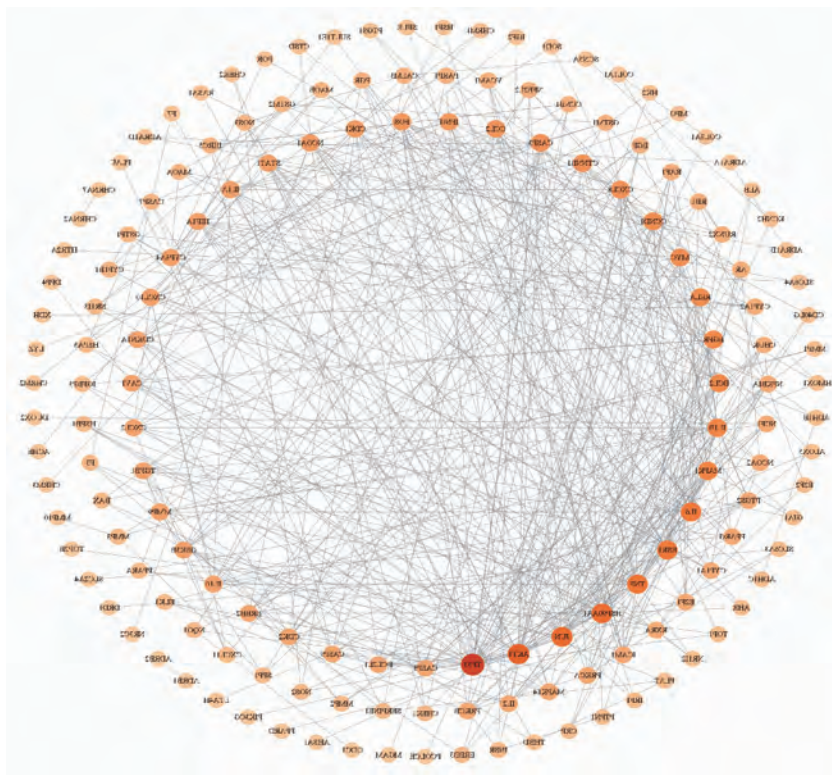
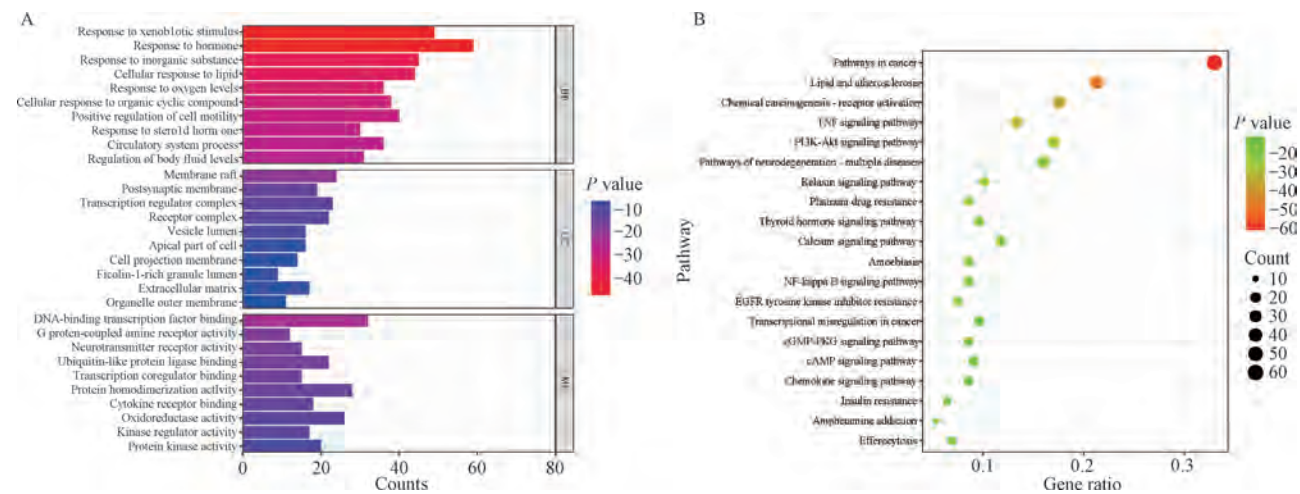


图3 PPI分析酸枣仁复方在抑郁症中潜在的作用目标

Figure 3 PPI analyses of potential targets for the action of the ZSSF in depression

物(TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-1 β)的相对表达水平。RT-qPCR 检测的结果如图 6 所示,与对照组相比,利血平组斑马鱼幼鱼的炎症因子标志物 TNF- α 、

IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-1 β 水平升高($P < 0.01, P < 0.001$)。与利血平组相比,酸枣仁复方低中高剂量组各指标均显著下降($P < 0.001$)。



注:A:GO 富集分析结果;B:KEGG 通路分析结果。

图 4 GO 富集分析结果和 KEGG 通路分析结果

Note. A. GO enrichment analysis results. B. KEGG pathway analysis results.

Figure 4 GO enrichment analysis results and KEGG pathway analysis results

表 4 酸枣仁复方与抑郁症蛋白质-蛋白质相互作用网络中的核心作用靶点

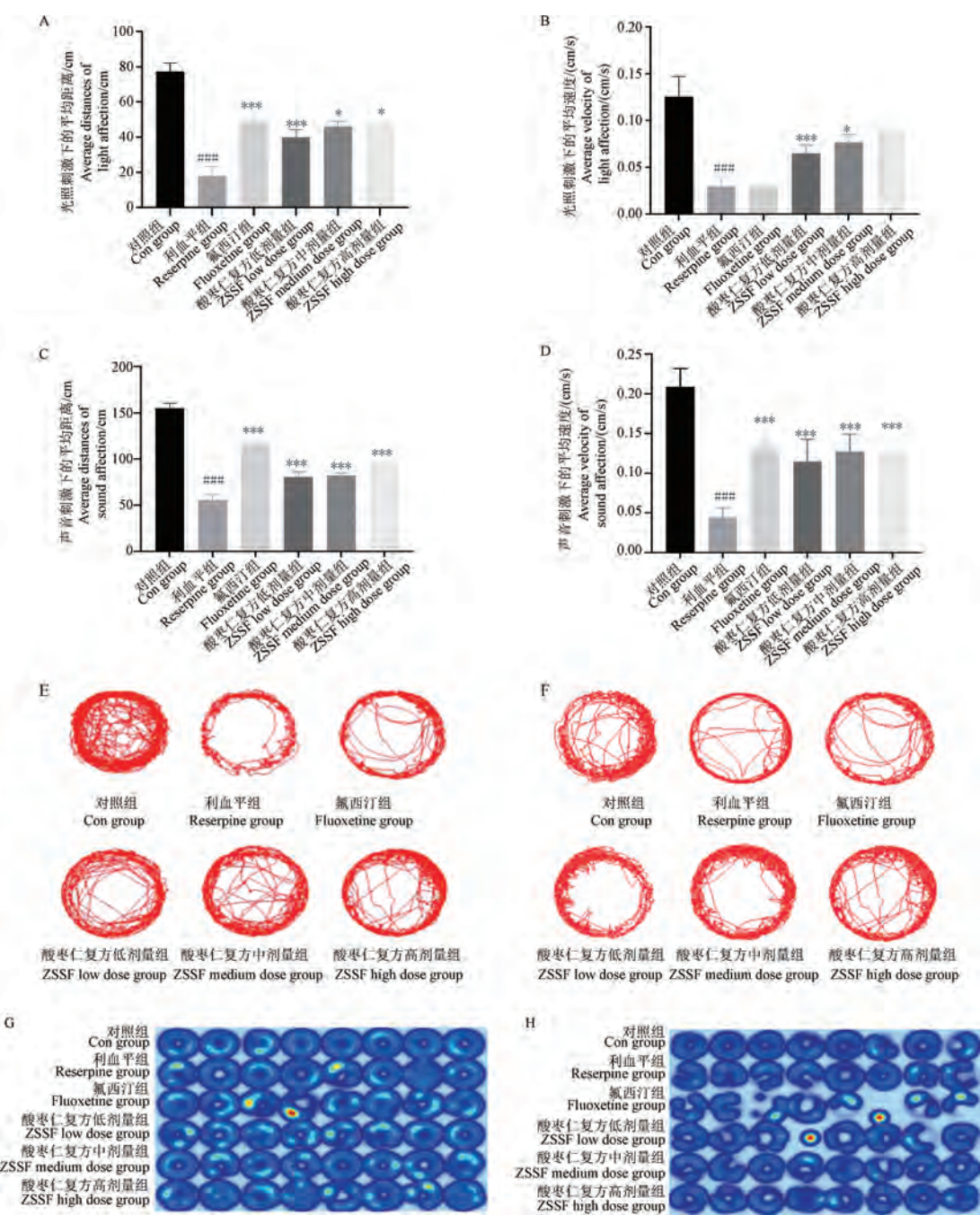
Table 4 Core targets of action in the protein-protein interaction network of ZSSF with depression			
靶点名称 Target name	度中心性 Degree	接近中心性 CC	介度中心性 BC
TP53	40	0.425 655 97	0.213 346 76
AKT1	30	0.420 749 28	0.102 864 50
JUN	27	0.446 483 18	0.236 443 89
TNF	24	0.392 473 11	0.075 095 83
IL-6	23	0.389 333 33	0.065 254 38
IL-1β	18	0.371 501 27	0.023 724 50
BCL-2	17	0.383 202 17	0.039 648 85
IL-10	10	0.306 722 68	0.000 948 32
IL-2	9	0.310 638 29	0.004 396 59
IL-1A	11	0.343 529 41	0.002 158 88

3 讨论

抑郁症作为一种常见的精神障碍类疾病,其主要临床表现为患者情绪低落。因为高患病率、高自杀率等特点,越来越受到人们的关注^[10]。虽然现在市面上的一线抗抑郁药可以改善抑郁症所带来的一些问题,但这些药物有更多的副作用,如性功能障碍、睡眠障碍和认知功能障碍^[11]。中药复方具有价格低且疗效显著的特点,因此许多患者喜欢用中药复方来缓解抑郁症状,而不喜欢使用疗效有限而副作用大的抗抑郁药物^[12]。但是中药复方组成成分复杂而且作用靶点多,限制了对中药复方作用机制的研究。而网络药理学可以通过多靶点研究药物作用,被广泛应用于中药活性化合物发现、整体

作用机制阐释方面^[13-14],很好地解决了这一问题。本研究通过网络药理学获得了“药物-活性化合物-潜在靶点”网络图,用其中得到的 188 个潜在靶点建立 PPI 网络。使用生物信息学工具筛选 10 个核心靶点,包括 TP53、AKT1、JUN、TNF、IL-6、IL-2、IL-1β、BCL-2、IL-10、IL-1A。GO 富集分析表明,酸枣仁复方在抑郁症中的作用与多种生物学过程有关,包括对激素的反应、对无机物的反应、对激素刺激的细胞反应和对有机环化化合物的细胞反应。分子功能主要包括转录因子结合、激酶结合和蛋白结构域特异性结合。本研究发现的靶点富集于炎症因子通路和细胞凋亡通路,如 PI3K-AKT 通路、TNF 通路和 cGMP-PKG 通路。有大量证据表明,抑郁症的发生与系统性免疫激活有关,包括炎症标志物和免疫细胞数量增加^[15]。转化生长因子(TGF)-β 和 IL-10,在抑郁症患者中也经常升高^[16],而 IL-6 和 IL-1β 的升高可能与抑郁症中单核/巨噬细胞的激活有关^[17]。这表明,调节炎症因子标志物的表达是治疗抑郁症的重要途径之一。

基于网络药理学研究得到酸枣仁复方治疗抑郁症的核心靶点后,进一步进行了体内实验验证。利血平是一种中枢镇静剂,长期使用利血平的患者会出现抑郁症^[18],因此,利血平被广泛应用于抑郁症、帕金森病和精神分裂症等神经退行性疾病的动物实验建模^[19]。首先建立了利血平诱导的斑马鱼抑郁模型,然后通过斑马鱼行为学实验初步探究了酸枣仁复方对抑郁症的治疗作用,之后利用 RT-qPCR 技术进行斑马鱼脑组织中炎症因子标志物的

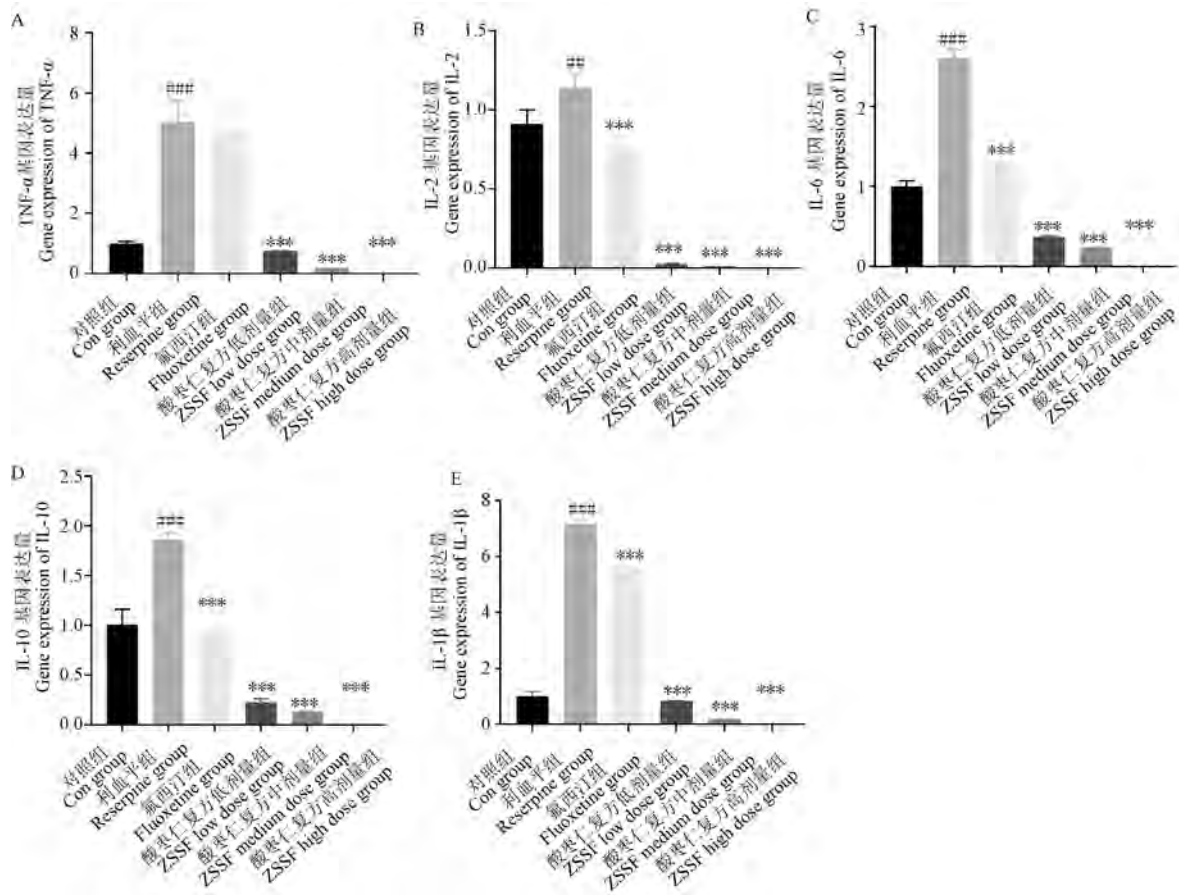


注:A:光照刺激对斑马鱼的运动距离的影响;B:光照刺激对斑马鱼的运动速度的影响;C:声音刺激对斑马鱼的运动距离的影响;D:声音刺激对斑马鱼的运动速度的影响;E:光照刺激对斑马鱼的运动轨迹的影响;F:声音刺激对斑马鱼的运动轨迹的影响;G:光照刺激下斑马鱼的运动热图;H:声音刺激下斑马鱼的运动热图;与对照组相比,#### $P < 0.001$;与利血平组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。(下同)

图5 酸枣仁复方对利血平幼鱼声光刺激状态下游行速度和距离的影响($n = 6$)

Note. A. Effect of light stimulation on the movement distance of zebrafish. B. Effect of light stimulation on the movement speed of zebrafish. C. Effect of sound stimulation on the movement distance of zebrafish. D. Effect of sound stimulation on the movement speed of zebrafish. E. Effect of light stimulation on the movement trajectory of zebrafish. F. Effect of sound stimulation on the movement velocity of zebrafish. G. Thermogram of zebrafish movement under light stimulation. H. Thermogram of zebrafish movement under sound stimulation. Compared with con group, #### $P < 0.001$. Compared with the reserpine group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 5 Effect of the compound of ZSSF on the marching speed and distance in the state of acoustic and visual stimulation in the zebrafish larvae($n = 6$)



注:与对照组相比,### $P < 0.01$ 。

图 6 酸枣仁复方对利血平幼鱼脑组织中炎症因子标志物的影响($n = 90$)

Note. Compared with the control group, ### $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of ZSSF on inflammatory factor markers in the brain tissue of zebrafish larvae($n = 90$)

实验验证。结果表明,酸枣仁复方治疗后,斑马鱼在光照刺激下的游动速度明显加快,游动距离明显增长($P < 0.05, P < 0.001$)。在声音刺激下也出现了游动速度和距离的恢复($P < 0.01$)。这表明酸枣仁复方可以明显改善利血平诱导的斑马鱼抑郁样行为表现。RT-qPCR 实验结果显示,与对照组相比,模型组中的 TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10 和 IL-1 β 基因表达水平升高($P < 0.01, P < 0.001$),而经过酸枣仁复方治疗后的炎症因子标志物基因表达量均出现下降趋势($P < 0.001$)。这表明酸枣仁复方可以通过抑制炎症因子的激活改善抑郁样症状,这与网络药理学的预测结果一致。

中药复方在抑郁症的治疗中具有独到的优势。如柴胡疏肝散可以通过提高 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的表达对抑郁症起到治疗作用^[20]。甘麦大枣汤可以通过降低 TNF 通路的表达治疗抑郁症^[21]。酸枣仁复方是《金匱要略》中经

典方剂酸枣仁汤的类方,由酸枣仁、茯苓、当归、百合、玫瑰花五味中药组成。之前对于组方中单味药的研究均证实组方中的中药有治疗抑郁症的效果。酸枣仁作为君药,有宁心安神、养津敛汗的功效。之前的研究表明,酸枣仁皂苷 A 可以上调抑郁小鼠脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平,进而治疗抑郁症^[22-23]。当归作为臣药,可以健脾宁心、养血活血。研究证实,当归皂苷可以调控抑郁大鼠血清中 IL-1 β 、IL-4、IL-6 和 TNF- α 的水平,进而治疗抑郁^[24-25]。这提示了酸枣仁复方对抑郁症有很好的治疗效果,本研究从网络药理学入手,证实了酸枣仁复方可能通过调控炎症因子的表达治疗抑郁症。而后采用实验验证,进一步证实了酸枣仁复方可以缓解利血平诱导的斑马鱼运动障碍和反应迟缓,其作用机制可能是通过降低炎症因子标志物如 IL-6 和 TNF- α 的表达来实现的。

本研究从网络药理学和实验验证两个方面探讨了酸枣仁复方的抗抑郁作用机制,阐明了酸枣仁复方可以改善利血平诱导的抑郁斑马鱼炎症反应。本研究有一些局限性,现有的药物和基因数据库可能不完整,降低了预测结果的置信度。此外,酸枣仁复方的确切生物活性成分还有待进一步研究,酸枣仁复方对抑郁症的其他作用有待进一步探讨。尽管如此,本研究结果还是为酸枣仁复方在抑郁症治疗中的作用提供了重要的初步信息,并表明酸枣仁复方有开发为新的抗抑郁中成药的潜力。

参 考 文 献(References)

[1] ALI T, RAHMAN S U, HAO Q, et al. Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation [J]. J Pineal Res, 2020, 69(2): e12667.

[2] CALDIROLI A, CAPUZZI E, TAGLIABUE I, et al. Augmentative pharmacological strategies in treatment-resistant major depression: a comprehensive review [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 13070.

[3] CIPRIANI A, FURUKAWA T A, SALANTI G, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis [J]. Lancet, 2018, 391(10128): 1357–1366.

[4] XIE W, MENG X, ZHAI Y, et al. *Panax notoginseng* saponins: a review of its mechanisms of antidepressant or anxiolytic effects and network analysis on phytochemistry and pharmacology [J]. Molecules, 2018, 23(4): 940.

[5] 朱靛婷,桂西,李琦,等. 整合网络药理学与非靶向血清代谢组学探讨四逆散治疗抑郁症的作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(12): 1390–1397.

ZHU L T, GUI X, LI Q, et al. Integration of network pharmacology and non-targeted serum metabolomics to explore the mechanism of action of Sini SAN in the treatment of depression [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(12): 1390–1397.

[6] ZONG Y, CHEN T, DONG H, et al. Si-Ni-San prevents reserpine-induced depression by inhibiting inflammation and regulating CYP450 enzymatic activity [J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1518.

[7] 丁娜娜,陈毅恒,李伟峰,等. 小柴胡汤及其类方辨治抑郁症的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6): 69–73.

DING N N, CHEN Y H, LI W F, et al. Research progress of xiaochaihu decoction and its SimilarP rescriptions in treatment of depression [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(6): 69–73.

[8] SHANG L, WANG Y, LI J, et al. Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. J

Ethnopharmacol, 2023, 302: 115876.

[9] ZHANG W, TIAN W, WANG Y, et al. Explore the mechanism and substance basis of Mahuang FuziXixin Decoction for the treatment of lung cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Comput Biol Med, 2022, 151: 106293.

[10] TANG Y Q, LI Z R, ZHANG S Z, et al. Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish [J]. Neurotoxicol Teratol, 2019, 76: 106835.

[11] VU H, SHAYA F T. Predicting factors of depression, antidepressant use and positive response to antidepressants in perinatal and postpartum women [J]. Clin Pract Epidemiol Ment Health, 2017, 13: 49–60.

[12] 何俊慧, 韦洁, 李冬梅, 等. 基于网络药理学、分子对接和动物实验探究壮药金缕半枫荷对抑郁症炎症的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 9(7): 1362–1370.

HE J H, WEI J, LI D M, et al. Mechanism of effect of Zhuang medicine *Semiliquidambar* cathayen. sis Chang on depression inflammation based on network pharmacology, molecular docking and animal experiments [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 9(7): 1362–1370.

[13] HOPKINS A L. Network pharmacology [J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(10): 1110–1111.

[14] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682–690.

[15] GAŁECKI P, GAŁECKA E, MAES M, et al. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-II A in patients with recurrent depressive disorder [J]. J Affect Disord, 2012, 138(3): 360–366.

[16] BUFALINO C, HEPGUL N, AGUGLIA E, et al. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies [J]. Brain Behav Immun, 2013, 31: 31–47.

[17] CERVENKA I, AGUDELO L Z, RUAS J L. Kynurenes: Tryptophan’s metabolites in exercise, inflammation, and mental health [J]. Science, 2017, 357(6349): eaaf9794.

[18] PARK B K, KIM Y R, KIM Y H, et al. Antidepressant-like effects of *Gyejibokryeong-hwan* in a mouse model of reserpine-induced depression [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 5845491.

[19] LEITH N J, BARRETT R J. Effects of chronic amphetamine or reserpine on self-stimulation responding: animal model of depression? [J]. Psychopharmacology, 1980, 72(1): 9–15.

[20] 贾奎, 冯龙, 黄晨杰, 等. 柴胡疏肝散对卒中后抑郁大鼠行为学及脑区 5-HT2A、BDNF 表达的影响 [J]. 中成药, 2023, 45(12): 3943–3949.

JIA K, FENG L, HUANG C J, et al. Effects of Chaihu Shugan Powder on behaviors and expression of 5-HT2A and BDNF in brain region of a rat model of post-stroke depression [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(12): 3943–3949.

[21] 于千尧, 于忠和, 戴玉良. 甘麦大枣汤联合艾司西酞普兰在

治疗抑郁症中的应用 [J]. 心理月刊, 2023, 18(12): 141-143.

YU Q Y, YU Z H, DAI Y L. Application of Ganmai Dazao Tang combined with escitalopram in the treatment of depression [J]. PSY, 2023, 18(12): 141-143.

[22] 李会涛, 李剑男, 张桐, 等. 酸枣仁皂苷 A 对抑郁小鼠行为及突触可塑性相关蛋白的作用 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(2): 36-43.

LI H T, LI J N, ZHANG T, et al. Effects of jujuboside A on behavior and synaptic plasticity-related proteins in depressed mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2024, 40(2): 36-43.

[23] LI H, LI J, ZHANG T, et al. Antidepressant effect of Jujuboside A on corticosterone-induced depression in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 620: 56-62.

[24] GONG W, CHEN J, XU S, et al. The regulatory effect of Angelicae Sinensis Radix on neuroendocrine-immune network and sphingolipid metabolism in CUMS-induced model of depression [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319: 117217.

[25] GONG W, ZHU S, CHEN C, et al. The anti-depression effect of angelicae Sinensis Radix is related to the pharmacological activity of modulating the hematological anomalies [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 192.

[收稿日期] 2024-01-25

《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:银行转账:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

账号: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。

王玉超,张兵,潘静,等. 基于数据挖掘的盆腔炎性疾病后遗症动物模型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 913-922.

WANG Y C, ZHAGN B, PAN J, et al. Analysis of animal models of sequelae of pelvic inflammatory disease based on data mining [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 913-922.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.010

基于数据挖掘的盆腔炎性疾病后遗症动物模型分析

王玉超^{1,2}, 张兵², 潘静², 李雅琳², 于潇¹, 刘金星^{2*}

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250014)

【摘要】 目的 梳理盆腔炎性疾病后遗症(sequelae of pelvic inflammatory disease, SPID)动物模型特点, 为规范造模流程、提高成模率提供参考。方法 检索近 40 年有关 SPID 动物模型的文献, 总结并分析动物种类、造模方法、阳性对照药、评价指标等。结果 纳入 243 篇文献, 多采用苯酚胶浆法或微生物感染法诱导大鼠建立 SPID 模型, 造模周期在 14 ~ 16 d 为主, 大多以盆腔组织形态观察和苏木素-伊红(HE)染色判定模型成功与否。中医病症结合模型研究较少。结论 SPID 动物模型造模方法缺乏一致性的判定标准, 建议综合动物行为学变化、盆腔组织形态学改变以及病理等进行评价。同时, 中医证候造模缺乏有效的方法和评价标准, 有待进一步研究发展。

【关键词】 盆腔炎性疾病后遗症; 数据挖掘; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0913-10

Analysis of animal models of sequelae of pelvic inflammatory disease based on data mining

WANG Yuchao^{1,2}, ZHAGN Bing², PAN Jing², LI Yalin², YU Xiao¹, LIU Jinxing^{2*}

(1. the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China;

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

Corresponding author: LIU Jinxing. E-mail: wycsdjn@163.com

【Abstract】 Objective To review the characteristics of animal models of sequelae of pelvic inflammatory disease (SPID) to provide a reference for standardizing the modeling process and improving the modeling rate. **Methods** Literature relevant to animal models of SPID from the past 40 years was searched, and animal species, modeling method, modeling cycles, modeling substances, positive control drugs, and evaluation indexes were summarized and analyzed. **Results** A total of 243 study manuscripts were included, most of which induced the SPID model in rats via the phenol paste or microbial infection method. The modeling cycles were typically between 14 and 16 days, and the success of the models was mostly determined by pelvic tissue morphology observation and pathological HE staining. Few research reports have focused on the traditional Chinese medicine (TCM) disease combination model. **Conclusions** No consistent criteria have been established for SPID animal model modeling, and thus it is recommended that researchers evaluate changes to animal behavior, pelvic histomorphology, and pathology. TCM syndrome modeling lacks effective method and evaluation standards, which need further research and development. Finally, the selection and use of positive-control drugs need to be further explored and perfected.

