

陈修保,徐飞,尹曦,等. 当归多糖对再生障碍性贫血小鼠骨髓 Th17/Treg 细胞平衡及相关炎症因子蛋白表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 1-9.

Chen XB, Xu F, Yin X, et al. Effect of *Angelica* polysaccharides on Th17/T-regulatory cell balance and expression of related inflammatory factor proteins in bone marrow of mice with aplastic anemia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.001

当归多糖对再生障碍性贫血小鼠骨髓 Th17/Treg 细胞平衡及相关炎症因子蛋白表达的影响

陈修保^{1,2}, 徐飞^{1,2}, 尹曦², 陈维达², 崔兴^{1,3}, 刘秀娟^{1,2*}, 陈泽涛^{1,2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250014;

3. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001)

【摘要】 目的 探究当归多糖 (*Angelica* polysaccharide, APS) 对再生障碍性贫血 (aplastic anemia, AA) 小鼠骨髓 Th17/Treg 细胞平衡及相关炎症因子蛋白表达的影响。方法 50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、环孢素 A 组、APS 低、高剂量组, 利用射线照射联合异源淋巴细胞输注的方法制备再生障碍性贫血小鼠模型。建模后灌胃给药 28 d, 观察小鼠一般情况、体重变化、脾指数, 检测外周血基本血液学参数变化, HE 染色评价小鼠骨髓组织病理变化; ELSIA 法检测骨髓 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 等蛋白表达水平; FCM 检测骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化。结果 与正常组相比, 模型组小鼠活动笨拙, 精神萎靡, 眼睑唇色耳廓颜色苍白, 进食饮水量减少; 体重及脾指数均明显下降; 外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显降低; 骨髓组织结构紊乱, 造血组织增生度明显减低; IL-17A、IL-6 蛋白表达明显上调, TGF- β 1、IL-10 蛋白表达明显下调; 骨髓 Th17 细胞比例明显增高, Treg 细胞比例明显降低, Th17/Treg 细胞比值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, APS 低、高剂量组一般状况均改善, 进食量及饮水量增加, 体重、脾指数明显升高, 外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度明显升高 ($P < 0.05$), 骨髓组织结构改善, 造血组织增生度升高 ($P < 0.05$); IL-17A、IL-6 蛋白表达明显下调, TGF- β 1、IL-10 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 骨髓 Th17 细胞比例明显降低, Treg 细胞比例明显升高, Th17/Treg 细胞比值显著下降 ($P < 0.01$)。结论 当归多糖能改善 AA 小鼠骨髓造血功能, 其机制可能是通过调节 Th17/Treg 细胞平衡来实现。

【关键词】 当归多糖; Th17/Treg; 炎症因子; 再生障碍性贫血; 当归补血汤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0001-09

Effect of *Angelica* polysaccharides on Th17/T-regulatory cell balance and expression of related inflammatory factor proteins in bone marrow of mice with aplastic anemia

CHEN Xiubao^{1,2}, XU Fei^{1,2}, YIN Xi², CHEN Weida², CUI Xing^{1,3}, LIU Xiujuan^{1,2*}, CHEN Zetao^{1,2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.

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

3. the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001)

【基金项目】 国家自然科学基金 (82305142); 山东省自然科学基金 (ZR2020MH354)。

【作者简介】 陈修保 (1987—), 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 肿瘤血液及老年病研究。E-mail: chen_xiubao@163.com

【通信作者】 陈泽涛 (1961—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤血液及老年病研究。E-mail: zetaochen2004@163.com

刘秀娟 (1987—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 心血管、代谢疾病研究。E-mail: juan.081@163.com * 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate the effect of *Angelica* polysaccharides on the balance of Th17/T-regulatory (Treg) cells and the expression of related inflammatory factor proteins in the bone marrow of mice with aplastic anemia. **Methods** 50 male BALB/c mice were randomly divided into a normal group, model group, cyclosporine A (CsA) group, and angelica polysaccharide low-(APS-L) and high-dose(APS-H) groups. A mouse model of aplastic anemia was prepared by combining irradiation with allogeneic lymphocyte infusion. After modeling, the mice were orally administered with corresponding drugs for 28 days. The general condition, weight changes, and spleen index of the mice were observed. Blood samples were taken to test for changes in basic hematological parameters of peripheral blood, and hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the pathological changes in mouse bone marrow tissue. An ELISA method was applied to detect bone marrow TGF- β 1. The expression levels of proteins such as IL-10, IL-17A, and IL-6 were analyzed, and flow cytometry was used in detecting the bone marrow Th17/Treg cell ratio. **Results** Compared with the normal group, the model group mice showed clumsiness during activity; lethargy; pale eyelids, lips, and ears; and reduced food and water intake. Both body weight and spleen index were significantly decreased. Peripheral red blood cell, white blood cell, and platelet counts and hemoglobin concentration were significantly reduced. A disordered bone marrow tissue structure and significantly reduced proliferation of hematopoietic tissue were seen. The expression of IL-17A and IL-6 proteins was significantly upregulated, and the expression of TGF- β 1 and IL-10 protein was significantly downregulated. The proportion of Th17 cells in bone marrow significantly increased, the proportion of Treg cells significantly decreased, and the ratio of Th17/Treg cells significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the general condition of the APS-L and APS-H groups improved, showing an increase in food and water intake; a significant increase in body weight and spleen index; a significant increase in peripheral red blood cells, white blood cells, platelets, and hemoglobin concentration ($P < 0.05$); an improvement in bone marrow tissue structure; and an increase in hematopoietic tissue proliferation ($P < 0.05$). The expression of IL-17A and IL-6 proteins was significantly downregulated. The expression of TGF- β 1 and IL-10 protein was significantly upregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The proportion of Th17 cells in bone marrow significantly decreased, the proportion of Treg cells significantly increased, and the ratio of Th17/Treg cells significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** *Angelica* polysaccharides can improve bone marrow hematopoietic function in aplastic anemia mice, and its mechanism of action may include the regulation of Th17/Treg cell balance.

[Keywords] *Angelica* polysaccharide; Th17/Treg; inflammatory factors; aplastic anemia; Danggui Buxue Tang

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

再生障碍性贫血,简称再障,是一种免疫功能异常引起的常见血液系统疾病,以骨髓造血功能衰竭为主要病理特征,临床主要表现为贫血、感染、出血等一系列症状。近些年本病发病率逐年升高,给患者生活质量造成了极大的影响,严重威胁着人们的身心健康。在机体细胞免疫系统中,T淋巴细胞发挥极其重要的作用,分泌产生诸多炎性因子,而且不同种类的T细胞分泌不同类别的炎性因子,发挥不同的免疫功能,形成机体内复杂的细胞因子相互作用网络系统^[1]。研究表明,再障患者的骨髓组织中存在TGF- β 1、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 等多种炎性因子水平紊乱,其发病与T淋巴细胞免疫功能异常密切相关^[2]。根据作用功能的不同,T淋巴细胞可分成效应T细胞、抑制性T细胞等许多不同亚群,辅助性T淋巴细胞(Th)、调节性T淋巴细胞(Treg)是其中数量较少的一部分,其作用却不可忽视。Th17/Treg细胞平衡与机体免疫应答及炎症反应等诸多生理病理过程关系密切,在再障疾病过程

中发挥着显著的作用^[3]。

中医药治疗再障历史悠久,治疗方法众多,中医特色突出,临床疗效显著,且有少见不良反应发生、患者依从性更好、治疗费用经济等诸多优势。当归补血汤是中医补气养血的经典名方,在再障的治疗中占有重要地位,而且临床疗效确切^[4]。课题组前期的研究为当归补血汤治疗再障的提供了基础药理作用的证据支持^[5],但对于其如何发挥治疗作用及确切有效成分仍需进一步探究。当归多糖(*Angelica* polysaccharides, APS)作为当归补血汤中当归的重要活性成分,具有调节免疫功能、保护血管内皮、抗氧化、缓解炎症、抗凋亡、控制肿瘤发展、抗应激等多重药理作用。实验研究表明当归提取物^[6]可通过调节Th17/Treg平衡,提高TGF- β /IL-17比值从而改善哮喘阴虚证小鼠肺组织炎症浸润情况。系统评价研究发现当归是通过干预Th17/Treg平衡治疗免疫介导的炎症性疾病的关键药物^[7]。

本研究旨在通过免疫介导的方法建立小鼠再障模型,观察 APS 对小鼠外周血基本血液学参数、骨髓组织病理变化影响;通过 ELSIA 法检测骨髓 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 等蛋白表达水平;FCM 检测骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化。探讨 APS 治疗再障的可能作用机制,为其治疗再障提供理论基础和药理学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 只 SPF 级雄性 DBA/2 健康小鼠,8 周龄,体重 18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006];50 只 SPF 级雄性 BALB/c 健康小鼠,8 周龄,体重 18~22 g,购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司[SCXK(鲁)2022-0006]。小鼠饲养于山东中医药大学附属医院动物实验中心[SYXK(鲁)2023-0031],温度控制在 20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度 45%~50%。本实验研究通过山东中医药大学附属医院动物伦理委员会伦理审查(AWE2019053),本实验全过程遵守动物实验 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

当归多糖(100 mg, HPLC \geq 95%, 货号 TDT006),购自上海融禾医药科技发展有限公司;环孢素 A 软胶囊(25 mg, 国药准字 H10960122),购自杭州中美华东制药有限公司;小鼠白介素 17A、小鼠白介素 6、小鼠转化生长因子 β 1、小鼠白介素 10 酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号 E-EL-M0047c、E-EL-M0044c、E-EL-0162c、E-EL-M0046c);FITC 抗小鼠 CD4 抗体、APC 抗小鼠 CD25 抗体、PE 抗小鼠 FOXP3 抗体、PE 抗小鼠 IL-17 抗体(美国 BioLegend 公司,货号 100509、102012、126404、506904);小鼠淋巴细胞分离液试剂盒(北京 Solarbio 公司,货号 P6040);固定破膜试剂盒(美国 BD 公司,货号 554714)。

HEMAVET 950FS 动物血细胞分析仪购自北京冠远科技有限公司;CX41 光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;Multiskan SkyHigh 多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;BD FACS VerseTM 流式细胞仪购自美国 BD 公司;F3000 荧光光谱仪购自日本 HITACHI 公司;LAT-Q9GM 小鼠尾静脉注射显像仪购自北京莱艾特科技发展有限公司;MICROMAX RF 高速低温离心机购自美国 Thermo

Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组给药

采用⁶⁰Co- γ 射线照射联合异源 DBA/2 小鼠淋巴细胞输注的方法^[8]建立再障动物模型。①异源淋巴细胞单细胞悬液制备:DBA/2 小鼠 8 只,75%乙醇消毒,处死后摘取胸腺、颈部、腋窝等处淋巴结,收集淋巴结组织,迅速剪碎,PBS 溶液冲洗,轻轻研磨至微细,200 目细胞筛网过滤,PBS 溶液重悬,调整成浓度为 5×10^9 /L 的淋巴细胞单细胞悬液,冷藏备用。②⁶⁰Co- γ 射线辐照:50 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、环孢素 A 组、APS 低(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量组。各组小鼠经⁶⁰Co- γ 射线(剂量 3.5 Gy)全身一次性均匀照射;正常组采用铅砖屏蔽照射。③异源淋巴细胞输注:BALB/c 小鼠照射后,经尾静脉注射输入淋巴细胞 PBS 悬液 0.2 mL;正常组小鼠经尾静脉注射等体积 PBS 溶液。模型建立次日开始治疗干预:APS 低(100 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量组每天灌胃当归多糖生理盐水溶液,剂量分别为 100 mg/kg、200 mg/kg;环孢素 A 组每天灌胃环孢素 A 生理盐水溶液,剂量为 25 mg/kg;正常组、模型组每天灌胃等体积生理盐水溶液;灌胃体积均为 10 mL/kg,每天 1 次,连续 28 d。治疗结束,禁食不禁水,次日取材。

1.3.2 一般状况、脾指数

观察小鼠精神状态、活动变化,唇色、耳廓、眼睑等颜色变化,饮水进食量及死亡情况。称量小鼠体重,每 3 d 1 次;实验结束称量小鼠体重,处死小鼠后剥离脾,称重,测算脾指数(脾指数 = 脾重量/mg/(小鼠体重/g \times 10))。

1.3.3 外周血基本血液参数

小鼠采血后迅速经血细胞分析仪检测外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度等外周血基本血液参数。

1.3.4 股骨组织病理学检测

分离小鼠股骨,4%多聚甲醛固定液固定 48 h,脱钙脱水,石蜡包埋,4 μ m 切片,HE 染色,显微镜下观察骨髓组织病理变化,计算骨髓造血组织增生度(造血组织增生度 = 造血组织面积/(造血组织面积 + 非造血组织面积) \times 100%)。

1.3.5 骨髓 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 蛋白表达

取小鼠骨髓置入研钵中,倒入液氮并研磨,加入 RIPA 裂解液,电动匀浆,置入超声波细胞粉碎

机,冰上超声 20 min;移入离心机,10 000 r/min,4 °C 离心,10 min。各组样本经荧光光谱仪检测蛋白浓度。按照 TGF- β 1、IL-10、IL-17A、IL-6 等 ELISA 检测试剂盒说明书检测流程,分别测定各组样本中相应蛋白表达水平。

1.3.6 骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡变化

取小鼠骨髓置于 200 目细胞筛网中,轻轻研磨,PBS 缓冲液反复冲洗,分别收集冲洗液至离心管中,4 °C 离心,去上清。细胞沉淀经 PBS 缓冲液重悬,加入红细胞裂解液裂解红细胞,再次 4 °C 离心,去上清,所得细胞沉淀再经 PBS 缓冲液重悬,调整细胞浓度至 1×10^7 /mL,得到单细胞悬液。取单细胞悬液 100 μ L 置于流式管中,5% CO₂ 37 °C 细胞培养箱,培养 4 h。根据流式抗体试剂盒说明书,加入抗体,4 °C 避光,孵育 40 min,离心,固定破膜;4 °C 避光孵育,30 min;按照检测流程,再依次加入相应抗体,4 °C,避光孵育 40 min。各标本经 PBS 溶液洗涤,流式染色缓冲液重悬细胞。标本上机检测 Th17 和

Treg 细胞比例,分析 Th17/Treg 细胞平衡变化情况。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件,计量数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学差异比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况、脾指数比较

正常组小鼠活动灵活,毛发亮泽;模型组小鼠动作笨拙,活动减少,精神萎靡,毛发蓬乱、缺乏光泽,眼睑、唇色、耳廓颜色苍白,进食饮水量减少。与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组小鼠精神状态、毛发蓬乱及光泽度均好转,活动量增加,进食量饮水量均改善,耳廓、眼睑、唇色转红润,以 APS 高剂量组效果改善最好。实验过程中各组小鼠均无死亡。

如图 1 和表 1 所示,与正常组相比,造模后除正常组外各组小鼠体重均有不同程度的下降,模型组

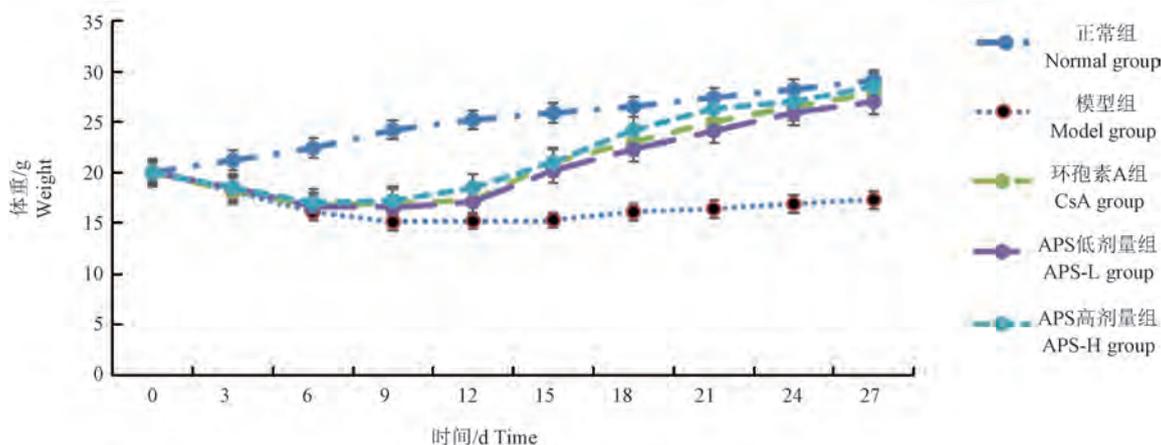


图 1 当归多糖对再障小鼠体重变化的影响($n=10$)

Figure 1 Effect of APS on weight in AA mice

表 1 当归多糖对再障小鼠体重、脾指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of APS on weight and spleen index in AA mice

组别 Groups	体重/g Weight	脾指数/(mg/g) Spleen index
正常组 Normal group	29.12 \pm 2.51	3.80 \pm 0.46
模型组 Model group	17.23 \pm 2.03 [#]	2.14 \pm 0.31 [#]
环孢素 A 组 CsA group	27.64 \pm 2.37 [*]	3.25 \pm 0.29 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	26.39 \pm 2.60 [*]	3.22 \pm 0.31 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	28.68 \pm 2.52 [*]	3.65 \pm 0.36 [*]

注:与正常组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$.

体重下降最明显;APS 低剂量组小鼠体重数值于第 12 天开始上升,高剂量组、环孢素 A 组于第 9 天开始上升;与模型组相比,实验结束环孢素 A 组、APS 低、高剂量组小鼠体重、脾指数均有明显升高($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠外周血基本血液参数的比较

模型组外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度与正常组相比,均明显降低($P < 0.05$)。与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋

白浓度均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

2.3 各组小鼠骨髓组织病理学的比较

正常组小鼠骨髓组织结构完整、细胞排列均

匀,未见异常变化,造血细胞数量丰富;模型组小鼠骨髓组织结构破坏、细胞排列紊乱,可见有核细胞数量明显减少,骨髓造血组织增生度明显减低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,APS 低剂量组紊乱的造血

表 2 当归多糖对再障小鼠外周血基本血液参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of APS on basic blood parameters of peripheral blood in AA mice

组别 Groups	红细胞/ $(\times 10^{12}/L)$ Red blood cell	白细胞/ $(\times 10^9/L)$ White blood cell	血小板/ $(\times 10^9/L)$ Platelet	血红蛋白/ (g/L) Hemoglobin
正常组 Normal group	10.03±0.84	6.31±0.54	1750±105	165.2±13.2
模型组 Model group	3.16±0.37 [#]	2.15±0.32 [#]	912±87 [#]	91.3±9.4 [#]
环孢素 A 组 CsA group	6.94±0.49 [*]	4.98±0.51 [*]	1473±101 [*]	130.6±12.0 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	6.38±0.71 [*]	4.92±0.53 [*]	1435±99 [*]	122.5±11.9 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	8.66±0.75 ^{**}	5.47±0.55 ^{**}	1629±112 ^{**}	138.6±12.7 [*]

注:与正常组相比, [#] $P < 0.05$;与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

组织结构可见修复,视野空白区域面积缩小,骨髓造血组织增生度较前改善;环孢素 A 组、APS 高剂量组骨髓组织结构修复明显紧密,造血细胞数量明显丰富,测算骨髓造血组织增生度明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3,图 2。

2.4 各组小鼠骨髓 TGF-β1、IL-10、IL-17A 和 IL-6 蛋白表达水平的比较

如表 4 所示,与正常组相比,模型组小鼠骨髓中 IL-17A、IL-6 蛋白的表达明显上调, TGF-β1、IL-10 蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$);与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组 IL-17A、IL-6 蛋白的表达明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), TGF-β1、IL-10 蛋

表 3 当归多糖对再障小鼠骨髓造血组织增生度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of APS on hyperplasia of bone marrow hematopoietic tissue in AA mice

组别 Groups	骨髓造血组织增生度/% Proliferation degree of medullary hematopoiesis
正常组 Normal group	90.23±6.17
模型组 Model group	41.48±5.02 [#]
环孢素 A 组 CsA group	71.70±6.49 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	68.59±6.96 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	77.40±7.05 [*]

注:与正常组相比, [#] $P < 0.05$;与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$.

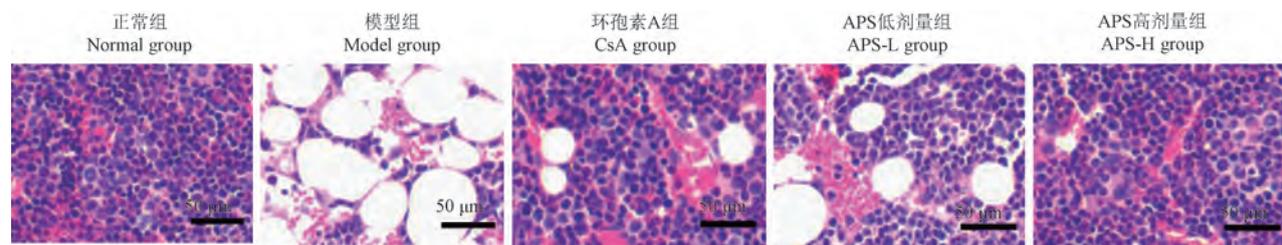


图 2 当归多糖对再障小鼠骨髓组织病理的影响

Figure 2 Effect of APS on bone marrow tissue pathology in AA mice

表 4 当归多糖对再障小鼠 TGF-β1、IL-10、IL-17A 和 IL-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of APS on protein expression of TGF-β1, IL-10, IL-17A and IL-6 in AA mice

组别 Groups	TGF-β1/ (pg/mL)	IL-10/ (pg/mL)	IL-17A/ (pg/mL)	IL-6/ (pg/mL)
正常组 Normal group	8.31±0.92	75.68±6.33	35.71±2.72	110.35±9.47
模型组 Model group	3.52±0.37 [#]	47.82±5.61 [#]	94.28±8.62 [#]	190.29±18.38 [#]
环孢素 A 组 CsA group	7.28±0.61 [*]	68.39±6.03 [*]	42.50±3.79 [*]	141.17±13.92 [*]
APS 低剂量组 APS-L group	7.15±0.69 [*]	70.52±6.84 [*]	46.92±4.27 [*]	136.14±12.75 [*]
APS 高剂量组 APS-H group	7.84±0.75 ^{**}	76.37±6.69 [*]	39.40±2.93 ^{**}	125.08±11.69 [*]

注:与正常组相比, [#] $P < 0.05$;与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

白的表达明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡的比较

FCM 检测显示,与正常组相比,模型组小鼠骨髓中 Th17 细胞比例明显增高 ($P < 0.05$),Treg 细胞比例明显降低 ($P < 0.05$),Th17/Treg 细胞比值显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,环孢素 A 组、APS 低、高剂量组骨髓中 Th17 细胞比例明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Treg 细胞比例明显增高 ($P < 0.05$),Th17/Treg 细胞比值显著下降 ($P < 0.01$)。见表 5,图 3。

表 5 当归多糖对再障小鼠骨髓 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 细胞平衡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of APS on ratio of Th17 and Treg, Th17/Treg in AA mice

组别 Groups	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
正常组 Normal group	13.05±1.37	9.16±0.91	1.85±0.23
模型组 Model group	23.12±3.09 [#]	4.22±0.39 [#]	6.76±0.52 ^{##}
环孢素 A 组 CsA group	17.54±2.11 [*]	7.37±0.48 [*]	2.35±0.25 ^{**}
APS 低剂量组 APS-L group	18.08±1.90 [*]	6.35±0.62 ^{**}	2.85±0.26 ^{**}
APS 高剂量组 APS-H group	15.53±1.84 ^{**}	8.14±0.71 [*]	1.91±0.24 ^{**}

注:与正常组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

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

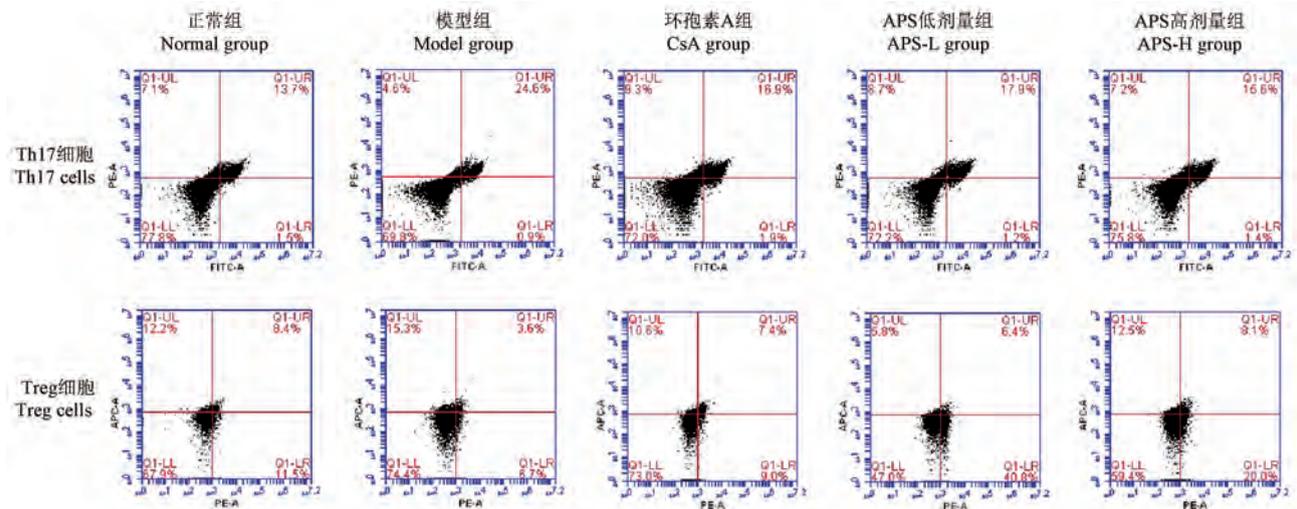


图 3 当归多糖对再障小鼠骨髓 Th17 和 Treg 细胞比例的影响

Figure 3 Effect of APS on ratio of Th17 and Treg cells in bone marrow in AA mice

3 讨论

再生障碍性贫血是一种临床常见的血液系统疾病,以骨髓造血功能衰竭为主要特征,主要表现为全血细胞减少、贫血、感染、出血等一系列症状。本病病程长,病情容易反复,增加了临床治疗难度,严重影响患者生活质量。对症支持治疗、激素治疗、免疫抑制剂、造血干细胞移植等是本病的主要治疗措施,然而临床治疗疗效欠佳,而且治疗费用较高^[9]。再障属于中医学“髓劳”“虚劳”“血癆”等疾病范畴,中医基本病机在于脾肾亏虚、气血不足^[10]。当归补血汤是中医补气养血的经典名方,功可“补气健脾,养血活血”,能够改善骨髓造血功能、纠正贫血状态、调节机体免疫功能紊乱^[11-12]。当归有“补血圣药”之称,是当归补血汤的关键组成药物,具有补血活血、养阴润燥、调经止痛、润肠通便

的功效,用于治疗血虚诸证、心悸、眩晕、虚寒腹痛、月经不调、风寒湿痹等疾病。当归多糖是当归主要活性成分之一,具有改善造血功能、调节免疫功能、抗氧化应激、抑制肿瘤、抑制炎症反应、镇痛、保护肝肾功能等多重药理作用^[13],作为天然植物当归的有效提取物,其具有安全性高、毒副作用小等诸多优点^[14]。研究发现当归多糖可升高免疫抑制小鼠免疫球蛋白 IgG、IgM 水平以及 T 细胞亚群水平,增强体液免疫和细胞免疫功能^[15-16]。Nai 等^[17]及 Mu 等^[18]的研究证实当归多糖可促进 T 细胞、B 细胞及自然杀伤细胞增殖,促进一氧化氮和肿瘤坏死因子 α 的产生,调节免疫系统功能。当归多糖可通过提高 HIF-2 α 蛋白的表达,减少核因子 κ B 和 GATA2 以及促炎细胞因子的表达,增加 CKD 大鼠骨髓源性单核细胞 Bcl-2/Bax 比例,刺激促红细胞生成素生成而纠正大鼠造血功能衰竭^[19-20]。当归多糖可促

进 T 细胞增殖,增强外周血细胞 CD4⁺ 细胞百分比和 CD4⁺/CD8⁺ 比率,改善白血病小鼠病毒感染引起的胸腺/体重指数降低,调节 Th1 和 Th2 相关细胞因子表达^[21]。当归多糖还通过激活参与非特异性免疫的自然杀伤细胞、巨噬细胞,影响辅助性 T 细胞相关细胞因子的表达,促进脾细胞、巨噬细胞和 T 细胞的增殖,发挥免疫调节作用^[22]。李芮等^[23] 利用网络药理学方法,预测和筛选到当归多糖是治疗再障的关键成分之一,通过韦恩图对药物、疾病靶点进行映射,并构建靶点蛋白作用网络,分析发现当归多糖可能作用于 VEGFA、TNF、IL-6、AKT1 等靶点,调控 JAK-STAT、TNF、HIF-1 等通路发挥治疗再生障碍性贫血作用。

Treg 细胞和 Th17 细胞是 T 淋巴细胞的重要亚群,是细胞免疫主要参与者,他们均能分泌多种细胞因子,参与机体免疫应答的多个过程,具有非常广泛的作用。Treg 细胞具有免疫抑制作用的特性,能够特异性的分泌 TGF- β 、IL-10、IL-35、IL-4 等多种细胞因子,从而调节效应 T 细胞的增殖与活化,有效减缓病理性免疫应答,降低炎症性损伤^[24-25]。Th17 细胞具有介导炎症反应的作用特性,可以选择性分泌 IL-17A、IL-22、IL-17F 等多种效应细胞因子,从而介导中性粒细胞动员、招募和活化,对机体炎症反应具有明显的促进作用。IL-17 与相应受体结合后,可刺激靶细胞释放 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎细胞因子,加剧炎症反应^[26]。Treg 细胞、Th17 细胞参与多种自身免疫性疾病、移植排斥反应、慢性炎症性疾病的发生发展,通过调节机体免疫平衡,影响着免疫性疾病预后和转归。Th17 细胞和 Treg 细胞相互制约、相互联系,呈现动态制约和协调平衡状态,并通过这种相互作用保持机体正常免疫功能。Th17 细胞与 Treg 细胞的增殖受多种因素的影响,其中 TGF- β 发挥重要的调节作用。TGF- β 可抑制初始 CD4⁺T 淋巴细胞向 Th17 细胞转化的过程,被抑制的 T 淋巴细胞会有更多的机会分化为 Treg 细胞;当机体受某些刺激影响后,可作用于调节效应细胞,促使调节效应细胞分泌 IL-6 等细胞因子,这些细胞因子具有拮抗 TGF- β 的作用,从而减轻 TGF- β 的分化抑制作用,促使更多的初始 CD4⁺T 淋巴细胞分化为 Th17 细胞。

研究发现再障骨髓造血微环境存在 TGF- β 、IL-17、IL-10、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 等多种炎性因子水平

紊乱,其发病机制与 T 淋巴细胞免疫功能异常密切相关。Th17 细胞和 Treg 细胞是再障造血细胞免疫功能破坏的主要 T 细胞亚群^[27-28]。Th17/Treg 细胞平衡失调,可通过异常调节和释放相应的细胞因子,破坏骨髓造血前体细胞,刺激免疫反应,损伤造血干细胞,引起骨髓造血功能损伤,影响机体造血机能^[29]。

本实验通过免疫介导的方法建立再障小鼠模型。研究发现模型组小鼠活动笨拙,精神萎靡,毛发蓬乱缺乏光泽,眼睑唇色耳廓颜色苍白,进食饮水量减少;体重及脾指数均明显下降;外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显降低;骨髓组织结构紊乱,造血组织增生度明显减低;骨髓 IL-17A、IL-6 蛋白表达明显上调,TGF- β 1、IL-10 蛋白表达明显下调;骨髓 Th17 细胞比例明显增高,Treg 细胞比例明显降低,Th17/Treg 细胞比值显著升高($P < 0.01$)。当归多糖干预后,再障小鼠精神状态、毛发蓬乱及光泽度均好转,活动量增加,进食量饮水量均改善,眼睑唇色耳廓颜色转红润,以 APS 高剂量组效果改善最好,体重、脾指数均明显升高($P < 0.05$),APS 高剂量组体重改善更早;APS 低、高剂量组外周血外周血红细胞、白细胞、血小板计数及血红蛋白浓度均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);APS 低剂量组紊乱的造血组织结构可见修复,骨髓造血组织增生度较前改善;APS 高剂量组骨髓组织结构修复明显,造血组织增生度明显升高($P < 0.05$);APS 低、高剂量组 IL-17A、IL-6 蛋白的表达明显下调,TGF- β 1、IL-10 蛋白的表达明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);骨髓 Th17 细胞比例明显降低,Treg 细胞比例明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Th17/Treg 细胞比值显著下降($P < 0.01$)。

综上所述,当归多糖能改善再障模型小鼠骨髓造血功能,降低骨髓 IL-17A、IL-6 蛋白表达水平,提高 TGF- β 1、IL-10 蛋白表达,其机制可能是通过调节 Th17/Treg 细胞平衡来实现。本研究为当归多糖治疗再障提供理论依据,丰富了经典名方当归补血汤治疗再障研究证据。

参考文献:

- [1] 杨晓梅,杨维,卢小玲. T 细胞肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(3): 72-76.
YANG X M, YANG W, LU X L. Advances in T cells

- immunotherapy on tumors [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2018, 46(3): 72-76.
- [2] 王文儒, 杜宇, 许勇钢, 等. 骨髓增生异常综合征与再生障碍性贫血的临床特征及淋巴亚群比较 [J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(10): 710-716.
WANG W R, DU Y, XU Y G, et al. Comparison of clinical features and T lymphocyte subsets between myelodysplastic syndrome and aplastic anemia [J]. *J Clin Hematol*, 2022, 35(10): 710-716.
- [3] KORDASTI S, COSTANTINI B, SEIDL T, et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment [J]. *Blood*, 2016, 128(9): 1193-1205.
- [4] 冯璟, 于远望. 当归补血汤对辐射损伤小鼠的防护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(10): 55-58.
FENG J, YU Y W. The protective effect of Danggui Buxue Decoction on radiation injury in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(10): 55-58.
- [5] 杨飞霞, 王玉, 夏鹏飞, 等. 当归补血汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(11): 2677-2685.
YANG F X, WANG Y, XIA P F, et al. Review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of Danggui Buxue Decoction and prediction and analysis of its Q-markers [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(11): 2677-2685.
- [6] 马婷婷, 冯兴中, 王学艳. 当归对阴虚哮喘 Balb/c 小鼠 Th1/Th2 及 Th17/Treg 的影响及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 758-762.
MA T T, FENG X Z, WANG X Y. Effects and mechanism of *Angelicae Sinensis Radix* on Th1/Th2 and Th17/Treg in mice with asthma and Yin deficiency syndrome [J]. *China J Chin Mater Med*, 2017, 42(4): 758-762.
- [7] XU Y Y, WANG D M, LIANG H S, et al. The role of Th17/Treg axis in the traditional Chinese medicine intervention on immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 535-558.
- [8] DENG P, LI X, WEI Y, et al. The herbal decoction modified Danggui Buxue Tang attenuates immune-mediated bone marrow failure by regulating the differentiation of T lymphocytes in an immune-induced aplastic anemia mouse model [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180417.
- [9] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断与治疗中国指南(2022年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2022, 43(11): 881-888.
Red Blood Cell Diseases (Anemia) Group, Hematology Branch, Chinese Medical Association. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anemia in China (2022) [J]. *Chin J Hematol*, 2022, 43(11): 881-888.
- [10] 何丹迪, 王金环, 雍彦礼, 等. 中医治疗再生障碍性贫血的研究概况与发展 [J]. *中国数字医学*, 2022, 17(1): 89-94.
HE D D, WANG J H, YONG Y L, et al. Research overview and development of aplastic anemia treated by traditional Chinese medicine [J]. *China Digit Med*, 2022, 17(1): 89-94.
- [11] 陈维达, 徐龙晋, 张静, 等. 当归补血汤对再障小鼠骨髓造血及线粒体自噬的实验研究 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 14-18.
CHEN W D, XU L J, ZHANG J, et al. Experimental study of Dangguibuxue Decoction on bone marrow hematopoiesis and mitophagy in aplastic anemia mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2019, 35(1): 14-18.
- [12] 王婷, 刘志勇, 罗黎明, 等. 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(12): 37-48.
WANG T, LIU Z Y, LUO L M, et al. Effects of decoction of *Angelica sinensis*, *Zingiberis Rhizoma Recens*, and mutton on traditional Chinese medicine symptoms of IBS-D female rats with spleen-kidney Yang deficiency [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(12): 37-48.
- [13] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2022, 50(1): 111-114.
MA Y C, WU W X, HU J H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Angelica sinensis* [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2022, 50(1): 111-114.
- [14] 任伟钰, 郑宜馨, 张月梅, 等. 当归多糖药理作用的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(10): 2484-2487.
REN W Y, ZHENG Y J, ZHANG Y M, et al. Research progress on pharmacological effects of angelica polysaccharide [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(10): 2484-2487.
- [15] 丁学兰, 赵信科, 邱勇玉, 等. 当归多糖对环磷酰胺致骨髓抑制小鼠外周血细胞、免疫功能的影响 [J]. *卫生职业教育*, 2016, 34(16): 153-155.
DING X L, ZHAO X K, QIU Y Y, et al. Effects of angelica polysaccharide on peripheral blood cells and immune function in mice with bone marrow suppression induced by cyclophosphamide [J]. *Health Vocat Educ*, 2016, 34(16): 153-155.
- [16] 杨铁虹, 贾敏, 梅其炳. 当归多糖对细胞免疫功能的增进作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(6): 782-783, 788.
YANG T H, JIA M, MEI Q B. Effects of *Angelica sinensis* polysaccharide on cell-mediated immunity [J]. *J Cell Mol Immunol*, 2005, 21(6): 782-783, 788.
- [17] NAI J, ZHANG C, SHAO H, et al. Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of *Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 2337-2353.
- [18] MU X, ZHANG Y, LI J, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide prevents hematopoietic stem cells senescence in D-galactose-induced aging mouse model [J]. *Stem Cells Int*, 2017,

- 2017; 3508907.
- [19] WANG K, WU J, XU J, et al. Correction of *Anemia* in chronic kidney disease with *Angelica sinensis* polysaccharide via restoring EPO production and improving iron availability [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 803.
- [20] LIU C, LI J, MENG F Y, et al. Polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* promotes hematopoiesis and thrombopoiesis through the PI3K/AKT pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10: 79.
- [21] YANG T, JIA M, ZHOU S, et al. Antivirus and immune enhancement activities of sulfated polysaccharide from *Angelica sinensis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3): 768-772.
- [22] YANG T, JIA M, MENG J, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2006, 39(4/5): 179-184.
- [23] 李芮, 刘健, 靳楠, 等. 基于网络药理学探讨当归补血汤治疗再生障碍性贫血作用机制 [J]. *陕西中医*, 2022, 43(3): 384-389.
- LI R, LIU J, JIN N, et al. Discussion on the mechanism of Danggui Buxue Decoction in treating aplastic *Anemia* based on network pharmacology [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2022, 43(3): 384-389.
- [24] SHI Q Z, YU H M, CHEN H M, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells regulate Treg/Th17 balance in aplastic anemia by transferring miR-23a-3p [J]. *Clin Exp Med*, 2021, 21(3): 429-437.
- [25] 肖秋萍, 钟友宝, 喻松仁, 等. 脾虚湿蕴证溃疡性结肠炎模型构建及 T 淋巴细胞变化的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(10): 1241-1249.
- XIAO Q P, ZHONG Y B, YU S R, et al. Model of ulcerative colitis with spleen deficiency and dampness syndrome, and changes in T lymphocytes [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(10): 1241-1249.
- [26] ZHANG J, LIU T, DUAN Y, et al. Single-cell analysis highlights a population of Th17-polarized CD4⁺ naive T cells showing IL6/JAK3/STAT3 activation in pediatric severe aplastic anemia [J]. *J Autoimmun*, 2023, 136: 103026.
- [27] YIN X, LIU B, WEI H, et al. Activation of the Notch signaling pathway disturbs the CD4⁺/CD8⁺, Th17/Treg balance in rats with experimental autoimmune uveitis [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 761-774.
- [28] 殷学伟, 周梦贤, 崔艳艳, 等. 龙胆泻肝汤对葡萄膜炎大鼠 Th17/Treg 动态免疫平衡的调控作用 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(5): 1098-1102.
- YIN X W, ZHOU M X, CUI Y Y, et al. The regulatory effect of Longdan Xiegan Tang on the dynamic immune balance of Th17/Treg in rats with uveitis [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(5): 1098-1102.
- [29] LIU C, SUN Y, SHAO Z. Current concepts of the pathogenesis of aplastic *Anemia* [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(3): 236-241.

[收稿日期]2024-01-30

马泽微, 黄丽, 郑云勤, 等. 叶酸对 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 $A\beta$ 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 10-18.

Ma ZW, Huang L, Zheng YQ, et al. Effect of folic acid on the expression of Flotillin-1 and β -amyloid protein in the brain of mice with Alzheimer's disease inflammation [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 10-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.002

叶酸对 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 $A\beta$ 表达的影响

马泽微¹, 黄丽¹, 郑云勤¹, 张美琳^{1,2,3}, 刘欢^{1,2,3*}

(1.天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,天津 300070;2.人群重大疾病防控教育部重点实验室,天津 300070;3.天津市环境营养与人群健康重点实验室,天津 300070)

【摘要】 目的 观察叶酸 (folic acid, FA) 补充对炎症刺激 AD 小鼠脑内 Flotillin-1 及 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 代谢相关蛋白表达的影响。方法 27 只 6 月龄雄性 APP/PS1 小鼠,随机分为 AD 组、AD+LPS 组和 AD+LPS+FA 组,每组各 9 只。9 只同月龄 C57BL/6J 雄性小鼠作为野生对照 (Control) 组。给予 AD+LPS+FA 组叶酸补充饲料 (8 mg/kg) 干预 3 个月,其他 3 组喂养普通饲料。实验结束前 1 周对 AD+LPS 组与 AD+LPS+FA 组小鼠腹腔注射脂多糖溶液 (LPS, 250 μ g/(kg·d)),其余两组注射生理盐水。采用 ELISA 方法检测各组小鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量以及脑组织 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 水平,Western blot 检测脑组织 Flotillin-1 蛋白的表达,免疫荧光双标法检测脑皮质区 Flotillin-1 和 $A\beta_{1-42}$ /APP/PS1/BACE1 的共表达。结果 经方差分析,与 Control 组相比,AD 组小鼠血清 TNF- α 、IL-6 含量升高 ($P < 0.05$)、脑内 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 水平升高 ($P < 0.05$)、脑内 Flotillin-1 蛋白的表达增加 ($P < 0.05$)、脑组织皮质区 Flotillin-1 与 $A\beta_{1-42}$ /APP/PS1/BACE1 的共表达蛋白增多 ($P < 0.05$);与 AD 组相比,AD+LPS 组小鼠血清炎症因子和脑内 $A\beta$ 水平均进一步升高 ($P < 0.05$)、脑组织皮质区 Flotillin-1 与 $A\beta_{1-42}$ /APP/BACE1 双标阳性蛋白表达量增多 ($P < 0.05$);与 AD+LPS 组相比,AD+LPS+FA 组小鼠体内炎症水平和脑内 $A\beta$ 含量降低 ($P < 0.05$)、脑组织 Flotillin-1 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)、脑组织皮质区 Flotillin-1 与 $A\beta_{1-42}$ /APP/PS1/BACE1 蛋白的共表达量减少 ($P < 0.05$)。结论 补充叶酸能够降低 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白的表达,减少 $A\beta$ 沉积。

【关键词】 叶酸; β 淀粉样蛋白; Flotillin-1; 阿尔茨海默病; 炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0010-09

Effect of folic acid on the expression of Flotillin-1 and β -amyloid protein in the brain of mice with Alzheimer's disease inflammation

MA Zewei¹, HUANG Li¹, ZHENG Yunqin¹, ZHANG Meilin^{1,2,3}, LIU Huan^{1,2,3*}

(1. Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China.

2. Key Laboratory of Prevention and Control of Major Diseases in the Population, Ministry of Education, Tianjin 300070.

3. Tianjin Key Laboratory of Environment, Nutrition and Public Health, Tianjin 300070)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of folic acid (FA) supplementation on the expression of Flotillin-1 and β -amyloid protein ($A\beta$)-metabolism-related proteins in the brains of inflammation-stimulated Alzheimer's disease (AD) mice. **Methods** Twenty-seven 6-month-old male APP/PS1 mice were randomly divided into AD, AD+LPS, and AD+LPS+FA groups, with nine mice in each group. Nine C57BL/6J male mice born within the same month were used as

【基金项目】 国家自然科学基金 (82173516)。

【作者简介】 马泽微 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与神经科学。E-mail: ma_zewei@163.com

【通信作者】 刘欢 (1980—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 营养与神经科学。E-mail: liuhuan@tmu.edu.cn

the Control group. The AD + LPS + FA group was given folic-acid-supplemented feed (8 mg/kg) for 3 months of intervention, while the other three groups were fed normal feed. Lipopolysaccharide solution (LPS, 250 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) was injected intraperitoneally into mice in the AD+LPS and AD+LPS+FA groups 1 week before the end of the experiment, and saline was injected into the remaining two groups. The serum inflammatory factors TNF- α and IL-6 levels and brain tissue A β_{1-40} and A β_{1-42} levels of mice in each group were detected by ELISA. Flotillin-1 protein expression in brain tissue was detected using Western blot, and the co-expression of Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 in the cortical region of the brain was detected via immunofluorescence double-labeling. **Results** After ANOVA analysis, we found mice in the AD group had elevated serum TNF- α and IL-6 levels ($P < 0.05$), elevated levels of A β_{1-40} and A β_{1-42} ($P < 0.05$), increased expression of Flotillin-1 protein ($P < 0.05$), and increased co-expression of Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 in the cortical brain tissue ($P < 0.05$) compared with the Control group. Compared with mice in the AD group, those in the AD+LPS group had further increases in serum inflammatory factors and A β levels in the brain ($P < 0.05$) and increased co-expression of Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 double-labeled proteins in their cortical brain tissue ($P < 0.05$). Compared with mice in the AD+LPS group, those in the AD+LPS+FA group had lower *in vivo* inflammation levels and A β content in the brain ($P < 0.05$), lower brain tissue Flotillin-1 protein expression ($P < 0.05$), and lower Flotillin-1 and A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 protein co-expression in cortical brain tissue ($P < 0.05$). **Conclusions** Folic acid supplementation may reduce Flotillin-1 protein expression and A β deposition in the brain of AD inflammatory mice.

【Keywords】 folic acid; β -amyloid protein; Flotillin-1; Alzheimer's disease; inflammation

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起始于老年期或老年前期、以进行性认知功能损伤为典型特征的神经退行性疾病,以 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 沉积和 tau 蛋白过度磷酸化 (microtubule-associated protein tau, p-tau) 为主要病理特征^[1]。“A β 级联反应”假说是目前较为公认的 AD 的主要发病机制^[2],即淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 经 β 分泌酶 (β -secretase 1, BACE1) 和 γ 分泌酶 (其催化亚基为 PSEN1) 代谢产生的 A β 是 AD 的触发因素^[3]。

浮靛蛋白 (Flotillin-1) 是一种主要在哺乳动物神经系统中表达的脂筏标记蛋白,与 AD 的发病存在关联。研究发现,Flotillin-1 在 AD 患者脑标本中的细胞外 A β 斑块和携带神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 的神经元中高度富集^[4]。在 APP/PS1 转基因小鼠中,细胞内 A β 积聚在 Flotillin-1 阳性内吞囊泡中^[5],通过敲除 Flotillin-1 基因或运动下调 Flotillin-1 水平,能够减弱 β -淀粉样蛋白的产生^[6-7]。脂筏是 APP 顺序性酶切生成 A β 的异常代谢过程的工作平台^[8],Chen 等^[9]在人脑 cDNA 文库中使用酵母双杂交系统筛选出 Flotillin-1 与 APP 的细胞内结构域 (APP intracellular domain, AICD) 直接相互作用,推测 Flotillin-1 可能诱导 APP 募集到脂筏上,影响 APP 的定位和加工,进而影响 A β 的含量。有研究则认为 Flotillins 改变了网格蛋白介导的内吞作用而影响 APP^[10-11];此

外,Flotillin-1 作为外泌体主要成分之一,可介导 A β 在细胞间传播^[12]。以上研究结果表明,Flotillin-1 与 AD 的病理发展密切相关,现被认为是一种在阿尔茨海默病诊断中的新兴的生物标志物^[13-14]。

叶酸 (folic acid, FA) 是一种水溶性 B 族维生素,流行病学研究显示低水平的叶酸与认知功能下降相关^[15-16]。随机临床试验表明,叶酸单独使用或与其他物质联合使用,可以改善轻度认知障碍患者认知功能,降低血液中 A β 相关生物标志物水平^[17-18]。在体内研究中,叶酸缺乏可增强 APP/PS1 小鼠脑中 A β 的积累,降低淀粉样蛋白相关 miRNAs 的表达^[19],而叶酸补充能够减少 AD 小鼠脑组织中 A β 沉积及 A β_{1-42} 含量^[20]。此外,叶酸还可以通过调节 N2a-APP 细胞中的 DNA 甲基转移酶活性来抑制 A β 的产生^[21]。如前所述,Flotillin-1 与 AD 的发病关系密切,叶酸对脑组织 A β 沉积的影响是否与 Flotillin-1 有关是本研究的关注重点。

近些年研究发现,神经炎症是 AD 疾病进程中的一个重要环节^[22],炎性介质会通过上调 β -分泌酶刺激 APP 的加工过程,促进 A β 的产生和聚集,A β 沉积又可刺激胶质细胞加剧炎症反应,两者相互影响^[23],直接或间接驱动神经元损伤,加速认知障碍进展。

APP/PS1 双转基因小鼠是 AD 主要的动物模型之一^[24],本研究给予 APP/PS1 小鼠脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的炎症刺激构建认知障碍

炎症模型,以更好地模拟 AD 患者体内炎症状态。通过检测炎症因子水平、脑内 A β 含量、Flotillin-1 及其与 A β 代谢相关蛋白共定位的表达情况,探讨叶酸对 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 A β 的影响,为叶酸对 AD 的防治机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 SPF 级 APP/PS1 双转基因雄性小鼠 27 只,野生型 C57BL/6J 小鼠 9 只,均为 6 月龄,体重 25~30 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]。于天津医科大学实验动物中心屏障设施内进行[SYXK(津)2019-0004],温度(22±2)℃,相对湿度(60±5)%,光照/黑暗 12 h/12 h 交替。所有实验动物操作经天津医科大学实验动物伦理委员会批准(TMUaMEC2022022),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 LPS (*Escherichia coli* 055:B5) (Sigma, 美国); 8 mg/kg 叶酸补充饲料 (Moldiets) (上海博奥派克生物科技有限公司, 中国); A β ₁₋₄₀ 与 A β ₁₋₄₂ 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (酶免科技有限公司, 中国, 货号: MM-0461M1、MM-0220M1); BCA 蛋白定量试剂盒 (山东思科捷生物技术有限公司, 中国, 货号: EC0001-A); HRP-山羊抗兔二抗 (山东思科捷生物技术有限公司, 中国, 货号: EF0002); A β ₁₋₄₂ 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 中国, 货号: bs-0076M); Flotillin-1 抗体 (Abcam, 美国, 货号: EPR6041); APP 抗体 (武汉赛维尔生物技术有限公司, 中国, 货号: GB121197); PS1 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 中国, 货号: bs-0025M); BACE1 抗体 (成都正能生物技术有限责任公司, 中国, 货号: 220934); 山羊抗兔荧光二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国, 货号: ZF-0316); 山羊抗鼠荧光二抗 (山东思科捷生物技术有限公司, 中国, 货号: EF0004)。

ChemiDoc™ XRS 成像系统 (Bio-Rad, 美国, 型号: 721BR03087); 多功能酶标仪 (Bio-Rad, 美国, 型号: SYNERGY™); 电泳仪 (Bio-Rad, 美国, 型号: 024BR09569); 倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本, 型号: IX2-UCB)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与干预

适应性喂养 1 周后,将 C57BL/6J 小鼠作为野

生对照 (Control) 组, APP/PS1 小鼠随机分为 AD 组、AD+LPS 组和 AD+LPS+FA 组, 每组各 9 只。AD+LPS+FA 组给予叶酸补充饲料 (8 mg/kg) 干预 3 个月, 其他 3 组给予普通饲料喂养。实验结束前 1 周, 对 AD+LPS 组与 AD+LPS+FA 组小鼠腹腔注射脂多糖溶液 (LPS, 250 μ g/(kg·d)), 其余两组注射生理盐水。实验结束, 所有小鼠禁食过夜, 采用吸入 CO₂ 安乐死处理, 取血并断头取出完整脑组织, 每组随机选取 5 只快速冷冻后保存于 -80 °C 冰箱备用, 另外 4 只于 4% 多聚甲醛固定, 进行石蜡包埋及切片。

1.3.2 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

取适量脑组织, 按质量/体积为 1:9 加入 PBS 缓冲液, 机器研磨, 裂解组织, 然后将组织匀浆于 4 °C 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用。使用小鼠 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 的 ELISA 试剂盒, 根据说明书的方法和操作步骤进行操作, 酶标仪测定各孔吸光值 (A450), 根据标准曲线, 测量脑组织匀浆中 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂ 的浓度。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定脑组织匀浆上清液的总蛋白量。最后根据蛋白定量的浓度, 换算脑组织内 A β 的含量。取外周血, 离心得到血清, 使用小鼠 TNF- α 和 IL-6 的 ELISA 试剂盒, 按照说明书步骤操作, 检测小鼠外周血中 TNF- α 、IL-6 含量。

1.3.3 Western blot 检测

取适量小鼠脑组织匀浆, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离总蛋白, 然后将分离的蛋白条带转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭。TBST 洗膜后, 将 PVDF 膜放入一抗稀释液 (Flotillin-1 (1:2000)、GAPDH (1:10 000)) 中, 4 °C 孵育过夜。弃去一抗稀释液, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 使用 ECL 试剂盒显影, 全自动凝胶成像仪拍照, 用 Image Proplus 6.0 软件计算各个条带的灰度值。以 GAPDH 为内参, Control 组为 1 进行均一化处理, 计算各组 Flotillin-1 蛋白的相对表达量。

1.3.4 免疫荧光染色

采用荧光双标法观察脑组织 Flotillin-1 与 AD 相关蛋白 A β ₁₋₄₂、APP、PS1、BACE1 的共定位。将石蜡切片于 60 °C 恒温箱烤片 15 min 后进行免疫荧光染色。依次进行脱蜡、水化、洗涤、消除内源性过氧化物酶、抗原修复、山羊血清封闭的过程, 与重组单

克隆兔抗 Flotillin-1 (1 : 100)、鼠抗 $A\beta_{1-42}$ (1 : 100)、鼠抗 APP (1 : 100)、鼠抗 PS1 (1 : 100)、鼠抗 BACE1 (1 : 100) 4 °C 孵育 12~16 h, PBST 洗涤切片后, 与荧光偶联二抗 (山羊抗兔 1 : 100 和山羊抗鼠 1 : 500) 常温孵育 1 h 后, 使用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片, 倒置荧光显微镜下观察。随机选取每只小鼠脑组织 3 个非重叠皮质区的高倍镜视野 ($\times 1000$), 计算单位面积下荧光双标的蛋白情况, 取平均值进行组间比较。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件, 计量资料以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 检验或 Welch 校正后采用 Tamhane's T_2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清炎症水平

各组小鼠血清炎症因子 TNF- α 含量的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 68.625, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠体内 TNF- α 水平升高 ($P < 0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠 TNF- α 水平进一步升高 ($P < 0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠血清 TNF- α 含量降低 ($P < 0.05$)。经方差分析, 各组小鼠血清炎症因子 IL-6 的差异具有统计学意义 ($F = 14.359, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠 IL-6 水平升

高 ($P < 0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠血清 IL-6 水平进一步升高 ($P < 0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠血清 IL-6 含量降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 脑组织 $A\beta$ 水平

各组小鼠脑组织 $A\beta_{1-40}$ 含量的比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 10.271, P = 0.001$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠脑内 $A\beta_{1-40}$ 水平升高 ($P < 0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠脑内 $A\beta_{1-40}$ 水平升高 ($P < 0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠脑内 $A\beta_{1-40}$ 降低 ($P < 0.05$)。经方差分析, 各组小鼠脑组织 $A\beta_{1-42}$ 含量的差异具有统计学意义 ($F = 13.613, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠脑内 $A\beta_{1-42}$ 水平升高 ($P < 0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠脑内 $A\beta_{1-42}$ 水平升高 ($P < 0.05$); 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠脑内 $A\beta_{1-42}$ 降低 ($P < 0.05$), $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ 也具有同样的差异性结果。见表 2。

2.3 脑组织 Flotillin-1 标记蛋白表达

各组小鼠脑组织 Flotillin-1 蛋白表达量的比较, 经 Control 组均一化处理后方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 35.385, P = 0.000$), 与 Control 组相比, AD 组小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 与 AD 组相比, AD+LPS 组小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白表达差异无统计学意义; 与 AD+LPS 组相比, AD+LPS+FA 组小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白表达量减少 ($P < 0.05$), 见图 1。

表 1 各组小鼠血清 TNF- α 与 IL-6 含量 ($\bar{x}\pm s, n = 5$)

Table 1 Levels of TNF- α and IL-6 in the serum of mice

组别 Groups	Control	AD	AD+LPS	AD+LPS+FA
TNF- α /(ng/L)	93.12 \pm 4.911	175.94 \pm 15.82 ^{**}	221.96 \pm 21.91 [*]	174.43 \pm 9.08 [#]
IL-6/(pg/mL)	6.73 \pm 0.65	9.10 \pm 0.67 ^{**}	10.49 \pm 1.60 [*]	7.83 \pm 0.50 ^{**#}

注: 与 Control 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 AD+LPS 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with AD+LPS group, [#] $P < 0.05$.

表 2 各组小鼠脑组织 $A\beta_{1-40}$ 与 $A\beta_{1-42}$ 含量 ($\bar{x}\pm s, n = 5$)

Table 2 Levels of $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ in the brain tissue of mice

组别 Groups	Control	AD	AD+LPS	AD+LPS+FA
$A\beta_{1-40}$ (pg/mg)	102.54 \pm 9.31	130.24 \pm 13.08 ^{**}	160.10 \pm 27.63 [*]	119.56 \pm 10.83 [#]
$A\beta_{1-42}$ (pg/mg)	17.74 \pm 2.04	26.50 \pm 5.25 ^{**}	36.84 \pm 7.15 [*]	24.68 \pm 2.93 ^{**#}
$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	0.17 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02 ^{**}	0.23 \pm 0.02 [*]	0.21 \pm 0.01 ^{**#}

注: 与 Control 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 AD+LPS 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with AD+LPS group, [#] $P < 0.05$.

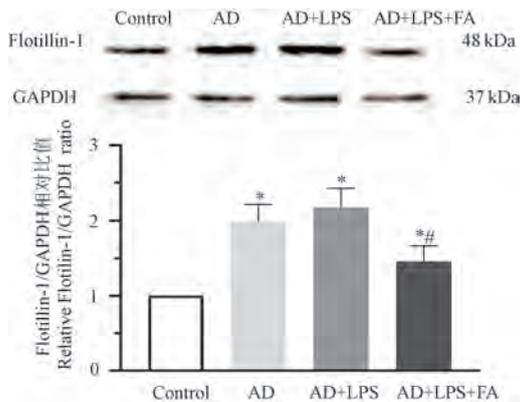
2.4 脑组织皮质区 Flotillin-1 与 A β_{1-42} 荧光共表达

如图 2 所示,各组小鼠脑组织皮质区 Flotillin-1 蛋白呈现出非扩散性的荧光信号,因此本研究比较了单位面积下荧光双标信号分子的数量,来表示

Flotillin-1 与 A β 及代谢相关蛋白的共表达情况。结果表明,各组间差异有统计学意义 ($F = 73.300, P = 0.000$),与 Control 组相比,AD 组小鼠脑内 Flotillin-1/A β_{1-42} 双标蛋白增加 ($P < 0.05$);与 AD 组相比,AD+LPS 组双标蛋白增加 ($P < 0.05$);与 AD+LPS 组相比,AD+LPS+FA 组 Flotillin-1/A β_{1-42} 双标蛋白减少 ($P < 0.05$),见图 2。

2.5 脑组织皮质区 Flotillin-1 与 A β 生成相关蛋白 (APP、PS1、BACE1) 荧光共表达

如图 3~图 5 所示,各组小鼠脑组织皮质区 Flotillin-1 与 A β 代谢相关蛋白荧光共表达比较,经方差分析,差异具有统计学意义 (APP: $F = 52.256, P = 0.000$; PS1: $F = 30.693, P = 0.000$; BACE1: $F = 62.549, P = 0.000$),与 Control 组相比,AD 组小鼠脑内 Flotillin-1/APP、Flotillin-1/PS1、Flotillin-1/BACE1 的双标蛋白增多 ($P < 0.05$);与 AD 组相比,AD+LPS 组 Flotillin-1/APP、Flotillin-1/BACE1 双标蛋白增加 ($P < 0.05$),Flotillin-1/PS1 双标蛋白无统计学意义;与 AD+LPS 组相比,AD+LPS+FA 组小鼠脑组织皮质区 Flotillin-1 与 APP、PS1、BACE1 共定位表达的蛋白均减少 ($P < 0.05$)。

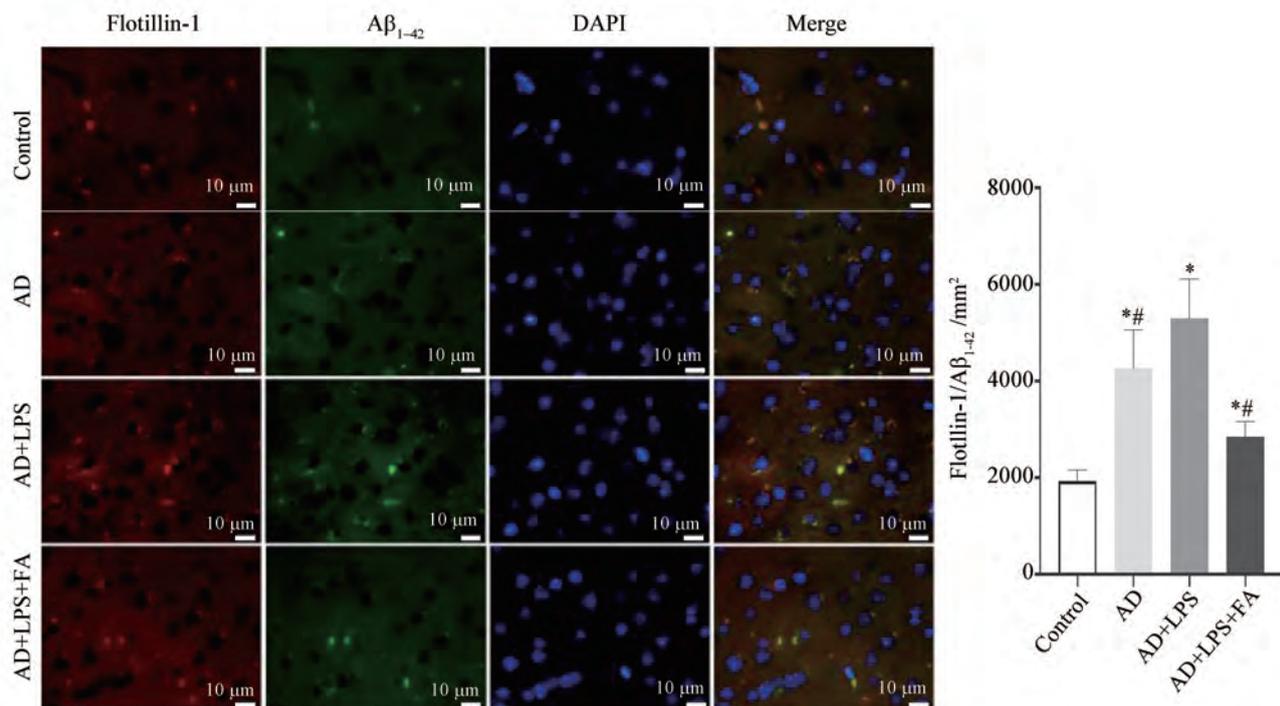


注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$;与 AD+LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠脑组织 Flotillin-1 蛋白表达 ($n = 5$)

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Expression of protein Flotillin-1 in brain tissues of mice

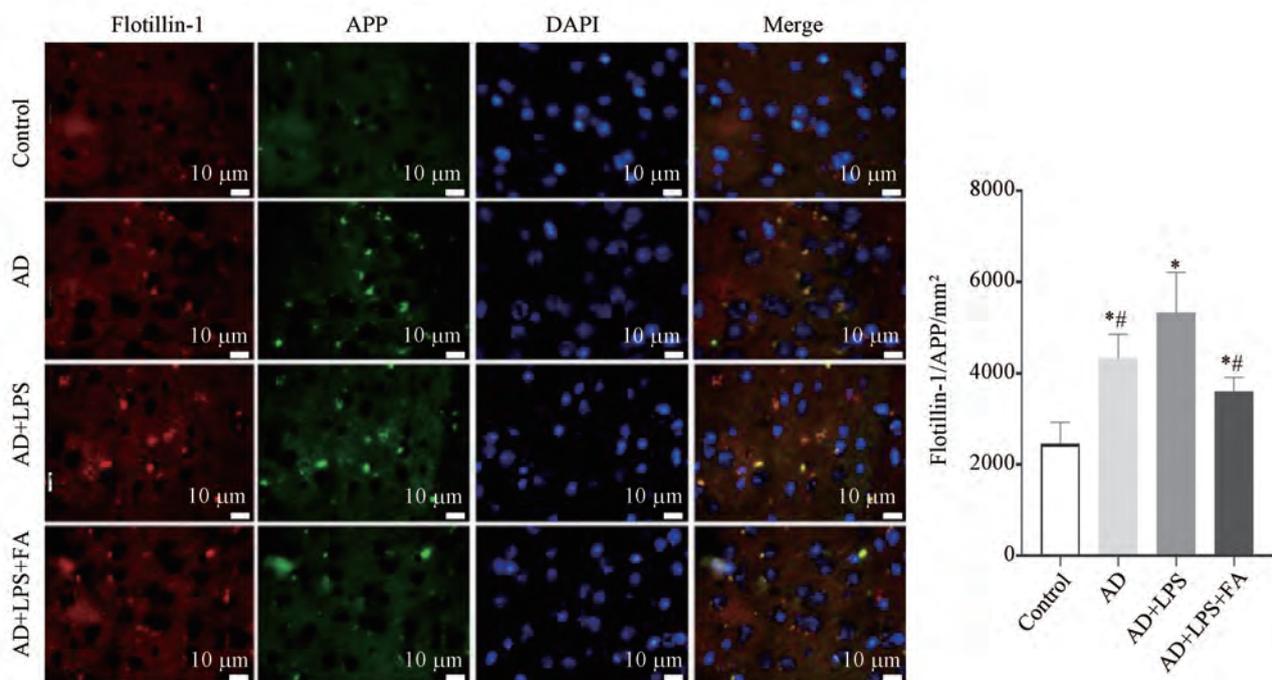


注:脑组织切片图标尺 = 10 μm (1000 \times)。与 Control 组比较, * $P < 0.05$;与 AD+LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/A β_{1-42} 免疫荧光结果 ($n = 4$)

Note. Brain biopsy scale = 10 μm (1000 \times). Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Immunofluorescence result of Flotillin-1/A β_{1-42} in the brain tissue of each group of mice

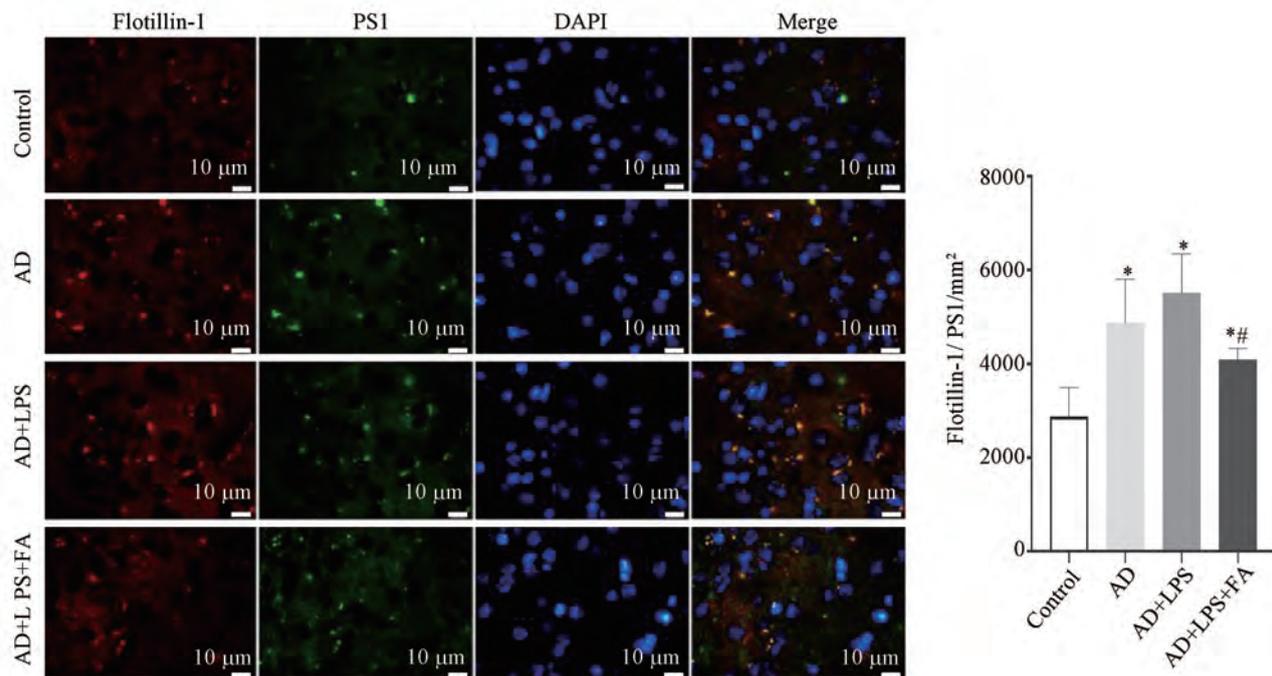


注:脑组织切片图标尺 = 10 μm (1000×)。与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 AD+LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/APP 免疫荧光结果 ($n = 4$)

Note. Brain biopsy scale = 10 μm (1000×). Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Immunofluorescence result of Flotillin-1/APP in the brain tissue of each group of mice

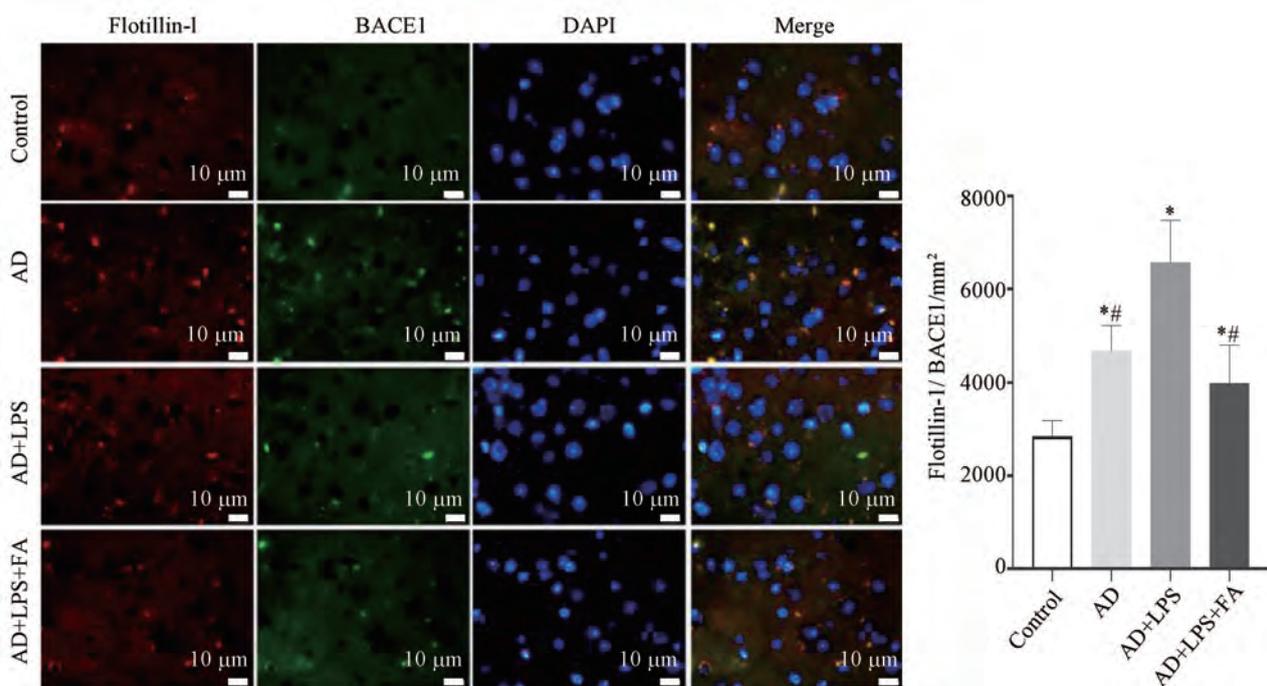


注:脑组织切片图标尺 = 10 μm (1000×)。与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 AD+LPS 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/PS1 免疫荧光结果 ($n = 4$)

Note. Brain biopsy scale = 10 μm (1000×). Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Immunofluorescence result of Flotillin-1/PS1 in the brain tissue of each group of mice



注:脑组织切片图标尺=10 μm (1000×)。与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 AD+LPS 组比较, # $P<0.05$ 。

图 5 各组小鼠脑组织 Flotillin-1/BACE1 免疫荧光结果($n=4$)

Note. Brain biopsy scale=10 μm (1000×). Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with AD+LPS group, # $P<0.05$.

Figure 5 Immunofluorescence result of Flotillin-1/BACE1 in the brain tissue of each group of mice

3 讨论

炎症与 AD 的病程发展密切相关,神经炎症促进 A β 的产生与积累^[25]。本研究采用对 APP/PS1 小鼠腹腔注射 LPS 的方法构建认知障碍炎症模型,放大 A β 病理特征。结果发现,LPS 刺激 AD 小鼠体内炎症水平显著提高,脑组织 A β_{1-40} 与 A β_{1-42} 含量均显著增加。

Flotillins 是位于细胞内和细胞外囊泡脂筏中的疏水蛋白,主要参与信号转导和膜-蛋白相互作用,且越来越多的证据表明 Flotillin-1 的积累与 AD 的进展有关^[13],Flotillin-1 将 APP 募集到脂筏上,参与淀粉样蛋白生成途径^[9]。本研究发现,与 Control 组小鼠相比,AD 小鼠及 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白的表达显著增加,可能是 Flotillin-1 的表达增强使 APP 生成 A β 的工作平台增多,进而导致 A β 的产生过多。A β_{1-42} 相较于 A β_{1-40} 更具聚集倾向性,易形成寡聚体,有更大的神经毒性^[26]。因此本研究对 Flotillin-1 和 A β_{1-42} 及 APP、PS1、BACE1 进行了共定位检测。结果发现,与 Control 组小鼠相比,AD 组和 AD+LPS 组小鼠脑内 Flotillin-1 与 A β_{1-42} /APP/PS1/BACE1 共标记蛋白的表达均显著增多,

表明 Flotillin-1 与 A β 代谢相关蛋白的相关性增强。此外,相比于 AD 组,AD+LPS 组小鼠大脑皮质区中与 A β_{1-42} 和 APP、BACE1 共标记蛋白进一步增多,提示炎症加剧状态下,Flotillin-1 蛋白与 A β_{1-42} 及前体物 APP、酶 BACE1 之间可能会产生更强的相关性,增加对 APP 的加工,影响 APP 的裂解。此外,Flotillin-1 被视为外泌体标记蛋白,因此 AD 小鼠的 Flotillin-1 表达增多表明可能存在外泌体携带 β -淀粉样蛋白的进行朊病毒样传播^[27],从而增加脑内 A β 水平,加重认知障碍。

叶酸是必需的微量营养素,可提供神经保护作用,低叶酸水平与认知减退相关^[17,28]。既往研究已经证明,补充叶酸可减少 AD 小鼠脑组织中 A β 沉积^[20],其机制可能与叶酸抑制 BACE1 表达、修饰 DNA 甲基化^[21,29]或影响 A β 代谢相关 miRNA 表达有关^[19]。本研究则关注到了 Flotillin-1 蛋白,对认知障碍炎症模型小鼠进行了 3 个月的叶酸补充干预,结果显示,叶酸对炎症加剧的脑内 A β_{1-42} 和 A β_{1-40} 沉积也能产生减弱作用。叶酸补充可降低 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 蛋白的表达量,减少脑内皮质区 Flotillin-1 与 A β_{1-42} 、APP、PS1、BACE1 共定位的蛋白表达,这表明补充叶酸可以调节

Flotillin-1 蛋白的表达,减少 A β ,并且叶酸对脑组织 A β 沉积的作用可能与 Flotillin-1 有关。课题组前期研究发现,叶酸缺乏可影响体外 N2a-APP 细胞 A β 与外泌体的分泌增多^[14],叶酸对 Flotillin-1 的调节也反映出其可能减少外泌体携带 A β 相关蛋白在脑内的传播作用。本研究发现,叶酸干预能够降低 AD 炎症小鼠外周炎症水平,与既往研究结果一致^[30-32],即叶酸在一定程度上减弱了促炎细胞因子对 A β 沉积的促进作用。

综上,本研究发现补充叶酸能够减少 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 A β 的表达,为探索叶酸防治 AD 提供新的线索。然而,本研究仍存在一定不足,如只是在该动物模型中发现叶酸补充能够降低 AD 炎症小鼠脑内 Flotillin-1 及 A β 代谢相关蛋白表达这一现象,尚不能证明叶酸通过影响 Flotillin-1 进而减少 A β 的生成,后续研究需对动物敲除 Flotillin-1 相关基因以进一步验证。此外,尚不清楚炎症刺激在叶酸调节 Flotillin-1 过程中的影响,未来仍要继续深入探索叶酸对 AD 的保护作用机制。

参考文献:

[1] BUSCHE M A, HYMAN B T. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10): 1183-1193.

[2] 王蓬文,李瑞晟,王虹,等. 姜黄素对 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠 A β 生成和降解的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(5): 367-371.

WANG P W, LI R S, WANG H, et al. Effect of curcumin on production and degradation of A β in APP^{swe}/PS1^{dE9} double transgenic mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2010, 18(5): 367-371.

[3] 隋小龙,梁良,张玲,等. 中药 I 号方对 APP/PS1 双转基因模型小鼠 APP 代谢的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 49-53, I0004, I0005.

SUI X L, LIANG L, ZHANG L, et al. Effect of a Chinese traditional prescription PN-1 on the amyloid precursor protein processing in transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014, 22(6): 49-53, I0004, I0005.

[4] KOKUBO H, LEMERE C A, YAMAGUCHI H. Localization of flotillins in human brain and their accumulation with the progression of Alzheimer's disease pathology [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 290(2): 93-96.

[5] RAJENDRAN L, KNOBLOCH M, GEIGER K D, et al. Increased A β production leads to intracellular accumulation of Abeta in flotillin-1-positive endosomes [J]. *Neurodegener Dis*, 2007, 4(2/3): 164-170.

[6] BITSIKAS V, RIENTO K, HOWE J D, et al. The role of

flotillins in regulating a β production, investigated using flotillin 1 -/-, flotillin 2 -/- double knockout mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85217.

[7] ZHANG X L, ZHAO N, XU B, et al. Treadmill exercise inhibits amyloid- β generation in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice by reducing cholesterol-mediated lipid raft formation [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(7): 498-503.

[8] EHEHALT R, KELLER P, HAASS C, et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(1): 113-123.

[9] CHEN T Y, LIU P H, RUAN C T, et al. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(1): 266-272.

[10] GLEBOV O O, BRIGHT N A, NICHOLS B J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(1): 46-54.

[11] ALSAQATI M, THOMAS R S, KIDD E J. Proteins involved in endocytosis are upregulated by ageing in the normal human brain: implications for the development of Alzheimer's disease [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73(3): 289-298.

[12] VINGTDEUX V, SERGEANT N, BUÉE L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 229.

[13] ANGELOPOULOU E, PAUDEL Y N, SHAIKH M F, et al. Flotillin: a promising biomarker for Alzheimer's disease [J]. *J Pers Med*, 2020, 10(2): 20.

[14] ABDULLAH M, KIMURA N, AKATSU H, et al. Flotillin is a novel diagnostic blood marker of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 72(4): 1165-1176.

[15] MA F, WU T, ZHAO J, et al. Plasma homocysteine and serum folate and vitamin B₁₂ levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a case-control study [J]. *Nutrients*, 2017, 9(7): 725.

[16] O'CONNOR D M A, SCARLETT S, DE LOOZE C, et al. Low folate predicts accelerated cognitive decline: 8-year follow-up of 3140 older adults in Ireland [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2022, 76(7): 950-957.

[17] MA F, LI Q, ZHOU X, et al. Effects of folic acid supplementation on cognitive function and A β -related biomarkers in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial [J]. *Eur J Nutr*, 2019, 58(1): 345-356.

[18] JIANG X, GUO Y, CUI L, et al. Study of diet habits and cognitive function in the Chinese middle-aged and elderly population: the association between folic acid, B vitamins, vitamin D, coenzyme Q10 supplementation and cognitive ability [J]. *Nutrients*, 2023, 15(5): 1243.

[19] LIU H, TIAN T, QIN S, et al. Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1502-1508.

- [20] 田甜, 孙杨, 王渭诗, 等. 叶酸对 AD 模型小鼠脑内 A β 沉积及 BACE1 表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2018, 34(3): 368-372.
TIAN T, SUN Y, WANG W S, et al. Effects of folic acid on A β deposition and BACE1 expression in brain of APP/PS1 transgenic mouse [J]. Chin J Public Health, 2018, 34(3): 368-372.
- [21] LI W, JIANG M, ZHAO S, et al. Folic acid inhibits amyloid β -peptide production through modulating DNA methyltransferase activity in N2a-APP cells [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 25002-25013.
- [22] 强伟杰, 陈颖, 蔡维艳, 等. 基于神经炎症的神经退行性疾病模型及中药治疗策略 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4): 461-466.
QIANG W J, CHEN Y, CAI W Y, et al. Research model of neurodegenerative diseases based on neuroinflammation and its traditional Chinese medicine treatment strategies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(4): 461-466.
- [23] CAI Z, HUSSAIN M D, YAN L J. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease [J]. Int J Neurosci, 2014, 124(5): 307-321.
- [24] 尚培骏, 姬乃春, 杨锦雯, 等. 基于 APP/PS1 双转基因小鼠与野生型小鼠比较综述学习记忆相关行为学实验优缺点和注意事项 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 969-984.
SHANG P J, JI N C, YANG J W, et al. Comparison of APP/PS1 double transgenic and wild-type mice to review the advantages, disadvantages, and cautions of behavioral tests related to learning and memory [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 969-984.
- [25] VENEGAS C, KUMAR S, FRANKLIN B S, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease [J]. Nature, 2017, 552(7685): 355-361.
- [26] 刘心朗, 贾建新. β 淀粉样蛋白在阿尔茨海默病中的作用机制研究进展 [J]. 解剖学杂志, 2020, 43(1): 60-63.
LIU X L, JIA J X. Research progress on the mechanism of beta Amyloid protein in Alzheimer's disease [J]. Chin J Clin Anat, 2020, 43(1): 60-63.
- [27] SARDAR SINHA M, ANSELL-SCHULTZ A, CIVITELLI L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers [J]. Acta Neuropathol, 2018, 136(1): 41-56.
- [28] BABYLON L, SCHMITT F, FRANKE Y, et al. Effects of combining biofactors on bioenergetic parameters, A β levels and survival in alzheimer model organisms [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(15): 8670.
- [29] LI W, LIU H, YU M, et al. Folic acid administration inhibits amyloid β -peptide accumulation in APP/PS1 transgenic mice [J]. J Nutr Biochem. 2015, 26(8): 883-891.
- [30] Paniz C, Bertinato J F, Lucena M R, et al. A daily dose of 5 mg folic acid for 90 days is associated with increased serum unmetabolized folic acid and reduced natural killer cell cytotoxicity in healthy Brazilian adults [J]. J Nutr, 2017, 147(9): 1677-1685.
- [31] ZHANG Q, WU H, ZOU M, et al. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T⁺ tf/J mouse model of autism [J]. J Nutr Biochem, 2019, 71: 98-109.
- [32] CIANCIULLI A, SALVATORE R, PORRO C, et al. Folic acid is able to polarize the inflammatory response in LPS activated microglia by regulating multiple signaling pathways [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 5240127.

[收稿日期]2024-02-29

周雪, 万贵平, 张真真. 人源异种皮下注射移植法建立子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型的评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 19-26.

Zhou X, Wan GP, Zhang ZZ. Evaluation of a nude mouse model of endometriosis fibrosis via the human xenograft subcutaneous transplantation method [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 19-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.003

人源异种皮下注射移植法建立子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型的评价

周雪^{1,2}, 万贵平^{1,2*}, 张真真^{1,2*}

(1.南京中医药大学附属中西医结合医院,南京 210028;2.江苏省中医药研究院,南京 210028)

【摘要】 目的 评估人源子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型建立的可行性,确定子宫内膜间充质干细胞是否参与诱导子宫内膜异位症纤维化。方法 收集人源子宫内膜标本4例,采用皮下注射的方式1:3移植到12只BABL/c裸鼠体内。记录病灶皮表形态及体积变化,移植后第15天处死裸鼠,观察病灶形态及其与腹壁周围粘连情况,HE染色评判造模结果,Masson染色评定纤维化程度,免疫荧光追踪子宫内膜间充质干细胞在子宫内膜异位症纤维化进程中的作用。结果 裸鼠异位病灶体积随时间增长,呈局限性、囊泡样改变,与腹壁粘连紧密,镜下可见子宫内膜腺体、胶原纤维沉积,造模成功率为83.4%,造模后病灶胶原纤维容积分数显著升高($P<0.01$),共聚焦成像提示子宫内膜间充质干细胞(SUSD2⁺)可在体内向肌成纤维细胞(α -SMA⁺)分化。结论 人源异种皮下注射移植的方法建立的裸鼠模型符合子宫内膜异位症纤维化的病变特点,操作简单,可行性高,此外体内观察到子宫内膜间充质干细胞参与诱导子宫内膜异位症纤维化形成,为进一步探究其发病机制提供较好的模型参考。

【关键词】 子宫内膜异位症;动物模型;异种移植;纤维化;BABL/c裸鼠;子宫内膜间充质干细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)08-0019-08

Evaluation of a nude mouse model of endometriosis fibrosis via the human xenograft subcutaneous transplantation method

ZHOU Xue^{1,2}, WAN Guiping^{1,2*}, ZHANG Zhenzhen^{1,2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China. 2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028)

【Abstract】 **Objective** To assess the feasibility of establishing a nude mouse model of endometriosis fibrosis of human origin and to determine whether endometrial mesenchymal stem cells are involved in inducing endometriosis fibrosis. **Methods** Four endometrial tissue specimens were collected and transplanted 1:3 into 12 BABL/c nude mice by subcutaneous injection. The morphology and volume of the lesions were recorded. The nude mice were sacrificed on the 15th day after transplantation to observe the morphology of the lesions and their adhesion to the periphery of the abdominal wall. HE staining was used to judge the result of modelling, Masson staining was used to assess the extent of fibrosis, and immunofluorescence was used to track the role of endometrial mesenchymal stem cells in the fibrotic process of

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82074319,82174420);江苏省中医药研究院自主科研项目(BM2018024-2019007)。

【作者简介】 周雪(1998—),女,硕士研究生,研究方向:妇科肿瘤临床研究。E-mail:2929229069@qq.com

【通信作者】 张真真(1985—),女,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:干细胞生物学。E-mail:zhenzhen_0618@163.com

万贵平(1964—),男,硕士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:妇科肿瘤临床研究。E-mail:wanguiping@263.net

* 共同通信作者

endometriosis. **Results** The volume of ectopic lesions in nude mice increased over time and showed restricted, vesicular-like changes. The tight adhesion of the lesions to the abdominal wall, endometrioid glands, and collagen fiber deposition were seen microscopically. The success rate of the modelling was 83.4%, and the collagen fiber volume fraction of the lesions was significantly higher after modelling ($P < 0.01$). Confocal imaging suggested that endometrial mesenchymal stem cells (SUSD2⁺) differentiated into myofibroblasts (α -SMA⁺) *in vivo*. **Conclusions** The nude mouse model established by human allogeneic transplantation via subcutaneous injection was consistent with the lesion characteristics of endometriosis fibrosis. The modelling method is simple and feasible and provides a better reference model for further investigating the pathogenesis of endometriosis fibrosis. In addition, *in vivo* observations using the model indicated that endometrial mesenchymal stem cells are involved in inducing the formation of endometriosis fibrosis.

[Keywords] endometriosis; animal model; xenotransplantation; fibrosis; BABL/c nude mice; endometrial mesenchymal stem cells

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

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)指子宫内膜腺体及间质生长在子宫腔以外的部位^[1],因其具有恶性肿瘤过度增殖和侵袭的特性,被称为“良性癌”^[2],困扰着 10%~15%的育龄期女性^[3]。纤维化是其固有的病理学特征^[4],广泛的纤维化是引起 EMS 患者盆腔粘连、疼痛、不孕的主要原因^[5]。EMS 纤维化的发病机制尚未阐明,现有研究发现子宫内膜间充质干细胞(endometrial mesenchymal stem cells, eMSCs)与 EMS 纤维化进程密切相关^[6],重复的腹腔镜监测限制了临床实施对照实验的可能,因此构建可靠的动物模型参考尤为重要。本研究尝试采用皮下注射移植人源子宫内膜组织的方法建立 EMS 纤维化裸鼠模型,评估该模型建立的可能性,在此基础上体内追踪 eMSCs 的命运,为进一步探究 EMS 纤维化的发病机制、药物治疗提供可信的体内研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雌性 SPF 级 BABL/c 裸鼠 12 只,6 周龄,体重 18~22 g。购于扬州大学比较医学中心[SCXK(苏)2022-0009]。在江苏省中医药研究院动物中心进行实验[SYXK(苏)2021-0025],本实验遵循 3R 原则,通过江苏省中医药研究院动物实验伦理审查(AEWC-202211125-250)。

1.1.2 标本

造模所用子宫内膜组织选自 2023 年 3 月,因子宫肌瘤等良性病变在江苏省中西医结合医院行宫腔镜下诊断性刮宫术的患者,共 4 例。患者年龄 23~48 岁,手术前 6 个月内未使用激素类药物、未放置宫内避孕装置,2 例患者宫内物术后病理提示为增

生期子宫内膜,2 例为分泌期子宫内膜。标本获取已通过江苏省中西医结合医院伦理委员会批准(2023-LWKYZ-016)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,PM150316);通用型组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,G1101-500ML);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS,江苏凯基生物技术股份有限公司, KGB5001);青霉素-链霉素溶液(Gibco,美国,15070063); α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(爱必信(上海)生物科技有限公司,abs130621);SUSD2(Sushi domain containing 2)抗体(Sigma,美国,HPA004117)。

1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,1374);电子称量仪(常熟市双杰测试仪器厂, JJ300);脱水机(DIAPATH, Donatello);包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-P5);病理切片机(上海徠卡仪器有限公司, RM2016);冻台(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, KD-P);光学显微镜(奥林巴斯(中国)有限公司, CKX41);眼科剪、眼科镊(山东新华医疗器械股份有限公司);20 mL 一次性使用侧孔无菌溶药注射器,1 mL 一次性使用无菌注射器(山东威高集团医用高分子制品股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本获取与处理

取自宫腔镜下诊刮术的人源子宫内膜由经验丰富的妇科医师留足临床病理送检的部分后收取实验用途。将搔刮的内膜组织 1/4 用于固定和石蜡切片制作,剩余置于 1×青霉素-链霉素溶液中,冰盒转移至生物安全柜处理。将标本按照患者来源依

次编号为 A、B、C、D,同一患者来源的内膜组织用预冷的 PBS 漂洗 3 次后称量并记录重量,内膜组织来源临床资料及漂洗后内膜组织重量见表 1,眼科剪将其分剪成约为 4 mm² 大小的碎片,10~12 块为一组,置于 0.3 mL 的 DMEM/F12 培养基中混合,冰盒转移混悬液至动物房准备接种,标本处理过程控制在 30 min 内。

1.3.2 皮下注射成模

选取裸鼠腹正中线与右下乳头连线中点为进针点,右侧腋下与侧腹壁之间血供丰富处为种植点;用 1 mL 针筒吸取含有内膜组织碎片的混悬液,连接 20 mL 侧孔注射器针头,吸取前均匀吹打,完全吸取组织碎片后排尽空气;左手握抓裸鼠背部皮肤,保持裸鼠头稍低,进针点局部皮肤消毒,针尖开口向上,右手持注射器斜 30° 进针突破进针点皮下后,斜 5° 推针至种植点,回抽无血后将内膜组织缓慢注入;消毒棉签按压进针点,待进针点无液体组织流出轻放回笼,1 例内膜组织标本造 3 只裸鼠。标本获取与处理、皮下注射成模流程如下(图 1)。

1.3.3 病灶取材

造模当日记为 D0, D15 颈椎脱臼法处死裸鼠,消毒腹部皮肤,持眼科剪沿腹中线剪开皮肤,镊子钝性分离暴露异位病灶生长处,剥离异位病灶, PBS 漂洗后 4 °C 固定于通用型组织固定液, 24 h 后梯度脱水、石蜡切片备用。

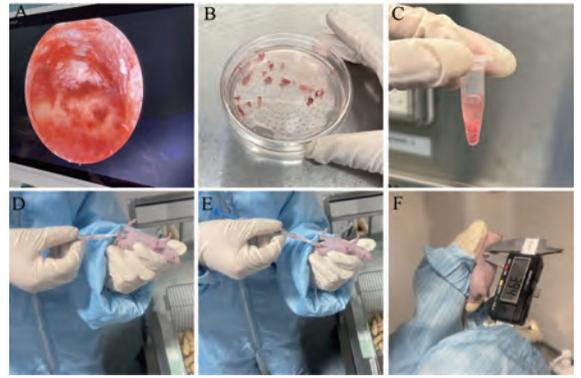
1.3.4 观察指标

裸鼠一般状态及病灶形态肉眼观:自 D0 起每日观察饮食、饮水情况、有无异常活动等,记录每日裸鼠皮表病灶位置、形状、外观, D15 暴露病灶观察其与腹壁粘连情况、表面有无毛细血管覆盖;病灶

表 1 人子宫内膜组织来源临床资料

Table 1 Clinical data of human endometrial tissue in four cases

组织来源 编号 Tissue number	年龄/岁 Age/year	病理类型 Pathological findings	漂洗后子宫内膜 组织重量/g Endometrial tissue weight after rinsing
A	42	子宫内膜增殖期改变 Proliferative endometrium	0.26
B	46	子宫内膜分泌期改变 Secretory endometrium	0.24
C	48	子宫内膜分泌期改变 Secretory endometrium	0.24
D	23	子宫内膜增殖期改变 Proliferative endometrium	0.25



注:A:宫腔镜下搔刮内膜组织;B:内膜组织漂洗;C:制成内膜碎片混悬液;D、E:皮下推送移植术;F:病灶测量。

图 1 人源子宫内膜异位症纤维化裸鼠模型建立

Note. A, Hysteroscopic scratching of endothelial tissue. B, Endothelial tissue rinsing. C, Making an endothelial debris suspension. D/E, Subcutaneous push grafts. F, Lesion measurement.

Figure 1 Establishment of a nude mouse model of endometriosis fibrosis of human origin

体积测量: D1 起用游标卡尺测量皮表病灶的最大直径(L)与最大横径(W),后每隔 1 d 测量 1 次,参照公式 $V = 0.52 \times L \times W^2$ 计算体积,绘制体积生长曲线;镜下组织学改变:将造模后异位病灶及相对应的造模前内膜标本切片进行 HE 染色,比较造模前、后组织形态改变;纤维化程度评估:将切片进行 Masson 染色,镜下观察胶原纤维沉积情况,随机截取镜下($\times 100$) 3 个视野,用 Image J 软件对图像进行分析,比较胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF),即胶原阳性面积与组织总面积的比值;免疫荧光染色:将切片进行免疫荧光染色, DAPI 标记的细胞核,采用 SUSD2 标记子宫内膜间充质干细胞, α -SMA 标记肌成纤维细胞,比较二者共定位情况。

1.4 统计学方法

使用 Graphpad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计分析,正态分布的计量数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述,均数间两两比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较使用双因素方差分析, Tukey 法进行多重比较检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠模型建立情况

2.1.1 裸鼠模型的一般观察及成模率

造模前裸鼠饮食、饮水量正常,反应迅速,状态

活跃,无异常活动;造模后病灶逐渐增大,D10 起各模型裸鼠出现舔舐、搔抓病灶周围皮肤现象的异常活动,状态活跃,兴奋多动,其可能与异位病灶增大、刺激局部神经传导引发疼痛等有关。12 只裸鼠注射部位无感染表现、无死亡,其中组织来源 C 组有 2 只裸鼠的病灶缩小,呈质硬结节改变,后证实造模失败,可能与该组织来源患者的年纪过大(48 岁)、内膜的生长活力差有关,造模成功率为 83.4% (10/12)。

2.1.2 病灶形态肉眼观

D0~D1 移植部位充满混悬液体,范围弥漫;D2

~D4 液体逐渐被吸收,病灶范围局限,位置下移;D5~D7 囊泡样异位病灶形成,皮表可见不规则的椭圆形凸起,透光良好;囊泡样病灶形成后,异位病灶体积缓慢增长;D15 病灶凸起明显,皮表隐约可见病灶周围细小血管,暴露皮肤后,可见内含澄清液体的单个囊泡样病灶,与腹壁、皮下粘连紧密,周围可见呈灰白色的结缔组织增生,病灶的表面覆有丰富毛细血管(图 2)。弥漫局限与囊泡样改变是异位病灶形成过程中最具特征性的两个标志,模型裸鼠多在 D3 时形成局限病灶,囊泡样病灶多在 D5 时出现(图 3)。

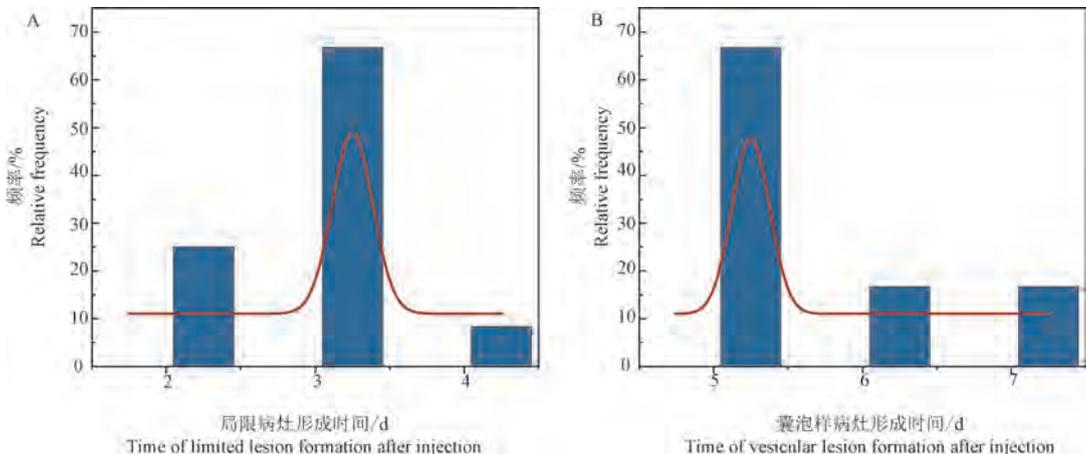


注:A:不同时间下皮表的病灶形态;B:D15 暴露皮肤后病灶形态。

图 2 病灶形态肉眼观

Note. A, Lesion morphology on the skin surface at different times. B, Lesion morphology after skin exposure at D15.

Figure 2 Lesion morphology by naked eyes



注:A:局限病灶形成时间频率分布直方图;B:囊泡样病灶形成时间频率分布直方图。

图 3 特征性病灶形成时间的频率分布直方图

Note. A, Histogram of frequency distribution of limited lesion formation. B, Histogram of frequency distribution of vesicular lesion formation.

Figure 3 Histogram of frequency distribution of characteristic lesion morphology formation

2.2 病灶体积变化

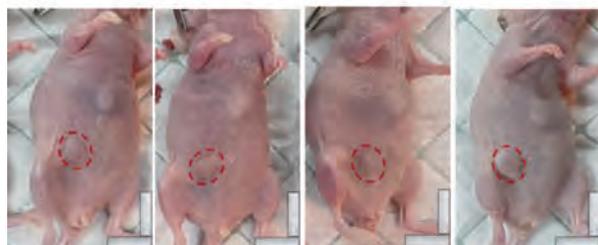
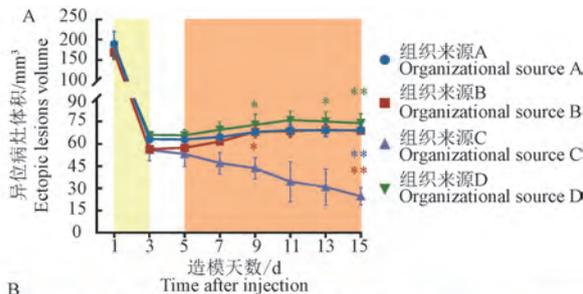
图中黄色区域所示,造模后混悬液液体逐渐被吸收,病灶局限,造模成功的组织来源 A、B、D 裸鼠病灶体积在 D3 时达到谷值,与病灶形态肉眼观察相符;图中橙色区域所示,组织来源 C 裸鼠病灶体积随时间缩小,在 D9、D13 时小于组织来源 B、D 裸鼠病灶,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),D15 时差异显著 ($P < 0.01$),HE 染色评判该组织来源裸鼠中仅有 1 只造模成功,以上提示成功的裸鼠模型病灶随时间增长,其体积的连续测量可直观反映造模结果 (图 4)。

2.3 镜下组织学改变

造模前留存的组织标本具有典型的子宫内膜腺体和间质结构,腺上皮呈柱状排列,核下可见空泡,腺体数目多,形态较为规则,基本无毛细血管及纤维结缔组织增生,或间质较致密,腺体呈增殖期改变;或腺体呈分泌期改变,间质较疏松,与常规病理结果相符。造模后异位病灶腺体丰富,呈不典型增生改变,形态不规则,囊泡增大,或见单个囊泡,其内覆扁平或矮柱状腺上皮,间质厚薄不一,间质邻近有较多毛细血管,纤维组织增生明显 (图 5)。

2.4 纤维化程度评估

Masson 染色后,造模前内膜组织细胞形态正



注:A:病灶体积变化曲线。D9、D13、D15 时,与组织来源 C 裸鼠病灶体积相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B:红色虚线所圈区域依次为 D15 时组织来源 A、B、C、D 裸鼠的皮表病灶。

图 4 病灶体积变化

Note. A, Lesion volume change curve. At D9, D13, and D15, compared with the volume of lesions in tissue-derived C nude mice, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. B, Area circled by the red dotted line is the skin surface lesions of tissue sources A, B, C, and D nude mice at D15.

Figure 4 Lesion volume change

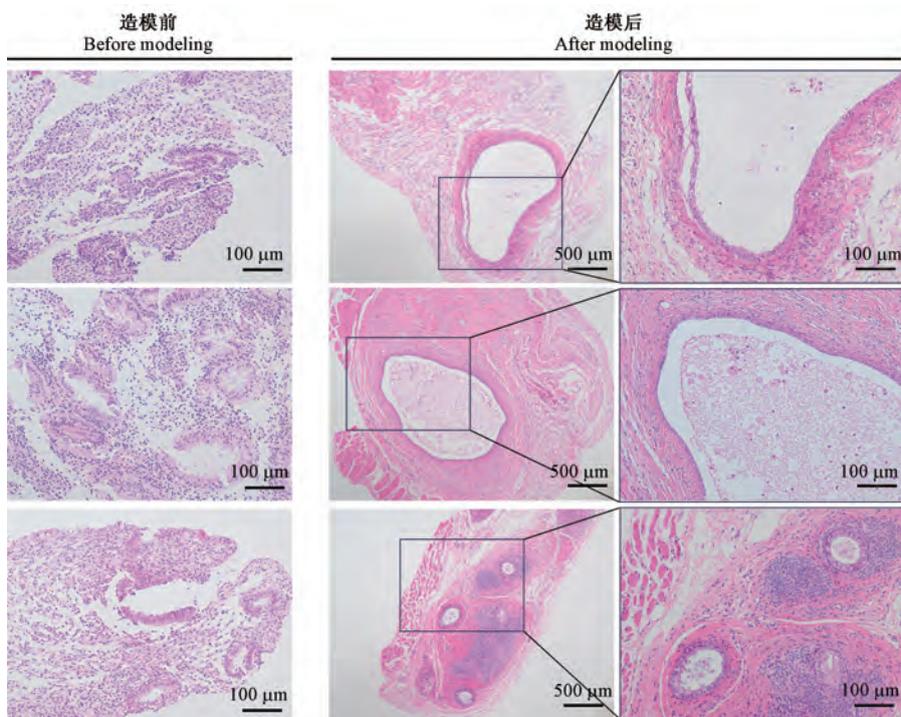


图 5 造模前、后组织学对比

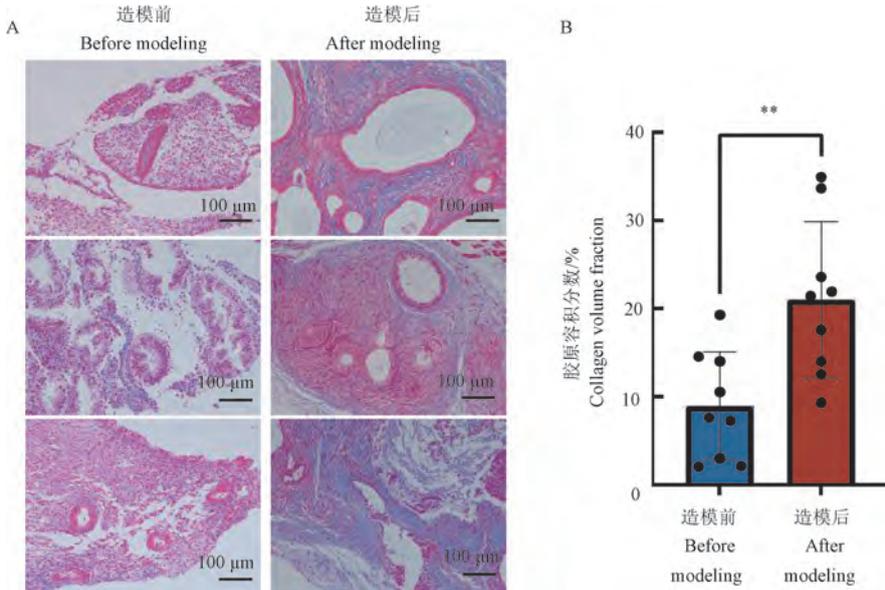
Figure 5 Histological comparison before and after modeling

常,蓝色胶原纤维偶见;而造模后病灶切片镜下可见大量胶原纤维聚集,增大的囊泡内可见少许胶原纤维沉积。造模后病灶组织的胶原纤维容积分数显著升高($P<0.01$),差异有统计学意义(图 6)。

2.5 共聚焦成像结果

共聚焦成像结果显示,用于造模的人源子宫内

膜中,呈绿色的 SUSD2 整齐地表达于血管周,较少见到呈红色的 α -SMA,二者无明显共定位;而造模后,异位病灶中 eMSCs 表达明显增多,并伴随着与 α -SMA 的共定位表达广泛存在(图 7),表明 eMSCs 在 EMS 纤维化病灶形成过程中向肌成纤维细胞分化。



注:A:造模前、后胶原纤维分布;B:造模前、后胶原容积分数。与造模前相比,** $P<0.01$ 。

图 6 造模前、造模后 Masson 染色与 CVF

Note. A, Distribution of collagen fibers before and after modeling. B, Collagen volume fraction before and after modeling. Compared with before modeling, ** $P<0.01$.

Figure 6 Masson staining and CVF before and after modeling

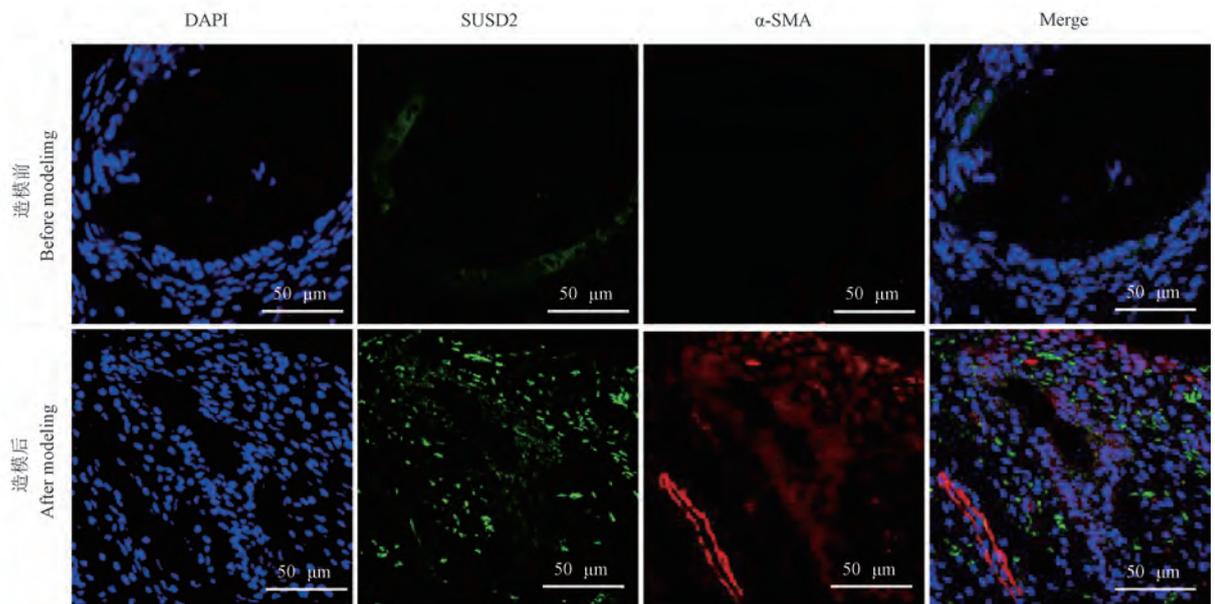


图 7 造模前、后免疫荧光染色对比

Figure 7 Comparison of immunofluorescence staining before and after modeling

3 讨论

纤维化是 EMS 主要的病理组织学特征,多由肌成纤维细胞过度沉积细胞外基质形成^[7-8],抑制纤维化是目前治疗 EMS 的潜在策略^[9-10]。现有报道表明 eMSCs 可以通过向肌成纤维细胞分化^[11-12]或旁分泌途径^[6],参与 EMS 纤维化的进程,然而其研究多缺乏相应的体内验证,因而适宜的动物模型构建可为体外深层次分子机制研究提供印证,是 EMS 纤维化发病机制及治疗药物研究的重要载体。为了确定 eMSCs 在 EMS 纤维化进程中的诱导作用,本实验在成功探索人源 EMS 纤维化裸鼠模型的基础上,利用 SUSD2(eMSCs 的标记物)、 α -SMA(肌成纤维细胞的标记物)对组织切片进行双染色,共聚焦成像结果显示,造模后异位病灶中 eMSCs 表达明显增多,并伴随着与 α -SMA 的共定位表达广泛存在,表明在人源 EMS 纤维化裸鼠体内,eMSCs(SUSD2⁺)可以向肌成纤维细胞(α -SMA⁺)分化。

在既往的动物模型探索中,非人灵长类动物虽具备自发形成 EMS 纤维化的条件^[13],但因成本高、造模成功率低等无法普及^[14]。啮齿类动物成本低廉、造模可行性高被广泛应用于 EMS 动物模型构建^[15],同源异体移植将供体大鼠或小鼠的子宫(包含子宫肌层和子宫内膜)通过腹膜缝合、腹腔注射或皮下注射的方式植入受体大鼠或小鼠体内诱发 EMS 纤维化;人源异种移植解决了同源内膜移植在种属起源、生化特性方面与人类异位病灶间存在差异的问题^[16],BALB/c 裸鼠是理想的人源子宫内膜组织植入受体,Grümmer 等^[17]研究显示造模后 2 d 种植内膜发生附着,第 4~7 天即可在移植灶处观察到血管内生,病灶可在腹膜内维持 4 周。

基于此,本实验采用人源异种皮下注射移植的方法建立 EMS 纤维化裸鼠模型。首先,在移植内膜类型及处理方式选择上,研究提示子宫内膜所处的月经周期对异位病变的影响无显著性差异^[18],使用新鲜的、未经体外培养的子宫内膜组织可明显提高病灶粘附率^[17],本实验利用腔镜可视化的条件,由高年资妇产科医师取材,再经术后病理筛除病变的内膜,确保裸鼠异位病灶保留人源组织的形态特征与生长侵袭活力;其次在移植方法的选择上,腹腔种植法^[14]须经麻醉、腹部切口手术、缝合等步骤,操作耗时长,裸鼠术后感染风险高;腹腔注射法造模后,受肠管蠕动的影响种植部位散在,不利于异位

病灶的定量评估,本实验选用皮下注射的方式,操作简便,节省了麻醉及缝合等步骤,缩短造模时间;此外,研究提示宿主的雌激素水平^[17]、外源性激素的补充^[19]及所处动情周期^[20]不影响异位病灶的形成及移植结果,故本研究造模前不予裸鼠去势或动情周期的统一,造模后也不予裸鼠外源性雌激素的补充。

移植后异位病灶体积增大、肉眼观察到内含澄清液体的类圆形囊状结构是评定模型成功的重要标准^[21],囊泡样异位病灶的形成符合 EMS 诊断中“异位包块”的核心特征,本实验中移植的人源子宫内膜碎片随时间定植、增长,在裸鼠体表即可观察异位病灶形态及生长情况,较为直观,而移植灶逐渐缩小至质硬结节,可用于初步判定造模结局。EMS 镜下病理诊断应至少包含以下三项中的两项^[1]:(1)子宫内膜基质细胞;(2)子宫内膜上皮细胞;(3)子宫内膜样组织内部或周围具有慢性出血征象。本实验对裸鼠异位病灶切片进行 HE 染色,镜下观察到子宫内膜样腺体和间质即判定为造模成功。Masson 染色是评估纤维化程度的重要依据,常用于纤维化相关研究^[22],本实验发现与移植前留存的内膜标本相比,模型移植灶 Masson 染色后镜下可见大量蓝色胶原纤维沉积,胶原纤维容积分数升高明显,提示移植后人源子宫内膜在受体裸鼠体内形成异位病灶的同时发生纤维化,符合 EMS 病变特点。该模型的建立,使体内追踪 eMSCs 命运成为可能,共聚焦成像提示 eMSCs(SUSD2⁺)可以在体内向肌成纤维细胞(α -SMA⁺)分化,这一发现验证了此前相关的体外研究^[11-12],因而在此基础上探究其深入的病理机制、开发 EMS 纤维化临床诊断的新型标志物、筛选治疗该病的有效药物是今后的新方向,以期为 EMS 纤维化患者提供个体化治疗。与此同时,观察到模型裸鼠存在舔舐、搔抓腹部等异常活动,可能与移植后异位病灶生长刺激局部神经传导引发疼痛有关,为在此模型基础上探索 EMS 疼痛模型提供借鉴。

综上所述,本实验采用皮下注射移植的方式将人源子宫内膜组织注射到裸鼠体内,成功建立 EMS 纤维化裸鼠模型,操作简便;通过对异位病灶皮表观察与体积测量初步评估造模成效,镜下组织学观察、纤维化程度评估以判定造模结果,可行性高;成功验证 eMSCs 在体内可以通过向肌成纤维细胞分化从而诱导 EMS 纤维化形成,为从抑制纤维化角度

治疗 EMS、探索 EMS 纤维化发病机制提供较好的模型基础。然而,裸鼠作为免疫缺陷小鼠,其作为造模受体限制了该模型在免疫、炎症等相关领域的研究^[23];此外,皮下移植的术式尚不能替代“逃逸”的子宫内膜碎片组织在盆腹腔中自由粘附、侵袭和血管生成的全过程,忽略了盆腹腔微环境在 EMS 纤维化致病过程中的作用。

参考文献:

- [1] BULUN S E, YILMAZ B D, SISON C, et al. Endometriosis [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(4): 1048-1079.
- [2] VERCELLINI P, VIGANÒ P, SOMIGLIANA E, et al. Endometriosis: pathogenesis and treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(5): 261-275.
- [3] CZYZYK A, PODFIGURNA A, SZELIGA A, et al. Update on endometriosis pathogenesis [J]. *Minerva Ginecol*, 2017, 69(5): 447-461.
- [4] BERNACCHIONI C, ROSSI M, VANNUZZI V, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 is a non-hormonal target to counteract endometriosis-associated fibrosis [J]. *Fertil Steril*, 2024, 121(4): 631-641.
- [5] 王安琪, 孙佳凡, 徐炜, 等. 子宫内位症纤维化相关细胞及其活化机制研究进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(11): 1637-1642.
- WANG A Q, SUN J F, XU W, et al. Research progress of fibrosis-related cells and their activation mechanism in endometriosis [J]. *J Nanjing Med Univ Soc Sci*, 2022, 42(11): 1637-1642.
- [6] LI J, DAI Y, ZHU H, et al. Endometriotic mesenchymal stem cells significantly promote fibrogenesis in ovarian endometrioma through the Wnt/ β -catenin pathway by paracrine production of TGF- β 1 and Wnt1 [J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(6): 1224-1235.
- [7] GARCIA GARCIA J M, VANNUZZI V, DONATI C, et al. Endometriosis: cellular and molecular mechanisms leading to fibrosis [J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(5): 1453-1461.
- [8] VIGANÒ P, OTTOLINA J, BARTIROMO L, et al. Cellular components contributing to fibrosis in endometriosis: a literature review [J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2020, 27(2): 287-295.
- [9] GUO S W. Fibrogenesis resulting from cyclic bleeding: the Holy Grail of the natural history of ectopic endometrium [J]. *Hum Reprod*, 2018, 33(3): 353-356.
- [10] ZHANG L, LI Y, GUAN C Y, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on injured rat endometrium during its chronic phase [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 36.
- [11] ZHANG Z, WANG J, CHEN Y, et al. Activin a promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells via STAT3-dependent Smad/CTGF pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 45.
- [12] ZHANG Z, SUO L, CHEN Y, et al. Endometriotic peritoneal fluid promotes myofibroblast differentiation of endometrial mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 6183796.
- [13] CUI M, LIU Y, MEN X, et al. Large animal models in the study of gynecological diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1110551.
- [14] 孟鑫, 陈景伟. 子宫内位症小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 857-863.
- MENG X, CHEN J W. Research progress in a mouse model of endometriosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(6): 857-863.
- [15] GU Z Y, JIA S Z, LENG J H. Establishment of endometriotic models: the past and future [J]. *Chin Med J*, 2020, 133(14): 1703-1710.
- [16] GRÜMMER R. Animal models in endometriosis research [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(5): 641-649.
- [17] GRÜMMER R, SCHWARZER F, BAINCZYK K, et al. Peritoneal endometriosis: validation of an *in vivo* model [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(8): 1736-1743.
- [18] NISOLLE M, CASANAS-ROUX F, MARBAIX E, et al. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(3): 572-577.
- [19] BELLIARD A, NOËL A, GOFFIN F, et al. Role of endocrine status and cell type in adhesion of human endometrial cells to the peritoneum in nude mice [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(5): 973-978.
- [20] 张薇, 沈洪沁, 黄启玲, 等. 非动情期 SD 大鼠子宫内位症模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(1): 21-24.
- ZHANG W, SHEN H Q, HUANG Q L, et al. Establishment of endometriosis model in SD rats during non-estrus [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2004, 12(1): 21-24.
- [21] 锁澍萱, 张真真, 开红英, 等. 子宫内位症纤维化与 M2 型巨噬细胞的关系 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(12): 1928-1932.
- SUO L X, ZHANG Z Z, KAI H Y, et al. Relationship between fibrosis and M2 macrophages in endometriosis [J]. *J Pract Med*, 2017, 33(12): 1928-1932.
- [22] PARK S J, CHO S W, KIM S M, et al. Assessment of myocardial fibrosis using multimodality imaging in severe aortic stenosis: comparison with histologic fibrosis [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2019, 12(1): 109-119.
- [23] 刘馨雨, 张艳芹, 邓梦琪, 等. 异种移植裸鼠子宫内位症纤维化模型的构建 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2023, 24(4): 397-400.
- LIU X Y, ZHANG Y Q, DENG M Q, et al. Establishment of endometriosis fibrosis nude mice model using xenotransplantation of human endometrium [J]. *Chin J Clin Obstet Gynecol*, 2023, 24(4): 397-400.

任周新,赵鹏,李建生. 烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠肺小动脉病变的评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 27-36.

Ren ZX, Zhao P, Li JS. Evaluation of pulmonary arteriolar lesions in rats induced by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 27-36.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.004

烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠肺小动脉病变的评估

任周新^{1,2}, 赵鹏^{1,2}, 李建生^{1,2*}

(1.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046; 2.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

【摘要】 目的 分析烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染诱导大鼠的肺小动脉形态结构的变化, 评估肺小动脉病变的严重程度。方法 对烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染大鼠的肺组织切片(对照组和模型组)进行分析。维多利亚蓝染色切片用于肺小动脉肌化、血管壁厚度、血管阻塞分值、肌性血管的内膜和中膜厚度以及新生内膜增殖度的检测; HE染色切片用于血管周围炎症细胞浸润及丛状病变等形态的观察和检测; VG染色切片用于内膜胶原纤维和肺小动脉胶原纤维面积百分率的观察和检测。综合以上结果, 按照 Heath-Edwards 标准对肺小动脉病变程度进行评级。结果 对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉, 与对照组比较, 模型组非肌性血管百分率显著减少($P < 0.01$), 肌性血管百分率显著增加($P < 0.01$), 部分肌性血管百分率无显著性差异($P > 0.05$), 非肌性血管壁厚度和肌性血管壁厚度均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$), 非肌性和肌性肺小动脉血管的阻塞分值均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)。对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉, 与对照组比较, 模型组的非肌性血管百分率显著减少($P < 0.05$), 肌性血管百分率和部分肌性血管百分率均无显著性差异($P > 0.05$), 肌性血管壁厚度和血管阻塞分值均显著增加($P < 0.05$), 非肌性血管壁厚度和血管阻塞分值均无显著性差异($P > 0.05$)。对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 或 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺肌性小动脉, 与对照组比较, 模型组内膜厚度和中膜厚度均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$), 血管周围炎症浸润分值均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)。对照组($n=9$)仅1个切片发现新生内膜, 新生内膜增殖度为1.61%。模型组($n=10$), 5个切片存在新生内膜, 新生内膜增殖度从1.04%到17.14%。所有切片均未发现丛状病变。对于血管直径 $\leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉, 与对照组比较, 模型组内膜胶原纤维表达未观察到变化, 血管胶原纤维面积百分率无显著性差异($P > 0.05$)。按照 Heath-Edwards 标准, 模型大鼠的肺小动脉病变未达到 III 级。结论 模型大鼠出现了肺小动脉肌化、内膜和中膜增厚等病理表现, 血管周围存在轻度到中度的炎症反应。较低的新生内膜增殖度和未出现胶原纤维表达的变化及未出现丛状病变, 提示该模型属于 Heath-Edwards 标准的 II 级病变。

【关键词】 肺小动脉重构; II 级病变(Heath-Edwards 分级); 病理学评估; 新生内膜; 丛状病变; 香烟烟雾暴露复合克雷伯杆菌感染; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0027-10

Evaluation of pulmonary arteriolar lesions in rats induced by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection

REN Zhouxin^{1,2}, ZHAO Peng^{1,2}, LI Jiansheng^{1,2*}

(1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan Province and Education Ministry, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Academy of Chinese Medicine Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【基金项目】 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项项目(JDZX2015156); 河南省高等学校重点科研项目(24A360013)。

【作者简介】 任周新(1969—), 男, 高级实验师, 博士, 研究方向: 呼吸系统疾病中医药防治基础研究。E-mail: renzhouxin123@126.com

【通信作者】 李建生(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中医药防治呼吸疾病。E-mail: li_js8@163.com

[Abstract] Objective To analyze the morphological and structural changes to pulmonary arterioles in rats induced by smoke exposure combined with *Klebsiella* infection, and to evaluate the severity of the pulmonary arteriolar lesions.

Methods Pulmonary arteriolar images from lung sections of control and model rats treated with smoke exposure combined with *Klebsiella* infection were analyzed by qualitative and quantitative method. Victorian-blue-stained sections were used for the detection of pulmonary arteriolar muscularization, vascular wall thickness, vascular occlusion score, the intima thickness and media thickness of muscular arterioles, and neointima proliferation. Hematoxylin and eosin-stained sections were used for the observation and detection of inflammatory cell infiltration and plexiform lesions around arterioles. Van Gieson-stained sections were used for the observation of collagen fibers in the intima and detection of the percentage of collagen fiber area in the arteriolar wall. Based on the above analyses, the degree of pulmonary arteriolar pathology was rated according to Heath-Edwards criteria. **Results** For $\leq 50 \mu\text{m}$ diameter arterioles, the percentage of non-muscular vessels was significantly decreased ($P < 0.01$), the percentage of muscular vessels was increased ($P < 0.01$), the percentage of partial muscular vessels was not significantly different ($P > 0.05$), the thicknesses of the non-muscular vessel walls and muscular vessel walls were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$), and the occlusion scores of both non-muscular and muscular pulmonary arterioles were significantly increased in the model group compared with the Control group ($P < 0.05, P < 0.01$). For $50 \mu\text{m} < \text{diameter} \leq 100 \mu\text{m}$ arterioles, the percentage of non-muscular vessels was significantly decreased ($P < 0.05$), the percentages of muscular vessels and partial muscular vessels were not significantly different ($P > 0.05$), the wall thickness and occlusion score of muscular vessels were significantly increased ($P < 0.05$), and the wall thickness and occlusion score of non-muscular vessels were not significantly different in the model group compared with the Control group ($P > 0.05$). Compared with the Control group, the model group showed significantly increased intimal thickness and media thickness and significantly increased perivascular inflammatory infiltration score in both muscular arterioles of $\leq 50 \mu\text{m}$ diameter and $50 \mu\text{m} < \text{diameter} \leq 100 \mu\text{m}$ ($P < 0.05, P < 0.01$). In the Control group ($n = 9$), only one section with two neointimal lesions was found, and the degree of neointima proliferation was 1.61%. In the model group ($n = 10$), five sections had neointima lesions, and the degree of neointima proliferation was 1.04% to 17.14%. No plexiform lesions were found in any section. For pulmonary arterioles with a diameter of $\leq 100 \mu\text{m}$, there was no change in the expression of intimal collagen fibers in the model group compared with the Control group, and there was no significant difference in the percentage of collagen fiber area in the vessel walls ($P > 0.05$). According to Heath-Edwards criteria, the pulmonary arteriole lesions in the model rats did not reach grade III. **Conclusions** The model rats showed pathological manifestations such as pulmonary arteriolar muscularization, thickening of the intima and media, and mild to moderate inflammatory reactions around arterioles. The low amount of neointimal proliferation and collagen fibers in the vascular wall and the absence of plexiform lesions suggest that the model may be up to grade II lesions, according to the Heath-Edwards criteria.

[Keywords] pulmonary arterioles remodeling; grade II lesions (Heath-Edwards classification); pathological evaluation; neointima; plexiform lesions; cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella* infection; rats

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

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 常见于慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 患者。香烟烟雾及致病菌等侵袭肺血管, 导致血管壁及其周围的炎症细胞浸润、血管内皮损伤、平滑肌异常增殖和胶原纤维增生等, 形成肺血管的异常重构和 PH^[1]。烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染的大鼠或小鼠具有典型的 COPD 和 PH 的病理学和病理生理学表现^[2-5]。多项研究发现造模 8 周是一个重要的节点, 此时大鼠肺小动脉表现出管壁异常增厚、管腔狭窄和肺小动脉肌化等病

变, 形成肺动脉高压; 之后, 在正常饲养环境中, 肺小动脉异常病变持续一定时间^[2-5]。

在药效学等研究和临床诊断中, 病理学是评估肺动脉重塑的金标准^[1]。但以往研究在上述模型肺小血管的病理学方面存在不足, 未能阐释肺小动脉是否出现如丛状病变等不可逆性的严重血管病变, 未比较不同直径大小的肺小动脉血管的病变程度以及缺乏血管壁纤维化程度及周围炎症程度的量化评估等。本研究在前期研究的基础上, 应用定性和定量相结合的方法, 对模型大鼠肺小动脉进行

病理形态学的检测与分析,评估肺小动脉异常重构的严重程度,重点诠释肺小动脉的病理损伤相当于 Heath-Edwards 标准的等级,以期 COPD 相关 PH 的肺小动脉重构的机制及药效学研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠,SPF 级,19 只,体重(164.0±17.7)g,购自江苏青龙山生物科技有限公司[SCXK(苏)2017-0001]。大鼠饲养于河南中医药大学动物实验中心[SYXK(豫)2015-0005],饲养和实验过程均符合 3R 原则。本实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(DWLL2018030063)。

1.2 主要试剂与仪器

克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)购自中国食品药品检定研究院,使用前配成 6×10^8 CFU/mL 的混悬液。红旗渠牌过滤嘴香烟(烤烟型,焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 12 mg)由河南中烟工业有限责任公司提供。

戊巴比妥钠购自 Merck 公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色液购自 Beyotime Biotechnology;维多利亚蓝弹力纤维(TANAKE Victoria blue)染色液和 Van Gieson(VG)染色液购自北京索莱宝公司。PE50 导管购自英国 Smith Medical 公司;Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统购自德国 Leica 公司;Image-Pro Plus (IPP) 6.0 专业图像分析系统购自美国 Media Cybernetics 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备和分组

大鼠适应环境 7 d,随机分为对照组($n=9$)和造模组($n=10$),对照组大鼠正常饲养;其余大鼠采用香烟烟雾暴露联合细菌感染的方法制备模型^[2]:大鼠吸气时,经鼻腔滴入 Kp 液 6×10^8 CFU/mL,0.1 mL,每 5 d 1 次,持续 8 周;点燃香烟并使烟熏箱烟雾浓度保持(3000±500) mL/m³,每次 40 min,每天两次,两次烟熏间隔至少 3 h,持续 8 周。造模结束后 4 周处死动物。

1.3.2 实验动物的麻醉、处死和灌注

采用戊巴比妥钠(9 g/L 生理盐水溶液)腹腔注射的方式麻醉大鼠。按照文献^[2]方法分离颈动脉及右颈外静脉;把含肝素的 PE50 导管经右颈外静脉插入肺动脉;之后,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉致

死大鼠;剪断腹主动脉和静脉,经 PE 管先后灌注磷酸缓冲盐溶液和 4% 多聚甲醛,直到腹主动脉无血液流出。

1.3.3 肺组织切片的染色

采用 4% 多聚甲醛固定左肺,乙醇脱水、石蜡包埋和制片,切片厚度 4 μm。采用 HE、TANAKE Victoria blue 和 VG 染色液,分别按照说明书染色切片。

1.3.4 肺小动脉图像的获取

每个样本的 3 种染色的病理切片,分别在 200 倍或 400 倍的光学显微镜下,拍摄并保存所有的肺小血管,以减少人为的选择偏差。按照图 1 所示,对肺小血管进行病理形态学检测和分析。

1.3.5 肺小动脉肌化的评估

维多利亚蓝弹力纤维染色的切片用于肺小动脉肌化的检测。参照文献^[6-7]并略作修改,选择最长直径(外层弹力板围绕)≤50 μm 或 50 μm<最长直径≤100 μm 的血管并且最长/最短直径比<2 的血管,用于肺小动脉肌化程度的评估。肺动脉肌化程度按如下标准分类:肌性动脉,含有双层弹力板且超过血管周长的一半;部分肌性动脉,含有双层弹力板但不足血管周长的一半;非肌性动脉,含有一层弹力板。计算各型小动脉数量占总小动脉数量的百分率。

1.3.6 肺小动脉壁厚度和肺小动脉阻塞的评估

参照文献^[6],选择维多利亚蓝弹力纤维染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕)≤50 μm 或 50 μm<最长直径≤100 μm 的血管,排除最长/最短直径比>2、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。合格的血管应用 Image Pro Plus 6.0 软件描记血管的外弹力板,闭合曲线的面积为血管的面积(area 1)。以 $2 \times \sqrt{\text{area}1/\pi}$ 作为该面积的直径,标识为 outer Φ。描记血管腔,获得相应的面积(area 2),以 $2 \times \sqrt{\text{area}2/\pi}$ 作为该面积的直径,标识为 lumen Φ。按照公式 $(\text{outer } \Phi - \text{lumen } \Phi)/2$ 计算血管壁厚度,按照公式 $100 \times [(\text{outer } \Phi - \text{lumen } \Phi)/\text{outer } \Phi]$ 计算血管阻塞分值。

1.3.7 肺肌性小动脉内膜及中膜厚度的评估

选择维多利亚蓝弹力纤维染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕)≤50 μm 或 50 μm<最长直径≤100 μm 的血管,排除最长/最短直径比>2、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。采用 Image Pro Plus 6.0 软件描记内弹力板,获得闭合曲



图 1 肺小血管病理形态学检测流程图

Figure 1 Process of pathomorphological examination of pulmonary arterioles

线的面积(area 3);以 $2 \times \sqrt{\text{area}3/\pi}$ 作为该面积的直径,标识为 Inner Φ 。按照公式 $(\text{outer } \Phi - \text{Inner } \Phi)/2$ 计算血管中膜厚度, $(\text{Inner } \Phi - \text{lumen } \Phi)/2$ 计算血管内膜厚度。

1.3.8 新生内膜血管的判断

选择维多利亚蓝弹力纤维染色的切片,分析直径 $\leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,计算新生内膜增殖度^[6,8]。新生内膜增殖度/% = 新生内膜血管数/总血管数 $\times 100\%$ 。新生内膜的判别标准^[6]为:含有外弹力板,内弹力板不完整,在内弹力板内侧与内皮之间存在新生内膜,并存在管腔阻塞。

1.3.9 血管周围炎症细胞浸润的评估

选择 HE 染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕) $\leq 50 \mu\text{m}$ 或 $50 \mu\text{m} < \text{最长直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的血管,排除最长/最短直径比 > 2 、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。参照文献^[9],半定量评价小动脉壁炎症细胞浸润程度,即:无:记 0 分;轻度:记 1 分,炎症细胞浸润血管壁周围不超过 25%;中度:记 2 分,炎症细胞浸润血管壁周围在 25% ~ 50%;重度:记 3 分,炎症细胞浸润血管壁周围在 50% ~ 75%;极重度:记 4 分,炎症细胞浸润血管壁周围在 75% 以上。

1.3.10 血管腔狭窄及丛状病变的观察

选择 HE 染色的切片,选择最长直径(外层弹力板围绕) $\leq 50 \mu\text{m}$ 或 $50 \mu\text{m} < \text{最长直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的血管,排除最长/最短直径比 > 2 、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。计数管腔狭窄并且具有多个狭小通道或单个狭小通道的血管,计算其占检测血管的百分率。参照文献的描述^[10-12]判断样本中肺小动脉丛状病变出现的百分率,丛状病变的组织形态为茎样血管腔内生长(stalk-like)型丛状病变或动脉瘤样血管腔外生长(aneurysm-like)丛状病变,后者病变呈血管球状结构;丛状病变的病灶内细胞核深染卵圆形,相邻细胞之间存在“缝隙样”通道(slit-like channel)。

1.3.11 血管胶原纤维增生的检测

选择 VG 染色的切片,按照染色结果判断:胶原纤维呈鲜红色,肌纤维和红细胞呈黄色,细胞核呈蓝色或蓝黑色。选择直径 $\leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,排除最长/最短直径比 > 2 、圆形不完整或塌陷超过血管壁 1/4 的血管。观察胶原纤维的表达。参照文献^[13],应用 Image Pro Plus 6.0 软件检测胶原纤维面积、血管壁面积,计算二者比值。即胶原纤维面积百分率/% = 胶原纤维面积/血管壁面积 $\times 100\%$ 。

1.3.12 Heath-Edwards 评估

以临床 PH 的肺血管病理形态学的 Heath-Edwards 分类标准为基础^[14],参照 PH 大鼠的研究资料^[6,11-12],将大鼠的肺小动脉病理损伤分为 4 级,即:I 级,血管中膜肥厚,内膜没有增生;II 级,血管中膜肥厚,伴有内膜增厚;III 级,内膜纤维增生或多数血管(至少 50%)具有新生内膜;IV 级,丛状病灶。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间样本均数比较采用两样本均数的 Unpaired *t* test 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 两组大鼠的肺小动脉血管分型

维多利亚蓝染色大鼠肺动脉壁弹力纤维,按照弹力纤维完整程度,将肺小动脉区分为非肌性血管(non-muscular pulmonary arterioles, N-MPA)、部分肌性血管(partial muscular pulmonary arterioles, P-MPA)和肌性血管(muscular pulmonary arterioles, MPA),见图 2。对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的非肌性血管百分率显著减少($P < 0.01$),肌性血管百分率显著增加($P < 0.01$),部分肌性血管百分率无显著性差异($P >$

0.05)。对于 $50 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的非肌性血管百分率显著减少($P < 0.05$),肌性血管百分率和部分肌性血管百分率均无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 两组大鼠的肺小动脉壁厚度和血管阻塞分值

对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的非肌性血管壁厚度和肌性血管壁厚度均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$),模型组的非肌性和肌性肺小动脉血管的阻塞分值均显著增加($P < 0.05, P < 0.01$)。对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的肌性血管壁厚度和血管阻塞分值均显著增加($P < 0.05$),非肌性血管的血管壁厚度和血管阻塞分值均无显著性差异($P > 0.05$)。见图 3,表 2、表 3。

2.3 两组大鼠的肺肌性小动脉内膜厚度和中膜厚度

对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的内膜厚度显著增加($P < 0.01$),中膜厚度显著增加($P < 0.01$)。对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的内膜厚度显著增加($P < 0.05$),中膜厚度显著增加($P < 0.05$)。见表 4 和图 3。

2.4 两组大鼠的肺小动脉新生内膜的观察结果

按照 van der Feen 等^[6]原则判断肺小动脉的新

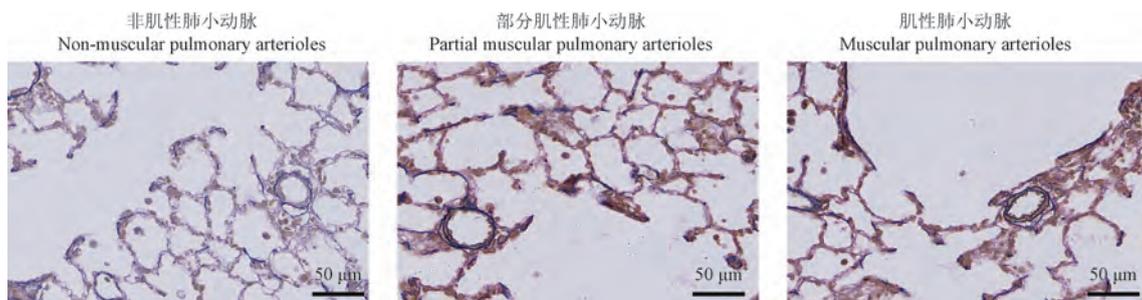


图 2 非肌性、部分肌性和肌性肺小动脉的形态(维多利亚蓝弹力纤维染色)

Figure 2 Morphology of non-muscular, partial muscular and muscular pulmonary arterioles (TANAKE Victoria blue stain)

表 1 两组大鼠的肺小动脉中非肌性、部分肌性和肌性血管百分率($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Percentages of N-MPA, P-MPA and MPA of rats between the two groups

直径/ μm Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	非肌性血管 N-MPA	部分肌性血管 P-MPA	肌性血管 MPA
$50 \leq D$	对照组 Control group	81.31±9.25	7.79±4.37	10.90±9.14
	模型组 Model group	64.68±11.55**	10.01±5.91	25.31±9.37**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	49.70±10.27	9.85±4.68	40.45±11.55
	模型组 Model group	38.67±12.08*	11.45±5.85	49.61±13.01

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

生内膜,见图 4。对照组 9 只大鼠中,1 只发现 2 个小动脉出现新生内膜,新生内膜增殖度为 1.61%,其它大鼠未发现新生内膜形成。模型组 10 只大鼠中,5 只大鼠未发现肺小动脉的新生内膜形成;5 只大鼠的肺小动脉存在新生内膜,新生内膜增殖度依次为:1.04%、1.12%、10.17%、11.44%和 17.14%。

2.5 两组大鼠的血管周围炎症细胞浸润及丛状病变等形态观察结果

对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的血管周围炎症浸润评分显著增加 ($P < 0.01$);对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,与对照组比较,模型组的血管周围炎症浸润评分显著增加 ($P < 0.05$)。该结果提示,模型大鼠的肺血管周围具有明显的炎症浸润现象。在较为严重的血管腔狭窄的形态上,两者区别明显,对于血管直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,管腔狭窄且具有多个狭小的通道或单个狭小通道的百分率,对照组与模型组分别为 0.90%和 5.54%;对于 $50 \mu\text{m} < \text{血管直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉,管腔狭窄且具有多个狭小的

通道或单个狭小通道的百分率,对照组与模型组分别为 0.56%和 3.86%。所有样本的血管,均未发现丛状病变。见表 5 和图 5。

2.6 两组大鼠肺小动脉胶原纤维的表达

如图 6 所示,胶原纤维在血管壁均有分布,模型组血管内膜(血管腔到内弹力膜之间)的胶原纤维

表 3 两组大鼠的肺小动脉血管阻塞分值 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 Occlusion score of small pulmonary arterioles of rats between the two groups

直径/ μm Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	非肌性血管 N-MPA	肌性血管 MPA
$50 \leq D$	对照组 Control group	16.64 \pm 3.87	24.10 \pm 7.48
	模型组 Model group	23.40 \pm 6.17*	39.15 \pm 9.50**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	20.67 \pm 7.29	21.73 \pm 5.39
	模型组 Model group	23.38 \pm 10.61	30.16 \pm 8.76*

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 两组大鼠的肺肌性小动脉内膜和中膜厚度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

Table 4 Small pulmonary arterial wall thickness of rats between the two groups

直径/ μm Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	内膜厚度 Intima thickness	中膜厚度 Media thickness
$50 \leq D$	对照组 Control group	1.860 \pm 0.413	2.354 \pm 0.816
	模型组 Model group	2.826 \pm 0.903**	3.940 \pm 0.906**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	2.308 \pm 0.718	3.588 \pm 0.875
	模型组 Model group	3.276 \pm 1.078*	5.433 \pm 2.302*

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 两组大鼠的肺小动脉壁厚度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)
Table 2 Small pulmonary arterial wall thickness of rats between the two groups

直径/ μm Diameter, <i>D</i>	组别 Groups	非肌性血管 N-MPA	肌性血管 MPA
$50 \leq D$	对照组 Control group	2.400 \pm 0.555	4.213 \pm 1.160
	模型组 Model group	3.405 \pm 1.230*	6.767 \pm 1.537**
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	5.418 \pm 2.180	6.000 \pm 1.298
	模型组 Model group	6.497 \pm 3.352	8.709 \pm 3.160*

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

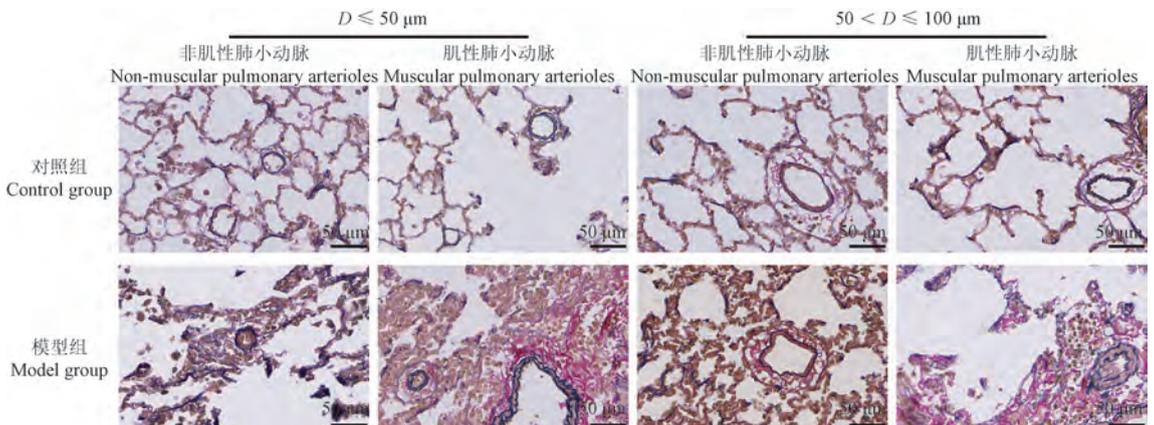


图 3 大鼠肺小动脉壁的形态表现(维多利亚蓝弹力纤维染色)

Figure 3 Morphology of pulmonary arterial wall in rats (TANAKE Victoria blue stain)

未见明显变化。另外,模型组的外弹力膜周围有炎症细胞浸润的部分血管,外弹力膜完全被胶原纤维包绕(模型组 1)或几乎无胶原纤维包绕(模型组 2)。对照组部分血管的外弹力膜周围没有或较少炎症细胞,但也存在完全包绕(对照组 1)或无包绕(对照组 2)的表现。检测血管直径 $\leq 100 \mu\text{m}$ 的肺小动脉血管胶原纤维面积百分率,与对照组 ($9.28 \pm 4.19\%$) 比较,模型组 ($11.28 \pm 3.84\%$) 未见显著变化 ($P > 0.05$)。

2.7 模型大鼠肺小动脉的 Heath-Edwards 等级评估

综合上述分析结果,与对照组比较,模型组大鼠的肺小动脉血管中膜增厚,伴有内膜增厚等,按照 Heath-Edwards 标准,属于 II 级。未出现丛状病灶的形态结果,确认没有 IV 级病理改变。未发现明显的内膜胶原纤维增生;部分样本出现新生内膜,但在全部检测的肺小动脉血管中,具有新生内膜的血管的百分率较低,根据上述形态结果判断未达到 III 级标准。

表 5 两组大鼠的肺小动脉炎症评估及丛状病变观察结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Inflammation scores of small pulmonary arterioles and plexiform lesions of the vessels between the two groups

直径/ μm Diameter, D	组别 Groups	炎症分值 Inflammation score (score/avessel)	丛状病变 百分率/% Plexiform lesions
$50 \leq D$	对照组 Control group	1.228 ± 0.590	0
	模型组 Model group	$2.005 \pm 0.552^{**}$	0
$50 < D \leq 100$	对照组 Control group	1.611 ± 0.551	0
	模型组 Model group	$2.271 \pm 0.525^*$	0

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

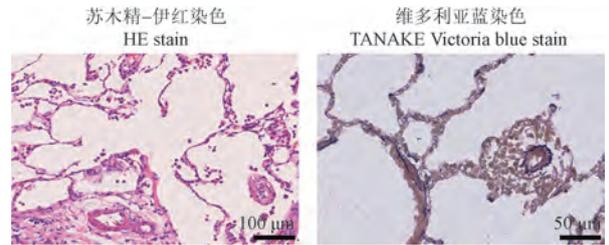


图 4 肺小动脉新生内膜的形成

Figure 4 Neointima formation in a arteriole

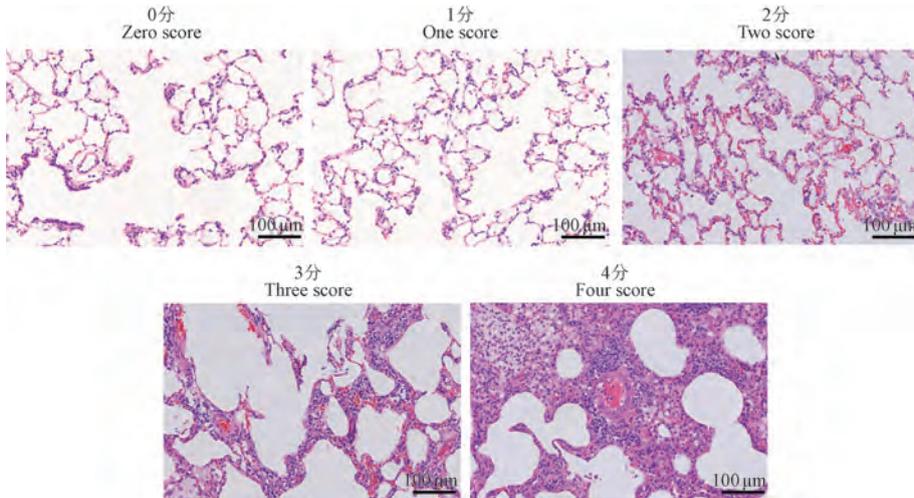


图 5 肺小动脉周围的炎症细胞浸润评分(HE 染色)

Figure 5 Scores of inflammatory cells infiltration around a pulmonary arteriole (HE stain)

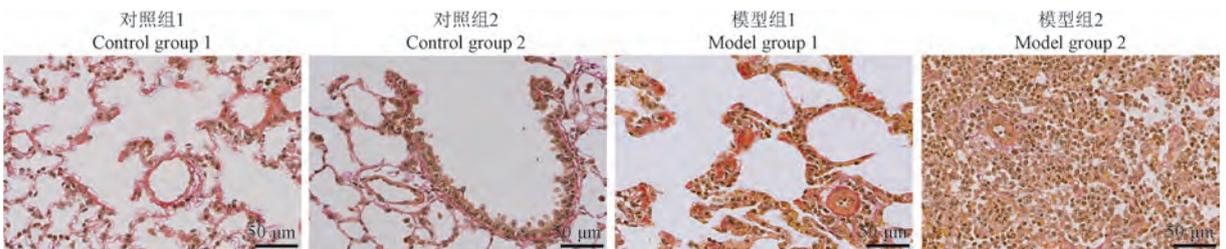


图 6 肺小动脉胶原纤维的表达(Van Gieson 染色)

Figure 6 Collagen fibers of pulmonary arterioles (Van Gieson stain)

3 讨论

烟草烟雾暴露是人类和多种实验动物 COPD 的主要病因之一。两者的病理表现具有高度的相似性。其中,烟雾的有害气体成分及有害颗粒损害肺血管,进而发展成肺动脉高压。病因相同和基本病理过程的相似性,使烟草烟雾暴露成为 COPD 合并肺动脉高压的理想造模方法,在药效学评估及疾病机制研究中得到广泛的应用。细菌感染加重肺血管周围的炎症反应等,进一步恶化肺小血管的异常重构。因此,烟草烟雾暴露结合细菌感染的复合打击,加速了肺小血管异常重构的形成与发展,恶化了肺小血管的损伤程度^[3]。前期的研究发现,烟雾暴露联合克雷伯杆菌感染大鼠或小鼠具有典型的 COPD 和 PH 的病理学和病理生理学表现,多项研究发现造模 8 周是一个重要的节点,此时肺小动脉表现出管壁异常增厚、管腔狭窄和肺小动脉肌化等病变,形成肺动脉高压;之后,在正常饲养环境中,肺小动脉病变能够至少持续 4 周^[2-5]。

在前期研究的基础上,本研究取得了一些新的发现。其一为不同直径的肺小动脉的肌化程度存在差异。文献中用于评估肺小动脉肌化的血管直径(直径)主要分为 $\leq 50 \mu\text{m}$ ^[6-7]和 $\leq 100 \mu\text{m}$ ^[2,15-16]的两类。本次研究发现,与对照组比较,模型组直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 和 $50 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 肺小动脉的非肌性血管百分率均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),模型组直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 肺小动脉的肌性百分率显著升高($P < 0.01$);但模型组 $50 \mu\text{m} < \text{直径} \leq 100 \mu\text{m}$ 肺小动脉的肌性百分率未见显著升高($P > 0.05$)。该结果提示,较小的肺小动脉对于外界不良刺激的敏感性更高而更易于肌化。该结果与张蕙等^[17]的发现一致。另外,小静脉的直径 $> 50 \mu\text{m}$ ^[18]可能出现平滑肌层和弹力膜^[19],形态与非肌性小动脉易于混淆。因此,选择直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的血管能减少小静脉计数为非肌性小动脉的错误,分析结果更为可靠。综上所述,建议选择 $\leq 50 \mu\text{m}$ 的肺小动脉用于肺小动脉肌化的评估。其二则是发现肌性的肺小动脉血管壁的增厚,不仅包括中膜增厚,还表现为内膜增厚。这产生了新的问题:增厚的内膜是否出现某些重度的异常形态,如新生内膜形成、纤维增生,甚至丛状病灶。

目前认为,炎性细胞在受损血管周围浸润,随后释放趋化、黏附和生长因子,刺激血管平滑肌细

胞通过内弹力膜迁移到内皮下,化生为新生内膜并增生。此过程中,内弹力膜的受损而丧失完整性是新生内膜形成的重要条件^[20]。因此,内弹力膜不完整和内壁至内弹力膜之间存在新生组织是判断肺小动脉新生内膜的标准^[6]。对照组中罕见新生内膜的血管(在 11.1% 的样本发现;发现样本中,新生内膜增殖度仅为 1.61%);模型组中,50% 的样本中发现新生内膜的血管,这些样本中,最高的新生内膜增殖度达到 17.1%。新生内膜属于 Heath-Edwards 分级的 III 级病变,是进行性 PH 区别于可逆轻症 PH 的病理学标志^[6,20]。尽管部分模型大鼠中出现该病变,但具有新生内膜的大鼠个体在整个群体中的比例未超过 50%;即使出现新生内膜,最高个体的新生内膜增殖度过低,达不到文献报道的至少 50% 的水平^[6,8]。

模型大鼠的肺小动脉的血管周围存在明显的炎症细胞浸润,部分血管的外膜破坏,炎症细胞聚集在外弹力膜的局部,甚至出现外弹力膜缺失而被增生的胶原纤维修复的现象。但 VG 染色的图像定量分析的结果表明,与对照组比较,尽管模型大鼠的血管壁胶原纤维面积百分率有所升高,但两组之间的差异无统计学意义。另外,血管腔到内弹力膜之间区域也未观察到胶原纤维的变化。这可能反映了炎症细胞分泌的某些酶等对纤维成分的破坏和胶原增生之间,达到了平衡状态。该结果也支持模型大鼠的病变血管未达到 III 级水平。

按照 Heath-Edwards 的分级,经典的 PH 动物模型,如单纯的野百合碱或低氧肺动脉高压大鼠或小鼠的肺血管异常重构,归类于 I 级到 II 级。在自然环境下,这些病变能够自然逆转而恢复^[21-22]。因此,这些模型不能模拟不可逆性或进行性的肺血管异常重构,即 III 级和 IV 级的病变。为了建立严重的模型,人们发现采取复合攻击的模式,是建立严重肺血管重构的有效方法。如左肺切除+野百合碱注射的大鼠出现普遍的新生内膜增生,新生内膜增殖度达到 54.5% ~ 88.5%^[6,8];皮下注射 3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidene]-indolin-2-one (SU-5416)+慢性低压低氧环境的大鼠出现新生内膜病变和严重的丛状病变,达到了 IV 级别^[12]。那么,烟草烟雾暴露复合克雷伯杆菌感染是否导致大鼠出现严重的病变呢? 本研究的结果表明,大鼠的肺血管异常重构属于 II 级标准,未达到 III 级标准。但已经出现了一定程度的新生内膜,这为后续开展以

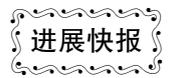
烟草烟雾暴露为基础,建立严重肺小动脉异常重构(至少 III 级)为特征的 COPD 大鼠模型奠定了基础。

参考文献:

- [1] 廖艺璇,陈亚红,米文君.慢性阻塞性肺疾病肺血管重塑的研究进展[J].生理科学进展,2016,47(4):295-299.
LIAO Y X, CHEN Y H, MI W J. Research progress of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Prog Physiol Sci, 2016, 47(4): 295-299.
- [2] 任周新,余海滨,梅晓峰,等.补肺益肾组方Ⅲ对大鼠实验性肺动脉高压的改善作用[J].吉林大学学报(医学版),2023,49(2):280-288.
REN Z X, YU H B, MEI X F, et al. Improvement effect of Bufei Yishen prescription Ⅲ on experimental pulmonary hypertension of rats [J]. J Jilin Univ Med Ed, 2023, 49(2): 280-288.
- [3] 崔莉莉,梅晓峰,卢瑞龙,等.不同刺激因素诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠模型肺小血管重塑的比较研究[J].中国比较医学杂志,2022,32(12):24-31.
CUI L L, MEI X F, LU R L, et al. Comparative study of pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease mouse models induced by different stimuli [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 24-31.
- [4] 李建生,秦燕勤,田燕歌,等.补肺益肾组方Ⅱ活性成分优化及组方Ⅲ的建立[J].中华中医药杂志,2023,38(6):2526-2532.
LI J S, QIN Y Q, TIAN Y G, et al. Optimization of active ingredients of effective-component compatibility of Bufei Yishen Formula(ECC-BYF) Ⅱ and the establishment of ECC-BYF Ⅲ [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(6): 2526-2532.
- [5] ZHANG L, TIAN Y, ZHAO P, et al. Electroacupuncture attenuates pulmonary vascular remodeling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease via the VEGF/PI3K/Akt pathway [J]. Acupunct Med, 2022, 40(4): 389-400.
- [6] VAN DER FEEN D E, WELJ M, SMIT-VAN OOSTEN A, et al. Shunt surgery, right heart catheterization, and vascular morphometry in a rat model for flow-induced pulmonary arterial hypertension [J]. J Vis Exp, 2017(120): 55065.
- [7] MAVROGIANNIS E, HAGDORN Q A J, BAZIOTI V, et al. Pirfenidone ameliorates pulmonary arterial pressure and neointimal remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. Pulm Circ, 2022, 12(3): e12101.
- [8] 刘斌,王献民,魏丽,等.4种肺动脉高压动物模型肺血管重构模式的差异研究[J].中国病理生理杂志,2008,24(2):289-293.
LIU B, WANG X M, WEI L, et al. Differentiation of pulmonary vascular remodeling pattern in 4 models of pulmonary hypertension [J]. Chin J Pathophysiol, 2008, 24(2): 289-293.
- [9] 丁永杰,张本炎,李敏.辛伐他汀早期与后期干预野百合碱诱导肺动脉高压大鼠的研究[J].中国呼吸与危重监护杂志,2017,16(1):64-70.
DING Y J, ZHANG B Y, LI M. Protective effects of simvastatin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2017, 16(1): 64-70.
- [10] GERGES C, GERGES M, FRIEWALD R, et al. Microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: hemodynamic phenotyping and histomorphometric assessment [J]. Circulation, 2020, 141(5): 376-386.
- [11] 蒋晓敏,周陵,陈绍良.肺动脉高压肺血管丛状病变的研究进展[J].中国病理生理杂志,2014,30(8):1519-1522.
JIANG X M, ZHOU L, CHEN S L. Progress in plexiform lesion of pulmonary hypertension [J]. Chin J Pathophysiol, 2014, 30(8): 1519-1522.
- [12] ABE K, TOBA M, ALZOUBI A, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2010, 121(25): 2747-2754.
- [13] 何骑伟,徐勇刚,廖艳彪,等.薯蓣皂苷元干预对野百合碱诱导肺动脉高压大鼠的影响[J].湖南师范大学学报(医学版),2015,12(2):21-24.
HE Q W, XU Y G, LIAO Y B, et al. The effects of diosgenin on monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. J Hunan Norm Univ Med Sci, 2015, 12(2): 21-24.
- [14] 马胜军,刘桂清,马增山,等.先天性心脏病伴肺动脉高压患者血清血管内皮生长因子与肺细小动脉形态变化的关系[J].中华心血管病杂志,2004,32(1):40-43.
MA S J, LIU G Q, MA Z S, et al. Relationship of serum vascular endothelial growth factor and the pulmonary vessel micromorphometric indexes in patients with congenital heart disease complicated by pulmonary hypertension [J]. Chin J Cardiol, 2004, 32(1): 40-43.
- [15] 樊梅,邓俊,王宋平.阿奇霉素对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺血管重构的影响[J].中国呼吸与危重监护杂志,2018,17(2):128-133.
FAN M, DENG J, WANG S P. The effect of azithromycin on pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2018, 17(2): 128-133.
- [16] 刘晓黎,王昌明,蒋明,等.NF-κB在大鼠COPD中的表达及PDTC与肺血管重构的关系[J].安徽医科大学学报,2018,53(10):1503-1508.
LIU X L, WANG C M, JIANG M, et al. The expression of NF-κB in rats with COPD and the correlation between PDTC and pulmonary vascular remodeling [J]. Acta Univ Med Anhui, 2018, 53(10): 1503-1508.
- [17] 张蕙,刘宏津,黄文辉,等.左心疾病所致的肺动脉高压大鼠模型中肺血管重构特点[J].中华医学杂志,2018,98(28):2269-2274.
ZHANG H, LIU H J, HUANG W H, et al. Characteristics of pulmonary vascular remodeling in rat model of pulmonary

- hypertension in left heart disease [J]. Natl Med J China, 2018, 98(28): 2269-2274.
- [18] 田牛. 微循环学 [M]. 北京: 原子能出版社, 2004.
TIAN N. Microcirculation [M]. Beijing: Atomic Energy Press, 2004.
- [19] 河北医学院《人体解剖学》编写组. 人体解剖学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
Writing group of Hebei Medical College for human anatomy. Human anatomy [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978.
- [20] 袁吉祥, 张亮, 魏述军. 血管损伤对新生内膜增生的影响 [J]. 中国循环杂志, 2016, 31(12): 1210-1214.
YUAN J X, ZHANG L, WEI S J. Impact of vascular injury on neointimal hyperplasia in experimental rabbit model [J]. Chin Circ J, 2016, 31(12): 1210-1214.
- [21] RUITER G, DE MAN F S, SCHALIJ I, et al. Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model [J]. Eur Respir J, 2013, 42(2): 553-556.
- [22] 刘云, 孙增先. 肺动脉高压动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 236-241.
LIU Y, SUN Z X. Research progress in animal models of pulmonary arterial hypertension [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 236-241.