【Keywords】 sequelae of pelvic inflammatory disease (SPID); data mining; animal model

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

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2022QH075, ZR2021MH079), 山东省中医药科技发展计划项目(M-2023234T)。

Funded by the Shandong Provincial Natural Science Foundation(ZR2022QH075, ZR2021MH079), Shandong Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Project(M-2023234T)。

【作者简介】 王玉超, 女, 主治医师, 在读博士研究生, 研究方向: 中医妇科学临床研究。Email: ziyouzhifeng_lion@163.com

【通信作者】 刘金星, 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 中医妇科学临床研究。Email: wycsdjn@163.com

盆腔炎症性疾病后遗症 (sequelae of pelvic inflammatory disease, SPID) 是女性盆腔生殖器官及周围结缔组织、盆腔腹膜发生的慢性炎症性病变, 多为盆腔炎症性疾病 (pelvic inflammatory disease, PID) 引起的临床后遗症, 一般分为近期与远期并发症, 二者发生的时间尚无明确的界定标准, 前者包括输卵管卵巢脓肿、肝周围炎, 后者主要包括慢性盆腔痛、不孕、异位妊娠等, 远期后遗症的发生率约为 25%^[1], 是 SPID 相关临床和实验研究的重点。在 10 万例 20 ~ 24 岁的 PID 女性队列研究中发现, 发生慢性盆腔痛 18 600 例、不孕 16 800 例、异位妊娠 8550 例^[2]。沙眼衣原体、支原体以及寄居于阴道的需氧菌和厌氧菌 (主要有大肠杆菌、表皮葡萄球菌等)^[3] 均参与了 PID 的发生。SPID 的主要病理改变是感染损伤组织在愈合时伴随黏连、增生和瘢痕的形成, 导致输卵管的黏连、阻塞、积水, 盆腔结缔组织、骶韧带的增生变厚等。

动物模型是实验研究的载体和基础, 稳定易复制的动物模型与疾病的理论研究、新药研发和中医药治疗等的开展息息相关。因此成功建立 SPID 动物模型、选择合适的给药时机和时长、合理的检测指标, 直接关系实验的效果和成败。本文总结分析近 40 年有关 SPID 动物模型的文献, 从动物种类、造模方式、造模周期、阳性对照药等方面总结 SPID 动物模型的特点, 探索研究的现状, 为 SPID 动物实验研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源与检索策略

以“(盆腔炎症性疾病后遗症 or 慢性盆腔炎) and

(动物模型 or 模型)”为主题词在中国知网、万方、维普数据库和中国生物医学文献数据库进行高级检索; 以“(Pelvic Inflammatory Disease and (Chronic)) and ((Models, Animal) OR (Animal Experimentation))”为主题词在 PubMed 数据库进行高级检索。时间范围均不限, 检索时间截至 2023 年 9 月 27 日。

1.2 文献筛选标准

(1) 纳入标准: 选择关于 SPID 动物模型应用的实验性研究期刊文献。(2) 排除标准: 会议论文、综述、学位论文、科技成果等文献, 体外研究、重复发表和资料不全的文献。

1.3 文献资料的筛选及数据处理

初步检索到文献 1202 篇, 排除不符合标准和重复的文献, 最后筛选得到 243 篇, 将相关数据录入 Microsoft Excel 2013 中, 建立 SPID 动物模型数据库, 并进行数据统计与分析。

2 结果

2.1 造模动物种类的选择

SPID 动物模型纳入文献中涉及动物 13 种, 包括大鼠、小鼠、兔、猴、猫等, 其中, 89.34% 选用大鼠 (60.24% 选择 SD 大鼠、28.28% 选择 Wistar 大鼠, 2 篇文章中的大鼠未具体分类), 见图 1。

2.2 造模方法

从造模物质方面看, SPID 动物模型的制备中有 61.70% 的文献采用病原体感染法, 35.48% 的文献采用苯酚胶浆法。从造模途径方面看, 12.10% 的文献选择经阴道无创造模法, 87.10% 的文献选择经腹手术法。经腹手术造模的文献中, 43.72% 的文献在

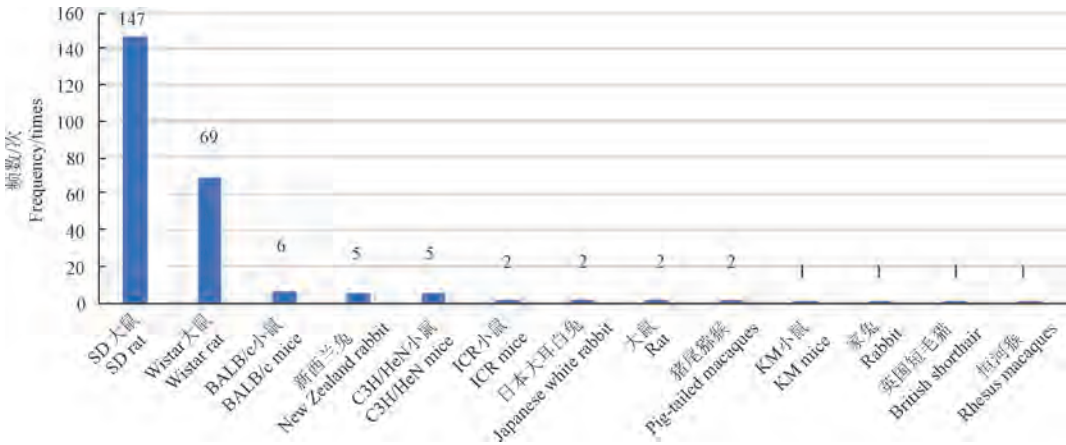


图 1 SPID 动物模型实验动物种类
Figure 1 Types of experimental animals in animal model of SPID

注入造模物质前对子宫内膜进行机械损伤(见表1)。在造模诱导方面,有15篇使用病原体感染法造模文献在正式造模前给予性激素类药物诱导动物假发情。

2.3 造模周期

89篇记载了具体的造模周期,因造模物质、造模途径以及动物种数的选择不同,造模的时长存在明显的差异性。SPID动物模型的复制建立在PID动物模型的基础上,其成模时间节点定在PID模型复制成功后的1~5周。经统计,实验动物以大鼠为最多选择,在70次的大鼠实验中,频数在10次以上的造模周期有3组,以14~16 d的造模周期居多,共计25次;其次为7~10 d,计16次,见表2。

2.4 造模物质

苯酚胶浆、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、病原体、异物置入等均可以用于制备SPID动物模型,以苯酚胶浆、病原体菌液诱导SPID动物模型最为常见。不同的造模物质选用的造模方式有差异,相同造模物质使用不同或相同造模方式时使用的剂量、配比也有区别(见表3)。

2.5 高频检测指标

分析243篇文献的检测方法、指标,使用频数大于5的共计669项,见表4。

2.6 阳性对照药和干预时间

166篇文献记录了阳性对照药物,总计186次,其中18篇应用了2种阳性对照药,中成药18种、西药15种。选择最多的阳性对照药是妇科千金胶囊(片),其次是妇炎康颗粒(胶囊、片、丸),西药使用

最多的是左氧氟沙星胶囊(片),见图2。妇科千金胶囊(片)给药时间最多的两个时间段是20~21 d(22次)和28~30 d(11次)。妇炎康给药时间最多的时间段是20~21 d(11次)。左氧氟沙星给药时间最多的两个时间段是20~21 d(3次)和28~30 d(4次)。

2.7 成模标准

2.7.1 西医成模标准

178篇记录了模型判定标准的文献中使用西医成模标准270次,其中以生殖器官病理变化、组织大体观为主要的模型评价指标,分别为128次(47.41%)和84次(31.11%)。93篇(52.25%)研究采用了单一成模标准,另外85篇(47.75%)研究采用了复合成模标准,以生殖器官病理变化、组织大体观为主(53个,62.35%)。

2.7.2 中医病症结合成模标准

纳入文献中仅有6篇采用中医病症结合模型复制方法造模,包括气滞血瘀型(3篇)、血瘀型(1篇)、阳虚型(1篇)、寒凝血瘀型(1篇),但阳虚型、寒凝血瘀型尚无中医证候判定标准。

3 讨论

3.1 实验动物

考虑生殖系统结构的特殊性,SPID模型动物的选择限定为哺乳动物^[10]。从统计结果看,制备SPID模型的动物主要有大鼠、小鼠、兔、猴等。其中,猴、兔、猫等动物是比较理想的模型动物选择,但受限于动物来源、饲养、伦理和实验成本等因素,

表 1 SPID 动物模型的造模方法概况

Table 1 Summary of replication methods related to SPID animal models

造模方式 Molding methods	造模途径 Molding approaches	动物种类(频数/次) Animal species (Frequency/time)	具体方法 Specific methods	占比/% Percentage/%
苯酚胶 浆法 Phenol glue method	经腹手术 Abdominal operation	SD大鼠(57), Wistar大鼠 (18), 日本大耳白兔(2) SD rat(57), Wistar rat (18), Japanese white rabbit (2)	麻醉后开腹,暴露子宫,用1 mL空针向宫腔内(输卵管卵巢方向)注入苯酚胶浆,关腹 After anesthesia, the uterus were exposed, and 1 mL of empty needle was used to inject phenol glue into the uterine cavity (in the direction of fallopian tubes and ovaries) to close the abdomen	35.48
	经腹手术+机械 性损伤 Abdominal surgery + mechanical injury	SD大鼠(8), Wistar大鼠 (2) SD rat(8), Wistar rat(2)	麻醉后开腹,暴露子宫,用锐器损伤子宫内膜后同经腹手术注入苯酚胶浆 After anesthesia, the uterus were exposed, and the endometrium was damaged with a sharp object, and then phenol glue was injected as the method of abdominal operation	
	经阴道无创法 Transvaginal noninvasive method	SD大鼠(1) SD rat(1)	麻醉后,用1 mL注射器套上10号针头,从大鼠阴道口插入约2 cm,然后将苯酚胶浆注入大鼠子宫左右两侧内。 After anesthesia, a 1 mL syringe with a 10-gauge needle was inserted about 2 cm from the vaginal opening of the rat, and then the phenol glue was injected into the left and right sides of the rat uterus	

续表 1

造模方式 Molding methods	造模途径 Molding approaches	动物种类(频数/次) Animal species (Frequency/time)	具体方法 Specific methods	占比/% Percentage/%
苯酚胶 浆法 Phenol glue method	经腹手术 Abdominal operation	SD 大鼠 (18), Wistar 大鼠 (13), BALB/c 小鼠 (4), 猪尾猕猴、恒河猴 (2), KM 小鼠 (1), 瑞士小白鼠 (1), 英国短毛猫 (1) SD rat (18), Wistar rat (13), BALB/c mice (4), Pigtail macaque, rhesus monkey (2), KM mice (1), Swiss white mice (1), English shorthair (1)	麻醉后开腹, 暴露子宫, 向宫腔内注射菌液, 关腹 After anesthesia, opening the abdominal cavity to expose the uterus, the bacterial solution was injected into the uterine cavity, and then to close the abdomen	16.13
	经腹机械损伤+ 病原体感染法 Mechanical injury+ pathogenic infection	SD 大鼠 (48), Wistar 大鼠 (34), 家兔 (1), 大鼠 (1) SD rat (48), Wistar rat (34), Rabbit (1), Rat (1)	麻醉后开腹, 暴露子宫, 用注射器机械损伤子宫内膜组织, 向宫腔内注入菌液, 关腹 After anesthesia, opening the abdominal cavity to expose the uterus, damaging the endometrium with a syringe needle, the bacterial solution was injected into the uterine cavity, and then to close the abdomen	33.87
	经阴道微创法 Transvaginal noninvasive method	新西兰兔 (6) New Zealand rabbit (6) SD 大鼠 (10), C3H/HeN 小鼠 (5), Wistar 大鼠 (4), BALB/c 小鼠 (1), ICR 小鼠 (1) SD rat (10), C3H/HeN mice (5), Wistar rat (4), BALB/c mice (1), ICR mice (1)	向泌尿生殖道内插入一次性无菌输液管或新生儿吸痰管, 深度 7~8 cm, 经此管注入混合菌液 (1 mL/kg), 观察无外溢, 将免倒置 3 min 结束 A disposable sterile infusion tube or neonatal sputum suction tube was inserted into the genitourinary tract, with a depth of about 7~8 cm. The mixed bacterial solution (1 mL/kg) was injected through the tube, and no overflow was observed. The rabbit was inverted for 3 min 暴露外阴后用移液枪注入菌液 ^[4] 或用浸满菌液的医用明胶/止血海绵 (0.5 cm×0.5 cm) 塞入阴道 ^[5] 或宫腔内 ^[6] , 倒立 3 min, 每天或隔天 1 次, 连续 4 或 8 次 After exposing the vulva, inject bacterial solution ^[4] with a pipette or insert medical gelatin/hemostatic sponge (0.5 cm×0.5 cm) filled with bacterial solution into the vagina ^[5] or uterine cavity ^[6] , and stand on head for 3 min, once a day or every other day, for 4 or 8 consecutive times	10.89
	经阴无创+经 腹手术 Transvaginal noninvasive method+ abdominal operation	SD 大鼠 (2) SD rat (2)	在接种前给予大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇 4.375 mg/kg, 隔周 1 次, 共 4 次。第 2 次注射后, 大鼠阴道接种支原体, 1 周后取阴道标本进行支原体培养, 阴性者继续接种, 培养均阳性后, 按照经腹手术处理 Before inoculation, the rats were given subcutaneous injection of estradiol benzoate 4.375 mg/kg, once every other week for a total of 4 times. After the second injection, the rats were inoculated vaginally with mycoplasma. After 1 week, the vaginal specimen was taken for mycoplasma culture. If the result was negative, the inoculation was continued. After the culture was positive, the procedure was carried out according to abdominal operation	0.81
异物置 入法 Foreign body insertion method	经腹手术 Abdominal operation	SD 大鼠 (4), Wistar 大鼠 (1) SD rat (4), Wistar rat (1)	麻醉后, 开腹, 沿一侧子宫角上 1 cm 处作一横切口, 将塑料管 (管径 2 mm, 长 5 mm, 重 2 mg) 放置于子宫内与子宫切口缝合固定, 关腹 ^[7] After anesthesia, the abdomen was opened, and a transverse incision was made 1 cm above the uterine horn on one side. A plastic tube (diameter 2 mm, length 5 mm, weight 2 mg) was placed in the uterus and fixed with the uterine incision, and the abdomen was closed ^[7]	2.02
LPS 宫腔注 射法 LPS intrauterine injection method	经阴道无创 Transvaginal noninvasive method	SD 大鼠 (1) SD rat (1)	麻醉大鼠后向宫腔内输注 LPS (30 μg/mL, 200 μL), 隔日 1 次, 连续 3 次 ^[8] After anesthesia, the rats were injected intrauterine LPS (30 μg/mL, 200 μL) once every other day for three consecutive times ^[8]	0.40
盐酸+ LPS 法 Hydrochloric acid + LPS method	经阴道无创 Transvaginal noninvasive method	BALB/c 小鼠 (1) BALB/c mice (1)	造模日前予小鼠 PMSG (每只每天 7.5 IU, 2 d) 皮下注射; 之后宫颈内注射盐酸 (25 mg/kg, 1 mol/L), 2 h 后宫颈内注射 LPS (2 h 50 mg/kg, 4 次) ^[9] Mice received one dose i. h. of PMSG (7.5 IU/animal/day, 2 days) before modeling day. After that, HCl was injected into the cervix (25 mg/kg, 1 mol/L), and LPS was injected into the cervix (2 h 50 mg/kg, 4 times) 2 h later ^[9]	0.40

表 2 SPID 动物模型复制周期

Table 2 Replication cycle of SPID animal models		
动物种类 Animal species	造模周期/d Replication cycle/d	频数/次 Frequency/times
大鼠 Rat	3	1
	7 ~ 10	16
	11 ~ 12	2
	14 ~ 16	25
	20 ~ 21	9
	25 ~ 30	16
小鼠 Mice	50	1
	7	2
	21	1
	28 ~ 30	4
	35	3
	42	1
兔 Rabbit	10	1
	14 ~ 15	4
	49	1
英国短毛猫 English shorthair	30	1
恒河猴和猪尾猴 Rhesus monkey and pigtail monkey	90	1

较少选用^[11]。目前 SPID 基础研究多选用耐受性好、繁殖周期短、体型适中、饲养和使用成本较低的啮齿类动物作为模型动物,尤其以大鼠(SD 大鼠、Wistar 大鼠)最为常用。

3.2 造模方法

基于 SPID 多因 PID 引起的疾病发展机理,目前 SPID 动物模型的各种造模方式均以建立动物盆腔急性炎症模型为基础,PID 模型复制成功后再常规喂养 1 ~ 5 周,待急性炎症消退病理改变形成确定 SPID 模型立。李俊良等^[12]通过兔宫腔插管灌注混合菌液建立 PID 模型,此后检测不同时段兔外周血白细胞变化、腹腔镜下盆腔变化以及组织病理,发现术后 14 d 内主要为急性炎症表现,14 d 后为输卵管黏连、水肿等后遗症表现。目前 SPID 动物模型制备有苯酚胶浆法、病原体感染法、异物置入法、LPS 法等,其中苯酚胶浆法、病原体感染法是目前使用较多且较成熟的造模方式,二者均有经腹手术和经阴道无创法两种方式。造模前予性激素类药物(如 HMSG、HCG、雌激素等)诱导动物假发情可能会提高造模成功率^[5]。

表 3 SPID 动物模型的造模物质

Table 3 Modelling material for SPID animal models				
造模物质 Modelling material		浓度 Concentration	频数/次 Frequency/ time	占比/% Percentage/%
病原体 Pathogen	苯酚胶浆 Phenol glue	10%	1	1.15
		15%	9	10.34
		20%	6	6.90
		25%	58	66.67
		26%	1	1.15
		30%	3	3.45
		不详 Unknown	9	10.34
	衣原体 <i>Chlamydia</i>	$10^5 \sim 10^{11}$ CFU/mL	13	8.55
	大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	6×10^6 、 3×10^8 CFU/mL	22	15.13
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	$1, 4 \times 10^9$ CFU/mL	6	3.95
	大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌 2:1或 1:1 <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Staphylococcus aureus</i> 2:1 or 1:1	$10^6 \sim 10^{10}$ CFU/mL	19	12.50
	大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、链球菌 2:1:1或 1:1:1 <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Staphylococcus aureus</i> 、 <i>Streptococcus</i> 2:1:1 or 1:1:1	$4 \sim 6 \times 10^6$ 、 1×10^7 、 4×10^8 、 $1 \sim 3 \times 10^9$ 、 3×10^{10} CFU/mL	76	50.00
	大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、解脲脲原体 <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Staphylococcus aureus</i> 、 <i>Ureaplasma urealyticum</i>	10^9 CFU/mL	8	5.26
	表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、淋病奈瑟菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 、 <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5×10^6 CFU/mL	1	0.66
	金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色假丝酵母菌 1:1:1 <i>Staphylococcus aureus</i> 、 <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Candida albicans</i> 1:1:1	3×10^9 CFU/mL	1	0.66
混合菌 Mixed bacteria	不详 Unknown	5	3.29	

表 4 SPID 动物模型的检测指标统计

Table 4 Statistics of detection indicators in SPID animal models

检测指标 Detection indicators	具体指标 Specific indicators	频数/次 Frequency/ time	占比/% Percentage/%
盆腔组织病理分析 Pelvic histopathological analysis	苏木素-伊红 (HE) 染色、Giemsa 染色、Masson 染色观察子宫或输卵管不同改变以及损伤评分 Observing different changes in the uterus or fallopian tubes and damage scores by HE staining, Giemsa staining and Masson staining	167	24.96
炎症因子检测 Detection of inflammatory factors	放射免疫法、ELISA 法等检测动物血清、子宫输卵管组织匀浆 (IL-1β、IL-2、IL-6、IL-10、TNF-α、NO 等) 表达 Detecting the expression of animal serum, uterus and fallopian tube tissue homogenate (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, NO, etc.) by Radioimmunoassay, ELISA, etc.	124	18.53
子宫输卵管组织蛋白表达 Protein expression in tissues of the uterus and fallopian tubes	Western Blot 检测蛋白在子宫输卵管组织中的表达情况, 免疫组织化学、免疫荧光观察蛋白表达位置 Detecting the expression of protein in uterus and fallopian tube tissue by Western Blot, and observing the protein expression position by immunohistochemistry, immunofluorescence	99	14.80
盆腔组织表观指标 Apparent indicators of pelvic tissue	子宫、输卵管大体变化 (充血、狭窄、积液等)、盆腔粘连情况及盆腔粘连 Verco、PhILips 评分 Gross changes in the uterus and fallopian tubes (congestion, stenosis, effusion, etc.), pelvic adhesions, and pelvic adhesions Verco and PhILips scores	50	7.47
血液流变学 Hemorheology	“锥板法”、血液流变仪测定全血黏度、血浆黏度、红细胞压积等指标 Determining whole blood viscosity, plasma viscosity, hematocrit and other indicators by the “cone plate method” and hemorheology	41	6.13
子宫输卵管组织基因表达 Gene expression in tissues of the uterus and fallopian tubes	实时荧光定量 PCR、PCR、原位杂交法等检测子宫输卵管组织基因表达 Detecting gene expression in uterus and fallopian tube tissue by qPCR, PCR, and <i>in situ</i> hybridization, etc	37	5.53
子宫肿胀情况 Swelling of the uterus	左右侧子宫分别称重, 患侧质量减去健侧质量即为子宫肿胀度, 子宫肿胀度/体重即为子宫肿胀率 Left and right sides of the uterus were weighed separately, and the mass of the affected side was reduced by the mass of the healthy side, which was the uterine swelling degree, and the uterine swelling degree divided by the weight was the uterine swelling rate	32	4.78
细胞分析 Cell analysis	流式细胞仪、免疫组化等分析外周血、脾的 T 淋巴细胞、NK 细胞等免疫细胞 Analyzing immune cells such as T lymphocytes and NK cells in peripheral blood and spleen by flow cytometry, immunohistochemistry, etc.	23	3.44
生化指标的检测 Detection of biochemical markers	动物血清/血浆、子宫组织匀浆 MDA、MPO、SOD 等氧化应激因子水平检测 Detecting the levels of oxidative stress factors (MDA, MPO, SOD, etc.) in animal serum or plasma and uterine tissue homogenates	21	3.14
免疫指标的检测 Detection of immune markers	免疫浊度法、单向扩散法、ELISA 等方法检测血清、子宫组织免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM、补体 C3、C4 等含量以及阴道冲洗液、宫腔分泌物中 SIgA 的含量 Detecting the contents of immunoglobulin IgG, IgA, IgM, complement C3 and C4 in serum and uterine tissue, as well as the content of SIgA in vaginal irrigation fluid and uterine secretions by immunoturbidity, unidirectional diffusion, ELISA and other methods	20	2.99
动物表观指标 Animal epithetical indicators	体重、毛发、饮食、活动状态、摄食量、精神、行为学等情况 Weight, hair, diet, activity status, food intake, mental, behavioral conditions, etc	14	2.09
输卵管通畅情况 Tubal patency	亚甲兰、生理盐水通液、HSG 等方法观察输卵管通畅度 Observing the patency of the fallopian tubes by methylene orchid, normal saline ventilation, HSG and other methods	12	1.79
脏器指数 Organ index	胸腺、肝、脾称重, 脏器重/体重即为相应脏器指数 Thymus, liver, and spleen are weighed, and the organ weight/weight is the corresponding organ index	8	1.20
子宫指数 Uterine index	子宫称重, 子宫重/体重即为子宫指数或称为子宫系数 Uterine weighing, uterine weight/weight is the uterine index or uterine coefficient	7	1.05
受孕率 Pregnancy rate	各组受孕动物数/各组动物数 Number of conceived animals in each group divided by number of animals in each group	7	1.05
电镜 Electron microscopy	透射电镜观察子宫内膜、输卵管微结构 Observing the microstructure of the endometrium and fallopian tubes	7	1.05

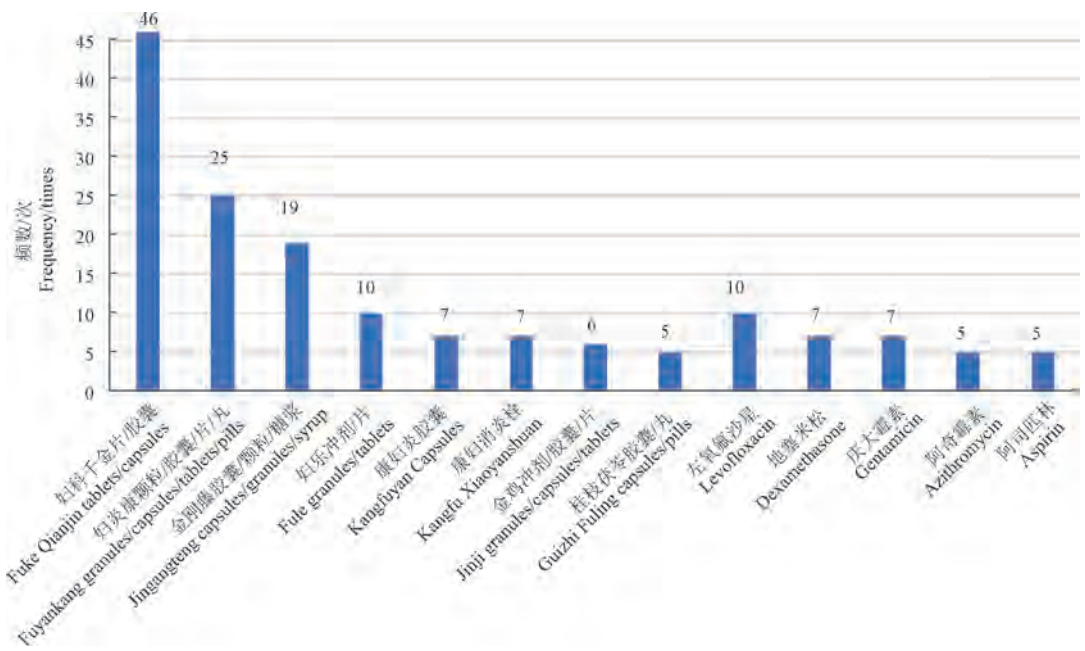


图 2 SPID 动物模型阳性对照药(高频, ≥ 5 次)
Figure 2 Positive control drugs in animal models of SPID(High frequency, ≥ 5 times)

3. 2. 1 苯酚胶浆法

苯酚胶浆对组织具有腐蚀性和刺激性,临床曾被作为黏堵剂用于女性输卵管绝育术。苯酚胶浆可造成子宫或输卵管粘膜组织的化学性灼伤、组织充血、水肿、炎症渗出,继而引起粘膜坏死脱落,肉芽组织增生,导致子宫和输卵管粘连、阻塞,从而复制 SPID 模型^[13]。在注入苯酚胶浆前用锐器对子宫内膜进行机械性损伤可破坏子宫内膜本身的物理性防御机制,提高成模率。该法虽与 SPID 的发病机制不同,但导致子宫和输卵管的组织粘连、阻塞与 SPID 的病理损伤相似,且该法操作相对简便、成模率高、易于复制。苯酚胶浆法选用大鼠、兔为模型动物,苯酚胶浆的使用尚无统一标准,选定浓度在 10% ~ 30%,以 25% 浓度使用频数最多,注射剂量每只 0.02 ~ 0.1 mL,以每只 0.04 ~ 0.06 mL 使用频数最多。

3. 2. 2 病原体感染法

外源性、内源性病原体单独或混合感染是导致盆腔炎发生的主要因素,盆腔炎迁延发展为 SPID。病原体直接接种于盆腔生殖器官内,导致急性炎症损伤,组织粘膜充血、水肿,白细胞浸润,纤维素性分泌物增多。造模选用的病原体有单一病原体和混合菌两种。单一病原体多选用大肠埃希菌,还有衣原体、金黄色葡萄球菌;混合菌液又分为两菌(大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌)、三菌(大肠埃希菌、金

黄色葡萄球菌加链球菌或支原体或白假丝酵母菌),但菌液浓度及接种量尚缺乏规范性,各项研究间有明显差别,以 10⁶ CFU/mL、10⁹ CFU/mL 浓度计数居多,高浓度的菌液可能在缩短造模时间、提高成模率方面具有优势,但操作不当易引起动物盆腔感染加重导致败血症等增加死亡率。