[收稿日期]2024-03-01



综述:斑马鱼模型在肠道微生物研究中的应用

斑马鱼作为一种可靠的肠道微生物研究模型,由于其成本低、遗传和发育一致性强、无菌胚胎制备的高效性、高通量化学筛选的有效性、体内活体成像的便利性及生物学重复程度高等优势,已被广泛用于微生物-宿主的相互作用和评估环境污染物的毒性研究。本文首先比较了斑马鱼模型与常见动物模型应用于宿主稳态和肠道微生物研究中存在的优势和局限性;重点对斑马鱼模型在肠道微生物与宿主发育、肠脑轴、免疫应答和代谢途径等方面研究的应用进行总结;同时,详细汇总了斑马鱼肠道微生物与环境污染物的毒理学评价、病原感染过程的探索以及益生菌应用等方面研究的进展情况。

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): 323-336. <https://doi.org/10.1002/ame2.12227>)。

左一鸣,杨智涵,史国花,等. 基于文献计量学的中医药治疗老年疾病潜在优势病种研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 37-49.

Zuo YM, Yang ZH, Shi GH, et al. Research on potential dominant diseases of traditional Chinese medicine in the treatment of geriatric diseases based on bibliometrics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 37-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.005

基于文献计量学的中医药治疗老年疾病潜在优势病种研究

左一鸣^{1,2}, 杨智涵^{1,2}, 史国花^{1,2}, 吕仕超^{1,2*}, 刘学政^{1,2*}

(1.天津中医药大学第一附属医院,天津 300381;2.国家中医针灸临床医学研究中心,天津 300381)

【摘要】 目的 采用文献计量学方法探究中医药治疗老年疾病的潜在优势病种,以期在临床中更好地发挥中医药治疗的特色和优势。**方法** 检索近10年在知网、万方、维普、中国生物医学数据库中收录的中医药治疗老年疾病的临床研究文献,统计并分析各疾病的研究变化趋势及临床有效率,以确定中医药治疗的潜在优势病种。**结果** 检索共获得文献22 859篇,最终纳入研究3768篇,根据世界卫生组织关于疾病和有关健康问题的国际统计分类(ICD-11)将疾病归为17类,共149个病种,主要以循环系统、骨骼肌肉系统或结缔组织系统、消化系统为主。**结论** 中医药治疗老年疾病的临床研究涉及病种广泛,但分布不均,最终确定潜在优势病种为骨质疏松、便秘、高血压,潜在次优势病种为心力衰竭、脑卒中、冠心病、糖尿病及其并发症、失眠。

【关键词】 文献计量学;中医药;老年疾病;优势病种

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)08-0037-13

Research on potential dominant diseases of traditional Chinese medicine in the treatment of geriatric diseases based on bibliometrics

ZUO Yiming^{1,2}, YANG Zhihan^{1,2}, SHI Guohua^{1,2}, LYU Shichao^{1,2*}, LIU Xuezheng^{1,2*}

(1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China.

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381)

【Abstract】 Objective Bibliometric approaches are used to investigate the characteristics and benefits of traditional Chinese medicine treatments for dominant diseases that can be applied in clinical therapy to effectively manage geriatric diseases. **Methods** Clinical research literature on the use of traditional Chinese medicine in the treatment of geriatric diseases within the past 10 years was retrieved from CNKI, Wanfang, VIP, and CBM databases. The research trends and clinical efficiency of each disease were statistically analyzed to determine the dominant diseases of TCM. **Results** A total of 22 859 articles were collected, with 3768 included in the research. In accordance with the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-11) of the World Health Organization, the diseases were classified into 17 categories and 149 diseases. The diseases primarily affect the circulatory system, skeletal

【基金项目】 国家中医药管理局:中医药循证能力提升项目。

【作者简介】 左一鸣(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治老年常见病、多发病。E-mail: zuoyim99525@163.com

【通信作者】 吕仕超(1985—),男,主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治老年常见病、多发病。E-mail: 372272027@qq.com

刘学政(1975—),男,主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治老年常见病、多发病。E-mail: drhare1975@163.com

* 共同通信作者

musculoskeletal or connective tissue system, and digestive system. **Conclusions** Traditional Chinese medicine clinical trials on the treatment of geriatric illnesses cover a diverse spectrum of diseases, although the distribution of focus is unequal. Potential dominant illnesses were eventually identified to include osteoporosis, constipation, and hypertension, with heart failure, stroke, coronary heart disease, diabetes and its complications, and insomnia being potential sub-dominant diseases.

【Keywords】 bibliometrics; traditional Chinese medicine; geriatric diseases; dominant diseases

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

随着医疗水平的发展,平均寿命逐渐提高,老年人口占总人口的比重也呈上升趋势。根据我国第 7 次全国人口普查数据显示,60 岁及以上人口高达 2.64 亿,全国老年人口占比 18.7%。另外《老年健康蓝皮书:中国老年健康研究报告(2018)》示,2000 年~2018 年我国 60 岁及以上老年人口占比从 10.2% 上升到 17.9%。同时预测 2030 年,中国人口快速老龄化将导致慢性非传染病的疾病负担至少增加 40%^[1]。老年病是指在老年期罹患的、与衰老有关并具有自身特点的疾病,大致可分为 3 类:一是一般只发生在老年期与机体老化相关的增龄性失能疾病,如阿尔茨海默病、老年性白内障等;二是多发生在老年期与机体老化后与抗病能力降低有关的疾病,也是老年常见病、多发病,此类疾病与机体老化明显相关,随年龄增加发病率也随之增高,如冠状动脉粥样硬化性心脏病、恶性肿瘤等;三是老年期与青中年期患病率无明显差异,但具有不同于青中年期发病特点的疾病,如消化性溃疡、糖尿病等^[2]。衰老是相关老年疾病最重要的危险因素之一,随着人口老龄化的逐渐发展,各种老龄化相关疾病的发病率也随之升高,从而降低患者生活质量、致残甚至导致死亡,给社会经济及公共卫生系统带来沉重的负担。《养老奉亲书》云:“年老之人,痿痺为常”,老年人主要的生理特点是脏腑机能衰退,精血耗减,神气渐衰,阴阳失衡,因此常伴有多脏器功能衰竭或多系统功能障碍,多脏受损、疾病合并出现、病理产物较多是老年人主要的病理特点^[3]。调查显示,老年住院病人中,患两种及以上疾病占 96.58%,五种及以上的有 28.77%,老年人常多病共患,因此服用更多的药物,而多药治疗是药物不良反应、经济负担、药物相互作用和不良事件的危险因素^[3-4]。另外起病多隐匿、症状不典型是老年病的另一个重要特征,老年人敏感性降低,对疼痛反应迟钝,因此许多疾病发生时的细微症状常被忽视,临床常难以在早期诊断出^[3]。中药多成分、多靶点、多通路的作用特点及中医整体观念,辨

证论治个体化的治疗理念在老年疾病的治疗中发挥独特作用。另外中医“治未病”的思想强调“未病先防,欲病救萌,既病防变,愈后防复”,医养结合,预防、康复与治疗并重是中医药治疗的另一大优势。

中医药作为中华文化的瑰宝、我国医疗卫生保健体系的重要组成部分,在防病治病、维护人们身心健康中发挥重要作用。随着社会经济进步、现代医学的快速发展以及人们对健康的需求不断增加,如何提高临床防病、治病的能力,是中医药发展的核心问题,因此展开中医药优势病种的研究,进一步提高中医药防病、治病的能力显得尤为重要^[5]。开展中医优势病种研究的关键问题是做好优势病种的筛选,只有在确立了优势病种的基础上针对性地开展中医临床诊疗路径研究,并规范推广,才能更充分地发挥中医药治疗的特色优势^[6]。目前普遍认为中医优势病种是指西医学无明确治疗方法或确切疗效,但中医有良好临床基础和较突出的临床疗效,能显示中医辨证论治优势的病种;西医疗法或药物不良反应较大,易诱发医源性或药源性疾病,而中医治疗没有以上弊端的病种;当今西医没有良策的疑难病或重疾,中医在该疾病的某个方面或环节体现出显著治疗优势的病种^[7]。本文基于文献计量学方法对 2013 年~2023 年各数据库收录的中医药治疗老年病的临床研究文献进行统计分析,以确定中医药治疗的潜在优势病种,以期为临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 文献检索

1.1.1 文献来源

本研究检索 2013 年~2023 年发表于中国知网(CNKI)、重庆维普中文期刊数据库(VIP)、万方数据知识服务平台(Wanfang)、中国生物医学文献数据库(CBM)的期刊文献。

1.1.2 检索策略

采用自由词与主题词相结合的检索方式,包括

疾病和干预措施两部分检索。以中国知网为例,检索人口选择专业检索,检索年限为 2013 年~2023 年,检索表达式为:“SU=(‘中医’OR‘传统医学’OR‘祖国医学’OR‘中西医’OR‘中药’OR‘针灸’OR‘针刺’)AND(‘老年患者’OR‘老年人’OR‘老年’)”,限定条件:临床研究;临床观察;临床疗效。

1.2 纳入标准

①研究类型为随机对照试验、非随机对照试验、队列研究、横断面研究、病例对照研究;②治疗组干预措施为口服中药、中药静脉制剂、中药外治、针灸、推拿等中医药干预措施,或中医药治疗联合其他疗法,对照组为常规西医治疗、物理治疗等;③研究对象为老年患者。

1.3 排除标准

①不同数据库间重复文献;②重复发表、不能获取全文及数据不全的文献;③研究对象非老年患者的文献;④文中未明确提出干预疾病名称的文献;⑤干预措施非中医药疗法或中医药疗法作为对照组的文献;⑥无对照组的病例观察;⑦研究类型为基础研究、病例报告、实验设计、综述、报纸、会议等文献。

1.4 文献筛选与数据提取

通过上诉检索方法检索后获得的文献数量较多且范围较广,需进一步手工检索对文献进行分类和排除。将检索文献导入 Endnote X9 软件初步去重后通过阅读标题及摘要排除明显与研究主题不相关的文献,后阅读全文按照纳入、排除标准逐一复筛,最终确定纳入研究的文献数量。建立 Excel 表格提取数据,主要涉及研究类型、样本量、干预措施、疗程、疗效评定、随访时间、不良反应报导等数据。以上工作由两名研究者分别独立进行,并相互核对,若无法达成共识时可进行探讨,必要时求助于第三方,以保证录入文献的真实性和可靠性。

1.5 数据分析

文献筛选后采用 Endnote X9 软件统计发文时间,获得年发文量,采用 Excel 2021 构建折线图,了解该领域发文趋势。根据最新世界卫生组织关于疾病和有关健康问题的国际统计分类(ICD-11)对疾病系统进行分类,将涉及的老年病种归为:肿瘤、血液和造血器官疾病以及某些涉及免疫机能的异常、内分泌营养和代谢疾病、精神和行为障碍、神经系统疾病、眼和附件疾病、耳和乳突疾病、循环系统疾病、呼吸系统疾病、消化系统疾病、皮肤和皮下组

织疾病、骨骼肌肉系统和结缔组织疾病、泌尿生殖系统疾病 13 大类。由于检索的临床研究中多数应用西医疾病名称,故纳入文献的各个系统中所包含的具体疾病名称按照现代医学标准进行归类,对于不好归类的个别病症纳入“其他”范畴。将中医药治疗老年病的文献按照数量及发表年份进行排序,建立相关数据库并统计其文献占比、临床疗效及发展趋势,采用 Excel 2021 构建饼图及面积图,了解各系统的文献数量及研究趋势。提取数据后导入 Excel 2021 计算各疾病有效率,经统计分析后,将潜在优势病种纳入的文献导出为 Refworks 格式并命名为 download.txt,使用 VOSviewer 1.6.18.0 软件进行关键词共现分析,选择默认参数,最小数量设置为 2,筛选干预措施相关关键词,导出关键词共现网络图及热点图。

2 研究结果

2.1 文献检索结果

通过检索以上数据库,共获得文献 22 859 篇,其中 CKNI 2937 篇、Wanfang 7816 篇、VIP 6823 篇、CBM 5283 篇,经过软件去重,根据纳入排除标准通过阅读题目及标题初筛、阅读全文复筛处理后,最终纳入中医药治疗老年疾病的期刊文献 3768 篇。文献筛选流程见图 1。

2.2 年度发文趋势

通过分析统计 2013 年~2023 年在 4 个数据库公开发表的中医药治疗老年病的期刊论文结果发现,2013 年~2018 年大部分时间该领域研究处于缓慢增长阶段,发文量较平稳,该阶段中 2014 年发文量最高达 413 篇。直至 2019 年发文量呈爆发式增长,高达 447 篇文献发表,随后研究处于快速增长时期,直至 2023 年前发文量均在 400 篇以上。总体而言,本研究纳入的中医药治疗老年病的临床研究年均发文量高达 350 篇,表明近年来在老年疾病的临床诊疗中,中医药疗法逐渐占据越来越重要的地位。具体发文趋势见图 2。

2.3 各系统文献分布情况

根据 ICD-11 对文献进行分析发现,纳入的 3768 篇文献共涉及 17 个系统、149 个病种。以临床研究的文献数量为依据,说明在各种老年性疾病的临床治疗过程中,应用中医药治疗较为普遍。但是对于涉及的 17 个系统的文献分布严重不均,循环系统文献量最大,骨骼肌肉系统或结缔组织系统、消

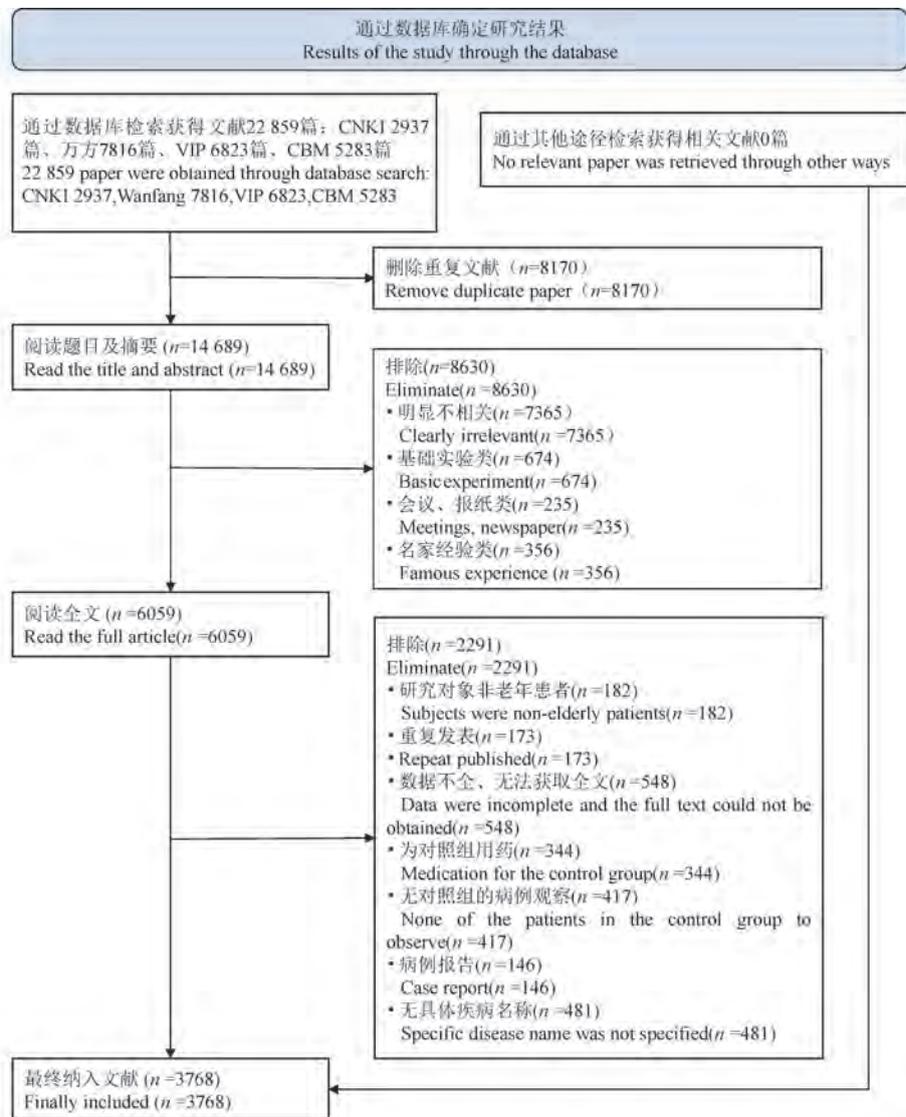


图1 文献筛选流程图

Figure 1 Flow chart for document screening

化系统次之,三者之和达到总文献量的48%,几乎占据了老年病种文献量的一半。除此之外,呼吸系统及神经系统较其他系统也具有较明显优势,提示中医药治疗在该领域有较大的发展空间。相较而言,免疫系统、血液或造血器官疾病、耳或乳突疾病、感染性疾病或寄生虫病及视觉系统疾病的研究文献之和占比不足总文献量的5%,说明以上领域在中医药治疗的临床研究中不占优势。具体结果见图3。表1提示,纳入的3768篇文献中,临床研究文献数量前十位的具体疾病分别为慢性便秘(341篇)、高血压(218篇)、失眠(176篇)、冠状动脉粥样硬化性心脏病(174篇)、骨质疏松(173篇)、骨关节炎(167篇)、脑卒中(163篇)、心力衰竭(163篇)、糖尿病及其并发症(152篇)、肺炎(129篇)。

以上疾病是老年病里研究证明中医药治疗有效的主要疾病,可以考虑为中医药治疗的潜在优势病种。各潜在优势疾病的发文趋势见图4,基本与纳入总文献的年度发文趋势相一致,提示以上疾病的临床研究随整体平稳发展,与其他疾病相比具有明显优势,始终作为中医药临床研究的热点疾病。

2.4 潜在优势病种临床有效性分析

为进一步研究中医药治疗老年病的潜在优势病种的有效性,统计各疾病的临床研究病例数量及临床有效率,见表2。提示中医药治疗老年病的潜在优势病种临床有效率均高于90%,说明中医药治疗在临床治疗上确有很好的疗效。考虑部分纳入文献质量较低,故统计疾病各临床研究的平均纳入病例数量,将平均不足40例的疾病排除以减少试验

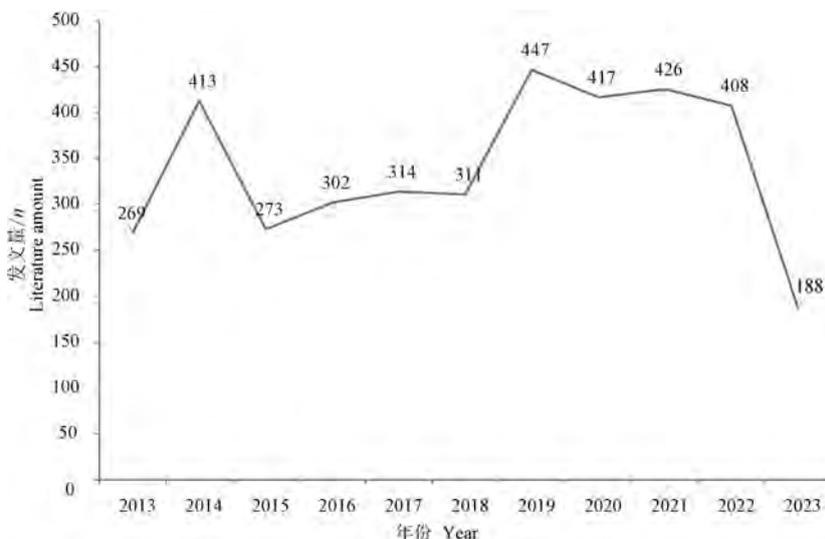


图 2 年度发文趋势图

Figure 2 Annual publication trend chart

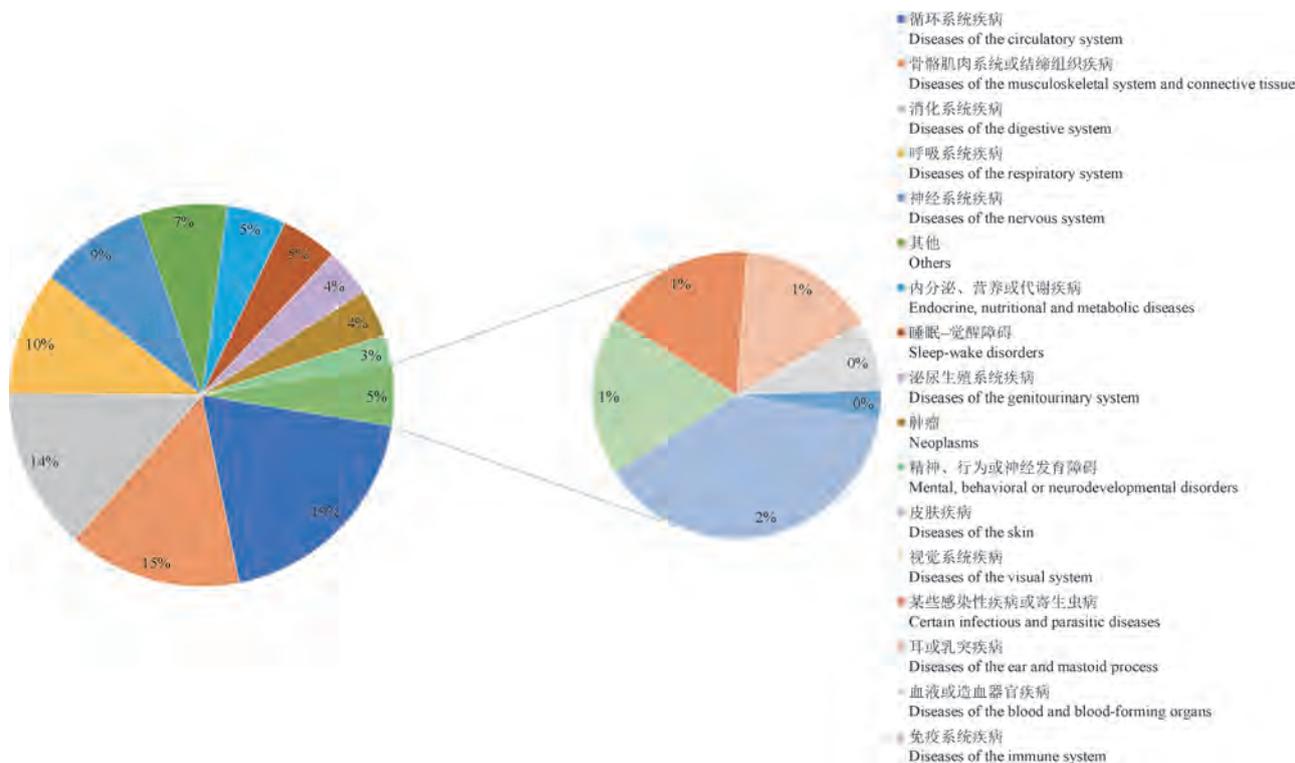


图 3 疾病系统分布比例

Figure 3 Distribution of disease systems in proportion

结果的不确定性。最终确定临床有效率前三位的疾病作为中医药治疗老年病的潜在优势病种,分别为:骨质疏松(92.97%)、慢性便秘(91.83%)、高血压(91.63%)。其余为潜在次优势病种:心力衰竭(91.62%)、脑卒中(91.07%)、冠心病(90.84%)、糖尿病及其并发症(90.84%)、失眠(90.16%)。

2.5 潜在优势病种关键词分析

对骨质疏松、慢性便秘、高血压纳入文献进行

关键词分析(图5)。文献导入 VOSviewer1.6.18.0 软件后筛选干预措施相关关键词进行共现分析及热点分析,结果显示:(1)老年性骨质疏松的文献中现代医学结合中药汤剂治疗的研究最多,除此之外针刺、电针及中医手法复位治疗广泛应用于骨质疏松的治疗,八段锦等中医传统健身功法等也对疾病起到辅助治疗作用;(2)老年慢性便秘的文献中中医干预措施更加丰富,除中药汤剂治疗外,针刺、艾

表 1 按系统分类的文献数量统计
Table 1 Literature quantity statistics by systematic classification

疾病分类 (ICD-11) Classification of diseases (ICD-11)	病种 Disease	文献频次 Number of articles	占比/% Percentage	病种数 Number of articles	占比/% Percentage
某些感染性疾病或寄生虫病 Certain infectious and parasitic diseases	带状疱疹(14)、肺结核(12)、病毒性肝炎(7) Herpes zoster (14), tuberculosis (12), viral hepatitis (7)	33	0.9	3	2.0
免疫系统疾病 Diseases of the immune system	艾滋病(5)、干燥综合征(1) Acquired immunodeficiency syndrome(5), sjögren's syndrome(1)	6	0.2	2	1.3
肿瘤 Neoplasms	肺癌(60)、胃癌(18)、直肠癌(16)、急性髓系白血病(12)、食管癌(10)、大肠癌(6)、肝癌(6)、结肠癌(4)、卵巢癌(3)、淋巴瘤(3)、骨髓瘤(2)、慢性粒细胞白血病(1)、膀胱癌(1)、前列腺癌(1)、甲状腺癌(1)、宫颈癌(1)、子宫内膜癌(1)、胆囊癌(1)、其他(4) Lung cancer(60), gastric cancer(18), rectal cancer(16), acute myelogenous leukemia (12), esophageal cancer (10), colorectal cancer (6), hepatocellular carcinoma (6), colon cancer (4), ovarian cancer(3), lymphoma(3), myeloma(2), chronic myeloid leukaemia(1), bladder cancer(1), prostate cancer(1), thyroid cancer(1), cervical cancer(1), endometrial cancer(1), gallbladder cancer(1), others(4)	151	4.0	19	12.8
血液或造血器官疾病 Diseases of the blood and blood-forming organs	贫血(11)、血小板减少症(3)、紫癜(1) Anemia(11), thrombopenia(3), purpura(1)	15	0.4	3	2.0
内分泌、营养或代谢疾病 Endocrine, nutritional and metabolic diseases	糖尿病及其并发症(152)、高脂血症(20)、营养不良(6)、肥胖(4)、甲状腺功能减退症(3)、桥本氏甲状腺炎(3)、甲状腺功能亢进症(1) Diabetic and its complications (152), hyperlipidemia (20), malnutrition(6), obesity (4), hypothyroidism (3), Hashimoto's thyroiditis(3), hyperthyroidism(1)	189	5.0	7	4.7
精神、行为或神经发育障碍 Mental, behavioral or neurodevelopmental disorders	抑郁障碍(63)、血管性痴呆(20)、焦虑障碍(10)、癫痫(1)、精神分裂症(1) Depressive disorder(63), vascular dementia(20), anxiety disorder (10), epilepsy (1), schizophrenia(1)	95	2.5	5	3.4
睡眠-觉醒障碍 Sleep-wake disorders	失眠(176)、阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(2) Insomnia(176), obstructive sleep apnea syndrome(2)	178	4.7	2	1.3
神经系统疾病 Diseases of the nervous system	脑卒中(163)、阿尔茨海默病(108)、帕金森综合征(34)、带状疱疹后遗神经痛(27)、偏头痛(6)、面瘫(2)、神经衰弱(2)、重症肌无力(1)、三叉神经痛(1) Stroke(163), Alzheimer's disease (108), Parkinson's disease (34), herpes zoster postherpetic neuralgia (27), migraine (6), facial paralysis (2), neurasthenia (2), myasthenia gravis (1), prosopalgia(1)	344	9.1	9	6.0

续表 1

疾病分类 (ICD-11) Classification of diseases (ICD-11)	病种 Disease	文献频次 Number of articles	占比/% Percentage	病种数 Number of articles	占比/% Percentage
循环系统疾病 Diseases of the circulatory system	高血压(218)、冠状动脉粥样硬化性心脏病(174)、心力衰竭(163)、心律失常(52)、后循环缺血性眩晕(41)、急性冠脉综合征(21)、肺源性心脏病(17)、下肢动脉硬化闭塞症(12)、动脉粥样硬化斑块形成(6)、深静脉血栓形成(6)、肺动脉高压(5)、低血压(4)、病毒性心肌炎(4)、静脉炎(3)、心脏瓣膜病(2) Hypertension(218), coronary atherosclerotic heart disease(174), heart failure(163), arrhythmia(52), posterior circulation ischemic vertigo(41), acute coronary syndrome(21), pulmonary heart disease(17), lower extremity atherosclerotic occlusive disease(12), atherosclerotic plaque formation(6), deep venous thrombosis(6), pulmonary arterial hypertension(5), hypotension(4), viral myocarditis(4), phlebitis(3), valvulopathy(2)	728	19.3	15	10.1
呼吸系统疾病 Diseases of the respiratory system	肺炎(129)、慢性阻塞性肺疾病(105)、支气管炎(71)、哮喘(51)、上呼吸道感染(13)、肺气肿(12)、肺纤维化(4)、支气管扩张症(3)、鼻炎(3)、鼻衄(3)、胸腔积液(1) Pneumonia(129), chronic obstruct pulmonary disease(105), bronchitis(71), asthma(51), upper respiratory tract infection(13), emphysema(12), pulmonary fibrosis(4), bronchiectasis(3), rhinitis(3), epistaxis(3), pleural effusion(1)	395	10.4	11	7.4
消化系统疾病 Diseases of the digestive system	功能性便秘(341)、慢性胃炎(39)、功能性消化不良(21)、消化性溃疡(19)、慢性腹泻(15)、痔疮(14)、胆囊炎(13)、肠梗阻(12)、反流性食管炎(9)、胆管结石(6)、脂肪肝(5)、胰腺炎(4)、药物性肝损害(2)、颞下颌关节紊乱综合征(2)、胆管炎(2)、肝硬化(1)、阑尾炎(1)、上消化道出血(1)、其他(8) Functional constipation(341), chronic gastritis(39), functional dyspepsia(21), peptic ulcer(19), chronic diarrhea(15), hemorrhoids(14), cholecystitis(13), ileus(12), reflux esophagitis(9), calculus of bile duct(6), fatty liver(5), pancreatitis(4), drug-induced liver injury(2), temporomandibular joint disorder syndrome(2), cholangitis(2), liver cirrhosis(1), appendicitis(1), upper gastrointestinal haemorrhage(1), others(8)	515	13.7	20	13.4
泌尿生殖系统疾病 Diseases of the genitourinary system	阴道炎(40)、尿失禁(25)、肾功能不全(22)、前列腺增生(19)、尿路感染(11)、膀胱功能障碍(8)、肾病综合征(8)、慢性尿酸性肾病(6)、盆腔炎(5)、肾小球肾炎(4)、肾盂肾炎(2)、下尿路结石(1)、尿潴留(1)、其他(1) Colpitis(40), urinary incontinence(25), renal insufficiency(22), prostatic hyperplasia(19), urinary tract infection(11), functional disorders of bladder(8), nephrotic syndrome(8), chronic uric acid nephropathy(6), pelvic inflammation(5), glomerular nephritis(4), pyelonephritis(2), calculus of lower urinary tract(1), uroschisis(1), others(1)	153	4.1	14	9.4
视觉系统疾病 Diseases of the visual system	年龄相关性黄斑变性(18)、老年性白内障(8)、老年性干眼症(4)、青光眼(2)、缺血性视神经损害(2)、玻璃体浑浊(1) Age-related macular degeneration(18), senile cataract(8), senile dry eyes(4), glaucoma(2), ischemic optic nerve damage(2), vitreous disturbranse(1)	35	0.9	6	4.0
耳或乳突疾病 Diseases of the ear and mastoid process	耳鸣(15)、老年性聋(13)、梅尼埃病(2) Tinnitus(15), presbycusis(13), Meniere's disease(2)	30	0.8	3	2.0
皮肤疾病 Diseases of the skin	皮肤瘙痒(45)、湿疹(16)、荨麻疹(4)、银屑病(4)、多汗症(3)、过敏性皮炎(2) Cutaneous pruritus(45), eczema(16), urticaria(4), psoriasis(4), ephidrosis(3), allergic dermatitis(2)	74	2.0	6	4.0

续表 1

疾病分类 (ICD-11) Classification of diseases (ICD-11)	病种 Disease	文献频次 Number of articles	占比/% Percentage	病种数 Number of articles	占比/% Percentage
肌肉骨骼系统或 结缔组织疾病 Diseases of the musculoskeletal system and connective tissue	骨质疏松(173)、骨关节炎(167)、腰椎间盘突出症(49)、类风湿关节炎(30)、未特指的下背部疼痛(26)、颈椎病(20)、肩周炎(17)、痛风(16)、骨骼肌减少症(13)、肢体疼痛(10)、风湿病(6)、腰椎椎管狭窄(4)、肩袖损伤(4)、滑囊炎(3)、骨质增生(3)、骨量减少(2)、强直性脊柱炎(2)、系统性红斑狼疮(1)、股骨头坏死(1)、干燥综合征(1)、退行性半月板损伤(1) Osteoporosis (173), osteoarthritis (167), protrusion of lumbar intervertebral disc (49), rheumatoid arthritis (30), unspecified lower back pain (26), cervical spondylosis (20), scapulohumeral periarthritits (17), gout (16), sarcopenia (13), limb pain (10), rheumatism (6), lumbar spinal stenosis (4), rotator cuff injury (4), bursitis (3), osteoproliferation (3), osteopenia (2), ankylosing spondylitis (2), systemic lupus erythematosus (1), femoral head necrosis (1), sicca syndrome (1), degenerative meniscal injury (1)	549	14.6	21	14.1
其他 Others	各部位骨折(261)、脓毒症(9)、夜尿症(8) Fracture (261), pyemia (9), enuresis (8)	278	7.3	3	2.0

表 2 潜在优势病种病例数及有效率

Table 2 Number of cases and effective rate of potential dominant diseases

排序 Rank	病种 Disease	文献频次 Number of articles	总病例数 Total number of cases	平均病例数 Average number of cases	临床有效率/% Clinical efficient
1	慢性便秘 Chronic constipation	341	14 988	43.70	91.83
2	高血压 Hypertension	218	11 863	54.42	91.63
3	失眠 Insomnia	176	8127	46.18	90.16
4	冠心病 Coronary heart disease	174	11 726	67.39	90.84
5	骨质疏松 Osteoporosis	173	9524	55.05	92.97
6	骨关节炎 Osteoarthritis	167	7666	37.40	91.86
7	脑卒中 Stroke	163	8557	47.28	91.07
8	心力衰竭 Heart failure	163	7875	46.60	91.62
9	糖尿病及其并发症 Diabetes and its complications	152	6454	41.90	90.84
10	肺炎 Pneumonia	129	5666	38.28	92.38

灸、推拿、中药外敷、耳穴埋籽、穴位贴敷等均具有较多的临床研究,且对中医药外治法的研究逐渐深入;(3)老年性高血压的文献中中药治疗占据主流,多种中药汤剂及中成药配合降压药物使用均取得较好的临床疗效,针刺治疗、穴位贴敷、中药静脉制剂等疗法研究处于逐渐增长阶段。归纳关键词共

现分析结果,中药汤剂治疗仍是目前中医药临床应用的主要干预措施,除此之外针灸推拿治疗、中药外治法及传统保健运动也广泛运用与临床治疗。且临床多将中西医治疗措施结合应用,疗效优于单一疗法,充分展现中医药疗法的多样性及有效性,也体现中医药异病同治,辨证论治的优势所在。

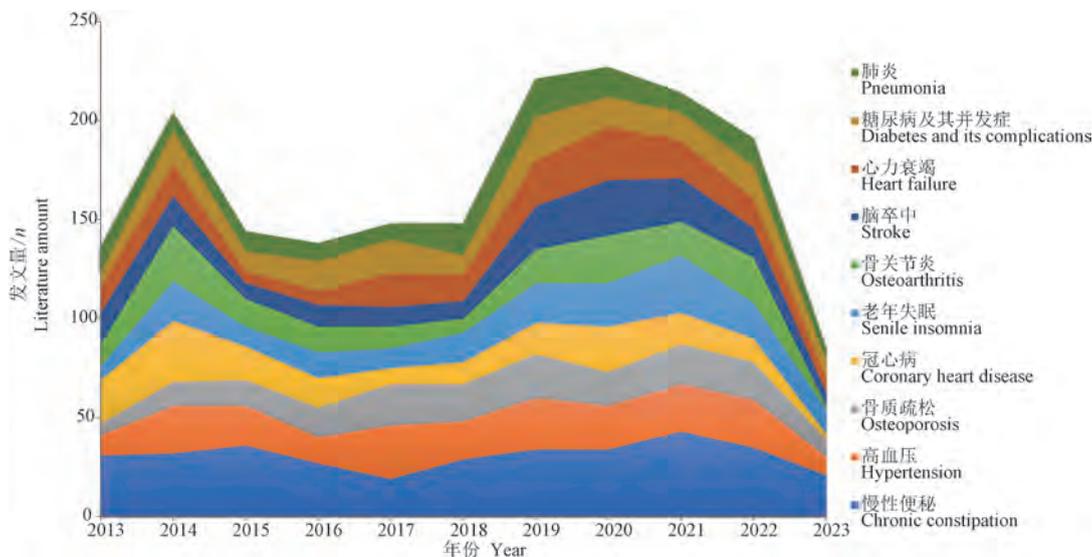


图 4 潜在优势病种发文趋势

Figure 4 Publication trend of potential dominant diseases

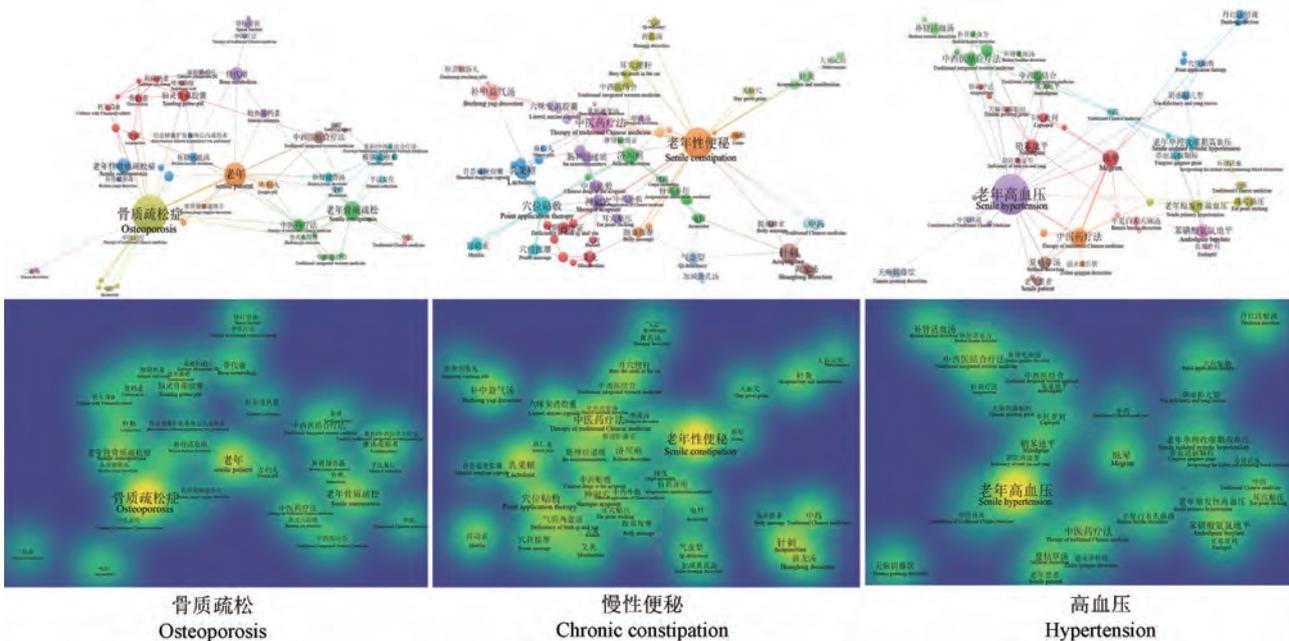


图 5 关键词共现图及热点图

Figure 5 Keywords co-occurrence map and hotspot map

3 讨论

研究表明, 中医药治疗老年疾病涉及病种广泛, 但分布严重不均, 主要集中在循环系统、骨骼肌肉系统或结缔组织系统和消化系统。本次研究确定了 3 个潜在优势病种: 骨质疏松、慢性便秘、高血压。说明临床中中医药治疗此类患者较多, 经过大量临床试验证实中医药治疗有效, 且在临床实践中积累了较多经验并获得较广泛的认可。另外研

究发现心力衰竭、脑卒中、冠心病、糖尿病及其并发症、失眠作为潜在的次优势病种, 提示中医药在以上疾病领域具有更大的临床研究意义, 提示未来研究的热点和方向。而在五官科疾病、皮肤疾病及血液疾病的研究相对缺乏, 可在未来进行进一步深入研究。

3.1 骨质疏松

骨质疏松是一种临床常见疾病, 是以骨量减少、骨密度减低和骨微结构破坏为特征的全身性骨

代谢疾病,最终导致脆性骨折的风险增加^[8]。随着全球老龄人口的增加,骨质疏松症患病率也随之增加,70 岁以上人群中骨质疏松症的发病率高达 70%^[9]。随着年龄的增长,骨质流失是骨折发病率、死亡率增加的征兆。骨质疏松性骨折的发病率是心血管疾病及肿瘤疾病的 3~4 倍,但是由于其起病隐匿,大部分患者在骨折发生前无明显的临床症状,故难以早期诊断出,严重降低了老年患者的生存质量^[10]。骨质疏松的具体发病机制尚不明确,目前西医对其治疗措施主要包括药物治疗、饮食干预、运动疗法等,药物治疗以基础治疗药物、骨吸收抑制剂、骨形成促进剂为主,尽管这些药物可以缓解骨丢失从而改善临床症状,但长期使用受到耐受性降低、不良反应严重和经济成本较高等多方面因素的限制^[11-12]。因此研究其他安全且有效的治疗骨质疏松的方法具有重要的临床价值及社会意义。在中医理论中认为肾为先天之本,藏精主骨,肾虚则精亏骨枯髓减。《素问·六节脏象论》中提出:“肾者,封藏之本,精之处也,其华在发,其充在骨”。脾为后天之本,主运化,濡养四肢百骸。《灵枢·决气篇》有言:“谷入气满,淖泽,注于骨”。然而随着年龄的增长,肾精逐渐亏虚,髓亏骨痿;脾胃逐渐虚弱以致运化失利,筋骨无以滋养,而发生骨质疏松。基于此,中医药治疗老年骨质疏松以补肾中药为主,例如淫羊藿、补骨脂均为治疗骨骼关节疾病的常用药,淫羊藿苷是淫羊藿中的主要活性成分,研究证明其可以通过刺激成骨细胞增殖,抑制破骨分化和破骨细胞的骨吸收活性来促进骨的生成^[13-14]。补骨脂素作为补骨脂的主要有效成分,可以通过增强成骨细胞特异性标记基因的表达以促进成骨细胞分化^[15]。除单味中药外,左归丸、右归丸、青娥丸等中药复方亦能促进骨密度提高并且改善患者的临床症状^[16-19]。另外,针灸疗法亦可以通过对内分泌调节、抑制氧化应激与炎症反应及通过骨代谢相关信号通路进行多层次、多靶点调节从而起到治疗疾病的目的^[20-21]。本研究纳入的大量临床研究表明,无论是中药汤剂、针灸,还是中医外治法,均能有效改善患者的临床症状,提高患者生存质量,表现出良好的疗效。中医药治疗骨质疏松可先后天并补,益肾健脾以达到强骨的治疗目的,其治疗优势体现在对于疾病早期无临床症状的患者,中医四诊辨病辨证存在显著的病理状态时,可选用早期中医药干预,改善骨代谢失衡,以防止疾病继续发

展;而对于疾病后期的患者亦可在西医治疗的基础上配合中药、针灸、中医外治等多种疗法,以中西医结合治疗显著改善患者的临床症状。

3.2 慢性便秘

慢性便秘是老年常见疾病,随着生活水平的不断提高和人口老龄化的加重,慢性便秘的患病率随之表现出明显上升趋势。老年慢性便秘的发病率随年龄增加而增加,多项研究调查结果显示,60 岁及以上老年人群中,慢性便秘患病率为 15%~20%,84 岁及以上人群可达 20%~37%,对于长期卧床老年人甚至高达 80%^[22]。其主要表现为排便次数减少(<3 次/周)、粪质干硬或排便困难。排便困难主要包括排便时间延长、排除困难、排便不尽感甚至需要手法辅助排便^[23]。虽然便秘本身通常不会危及生命,但是其并发症及危害包括加重心脑血管疾病、粪石性肠梗阻、精神心理障碍等严重降低了老年患者的生存质量,甚至导致死亡^[21]。老年人慢性便秘可由多种因素引起,包括活动量减少、膳食结构失衡以及服用多种药物等^[24-25]。而一味地增加运动量或减少药物用量对于老年患者并不现实,现代医学多采用通便类、促动力类等药物治疗便秘,但长期使用会导致腹泻、电解质失衡、肝毒性等多种不良反应,且面临停药后复发率较高的问题,患者易滥用或依赖泻药,均是临床迫切需要解决的难题^[26-27]。随着观念的改变,对于老年患者慢性便秘的治疗不应局限在仅改善便秘的症状,还应注重整体调节,提高患者的生活质量,此为中医药的介入提供了切入点。《素问·灵兰秘典论篇》曰:“大肠者,传道之官,变化出焉”,提出便秘病位在大肠。但其病因涉及多个脏腑,《诸病源候论·大便难候》亦曰:“所谓大便不畅者,由于三焦通调五脏不和,冷热之气不调,热气偏入肠胃,津液竭燥,故令糟粕痞结壅塞不通也”。老年人脏腑渐衰,功能减退,病理特点为气血津液不足,常因虚致秘。随着中医药药理机制、临床机制研究不断完善,无论是单味中药或是中药复方,均能分别通过多种通路及血清学指标改善胃肠动力、调节肠道菌群、调整激素水平以缓解便秘^[26,28]。总体而言,老年患者便秘的影响因素众多,机制复杂,治疗棘手。中医药在整体观念、辨证论治的基础上,将人视作整体,不仅能够通过大量有效方剂及内外治法改善患者的临床症状,更能对其整体把控。提供个体化、精准化治疗是中医治疗优势之一,根据患者的体质特征多脏腑共调

以缓解其病因。形神同调,理气开郁,调节患者焦虑、抑郁等不良情绪。随着中医药现代化研究的进展,治疗手段更加丰富和灵活多样,因此,在临床治疗上可以取长补短、中西医协同配合,充分发挥中医优势提高疗效。

3.3 高血压

我国心血管疾病负担沉重,心血管病占居民死亡原因首位^[29]。其中高血压是诱发多种心脑血管疾病的重要危险因素之一,与心力衰竭、心肌梗死甚至死亡等不良心血管结局密切相关^[30]。与许多疾病相同,高血压的发病率随年龄逐渐增长,中国高血压调查发现我国青年人群(18~34岁)高血压患病率为5.2%,而75岁以上居民为59.8%^[31]。与年轻人不同的是,高血压在老年患者中存在独特发病原因,包括血流动力学变化、动脉硬化、压力感受器反射敏感性和 β 肾上腺素能系统反应性降低等,随着年龄增加血管阻力随着血管壁的顺应性降低而增加,导致老年高血压患病率增加,因此老年高血压具有收缩压升高为主、血压波动较大、假性高血压、昼夜节律异常等特点,另外高龄患者常伴有多种危险因素和相关疾病,如糖尿病、高脂血症、冠心病、脑血管病等,多重用药是其常见现象,导致在选择合适的降压药物时困难较大^[32-35]。目前对于老年高血压的治疗主要包括生活方式干预和降压药物治疗,而与中青年相比,老年高血压患者对于血压下降的耐受性更差,因此降压药物的治疗需从小剂量开始,并需严格监测血压波动,根据患者耐受情况逐渐、缓慢地增加治疗强度,直到达到标准血压范围。同时,还应控制各种危险因素及治疗相关靶器官损害与其他临床疾病,因此大多数患者需要终身坚持治疗^[34]。基于此大量中医药治疗高血压的基础研究和临床研究相继实施,研究结果表明中医药在治疗老年高血压方面不断取得新的突破,在改善病人临床症状、控制血压、防治并发症等方面具有明显疗效。传统医学并无高血压病名记载,但根据其临床症状可归属于“眩晕”“头痛”等范畴,与情志失调、饮食不节、久病过劳、年迈体虚等因素密切相关^[36]。研究证明天麻钩藤饮、半夏白术天麻汤、六味地黄丸等多种中药汤剂对各种证型的高血压均有良好的治疗效果^[36-39]。其中钩藤单体化学成分及其提取物可扩张血管,降低外周阻力,而天麻可降低心率,增加血管顺应性,合用可增强降压疗效^[40]。除此之外野菊花、天麻、葛根等多种中药

及其提取物可通过多通路达到降压的治疗效果^[41]。针刺疗法是中医传统治疗方法之一,针刺太冲、涌泉、行间、三阴交、足三里、丰隆等穴位不仅能够改善头痛、头晕等症状,还能有效降压^[42]。另外中医治疗的优势还体现在“治未病”方面,个体化病因调护、辨证干预是未病先防、既病防变的关键。通过筛查高危人群进行中医药辨证论治以预防疾病发生,对于已患高血压人群给予早期中医药治疗干预,防止或延缓心、脑、肾等靶器官并发症的发生,降低终点事件和死亡的发生率,以改善长期预后^[43]。

3.4 局限性

本研究受分析软件限制无法进行中英文文献共同分析,经初步检索英文数据库发现相关文献病种分布较为分散,同一疾病研究数量较少,难以进行后续统计及共现分析,因此本研究仅纳入中文文献,可能导致结果出现一定偏倚。待大数据分析软件进一步更新升级,这种局限性会得到进一步改善,后续研究可进一步增加数据库来源。另外在筛选文献过程中发现核心期刊数量较少,纳入文献质量普遍偏低,其疗效可信度较低,因此研究结果仅作为中医药治疗的潜在优势病种以提供临床参考,提示今后需要开展更多高质量、大规模的临床随机对照试验以提供更高级别的循证证据。

4 结论

中医药治疗老年疾病的优势病种主要集中在循环系统、骨骼肌肉系统或结缔组织系统和消化系统,以骨质疏松、慢性便秘、高血压为其潜在的优势病种,心力衰竭、脑卒中、冠心病、糖尿病及其并发症、失眠作为潜在的次优势病种。

参考文献:

- [1] 刘远立,郑忠伟,饶克勤,等.中国老年健康研究报告(2018)[M].北京:社会科学文献出版社,2019.
LIU Y L, ZHENG Z W, RAO K Q, et al. Annual report on elderly health in China (2018) [M]. Beijing: Social Sciences Academic Press, 2019.
- [2] 王飞.中医老年病学[M].北京:中国中医药出版社,2017.
WANG F. Geriatrics of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [3] 王亚军,宋凯.针灸治疗老年病的现状和规律分析[J].辽宁中医杂志,2017,44(11):2388-2390.
WANG Y J, SONG K. Law and actuality of acupuncture and moxibustion on senile disease [J]. Liaoning J Tradit Chin Med,

- 2017, 44(11): 2388-2390.
- [4] KIM L D, KONCILJA K, NIELSEN C. Medication management in older adults [J]. *Cleve Clin J Med*, 2018, 85(2): 129-135.
- [5] 曹洪欣. 中医优势病种临床研究的战略思考与实践 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(1): 11-12.
CAO H X. Strategic thinking and practice of clinical research on dominant diseases of traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2009, 50(1): 11-12.
- [6] 梁子钰, 李俊德, 龙子弋. 中药治疗脾胃病优势病种的文献计量学研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2015, 10(10): 1447-1450, 1455.
LIANG Z Y, LI J D, LONG Z Y. Bibliometrics analysis on dominant diseases of Chinese medicine in treating spleen and stomach disease [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2015, 10(10): 1447-1450, 1455.
- [7] 林奕, 王学谦, 赵晖, 等. 中医优势病种评价的方法学探讨 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(19): 1663-1667.
LIN Y, WANG X Q, ZHAO H, et al. Discussion on methodology of evaluating the dominant diseases of traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 62(19): 1663-1667.
- [8] LORENTZON M. Treating osteoporosis to prevent fractures: current concepts and future developments [J]. *J Intern Med*, 2019, 285(4): 381-394.
- [9] CHEN W, ZHANG B, CHANG X. Emerging roles of circular RNAs in osteoporosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(19): 9089-9101.
- [10] SÖZEN T, ÖZİŞİK L, BAŞARAN N Ç. An overview and management of osteoporosis [J]. *Eur J Rheumatol*, 2017, 4(1): 46-56.
- [11] KHOSLA S, HOFBAUER L C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(11): 898-907.
- [12] LIU J, CURTIS E M, COOPER C, et al. State of the art in osteoporosis risk assessment and treatment [J]. *J Endocrinol Invest*, 2019, 42(10): 1149-1164.
- [13] WANG Z, WANG D, YANG D, et al. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(3): 535-544.
- [14] 辛红美, 许洁, 汪长东. 淫羊藿苷促进 MC3T3-E1 成骨分化通过 Hedgehog 信号通路 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(5): 616-620.
XIN H M, XU J, WANG C D. Icariin promotes differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts through Hedgehog signaling pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(5): 616-620.
- [15] TANG D Z, YANG F, YANG Z, et al. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(2): 256-261.
- [16] 高举会, 林庶茹, 尚德阳. 左归丸对去卵巢巢鼠骨质疏松症大鼠 Hedgehog/Smo/GLI1 表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(3): 549-551.
GAO J H, LIN S R, SHANG D Y. Effect of Zuogui pill on the expression of Hedgehog/Smo/GLI1 in ovariectomized osteoporosis rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(3): 549-551.
- [17] 高举会, 林庶茹, 尚德阳. 右归丸含药血清对骨髓间充质干细胞 Hedgehog 信号通路影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(10): 44-46.
GAO J H, LIN S R, SHANG D Y. Effect of Yougui pill containing serum on Hedgehog signaling pathway of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2019, 21(10): 44-46.
- [18] 刘彤, 李俊儒, 付夜平, 等. “峻补肾阳”之右归丸对骨质疏松症防治的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(9): 1347-1350.
LIU T, LI J R, FU Y P, et al. Research progress of “Jun Tonifying Kidney Yang” Yougui Pill on prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2022, 28(9): 1347-1350.
- [19] SHUAI B, ZHU R, YANG Y P, et al. Positive effects of Qing'e Pill on trabecular microarchitecture and its mechanical properties in osteopenic ovariectomised mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(4): 270-277.
- [20] 白彦登, 王冠, 张海军, 等. TGF- β 1/Smad4 信号通路对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓微环境的影响及针刺干预机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(8): 1140-1146.
BAI D Y, WANG G, ZHANG H J, et al. Effect of TGF- β 1/Smad4 signaling pathway on bone marrow microenvironment in ovariectomized osteoporosis rats and mechanism of acupuncture intervention [J]. *Chin J Osteoporos*, 2021, 27(8): 1140-1146.
- [21] MANOLAGAS S C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis [J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(3): 266-300.
- [22] 中国老年保健医学研究会老龄健康服务与标准化分会, 《中国老年保健医学》杂志编辑委员会. 中国老年人便秘评估技术应用共识(草案) [J]. *中国老年保健医学*, 2019, 17(4): 46-47.
Aging Health Service and Standardization Branch of Chinese Geriatric Health Care Medical Research Association, Editorial Board of Chinese Geriatric Health Care Medicine. Consensus on the application of constipation assessment technology for the elderly in China (draft) [J]. *Chin J Geriatr Care*, 2019, 17(4): 46-47.
- [23] 中华医学会外科学分会结直肠外科学组. 中国成人慢性便秘评估与外科处理临床实践指南(2022 版) [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2022, 25(1): 1-9.
Colorectal Surgery Group, Surgery Branch, Chinese Medical Association. Clinical practice guideline on the evaluation and management of chronic constipation for Chinese adults (2022 edition) [J]. *Chin J Gastrointest Surg*, 2022, 25(1): 1-9.
- [24] 中华医学会老年医学分会中华老年医学杂志编辑委员会. 老

- 年人慢性便秘的评估与处理专家共识 [J]. 中华老年医学杂志, 2017, 36(4): 371-381.
- Editorial Board of the Chinese Journal of Geriatrics, Geriatrics Branch, Chinese Medical Association. Expert consensus on the assessment and treatment of chronic constipation in the elderly [J]. Chin J Geriatr, 2017, 36(4): 371-381.
- [25] 梁堃. 老年便秘的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(12): 1761-1763.
- LIANG K. Research progress of constipation in the elderly [J]. Chin J Gerontol, 2006, 26(12): 1761-1763.
- [26] 丰胜利. 中医治疗老年难治性便秘的现状与思考 [J]. 中医杂志, 2020, 61(10): 905-908.
- FENG S L. Present situation and thinking of treating senile intractable constipation with traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 61(10): 905-908.
- [27] VAZQUEZ ROQUE M, BOURAS E P. Epidemiology and management of chronic constipation in elderly patients [J]. Clin Interv Aging, 2015, 10: 919-930.
- [28] 夏晨曦, 周玲, 秦珂馨, 等. 基于肠道菌群探讨中医药治疗老年便秘 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(1): 251-254.
- XIA C X, ZHOU L, QIN K X, et al. Discussion on treatment of senile constipation with traditional Chinese medicine based on intestinal flora [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(1): 251-254.
- [29] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要 [J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.
- China Cardiovascular Health and Disease Report Writing Group. Report on cardiovascular health and diseases burden in China: an updated summary of 2020 [J]. Chin Circ J, 2021, 36(6): 521-545.
- [30] NGUYEN BA, ALEXANDER MR, HARRISON DG. Immune mechanisms in the pathophysiology of hypertension [J]. Nat Rev Nephro, 2024, 20(8): 530-540.
- [31] WANG Z, CHEN Z, ZHANG L, et al. Status of hypertension in China: results from the China hypertension survey, 2012-2015 [J]. Circulation, 2018, 137(22): 2344-2356.
- [32] SETTERS B, HOLMES H M. Hypertension in the older adult [J]. Prim Care, 2017, 44(3): 529-539.
- [33] OLIVEROS E, PATEL H, KYUNG S, et al. Hypertension in older adults: Assessment, management, and challenges [J]. Clin Cardiol, 2020, 43(2): 99-107.
- [34] 中国老年医学学会高血压分会, 北京高血压防治协会, 国家老年疾病临床医学研究中心(中国人民解放军总医院, 首都医科大学宣武医院). 中国老年高血压管理指南 2023 [J]. 中华高血压杂志, 2023, 31(6): 508-538.
- Hypertension Branch of Chinese Geriatrics Society, Beijing Association for Prevention and Treatment of Hypertension, National Clinical Research Center for Geriatric Diseases (General Hospital of the People's Liberation Army of Chinese, Xuanwu Hospital of Capital Medical University). China elderly hypertension management guidelines 2023 [J]. Chin J Hypertens, 2023, 31(6): 508-538.
- [35] 曹丰, 王亚斌, 薛万国, 等. 中国老年疾病临床多中心报告 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(11): 801-808.
- CAO F, WANG Y B, XUE W G, et al. Clinical multi-centers report of chronic diseases among elderly inpatients in China [J]. Chin J Mult Organ Dis Elder, 2018, 17(11): 801-808.
- [36] 中华中医药学会心血管病分会. 高血压中医诊疗专家共识 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 217-221.
- Cardiovascular Disease Branch of the Chinese Association of Traditional Chinese Medicine. Expert consensus on diagnosis and treatment of hypertension with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(15): 217-221.
- [37] 薄荣强, 胡元会, 石晶晶, 等. 基于信息计量学关于天麻钩藤饮治疗高血压病随机对照试验的文献研究分析 [J]. 中医药导报, 2017, 23(24): 106-109, 133.
- BO R Q, HU Y H, SHI J J, et al. Literature research and analysis of randomized controlled trials of Tianma Gouteng Decoction on hypertension based on information metrology [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 23(24): 106-109, 133.
- [38] 熊兴江, 王阶. 论半夏白术天麻汤在高血压病中的运用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2862-2865.
- XIONG X J, WANG J. Application of Banxia Baizhu Tianma Tang on hypertension [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2012, 27(11): 2862-2865.
- [39] 刘巍, 熊兴江, 王阶. 论六味地黄丸在高血压病治疗中的运用 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11): 3329-3333.
- LIU W, XIONG X J, WANG J. Discussion on the treatment of hypertension by Liuwei Dihuang Wan [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(11): 3329-3333.
- [40] 田昕彤, 周巍, 杨继, 等. 钩藤及其配伍制剂治疗高血压的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4395-4403.
- TIAN X T, ZHOU W, YANG J, et al. Research progress of Uncariae Ramulus Cum Uncis and its compatible preparations in treatment of hypertension [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(13): 4395-4403.
- [41] 范浩浩, 董宏利. 老年高血压的中医药治疗进展 [J]. 实用老年医学, 2023, 37(2): 119-123.
- FAN H H, DONG H L. Progress in treatment of senile hypertension with traditional Chinese medicine [J]. Pract Geriatr, 2023, 37(2): 119-123.
- [42] WANG J, XIONG X, LIU W. Acupuncture for essential hypertension [J]. Int J Cardiol, 2013, 169(5): 317-326.
- [43] 《高血压病治未病干预指南》编写组, 北京中医药大学东直门医院. 高血压病治未病干预指南 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(8): 1063-1075.
- Compilation Group of "Guidelines for Intervention in the Treatment of Hypertension", Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine. Guidelines for prevention and treatment of hypertension [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(8): 1063-1075.

张倩,屠海焯,朱科燕,等.多因素诱导高尿酸肾病大鼠模型的建立与芪苓颗粒的干预作用研究[J].中国比较医学杂志,2024,34(8):50-59.

Zhang Q, Tu HY, Zhu KY, et al. Establishment of a multi-factor-induced hyperuricemic nephropathy rat model to study the intervention effect of Qiling granules [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 50-59.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.006

多因素诱导高尿酸肾病大鼠模型的建立与芪苓颗粒的干预作用研究

张倩¹,屠海焯²,朱科燕¹,郁晨³,蔡月琴¹,戎亦骊¹,张利棕¹,
陈民利^{1,3},方明笋^{1*}

(1.浙江中医药大学动物实验研究中心,杭州 310053;2.浙江中医药大学药学院,杭州 310053;
3.杭州利孚泰转化医学研究中心,杭州 310051)

【摘要】 目的 采用“氧嗪酸钾联合腺嘌呤加酵母饲料饲喂”的多因素诱导法建立高尿酸肾病(HN)大鼠模型,并观察芪苓颗粒(QLG)的干预作用。方法 取58只SPF级雄性SD大鼠,随机取10只大鼠作正常对照(normal control,NC)组,其余大鼠采用多因素诱导法建立HN大鼠模型,造模2周后颌下取血检测血清UA、CREA、BUN、TG和TC,筛选出血清UA和体重接近均值的HN大鼠40只,采用分层随机法分为模型对照(Model,M)组、QLG低剂量(Qiling granules low dose,QLG-L)组、QLG高剂量(Qiling granules high dose,QLG-H)组和阳性对照(positive control,PC)组,每组10只。各组每天给予相应药物灌胃,连续给药4周后颌下采血检测血清UA、CREA、BUN、TG和TC,行安死术,取肝组织检测XOD、ADA活性,取肾组织进行HE、Gomori六胺银染色,并用免疫组化和Western blot法观察肾GLUT9、OAT1、VCAM-1和TGF- β 的蛋白表达。结果 与NC组比,M组血清UA、CREA、BUN、TC、TG水平和肝XOD、ADA活性均显著升高($P<0.01$),肾组织病变明显,肾小管尿酸盐含量和肾GLUT9、VCAM-1、TGF- β 蛋白表达均显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)、OAT1表达显著降低($P<0.01$)。与M组比,各给药组大鼠的血清UA水平和肝XOD、ADA活性以及肾VCAM-1蛋白表达均显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),QLG-L组大鼠的血清CREA、BUN水平和肾TGF- β 蛋白表达亦显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),QLG-H组大鼠的血清CREA、BUN水平和肾GLUT9蛋白表达亦显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),各给药组大鼠的尿酸盐沉积及其引发的肾损伤均有不同程度的减轻但无显著差异($P>0.05$)。结论 给予大鼠酵母饲料饲喂的同时给予氧嗪酸钾与腺嘌呤联合灌胃可诱导建立稳定的HN大鼠模型;QLG可通过改善HN模型大鼠UA代谢紊乱、减轻肾炎症和尿酸盐沉积及其引发的肾损伤来有效治疗HN,其作用机制与降低血清UA、CREA、BUN、TG水平和肝XOD、ADA活性以及肾GLUT9、OAT1、VCAM-1、TGF- β 蛋白的表达有关。

【关键词】 高尿酸血症;尿酸性肾病;高尿酸肾病;肾损伤;芪苓颗粒

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)08-0050-10

Establishment of a multi-factor-induced hyperuricemic nephropathy rat model to study the intervention effect of Qiling granules

ZHANG Qian¹, TU Haiye², ZHU Keyan¹, YU Chen³, CAI Yueqin¹, RONG Yili¹, ZHANG Lizong¹,
CHEN Minli^{1,3}, FANG Mingsun^{1*}

【基金项目】浙江省基础公益研究计划(LTGD23C040003)。

【作者简介】张倩(1991—),女,硕士研究生,研究方向:中药学。E-mail:zqq19912024@163.com

【通信作者】方明笋(1987—),男,实验师,硕士,研究方向:实验动物与比较药理。E-mail:fms268@163.com

(1. Animal Experimental Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053. 3. Hangzhou Lifutai Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310051)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of hyperuricemic nephropathy (HN) using a multifactorial induction method of potassium oxazinate combined with adenine and yeast feed to observe the intervention effect of Qiling granules (QLG). **Methods** Fifty-eight SPF-grade male SD rats were selected, and 10 rats were randomly allocated to the normal control (NC) group. The remaining rats were induced by multiple factors to establish HN rat models. After 2 weeks of modeling, submandibular blood samples were taken to detect serum UA, CREA, BUN, TG, and TC. Forty HN rats with bleeding clearance UA and body weight close to the mean were selected. They were randomly divided into a model (M) group, QLG low dose (QLG-L) groups, QLG high dose (QLG-H) group, and a positive control (PC) group, with 10 rats in each group, using a stratified randomization method. Each group was given corresponding drugs by gavage daily, and after continuous administration for 4 weeks, submandibular blood samples were taken to detect serum UA, CREA, BUN, TG, and TC. After euthanasia of the rats, liver tissue was taken to detect XOD and ADA activity. Renal tissue was taken for HE and Gomori hexamine silver staining, and the protein expression of GLUT9, OAT1, VCAM-1, and TGF- β in the kidneys was observed using immunohistochemistry and Western blot method. **Results** Compared with the NC group, the M group's serum levels of UA, CREA, BUN, TC, and TG, as well as liver XOD and ADA activities, were significantly increased ($P < 0.01$). The renal tissue of the model rats showed significant pathological changes. The area of renal tubules positive for urate and the expression of GLUT9, VCAM-1, and TGF- β proteins in the kidneys were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the expression of OAT1 was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the M group, each treatment group showed significantly reduced serum UA levels, liver XOD, ADA activity, and renal VCAM-1 protein expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The serum CREA and BUN levels and renal TGF- β protein expression of rats in the QLG-L group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum CREA and BUN levels and renal GLUT9 protein expression of rats in the QLG-H group were also significantly reduced ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The urate deposition and renal injury caused by each treatment were reduced to varying degrees, but there were no significant differences among groups ($P > 0.05$). **Conclusions** A stable HN rat model can be induced by gavage of potassium oxazinate and adenine in combination with yeast feed. QLG can effectively treat HN by improving UA metabolic disorders, reducing the renal inflammation and urate deposition that cause renal damage in HN model rats. Its mechanism of action is related to a reduction in serum UA, CREA, BUN, and TG levels; liver XOD and ADA activities; and the expression of GLUT9, OAT1, VCAM-1, and TGF- β proteins in the kidneys.

【Keywords】 hyperuricemia; urinary acid nephropathy; hyperuricemic nephropathy; kidney injury; Qiling granules

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

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是一种以血清尿酸浓度过高为特征的代谢性疾病,是我国仅次于糖尿病的第二大代谢性疾病,可引起痛风和尿路结石等疾病,近年来患病率呈逐年升高,严重危害人类身体健康。高尿酸肾病 (hyperuricemic nephropathy, HN) 是由高尿酸血症引发的,因尿酸沉积在肾上对肾产生损害而引起的疾病,又称尿酸性肾病或痛风性肾病,因其发病隐匿,多数患者未能被及时发现并干预,严重者可发展成尿毒症,对患者的预期寿命与生活质量造成巨大威胁^[1]。目前,临床上暂无安全有效的治疗药物,西医常采用别嘌醇、非布司他等降尿酸药物来治疗 HN,这类药物虽可显著降低尿酸水平,但无法改善 HN 的肾损伤情

况且存在肝损伤与心血管系统损害等不良反应,应用受限^[2]。HN 在中医中属于“痹证”“水肿”“痛风”等范畴,近年来,中医药通过健脾益肾、祛湿化痰泄浊除痹等方法并选用黄芪、土茯苓、薏苡仁、丹参等中药进行治疗,临床结果显示疗效显著,副作用小且可减少疾病的复发^[3]。芪苓颗粒 (Qiling granules, QLG) 由中药黄芪、土茯苓、薏苡仁、桑寄生、丹参、秦艽和山慈菇配伍制成,临床用于治疗 HN,但其药理作用有待进一步的探讨。

动物模型是疾病机制研究与药物研发的重要工具,但目前尚无稳定且死亡率较低的 HN 模型建立方法。严美霞等^[4]指出,通过尿酸酶抑制剂氧嗉酸钾联合尿酸前体物质腺嘌呤共同诱导,同时给予

酵母饲料饲喂,可最大程度模拟人类尿酸性肾损伤的发生。本团队前期研究也发现采用“氧嗉酸钾联合腺嘌呤加酵母饲料饲喂”的多因素诱导法可建立相对稳定的 HN 大鼠模型。因此,本研究采用多因素诱导法建立 HN 大鼠模型,并用 QLG 进行干预,探讨 QLG 的干预作用及机制,为多因素诱导 HN 模型的应用与 QLG 的临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 58 只,体重为 180~220 g, 6~8 周龄,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司 [SCXK(沪)2022-0009],合格证编号:20220009000835。饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障环境[SYXK(浙)2021-0012],每笼饲养 3~4 只大鼠,自由饮食饮水,试验期间造模大鼠均饲喂 10% 酵母饲料(20220927,协同生物),温度(22±2)℃,相对湿度 40%~70%,12 h/12 h 明暗交替,噪音<50 dB。本研究所有饲养和动物实验操作程序均经浙江中医药大学动物实验研究中心实验动物管理与使用委员会批准(IACUC-20220801-15),并遵守实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

芪苓颗粒处方提取物:棕色粉状物,每包 20 g,处方为土茯苓、薏苡仁各 30 g,黄芪、桑寄生、丹参各 15 g,秦艽 10 g、山慈菇 5 g,批号:20220402,由正大青春宝药业有限公司研制并提供。遮光、密封保存,临用时用 0.5% CMC-Na 配置成相应浓度。别嘌醇:白色片剂,每片 0.1 g,20 片/盒,批号:202214547,国药准字:H34021248,购自合肥久联制药有限公司,遮光、阴凉处保存,临用时用灭菌水配置成相应浓度。氧嗉酸钾(B2226363)、腺嘌呤(H2121045)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;异氟烷(2022032341,瑞沃德生命科技有限公司);尿素氮(220928101)、肌酐(220809101)和尿酸(220612101)检测试剂盒均购自美康生物科技股份有限公司;肝黄嘌呤氧化酶(20230228)和腺苷脱氨酶(20230308)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;尿酸盐染色试剂盒(20221230,索莱宝生物科技有限公司);伊红染液(121886)、苏木素染液(123196)均购自美国 Epreidia 公司;蛋白提取试剂盒(20230404)和 BCA 蛋白含量检测试剂盒(20230316)均购自江苏凯基生物技术有限公司;葡

萄糖转运蛋白 9(26486-1-AP,稀释比 1:500)、转化生长因子-β(21898-1-AP,稀释比 1:500)、有机阴离子转运蛋白 1(26574-1-AP,稀释比 1:500)抗体,均购自武汉三鹰生物技术有限公司;血管细胞粘附因子-1(DF6082,稀释比 1:500)抗体购自美国 Affinity 公司;IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG(H+L)(926-32211,稀释比 1:5000)购自美国 LI-COR 公司。

AQLG04-电子分析天平(METTLER,瑞士);AF100 雪花状制冰机(SCOTSMAN,美国);日立 3110 全自动生化分析仪、HT7800 透射电子显微镜(日立,日本);RM2245 切片机(Leica,德国);STP120 脱水机、AP280-2 包埋机、HM335E 切片机(MICROM,德国);NanoZoomer 数字切片扫描仪(滨松光子,日本);Varioskan Flash 多功能酶标仪(Thermo,美国);Precellys24 生物样品匀质机(Bertin Technologies,中国);Western 电泳及转膜装置(Bio-Rad,美国);Odyssey 双色红外荧光扫描系统(Gene Company Limited,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 高尿酸肾病大鼠模型的建立与药物干预

体重为 180~220 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠 58 只,适应性饲养后按体重随机取 10 只大鼠为正常对照(normal control,NC)组,其余大鼠在试验期间均饲喂 10% 酵母饲料,并在造模第 1 周同时每日给予氧嗉酸钾 250 mg/kg 与腺嘌呤 150 mg/kg 联合灌胃;造模第 2~6 周,同时每日给予氧嗉酸钾 250 mg/kg 与腺嘌呤 100 mg/kg 联合灌胃,多因素诱导法建立 HN 大鼠模型。

连续造模 2 周后,颌下取血检测血清尿酸(uric acid,UA)、肌酐(creatinine,CREA)、尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、甘油三酯(triglyceride,TG)和总胆固醇(total cholesterol,TC)水平,筛选出 40 只血清 UA 和体重接近均值的 HN 大鼠,并采用分层随机法分为 4 组,即模型对照(Model,M)组(纯水)、QLG 低剂量(Qiling granules low dose,QLG-L)组(4.16 g/kg QLG)、QLG 高剂量(Qiling granules high dose,QLG-H)组(8.32 g/kg QLG)、阳性对照(positive control,PC)组(10 mg/kg 别嘌醇),每组 10 只。试验期间,每日观察各组大鼠的体征和死亡率并灌胃给予相应的药物或纯水,每周记录体重。连续给药 4 周后,大鼠取血并行安死术、取材。

1.3.2 血液生化指标测定

给药第 0、4 周时,大鼠禁食不禁水 12 h 后颌下

采血 0.5 mL, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 利用全自动生化分析仪检测血清 UA、CREA、BUN、TC 和 TG 水平。

1.3.3 肝酶活性检测

取肝最大叶暂存 -80 °C 冰箱, 每组随机选取 6 个样本, 按相应试剂盒说明书检测肝黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XOD) 和腺苷脱氨酶 (Adenosine deaminase, ADA) 活性。

1.3.4 肾组织病理学检查

取左肾对半切开, 一半置于 4% 甲醛固定 24 h, 脱水、包埋并切片 (4 μm) 后, 每组随机选取 6 个样本, 进行 HE 染色和免疫组化检测, 观察肾组织病变情况; 另一半置无水乙醇中固定过夜, 每组随机选取 6 个样本, 进行 Gomori 六胺银染色, 观察尿酸盐沉积情况。

病变程度评定方法如下: (1) HE 染色肾组织病变程度评分: 以“肾小球损伤、肾小管扩张、肾小管萎缩、肾小管上皮损伤 (变性、坏死)、间质炎症细胞浸润和间质纤维化”为观察指标, 各项无病变记为 0 分, 病变范围小于 15% 记为 1 分, 16%~30% 记为 2 分, 31%~50% 记为 3 分, 大于 50% 记为 4 分^[4]。肾病变最高累计得分 24 分。(2) Gomori 六胺银染色半定量分析: 在 20×物镜视野下分别截取 6 张照片/只动物, 用 IPP 6.0 图像分析软件进行图像分析, 按公式“阳性面积比例% = 阳性面积/肾组织总面积 × 100%”计算尿酸盐结晶阳性面积比例。

1.3.5 免疫组化检测

将随机选出的 6 只大鼠的肾组织切片置 60 °C 烤箱烘烤 2 h, 脱蜡至水, 经高压热修复后 3% 双氧水灭活 10 min; 滴加一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日 37 °C 复温 30 min 后, 滴加二抗, 37 °C 孵育 30 min; DAB 显色, 苏木素复染, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。结果显示阳性表达呈棕黄色, 细胞核蓝色。每只动物截取 6 张 20 倍物镜视野下照片, 采用 IPP 6.0 图像分析软件获得目标蛋白阳性染色面积, 计算阳性面积比例/% = 阳性染色面积/肾组织面积 × 100%, 以阳性面积比例的平均值反映该动物肾组织葡萄糖转运蛋白 9 (glucose transporter 9, GLUT9)、有机阴离子转运蛋白 1 (organic anion transporter 1, OAT1)、血管细胞粘附因子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和转化生长因子-β (transforming growth factor-beta, TGF-β) 的表达情况。

1.3.6 免疫印迹法检测

每组随机选取 6 只大鼠的右肾组织利用白蛋白试剂盒提取肾组织总蛋白, 并用 BCA 法进行蛋白含量测定后, 利用免疫印迹法 (Western blot) 检测 GLUT9、OAT1、VCAM-1 和 TGF-β 的蛋白表达情况。

1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 ± 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示, 肾组织病理学等级评分采用秩和检验剔除异常值, 其他数据剔除平均数 ± 2 倍标准差外的数据。多组间数据比较采用单因素检验 (One-Way ANOVA) 分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。绘图采用 GraphPad Prism 8 软件。

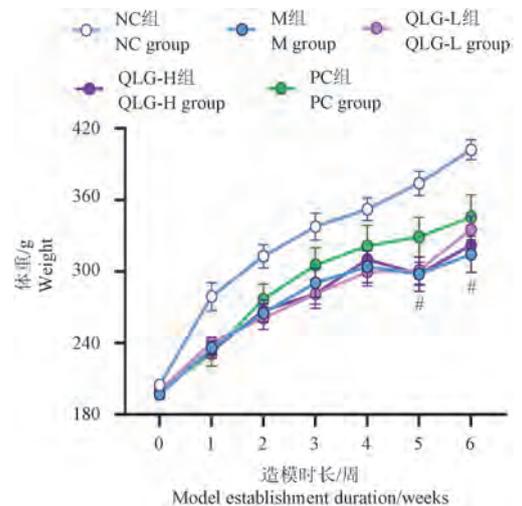
2 结果

2.1 一般观察

试验期间, 各组大鼠状态良好, 未出现死亡情况。由图 1 可见, NC 组大鼠的体重正常增长; 与 NC 组比较, M 组大鼠体重相对降低, 且在造模 5、6 周时下降显著 ($P < 0.05$); 与 M 组比较, 各给药组体重均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 血清 UA、CREA、BUN 水平

由图 2 可见, 与 NC 组比较, M 组大鼠 UA、CREA、BUN 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与 M 组比较, 各给药组大鼠给药 4 周时的 UA 水平均显著降低 ($P < 0.01$), QLG-L 组和 QLG-H 组大鼠的 CREA 和 BUN 水平均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注: 与 NC 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 体重变化情况

Note. Compared with the NC group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Weight changes

2.3 血清 TC、TG 水平

由图 3 可见,与 NC 组比,M 组大鼠的 TG 和 TC 水平均显著升高($P<0.01$)。与 M 组比较,各给药组大鼠给药 4 周时的 TG 和 TC 水平均有不同程度的降低,其中,QLG-H 组大鼠的 TG 水平显著降低($P<0.01$)。

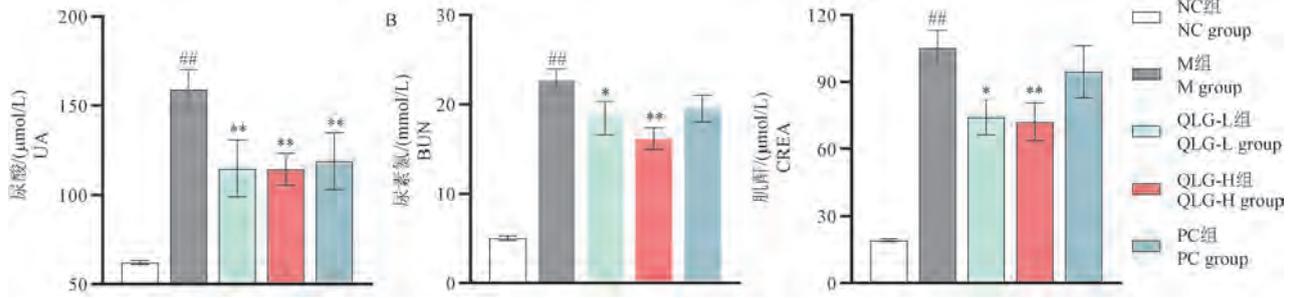
2.4 肝 XOD 和 ADA 活性

由图 4 可见,与 NC 组比较,M 组大鼠血清肝

XOD 和 ADA 活性显著升高($P<0.01$);与 M 组比较,各给药组给药 4 周时大鼠肝 XOD 和 ADA 活性均显著降低($P<0.05, P<0.01$)。

2.5 肾组织损伤与尿酸沉积情况

由图 5 可见,NC 组大鼠肾组织皮质、髓质结构清晰;肾小球体积无明显增大或缩小;肾小管无管壁萎缩或管腔扩张,少量上皮可见轻度水肿但无变性或坏死;系膜基质无增生,间质无明显炎性细胞

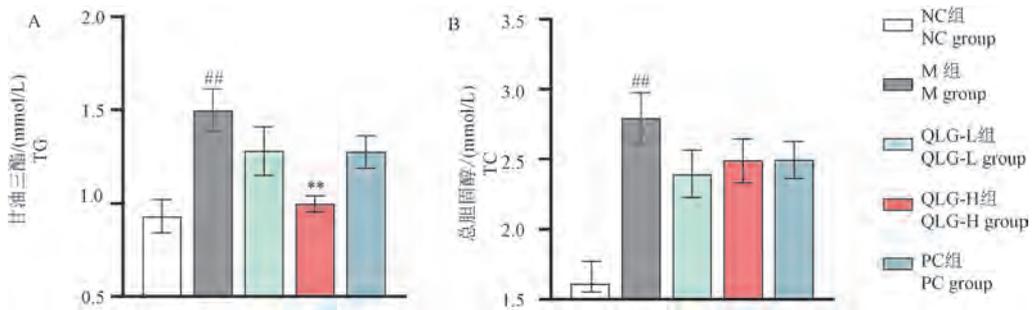


注:与 NC 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 M 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

图 2 血清 UA、CREA 和 BUN 水平

Note. Compared with the NC group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the M group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 2 Serum UA, CREA and BUN levels

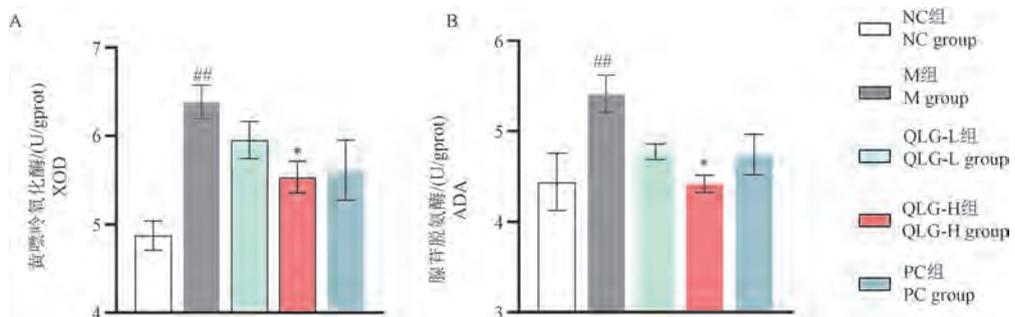


注:与 NC 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 M 组比较, ^{**} $P<0.01$ 。

图 3 血清 TG 和 TC 水平

Note. Compared with the NC group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the M group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 3 Serum TG and TC levels



注:与 NC 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 M 组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

图 4 肝 XOD 和 ADA 的活性

Note. Compared with the NC group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the M group, ^{*} $P<0.05$.