从病原体接种方式看,该法有以下 4 种方式:(1)经腹手术病原体感染法:手术创伤、术后应急等容易引起手术并发症、败血症等导致动物死亡,对研究者的操作要求较高^[14]。(2)经腹手术机械损伤内膜 + 病原体感染法:锐器破坏子宫内膜粘膜细胞的物理屏障后注入病原体,提高了造模成功率。(3)经阴道病原体感染法:以兔为模型动物时选用经阴道子宫置管注入病原体^[12],以大(小)鼠为模型动物时采用移液枪注菌^[4]或用浸满菌液的医用明胶/止血海绵塞入阴道^[5]或宫腔内^[6]。该法操作相对简单,对动物损伤轻微,接种后并发症和死亡率较低。(4)经阴道 + 经腹手术病原体感染法^[15]:该法更贴合人类 PID 多为内、外原性病原体混合感染所致的理论^[16]。

3. 2. 3 异物置入法

塑料管压迫子宫内膜,导致无菌性炎症反应,白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等炎性细胞增加,炎性因子释放。该方法要求研究者有精巧的手术操作技能、较难重复、成功率偏低,且其致病途径与人类

有别,该方法造模的研究较少^[17]。

3.2.4 LPS 宫腔注射法

LPS 是革兰氏阴性菌细胞外壁的成分,是一种常见的内毒素,可以通过细胞信号转导激活体内免疫反应,引起机体炎症反应,被广泛应用于炎症模型的建立。LPS 具有易于控制剂量、测量和识别简单、模型重现性好的优点^[18],可以避免因菌液浓度控制不当导致的动物感染死亡^[19]。

3.2.5 盐酸 + LPS 法

盐酸可以损伤破坏子宫粘膜的物理屏障,在此基础上宫腔注射 LPS,较单独腹腔或宫腔注射 LPS,可明显减轻动物的全身炎症反应^[19]。

3.3 成模标准

SPID 模型评价主要从组织形态损伤、组织病理改变、炎症反应以及一般行为学等方面进行。SPID 以盆腔生殖器官及周围组织的慢性炎症反应为主要症状,子宫输卵管的形态学变化如充血、肿胀、迂曲、积液、与周围组织粘连情况以及病理形态学变化如粘膜皱襞增厚、上皮细胞坏死、慢性炎性细胞(如淋巴细胞、浆细胞)浸润、纤维结缔组织增生等是判定模型复制成功的主要判定标准。另外盆腔组织或血清中炎性因子的变化也是判定模型复制成功的可信标准。所纳入文献中关于中医病症结合模型的研究少,成模标准不统一,多以动物行为学变化以及耳色、舌色、爪色的变化判断证型。

3.4 高频检测指标

SPID 的临床表现具有异质性,因而研究目的不同,检测指标具有一定的差异性。大多数研究对子宫或输卵管组织进行了病理切片分析,通过 HE 染色或 Masson 染色观察盆腔组织的形态学变化,评估模型是否复制成功以及药物干预效果。在实验室检测方面,大部分研究对动物组织匀浆、血清中的炎性因子及相关蛋白的表达进行了检测,以此判断机体炎症程度及药物干预的效果。炎症因子的释放可以引起血液粘稠度改变,导致血栓形成,临床研究提示 SPID 患者存在一定的血流学改变^[20],在中医血瘀证相关的研究中进行了血液流变学相关指标的检测^[21-22]。因输卵管炎导致输卵管通畅度改变,不孕、异位妊娠的发生,输卵管通畅度检测、治疗后的受孕率也是不孕症方向研究者的关注点^[23-25]。

3.5 阳性对照药

合理、公认的阳性对照药及用药时间对研究的

可信度有重要影响。不同药物的有效作用剂量、时间、毒性不同,严格的给药量和周期需要结合药理学和独立实验等综合确定^[26],纳入的文献中有 166 篇文献是关于药物的作用机制及药效的研究,阳性对照药的用药时间与研究药物一致,很少有研究明确说明给药周期及剂量的依据。左氧氟沙星是使用最多的西药对照药,用药时间为 3 ~ 4 周^[27-28],使用时间与临床抗生素治疗规范有较明显差别,且抗生素用于慢性盆腔炎的治疗合适与否有待商榷。妇科千金胶囊和妇炎康是使用较多的中成药类对照药,二者在临床均用于 SPID 的治疗,但主治证型有异,前者组成药物攻补兼施,主治湿热瘀阻兼气血不足的虚实夹杂证;后者药物偏于清热解毒主治湿热下注,毒瘀互阻的实证。纳入文献中 SPID 模型以西医诊断标准为主要评价依据,缺乏稳定、成熟的病证结合模型建立和判定标准,所选用中成药阳性对照药缺乏可靠的依据,研究结果的可信度有待考证。

4 总结与展望

通过 SPID 动物模型相关文献的挖掘、整理、分析可知,目前 SPID 模型主要选择大鼠。经腹手术苯酚胶浆法、经腹手术或经阴道病原体感染法建立 PID 模型后常规喂养动物数周等待后遗症的发生是目前应用较多、较成熟的 SPID 模型建立方法,其中经阴道混合菌感染法是符合临床发病机制的造模方法,但涉及微生物感染造模对动物实验室条件有一定的要求;宫腔注射 LPS 法是近年来新兴的造模方法,可以避免因菌液浓度控制不当导致的动物死亡。造模周期多在造模后 14 ~ 16 d,以盆腔组织形态病理学改变为主要依据。阳性对照药的选择以及给药时限尚需进一步的研究和探索。中医药治疗是 SPID 有效的治疗措施,能明显改善患者的慢性盆腔痛、提高妊娠率、降低异位妊娠的发生,建立稳定成熟的中医病症结合模型对中医药的研究具有极重要的价值,是将来 SPID 模型的研究方向之一。

参 考 文 献(References)

- [1] 米兰,刘朝晖. 盆腔炎症性疾病后遗症[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(10): 731-733.
MI L, LIU C H. Sequela of pelvic inflammatory disease [J]. J Pract Obstet Gynecol, 2013, 29(10): 731-733.
- [2] YE H J M, HOOK E W 3rd, GOLDIE S J. A refined estimate of the average lifetime cost of pelvic inflammatory disease [J]. Sex

Transm Dis, 2003, 30(5): 369-378.

[3] 罗惠, 叶国柳, 晋茂生. 急性盆腔炎性疾病患者的致病微生物研究及药物治疗分析 [J]. 中华全科医学, 2023, 21(8): 1308-1311, 1432.

LUO H, YE G L, JIN M S. Analysis of the pathogenic microorganisms and drug treatment of acute pelvic inflammatory disease [J]. Chin J Gen Pract, 2023, 21(8): 1308 - 1311, 1432.

[4] 左瑾楠, 张兵, 于潇, 等. 逍遥舒坤颗粒对大鼠盆腔炎性疾病后遗症的治疗作用及其机制 [J]. 山东医药, 2023, 63(26): 40-43.

ZUO J N, ZHANG B, YU X, et al. Therapeutic effects of Xiaoyao Shukun Granules on sequelae of pelvic inflammatory diseases [J]. Shandong Med J, 2023, 63(26): 40-43.

[5] 徐佳, 谭雅莉, 肖志葵, 等. 妇科千金方及其拆方对盆腔炎性疾病后遗症大鼠的作用 [J/OL]. 中成药, [2024-04-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230522.1612.002.html>.

XU J, TAN Y L, XIAO Z K, et al. Effects of Fuke Qianjin Formula and its modifications on the sequelae of pelvic inflammatory disease in rats [J/OL]. Chin Tradit Patent Med, [2024-04-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230522.1612.002.html>.

[6] 杨塍, 邓卉, 王彩霞, 等. 当归芍药散对慢性盆腔炎大鼠子宫组织 NF-κB 信号通路蛋白的影响 [J]. 中医药导报, 2020, 26(9): 7-11.

YANG K, DENG H, WANG C X, et al. Effect of Danggui Shaoyao Powder on NF-κB signaling pathway protein in uterine tissue of rats with chronic pelvic inflammation [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 26(9): 7-11.

[7] 谢紫烨, 黄政海, 俞婵娟, 等. 康妇消炎栓治疗慢性盆腔炎模型大鼠药效学研究 [J]. 中成药, 2018, 40(12): 2747-2750.

XIE Z Y, HUANG Z H, YU C J, et al. Pharmacodynamics of Kangfu Xiaoyan suppository in treating chronic pelvic inflammatory disease model rats [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(12): 2747-2750.

[8] ZHAO C, LI J, CAI H, et al. An injectable hydrogel scaffold with IL-1β-activated MSC-derived exosomes for the treatment of endometritis [J]. Biomater Sci, 2023, 11(4): 1422-1436.

[9] 王阳, 刘小月, 卜晓玲. 参芪扶正汤对盆腔炎性疾病后遗症小鼠上生殖道细胞自噬水平的影响 [J]. 河北中医药学报, 2022, 37(2): 1-5, 9.

WANG Y, LIU X Y, BU X L. Effect of Shenqi fuzheng decoction on autophagy level of upper reproductive tract cells in mice with sequelae of pelvic inflammatory disease [J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 2022, 37(2): 1-5, 9.

[10] ROBERTS L M, SANFILIPPO J S, RAAB S. Effects of laparoscopic lavage on adhesion formation and peritoneum in an animal model of pelvic inflammatory disease [J]. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 2002, 9(4): 503-507.

[11] 殷利军, 陈辉, 熊利泽. 神经病理性疼痛动物模型的选择与建立 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(10): 725-730.

YIN L J, CHEN H, XIONG L Z. Selection and establishment of animal models of neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2023, 29(10): 725-730.

[12] 李俊良, 刘恒, 王建六, 等. 免盆腔炎性疾病后遗症模型的制备 [J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(6): 517-519, 533.

LI J L, LIU H, WANG J L, et al. The established animal model of sequelae of pelvic inflammatory disease [J]. J Int Obstet Gynecol, 2011, 38(6): 517-519, 533.

[13] 唐萍, 张传平, 陆紫琪, 等. 盆炎净片对苯酚胶浆致大鼠盆腔炎性疾病后遗症的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(3): 332-337.

TANG P, ZHANG C P, LU Z Q, et al. Effect of pen Yan Jing Tablets on SPID induced by phenolic mucilage in rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2021, 32(3): 332-337.

[14] 冯子聪, 张昭, 黎哲, 等. 大肠埃希菌致慢性输卵管炎症模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 19-23.

FENG Z C, ZHANG Z, LI Z, et al. The establishment of chronic salpingitis model of New Zealand rabbits caused by *Escherichia coli* [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(3): 19-23.

[15] 李晓燕, 朱晓芙, 朱长玲, 等. 慢盆消炎方对慢性子宫内膜炎模型大鼠 IL-2、MMP-2 及 TIMP-2 的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(10): 762-764.

LI X Y, ZHU X F, ZHU C L, et al. Effects of manpenxiaoyan decocion on the expression of IL-2, MMP-2, and TIMP-2 in chronic endometritis rats [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2012, 22(10): 762-764.

[16] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2018.

XIE X, KONG B H, DUAN T, et al. Obstetrics and Gynecology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2018.

[17] 黄丽, 孙培文, 罗隽, 等. 慢性盆腔炎模型的建立与评价 [J]. 中南药学, 2010, 8(6): 469-472.

HUANG L, SUN P W, LUO J, et al. Establishment and evaluation of chronic pelvic inflammatory disease model [J]. Cent South Pharm, 2010, 8(6): 469-472.

[18] WEN L, SUN W, XIA D, et al. The m6A methyltransferase METTL3 promotes LPS-induced microglia inflammation through TRAF6/NF-κB pathway [J]. Neuroreport, 2022, 33(6): 243-251.

[19] OH Y, LEE J, KIM H C, et al. Establishment of hydrochloric acid/lipopolysaccharide-induced pelvic inflammatory disease model [J]. J Vet Sci, 2016, 17(3): 413-419.

[20] 程静, 宋红萍, 陈冠荣, 等. 盆康舒颗粒对慢性盆腔炎的保护作用及机制探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(11): 895-898.

CHENG J, SONG H P, CHEN G R, et al. Experimental study on the anti-chronic pelvic inflammatory effect of Penkangshu Granule and its mechanism of action [J]. Chin J Hosp Pharm, 2014, 34(11): 895-898.

[21] 陈瑞雪, 李丽静, 王红玉, 等. 复方盆炎宁对气虚血瘀型盆

腔炎大鼠血液流变学的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(3): 183-184.

CHEN R X, LI L J, WANG H Y, et al. Effects of Fufang penyaning on blood rheology in pelvic inflammation rats with syndrome of qi deficiency and blood stasis [J]. J Basic Chin Med, 2006, 12(3): 183-184.

[22] 刘丽, 刘进哲, 王亚文, 等. 膈下逐瘀汤加减方对大鼠气滞血瘀型慢性输卵管炎模型病理学及血清 IL-6 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2575-2578, 2817.

LIU L, LIU J Z, WANG Y W, et al. Effect of Gexia Zhuyu Decoction on pathological histomorphology and serum IL-6 in rats with qi stagnation and blood stasis type of chronic salpingitis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(11): 2575-2578, 2817.

[23] 徐桂中, 张欣, 侯一平, 等. 金黄色葡萄球菌致小鼠慢性输卵管炎性不孕模型制作 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(3): 6-9.

XU G Z, ZHANG X, HOU Y P, et al. Modeling chronic salpingitis infertility with *Staphylococcus aureus* in mice [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(3): 6-9.

[24] 陈丹纯, 梁静, 张嫋嫋, 等. 和坤方对大鼠慢性输卵管炎性阻塞性模型的病理组织形态学的影响 [J]. 四川中医, 2014, 32(9): 36-39.

CHEN D C, LIANG J, ZHANG X X, et al. Effect of Hekun recipe on histopathology of chronic salpingitis obstructive model in rats [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2014, 32(9): 36-39.

[25] 罗惠娟, 周娟, 汤小湄, 等. 人脐带间充质干细胞对输卵管炎大鼠输卵管超微结构和功能的改变 [J]. 生殖与避孕, 2014, 2: 108-115.

LUO H J, ZHOU J, TANG X M, et al. Oviduct ultrastructure and function comparison of effectiveness of WJMSCs on rat's acute and chronic salpingitis [J]. Reprod Contracept, 2014, 2: 108-115.

[26] 葛君玺, 秦格, 谢逸轩, 等. 基于数据挖掘的扩张型心肌病动物模型研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1167-1176.

GE J X, QIN G, XIE Y X, et al. Data mining-based animal model for dilated cardiomyopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1167-1176.

[27] 江利, 姜梦婕, 韩克. 桂枝茯苓丸对慢性盆腔炎大鼠血清炎症因子水平及子宫组织 caspase-3、caspase-8 表达的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(10): 2846-2850.

JIANG L, JIANG M J, HAN K. Effect of Guizhi Fuling pill on serum inflammatory factor level and expression of caspase-3 and caspase-8 in uterine tissue of rats with chronic pelvic inflammation [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(10): 2846-2850.

[28] 陈柯贝, 黄小妹, 莫桂梅, 等. 复方小钻方 3 种颗粒剂对慢性盆腔炎大鼠的影响 [J]. 陕西科技大学学报, 2021, 39(4): 61-65.

CHEN K B, HUANG X M, MO G M, et al. Effects of three types of Xiaozuan Granules on chronic pelvic inflammation rats [J]. J Shaanxi Univ Sci Technol, 2021, 39(4): 61-65.

[收稿日期] 2024-03-01

刘翼骁,韩欣园,肖依彤,等. 甘草次酸及其衍生物在神经退行性疾病中的防治作用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 923-932.

LIU Y X, HAN X Y, XIAO Y T, et al. Advancements in research on the preventive and curative roles of glycyrrhetic acid and its derivatives in neurodegenerative disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 923-932.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.011

甘草次酸及其衍生物在神经退行性疾病中的防治作用研究进展

刘翼骁¹, 韩欣园¹, 肖依彤¹, 于昕卓¹, 叶田园^{2*}

(1. 山东中医药大学中医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学中医药创新研究院, 济南 250355)

【摘要】 随着全球人口老龄化加剧,神经退行性疾病发病率逐年上升,严重影响老年患者的生活质量,给社会带来沉重负担。甘草次酸是中药甘草的主要活性成分之一,具有抑制神经炎症、保护神经元等作用,对于甘草次酸及其衍生物在神经退行性疾病中的作用机制研究日益增多。本研究综述了甘草次酸及其衍生物在阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、多发性硬化和小脑萎缩的作用及其机制的研究,并对其未来在神经退行性疾病中的应用进行讨论与展望。

【关键词】 甘草次酸;衍生物;作用机制;神经退行性疾病

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847(2024)07-0923-10

Advancements in research on the preventive and curative roles of glycyrrhetic acid and its derivatives in neurodegenerative disease

LIU Yixiao¹, HAN Xinyuan¹, XIAO Yitong¹, YU Xinzhuo¹, YE Tianyuan^{2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Innovative Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Corresponding author: YE Tianyuan. E-mail: yetianyuan2013@163.com

【Abstract】 The annual incidence of neurodegenerative disease has been increasing with the aging of the global population, seriously affecting the quality of life of elderly patients and imposing a heavy burden on society. Glycyrrhetic acid, which inhibits neuroinflammation and protects neurons, is one of the main active ingredients of the traditional Chinese medicine *Glycyrrhiza glabra*. Increasing numbers of studies are focusing on the mechanism of action of glycyrrhetic acid and its derivatives in neurodegenerative disease. This review summarizes studies on the effects and mechanisms of action of glycyrrhetic acid and its derivatives in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, and cerebellar atrophy. Additionally, the future applications of glycyrrhetic acid and its derivatives in neurodegenerative disorders are discussed.

【Keywords】 glycyrrhetic acid; derivative; mechanism of action; neurodegenerative disease

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

[基金项目] 国家自然科学基金(82205078), 山东省自然科学基金(ZR2021QH157), 山东省中医药科技项目(2021Q079), 山东省大学生创新创业训练计划项目(S202310441013, S202310441012)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82205078), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021QH157), Shandong Province Traditional Chinese Medicine Technology Project (2021Q079), the Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project of Shandong Province (S202310441013, S202310441012).

[作者简介] 刘翼骁,在读本科生,研究方向:中药药理与毒理学研究。Email:2302534289@qq.com

[通信作者] 叶田园,硕士生导师,研究方向:中药药理与毒理学研究。Email:yetianyuan2013@163.com

神经退行性疾病是由中枢神经系统神经元变性引发的不可逆的神经病变,包括阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、多发性硬化、小脑萎缩等,主要表现为认知障碍和记忆力明显下降,同时也会出现运动障碍^[1]。随着世界老龄化进展加速,神经退行性疾病逐渐成为棘手的社会难题。

中医学认为阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 属“痴呆”范畴,肾精亏虚所致的脑髓失养与脑内浊毒的内生会使脑消髓减、神机失常,从而引发阿尔茨海默病。 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β) 是阿尔茨海默病的主要病理产物之一,属于脑内浊毒内生,会损伤脑髓、蒙蔽心窍^[2]。帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 属于“颤证”范畴,病位在脑,病性本虚标实,其以脾虚为本,络脉阻滞为标。患者脾失运化,致水湿停聚,气血运行不畅,脾主升清功能失常,且脾在体合肉,脾在液为涎^[3]。临床上帕金森病患者表现为精神萎靡、四肢沉重、肌肉僵硬、流涎等,与中医理论相应^[3]。肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 初期,表现为肌肉颤动伴发疼痛,归为“痙病”,中后期肌肉萎缩逐渐成为主要症状,归为“痿病”,多表现为脾肾亏虚,临床上可见肌肉萎缩无力、精神不振^[4]。中医对于神经退行性疾病治疗多以补肾健脾、益气活血为主,补肾健脾以治疗肾精亏虚所致的脑髓失养与脾胃亏虚所致的精神萎靡、四肢无力,益气活血以“补其不足,损其有余”,补气血,祛瘀毒^[5]。

当前能够明确治愈神经退行性疾病的药物尚未出现,某些药物服用后会产生一系列不良反应。中药凭借其多靶点、副作用较少的优势,逐渐被人们重视,大量中药活性成分的作用机制被逐渐挖掘。许多中药单体与复合物已被证实实在促进神经

元生成和减轻神经炎症等方面发挥着有效作用,如川陈皮素能够下调 APP/PS1 小鼠中高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB-1) 和半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 表达,抑制神经炎症,提高小鼠空间学习和记忆能力^[6]。鱼腥草酸钠可以通过抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/焦孔素 D (gasdermin D, GSDMD) 表达来减轻 A β 氧化应激造成的神经元损伤^[7]。海藻糖可以通过诱导细胞自噬清除突变亨廷顿蛋白以及 α -突触核蛋白的自噬底物,并抑制 tau 蛋白的磷酸化^[8]。越来越多的中药在神经退行性疾病的治疗中展现出巨大潜力。

甘草来源于豆科甘草属植物的干燥根以及根茎,为中医组方中的常见药,归心、肺、脾、胃经。具备益气解毒,调和诸药的功效,被誉为“国老”,其主要活性成分甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA) 是一种五环三萜类化合物,具有手性刚性骨架和多个反应位点,生物相容性较好,近年来备受关注^[9]。甘草次酸及其衍生物 18 α -甘草次酸 (18 α -GA)、18 β -甘草次酸 (18 β -GA) (化学结构见图 1) 逐渐被证实具有抑制神经炎症、防止神经元损伤、抗氧化应激等作用,能够通过血脑屏障^[10],对于神经退行性疾病的预防和治疗展现出潜在的价值。本研究综述了近年来对于甘草次酸及其衍生物在神经退行性疾病中的作用及机制研究,以期对神经退行性疾病的防治提供新思路。

1 甘草次酸的药物代谢动力学

1.1 人体内的药物代谢动力学

健康男性志愿者口服不同剂量的甘草次酸

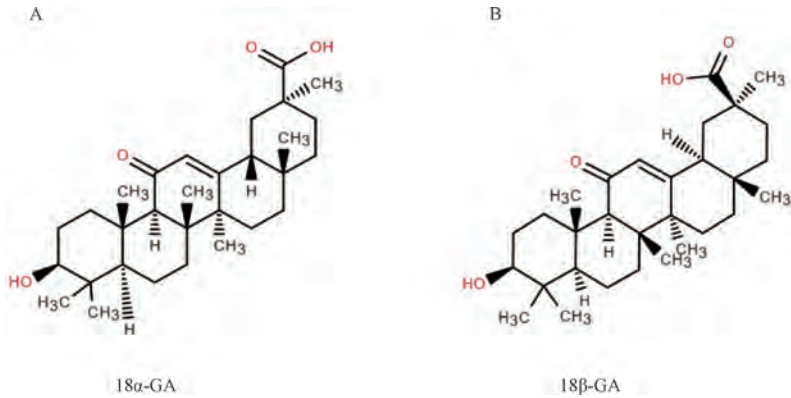


图 1 18 α -GA 和 18 β -GA 的化学结构

Figure 1 Chemical structures of 18 α -GA and 18 β -GA

(500、1000、1500 mg) 后,采用高效液相色谱法测定血浆和尿液中甘草次酸的浓度,当甘草次酸剂量 > 500 mg 时,血药浓度-时间曲线呈双相衰减。1000 mg 组和 1500 mg 组第二消除相的平均半衰期分别为 (11.5 ± 1.2) h 和 (38.7 ± 10.5) h。血药浓度峰值和药时曲线下面积 (area under curve, AUC) 随甘草次酸剂量增加而增大。甘草次酸和甘草次酸葡萄糖醛酸苷在 24 h 内的尿排出量的含量不到给药剂量的 1%。其动力学特点是在组织中广泛分布,达峰时间长^[11],同时甘草次酸在人体内存在肠肝循环^[12]。

1.2 大鼠体内的药物代谢动力学

通过反相高效液相色谱法分析大鼠血浆中甘草次酸,乙腈沉淀法处理血浆样品,甘草次酸血药浓度在 50 ~ 2000 ng/mL 时,线性关系良好 ($r = 0.9997$),血药浓度-时间曲线与二室开放模型相符合。100、1000、2000 ng/mL 的甘草次酸回收率分别为 $(105.2 \pm 2.23)\%$ 、 $(102.5 \pm 2.95)\%$ 、 $(98.4 \pm 2.32)\%$ 。分布相的生物半衰期为 (0.153 ± 0.023) h,消除相的生物半衰期为 (2.365 ± 0.866) h, $C_{\max} = (2.074 \pm 0.100)$ mg/L, $CL = (0.715 \pm 0.082)$ L/(h·kg), $V_d = (2.427 \pm 0.872)$ L/kg, $AUC_{0-6h} = (1.302 \pm 0.151)$ mg/(h·L)。表明甘草次酸在大鼠体内快速广泛分布^[13]。甘草次酸在大鼠体内的分布容积为 100 ~ 1000 mL/kg,在大鼠血浆中先快速分布,后缓慢消除。甘草次酸主要以葡萄糖醛酸苷以及硫酸盐的形式被胆汁排出,在尿液中含量极少,未发现明显的肠肝循环^[14]。

2 甘草次酸的毒性

大鼠口服甘草次酸 (100 mg/kg) 16 d 后,血浆和尿液中甘草次酸的代谢产物 3-O-单葡萄糖醛酸基甘草次酸 (glycyrrhetic acid 3-O-mono- β -d-glucuronide, GAMG) 水平显著升高, GAMG 通过有机阴离子转运体 (organic anion transporters, OATs) 主动转运到肾小管后, 11 β -羟基类固醇脱氢酶 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD) 受到抑制,肾小管上皮细胞中的皮质醇累积,从而诱发假性醛固酮增多症^[15]。小鼠单次静脉注射甘草次酸 (每只 100 μ L) 后发现 11 β -HSD2 受到抑制,皮质酮水平增加,胸腺和脾中的淋巴细胞凋亡^[16]。18 β -GA (20 μ mol/L) 能够诱导小鼠腹膜巨噬细胞中一氧化氮 (nitrous oxide, NO) 的产生,下调抗炎细胞因子白介

素-10 (interleukin-10, IL-10) 和白介素-4 (interleukin-4, IL-4) 的表达水平,上调促炎细胞因子白介素-12 (interleukin-12, IL-12)、干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达水平^[17],这可能会导致靶器官损伤。甘草次酸 (10 μ mol/L) 处理大鼠肝细胞线粒体后,会引起线粒体肿胀以及膜电位丧失,并引发细胞色素 C 释放,从而引发细胞凋亡^[18]。

3 甘草次酸及其衍生物在神经退行性疾病中的作用

3.1 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)

AD 是与年龄密切相关的最常见的神经退行性疾病之一,其发生与 A β 的沉积、tau 蛋白高度磷酸化形成的神经原纤维缠结、神经元丢失和神经炎症等密切相关^[19]。

甘草次酸及其衍生物可以通过减弱神经毒性、减少神经元死亡发挥神经保护作用。3 $\times$ Tg-AD 小鼠是 AD 的常用模型^[20],谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭会引发 3 $\times$ Tg-AD 小鼠神经元的死亡,上调核因子 NF-E2 相关因子 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 能够提高神经元抗氧化应激能力^[21]。18 α -GA 可以恢复 3 $\times$ Tg-AD 神经元中较低的 Nrf2 和谷氨酰半胱氨酸连接酶 (glutamate cysteine ligase, GCL) 水平,通过上调 GCL 水平刺激 GSH 的合成,并促进 Nrf2 转移至细胞核,提高神经元在 A β 应激下的存活率,从而达到保护神经的目的^[22]。7-酮胆固醇能诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (rat adrenal pheochromocytoma, PC12) 细胞核受损,线粒体跨膜电位丧失,胞质促凋亡蛋白 (Bcl2-associated X, Bax) 和细胞色素 C 水平升高, Caspase-3 活化和细胞死亡, 18 β -GA 能够降低线粒体促凋亡蛋白/B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl2-associated X/B-cell lymphoma-2, Bax/Bcl-2) 比率^[23],抑制线粒体受损,抑制 Caspase-3 活化以减少细胞色素 C 释放,并能够通过抑制线粒体膜通透性的变化,保护 7-酮胆固醇诱导的神经元损伤^[24]。同时, 18 β -GA 还可以激活 PC12 细胞中的磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidyl-inositol 3-kinase/serine-threonine kinase, PI3K/AKT) 信号通路^[23],使其免受 A β 诱导的神经毒性,减少 A β 的产生和沉积、tau 的过度磷酸化^[25]。N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR) 是谷氨酸触发的离

子门控通道,在神经系统的兴奋性突触传递、可塑性和神经毒性中起关键作用^[26]。NMDAR 可以结合 A β 并转导突触毒性^[27],而甘草次酸能够抑制 NMDAR 以发挥神经保护作用^[28]。乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 能够减少 A β 产生与集聚^[29],通过 Ellman 方法检测 18 β -GA 对乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的抑制作用,发现 18 β -GA 可以通过抑制 AChE 从而维持 ACh 的水平和作用持续时间,从而减轻 AD^[30]。

18 β -GA 能够通过抑制炎症反应和 tau 磷酸化在 AD 中发挥作用。小胶质细胞的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 信号激活会引发 AD 中的炎症,同时星形胶质细胞中的 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 与 p38 MAPK 级联能导致炎症反应并引发兴奋毒性,神经元的 p38 MAPK 信号则会促使 tau 磷酸化^[31]。研究表明,18 β -GA 能够抑制 p38 MAPK、JNK 和 tau 磷酸化水平^[32]。AD 的发生与神经炎症密切相关,病原体脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 激活的巨噬细胞可以引发神经炎症。LPS 可诱导磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 和核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 活化,从而产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、前列腺素 (prostaglandin, PG)、NO、TNF- α ,促进 AD 炎症反应^[33]。18 β -GA 能够抑制 NF- κ B 和 PI3K 的活性,减少 LPS 诱导的 TNF- α 、白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的产生,抑制 LPS 诱导的 NO、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 的生成和 ROS 堆积,从而通过抑制炎症反应改善 AD^[34]。

A β 斑块集聚会诱导连接蛋白半通道开放,从而释放谷氨酸和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP),引发神经毒性,损伤神经元来加速 AD 进程^[35]。在 A β 斑块周围反应性星形胶质细胞中的间隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 表达增加, Cx43 半通道活性也增加,18 α -GA 能够通过抑制连接蛋白半通道的开放来改善 AD 病理^[36]。8-溴-环二磷酸腺苷核糖 (8-bromo-cadp-ribose, 8-Br-cADPR) 处理小鼠原代小胶质细胞后,ADP-核糖基环化酶/环 ADP 核糖 (cluster of differentiation 38/cyclic ADP ribose, CD38/cADPR) 通路被抑制, Cx43 半通道过度激活,小胶质细胞释放 ATP 增多,引发小胶质细胞的凋亡和炎症,18 α -GA 能够抑制其诱

导的 Cx43 半通道开放,并激活 CD38,减少 ATP 释放,从而减少小胶质细胞的凋亡^[37]。另有研究表明,特异性敲除 Cx43 可显著改善 APP/PS1 双转基因小鼠的空间学习记忆能力和物体识别记忆能力^[38],因此推测 18 α -GA 可通过抑制 Cx43 半通道来改善认知障碍。

3.2 帕金森病 (Parkinson's disease, PD)

PD 为常见的神经退行性疾病之一,PD 患者可表现为肌肉强直、运动迟缓和步态失常等运动障碍以及抑郁、认知功能减退等非运动障碍。病理特征主要包括黑质多巴胺能神经元的缺失以及纹状体多巴胺含量减少^[39]。

甘草次酸及其衍生物能够调节促炎因子释放,减少神经元缺失。小胶质细胞促炎因子的释放量与多巴胺神经元的存活率呈负相关^[40],根据微环境的不同,小胶质细胞会形成促炎或抗炎表型,这两种表型都对神经元起重要的调节作用^[41]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 可以诱导促炎型小胶质细胞释放促炎因子,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ,诱发神经炎症引起神经元缺失,常用于构建 PD 动物模型^[42]。小胶质细胞可通过上调 IL-4、IL-10 等抗炎因子表达发挥神经保护作用^[43]。18 β -GA 能够通过激活抗炎型小胶质细胞释放抗炎因子从而对 MPTP 诱导的小鼠显示出神经保护作用,随着 18 β -GA 浓度的增加,抗炎因子 IL-4 和 IL-10 表达水平升高,促炎细胞因子 IL-6 和 IL-1 β 数量减少^[44],炎症反应引起的神经元受损也得到缓解。Cx43 半通道异常开放释放的 ATP 可诱导小胶质细胞活化,其中以促炎型小胶质细胞为主^[45]。在 MPTP 诱导的雄性杂合 Cx30 KO 小鼠中,纹状体中 Cx43 表达增加^[46],星形胶质细胞 Cx43 半通道通透性也增加^[47],18 β -GA 可以抑制 Cx43 半通道开放,减少促炎因子释放,以防止神经元变性^[48]。Caspase 的激活为神经元凋亡的主要因素之一,Bcl-2 家族成员是调节其激活环节的关键^[49],Bcl-2 可降低线粒体外膜的通透性,抑制线粒体释放凋亡因子,在双酚 A (bisphenol A, BPA) 诱导后,大鼠脑细胞 Bax/Bcl-2 比率升高,18 β -GA 给药可下调 Bax 和 Caspase-3 的表达,上调 Bcl-2 表达,从而抑制细胞色素 C 释放,减少神经元损伤与凋亡^[32]。髓系细胞触发受体 2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) 作为炎症反应的关键调节因子,能够下调 TNF- α 的表达^[50],Nrf2

能够启动 TREM2 的转录, 1-甲基-4-苯基吡啶 (N-methyl-4-phenylpyridinium, MPP) 是一种神经毒性化合物, 能够引发神经炎症, 杀死多巴胺能神经元^[51], 18 β -GA 处理 MPP 诱导的小胶质细胞后, 抗炎型小胶质细胞活化, 细胞核中 Nrf2 的水平上调, TREM2 的表达也随 18 β -GA 浓度升高而升高, 神经元缺失得到抑制^[44]。综上, 18 β -GA 可通过抑制 Cx43 半通道开放, 激活抗炎型小胶质细胞, 减少神经元受损。

18 β -GA 可通过多条通路延缓 PD 进程。BDNF/TrkB 信号通路与中枢神经系统活动密切相关, 酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 为脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的受体, 促进 BDNF 上调可防止黑质变性^[52]。18 β -GA 处理 Wistar 大鼠后, 发现其前额叶皮层和海马体中的 TrkB 与 BDNF 的表达均有所增加^[53]。18 β -GA 可以通过上调 PI3K-Akt 通路抑制 6-羟基多巴胺 (oxidopamine hydrobromide, 6-OHDA) 诱导的 PC12 细胞死亡^[23]。另有研究发现, 18 β -GA 还能够通过激活 PI3K-AKT 通路^[23], 促进多巴胺神经元生长^[54]。以上研究表明, 18 β -GA 可通过促进 BDNF 表达上调, 激活 PI3K-Akt 信号通路保护神经细胞。

3.3 肌萎缩性脊髓侧索硬化症

肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种由运动神经元变性引起的破坏性疾病。ALS 患者在脊髓星形胶质细胞中表现出 NF- κ B 活性增加的趋势^[55], NF- κ B 已被证明能够推动神经退行性疾病发展^[56], 其可控制 TNF- α 等炎症细胞因子, 引起神经元死亡和脱髓鞘^[57]。18 β -GA 可以通过抑制 NF- κ B 信号通路来缓解 BPA 诱导的 Wistar 白化大鼠的神经炎症, 显著下调 TNF- α 表达, 抑制 NF- κ B 信号通路, 减少神经元死亡与脱髓鞘^[32]。同时在家族性病例中 ALS 是超氧化物歧化酶 1 基因 (recombinant superoxide dismutase 1, SOD1) 发生突变所致^[58]。几乎所有突变都导致 SOD 活性显著丧失^[59]。18 β -GA 可提高成年正常小鼠侧脑室室下区 (subventricular zone, SVZ) 中神经干细胞 (neural stem cell, NSCs) 的 SOD1 表达, 减少细胞内 ROS 的堆积, 维持成年小鼠 SVZ 的 NSCs 增殖潜能^[60]。

3.4 多发性硬化和小脑萎缩

多发性硬化 (multiple sclerosis, MS) 是中枢神经系统慢性炎症脱髓鞘疾病的一种, 病理上可见中枢

神经系统白质的脱髓鞘、炎症细胞因子浸润等^[61], 包括肢体无力等症状。小脑萎缩 (cerebellar atrophy, CA) 是小脑的退行性病变, 也会出现脱髓鞘的现象^[62]。氯丙嗪 (chlorpromazine, CPZ) 能够诱导细胞凋亡并引发中枢神经系统脱髓鞘^[63]。18 β -GA 能够上调髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 水平, 降低 CPZ 诱导的脱髓磷脂损伤; 同时还能够使小胶质细胞极化由促炎型小胶质细胞向抗炎型小胶质细胞转移, 并改善小鼠的运动能力^[64]。

4 甘草次酸治疗神经退行性疾病的主要机制

4.1 抗氧化应激

中枢神经系统含多种不饱和脂肪酸、耗氧量大, 抗氧化能力弱, 神经元容易受到氧化应激的影响^[65]。当代谢失衡, ROS 累积到一定程度, 大于神经元细胞解毒能力时, 就会导致氧化应激, 造成神经元凋亡。氧化应激与 AD、PD 等和年龄关联紧密的神经退行性疾病息息相关^[66]。GSH 是存在于人体的抗氧化剂, 可以拮抗各类炎症细胞因子的氧化, 在神经退行性疾病中发挥重要作用^[67]。1-甲基-4-苯基吡啶离子 (N-methyl-4-phenylpyridinium iodide, MPP⁺) 处理可以抑制呼吸链, 引发线粒体功能障碍, 从而致使 ROS 堆积, 产生毒性与炎症^[68]。18 β -GA 能够有效预防 MPP⁺ 诱导的 GSH 减少^[69], 减少氧化应激带来的损伤。

4.2 抑制细胞衰老和凋亡

上述提到的氧化应激能够通过线粒体激活 MAPK-JNK 途径, JNK 转运入细胞核后会激活 p53 转录, p53 能够引发细胞凋亡和自噬从而导致神经元损伤和死亡^[70-71], BPA 对生物体具有急性毒性^[72]。BPA 诱导后, 大鼠脑组织中 JNK 水平上升, 而 18 β -GA 与 BPA 联合给药后, p38 MAPK 和 JNK 的水平受到抑制, 脑细胞凋亡减少^[32]。DNA 损伤可以通过诱导细胞衰老凋亡和组织功能障碍来促进个体衰老, 并引发与年龄相关的神经退行性疾病^[73], 18 β -GA 可以通过激活细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/Nrf2 途径减轻丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 诱导的 DNA 损伤^[74], 从而治疗神经退行性疾病。18 β -GA 可以抑制 Caspase-3 的激活, 减少 MPP⁺ 诱导的细胞凋亡^[69]。泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 能够调控蛋白酶体功能, 蛋白酶体系统

表 1 各类模型中甘草次酸及其衍生物对于神经退行性疾病的作用机制研究

Table 1 Mechanism of action of glycyrrhetic acid and its derivatives in various models of neurodegenerative diseases			
成分 Ingredient	模型 Model	作用机制 Mechanisms of action	参考文献 Reference
18α-GA	GCL 抑制剂处理的 3 × Tg-AD 小鼠神经元 GCL inhibitor-treated neurons in 3 × Tg-AD mice	激活 Nrf2, 上调 GCL, 刺激 GSH 合成, 促进 Nrf2 入核, 提高神经元存活率 Activates Nrf2, upregulates GCL, stimulates GSH synthesis, promotes Nrf2 entry into the nucleus, improves neuronal survival	[22]
	DCFS 处理的星形胶质细胞 DCFS-treated astrocytes	通过抑制半通道, 限制谷氨酸的过量释放, 减少兴奋性毒性 Reducing excitotoxicity by inhibiting hemichannels, limiting excessive glutamate release	[80]
	HIV 处理的星形胶质细胞 HIV-treated astrocytes	作用于半通道和间隙连接, 减少细胞凋亡 Acts on hemichannels and gap junctions to reduce apoptosis	[85]
	PGN 处理的小胶质细胞 PGN-treated microglia	抑制连接蛋白 Cx43 表达, 抑制促炎信号传导 Inhibition of connexin Cx43 expression and inhibition of pro-inflammatory signalling	[82]
	8-Bromo-cADPR 处理的小胶质细胞 8-Bromo-cADPR-treated microglia	促进 CD38/cADPR 依赖性信号传导, 激活 CD38, 减轻 ATP 过量释放引发的小胶质细胞凋亡 Promotion of CD38/cADPR-dependent signalling, activation of CD38 attenuates microglial apoptosis triggered by excessive ATP release	[37]
	BALB/c 小鼠中的 NSCs NSCs in BALB/c mice	上调 Nrf2 蛋白水平, 促进 SOD1 表达, 减少 ROS 堆积, 维持 NSCs 增殖潜能 Up-regulation of Nrf2 protein level, promotes SOD1 expression, reduces ROS accumulation, maintains the proliferative potential of NSCs	[60]
	BPA 处理的 NSCs BPA-treated NSCs	激活 UPS, 增加蛋白酶体活性, 促进 NSCs 增殖和分化 Activation of UPS, increase in proteasome activity, promotion of NSCS proliferation and differentiation	[76]
	LPS 处理的 IEC-6 细胞 LPS-treated IEC-6 cells	抑制 Cx43 半通道开放, 减少促炎因子释放 Inhibition of Cx43 hemichannel opening, reduces pro-inflammatory factor release	[48]
	MMC 处理的人成纤维细胞 MMC-treated human fibroblasts	激活 ERK/Nrf2 途径, 减轻 DNA 损伤和氧化应激以减少细胞凋亡 Activation of ERK/Nrf2 pathway, attenuate DNA damage and oxidative stress to reduce apoptosis	[74]
	CUMS 处理的 Wistar 大鼠 CUMS-treated Wistar rats	激活 BDNF/TrkB 信号通路, 减轻神经炎症 Activation of BDNF/TrkB signalling pathway, reduce neuroinflammation	[53]
18β-GA	BPA 处理的 Wistar 白化大鼠 BPA-treated Wistar albino rats	抑制 JAK1/STAT1 与 NF-κB 信号通路, 抑制细胞色素 C 释放, 减少神经元损伤 Inhibition of JAK1/STAT1 and NF-κB signalling pathway, inhibits cytochrome C release and reduces neuronal damage	[32]
	全脑缺血再灌注处理的 C57BL/J6 小鼠 Whole brain ischemia-reperfusion-treated C57BL/J6 mice	提高 SOD 活性, 发挥抗炎抗氧化作用 Enhances SOD activity, exerts anti-inflammatory and antioxidant effects	[86]
	CPZ 处理的 KM 小鼠 CPZ-treated KM mice	上调 MBP 表达, 降低脱髓磷脂损伤, 扭转小胶质细胞极化方向, 改善小鼠运动能力 Up-regulation of MBP expression, reduces demyelinating phospholipid damage, reverses the direction of microglia polarisation, improves locomotion in mice	[64]
	MPP 处理的 PC12 细胞 MPP treated PC12 cells	限制 GSH 减少, 抑制 Caspase-3 激活, 减少细胞凋亡 Limiting GSH reduction, inhibiting Caspase-3 activation, reduces apoptosis	[69]
	6-OHDA 处理的 PC12 细胞 6-OHDA-treated PC12 cells	激活 PI3K/Akt 信号通路, 降低 Bax/Bcl-2 比率, 抑制 Caspase-3 活化, 减少细胞色素 C 释放, 减少细胞死亡 Activates PI3K/Akt signalling pathway, reduces Bax/Bcl-2 ratio, inhibits Caspase-3 activation, reduces cytochrome C release, reduces cell death	[23]
	LPS 处理的巨噬细胞 LPS-treated macrophages	抑制 NF-κB 信号通路传导与 PI3K 活性, 减少 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等促炎因子产生, 抑制 NO、PGE2 生成, 改善 ROS 堆积 Inhibits NF-κB signalling pathway transmission and PI3K activity, reduces the production of pro-inflammatory factors such as TNF-α, IL-6 and IL-1β, inhibits NO and PGE2 production, ameliorates ROS accumulation	[34]
	MPP 处理的小胶质细胞 MPP-treated microglia	上调细胞核中 Nrf2 水平, 启动 TREM2 转录, 活化抗炎型小胶质细胞 Up-regulation of Nrf2 levels in the nucleus, initiates TREM2 transcription, activation of anti-inflammatory microglia	[44]

故障可能导致泛素阳性聚合体在神经元细胞的包涵体中积聚,从而引发神经元的功能紊乱,导致细胞应激和凋亡。越来越多的研究表明蛋白酶体失效在多种神经退行性疾病的发病机制中起着重要作用^[75]。BPA 通过抑制蛋白酶体介导神经毒性^[76],能够抑制 NSCs 的增殖分化,损害髓鞘形成,并导致线粒体碎片化过多^[77]。18 α -GA 能够激活 UPS,使蛋白酶体活性增加,抑制 BPA 介导的神经毒性,促进 NSCs 增殖和分化,并发挥神经保护作用^[76]。

4.3 调节星形胶质细胞与连接蛋白

星形胶质细胞与在其内部高度表达的连接蛋白在神经退行性疾病的发展中发挥着重要作用,近年来对其在神经退行性疾病中的机制研究日益增多^[78]。谷氨酸是大脑中主要的兴奋性神经递质。星形胶质细胞谷氨酸转运蛋白能够通过摄取细胞外谷氨酸来防止神经元因谷氨酸兴奋性中毒而死亡^[79]。18 α -GA 能够通过星形胶质细胞来抑制半通道,限制谷氨酸的过量释放^[80],减少谷氨酸诱导的细胞死亡^[81]。金黄色葡萄球菌衍生的肽聚糖(peptidoglycan, PGN)会诱导 Cx43 表达的显著增加,促进促炎信号传导,通过间隙连接阻断剂 18 α -GA 可以逆转 PGN 诱导的小胶质细胞损伤^[82]。人类免疫缺陷病毒-1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)感染会损害中枢神经系统,导致认知障碍甚至严重的神经功能障碍^[83],其可以抑制含连接蛋白的通道,如缝隙连接和半通道,促进细胞色素 C 以及促炎因子大量释放,并引发细胞凋亡^[84]。18 α -GA 可通过抑制缝隙连接和半通道防止 HIV-1 对中枢神经系统的损伤^[85]。

5 讨论

甘草次酸作用于神经元后,能够激活 Nrf2 并上调 GCL 水平,促进 GSH 合成并促进 Nrf2 移位进入细胞核,提高神经元在 A β 应激下的存活率。在上调 Nrf2 水平的同时,甘草次酸能够促进 TREM2 转录,激活抗炎型小胶质细胞释放抗炎因子,抑制 MAPK-JNK 途径,减少促炎细胞因子生成,减轻神经炎症,保护神经元。在小胶质细胞中,甘草次酸能够抑制连接蛋白 Cx43 表达,促进 CD38/cADPR 依赖性信号传导,减少 ATP 释放,降低 Bax/Bcl-2 比率,减少细胞色素 C 释放,同时能够上调 MBP 表达,降低脱髓磷脂损伤,改善小胶质细胞极化方向,

抑制促炎信号传导,减少小胶质细胞凋亡。在星形胶质细胞中,甘草次酸能够抑制 p38MAPK 和 JNK 水平,降低 tau 磷酸化水平,抑制 NF- κ B 信号通路,显著下调 TNF- α 表达,抑制半通道,降低谷氨酸的过量释放引起的神经毒性,减少神经炎症(见表 1)。

综上,甘草次酸可通过 Nrf2、Cx43、MBP 等多靶点和 MAPK-JNK、NF- κ B、PI3K-AKT 等多条信号通路,保护神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞等神经细胞。由于神经退行性疾病发病机制复杂,传统的单靶点药物较难发挥疗效,甘草次酸及其衍生物能够通过多靶点、多信号通路在神经退行性疾病中发挥作用。不过,要将甘草次酸及其衍生物推广到临床应用还需要进一步的体内外实验研究。

参 考 文 献(References)

- [1] WILSON D M 3rd, COOKSON M R, VAN DEN BOSCH L, et al. Hallmarks of neurodegenerative diseases [J]. Cell, 2023, 186(4): 693-714.
- [2] 王晋平, 莫雪妮, 古联, 等. 基于认知障碍症状分期分度标准探讨阿尔茨海默病论治新思路 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(11): 5360-5364.
WANG J P, MO X N, GU L, et al. Exploration on the new idea of treating Alzheimer's disease based on the grading standard of cognitive impairment symptoms [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(11): 5360-5364.
- [3] 潘才钰, 盛和静. 培元解痉汤结合调神畅志安眠法针刺治疗帕金森病伴失眠疗效观察 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(12): 207-210.
PAN C Y, SHENG H J. Clinical effect of Peiyuan jiejing decoction combined with acupuncture for regulating spirit, invigorating mind and calming sleep on Parkinson's disease with insomnia [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(12): 207-210.
- [4] 王柳丁, 樊雪鸣, 申伟, 等. 张允岭从“脾肾并重”论治肌萎缩侧索硬化症经验 [J]. 中医杂志, 2023, 64(20): 2067-2070.
WANG L D, FAN X M, SHEN W, et al. ZHANG Yunling's experience in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis from emphasis on both spleen and kidney [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(20): 2067-2070.
- [5] 应春苗, 刘飞祥, 潘小龙, 等. 中药延缓神经血管单元衰老治疗神经退行性疾病的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(15): 4060-4071.
YING C M, LIU F X, PAN X L, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in treatment of neurodegenerative diseases by delaying neurovascular unit aging [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(15): 4060-4071.
- [6] CHAI W, ZHANG J, XIANG Z, et al. Potential of nobletin against Alzheimer's disease through inhibiting neuroinflammation [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(4): 1145-1154.

- [7] ZHAO Y, TIAN Y, FENG T. Sodium houttuynfonate ameliorates β -amyloid₁₋₄₂-induced memory impairment and neuroinflammation through inhibiting the NLRP3/GSDMD pathway in Alzheimer's disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 8817698.
- [8] WANG S F, WU M Y, CAI C Z, et al. Autophagy modulators from traditional Chinese medicine: Mechanisms and therapeutic potentials for cancer and neurodegenerative diseases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194: 861-876.
- [9] JIN L, DAI L, JI M, et al. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium conjugated glycyrrhetic acid derivatives as potent anticancer drugs [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 85: 179-190.
- [10] SUN Y, DAI C, YIN M, et al. Hepatocellular carcinoma-targeted effect of configurations and groups of glycyrrhetic acid by evaluation of its derivative-modified liposomes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1621-1632.
- [11] KRÄHENBÜHL S, HASLER F, FREY B M, et al. Kinetics and dynamics of orally administered 18 β -glycyrrhetic acid in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(3): 581-585.
- [12] CARLAT L E, MARGRAF H W, WEATHERS H H, et al. Human metabolism of orally ingested glycyrrhetic acid and monoammonium glycyrrhizinate [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959, 102: 245-248.
- [13] 陆洋, 李娟, 杜卓颖. 甘草次酸在大鼠体内药动学的 RP-HPLC 研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(11): 1294-1296.
- LU Y, LI J, DU S Y. Study on pharmacokinetics of glycyrrhetic acid in rats by RP-HPLC [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2008, 33(11): 1294-1296.
- [14] KRÄHENBÜHL S, HASLER F, KRAPF R. Analysis and pharmacokinetics of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid in humans and experimental animals [J]. *Steroids*, 1994, 59(2): 121-126.
- [15] MAKINO T, OKAJIMA K, UEBAYASHI R, et al. 3-Monoglucuronyl-glycyrrhetic acid is a substrate of organic anion transporters expressed in tubular epithelial cells and plays important roles in licorice-induced pseudoaldosteronism by inhibiting 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 342(2): 297-304.
- [16] HORIGOME H, HOMMA M, HIRANO T, et al. Glycyrrhetic acid induced apoptosis in murine splenocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(1): 54-58.
- [17] UKIL A, BISWAS A, DAS T, et al. 18 Beta-glycyrrhetic acid triggers curative Th1 response and nitric oxide up-regulation in experimental visceral leishmaniasis associated with the activation of NF- κ B [J]. *J Immunol*, 2005, 175(2): 1161-1169.
- [18] SALVI M, FIORE C, ARMANINI D, et al. Glycyrrhetic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(12): 2375-2379.
- [19] GUO T, ZHANG D, ZENG Y, et al. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2020, 15(1): 40.
- [20] STOVER K R, CAMPBELL M A, VAN WINSEN C M, et al. Analysis of motor function in 6-month-old male and female 3xTg-AD mice [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 281: 16-23.
- [21] KANNINEN K, HEIKKINEN R, MALM T, et al. Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(38): 16505-16510.
- [22] GHOSH D, LEVAULT K R, BREWER G J. Dual-energy precursor and nuclear erythroid-related factor 2 activator treatment additively improve redox glutathione levels and neuron survival in aging and Alzheimer mouse neurons upstream of reactive oxygen species [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(1): 179-190.
- [23] KAO T C, SHYU M H, YEN G C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(2): 754-761.
- [24] KIM D E, YOUN Y C, KIM Y K, et al. Glycyrrhizin prevents 7-ketocholesterol toxicity against differentiated PC12 cells by suppressing mitochondrial membrane permeability change [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(8): 1433-1442.
- [25] KITAGISHI Y, NAKANISHI A, OGURA Y, et al. Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2014, 6(3): 35.
- [26] CULL-CANDY S, BRICKLEY S, FARRANT M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(3): 327-335.
- [27] DE FELICE F G, VELASCO P T, LAMBERT M P, et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11590-11601.
- [28] YOSHIDA Y, FUJIGAKI H, KATO K, et al. Selective and competitive inhibition of kynurenine aminotransferase 2 by glycyrrhizic acid and its analogues [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10243.
- [29] LANE R M, KIVIPELTO M, GREIG N H. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2004, 27(3): 141-149.
- [30] ABDEL BAR F M, ELIMAM D M, MIRA A S, et al. Derivatization, molecular docking and *in vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity of glycyrrhizin as a selective anti-Alzheimer agent [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(18): 2591-2599.
- [31] MUNOZ L, AMMIT A J. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(3): 561-568.
- [32] CAGLAYAN C, KANDEMIR F M, AYNA A, et al. Neuroprotective effects of 18 β -glycyrrhetic acid against bisphenol A-induced neurotoxicity in rats: involvement of neuronal apoptosis, endoplasmic reticulum stress and JAK1/STAT1 signaling pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(6): 1931-1940.