Figure 4 Activity of liver XOD and ADA

浸润;未见棕褐色尿酸盐结晶沉积。与 NC 组比较, M 组肾组织结构紊乱,皮质肾小球数明显减少;大量肾小管管壁变薄且扩张明显,可见大量棕褐色尿酸盐结晶弥漫性分布,大量上皮细胞空泡样或颗粒样变性,较多上皮细胞坏死脱落、刷状缘缺失;间质轻度水肿并伴随炎性细胞弥漫性浸润,病变程度评分和尿酸盐阳性面积率均显著升高($P<0.01$)。与 M 组比较,QLG-L 组和 QLG-H 组大鼠肾组织各类病变情况均有所减轻,肾间质尿酸盐沉积均有所减少,病变程度评分和尿酸盐阳性面积率均有下降趋势,但无显著差异($P>0.05$)。

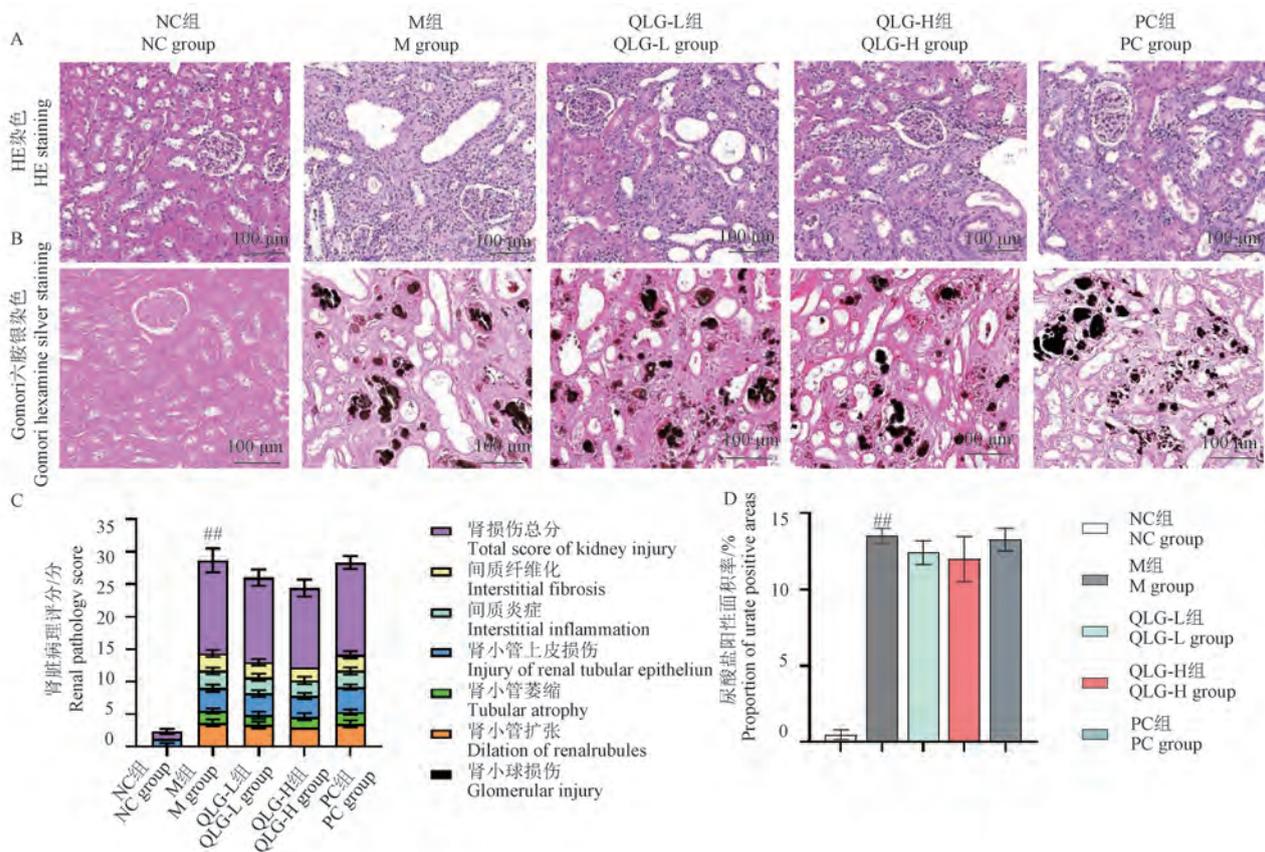
2.6 免疫组化检测肾 GLUT9、OAT1、VCAM-1 和 TGF-β 蛋白表达

与 NC 组比较, M 组大鼠肾小管上皮 GLUT9 和 VCAM-1 以及肾小管、肾间质 TGF-β 的阳性表达均

增加,阳性面积率均显著升高($P<0.01$),肾小管上皮基底侧 OAT1 蛋白阳性表达减少,阳性面积率显著降低($P<0.01$);与 M 组比较,QLG-L 组和 QLG-H 组大鼠肾组织的 GLUT9、TGF-β 和 VCAM-1 蛋白阳性表达均有所减少,阳性面积率均有一定的下降趋势, OAT1 蛋白阳性表达有所增加,阳性面积率有所升高,其中,QLG-L 组大鼠肾组织 TGF-β 蛋白的阳性面积率显著下降($P<0.01$,表 1,图 6)。

2.7 Western blot 检测肾 GLUT9、OAT1、VCAM-1 和 TGF-β 蛋白表达

由图 7 可见,与 NC 组比较, M 组大鼠肾组织 GLUT9、TGF-β 和 VCAM-1 蛋白水平均显著升高($P<0.01, P<0.05$), OAT1 蛋白水平显著降低($P<0.01$);与 M 组比较,各给药组大鼠肾的 VCAM-1 蛋白表达均显著降低($P<0.01$),QLG-L 组、QLG-H 组



注: A:典型病变肾 HE 染色; B:典型病变肾 Gomori 六胺银染色; C:肾组织病变程度评分结果; D:肾组织尿酸盐阳性面积率统计结果。与 NC 组比较, ^{##} $P<0.01$ 。

图 5 肾组织病变程度与尿酸沉积情况

Note. A, HE staining for typical renal lesions. B, Gomori hexamine silver staining for typical renal lesions. C, Score result of the degree of renal tissue lesions. D, Statistical result of the positive area rate of urate in renal tissue. Compared with the NC group, ^{##} $P<0.01$.

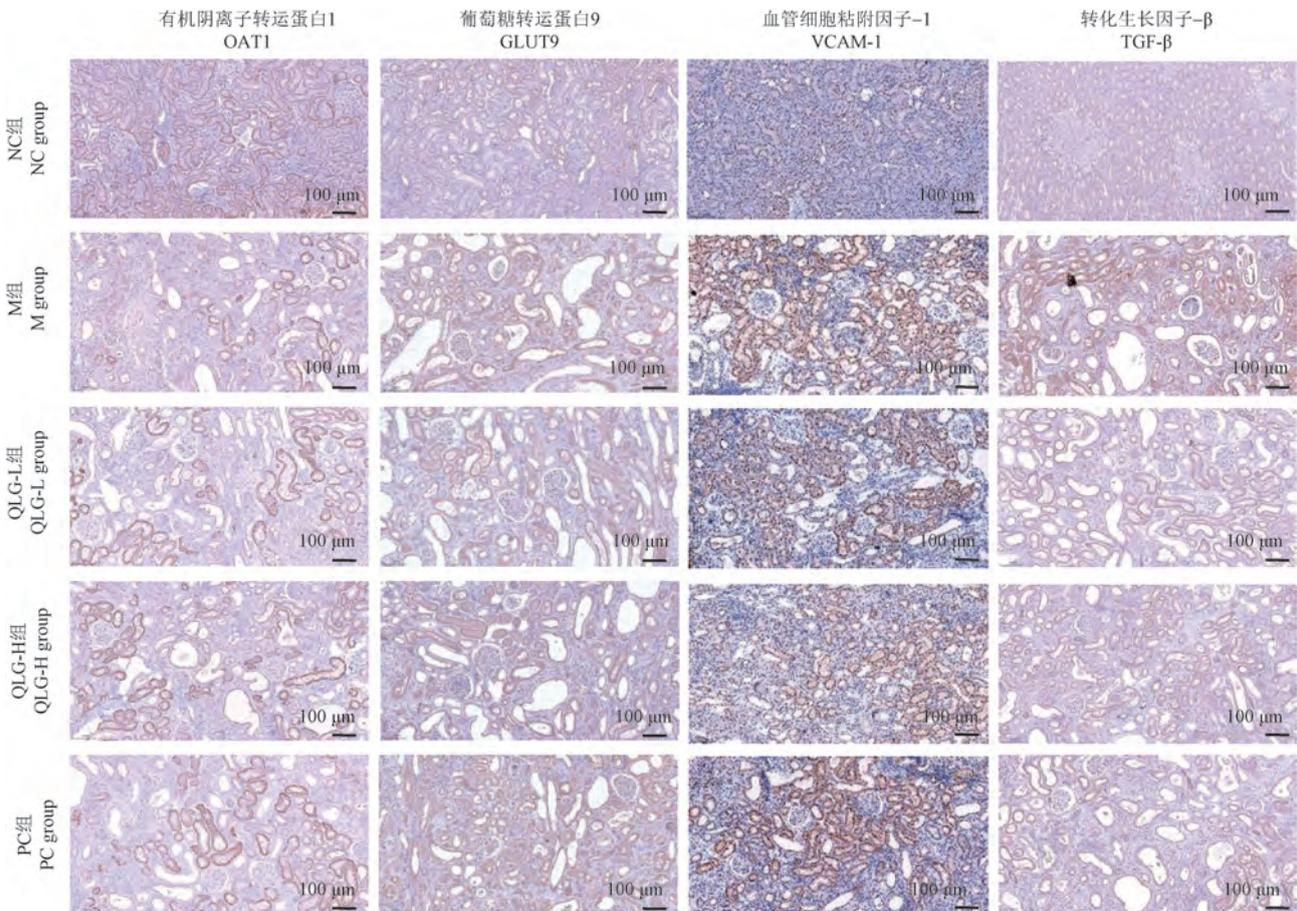
Figure 5 Degree of renal tissue lesions and uric acid deposition

表 1 肾组织 GLUT9、OAT1、TGF- β 和 VCAM-1 免疫组化染色的阳性面积率半定量分析/%Table 1 Semi quantitative analysis of the immunohistochemical staining's positive area rates of renal tissue GLUT9, OAT1, TGF- β and VCAM-1

组别 Groups	葡萄糖转运蛋白 9 GLUT9	有机阴离子转运蛋白 1 OAT1	转化生长因子- β TGF- β	血管细胞粘附因子-1 VCAM-1
NC 组 NC group	24.54 \pm 5.57	28.12 \pm 3.91	8.41 \pm 4.48	3.16 \pm 1.73
M 组 M group	41.29 \pm 4.43 ^{##}	11.68 \pm 2.31 ^{##}	31.42 \pm 1.87 ^{##}	27.23 \pm 6.37 ^{##}
QLG-L 组 QLG-L group	39.91 \pm 3.49	12.21 \pm 5.75	23.17 \pm 2.02 ^{**}	21.24 \pm 5.89
QLG-H 组 QLG-H group	37.91 \pm 3.46	12.85 \pm 2.50	25.10 \pm 4.57	18.76 \pm 2.28
PC 组 PC group	40.18 \pm 9.08	14.00 \pm 5.91	22.51 \pm 6.05	18.35 \pm 4.91

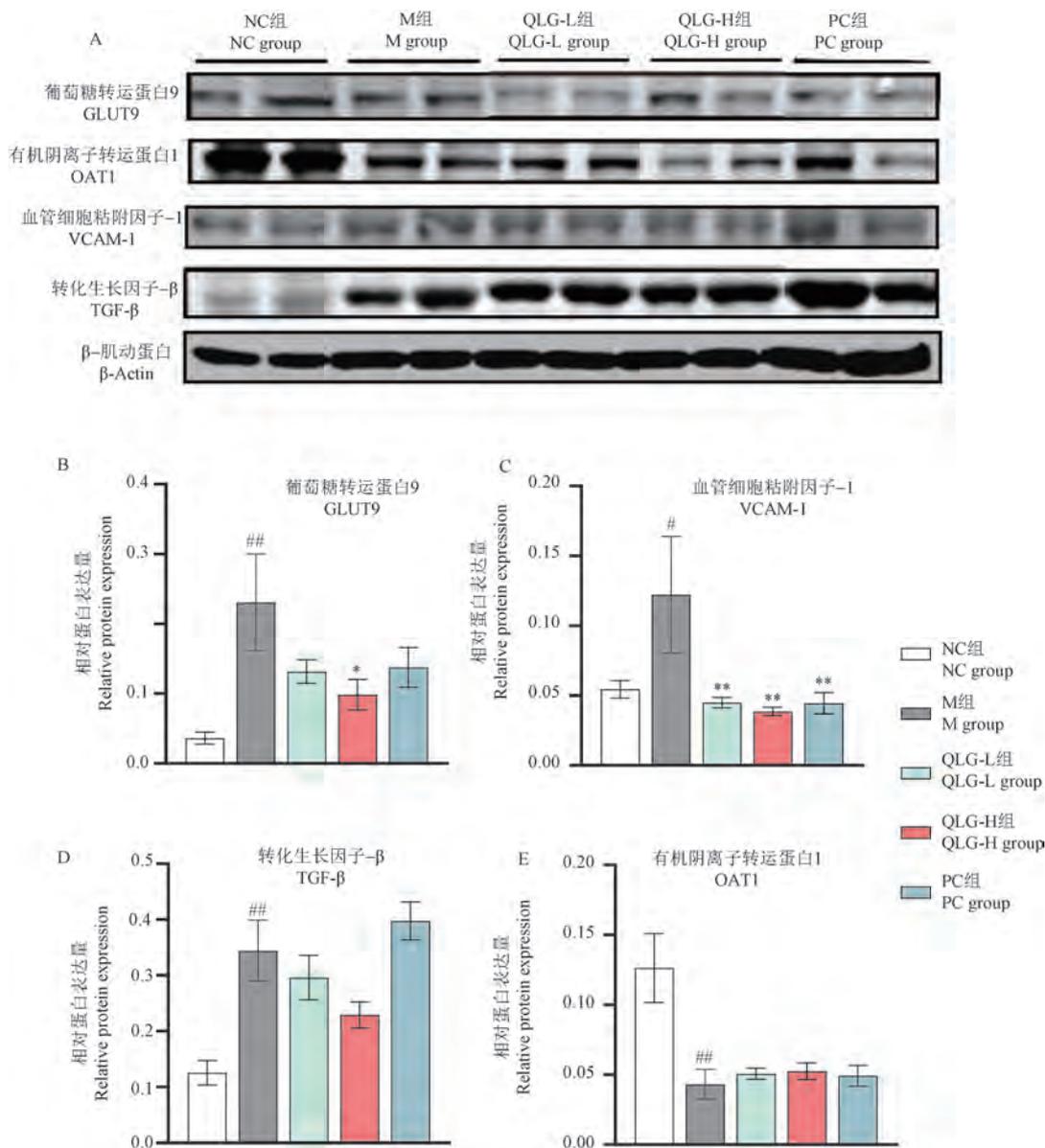
注:与 NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 M 组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the NC group, ^{##} $P < 0.01$. Compared with the M group, ^{**} $P < 0.01$.

图 6 免疫组化检测肾组织 OAT1、GLUT9、VCAM-1 和 TGF- β 蛋白表达Figure 6 Immunohistochemical detection of renal tissue's OAT1, GLUT9, VCAM-1 and TGF- β protein expression

大鼠肾 GLUT9 和 TGF- β 蛋白表达均有不同程度的降低,其中,QLG-H 组大鼠肾 GLUT9 蛋白表达显著

降低($P < 0.05$),而 OAT1 表达均有所增加,但无显著差异($P > 0.05$)。



注:与 NC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与 M 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 Western blot 检测肾组织 GLUT9、OAT1、TGF-β、VCAM-1 蛋白表达情况

Note. Compared with the NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the M group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 7 Western blot detection of renal tissue's GLUT9, OAT1, TGF-β and VCAM-1 protein expression

3 讨论

近年来,随着高糖、高嘌呤、高脂食物在大众饮食中的占比不断升高,因机体内嘌呤代谢紊乱所致的 HUA 在人群中的患病率逐年升高;长期 HUA 又会使尿酸不断沉积在肾上,引发 HN,严重时可发展为肾纤维化,甚至肾衰竭,但目前临床上暂无安全有效的治疗药物。动物模型是疾病研究与药物研发的重要工具,啮齿类动物是 HUA 造模的常用动物,但与人类不同,其体内有可将尿酸分解并排出

的尿酸酶,故不易发生高尿酸,因而在 HUA 模型制备中需采用尿酸酶抑制以提高造模成功率。氧嗪酸钾是目前常用的尿酸酶抑制,可抑制尿酸酶活性,减少尿酸分解;腺嘌呤、次黄嘌呤等尿酸前体物质和酵母膏、干酵母等高嘌呤物质可通过促进尿酸生成从而引发 HUA,但腺嘌呤等存在肾毒性,剂量较高时易导致动物死亡、较低则会降低 HUA 造模成功率^[5]。因此,研究者们试图通过不同诱导因素联用和不同剂量与配比来提高 HUA 模型成功率、降低动物死亡率、缩短造模时长以建立稳定可靠的 HUA

模型,虽已提出较多方法,但仍无合适且可较好复制的建模方法^[6]。本课题组前期也进行了不同剂量与配比的试验,研究发现,造模初期在饲喂酵母饲料的同时,给予氧嗪酸钾(250 mg/(kg·d))与腺嘌呤(150 mg/(kg·d))联合灌胃 1 周后,可见大鼠尿酸水平显著升高,从第 2 周起将腺嘌呤剂量降低至 100 mg/(kg·d),继续造模 5 周,试验期间无死亡发生,且可见大鼠尿酸稳定上升,并能引发 HN。因此,本项目采用“10%酵母饲料饲喂的同时,给予氧嗪酸钾(250 mg/(kg·d))与腺嘌呤(150 mg/(kg·d))联合连续灌胃 1 周后,再给予氧嗪酸钾(250 mg/(kg·d))与腺嘌呤(100 mg/(kg·d))连续灌胃 5 周”建立 HN 大鼠模型,结果显示,6 周的造模期间内大鼠均未发生死亡,且与 NC 组比较,M 组大鼠的血清 UA、CREA、BUN、TC、TG 水平和肝 XOD、ADA 活性均显著升高;HE 染色可见肾组织结构紊乱,肾小管管壁萎缩、管腔扩张、上皮细胞空泡样、颗粒样变性并出现坏死脱落与刷状缘缺失,间质炎性细胞弥漫性浸润等明显肾病变情况;Gomori 六胺银染色可见肾小管中有大量黑染的尿酸盐沉积,肾尿酸盐阳性面积率显著升高;肾 GLUT9、VCAM-1 和 TGF- β 表达均显著升高,OAT1 表达明显降低。以上结果表明,本研究建立的 HN 模型大鼠的血清 UA 水平高且存在明显的尿酸代谢紊乱、脂质代谢紊乱与肾损伤,与 Wen 等^[7]报道的 HN 临床表现及疾病特征相符。

血清 UA 长期维持在较高水平是 HN 发生发展的直接原因,UA 水平的高低可反映机体 UA 代谢的紊乱程度;CREA 和 BUN 可评估肾小球滤过功能和尿液浓缩功能,其水平升高提示肾组织及其功能受损。肝 XOD 是嘌呤分解代谢中的限速酶,ADA 是参与尿酸代谢的关键酶,高尿酸血症可导致血液中 TC、TG 水平升高,高胆固醇又可介导 XOD 的活性增强,提示脂质代谢与 UA 代谢密切相关^[8]。HE 染色和 Gomori 六胺银染色可分别用来观察肾组织病变情况和尿酸盐沉积情况^[9]。本研究结果显示,与 M 组比较,各给药组大鼠给药 4 周时血清 UA 水平和肝 XOD、ADA 活性均显著降低,QLG-L 组和 QLG-H 组大鼠 CREA、BUN、TC、TG 水平和肝 XOD、ADA 活性均有不同程度的降低,尿酸盐沉积及其引发的肾病变程度均有不同程度的减轻,表明 QLG 可降低 HN 模型大鼠血清 UA 水平,改善脂质代谢紊乱与肾损伤情况,提示 QLG 可有效应对高尿酸肾病,其作

用机制可能与降低 HN 大鼠血清 UA、CREA、BUN、TG 水平和肝 XOD、ADA 活性,减轻尿酸盐沉积及其引发的肾损伤有关。

尿酸转运蛋白在尿酸代谢过程中起着重要作用,GLUT9 是一种重要的尿酸重吸收蛋白,主要分布在近曲小管基底外侧膜,可通过转运葡萄糖来加速肾中尿酸的重吸收;OAT1 参与肾对有机阴离子的消除,是一种重要的尿酸排泄蛋白,主要分布在肾近曲小管细胞基底膜,可将尿酸盐从血液输送到近端肾小管细胞^[10]。VCAM-1 是一种黏附分子,参与了白细胞黏附和炎症细胞浸润过程。在高尿酸肾病中,VCAM-1 的表达增加,导致炎症细胞在肾小球区域聚集,从而造成肾损伤^[11]。TGF- β 是一类调节细胞生长和分化的细胞因子,可被 HN 大鼠中持续升高的 UA 激活,介导肾小管的纤维化,进而导致肾损伤^[12]。本研究结果显示,与 M 组比较,QLG-L 组和 QLG-H 组大鼠肾中 GLUT9、VCAM-1 和 TGF- β 的表达均有不同程度的降低,OAT1 表达均有所增高,表明 QLG 可改善 HN 模型大鼠肾 GLUT9、VCAM-1、TGF- β 和 OAT1 蛋白的异常表达,提示 QLG 可通过干预 GLUT9、VCAM-1、TGF- β 和 OAT1 蛋白的表达来改善 HN 模型大鼠的 UA 代谢紊乱、降低其肾炎症反应与纤维化程度。

综上所述,给予大鼠酵母饲料饲喂的同时给予氧嗪酸钾与腺嘌呤联合灌胃可诱导建立稳定的 HN 大鼠模型,该模型适用于 HN 相关药物的作用及机制研究;QLG 可通过改善 HN 模型大鼠 UA 代谢紊乱、减轻肾炎症与尿酸盐沉积及其引发的肾损伤来有效治疗 HN,其作用机制与降低血清 UA、CREA、BUN、TG 水平和肝 XOD、ADA 活性以及肾 GLUT9、OAT1、VCAM-1、TGF- β 蛋白的表达有关。

参考文献:

- [1] DEMIRAY A, AFSAR B, COVIC A, et al. The role of uric acid in the acute myocardial infarction: a narrative review [J]. *Angiology*, 2022, 73(1): 9-17.
- [2] BAI Y, WU B, GOU L, et al. Cardiovascular safety evaluation of febuxostat and allopurinol: findings from the FDA adverse event reporting system [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(18): 6089.
- [3] 王雨,林志健,张冰. 尿酸代谢紊乱相关疾病的现代认知及中医药防治进展 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(12): 3160-3167.
WANG Y, LIN Z J, ZHANG B. Modern cognition of diseases related to uric acid metabolic disorder and progress in prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin*

- Mater Med, 2024, 49(12): 3160-3167.
- [4] 严美霞, 霍帅, 田瑞敏, 等. 尿酸性肾病大鼠模型建立的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 1-9.
YAN M X, HUO S, TIAN R M, et al. Establishment of a rat model of uric acid nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 1-9.
- [5] DHOUBI R, AFFES H, SALEM M B, et al. Creation of an adequate animal model of hyperuricemia (acute and chronic hyperuricemia); study of its reversibility and its maintenance [J]. Life Sci, 2021, 268: 118998.
- [6] 李兰, 程冬旗, 袁玉佳, 等. 不同剂量氧嗪酸钾联合腺嘌呤诱导大鼠高尿酸肾损伤模型的建立与评价 [J]. 华西医学, 2021, 36(5): 643-650.
LI L, CHENG D Q, YUAN Y J, et al. Establishment and evaluation of hyperuricemic nephropathy model induced by different doses of potassium oxanate combined with adenine in rats [J]. West China Med J, 2021, 36(5): 643-650.
- [7] WEN S, ARAKAWA H, TAMAI I. Uric acid in health and disease: From physiological functions to pathogenic mechanisms [J]. Pharmacol Ther, 2024, 256: 108615.
- [8] CLARAMUNT D, GIL-PEÑA H, FUENTE R, et al. Chronic kidney disease induced by adenine: a suitable model of growth retardation in uremia [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 309(1): F57-F62.
- [9] 李东东, 刘伟伟, 周子正, 等. 降尿酸方对尿酸性肾病大鼠肾脏细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(6): 49-54.
LI D D, LIU W W, ZHOU Z Z, et al. Effect and mechanism of Jiangniaosuan prescription on renal cell apoptosis in rats with uric acid nephropathy [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2022, 29(6): 49-54.
- [10] YANG B, XIN M, LIANG S, et al. New insight into the management of renal excretion and hyperuricemia: Potential therapeutic strategies with natural bioactive compounds [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1026246.
- [11] LIU Z, XIANG H, DENG Q, et al. Baicalin and baicalein attenuate hyperuricemic nephropathy via inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B signalling pathway [J]. Nephrology, 2023, 28(6): 315-327.
- [12] CHEN L, YANG T, LU D W, et al. Central role of dysregulation of TGF- β /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 670-681.

[收稿日期] 2024-05-09

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》不接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章的说明

本刊严格遵守我国实验动物相关法规和标准,为保障实验动物的福利权益,不断提升动物实验研究的水平并获得国际学术界同行的认可,根据国际和国内实验动物有关法规和标准,规定实验动物麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂,特别是当涉及存活手术的动物实验时。

鉴于水合氯醛属于镇静、催眠以及抗惊厥药物,其作为麻醉剂效果较差,只作用于中枢神经系统,无法阻断痛觉感受器达到镇痛效果,且刺激性强、毒副作用较大,存在干扰实验结果且有悖于实验动物伦理审查原则等问题,国际期刊普遍建议不再使用水合氯醛作为实验动物的麻醉剂。

本刊亦不接收使用水合氯醛作为实验动物麻醉剂的文章,特此告知广大作者及读者。

《中国比较医学杂志》编辑部

王春玲,文晓东. 八月札乙醇提取物对人肝癌细胞抑制增殖、促进凋亡及转录组学分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 60-71.

Wang CL, Wen XD. Transcriptome analysis of ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on cell proliferation inhibitory functions and apoptosis promotion in human liver cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 60-71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.007

八月札乙醇提取物对人肝癌细胞抑制增殖、促进凋亡及转录组学分析

王春玲^{1,2}, 文晓东^{3*}

(1.广西中医药大学广西高校中药神经-代谢及免疫药理重点实验室, 南宁 530200; 2.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 3.广西中医药大学附属瑞康医院脑病一区, 南宁 530011)

【摘要】 目的 探讨八月札乙醇提取物(ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz, EEATK)对人肝癌细胞增殖、凋亡的影响及可能作用机制。方法 体外培养人肝癌细胞(Hep3B和Huh-7),设置空白对照组、索拉菲尼(Sorafenib, 5 μ mol/L)组及EEATK组(0.10、0.15、0.20、0.3 mg/mL),分别给予对应药物干预,采用CCK-8法检测不同分组的药物干预对肝癌细胞活力的影响,筛选最佳作用浓度用于后续实验;采用EdU染色法、克隆形成实验、Annexin V-FITC/PI双染法观察EEATK(0.15 mg/mL)对人肝癌细胞(Hep3B和Huh-7)增殖和凋亡的影响;转录组测序分析EEATK调控Hep3B细胞增殖、凋亡的差异表达基因;使用基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析差异表达基因的功能及富集通路;并联合比较毒物基因组学(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)数据库分析与肝癌增殖、凋亡相关基因,应用qRT-PCR验证关键基因表达情况。结果 与空白对照组相比,随着EEATK浓度增加,能够显著抑制Hep3B和Huh-7细胞的活力($P < 0.01$);0.15 mg/mL的EEATK作用肝癌细胞后,EdU阳性细胞率、细胞克隆形成率均显著降低(均 $P < 0.01$),同时细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$);Hep3B细胞转录组测序结果分析显示,与空白对照组相比,EEATK引起1577个基因表达发生显著改变($P < 0.01$),其中表达上调差异基因942个,表达下调差异基因635个。GO功能富集分析发现差异表达基因主要显著富集于胆固醇合成、炎症、细胞外基质中。KEGG通路分析提示EEATK可能主要通过转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路及核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路发挥抑癌作用。CTD分析及qRT-PCR检测显示EEATK可引起BIRC5、细胞周期蛋白依赖性激酶1(cyclin-dependent kinases 1, CDK1)等细胞凋亡相关基因的表达显著下调($P < 0.01$),周期蛋白抑制因子1A(cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、脯氨酸羟化酶3(egl-9 family hypoxia inducible factor 3, EGLN3)的表达显著上调($P < 0.01$);同时,可引起FAM83D(family with sequence similarity 83D, FAM83D)、MKI-67等细胞增殖相关基因显著下调($P < 0.01$),MYC、叉头框蛋白1(forkhead box C1, FOXC1)等表达显著上调($P < 0.01$)。结论 EEATK可抑制细胞增殖并诱导凋亡,通过调节TGF- β 及NF- κ B信号通路中相关基因的表达而发挥抗肝癌作用。

【关键词】 八月札;肝癌;增殖;凋亡;转录组学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)08-0060-12

Transcriptome analysis of ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on cell proliferation inhibitory functions and apoptosis promotion in human liver cells

【基金项目】 广西壮族自治区中医药管理局课题(GXZYA20220096);广西中医药大学校级科研项目(2023MS016)。

【作者简介】 王春玲(1974—),女,博士,讲师,研究方向:抗肿瘤药物研究。E-mail:409116325@qq.com

【通信作者】 文晓东(1973—),男,博士,副教授,研究方向:抗肿瘤药物研究。E-mail:1021643438@qq.com

WANG Chunling^{1,2}, WEN Xiaodong^{3*}

(1. Key Laboratory of TCM Neuro-Metabolism and Immunopharmacology of Guangxi Education Department, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China. 2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200. 3. Brain Disease Area 1, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011)

[Abstract] Objective To investigate the effects of ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz (EEATK) on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma Hep3B and Huh-7 cells and to explore its underlying mechanism. **Methods** Human Hep3B cells and Huh-7 cells were cultured *in vitro* and separated into control group, Sorafenib group (5 $\mu\text{mol/L}$), and EEATK groups (0.10 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.3 mg/mL) and given the corresponding drug interventions. A CCK-8 assay was used to measure the impact of the different interventions on the proliferation of Hep3B cells and Huh-7 cells to screen the optimal action-inducing concentrations for subsequent experiments. EdU staining assay and colony formation assay were used to explore the effect of EEATK on proliferation, and Annexin V-FITC/PI double-staining assay was applied for apoptotic rate analysis. Transcriptome sequencing (RNA-seq) technology was used to analyze differentially expressed genes (DEGs) related to cell proliferation and apoptosis in the control group and EEATK (0.15 mg/mL) groups of Hep3B cells. DEGs were analyzed for function with Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment. The Comparative Toxicogenomics Database (CTD) was used to validate the expression of key proteins related to cell proliferation and apoptosis, and the findings were verified by qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, different concentration of EEATK significantly inhibited the activity of Hep3B and Huh-7 cells ($P < 0.01$). Hep3B cells were treated with 0.15 mg/mL EEATK, the EdU-positive cell rate and clone formation rate significantly decreased (all $P < 0.01$). At the same time, the apoptotic rate of the EEATK group significantly increased ($P < 0.01$). Transcriptome sequencing of Hep3B cells showed that EEATK induced significant changes in the expression of 1577 genes ($P < 0.01$), of which 942 were up-regulated and 635 were down-regulated compared with the control group. GO functional enrichment analysis revealed that the DEGs were mainly enriched for cholesterol synthesis, inflammation, and extracellular matrix. KEGG pathway analysis showed that EEATK plays an anti-tumor role, mainly through the TGF- β and NF- κ B signaling pathways. CTD and qRT-PCR analysis showed that EEATK significantly down-regulated the expression of apoptosis-related genes such as BIRC5 and CDK1 ($P < 0.01$) and significantly upregulated the expression of CDKN1A and EGLN3 ($P < 0.01$). At the same time, EEATK caused the significant downregulation of cell-proliferation-related genes such as FAM83D and MKI-67 ($P < 0.01$), and significantly upregulated the expression of MYC and FOXC1 ($P < 0.01$). **Conclusions** EEATK can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in a manner that may be related to the regulation of TGF- β and NF- κ B signal pathway-related gene expression.

[Keywords] *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz; hepatic carcinoma; proliferation; apoptosis; transcriptomics

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

肝细胞癌 (hepatic carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率在不断上升。我国肝癌患者的 5 年平均生存率仅为 12.1%^[1]。目前, 化学药物治疗是临床上治疗肝癌的常用手段, 但长期服用会产生耐药性导致治疗低效, 寻找高效低毒的药物对于肝癌的治疗具有重要意义。凋亡受阻和无限增殖是肿瘤细胞的主要特点, 抑制细胞增殖和促进凋亡可作为治疗 HCC 一种有效的方法。

广西民间应用八月札作为抗肝癌药物已有较长的历史, 效果显著。本课题组前期研究从细胞及动物水平联合发现 EEATK 具有明显的抗肝癌活性^[2], 但其抗肝癌的作用机制尚不清楚。本研究通

过体外实验结合转录组学初步阐明其抗肝癌的作用机制, 为八月札的深入研究和临床应用提供实验依据, 对进一步推动八月札的科学开发利用具有重要的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 Huh-7 和 Hep3B 均购自赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

八月札, 购于广西仙茱中药有限公司, 由广西中医药大学中药鉴定教研室马雯芳教授鉴定为三

叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. 的干燥近成熟的果实。DMEM、MEM 培养液和 CCK-8 检测试剂盒均购自 Biosharp 生物科技公司; CLARK 胎牛血清购自上海慧颖生物科技有限公司; BeyoClick™ EdU-488、RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒均购自康为世纪生物科技有限公司; Scientific RevertAid RT 试剂盒、磷脂酰丝氨酸蛋白抗体-荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司; qRT-PCR 引物见表 1, 由武汉灵思生物技术有限公司设计及合成。cDM2500 型倒置显微镜 (德国 Leica 公司); Forma TM 31 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); Pico17 型低速离心机 (美国 Thermo 公司); HBS-1096A 多功能酶标仪 (南京德铁实验设备有限公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司); MF52 型荧光显微镜 (广州市明美科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 EEATK 冻干粉的制备

取八月札粗粉 500 g, 按料液比 (m/v, 1 : 8) 用石油醚 4000 mL 回流脱脂 2 次, 每次 1.5 h, 挥尽药材中的石油醚后, 取 8 倍药材量的 95% 乙醇回流提取 2 h, 第二次加入 6 倍的 75% 乙醇回流提取 1.5 h, 第三次加入 6 倍量的 50% 乙醇再回流提取 1 h, 过滤合并药液, 减压回收乙醇, 并浓缩成浸膏, 经冷冻干燥后获得冻干粉。

1.3.2 细胞培养

采用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液培养 Huh-7 细胞, Hep3B 细胞以相同条件培养于 MEM 培养液中, 传 2 ~ 3 代。两株细胞均在在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 细胞单层铺满培养瓶 70% ~ 85% 后, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的细胞

用于实验。

1.3.3 CCK-8 检测细胞活力

对数生长期的 Huh-7 和 Hep3B 细胞以 2×10^4 / 孔接种于 96 孔板。将细胞分为空白对照组、索拉菲尼组 (Sorafenib, 5 μmol/L) 和 EEATK 组 (0.10、0.15、0.20、0.30 mg/mL), 每组平行设置 6 个复孔。作用细胞 24 h 后吸弃培养基, 沿孔的侧壁每孔缓慢加入 10 μL CCK-8 工作液, 继续培养 4 h 后取出培养板, 在 450 nm 波长下用多功能酶标仪测定各孔吸光度值 (OD 值), 按下式计算细胞抑制率 = $(1 - \text{给药孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.3.4 EdU 检测细胞增殖能力

对数生长期的 Huh-7 和 Hep3B 细胞, 分别以 1×10^6 / 孔接种于 6 孔板, 将细胞分为空白对照组和终浓度为 0.15 mg/mL 的 EEATK 组, 每组设 3 个复孔。空白对照组接种细胞常规培养不加入药物, EEATK 组加入终浓度为 0.15 mg/mL 的培养液; 以上两组细胞于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后按照 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒说明书操作后使用倒置荧光显微镜拍摄图像。

1.3.5 克隆形成实验检测细胞克隆形成

对数生长期的 Huh-7 和 Hep3B 细胞按 1×10^6 / 孔分别接种于 6 孔板中, 分组及加药浓度同“1.3.4”项下, 作用 24 h 后对各孔细胞进行消化, 并用相同体积培养液重悬细胞, 同时对正常组细胞进行计数; 正常组接种 3000 个细胞至 24 孔板中, 药物组按正常细胞组等体积接种 24 孔板。6 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 10 d, 中间隔 2 d 换液 1 次, 待细胞长成克隆 (约 20 ~ 30 个细胞) 后, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫溶液染色 20 min, 流水冲洗晾干后拍照, 计算克隆形成率。

1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

Hep3B 细胞分组同“1.3.4”项下, 作用 24 h 后

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 primer sequence for qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	片段长度/bp Length field
BIRC5	5'-AGGACCACCGCATCTCTACAT-3'	5'-AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG-3'	118
CDK1	5'-AAACTACAGGTCAAGTGGTAGCC-3'	5'-TCCTGCATAAGCACATCCTGA-3'	148
CDKN1A	5'-TGTCCTCAGAACCCATGC-3'	5'-AAAGTCGAAGTTCATCGCTC-3'	139
EGLN3	5'-CTGGGCAAATACTACGTCAAGG-3'	5'-GACCATCACCGTTGGGGTT-3'	106
FAM83D	5'-GGGAAGTTCACGAAAAGTTCA-3'	5'-GACTGGGCATACAGGATTCCG-3'	167
MKI-67	5'-GCCTGCTCGACCCCTACAGA-3'	5'-GCTTGTCAACTGCGGTTC-3'	127
MYC	5'-GGCTCTGGCAAAAAGGTCA-3'	5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'	119
FOXC1	5'-TGTTGAGTACACAGAGGATCG-3'	5'-ACAGTCGTAGACGAAAGCTCC-3'	112
GAPDH	5'-ACAACTTTGGTATCGTGAAGG-3'	5'-GCCATCAGCCACAGTTTC-3'	101

吸弃培养液,用 0.25%胰酶收集各组细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,将细胞重悬浮于 250 μL 结合缓冲液中,调整待测细胞的浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ (结合缓冲液用去离子水稀释 4 倍)。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 的流式管中,加入 5 μL Annexin-VFITC 和 10 μL 的 PI,轻轻混匀,避光,室温反应 20 min,在反应管中补加 400 μL PBS,立即应用流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

1.3.7 转录组数据分析 EEATK 干预 Hep3B 细胞后基因差异表达的影响

Hep3B 细胞分组同“1.3.4”项下处理,24 h 后收集细胞,每份细胞加入 1 mL TRIzol 试剂处理细胞,提取总 RNA 后制成细胞重悬液后,进行转录组测序,转录组测序由武汉灵思信息技术有限公司协助完成。利用 DESeq2 软件进行基因差异表达的分析,差异表达基因(筛选标准: $|\log\text{FC}| > 1$ 及 $P < 0.05$);采用 cluster Profiler 软件对所筛选出来的差异基因,进行 GO 分析。转录组数据联合数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)分析差异表达基因中与增殖、凋亡相关的关键基因,并利用在线软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制韦恩图。

1.3.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

Hep3B 细胞分组同“1.3.4”项下,每组均设 3 个复孔,处理 24 h 后收集细胞,每份细胞加入 1 mL TRIzol 试剂处理细胞,提取总 RNA 后制成细胞重悬液后,应用 Scientific RevertAid RT 试剂盒合成 cDNA 后,qRT-PCR 检测 BIRC5、CDK1、CDKN1A、EGLN3、

FAM83D、MKI-67、MYC、FOXC1 的表达。数据以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示, $\Delta\text{CT} = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值}$, $\Delta\Delta\text{CT} = \text{实验组 (Ct (目的基因) - Ct (内参基因))} - \text{对照组 (Ct (目的基因) - Ct (内参基因))}$ 。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

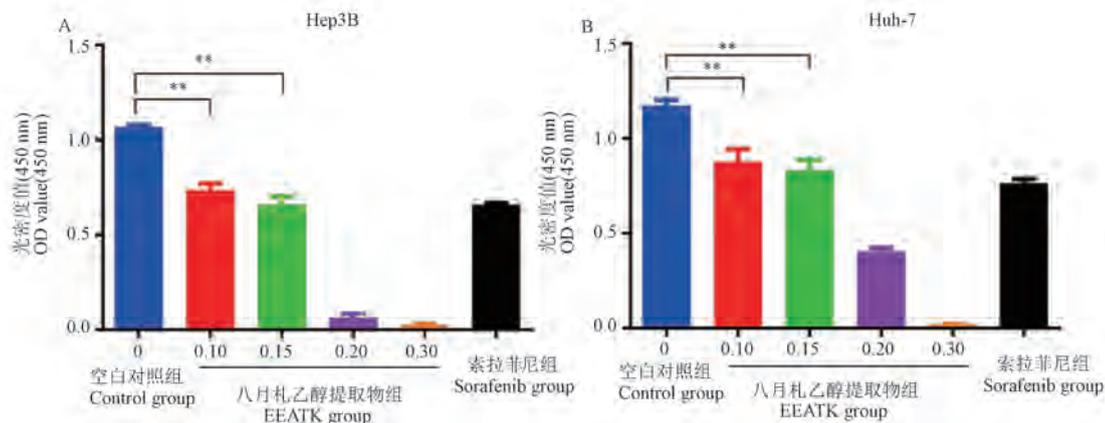
2 结果

2.1 EEATK 抑制 Hep3B 及 Huh-7 细胞的活力

以索拉菲尼(5 $\mu\text{mol/L}$)为对照,使用不同终浓度(0.1、0.15、0.2 和 0.3 mg/mL)的 EEATK 分别作用 Hep3B 及 Huh-7 细胞 24 h 后,利用 CCK-8 试剂检测细胞活力的变化。结果显示,与空白对照组比较,随着浓度的增加,EEATK 各组细胞的 OD 值显著降低(均 $P < 0.01$),见图 1。当 EEATK 终浓度为 0.15 mg/mL 时,Hep3B 及 Huh-7 细胞活力抑制率分别为 38.29%、21.40%,当终浓度为 0.20 mg/mL 时,对 Hep3B 及 Huh-7 细胞的抑制率均显著升高,分别为 94.10% 和 65.43%,故本研究选用 0.15 mg/mL 为终浓度进行后续实验。

2.2 EEATK 抑制 Hep3B 及 Huh-7 细胞的增殖

EdU 检测结果分析发现,EEATK 干预后可显著抑制肝癌细胞(Hep3B、Huh-7)中 EdU 阳性细胞数($P < 0.01$);克隆形成实验分析发现,EEATK 干预后可显著抑制肝癌细胞的克隆形成数($P < 0.01$),如图 2 所示。



注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

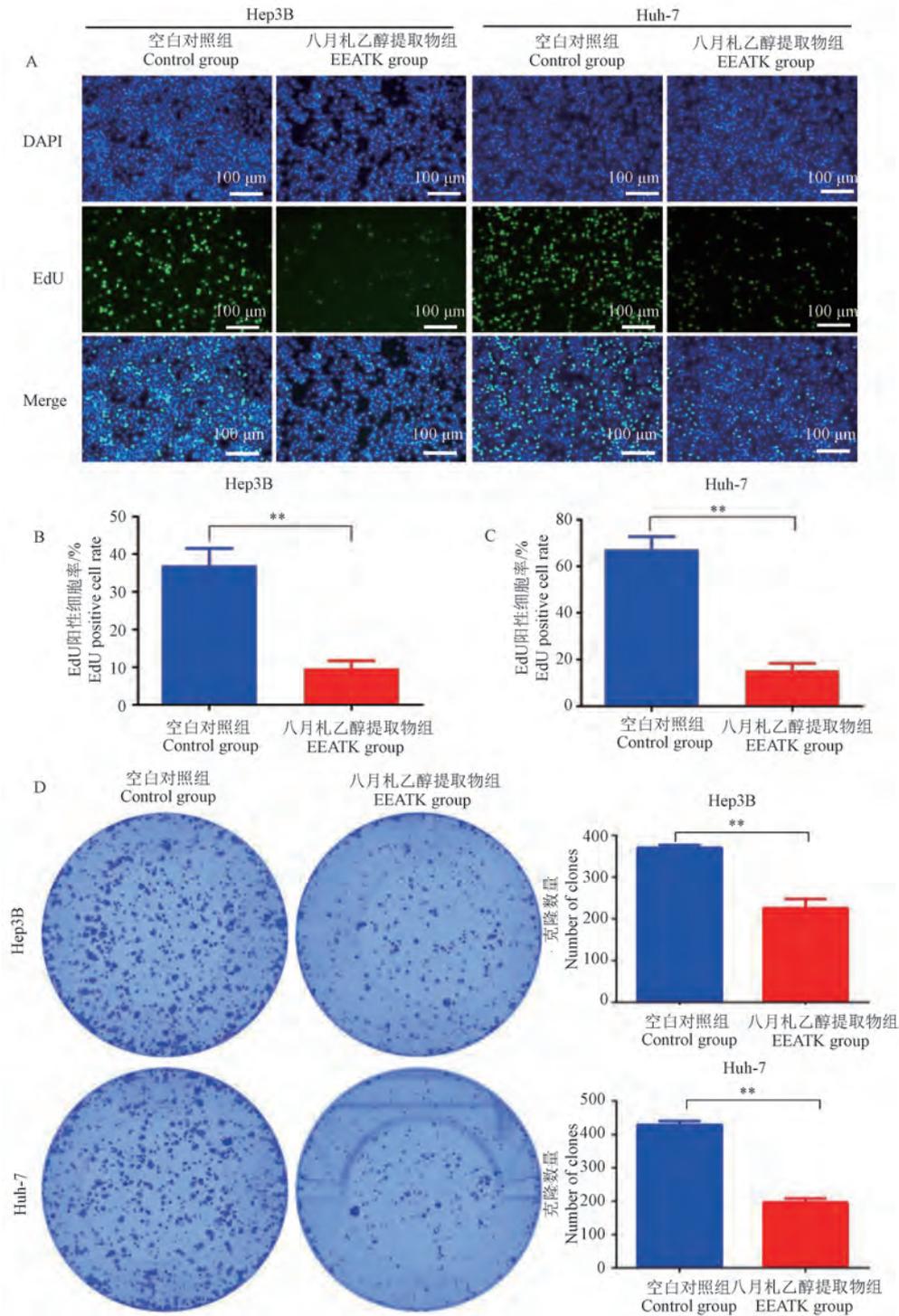
图 1 EEATK 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 1 Effects of EEATK on the viability of Hep3B and Huh-7 cells respectively

2.3 EEATK 促进 Hep3B 及 Huh-7 细胞的凋亡 凋亡检测结果表明, EEATK 组对 Hep3B 及

Huh-7 细胞的凋亡率较空白对照组均显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 EEATK 可能通



注: A: EEATK 干预后 EdU 检测细胞增殖能力变化; B、C: Hep3B、Huh-7 细胞 EdU 阳性细胞数统计; D: EEATK 干预后克隆形成实验检测细胞克隆形成变化。与空白对照组比较, $** P < 0.01$ 。

图 2 EEATK 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞增殖能力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, EdU was used to detect the changes in Hep3B and Huh-7 cells of proliferation ability after EEATK intervention. B/C, Statistics on the number of EdU positive cells in Hep3B and Huh-7 cells. D, Clone formation assay was used to detect the changes in Hep3B and Huh-7 cells after EEATK intervention. Compared with the control group, $** P < 0.01$.

Figure 2 Effect of EEATK on proliferation of Hep3B and Huh-7 cells

过促进细胞凋亡而抑制生长增殖,见图 3。

2.4 EEATK 对肝癌 Hep3B 细胞的差异表达基因的影响

2.4.1 差异表达基因的筛选

利用 DESeq2 包进行差异表达基因比较分析,筛选条件为 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 。 \log_2FC 即差异表达倍数再取以 2 为底的对数, $\log_2FC \geq 1$ 即为上调的差异基因, $\log_2FC \leq -1$ 为下调的差异表达基因。

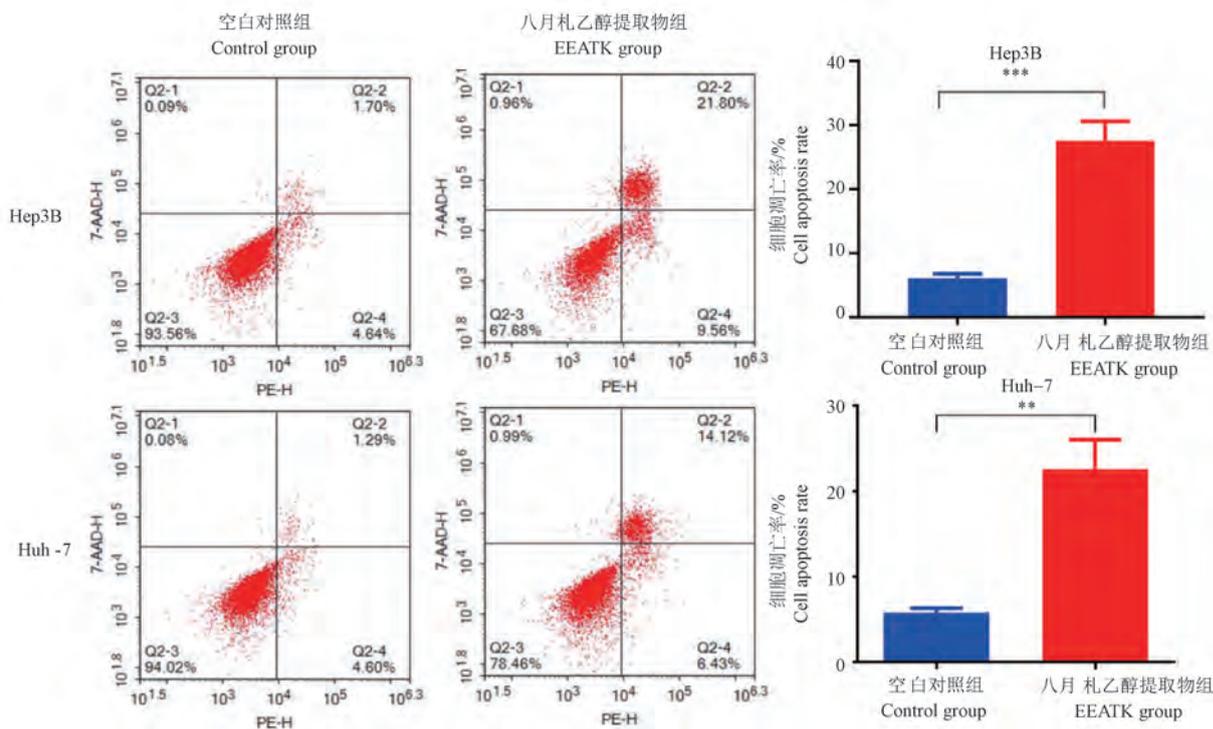
采用热图形式展示 EEATK 抑制肝癌 Hep3B 的差异基因的聚类分析,热图中表达模式相近的基因会被聚集在一起,每个方格中的颜色反映的是表达数据的行进行均一化处理后得到的数值聚类结果,呈现了上调基因与下调基因在组内与组间的分布情况。分析发现 EEATK 组与空白对照组的组间差异显著,具有统计学意义 ($P < 0.01$),与空白对照组比较,EEATK 组调控显著差异表达基因共 1577 个,其中红色表示相对上调差异基因 942 个,蓝色表示相对下调差异基因 635 个,见图 4。选取 $\log_2FC \geq 4$ 及 $\log_2FC \leq -4$ 的差异表达基因,部分结果见表 2。

2.4.2 差异表达基因 GO 功能富集分析

GO 术语由以下 3 个部分组成:生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。对经 EEATK 干预 Hep3B 细胞后的差异表达基因进行 GO 功能富集分析,总共获得了 3232 个 GO 富集条目,BP、CC 和 MF 富集分条目数分别是 2284、378 和 570 个。主要富集的生物过程包括胆固醇生物合成过程及其调节、炎症反应、细胞外间质组织、类固醇代谢;主要富集的细胞成分为质膜筏、内质网内腔、胶原的细胞外基质、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。主要富集的分子功能包括信号受体结合及活性、生长因子活性、UDP-糖基转移酶活性和乙醇脱氢酶活性等,见图 5A 及表 3。

2.4.3 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 结果显示,EEATK 抑制肝癌 Hep3B 的差异表达基因的富集通路共 332 条,基因主要富集于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 受体相互作用、TGF- β 信号通路、NF- κ B 信号通路、细胞色素代

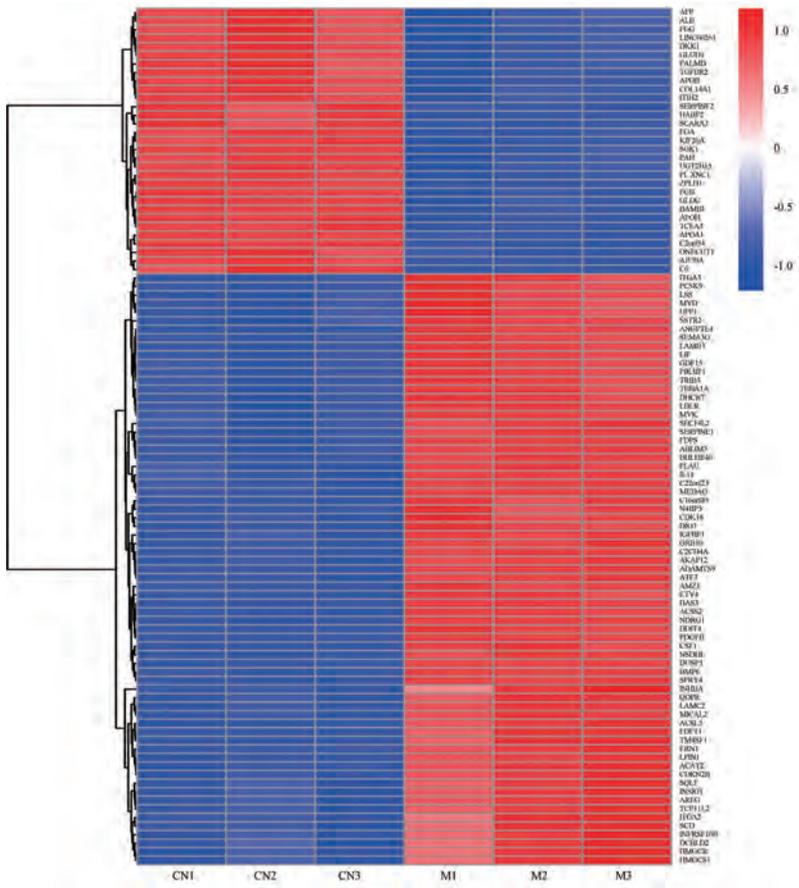


注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 EEATK 对 Hep3B 及 Huh-7 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Annexin V-FITC/PI dual staining method was used to detect the effect of EEATK on the apoptosis rates of Hep3B and Huh-7 cells



注: CN1~CN3:空白对照组;M1~M3:八月札乙醇提取物组,红色为相对上调差异表达基因,蓝色为相对下调差异表达基因。

图 4 EEATK 干预肝癌细胞 Hep3B 的差异表达基因聚类分析

Note. CN1~CN3, Control group. M1~M3, EEATK group. Red represents relatively upregulated differentially expressed genes, while blue represents relatively downregulated differentially expressed genes.

Figure 4 Cluster analysis of differentially expressed genes in Hep3B liver cancer cells treated with EEATK

表 2 差异表达基因
Table 2 Differentially expressed genes

Gene ID	log2FoldChange	P value	padj
OLAH	7.26	2.78E-08	3.75E-07
TLR4	6.67	1.31E-06	1.34E-05
LINC01629	6.50	4.01E-06	3.69E-05
ABCC8	6.42	6.04E-06	5.40E-05
TNS4	6.24	1.26E-05	0.00010532
BLOC1S5-TXNDC5	6.22	5.68E-05	0.0004108
LOC100130744	6.19	9.83E-06	8.38E-05
DMBT1	6.13	3.40E-05	0.00025738
C11orf96	6.13	2.63E-05	0.00020496
ADH1A	-5.03	2.79E-09	4.30E-08
SLC13A2	-5.03	4.54E-13	1.08E-11
ABCD2	-5.05	0.01129	0.043513
F13B	-5.05	2.64E-05	0.00020564
ADH1C	-5.07	2.86E-05	0.00022114
LOC102723675	-5.08	0.0020963	0.010319
FOLH1B	-5.27	0.00023351	0.0014691
KLHL3	-5.35	0.00081067	0.0044587
TLR10	-5.47	0.0005805	0.0033142
PGLYRP2	-5.58	0.00038032	0.0022732

注:上调、下调均取前 10 位;差异倍数>4, P<0.05。

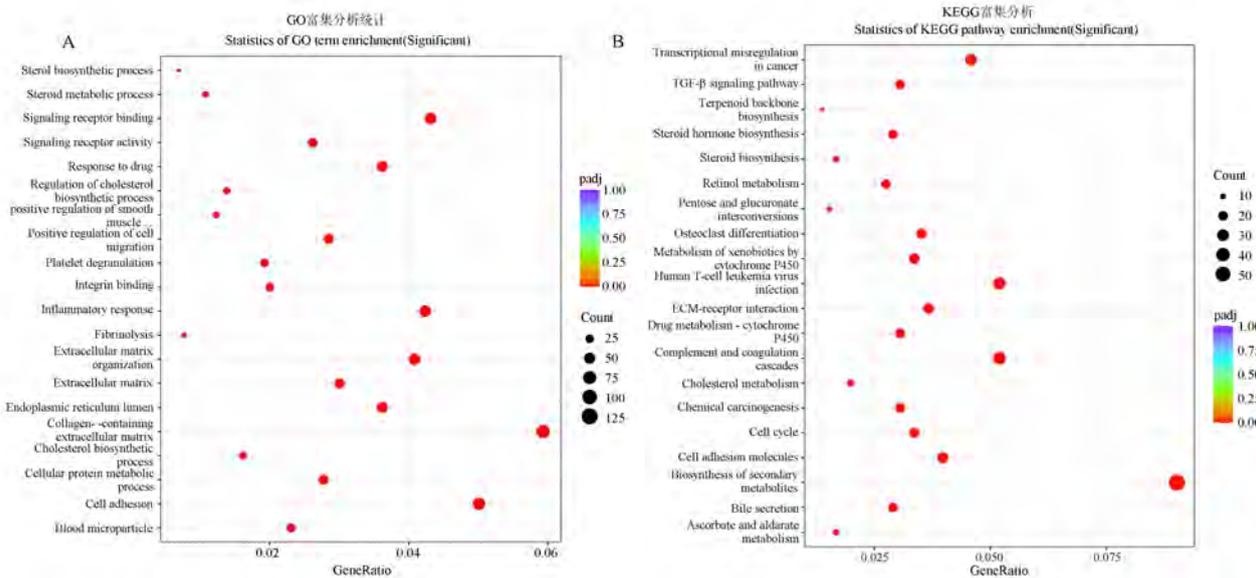
Note. Top 10 for both upregulation and downregulation, multiple of differences>4, P<0.05.

谢外源物代谢通路、类固醇激素生物合成等通路,表明这些通路中的差异表达基因可能影响细胞的增殖和诱导细胞凋亡,见图 5B 及表 4。

2.4.4 EEATK 抑制肝癌 Hep3B 细胞与细胞增殖、凋亡差异基因的筛选及验证

本研究的细胞实验已经证实 EEATK 抑制肝癌

细胞增殖可能是诱导凋亡实现的,差异表达基因显著富集在 TGF-β、NF-κB 信号通路,这两条信号通路与肝癌细胞增殖、凋亡密切相关,本研究通过转录组学联合 TCD 数据库分析,筛选出 EEATK 抑制肝癌 Hep3B 细胞与增殖等相关的差异表达基因(图 6),结果以 padj<0.05 为显著富集,并利用韦恩在线



注:A:差异表达基因的 GO 功能分析;B:差异表达基因的 KEGG 富集分析。

图 5 差异表达基因的 GO 功能分析及 KEGG 富集分析

Note. A, GO functional analysis of differentially expressed genes. B, KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes.

Figure 5 GO functional analysis and KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

表 3 差异表达基因 GO 富集注释表

Table 3 GO enrichment annotation table for differentially expressed genes

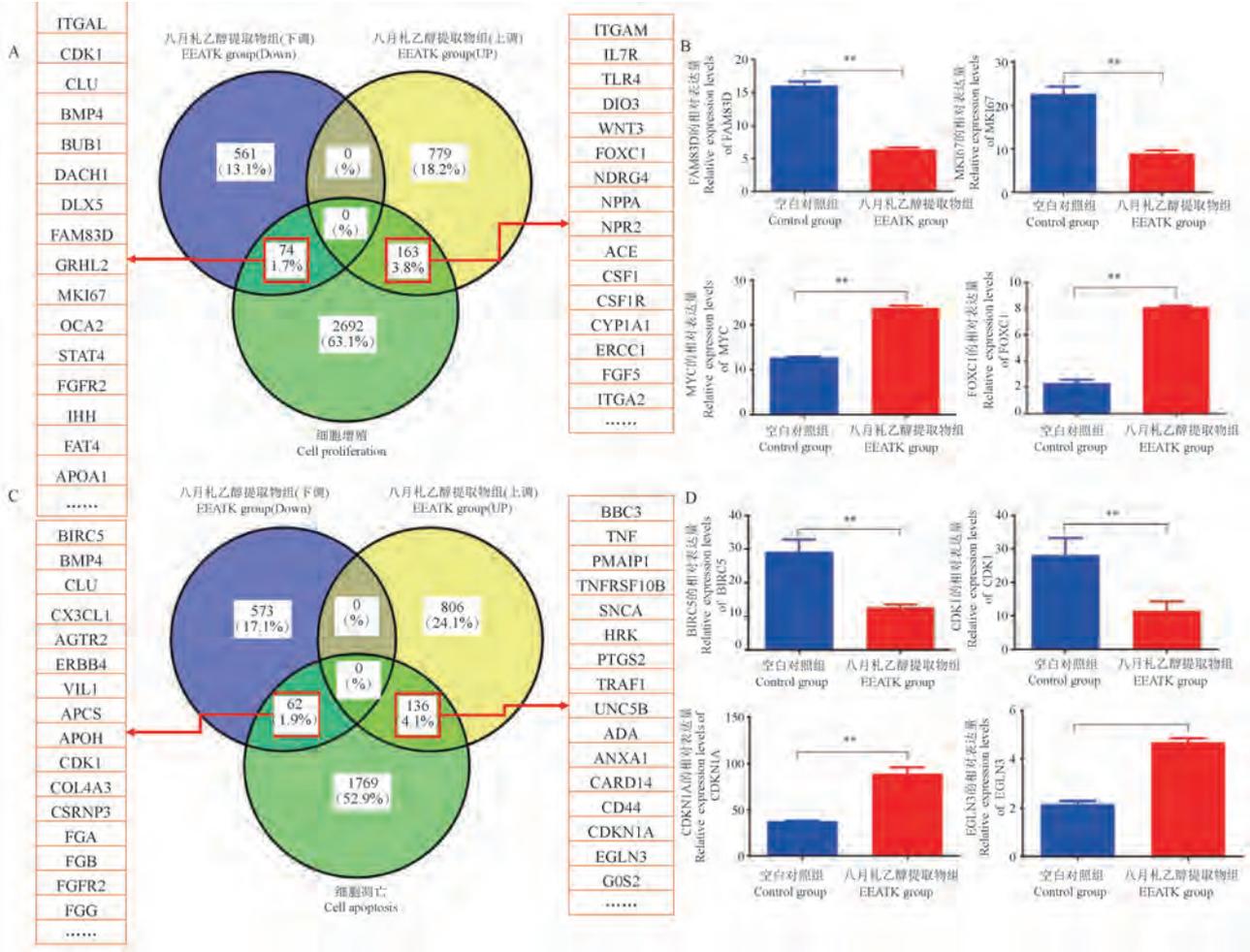
ID	描述 Description	GO_Class	P value	padj
GO:0006695	胆固醇生物合成过程 Cholesterol biosynthetic process	BP	4.04E-17	1.09E-13
GO:0030198	细胞外间质组织 Extracellular matrix organization	BP	0.001183	0.022086
GO:0045540	胆固醇生物合成过程的调节 Regulation of cholesterol biosynthetic process	BP	6.17E-16	8.34E-13
GO:0008202	类固醇代谢 Steroid metabolic process	BP	1.01E-08	3.60E-06
GO:0006954	炎症反应 Inflammatory response	BP	1.54E-07	5.95E-05
GO:0042493	对药物的反应 Response to drug	BP	1.60E-09	8.56E-07
GO:0007155	细胞粘附 Cell adhesion	BP	4.10E-07	0.000111
GO:0042730	纤维蛋白溶解 Fibrinolysis	BP	9.09E-06	0.000541
GO:0008202	类固醇代谢 Steroid metabolic process	BP	1.01E-08	3.60E-06
GO:0045121	质膜筏 Membrane raft	CC	0.0001056	0.004393
GO:0005788	内质网腔 Endoplasmic reticulum lumen	CC	9.76E-09	3.47E-06
GO:0062023	含胶原蛋白的细胞外间质 Collagen-containing extracellular matrix	CC	2.15E-11	2.31E-08

续表3

ID	描述 Description	GO_Class	P value	padj
GO:0031012	细胞外间质 Extracellular matrix	CC	1.92E-06	0.000399
GO:0016323	基底外侧质膜 Basolateral plasma membrane	CC	0.0012822	0.043974
GO:0031093	血小板 α 颗粒腔 Platelet alpha granule lumen	CC	9.37E-06	0.000543
GO:0031410	细胞质小泡 Cytoplasmic vesicle	CC	1.43E-05	0.001464
GO:0072562	血液微粒 Blood microparticle	CC	6.93E-09	3.17E-06
GO:0016324	顶端质膜 Apical plasma membrane	CC	0.000173	0.005804
GO:0005102	信号传导受体结合 Signaling receptor binding	MF	7.89E-05	0.003194999
GO:0038023	信号传导受体活性 Signaling receptor activity	MF	6.71E-05	0.006257259
GO:0005178	整合素结合 Integrin binding	MF	8.69E-05	0.007835062
GO:0008083	生长因子活性 Growth factor activity	MF	1.80E-07	6.10E-05
GO:0008194	UDP-糖基转移酶活性 UDP-glycosyltransferase activity	MF	5.90E-09	2.53E-06
GO:0008201	肝素结合 Heparin binding	MF	2.13E-08	5.08E-06
GO:0030247	多糖结合剂 Polysaccharide binding	MF	0.00027	0.00751
GO:0005201	细胞外间质结构成分 Extracellular matrix structural constituent	MF	0.000272	0.007513
GO:0008106	醇脱氢酶(NADP +) 活性 Alcohol dehydrogenase (NADP+) activity	MF	5.00E-06	0.0003458

表 4 差异表达基因主要通路分析表
Table 4 Analysis of main pathways of differentially expressed genes

ID	描述 Description	P value	padj
map04512	细胞外基质-受体相互作用 ECM-receptor interaction	2.51E-06	0.000387199
map04350	TGF- β 信号通路 TGF-beta signaling pathway	2.68E-05	0.001649486
map04064	NF- κ B 信号通路 NF-kappa B signaling pathway	2.32E-05	0.001649486
map00980	细胞色素代谢外源物代谢通路 Metabolism of xenobiotics by cytochrome	1.20E-09	5.41E-08
map00982	药物代谢-细胞色素 P450 Drug metabolism-cytochrome P450	4.17E-11	3.76E-09
map05204	化学致癌作用 Chemical carcinogenesis	9.42E-06	0.000347588
map00900	萜类骨架生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	0.004558131	0.047509755
map00140	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	2.21E-11	2.99E-09
map04975	脂肪消化吸收 Fat digestion and absorption	0.000759099	0.011428659
map00072	酮体的合成与降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	0.000675403	0.01019245



注: A:细胞增殖相关基因筛选;B:qRT-PCR 检测验证细胞增殖相关基因验证;C:细胞凋亡相关基因筛选;D:qRT-PCR 检测验证细胞凋亡相关基因验证。与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 6 EEATK 对 Hep3B 细胞增殖、凋亡相关基因表达的影响

Note. A, Screening the cell proliferation related gene. B, qRT-PCR was used to verify the expression of genes related to cell proliferation. C, Screening the apoptosis related genes. D, qRT-PCR was used to verify apoptosis related genes. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of EEATK on the expression of proliferation and apoptosis related genes in Hep3B cells

软件绘制韦恩图,结果表明,EEATK 显著调控细胞增殖的差异表达基因共 236 个(上调 162 个,下调 74 个),qRT-PCR 检测结果发现 FAM83D、MKI-67 的表达显著降低($P < 0.01$),MYC、FOXC1 的表达显著升高($P < 0.01$);凋亡相关差异基因共计 198 个(上调 136 个,下调 62 个),其中 BIRC5、CDK1 的表达显著降低($P < 0.01$),CDKN1A、EGLN3 的表达显著升高($P < 0.01$)。

3 讨论

肿瘤是一种具有侵袭性的细胞增殖过程,能获得持续增殖信号,实现增殖永生,由于一系列的基因突变,造成细胞增殖与凋亡失衡,从而使得癌

细胞快速增殖。因此研究调控肝癌细胞增殖与凋亡的关键通路,将有望发现干预肝癌的潜在靶点,可有效推动临床肝癌的治疗。

本研究应用 0.1~0.3 mg/mL 范围内的 EEATK 作用于人肝癌 Hep3B 和 Huh-7 两种细胞,CCK-8 实验结果表明,两种细胞的增殖抑制率随 EEATK 浓度升高而增加,同时筛选出了 EEATK 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞的最佳药物浓度用于后续实验。EdU 染色结果显示 EEATK 显著降低人肝癌 Hep3B 和 Huh-7 细胞中 EdU 阳性细胞数量。克隆形成结果显示,在 EEATK 明显减少细胞的克隆数,进一步证实了 EEATK 能抑制肝癌细胞的增殖。流式细胞仪检测发现 EEATK 显著增加细胞凋亡率。以上结果提

示,EEATK 具有抑制 Hep3B 和 Huh-7 细胞增殖和促进其凋亡的作用。

GO 分析显示差异表达基因主要富集于胆固醇生物合成及调节、ECM 和炎症等方面。作为快速增殖的细胞,癌细胞较正常细胞需要更高水平的胆固醇来维持细胞膜的生物合成和其他功能需求,胆固醇生物合成增加是许多癌症的一个特征,如在来源于乳腺癌患者的肿瘤干细胞中以观察到胆固醇生物合成的升高^[3],高水平胆固醇促进肿瘤细胞的生长、存活、增殖、迁移、侵袭和转移^[4-5]。而阻断胆固醇的合成和摄取对肿瘤的形成和生长有抑制作用。ECM 作为细胞外微环境的主要部分,是由多种细胞外大分子共同构建成的统一整体,萦绕在肿瘤细胞周围,为其提供基本的液体浸润和空间支持^[6-7]。ECM 可以通过整合素或其他细胞表面受体与细胞直接发生作用,调节关键的细胞过程,例如分化,细胞的增殖和代谢,进而影响整个组织的结构与功能^[8]。癌症中僵硬和非弹性 ECM 的沉积导致化学治疗分子的扩散受阻,并阻碍免疫细胞的浸润,这是恶性进展的关键特征,增加的 ECM 刚度降低抗肿瘤能力^[9]。炎症与肿瘤发生发展关系密切,急性炎症反应不及时消退,可能会转化为慢性炎症,导致免疫抑制微环境中存在大量免疫抑制细胞和细胞因子,这些变化促进基因激活、DNA 和蛋白质损伤、ROS 释放并影响包括 NF- κ B 等多种信号通路^[10]。炎症参与肿瘤发生的多个步骤,包括细胞转化、促进、存活、增殖、侵袭、血管生成和转移等^[11]。

KEGG 富集分析表明 EEATK 的抗癌作用是通过多种途径介导的,如 ECM 受体相互作用通路、TGF- β 信号通路、NF- κ B 通路和代谢信号通路。其中,含有最多富集基因的 TGF- β 、NF- κ B 信号通路可能是 EEATK 发挥肝癌作用的关键信号通路。TGF- β 通路中的信号失调在 HCC 微环境中的炎症发挥着核心作用。过度表达的 TGF- β 会导致大量代谢紊乱和功能障碍,并促进上皮间质转化(EMT)和 ECM 过度沉积^[12-13],从而导致免疫功能障碍、纤维化和癌症^[12,14]。

TGF- β 、NF- κ B 在肝癌中均被异常激活,参与肝癌细胞增殖、侵袭及迁移整个过程。中药、中药活性成分可通过 TGF- β 、NF- κ B 通路影响肝癌细胞增殖,如裂果薯皂苷单体 I 能抑制 SMMC-7721 细胞增殖,侵袭和转移,其机制可能与抑制 TGF- β /Smad 信号通路发生有关^[15]。苦参注射液通过抑制 TGF- β /

Smad7 信号通路进而缓解肝纤维化及肝癌的进展^[16]。双花汤可通过抑制 NF- κ B 信号通路,促进 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体表达,最终抑制肝癌细胞增殖、侵袭及迁移^[17]。以上结果说明 TGF- β 、NF- κ B 信号均是复方中药、中药活性成分治疗肝癌的重要信号通路。

FAM83D 基因调节有丝分裂过程,在肝癌组织中高表达,促进细胞增殖和迁移,抑制细胞凋亡^[18]。MKI-67 是一种增殖细胞相关的核抗原,其在 HCC 中表达量升高,敲低 MKI-67 可以抑制 HCC 的增殖^[19]。MYC 是与细胞增殖密切相关的基因,可影响细胞生长和增殖功能的复制、转录和翻译,以及细胞代谢和凋亡^[20]。FOXC1 是 FOX 蛋白家族的一员,FOXC1 可激活核 NF- κ B 信号,从而调节细胞的增殖^[21],本研究表明 EEATK 可显著降低 Hep3B 细胞中 FAM83D、MKI-67 的表达,显著升高 MYC、FOXC1 的表达,提示 EEATK 可能通过影响上述关键基因的表达抑制细胞增殖。

BIRC5,也称 Survivin,是凋亡蛋白抑制剂家族(inhibitors of apoptosis protein, IAPs)中抑制凋亡作用最强的蛋白,在恶性肿瘤组织中高表达,是调节细胞周期、凋亡关键因子^[22]在肿瘤发生和转移过程中直接调节癌细胞的凋亡和有丝分裂^[23]。CDK1 是细胞周期检查点的重要调控基因,其失调可导致可促进肿瘤侵袭性发展、细胞增殖^[24]。CDKN1A 可阻止 G₁/S 过渡进而减慢细胞周期^[25],从而抑制细胞增殖。EGLN3 在多种恶性肿瘤中表达降低,上调胃癌细胞中 EGLN3 的表达显著抑制细胞增殖和转移^[26]。结果表明,EEATK 可以显著降低 BIRC5、CDK1 的表达,显著升高 CDKN1A、EGLN3 的表达,说明 EEATK 可能通过调控上述靶点促进 Hep3B 细胞凋亡。

综上所述,EEATK 抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡,其作用机制可能与调控 TGF- β 、NF- κ B 信号通路及多个靶点有关,还需要对发现的关键信号通路及其靶基因进行全面、深层次的探究。

参考文献:

- [1] ZENG H, CHEN W, ZHENG R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-e567.
- [2] 王春玲, 郑作文. 八月札抗肝癌活性部位的筛选 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(7): 784-789.