- [33] YEN G C, DUH P D, HUANG D W, et al. Protective effect of pine (*Pinus morrisonicola* Hay.) needle on LDL oxidation and its anti-inflammatory action by modulation of iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(1): 175-185.
- [34] WANG C Y, KAO T C, LO W H, et al. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ inhibitions [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(14): 7726-7733.
- [35] ORELLANA J A, SHOJI K F, ABUDARA V, et al. Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels [J]. J Neurosci, 2011, 31(13): 4962-4977.
- [36] YI C, MEI X, EZAN P, et al. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(10): 1691-1701.
- [37] MA Y, CAO W, WANG L, et al. Basal CD38/cyclic ADP-ribose-dependent signaling mediates ATP release and survival of microglia by modulating connexin 43 hemichannels [J]. Glia, 2014, 62(6): 943-955.
- [38] REN R, ZHANG L, WANG M. Specific deletion connexin 43 in astrocyte ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice [J]. Life Sci, 2018, 208: 175-191.
- [39] CABREIRA V, MASSANO J. Parkinson's disease: clinical review and update [J]. Acta Med Port, 2019, 32(10): 661-670.
- [40] OUCHI Y, YOSHIKAWA E, SEKINE Y, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease [J]. Ann Neurol, 2005, 57(2): 168-175.
- [41] TANG Y, LE W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1181-1194.
- [42] PORRAS G, LI Q, BEZARD E. Modeling Parkinson's disease in primates: the MPTP model [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(3): a009308.
- [43] HAN Y, ZHANG L, WANG Q, et al. Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation [J]. Psychoneuroendocrinology, 2019, 107: 37-45.
- [44] LUO H, ZHANG C, HE L, et al. 18 β -glycyrrhetic acid ameliorates MPTP-induced neurotoxicity in mice through activation of microglial anti-inflammatory phenotype [J]. Psychopharmacology, 2023, 240(9): 1947-1961.
- [45] YIN X, FENG L, MA D, et al. Roles of astrocytic connexin-43, hemichannels, and gap junctions in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury induced neuroinflammation and the possible regulatory mechanisms of salvianolic acid B and carbenoxolone [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 97.
- [46] FUJITA A, YAMAGUCHI H, YAMASAKI R, et al. Connexin 30 deficiency attenuates A2 astrocyte responses and induces severe neurodegeneration in a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine hydrochloride Parkinson's disease animal model [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 227.
- [47] MAATOUK L, YI C, CARRILLO-DE SAUVAGE M A, et al. Glucocorticoid receptor in astrocytes regulates midbrain dopamine neurodegeneration through connexin hemichannel activity [J]. Cell Death Differ, 2019, 26(3): 580-596.
- [48] ZOU Z, LIU B, ZENG L, et al. Cx43 inhibition attenuates sepsis-induced intestinal injury via downregulating ROS transfer and the activation of the JNK1/Sirt1/FoxO3a signaling pathway [J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 7854389.
- [49] EKERT P G, SILKE J, VAUX D L. Caspase inhibitors [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11): 1081-1086.
- [50] KANAZAWA M, NINOMIYA I, HATAKEYAMA M, et al. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2135.
- [51] CAO Q, ZOU Q, ZHAO X, et al. Regulation of BDNF transcription by Nrf2 and MeCP2 ameliorates MPTP-induced neurotoxicity [J]. Cell Death Discov, 2022, 8(1): 267.
- [52] CAO Q, LUO S, YAO W, et al. Suppression of abnormal α -synuclein expression by activation of BDNF transcription ameliorates Parkinson's disease-like pathology [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 29: 1-15.
- [53] GUPTA G L, SHARMA L, SHARMA M. 18 β -glycyrrhetic acid ameliorates neuroinflammation linked depressive behavior instigated by chronic unpredictable mild stress via triggering BDNF/TrkB signaling pathway in rats [J]. Neurochem Res, 2023, 48(2): 551-569.
- [54] WANG R, YANG S, NIE T, et al. Transcription factors: potential cell death markers in Parkinson's disease [J]. Neurosci Bull, 2017, 33(5): 552-560.
- [55] OUALI ALAMI N, SCHURR C, OLDE HEUVEL F, et al. NF- κ B activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS [J]. EMBO J, 2018, 37(16): e98697.
- [56] AZAM S, JAKARIA M, KIM I S, et al. Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathway by polyphenols in the treatment of age-linked neurodegenerative diseases: focus on TLR4 signaling [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1000.
- [57] COLOMBO E, FARINA C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation [J]. Trends Immunol, 2016, 37(9): 608-620.
- [58] BROWN R H Jr, ROBBERECHT W. Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis [J]. Semin Neurol, 2001, 21(2): 131-139.
- [59] SACCON R A, BUNTON-STASYSHYN R K A, FISHER E M C, et al. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? [J]. Brain, 2013, 136(8): 2342-2358.
- [60] 刘雪芹, 牛晓洁, 王必慧, 等. 18 α -甘草次酸通过抗氧化作用促进成年小鼠室管膜下区神经干细胞增殖 [J]. 解剖学报, 2022, 53(1): 11-18.
- LIU X Q, NIU X J, WANG B H, et al. 18 α -glycyrrhetic acid promoting neural stem cells proliferation through antioxidant in

- the subventricular zone of adult mice [J]. *Acta Anat Sin*, 2022, 53(1): 11–18.
- [61] KUMAR V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation [J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 332: 16–30.
- [62] PORETTI A, WOLF N I, BOLTSHAUSER E. Differential diagnosis of cerebellar atrophy in childhood: an update [J]. *Neuropediatrics*, 2015, 46(6): 359–370.
- [63] FALANGOLA M F, GUILFOYLE D N, TABESH A, et al. Histological correlation of diffusional kurtosis and white matter modeling metrics in cuprizone-induced corpus callosum demyelination [J]. *NMR Biomed*, 2014, 27(8): 948–957.
- [64] TIAN H, CHENG Y, ZHANG Y, et al. 18 β -Glycyrrhetic acid alleviates demyelination by modulating the microglial M1/M2 phenotype in a mouse model of cuprizone-induced demyelination [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 755: 135871.
- [65] SIES H, BELOUSOV V V, CHANDEL N S, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(7): 499–515.
- [66] FERNANDEZ A, MEECHAN D W, KARPINSKI B A, et al. Mitochondrial dysfunction leads to cortical under-connectivity and cognitive impairment [J]. *Neuron*, 2019, 102(6): 1127–1142.
- [67] SMITH G A, LIN T H, SHEEHAN A E, et al. Glutathione S-transferase regulates mitochondrial populations in axons through increased glutathione oxidation [J]. *Neuron*, 2019, 103(1): 52–65.
- [68] JENNER P. Oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(3): S26–S36.
- [69] YIM S B, PARK S E, LEE C S. Protective effect of glycyrrhizin on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and cell death in differentiated PC12 cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(2): 816–822.
- [70] MAALOUF M, SULLIVAN P G, DAVIS L, et al. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation [J]. *Neuroscience*, 2007, 145(1): 256–264.
- [71] HE Z Q, HUAN P F, WANG L, et al. Paeoniflorin ameliorates cognitive impairment in Parkinson's disease via JNK/p53 signaling [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(4): 1057–1070.
- [72] LIU X, SHI H, XIE B, et al. Microplastics as both a sink and a source of bisphenol A in the marine environment [J]. *Environ Sci Technol*, 2019, 53(17): 10188–10196.
- [73] ZHAO Y, SIMON M, SELUANOV A, et al. DNA damage and repair in age-related inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(2): 75–89.
- [74] LEFAKI M, PAPAEGENIOU N, TUR J A, et al. The dietary triterpenoid 18 α -Glycyrrhetic acid protects from MMC-induced genotoxicity through the ERK/Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2020, 28: 101317.
- [75] FERNÁNDEZ-CRUZ I, REYNAUD E. Proteasome subunits involved in neurodegenerative diseases [J]. *Arch Med Res*, 2021, 52(1): 1–14.
- [76] SINGH S J, TANDON A, PHOOLMALA, et al. Bisphenol-A (BPA) impairs hippocampal neurogenesis via inhibiting regulation of the ubiquitin proteasomal system [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(6): 3277–3298.
- [77] AGARWAL S, YADAV A, TIWARI S K, et al. Correction: Dynamin-related protein 1 inhibition mitigates bisphenol A-mediated alterations in mitochondrial dynamics and neural stem cell proliferation and differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(9): 2887.
- [78] HUANG X, SU Y, WANG N, et al. Astroglial connexins in neurodegenerative diseases [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 657514.
- [79] ERIKSON K M, ASCHNER M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction [J]. *Neurochem Int*, 2003, 43(4/5): 475–480.
- [80] YE Z C, WYETH M S, BALTAN-TEKKOK S, et al. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(9): 3588–3596.
- [81] KAWAKAMI Z, IKARASHI Y, KASE Y. Isoliquiritigenin is a novel NMDA receptor antagonist in kampo medicine yokukansan [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(8): 1203–1212.
- [82] GARG S, SYED M M, KIELIAN T. *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan induces Cx43 expression and functional gap junction intercellular communication in microglia [J]. *J Neurochem*, 2005, 95(2): 475–483.
- [83] HEATON R K, CLIFFORD D B, FRANKLIN D R Jr, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER study [J]. *Neurology*, 2010, 75(23): 2087–2096.
- [84] EUGENIN E A, BERMAN J W. Cytochrome C dysregulation induced by HIV infection of astrocytes results in bystander apoptosis of uninfected astrocytes by an IP3 and calcium-dependent mechanism [J]. *J Neurochem*, 2013, 127(5): 644–651.
- [85] MALIK S, THEIS M, EUGENIN E A. Connexin 43 containing gap junction channels facilitate HIV bystander toxicity: implications in NeuroHIV [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 404.
- [86] OZTANIR M N, CIFTCI O, CETIN A, et al. The beneficial effects of 18 β -glycyrrhetic acid following oxidative and neuronal damage in brain tissue caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(8): 1221–1228.

杨润泽,秦靖,郭晨博,等. 坏死性凋亡在胰腺疾病中的作用机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 933-941.
YANG R Z, QIN J, GUO C B, et al. Research progress on mechanism of necrotizing apoptosis in pancreatic disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 933-941.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.012

坏死性凋亡在胰腺疾病中的作用机制研究进展

杨润泽^{1#}, 秦靖^{3#}, 郭晨博¹, 胡耀华², 汪湛东¹, 张延英¹, 宋冰¹,
白敏¹, 师长宏^{3*}, 汪永锋^{1*}

(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000; 2. 延安大学医学院,
陕西 延安 716000; 3. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710000)

【摘要】 坏死性凋亡介于细胞凋亡和坏死之间, 是一种受调控的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶非依赖性程序性细胞死亡, 可诱导炎症反应发生。研究表明, 它与胰腺疾病的病程进展及预后密切相关, 在胰腺疾病进展中发挥重要的双向调控作用, 且相关的坏死性凋亡抑制剂与诱导剂有望用于胰腺疾病的治疗。基于此, 本文对坏死性凋亡发生的机制及其在胰腺疾病进展中的作用进行综述, 旨在为胰腺疾病的发病机制和治疗提供新的认识, 为其靶向性药物的研发提供理论依据。

【关键词】 坏死性凋亡; 急性胰腺炎; 胰腺癌; 受体相互作用蛋白激酶 1; 受体相互作用蛋白激酶 3; 混合谱系激酶结构域样

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2024) 07-0933-09

Research progress on mechanism of necrotizing apoptosis in pancreatic disease

YANG Runze^{1#}, QIN Jing^{3#}, GUO Chenbo¹, HU Yaohua², WANG Zhandong¹, ZHANG Yanying¹,
SONG Bing¹, BAI Min¹, SHI Changhong^{3*}, WANG Yongfeng^{1*}

(1. Basic Medical College of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China; 3. Experimental Animal Center of Air
Force military Medical University, Xi'an 710000, China)

Corresponding author: WANG Yongfeng. E-mail: wyf@gszy.edu.cn; SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Necroptosis is a regulated process of programmed cell death independent of aspartic acid-specific cysteine protease, which can induce inflammation. Studies have shown that necroptosis is closely related to the progression and prognosis of pancreatic disease and plays an important two-way regulatory role in its progression. Related necroptosis inhibitors and inducers are expected to be used in the treatment of pancreatic disease. We herein review the mechanism of necroptosis and its role in the progression of pancreatic disease to provide a new understanding of the pathogenesis and treatment of pancreatic diseases and offer a theoretical basis for the research and development of targeted drugs.

【Keywords】 necroptosis; acute pancreatitis; pancreatic cancer; receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1); receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3); mixed-lineage kinase domain-like (MLKL)

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

【基金项目】 国家自然科学基金 (82160871), 甘肃省自然科学基金 (22JR5RA591), 甘肃省中医药管理局项目 (GZKZ-2021-10)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (82160871), Natural Science Foundation of Gansu Province (22JR5RA591), Project of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (GZKZ-2021-10).

【作者简介】 杨润泽, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医肿瘤防治。Email: 1377623986@qq.com;

秦靖, 女, 助理实验师, 研究方向: 中西医肿瘤防治。Email: qinjingjd@fmmu.edu.cn。

#共同第一作者

【通信作者】 汪永锋, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中西医结合治疗胰腺病研究。Email: wyf@gszy.edu.cn;

师长宏, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病的动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn。

* 共同通信作者

胰腺外分泌功能的异常通常会导致急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 和胰腺癌 (pancreatic cancer, PC)。在全球范围内, AP 是最常见的胰腺疾病, 而 PC 是致死率最高的胰腺疾病。AP 在全球每年的总发病率约为 34/100 000, 并随着生活方式的改变而逐年增高^[1]。PC 是最致命的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率分别位于恶性肿瘤的第七位和第六位, 且近几年的发病率呈上升趋势^[2]。AP 和 PC 不仅给患者带来了心理和经济负担, 而且给社会带来了巨大的经济负担。近年来, 随着对细胞死亡方式的研究愈发深入, 研究者们发现坏死性凋亡与 AP 和 PC 的发展密切相关^[3]。坏死性凋亡是一种依赖混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase-like, MLKL)、受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, RIPK3) 和受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIPK1) 活性的调节性细胞死亡^[4]。研究表明, 胰腺腺泡细胞的坏死性凋亡在 AP 早期即可被观察到, 并且在 AP 的进展中发挥关键作用^[5]。此外, 由于胰腺癌细胞具有抗凋亡性, 坏死性凋亡作为一种细胞死亡的替代死亡方式有望成为 PC 新的治疗策略^[6]。近期随着对坏死性凋亡在胰腺疾病进展中的研究进一步深入, 越来越多的研究表明, 坏死性凋亡在胰腺疾病发展中的作用并不是单一的, 其双向调控作用对于机体的保护和维持稳态至关重要。

基于此, 本文将对坏死性凋亡在急性胰腺炎和胰腺癌发展中的双向调控作用进行归纳, 并探讨了相关靶向分子化合物在胰腺疾病治疗中的作用, 以期对胰腺疾病生理病理研究和相关药物开发提供新的思路, 从而提高临床患者的疗效并改善其预后。

1 坏死性凋亡概述

1.1 坏死性凋亡的特点

坏死性凋亡既不是坏死, 也不是凋亡, 它是细胞凋亡受阻后, 细胞外信号或细胞内信号被激活, 由 RIPK1 和 RIPK3 介导的一种模拟细胞凋亡和坏死特征的细胞程序性坏死方式。不同于细胞凋亡会出现的细胞皱缩, 凋亡小体形成并通过吞噬细胞和巨噬细胞吞噬掉免疫原性的蛋白质, 坏死性凋亡的特征则是细胞肿胀, 细胞质空泡形成, 细胞器膜破坏, 溶酶体肿胀和破裂, 细胞膜破坏释放内容物, 引发先天性和适应性免疫应答, 并通过巨噬细胞

清除坏死细胞^[7]。其分子特点是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 (caspase-8) 被抑制或失活后诱导 RIPK1 和 RIPK3 结合形成复合物, 进一步促使 MLKL 磷酸化, 导致细胞肿胀, 质膜破裂和内容物释放^[8]。

1.2 坏死性凋亡在疾病中发挥双向调控作用

坏死性凋亡作为一种受调控的程序性细胞死亡, 可诱导炎症反应, 并影响肿瘤的发展。尽管与许多疾病的发病机制有关, 但随着研究的进展, 在许多疾病的生理病理中的作用被重新进行评估。许多证据表明, 坏死性凋亡并不是一个纯粹的有害过程, 从生理和病理角度看, 坏死性凋亡是一把“双刃剑”。一方面, 坏死性凋亡可引发炎症级联反应, 导致严重的组织损伤。另一方面, 坏死性凋亡作为一种宿主的防御机制, 通过其强大的促炎作用以抑制肿瘤。

已有研究表明坏死性凋亡的激活, 可导致炎症细胞因子风暴和多器官衰竭^[9]。然而越来越多的证据表明, 坏死性凋亡亦可在肿瘤中发挥抑制作用。在哺乳动物中, 细胞凋亡是抵御肿瘤细胞的第一道防线, 而在各种癌症中细胞凋亡被抑制的情况下, 坏死性凋亡可以作为清除肿瘤细胞的强大第二道防线。在不同类型的癌症中, 坏死性凋亡途径中关键分子的表达上调, 表明坏死性凋亡的激活有效抑制肿瘤细胞生长^[10]。综上所述, 坏死性凋亡是一种具有促炎作用和免疫原性的程序性细胞死亡途径, 在各种生理和病理条件下发挥着双向调控作用。

2 坏死性凋亡发生机制

2.1 坏死性凋亡的启动

坏死是细胞的被动性死亡, 而坏死性凋亡与凋亡均是受到高度调控的细胞死亡形式, 且存在一些共同的上游信号元件。但坏死性凋亡与凋亡启动条件存在巨大差异。凋亡是一种细胞发育到一定阶段会发生的正常现象, 而坏死性凋亡则是细胞在受到外界刺激时发生的程序性死亡, 因此坏死性凋亡在疾病的发生及进展中起重要作用。

坏死性凋亡的启动可由多种刺激因素触发, 大多数需要细胞死亡受体和配体的相互作用。目前已知的受体包括肿瘤坏死因子受体、凋亡相关蛋白因子 (factor of associated suicide, Fas) 和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor, TRAILR)^[11], 这些受体激活

后招募死亡结构域相关蛋白和 1 型相关死亡域,与 caspase-8 和 caspase-10 等相作用形成寡聚复合物^[12],招募有活性的 RIPK1 抵达细胞膜。之后 RIPK1 可以被凋亡抑制因子泛素化使 RIPK1 从细胞膜上解离,使其转变为促死亡蛋白,通过激活核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 促使下游炎症发生^[13]。当 caspase-8 失活或活性受到抑制时,细胞凋亡被抑制, RIPK1 通过招募并磷酸化 RIPK3 诱导坏死性凋亡的发生^[14]。此外, RIPK3 也可以通过非依赖 RIPK1 激活的方式调控坏死性凋亡,先天性免疫应答或 DNA 病毒诱导 Z-DNA 结合蛋白 1 激活可以与 RIPK3 同型的相互作用基序结构直接进行结合,激活 RIPK3 进一步磷酸化 MLKL 诱导坏死性凋亡^[15]。

2.2 坏死性凋亡的执行

虽然同为受调控的细胞死亡方式,但凋亡与坏死性凋亡的主要执行分子各不相同。凋亡的执行

者主要为两类酶,包括可彻底破坏细胞的生物命令系统的核酸内切酶和促使细胞结构全面解体的 caspases-3,而坏死性凋亡的主要执行者是 MLKL。MLKL 依赖 RIPK3 的磷酸化可以促进其发生构象变化并向质膜易位,在质膜上产生孔膜复合物,导致其 N 端死亡效应结构域(4 helical bundle domain, 4HBD)的暴露。4HBD 中带正电荷的片段可与质膜上带负电荷的磷脂酰肌醇磷酸盐相互作用完成打孔^[16]。质膜膜孔形成后 Ca^{2+} 或 Na^{+} 离子内流会导致细胞肿胀破裂,细胞内容物泄露,发生炎症变化和白细胞介素 (interleukin, IL) 释放,形成细胞死亡的终末阶段(图 1)^[17]。此外,有研究发现免疫抑制剂 TAM (Tyr03, Axl, and Mer) 激酶可以不依赖 RIPK3,直接通过 Tyr376 位点磷酸化 MLKL 以调控坏死性凋亡信号的传导^[18]。因此,精确调控 MLKL 在维持细胞存活、制衡凋亡以及坏死性凋亡方面发挥重要作用。

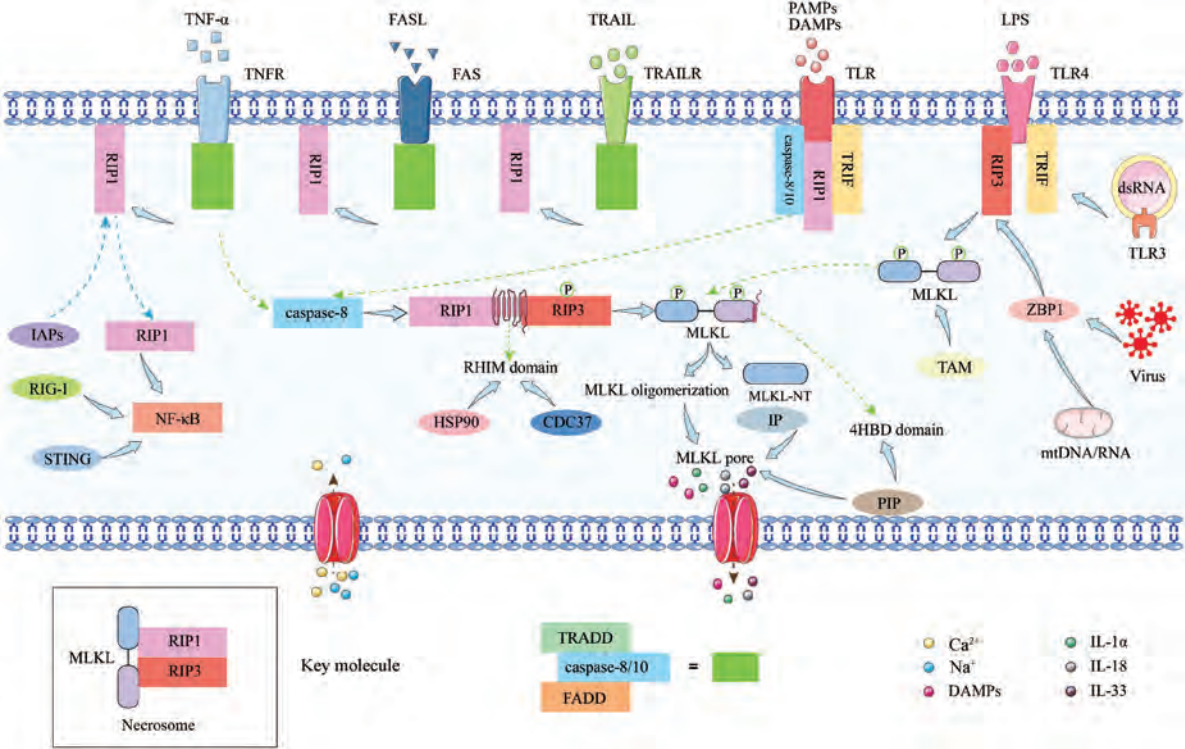


图 1 坏死性凋亡的分子机制图
Figure 1 Molecular mechanism diagram of necrotic apoptosis

3 坏死性凋亡在胰腺炎进展中的作用

AP 是由多种病因引起的胰腺病理性细胞通路和细胞器功能障碍,最终导致胰腺腺泡细胞死亡。AP 起病急、病情重、并发症多,临床上还没有针对性治疗特效药。随着研究的深入,发现坏死性凋亡

作为调节性细胞死亡的形式之一,在 AP 所致腺泡细胞死亡机制及胰蛋白酶过早活化中扮演着非常重要的角色。

3.1 坏死性凋亡在急性胰腺炎进展中发挥促进作用

AP 是胰酶在胰腺内被激活后引起胰腺组织自

身消化、水肿、出血甚至坏死的炎症反应。胰蛋白酶在胰腺导管及腺泡细胞中通常以无活性的酶原形式存在,进入肠腔之后,可在肠激酶的作用下转化为具有活性的胰蛋白酶。当胰管发生梗阻或受酒精、外伤等因素损伤时,胰腺腺泡细胞内酶原颗粒胞吐过程受限,溶酶体与酶原颗粒发生作用,胰蛋白酶原被溶酶体内的组织蛋白酶 B 活化为胰蛋白酶,引起胰腺及胰腺外组织的自我消化^[19]。最新研究表明,溶酶体组织蛋白酶 B 的释放则会激活细胞死亡受体,诱发坏死性凋亡^[20]。在 AP 中可观察到胰腺腺泡细胞发生坏死性凋亡,导致炎症因子的释放和炎症的产生,坏死性凋亡因子 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 等在 AP 后续进展过程中扮演了关键角色。研究发现 RIPK3 和 MLKL 高表达与急性胰腺炎坏死程度呈正相关,而 RIPK1 高表达与坏死程度呈负相关^[21]。基于动物模型的实验研究发现, RIPK3 可以通过磷酸化 MLKL 促进胰腺腺泡细胞坏死,而敲除 RIPK3 和 MLKL 可以阻止肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)诱导的细胞因子风暴,抑制炎症反应,保护腺泡细胞。RIPK1 通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活,防止腺泡细胞坏死^[22]。上调 RIPK1 或抑制 RIPK3 表达,可能为急性胰腺炎的治疗提供了新的策略。因此,进一步研究坏死性凋亡在 AP 发生发展过程中的作用机制具有重要意义。

3.2 基于坏死性凋亡途径靶点用于急性胰腺炎的治疗研究

AP 是一种具有潜在威胁性的疾病,部分患者最终可发展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)。目前针对 AP 的治疗方法仍以补液、抗感染等对症支持治疗为主,这种缺乏特异性的治疗方式是 AP 尤其是 SAP 患者病死率居高不下的主要原因。因此,研发 AP 的特异性治疗方案至关重要。

研究表明,胰腺腺泡细胞的坏死程度决定 AP 的严重程度,通过抑制坏死性凋亡可以最大限度地降低严重程度。因此针对坏死性凋亡途径及相关因子展开的一系列药物开发,相关动物实验研究结果展示出良好的临床应用和转化前景(表 1)。

RIPK1 是坏死性凋亡的关键组成部分,其激动剂为坏死性凋亡抑制剂(necrostatin-1, Nec-1),在急性胰腺炎中发挥重要作用。Nec-1 是一种具有特异性且强效的坏死性凋亡抑制剂,在细胞坏死中靶向 RIPK1 激酶^[23]。研究表明,在酒精和雨蛙素诱导的

急性胰腺炎动物模型中提前给予 Nec-1 可上调 RIPK1 水平,并降低 RIPK3、MLKL 的表达,抑制细胞坏死性凋亡,降低急性胰腺炎的严重程度^[24]。Nec-1 还可以减少坏死性凋亡在肠道屏障损伤中的作用,从而减轻肠道屏障损伤,对急性胰腺炎合并肠道损伤起到保护作用^[25]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一种多能干细胞,临床上可解决多种血液系统、心血管、神经系统、自身免疫等方面疾病^[26]。CUI 等^[27]发现 MSC 与 SAP 密切相关,在牛黄胆酸钠诱导的 SAP 中,有骨髓来源的间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)干预的实验组其胰腺 RIPK3 和 MLKL 的表达显著降低,系统性炎症反应减少, BMSC 起到抗炎作用。此外, BMSC 与 Nec-1 相比, BMSC 可提高在胰组织中 Reg4 基因、PDX1 基因和 PTF1 基因的表达,增强受损胰腺组织的再生^[28]。

一些中药提纯物可以通过抑制坏死性凋亡对胰腺炎的发展起到良性作用。小檗碱是一种从中草药黄连和其他小檗属植物中分离出来的异喹啉生物碱,可用于治疗许多疾病^[29]。OU 等^[30]建立了大鼠急性胰腺炎模型,发现小檗碱可以通过降低 RIPK3 的表达以及减轻重症胰腺炎大鼠海马组织中的神经元凋亡和坏死性凋亡,来减轻认知缺陷并降低相关死亡率。

此外,针对坏死性凋亡途径中关键蛋白的小分子抑制剂也表现出较好的治疗作用。PX478 是一种具有口服活性的选择性缺氧诱导因子 1 α 抑制剂,通过下调坏死性凋亡因子 RIPK3 和 MLKL 水平来减少胰腺腺泡细胞的坏死,减轻胰腺的组织学损伤^[31]。钙调蛋白依赖型蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II, CaMK II) 是一种钙调控蛋白,与细胞死亡密切相关。ZHU 等^[32]发现 KN93 作为 CaMK II 抑制剂通过降低 RIPK3、MLKL 的表达和活性氧的产生,对胰腺腺泡细胞起到保护作用。

Toll 样受体是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子。研究表明 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 在胰腺组织中广泛表达并参与坏死性凋亡的激活启动,在胰腺炎中起重要作用^[33]。SU 等^[34]发现一种新型的 15 个氨基酸合成肽 HTD4010 可下调 TLR4 的表达,通过 TLR4 信号通路使 RIPK3 和 MLKL 的表达显著降低,减轻 AP 小

表 1 急性胰腺炎中坏死性凋亡途径相关因子调控药物

Table 1 Drugs regulating factors related to necrotic apoptosis pathway in acute pancreatitis

调控物质 Regulatory substances	靶向蛋白质 Targeted proteins	作用 Effect	参考文献 References
坏死性凋亡抑制剂 Necrostatin-1	RIPK1 ↑	抑制坏死性凋亡诱导的坏死小体形成,可缓解肠道屏障功能障碍并减缓重症胰腺炎的发展。 Inhibiting the formation of necrotic bodies induced by necrotic apoptosis can alleviate intestinal barrier dysfunction and slow down the development of severe pancreatitis.	[23-25]
骨髓来源的间充质干细胞 Mesenchymal stem cells derived from bone marrow	RIPK1 ↑、RIPK3 ↓、 MLKL ↓	通过上调 RIPK1,抑制 RIPK3、MLKL 表达,降低 IL-4 和 IL-10 等炎症因子水平,提高抗炎介质水平,减少胰腺腺泡细胞损伤,促进了受损胰腺组织的再生,保护胰腺免受破坏。 By upregulating RIPK1, inhibiting the expression of RIPK3 and MLKL, reducing the levels of inflammatory factors such as IL-4 and IL-10, increasing the level of anti-inflammatory mediators, reducing pancreatic acinar cell damage, promoting the regeneration of damaged pancreatic tissue, and protecting the pancreas from damage.	[26-28]
小檗碱 Berberine	RIPK1 ↑、RIPK3 ↓	降低坏死性凋亡相关蛋白质水平,减缓重症胰腺炎的发展。 Reduce the levels of necroptosis related proteins and slow down the development of severe pancreatitis.	[29-30]
缺氧诱导因子 1α 抑制剂 (PX478) Hypoxia induced factor-1α (PX478)	RIPK3 ↓、MLKL ↓	抑制 RIPK3、p-MLKL 的表达,减少胰腺腺泡细胞的坏死,改善胰腺炎。 Inhibiting the expression of RIPK3 and p-MLKL, reducing necrosis of pancreatic acinar cells, and improving pancreatitis.	[31]
钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 抑制剂(KN93) Calcium/calmodulin- dependent protein kinase type II inhibitor(KN93)	RIPK3 ↓、MLKL ↓	抑制 RIPK3、p-MLKL 的表达,保护胰腺腺泡细胞。 Inhibiting the expression of RIPK3 and p-MLKL to protect pancreatic acinar cells.	[32]
氨基酸合成肽 (HTD4010) Amino acid synthetic peptide(HTD4010)	RIPK3 ↓、MLKL ↓ RIPK1 ↑	通过 Toll 样受体 4 信号通路减轻 AP 的严重程度。 Reduce the severity of AP through the Toll like receptor 4 signaling pathway.	[33-34]
瑞莎托维 Risatovi	RIPK3 ↓	下调 NF-κB,减少大鼠胰腺组织中中性粒细胞和巨噬细胞的迁移和浸润。降低炎症反应,改善肠道屏障功能障碍,减轻胰腺损伤。 Downregulation of NF-κB reduces the migration and infiltration of neutrophils and macrophages in rat pancreatic tissue. Reduce inflammatory response, improve intestinal barrier dysfunction, and alleviate pancreatic damage.	[35]

鼠的严重程度,对小鼠胰腺细胞起保护作用。针对 TLR4 信号通路,WU 等^[35]发现高脂肪饮食具有显著增加 TLR4 和 RIPK3 表达的作用,瑞莎托维作为 TLR4 的选择性抑制剂,可抑制 TLR4 信号,降低 RIPK3 表达以及炎症信号 NF-κB 表达。由此减少了高脂饮食胰腺炎模型小鼠中嗜中性粒细胞和巨噬细胞的迁移和浸润,降低炎症反应,改善肠道屏障功能障碍,从而减轻胰腺损伤,起到保护作用。

需要注意的是,这些研究都是通过体外实验或动物模型进行的,尚未在临床试验中进行评估。因此,在未来的研究中,应该收集更多的数据,以准确地反映坏死性凋亡在 AP 治疗中的作用,并为进一步研发坏死性凋亡相关药物提供充分证据。

4 坏死性凋亡在胰腺癌进展中的作用

PC 是一种致命的、具有高度侵袭性和耐药性的

疾病。随着其危险因素的激增,如老龄化、吸烟、肥胖、糖尿病和饮酒,PC 的发病率持续增加,并逐渐成为全球癌症相关死亡的主要原因。作为一种预后较差的恶性肿瘤,揭示 PC 发生发展的机制对于制定有效的治疗策略,提高患者的总体生存率具有重要意义。

4.1 坏死性凋亡在胰腺癌进展中发挥抑制作用

研究表明,坏死性凋亡在抑制恶性肿瘤的发展过程中发挥重要作用,通过抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移来改善肿瘤患者预后,BAIK 等^[36]的实验表明,高表达 RIPK3 的 PC 细胞在小鼠胰腺中生长时,肿瘤细胞的坏死性凋亡发生率提高。此外,坏死性凋亡相关因子可作为一种新的标志物,在评估 PC 预后方面具有极大价值。例如,坏死凋亡核心蛋白 RIPK3 和 MLKL 的低表达分别与胰腺癌的预后不良有关。而 MLKL 表达上调预示着低组织学

分级、有限的转移扩散和改善患者总体生存状态。目前研究发现坏死性凋亡中相关因子 RIPK1、RIPK3 在 PC 中高表达,并在化疗后其表达水平进一步上调,可作为 PC 关键的生物标志物^[37]。COLBERT 等^[38]发现坏死性凋亡的关键底物 MLKL 在人胰腺癌组织中高表达,尤其是在肿瘤侵袭前沿的表达更为强烈,并且 MLKL 的高表达与接受辅助化疗的胰腺癌手术切除患者总生存期降低以及无复发生存期降低有关,因此 MLKL 还可作为 PC 患者预后评估的生物标志物。

肿瘤免疫学的实验研究进一步支持了坏死性凋亡的抗肿瘤作用。坏死性凋亡可能在激发免疫原性和抗肿瘤免疫监测方面发挥重要作用。已有研究表明,坏死性肿瘤细胞释放 IL-1 α 激活树突状细胞(dendritic cells, DCs)。被激活的 DCs 通过产生细胞毒性 IL-12 或激活 CD8⁺ T 细胞来清除肿瘤细胞以诱导抗肿瘤免疫反应。类似地, YATIM 等^[39]证明了肿瘤微环境中的成纤维细胞通过坏死性凋亡激活 NF- κ B 信号传导诱导强烈的免疫反应。NKT 细胞也被报道参与了 RIPK3 介导的抗肿瘤免疫反应^[40]。

综上所述,坏死性凋亡独特的作用机制有望为胰腺疾病的治疗和预后评估带来新的前景。

4.2 基于坏死性凋亡途径的相关靶点用于胰腺癌的药物治疗

由于 PC 细胞对凋亡具有抵抗力,在其他癌症中取得良好治疗效果的化疗和免疫治疗药物,在 PC 并未取得良好的临床效果,寻找替代的细胞死亡模式有望成为 PC 治疗的一种新的治疗策略^[41]。因此,坏死性凋亡途径作为一种可调控的新的细胞死亡模式对肿瘤治疗具有重要意义。大多数的肿瘤细胞由于 RIPK3 的低表达而表现对坏死性凋亡的抵抗,从而促进恶性肿瘤的生长,而 MLKL 的低表达也会导致恶性肿瘤预后不良^[42]。这一研究结果为利用坏死性凋亡途径治疗胰腺癌扩展了思路。在肿瘤的治疗中,凋亡诱导剂与癌症耐药密切相关,一旦促凋亡分子不能激活凋亡小体,就会触发 RIPK1 和 RIPK3 介导的坏死性凋亡^[43]。因此,坏死性凋亡可以通过非凋亡途径杀死肿瘤细胞,基于此研发的药物可以改善传统药物的耐药性。RIPK1、RIPK3 和 MLKL 是细胞死亡和存活途径的关键分子,也是治疗 PC 的潜在重要靶点。本文归纳胰腺癌中坏死性凋亡诱导物,为后期研究提供参

考(表 2)。

坏死性凋亡作为凋亡的替代方式,能够加快癌细胞死亡,起到防止肿瘤发展的作用^[44]。紫草素是从赤藓根部分离的天然产物,对炎症、溃疡、感染和肿瘤均有药理作用^[45]。AKIMOTO 等^[46]发现紫草素衍生物萘醌(Naphthoquinone)通过调节 RIPK1、RIPK3 的表达,诱导胰腺癌细胞坏死并增强胰腺癌一线药物吉西他滨在 PC 中的抗癌作用。IMB5036 是一种新的吡嗪酮化合物,具有抗肿瘤活性,可抑制癌细胞的生长和转移^[47]。ZIELINSKA 等^[48]发现 IMB5036 可刺激 MLKL 从细胞质转移到细胞膜上并上调 RIPK1、RIPK3 的水平,激活坏死性凋亡,加速细胞肿胀和增加膜通透性,诱导发生更多的坏死性凋亡,抑制人类胰腺癌的进展。半胱天冬氨酸酶模拟物被广泛应用于如骨髓恶性肿瘤、乳腺癌、结肠癌等肿瘤的研究中^[49]。ANGUIANO-HERNANDEZ 等^[50]发现,半胱天冬氨酸酶激活物的模拟物 BV6 可以激活 RIPK1、RIPK3 和 TNF- α ,加快肿瘤细胞死亡,抑制胰腺癌发展。抗糖尿病脂联素受体激动剂可以激活 RIPK1、细胞外调节激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)通路,通过坏死性凋亡诱导胰腺癌细胞死亡,抑制肿瘤生长,有望成为 PC 的治疗药物^[51]。银纳米颗粒(Ag nanoparticles, AgNPs)是一种具有提高化疗成功率潜力的试剂。ZHAO 等^[52]发现 AgNPs 可以促进肿瘤抑制因子 p53 蛋白的释放以及上调 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 的表达水平,最终在人胰腺癌细胞中诱导混合型程序性细胞死亡,并显著提高胰腺肿瘤中的化学敏感性。极光激酶 A(aurora kinase A gene, AURKA)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其上调在人类恶性肿瘤中普遍存在。ZHOU 等^[53]发现 AURKA 抑制剂 CCT137690 可增强 RIPK1-RIPK3 和 RIPK3-MLKL 复合物的形成,诱导 PC 细胞死亡,显著抑制了体外和体内的胰腺癌细胞的生长,这也说明了 AURKA 可能是坏死性凋亡和活化的负调节因子。

引发肿瘤细胞坏死性凋亡的治疗策略在抗肿瘤治疗方面显示出巨大的潜力。然而,这些治疗策略的有效性和安全性需要广泛评估。值得注意的是,坏死性凋亡可能会引起慢性炎症反应,促进血管生成、细胞增殖和转移。因此,需要更多的实验和临床试验来探索基于坏死性凋亡的抗肿瘤治疗的潜在应用^[54]。

表 2 胰腺癌中坏死性凋亡诱导物

Table 2 Ecrotizing apoptosis inducers in pancreatic cancer

物质 Material	靶向蛋白质 Targeted proteins	作用 Effects	参考文献 References
萘醌 Naphthoquinone	RIPK1 ↑、RIPK3 ↑	调节 RIPK1、RIPK3 的表达,诱导胰腺癌细胞坏死。 Regulate the expression of RIPK1 and RIPK3 and induce necrosis of pancreatic cancer cells.	[46]
新型哒嗪酮类化合物 (IMB5036) New pyridazinone compounds (IMB5036)	RIPK1 ↑、RIPK3 ↑、 MLKL ↑	刺激 MLKL 从细胞质转移到细胞膜上,上调 RIPK1、RIPK3、MLKL 的水平,抑制胰腺癌的进展。 Stimulate MLKL to transfer from cytoplasm to cell membrane, up regulate the levels of RIPK1, RIPK3, and MLKL, and inhibit the progress of pancreatic cancer.	[47-48]
半胱天冬酶氨基酸模拟物 (BV6) Cysteine aspartate analogue (BV6)	RIPK1 ↑、RIPK3 ↑、 TNF-α ↑	激活 RIPK1、RIPK3、坏死体复合物以及 TNF-α 水平,加快癌细胞死亡,抑制胰腺癌进展。 Activate RIPK1, RIPK3, necrosome complex and TNF-α levels, accelerate cancer cell death, and inhibit the progress of pancreatic cancer.	[49-50]
抗糖尿病脂联素受体激动剂 Anti diabetes adiponectin receptor agonist	RIPK1 ↑、ERK1 ↑、 ERK2 ↑	激活 RIPK1、ERK1/2 通路,通过坏死性凋亡诱导胰腺癌细胞死亡。 Activate RIPK1 and ERK1/2 pathways and induce pancreatic cancer cell death through necrotic apoptosis.	[51]
银纳米颗粒 Silver nanoparticles	RIPK1 ↑、RIPK3 ↑、 MLKL ↑、LC3- II ↑	上调 RIPK1、RIPK3、MLKL 和 LC3- II 的水平,提高胰腺癌对于化疗的敏感性。 Upregulate the levels of RIPK1, RIPK3, MLKL and LC3- II, and improve the sensitivity of pancreatic cancer to chemotherapy.	[52]
癌基因 (AURKA) 激酶抑制 剂 CCT137690 Cancer gene (AURKA) kinase inhibitor CCT137690	RIPK1-RIPK3 ↑、 RIPK3-MLKL ↑	增强 RIPK1-RIPK3 和 RIPK3-MLKL 复合物的形成,诱导 PC 细胞死亡,抑制了肿瘤的发展。 Enhancing the formation of RIPK1-RIPK3 and RIPK3-MLKL complexes, inducing PC cell death, and inhibiting tumor development.	[53]

5 小结展望

细胞坏死性凋亡作为一种新发现的程序性死亡方式,其结合了细胞凋亡和细胞坏死两者的特点,是机体调控细胞死亡的重要方式,在胰腺病变中与 AP 和 PC 发展密切相关。然而,需要注意的是,坏死性凋亡在不同情况下对于胰腺疾病的作用也不同,其可通过引发炎症级联反应导致严重的组织损伤,也可通过其强大的促炎作用发挥抗肿瘤的作用。在 AP 中坏死性凋亡相关关键因子为 RIPK1、RIPK3 和 MLKL,通过干预其相关靶点可减少胰腺腺泡细胞的坏死,对急性胰腺炎发展起到保护作用,并且其相关的坏死性抑制剂在重症胰腺炎中也起到良性作用。此外,坏死性凋亡可在各种类型的刺激下发生,并且在其信号转导通路的基础上,可通过多种途径调节坏死性凋亡以延缓肿瘤进展。此前已有报道称,依赖于 RIPK3 的线粒体磷酸酶 5 可通过去磷酸化调节树突状细胞的活性,并参与抗肿瘤免疫反应^[55]。因此,坏死性凋亡在 PC 预后评估、药物开发、耐药问题等方面提供了重要的研究思路,发现并识别坏死性凋亡的生物标志物,深入研究坏死性凋亡的分子机制和生理病理作用,特别是与其他细胞死亡机制和免疫系统之间的相

互作用,有助于进一步开发抗肿瘤治疗的靶点,为后期坏死性凋亡诱导剂在临床应用提供理论依据。

综上所述,坏死性凋亡在 AP 和 PC 中作用机制的发现为 AP 和 PC 的治疗开辟了新的前景。然而坏死性凋亡与人类疾病之间存在着错综复杂的关系,仍需进一步探究坏死性凋亡在胰腺疾病中的生理和病理作用的分子机制,研究其与其他细胞死亡机制的关系及其与免疫系统的相互作用,从而推进坏死性凋亡在胰腺疾病治疗领域中的应用。

参 考 文 献 (References)

[1] TONG X, TANG R, XIAO M, et al. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 174.

[2] WU Z, HUANG X, CAI M, et al. Novel necroptosis-related gene signature for predicting the prognosis of pancreatic adenocarcinoma [J]. Aging, 2022, 14(2): 869-891.

[3] BAI Y, LAM H C, LEI X. Dissecting programmed cell death with small molecules [J]. Acc Chem Res, 2020, 53(5): 1034-1045.

[4] SHI F L, YUAN L S, WONG T S, et al. Dimethyl fumarate inhibits necroptosis and alleviates systemic inflammatory response syndrome by blocking the RIPK1-RIPK3-MLKL axis [J]. Pharmacol Res, 2023, 189: 106697.

[5] LIU Y, LIU T, LEI T, et al. RIP1/RIP3-regulated necroptosis

- as a target for multifaceted disease therapy [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(3): 771–786.
- [6] HUANG Y, WANG S, KE A, et al. Ferroptosis and its interaction with tumor immune microenvironment in liver cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(1): 188848.
- [7] SHI C, CAO P, WANG Y, et al. PANoptosis: a cell death characterized by pyroptosis, apoptosis, and necroptosis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 1523–1532.
- [8] DAI W, CHENG J, LENG X, et al. The potential role of necroptosis in clinical diseases [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(5): 89.
- [9] KITUR K, WACHTEL S, BROWN A, et al. Necroptosis promotes *Staphylococcus aureus* clearance by inhibiting excessive inflammatory signaling [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(8): 2219–2230.
- [10] LLOYD A F, DAVIES C L, HOLLOWAY R K, et al. Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(7): 1046–1052.
- [11] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1106–1121.
- [12] SCHOCK S N, CHANDRA N V, SUN Y, et al. Induction of necroptotic cell death by viral activation of the RIG-I or STING pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(4): 615–625.
- [13] ZHANG T, XU D, LIU J, et al. Prolonged hypoxia alleviates prolyl hydroxylation-mediated suppression of RIPK1 to promote necroptosis and inflammation [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(7): 950–962.
- [14] VANDENABEELE P, DECLERCQ W, VAN H F, et al. The role of the kinases RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necrosis [J]. *Sci Signal*, 2020, 115(44): 23–25.
- [15] KARKI R, KANNEGANTI T D. ADAR1 and ZBP1 in innate immunity, cell death, and disease [J]. *Trends Immunol*, 2023, 44(3): 201–216.
- [16] QUARATO G, GUY C S, GRACE C R, et al. Sequential engagement of distinct MLKL phosphatidylinositol-binding sites executes necroptosis [J]. *Mol Cell*, 2016, 61(4): 589–601.
- [17] CHEN X, HE W T, HU L, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007–1020.
- [18] ZHANG T, XU D, TREFTS E, et al. Metabolic orchestration of cell death by AMPK-mediated phosphorylation of RIPK1 [J]. *Science*, 2023, 380(6652): 1372–1380.
- [19] LEE P J, PAPACHRISTOU G I. New insights into acute pancreatitis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(8): 479–496.
- [20] WU J, MULATIBIEKE T, NI J, et al. Dichotomy between receptor-interacting protein 1- and receptor-interacting protein 3-mediated necroptosis in experimental pancreatitis [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(5): 1035–1048.
- [21] WU J, HUANG Z, REN J, et al. Mkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl in necroptosis [J]. *Cell Res*, 2013, 23(8): 994–1006.
- [22] EKHLAK M, KULKARNI P P, SINGH V, et al. Necroptosis executioner MLKL plays pivotal roles in agonist-induced platelet prothrombotic responses and lytic cell death in a temporal order [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1886–1899.
- [23] CAO L, MU W. Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105297.
- [24] OUYANG Y, WEN L, ARMSTRONG J A, et al. Protective effects of necrostatin-1 in acute pancreatitis: partial involvement of receptor interacting protein kinase 1 [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1035.
- [25] SONG G, MA Z, LIU D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate severe acute pancreatitis by inhibiting necroptosis in rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1/2): 7–19.
- [26] UDER C, BRÜCKNER S, WINKLER S, et al. Mammalian MSC from selected species: Features and applications [J]. *Cytometry A*, 2018, 93(1): 32–49.
- [27] CUI Q R, LING Y H, WEN S H, et al. Gut barrier dysfunction induced by aggressive fluid resuscitation in severe acute pancreatitis is alleviated by necroptosis inhibition in rats [J]. *Shock*, 2019, 52(5): e107–e116.
- [28] AASEBØ E, BRENNER A K, HERNANDEZ-VALLADARES M, et al. Proteomic comparison of bone marrow derived osteoblasts and mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5665.
- [29] SONG D, HAO J, FAN D. Biological properties and clinical applications of berberine [J]. *Front Med*, 2020, 14(5): 564–582.
- [30] OU X, HUA Y, LIAO X, et al. Cognitive impairments induced by severe acute pancreatitis are attenuated by berberine treatment in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3437–3444.
- [31] ILEGEMS E, BRYZGALOVA G, CORREIA J, et al. HIF-1 α inhibitor PX-478 preserves pancreatic β cell function in diabetes [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(638): eaba9112.
- [32] ZHU Q, HAO L, SHEN Q, et al. CaMK II inhibition attenuates ROS dependent necroptosis in acinar cells and protects against acute pancreatitis in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4187398.
- [33] ANWAR M A, SHAH M, KIM J, et al. Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(3): 1053–1090.
- [34] SU Y R, HONG Y P, MEI F C, et al. High-fat diet aggravates the intestinal barrier injury via TLR4-RIP3 pathway in a rat model of severe acute pancreatitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 2512687.
- [35] WU J, MA X, CHEN W, et al. Protective effects of HTD4010, a Reg3 α /PAP-derived peptide, in mouse model of acute pancreatitis via toll-like receptor 4 pathway [J]. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 2019, 512(4): 670–677.
- [36] BAIK J Y, LIU Z, JIAO D, et al. ZBP1 not RIPK1 mediates tumor necroptosis in breast cancer [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2666.
- [37] SEIFERT L, WERBA G, TIWARI S, et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression [J]. Nature, 2016, 532(7598): 245–249.
- [38] COLBERT L E, FISHER S B, HARDY C W, et al. Pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein expression is a prognostic biomarker in patients with early-stage resected pancreatic adenocarcinoma [J]. Cancer, 2013, 119(17): 3148–3155.
- [39] YATIM N, JUSFORGUES-SAKLANI H, OROZCO S, et al. RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells [J]. Science, 2015, 350(6258): 328–334.
- [40] KANG Y J, BANG B R, HAN K H, et al. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumours and liver inflammation by mitochondrial PGAM5-Drp1 signalling [J]. Nat Commun, 2015, 6: 8371.
- [41] MARTINEZ-OSORIO V, ABDELWAHAB Y, ROS U. The many faces of MLKL, the executor of necroptosis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10108.
- [42] ALVAREZ-DIAZ S, PREAUDET A, SAMSON A L, et al. Necroptosis is dispensable for the development of inflammation-associated or sporadic colon cancer in mice [J]. Cell Death Differ, 2021, 28(5): 1466–1476.
- [43] HASSANEIN E H M, IBRAHIM I M, ABD EL-MAKSOUH M S, et al. Targeting necroptosis in fibrosis [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(12): 10471–10484.
- [44] KARLOWITZ R, VAN WIJK S J L. Surviving death: emerging concepts of RIPK3 and MLKL ubiquitination in the regulation of necroptosis [J]. FEBS J, 2023, 290(1): 37–54.
- [45] LEE J H, HAN S H, KIM Y M, et al. Shikonin inhibits proliferation of melanoma cells by MAPK pathway-mediated induction of apoptosis [J]. Biosci Rep, 2021, 41(1): BSR20203834.
- [46] AKIMOTO M, MARUYAMA R, KAWABATA Y, et al. Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8): 804.
- [47] LV X, ZHAO Q, DONG Y, et al. IMB5036, a novel pyridazinone compound, inhibits hepatocellular carcinoma growth and metastasis [J]. Invest New Drugs, 2022, 40(3): 487–496.
- [48] ZIELINSKA E, ZAUSZKIEWICZ-PAWLAK A, WOJCIK M, et al. Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncotarget, 2018, 9(4): 4675–4697.
- [49] BODDU P, CARTER B Z, VERSTOVSEK S, et al. SMAC mimetics as potential cancer therapeutics in myeloid malignancies [J]. Br J Haematol, 2019, 185(2): 219–231.
- [50] ANGUIANO-HERNANDEZ Y M, CHARTIER A, HUERTA S. Smac/DIABLO and colon cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2007, 7(4): 467–473.
- [51] HANNES S, ABHARI B A, FULDA S. Smac mimetic triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked [J]. Cancer Lett, 2016, 380(1): 31–38.
- [52] ZHAO Q, ZHENG Y, LV X, et al. IMB5036 inhibits human pancreatic cancer growth primarily through activating necroptosis [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2022, 130(3): 375–384.
- [53] ZHOU Y, CAI Z, ZHAI Y, et al. Necroptosis inhibitors: mechanisms of action and therapeutic potential [J]. Apoptosis, 2024, 29(1/2): 22–44.
- [54] RATHJE O H, PERRYMAN L, PAYNE R J, et al. PROTACs targeting MLKL protect cells from necroptosis [J]. J Med Chem, 2023, 66(16): 11216–11236.
- [55] KANG Y J, BANG B R, HAN K H, et al. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumours and liver inflammation by mitochondrial PGAM5-Drp1 signalling [J]. Nat Commun, 2015, 6: 8371.

[收稿日期] 2023-09-15

胡毅龙,赵怡楠,苗晋鑫,等. 大小鼠帕金森病行为学评价方法概述及常用动物模型特点分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 942-954.

HU Y L, ZHAO Y N, MIAO J X, et al. Overview of behavioral evaluation methods of Parkinson's disease in rat and mouse and analysis of the characteristics of common animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 942-954.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.013

大小鼠帕金森病行为学评价方法概述及常用动物模型特点分析

胡毅龙^{1,2}, 赵怡楠^{1,2}, 苗晋鑫^{1,2}, 苗明三^{1,2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 郑州 450046)

【摘要】 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是第二大中老年人常见的神经退行性疾病, 患病周期长、治疗过程复杂, 是当今社会的一个巨大挑战。PD 动物模型的行为学变化可以直观地反映出实验动物的成模情况与药物干预后的变化情况。因此选择规范的动物模型以及相适宜的行为学检测方法是进行 PD 机制研究、抗 PD 药物研发的基础。本文对国内外关于大小鼠的帕金森行为学实验方法进行归纳, 对常用帕金森行为学实验的实验设备、实验方法、评价指标、注意事项进行了系统性总结, 同时对目前常用的帕金森模型进行了概述, 对模型的造模机制、与帕金森临床特征的吻合情况、优缺点进行了分析, 以期研究者根据研究目的选择适宜的帕金森模型与行为学检测方法。

【关键词】 帕金森病; 大小鼠; 行为学实验; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0942-13

Overview of behavioral evaluation methods of Parkinson's disease in rat and mouse and analysis of the characteristics of common animal models

HU Yilong^{1,2}, ZHAO Yinan^{1,2}, MIAO Jinxin^{1,2}, MIAO Mingsan^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: MIAO Mingsan. E-mail: miaomingsan@163.com

【Abstract】 Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease in middle-aged and elderly people. It is characterized by a long disease course and complex treatment process, introducing great challenges to society. Behavioral changes in animal models of Parkinson's disease can intuitively reflect the modeling situation of experimental animals and the effects of drug interventions. Therefore, selecting standardized animal models and appropriate behavioral assays is fundamental for both understanding the mechanisms of Parkinson's disease and developing anti-Parkinson drugs. In this paper, we summarize the method of behavioral experiments of Parkinson's disease using mice and rats at home and abroad and systematically summarize the experimental equipment, experimental method, evaluation indexes, and precautions of commonly used Parkinson's behavioral experiments. We also provide an overview of the commonly used animal models of

[基金项目] 岐黄学者 (国中医药人教函 2022-6), 河南省重大公益专项 (201300310100), 河南省高等学校重点科研项目计划 (22A360013)。

Funded by Qihuang Scholar (Letter of Teaching Traditional Chinese Medicine 2022-6), Major Public Welfare Projects in Henan Province (201300310100), Key Research Project Program for Higher Education Institutions in Henan Province (22A360013)。

[作者简介] 胡毅龙, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药学。Email: huyilong20001003@163.com

[通信作者] 苗明三, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药学。Email: miaomingsan@163.com

Parkinson’s disease and analyze their modeling mechanisms, alignment with the clinical features of Parkinson’s disease, and respective advantages and disadvantages. This analysis will help researchers in choosing appropriate animal models of Parkinson’s disease and behavioral testing method according to the purpose of the study.