- WANG C L, ZHENG Z W. Screening of anti-hepatocarcinoma active fractions from akebiae fructus [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(7): 784-789.
- [3] HUANG B, SONG B L, XU C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Nat Metab, 2020, 2(2): 132-141.
- [4] ABDALKAREEM JASIM S, KZAR H H, HAIDER HAMAD M, et al. The emerging role of 27-hydroxycholesterol in cancer development and progression: an update [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 109074.
- [5] WANG R, LIU Z, FAN Z, et al. Lipid metabolism reprogramming of CD8⁺ T cell and therapeutic implications in cancer [J]. Cancer Lett, 2023, 567: 216267.
- [6] BANYSPALUCHOWSKI M, LOIBL S, WITZEL I, et al. Clinical relevance of collagen protein degradation markers C3M and C4M in the serum of breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy in the GeparQuinto trial [J]. Cancers, 2019, 11(8): 1186.
- [7] KESH K, GUPTA V K, DURDEN B, et al. Therapy resistance, cancer stem cells and ECM in cancer: the matrix reloaded [J]. Cancers, 2020, 12(10): 3067.
- [8] YANG X, CHEN L, MAO Y, et al. Progressive and prognostic performance of an extracellular matrix-receptor interaction signature in gastric cancer [J]. Dis Markers, 2020, 2020: 8816070.
- [9] Mittelheisser V, Gensbittel V, Bonati L, et al. Evidence and therapeutic implications of biomechanically regulated immunosurveillance in cancer and other diseases [J]. Nat Nanotechnol. 2024, 19(3): 281-297.
- [10] Zhao H, Wu L, Yan G, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 263.
- [11] MANTOVANI A. Cancer: inflammation by remote control [J]. Nature, 2005, 435(7043): 752-753.
- [12] SU J, MORGANI S M, DAVID C J, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1 [J]. Nature, 2020, 577(7791): 566-571.
- [13] CHAKRAVARTHY A, KHAN L, BENSLER N P, et al. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4692.
- [14] LIU S, REN J, TEN DIJKE P. Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 8.
- [15] 吕美娴, 廖智红, 周欢, 等. 裂果薯皂苷单体 I 通过 TGF- β 调控上皮间质转化对入肝癌细胞 SMMC-7721 侵袭和转移的影响 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3): 408-413.
- LYU M X, LIAO Z H, ZHOU H, et al. Effect of saponin monomer I of *Schizocapsa plantaginea* Hance on invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 by regulating epithelial-mesenchymal transition through TGF- β 1 [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(3): 408-413.
- [16] YANG Y, SUN M, LI W, et al. Rebalancing TGF- β /Smad7 signaling via Compound Kushen injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(7): e410.
- [17] DAI B, FAN M, HUANG X, et al. Shuanghua decoction exerts anticancer activity by activating NLRP3 inflammasome via ROS and inhibiting NF- κ B signaling in hepatocellular carcinoma cells [J]. Phytomedicine, 2022, 103: 154249.
- [18] NIE J, LU L, DU C, et al. *FAM83D* promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the *FBXW7/MCL1* pathway [J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(10): 3790-3802.
- [19] HOU Y Y, CAO W W, LI L, et al. MicroRNA-519d targets MKI67 and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703 [J]. Cancer Lett, 2011, 307(2): 182-190.
- [20] GONSALVES W I, BRONIOWSKA K, JESSEN E, et al. Metabolomic and lipidomic profiling of bone marrow plasma differentiates patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance from multiple myeloma [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10250.
- [21] WANG J, RAY P S, SIM M S, et al. FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF- κ B signaling [J]. Oncogene, 2012, 31(45): 4798-4802.
- [22] Siragusa G, Tomasello L, Giordano C, et al. Survivin (BIRC5): Implications in cancer therapy [J]. Life Sci, 2024, 350: 122788.
- [23] FANG X L, CAO X P, XIAO J, et al. Overview of role of survivin in cancer: expression, regulation, functions, and its potential as a therapeutic target [J]. J Drug Target, 2024, 32(3): 223-240.
- [24] IZADI S, NIKKHOO A, HOJJAT-FARSANGI M, et al. CDK1 in breast cancer: implications for theranostic potential [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20(7): 758-767.
- [25] SINGH S K, BANERJEE S, ACOSTA E P, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(10): 17216-17228.
- [26] CAI F, YANG X, MA G, et al. EGLN3 attenuates gastric cancer cell malignant characteristics by inhibiting JMJD8/NF- κ B signalling activation independent of hydroxylase activity [J]. Br J Cancer, 2024, 130(4): 597-612.

梁玉琼, 黄庆, 黄娟娟, 等. 薯蓣皂苷抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 72-77, 86.

Liang YQ, Huang Q, Huang JJ, et al. Dioscin promotes apoptosis of HepG2 cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 72-77, 86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.008

薯蓣皂苷抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路促进肝癌细胞凋亡的研究

梁玉琼¹, 黄庆^{2*}, 黄娟娟¹, 梁芳¹, 滕丽娟¹, 郑洋¹

(1. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院实验中心, 南宁 530222;

2. 广西中医药大学第一附属医院药学部, 南宁 530023)

【摘要】 目的 研究薯蓣皂苷(DIO)对人 HepG2 肝癌细胞凋亡的影响及其可能抗癌作用机制。方法 DIO (0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 $\mu\text{mol/L}$) 干预 HepG2 肝癌细胞, MTT 法检测细胞增殖情况, 并计算半数抑制率(IC_{50}); 划痕实验分析细胞的迁移能力, Western blot 检查细胞中凋亡因子及 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达差异。结果 与对照组比较, DIO 组 HepG2 细胞抑制率显著升高($P < 0.01$), 并诱导细胞在形态学上出现凋亡特点, 呈时间与剂量依赖性; 划痕实验结果显示 DIO 显著抑制 HepG2 细胞的迁移距离; 与对照组比较, DIO 干预细胞 24 h 后, Caspase-3、cleaved Caspase-3 水平明显上调, 而 Bcl-2、 β -catenin 水平显著下调($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$); 采用 LiCl 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, LiCl 组细胞中 Wnt1、 β -catenin 水平较对照组显著上调($P < 0.01$); 与 LiCl 组比较, LiCl+DIO 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin、GSK-3 β 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。结论 DIO 体外能够促进 HepG2 肝癌细胞凋亡, 机制可能是其下调 β -catenin 的蛋白表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导, 进而抑制凋亡因子 Bcl-2 表达, 最终诱导细胞凋亡而发挥抗肝癌作用。

【关键词】 薯蓣皂苷; HepG2; 肝癌; Wnt/ β -catenin 信号通路; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0072-06

Dioscin promotes apoptosis of HepG2 cells by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway

LIANG Yuqiong¹, HUANG Qing^{2*}, HUANG Juanjuan¹, LIANG Fang¹, TENG Lijuan¹, ZHENG Yang¹

(1. Experiment Teaching Center, Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China. 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023)

【Abstract】 **Objective** To detect the apoptosis effects of dioscin in HepG2 cells and its possible anti-hepatocellular carcinoma mechanisms. **Methods** HepG2 human hepatocellular carcinoma cells were exposed to 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, or 8 $\mu\text{mol/L}$ dioscin, and cell proliferation was measured via MTT assay. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated with the software. A scratch test was used to analyze cell migration ability. Western blot was employed to evaluate the expression of apoptosis and Wnt/ β -catenin-pathway-related proteins. **Results** Compared

【基金项目】 2022 年度广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2022KY1671); 广西自然科学基金项目(2023GXNSFBA026230); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院科研项目(2023MS004)。

【作者简介】 梁玉琼(1988—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 药物毒性及肿瘤药理。E-mail: 1728252596@qq.com

【通信作者】 黄庆(1989—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药活性成分及质量控制。E-mail: 185307564@qq.com

with the control group, the dioscin-treated HepG2 cells' proliferation was significantly more inhibited, and the inhibition increased in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.01$). HepG2 cells showed morphological characteristics of apoptosis after they were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ or 2 $\mu\text{mol/L}$ dioscin. The scratch test indicated that the migration distance of HepG2 cells was remarkably reduced when treated with dioscin. In the Western blot experiment, the expression levels of Caspase-3 and cleaved Caspase-3 were visibly up-regulated, while those of Bcl-2 and β -catenin were significantly down-regulated when the cells were treated with dioscin for 24 h ($P < 0.05$, $P < 0.01$). When LiCl reagent was added to the HepG cells to activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway, the expression levels of Wnt1 and β -catenin were remarkably increased compared with those of the control group ($P < 0.01$). Compared with the LiCl group, the LiCl + DIO group's expression of Wnt1, β -catenin, and GSK-3 β was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** DIO can promote the apoptosis of HepG2 cells by inhibiting β -catenin protein expression and thereby down-regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This inhibits apoptosis-related gene Bcl-2 expression, which leads to the induction of cell apoptosis. Therefore, DIO can have an anti-hepatocellular carcinoma effect.

【Keywords】 dioscin; HepG2; hepatocellular carcinoma; Wnt/ β -catenin signaling pathway; apoptosis

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

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC), 最常见的原发性肝癌, 是癌症相关死亡的第三大原因^[1]。肝癌的发病机理尚未明晰, 普遍认为主要出现在与病毒性肝炎感染、酗酒或代谢综合征相关的病变肝中。到目前为止, 肝癌的临床治疗取得了一些进展, 但由于多数患者确诊时已是肝癌晚期, 常规的肝切除术或肝移植术治疗 HCC 已无意义, 需要进行系统且全面的综合抗肿瘤治疗, 包括放疗、化疗及分子免疫治疗等。除此之外, 包括阿霉素、顺铂和 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 在内的药物对 HCC 的生存期也有改善。然而, 临床上使用这些药物的部分患者已出现心脏及神经损害等副作用。因此, 开发新的高效、低毒的抗癌药物对突破 HCC 现有的治疗瓶颈具有重要临床意义。

薯蓣皂苷 (dioscin, DIO) 是一种天然皂苷类化合物, 可从盾叶薯蓣、黄药子等中药中提取, 具有抗肿瘤、抗炎、抗真菌、抗肝纤维化、改善心血管等广泛生物活性。研究表明, DIO 能够抑制肝癌细胞 HepG2^[2]、Huh7^[3] 增殖, 并诱导肝癌细胞凋亡, 但相关机制尚未阐明。细胞凋亡是一种细胞选择主动死亡的过程, 该过程受细胞内外因素的影响。目前研究认为肿瘤诱发的关键因素可能是肿瘤细胞无限增殖与凋亡异常降低^[4], 因此抑制肿瘤细胞增殖, 诱导凋亡成为抗肿瘤的有效治疗手段之一。Wnt/ β -catenin 通路在多种肿瘤中均被过度激活, 能够影响细胞的增殖、凋亡。因此, 本研究拟在体外 HepG2 肝癌模型中, 探讨 DIO 对细胞增殖、凋亡的影响及其可能的抗肝癌机制, 为开发抗肝癌中药新药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

HepG2 肝癌细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

薯蓣皂苷 (纯度 $\geq 98\%$, 批号: Y04J12Z136341) 购自上海源叶科技有限公司; 胎牛血清 (FBS) (批号: 1347575) 购自美国 GIBCO 公司; DMEM 高糖培养基 (1X), 批号: 319005040 购自维森特生物技术 (南京) 有限公司; Hoechst33258 染色液 (批号: C0003-2) 购自碧云天生物技术研究所; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 批号: M8180)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号: 08E02A46) 购自北京索莱宝科技有限公司; Dimethyl Sulfoxide (DMSO, 批号: 2J242J24) 购自 Sunshine 公司; 兔抗人 β -actin 多克隆抗体 (批号: 60008-1-1g)、兔抗人 β -catenin (批号: 1619501)、Wnt1 (批号: 040319190715)、GSK3 β (批号: 22104-1-AP)、cleaved Caspase-3 (批号: 19677-1) 多克隆抗体及鼠抗人 Caspase-3 (批号: 25546-1-AP)、Bcl-2 (批号: 18654-1-AP) 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司。

倒置相差荧光显微镜 (Olympus, 日本 Nikon 公司); CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific, 美国); 酶标仪 (TECAN, 瑞士); 电泳仪、半干转膜仪及凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); -80 °C 冰箱 (海尔, 中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将对数生长期的 HepG2 肝癌细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 并放入培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 中孵育, 每天 1 次的频率更换培养液,

待细胞长至对数期时,加入 0.25% 胰蛋白酶消化并传代。取一部分细胞于培养箱中继续培养,其余细胞进行后续实验。

1.3.2 MTT 法检测 HepG2 细胞增殖

将对数生长期的 HepG2 细胞消化,以 2×10^4 /孔接种在 96 孔板,24 h 后吸弃细胞上清液,加入不同浓度(0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 $\mu\text{mol/L}$) DIO,并设对照组(不加 DIO)和空白孔(无细胞),每组设 6 个复孔。24 h、48 h 后,各孔分别加入 10 μL MTT(5 mg/mL)继续培养 4 h。吸去孔内培养液,加入 DMSO(每孔 200 μL),采用酶标仪 490 nm 检测各孔吸光值,计算细胞抑制率。

1.3.3 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡

HepG2 细胞接种在 6 孔板(1×10^4 /孔),培养 24 h 后,细胞分为 3 组:对照组,常规培养(不加药物);1 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组和 2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组,每组 3 个复孔。各组分别加入 DMSO 和不同浓度的 DIO 24 h 后,按照试剂盒说明书染色细胞,拍照记录细胞凋亡情况。

1.3.4 划痕实验检测细胞体外迁移能力

取 2 mL HepG2 细胞(密度为 5×10^5 /mL)种于 6 孔板 24 h,等细胞长至 80%~90%时,各孔使用枪头进行划痕并清洗细胞,按照“1.3.3”项下方法进行分组与给药,每组设 3 个复孔。分别于 0、24 h 观察划痕内的 HepG2 细胞,拍照。

1.3.5 Western blot 法检测 HepG2 细胞中凋亡相关基因及 β -catenin 蛋白表达

按照“1.3.2”项下方法对 HepG2 细胞进行处理,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,并放入培养箱中孵育过夜后,细胞分为对照组和 1 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组。培养 24 h 后,每个培养皿的细胞加入 300 μL RIPA 裂解液,10 min 后冰上快速刮取细胞,离心并收集细胞总蛋白。根据说明书进行各组蛋白浓度检测。制胶,SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别加入一抗(Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2 和 β -catenin)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜,加入二抗常温孵育 2 h,将 PVDF 膜置于 Bio-Rad 凝胶成像系统显影。结果采用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.3.6 Western blot 法检测 DIO 对 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞接种到 6 孔板中,分为对照组、LiCl 组(20 mmol/L)、LiCl+DIO 组(2

$\mu\text{mol/L}$),每组设 6 个复孔。药物处理 24 h 后,同“1.3.5”项下提取细胞并测定蛋白浓度。Western blot 法检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 软件统计分析,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIO 对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用

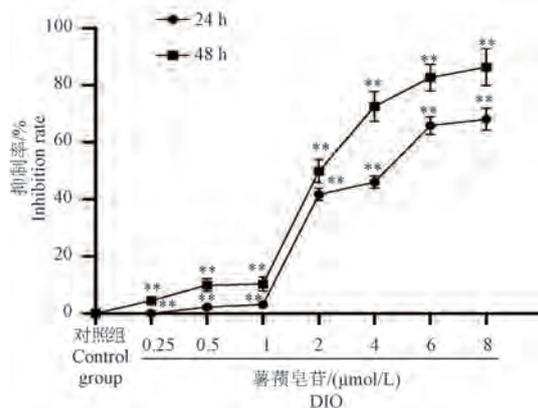
与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较,HepG2 细胞经 DIO(0.25、0.5、1、2、4、6 和 8 $\mu\text{mol/L}$)刺激 24 h、48 h 后,其可显著抑制细胞增殖($P < 0.01$),且随着给药时间的延长及浓度的增加其抑制作用增强。经计算 IC_{50} (24 h、48 h)值分别为 4.19、2.32 $\mu\text{mol/L}$,因此后续实验选择 1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 干预 HepG2 细胞,观察其抗肝癌作用及相关机制,见图 1。

2.2 DIO 对 HepG2 肝癌细胞凋亡形态学的影响

Hoechst 荧光染色结果显示,对照组细胞未出现凋亡特征。然而,相较于对照组,1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组细胞出现了典型的凋亡形态学特征,主要表现为核染色质浓缩聚集及碎块状致密浓染,并发出蓝白色荧光等;同时,HepG2 细胞 DIO 刺激后凋亡程度随 DIO 浓度的提高呈逐渐增强的趋势。提示 DIO 能够诱导 HepG2 细胞出现凋亡细胞核形态,诱导细胞凋亡,见图 2。

2.3 DIO 对 HepG2 肝癌细胞迁移能力的影响

如图 3 所示,划痕实验结果显示,给药 24 h 后,



注:与对照组比较,** $P < 0.01$

图 1 DIO 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 1 Inhibition of DIO on proliferation of HepG2 cells

对照组 HepG2 细胞几乎长满划痕。与对照组比较, 1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组的划痕仍有间隙, 细胞迁移距离明显缩短。可知, DIO 长时间干预 HepG2 肝癌细胞可导致细胞的迁移能力减弱。

2.4 DIO 对 HepG2 肝癌细胞凋亡相关表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组细胞 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均

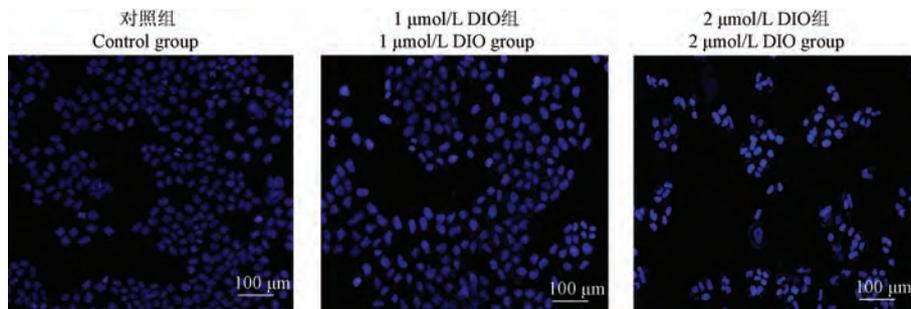


图 2 DIO 对 HepG2 细胞凋亡形态的影响

Figure 2 Effect of DIO on apoptosis features of HepG2 cells

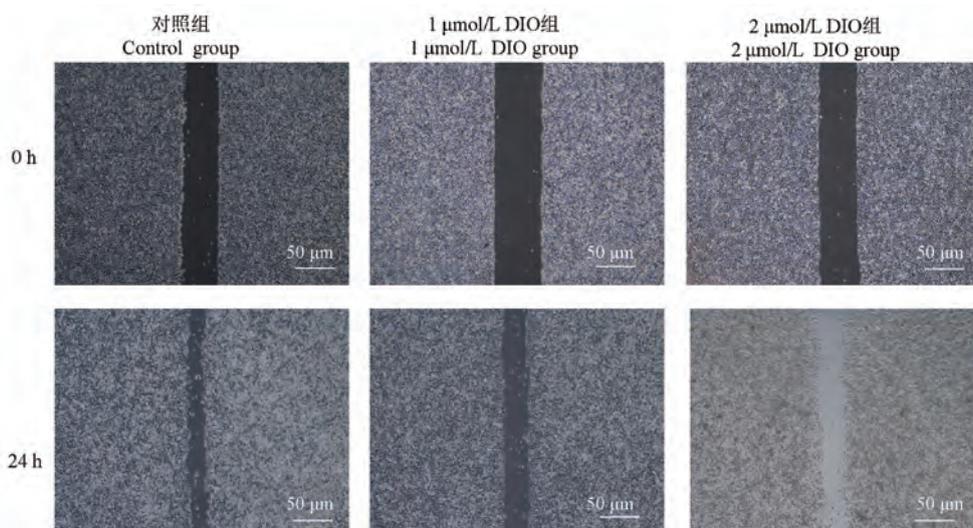
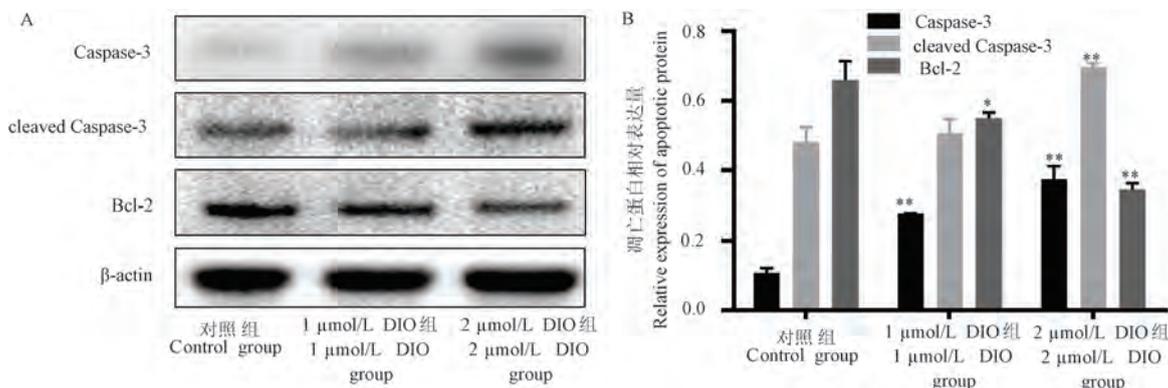


图 3 划痕实验

Figure 3 Changes of migration in HepG2 cells



注: A: HepG2 细胞内凋亡蛋白表达条带; B: HepG2 细胞内凋亡蛋白相对表达量。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 DIO 对凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, Protein expression band of Caspase-3, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 in HepG2 cells. B, Relative protein expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3 and Bcl-2 in HepG2 cells. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Expression of DIO on apoptosis-related proteins of HepG2 cells

明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 其中 $2 \mu\text{mol/L}$ DIO 对 Bcl-2 的抑制作用最强。提示 DIO 可促进 HepG2 细胞发生凋亡作用, 且呈浓度依赖的特点。

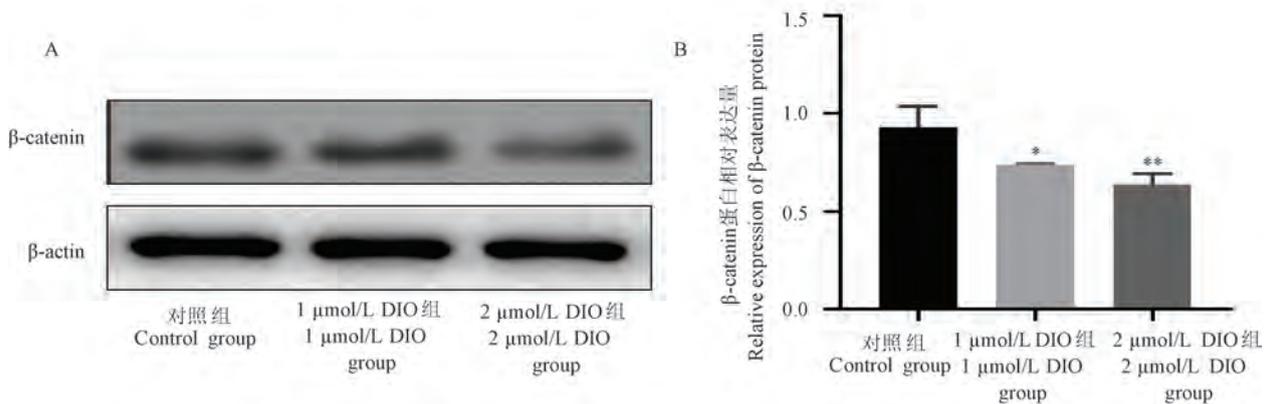
2.5 DIO 对 HepG2 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响

与对照组比较, DIO 处理组的细胞中 β -catenin 蛋白表达随干预浓度的增加而逐渐降低 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 提示 DIO 可以使 HepG2 细胞中的 Wnt/ β -

catenin 信号通路呈抑制状态, 发挥抗 HCC 作用, 见图 5。

2.6 DIO 对 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, LiCl 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin 的蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.01$); 与 LiCl 组比较, LiCl + DIO 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin、GSK-3 β 的蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$)。

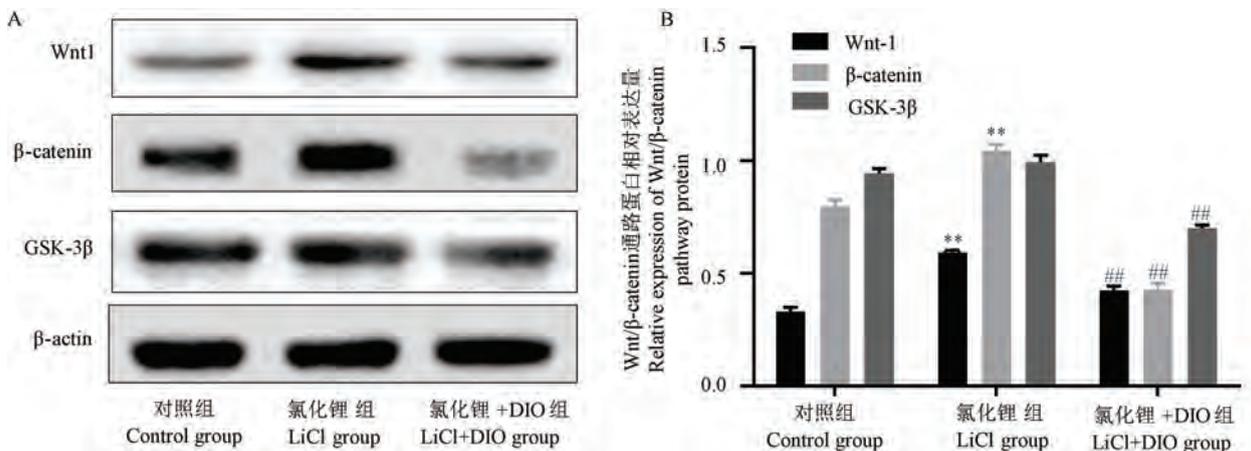


注: A: HepG2 细胞内 β -catenin 蛋白表达条带; B: HepG2 细胞内 β -catenin 蛋白相对表达量。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 DIO 对 HepG2 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Note. A, Protein expression band of β -catenin in HepG2 cells. B, Relative protein expression of β -catenin in HepG2 cells. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Expression of DIO on β -catenin proteins of HepG2 cells



注: A: HepG2 细胞内 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达条带; B: HepG2 细胞内 Wnt/ β -catenin 通路蛋白相对表达量。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 LiCl 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 DIO 对 HepG2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Note. A, Protein expression band of Wnt1, β -catenin and GSK-3 β in HepG2 cells. B, Relative protein expression of Wnt1, β -catenin and GSK-3 β in HepG2 cells. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the LiCl group, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Differential expression of DIO on Wnt/ β -catenin signal pathway related proteins of HepG2 cells

3 讨论

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,发病率、死亡率呈逐年上升趋势,据数据统计显示,2040 年将新增 140 万例肝癌病例,且肝癌死亡人数比 2020 年增加 56.4%^[5]。这些结果表明,加强对现有的肝癌预防措施,并针对肝癌高危人群进行早期筛查,对提高 HCC 患者的生存周期具有关键作用。

近年来,中药天然产物 DIO 已被证实具有抗 HCC 作用。Chen 等^[6]发现 DIO 能诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡,并且细胞中 Caspase-3 表达增加和 Bcl-2 表达下调,并减弱细胞迁移与侵袭能力。与此同时,课题组前期研究同样也发现 DIO 能够抑制 HepG2 细胞增殖并促进细胞凋亡^[7],并且对正常人肝细胞的毒性作用较小^[8]。但 DIO 调节 HepG2 细胞凋亡的机制研究尚处于空白阶段。Wnt/ β -catenin 信号通路参与 HCC 的生长与发展,但该通路是否被 DIO 调控,目前尚不清楚。因此,本研究拟通过研究 DIO 对 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响,探讨其是否通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路影响细胞凋亡。

本研究首先采用 MTT 实验检测 DIO 对 HepG2 细胞增殖的影响,结果显示 DIO 对细胞的增殖呈显著抑制趋势,提示 DIO 可直接抑制 HepG2 细胞的生长,具有抗 HCC 效应。划痕实验结果显示,1、2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组细胞迁移距离明显缩短,且以 2 $\mu\text{mol/L}$ DIO 组较为显著,表明 DIO 对细胞的迁移能力有抑制作用。Hoechst 染色检测结果显示,DIO 处理组细胞出现凋亡的形态学变化,核染色质聚集且亮度增高。以上结果说明 DIO 能够抑制细胞增殖并促进凋亡,提示该药物可作为治疗肝癌的潜在候选药物。

细胞凋亡的发生由一系列蛋白表达所调控,其中 Bcl-2、Bax 是凋亡代表性因子,Caspase-3 是凋亡执行蛋白^[9]。当 Bcl-2 表达上调时,Bcl-2 可以阻止 Bax 外移,进而抑制线粒体释放相关因子,最终导致抗凋亡作用;反之,当 Bcl-2 表达下调时,促进细胞凋亡。本研究在 DIO 处理组细胞出现凋亡形态的基础上进一步检测了凋亡相关蛋白的表达,发现 DIO 各剂量组 HepG2 细胞 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达减少,提示 DIO 确实通过诱导细胞凋亡发挥其抗 HCC 作用。

研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路在 HCC 中异常活化,且该通路对肿瘤细胞的凋亡呈负性调控作

用^[10]。 β -catenin 是调控 Wnt/ β -catenin 通路关启的关键影响因子。当 β -catenin 呈高表达时,通路启动,从而影响 Wnt1、GSK-3 β 等相关特异基因的表达;反之,通路关闭。为验证 DIO 是否通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥抗 HCC 作用,本研究首先检测 β -catenin 的表达差异。结果显示,DIO 作用 24 h 后,HepG2 细胞中 β -catenin 蛋白表达显著下调,表明 DIO 可以通过影响 Wnt/ β -catenin 通路发挥抗 HCC 作用。此外,为明确 DIO 抗肿瘤与 Wnt/ β -catenin 信号通路间的关系,本研究还进一步使用 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 LiCl 干预肝癌细胞,结果显示,与对照组比较,LiCl 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin 蛋白表达显著上调;与 LiCl 组比较,LiCl+DIO 2 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2 细胞 Wnt1、 β -catenin、GSK-3 β 蛋白表达显著下调。以上研究结果表明,DIO 能够通过下调 β -catenin 蛋白表达,阻抑 Wnt/ β -catenin 信号通路传导,最后抑制肝癌进程。也有报道表明,Wnt/ β -catenin 信号通路中 Wnt 因子可通过上调 Bcl-2 的表达,进而发挥抗凋亡作用^[11]。因此,结合本研究结果推测,DIO 通过下调 β -catenin 蛋白表达进而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导,然后抑制下游相关基因 Bcl-2 表达,最终诱导肝癌细胞凋亡。

综上所述,DIO 体外具有促进 HepG2 肝癌细胞凋亡作用,其机制可能是其通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导,进而活化 Caspase-3,抑制下游相关基因 Bcl-2 表达,最终诱导肝癌细胞凋亡。本研究从体外实验进一步证实 DIO 抗 HCC 疗效及机制,为 DIO 在抗肝癌开发应用中提供了实验理论依据。

参考文献:

- [1] CHAKRABORTY E, SARKAR D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. *Cancers*, 2022, 14 (11): 2798.
- [2] OKUBO S, OHTA T, SHOYAMA Y, et al. Steroidal saponins isolated from the rhizome of *Dioscorea tokoro* inhibit cell growth and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Life*, 2021, 11(8): 749.
- [3] HSIEH M J, YANG S F, HSIEH Y S, et al. Autophagy inhibition enhances apoptosis induced by dioscin in Huh7 cells [J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2012, 2012: 134512.
- [4] REN Y, WANG R, WENG S, et al. Multifaceted role of redox pattern in the tumor immune microenvironment regarding autophagy and apoptosis [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 130.

李欣欣,张宁,冯光玲,等. 基于 IL-23/Th17 炎症通路探讨司库奇尤单抗对钙化性主动脉瓣膜病的影响及作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 78-86.

Li XX, Zhang N, Feng GL, et al. Exploring the effect and mechanism of action of secukinumab on calcific aortic valve disease based on the IL-23/Th17 inflammatory pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 78-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.009

基于 IL-23/Th17 炎症通路探讨司库奇尤单抗对钙化性主动脉瓣膜病的影响及作用机制

李欣欣¹, 张宁², 冯光玲², 兰真真², 郭娇², 刘新灿^{2*}

(1. 宁德师范学院附属宁德市医院 消化内科, 福建 宁德 352000;

2. 河南中医药大学第一附属医院 心脏中心, 郑州 450000)

【摘要】 目的 观察 IL-23/Th17 炎症通路是否参与钙化性主动脉瓣膜病的发生发展, 司库奇尤单抗是否可以通过抑制 IL-23/Th17 炎症通路延缓钙化性主动脉瓣膜病的进展。方法 按随机数字表法将 47 只小鼠分为空白对照组、模型组和司库奇尤单抗组。空白对照组给予正常饲料喂养, 模型组、司库奇尤单抗组给予促钙化饲料喂养 16 周后建立钙化性主动脉瓣膜病模型, 司库奇尤单抗对司库奇尤单抗组小鼠干预 4 周后, 在多普勒超声下检测所有小鼠主动脉瓣峰值流速变化; 采用 HE 染色、Von Kossa 染色、免疫组化染色、ELISA 和实时荧光定量 PCR 进行相关指标测定。结果 与模型组相比, 司库奇尤单抗组药物干预 4 周后, 能够显著降低主动脉瓣膜的峰值流速 ($P < 0.05$), 降低血清 IL-6、IL-17、IL-23 水平 ($P < 0.05$); 与司库奇尤单抗组相比, 模型组瓣叶厚度明显增加且有更多的钙盐沉积; 免疫组化结果显示司库奇尤单抗组与模型组相比, 瓣叶中巨噬细胞 ($P < 0.05$)、IL-17A ($P < 0.05$)、IL-23 ($P > 0.05$) 浸润均减少。PCR 结果提示, 与模型组相比, 司库奇尤单抗组的 STAT3、BMP-2 及 α -SMA mRNA 的表达均显著减少 ($P < 0.05$)。结论 IL-23/Th17 炎症通路参与了钙化性主动脉瓣膜病的发病过程, 经司库奇尤单抗干预后小鼠瓣膜的炎症、纤维化、成骨分化及钙化情况均有所缓解, 司库奇尤单抗可能通过抑制 IL-23/Th17 炎症通路而延缓疾病进展。

【关键词】 IL-23/Th17; 钙化性主动脉瓣膜病; 炎症; 司库奇尤单抗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0078-09

Exploring the effect and mechanism of action of secukinumab on calcific aortic valve disease based on the IL-23/Th17 inflammatory pathway

LI Xinxin¹, ZHANG Ning², FENG Guangling², LAN Zhenzhen², GUO Jiao², LIU Xincan^{2*}

(1. Department of Gastroenterology, Ningde Municipal Hospital of Ningde Normal University, Ningde 352000, China.

2. Heart Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 **Objective** To observe whether the IL-23/Th17 inflammatory pathway is involved in the development of calcific aortic valve disease, and whether secukinumab can delay the progression of calcific aortic valve disease by inhibiting this pathway. **Methods** Forty-seven mice were divided into a blank control group, model group, and secukinumab group according to the random number table method. The blank control group was fed normal chow, while the

model group and secukinumab group were fed pro-calcification chow for 16 weeks to establish a calcific aortic valve disease model. After intervention with secukinumab for 4 weeks, peak flow velocity changes in the aortic valves were detected under Doppler ultrasonography in all mice. Relevant indexes were determined by hematoxylin and eosin staining, Von Kossa staining, immunohistochemical staining, ELISA, and qPCR. **Results** Compared with the model group, the secukinumab group showed significantly reduced peak flow velocity ($P < 0.05$) and serum IL-6, IL-17, and IL-23 levels ($P < 0.05$) in the aortic valve. Compared with the secukinumab group, the model group's leaflet thickness was significantly increased, and there were more calcium deposits. Immunohistochemical result showed that macrophage infiltration ($P < 0.05$), IL-17A ($P < 0.05$) and IL-23 ($P > 0.05$) levels in the valve leaflets were reduced in the secukinumab group compared with the model group. PCR result suggested that the expression of STAT3, BMP-2, and α -SMA mRNA was significantly lower in the secukinumab group than the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** The IL-23/Th17 inflammatory pathway is involved in the pathogenesis of calcific aortic valve disease. The inflammation, fibrosis, osteogenic differentiation, and calcification of mouse valves were alleviated after intervention with secukinumab, which may delay disease progression by inhibiting the IL-23/Th17 inflammatory pathway.

【Keywords】 IL-23/Th17; calcific aortic valve disease; inflammation; secukinumab

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

钙化性主动脉瓣膜病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是继冠心病和动脉高血压之后第三大常见心血管疾病^[1]。它是一种动态疾病, 主动脉瓣叶根部的初始细胞转变为能使瓣膜增厚的纤维化样细胞, 称为动脉硬化, 而后瓣膜小叶发生钙化和重塑致使瓣膜结构改变、功能受损, 最终发展为主动脉瓣狭窄 (aortic stenosis, AS) 并伴有不稳定的血流动力学^[2]。CAVD 的患病率在 60 岁以上的人群中超过了 2%, 动脉硬化患病率在 65 岁以上人群中则超过 25%, 后者虽无明显狭窄, 但增加了与心梗、心血管事件相关的死亡风险^[3-4]。CAVD 患者会经历漫长渐进的无症状期, 一旦出现晕厥、心绞痛等症状时, 手术是这类患者唯一的治疗方式, 且价格昂贵, 也不是所有患者都能满足治疗条件^[5]。出现症状的患者若未及时手术治疗, 其 2 年生存率仅为 50%, 5 年生存率仅为 20%^[6-7]。全球目前尚无可以治疗或者延缓 CAVD 的上市药物, 因此, 探索早期的药物干预对于预防或减缓 CAVD 进展具有重要意义。

有回顾性和前瞻性研究显示, 年龄、性别糖尿病、肥胖、高血压、吸烟、血浆脂蛋白 (Lp(a))、低密度脂蛋白胆固醇水平及遗传等因素均与 CAVD 的发病风险相关^[8]。CAVD 的发病机制涉及异常基质沉积、纤维化、炎症、脂质积累等, 其中, 炎症反应的激活作为最重要的部分贯穿整个发病过程^[9]。已有研究表明, IL-23/Th17 炎症通路在动脉血管粥样硬化、银屑病和炎性肠病等多种炎症相关性疾病中都起着关键作用, 但其在 CAVD 中的作用机制尚不明确^[10-11]。有研究发现, 在主动脉瓣钙化小鼠模型

中, 敲除 IL-17A 基因的小鼠较未敲除该基因的小鼠主动脉瓣钙化程度及免疫炎症反应都有所减轻, 说明 IL-17A 在钙化性主动脉瓣膜病中起到了重要作用, 但 IL-23/Th17 炎症通路中 IL-17A 的上游炎症因子 IL-23 表达状态并不清楚^[12]。司库奇尤单抗作为 IL-17A 的抑制剂, 目前临床已被用于治疗银屑病, 疗效良好且安全性高, 临床研究显示司库奇尤单抗可改善斑块状银屑病患者血管内皮功能^[13]。因此, 本研究建立主动脉瓣狭窄小鼠模型, 通过检测 IL-23/Th17 炎症通路相关因子在病变瓣膜的表达情况及司库奇尤单抗对小鼠瓣膜病变干预效果, 探讨 IL-23/Th17 炎症通路与钙化性主动脉瓣膜病之间的关系, 以及司库奇尤单抗对 CAVD 的影响与潜在机制, 为主动脉瓣钙化的发病机制提供新的理论依据, 为临床防治提供新的方向和靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

47 只 20 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 (26 ± 2) g, 购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场 [SCXK(豫)2019-0002], 饲养于河南中医药大学第一附属医院动物实验研究中心动物房 [SYXK(豫)2022-0004], 本研究已通过河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会的审查及批准 (DWLL202203004), 实验动物饲养及实验过程严格遵循 3R 原则进行。

1.2 主要试剂与仪器

司库奇尤单抗 (2230584, 瑞士诺华制药公司); 小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (A30610736, Servicebio); 山

羊抗兔 IgG (CR2109125, Servicebio); Anti-IL-23 单克隆抗体 (AC3560961007, Servicebio); Anti-IL-17A 单克隆抗体 (AC220211006, Servicebio); Anti-CD68 单克隆抗体 (AC220117031, Servicebio); 促钙化饲料 (南通特洛菲饲料科技有限公司)。台式高速冷冻型微量离心机 (Dragon Lab); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad); 研磨仪 (Servicebio); 全自动洗板机 (雷杜生命科技有限公司); 酶标检测仪 (BioTeK); 组织脱水机 (DIAPATH); 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); 病理切片机 (上海徠卡仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建

动物模型根据 Tandon 等^[14]创造的一种基于促钙化饮食的非转基因小鼠模型,能够模拟 CAVD 小鼠主动脉狭窄、钙化、基质重塑等病变过程,其克服了传统饮食诱导及基因修饰模型的周期长、成功率低、成本高等不足,是一种新兴动物实验模型^[15]。小鼠进入实验室 1 周,待其适应实验室各方面后,开始给予促钙化饲料(成分:胆固醇:2.07% w/w+总维生素 D3:75 042 IU/kg+钙:0.99% w/w+磷:0.75% w/w),动物自由采食与饮水。喂养 16 周后,小鼠行彩超多普勒检测主动脉瓣峰值流速,对比基线增加 15% 以上(说明小鼠出现主动脉瓣狭窄)即为造模成功^[15-16]。

1.3.2 实验分组及给药

按随机数字表法将 47 只小鼠分为 3 组:空白对照组(15 只)、模型组(16 只)和司库奇尤单抗组(16 只)。空白对照组平时给予正常饲料喂养,模型组、司库奇尤单抗组给予促钙化饲料。司库奇尤单抗组小鼠从第 16 周开始每周通过腹腔注射司库奇尤单抗(剂量为 20 mg/kg),同样时间按照体重以同样方式给予对照组和模型组小鼠生理盐水(10 mL/kg),连续给药 4 周,每周 1 次,给药同时保持原饮食不变。

1.3.3 多普勒超声心动图检测

彩色多普勒超声用于检测主动脉瓣狭窄的情况。彩色多普勒超声在胸骨旁长轴和胸骨上切面对主动脉瓣峰值血流速度及反流进行成像,超声探头角度校正范围为 40°~50°。为减少操作差异,整个操作均由同一人完成,以上操作和检测结果均在超声科老师的指导下完成。

1.3.4 HE 染色及 Von Kossa 染色

HE 染色用于观察瓣膜形态结构改变, Von

Kossa 染色用于观察瓣膜钙盐沉积水平。取主动脉瓣组织于 10% 中性福尔马林固定,顺乙醇梯度脱水后石蜡包埋,经组织切片机切 3 μm 超薄石蜡切片后脱蜡复水,进行 HE 染色和 Von Kossa 染色。

1.3.5 免疫组化检测

检测 3 组瓣膜小叶上巨噬细胞、IL-17A 和 IL-23 阳性细胞表达情况。取 3 μm 超薄主动脉瓣组织的石蜡切片,经脱蜡复水抗原修复、封固后,一抗孵育过夜,二抗孵育显色。

1.3.6 ELISA 检测血清 IL-6、IL-17、IL-23 表达

ELISA 检测血清中炎症因子 IL-6、IL-17、IL-23 的表达水平,按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 检测

实时荧光定量 PCR 检测主动脉瓣组织 IL-23/Th17 通路中 STAT3、成骨通路关键位点 BMP-2 及纤维化相关的 α-SMA mRNA 表达情况。提取瓣膜 RNA 后,对其纯度和浓度进行测定,再将 RNA 逆转录,引物设计完成后,经预变性、变性、退火、延伸进行 PCR 扩增,行 40 个循环,各引物序列见表 1。PCR 扩增以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内对照,计算出样本以上 3 种基因表达的相对值。

1.4 统计学方法

实验结果采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数间比较采用方差分析,方差分析两两比较时选用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。采用 Image J 对免疫组化图片进行定量分析,采用 Graph Pad Prism 7 软件制作统计图。

2 结果

2.1 一般情况

经过模型建立和药物腹腔注射后,各组实验小鼠具体数量如下:空白对照组 15 只,模型组 14 只,司库奇尤单抗组 14 只。模型组及司库奇尤单抗组

表 1 实时荧光定量 PCR 相关引物

Table 1 Primers used for the qPCR

名称 Name	引物序列 Primer sequence
STAT3	S:5'-TGGCGAGAAGCATTGTGAGTG-3' A:5'-TCTTAATTTGTTGGCGGGTCT-3'
BMP-2	S:5'-GCTGACCACCTGAAGTCCACT-3' A:5'-CCTCCACAACCATGTCTGATAA-3'
α-SMA	S:5'-GTACCACCATGTACCCAGGC-3' A:5'-GAAGGTAGACAGCGAAGCCA-3'
GAPDH	S:5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3' A:5'-TGAGGCTCAATGAAGGGTCT-3'

在造模期间因小鼠相互打斗致死各 1 只,模型组在第 10 周时有 1 只小鼠可能因个体差异不喜促钙化饲料而导致过于消瘦死亡,司库奇尤单抗组有 1 只小鼠在第 16 周后超声检测未达到造模成功标准,将其排除。

2.2 多普勒超声心动图检测结果

在小鼠开始造模前、造模第 16 周及第 20 周(即给药 4 周后)时,对所有小鼠进行主动脉瓣峰值血流速度的检测。造模前 3 组间该指标均无统计学意义($P>0.05$)。造模 16 周时,除空白对照组及司库奇尤单抗组的 1 只小鼠之外,其余小鼠的主动脉瓣峰值流速均较基线增加大于 15% ($P<0.05$)。给药 4 周后,司库奇尤单抗组的主动脉瓣峰值流速与模型组相比有所降低($P<0.05$)。空白对照组小鼠的主动脉瓣峰值流速在造模前、造模第 16 周及第 20 周均未表现出差异性($P>0.05$);而模型组及司库奇尤单抗组小鼠的主动脉瓣峰值流速在造模前、造模第 16 周及第 20 周均表现出差异性($P<0.05$,表 2)。

2.3 主动脉瓣膜组织的 HE 染色及 Von Kossa 染色结果

通过 HE 染色观察主动脉瓣的形态变化。结果

显示,与空白对照组相比,另两组的瓣膜各层结构紊乱且厚度增大,其中模型组瓣膜增厚明显,司库奇尤单抗组瓣膜厚度较模型组减小(图 1)。

通过 Von Kossa 染色观察钙盐沉积情况,黑色颗粒即为钙盐沉积。结果显示,空白对照组小鼠的主动脉瓣未见异常,而模型组瓣膜出现了许多黑色颗粒沉积,司库奇尤单抗组也存在少量黑色颗粒沉积,主要出现于病变瓣膜的边缘且分布相对集中,说明瓣膜组织发生了钙化(图 1)。

2.4 主动脉瓣膜免疫组织化学染色结果

CD68 抗体用于检测病变瓣膜组织炎症巨噬细胞的浸润情况。空白对照组中瓣膜小叶未发现表达强度高的阳性细胞,仅发现很少的零散弱阳性细胞于瓣膜边缘;在模型组中,阳性细胞主要分布于病变部位的瓣膜内皮细胞附近,阳性表达强度高;而司库奇尤单抗组瓣膜可见阳性巨噬细胞标记物 CD68 的表达量明显低于模型组($P<0.05$,图 2)。

IL-17A 用于检测瓣膜组织中 IL-17A 的表达情况。镜下观察主动脉瓣组织,空白对照组中瓣膜小叶发现有微量 IL-17A 的表达;而在模型组中发现了 IL-17A 的大量聚集表达,且主要分布于病

表 2 各组小鼠不同时期的主动脉瓣峰值流速($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Aortic valve peak flow velocity in various groups of mice at different times

组别 Groups	空白对照组 Blank control group	模型组 Model group	司库奇尤单抗组 Secukinumab group
造模前主动脉瓣峰值流速/(mm/s) Pre-modelling AV peak flow velocity	581.03±39.00	578.02±39.51	594.92±41.81
造模第 16 周主动脉瓣峰值流速/(mm/s) AV peak flow velocity at week 16 of modelling	597.07±42.47	833.94±56.08* ^{&}	850.30±47.74* ^{&}
造模第 20 周主动脉瓣峰值流速/(mm/s) AV peak flow velocity at week 20 of modelling	615.68±43.91	922.80±45.62* ^{&+}	768.34±42.53* ^{&+}

注:与同一时期空白对照组相比,* $P<0.05$;与同一时期模型组相比,[#] $P<0.05$;与同组间造模前相比,[&] $P<0.05$;与同组间第 16 周相比,⁺ $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank control group in the same period, * $P<0.05$. Compared with model group in the same period, [#] $P<0.05$. Compared with pre-modelling in the same group, [&] $P<0.05$. Compared with week 16 of modelling in the same group, ⁺ $P<0.05$.

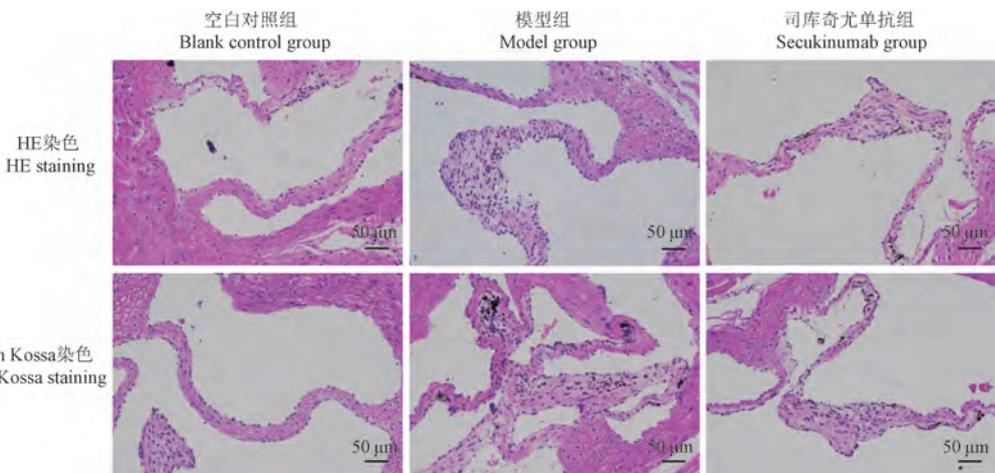


图 1 主动脉瓣膜组织 HE 及 Von Kossa 染色

Figure 1 HE and Von Kossa staining of aortic valve tissue

变部位的瓣膜内皮细胞附近且阳性表达强度高；司库奇尤单抗组瓣膜的 IL-17A 表达量明显低于模型组并且表达强度一般，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

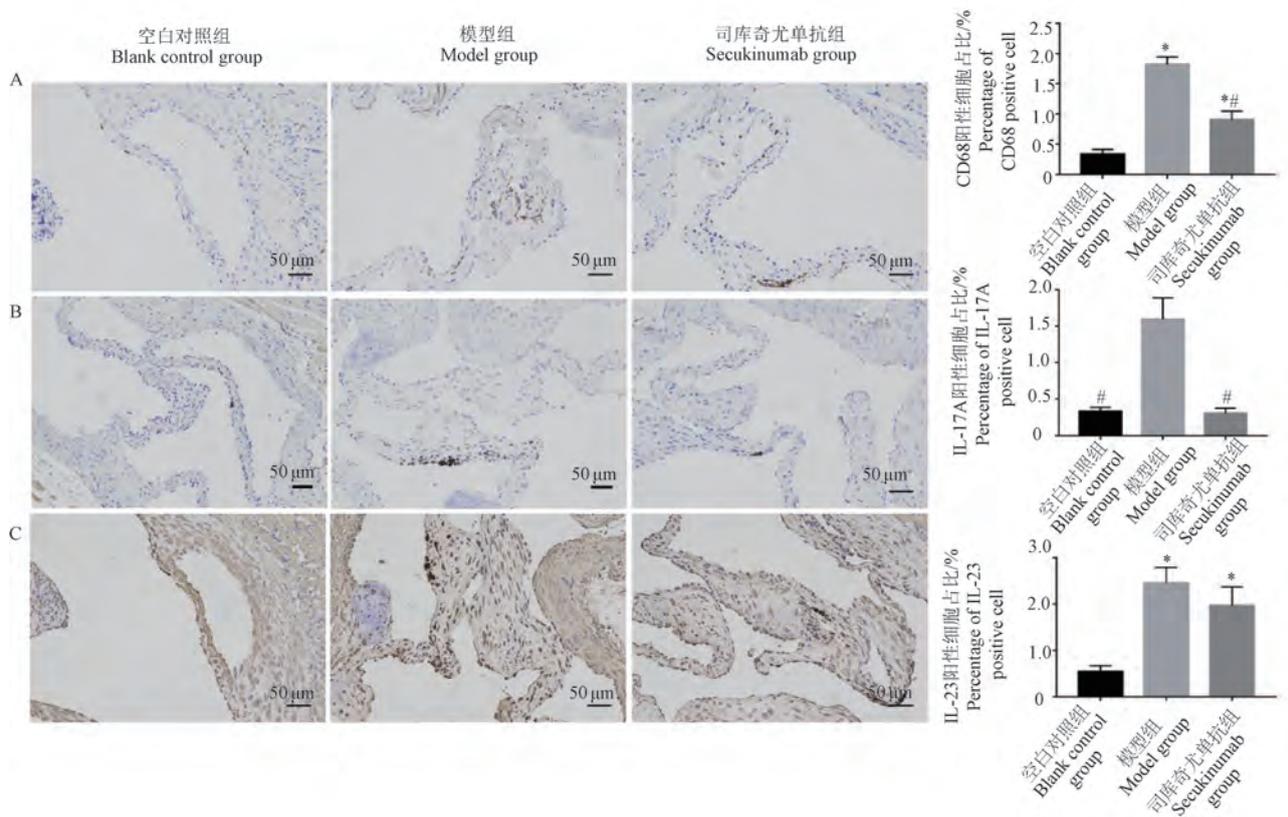
IL-23 抗体用于检测瓣膜组织中 IL-23 的表达情况。镜下观察主动脉瓣组织，发现空白对照组中瓣膜仅出现少量 IL-23 的表达；模型组中 IL-23 大量聚集并且表达强度高；司库奇尤单抗组瓣膜的 IL-23 表达量同样高度密集，仅稍低于模型组，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，三组的 IL-23 分布主要集中在病变处的瓣膜内皮细胞附近 (图 2)。

2.5 ELISA 检测血清 IL-6、IL-17、IL-23 结果

结果显示，模型组与空白对照组相比较，血清中 IL-6、IL-17、IL-23 浓度明显上升，而司库奇尤单抗组与模型组比较，血清中 IL-6、IL-17、IL-23 较低于模型组 ($P < 0.05$)；司库奇尤单抗组小鼠的血清 IL-6 浓度稍低于空白对照组，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，司库奇尤单抗组小鼠的血清 IL-17、IL-23 浓度高于空白对照组 ($P < 0.05$, 表 3)。

2.6 实时免疫荧光定量检测结果

STAT3 是 IL-23/Th17 炎症通路中的关键分子。图 3 结果显示，与空白对照组相比，模型组的 STAT3



注：A：巨噬细胞；B：IL-17A；C：IL-23。与空白对照组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ 。

图 2 主动脉瓣膜组织中巨噬细胞、IL-17A、IL-23 免疫组化染色

Note. A, Macrophages. B, IL-17A. C, IL-23. Compared with blank control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Immunohistochemical staining of macrophages, IL-17A, IL-23 in aortic valve tissue

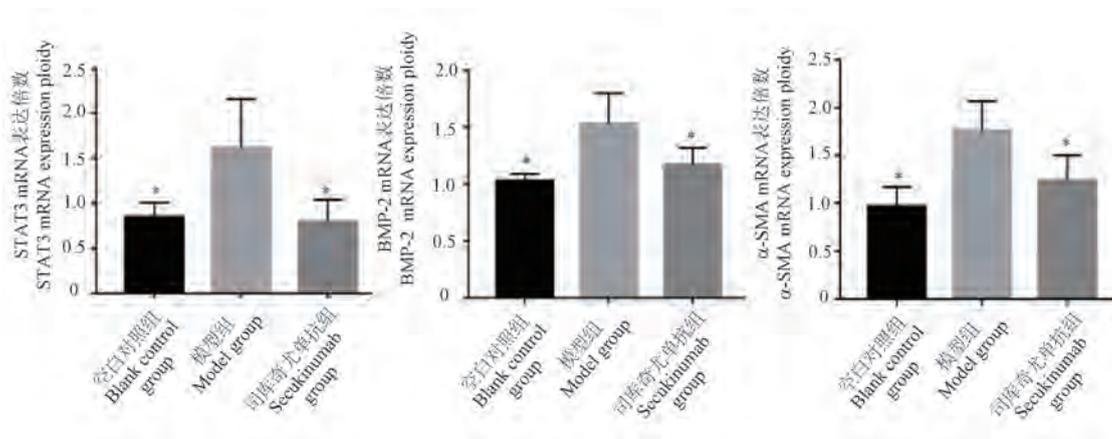
表 3 各组小鼠血清 IL-6、IL-17 和 IL-23 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Serum IL-6, IL-17 and IL-23 levels in mice of each group

组别 Groups	空白对照组 Blank control group	模型组 Model group	司库奇尤单抗组 Secukinumab group
白介素-6 IL-6	19.51 ± 12.54	36.44 ± 16.79*	13.93 ± 12.96*#
白介素-17 IL-17	52.07 ± 12.47	174.94 ± 36.08*	131.30 ± 21.74*#
白介素-23 IL-23	45.68 ± 13.91	128.80 ± 25.62*	87.34 ± 22.53*#

注：与空白对照组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ 。

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



注:与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

图3 主动脉瓣中病变形成相关蛋白的 mRNA 表达倍数

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

Figure 3 Expression ploidy of mRNA for lesion formation-associated proteins in the aortic valve

mRNA 表达倍数明显增加($P < 0.05$),司库奇尤单抗组的 STAT3 mRNA 表达倍数较模型组显著减少($P < 0.05$)。

BMP-2 是成骨分化的标志。结果显示,与空白对照组相比,模型组的 BMP-2 mRNA 表达倍数明显增加($P < 0.05$),与模型组相比,司库奇尤单抗组的 BMP-2 mRNA 表达倍数显著减少($P < 0.05$)。

α -SMA 主要反应了瓣膜的纤维化程度。结果显示,模型组的 α -SMA mRNA 表达倍数较空白对照组明显增加($P < 0.05$),而司库奇尤单抗组小鼠的 α -SMA mRNA 表达倍速较模型组则显著减少($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来,CAVD 已代替风湿性瓣膜病成为发达国家最常见的心脏瓣膜疾病,因此,探索 CAVD 相关的生物分子机制、寻找潜在的治疗靶点将推动人类对 CAVD 的认知,有利于开辟诊断及治疗的新途径。

CAVD 与动脉粥样硬化性心脏病拥有共同的危险因素,如收缩期高血压、高胆固醇和吸烟习惯等,虽两者有一定的相似之处,但瓣膜与血管壁有着不同的特性,主动脉瓣上的组织、细胞以及血流动力学应力与脉管系统均存在显著差异^[17]。诱导降低低密度脂蛋白胆固醇的他汀类药物是二级预防动脉粥样硬化性心脏病非常有效的药物,但其对 CAVD 患者的病情无明显改善作用^[18]。关于目前研究 CAVD 的治疗靶点,大致可分为 4 大类:第一

类,Notch1 通路的治疗靶点:钙粘蛋白-11、lncRNA H19、miRNA-34a、RANKL;第二类,动脉粥样硬化或血管病的治疗靶点:脂蛋白 a(Lp(a))、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 型(PCSK9)、基质 Gla 蛋白(MGP)、组织蛋白酶 S(Cathepsin S)、Sortilin;第三类,代谢相关靶点:可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)、P2Y 型紫癜受体 2、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、钠依赖性磷酸盐转运体 1(NPT1)、肌醇六磷酸六钠盐(INSP6)、二肽酰基酶 4(DPP-4);第四类,G 蛋白偶联受体靶点:血管紧张素 II 受体 2 型、血清素 2B 受体^[19-21]。虽然近些年临床及科研人员在寻找治疗 CAVD 的潜在靶点上有一定进展,但是目前仍没有治疗 CAVD 的临床药物,因此,对于 CAVD 疾病机制的探索仍需继续。

CAVD 不再认为是随年龄增长而发生的简单被动钙沉积过程,而是多因素复杂的主动调节结果,其中,炎症反应贯穿了 CAVD 形成的各个环节,对疾病发生发展起到了至关重要的作用^[9]。IL-23 和 IL-17 在免疫反应中有关键作用,若两者失调会加剧慢性免疫介导的炎症,其通路的激活则会加剧多种炎症性疾病(如动脉粥样硬化、银屑病、强直性脊柱炎等)的发展^[22]。因此,近些年出现了许多阻断 IL-23/Th17 的临床研究,IL-23/Th17 成为了部分自身免疫性疾病有希望的治疗靶点。IL-23 是促炎性细胞因子,主要由巨噬细胞和树突状细胞产生,响应外源性或内源性信号,驱动 Th17 细胞的分化和活化产生 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 和 TNF- α ^[22]。IL-17 是重要的炎症介质,主要来源于 Th17 细胞,由 IL-

17A 至 IL-17F 组成,可以与特异性受体结合刺激相应靶细胞释放大量前炎症因子并活化中性粒细胞,使炎症因子水平上升引发一系列炎症反应^[23]。而 CD4⁺T 细胞是 Th17 的前体细胞,TGF- β 、IL-6 和 IL-21 等可以激活 T 淋巴细胞并促进 Th0 细胞向 Th17 细胞的分化,从而导致 Th17 细胞对 IL-23 有反应,是 Th17 细胞稳定和扩增至关重要的步骤^[24-29]。在 Th17 细胞分化过程中,ROR γ t 是最为关键的转录因子之一,与 IL-17 共同参与了多种自身免疫病的病理过程^[30]。IL-23 和 Th17 受体相结合后,胞内信号转导及 STAT3 被活化而使 ROR γ t 表达增加,并且与 IL-17 基因特异性的 RORE 结合从而促进 Th17 细胞分泌并释放 IL-17C,同时与 IL-23 结合后的 Th17 细胞能够通过 TNF- α 及 NF- κ B 通路等多渠道分泌 IL-17 而进一步引起炎症的发生^[31]。JAK2-STAT3 炎症通路可以诱导成骨细胞的分化增值,还能增加化学趋化因子(如 IL-6、IL-8 等)的表达导致瓣膜损伤,并提高细胞外基质钙盐沉积相关因子表达^[32-34]。

基于以上,本研究通过促钙化饲料喂养小鼠来建立 CAVD 模型,并在早期阶段给予司库奇尤单抗干预 CAVD 小鼠。结果发现,在 CAVD 模型小鼠中,IL-23/Th17 炎症通路中相关因子表达增高,巨噬细胞募集增多,瓣膜处的 STAT3、BMP-2、 α -SMA 及血清中 IL-6、IL-17、IL-23 水平均升高,并且在病变处出现大量钙盐沉积,说明钙化瓣膜中 IL-23/Th17 炎症通路被激活,瓣膜出现了不同程度的炎症、纤维化、成骨分化及钙化。早期阶段对 CAVD 小鼠进行司库奇尤单抗的干预,小鼠的主动脉瓣峰值血流速度及 IL-6、IL-17、IL-23 有所降低,瓣膜处募集的巨噬细胞及钙盐沉积减少,司库奇尤单抗对瓣膜的炎症、纤维化、成骨分化及钙化情况均有所改善,说明司库奇尤单抗可能阻断了 IL-23/Th17 炎症通路,减轻了炎症反应,延缓了瓣膜钙化的进程。其可能是在 IL-23 与 Th17 的结合后,STAT3 被活化而使 ROR γ t 表达增加,导致 Th17 细胞释放大量 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 和 TNF- α 等炎症因子,IL-17A 炎症因子通过 IL-17RA 和 IL-17RC 的异二聚体复合物发出信号,以诱导反应细胞产生如 IL-6 等促炎细胞因子,导致瓣膜炎症反应的发生,从而加快瓣膜钙化。而司库奇尤单抗作为 IL-17A 的抑制剂,可以选择性结合细胞因子 IL-17A,从而直接使血清 IL-17 减少,可能是 IL-23 的减少抑制了初始 T 细胞分化

成 Th17,从而进一步抑制了 IL-17、IL-6、TNF- α 的释放,减缓了一系列炎症反应。也可能是释放的 IL-17 激活了 JAK2-STAT3 信号传导,从而导致瓣膜细胞外基质钙盐大量沉积和 IL-6、BMP-2 的表达增高。巨噬细胞在衰老和主动脉瓣狭窄患者的钙化瓣叶上显着存在,与瓣膜炎症及钙化程度直接相关,现已被用于评估瓣膜的钙化程度,因此确定其在 CAVD 中的作用至关重要^[35-36]。促炎性 M1 巨噬细胞作为主要存在于 CAVD 的巨噬细胞亚群,在 CAVD 病程中逐渐增强,并不断积累引发炎症级联反应,从而促进免疫细胞浸润和疾病进展。M1 巨噬细胞可能通过分泌 TNF- α 和 IL-1 β 促炎细胞因子浸润纤维化的瓣叶使 VIC 的肌成纤维细胞失活并高度增殖,再通过分泌 IL-6 促进失活的肌成纤维细胞向成骨细胞样分化,从而介导瓣膜从纤维化转变到钙化^[37-38]。

本研究也存在一定局限性。第一,本模型与人 CAVD 的发病机制具有一定的差异。第二,由于小鼠主动脉瓣膜组织较小,样本量较少,未行蛋白质印迹分析。第三,CAVD 目前仍没有批准上市的治疗药物,本研究无法设置阳性对照。

迄今为止,CAVD 对于人类来说仍是一种挑战性疾病,是现代医学的难点及研究热点,全球为此探索过各种治疗药物,虽暂无延缓疾病进展或改善预后的上市药物,但已经发现潜在的治疗靶点。本研究虽然已经验证了 IL-23/Th17 炎症通路参与 CAVD 的病变过程,但是 IL-23/Th17 炎症通路下具体机制仍需要后期实验去探索验证。随着医学界对 CAVD 的关注度越来越高,相信不久的将来一定能对疾病有更全面的认识,寻找到早期干预的有效治疗药物,为 CAVD 患者带来福音。

参考文献:

- [1] GO A S, MOZAFFARIAN D, ROGER V L, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2013, 127(1): 143-152.
- [2] VAN DER VEN C F, WU P J, TIBBITT M W, et al. *In vitro* 3D model and miRNA drug delivery to target calcific aortic valve disease [J]. *Clin Sci*, 2017, 131(3): 181-195.
- [3] NIGHTINGALE A K, HOROWITZ J D. Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk [J]. *Heart*, 2005, 91(11): 1389-1393.
- [4] PELTONEN T, OHUKAINEN P, RUSKOAHO H, et al. Targeting vasoactive peptides for managing calcific aortic valve

- disease [J]. *Ann Med*, 2017, 49(1): 63–74.
- [5] BAUMGARTNER H, FALK V, BAX J J, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(36): 2739–2791.
- [6] OSNABRUGGE R L, MYLOTTE D, HEAD S J, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(11): 1002–1012.
- [7] THADEN J J, NKOMO V T, ENRIQUEZ-SARANO M. The global burden of aortic stenosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2014, 56(6): 565–571.
- [8] MONCLA L M, BRIEND M, BOSSÉ Y, et al. Calcific aortic valve disease: mechanisms, prevention and treatment [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(8): 546–559.
- [9] NEWBY D E, COWELL S J, BOON N A. Emerging medical treatments for aortic stenosis: statins, angiotensin converting enzyme inhibitors, or both? [J]. *Heart*, 2006, 92(6): 729–734.
- [10] XU D, FU J, JIN L, et al. Circulating and liver resident CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B [J]. *J Immunol*, 2006, 177(1): 739–747.
- [11] SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A. Human Th17 cells in infection and autoimmunity [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(5): 620–624.
- [12] 黄丽丹. 白细胞介素-17A 基因敲除抑制主动脉瓣钙化研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(3): 571.
HUANG L D. Interleukin-17A deficiency alleviates the progress of aortic valve calcification in ApoE^{-/-} mice [J]. *Chin J Exp Surg*, 2019, 36(3): 571.
- [13] VON STEBUT E, REICH K, THAÇI D, et al. Impact of secukinumab on endothelial dysfunction and other cardiovascular disease parameters in psoriasis patients over 52 weeks [J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139(5): 1054–1062.
- [14] TANDON I, JOHNS S, WOESSNER A, et al. Label-free optical biomarkers detect early calcific aortic valve disease in a wild-type mouse model [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1): 521.
- [15] 宗永辉, 刘新灿. 钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 133–139, 145.
ZONG Y H, LIU X C. Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(11): 133–139, 145.
- [16] NIEPMANN S T, STEFFEN E, ZIETZER A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847–856.
- [17] COTÉ N, MAHMUT A, BOSSE Y, et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease [J]. *Inflammation*, 2013, 36(3): 573–581.
- [18] CAPOULADE R, CLAVEL M A, DUMESNIL J G, et al. Insulin resistance and LVH progression in patients with calcific aortic stenosis: a substudy of the ASTRONOMER trial [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2013, 6(2): 165–174.
- [19] LINDMAN B R, MERRYMAN W D. Unloading the stenotic path to identifying medical therapy for calcific aortic valve disease: barriers and opportunities [J]. *Circulation*, 2021, 143(15): 1455–1457.
- [20] KRALER S, BLASER M C, AIKAWA E, et al. Calcific aortic valve disease: from molecular and cellular mechanisms to medical therapy [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(7): 683–697.
- [21] MARTIN M, MOTTA S E, EMMERT M Y. Have we found the missing link between inflammation, fibrosis, and calcification in calcific aortic valve disease? [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(10): 899–901.
- [22] SCHINOCCA C, RIZZO C, FASANO S, et al. Role of the IL-23/IL-17 pathway in rheumatic diseases: an overview [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 637829.
- [23] PATEL D D, KUCHROO V K. Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions [J]. *Immunity*, 2015, 43(6): 1040–1051.
- [24] IVANOV I I, ZHOU L, LITTMAN D R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19(6): 409–417.
- [25] BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 235–238.
- [26] VELDHOEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGFβ₂ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells [J]. *Immunity*, 2006, 24(2): 179–189.
- [27] HUBER M, BRÜSTLE A, REINHARD K, et al. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(52): 20846–20851.
- [28] WILSON N J, BONIFACE K, CHAN J R, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(9): 950–957.
- [29] MORISHIMA N, MIZOGUCHI I, TAKEDA K, et al. TGF-β is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 105–110.
- [30] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor RORγ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1121–1133.
- [31] XIA L, TIAN D, HUANG W, et al. Upregulation of IL-23 expression in patients with chronic hepatitis B is mediated by the HBx/ERK/NF-κB pathway [J]. *J Immunol*, 2012, 188(2): 753–764.
- [32] KATSUYAMA T, COMOGLIO F, SEIMIYA M, et al. During *Drosophila* disc regeneration, JAK/STAT coordinates cell

- proliferation with Dilp8-mediated developmental delay [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(18): E2327-E2336.
- [33] VOSS A, BODE G, KERKHOFF C. Double-stranded RNA induces IL-8 and MCP-1 gene expression via TLR3 in HaCaT-keratinocytes [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012, 11(5): 397-405.
- [34] LUO Y P, ZHOU H, KRUEGER J, et al. The role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression [J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 662-673.
- [35] HJORTNAES J, BUTCHER J, FIGUEIREDO J L, et al. Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(16): 1975-1984.
- [36] ANSTINE L J, HORNE T E, HORWITZ E M, et al. Contribution of extra-cardiac cells in murine heart valves is age-dependent [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(10): e007097.
- [37] LI G, QIAO W, ZHANG W, et al. The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 153(6): 1318-1327.
- [38] GRIM J C, AGUADO B A, VOGT B J, et al. Secreted factors from proinflammatory macrophages promote an osteoblast-like phenotype in valvular interstitial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(11): e296-e308.

[收稿日期]2024-03-26

(上接第 77 页)

- [5] 管颜青. 2040 年全球肝癌新发病例将增 55% [N]. *医师报*, 2022-10-13(B02).
- GUAN Y Q. The number of new liver cancer cases worldwide will increase by 55% in 2040 [N]. *Medical newspaper*, 2022-10-13(B02).
- [6] CHEN B, ZHOU S, ZHAN Y, et al. Dioscin inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2222.
- [7] 梁玉琼, 黄庆, 陈梁可, 等. 薯蓣皂苷对 HepG2 肝癌细胞增殖的抑制作用 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 62-66, 213.
- LIANG Y Q, HUANG Q, CHEN L K, et al. Inhibitory effects of dioscin on the proliferation of HepG2 cells [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2021, 37(8): 62-66, 213.
- [8] 梁玉琼, 黄庆, 梁天坚, 等. 薯蓣皂苷对肝癌细胞 Bel-7402 和正常人肝细胞 LO2 增殖和凋亡的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(3): 30-35.
- LIANG Y Q, HUANG Q, LIANG T J, et al. Proliferation and apoptosis of dioscin in Bel-7402 and LO2 cells [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(3): 30-35.
- [9] 李岩溪. 天然产物膨麒麟内酯靶向 β -catenin 诱导结肠癌细胞凋亡的作用机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- LI Y X. The effect and mechanism of natural product wedelolactone inducing apoptosis of colorectal cancer cells by targeting β -catenin [D]. Shenyang: China Medical University, 2022.
- [10] MA Q, YU J, ZHANG X, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway-a versatile player in apoptosis and autophagy [J]. *Biochimie*, 2023, 211: 57-67.
- [11] TONG Q, YI M, KONG P, et al. TRIM36 inhibits tumorigenesis through the Wnt/ β -catenin pathway and promotes caspase-dependent apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 278.

[收稿日期]2024-03-01

郭亚茜,杜晓鹏,刘凯慧,等. 无菌金黄地鼠模型建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 87-93.

Guo YX, Du XP, Liu KH, et al. Establishment of sterile golden hamster model [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 87-93.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.010

无菌金黄地鼠模型建立

郭亚茜,杜晓鹏,刘凯慧,王昭华,朱 华*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家动物模型技术创新中心,国家卫生健康委比较医学重点实验室,
国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

【摘要】 目的 使用剖宫产净化(cesarean section purification)方法建立无菌金黄地鼠模型。**方法** 供胎母鼠选择 SPF 级金黄地鼠,雌雄按 1:1 进行交配,见栓后与雄鼠分开饲养。代乳母鼠的合笼时间应早于供胎母鼠一周。怀孕的金黄地鼠临产时在超净工作台内进行子宫摘除术,传入净化用隔离包内,剥离子宫获得待净化乳鼠,分别使用无菌级 ICR 小鼠和无菌级 SD 大鼠进行代乳,成功离乳后转入饲养用隔离包内。每月对饲养用隔离包进行无菌状态检测。**结果** 共实施 3 次剖宫产手术,第 1 次和第 2 次代乳失败,第 3 次代乳成功,获得仔鼠 18 只,存活率 88%,离乳存活率 66%,依照 GB/T 14926.41-2001 进行无菌金黄地鼠状态检测均为合格。**结论** 通过剖宫产净化技术,使用无菌级 ICR 小鼠和无菌级 SD 大鼠进行代乳,达到微生物净化目的,获得无菌化金黄地鼠模型。

【关键词】 金黄地鼠;无菌动物;剖宫产净化;隔离器

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0087-07

Establishment of sterile golden hamster model

GUO Yaxi, DU Xiaopeng, LIU Kaihui, WANG Zhaohua, ZHU Hua*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, National Center of Technology Innovation for animal model, NHC Key Laboratory of Comparative Medicine, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective A sterile golden hamster model was established by cesarean section purification. **Methods** SPF-grade donor female golden hamsters were selected, and males and females were mated 1:1 and separated after mating. The cage time of the surrogate mothers was 1 week earlier than that of the donor mothers. Parturient golden hamsters underwent hysterectomy on a sterilized workbench, and the uteruses were transferred into isolation kits and stripped. To obtain sterile milk for milk replacement, sterile ICR mice and sterile SD rats were used. After successful separation, the hamsters were transferred to isolation kits to prepare for feeding. The sterility status of the feeding isolation kits was tested monthly. **Results** Three caesarean sections were performed, but the first and second lactations failed. The third milk replacement was successful, and 18 young hamsters were obtained with survival rates of 88% and 66% after weaning. All hamsters were quality tested by GB/T 14926.41-2001. **Conclusions** Using a cesarean section purification technique and sterile ICR mice and SD rats for microbial-free milk replacement, a sterile golden hamster model was obtained.