【Keywords】 Parkinson’s disease; rat and mouse; behavioral experiment; animal model

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

帕金森病(Parkinson’s disease, PD)又称震颤麻痹^[1],是第二大中老年常见的神经系统变性疾病。PD 的病理特征是纹状体和中脑黑质致密区多巴胺能神经元功能障碍和丢失,临床表现分为运动症状:动作迟缓、肌强直、静止性震颤、姿势平衡障碍以及非运动症状:嗅觉减退、便秘、睡眠障碍、抑郁。流行病学调查显示,全球每 10 万人中就有 100 ~ 200 例 PD 患者,且年发病率为 0.0015%。截至 2016 年,中国的 PD 患者近 300 万,是 PD 患者最多的国家^[2-3]。PD 患病周期长、治疗过程复杂,主要治疗手段是药物治疗和手术治疗,但手术治疗后仍需服用药物,这在全球老龄化的今天,是一个巨大的挑战。

实验动物的行为响应特征与人类具有相似性,因此建立模型进行推演,实现动物与人之间生物效应的等效性分析,是研究 PD 发生机制及抗 PD 药物药效学评价的主要有效途径。在开展动物实验研究时,通过观察 PD 动物模型的表现表现判断药效是比病理指标更为直观的手段,这就需要借助行为学实验来对 PD 动物模型的运动行为进行观察和评价。因此,本文对大小鼠 PD 行为学实验的实验设备、实验方法、评价指标、注意事项以及常用的帕金森病动物模型进行综述,以期为 PD 机制的进一步研究与治疗药物开发提供参考。

1 大小鼠 PD 行为学评价方法

大小鼠 PD 行为学评价方法是以运动迟缓、肌强直、姿势异常以及静止性震颤 4 大临床症状为核心而设计,主要对大小鼠的运动能力、平衡能力、四肢协调能力、行为姿势、震颤行为进行评价,PD 的行为学实验方法主要有旷场实验、爬杆实验、悬挂实验、疲劳转棒实验、平衡木实验、阿扑吗啡诱导旋转实验等。此外,针对大小鼠的肌强直和震颤行为又有僵直评分测试、震颤麻痹评分、行为学评分。

1.1 旷场实验(open field test)

旷场实验最早于 1934 年由 HALL^[4]设计,是测试实验动物在规定时间内在一定区域的自发活动情况,是研究小型动物活动能力的主要行为学测试

方法之一。检测指标为实验动物的运动总路程、运动总时间、平均速度、站立次数。旷场实验一般需要借助自动摄像设备记录动物的运动轨迹、时间、速度等行为指标。观察帕金森动物模型的运动能力,从而评价帕金森动物模型的成模情况以及药物的抗帕金森作用。

1.1.1 实验设备

旷场实验的设备分为 3 部分:黑色敞口观察箱、观察箱上方摄像设备和数据记录与分析系统(计算机)。

1.1.2 实验方法

与焦虑、抑郁行为实验方法不同,旷场实验在用于测定自发活动时需要适应期,实验方法参见文献^[5-10]。

1.1.3 评价指标

(1)总路程:动物在实验记录时间内产生的运动总路程。正常动物 5 min 内的总路程为 1000 ~ 2500 cm,动物出现 PD 样行为时运动能力下降,运动总路程显著性减少($P < 0.05$)^[5]。(2)运动总时间:动物在实验记录时间内运动状态的时间累积。正常动物运动时间多大于检测时间的 30%,动物出现 PD 样行为时运动能力下降,运动总时间显著性减少($P < 0.05$)^[6-8]。(3)平均速度:总路程与运动总时间的比值。正常动物的运动速度多为 3 ~ 8 cm/s。动物出现 PD 样行为时运动能力下降,运动速度显著性下降($P < 0.05$)^[9]。(4)站立次数:动物在实验记录时间内的站立总次数。10 min 检测时间,正常大鼠站立次数 20 ~ 50 次;正常小鼠站立次数 60 ~ 130 次,动物出现 PD 样行为时运动能力下降,站立次数显著性减低($P < 0.05$)^[9]。

1.1.4 主要注意事项

(1)实验环境应保持安静^[10]; (2) C57BL/6 等品系的黑色小鼠在进行旷场实验时应在动物背部做明显标记提高对比度,以供摄像装置的捕捉。

1.2 爬杆实验(pole test)

爬杆实验最早在 1985 年由 OGAWA 等^[11]设计,用于 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine

hydrochloride, MPTP) 诱导的 PD 小鼠模型运动迟缓的研究。其原理是通过记录小鼠由杆顶端往下爬到底端所需要的时间来分析小鼠的运动协调能力和运动耐受力。爬杆实验操作和观察指标简单、实验误差小,是检测小鼠 PD 的常用行为学实验。

1.2.1 实验设备

爬杆实验的设备分为 2 个部分:直径 1 cm,长 50 cm 固定于底座的长杆、固定于杆部上方直径 2.5 cm 的小球。

1.2.2 实验方法

爬杆实验在正式实验之前需要进行适应性训练,因此本实验分适应期和实验期,实验方法参见

文献^[12-15]。

1.2.3 评价指标

(1)小鼠头朝上转为头朝下的时间:小鼠在顶端小球的转头时间反映了小鼠的运动协调能力,当小鼠出现 PD 样行为时,小鼠转头时间显著性上升($P < 0.05$)^[12]。(2)小鼠自顶端爬至底部的总时间:小鼠爬行的总时间可反映小鼠的运动协调能力和运动耐受力,小鼠若出现 PD 样行为,则运动耐受力下降,出现从杆上掉落或停留在顶部不动现象^[13-14]。当小鼠出现 PD 行为时,小鼠爬行总时间显著性上升($P < 0.05$)。另有研究者根据小鼠爬行时间和状态对小鼠进行评分^[15],评分标准见表 1。

表 1 小鼠爬杆实验评分标准

Table 1 Scoring criteria for mouse pole test	
小鼠爬杆时间/s Mouse climbing time/s	分值/分 Score/points
小鼠从杆上一次顺利爬下,爬杆时间 < 4.00 s Mouse successfully climbed down from the pole for the first time, climbing time < 4.00 s	0
小鼠停顿数次后能爬下,爬杆时间为 4.01 ~ 8.00 s Mouse can climb down after several pauses, climbing time is 4.01 ~ 8.00 s	1
小鼠缓慢爬行伴轻微震颤,爬杆时间为 8.01 ~ 12.00 s Mouse crawled slowly with slight tremor, climbing time is 8.01 ~ 12.00 s	2
小鼠掉落,频繁性震颤,四肢僵直或爬杆时间 > 12.00 s Mouse fell, frequently trembled, their limbs were stiff, or the climbing time > 12.00 s	3

1.2.4 主要注意事项

(1)实验装置顶部小球一般为木制粗糙小球,防止小鼠滑落;长杆表面应粗糙,必要时可在长杆表面覆盖胶布以增加摩擦力^[15];(2)大鼠体重较重、身形较长,爬杆时易掉落,因此爬杆实验更适用于小鼠。

1.3 悬挂实验(wire hanging test)

用来检测 PD 的典型症状——肌强直和震颤,小鼠出现肌强直和震颤症状时可表现为肌无力和运动障碍,此时将动物前肢悬挂于不锈钢棒上,通过动物坚持的时间以及动物在悬挂过程中的机体协调度可判断动物是否出现 PD 样行为以及严重程度。悬挂实验操作简单、实验设备易得,广泛用于检测 PD 模型的造模情况。

1.3.1 实验设备

悬挂实验的设备分为 2 部分:距离 100 cm 的两支架底座、水平放置于两支架间的直径 1.5 mm 的不锈钢棒。不锈钢棒距离地面 50 cm,装置下方铺设布料或垫料防止动物摔伤。

1.3.2 实验方法

轻提小鼠尾巴将小鼠倒置,令其前肢刚好抓住不锈钢棒后放开小鼠尾巴,观察小鼠的状态,记录

小鼠悬挂的时间。重复 3 次,计算重复测量的平均值作为悬挂实验结果^[16-17]。

1.3.3 评价指标

小鼠自挂上不锈钢棒至掉落的时间:小鼠悬挂时间可以反映小鼠的运动能力与耐力,小鼠的后肢攀援情况可反映小鼠的运动协调能力。当小鼠出现 PD 样行为时,小鼠悬挂时间显著性下降($P < 0.05$)。本实验亦可通过小鼠的后肢攀援上不锈钢棒情况与悬挂时间进行评分^[16],评分标准见表 2,另外每爬上一个后肢,则在分数基础上加 1 分。当小鼠出现 PD 样行为时,小鼠悬挂评分与正常小鼠相比显著性下降($P < 0.05$)。

表 2 小鼠悬挂实验评分标准

Table 2 Scoring criteria for mouse wire hanging test	
悬挂至掉落时间/s Suspension to drop time/s	分值/分 Score/points
0 ~ 4	0
5 ~ 9	1
10 ~ 14	2
15 ~ 19	3
20 ~ 24	4
25 ~ 29	5
≥ 30	6

1.3.4 主要注意事项

(1) 两支架之间的距离应足够宽, 防止小鼠悬挂过程中尾巴钩到两端支架; (2) 大鼠体重过重, 不易正常维持悬挂状态, 应控制大鼠体重或选取其他行为学测试^[17]。

1.4 疲劳转棒实验 (rotarod system test)

疲劳转棒实验最早出现在 1957 年 DUNHAM 等^[18]研究中。1968 年, JONES 等^[19]改进设计了经典的工业转棒。疲劳转棒实验原理是让动物被迫于旋转棒之上保持平衡并跟随旋转棒运动, 动物的表现可以用来评价动物的平衡能力、四肢协调能力与耐力。疲劳转棒实验可以很好地反映出动物的运动协调能力, 广泛用于 PD 动物模型的运动功能评价。

1.4.1 实验设备

疲劳转棒实验的实验设备为疲劳转棒仪, 小鼠转棒直径 3 cm、长度 6 cm; 大鼠转棒直径 7 ~ 9 cm、长度 9 cm。

1.4.2 实验方法

疲劳转棒实验在正式实验之前需要进行适应性训练, 因此本实验分适应期和实验期, 实验方法参见文献^[20-22]。

1.4.3 评价指标

(1) 首次跌落时间: 动物从放上转棒至第 1 次掉落的时间, 首次跌落时间越短则动物平衡与协调能力越差。正常动物 5 min 内的首次跌落时间一般 ≥ 200 s, 当动物出现 PD 样行为时, 动物首次跌落时间显著性下降 ($P < 0.05$)^[20]。(2) 力竭时间: 动物从放上转棒至第 3 次掉落的时间。力竭时间反映了动物的耐力、平衡能力与四肢协调能力, 同时也反映了动物的运动学习能力。正常动物的 5 min 内的力竭时间一般 ≥ 200 s, 当动物出现 PD 样行为时, 动物力竭时间显著性下降 ($P < 0.05$)^[21]。

1.4.4 主要注意事项

(1) 转棒的转速应随实验动物的运动情况随时进行调整, 但实验整体应使用同一模式与同一转速。(2) 在训练期应对活动过多或过少的动物进行剔除, 以保证后期实验的均一性^[22]。

1.5 平衡木实验 (balance beam test)

平衡木实验包括平衡实验和行走实验, 平衡实验主要对动物的平衡能力进行检测, 行走实验则是对动物的运动协调能力进行评估。PD 动物模型前庭功能紊乱会造成实验动物难以维持平衡、协调能力下降。平衡木实验对实验动物前庭与运动脑区

缺陷敏感, 检测方法简便, 是常用的运动功能障碍行为学实验。

1.5.1 实验设备

1 ~ 2 m 长木条与两端底座, 木条末端应设有黑色笼子供动物休息。两端底座应有高度差以保证平衡木维持 15° 倾斜或底座水平。平衡木宽度随实验动物的品系不同而调整, 大鼠平衡木一般宽 1.8 cm, 小鼠平衡木一般宽 0.6 cm。

1.5.2 实验方法

平衡木实验在正式实验之前需要进行适应性训练, 因此本实验分适应期和实验期, 实验方法参见文献^[23]。

1.5.3 评价指标

动物在平衡木上的姿势与跌落时间反映了动物的平衡能力和运动协调能力。如脑内单侧黑质区注射 6-羟基多巴 (6-hydroxydopa, 6-OHDA) 的小鼠出现单侧肢体运动受阻, 小鼠则会滑向平衡木的一侧或掉落。通过动物的运动姿势与掉落时间对动物进行评分^[23], 评分标准见表 3。

1.5.4 主要注意事项

(1) 本实验利用到了啮齿类动物趋暗的天性, 即诱导动物从明亮嘈杂场地走向平衡木另一端黑色鼠笼, 因此要保证鼠笼以外环境的灯光明亮^[24]。(2) 实验进行过程中, 应在平衡木下方铺设垫料, 防止动物跌伤。

1.6 阿扑吗啡诱导旋转实验 (apomorphine-induced rotation test)

阿扑吗啡诱导的旋转实验主要用于检测 6-羟基多巴制备的帕金森大鼠模型, 当大鼠脑内单侧注射 6-OHDA 后, 脑内单侧多巴胺能神经元出现变性坏死、多巴胺含量下降。此时给予效多巴胺受体激动剂阿扑吗啡 (apomorphine, APO), 大鼠脑内仅健康侧多巴胺能神经元被激活, 大鼠将出现单侧运动障碍, 表现出旋转行为。阿扑吗啡诱导的旋转实验简便易行、无需额外实验设备, 可以准确地检测 6-OHDA 帕金森大鼠的造模情况。

1.6.1 实验药品

生理盐水配置的 0.5 mg/mL 的 APO 注射液。

1.6.2 实验方法

大鼠脑立体定位注射 6-OHDA 造模, 2 ~ 3 周后, 颈背部皮下注射 0.05 mg/100 g APO。

1.6.3 评价指标

注射 APO 5 min 后, 记录大鼠 30 min 内的旋转

表 3 平衡木实验评分标准

Table 3 Scoring criteria for balance beam test

表现 Performance	分值/分 Score/points
稳定平衡姿势,顺利通过平衡木 Stabilize the balance posture and pass the balance beam smoothly	0
紧抓平衡木边缘,通过平衡木 Grasp the edge of the balance beam and pass through the balance beam	1
紧抱平衡木,一肢体从平衡木垂落通过平衡木 Hold the balance beam tightly, and one limb hangs from the balance beam and passes through the balance beam	2
两肢体从平衡木垂落或在平衡木上旋转超过 60 s 未掉落 Both limbs fall from the balance beam or rotate on the balance beam for more than 60 s without falling	3
试图在平衡木上平衡超过 40 s 但跌落 Trying to balance on the balance beam for more than 40 s but falling down	4
试图在平衡木上平衡超过 20 s 但跌落 Trying to balance on the balance beam for more than 20 s but falling down	5
未尝试在平衡木上平衡即跌落 Fall without trying to balance on the balance beam	6

圈数。PD 模型判定标准:大鼠 30 min 内每分钟的平均旋转圈数大于或等于 7^[21,25]。

1.6.4 主要注意事项

(1)6-OHDA 损毁多巴胺能神经元需要一定时间,若第 1 次检测大鼠未出现旋转反应,可在 1 周内重复检测;(2)大鼠注射 APO 后应置于干净无异味的空旷场地进行观察检测,异物或气味会对大鼠造成干扰^[25]。

2 常用 PD 动物模型

实验动物模型是研究疾病的基础,建立 PD 动物模型模拟 PD 患者的临床症状,对于帕金森病机制的研究以及抗帕金森药物的研发与临床诊疗均有重大意义。目前常用的 PD 动物模型主要分为两类:神经毒素类模型与基因工程类模型,两类模型的病理特征与临床相比各具有不同侧重点。

2.1 神经毒素类模型

2.1.1 MPTP 模型

MPTP 是一种具有海洛因样作用的人工化学合成产物。MPTP 为脂溶性有机化合物,透过血脑屏障后可以选择性地被星形胶质细胞线粒体外膜的单胺氧化酶-B (monoamine oxidase-B, MAO-B) 催化并进一步自发氧化生成 MPP⁺^[26-27]。MPP⁺与多巴胺结构相似,因此可与多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 高度亲和进入多巴胺能神经元^[28], MPP⁺进入多巴胺能神经元后能够抑制线粒体复合物 I 活性,干扰并阻断线粒体电子传递链,最终导致三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的消耗,

氧自由基生成增加,细胞内一氧化氮含量增加,从而导致多巴胺能神经元变性和死亡。MPTP 制备 PD 模型的方法简单,给药方式多样,且该模型的运动症状与病理特征均较符合 PD 的临床表现。根据其造模机制,该模型更适用于帕金森线粒体功能障碍的研究^[29]。但该模型具有一定的自发修复且 MPTP 的剂量和给药方法对造模情况具有较大影响^[30]。

2.1.2 6-OHDA 模型

6-OHDA 是一种儿茶酚胺选择性神经毒素,不能通过血-脑屏障,因此需要通过脑立体定位注射的方式注射于特定脑区,常见的注射靶点为:黑质、纹状体、内侧前脑束。6-OHDA 是多巴胺的羟基化衍生物,注射入脑以后,一方面可与多巴胺质膜转运蛋白高度亲和,在多巴胺能神经元内运输毒素,竞争性抑制多巴胺^[31],诱导多巴胺能神经元变性。另一方面,可以触发氧化应激相关细胞毒性和小胶质细胞依赖性多巴胺神经元炎症^[32]。6-OHDA 模型对多巴胺能神经元的特异性强、病理特征明显、稳定性强。但该模型的运动症状与临床不相符,且脑立体定位注射对操作者要求较高。另外值得注意的是,6-OHDA 极易氧化,在实验和贮存过程中要格外注意。

2.1.3 鱼藤酮模型

鱼藤酮是一种天然有机化合物,存在于豆科 (Fabaceae) 鱼藤属植物的根中,常被用作杀虫剂。鱼藤酮具有亲脂性,其透过血-脑屏障后,既能直接作用于多巴胺能神经元细胞内的线粒体,释放活性

氧(reactive oxygen species, ROS), 干扰多巴胺代谢, 通过氧化应激引起细胞凋亡与坏死, 又可作用于非多巴胺能神经元, 释放细胞因子与 ROS, 从而间接引起多巴胺能神经元细胞的凋亡与坏死^[33]。鱼藤酮诱导 PD 模型涵盖氧化应激、神经炎症、细胞凋亡等多种机制, 运动症状与病理特征均与临床高度符合, 是研究 PD 路易小体(Lewy-bodies)形成的理想模型。但鱼藤酮自身半衰期短、降解较快, 用该模型进行实验研究时周期不能过长。

2.1.4 百草枯模型

百草枯是一种联吡啶类除草剂, 其化学结构与 MPTP、MPP⁺相似, 也是一种神经毒素。百草枯用于诱导 PD 模型是由于其可能是帕金森病因的环境因素之一, 百草枯透过血-脑屏障之后, 可通过中性氨基酸转运系统以 Na⁺ 依赖方式进入神经元内^[34], 抑制线粒体复合物 I 活性而致线粒体功能异常^[35]。此外还可使神经元内 α -突触核蛋白(α -synuclein)纤维化聚集、路易小体形成^[36]。百草枯模型的病理特征与临床吻合度高且操作简单。但临床百草枯所致帕金森主要是小剂量经口暴露, 实验研究所用腹腔注射大剂量方式与临床不相符。

2.2 基因工程类模型

2.2.1 α -synuclein

α -synuclein 是一种在中枢神经系统突触前及核周表达的可溶性蛋白质, 而帕金森标志物 Lewy-bodies 的主要组成部分是纤维化的 α -synuclein, 因此, α -synuclein 的纤维化在帕金森发病中起着重要作用^[37]。 α -synuclein 基因突变可导致分子结构突变, 形成蛋白聚集^[38]。异常的 α -synuclein 聚集与 Lewy-bodies 的形成、多巴胺能神经元死亡乃至 PD 的发生有密切关系。 α -synuclein 转基因模型具有 PD 的运动症状和经典标志 Lewy-bodies, 但尚未有关于黑质、纹状体内神经损伤的报道。

2.2.2 Parkin/PINK1

PARK 基因的突变会导致线粒体功能障碍, 即 PINK1 (PARK6) 和 Parkin (PARK2)。PINK1 突变导致常染色体隐性遗传性 PD, 帕金森某些临床特征在 PINK1 突变患者中更为常见。Parkin 相关基因的激活可改善线粒体功能、恢复 PD 运动症状。PINK1 突变与隐性 PD 有关, 其突变体表现出多巴胺能神经元变性和运动缺陷。PARK 基因突变模型对氧化应激和活性氧的产生很敏感, 但是未观察到多巴胺能神经元变性或纹状体多巴胺水平降低等

病理学特征^[39-40]。

2.2.3 LRRK2

LRRK2 是由 PARK8 基因编码的一种蛋白激酶。LRR2 基因缺失影响内质网输出蛋白的调控, 进而影响纹状体中多巴胺在细胞表面的分布。LRRK2 转基因模型具有不同的病理特征。LRRK2 的 BAC 转基因小鼠模型显示出年龄依赖性进行性运动障碍, 纹状体多巴胺释放轻度减少, 但无明显的多巴胺细胞损失和 α -synuclein 聚集^[41]。LRRK2 KO 小鼠缺乏神经退行性或神经元结构的改变, 但导致了 α -synuclein 在大脑中的聚集^[42]。

2.2.4 DJ-1

DJ-1 是一种抗氧化蛋白, 可以保护细胞免受氧化应激伤害。DJ-1 基因突变会造成氧化应激反应功能紊乱, 导致常染色体隐性 PD。DJ-1 基因敲除小鼠的纹状体中多巴胺水平下降, 运动能力受损, 黑质致密部中多巴胺能神经元损失^[43-44]。DJ-1 敲除大鼠表现出明显的黑质多巴胺能神经元损失并伴有运动缺陷^[45-46]。各类型动物模型特征与优缺点见表 4。

3 小结与展望

PD 致病因素多、发病机制复杂, 帕金森行为学实验主要围绕 PD 的临床运动症状如运动迟缓、肌强直、姿势异常以及静止性震颤而设计。主要运用的行为学实验包括: 检测动物运动能力的旷场实验; 检测动物运动协调能力和运动耐受力的爬杆实验; 判断动物是否出现肌强直和静止性震颤症状的悬挂实验; 评估动物平衡能力、四肢协调能力与耐力的疲劳转棒实验; 评价动物平衡、协调能力的平衡木实验; 直接判断动物是否出现神经元损伤的阿扑吗啡诱导旋转实验。PD 的动物模型以 PD 的病理特征: 多巴胺神经元功能障碍和丢失与运动症状为核心而建立, 常用的模型包括: MPTP 模型、6-OHDA 模型、鱼藤酮模型、百草枯模型与基因工程模型。

选择规范的动物模型以及相适宜的行为学检测方法, 是进行 PD 机制研究、抗 PD 药物研发的基础。现有的 PD 动物模型均符合 PD 的首要病理特征——黑质、纹状体多巴胺能神经元的丢失, 同时不同模型又各有特点与针对性, 因此实验者在进行实验研究时, 也应依据模型特点检测不同的指标, 详见表 5。如对 PD 线粒体功能障碍进行研究时可

表 4 帕金森病动物模型
Table 4 Parkinson's disease animal models

类型 Types	模型 Models	造模方法 Modeling methods	造模机制 Modeling mechanism	运动特征 Motion characteristics	病理特征 Pathological features	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
神经毒 素类 Neurotoxic	MPTP 模型 ^[47-51] MPTP model ^[47-51]	腹腔注射; 每天 30 mg/kg; 持续 1 周 Intraperitoneal injection; 30 mg/kg per day; lasting for 1 week	抑制线粒体复 合物 I 活性, 干 扰并阻断线粒 体电子传递链 Inhibit the activity of mitochondrial complex I, interfere with and block the mitochondrial electron transfer chain	震颤、痉挛, 四 肢协调性明显 下降 Tremors, spasms, and decreased coordination of limbs	多巴胺能神经 元变性、死亡; 多巴胺含量降 低; TH 含量降 低; α -synuclein 产生纤维化 Dopaminergic neurons degenerated and died; Dopamine content decreased; TH content decreased; α - synuclein produces fibrosis	造模方法简单, 给药方式多样, 运动症状与病 理特征均较符 合临床 Modeling method is simple, administration methods are diverse, motor symptoms and pathological features are more in line with the clinic	具有一定的自发修 复作用, 且 MPTP 的剂量和给药方法 的对造模情况具有 较大影响 It has a certain spontaneous repair effect, dosage and administration method of MPTP have great influence on the modeling situation
	6-OHDA 模型 ^[52-54] 6-OHDA model ^[52-54]	黑质、内侧前脑 束、纹状体区脑 立体注射; 每个 点位 6 μ g 左 右; 单次注射 Stereoscopic injection of substantia nigra, medial forebrain tract and striatum; each point is about 6 μ g; single injection	竞争性抑制多 巴胺; 触发氧化 应激, 引起多巴 胺能神经元 炎症 Competitive inhibition of DA; trigger oxidative stress, cause inflammation of DA neurons	单侧旋转 Unilateral rotation	多巴胺能神经 元变性、坏死; 多巴胺含量降 低; TH 含量降 低; α -synuclein 含量下降, 未产 生纤维化 Dopaminergic neurons degenerated and died; Dopamine content decreased; TH content decreased; content of α - synuclein decreased without fibrosis	对多巴胺能神 经元的特异性 强, 病理特征明 显, 模型稳定 性强 It has strong specificity for dopaminergic neurons, obvious pathological features and strong model stability	运动症状与临床不 符, 且脑立体定位 注射对操作者要求 较高 Motor symptoms are inconsistent with the clinic, stereotactic injection of brain requires the operator more
	鱼藤酮 模型 ^[55-57] Rotenone model ^[55-57]	颈背部皮下注 射; 每天 2 mg/ kg; 持续 3 周 Subcutaneous injection of neck and back; 2 mg/kg per day; lasting for 3 weeks	激起氧化应激, 引起多巴胺能 神经元细胞凋 亡坏死 Arouse oxidative stress, cause apoptosis and necrosis of DA neurons	动作迟缓、弓 背、四肢僵硬或 瘫痪、震颤 Slow movement, hunchback, stiff limbs, paralysis, tremor	多巴胺能神经 元丢失、死亡; 多巴胺含量降 低; TH 含量降 低; α -synuclein 产生纤维化; 出 现富含纤维化 α -synuclein 的 路易小体 Dopaminergic neurons lost and died; Dopamine content decreased; TH content decreased; α - synuclein produces fibrosis; Lewy bodies rich in fibrotic α - synuclein appeared	涵盖氧化应激、 神经炎症、细胞 凋亡等多种机 制, 且运动症状 与病理特征均 与临床高度 符合 It covers many mechanisms such as oxidative stress, neuroinflammation, apoptosis, etc., motor symptoms and pathological features are highly consistent with the clinic	鱼藤酮半衰期短, 降解快 Rotenone has short half-life, fast degradation

续表 4

类型 Types	模型 Models	造模方法 Modeling methods	造模机制 Modeling mechanism	运动特征 Motion characteristics	病理特征 Pathological features	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
基因工程类 Genetic	百草枯模型 Paraquat model ^[58-60]	腹腔注射; 每天 10 mg/mg; 连续 1 周 Intraperitoneal injection; 10 mg/mg per day; lasting for 1 week	抑制线粒体复合物 I 活性而致线粒体功能异常 Inhibition of mitochondrial complex I activity leads to abnormal mitochondrial function	反应迟钝、动作缓慢、肌肉僵硬 Slow response, slow movement, stiff muscles	多巴胺能神经元减少; TH 含量降低; α -synuclein 纤维化聚集; 神经元细胞中出现路易小体 Dopaminergic neurons decreased; TH content decreased; α -synuclein fibrosis aggregation; Lewy bodies appeared in neurons	病理特征与临床吻合度高, 操作简单 Pathological features are highly consistent with the clinic and the operation is simple	临床百草枯所致帕金森主要是小剂量经口暴露, 实验研究所用腹腔注射大剂量方式与临床不相符 Parkinson's disease caused by paraquat is mainly caused by low-dose oral exposure, and the way of intraperitoneal injection of high-dose in experimental research is not consistent with clinic
	α -synuclein ^[61]	α -synuclein 基因突变 α -synuclein gene mutation	分子结构突变, 形成 α -synuclein 蛋白聚集 Molecular structure mutation, forming α -synuclein protein aggregation.	反应迟钝、四肢震颤, 行为能力丧失 Slow response, limb tremor, loss of behavioral ability	α -synuclein 异常聚集; 路易小体形成 α -synuclein abnormal aggregation; Lewy body formation	模型种类多样, 在猴、果蝇、小鼠、秀丽线虫中过表达均可较好地模拟帕金森 There are many kinds of models, and over-expression in monkeys, fruit flies, mice and Caenorhabditis elegans can simulate Parkinson's disease well	未有黑质、纹状体神经损伤 There was no nerve injury in substantia nigra and striatum
	Parkin/PINK1 ^[39-40]	基因突变 Gene mutation	线粒体功能障碍、氧化损伤 Mitochondrial dysfunction and oxidative damage	运动缺陷 Motion defect	多巴胺能神经元变性、死亡 Dopaminergic neurons degenerated and died	机制多样, 可对帕金森线粒体功能和氧化应激等机制进行研究 There are various mechanisms, which can be used to study the mitochondrial function and oxidative stress of Parkinson's disease	未有多巴胺能神经元变性或纹状体多巴胺水平降低等病理学特征 There were no pathological features such as dopaminergic neuron degeneration or decreased dopamine level in striatum
	LRRK2 ^[41-42]	LRR2 基因敲除 LRR2 gene knockout	影响内质网输出蛋白的调控, 进而影响纹状体中多巴胺在细胞表面的分布 It affects the regulation of endoplasmic reticulum output protein, and then affects the distribution of dopamine on the cell surface in striatum	运动障碍 Dyskinesia	多巴胺含量轻度减少; α -synuclein 异常聚集 Dopamine content decreased slightly; α -synuclein anomaly aggregation	LRR2 敲除小鼠模型显示出年龄依赖性运动障碍, 更符合帕金森的发病规律 LRR2 knockout mouse model shows age-dependent dyskinesia, which is more in line with the pathogenesis of Parkinson's disease	没有明显的多巴胺细胞损失和 α -突触蛋白聚集 There was no obvious loss of dopamine cells and aggregation of α -synuclein

续表 4

类型 Types	模型 Models	造模方法 Modeling methods	造模机制 Modeling mechanism	运动特征 Motion characteristics	病理特征 Pathological features	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
	DJ-1 ^[43-46]	DJ-1 基因敲除 DJ-1 gene knockout	氧化应激反应 功能紊乱 Oxidative stress response dysfunction	运动缺陷 Motion defect	多巴胺能神经 元明显损伤;多 巴胺含量降低 Detail damage Dopaminergic neurons damaged obviously; Dopamine content decreased	DJ-1 敲除后对 神经毒素更敏 感,更利于联合 造模 DJ-1 is more sensitive to neurotoxin after knockout, which is more conducive to joint modeling	小鼠模型多巴胺含 量虽下降,但黑质 致密部中多巴胺能 神经元并未损失 Although the content of DA in mouse model decreased, the DA neurons in substantia nigra compacta were not lost

表 5 模型检测指标
Table 5 Model detection index

动物模型 Animal models	组织病理 Histopathology	生化指标 Biochemical indicator	蛋白质印迹 Western Blot	免疫组化 Immunohisto- chemical	免疫荧光 Immunofluo- rescence	mRNA 指标 mRNA index
MPTP 模型 ^[63-64] MPTP model ^[63-64]	纹状体细胞数量减少,排列疏松,胞核固缩与空泡变性增多;神经元细胞变性坏死,数量明显减少;尼氏小体减少,细胞质染色变浅,细胞核固缩、破裂溶解 Number of striatal cells decreased, the arrangement was loose, nuclear condensation and vacuolar degeneration increased, neurons degenerated and died, and the number decreased obviously; Nissl bodies decreased, cytoplasm staining became shallow, and the nucleus contracted, ruptured and dissolved	炎症因子 IL-1β ↑、TNF-α ↑、IL-18 ↑; 氧化应激指标 SOD ↓、MDA ↑、GSH-Px ↓; 免疫因子 IFN-γ ↓ Inflammatory factor IL-1β ↑, TNF-α ↑, IL-18 ↑; Oxidative stress index SOD ↓, MDA ↑, GSH-Px ↓; Immune factor IFN-γ ↓	炎症相关 IL-1β ↑、TNF-α ↑、NLRP3 ↑、ASC ↑、PKA C-α ↓; 凋亡通路蛋白 Caspase-1 ↑; 铁死亡标志物 GPX4 ↓、FTH1 ↓; Wnt 非经典途径 Wnt5a ↓、β-catenin ↓ Inflammation related IL-1β ↑, TNF-α ↑, NLRP3 ↑, ASC ↑, PKA C-α ↓; Apoptosis pathway protein Caspase-1 ↑; Ferroptosis marker GPX4 ↓, FTH1 ↓; Wnt non-classical approach Wnt5a ↓, β-catenin ↓	酪氨酸羟化酶 ↓; 半胱氨酸天冬氨酸转氨酶 1 ↑; 酪氨酸羟化酶 ↓; 半胱氨酸天冬氨酸转氨酶 1 ↑; Caspase-1 ↑; Microglial activation marker Iba1 ↑	酪氨酸羟化酶 ↓; 半胱氨酸天冬氨酸转氨酶 1 ↑; 酪氨酸羟化酶 ↓; 半胱氨酸天冬氨酸转氨酶 1 ↑; Caspase-1 ↑; Microglial activation marker Iba1 ↑	酪氨酸羟化酶 mRNA ↓; 多巴胺转运体 mRNA ↓; TH mRNA ↓; Dopamine transporter mRNA ↓
6-OHDA 模型 ^[65-66] 6-OHDA model ^[65-66]	脑组织细胞排布紊乱、肿胀,且出现细胞破裂现象;神经元细胞数量减少,胞核固缩,核仁模糊不清,出现空泡化 Brain tissue cells are disordered and swollen, and cell rupture occurs; Number of neurons decreased, nucleus contracted, nucleoli was blurred, vacuolation appeared	炎症因子 TNF-α ↑、IL-1β ↑、IL-6 ↑; 氧化应激指标 GSH ↓、SOD ↓、MDA ↑ Inflammatory factor TNF-α ↑, IL-1β ↑, IL-6 ↑; Oxidative stress index GSH ↓, SOD ↓, MDA ↑	炎症因子 IL-1β ↑、TNF-α ↑、IL-6 ↑、IL-10 ↓; 炎症通路 p-IκBα ↑、NF-κB p65 ↑; 凋亡与内质网应激蛋白 TRPV4 ↑、PERK ↑、CHOP ↑ Inflammatory factor IL-1β ↑, TNF-α ↑, IL-6 ↑, IL-10 ↓; Inflammatory pathway p-IκBα ↑, NF-κB p65 ↑; Apoptosis and endoplasmic reticulum stress protein TRPV4 ↑, PERK ↑, CHOP ↑	-	-	-

续表 5

动物模型 Animal model	组织病理 Histopathology	生化指标 Biochemical indicator	蛋白质印迹 Western Blot	免疫组化 Immunohisto- chemical	免疫荧光 Immunofluo- rescence	mRNA 指标 mRNA index
鱼藤酮 模型 ^[67-68] Rotenone model ^[67-68]	脑组织细胞存在大量破裂、肿胀等异常表现,细胞排列紊乱;DA 能神经元细胞数量明显减少,且排列紊乱,胞体皱缩	炎症因子 IL-3 ↑、TNF-α ↑; 神经递质 5-HT ↓; 氧化应激指标 CAT ↓、AOPP ↑	炎症通路 TLR4 ↑、MyD88 ↑、NF-κB p65 ↑、p-NF-κB p65 ↑、PI3K ↑、mTOR ↓; 凋亡通路 p53 ↑、Bax ↑、Caspase-3 ↑、Bcl-2 ↓		α-突触核蛋白 ↑; 小胶质细胞活化标志 Iba-1 ↑	p53 mRNA ↑; Bax mRNA ↑; Caspase-3 mRNA ↑
	There are a lot of abnormal manifestations such as rupture and swelling in brain tissue cells, and the cells are arranged in disorder; Number of DA neurons is obviously reduced, and the arrangement is disordered, cell body shrinks	Inflammatory factor IL-3 ↑, TNF-α ↑; Neurotransmitter 5-HT ↓; Oxidative stress index CAT ↓, AOPP ↑	Inflammatory pathway TLR4 ↑, MyD88 ↑, NF-κB p65 ↑, p-NF-κB p65 ↑, PI3K ↑, mTOR ↓; Apoptosis pathway p53 ↑, Bax ↑, Caspase-3 ↑, Bcl-2 ↓	酪氨酸羟化酶 ↓ Tyrosine hydroxylase ↓	α-synuclein ↑; Microglial activation marker Iba1 ↑	
百草枯 模型 ^[69-70] Paraquat model ^[69-70]	纹状体区域细胞肿胀破裂,核仁皱缩;神经元细胞固缩减少,排列紊乱	炎症因子 TNF-α ↑、IL-1β ↑、IL-6 ↑、IL-10 ↓; 氧化应激指标 SOD ↓、MDA ↑、CAT ↓、GPx ↓; 线粒体功能指标 ATP ↓	炎症因子 iNOS ↑、IL-1β ↑、HMGB1 ↑; 炎症通路 PI3K ↑、PDK-1 ↑、p-AKT ↑; 神经递质 TGF-β ↓、GDNF ↓; 线粒体融合/分裂蛋白 Mfn2 ↓、Drp1 ↑		酪氨酸羟化酶 ↓; 小胶质细胞活化标志 Iba1 ↑	NF-κB mRNA ↑
	Cells in the striatum area swell and rupture, nucleoli shrink; Neuron cells are reduced in shrinkage, disordered in arrangement	Inflammatory factor TNF-α ↑, IL-1β ↑, IL-6 ↑, IL-10 ↓; Oxidative stress index SOD ↓, MDA ↑, CAT ↓, GPx ↓; Mitochondrial function index ATP ↓	Inflammatory factor iNOS ↑, IL-1β ↑, HMGB1 ↑; Inflammatory pathway PI3K ↑, PDK-1 ↑, p-AKT ↑; Neurotransmitter TGF-β ↓, GDNF ↓; Mitochondrial fusion/division protein Mfn2 ↓, Drp1 ↑	-	Tyrosine hydroxylase ↓; Microglial activation marker Iba1 ↑	

选择 MPTP 模型,针对 Lewy-bodies 进行研究时可选择鱼藤酮模型、百草枯模型或 α-synuclein 转基因模型,对 PD 致病因素进行研究可选择百草枯模型,对 PD 遗传因素进行研究可选择基因工程模型。在对 PD 模型动物进行行为学测试时,应从多方面、多角度对动物模型进行评价。文中综述的行为学实验均有不同的侧重点,实验研究时应根据 PD 模型的运动协调能力、平衡能力、肌张力等进行综合评价,对同一个模型应至少选择两种以上的行为学测试,且两种行为学的指标均趋向 PD 的临床运动症状或至少有一项行为学测试出现显著性变化^[62]。

综上所述,本文对大小鼠 PD 模型行为学测试的实验设备、实验方法、评价指标、注意事项进行了系统性归纳,同时,对常用的 PD 大小鼠模型的造模机制、与 PD 临床特征的吻合情况、优缺点、检测指标进行了总结分析,旨在对 PD 的机制研究、抗 PD 药物的研发提供参考。

参 考 文 献(References)

[1] TOLOSA E, GARRIDO A, SCHOLZ S W, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson’s disease [J]. Lancet Neurol, 2021, 20(5): 385–397.

[2] ASCHERIO A, SCHWARZSCHILD M A. The epidemiology of Parkinson’s disease: risk factors and prevention [J]. Lancet Neurol, 2016, 15(12): 1257–1272.

[3] TYSNES O B, STORSTEIN A. Epidemiology of Parkinson’s disease [J]. J Neural Transm, 2017, 124(8): 901–905.

[4] HALL C S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality [J]. J Comp Psychol, 1934, 18(3): 385–403.

[5] MASINI D, KIEHN O. Targeted activation of midbrain neurons restores locomotor function in mouse models of Parkinsonism [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 504.

[6] BESERRA-FILHO J I A, MARIA-MACÊDO A, SILVA-MARTINS S, et al. Lippia grata essential oil complexed with β-cyclodextrin ameliorates biochemical and behavioral deficits in an animal model of progressive Parkinsonism [J]. Metab Brain Dis,

- 2022, 37(7): 2331–2347.
- [7] WEN J, ZHANG Y Q, LIU D Q, et al. Demethylenetetrahydroberberine protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease [J]. Chin J Nat Med, 2022, 20(2): 111–119.
- [8] ACAR N, PARLAK H, OZKAN A, et al. The effect of docosahexaenoic acid on apelin distribution of nervous system in the experimental mouse model of Parkinson's disease [J]. Tissue Cell, 2019, 56: 41–51.
- [9] RAY A, KAMBALI M, RAVINDRANATH V. Thiol oxidation by diamide leads to dopaminergic degeneration and Parkinsonism phenotype in mice: a model for Parkinson's disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25(5): 252–267.
- [10] BISPO J M M, MELO J E C, GOIS A M, et al. Sex differences in the progressive model of Parkinsonism induced by reserpine in rats [J]. Behav Brain Res, 2019, 363: 23–29.
- [11] OGAWA N, HIROSE Y, OHARA S, et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice [J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1985, 50(3): 435–441.
- [12] BEAUCHAMP L C, LIU X M, VELLA L J, et al. ATH434 rescues pre-motor hyposmia in a mouse model of Parkinsonism [J]. Neurotherapeutics, 2022, 19(6): 1966–1975.
- [13] MARTINEZ P A, MARTINEZ V E, RANI S, et al. Impaired aldehyde detoxification exacerbates motor deficits in an α -synuclein mouse model of Parkinson's disease [J]. Brain Behav, 2023, 13(9): e3150.
- [14] HENG Y, ZHANG Q S, MU Z, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates motor impairment and neuroinflammation in the MPTP-probenecid-induced Parkinsonism mouse model by targeting α -synuclein abnormalities in the substantia nigra [J]. Toxicol Lett, 2016, 243: 7–21.
- [15] 林臻, 陈洪志, 赵航, 等. MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 57–62, 85.
- LIN Z, CHEN H Z, ZHAO H, et al. Preparation and assessment of a C57BL/6 mouse Parkinson's model induced by MPTP [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 57–62, 85.
- [16] EYVARI BROOSHGHALAN S, SABAHI M, EBADI S A, et al. Silibinin chronic treatment in a rat model of Parkinson disease: a comprehensive *in-vivo* evaluation and *in silico* molecular modeling [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 941: 175517.
- [17] NASER A F A, AZIZ W M, AHMED Y R, et al. Parkinsonism-like disease induced by rotenone in rats: treatment role of curcumin, dopamine agonist and adenosine A_{2A} receptor antagonist [J]. Curr Aging Sci, 2022, 15(1): 65–76.
- [18] DUNHAM N W, MIYA T S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice [J]. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc, 1957, 46(3): 208–209.
- [19] JONES B J, ROBERTS D J. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod [J]. J Pharm Pharmacol, 1968, 20(4): 302–304.
- [20] INOUE N, OGURA S, KASAI A, et al. Knockdown of the mitochondria-localized protein p13 protects against experimental Parkinsonism [J]. EMBO Rep, 2018, 19(3): e44860.
- [21] LI M, WANG K, SU W T, et al. Effects of electroacupuncture on metabolic changes in motor cortex and *Striatum* of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(9): 701–708.
- [22] MOHAMMAD H M F, EL-BAZ A A, MAHMOUD O M, et al. Protective effects of evening primrose oil on behavioral activities, nigral microglia and histopathological changes in a rat model of rotenone-induced Parkinsonism [J]. J Chem Neuroanat, 2023, 127: 102206.
- [23] KUMARI M, RAMDAS P, RADHAKRISHNAN A K, et al. Tocotrienols ameliorate neurodegeneration and motor deficits in the 6-OHDA-induced rat model of Parkinsonism: behavioural and immunohistochemistry analysis [J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1583.
- [24] 刘新民, 陈善广, 秦川. 动物行为实验方法学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社; 2023.
- LIU X M, CHEN S G, QIN C. Experimental methodology based on animal behaviour research [M]. Beijing: China Light Industry Press; 2023.
- [25] HAGHDOST-YAZDI H, SAROOKHANI M, FARAJ A, et al. Evaluation of the association between blood homocysteine concentration and the degree of behavioral symptoms in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2014, 124: 297–304.
- [26] CHIBA K, TREVOR A, CASTAGNOLI N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984, 120(2): 574–578.
- [27] 周甜甜, 张秋双, 陈颖, 等. 天麻联苳化合物 20C 对 MPTP/p 诱导帕金森小鼠模型的作用及机制 [J]. 中国药物警戒, 2020, 17(11): 753–757, 772.
- ZHOU T T, ZHANG Q S, CHEN Y, et al. Effects of bibenzyl Compound(20C) from *Gastrodia elata* on MPTP/p-induced mice and mechanism [J]. Chin J Pharmacovigil, 2020, 17(11): 753–757, 772.
- [28] KIN K, YASUHARA T, KAMEDA M, et al. Animal models for Parkinson's disease research: trends in the 2000s [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5402.
- [29] BIAN M, LIU J, HONG X, et al. Overexpression of parkin ameliorates dopaminergic neurodegeneration induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in mice [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39953.
- [30] FRANCARDO V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options [J]. Behav Brain Res, 2018, 352: 142–150.
- [31] LITVAN I, HALLIDAY G, HALLETT M, et al. The etiopathogenesis of Parkinson disease and suggestions for future research. Part I [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2007, 66(4): 251–257.
- [32] MATHEUS F C, RIAL D, REAL J I, et al. Decreased synaptic

- plasticity in the medial prefrontal cortex underlies short-term memory deficits in 6-OHDA-lesioned rats [J]. Behav Brain Res, 2016, 301: 43–54.
- [33] BISBAL M, SANCHEZ M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(5): 762–766.
- [34] PRASAD K, WINNIK B, THIRUCHELVAM M J, et al. Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(10): 1448–1453.
- [35] LI X, YIN J, CHENG C M, et al. Paraquat induces selective dopaminergic nigrostriatal degeneration in aging C57BL/6 mice [J]. Chin Med J, 2005, 118(16): 1357–1361.
- [36] 张宝馥, 王楷栋, 张冰洋, 等. 百草枯引起神经元 α -突触核蛋白寡聚化并向细胞核易位的时间依赖性研究 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(2): 193–199.
- ZHANG B F, WANG K D, ZHANG B Y, et al. Temporal dependence of neuronal alpha-synuclein oligomerization and nuclear translocation induced by paraquat. [J]. J Environment Occupat Med, 2022, 39(2): 193–199.
- [37] BHURTEL S, KATILA N, SRIVASTAV S, et al. Mechanistic comparison between MPTP and rotenone neurotoxicity in mice [J]. Neurotoxicology, 2019, 71: 113–121.
- [38] DETTMER U, NEWMAN A J, LUTH E S, et al. *In vivo* cross-linking reveals principally oligomeric forms of α -synuclein and β -synuclein in neurons and non-neural cells [J]. J Biol Chem, 2013, 288(9): 6371–6385.
- [39] MOISOI N, FEDELE V, EDWARDS J, et al. Loss of PINK1 enhances neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease triggered by mitochondrial stress [J]. Neuropharmacology, 2014, 77: 350–357.
- [40] ZHANG R, JIANG W, WANG G, et al. Parkin inhibits proliferation and migration of bladder cancer via ubiquitinating Catalase [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 245.
- [41] LI Y, LIU W, OOT F, et al. Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(7): 826–828.
- [42] PELLEGRINI L, HAUSER D N, LI Y, et al. Proteomic analysis reveals co-ordinated alterations in protein synthesis and degradation pathways in LRRK2 knockout mice [J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(18): 3257–3271.
- [43] 张秩荻, 张迎宏, 马芙蓉, 等. DJ-1 蛋白在帕金森病嗅觉障碍中作用研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(23): 5881–5885.
- ZHANG Z D, ZHANG Y H, MA F R, et al. Research progress on the role of DJ-1 protein in olfactory dysfunction of Parkinson's disease [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(23): 5881–5885.
- [44] HAUSER D N, PRIMIANI C T, LANGSTON R G, et al. The polg mutator phenotype does not cause dopaminergic neurodegeneration in DJ-1-deficient mice [J]. eNeuro, 2015, 2(1): 75.
- [45] DAVE K D, SILVA S D, SHETH N P, et al. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease [J]. Neurobiol Dis, 2014, 70: 190–203.
- [46] 王华林, 刘冉, 纪文亮, 等. DJ-1 在运动改善 PD 行为功能障碍中的作用研究进展 [J]. 生命科学, 2022, 34(2): 197–202.
- WANG H L, LIU R, JI W L, et al. Research progress on the role of DJ-1 in regulating PD behavioral dysfunction by exercise [J]. Chin Bull Life Sci, 2022, 34(2): 197–202.
- [47] 陈世坚, 李舸, 张钰, 等. MPTP 诱导帕金森病小鼠亚急性与慢性模型的比较及评价 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8): 1247–1252.
- CHEN S J, LI G, ZHANG Y, et al. Comparison and evaluation of MPTP-induced subacute and chronic models of Parkinson's disease in mice [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(8): 1247–1252.
- [48] HU M, LI F, WANG W. Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 565–573.
- [49] JANG Y, KWON I, SONG W, et al. Modulation of mitochondrial phenotypes by endurance exercise contributes to neuroprotection against a MPTP-induced animal model of PD [J]. Life Sci, 2018, 209: 455–465.
- [50] MOCHIZUKI H, GOTO K, MORI H, et al. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease [J]. J Neurol Sci, 1996, 137(2): 120–123.
- [51] ELSAYED M H, ATIF H M, ELADL M A, et al. Betanin improves motor function and alleviates experimental Parkinsonism via downregulation of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway: Molecular docking and biological investigations [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 164: 114917.
- [52] RODRÍGUEZ M, BARROSO-CHINEA P, ABDALA P, et al. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 2001, 169(1): 163–181.
- [53] HERNANDEZ-BALTAR D, ZAVALA-FLORES L M, VILLANUEVA-OLIVO A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model [J]. Neurologia, 2017, 32(8): 533–539.
- [54] 王孟迪, 张秋梅, 范蓓, 等. 基于文献数据库的 6-OHDA 帕金森病大鼠模型特点分析及在中药研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 93–102.
- WANG M D, ZHANG Q M, FAN B, et al. Analysis on the characteristics of 6-OHDA induced rat model of Parkinson's disease based on literature data base and the application in the study of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 93–102.
- [55] WANG Y, LIU W, YANG J, et al. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish [J]. Neurotoxicology, 2017, 58: 103–109.

[56] INDEN M, KITAMURA Y, ABE M, et al. Parkinsonian rotenone mouse model; reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(1): 92-96.

[57] 毛美玲, 关银瑞, 闫咏梅, 等. 鱼藤酮致帕金森病模型的最佳造模方法探讨 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(9): 1611-1616.

MAO M L, GUAN Y R, YAN Y M, et al. Discussion on the best modeling method of Parkinson's disease model induced by rotenone [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2022, 20(9): 1611-1616.

[58] MANNING-BOG A B, MCCORMACK A L, LI J, et al. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice; paraquat and alpha-synuclein [J]. J Biol Chem, 2002, 277(3): 1641-1644.

[59] CHENG Y H, CHOU W C, YANG Y F, et al. PBPK/PD assessment for Parkinson's disease risk posed by airborne pesticide paraquat exposure [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(6): 5359-5368.

[60] 刘哲川, 李坤, 马帅男, 等. 利拉鲁肽对百草枯诱导的小鼠帕金森病模型炎症及线粒体融合/分裂的影响 [J]. 解剖学报, 2023, 54(6): 676-681.

LIU Z C, LI K, MA S N, et al. Effects of liraglutide on inflammation and mitochondrial fusion/division in Parkinson's disease model of mice induced by paraquat [J]. Acta Anat Sin, 2023, 54(6): 676-681.

[61] SEN A, KALVAKURI S, BODMER R, et al. Clueless, a protein required for mitochondrial function, interacts with the PINK1-Parkin complex in *Drosophila* [J]. Dis Model Mech, 2015, 8(6): 577-589.

[62] 姜宁, 张亦文, 姚彩虹, 等. 大小鼠抑郁行为实验方法概述 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 830-838.

JIANG N, ZHANG Y W, YAO C H, et al. Overview of animal behavioral tests of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 830-838.

[63] 张新宁, 陈志刚, 陈路, 等. 补肾益髓方对帕金森病模型小鼠脑组织 NLRP3 炎症小体激活相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2023, 64(1): 71-76.

ZHANG X N, CHEN Z G, CHEN L, et al. Effect of Bushen yisui formula on the expression of NLRP3 inflammasome activation-related protein in the brain tissue in Parkinson's disease model mice [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(1): 71-76.

[64] 刘柯婷, 陈缤彬, 税玉莲, 等. 外源性 H₂S 对帕金森病模型小鼠神经保护作用及其对基质金属蛋白酶 9 和 Caspase-1 表达的影响 [J]. 解剖学报, 2023, 54(3): 289-295.

LIU K T, CHEN B B, SHUI Y L, et al. Neuroprotective effect of exogenous hydrogen sulfide and the expression of matrix metalloproteinases-9 and Caspase-1 in mice model of Parkinson's disease [J]. Acta Anat Sin, 2023, 54(3): 289-295.

[65] 孙伟, 吴春明, 刘张, 等. 6-羟基多巴胺损毁单侧内侧前脑束和单侧纹状体的帕金森大鼠模型早期和晚期行为学 [J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(2): 120-125.

SUN W, WU C M, LIU Z, et al. Behavior at early and later stages after unilateral medial forebrain bundle and striatal lesions induced by 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson disease [J]. J China Med Univ, 2023, 52(2): 120-125.

[66] 徐利, 李莹莹, 张锦军, 等. 毛钩藤碱对 6-羟基多巴胺诱导的帕金森病模型大鼠神经保护作用及机制研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(5): 613-619.

XU L, LI Y Y, ZHANG J J, et al. Neuroprotective effect and mechanism of hirsutine on 6-hydroxydopamine induced Parkinson's disease model in rats [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2023, 40(5): 613-619.

[67] 才昊, 栾梅, 赵德福. 沉默 miR-331-5p 对帕金森病模型大鼠的干预效果及作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(1): 192-195.

CAI H, LUAN M, ZHAO D F. Intervention effect and mechanism of silent miR-331-5p on Parkinson's disease model rats [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(1): 192-195.

[68] 崔拓拓, 曹俊岭, 欧阳竞锋, 等. 大定风珠对帕金森病模型小鼠脑黑质小胶质细胞活化及 TLR4/MyD88/NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2023, 64(9): 930-938.

CUI T T, CAO J L, OUYANG J F, et al. Effect and dadingfengzhu pill on the activation of microglial cells in the substantia nigra and TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in Parkinson's disease model mice [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(9): 930-938.

[69] WANG K, ZHANG B, TIAN T, et al. Taurine protects dopaminergic neurons in paraquat-induced Parkinson's disease mouse model through PI3K/Akt signaling pathways [J]. Amino Acids, 2022, 54(1): 1-11.

[70] FATHY S M, EL-DASH H A, SAID N I. Neuroprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice and seed extract in paraquat-induced mouse model of Parkinson's disease [J]. BMC Complementary Med Ther, 2021, 21(1): 130.

[收稿日期] 2023-11-23