【Keywords】 golden hamster; sterile animals; cesarean section purification; isolator

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

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2022-12M-1-020)。

【作者简介】 郭亚茜(1989—),女,主管技师,研究方向:无菌动物技术。E-mail:GYX409@163.com

【通信作者】 朱华(1971—),女,主任技师,硕士,研究方向:疾病与肠道微生态。E-mail:zhuh@cnilas.org

标准化的实验动物是保障结果准确性、可靠性的关键因素。金黄地鼠 (golden hamster, *Mesocricetus auratus*) 虽然已广泛应用于新型冠状病毒、代谢性疾病发病机制、疫苗和治疗药物评价等领域^[1-3], 占地鼠使用总量的 90%。但这些金黄地鼠多为普通级, 容易受到沙门菌、多杀巴斯德杆菌、泰泽病原体、绿脓杆菌等侵害, 严重影响实验结果的准确性; 张华琼等^[4]通过剖宫产净化, 使用国外引入的 SPF 级金黄地鼠进行代乳, 率先在国内培育出 SPF 级金黄地鼠, 提高了金黄地鼠的微生物等级。近年来, 肠道微生物对于人类健康和疾病发生发展的影响越来越受到关注^[5-7]。无菌动物作为微生物背景最清晰, 可对菌群、基因及饮食等环境因素进行有效控制, 是研究肠道菌群 (gut microbiota, GM) 对人类健康及疾病影响的最有效动物模型之一^[8-9]。但目前未见无菌金黄地鼠种群的相关报道, 缺乏肠道菌群与特定疾病关系研究的金黄地鼠模型^[10]。本实验利用剖宫产手术获得待净化乳鼠, 使用无菌级 ICR 小鼠和无菌级 SD 大鼠进行代乳的方式对金黄地鼠进行生物净化, 建立无菌金黄地鼠种群。

1 材料和方法

1.1 实验动物

18 周龄 SPF 级金黄地鼠, 雌雄各 30 只, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京)

2021-0011], 20 周龄无菌级 ICR 小鼠, 雌雄各 30 只, 22 周龄无菌级 SD 大鼠, 雌雄各 30 只, 由本实验室繁育。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所隔离设施内进行 [SYXK (京) 2023-0037]。所有实验过程经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物伦理审查委员会批准 (ZH23002)。

1.2 主要试剂与仪器

过氧乙酸消毒液 (北京洗得宝消毒制品有限公司, HY-XDB-500)。手术隔离器 (北京环宇中科净化工程有限公司, 1160 cm×650 cm×600 cm); 高压蒸汽灭菌器 (TOMY, SX-700); 超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司, ZHJH-C1118C)。

1.3 实验方法

生物净化是建立高等级动物种群唯一经济有效的方法^[11]。目前国内普遍采用的技术是剖宫产净化, 其方法是通过子宫摘除术获得乳鼠后, 由同种或异种动物代乳 (见图 1)。

1.3.1 动物的准备

代乳母鼠选择经产、母性好、不食仔、健康的无菌级 ICR 小鼠、无菌级 SD 大鼠; 供胎母鼠选择经产 2~3 胎、健康无疾病的 SPF 级金黄地鼠。根据其妊娠期时间精确计算 ICR 小鼠、SD 大鼠和金黄地鼠合笼时间, 按 1:1 进行合笼, 记录见栓日期, 见栓后与雄鼠分开饲养。代乳母鼠的合笼时间应早于供胎母鼠 1 周, 确保代乳母鼠提前分娩, 做好代乳准备。

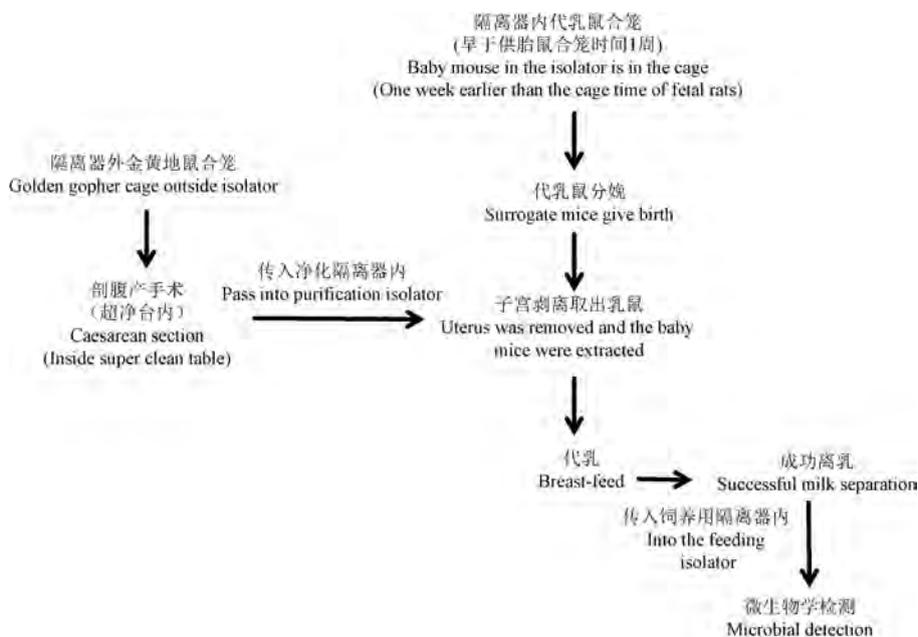


图 1 剖宫产净化技术路线图

Figure 1 Technical roadmap for purification of cesarean section

1.3.2 术前准备

将剖宫产净化隔离包用 2% 过氧乙酸溶液喷雾灭菌,保持 48 h 通风后备用^[12]。实施剖宫产手术的环境温度要达到 36~38 °C,将 U 型渡槽与隔离包传递仓口连接,用 37 °C 蒸馏水配制 2% 过氧乙酸溶液,倒入 U 型渡槽内^[13]。确保每只孕鼠准备一套手术器械,经 121 °C 60 min 高压灭菌后备用^[14]。

1.3.3 剖宫产手术

金黄地鼠孕鼠妊娠期 15~17 d 时,开始密切观察,当孕鼠出现食欲减退、烦躁不安、有坐窝行为、触诊其耻骨联合成开口状态、外阴潮红、肿胀、有少量分泌物时,孕鼠达到临产状态,可进行剖腹产子宫摘除术^[15]。将颈椎脱臼处死的孕鼠放入 2% 过氧乙酸溶液中浸泡 3 s,置于解剖板上,固定其四肢和头部。用碘酒棉球逆毛消毒孕鼠腹部,沿腹中线剪开腹部,充分暴露子宫,用止血钳夹住子宫颈及双侧子宫角,在子宫颈外侧将其剪断分离子宫。将子宫通过装有 37 °C 2% 过氧乙酸溶液的 U 型渡槽传入净化用隔离包内,使用无菌水冲洗子宫表面残留的过氧乙酸后,放在纱布上,撕开子宫及羊膜取出乳鼠,迅速擦去乳鼠鼻和口腔周围的羊膜及羊水。健康的乳鼠开始张口呼吸;没有呼吸的乳鼠要轻轻的有节律的触压胸部,促其呼吸;或用镊子轻夹其尾根,使发出叫声,引发呼吸。开始呼吸的乳鼠将由紫红色渐渐变为鲜红色。

操作时需注意操作细节:颈椎脱臼处死孕鼠时注意力度,避免伤及胎仔;选择供胎母鼠时注意不能携带可通过胎盘屏障垂直传播的病原体;实验操作过程中,严格执行无菌操作;准确判断孕鼠分娩时间,及时进行剖宫产手术,获得足月乳鼠十分重要,避免由于过早剖宫产,获得体弱早产乳鼠,或者错过分娩时间,孕鼠自然分娩,导致剖宫产手术净化失败^[16-17]。

1.3.4 代乳

剖宫产手术完成后,选择个体大、手术过程中无外伤的乳鼠,用代乳母鼠的粪便、尿液、垫料等充分混味后放入代乳母鼠原盒内进行代乳,保留 1~2 只亲仔。观察剖腹产乳鼠腹部有月牙形白色乳液,表示代乳母鼠接受代乳。

本实验共进行剖宫产净化 3 次。第 1 次剖得的金黄地鼠乳鼠,全部由分娩后 1~2 d 的无菌级 ICR

母鼠代乳;第 2 次和第 3 次剖宫产净化的代乳分为两个阶段,1~5 日龄由无菌级 ICR 小鼠代乳,6~21 日龄由无菌级 SD 大鼠代乳。将由无菌级 ICR 母鼠代乳 5 d 的金黄地鼠乳鼠转移至无菌级 SD 代乳母鼠笼中之前,应与无菌级 SD 母鼠的粪便、尿液、垫料等充分混味后再进行代乳。第 2 次剖得的金黄地鼠乳鼠,1~5 日龄由分娩后 3~5 d 的无菌级 ICR 母鼠代乳,6~21 日龄由正在分娩的无菌级 SD 母鼠代乳。第 3 次剖得的金黄地鼠乳鼠,1~5 日龄由分娩后 3~5 d 的无菌级 ICR 母鼠代乳,6~21 日龄由分娩后 1~2 d 的无菌级 SD 母鼠代乳。

1.3.5 金黄地鼠无菌状态维持及检测

成功离乳的无菌金黄地鼠转移至饲养用隔离包内,每月采集金黄地鼠粪便样品、饲料、垫料、饮用水送至中国食品药品检定研究院进行无菌状态检测,并出具检测报告。

2 结果

2.1 剖宫产手术及代乳情况

第 1 次剖宫产手术,剖得 21 只乳鼠,2 只乳鼠剖宫产后死亡,19 只乳鼠混味后由 7 只无菌级 ICR 母鼠进行代乳,由于金黄地鼠和 ICR 乳鼠之间存在个体差异,金黄地鼠乳鼠在第 6 天开始出现死亡,第 8 天全部死亡,净化失败。

第 2 次剖宫产手术,剖得 26 只乳鼠,5 只乳鼠剖宫产后死亡,21 只乳鼠混味后 1~5 日龄由 7 只无菌级 ICR 母鼠进行代乳,6~21 日龄由 5 只无菌级 SD 母鼠进行代乳,金黄地鼠乳鼠 6 日龄时,SD 代乳母鼠正在分娩或刚刚分娩,SD 母鼠没有提前分娩做好代乳准备,净化失败。

第 3 次剖宫产手术,剖得 18 只乳鼠,2 只乳鼠剖宫产后死亡,16 只乳鼠混味后 1~5 日龄由 8 只无菌级 ICR 母鼠进行代乳,6~21 日龄由 6 只无菌级 SD 母鼠进行代乳(表 1)。本次剖宫产净化代乳成功,成功离乳金黄地鼠 12 只,7 雌 5 雄(图 2)。

解剖时可见无菌金黄地鼠盲肠巨大(图 3)。无菌金黄地鼠 10 周龄时,按雌雄 1:1 进行合笼,5 只雌鼠中 4 只成功受孕,其中 1 号母鼠产仔 9 只,在哺乳期 2 周时开始拒绝哺乳,2 号母鼠产仔 7 只,3 号母鼠产仔 8 只,4 号母鼠产仔 3 只,成功离乳 18 只金黄地鼠。具体生产繁育情况见表 2 和图 4。

表 1 第 3 次剖宫产手术 ICR 母鼠代乳情况

Table 1 Third caesarean section operation ICR female mice lactation

供胎母鼠 Donor mice	剖得仔鼠只数 Number of pups been collected	代乳时间 Lactation time	代乳母鼠 Fostermothers	给予代乳只数 Number of pups been fostered	离乳只数 Survival number of weaning pups	离乳率/% Survival rate of weaning pups
金黄地鼠 Golden hamster	18	1~5 d	ICR 小鼠 ICR mice	16	/	/
		6~21 d	SD 大鼠 SD rats	15	12	66

表 2 无菌金黄地鼠繁殖情况

Table 2 Reproduction of sterile golden hamster

孕鼠编号 Pregnant rat number	1	2	3	4	5
产仔只数 Number of litters	9	7	8	3	0
2 周龄时仔鼠剩余只数 Number of piglets remaining at 2 weeks of age	3	7	8	3	/
成功乳鼠只数 Number of successful milk separations	0	7	8	3	/



图 2 不同日龄无菌金黄地鼠

Figure 2 Germ-free golden hamsters of different ages



图 3 无菌金黄地鼠的盲肠

Figure 3 Cecum of sterile golden hamsters

2.2 金黄地鼠无菌状态维持及检测

本实验共成功离乳金黄地鼠 12 只, 7 雌 5 雄。

采集金黄地鼠粪便样本按照 GB/T 14926.41-2001 进行无菌状态检测。检测结果合格(图 5)。



图 4 无菌金黄地鼠哺乳情况

Figure 4 Nursing status of sterile golden hamster



图 5 金黄地鼠无菌状态检测报告

Figure 5 Detection report of sterility status of golden hamster

3 讨论

卢领群等^[18]和潘思丹等^[19]分别在长爪沙鼠和布氏田鼠的异种代乳净化的研究中提到,代乳母鼠分娩后1 d时,是投入供体乳鼠进行代乳的最佳时间。与之不同的是在进行金黄地鼠净化时,刚刚出生的金黄地鼠乳鼠和ICR乳鼠之间,存在种间差异,ICR乳鼠体重1.5 g左右,金黄地鼠乳鼠体重2~3 g左右。需要ICR代乳母鼠提前分娩,缩小两种乳鼠间的体格差异。此外,小鼠妊娠期为19~21 d,大鼠妊娠期为19~23 d,金黄地鼠妊娠期为15~17 d^[20],故ICR代乳母鼠和SD代乳母鼠的合笼时间

需要较金黄地鼠提前1周,确保ICR代乳母鼠在剖宫产手术前3~5 d分娩。SD代乳母鼠在金黄地鼠乳鼠6日龄时分娩1~2 d,做好代乳准备。

本次实验一共进行了3次剖宫产净化,第1次剖宫产净化失败的原因可能是由于刚刚出生的金黄地鼠乳鼠体重2~3 g左右,ICR乳鼠体重1.5 g左右,已经存在较大体格差异。金黄地鼠乳鼠出生后生长发育速度也快于ICR乳鼠,5日龄后金黄地鼠乳鼠个体明显长大,ICR代乳母鼠不能满足其哺乳需求,导致从第6天开始ICR代乳母鼠拒绝代乳或将乳鼠咬死,净化失败。

根据第1次的经验,同时参考柏熊等^[21]在东方

田鼠的异种代乳净化中的经验,第 2 次剖宫产净化时将金黄地鼠乳鼠代乳分 2 个阶段进行:1~5 日龄,乳鼠吮吸力弱,乳汁需求量少,由 ICR 母鼠代乳;6~21 日龄,乳鼠逐渐长大,乳汁需求量大,由 SD 母鼠进行代乳。第 2 次剖宫产净化失败的原因可能是由于 ICR 小鼠、SD 大鼠和金黄地鼠因为妊娠期的不同,合笼时间安排不够精确,金黄地鼠已满 6 日龄而 SD 代乳母鼠正在分娩或刚刚分娩,SD 母鼠没有提前分娩做好代乳准备,拒绝代乳,净化失败。

总结前面两次净化失败的经验,第 3 次剖宫产净化时,增加了动物数量,精确计算 ICR 小鼠、SD 大鼠和金黄地鼠妊娠期,优化合笼时间,使金黄地鼠满 6 日龄时 SD 代乳母鼠处于分娩后 1~2 d 的最佳代乳时期,有效提高了异种代乳的离乳率。根据金黄地鼠生物学特性,金黄地鼠仔鼠在 12 日龄时可爬出窝外觅食,14 日龄睁眼,一边觅食一边靠母鼠乳汁哺育至离乳。在金黄地鼠乳鼠 14 日龄睁眼后,随时观察代乳情况,如被代乳金黄地鼠与 SD 亲仔体型差异过大发生拒绝哺乳现象,可提前将其与 SD 代乳母鼠分开,人工饲喂软料至离乳。第 3 次剖宫产代乳净化成功。

本次实验通过剖宫产净化技术,使用无菌 ICR 小鼠和无菌 SD 大鼠进行代乳,成功离乳金黄地鼠 12 只,7 雌 5 雄。无菌动物最显著的特点就是盲肠巨大,解剖时可见无菌金黄地鼠盲肠巨大,符合无菌动物的生物学特性。其原因可能是由于缺乏肠道微生物的刺激,影响其代谢活动,使其肠腔渗透压不平衡,导致盲肠增大^[22-23]。F₁ 代无菌金黄地鼠具有繁殖能力,但每窝产仔数少,成功离乳率低,与文献报道相符^[15]。采集金黄地鼠粪便样本按照 GB/T 14926.41-2001 进行无菌状态检测,达到微生物净化目的,获得无菌化金黄地鼠模型。

参考文献:

[1] RASIKA S, FERNANDOIS D, PRÉVOT V. Sowing SARS-CoV-2 to reap neurodegeneration: a hamster study [J]. EBioMedicine, 2022, 80: 104071.

[2] UEMATSU T, TAKANO T, MATSUI H, et al. Prophylactic administration of ivermectin attenuates SARS-CoV-2 induced disease in a Syrian *Hamster Model* [J]. J Antibiot, 2023, 76 (8): 481-488.

[3] YUAN D, CHEN J, ZHAO Z, et al. Metabolomics analysis of visceral leishmaniasis based on urine of golden hamsters [J]. Parasit Vectors, 2023, 16(1): 304.

[4] 张华琼, 黄麟, 罗素兰, 等. 剖腹产建立 SPF 金黄地鼠种群

[J]. 四川动物, 2005, 24(1): 85-87.

ZHANG H Q, HUANG L, LUO S L, et al. Establishment of SPF golden *Hamster* colony by cesarean section [J]. Sichuan J Zool, 2005, 24(1): 85-87.

[5] DI VINCENZO F, DEL GAUDIO A, PETITO V, et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review [J]. Intern Emerg Med, 2024, 19(2): 275-293.

[6] SKOUFOU M, TSIGALOU C, VRADELIS S, et al. The networked interaction between probiotics and intestine in health and disease: a promising success story [J]. Microorganisms, 2024, 12(1): 194.

[7] 朱茜, 谭向, 武志峰, 等. 无菌动物在肠道微生物组学研究中的应用研究现状 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(5): 79-83.

ZHU Q, TAN X, WU Z F, et al. Application of germ-free animals in gut microbiome research [J]. Lab Anim Sci, 2022, 39(5): 79-83.

[8] JIA X, XU W, ZHANG L, et al. Impact of gut microbiota and microbiota-related metabolites on hyperlipidemia [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 634780.

[9] KAMAREDDINE L, NAJJAR H, SOHAIL M U, et al. The microbiota and gut-related disorders: insights from animal models [J]. Cells, 2020, 9(11): 2401.

[10] 郭亚茜, 杜晓鹏, 朱华. 金黄地鼠生物净化及其应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 676-682.

GUO Y Q, DU X P, ZHU H. Biological purification and application of golden hamster [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 676-682.

[11] AGHIGHI F, SALAMI M. What we need to know about the germ-free animal models [J]. AIMS Microbiol, 2024, 10(1): 107-147.

[12] DREMOVA O, MIMMLER M, PAESLACK N, et al. Sterility testing of germ-free mouse colonies [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1275109.

[13] BASIC M, BLEICH A. Gnotobiotics: Past, present and future [J]. Lab Anim, 2019, 53(3): 232-243.

[14] MOODY L V, MIYAMOTO Y, ANG J, et al. Evaluation of peroxides and chlorine oxides as disinfectants for chemical sterilization of gnotobiotic rodent isolators [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2019, 58(5): 558-568.

[15] 王荫槐, 王钊. 悉生动物学 [M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 2007.

WANG Y H, WANG J. Gnotobiology [M]. Shenyang: Liaoning University Publishing House, 2007.

[16] 胡秀兰, 陈均华, 胡政. 金黄地鼠剖腹产子宫摘取适宜条件的研究 [J]. 河南职工医学院学报, 2006, 18(6): 429-430.

HU X L, CHEN J H, HU Z. Study on the optimum conditions of Caesarean operation for golden *Hamster* [J]. J Henan Med Coll, 2006, 18(6): 429-430.

[17] 戴方伟, 卢领群, 金晓音, 等. 大鼠临产期判断方法的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(4): 233-235.

- DAI F W, LU L Q, JIN X Y, et al. Study on judgment of the confinement time in rats [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(4): 233-235.
- [18] 卢领群, 宋晓明, 戴方伟, 等. 长爪沙鼠的生物净化技术 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 62-66.
LU L Q, SONG X M, DAI F W, et al. Biological cleaning technologies for Mongolian gerbils [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(4): 62-66.
- [19] 潘思丹, 张曼, 施海霞, 等. 布氏田鼠剖腹产净化技术的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(3): 352-354.
PAN S D, ZHANG M, SHI H X, et al. Study on cesarean section purification method of Brandt's vole [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(3): 352-354.
- [20] CHANUT F J A, WILLIAMS A M. The Syrian golden *Hamster* estrous cycle; unique characteristics, visual guide to staging, and comparison with the rat [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(1): 43-50.
- [21] 柏熊, 王晓东, 谢建云, 等. 东方田鼠种群的生物净化方法 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(3): 215-217.
BAI X, WANG X D, XIE J Y, et al. Biological purification method of *Microtus fortis* population [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(3): 215-217.
- [22] WOSTMANN B, BRUCKNER-KARDOSS E. Development of cecal distention in germ-free baby rats [J]. Am J Physiol, 1959, 197: 1345-1346.
- [23] 陈力, 詹成, 王琳, 等. 无菌动物的生物学特性及其在人类疾病研究中的应用 [J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(3): 409-412.
CHEN L, ZHAN C, WANG L, et al. Biological characteristics of germ free animals and its application in the research on human diseases [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2015, 42(3): 409-412.

[收稿日期] 2024-04-08



《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R

国际刊号 ISSN 1671-7856

邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

陈芹,李建民,高芸,等. 基于教学培训相结合的医学动物实验规范化实践研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 94-98.
Chen Q, Li JM, Gao Y, et al. Reflections on and practical applications of combining teaching and training to promote the standardization of animal experiments for medical postgraduates [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 94-98.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.011

基于教学培训相结合的医学动物实验规范化 实践研究

陈芹,李建民,高芸,邱晨*

(南京医科大学 医药实验动物中心 模式动物重点实验室,南京 211166)

【摘要】 研究生是高校开展动物实验的主体。但医学研究生专业课程中缺少实验动物专业技能知识与管理规范教育的相关内容,导致违规开展动物实验的情况时有发生,给医学研究带来极大的生物安全隐患。为了进一步保证动物实验质量、提高研究生科研能力与素质,本文结合实践,提出医学研究生实验动物学课程联合培训的创新教学模式,根据科研需求进行教学内容改革,完善教学方法,并对教学-培训模式的意义进行分析探讨。以期为强化研究生规范动物实验意识、提高其科研素养提出新的思路,也为国内医学研究生动物实验规范化教育提供参考。

【关键词】 培训;医学研究生;动物实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0094-05

Reflections on and practical applications of combining teaching and training to promote the standardization of animal experiments for medical postgraduates

CHEN Qin, LI Jianmin, GAO Yun, QIU Chen*

(Animal Experimental Center of Medicine and Pharmacy, Key Laboratory of Model Animal, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

【Abstract】 Graduate students are the main practitioners of animal experiments in universities. However, a lack of professional skills and management standards for education on laboratory animals in medical graduate student courses has led to frequent violations of animal experimental guidelines and poses a significant biosafety risks. To ensure the quality of animal experiments and improve the research quality and skills of graduate students, with reference to current practices, this article proposes an innovative teaching model combining a Laboratory Animal Science course with training for medical graduate students. We suggest reforms to teaching content according to scientific research needs, recommend improvements in teaching method, and analyze the significance of the teaching-training model. Our review was written to propose new ideas for strengthening graduate students' awareness of animal experiment standardization and improve their scientific research literacy, as well as provide a reference for animal experiment standardization for educators of domestic medical students.

【Keywords】 training; medical graduate student; animal experiment

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

【基金项目】 南京医科大学教育教学改革项目(2023YJS-LX038)。

【作者简介】 陈芹(1979—),女,助理研究员,博士,研究方向:动物疾病模型。E-mail:chenqin@njmu.edu.cn

【通信作者】 邱晨(1987—),女,副教授,博士,研究方向:代谢性疾病。E-mail:chenqiu@njmu.edu.cn

实验动物作为生命科学和医学体内研究的重要工具,对生命科学和医学相关学科的基础性支撑作用愈加凸显,在探索人类发病机制、获取防病治病手段以及进行新药研发等方面发挥了重要作用^[1]。作为开展动物实验的主体,研究生是高校科研队伍的重要力量和医学研究的主力军。加强研究生实验动物基本知识与技能的教育,是保证动物实验质量、提高研究生科研能力与素质、提升科学研究水平所必需。据不完全统计,本校超过 90% 研究生需要以实验动物作为研究对象开展研究课题。然而,研究生在利用实验动物开展研究时,对实验动物的生物安全不够重视,导致高校内生物安全事件时有发生^[2],其主要原因是医学研究生专业课程中缺少实验动物专业技能知识与法律法规教育的相关内容。这部分内容仅仅依赖传统的课程教学是无法完全覆盖的,必须通过专业的技能培训来实现。培训教育作为提高人员素质最有效的途径和手段之一,对促进人才培养起到极大的推动作用^[3]。加强实验动物相关政策法规及技术标准的宣贯及相关专业技术的培训,树立实验动物从业人员的正确认知和意识,从而确保其规范完成科研工作^[4]。如何将专业培训与研究生《实验动物学》课程教学相结合,以期提高研究生科研能力与素质,是值得深思的重要问题。

1 创新“1”+“N”教学培训模式

江苏省一直实行实验动物管理法制化与规范化。《江苏省实验动物管理办法》明确规定,从事实验动物工作的单位,应当组织从业人员进行专业培训和等级考核,使其达到岗位要求,并组织实验动物专业技术人员参加实验动物学及相关专业的继续教育^[5]。根据以上规定,笔者所在单位南京医科大学医药实验动物中心的实验动物设施实行准入制度,即进入动物设施的实验人员必须具备“双证”即《动物中心准入证》(校证)和《江苏省培训记录卡》(省证)。实验人员只有进行相应的培训和考核后,才能开展动物实验。医学研究生因为课题研究需要,绝大多数要开展动物实验,是培训需求的主体。因此,我们探索性地将课程教学和动物实验资质培训进行有机地整合,并针对我校实际情况,根据面向不同研究生对象,建立“1”+“N”两种教学培训模式。

医学实验动物学作为我校研究生的专业必修

课、临床等专业研究生与在职博士生的选修课,越来越受到师生们的重视,选课学生人数逐年增加,近两年选课人数分别达到 871 人(2022 学年)、1073 人(2023 学年)。针对选课研究生教学,我们推行“1”模式:即开设一门《医学实验动物学》课程,学生系统性完成该课程学习后参加“双证”考试,合格者可获得“双证”。系统的课程学习与考核体系是实现“一课双证”的重要保障。目前,本校研究生医学实验动物学课程共 32 学时,其中包括介绍实验动物的基本概念与动物实验操作技术 16 学时,以及 16 学时的规范化培训内容,涉及实验动物伦理申请书的填写细则、实验动物繁殖和操作技术、进动物申请规范操作、屏障设施规范操作等 4 个模块。完成课程学习后,学生进行线下闭卷考试和线上考试两部分组成的课程考核。线下闭卷考试合格者可获得由本校实验动物中心培训部颁发的校证;此外,每学期组织学生统一参加由江苏省实验动物管理委员会办公室主办(下文简称动管办)的线上考试,合格者可获得由动管办颁发的省证。“双证”是作为校内开展动物实验相关工作的基本指标。同时,我们在研究生(包括硕士生与博士生)中做到实验动物学课程全覆盖,把实验动物课程学分与“一课双证”相结合,使研究生通过课程学习,意识到动物实验生物安全和规范操作的重要性和必要性。

此外,部分研究生、本科生、青年教师和附院医生等研究实验人员也需要开展动物实验。针对这部分人员,我们推行“N”模式:这些散在的、陆续计划开展动物实验的相关人员通过邮件进行培训报名,在人数达到一定数量(N)时,即进行专场准入证培训与考核,以充分满足学校、附院及乃至周边院校开展动物实验、获取相关从业资质的需求。培训后考试合格即可获得动物中心设施准入资格。目前,笔者所在教研室已经形成完整的准入证培训体系,每年定期开展 5~6 期的培训。

通过“1”模式对研究生进行统一教学,将教学课程和准入培训进行有机整合(一课双证);通过“N”模式作为必要的补充,满足全校教学、科研人员开展动物实验的需求。通过有机地将两种途径进行整合,利用“1”+“N”新型教学培训模式达到对所有动物实验从业人员“凡进入者必培训考核”的全覆盖。

2 探索教学内容改革,针对科研需求安排教学重点

在教学改革持续推进的背景下,调整实验动物

学成为大势所趋^[6]。尽管很多高校开设了实验动物学课程,但理论多与实践脱节。例如,本中心所在高校为医学院校,学生进行动物实验的目的多为进行肿瘤、免疫、代谢等疾病研究。主要的实验动物为多种基因编辑小鼠和大鼠,且涉及到种类繁多的小动物常规操作,而大动物实验需求相对较少。鉴于该现状,有必要在加强实验动物科学的理论教育过程中,探索教学内容的改革并强化动物实验操作技能的培训,切实做到“学而有用”“学而能用”。因此,我们对研究生实验动物学课程教学内容进行了如下调整。

将实验动物中心准入证培训纳入研究生课程(一课双证),并切合研究生开展动物实验的需求,将培训与常规教学内容有机整合。例如,在授课时,先介绍实验动物福利与伦理,之后讲解实验动物伦理申请书如何填写,先理论后实践,从而加强培训与课程的联系;此外,课程中介绍实验动物环境与设施的章节可以与屏障设施的规范操作流程相结合,使学生不仅了解什么是实验动物环境与设施,并且知道如何规范使用设施开展动物实验。

医学院校大部分研究生需要利用实验动物进行教学和科学实验研究,尤其是对科学研究中常用的小鼠、大鼠等实验动物进行实验操作^[7]。鉴于医学研究生主要开展大、小鼠实验,在教学中我们适当减少实验动物理论与大动物的知识点,重点介绍大小鼠的繁育、生理特点;增加动物实验操作方法培训,如麻醉、尾静脉注射、血液采集等动物实验基本技术规范操作。

医学实验动物以模式动物为主,着眼于基因编辑动物、免疫缺陷动物。其中,基因敲除鼠模型是研究基因功能和动物表型的有力工具,随着基因工程的不断进步,CRISPR/Cas9 技术的出现与成熟,基因敲除小鼠可在较短时间内构建成功,为研究人员提供了很大的便利条件^[8]。因此,课程结合科研项目实例,深入介绍基因编辑动物模型的构建方法、配繁策略以及免疫缺陷动物建模等实际应用。

在推进教学内容改革以来,本校科研活动蓬勃开展,重量级研究论文陆续发表,说明此项改革是切实有效的,能够有效推进动物实验的顺利开展,为研究人员获得有价值的研究数据提供助力。

3 改进教学方法,丰富教学手段,多途径强化规范动物实验意识

理论课程和培训课程教学主要以传统的教师

讲授课堂模式进行,越来越多的事实说明这种“灌输式”教学模式无益于提高教学效果^[9]。由于大量内容的被动输入,容易造成学生疲劳,无法激发学习兴趣及热情,学习效果不明显^[10]。在整合研究生课程与培训内容的时候,我们对教学方法进行了改进,结合丰富的教学手段,强化研究生规范开展动物实验的意识。

笔者所在的医药实验动物中心,目前拥有 4378 平方米的 10 个独立屏障环境动物实验饲养设施和约 200 平方米的动物实验设施,并配备动物影像、病理检查、生理行为学检测等多个动物实验设备和平台,为进行教学提供了良好的硬件支持。例如,在学习“实验动物环境与设施”这一章节时,可以现场参观并介绍屏障环境实验室各个环境指标的控制与检测,物流、人流和动物物流的标准操作规程,增加学生对实验动物设施的客观认识。

其次,将现场培训的实践内容改为首次进入设施的带教。在准入证培训体系建立初期,除了常规的理论教学,还进行 20 人次的小班模拟教学。在模拟屏障设施的场地,由专业教师示范人员进出设施的具体操作和注意事项。然而,在实施过程中,我们发现这种模拟教学的方式存在诸多问题。每一期的培训往往需要多次小班授课,整个培训过程需要重复消耗一定数量的物资,且占用大量培训教师的工作时间,而且教学效果见效甚微。因此,我们将现场培训模拟教学改为首次进入设施的带教。即通过培训考核后,首次申请进入设施时,由管理人员进行一对一的现场带教。教学效果更好、效率更高。

再者,积极建立网络教育培训平台,尝试由现场授课模式向网络化自主培训的转型。目前,我们对研究生的教学培训工作以线下方式开展,效率低且过于机械化。因此,笔者所在教研室已经开始进行网络教学资源建设,努力实现在线培训教学视频资源的共享。目前,系统还在建设与完善中,预期将达到准入证培训实施全线上自主报名、培训与考核的目标,为研究生提供网络培训学习的资源,并获得线上培训证书,进行高效率的教育培训。

此外,通过组织研究生社团活动,以寓教于乐的方式提高规范动物实验的意识。科研和实验人员对实验动物福利伦理的观念不够、意识淡薄,是我国实验动物伦理福利工作中普遍存在的问题^[11]。为此,教研室依托医药实验动物中心于 2019 年建立

了学校首个研究生社团——动物伦理福利保护“科爱”社,旨在提高全校师生实验动物伦理福利意识,纪念为人类健康科研牺牲生命的实验动物。社团建立以来已经成功举办了多次活动,包括“动物友善实验室”标语大赛、“发现可爱的实验动物”艺术作品征集等。通过由研究生主办、研究生参加的社团活动,有效地向科研工作者宣传科学、规范和人道使用实验动物的理念,让本校师生树立关心爱护实验动物的伦理意识,怀感恩和敬畏之心,在利用实验动物的同时,尊重和善待实验动物。

4 开展研究生培训教育的意义

作为开展动物实验的主体,研究生是高校科研队伍的重要力量和医学研究的主力军。加强研究生实验动物基本知识 with 技能的教育,以培训强化动物实验管理制度,树立医学研究生动物实验规范化的责任意识,是保证动物实验质量、提高研究生科研能力与素质、提升科学研究水平所必需的。

4.1 排除潜在生物安全危害的重要保障

实验动物是高等医学、药学、农业院校和涉及生命科学的综合性大学等高校进行教学实验、科学研究的物质基础,是非常特殊的活的试剂、精密的仪器。动物实验对生物医学的发展具有举足轻重的作用,实验动物作为疾病模型和治疗新策略的受试者,为人类健康做出了巨大牺牲^[12]。高校实施动物实验的科研人员和学生来源复杂,专业背景差异大,动物实验水平参差不齐,实验动物使用计划性差;部分实验研究的科研人员和学生,由于缺乏对实验动物福利的科学认识,实验动物伦理意识淡薄,违规开展动物实验的情况时有发生,成为高校生物安全的主要隐患。通过培训教学与考核的过程,可以加强研究生的规范动物实验的意识,提高科研素质,有效减少动物实验过程中存在的生物安全隐患,为新医科建设保驾护航^[2]。

4.2 提高部门协作,加强与研究生沟通的重要渠道

培训与教学的结合是多部门共同协作的结果。目前,我们实施的准入证培训由教研室牵头、伦理质量保障办公室、饲养部多部门共同参与完成。由于研究生的人数较多,在培训组织与实施过程中,需要各部门多位人员共同参与具体的培训教学工作,涉及培训授课、考核阅卷等。各部门人员协作又能为培训教学体系的完善提供多角度建议,助益于完善培训制度,形成正向的闭环。此外,培训

教学也提供了与研究生沟通的有效渠道。通过与研究生的沟通交流,能进一步了解研究生的科研需求,从而推动完善动物实验的管理制度;从考核结果中发现研究生薄弱的知识点,加强培训教育以弥补短板。强化医学研究生实验动物相关知识的教学与培训,势必将有助于推进动物实验规范化进程,从源头上保障高校动物实验顺利开展。

4.3 辐射附属医院与周边高校,扩大影响力

我校动物中心具有独立、健全的饲养管理体系和饲养管理规范,动物实验科研平台资源丰富,既可以保证校内教学用实验动物的供应,满足科研用实验动物的需求,还为附院以及周边多所高校的科研提供多种形式的服务。同时,在读的医学研究生学位类型和教育类型多样化,通常包括全日制、非全日制、学术型、专业学位型、委托培养等。通过对研究生的专业培训不仅能促进本校的动物实验规范化,同时,对附属医院与周边高校的动物实验管理也起到很好的辐射与引领作用,形成更为广泛的地区影响力。

研究生教育承担着培养拔尖人才的社会责任,实验动物学是现代生命科学研究的基础学科^[12]。我们首次依靠课程教学提供实验动物相关知识,专业培训强化动物实验管理制度和规范,借助以教学联合培训的创新模式,综合提高医学研究生的知识储备、主体责任与科研素养,为高水平的医学科研成果提供土壤,为新医科建设提供助力,从源头上保障高校动物实验顺利开展,真正推动实验动物工作健康发展,带动实验动物学科良性发展。

参考文献:

- [1] 鞠吉雨,徐玉梅,耿云峰,等. 加强医学研究生实验动物福利教育的思考[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 94-97.
JU J Y, XU Y M, GENG Y F, et al. Improving education on the welfare of experimental animals among medical graduate students [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(10): 94-97.
- [2] 王芳,张景科,田永刚,等. 新医科背景下高校动物实验室安全隐患及管理机制探究[J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42(3): 93-95.
WANG F, ZHANG J K, TIAN Y G, et al. Potential safety hazard and management of animal laboratories in colleges and universities under the background of new medical science [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2023, 42(3): 93-95.
- [3] 林凯丽,刘梅轩,孙井江,等. 实验动物从业人员培训系统的建立与应用[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 119-122.

- LIN K L, LIU M X, SUN J J, et al. Establishment and application of the training system for laboratory animal employees [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(5): 119-122.
- [4] 王小晓. 医学研究中实验动物福利伦理审查现存问题之刍议 [EB/OL]. (2024-06-12). <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=n6BwBobH4uvrdPqgAX54JlZ-EflgPvuJWTCyc8rIBFvx7gqrsT1eHwWFLJZfEZc7jC9VahAwPMbNMLVp3F2uge7yp-DrWpfVOjJ5qotsddk1e4Bux-KieMwAB1ddevPmlAXjawz2cSkeg6K7Q8fRaJnMuiMDJOuB21NWmDvTQsQO8PaIcV64pWYxbAE5WaV4KGPimOH8pWfi4rsbRcR-RdS5XcHKOYH&uniplatform=NZKPT&language=CHS>.
- WANG X X. Consideration of the issues related to the ethical review of laboratory animal welfare in medical research [EB/OL]. (2024-06-12). <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=n6BwBobH4uvrdPqgAX54JlZ-EflgPvuJWTCyc8rIBFvx7gqrsT1eHwWFLJZfEZc7jC9VahAwPMbNMLVp3F2uge7yp-DrWpfVOjJ5qotsddk1e4Bux-KieMwAB1ddevPmlAXjawz2cSkeg6K7Q8fRaJnMuiMDJOuB21NWmDvTQsQO8PaIcV64pWYxbAE5WaV4KGPimOH8pWfi4rsbRcR-RdS5XcHKOYH&uniplatform=NZKPT&language=CHS>.
- [5] 陈林, 艾曼, 徐航, 等. 江苏省实验动物行政许可现状 [J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(4): 284-289.
- CHEN L, AI M, XU H, et al. Current status of administrative licensing for laboratory animals in Jiangsu Province [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(4): 284-289.
- [6] 朱立麒, 杨玲, 王怡, 等. 动物福利理念在实验动物学教学中的应用 [J]. *中国畜禽种业*, 2022, 18(7): 63-65.
- ZHU L L, YANG L, WANG Y, et al. Application of animal welfare concept in laboratory animal science teaching [J]. *Chin Liv Poultry Breed*, 2022, 18(7): 63-65.
- [7] 智妍, 杨红宇, 罗红, 等. 实验动物学实验课程教学改革初探 [J]. *医学动物防制*, 2021, 37(9): 877-879, 882.
- ZHI Y, YANG H Y, LUO H, et al. Initial exploration on innovation in experimental course of laboratory animal science [J]. *J Med Pest Control*, 2021, 37(9): 877-879, 882.
- [8] 李梦瑶, 高枫, 郑帆帆, 等. 应用基因修饰动物模型研究抑郁症进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1610-1616.
- LI M Y, GAO F, ZHENG F F, et al. Progress in depression research using genetically modified animal models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1610-1616.
- [9] 魏盛, 耿希文, 徐凯勇, 等. 基于互联网交互平台三明治教学法在医学实验动物学教学中的应用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(3): 266-270.
- WEI S, GENG X W, XU K Y, et al. Application of sandwich teaching method based on internet interactive platform in teaching of medical experimental zoology [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2021, 41(3): 266-270.
- [10] 孟寒, 张兆南, 杨子豪, 等. 基于“新三中心”的医学实验动物学教学模式创新 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(6): 90-94.
- MENG H, ZHANG Z N, YANG Z H, et al. Teaching method innovations in medical laboratory animal science under the “new three centers” education concept [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(6): 90-94.
- [11] 王贵平, 周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 683-689.
- WANG G P, ZHOU Z Y. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(5): 683-689.
- [12] 周正宇. 针对生物医学类研究生实验动物学教学的思考 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(6): 537-539.
- ZHOU Z Y. Reflections on laboratory animal science teaching for biomedical postgraduates [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(6): 537-539.

[收稿日期]2024-03-19

郭焕荣,王静,赵自刚,等.铁死亡及其在实验性急性肺损伤中的作用[J].中国比较医学杂志,2024,34(8):99-106.
Guo HR, Wang J, Zhao ZG, et al. Ferroptosis and its role during experimental acute lung injury [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 99-106.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.012

铁死亡及其在实验性急性肺损伤中的作用

郭焕荣¹,王静^{1,2},赵自刚^{1,3},牛春雨^{1,3*}

(1.河北北方学院基础医学院/微循环研究所,河北 张家口 075000;2.河北医科大学基础医学院,石家庄 050017;3.河北省急危重症发病机制及干预重点实验室,河北 张家口 075000)

【摘要】 作为一种非凋亡性细胞死亡方式,铁死亡的特征是铁依赖性脂质过氧化物积累引起的膜脂质过氧化、线粒体萎缩等,在形态和生化特性上与其他细胞程序性死亡不同。铁死亡受多种代谢通路调控,参与了失血性休克、缺血再灌注、脓毒症、放射等引起的急性肺损伤。本文综述了铁死亡的主要调控机制及其在多种动物模型急性肺损伤发病机制中的作用,以期防治急性肺损伤提供新的策略。

【关键词】 铁死亡;谷胱甘肽过氧化物酶4;脂质过氧化;急性肺损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0099-08

Ferroptosis and its role during experimental acute lung injury

GUO Huanrong¹, WANG Jing^{1,2}, ZHAO Zigang^{1,3}, NIU Chunyu^{1,3*}

(1. School of Basic Medical Sciences/Institute of Microcirculation, Hebei North College, Zhangjiakou 075000, China.
2. School of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017. 3. Hebei Key Laboratory of Acute and Critical Disease Pathogenesis and Intervention, Zhangjiakou 075000)

【Abstract】 Ferroptosis is a non-apoptotic mode of cell death characterized by iron-dependent lipid-peroxide-accumulation-induced membrane lipid peroxidation and mitochondrial atrophy. It differs from other programmed cell deaths in its morphological and biochemical properties. Ferroptosis is regulated by a variety of metabolic pathways that are involved in the acute lung injury induced by hemorrhagic shock, ischemia-reperfusion, sepsis, and radiation. This article reviews the main regulatory mechanisms of ferroptosis and its role in the pathogenesis of acute lung injury in various animal models with the aim of providing new strategies for the prevention and treatment of acute lung injury.

【Keywords】 ferroptosis; glutathione peroxidase 4; lipid peroxidation; acute lung injury

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

2012年,Dixon等^[1]认识到一种新型细胞死亡方式——铁死亡,特征是铁依赖性脂质过氧化,受细胞内信号通路的严密调节,与许多疾病的发生发展有关。急性肺损伤(acute lung injury,ALI)发病率和死亡率较高,发病机制与炎症反应失控、氧化应激、细胞凋亡和缺氧有关。在ALI发生过程中,致病

因素导致活性氧(reactive oxygen species,ROS)累积和蛋白酶释放,增加肺通透性,引起肺水肿与呼吸窘迫;鉴于铁死亡与脂质过氧化化的关系,提示铁死亡参与了ALI的发生发展^[2],但详细机制仍不完全清楚。因此,深入研究铁死亡在ALI中的作用与机制,明晰二者关系,对于治疗ALI有积极意义。本文

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82270524)。

【作者简介】 郭焕荣(1998—),女,硕士研究生,研究方向:急危重症的病理生理学研究。E-mail:2213607342@qq.com

【通信作者】 牛春雨(1967—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:急危重症的病理生理学研究。E-mail:ncylxf@126.com

综述近年来铁死亡及其在失血性休克 (hemorrhagic shock, HS)、缺血再灌注 (ischemic reperfusion, I/R) 损伤、脓毒症等急危重症引起 ALI 中的作用与部分机制, 以期防治 ALI 提供新的视角。

1 铁死亡

1.1 铁死亡的发现和提出

铁死亡相关关键膜蛋白系统 Xc⁻ (cystine/glutamate antiporter system, System Xc⁻) 早在 20 世纪 80 年代就已经发现; 2003 年 Dolma 等^[3] 从 23 550 种化合物中筛选出对 Ras 基因突变细胞具有致命作用的新分子 erastin, 用荧光显微镜监测 erastin 处理的致瘤细胞的细胞核, 发现没有出现凋亡的典型核变和染色质边缘化, 由此推测 erastin 诱导的细胞死亡是非凋亡的, 此外还观察到 erastin 的致死作用一旦出现, 是迅速且不可逆的。2008 年, Yang 等^[4] 鉴定合成了对 Ras 突变肿瘤细胞具有一定程度致死性的两种新型化合物, 并将其命名为 Ras 选择性致死小分子 (Ras-selective lethal small molecule, RSL) 3 和 RSL5, 发现二者诱导的细胞死亡不能被半胱天冬酶抑制剂阻止, 却可以被铁螯合剂甲磺酸去铁胺 (deferoxamine mesylate, DFOM) 和抗氧化剂维生素 E 抑制。在此基础上, Dixon 等^[1] 观察到用 erastin 处理的 Ras 突变肿瘤细胞唯一特征是涉及到线粒体的缩小和膜密度增加, 与铁代谢的异常及脂质过氧化的累积密切相关; 随后的研究认识到这是一种铁依赖的、非凋亡类型的细胞死亡方式, 并将这种死亡方式正式命名为“铁死亡”。2015 年 Dixon 等^[5] 筛选出酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)、溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 与铁死亡的发生密切相关, 前者与多不饱和脂肪酸合成有关, 后者与脂质重塑相关。

1.2 铁死亡的特点

铁死亡特征是细胞内脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO) 积累和氧化还原失衡, 与凋亡、自噬、坏死性凋亡等非坏死性细胞死亡方式类型在形态学、遗传学和生物化学等方面有较大差异。铁死亡的形态学主要特征是细胞膜与线粒体的形态学异常; 细胞膜异常以断裂和出泡为主, 线粒体异常以膜密度增加、嵴数量减少或消失为主, 细胞核形态变化不明显; 生化特点表现为 ROS 和铁离子积

累、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 激活、半胱氨酸摄取和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 等介质的释放^[6]; 分子层面表现为环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, Cox2)、ACSL4、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 1 表达上调, 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、铁蛋白表达下调。最新研究结果鉴定出重组过氧化还原酶 3 (recombinant peroxiredoxin 3, PRDX3) 通过抑制胱氨酸摄取刺激铁死亡, 特异性存在于铁死亡细胞中, 故将高氧化的 PRDX3 作为标记物来识别体内/体外的铁死亡细胞; 铁死亡发生时, PRDX3 水平上调^[7]。

1.3 铁死亡的发生机制

1.3.1 铁代谢与铁死亡

铁是 LPO 积累和铁死亡发生所必需的。铁代谢主要包括铁转移和储存, 机体通过复杂的调控网络维持铁摄入、存储和流出的动态平衡^[8]。为了维持细胞铁水平并避免过量的 Fe²⁺ 蓄积, 转运和储存蛋白受到严格调节。循环 Fe³⁺ 通过转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor, TFR1) 导入细胞, 在还原酶作用下还原为 Fe²⁺; Fe²⁺ 通过二价金属离子转运体 1 介导, 从核内体进入细胞质, 分散在不稳定的铁池 (labile iron pool, LIP); 多余的 Fe²⁺ 被位于细胞膜的铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) 转运到细胞外, 以此保持细胞铁稳态。由于铁是各种代谢酶的辅助因子, 故少量 Fe²⁺ 用于维持生理条件下的新陈代谢; 又由于铁还具有氧化还原性, 故细胞内过量的 Fe²⁺ 通过芬顿反应或铁依赖性氧化酶, 促进 ROS 产生和累积, 导致细胞发生氧化应激损伤, 最终引起铁死亡。血液循环中, Fe²⁺ 与 FPN 结合, 形成转铁蛋白结合铁 (transferrin bound iron, TBI); 此外, 还有少量铁不与 FPN 结合, 即非转铁蛋白结合铁 (non-transferrin bound iron, NTBI)。病理情况下, NTBI 增多被认为也会诱导氧化自由基产生并有细胞毒性作用, 从而间接导致铁死亡^[9]。

铁调节途径通过多种机制增加细胞中不稳定的铁, 引起铁死亡。正常情况下, 体内和细胞中的铁水平高低, 影响着铁调节蛋白 (iron regulatory protein, IRP) 与靶基因 mRNA 上的铁反应元件 (iron responsive element, IRE) 的结合, 进而通过调控铁代

谢相关基因表达,维持铁稳态。在正常细胞中,IRP1 活性由 Fe-S 簇控制,当细胞铁含量低时,IRP1 不与 Fe-S 簇结合,而通过与多种 mRNA 分子结合并改变相应蛋白质的合成来增加细胞铁含量;当细胞铁含量高时,二者结合,抑制 IRP1 与 mRNA 结合来降低铁浓度。然而,由于 Fe-S 簇极易受到过氧化物的影响,过氧化物消耗 Fe-S 簇,IRP1 仍然会促进细胞铁的增加^[10]。可见,铁代谢稳态调节也是调控铁死亡的潜在靶点。

1.3.2 脂质代谢与铁死亡

多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 作为细胞膜的组成部分,可调节多种生物功能。但由于有较弱的 C-H 键存在于双烯丙基位置,导致 PUFA 易被氧化,故细胞膜上的 PUFA 易成为脂质过氧化损伤的主要结构^[11]。普遍认为,PUFA 双烯丙基位置的过氧化是促进铁死亡发生的关键环节^[12]。由于 PUFA 是脂质过氧化过程中的底物,故其多少含量与所处位置与内脂质过氧化程度密切相关。ACSL4 激活后,在 LPCAT3 参与下,游离 PUFA 与膜磷脂结合形成 PUFA-PE^[13],PUFA-PE 在脂氧合酶介导的酶促反应下,形成 LPO^[12]。此外,补充 AA 或其他形式的 PUFA,也会使大量 PUFA 氧化和脂肪酸自由基的产生,当 LPO 累积超过阈值就会引起质膜损伤,导致铁死亡。

1.3.3 氨基酸代谢与铁死亡

细胞膜的胱氨酸/谷氨酸逆向转运体系 Xc-,以 1:1 的比例使胱氨酸逆向转运至细胞内,并将谷氨酸排出细胞^[14]。系统 Xc-亦可将胱氨酸还原为半胱氨酸,后者参与 GSH 合成,GPX4 使 GSH 催化 LPO 还原成无毒的相应的醇。GPX4 是一种多功能蛋白,与谷胱甘肽过氧化物酶家族 (GPXs) 其他成员相比,缺乏二聚化界面,以单体形式存在。以自由形式或与磷脂、脂蛋白复合的形式还原过氧化脂质,从而降低脂质过氧化^[11]。GSH 是 GPX4 发挥作用的必要辅助因子,通过抑制系统 Xc- (例如调控 SLC7A11 的表达) 阻碍 GSH 的吸收,导致 GPX4 活性降低,细胞抗过氧化能力降低,脂质活性氧堆积,引起细胞的氧化性死亡,触发铁死亡。

1.3.4 与铁死亡发生相关信号分子的作用

除前述铁代谢、脂质代谢、氨基酸代谢参与铁死亡的发生外,铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)、p53、核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2,

Nrf2) 等信号分子在不同程度上通过调节相关代谢进程,参与了铁死亡的发生机制。

FSP1 位于细胞质膜上,通过其 N 端肉豆蔻酰化基序发挥抗铁死亡作用。豆蔻酰化的 FSP1 可以发挥氧化还原酶的作用,通过使用消耗 NADPH 的还原反应将辅酶 Q (coenzyme Q, CoQ) 10 还原为 CoQH2,CoQ 的还原形式能够捕获脂质过氧化自由基并阻止 LPO 的扩散或通过维生素 E 间接抑制后续铁死亡^[15]。此外,FSP1 通过降低 CoQ10 促进亲脂性自由基捕获抗氧化剂 (radical trapping antioxidant,RTA) 生成,RTA 发挥抗氧化作用从而有效阻止 LPO 过量累积,抑制铁死亡发生。随后发现,似乎 GPX4 和 FSP1 至少在某种程度上都与甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 途径相交:异戊烯基二磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 稳定了硒代半胱氨酸特异性 tRNA,这是合成包括 GPX4 在内的硒酶所必需的,并且 CoQ10 作为 MVA 途径的最终代谢物之一,也是 FSP1 的主要底物。因此通过抑制 MVA 途径降低 IPP 水平,可以阻碍硒代半胱氨酸 tRNA 成熟,进一步抑制 GPX4 合成和 FSP1 的抗铁死亡作用,引起铁死亡^[16]。可见,FSP1 参与铁死亡的机制与调节脂质代谢、氨基酸代谢有关。

作为一种人类肿瘤抑制基因,p53 通过对多种蛋白的转录调控或相互作用,影响氨基酸代谢、脂质代谢和 ROS 等多种代谢途径,诱导肿瘤细胞铁死亡,抑制肿瘤细胞的生长增殖,发挥抗肿瘤作用^[17]。①p53 通过氨基酸代谢途径调控癌细胞铁死亡:p53 通过抑制 SLC7A11 阻断上游胱氨酸的摄取,导致细胞内半胱氨酸合成减少,使下游 GSH 合成减少,诱导癌细胞的 GSH 耗竭和铁死亡,从而抑制肿瘤生长^[18]。同时,谷氨酰胺酶 2 (glutamatase 2, GLS2) 参与谷氨酰胺分解的第一步,将谷氨酰胺转化为 GSH 的组成成分谷氨酸,谷氨酸通过三羧酸循环参与线粒体生物能量的调节^[19],p53 与 GLS2 基因的启动子区域的功能性 p53-DNA 结合元件相结合,增强线粒体呼吸功能,促进 ATP 产生,催化谷氨酸的大规模生产,抑制系统 Xc 活性,并通过阻断上游胱氨酸摄取来诱导癌细胞铁死亡^[20]。②p53 通过脂质代谢途径调控铁死亡:p53 以激活亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1 (多胺分解代谢的限速酶) 的方式增加 AA-15-脂加氧酶的活性和表达水平,提高 LPO 水平,进而诱导癌细胞铁死亡^[21]。

生理状态下,Nrf2 与 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1

(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 结合; 当氧化应激导致细胞氧化还原失衡时, Nrf2 与 Keap1 解离, 并转移到细胞核中与抗氧化反应元件结合, 促进靶基因转录以及抗氧化和抗炎蛋白翻译, 从而保护细胞^[22]。与铁代谢和脂质过氧化相关的多个基因都受到 Nrf2 的转录调控, 故通过阻断 Nrf2 降解, 增加 Nrf2 水平可以促进靶基因 GPX4、谷胱氨酸-半胱氨酸连接酶、SLC7A11 转录, 抑制细胞铁死亡。除了 GPX4 和 SLC7A11 外, FPN 以及细胞质中关键的铁储存蛋白也受 Nrf2 控制^[23-24]。因此, 通过对 Nrf2 通路的药理学调控, 靶向铁死亡上游调控因子是治疗铁死亡相关疾病的最佳途径之一。

综上所述, 铁代谢、脂质代谢、氨基酸代谢失衡以及 FSP1、p53、Nrf2 等信号分子对这些代谢途径的调节, 参与了铁死亡的发生(图 1)。靶向引起铁死亡各环节的治疗措施, 有利于减轻铁死亡及其引起的细胞死亡。

2 铁死亡与急性肺损伤

生理状态下, 巨噬细胞的吞噬作用、转铁蛋白、呼吸道上皮表面的抗氧化分子和呼吸道纤毛排痰系统来维持肺的铁稳态。任何致病因素, 一旦破坏了铁稳态, 肺就会发生氧化应激损伤, 引起铁死亡。

近年来, 铁死亡在 HS、I/R 损伤、脓毒症等急危重症引起 ALI 中的作用受到关注。

2.1 HS 引起的 ALI

HS 后, 黄嘌呤氧化物生成增加, 儿茶酚胺氧化能力增强, 产生大量 ROS, 打破了自由基代谢平衡状态^[25]。一般来说, 缺氧/缺血和线粒体功能抑制有关, Duan 等^[26]研究发现 HS 后肠上皮线粒体动力相关蛋白(dynamin-related protein 1, Drp1)被激活, 出现了明显的线粒体易位, 活化的 Drp1 可能通过抑制醌生物合成来破坏线粒体呼吸链, 抑制线粒体谷胱氨酸-谷胱甘肽代谢, 或阻断其他一些非线粒体依赖途径, 比如酪氨酸-多巴胺代谢和维生素 E 依赖途径, 导致 ROS 过度积累。进一步探究发现 Drp1 诱导的 ROS 积累参与了休克后肠道微生物组成和肠道屏障功能的调节。休克后肠道菌群失调及含有肠源性炎性介质和有毒代谢产物的肠系膜淋巴液回流到体循环, 是引起全身炎症反应失控和诱发 HS 肺损伤的关键因素^[27]。Nrf2 作为体内重要的抗炎和抗氧化因子, 萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是 Nrf2 途径的有效激活剂, Liang 等^[25]基于小鼠 HS 模型, 发现 SFN 通过下调 Nrf2 途径激活的肺组织多种促炎细胞因子从而发挥抗炎作用, 可显著提高肺组织干湿比, 减少肺中性粒细胞浸润和降低髓过氧

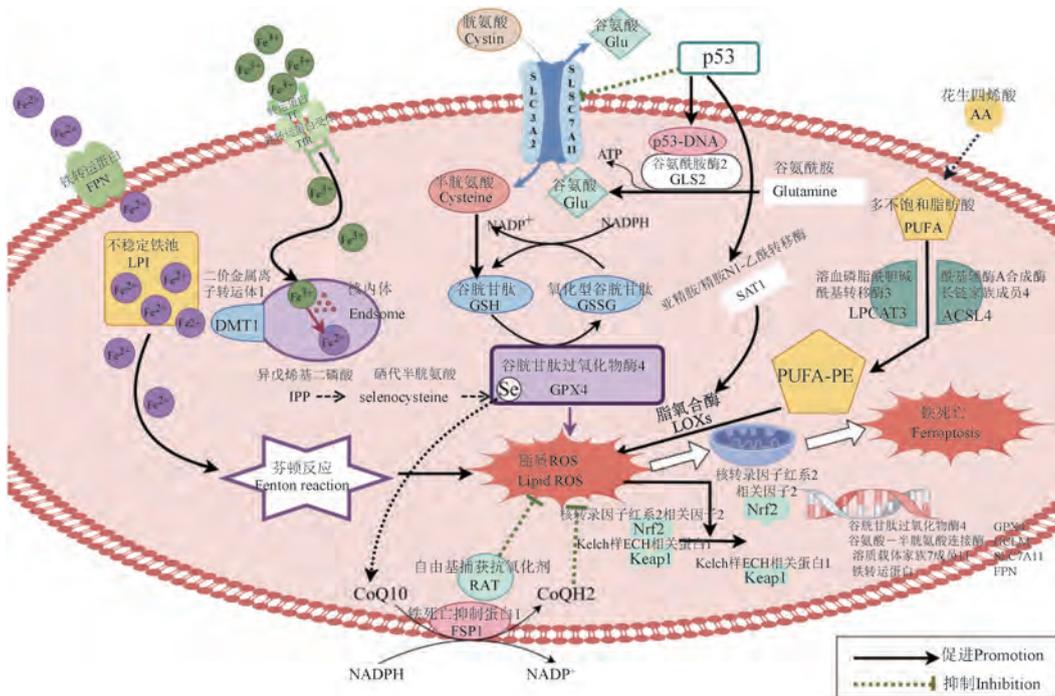


图 1 铁死亡的发生机制
Figure 1 Mechanisms of ferroptosis

化物酶水平,缓解 ALI,而 Nrf2 作为铁死亡过程中的关键调节因子,也可通过调节脂质过氧化相关基因来缓解肺损伤,因此,铁死亡可能间接参与 HS 肺损伤的发生发展。此外,Wang 等^[28]通过生物信息学分析鉴定了 ALI 中与铁死亡相关的关键基因,并证实 HS 小鼠肺组织铁死亡相关分子 GPX4、ACSL4 和 SLC7A11 出现显著变化。这些结果进一步证实了 HS 后肺损伤与铁死亡的相关性,但更多的证据仍需进一步探索。

2.2 I/R 引起的 ALI

肺 I/R 损伤是一类具有高致死率的无细菌性肺部损害疾病,尽管现在手术管理和免疫抑制取得了很大的进步,但是在肺移植、心肺复苏、体外循环和肺栓塞等情况下还是会时常发生。肺 I/R 本质上是一种快速而复杂的炎症反应,包括内皮和上皮损伤/功能障碍,炎症细胞、炎性因子和 DAMPs 的释放以及 ROS 等因素作用下造成的不可逆肺组织损伤^[29]。在肺 I/R 的过程中,ACSL4 表达和丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量显著增加,铁死亡保护蛋白 GPX4 表达随时间依赖性降低,且 I/R 导致总 GSH、PaO₂ 显著降低;铁死亡抑制剂利普司他丁-1(liproxstatin-1,Lip-1)预处理,降低了 MDA 和炎性因子水平,消除了肺 I/R 损伤对气体交换的影响,缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R)处理的肺上皮细胞乳酸脱氢酶活性升高、细胞活力下降,敲除 ACSL4 基因恢复细胞活力,有效减少细胞脂质 ROS 积累,降低细胞对 H/R 的敏感性^[30]。也有研究发现,铁死亡发生于再灌注期,随着再灌注时间延长,ACSL4、铁和 MDA 水平逐渐升高,GPX4 水平降低,但随着缺血期延长,并未发现铁死亡指数的显著变化,说明铁死亡的发生与缺血时间有关^[31]。

铁死亡除参与肺 I/R 损伤外,亦在远离肺的组织损伤,譬如腹部损伤、感染和手术诱导肠 I/R 引起 ALI 中发挥作用^[32]。在肠 I/R 诱导 ALI 的小鼠铁死亡增加,并且随着 I/R 持续时间的增加,GSH 消耗,MDA 和 Fe²⁺ 的百分比也随之增加,特异性铁死亡抑制剂铁抑素-1(ferrostatin-1,Fer-1)处理逆转了上述变化,也显著减轻了肺上皮细胞损伤和肺通透性^[33-34]。Dong 等^[35]通过实验证明 I/R 组小鼠 II 型肺泡上皮细胞中出现与铁死亡相关的特征性线粒体形态变化—线粒体较小,嵴减少,同时铁死亡因子的表达增加,而抗铁死亡因子的表达减少,表明上皮可能在 I/R 期间经历铁死亡。通过尾静脉注射

Fe 和 Fer-1,发现 Fer-1 减轻改善小鼠肺水肿、抑制脂质过氧化,增加上皮细胞活力,减轻肺损伤;而 Fe 可以逆转上述变化,作为铁死亡的负调节因子,通过 ROS-Nrf2 途径调节 SLC7A11 转录^[36];此外,激活 Nrf2 后能够上调多种 ROS 解毒酶,例如血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1,HO-1)^[37],敲低 Nrf2 可以显著降低 SLC7A11 和 HO-1 蛋白表达水平,促进 LPO 积累,说明 Nrf2 可能通过调节 SLC7A11 和 HO-1 表达来发挥其抗铁死亡作用。

总体来看,铁死亡参与了肺 I/R 以及肺外 I/R 因素引起 ALI 的发病过程;以铁死亡为核心和靶点,深入研究铁死亡在肺 I/R 损伤中的详细机制,有助于针对肺 I/R 损伤实施有效干预措施,提供有效预防策略。

2.3 脓毒症肺损伤

脓毒症引起多个脏器功能障碍,临床上最常见为呼吸系统功能障碍,主要表现为呼吸窘迫和进行性低氧血症,易发展为 ALI,发病率及致死率较高^[38]。在脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导 ALI 模型上,发现随着 LPS 暴露时间的延长,肺上皮细胞中 ROS 水平和 Fe²⁺ 水平增加,GPX4 蛋白表达逐渐降低;用不同浓度 Fer-1 处理肺上皮细胞后,细胞活力显著增加,细胞凋亡率、ROS 水平和 Fe²⁺ 水平显著降低^[39]。盲肠结扎穿孔引起大鼠脓毒症后,肺组织出现明显炎症反应以及损伤;Fer-1 预处理,减轻了大鼠肺损伤程度,表现在肺泡破裂明显减少,肺水肿减轻,肺泡壁厚度变薄,炎症细胞浸润减少,炎症反应减轻,明显提高动物存活率^[40]。这些研究表明,铁死亡参与了脓毒症 ALI 的发病过程。多种治疗药物通过抑制铁死亡发挥了良好的抗脓毒症肺损伤作用^[41-42]。

中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps,NETs)在 ALI 以及炎症反应失控中的作用受到关注。干扰 NETs 驱动基因肽酰精氨酸脱酰胺酶 4(peptidylarginine deiminase 4,PAD4)、NETs 组分抑制剂西维司他在破坏 NETs 形成的同时,抑制了 LPS 引起小鼠肺和内皮细胞的铁死亡,改善了肺血管通透性与内皮屏障,西维司他亦可提高小鼠存活率,该作用与保护内皮多糖包被有关^[43]。LPS 在引起小鼠肺泡上皮细胞(MLE12 细胞)铁死亡的同时,也提高了内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78、活化转录因子 4 和 C/EBP 同源蛋白的表达,激活内质网自噬相关受

体序列相似性家族 134 成员 B 可显著降低 LPS 引起的铁死亡与 ERS, 亦减轻了脓毒症小鼠肺损伤^[44]。LPS 增加了小鼠肺组织干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 表达, 引起了铁死亡, STING 敲除减轻了 LPS 引起的肺部炎症和上皮细胞损伤、铁死亡, 提高了转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的磷酸化表达; 铁死亡诱导剂逆转了 STING 敲除引起的炎症缓解与铁死亡减少, STAT3 抑制剂增加了 STING 敲除后的铁死亡, 说明 STING 通过 STAT3 参与 LPS 引起的肺铁死亡^[45]。与肺 I/R 损伤中的铁死亡相一致, Nrf2 缺失亦加重了脓毒症 ALI 的程度, GSH、GSH/氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 比值和 MDA 水平出现负向变化, 4-衣康酸辛酯 (4-octyl itaconate, 4-OI) 减轻肺损伤、抗脂质过氧化的作用失效^[23], 说明 4-OI 抗铁死亡作用依赖 Nrf2。这些研究表明, NETs 释放、ERS 以及 STING-STAT3、Nrf2 等信号参与了脓毒症肺损伤铁死亡的发生机制。

2.4 油酸诱导的急性肺损伤

过量油酸 (oleic acid, OA) 或外源给予 OA 可引起 ALI。研究发现, OA 对肺内皮细胞有直接毒性, 引起细胞坏死, 诱发毛细血管充血和间质/肺泡内水肿, 也可通过调控抗/促凋亡蛋白表达, 增强 ROS 产生, 诱导线粒体去极化和凋亡^[46]; 在 OA 致小鼠 ALI 模型上, 肺组织含水量增加, 肺泡通透性增加, 电镜观察到 II 型肺泡上皮细胞存在线粒体收缩和线粒体膜破裂的现象; OA 引起铁浓度在肺组织显著增加、GSH 消耗和 MDA 积累, 肺组织 GPX4 和 Ft 蛋白表达水平下调^[47], 这些结果均提示铁死亡在 OA 诱导 ALI 的发病机制中发挥潜在作用。

2.5 急性放射性肺损伤

放射性肺损伤 (radiation-induced lung injury, RILI) 是指正常肺组织被放射线损伤所引起的无菌性炎症。在小鼠急性 RILI 实验中, 随着照射时间延长, 肺 ROS 水平增加更为明显, 肺中存在胶原蛋白沉积, 同时 GPX4 蛋白和 mRNA 水平显著下调^[48-49]; Lip-1 治疗降低了 RILI 小鼠 ROS 含量、炎症细胞因子水平, 提高了 GPX4、Nrf2 表达, Nrf2 信号传导激活又可以下调 TGF- β 1, 并减轻包括 RILI 在内的纤维化疾病^[50]。这些研究加深了我们对 RILI 铁死亡的理解, 亦为研究新的防治 RILI 的措施提供了借鉴。

3 总结与展望

机体抗氧化功能抑制或失活, 细胞氧化还原平衡稳态破坏, 胞内有有毒脂质代谢产物蓄积, 均引起细胞铁稳态失衡, 引起铁死亡。在多种类型 ALI 的发展进程中都有铁死亡的发生, 存在特征性铁浓度增加、GSH 消耗和 ROS 累积, 导致肺泡损伤严重, 进一步影响肺换气功能; 而使用铁死亡抑制剂或铁螯合剂能够有效逆转各种因素引发的肺泡上皮屏障功能障碍, 抑制铁死亡减轻 ALI。尽管在理解铁死亡调控机制方面取得了相当大的进展, 但是目前我们只知道干预铁死亡过程可能有助于预防和治疗 ALI, 至于铁死亡促进 ALI 的详细机制仍需继续探索; 同时, 目前对铁死亡与 ALI 的相关研究只停留在动物模型和/或体外研究阶段, 且在动物实验中使用铁死亡抑制剂时, 为了在靶组织中达到有意义的药效学反应, 还需进一步确定合适的试剂配方和给药途径。此外, 铁死亡抑制剂的确切剂量和副作用在很大程度上也仍未知。因此, 我们需要对 ALI 与铁死亡之间的关系进行更全面、更深入的研究, 并以此为基础, 靶向铁死亡开发防治 ALI 新的药物, 也为决策临床防治 ALI, 提供更多治疗措施。

参考文献:

- [1] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [2] LIU X, WANG L, XING Q, et al. Sevoflurane inhibits ferroptosis: a new mechanism to explain its protective role against lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Life Sci*, 2021, 275: 119391.
- [3] DOLMA S, LESSNICK S L, HAHN W C, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 285-296.
- [4] YANG W S, STOCKWELL B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells [J]. *Chem Biol*, 2008, 15(3): 234-245.
- [5] DIXON S J, WINTER G E, MUSAVI L S, et al. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(7): 1604-1609.
- [6] YU S, JIA J, ZHENG J, et al. Recent progress of ferroptosis in lung diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 789517.
- [7] CUI S, GHAI A, DENG Y, et al. Identification of hyperoxidized PRDX3 as a ferroptosis marker reveals ferroptotic damage in

- chronic liver diseases [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(21): 3931–3939.
- [8] ANDREWS N C, SCHMIDT P J. Iron homeostasis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 69–85.
- [9] BRISSOT P, ROPERT M, LAN C L, et al. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(3): 403–410.
- [10] STOCKWELL B R, JIANG X. The chemistry and biology of ferroptosis [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 365–375.
- [11] YAN H F, ZOU T, TUO Q Z, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 49.
- [12] YANG W S, STOCKWELL B R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165–176.
- [13] D' HERDE K, KRYSKO D V. Ferroptosis: Oxidized PEs trigger death [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 4–5.
- [14] WAN C, LI S, WEN L, et al. Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(3): 373–382.
- [15] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266–282.
- [16] 马明和, 刘川川. 铁死亡与急性肝损伤研究进展 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2023, 30(12): 1501–1506.
- MA M H, LIU C C. Progress of relationship between ferroptosis and acute liver injury [J]. *Chin J Bases Clin Gen Surg*, 2023, 30(12): 1501–1506.
- [17] LIU J, ZHANG C, WANG J, et al. The regulation of ferroptosis by tumor suppressor p53 and its pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8387.
- [18] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57–62.
- [19] SUZUKI S, TANAKA T, POYUROVSKY M V, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(16): 7461–7466.
- [20] TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107–125.
- [21] OU Y, WANG S J, LI D, et al. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(44): E6806–E6812.
- [22] LIU S, PI J, ZHANG Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102389.
- [23] CHU X, LI L, YAN W, et al. 4-octyl itaconate prevents free fatty acid-induced lipid metabolism disorder through activating Nrf2-AMPK signaling pathway in hepatocytes [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5180242.
- [24] KERINS M J, OOI A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1756–1773.
- [25] LIANG W, GREVEN J, FRAGOULIS A, et al. Sulforaphane-dependent up-regulation of NRF2 activity alleviates both systemic inflammatory response and lung injury after hemorrhagic shock/resuscitation in mice [J]. *Shock*, 2022, 57(2): 221–229.
- [26] DUAN C, KUANG L, XIANG X, et al. Activated Drp1-mediated mitochondrial ROS influence the gut microbiome and intestinal barrier after hemorrhagic shock [J]. *Aging*, 2020, 12(2): 1397–1416.
- [27] DEITCH E A. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207(Suppl 1): E103–E111.
- [28] WANG J, YUE X Q, LI Y T, et al. Analysis and identification of ferroptosis-related gene signature for acute lung injury [J]. *Shock*, 2024, 61(5): 728–739.
- [29] FERRARI R S, ANDRADE C F. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 590987.
- [30] XU Y, LI X, CHENG Y, et al. Inhibition of ACSL4 attenuates ferroptotic damage after pulmonary ischemia-reperfusion [J]. *FASEB J*, 2020, 34(12): 16262–16275.
- [31] TANG L J, LUO X J, TU H, et al. Ferroptosis occurs in phase of reperfusion but not ischemia in rat heart following ischemia or ischemia/reperfusion [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(2): 401–410.
- [32] MURA M, ANDRADE C F, HAN B, et al. Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs [J]. *Shock*, 2007, 28(2): 227–238.
- [33] LI Y, CAO Y, XIAO J, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits ferroptosis and alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2635–2650.
- [34] QIANG Z, DONG H, XIA Y, et al. Nrf2 and STAT3 alleviates ferroptosis-mediated IIR-ALI by regulating SLC7A11 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5146982.
- [35] DONG H, QIANG Z, CHAI D, et al. Nrf2 inhibits ferroptosis and protects against acute lung injury due to intestinal ischemia reperfusion via regulating SLC7A11 and HO-1 [J]. *Aging*, 2020, 12(13): 12943–12959.
- [36] SUN X, OU Z, CHEN R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1): 173–184.
- [37] ABDALKADER M, LAMPINEN R, KANNINEN K M, et al. Targeting Nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 466.
- [38] TAO H, LI N, ZHANG Z, et al. Erlotinib protects LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting EGFR/TLR4 signaling pathway [J]. *Shock*, 2019, 51(1): 131–138.
- [39] 柳红英, 丁璐, 王卉, 等. GPX4 m6A 修饰在脓毒症诱导急性肺损伤小鼠肺上皮细胞铁死亡过程中的调控作用 [J]. *中*

- 国病理生理杂志, 2022, 38(9): 1659-1666.
- LIU H Y, DING L, WANG H, et al. Regulatory role of GPX4 m6A modification in ferroptosis of lung epithelial cells in mice with sepsis-induced acute lung injury [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(9): 1659-1666.
- [40] 刘奕言, 张紫森, 包代琴, 等. 抑制周细胞铁死亡对脓毒症大鼠肺血管屏障功能的保护作用 [J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(20): 2037-2047.
- LIU Y Y, ZHANG Z S, BAO D Q, et al. Protective effects of inhibiting pericyte ferroptosis on pulmonary vascular barrier function in septic rats [J]. J. Army Med. Univ, 2022, 44(20): 2037-2047.
- [41] XU Z, LI J, ZHOU K, et al. Exocarpium Citri Grandis ameliorates LPS-induced acute lung injury by suppressing inflammation, NLRP3 inflammasome, and ferroptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 329: 118162.
- [42] LI Z, YU Y, BU Y, et al. QiShenYiQi pills preserve endothelial barrier integrity to mitigate sepsis-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 322: 117610.
- [43] FEI Y, HUANG X, NING F, et al. NETs induce ferroptosis of endothelial cells in LPS-ALI through SDC-1/HS and downstream pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 175: 116621.
- [44] 金子琦, 唐波, 吴章宏, 等. 脓毒症相关肺损伤中内质网应激诱导的铁死亡机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(3): 491-499.
- JIN Z Q, TANG B, WU Z H, et al. Mechanism of iron death induced by endoplasmic reticulum stress in sepsis-related lung injury [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(3): 491-499.
- [45] GU Y, LV L, JIN J, et al. STING mediates LPS-induced acute lung injury by regulating ferroptosis [J]. Exp Cell Res, 2024, 438(2): 114039.
- [46] GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE C F, SILVA A R, BURTH P, et al. Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 260465.
- [47] 周航, 李凤, 牛建一, 等. 铁死亡参与油酸诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. 生理学报, 2019, 71(5): 689-697.
- ZHOU H, LI F, NIU J Y, et al. Ferroptosis was involved in the oleic acid-induced acute lung injury in mice [J]. Acta Physiologica Sin, 2019, 71(5): 689-697.
- [48] LI X, ZHUANG X, QIAO T. Role of ferroptosis in the process of acute radiation-induced lung injury in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(2): 240-245.
- [49] LI X, DUAN L, YUAN S, et al. Ferroptosis inhibitor alleviates Radiation-induced lung fibrosis (RILF) via down-regulation of TGF- β 1 [J]. J Inflamm, 2019, 16: 11.
- [50] BIAN C, QIN W J, ZHANG C Y, et al. Thalidomide (THD) alleviates radiation induced lung fibrosis (RILF) via down-regulation of TGF- β /Smad3 signaling pathway in an Nrf2-dependent manner [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 446-453.

[收稿日期]2024-05-15

和梦杰,戴雪伶,霍清,等. 巴戟天寡糖抗抑郁作用机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 107-114.
He MJ, Dai XL, Huo Q, et al. Research progress on the mechanism of action of *Morinda officinalis* oligosaccharides on depression [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 107-114.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.013

巴戟天寡糖抗抑郁作用机制的研究进展

和梦杰,戴雪伶,霍清,李昕*

(北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室,北京 100191)

【摘要】 抑郁症是一种心理精神障碍疾病。近些年,全世界抑郁症发病率的不断升高,给社会带来沉重的经济负担。巴戟天寡糖(*Morinda officinalis* oligosaccharides, MOOs)是从中草药巴戟天中提取的活性物质,可以舒郁安神、补肾益智,同时对患者的认知障碍有一定的改善作用。本文基于抑郁症的假说机制,通过查阅现有的研究阐释MOOs与抑郁症之间的联系,提出MOOs通过调节单胺类神经递质水平、增强神经可塑性、调节HPA轴功能和细胞因子水平以及影响肠道菌群等机制改善抑郁症,为MOOs抗抑郁的研究提供新思路。

【关键词】 巴戟天寡糖;抑郁症;作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0107-08

Research progress on the mechanism of action of *Morinda officinalis* oligosaccharides on depression

HE Mengjie, DAI Xueling, HUO Qing, LI Xin*

(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Depression is a psychosomatic disorder. The rising incidence rate of depression in recent years is placing a heavy economic burden on societies around the world. *Morinda officinalis* oligosaccharides (MOOs) are active substances extracted from the Chinese herb *Morinda officinalis* that can soothe depression and calm the mind, tonify the kidneys, and benefit the intellect, as well as improve cognitive disorders in patients to a certain extent. On the basis of the hypothesised pathological mechanism of depression, this study explains the link between MOOs and depression by reviewing existing studies. We propose that MOOs can improve depression through mechanisms that regulate the levels of monoamine neurotransmitters, enhance neuroplasticity, regulate the function of the HPA axis and levels of cytokines, and influence gut microbiota. This paper provides new ideas for research on the antidepressant effects of MOOs.

【Keywords】 *Morinda officinalis* oligosaccharides; depression; mechanism of action

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

抑郁症是一种情绪低落且伴有各种躯体症状和生理功能障碍的综合征,抑郁患者会注意力丧失,对事物失去兴趣以及睡眠和食欲模式发生改变,严重者会产生自杀念头,对患者生活造成了极

大影响^[1]。抑郁症的病因复杂,发病机制与多种因素有关,主要抑郁假说有单胺类神经递质假说、下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic pituitary adrenal, HPA)轴功能亢进假说、神经可塑性假说、细胞因子

【基金项目】 国家自然科学基金项目(11975048);北京联合大学校级教改项目(JY2023Y008)。

【作者简介】 和梦杰(2001—),女,硕士研究生,研究方向:天然活性物质的功效研究。E-mail:1824206294@qq.com

【通信作者】 李昕(1971—),女,讲师,研究方向:生物活性物质功效研究。E-mail:lixinenglish@126.com

假说等^[2]。遗传因素与社会环境也被认为是抑郁症的诱发因素之一^[3]。也有研究者在多种肠道细菌中发现摩根氏菌属会增加重度抑郁症的患病风险,揭示特定肠道细菌是抑郁症的潜在致病因子,研究还进一步指示了由肠道微生物引起的炎症反应能影响人的情绪^[4]。目前,临床上广泛应用的抗抑郁药物主要靶向单胺类神经递质及其受体,如单胺氧化酶抑制剂(monoamine oxidase inhibitor, MAOI)、三环类抗抑郁药(tricyclic antidepressants, TCAs)、选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs)等^[5]。然而,这些抗抑郁药物靶点单一、不良反应发生率高,对部分抑郁症患者起效缓慢,停药还可能导致戒断反应和抑郁症复发,导致用药周期增加,不能充分治疗抑郁症^[6]。因此,探索疗效和安全性高的抗抑郁药物迫在眉睫。

巴戟天寡糖(*Morinda officinalis* oligosaccharides, MOOs)来源于传统中草药巴戟天的根,为巴戟天抗抑郁作用的主要活性成分。早期研究表明,从巴戟天属植物巴戟天的根中提取分离出来的 5 种寡糖类化合物,具有显著的抗抑郁活性^[7]。随着研究的深入,MOOs 在抑郁症中的作用机制逐渐被阐明,而关于 MOOs 与抑郁症及其假说机制相关研究鲜有系统报道。基于此,本文从 MOOs 对抑郁症作用机制的研究角度做一综述,使其药理效应能够被更好地理解,为 MOOs 临床应用于抑郁症的治疗和研究提供理论依据。

1 MOOs 概述

药用植物巴戟天(*Morinda officinalis* How)为茜草科多年生木质藤本植物巴戟天的干燥根,含多种成分,其中的寡糖类物质具有较好的生物活性和较强的药用潜力,占巴戟天成分含量的 50% 以上,具有显著的增强免疫和抗抑郁作用^[8]。MOOs 是从巴戟天根中提取的低聚糖,化学成分包含两种类型的寡糖(图 1),一种是巴戟天中典型的糖类化合物菊淀粉型寡糖(inulin-type oligosaccharides of *Morinda officinalis*, IOMO),其结构组成由单糖 D-葡萄糖和 D-果糖按不同比例构成,菊粉糖一端是蔗糖;另一种菊粉型低聚果糖(Fructooligosaccharides, FOS)是巴戟天中新发现的一类寡糖化合物,全部由果糖组成,其一端是吡喃型果糖^[9]。据报道,IOMO 可有效治疗抑郁症,对抑郁症动物模型的症状改善具有重要作用^[10]。主要含 FOS 的巴戟天寡糖胶囊,已于 2012 年被中国食品药品监督管理总局(China Food and Drug Administration, CFDA)批准为治疗轻、中度抑郁发作的口服处方药^[11]。治疗轻中度抑郁的疗效不逊于常规抗抑郁药,可为临床替代选择抗抑郁药提供新的方向^[12]。

另外,MOOs 具有多种药理作用,长期以来被用于滋养肾和增强人体免疫力。在一项研究中,将制备的 H₂O₂ 解体的人精子与寡糖体外共培养,采用共聚焦显微拉曼光谱观察 DNA 的变化,发现 MOOs 能保护人类精子 DNA 免受 H₂O₂ 损伤以及增强生殖功能^[13]。Deng 等^[14]发现在阿尔茨海默病

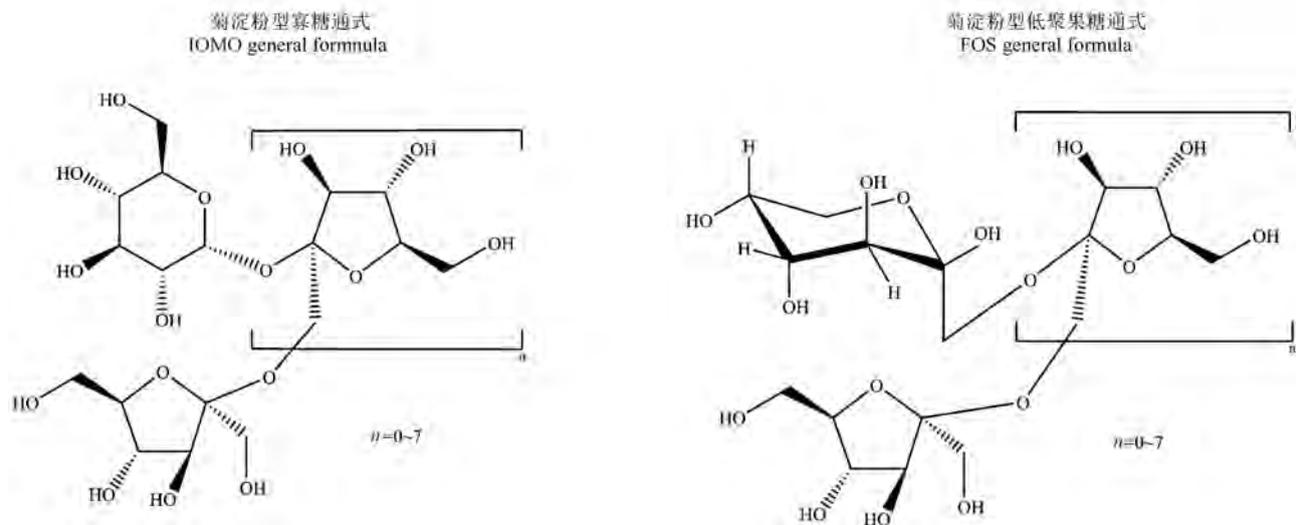


图 1 巴戟天寡糖结构式

Figure 1 Structural formula of *Morinda officinalis* oligosaccharides

(Alzheimer's disease, AD) 大鼠模型中, MOOs 可以预防 D-半乳糖和 A β 25-35 诱导的 AD 大鼠神经退行性变, 对海马体和皮层起到神经保护作用。MOOs 在急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 中也起到改善作用, MOOs 可以减轻脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 小鼠病理损伤, 降低促炎细胞因子的表达, 体外研究进一步表明, MOOs 显著减弱 LPS 诱导的 M1 极化, 抑制 LPS 诱导的 HSP90 和 NF- κ B 上调^[15]。同时, 通过观察抑郁症大鼠行为变化发现巴戟天提取物与临床有效的抗抑郁药物地昔帕明作用效果类似, 显示出很大的抗抑郁特性^[16]。

2 MOOs 在抑郁症中的作用机制

2.1 MOOs 提高单胺类神经递质水平改善抑郁症

大脑功能依赖于脑内数十亿神经元突触前和突触后膜上各种神经递质的存在和作用, 特定神经递质在抑郁症的发展和临床表现中有一定的作用。抑郁症的单胺类神经递质假说认为中枢神经系统 (central nervous systems, CNS) 突触间隙中单胺类神经递质浓度水平和功能下降, 使神经传递减少和认知表现受损, 导致抑郁症的发生^[17]。作为常见的单胺类神经递质, 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 大量存在于脑内, 在 CNS 中具有重要的调节作用。5-HT 是脑内最大的内聚神经递质系统, 支配着所有脑区, 其水平的变化与抑郁症行为症状和躯体功能变化有关; DA 调节奖赏、动机功能、工作记忆和注意力, 其分泌量的增加和传递可以增强行动的动机和决策的信心, 改善认知结果, 异常会导致动机、注意力和攻击性受损; NE 参与调节情绪、认知功能和应激反应等多种生理过程, 与 5-HT 和 DA 共同作用的低水平 NE 可以介导兴趣、攻击性、注意力、性和动机等广谱的抑郁症状。有证据表明, CNS 内神经递质能 (如 DA 能) 传递障碍会直接影响大脑的正常功能诱发抑郁, 这也是抑郁症病理生理学的关键特征之一^[18]。

目前, 有效的抗抑郁药如氟西汀, 主要通过阻断单胺神经递质的再摄取和增加突触间隙中 5-HT、DA 和 NE 的水平来发挥抗抑郁作用^[19]。Zhang 等^[20]首次揭示 SD 大鼠经口服用的 MOOs 可作用于肠道菌群, 再通过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 促进脑内 5-HT 的产生, 发挥抗抑郁作用。研究显示, MOOs (P_6) 或三环类抗抑郁药地昔帕明

(DIM) 能够抑制皮质酮 (corticosterone, CORT) 诱导的 PC12 细胞凋亡, 增强神经营养因子表达, 提高 5-HT 和 Gs-AC-cAMP 通路活性, 从而缓解抑郁^[21]。

2.2 MOOs 增强神经可塑性改善抑郁症

当机体长期受到各种内外刺激时, 会引起 CNS 的结构和功能发生适应性变化, 其中, 前额叶、海马、杏仁核和伏隔核等多个脑区的谷氨酸能突触和树突棘异常, 导致脑中神经环路功能障碍, 从而出现抑郁症状^[22]。其中, 评价神经可塑性的重要指标为神经营养因子, 在脑内合成且广泛分布于 CNS 内的脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是与神经元的存活、分化和生长相关的神经营养因子^[23]。BDNF 在 CNS 的生长和发育过程中起着重要的营养和保护作用, 它通过调控神经元形成, 轴突和树突的生长、重塑, 膜受体运输以及神经递质释放, 从而保护神经元免受应激引起的损伤^[24]。BDNF 水平降低会引起脑神经元损伤后修复、再生能力下降。据报道, 抑郁症患者尸检结果显示 PFC 中 BDNF 外显子 IV 的表达明显降低^[25]。对动物进行 BDNF 脑灌注则能明显改善其抑郁行为。

研究发现, 在慢性不可预知应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 和强迫游泳实验两种抑郁模型大鼠研究中, MOOs 治疗能够促进大鼠对应激的恢复能力, 介导内侧前额叶皮质 (medial prefrontal cortex, mPFC) 中 BDNF、磷酸化-Ser9-GSK-3 β 蛋白、 β -连环蛋白和突触蛋白表达增加, 从而调控 BDNF-GSK-3 β - β -连环蛋白信号通路实现抗抑郁作用^[26]。有证据表明, 在 CORT 诱导的 PC12 细胞模拟抑郁患者脑神经元的病变状态研究中, MOOs 菊粉型六糖 (IHS) 逆转 PC12 细胞 NGF mRNA 水平的降低, 上调 AC-cAMP-CREB 信号通路来提高 BDNF 的表达, 并对 N-甲基-D-天冬氨酸损伤的大鼠大脑皮层细胞具有保护和抗抑郁作用, 认为神经保护作用为抗抑郁药的常见机制之一^[27]。Zhu 等^[28]发现脑卒中后抑郁 (poststroke depression, PSD) 大鼠 mPFC 葡萄糖消耗量降低, 葡萄糖转运蛋白-3 (GLUT3) 表达减少, 使葡萄糖代谢受到抑制, 而 MOOs 通过调控 PKA/pCREB 通路诱导 mPFC 中 GLUT3 的表达上调, 使 GLUT3 恢复到正常水平, 从而改善脑卒中后抑郁大鼠的葡萄糖代谢, 增强突触活性, 改善抑郁行为。

2.3 MOOs 调节 HPA 轴功能亢进改善抑郁症

HPA 轴由下丘脑、垂体前叶和肾上腺皮质的脑

室旁核组成,既是神经内分泌系统的重要组成部分,也是调节机体应激反应的神经内分泌系统,参与控制机体的多种活动,并将外周器官连接到 CNS^[29]。当机体受到外界压力或刺激时,大脑皮层会将产生的刺激信号迅速传递到下丘脑,激活 HPA 轴,引起下丘脑的神经细胞释放大量促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH),CRH 进而刺激垂体前叶合成并分泌大量促肾上腺皮质激素(adreno-cortico-tropic-hormone, ACTH),大量的 ACTH 会引起肾上腺皮质束状带分泌糖皮质激素,导致血清皮质醇水平升高,从而攻击富含糖皮质激素受体的海马区,造成海马区受损,导致抑郁症的发生^[30]。研究发现,HPA 轴释放的 3 种主要激素有 CRH、ACTH 和 CORT,均已在抑郁症中进行了深入研究,它们介导抑郁症与 HPA 轴的密切关联,其中 CORT 是应激的主要指标^[31]。Chi 等^[32]将大鼠经 CUMS 程序处理 4 周建立抑郁模型后,发现大鼠尿液中 CORT 水平显著升高,FOS 治疗 3 周后,发现血浆和尿液中 CORT 水平显著降低,使应激下极度升高的 CORT 水平恢复到正常水平,通过调节 HPA 轴缓解 CUMS 后抑郁大鼠的抑郁样行为。

2.4 MOOs 调节细胞因子水平改善抑郁症

抑郁症细胞因子假说认为抑郁症是一种与免疫应答系统相关的神经心理免疫紊乱性疾病,外周免疫系统激活释放大量促炎细胞因子,促炎细胞因子通过 BBB 进入大脑,破坏神经递质传递功能,影响机体精神活动,产生各种抑郁相关行为,导致机体抑郁的发生,进而使神经内分泌和神经生化发生改变^[33]。临床证据表明,促炎细胞因子尤其是白细胞介素 1(interleukin 1, IL-1)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和急性期反应物 CRP 的异常可能导致抑郁症的发生、复发和发展^[34]。

研究显示,MOOs 通过 I κ B/NF- κ B p65 信号通路抑制 LPS + ATP 处理的原代大鼠小胶质细胞 NLRP3 炎症小体活化,降低脑卒中后抑郁大鼠缺血海马区 IL-18、IL-1 β 和 NLRP3 炎症小体表达来抑制炎症反应,改善大鼠的抑郁样行为^[35](表 1)。Zhu 等^[36]研究发现,在慢性轻度应激(chronic mild stress, CMS)模型小鼠或 LPS 和 ATP 刺激的 BV2 细

胞中,CMS 诱导 E2F2 和 My D88 的 mRNA 表达上调,MOOs 通过抑制 E2F2 调控的 My D88/PI3K 信号通路,使 E2F2、My D88、p-AKT、p-NF- κ B p65 和 p-PI3K 的蛋白水平下调,减轻 CMS 小鼠抑郁行为和炎症。在动物研究中,MOOs 和艾司西酞普兰联合使用,显著提高海马神经递质和神经营养因子水平,刺激 CMS 小鼠海马神经发生,调节 CMS 小鼠 CNS 小胶质细胞极化过程,缓解小鼠中枢神经系统 CNS 小胶质细胞过度激活和炎症反应,产生抗抑郁活性^[37]。同样,Lai 等^[38]分别对慢性约束应激(chronic restraint stress, CRS)和 LPS 诱导的模型小鼠进行研究,发现 CRS 刺激使海马小胶质细胞数量增加,28 d IOMO 治疗显著降低 CRS 诱导的海马炎症细胞因子 IL-6 的表达,显著抑制小胶质细胞的活化,使海马小胶质细胞的活性正常化,IOMO 治疗还能明显抑制 LPS 诱导引起的 INOS、NLRP3 炎症小体、caspase-1 和 IL-1 β 的表达升高。有证据表明,MOOs 改善了高血压伴随抑郁症模型大鼠脑组织核溶解、炎性浸润、线粒体肿胀、核固缩和神经元结构模糊,抑制了高血压伴抑郁症期间 LPS 刺激的星形胶质细胞内促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放和线粒体损伤,此外,在分子水平上,MOOs 还上调了星形胶质细胞中 Mfn2 表达,激活 PI3K/Akt/mTOR 途径介导的星形胶质细胞中的线粒体自噬,从而去除星形胶质细胞中受损的线粒体,表现出抗抑郁的特性^[39]。

2.5 MOOs 影响肠道菌群改善抑郁症

肠-脑轴促进肠道微生物群和代谢物之间的双向交流,已成为治疗抑郁症的一个有前景的靶点。有报道称,人体肠道中存在着多种细菌,这些肠道微生物不仅可以调节神经递质水平,如乳酸菌和双歧杆菌可产生 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和组胺,大肠杆菌可产生 5-HT、DA 和 NE,而且它们产生的特征代谢物还能影响 CNS 发育和功能,从而影响宿主心理和行为能力^[40]。然而,在正常生理条件下,GABA、5-HT 和 DA 不能穿过 BBB,而某些神经递质的前体通过 BBB 转化为有活性的神经递质。其中,色氨酸是血清素的前体,其可用性受肠道细菌的影响。众所周知,压力可以激活犬尿氨酸途径的酶,从而减少用于血清素合成的色氨酸的量。因此,认为犬尿氨酸在抑郁障碍的发病机制中起重要作用^[41]。

表 1 巴戟天寡糖抗抑郁作用机制

Table 1 Antidepressant mechanism of action of *Morinda officinalis* oligosaccharides

研究对象 Investigator	动物模型及干预措施 Animal model and intervention study	作用部位 Site of action	抑郁假说 Depression hypothesis	作用机制及调控途径 Mechanisms of action and regulatory pathways
MOOs (P ₆) 或 DIM ^[21]	CORT 诱导 PC12 细胞	PC12 细胞	单胺类神经递质假说、神经可塑性假说 Monoamine neurotransmitter hypothesis, neuroplasticity hypothesis	增加 5-HT 含量、HPA 轴功能亢进状态正常化、提高 Gs-AC-cAMP 通路活性 Increase in 5-HT content, normalization of the hyperfunctional state of the HPA axis, increase in Gs-AC-cAMP pathway activity
MOOs (P ₆) or DIM	CORT induced PC12 cells	PC12 cells		
MOOs ^[26]	CUMS 和强迫游泳模型大鼠 CUMS and forced swimming model rats	mPFC	神经可塑性假说 Neuroplasticity hypothesis	BDNF、突触蛋白表达增加,调控 BDNF-GSK-3β-β-连环蛋白信号通路 Increased expression of BDNF, synaptophysin, and regulation of the BDNF-GSK-3β-β-linker protein signalling pathway
MOOs(IHS) ^[27]	CORT 诱导的 PC12 细胞 CORT induced PC12 cells	PC12 细胞 PC12 cells	神经可塑性假说 Neuroplasticity hypothesis	提高 NGF mRNA 水平,上调 AC-cAMP-CREB 信号通路促进 BDNF 的表达 Increasing NGF mRNA levels and upregulating the AC-cAMP-CREB signalling pathway promotes BDNF expression
MOOs ^[28]	PSD 大鼠 Poststroke depression rats	mPFC	神经可塑性假说 Neuroplasticity hypothesis	调控 PKA/pCREB 通路诱导 GLUT3 表达上调 Modulation of PKA/pCREB pathway induces upregulation of GLUT3 expression
FOSs ^[32]	CUMS 模型大鼠 CUMS model rats	血浆、尿液 Plasma, urine	HPA 轴功能亢进假说 HPA axis hyperfunction hypothesis	降低 CORT 水平,调节 HPA 轴 Reducing CORT levels and regulating the HPA axis
MOOs ^[35]	LPS + ATP 处理原代大鼠小胶质细胞、PSD 大鼠 LPS+ATP treatment of primary rat microglia, PSD rat	海马、小胶质细胞 Hippocampus, microglia	细胞因子假说 Cytokine hypothesis	降低 IL-18、IL-1β 表达,通过 IκB/NF-κB p65 信号通路抑制的 NLRP3 炎症小体活化 Reduced IL-18, IL-1β expression and NLRP3 inflammatory vesicle activation inhibited by the IκB/NF-κB p65 signaling pathway
MOOs ^[36]	CMS 模型小鼠、LPS 和 ATP 处理的 BV2 细胞 CMS model mice, LPS and ATP treated BV2 cells	海马、BV2 细胞 Hippocampus, BV2 cells	细胞因子假说 Cytokine hypothesis	抑制 E2F2 调控的 MyD88/PI3K 信号通路,使 E2F2、My D88、p-AKT、p-NF-κB p65 和 p-PI3K 的蛋白水平下调 Inhibition of the E2F2-regulated MyD88/PI3K signaling pathway resulted in down-regulation of protein levels of E2F2, My D88, p-AKT, p-NF-κB p65 and p-PI3K
MOOs 联合艾司西酞普兰 ^[37] MOOs combined escitalopram	CMS 模型小鼠 CMS model mice	海马、小胶质细胞 Hippocampus, microglia	单胺类神经递质假说、神经可塑性假说、细胞因子假说 Monoamine neurotransmitter hypothesis, neuroplasticity hypothesis, cytokine hypothesis	提高海马神经递质和神经营养因子水平,刺激海马神经发生,调节小胶质细胞极化过程,缓解 CMS 小鼠 CNS 小胶质细胞过度激活和炎症反应 Increasing hippocampal neurotransmitter and neurotrophic factor levels, stimulating hippocampal neurogenesis, modulating microglial cell polarisation processes and alleviating CNS microglial cell hyperactivation and inflammatory responses in CMS mice
IOMO ^[38]	CRS 和 LPS 诱导的模型小鼠 CRS and LPS induced model mice	海马、小胶质细胞 Hippocampus, microglia	细胞因子假说 Cytokine hypothesis	降低海马炎性细胞因子 IL-6 的表达,抑制小胶质细胞的活化,抑制 INOS、NLRP3 炎症小体、caspase-1 和 IL-1β 的表达升高 Reduced expression of the hippocampal inflammatory cytokine IL-6, inhibited microglia activation, and suppressed elevated expression of INOS, NLRP3 inflammatory vesicles, caspase-1 and IL-1β

续表 1

研究对象 Investigator	动物模型及干预措施 Animal model and intervention study	作用部位 Site of action	抑郁假说 Depression hypothesis	作用机制及调控途径 Mechanisms of action and regulatory pathways
MOOs ^[39]	高血压伴随抑郁症模型大鼠、LPS 刺激原代星形胶质细胞和原代神经元 Hypertension accompanied by depression model rats, LPS stimulation of primary astrocytes and primary neurons	脑组织、星形胶质细胞 Brain tissue, astrocytes	细胞因子假说 Cytokine hypothesis	抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放和线粒体损伤,上调星形胶质细胞中 Mfn2 表达,激活 PI3K/Akt/mTOR 途径介导的星形胶质细胞中的线粒体自噬 Inhibition of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6 and IL-1 β release and mitochondrial damage, up-regulation of Mfn2 expression in astrocytes, and activation of mitochondrial autophagy in astrocytes mediated by the PI3K/Akt/mTOR pathway
MOOs ^[20]	CUMS 模型大鼠、肠道菌群培养物 CUMS model rats, cultures of rat gut microbiota	肠道菌群 Gut microbiota	微生物群-肠-脑轴 Microbiota-gut-brain axis	增加肠道菌群中 5-HTP,调节色氨酸 \rightarrow 5-HTP \rightarrow 血清素(5-HT)代谢途径 Increase 5-HTP in intestinal flora, regulate tryptophan \rightarrow 5-HTP \rightarrow serotonin (5-HT) metabolic pathway
FOSs ^[32]	CUMS 模型大鼠 CUMS model rats	肠道菌群 Gut microbiota	微生物群-肠-脑轴 Microbiota-gut-brain axis	调节抑郁症大鼠中有益细菌的出现和抑郁相关细菌的消失,促进细菌门蓝藻的丰度,调节宿主肠道菌群 Modulation of the emergence of beneficial bacteria and the disappearance of depression-associated bacteria in depressed rats, promotion of the abundance of bacteriophage cyanobacteria, and modulation of host intestinal flora

研究表明,在 APP/PS1 小鼠的粪便样本中,MOOs 给药使一些细菌的丰度在属和科水平上表现出实质性的变化,特别是使乳酸菌、异芽菌、乳杆菌科和螺旋藻科的丰度明显增加,表明 MOOs 在预防动物肠道菌群失调方面具有益生元作用^[42]。一项研究首次揭示口服 MOOs 通过调节色氨酸 \rightarrow 5-羟色氨酸(5-hydroxytryptophan, 5-HTP) \rightarrow 血清素(5-HT)代谢途径作用于肠道微生物群,研究显示 MOOs 提高肠道微生物群中色氨酸羟化酶水平,从而加速色氨酸和 5-HTP 生产,同时,MOOs 抑制 5-羟色氨酸脱羧酶活性,从而减少 5-HT 产生,并积累 5-HTP,而从肠道微生物群中升高的 5-HTP 被大量吸收到血液中,然后穿过 BBB 提高大脑中 5-HT 水平,因此,MOOs 使肠道微生物群中的 5-HTP 增加来缓解抑郁症^[20]。有研究表明,正常大鼠和 CUMS 大鼠的肠道菌群呈远距离聚集,主要与抑郁症大鼠中有益细菌(如不动杆菌属、巴恩斯氏菌属、粪球菌属、小杆菌属、乳酸杆菌属和类芽孢杆菌属)的消失和抑郁相关细菌(如厌氧棒状菌属、颤杆菌属、变形菌门和链球菌属)的出现有关,而抑郁症大鼠肠道菌群失调在 FOSs 治疗后得以恢复。另外,FOSs 可减轻 CUMS 大鼠抑郁样行为,修复肠上皮损伤,还

能促进以分泌药理上重要的代谢物(如 H₂S)而闻名的细菌且具有抗抑郁特性的蓝藻的丰度。研究还表明,将 FOSs 的成分、聚合度(degree of polymerization, DP)5 与标准抗抑郁药物氟西汀相比,FOSs 诱导的肠道菌群调节更具抗抑郁作用,表明 FOSs 的抗抑郁功效与宿主肠道菌群的调节作用且密切相关^[32]。

3 小结与展望

近年来,研究者对抑郁症开展大量深入研究,提出与抑郁症病因相关的各种假说,仍然未找到其确切的发病机制,但都为阐述抑郁症发病机制提供了可能性。MOOs 作为中草药巴戟天中抗抑郁的生物活性成分,其通过增加脑内 5-HT 的产生调节单胺神经递质水平,降低 CORT 含量调节 HPA 轴功能异常,提高 BDNF 与 NGF 表达水平、增加突触蛋白表达、刺激海马神经发生改善神经可塑性,抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 IL-18 的释放、抑制 NLRP3 炎症小体的表达升高、抑制小胶质细胞的过度激活来降低炎症反应以及调控脑肠轴改善肠道菌群等多靶点、多途径、多层次的发挥了抗抑郁作用。总之,随着对抑郁症发病机制进行了广泛的

研究,MOOs 及其相关作用机制在抑郁症中的重要性也越来越被重视。MOOs 作为我国第一个抗抑郁症的中药,也是国际上首先发现的具有抗抑郁作用的寡糖。临床上,MOOs 的广泛应用填补了我国中药行业在治疗抑郁领域的空缺,也为抑郁症的治疗提供新的选择,对我国传统中药的发展具有重要意义。综上所述,MOOs 在抑郁症中的影响受到越来越多的关注,本文为未来 MOOs 抗抑郁机制的全面而深入的研究提供了理论依据,也为临床治疗抑郁症以及抗抑郁药物的研发提供新的思路。然而,MOOs 更为具体的相关效应成分及精准靶点仍需要进一步探究。

参考文献:

- [1] WANG H Q, WANG Z Z, CHEN N H. The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: Genetic bases and biological correlates [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 167: 105542.
- [2] NEDIC ERJAVEC G, SAGUD M, NIKOLAC PERKOVIC M, et al. Depression: Biological markers and treatment [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 105: 110139.
- [3] ZHANG L, ZHANG Y, GUO W, et al. An effect of chronic negative stress on hippocampal structures and functional connectivity in patients with depressive disorder [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2024, 20: 1011–1024.
- [4] QIN Y, HAVULINNA A S, LIU Y, et al. Combined effects of host genetics and diet on human gut microbiota and incident disease in a single population cohort [J]. *Nat Genet*, 2022, 54 (2): 134–142.
- [5] GU X, GAO X, CHENG J, et al. Emerging application of metabolomics on Chinese herbal medicine for depressive disorder [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111866.
- [6] LI Q F, LU W T, ZHANG Q, et al. Proprietary medicines containing *Bupleurum chinense* DC. (Chaihu) for depression: network meta-analysis and network pharmacology prediction [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 773537.
- [7] 崔承彬, 杨明, 姚志伟, 等. 中药巴戟天中抗抑郁活性成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 1995, 20(1): 36–39, 62–63. CUI C, YANG M, YAO Z, et al. Antidepressant active constituents in the roots of *Morinda officinalis* How [J]. *China J Chin Mater Med*, 1995, 20(1): 36–39, 62–63.
- [8] LIU M, CAI M, DING P. Oligosaccharides from traditional Chinese herbal medicines: a review of chemical diversity and biological activities [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(3): 577–608.
- [9] HAO Q, NAN T, ZHOU L, et al. Rapid simultaneous quantification of fructooligosaccharides in *Morinda officinalis* by ultra-high performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(13): 2222–2230.
- [10] QIU Z K, LIU C H, GAO Z W, et al. The inulin-type oligosaccharides extract from *Morinda officinalis*, a traditional Chinese herb, ameliorated behavioral deficits in an animal model of post-traumatic stress disorder [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31 (5): 1143–1149.
- [11] CHI L, CHEN L, ZHANG J, et al. Development and application of bio-sample quantification to evaluate stability and pharmacokinetics of inulin-type fructo-oligosaccharides from *Morinda Officinalis* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 156: 125–132.
- [12] DU Y, ZHENG Q, OU Z H, et al. Efficacy and safety of *Morinda officinalis* oligosaccharide capsules for depressive disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. *Braz J Psychiatry*, 2021, 43(3): 306–313.
- [13] CHEN D L, LI N, LIN L, et al. Confocal mirco-Raman spectroscopic analysis of the antioxidant protection mechanism of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* on human sperm DNA [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 119–124.
- [14] DENG S, LU H, CHI H, et al. Neuroprotective effects of OMO within the hippocampus and cortex in a D-galactose and $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced rat model of Alzheimer's disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 1067541.
- [15] QING C, WU Y, LIU B, et al. Ameliorative effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides on LPS-induced acute lung injury [J]. *Chem Biodivers*, 2024, 21(5): e202400506.
- [16] ZHANG Z Q, YUAN L, YANG M, et al. The effect of *Morinda officinalis* How, a Chinese traditional medicinal plant, on the DRL 72-s schedule in rats and the forced swimming test in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 72(1/2): 39–43.
- [17] HERSEY M, HASHEMI P, REAGAN L P. Integrating the monoamine and cytokine hypotheses of depression: Is histamine the missing link? [J]. *Eur J Neurosci*, 2022, 55(9/10): 2895–2911.
- [18] D'ONOFRIO A M, PIZZUTO D A, BATIR R, et al. Dopaminergic dysfunction in the left putamen of patients with major depressive disorder [J]. *J Affect Disord*, 2024, 357: 107–115.
- [19] LIU H, ZHANG X, SHI P, et al. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor: a key receptor in the cholinergic anti-inflammatory pathway exerting an antidepressant effect [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 84.
- [20] ZHANG Z W, GAO C S, ZHANG H, et al. *Morinda officinalis* oligosaccharides increase serotonin in the brain and ameliorate depression via promoting 5-hydroxytryptophan production in the gut microbiota [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(8): 3298–3312.
- [21] LI Y F, GONG Z H, YANG M, et al. Inhibition of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis*, a Chinese traditional herbal medicine, on the corticosterone induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Life Sci*, 2003, 72(8): 933–942.
- [22] LIU W, GE T, LENG Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 6871089.

- [23] AHMED A, ZENG G, AZHAR M, et al. Combination of Shengmai San and *Radix puerariae* ameliorates depression-like symptoms in diabetic rats at the nexus of PI3K/BDNF/SYN protein expression [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6(3): 211–220.
- [24] TIWARI S, QI L, WONG J, et al. Association of peripheral manifestation of brain-derived neurotrophic factor with depression; a meta-analysis [J]. *Brain Behav*, 2022, 12(6): e32581.
- [25] HAN M, ZENG D, TAN W, et al. Brain region-specific roles of brain-derived neurotrophic factor in social stress-induced depressive-like behavior [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(1): 159–173.
- [26] XU L Z, XU D F, HAN Y, et al. BDNF-GSK-3 β -Catenin pathway in the mPFC is involved in antidepressant-like effects of *Morinda officinalis* oligosaccharides in rats [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2017, 20(1): 83–93.
- [27] LI Y F, LIU Y Q, YANG M, et al. The cytoprotective effect of inulin-type hexasaccharide extracted from *Morinda officinalis* on PC12 cells against the lesion induced by corticosterone [J]. *Life Sci*, 2004, 75(13): 1531–1538.
- [28] ZHU J, PENG Q, XU Y, et al. *Morinda officinalis* oligosaccharides ameliorate depressive-like behaviors in poststroke rats through upregulating GLUT3 to improve synaptic activity [J]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13376–13395.
- [29] THOMSON F, CRAIGHEAD M. Innovative approaches for the treatment of depression: targeting the HPA axis [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(4): 691–707.
- [30] ZHOU L, WANG T, YU Y, et al. The etiology of poststroke-depression: a hypothesis involving HPA axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113146.
- [31] CHAI Y, LI Q, WANG Y, et al. The value of HPA axis hormones as biomarkers for screening and early diagnosis of postpartum depression; updated information about methodology [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 916611.
- [32] CHI L, KHAN I, LIN Z, et al. Fructo-oligosaccharides from *Morinda officinalis* remodeled gut microbiota and alleviated depression features in a stress rat model [J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153157.
- [33] CATENA-DELL'OSSO M, BELLANTUONO C, CONSOLI G, et al. Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(2): 245–255.
- [34] LIU C H, ZHANG G Z, LI B, et al. Role of inflammation in depression relapse [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 90.
- [35] LI Z, XU H, XU Y, et al. *Morinda officinalis* oligosaccharides alleviate depressive-like behaviors in post-stroke rats via suppressing NLRP3 inflammasome to inhibit hippocampal inflammation [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(12): 1570–1586.
- [36] ZHU Z H, YIN X Y, XU T S, et al. *Morinda officinalis* oligosaccharides mitigate chronic mild stress-induced inflammation and depression-like behaviour by deactivating the MyD88/PI3K pathway via E2F2 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 855964.
- [37] PAN S M, YIN X Y, DAI D M, et al. Unraveling the potential of *Morinda officinalis* oligosaccharides as an adjuvant of escitalopram in depression treatment and exploring the underlying mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 328: 118124.
- [38] LAI Z K, YIN Y Y, YAN J Z, et al. Inulin-type oligosaccharides of *Morinda officinalis* exerted antidepressant effects by reducing hippocampal inflammation [J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(6): 2065–2075.
- [39] YANG L, AO Y, LI Y, et al. *Morinda officinalis* oligosaccharides mitigate depression-like behaviors in hypertension rats by regulating Mfn2-mediated mitophagy [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 31.
- [40] CHUDZIK A, ORZYŁOWSKA A, ROLA R, et al. Probiotics, prebiotics and postbiotics on mitigation of depression symptoms: modulation of the brain-gut-microbiome axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 1000.
- [41] WANG X, ZHOU J, JIANG T, et al. Deciphering the therapeutic potential of SheXiangXinTongNing: Interplay between gut microbiota and brain metabolomics in a CUMS mice model, with a focus on tryptophan metabolism [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155584.
- [42] YANG X, CHEN D L, YANG J, et al. Effects of oligosaccharides from *Morinda officinalis* on gut microbiota and metabolome of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 412.

[收稿日期]2024-03-25

罗诗雯,罗权焯,聂娟,等. 基于中西医临床病证特点的动脉粥样硬化动物模型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 115-127.

Luo SW, Luo QY, Nie J, et al. Animal model analysis of atherosclerosis based on clinical symptoms in traditional Chinese medicine and Western medicine [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 115-127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.014

基于中西医临床病证特点的动脉粥样硬化 动物模型分析

罗诗雯¹, 罗权焯², 聂娟¹, 李 璠¹, 韦晶玥¹, 陈惠卿¹, 朴美虹¹, 杨冬梅^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学中西医结合防治血管疾病基础研究中心, 长沙 410208;
2. 湖南中医药大学湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 长沙 410208)

【摘要】 对常见动脉粥样硬化(AS)动物模型与中西医临床病证特点进行吻合度分析与评分,为研究AS疾病选择的动物模型提供参考。对常见AS动物模型的品种、造模方法、原理、特点进行总结,并根据AS中西医临床诊断标准对15种常见模型进行吻合度分析。现有AS动物模型常用的制备方法有高脂喂养型、机械损伤联合高脂喂养型、基因工程联合高脂喂养型、化学诱导结合高脂喂养型以及病证结合模型。其中,中西医临床吻合度相对较高的是球囊损伤联合高脂喂养型、ApoE^{-/-}联合高脂喂养型以及病证结合中的痰瘀互结型。现有的AS动物模型大多以西医造模方法为主,评价标准亦以西医诊断指标为主,缺少中西医病证结合的特点,很难揭示中医整体观念、辨证论治的核心。因此,构建准确、高吻合度的中西医病证结合动物模型将是深入研究AS机制和防治的重点。

【关键词】 动脉粥样硬化;病证结合;诊断标准;动物模型;吻合度

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)08-0115-13

Animal model analysis of atherosclerosis based on clinical symptoms in traditional Chinese medicine and Western medicine

LUO Shiwen¹, LUO Quanyue², NIE Juan¹, LI Liu¹, WEI Jingyue¹, CHEN Huiqing¹, PIAO Meihong¹, YANG Dongmei^{1,2*}

(1. Basic Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Vascular Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

【Abstract】 On the basis of the clinical characteristics of atherosclerosis (AS) in traditional Chinese medicine (TCM) and Western medicine, this paper analyzes common animal models of AS. The coincidence of clinical characteristics of the models was scored in the hope of providing new ideas and a reference for those studying AS. This paper reviews the varieties, modeling method, modeling principles, and characteristics of common animal models of

【基金项目】 国家自然科学基金(81673722);湖南省科技创新计划资助(2021RC4064);湖南省科技厅重点项目(2022SK2011);湖南省教育厅重点项目(20A379);湖南省自然科学基金项目(2022JJ40314);湖南省教育厅项目(22B0387);湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202210541021);湖南中医药大学重点培育学科基础医学学科(202302)。

【作者简介】 罗诗雯(2001—),女,本科,研究方向:中西医结合治疗心血管疾病。E-mail:1458956997@qq.com

【通信作者】 杨冬梅(1991—),女,实验师,研究方向:心血管药理学研究。E-mail:1607594768@qq.com

AS. Moreover, similarities among common animal models, in terms of their clinical diagnostic criteria and symptom characteristics, were assessed. High-fat feeding type, mechanical injury combined with high-fat feeding type, genetic engineering combined with high-fat feeding type, chemical induction combined with high-fat feeding type, and combined Chinese clinical syndrome and Western disease AS models are widely established. Comparative analysis showed that balloon injury combined with high fat feeding type, ApoE receptor-knockout mouse combined with high-fat diet type, and phlegm and blood stasis type models of disease and symptom combinations showed a comparatively high level of clinical agreement between Chinese and Western medicine. Presently, most animal models of AS have a high degree of relevance to Western medicine, and the evaluation criteria used for the models are predominately from a Western medicine perspective. Models that combine disease and syndrome are lacking, hindering the development of wholism concepts and treatment through the differentiation of syndromes used in TCM. Therefore, establishing an animal model with a high degree of accuracy and coincidence between TCM and Western perspectives that combines the disease and its TCM symptoms is a top priority for studying the prevention and treatment of AS.

【Keywords】 atherosclerosis; combination between disease and syndrome; diagnostic criteria; animal models; coincidence degree

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

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种脂类复合物沉积于大、中动脉血管,最终形成粥样斑块,并可诱发血栓形成、斑块破裂及斑块出血等继发改变的慢性疾病,也是心脑血管疾病发生发展的重要病理基础^[1-2]。近年来,AS 的全球发病率明显上升,严重威胁人们健康。目前,临床上治疗 AS 主要用调脂药、抗血小板药、溶栓药等药物或动脉支架介入术、血运重建及旁路移植等手术进行干预^[3]。但药物治疗存在肝肾功能受损、横纹肌溶解症等多种不良反应,手术治疗存在血管再狭窄、血管内血栓形成、感染等并发症^[4]。基于完整的中医理论,AS 以心脉痹阻为主要病机,临床表现为本虚标实、虚实夹杂,总治则为先治其标,后治其本,治标重在活血化瘀,治本重在补益心气,在各个病变时期均灵活辨证、因人而异地开具处方用药,兼具灵活性、实用性与安全性等优点^[5]。因此,中西医结合防治 AS 具有重要意义。

动物模型在疾病的防治研究中扮演重要角色。目前,现代医学对 AS 病因病机的认识尚未完全,故此构建贴合临床的中西医病证结合的 AS 动物模型对中西医防治 AS 至关重要。本文基于 AS 中西医临床病证特点,总结目前常见 AS 动物模型的应用情况,比较其中西医临床症状的吻合度,以期为中西医病证结合的 AS 模型改良、动物实验研究以及新药开发提供基础,有利于更全面地认识 AS 本质。

1 动脉粥样硬化的中西医病因病机

1.1 西医病因病机

目前认为,高脂血症、高血压、糖尿病、吸烟等

为 AS 的主要危险因素^[6]。而 AS 现有的发病机制主要集中于脂质浸润学说、损伤-反应学说、血小板聚集与血栓形成假说及平滑肌细胞克隆学说等^[7-8]。在高脂血症、剪切应力等危险因素作用下,血浆低密度脂蛋白因内皮细胞受损进入内膜,并被氧化成氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL);同时,大量单核细胞黏附在内膜,并移入内膜成为巨噬细胞,而巨噬细胞在 Ox-LDL 的作用下转变为泡沫细胞形成最早的脂质条纹^[8]。活化的巨噬细胞分泌多种生长因子和炎症因子,促进斑块生长、炎症反应^[9]。部分血管平滑肌细胞亦可吞噬脂质成为泡沫细胞,部分从中膜迁移至内膜大量增殖,分泌胶原和弹力纤维形成纤维帽^[9]。最终,纤维帽包绕脂质条纹形成典型斑块。

1.2 中医病因病机

AS 并无明确统一的中医学病名,但可根据其胸闷胸痛、心悸、气促、眩晕、一过性黑蒙及记忆力减退等临床症状,将其归属于“胸痹”“真心痛”“中风”“眩晕”等范畴^[10]。中医认为 AS 与饮食失调、五志所伤、年高体衰、气血亏耗等病因相关^[11]。AS 病机可分为虚实两个方面,“虚”为正虚,指气血阴阳亏虚,“实”为邪实,指瘀血、痰浊、湿热等^[12]。脏腑功能失调易形成痰浊、血瘀、气滞、热毒,而痰瘀互结,凝结成块,阻滞脉络,最终形成动脉粥样硬化斑块^[13]。其中脾胃受损,运化无权,水谷精微变为浊脂,入血则使血脂升高,浊脂累及而成血中之痰浊^[14]。脉络瘀闭,则使气血阴阳更虚,脉络受损愈加严重,如此往复,因虚致实,因实致虚,虚实错杂,不断推进斑块形成。

2 动脉粥样硬化诊断标准

2.1 西医诊断标准

西医主要通过观察症状体征、实验室检查及影像学检查等方式,结合患者病史等做出临床诊断。本文参照《动脉粥样硬化中西医防治专家共识(2021)》^[15]、2018 年出版的《内科学》^[16]及文献^[17-19]的标准,拟定以下 AS 西医诊断标准,参考模型评价新方法^[20],认为影像学指标、血清学指标是重点评估内容且可信度高,应作为主要指标,各赋分 40%,其中 CT 血管造影赋分 20%,磁共振显像血管造影和多普勒超声各赋分 10%;血脂指标中 LDL-C 赋分 30%,炎症因子赋分 10%;心电图检查、超声心动图检查、放射性核素心脏检查、负荷试验等检查应作为次要指标,各赋分 4%,共计 100%。见表 1。

2.2 中医诊断标准

中医诊断标准依据 2017 年中国中医药出版社

发行的《中医内科学》^[21]、《动脉粥样硬化中西医防治专家共识(2021)》^[15]及文献^[22-24]的标准来制定,中医临床诊断动脉粥样硬化具体表现的主症为:①形体变化;②面色/皮色暗少华;③胸痛胸闷,心悸头晕;④肢体麻木;⑤身困乏力。次症为各证型不同症状,包括:①多痰;②情绪变化;③睡眠状态;④饮食变化;⑤二便变化为各证型不同症状。在判断与中医临床诊断标准吻合度时,符合主症一项赋值 15%,符合次症一项赋值 5%,总分为 100%。依据中医诊断标准可以将动脉粥样硬化的中医辨证分型分为五类:痰瘀互结证、痰热互结证、气阴两虚证、气滞血瘀证、气虚血瘀证^[15]。见表 2。

3 动脉粥样硬化模型分析

3.1 模型动物的选择

目前 AS 动物模型已成功在大鼠、小鼠、家兔、小型猪等动物中复制。其中鼠类和家兔类为 AS 模型常用的研究对象。鼠类因其病变过程与人体类

表 1 动脉粥样硬化西医诊断标准

Table 1 Diagnostic criteria of western medicine for atherosclerosis (AS)

指标 Indicators	临床表现 Clinical features
影像学指标 (40%) Imaging indices (40%)	①CT 血管造影(CTA)(20%);血管狭窄性或扩张性病变 ①CT angiography (CTA) (20%); Stenosis or dilatation of blood vessels ②磁共振显像血管造影(MRA)(10%);血管狭窄性或扩张性病变 ②Magnetic resonance imaging angiography (MRA) (10%); Stenosis or dilatation of blood vessels
主要指标 (80%) Key indicators (80%)	③多普勒超声(10%);血流情况和血管病变 ③Doppler ultrasound (10%); Blood flow and vascular disease ④低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)增高(15%) ④Increased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) (15%) ⑤血清总胆固醇(TC)增高(5%) ⑤Increased serum total cholesterol (TC) (5%)
血清学指标 (40%) Serum markers (40%)	⑥甘油三酯(TG)增高(5%) ⑥Increased triglyceride level (5%) ⑦高密度脂蛋白胆固醇(TG)(HDL-C)降低(5%) ⑦Decreased high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (5%)
炎症因子 (10%) Inflammatory cytokines (10%)	⑧白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 (IL-1)、肿瘤坏死因子 (TNF-α)、C 反应蛋白 (CRP) 等 ⑧Interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor receptor-α (TNF-α), C-reactive protein (CRP), et al.
次要指标 (20%) Secondary indicators (20%)	①心电图检查 ①Electrocardiogram ②超声心动图 ②Echocardiographic ③放射性核素心脏检查 ③Radionuclide cardiac ④负荷试验 ④Stress test ⑤血管内超声显像 ⑤Intravascular ultrasound imaging

表 2 动脉粥样硬化中医辨证分型
Table 2 Traditional Chinese medicine syndrome differentiation of AS

辨证分型 Syndrome differentiation	主症 Main syndrome	次症 Secondary syndrome	舌脉 Pulse and tongue
痰瘀互结证 Phlegm turbidity and blood stasis syndrome	①形体肥胖 ①Physical obesity ②面色晦暗 ②Dim complexion ③胸闷、心悸、头晕 ③Oppression in the chest, palpitations, dizziness ④肢体麻木、痿废 ④Numbness and flaccidity of limbs ⑤身困乏力 ⑤Physical fatigue	①多痰 ①Phlegm ②心烦易怒 ②Irritability ③少寐 ③Restlessness at night ④大便干结 ④Constipation ⑤局部肿块、局部刺痛 ⑤Local lump, local tingling	舌紫暗或有斑点,苔膩或少津, 脉弦涩或弦滑 Tongue is purple and dark or spotted, the moss is greasy or less fluid, the pulse is stringy and slippery or unsmooth and stringy
痰热互结证 Phlegm-heat accumulation syndrome	①形体肥胖 ①Physical obesity ②面色晦暗 ②Dim complexion ③胸闷胀痛、头晕 ③Chest tightness, pain and dizziness ④肢体麻木、疼痛,间歇性跛行、肢端溃疡、坏 疽,甚至趾(指)节脱落等 ④Limb numbness, pain, intermittent claudication, acromegaly ulcer and gangrene or joint shedding ⑤身困乏力 ⑤Physical fatigue	①夜寐鼾声阵作或夜寐不安 ①Snoring at night or restlessness at night ②口干或口臭 ②Dry mouth or fetid mouth odor ③大便干结或黏滯不爽 ③Constipation or sticky ④小便黄或黄浊 ④Yellow urine ⑤烦躁易怒 ⑤Irritability	舌质红、苔黄燥或黄膩,脉滑 数;或舌质绛红,苔少,脉细数 Tongue is red, the moss is yellow and greasy or yellow and dry, pulse slip number, tongue is crimson, the moss is less and the pulse is thin
气阴两虚证 Qi and yin deficiency syndrome	①形体消瘦 ①Thin body ②面色少华 ②Bad complexion ③胸痛隐隐、眩晕 ③Chest pain, dizziness ④肢体麻木 ④Limb numbness ⑤神疲乏力 ⑤Mental fatigue	①口干少饮 ①Dry mouth ②大便无力或干结 ②Constipation ③自汗盗汗 ③Spontaneous sweating and night sweats ④失眠多梦 ④Insomnia and dreams ⑤遇劳加重 ⑤Aggravated by exertion	舌质红或淡,苔少,脉细弱 Tongue is red or light red, the moss is less, the pulse is thin
气滞血瘀证 Qi-stagnancy and blood stasis syndrome	①形体消瘦 ①Thin body ②面色紫暗 ②Purple complexion ③局部胀闷,走窜疼痛 ③Local bloating, unfixed pain ④肢体麻木或偏瘫 ④Numbness or hemiplegia of limbs ⑤神疲乏力 ⑤Mental fatigue	①皮肤青筋暴露 ①Exposure of skin blue veins ②情志抑郁 ②Emotional depression ③急躁易怒 ③Impatience and irritability ④刺痛、拒按 ④Stinging, tenderness ⑤肿块坚硬,局部青紫肿胀 ⑤Hard lump, local bruising and swelling	舌质紫暗或见瘀斑,脉涩 Tongue is purple or have ecchymosis, the pulse is stringy

似、价格低廉、饲养成本低、喂养方便、易于繁殖等特性,常被用于 AS 实验研究^[25]。其中,小鼠由于体型过小,较难进行临床性检查评估,故常通过基因工程构建 ApoE^{-/-}小鼠和 LDL-R^{-/-}小鼠以缩短模型构建周期、提高成功率,多适用于 AS 炎症和免疫因子的作用机制研究;以 SD 大鼠为代表的大鼠对外科手术操作的耐受力强,且其抗感染能力强,故常被用于球囊损伤术、结扎术等手术造模法^[26]。家

兔对高脂饮食极为敏感,故选择家兔作为研究对象具有复制简单、建模时间短、成功率高、损伤条件可控性好、易于评判的优点,通常适用于疾病预防治疗等研究^[27]。然而家兔 AS 病变大多只表现为早期脂质条纹,难以形成稳定的纤维斑块,同时也存在造模周期长、死亡率较高等缺点^[28]。目前,用于构建 AS 模型的动物种属各有其优缺点和适用范围,故此,应根据实验目的和条件选择合适的动物模型

作为研究对象。

3.2 动脉粥样硬化动物模型与临床特点的吻合度

AS 模型常用的制备方法有高脂喂养型、结扎型、机械损伤联合高脂喂养型、基因工程联合高脂喂养型、化学诱导联合高脂喂养型及病证结合模型。具体造模方法、造模原理、特点、吻合度及应用情况如表 3 所示。

3.3 观测指标

观测 AS 动物模型的指标有如下几类：①表观

指标和行为学变化：包括动物精神状态、饮食量、体重等情况；②血清生化指标检测：ELISA 等方法测定 TC、TG、HDL、LDL、ox-LDL、白介素-10 (IL-10) 等；③病理形态学检查：肉眼观察、HE 染色、油红 O 染色、电镜法等方法检测血管内膜中膜厚度比值、斑块面积等；④影像学指标：小动物超声、彩色多普勒、冠状动脉血管造影等方法观察动脉的外形、走行、管壁的厚度，内膜有无增厚及斑块，管腔有无狭窄闭塞，颈总动脉内血流情况等^[24, 62-63]。

表 3 常见动脉粥样硬化动物模型与中西医临床病证特点吻合度分析

Table 3 Consistency between common animal model of AS and clinical symptoms in traditional Chinese medicine and western medicine

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	造模方法及原理 Preparation method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics
高脂喂养型 High-fat feeding model	新西兰兔 New Zealand rabbit	高脂饲料饲喂 12 周, 诱发高脂血症 ^[29-30] Rabbit was fed with HFD for 12 weeks to induce hyperlipidemia ^[29-30]	优点: 操作简单, 成本较低, 较符合人类饮食的特点, 病理改变与人早期相似 缺点: 动物成模率较低, 造模周期也较长, 无法形成稳定的 AS 斑块 Advantages: Simple operation, low price Disadvantages: Difficult surgical, longer mold-making period, failure to form stable plaques	西医 ⁽¹⁾ 符合主要指标: ①③④⑤⑥⑦⑧, 吻合度 70% 中医 ⁽²⁾ 符合主症①⑤, 吻合度 30% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ①⑤, 30% match
结扎型 Ligated model	SD 大鼠 Sprague-Dawley rat	冠状动脉左前降支结扎, 阻断血流引起管腔内剪切力改变 ^[31-32] Ligate coronary artery left anterior descending branch to block blood flow and change shear forces in luminal ^[31-32]	优点: 可重复性和可行性高 缺点: 需精良的设备, 手术操作技术难度大、要求高 Advantages: High repeatability and high feasibility Disadvantages: Sophisticated equipment, difficult and demanding surgical operation	符合西医诊断主要指标: ①③⑤⑥⑧; 次要指标: ①②, 吻合度 58% 符合中医诊断主症①②⑤; 吻合度 45% Western medicine primary index: ①③⑤⑥⑧; secondary index: 58% match TCM primary evidence: ①②⑤, 45% match
机械损伤联合高脂喂养型 Mechanical injury combined with high-fat feeding type	新西兰大白兔 New Zealand rabbit	右髂动脉球囊损伤术联合高脂饲料饲养 12 周, 高脂血症的基础上损伤内膜 ^[33] Rabbits underwent right iliac artery balloon injury combined with HFD for 12 weeks ^[33]		
	SD 大鼠 Sprague-Dawley rat	主动脉球囊损伤联合高脂饮食饲喂 6 周 ^[34] Rats underwent aorta balloon injury technique combined with HFD for 6 weeks ^[34]		符合西医诊断主要指标: ①③④⑤⑥⑦⑧; 次要指标: ⑤, 吻合度 75% 符合中医诊断主症: ①②⑤, 吻合度 45% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧; secondary index, 75% match TCM primary evidence: ①②⑤, 45% match
	中国实验小型猪 China experimental miniature pig	冠状动脉血管内皮损伤联合高脂饮食饲喂 8 周 ^[35] Pigs underwent coronary vascular endothelial injury combined with HFD for 8 weeks ^[35]	优点: 造模周期短, 成功率高, 血流变及凝血指标有明显改变 Advantages: Longer mold-making period, high success rate, significantly change of blood flow change and coagulation indexes	
	西藏小型猪 Tibet mini-pig	饲喂高脂饲料 2 周, 行颈外动脉穿刺术造成左侧颈总动脉球囊损伤 ^[36] Pigs underwent left common carotid artery balloon combined with HFD for 2 weeks ^[36]		

续表 3

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	造模方法及原理 Preparation method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics
气体干燥型联合高脂喂养模型 Airdrying combined with HFD model	日本大耳白兔 Japanese white rabbit	干燥气体联合高脂饲料喂养 8 周, 损伤内膜激活组织型纤溶酶原激活剂、前列环素 ^[37] Rabbits were underwent airdrying methods combined with HFD for 8 weeks, to damage inner membrane activates tissue plasminogen activator, prostacyclin ^[37]	优点: 造模时间短, 重复性好, 操作简便 缺点: 不稳定 Advantages: Shorter mold-making period, high repeatability and simple operation Disadvantages: Instability	符合西医诊断主要指标: ①③④⑤⑥⑦, 吻合度 60% 符合中医诊断主症: ②, 吻合度 30% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦, 60% match TCM primary evidence: ②, 30% match
ApoE 基因敲除型联合高脂喂养模型 ApoE receptor knockout mouse combined with HFD model	ApoE ^{-/-} 小鼠 ApoE ^{-/-} mice	高脂饲料饲喂 12 周, ApoE ^{-/-} 小鼠清除血浆脂蛋白的能力严重受损, 血浆胆固醇水平升高 ^[38-42] Mice were fed with HFD for 12 weeks, and ApoE ^{-/-} mice have a severely impaired ability to clear plasma lipoproteins, with elevated plasma cholesterol levels ^[38-42]	优点: AS 模型成功率高 缺点: 脂质代谢与人体不同, 体型小, 可获得的血液样本少, 形成的 AS 病变不具有厚纤维帽 Advantages: High success rate Disadvantages: Different lipid metabolism, small size, few available blood samples and lack of fiber cap	符合西医诊断主要指标: ①③④⑤⑥⑦⑧, 吻合度 70% 符合中医诊断主症: ①②⑤; 次症: ④, 吻合度 50% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ①②⑤; secondary evidence: ④, 50% match
LDL-R 基因敲除联合高脂喂养模型 LDL receptor knockout mouse combined with HFD model	LDL-R ^{-/-} 小鼠 LDL-R ^{-/-} mice	高脂饲料喂养 12 周, LDL-R ^{-/-} 小鼠血浆中脂蛋白增多, 胆固醇水平升高 ^[43-44] LDL-R ^{-/-} mice were fed with HFD for 12 weeks, with increased lipoprotein in plasma and increased blood cholesterol levels ^[43-44]	优点: 在脂代谢实验研究中更稳定 缺点: 造模成功率相对较低, 病变进展需要饲料调控, 形成的 AS 病变不具有厚纤维帽 Advantages: More stable in the experimental studies of lipid metabolism Disadvantages: Low success rate, feed regulation requirement and lack of fiber cap	符合西医诊断主要指标: ①③④⑤⑥⑦⑧, 吻合度 70% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match
基因敲除联合高脂喂养模型 Genetic engineering combined with high-fat feeding type	ApoE ^{-/-} 与 LDL-R ^{-/-} 双敲除模型 ApoE receptor and LDL receptor knockout mouse combined with HFD model	高脂饮食喂养 22 周, ApoE 和 LDL-R 双敲除使其清除血浆脂蛋白的能力严重受损, 脂蛋白增多加速 ^[45-46] ApoE ^{-/-} LDL-R ^{-/-} mice were fed with HFD for 22 weeks, and mice have a severely impaired ability to clear plasma lipoproteins and the lipoproteins were accelerated ^[45-46]	优点: AS 的严重程度增加, 能自发性形成斑块破裂和心肌梗死 缺点: 易发生严重管腔闭塞, 导致过早死亡 Advantages: Increases severity, spontaneous formation plaque rupture and myocardial infarction Disadvantages: Prone to severe lumen occlusion and premature death	符合西医诊断主要指标: ①③④⑤⑧, 吻合度 60% Western medicine primary index: ①③④⑤⑧, 60% match
AAV-PCSK9 联合高脂喂养模型 AAV-PCSK9 mouse combined with HFD model	AAV-PCSK9 小鼠 AAV-PCSK9 mice	高脂饲料喂养 + 尾静脉注射 AAV-PCSK9 ^{DY} 3 个月, 增强肝 LDL 受体的降解 ^[47] Mice were injected with AAV-PCSK9 ^{DY} and fed with Western diet for 3 months, to enhance the degradation of the hepatic LDL receptor ^[47]	优点: 不依赖转基因动物, 造模迅速 缺点: 病变进展需要饲料调控; 缺乏复杂病变的证据 Advantages: Do not rely on transgenic animals, shorter mold-making period Disadvantages: Feed regulation requirement, lack of evidence of complex lesions	符合西医诊断主要指标: ①③⑤⑥⑧, 吻合度 50% Western medicine primary index: ①③⑤⑥⑧, 50% match
维生素 D3 联合高脂喂养联合模型 Fed with HFD combined with vitamin D3 solution intraperitoneal injection model	Wistar 大鼠或 SD 大鼠 Wistar rats or Sprague-Dawley rat	高脂饲料喂养, 同时在前 3 d 腹腔注射维生素 D3 溶液 (6×10 ⁵ U/kg), 加速斑块内钙沉积, 稳定斑块 ^[48-49] Rat were fed with HFD combined with vitamin D3 solution intraperitoneal injection (6×10 ⁵ U/kg), accelerating calcium deposition in the plaque and stabilizing the plaque ^[48-49]	优点: 经济, 省时省力, 病变过程较稳定, 易形成后期粥样斑块、钙沉积病变 缺点: 维生素 D 剂量难以把握 Advantages: Low price, timesaving, stable lesion process, easy to form later plaque and calcium deposition lesions Disadvantages: Unpredictable dose	符合西医诊断主要指标: ①③④⑤⑥⑦⑧, 吻合度 70% 符合中医诊断主症: ②, 吻合度 15% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ②, 15% match

续表 3

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	造模方法及原理 Preparation method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics	
化学诱导联合高脂喂养型 Chemical induction combined with high-fat feeding model	静脉注射脂多糖联合高脂喂养模型 Intravenous treatment with lipopolysaccharide combined with HFD model	新西兰白兔 New Zealand rabbit	高脂饲料喂养,每周 1 次耳缘静脉注射不同剂量 LPS (100、200、1000、2000 ng/kg),持续 8 周,引起严重全身炎症反应,损伤内皮细胞 ^[50] Rabbits were fed with HFD and different doses of LPS (100, 200, 1000, 2000 ng/kg) were injected once a week for 8 weeks, to cause a severe systemic inflammatory response and damage the endothelial cells ^[50]	优点:适合 AS 中炎症信号通路的研究 缺点:注射后易引起兔的感染性休克甚至死亡 Advantages: Suitable for studying the inflammatory signaling pathways in AS Disadvantages: Easily cause of septic shock and death	符合西医诊断主要指标:①③④⑤⑥⑦⑧,吻合度 70% 符合中医诊断主症:①,吻合度 15% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ①, 15% match
静脉注射牛血清白蛋白法联合高脂喂养模型 Intravenous treatment with bovine serum albumin combined with HFD model	日本大耳白兔 Japanese white rabbit	耳缘静脉注射牛血清白蛋白 (250 mg/kg),皮下注射卵清白蛋白 (2.5 mg/kg),诱导免疫反应,联合高脂饲料饲喂 8 周 ^[51-52] Bovine serum albumin (250 mg/kg) was injected at the ear margin and ovalbumin (2.5 mg/kg) was injected subcutaneously to induce immune response combined with HFD for 8 weeks ^[51-52]	优点:时间短、成活率高、模型稳定、可控性好 缺点:单纯免疫损伤造模周期长,常联合高脂喂养 Advantages: Shorter mold-making period, high success rate, stable models and well controllable Disadvantages: Longer mold-making period	符合西医诊断主要指标:③④⑤⑥⑦⑧,吻合度 50% 符合中医诊断主症:①,吻合度 15% Western medicine primary index: ③④⑤⑥⑦⑧, 50% match TCM primary evidence: ①, 15% match	
痰瘀互结证 AS 模型 Phlegm and blood stasis syndrome AS model	中国实验小型猪 China experimental miniature pig	高脂饲料喂养 2 周,用介入法行冠状动脉血管内皮损伤,诱导脾失健运,聚湿生痰,血液黏度增加,瘀血阻络 ^[35] Fed with HFD for 2 weeks, pigs underwent coronary vascular endothelial injury, to induce the dysfunction of spleen in transportation, the accumulation of dampness and phlegm stasis and blood stasis ^[35]	优点:模型符合传统中医病因病机理论,成模率高,对中西医临床特点均有较好的表现力 Advantages: Accordance with the theory of etiology and pathogenesis of TCM, high success rate, good performance on the clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicine	符合西医诊断主要指标:①③④⑤⑥⑦⑧,吻合度 70% 符合中医诊断主症:①③⑤,次症:①④,吻合度 55% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ①③⑤, secondary evidence: ①④, 55% match	
肝郁证 AS 模型 Liver depression syndrome AS model	ApoE ^{-/-} 小鼠 ApoE ^{-/-} mice	CUMS 方法:孤立后群居 6 h、湿润环境 6 h、快速灯光交换加白噪音 2 h、倾斜鼠笼 6 h、整晚照明 12 h、夹尾 15 min、禁水 24 h、禁食 24 h,8 种方法随机安排,模拟肝郁证,肝失条达则气滞血瘀 ^[53] CUMS method: Live in groups after isolation for 6 h, live in wet environment for 6 h, rapid light exchange and white noise for 2 h, tilted rat cage for 1 h, lighting all night for 12 h, tail clipped for 15 min, water prohibition for 24 h, fasting for 24 h, 8 methods were randomly arranged to simulate liver depression syndrome, and loss of liver function causes Qi stagnation and blood stasis ^[53]	优点:成模率高,对中西医临床特点均有较好的表现力 缺点:造模过程较为复杂 Advantages: High success rate, good performance on the clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicine Disadvantages: Complicated method	符合西医诊断主要指标:①③④⑤⑥⑦⑧,吻合度 70% 符合中医诊断主症:①②⑤,次症:②⑤,吻合度 55% Western medicine primary index: ①③④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ①②⑤, secondary evidence: ②⑤, 55% match	
脾虚痰浊证 AS 模型 Spleen deficiency and phlegm syndromes AS model	ApoE ^{-/-} 小鼠 ApoE ^{-/-} mice	高脂饲料喂养 12 周,过食肥甘,脾失健运,聚湿生痰 ^[54] Mice were fed with HFD for 12 weeks, excessive HFD caused dysfunction of spleen in transportation, the accumulation of dampness and phlegm stasis ^[54]	优点:模型易复制,对中西医临床特点均有较好的表现力 Advantages: High repeatability, good performance on the clinical characteristics of TCM and Western medicine	符合西医诊断主要指标:③④⑤⑥⑦⑧,吻合度 50% 符合中医诊断主症:①②⑤,次症:⑤,吻合度 50% Western medicine primary index: ③④⑤⑥⑦⑧, 50% match TCM primary evidence: ①②⑤, secondary evidence: ⑤, 50% match	

续表3

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	造模方法及原理 Preparation method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics	
气滞血瘀证 AS 模型 Qi stagnation and blood stasis syndrome AS model	Wistar 大鼠 Wistar rats	脂肪乳灌胃 3 周后,尾静脉注射小牛血清蛋白 468.75 mg/kg,冰水中 20 min,寒凝血脉,瘀滞脉道,造模 8 周 ^[55] After 3 weeks of fat milk gavage, calf serum protein 468.75 mg/kg was injected into the tail vein, in ice water for 20 min, lasting 8 weeks, which caused cold pathogen obstruction ^[55]	优点:模型符合传统中医病因病机理论 Advantages: Accordance with the theory of etiology and pathogenesis of TCM	符合西医诊断主要指标:③④⑤⑥⑦,吻合度 40% 符合中医诊断主症:①②⑤;次症:④,吻合度 50% Western medicine primary index: ③④⑤⑥⑦, 40% match TCM primary evidence: ①②⑤; secondary evidence: ④, 50% match	
痰湿血瘀毒损证 AS 模型 Phlegm-dampness and blood stasis syndrome AS model	ApoE ^{-/-} 小鼠 ApoE ^{-/-} mice	高脂饲料喂养 14 周,肥甘厚味,伤及脾胃,脾失健运,而致痰湿内阻,气机不畅,血瘀内停,日久郁热成毒 ^[56] Mice were fed with HFD for 14 weeks, which caused dysfunction of spleen in transportation, the accumulation of dampness and phlegm stasis, as well as Qi stagnation, blood stasis and noxious heat	优点:模型较符合传统中医病因病机理论 Advantages: Accordance with the theory of etiology and pathogenesis of TCM	符合西医诊断主要指标:①②④⑤⑥⑦,吻合度 70% 符合中医诊断主症:②⑤;次症:②③④⑤,吻合度 50% Western medicine primary index: ①②④⑤⑥⑦ secondary index: 70% match TCM primary evidence: ②⑤; secondary evidence: ②③④⑤, 50% match	
病证结合型 AS 模型 Models of AS combining Chinese clinical syndrome and western disease	秽浊痰阻证 AS 模型 Obscene phlegm obstruction syndrome AS model	ApoE ^{-/-} 小鼠 ApoE ^{-/-} mice	干寒环境和高脂饲料同时联合干预,肥甘生痰,津伤炼痰,寒凝血脉,则血运不畅 ^[57] Mice were intervened by dry-cold environment and HFD, which can cause phlegm and stagnation of blood ^[57]	优点:内外环境、饮食等诸多因素联合诱导模型 Advantages: Combination internal and external environment with diet	符合西医诊断主要指标:①②④⑤⑥⑦⑧,吻合度 70% 符合中医诊断主症:②⑤;次症:②③④⑤,吻合度 50% Western medicine primary index: ①②④⑤⑥⑦⑧, 70% match TCM primary evidence: ②⑤; secondary evidence: ②③④⑤, 50% match
湿热证 AS 模型 Damp-heat syndrome AS model	SD 大鼠 Sprague-Dawley rat	高脂高糖饲料喂养+维生素 D3+LPS 内毒素,共 6 周,模拟外感湿热邪毒,内伤饮食肥甘 ^[58] Rats were fed with HFD, and damp-heat syndrome was induced by intraperitoneal injection of vitamin D3 + tail vein injection of LPS endotoxin for 6 weeks, imitating exogenous damp-heat and pathogenic poison and affected by improper diet ^[58]	优点:以脾为中心,内外合邪,病机上符合中医理论 Advantages: Accordance with the theory of pathogenesis of TCM	符合西医诊断主要指标:①②④⑤⑥⑦,吻合度 60% 符合中医诊断主症:⑤;次症:②④⑤,吻合度 30% Western medicine primary index: ①②④⑤⑥⑦, 60% match TCM primary evidence: ⑤; secondary evidence: ②④⑤, 30% match	
气虚血瘀证 AS 模型 Qi-deficiency and blood-stasis syndrome AS model	Wistar 大鼠 Wistar rats	灌胃脂肪乳+疲劳跑步双因素联合结扎冠脉 ^[59] Rats were fed with fat milk diet, and underwent exercise fatigue combine ligation of coronary artery ^[59]	优点:灌胃饲养和结扎提高成模的均匀性 Advantages: High uniformity of mold	符合西医诊断次要指标:②,吻合度 5% 符合中医诊断主症:②③⑤;次症:②⑤,吻合度 55% Western medicine secondary index: ②, 5% match TCM primary evidence: ②③⑤; secondary evidence: ②⑤, 55% match	
心脾阳虚证 AS 模型 Heart and spleen yang deficiency syndrome AS model	Wistar 大鼠 Wistar rats	皮下多点注射脑垂体后叶素、BAT 切除术,隔日寒冷环境刺激联合高脂饲料,寒伤中阳 ^[60] Rats were applied incising BAT, high fatty diet and cold stimulation every other day, and subcutaneous injection with pituitrin, with cold evil being apt to attack yang ^[60]	优点:病机上符合中医理论 Advantages: Accordance with the theory of pathogenesis of TCM	符合西医诊断次要指标:②,吻合度 5% 符合中医诊断主症:①②⑤;次症:②④⑤,吻合度 60% Western medicine secondary index: ②, 5% match TCM primary evidence: ①②⑤; secondary evidence: ②④⑤, 60% match	

续表3

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	造模方法及原理 Preparation method and principle	模型优缺点 Model advantages and disadvantages	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics
寒凝血瘀证 AS 模型 Cold coagulation and blood stasis AS model	SD 大鼠 Sprague- Dawley rat	股静脉注射垂体后叶素 6 U/kg, 引起冠状动脉较长时间强烈痉挛, 急性心肌缺血, 模拟寒邪致病特点射 ^[61] 6 U/kg pituitrin was injected at femoral vein, causing intense spasm of the coronary artery for a long time and acute myocardial ischemia, imitating the characteristics of pathogenic cold causing diseases ^[61]	优点: 病机上符合中医理论, 且符合临床急性心绞痛寒邪直入心脉的发病特点 Advantages: Accordance with the theory of pathogenesis of TCM and the acute angina pectoris induced by pathogenic cold of clinical character	符合西医诊断次要指标: ④, 吻合度 4% 符合中医诊断主症: ②; 次症: ④⑤, 吻合度 25% Western medicine secondary index: ④, 4% match TCM primary evidence: ②, secondary evidence: ④⑤, 25% match

注: (1): 西医诊断见表 1; (2): 中医诊断见表 2。本文根据 AS 西医诊断标准及中医辨证分型, 根据文献^[20]的研究对其中西医诊断标准进行赋值, 结合文献中动物模型的一般表现及检测指标计算其吻合度, 同时将模型吻合度分为高中低三项, 临床吻合度 ≥70% 为高, 50% ~ 70% 为中, ≤50% 为低。

Note. (1), See Table 1 for Western medical diagnosis. (2), See Table 2 for Chinese medicine diagnosis. According to the diagnostic criteria of Western medicine and TCM syndrome differentiation of AS and based on the literature^[20], this paper assign values to the diagnostic criteria of TCM and Western medicine. Then, combined with the usual manifestations and detection indexes of animal models in the literature, the coincidence degree is calculated and is classified into high, medium and low levels. Calculated value ≥70% means high consistency, calculated value between 50% and 70% means medium consistency, and calculated value ≤50% means low consistency.

4 讨论和结论

目前, 构建 AS 动物模型的方法尚不成熟, 仍需通过建立适宜的动物模型为 AS 的机制研究及临床治疗提供参考。现有的 AS 动物模型复制方法, 主要包括高脂喂养型、机械损伤联合高脂喂养型、基因工程联合高脂喂养型、化学诱导联合高脂喂养型及病证结合模型, 共 5 大类型。上述 5 种采用不同方法构建的 AS 动物模型, 中西医的吻合度有所不同。本研究分析发现, 几乎所有 AS 模型的构建都需要联合高脂喂养模型。其中单纯高脂喂养模型、机械损伤联合高脂喂养模型、ApoE^{-/-} 基因敲除联合高脂喂养模型、LDL-R 基因敲除型联合高脂喂养模型、维生素 D 联合高脂喂养联合模型、静脉注射脂多糖联合高脂喂养模型等与临床病证吻合度较高 (≥70%), 但作用机制存在差异且都有各自的优缺点。此外, 上述模型虽然多具备很高的西医临床吻合度, 但也存在其中医证候临床模拟效果普遍不佳 (吻合度 ≤50%)。其中机械损伤联合高脂喂养模型与 ApoE^{-/-} 基因敲除联合高脂喂养模型与人类 AS 模型最接近, 具有一定的使用价值, 但前者存在手术过程较为复杂的缺点, 后者存在造模成本较高、小鼠体型小可获得的血液样本少, 形成的 AS 病变不具有厚纤维帽等不足。

AS 病证结合模型中, 痰瘀互结证与肝郁证 AS 模型与中西医临床病证特点的吻合度最高 (西医吻合度 ≥70%, 中医吻合度 ≥55%), 除了能较好呈现动脉内膜中膜厚度比、管腔狭窄程度、血脂四项、炎症因子、心电图异常等西医诊断指标, 痰瘀互结证

能利用体表心电图计算心肌缺血程度进而模拟中医胸闷、胸痛等, 通过体重指数和饮食情况评价痰多体胖等, 通过无创血流动力学反映脉象, 最后数码图片分析舌象变化, 四诊评分方法独特创新, 而肝郁证表现出眯眼嗜睡、行动迟缓、毛发稀疏缺少光泽、贴边等肝郁征象, 利用肝郁气滞、血行不畅的中医病机, 在呈现中医证候方面有较好表现力。同时, 痰瘀互结型基于中医脾失健运, 聚湿生痰以及离经之血便是瘀的病机进行复制, 符合 AS 中医痰浊瘀阻脉络的证型病机和表现, 也是 AS 临床常见的证候类型。此外, 气虚血瘀证采用灌胃脂肪乳+疲劳跑步双因素联合结扎冠脉, 造模原理较符合中西医病因病机, 中医吻合度良好 (55%), 但西医吻合度较低, 应完善对血脂四项、炎症因子等指标的检测。心脾阳虚证模拟内外寒邪, 损伤心脾之阳, 造模符合中医理论且中医证候表现力最好 (60%), 但西医证候只进行了心电图检查, 吻合度仅为 5%。寒凝血瘀证利用垂体后叶素单一因素造模, 中西医吻合度均较低。

本文通过对比不同文献中 AS 动物模型, 发现该疾病模型的构建仍在不断发展, 大部分模型难以完全模拟人类发病情况, 疾病深层机制尚未明确。同时, 目前尚未缺乏动脉粥样硬化血虚血瘀证、心肾阴虚证等中西病证结合模型的构建。目前构建 AS 模型的评价标准多以西医病机为标准, 与中医证型吻合度为中等或偏低, 总体西医吻合度较中医吻合度高, 该现状不利于中医药治疗和预防该病发展的研究。同时我们发现, 由于 AS 中医诊断标准的主症为“胸闷”“胸痛”“头晕”“肢体麻木”等, 这些

指征难以在动物模型上得到有效观测,故基于中西医临床病证特点建立的 AS 动物模型的中医吻合度普遍不高。未来构建该模型可以从以下 4 方面进行改进:①通过“以方测证”法,逆向验证中医证候模型的建立;②将难以评估的中医证候用西医诊断技术量化,如舌象和舌下络脉可通过舌象仪直接分析,或采集数码图片结合比色卡进行分析,“胸痛”症状可以用体表心电图进行评分;③建议某些中医病证结合模型(如寒凝血瘀证)的构建采用联合造模的方法;④建议采用联合西医致病因素和中医患病因素,如造模过程中增加冰水刺激,基于寒凝血瘀原理诱导淤血新生,在高脂高糖饲料喂养+维生素 D3+LPS 内毒素的基础上,增加湿热环境的构建,进一步诱导湿热证 AS 模型,同时加强相关指征的检测,以提高中医临床吻合度。

近年来,以动脉粥样硬化为主的心血管事件在全球的发病率和死亡率不断升高。构建与临床有高吻合度的 AS 动物模型是深入研究该疾病的基础。本文基于动脉粥样硬化的中西医临床表现和中西医临床诊断指标,总结目前常见 AS 动物模型的评价指标,并通过对比与中西医临床诊断指标的吻合度予以相应评分,以期为日后 AS 动物模型的制备、AS 病机的深入研究、AS 治疗药物的开发提供参考。

参考文献:

[1] ZHANG S, LIU Y, CAO Y, et al. Targeting the microenvironment of vulnerable atherosclerotic plaques: an emerging diagnosis and therapy strategy for atherosclerosis [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(29): e2110660.

[2] TANG H, ZENG Z, SHANG C, et al. Epigenetic regulation in pathology of atherosclerosis: a novel perspective [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 810689.

[3] LU Y, CUI X, ZHANG L, et al. The functional role of lipoproteins in atherosclerosis: novel directions for diagnosis and targeting therapy [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(2): 491-520.

[4] CADET B, BHUTTA S, MAHMOUDZADEH S, et al. When overdose of doxylamine leads to severe rhabdomyolysis and renal failure that requires hemodialysis: a case report and literature review [J]. *Cureus*, 2023, 15(8): e43395.

[5] 陈豪攀, 耿锰行, 孟毅. 孟毅运用“通脉五法”治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病之经验 [J]. *江苏中医药*, 2024, 56(3): 26-29.

CHEN H P, GENG M H, MENG Y. MENG Yi's experience in treating coronary atherosclerotic heart disease with "five methods to dredging collaterals" [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2024, 56(3): 26-29.

[6] BOCHI A P G, FERREIRA G D S, DEL BIANCO V, et al. Aerobic exercise training reduces atherogenesis induced by low-sodium diet in LDL receptor knockout mice [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(10): 2023.

[7] HUYNH K. Inflammation: Targeting inflammatory pathways to treat atherosclerosis and cancer [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(11): 629.

[8] STARK K, MASSBERG S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(9): 666-682.

[9] CHISTIakov D A, MELNICHENKO A A, MYASOEDOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis [J]. *J Mol Med*, 2017, 95(11): 1153-1165.

[10] 祁磊, 李华刚, 周玉朱, 等. 动脉粥样硬化的中医治疗经验探讨 [J]. *中国当代医药*, 2021, 28(8): 154-156.

QI L, LI H G, ZHOU Y Z, et al. Discussion on the experience of TCM treatment of atherosclerosis [J]. *China Mod Med*, 2021, 28(8): 154-156.

[11] 宋玮, 张钟艺, 沈涛. 从“气津敷布”视角构建动脉粥样硬化中医辨治体系 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(2): 592-597.

SONG W, ZHANG Z Y, SHEN T. Construction of traditional Chinese medicine differentiation and treatment system for atherosclerosis from the perspective of 'qi and fluid compress' [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(2): 592-597.

[12] 梁清芝, 陈正涛, 周若然, 等. 内质网应激在动脉粥样硬化中的作用及中医药调控研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(5): 226-235.

LIANG Q Z, CHEN Z T, ZHOU R R, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and its regulation by traditional Chinese medicine: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(5): 226-235.

[13] 崔馨月, 王群, 宋因, 等. 基于“脾失健运-膏脂传输障碍”探讨 HDL 蛋白修饰影响动脉粥样硬化发生发展的理论研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(9): 1492-1495.

CUI X Y, WANG Q, SONG N, et al. Theoretical study on the influence of HDL protein modification on the occurrence and development of atherosclerosis based on "spleen deficiency-intimement and fat transfer disorder" [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(9): 1492-1495.

[14] 段佳芥, 咸楠星, 裴宇鹏, 等. 基于“痰浊-痰结-痰瘀”论动脉粥样硬化性相关心血管疾病的病机演变 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14(10): 81-84.

DUAN J Q, XIAN N X, PEI Y P, et al. The pathogenesis evolution of atherosclerotic-related cardiovascular diseases based on the "phlegm turbidity-phlegm coagulation-phlegm stasis" theory [J]. *Clin J Chin Med*, 2022, 14(10): 81-84.

[15] 中国医师协会中西医结合分会心血管专业委员会, 中华中医药学会心血管病分会. 动脉粥样硬化中西医结合防治专家共识 (2021 年) [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(3): 287-293.

- Cardiovascular Professional Committee of the Branch of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of the Chinese Medical Doctor Association, and Cardiovascular Disease Branch of the Chinese Association of Traditional Chinese Medicine. Expert consensus on prevention and treatment of atherosclerosis in Chinese and Western medicine (2021) [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2022, 42(3): 287-293.
- [16] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
GE J B, XU Y J, WANG C. *Internal Medicine* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.
- [17] CALCAGNO C, PÉREZ-MEDINA C, MULDER W J M, et al. Whole-body atherosclerosis imaging by positron emission tomography/magnetic resonance imaging: from mice to nonhuman Primates [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(5): 1123-1134.
- [18] 叶鹏飞, 郭应坤, 张怡, 等. 构建兔颈总动脉粥样硬化斑块模型的新方法及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3): 301-306.
YE P F, GUO Y K, ZHANG Y, et al. Establishment and evaluation of a rabbit model of carotid atherosclerotic plaque [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(3): 301-306.
- [19] KAMATO D, ILYAS I, XU S, et al. Non-mouse models of atherosclerosis: approaches to exploring the translational potential of new therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12964.
- [20] 田硕, 曹利华, 苗明三, 等. 基于临床中西医病症特点的中医药动物模型评价新方法 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(6): 165-169.
TIAN S, CAO L H, MIAO M S, et al. A new method for the evaluation of animal models used in traditional Chinese Medicine based on the clinical characteristics of Chinese and Western medicine [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2017, 33(6): 165-169.
- [21] 张伯礼, 吴勉华. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
ZHANG B L, WU M H. *Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine* [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2017.
- [22] 王艳, 武东杰, 辛红艳, 等. 彩色多普勒超声、CTA 对脑卒中颈动脉粥样硬化的诊断价值对比研究 [J]. *临床医学工程*, 2022, 29(11): 1483-1484.
WANG Y, WU D J, XIN H Y, et al. Comparative study on the diagnostic value of color Doppler ultrasound and CTA in the diagnosis of carotid atherosclerosis in stroke [J]. *Clin Med Eng*, 2022, 29(11): 1483-1484.
- [23] 易琼, 李雅, 郭志华, 等. 基于“心受气于脾”探讨心痛泰调控 p38 MAPK/AP-1 对动脉粥样硬化兔的中医证候和 VSMC 胶原纤维的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(19): 56-65.
YI Q, LI Y, GUO Z H, et al. Effect of Xintongtai regulating p38 MAPK/AP-1 on traditional Chinese medicine syndrome score and collagen fibers in VSMCs of rabbits with atherosclerosis: an exploration based on theory of heart receiving qi from spleen [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(19): 56-65.
- [24] 国家中医药管理局. 中医内科学病证诊断疗效标准: ZY/T001.1-94 [S]. 1994.
National Administration of Traditional Chinese Medicine. *Diagnosis and Efficacy standard of Internal Medicine: ZY/T001.1-94* [S]. 1994.
- [25] 杨琳, 董莉, 陶红, 等. 鼠类动脉粥样硬化模型的制备 [J]. *心肺血管病杂志*, 2013, 32(6): 806-808.
YANG L, DONG L, TAO H, et al. Preparation of atherosclerosis model in rats [J]. *J Cardiovasc Pulm Dis*, 2013, 32(6): 806-808.
- [26] 陈文明, 蹇明辉, 赵然尊, 等. 人参皂苷 Rg3 对大鼠颈动脉球囊损伤模型 PCNA、CyclinD1 及 CDK4 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(5): 1162-1165.
CHEN W M, JIAN M H, ZHAO R Z, et al. Effect of ginsenoside Rg3 on the expression of PCNA, CyclinD1 and CDK4 in rat carotid balloon injury model [J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(5): 1162-1165.
- [27] 刘欣, 易丽贞, 吴雪芬, 等. 动脉粥样硬化兔模型建立的研究概况 [J]. *湖南中医杂志*, 2021, 37(4): 192-196.
LIU X, YI L Z, WU X F, et al. General situation of research on the establishment of rabbit model of atherosclerosis [J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2021, 37(4): 192-196.
- [28] 周思静, 罗诗雯, 潘永豪, 等. 球囊损伤动物模型建立与运用的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(12): 1098-1104.
ZHOU S J, LUO S W, PAN Y H, et al. Progressing on methods of creating balloon injury animal model and its application [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(12): 1098-1104.
- [29] 范丽红, 黄河, 方园, 等. 隔药饼灸对高血脂症合并动脉粥样硬化兔 ADPN、MMP-3 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(1): 117-121.
FAN L H, HUANG H, FANG Y, et al. Effects of herbal cake-separated moxibustion on the expression of serum ADPN, MMP-3 in rabbits with hyperlipidaemia and atherosclerosis [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(1): 117-121.
- [30] 张涛, 蒋知新, 杜大勇, 等. 秋水仙碱对新西兰兔不稳定斑块形成的影响研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 365-373.
ZHANG T, JIANG Z X, DU D Y, et al. Effect of colchicine on unstable plaque formation in New Zealand rabbits [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 365-373.
- [31] 李静, 郭志华, 刘建和, 等. 冠心病心血瘀阻证模型大鼠的建立及方药评价 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(1): 86-93.
- [32] 李静, 郭志华, 刘建和, 等. 基于代谢组学探讨血府逐瘀汤对冠心病心血瘀阻证模型大鼠的疗效机制 [J]. *中国中药药*

- 志, 2023, 48(20): 5623-5631.
- LI J, GUO Z H, LIU J H, et al. Efficacy and mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction on model rats of coronary heart disease with heart blood stasis syndrome based on metabolomics [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(20): 5623-5631.
- [33] 杨莉红, 成英, 孙月, 等. 实时剪切波超声弹性成像技术评价兔腹主动脉粥样硬化斑块易损性的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2018, 34(5): 460-462.
- YANG L H, CHENG Y, SUN Y, et al. Experimental study on real-time shear wave ultrasonic elastography in evaluating the vulnerability of atherosclerotic plaques in abdominal aorta of rabbits [J]. Chin J Ultrasound Med, 2018, 34(5): 460-462.
- [34] 靳宏光, 朱星, 李铁, 等. 痰瘀同治法对动脉粥样硬化大鼠易损斑块的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(10): 2150-2153.
- JIN H G, ZHU X, LI T, et al. Effect of phlegm and blood stasis therapy on vulnerable plaque in atherosclerotic rats [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(10): 2150-2153.
- [35] 李磊, 刘建勋, 任建勋, 等. 小型猪痰瘀互结证冠心病的方证相应研究 [J]. 药学报, 2017, 52(11): 1698-1704.
- LI L, LIU J X, REN J X, et al. Relationship between prescription and syndrome on mini-swine phlegm-stasis syndrome of coronary heart disease [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(11): 1698-1704.
- [36] 徐雁云, 潘永明, 黄俊杰, 等. 西藏小型猪颈动脉粥样硬化模型的建立及评价研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 287-295.
- XU Y Y, PAN Y M, HUANG J J, et al. Establishment and disease characteristics of a carotid atherosclerosis model in Tibet mini-pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 287-295.
- [37] 方永军, 胡亚莉, 范小璇, 等. 大黄蛰虫丸对颈动脉粥样硬化家兔颈动脉狭窄程度、血脂指标及斑块的影响研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(5): 81-85.
- FANG Y J, HU Y L, FAN X X, et al. Impact of Dahuang Zhechong pill on degree of carotid stenosis, blood lipid parameters and plaques in rabbits with carotid atherosclerosis [J]. Pract J Card Cereb Pneu Vasc Dis, 2019, 27(5): 81-85.
- [38] LEE Y T, LIN H Y, CHAN Y W, et al. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances [J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1): 12.
- [39] 郑双, 谭伟江, 李想, 等. 紫苏籽提取物在 ApoE^{-/-}小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 683-691.
- ZHENG S, TAN W J, LI X, et al. Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 683-691.
- [40] 张华, 苗文艳, 徐正伟, 等. 天香丹对动脉粥样硬化模型小鼠 TLR4/NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2023, 32(1): 47-50.
- ZHANG H, MIAO W Y, XU Z W, et al. Effects of Tianxiang Dan on TLR4/NF-κB signaling pathway in atherosclerosis model mice [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2023, 32(1): 47-50.
- [41] ZHOU L, LONG J, SUN Y, et al. Resveratrol ameliorates atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS in ApoE^{-/-} mice and inhibits the activation of CD4⁺ T cells [J]. Nutr Metab, 2020, 17: 41.
- [42] 徐松涛, 李嘉颖, 沈利叶, 等. 超声、高分辨率磁共振成像技术在诊断评估兔颈动脉粥样硬化中的应用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 9-16.
- XU S T, LI J Y, SHEN L Y, et al. Application of ultrasound and high-resolution magnetic resonance imaging in the diagnosis and evaluation of carotid atherosclerosis in rabbits [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 9-16.
- [43] ZHANG Y, DING J, WANG Y, et al. Guanxinkang decoction attenuates the inflammation in atherosclerosis by regulating efferocytosis and MAPKs signaling pathway in LDLR^{-/-} mice and RAW_{264.7} cells [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 731769.
- [44] 梁英权, 韩际宏, 余茂耘. 霍山石斛对高脂诱导的 LDLR 基因敲除小鼠动脉粥样硬化和血管钙化的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(11): 930-935.
- LIANG Y Q, HAN J H, YU M Y. *Dendrobium Huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng inhibits the development of atherosclerosis and vascular calcification induced by high-fat diet in LDLR^{-/-} mice [J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(11): 930-935.
- [45] SATO T, YOSHIMURA M, SANDA T, et al. Changes in spontaneous thrombolytic activity during progression of atherosclerosis in Apo^{-/-} and LDLR^{-/-} double knockout mice [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(9): 4521-4528.
- [46] YANG Y, FENG K, YUAN L, et al. Compound Danshen Dripping Pill inhibits hypercholesterolemia/atherosclerosis-induced heart failure in ApoE and LDLR dual deficient mice *via* multiple mechanisms [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(3): 1036-1052.
- [47] ACHNER L, KLERSY T, FELS B, et al. AFM-based nanoindentation indicates an impaired cortical stiffness in the AAV-PCSK9^{DY} atherosclerosis mouse model [J]. Pflugers Arch, 2022, 474(9): 993-1002.
- [48] ZHANG Y, XU R, LI X, et al. Effects of icariin on long noncoding RNA and mRNA expression profile in the aortas of apoE-deficient mice [J]. Biosci Rep, 2019, 39(7): BSR20190855.
- [49] 刘艳文, 刘水清, 林少伟, 等. 毛蕊花糖苷调节 HMGB1/RAGE/NF-κB 信号通路对动脉粥样硬化大鼠内皮功能障碍的影响 [J]. 天津医药, 2023, 51(12): 1339-1343.
- LIU Y W, LIU S Q, LIN S W, et al. Effect of verbascoside regulating HMGB1/RAGE/NF-κB signaling pathway on endothelial dysfunction in atherosclerotic rats [J]. Tianjin Med J, 2023, 51(12): 1339-1343.
- [50] YANG J X, WU S, HUANG X L, et al. Hypolipidemic activity and antiatherosclerotic effect of polysaccharide of *Polygonatum sibiricum* in rabbit model and related cellular mechanisms [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 391065.

- [51] 唐云, 张建影, 易琼, 等. 心痛泰对动脉粥样硬化兔血清 IL-1、TNF- α 及主动脉 MPO 表达的影响 [J]. 中医药导报, 2020, 26(14): 13-16.
TANG Y, ZHANG J Y, YI Q, et al. Effect of Xintongtai on the expression of serum IL-1, TNF- α and aortic MPO in atherosclerotic rabbits [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 26(14): 13-16.
- [52] 张晓奇, 孙月, 杨寒凝, 等. 超声结合病理评估多种制备兔腹主动脉粥样硬化斑块模型方法 [J]. 中国超声医学杂志, 2020, 36(1): 73-76.
ZHANG X Q, SUN Y, YANG H N, et al. Multiple methods for the preparation of rabbit abdominal aortic atherosclerotic plaque models by ultrasound combined with pathology [J]. Chin J Ultrasound Med, 2020, 36(1): 73-76.
- [53] 黄曾艳, 彭春丽, 黄曼萍, 等. 肝郁型动脉粥样硬化小鼠模型建立及与易损斑块的相关性研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(1): 68-73.
HUANG Z Y, PENG C L, HUANG M P, et al. Establishment of atherosclerosis mouse model of liver depression type and its correlation with vulnerable plaque [J]. J Basic Chin Med, 2022, 28(1): 68-73.
- [54] 杜高乐, 姜钧文. 健脾祛痰方对限制活动 ApoE^{-/-} 小鼠体成分/行为学变化的影响 [J]. 中医临床研究, 2024, 16(4): 16-20, 25.
DU G L, JIANG J W. Effect of Jianpi qutan recipe on body composition/behavioral changes of ApoE^{-/-} mice with limited activity [J]. Clin J Chin Med, 2024, 16(4): 16-20, 25.
- [55] 郭文鹤, 黄娜娜, 张晓亮, 等. 动脉粥样硬化(气滞血瘀证) 病证结合大鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 32-41.
GUO W H, HUANG N N, ZHANG X L, et al. A study on a rat model of atherosclerosis with qi stagnation and blood stasis syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 32-41.
- [56] 白云绮, 李慧, 宋珂, 等. ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型的中医证型 [J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 71-76.
BAI Y Q, LI H, SONG K, et al. Preliminary study on TCM syndromes of ApoE^{-/-} mouse atherosclerosis model [J]. World Chin Med, 2021, 16(1): 71-76.
- [57] 孙龙飞, 安冬青, 马文慧, 等. 天香丹对动脉粥样硬化秽浊痰阻证 ApoE(-/-) 小鼠 MMP-9 和 TIMP-1 的影响 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(9): 1505-1508, 1512.
SUN L F, AN D Q, MA W H, et al. The effect of Tianxiangdan on the expression of matrix metalloproteinases-9 and tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1 of atherosclerotic in ApoE(-/-) mice [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2015, 24(9): 1505-1508, 1512.
- [58] 李亮. 基于自噬探讨小檗碱抗湿证动脉粥样硬化的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
LI L. The study on the mechanism of berberine anti-atherosclerosis with damp-heat syndrome based on autophagy theory [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2020.
- [59] 黄烁, 刘建勋, 李磊, 等. 4 种冠心病气虚血瘀证大鼠模型建立方法的比较 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4216-4225.
HUANG S, LIU J X, LI L, et al. Comparison of 4 types of coronary heart disease model of Qi-deficiency and blood-stasis syndrome in rats [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(22): 4216-4225.
- [60] 唐汉庆, 卢兰, 李晓华, 等. 附子注射液对冠心病心脾阳虚证模型大鼠离体心肌的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(8): 933-935, 976.
TANG H Q, LU L, LI X H, et al. Effect of aconite injection on myocardial of spleen Yang deficiency rats model of coronary heart disease [J]. J Basic Chin Med, 2015, 21(8): 933-935, 976.
- [61] 王朋, 杨明会, 李绍旦, 等. 冠心病心绞痛寒凝血瘀证动物模型的建立 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(3): 309-311.
WANG P, YANG M H, LI S D, et al. Establishment of coronary heart disease and angina pectoris syndrome of cold coagulation and blood stasis animal model [J]. J Basic Chin Med, 2014, 20(3): 309-311.
- [62] 刘德敏, 裴东果, 崔炜. 高脂饲料与丙基硫氧嘧啶及维生素 D3 对动脉粥样硬化大鼠主动脉瓣膜厚度的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(4): 337-340.
LIU D M, PEI D G, CUI W. Influence of high-fat plus propylthiouracil diet and vitamin D3 on aortic valve thickness in SD rats [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2017, 31(4): 337-340.
- [63] 于丽娜, 耿巍, 胡莹, 等. IL-6、CRP 在高脂喂养联合球囊损伤所致动脉粥样硬化中的表达 [J]. 心血管康复医学杂志, 2021, 30(6): 649-653.
YU L N, GENG W, HU Y, et al. Expression of IL-6 and CRP in atherosclerosis caused by high-fat feeding combined balloon injury [J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med, 2021, 30(6): 649-653.

[收稿日期] 2024-03-23

张芳之, 苗芙蕊, 范郁山, 等. 基于中西医临床病证特点的强直性脊柱炎动物模型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 128-138.

Zhang FZ, Miao FR, Fan YS, et al. Analysis of ankylosing spondylitis animal model based on clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicine [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 128-138.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.015

基于中西医临床病证特点的强直性脊柱炎 动物模型分析

张芳之, 苗芙蕊*, 范郁山, 贺煜竣

(广西中医药大学针灸推拿学院, 南宁 530001)

【摘要】 强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种以骶髂关节炎、脊柱关节炎为主要表现的自身免疫性疾病。该病好发于青壮年男性,致残率高,严重威胁患者生命健康。临床常用的治疗药物中生物制剂价格昂贵,激素、非甾体抗炎药、抗风湿药不良反应多。中医药可调节免疫、抗炎,临床疗效佳。为了深入研究强直性脊柱炎的发病机理和治疗药物、方法的研发及筛选,本文总结了现有强直性脊柱炎动物模型造模方法、机制及分析模型优缺点,对动物模型的中西医病证特点进行对比,评价中西医病证吻合度。构建中西医病证吻合度更高的强直性脊柱炎动物模型是中医药治疗强直性脊柱炎的关键。本文分析动物模型中西医病证吻合度,以期为强直性脊柱炎的中药研发、针灸治疗等中医疗法奠定基础。

【关键词】 强直性脊柱;动物模型;临床病症特点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0128-11

Analysis of ankylosing spondylitis animal model based on clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicine

ZHANG Fangzhi, MIAO Furui*, FAN Yushan, HE Yujun

(Faculty of Acupuncture, Moxibustion and Tuina of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

【Abstract】 Ankylosing spondylitis is an autoimmune disease with sacroiliac arthritis and spinal arthritis as the main manifestations. The disease mainly occurs in young men, has a high disability rate, and is a serious threat to the life and health of patients. Biological agents are expensive, and many adverse reactions to hormones, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and anti-rheumatic drugs have been recorded. Traditional Chinese medicine can regulate the immunity and anti-inflammatory effects of the disease, and has good clinical effects. To promote the further study of the pathogenesis of ankylosing spondylitis and the development and screening of therapeutic drugs and therapies, in this paper, we summarize the method and mechanisms of modeling of the existing animal model of ankylosing spondylitis and analyze the advantages and disadvantages of the model. To evaluate the agreements between Chinese and Western medicine clinical characteristics, we compare the characteristics of Chinese and Western medical syndromes of the animal model. Building an

【基金项目】 国家自然科学基金(82260983);广西壮族自治区中医药管理局中医药人才队伍建设专项范郁山广西名中医传承工作室(2023017-05-07);广西中医药大学博士科研启动基金项目(2023BS017);广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2023149)。

【作者简介】 张芳之(1993—),女,博士研究生,研究方向:针灸治疗内分泌和代谢疾病的基础与应用研究。E-mail:2859961032@qq.com

【通信作者】 苗芙蕊(1985—),女,硕士生导师,副主任医师,研究方向:针灸治疗内分泌和代谢疾病的基础与应用研究。

E-mail: snowymiao@163.com

animal model of ankylosing spondylitis with a higher degree of consistency between traditional Chinese and Western medicine is the key to innovative research into traditional Chinese medicine method of treating ankylosing spondylitis. To lay the foundation for research into traditional Chinese medicines and acupuncture for ankylosing spondylitis, this paper analyzes the degree of concurrence between the Chinese and Western medicine clinical characteristics of animal models.

[Keywords] ankylosing spondylitis; animal model; clinical syndrome characteristics

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

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种严重的慢性炎症性疾病,主要累及中轴骨骼,影响脊柱和骶髂关节,常伴有关节外器官症状,如炎症肠病、葡萄膜炎、AS 相关心血管疾病等。据统计表明,AS 全球患病率约为 0.2%~1.4%^[1]。该病好发于青壮年男性,致残率高,严重威胁患者生命健康。目前西医治疗 AS 多采用激素、非甾体抗炎药、抗风湿药、生物制剂等。药物治疗 AS 疗效尚可,但不良反应多,如耐药性、胃肠道反应、肝肾毒性等,且价格昂贵,需长期用药,停药易复发。中药复方治疗 AS 疗效确切,可调节机体免疫,控制炎症,发展前景广阔^[2-3]。因此 AS 的中药创新研发意义重大。与中医证型相似度高的动物模型是中药研发的关键因素。目前 AS 模型众多,造模方法各异,不同模型症状有一定差异。临床研究主要以构建西医疾病模型为主,鲜见中医证候模型。本文通过分析 AS 动物模型的中西医病证吻合度,为构建完善的中医证候动物模型提出建议,推进中药新药研发及针灸治疗等中医疗法的发展。

1 AS 病因病机

1.1 AS 西医病因病机

AS 的发病机制复杂,病因不清。现代医学认为 AS 的致病因素有遗传因素、免疫因素、微生物感染、内分泌因素等^[4-5]。AS 的发病关键是炎症反应和后期的病理性新骨生成。炎症导致了组织最初的损伤,随后出现愈合和修复,最后通过机械因素等独立机制导致骨骼再造,新骨生成,导致强直^[6]。AS 是一种由多种致病途径和细胞类型介导的疾病,近来研究强调了局部免疫代谢环境、肠道免疫轴和 T 细胞可塑性在疾病发病机制中的重要性^[7]。

1.2 AS 中医病因病机

中医将 AS 归属于“大偻”“肾痹”“督痹”“竹节风”“龟背风”等范畴,认为其病位在筋骨,病因病机为本虚标实。“大偻”首次见于《黄帝内经》,“阳气者,精则养神,柔则养筋。开阖不得,寒气从之,乃生大偻”,表述了大偻的病因病机。《素问·痹论

篇》谓:“肾痹者,善胀,尻以代踵,脊以代头”,指出“肾痹”的症状是脊背屈曲。中医辨证将其分为湿热痹阻、寒湿痹阻、瘀血痹阻、肾阳亏虚、肝肾不足等^[8]。中医认为肾主骨,肝主筋,肾精亏虚不能充髓,则骨骼失去濡养,肝血亏虚,则不能荣养筋骨。肝肾不足,正虚则外邪侵袭,风寒湿邪乘虚而入,邪滞经脉,不通则痛。如《素问》指出:“风寒湿三气杂至合而为痹也”。《诸病源候论》亦谓:“肝主筋而藏血。血为阴,气为阳。阳气,精则养神,柔则养筋。阴阳和同,则气血调适,共相荣养也,邪不能伤。若虚则受风,风寒搏于脊脊之筋,冷则挛急,故令背偻。”兼之久病多虚、多瘀,寒湿之邪日久化痰化瘀,痰瘀互结,胶着筋脉,发为背偻。

2 AS 中西医诊断标准

2.1 AS 西医诊断标准

西医诊断标准根据国际脊柱关节炎协会(ASAS)公布的 2009 年 ASAS 标准^[9]拟订。脊柱关节炎的分类和诊断标准:(1)临床表现:①炎症性腰痛 ≥ 3 个月,发病年龄 <45 岁;②X 线或 MRI 提示骶髂关节炎兼 1 个及以上 SpA 特征;③HLA-B27 阳性兼 2 个及以上 SpA 特征。(2)SpA 特征:①炎症性腰痛;②起止点炎;③关节炎;④指(趾)炎;⑤葡萄膜炎;⑥炎症性肠病;⑦银屑病;⑧SpA 家族史;⑨非甾体类抗炎药疗效好;⑩HLA-B27 阳性;⑪CRP 升高。临床表现中符合①、②或①、③者均可诊断为中轴型脊柱关节病,中轴型脊柱关节病中放射学阳性者可诊断为强直性脊柱炎。根据动物可出现的症状总结如下:①中轴关节炎;②炎症性腰痛;③HLA-B27 阳性;④起止点炎;⑤外周关节炎;⑥指(趾)炎;⑦葡萄膜炎;⑧炎症性肠病;⑨牛皮癣样皮肤或指甲病变;在判断与西医临床症状匹配度时符合①则赋值 20%,其余每一项赋值 10%。

2.2 AS 中医诊断标准

中医诊断标准根据《中药新药临床研究指导原则 试行》^[8]拟订。每个证型主症总赋值 70%,次症总赋值 30%,总分 100%,主症、次症每一小项赋值具体见表 1。

表 1 强直性脊柱炎中医辨证分型

Table 1 Traditional Chinese medicine syndrome differentiation and typing of ankylosing spondylitis

辨证分型 Syndrome differentiation and classification	主症 Main symptoms	次症 Secondary symptoms	舌脉 Tongue and pulse	赋值 Assignment
湿热痹阻证 Damp heat obstruction syndrome	①晨僵;②发热;③脊背、腰骶疼痛;④脊柱活动度受限;⑤目赤肿痛;⑥四肢关节红肿热痛 ① Morning stiffness; ② fever; ③ pain in the back and lower back; ④ limited spinal mobility; ⑤ swelling and pain in the eyes; ⑥ redness, swelling, heat and pain in the joints of the limbs	①口干不欲饮或口渴;②肢体困重;③大便干;④小便黄 ① Dry mouth, no desire to drink or thirst; ② limb fatigue and heaviness;; ③ dry stool; ④ yellow urine	舌质红,苔黄厚腻或黄,脉滑数 Red tongue yellow, thick and greasy or yellowish moss, slippery pulse	符合 1 项主症时赋值 11.7%,符合 1 项次症赋值 7.5% 11.7% when 1 main symptom is met, 7.5% when 1 secondary symptom is met
寒湿痹阻证 Cold dampness obstruction syndrome	①腰骶、脊背疼痛;②脊柱活动度受限;③遇寒晨僵加重,遇热晨僵减轻 ① Lumbosacral and back pain; ② limited spinal mobility; ③ aggravated morning stiffness when encountering cold, and reduced morning stiffness when encountering heat	①肢体困重;②四肢冷痛 ① Limb fatigue and heaviness; ② cold pain in limbs	舌质淡,苔水滑或白,脉弦滑 Pale tongue, watery or white moss, stringy and slippery pulse	符合 1 项主症时赋值 23.3%,符合 1 项次症赋值 15% 23.3% when 1 main symptom is met, 15% when 1 secondary symptom is met
瘀血痹阻证 Stagnation of blood stasis and obstruction syndrome	①晨僵;②腰骶、脊背疼痛;③疼痛夜间加重,或刺痛;④脊柱活动度受限 ① Morning stiffness; ② lumbosacral and back pain; ③ pain worsens at night, or stings; ④ limited spinal mobility	①肌肤干燥少泽 ① Dry and dull skin	舌质暗或见瘀斑,脉涩或沉细 Dark tongue or petechiae, astrigent or fine pulse	符合 1 项主症时赋值 17.5%,符合 1 项次症赋值 30% 17.5% when 1 main symptom is met, 30% when 1 secondary symptom is met
肾阳亏虚证 Kidney Yang deficiency syndrome	①晨僵;②腰、脊背、足跟疼痛;③脊柱活动度受限;④手足不温,畏寒喜暖,局部冷痛 ① Morning stiffness; ② pain in the waist, back and heels; ③ limited spinal mobility; ④ lukewarm hands and feet, aversion to cold and warmth, and local cold pain	①面色不华;②精神不振;③腰膝酸软;④遗精;⑤阳痿 ① Poor complexion; ② low spirits; ③ sore waist and knees; ④ nocturnal emission; ⑤ impotence	舌质淡,苔白,脉沉细 Tongue pale, moss white, veins sunken and fine	符合 1 项主症时赋值 17.5%,符合 1 项次症赋值 6% 17.5% when 1 main symptom is met, 6% when 1 secondary symptom is met
肝肾不足证 Syndrome of liver and kidney deficiency	①晨僵;②腰膝酸软;③腰骶、脊背、足跟疼痛;④脊柱活动度受限;⑤眩晕耳鸣;⑥局部酸痛 ① Morning stiffness; ② soreness and weakness in the waist and knees; ③ pain in the lumbosacral, spinal, and heel regions; ④ limited spinal mobility; ⑤ dizziness and tinnitus; ⑥ local soreness and pain	①盗汗;②手足心热;③肌肉瘦削 ① Night sweats; ② hot palms and feet; ③ thin muscles	舌质红,苔少或见剥脱,脉细数或沉细 Red tongue, scanty or flaking moss, fine or subtle pulse	符合 1 项主症时赋值 11.7%,符合 1 项次症赋值 10% 11.7% when 1 main symptom is met, 10% when 1 secondary symptom is met

3 AS 动物模型研究现状分析

AS 动物模型造模方式大致可分为 4 类,分别是附着点炎动物模型、HLA-B27 转基因动物模型、炎症诱导的动物模型和其他动物模型。目前多以大鼠和小鼠为建模对象。鼠类价格低、饲养方便、生命周期短、操作简单,是良好的模型对象。AS 动物模型也有犬科、熊科及灵长类动物^[10],但因其影响因

素多、价格昂贵、饲养难度高,很少研究。文中对 AS 常见动物模型的造模方法和特点进行对比分析,参照中医证型诊断标准,进行中西医病证吻合度分析,见表 2。HLA-B27 转基因大鼠模型与西医吻合度高,临床表现相似度高,与中医吻合度在所有模型中较高,符合中医肾阳亏虚证,但其操作复杂,技术难度高、价格昂贵,难以广泛运用。HLA-B27 转基因小鼠模型中医吻合度在所有模型中较高,但因

其发病未涉及中轴关节,不合适进行研究。SKG 小鼠模型西医吻合度一般,中医吻合度在所有模型中最高,符合中医湿热痹阻证,有利于研究 AS 的中医致病机制。BALB/c 小鼠模型西医吻合度一般,中医吻合度低,符合中医湿热痹阻证,其操作简单,成模率高,疾病进程与人类相似,是较有价值的动物模型。TNF^{ΔARE} 小鼠模型操作复杂,周期长,西医吻合度一般,中医吻合度低,符合中医肝肾不足证,该法利用基因工程技术,特异性敲除 TNF 中的 ARE 序列,与人类 AS 相似度尚可,适合研究人类肠道关节轴疾病相关机制。但此造模方法价格昂贵,技术难度高,不易推广。tmTNF 小鼠模型中医、西医吻合度低,符合中医肝肾不足证。tmTNF 小鼠的病理学

与脊柱关节病患者的病理学相似度高,早期炎症阶段表现为受影响关节的附着点炎和滑膜炎,特征是嗜中性粒细胞浸润和间充质细胞积聚;随后,炎症的消退伴随异位骨形成,导致关节强直^[11]。该模型利于评估针对疾病不同阶段的人类疗法的疗效。不足之处为利用转基因技术造模,周期长,技术要求严格。DBA/1 小鼠为自发性关节炎模型,操作简单,中西医吻合度低,符合中医肝肾不足证,是研究性别、压力、炎症和与人类关节炎之间关系的重要工具。(BXSb×NzB)F1 小鼠模型中西医吻合度均低,发病未涉及中轴关节,但适用于识别在疾病发病机制中多重易感性等位基因的相互作用和阐明环境因素和遗传在不同疾病表型(如强直性附着点

表 2 强直性脊柱炎动物模型中西医病证评价

Table 2 Evaluation of traditional Chinese and Western medicine syndrome in ankylosing spondylitis animal models

分类 Classification	模型 Model	造模方法 Modeling method	模型特点 Model characteristics	机制 Mechanism	临床符合度 Clinical compliance
HLA-B27 转基因动物模型 HLA-B27 transgenic animal model	Lewis 大鼠、Fisher 大鼠 ^[14-17] Lewis Fisher rats ^[14-17]	将 6.5 kb EcoR I 片段(含 HLA-B * 2705 基因)和 15 kb Sall-PvuII 片段(含人 β2-微球蛋白基因)显微注射入大鼠受精卵,构建双转基因大鼠模型 A double transgenic rat model was constructed by microinjecting a 6.5 kb EcoR I fragment (containing the HLA-B * 2705 gene) and a 15 kb Sall-PvuII fragment (containing the human β2-microglobulin gene) into the fertilized eggs of rats	优点:与人类脊柱关节炎的临床和组织学相似度高 缺点:操作复杂,价格昂贵,技术要求高 Advantages: high clinical and histologic similarity to human spondyloarthropathies Disadvantages: complex, expensive and technically demanding operation	发病机制不明确,可能与同源二聚体形成 ^[18-20] 、HLA-B27 错误折叠 ^[21] 、肠道生态失调相关 ^[22-25] Pathogenesis is unclear and may be associated with homodimer formation ^[18-20] , HLA-B27 misfolding ^[21] , and intestinal ecological dysregulation ^[22-25]	符合西医临床表现:①中轴关节炎;②炎性腰背痛;③HLA-B27 阳性;④外周关节炎;⑤指(趾)炎;⑥葡萄膜炎;⑦炎症性肠病;⑧牛皮癣样皮肤或指甲病变;吻合度 90%;符合中医肾阳亏虚证,主症:①晨僵;②腰、脊背、足跟疼痛;次症:③精神不振;④阳痿;吻合度 47% Consistent with clinical manifestations in western medicine: ① axial arthritis; ② inflammatory low back pain; ③ HLA-B27 positive; ④ peripheral arthritis; ⑤ finger (toe) inflammation; ⑥ uveitis; ⑦ inflammatory bowel disease; ⑧ psoriasis like skin or nail lesions, with a 90% degree of anastomosis; In line with the traditional Chinese medicine kidney yang deficiency syndrome, the main symptoms are: ① morning stiffness; ② pain in the waist, spine, and heel; Secondary symptoms: ③ mental depression; ④ erectile dysfunction; consistency 47%
小鼠 ^[26] Mice ^[26]	(β2m ^{-/-} · HLA-B27) F1 产生的 B27+ 后代互相杂交以获得 B27+ β2m ^{-/-} 动物模型 B27 + progeny from (β2m ^{-/-} · HLA-B27) F1 were crossed with each other to obtain a B27 + β2m ^{-/-} animal model		优点:与人类疾病部分临床表现类似 缺点:耗时长,有性别差异,雄性较雌性症状更严重,发病未涉及中轴关节,不合适进行研究 Advantages: similar to some of the clinical manifestations of the disease in humans Disadvantages: time-consuming, gender differences, males have more severe symptoms than females, onset does not involve the mid-axial joints, unsuitable for studies		符合西医临床表现:⑤外周关节炎;⑥指(趾)炎;⑦牛皮癣样皮肤或指甲病变;吻合度 30%;符合中医瘀血痹阻,主症:①晨僵;次症:②肌肤干燥少泽;吻合度 47.5% Matches the clinical manifestations of Western medicine: ⑤ peripheral arthritis; ⑥ finger (toe) inflammation; ⑦ psoriasis-like skin or nail lesions; the degree of match is 30%; matches the Chinese medicine blood stasis obstruction, the main symptom: ① morning stiffness; the secondary symptom: ② skin dryness and lack of luster; the degree of match is 47.5%

续表 2

分类 Classification	模型 Model	造模方法 Modeling method	模型特点 Model characteristics	机制 Mechanism	临床符合度 Clinical compliance
炎症诱导的动物模型 Animal models of inflammation induction	SKG 小鼠 [27-32] SKG mice [27-32]	在 ZAP70 的 SH2 结构域上具有缺陷的 SKG 小鼠腹腔注射 β -葡聚糖或酵母多糖或通过阴道拭子将鼠衣原体接种到小鼠生殖道可诱导 SpA 疾病 SpA disease is induced in SKG mice with defects in the SH2 structural domain of ZAP70 by intraperitoneal injection of β -glucan or yeast polysaccharides or by inoculation of <i>Chlamydia muridarum</i> into the reproductive tract of mice by vaginal swabbing	优点: 周期短, 操作简单, 无性别差异 缺点: 注意饲养环境, 环境菌群变化会影响疾病严重程度 ^[33] Advantages: short cycle time, simple operation, no gender differences Disadvantages: pay attention to the rearing environment, changes in the environmental flora can affect the severity of the disease ^[33]	ZAP-70 是 T 细胞中关键的信号转导分子, 编码 ZAP-70 SH2 结构域的基因突变, 使胸腺中 T 细胞的阳性和阴性选择配对, 导致胸腺产生致关节炎自身免疫性 CD4 ⁺ T 细胞 ^[27] Mutations in the gene encoding the structural domain of ZAP-70 SH2, a key signaling molecule in T cells, pair positive and negative selection of T cells in the thymus, leading to the production of arthritogenic autoimmune CD4 ⁺ T cells in the thymus ^[27]	符合西医临床表现: ①中轴关节炎; ②炎性腰背痛; ⑤外周关节炎; ⑥指(趾)炎; ⑧炎症性肠病; ⑨牛皮癣样皮肤或指甲病变; 吻合度 70%; 符合中医湿热痹阻证, 主症: ①晨僵; ③脊背、腰骶疼痛; ⑤目赤肿痛; ⑥四肢关节红肿热痛; 次症: ②肢体困重; 吻合度 54.3% In line with the clinical manifestations of Western medicine: ① axial arthritis; ② inflammatory lower back pain; ⑤ peripheral arthritis; ⑥ finger (toe) inflammation; ⑧ inflammatory bowel disease; ⑨ psoriasis-like skin or nail lesions; with a degree of match of 70%; in line with the Chinese medicine of the damp-heat paralysis syndrome, the main symptom: ① morning stiffness; ③ spine, lumbar-sacral pain; ⑤ redness of the eyes and swelling pain; ⑥ redness, swelling, heat and pain of the joints of the limbs; the secondary symptom: ② heavy limb sleepiness; with a degree of match of 54.3%
	BALB/c 小鼠 ^[34-35] BALB/c mice ^[34-35]	BALB/c 小鼠腹膜内注射溶解于 100 μ L PBS (0.14 mol/L 氯化钠溶于 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.2) 中的蛋白多糖和弗氏完全佐剂, 1 周和 4 周后, 给小鼠重新注射 PBS 中的抗原和弗氏不完全佐剂 BALB/c mice were injected intraperitoneally with proteoglycans dissolved in 100 μ L of PBS (0.14 mol/L NaCl dissolved in 0.01 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.2) and Fuchs' complete adjuvant, and the mice were re-injected with antigens in PBS and Fuchs' incomplete adjuvant after 1 and 4 weeks	优点: 操作简单, 成模率高 缺点: 具有性别差异, 雌性小鼠患病率高 Advantages: easy to use, high modeling rate Disadvantages: gender differences, high prevalence of disease in female mice	蛋白聚糖的一些 T 细胞表位已被表征为显性/致关节炎, 由于人和小鼠蛋白聚糖之间的序列高度同源性, 用人蛋白聚糖对易感 BALB/c 小鼠进行免疫会引发对小鼠的自身免疫反应, 诱发关节炎和脊椎炎 ^[35] Some T-cell epitopes of proteoglycans have been characterized as dominant/arthritogenic, and immunization of susceptible BALB/c mice with human proteoglycans triggers an autoimmune response against the mice, inducing arthritis and spondylitis, due to a high degree of sequence homology between human and mouse proteoglycans ^[35]	符合西医临床表现: ①中轴关节炎; ②炎性腰背痛; ④起止点炎; ⑤外周关节炎; ⑥指(趾)炎; ⑨牛皮癣样皮肤或指甲病变; 吻合度 70%; 符合中医湿热痹阻证, 主症: ③腰骶、脊背疼痛; ④脊柱活动度受限; 次症: ②肢体困重; 吻合度 30.9% Clinical manifestations of Western medicine: ① mid-axis arthritis; ② inflammatory low back pain; ④ origin and destination inflammation; ⑤ peripheral arthritis; ⑥ dactylitis; ⑨ psoriasis-like skin or nail lesions, with a degree of match of 70%; in line with the Chinese medicine of the damp-heat paralysis syndrome: ③ lumbosacral, spinal and dorsal pain; ④ spinal mobility restriction; the secondary symptom: ② heavy limb sleepiness; with a degree of match of 30.9%

续表 2

分类 Classification	模型 Model	造模方法 Modeling method	模型特点 Model characteristics	机制 Mechanism	临床符合度 Clinical compliance
	TNF ^{ΔARE} 小鼠 ^[36-37] TNF ^{ΔARE} mice ^[36-37]	TNF ^{ΔARE} 模型造模方法为靶向敲除鼠 TNF 中 ARE 序列 TNF ^{ΔARE} model modeling method for targeted knockdown of ARE sequence in murine TNF	优点:成模率高; 缺点:操作复杂,技术难度大,价格昂贵 Advantages: high mold formation rate; Disadvantages: complex operation, technically difficult and expensive	TNF 调节因子 ARE 的缺失导致 TNF 过度表达,诱导肠道炎症和 SpA ^[36] Deletion of the TNF regulator ARE leads to TNF overexpression, inducing intestinal inflammation and SpA ^[36]	符合西医临床表现:①中轴关节炎;②炎性腰背痛;④起止点炎;⑤外周关节炎;⑧炎症性肠病;吻合度 60%;符合中医肝肾不足证,主症:③腰骶、脊背、足跟疼痛;④脊柱活动度受限;次症:③肌肉瘦削;吻合度 33.4% In line with the clinical manifestations of Western medicine: ① axial arthritis; ② inflammatory low back pain; ④ origin and destination inflammation; ⑤ peripheral arthritis, ⑧ inflammatory bowel disease; with a degree of match of 60%; in line with the Chinese medicine liver and kidney deficiency syndrome, the main symptom: ③ lumbosacral, spine, heel pain; ④ spinal mobility limitation; the secondary symptom: ③ thin muscles; with a degree of match of 33.4%
	TgA86 小鼠 ^[38,11] TgA86 mice ^[38,11]	将含有 muTNF _{Δ1-12} 珠蛋白杂交基因的 BamHI-Sal I 片段显微注射到 (CBA X C57BL/6) F2 杂交小鼠的受精卵中 BamHI-Sal I fragment containing the muTNF _{Δ1-12} bead protein hybrid gene was microinjected into fertilized eggs of (CBA X C57BL/6) F2 hybrid mice	优点:与人类病理表现相似度高,成模率高; 缺点:操作复杂,周期长 Advantages: high similarity to human pathological manifestations, high mold-forming rate; Disadvantages: complex operation, long cycle time	该转基因小鼠过度表达鼠 TNF 的突变跨膜蛋白 (muTNF _{Δ1-12}), 跨膜 TNF 通过协同 p55/p75 TNFR 信号传导介导其致关节炎活性 ^[38] This transgenic mouse overexpresses a mutant transmembrane protein of murine TNF (muTNF _{Δ1-12}), and transmembrane TNF mediates its arthritogenic activity through synergistic p55/p75 TNFR signaling mediates its arthritogenic activity ^[38]	符合西医临床表现:①中轴关节炎;②炎性腰背痛;④起止点炎;⑤外周关节炎;吻合度 50%;符合中医肝肾不足证,主症:③腰骶、脊背、足跟疼痛;④脊柱活动度受限;次症:③肌肉瘦削;吻合度 33.4% In line with the clinical manifestations of Western medicine: ① central axis arthritis; ② inflammatory low back pain; ④ origin and destination inflammation; ⑤ peripheral arthritis, with a degree of match of 50%; in line with the Chinese medicine liver and kidney deficiency syndrome, the main symptom: ③ pain in the lumbosacral region, spine, and heel; ④ limitation of spinal mobility; the secondary symptom: ③ thin muscles; with a degree of match of 33.4%
附着点炎的动物模型 Animal models of adhesion pitting	DBA/1 小鼠 ^[39-40] DBA/1 mice ^[39-40]	衰老雄性 DBA/1 小鼠 Senescent male DBA/1 mice	优点:与人类病理表现相似度高,成模率高,操作简单; 缺点:具有性别差异、环境差异,周期长 Advantages: high similarity to human pathological manifestations, high modeling rate, simple operation; Disadvantages: gender differences, environmental differences, long lead times	激素、衰老、环境、行为、压力等因素参与了 DBA/1 小鼠附着点炎、关节炎和关节强直的自发发展过程 ^[39-41] Hormonal, aging, environmental, behavioral, and stress factors are involved in the spontaneous development of attachment point inflammation, arthritis, and joint ankylosis in DBA/1 mice ^[39-41]	符合西医临床表现:④起止点炎;⑤外周关节炎;⑥指(趾)炎;⑨牛皮癣样皮肤或指甲病变;吻合度 40%;符合中医肝肾不足证,主症:①晨僵;⑥局部酸痛;次症:②手足心热;吻合度 33.4% In line with the clinical manifestations of Western medicine: ④ starting and ending point inflammation; ⑤ peripheral arthritis; ⑥ finger (toe) inflammation; ⑨ psoriasis like skin or nail lesions; 40% fit; in line with the Chinese medicine liver and kidney deficiency syndrome, the main symptoms: ① morning stiffness; ⑥ local soreness; the secondary symptom: ② hand, foot, and heart heat; with a fit rate of 33.4%

续表2

分类 Classification	模型 Model	造模方法 Modeling method	模型特点 Model characteristics	机制 Mechanism	临床符合度 Clinical compliance
	(BXSb × Nzb) F1 小鼠 ^[12] (BXSb × Nzb) F1 mice ^[12]	(BXSb × Nzb) F1 小鼠 (BXSb × Nzb) F1 mice	优点:操作简单,成模率高; 缺点:具有性别差异,雄性出现强直性附着点炎,雌性出现系统性红斑狼疮,发病未涉及中轴关节 Advantages: easy to perform, high rate of mold formation; Disadvantages: gender-specific, males present with ankylosing adhesion pemphigoid, females present with systemic lupus erythematosus, onset of disease does not involve the midshaft joints	源自 BXSb 和 Nzb 的易感性等位基因的联合作用参与了关节病的发病机制,可能与 IFN- γ 和 IL-17 上调介导 BMP 信号通路相关 ^[12] Combined action of susceptibility alleles derived from BXSb and Nzb is involved in the pathogenesis of arthropathy and may be associated with the upregulation of IFN- γ and IL-17 mediating the BMP signaling pathway ^[12]	符合西医临床表现:④起止点炎;⑤外周关节炎;吻合度 20%;符合中医肝肾不足证,主症:①晨僵;⑥局部酸痛;吻合度 23.4% In line with the clinical manifestations of Western medicine: ④ inflammation at the starting and ending points; ⑤ peripheral arthritis; 20% fit; In line with the traditional Chinese medicine liver and kidney deficiency syndrome, the main symptoms are: ① morning stiffness; ⑥ local soreness; fit 23.4%
	ANK/ ANK 小鼠 ^[42-43] ANK/ ANK mice ^[42-43]	ANK 突变小鼠的杂合子雄性后代与 (C3HeB/FeJ × C57BL/6J-A ^{W-1}) F1 杂交,杂交后代继续重复杂交以维持 ANK 基因 Heterozygous male progeny of ANK mutant mice were crossed with (C3HeB/FeJ × C57BL/6J-A ^{W-1}) F1, and the cross progeny continued to repeat the cross to maintain the ANK gene	优点:无性别差异,与人类 SpA 疾病相似度高; 缺点:周期长,操作复杂,小鼠进行性强直为非炎症介导 Advantages: no sex differences, high similarity to human SpA disease; Disadvantages: long cycle time, complex operation, progressive tons in mice is non-inflammatory mediated	ANK 编码一种转运无机磷酸盐的跨膜蛋白,ANK 功能丧失使焦磷酸盐沉积于细胞内,导致过量羟基磷灰石钙沉积,椎间盘或软骨钙化引起关节或脊柱强直 ^[42] ANK encodes a transmembrane protein that transports inorganic pyrophosphate, and loss of ANK function allows pyrophosphate to be deposited intracellularly, leading to excess calcium hydroxyapatite deposition and calcification of the intervertebral discs or cartilage resulting in ankylosis of the joint or spine ^[42]	符合西医临床表现:①中轴关节炎;②炎性腰背痛;⑤外周关节炎;⑥指(趾)炎;吻合度 50%;符合中医肝肾不足证,主症:①晨僵;③腰骶、脊背、足跟疼痛;④脊柱活动度受限;次症:③肌肉瘦削;吻合度 45.1% Consistent with clinical manifestations in Western medicine: ① axial arthritis; ② inflammatory lower back pain; ⑤ peripheral arthritis; ⑥ finger (toe) inflammation; 50% fit; In line with the traditional Chinese medicine liver and kidney deficiency syndrome, the main symptoms are: ① morning stiffness; ③ pain in the lumbosacral; spinal, and heel regions; ④ limited spinal mobility; and the secondary symptoms are: ③ thin muscles; fit 45.1%
其他动物模型 Other animal models	(MRL/rpl × C3H/lpr; MC) F1 小鼠 ^[44] (MRL/rpl × C3H/lpr; MC) F1 mice ^[44]	由两种 Fas 缺陷型小鼠进行杂交, (MRL/rpl × C3H/lpr; MC) F1 Hybridization by two Fas-deficient mice, (MRL/rpl × C3H/lpr; MC) F1	优点:操作简单,成模率高; 缺点:具有性别差异,雄性发病率高,发病未涉及中轴关节 Advantages: easy to perform, high rate of mold formation Disadvantages: gender differences, high incidence in males, onset of disease not involving the mid-axial joints	与 7 号染色体显性基因座和 Y 连锁基因座的共同作用相关 Associated with the co-occurrence of dominant and Y-linked loci on chromosome 7	符合西医临床表现:④起止点炎;⑤外周关节炎;吻合度 20%;符合中医肝肾不足证,主症:①晨僵;⑥局部酸痛;吻合度 23.4% It is consistent with the clinical manifestations of Western medicine: ④ origin and destination inflammation; ⑤ peripheral arthritis; the degree of coincidence is 20%; it is consistent with the evidence of insufficiency of liver and kidney in Chinese medicine, and the main symptoms are: ① morning stiffness; ⑥ localized aching pain; the degree of coincidence is 23.4%

续表2

分类 Classification	模型 Model	造模方法 Modeling method	模型特点 Model characteristics	机制 Mechanism	临床符合度 Clinical compliance
	A20 缺陷小鼠 ^[45-46] A20-deficient mice ^[45-46]	A20 ^{fl/fl} Cd11c-Cre 小鼠 A20 ^{fl/fl} Cd11c-Cre mice	优点:成模率高; 缺点:小鼠易死亡 Advantages: high rate of mold formation; Disadvantages: mice die easily	A20 可维持免疫稳态,抑制 NF-κB 活化,控制炎症反应。DC 中缺乏 A20 的小鼠会出现自发的 DC 激活、T 细胞激活和 T 细胞扩增导致免疫紊乱 ^[45] A20 maintains immune homeostasis, inhibits NF-κB activation, and controls inflammatory responses. Mice lacking A20 in DC develop spontaneous DC activation, T-cell activation, and T-cell expansion leading to immune disorders ^[45]	符合西医临床表现:①中轴关节炎;②炎性腰背痛;④起止点炎;⑤外周关节炎;⑧炎症性肠病;吻合度 60%;符合中医肝肾不足证,主症:①晨僵;③腰骶、脊背、足跟疼痛;④脊柱活动度受限;⑥局部酸痛;吻合度 46.8% Consistent with clinical manifestations in Western medicine: ① axial arthritis; ② inflammatory lower back pain; ④ starting and ending point inflammation; ⑤ peripheral arthritis; ⑧ inflammatory bowel disease; 60% fit; In line with the traditional Chinese medicine liver and kidney deficiency syndrome, the main symptoms are: ① morning stiffness; ③ pain in the lumbar, sacral, spinal, and heel regions; ④ limited spinal mobility; ⑥ local soreness; fit 46.8%

注:高吻合度,中医≥70%,西医≥75%;一般吻合度,50%≤中医<70%,55%≤西医<75%;低吻合度,中医<50%,西医<55%。
Note. High degree of anastomosis, traditional Chinese medicine ≥70%, Western medicine ≥75%. General fit, 50% ≤ traditional Chinese medicine <70%, 55% ≤ Western medicine <75%. Low degree of anastomosis, traditional Chinese medicine <50%, Western medicine <55%.

炎和系统性红斑狼疮)发展中的关系机制^[12]。ANK/ANK 小鼠模型中西医吻合度低,符合中医肝肾不足证,ANK/ANK 小鼠与人类 AS 影像学改变相似度高,但这种强直是非免疫介导的疾病^[13]。(MRL/lpr×C3H/lpr;MC) F1 小鼠模型中西医吻合度低,符合中医肝肾不足证。此模型适合研究 AS 附着点炎,但价格昂贵,耗时长,不易获得。A20^{fl/fl} Cd11c-Cre 小鼠模型西医吻合度一般,中医吻合度在所有动物模型中较高,符合中医肝肾不足证,此模型操作技术要求高,周期长,有待完善。表中动物模型西医吻合度较高,中医证型吻合度较低,在 AS 动物模型中难以体现中医诊断标准。

4 讨论

西医的非甾体药、抗风湿药、生物制剂均无法治愈 AS^[47]。中药有良好的抗炎作用,是治疗多种炎症和炎症相关疾病的有效方法^[48]。中医临床吻合度高的动物模型对中药研发具有重要意义。因此,建立高吻合度的 AS 中医动物模型势在必行。由于西医不同造模方法形成的动物模型倾向于不同的中医证型,笔者认为,可先规范验证各类西医造模方法与不同中医证型吻合度,在此基础上,根据所倾向的中医证型再进行二次造模,以提高中医证型临床吻合度。湿热痹阻证可通过将鼠置于人工气箱模拟的湿热环境,同时予高糖饲料、猪油、蜂

蜜水、二锅头等饲养^[49]造模;通过湿热评分^[50],临床关节炎分级^[51]评估模型。AS 寒湿痹阻证模型将鼠置于人工气候箱模拟的寒湿环境造模;通过行皮肤、毛发、大便等评分验证模型^[52]。AS 瘀血痹阻证模型通过游泳结合注射 10% 高分子右旋糖酐生理盐水液^[53]造模;模型验证通过观察鼠尾部皮肤状态,如是否出现鳞屑、脱皮进行评估。还可采集大鼠舌图像和测量大鼠耳廓血流灌注量验证模型^[54]。AS 肾阳亏虚证模型采用灌胃羟基脲^[55]二次造模,大鼠出现精神差、四肢温低、体重减轻、毛发杂乱、反应迟钝等表现,提示肾阳虚证型造模成功。肝肾亏虚证型的重要表现是骨质疏松^[56]。雌激素对维持骨稳态具有重要作用^[57]。有文献采取切除卵巢的方式进行肝肾不足型骨质疏松模型造模^[58]。此种造模方法值得参照。模型验证通过主证中的足跟疼痛评估,观察鼠是否跛行、舔舐足跟和附着点炎评分^[59]评估足跟疼痛。

表中动物模型西医吻合度较高,中医证型吻合度较低,在 AS 动物模型中难以体现中医诊断标准。目前尚无一致的动物中医证型评估方法,在探索中医药治疗 AS 时,后续应进一步构造吻合度更高的中西医病证模型,以期为中医药治疗 AS 提供科学基础。

参考文献:

[1] MA S, WANG D D, MA C Y, et al. MicroRNA-96 promotes

- osteoblast differentiation and bone formation in ankylosing spondylitis mice through activating the Wnt signaling pathway by binding to SOST [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15429–15442.
- [2] 牛晓庆, 吕水英, 张俊莉, 等. 补肾清热汤对肾虚湿热型强直性脊柱炎患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2023, 45(2): 435–439.
- NIU X Q, LYU S Y, ZHANG J L, et al. Clinical effects of Bushen Qingre Decoction on patients with ankylosing spondylitis due to Kidney Deficiency with Dampness-heat [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(2): 435–439.
- [3] 吕水英, 鲁超, 殷继超, 等. 补肝强腰方对活动期强直性脊柱炎肝肾亏虚证患者 TNF- α 、IL-37、COX-2 及骨代谢的影响 [J]. *中医学报*, 2022, 37(9): 1982–1987.
- LYU S Y, LU C, YIN J C, et al. Effects of Bugan Qiangyao Recipe on TNF- α , IL-37, COX-2 and bone metabolism in patients with active ankylosing spondylitis with liver and kidney deficiency syndrome [J]. *Acta Chin Med*, 2022, 37(9): 1982–1987.
- [4] ZHU W, HE X, CHENG K, et al. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments [J]. *Bone Res*, 2019, 7: 22.
- [5] REZAIEMANESH A, ABDOLMALEKI M, ABDOLMOHAMMADI K, et al. Immune cells involved in the pathogenesis of ankylosing spondylitis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 198–204.
- [6] PACHECO-TENA C, PÉREZ-TAMAYO R, PINEDA C, et al. Bone lineage proteins in the entheses of the midfoot in patients with spondyloarthritis [J]. *J Rheumatol*, 2015, 42(4): 630–637.
- [7] VORUGANTI A, BOWNESS P. New developments in our understanding of ankylosing spondylitis pathogenesis [J]. *Immunology*, 2020, 161(2): 94–102.
- [8] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- ZHENG X Y. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicine drugs: trial. [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2002.
- [9] SIEPER J, RUDWALEIT M, BARALIAKOS X, et al. The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(Suppl 2): ii1–ii44.
- [10] NUNN C L, ROTHSCHILD B, GITTLEMAN J L. Why are some species more commonly afflicted by arthritis than others? A comparative study of spondyloarthropathy in Primates and carnivores [J]. *J Evol Biol*, 2007, 20(2): 460–470.
- [11] CHRISTODOULOU-VAFEIADOU E, GEKA C, NTARI L, et al. Ectopic bone formation and systemic bone loss in a transmembrane TNF-driven model of human spondyloarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 232.
- [12] ABE Y, OHTSUJI M, OHTSUJI N, et al. Ankylosing enthesitis associated with up regulated IFN- γ and IL-17 production in (BXSb \times NZB) F(1) male mice: a new mouse model [J]. *Mod Rheumatol*, 2009, 19(3): 316–322.
- [13] LIN A, INMAN R D, STREUTKER C J, et al. Lipocalin 2 links inflammation and ankylosis in the clinical overlap of inflammatory bowel disease (IBD) and ankylosing spondylitis (AS) [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 51.
- [14] HAMMER R E, MAIKA S D, RICHARDSON J A, et al. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human β 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders [J]. *Cell*, 1990, 63(5): 1099–1112.
- [15] VAN TOK M N, SATUMTIRA N, DORRIS M, et al. Innate immune activation can trigger experimental spondyloarthritis in HLA-B27/Hu β 2m transgenic rats [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 920.
- [16] ARAUJO L M, JOUHAULT Q, FERT I, et al. Effects of a low-dose IL-2 treatment in HLA-B27 transgenic rat model of spondyloarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23(1): 193.
- [17] ROMERO-LÓPEZ J P, ELEWAUT D, PACHECO-TENA C, et al. Inflammatory foot involvement in spondyloarthritis: from tarsitis to ankylosing tarsitis [J]. *Front Med*, 2021, 8: 730273.
- [18] JEANTY C, SOURISCE A, NOTEUIL A, et al. HLA-B27 subtype oligomerization and intracellular accumulation patterns correlate with predisposition to spondyloarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(8): 2113–2123.
- [19] KOLLNBERGER S, BIRD L A, RODDIS M, et al. HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors [J]. *J Immunol*, 2004, 173(3): 1699–1710.
- [20] TRAN T M, SATUMTIRA N, DORRIS M L, et al. HLA-B27 in transgenic rats forms disulfide-linked heavy chain oligomers and multimers that bind to the chaperone BiP [J]. *J Immunol*, 2004, 172(8): 5110–5119.
- [21] TRAN T M, DORRIS M L, SATUMTIRA N, et al. Additional human β 2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(4): 1317–1327.
- [22] BREBAN M, BEAUFRÈRE M, GLATIGNY S. The microbiome in spondyloarthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2019, 33(6): 101495.
- [23] RATH H C, WILSON K H, SARTOR R B. Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli* [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(6): 2969–2974.
- [24] QIAN B F, TONKONOGY S L, BALFOUR SARTOR R. Luminal bacterial antigen-specific CD4⁺ T-cell responses in HLA-B27 transgenic rats with chronic colitis are mediated by both major histocompatibility class II and HLA-B27 molecules [J]. *Immunology*, 2006, 117(3): 319–328.
- [25] DIELEMAN L A, HOENTJEN F, QIAN B F, et al. Reduced ratio of protective versus proinflammatory cytokine responses to

- commensal bacteria in HLA-B27 transgenic rats [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136(1): 30–39.
- [26] KHARE S D, LUTHRA H S, DAVID C S. Spontaneous inflammatory arthritis in HLA B27 transgenic mice lacking β 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies [J]. *J Exp Med*, 1995, 182(4): 1153–1158.
- [27] YOSHITOMI H, SAKAGUCHI N, KOBAYASHI K, et al. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(6): 949–960.
- [28] RUUTU M, THOMAS G, STECK R, et al. β -glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease-like ileitis in SKG mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64: 2211–2222.
- [29] JEONG H, BAE E K, KIM H, et al. Spondyloarthritis features in zymosan-induced SKG mice [J]. *Joint Bone Spine*, 2018, 85(5): 583–591.
- [30] NAKAMURA A, ZENG F, NAKAMURA S, et al. Macrophage migration inhibitory factor drives pathology in a mouse model of spondyloarthritis and is associated with human disease [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(616): eabg1210.
- [31] ROMAND X, LIU X, RAHMAN M A, et al. Mediation of interleukin-23 and tumor necrosis factor-driven reactive arthritis by *Chlamydia*-infected macrophages in SKG mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(7): 1200–1210.
- [32] BAILLET A C, REHAUME L M, BENHAM H, et al. High *Chlamydia* burden promotes tumor necrosis factor-dependent reactive arthritis in SKG mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(6): 1535–1547.
- [33] REHAUME L M, MONDOT S, DE CÁRCER D A, et al. ZAP-70 genotype disrupts the relationship between microbiota and host, leading to spondyloarthritis and ileitis in SKG mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(10): 2780–2792.
- [34] GLANT T T, MIKECZ K, ARZOUMANIAN A, et al. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology [J]. *Arthritis Rheum*, 1987, 30(2): 201–212.
- [35] BÁRDOS T, SZABÓ Z, CZIPRI M, et al. A longitudinal study on an autoimmune murine model of ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(7): 981–987.
- [36] KONTOYIANNIS D, PASPARAKIS M, PIZARRO T T, et al. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies [J]. *Immunity*, 1999, 10(3): 387–398.
- [37] ARMAKA M, APOSTOLAKI M, JACQUES P, et al. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(2): 331–337.
- [38] ALEXOPOULOU L, PASPARAKIS M, KOLLIAS G. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling [J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(10): 2588–2592.
- [39] LORIES R J, MATTHYS P, DE VLAM K, et al. Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoparonychia in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(5): 595–598.
- [40] BRAEM K, CARTER S, LORIES R J. Spontaneous arthritis and ankylosis in male DBA/1 mice: further evidence for a role of behavioral factors in “stress-induced arthritis” [J]. *Biol Proced Online*, 2012, 14(1): 10.
- [41] HOLMDAHL R, JANSSON L, ANDERSSON M, et al. Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 1992, 88(3): 467–472.
- [42] SWEET HO, GREEN MC. Progressive ankylosis, a new skeletal mutation in the mouse [J]. *J Hered*, 1981, 72(2): 87–93.
- [43] ZHANG Y. Animal models of inflammatory spinal and sacroiliac joint diseases [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2003, 29(3): 631–645.
- [44] MORI S, ZHANG M C, TANDA N, et al. Genetic characterisation of spontaneous ankylosing arthropathy with unique inheritance from Fas-deficient strains of mice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(10): 1273–1278.
- [45] HAMMER G E, TURER E E, TAYLOR K E, et al. Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(12): 1184–1193.
- [46] VEREECKE L, VIEIRA-SILVA S, BILLIET T, et al. A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5103.
- [47] 吴珮涵, 王晓霞. 强直性脊柱炎的生物治疗研发进展 [J]. *实用药物与临床*, 2022, 25(10): 947–952.
- WU P H, WANG X X. Research and development progress of biological therapy for ankylosing spondylitis [J]. *Pract Pharm Clin Remedies*, 2022, 25(10): 947–952.
- [48] DU H Z, HOU X Y, GUO Y J, et al. Classic mechanisms and experimental models for the anti-inflammatory effect of traditional Chinese medicine [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(2): 108–119.
- [49] 李沁媚, 王玉涵, 吕菲菲, 等. 溃疡性结肠炎与湿热证溃疡性结肠炎大鼠模型比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3): 354–363.
- LI Q M, WANG Y H, LYU F F, et al. Comparative study of rat models with ulcerative colitis and ulcerative colitis plus damp-heat syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(3): 354–363.
- [50] 陈弋, 王琛, 徐秋英, 等. 两种岭南湿热证小鼠模型肠道菌群动态变化的研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(7): 2186–2197.
- CHEN Y, WANG C, XU Q Y, et al. Dynamic changes of Intestinal Flora in two kinds of mice models of Lingnan Damp-Heat Syndrome [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2020, 22(7): 2186–2197.
- [51] HALEY E K, MATMUSAEV M, HOSSAIN I N, et al. The impact of genetic background and sex on the phenotype of IL-23

- induced murine spondyloarthritis [J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0247149.
- [52] 耿子涵, 包蕾, 郭姗姗, 等. 人冠状病毒 229E 寒湿疫毒袭肺证病证结合小鼠模型的建立及评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 3-12, 67.
- GENG Z H, BAO L, GUO S S, et al. Establishment and evaluation on a mouse model combing disease with syndrome of hCoV-229E pneumonia with “Hanshi Yidu Xifei” syndrome [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(1): 3-12, 67.
- [53] 潘永明, 杨玉伟, 刘瑞敏, 等. 不同血瘀造模对 B₁₆ 荷瘤鼠肝转移模型的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(4): 326-330.
- PAN Y M, YANG Y W, LIU R M, et al. Effect of different methods of making models of blood stasis syndrome on hepatic metastasis in tumor-bearing mouse models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2010, 18(4): 326-330.
- [54] 郝婷婷, 郭浩, 刘建勋, 等. 2 种分析方法对睡眠剥夺大鼠血瘀证评价的初步研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(9): 1880-1885.
- HAO T T, GUO H, LIU J X, et al. Preliminary study on two analytical methods for evaluation of traditional Chinese medicine syndromes model in rats with blood stasis due to sleep deprivation [J]. *China J Chin Mater Med*, 2018, 43(9): 1880-1885.
- [55] 马小娟, 马文礼, 王丽新. 不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 64-74.
- MA X J, MA W L, WANG L X. Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-Yang deficiency animal model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 64-74.
- [56] 张风帅, 王广亮, 符朝程, 等. 张氏杜仲补骨汤治疗肝肾亏虚型原发性骨质疏松症临床观察 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(11): 37-40.
- ZHANG F S, WANG G L, FU C C, et al. Clinical observation of ZHANG's Duzhong bugu decoction on treating primary osteoporosis with deficiency of liver and kidney type [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2023, 25(11): 37-40.
- [57] EMMANUELLE N E, MARIE-CÉCILE V, FLORENCE T, et al. Critical role of estrogens on bone homeostasis in both male and female: from physiology to medical implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1568.
- [58] 陈利锋. 强骨胶囊对肝肾不足型骨质疏松症大鼠骨代谢影响的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2003.
- CHEN L F. Experimental study on the effect of strong bone capsule on bone metabolism in rats with liver and kidney deficiency osteoporosis [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2003.
- [59] TABUCHI Y, KATSUSHIMA M, NISHIDA Y, et al. Oral dextran sulfate sodium administration induces peripheral spondyloarthritis features in SKG mice accompanied by intestinal bacterial translocation and systemic Th1 and Th17 cell activation [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 176.

[收稿日期]2023-06-03

李玉婷,牛春雨,赵自刚. NLRP3-细胞焦亡在实验性脓毒症肺损伤中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 139-147.

Li YT, Niu CY, Zhao ZG. Role of NLRP3-pyroptosis in experimental sepsis-induced lung injury [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 139-147.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.016

NLRP3-细胞焦亡在实验性脓毒症肺损伤中的作用

李玉婷¹,牛春雨^{1,2*},赵自刚^{1,2*}

(1.河北北方学院基础医学院 & 微循环研究所,张家口 075000;2.河北省急危重症发病机制及干预重点实验室,张家口 075000)

【摘要】 NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)介导的肺实质细胞与免疫细胞焦亡在脓毒症肺损伤的发生机制中发挥关键作用。NF-κB、JAK2/STAT3和MAPK信号通路参与了NLRP3介导的细胞焦亡。靶向NLRP3-细胞焦亡及其相关信号通路,Physalin B、五味子素、促红细胞生成素等药物干预,针刺足三里、肺俞穴等物理疗法,以及麦角内酯等NLRP3特异性抑制剂,均发挥了良好的抗脓毒症肺损伤作用。本文综述NLRP3-细胞焦亡在实验性脓毒症肺损伤中的作用与机制,以及靶向NLRP3-细胞焦亡防治脓毒症肺损伤的实验研究进展,期望以NLRP3-细胞焦亡为切入点,为形成脓毒症肺损伤的防治新策略提供思考。

【关键词】 NLRP3;细胞焦亡;脓毒症;肺损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)08-0139-09

Role of NLRP3-pyroptosis in experimental sepsis-induced lung injury

LI Yuting¹, NIU Chunyu^{1,2*}, ZHAO Zigan^{1,2*}

(1. Basic Medical College & Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China.

2. Hebei Key Laboratory of Critical Disease Mechanism and Intervention, Zhangjiakou 075000)

【Abstract】 The Nod-like receptor pyrin domain-associated protein 3 (NLRP3)-mediated pyroptosis of pulmonary parenchymal and immune cells plays a key role in the pathogenesis of lung injury during sepsis. NF-κB, JAK2/STAT3 and MAPK signaling pathways are involved in NLRP3-mediated pyroptosis. Targeting NLRP3-pyroptosis and its related signaling pathways, pharmacological interventions with Physalin B, schisandrin, erythropoietin, and physical therapies such as acupuncture at Zusanli and Feishu points, as well as NLRP3-specific inhibitors like ergolide, have all shown effective anti-septic effects in treating lung injuries. This article reviewed the roles and mechanisms of NLRP3-pyroptosis in sepsis-induced lung injury, as well as the experimental progresses made in targeting NLRP3 pyroptosis as a therapy. We aim to highlight the importance of NLRP3-pyroptosis as a target, providing insights for the prevention and treatment of sepsis-induced lung injury.

【Keywords】 Nod-like receptor pyrin domain-associated protein 3; pyroptosis; sepsis; lung injury

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

脓毒症是宿主对感染反应失调引起的器官功能衰竭。据统计,全球每年约有4890万脓毒症病

例,且有1100万例患者死于脓毒症^[1]。在脓毒症发展过程中,大量免疫细胞聚集、浸润于肺组织,激活

【基金项目】 国家自然科学基金(82270524)。

【作者简介】 李玉婷(1998—),女,硕士,研究方向:休克与微循环研究。E-mail:18715964518@163.com

【通信作者】 赵自刚(1974—),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向:休克与微循环研究。E-mail:zzghyl@126.com

牛春雨(1967—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:休克与微循环研究。E-mail:ncylxf@126.com *共同通信作者

细胞内信号转导通路,引起细胞因子大量释放、炎症细胞持续激活,导致细胞因子风暴^[2]。细胞因子风暴引起难以缓解的肺部炎症反应,最终演变为急性肺损伤(acute lung injury, ALI)乃至急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。一般情况下,炎症小体在感染或组织损伤时被激活,引起炎症反应。在众多炎症小体中,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) 炎症小体是研究最为充分的一种,主要功能是通过切割前体半胱氨酸蛋白酶-1 (pro-caspase-1) 激活半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1),促使白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 成熟和释放^[3]。细胞焦亡表现为细胞感应到病原体攻击后引发免疫反应,自动穿孔细胞膜,排出胞质内容物和炎症介质,引起炎症反应以及后续的组织或器官结构和功能部分丧失,成为多种致病因素引起脓毒症肺损伤的关键机制之一。为了深入揭示脓毒症肺损伤的发生机制以及 NLRP3-细胞焦亡在脓毒症肺损伤中如何发挥作用,并以此形成新的防治策略,学者们建立了多种实验性脓毒症肺损伤模型,在模拟人类脓毒症肺损伤发病过程的基础上,聚焦 NLRP3 活化及其引起的细胞焦亡,揭示了相关信号通路在脓毒症肺损伤中的作用,并针对 NLRP3-细胞焦亡开展了诸多脓毒症肺损伤的实验性防治研究。本文综述 NLRP3 介导的细胞焦亡在实验性脓毒症肺损伤中的作用与机制,以及靶向 NLRP3-细胞焦亡防治脓毒症肺损伤的实验研究进展。

1 NLRP3 激活途径与细胞焦亡

作为一种模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), NLRP3 炎症小体能够感知各种感染性和非感染性的内源性或外源性激活剂,即损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMP) 或病原体相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMP)^[4]。这种感知能力使得 NLRP3 能够快速响应生物体内外的不同威胁,启动炎症过程,为机体提供有效免疫防御。NLRP3 炎症小体由 3 个不同结构域组成,包括一个富含亮氨酸重复序列 (leucine rich repeat domain, LRR) 结构域,具有自抑制功能和信号识别能力,一个具有 ATP 酶活性并介导自体寡聚化的中央核苷酸结构域 (nucleotide binding and oligomerization domain,

NOD), 又称 NACHT 结构域, 以及一个 N 末端热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD)^[4]。NLRP3 炎症小体活化机制极为复杂, 可以被多种激动剂触发, 包括 PAMPs (例如病毒 RNA、微生物毒素和细菌表面成分) 以及 DAMPs (例如尿酸晶体、ATP、铝佐剂和 β -淀粉样肽)。目前认为, NLRP3 激活主要包括经典、非经典和替代性 3 种途径。细胞焦亡最显著特点是与微生物感染及内源性损伤相关的信号激活, 以及依赖于炎性囊泡和 Caspases 参与。与 NLRP3 炎症小体激活相对应, 细胞焦亡发生的主要途径分为 Caspase-1 经典途径和 Caspase-4/5/11 非经典途径。

1.1 经典激活途径

NLRP3 炎症小体经典激活途径可分为两个关键阶段: 启动和激活。在启动阶段, NLRP3 和 pro-IL-1 β 在转录水平上调, 这一过程可通过识别多种 PAMPs 或 DAMPs, 或通过促炎细胞因子诱导, 导致核转录因子- κ B (nuclear factor- κ -B, NF- κ B) 激活和转录。除了调控转录外, 启动步骤还可以调控 NLRP3 的翻译后修饰, 如磷酸化或泛素化。泛素特异性肽酶 1 (ubiquitin-specific peptidase 1, USP1) 相关因子 1 (ubiquitin-specific peptidase 1-related factor 1, UAF1) 去除 NACHT 和 LRR 结构域上的 K48 多聚泛素化链, 通过抑制 NLRP3 泛素化依赖的蛋白酶体途径降解来促进 NLRP3 激活^[5]。此外, ABRO1 是去泛素化酶复合物的一个亚基, 其介导 NLRP3 的 S194 磷酸化对 NLRP3 炎症小体组装和激活也起到关键作用^[6]。综上, 启动步骤通过转录调控和翻译后修饰对 NLRP3 炎症小体的激活至关重要。

在激活因素的刺激下, K^+ 外流、 Cl^- 外流、 Na^+ 内流、 Ca^{2+} 动员、线粒体功能障碍、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生、线粒体 DNA 释放、溶酶体分解释放金属蛋白酶, 为炎症小体的组装和激活提供条件^[7-8]。随后, 通过招募含有衔接蛋白的凋亡相关斑点蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CADR domain, ASC) 促进 NLRP3-ASC 复合体形成, 暴露的 CARD 与非活性的 pro-caspase-1 的 CARD 部分相互连接, 进一步增加 pro-caspase-1 表达, 并自催化裂解为 p20 和 p10 两个亚基^[9]。这两个亚基的四聚体形成具有活性的 Caspase-1, 进而切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 促进 Caspase-1 依赖性 IL-18 和 IL-1 β 的激活和释放。同时, Caspase-1 将消皮素-D (gasdermin D, GSDMD) 切

割成 GSDMD 的 N-末端和 GSDMD 的 C-末端区域, 转移到细胞膜上形成孔隙, 引起细胞焦亡, 导致成熟炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 通过 GSDMD 孔释放到细胞外环境^[10], 参与炎症反应, 并调节免疫功能。

1.2 非经典激活途径

与依赖 Caspase-1 经典激活途径不同, NLRP3 炎症小体非经典激活途径是依赖 Caspase-4/5/11 完成的。革兰氏阴性菌进入吞噬细胞, 通过降解细菌壁, 释放脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。LPS 结合并刺激小鼠 Caspase-11 或人 Caspase-4/5, 导致 Caspases 寡聚化和自切割, 从而导致 NLRP3 非典型激活^[11]。活化的 Caspase-11 不能直接切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 但可以水解 GSDMD 生成 GSDMD-N, GSDMD-N 与质膜中的心磷脂、磷酸基肌醇和磷脂酰丝氨酸结合, 从而在细胞膜上穿孔, 诱导 K⁺ 外流, 导致细胞焦亡^[12]。Caspase-4/5/11 激活还促使重要的 ATP 通道中泛连接蛋白-1 (Pannexin 1, PANX1) 激活, 启动 ATP 释放; PANX1 与嘌呤能受体 (purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel 7, P2X7) 相互作用, 打开通道, 导致钾离子流出, 从而激活 NLRP3 炎症小体并诱导 Caspase-1 激活的经典焦亡途径^[13]。因此, NLRP3 炎症小体成为连接典型和非典型焦亡途径的关键纽带。

1.3 NLRP3 的替代激活途径

替代性 NLRP3 炎症小体激活只需一个信号, 该途径仅存在于人类单核细胞中, 其中 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 识别胞外 LPS, 通过 Caspase-8/FAS - 相关死亡结构域蛋白 (FAS-associated death domain protein, FADD)/受体结合丝氨酸激酶 3 (receptor binding serine kinase 3, RIPK3) 信号通路诱导 NLRP3 活化和细胞因子成熟, 但是这不能引起 ASC 斑点形成, 也不导致细胞焦亡^[14]。此外, 载脂蛋白 C3 (apolipoprotein C3, ApoC3) 也能激活人单核细胞中 Caspase-8 依赖的替代性 NLRP3 炎症小体, ApoC3 与 TLR2 和 TLR4 相互作用并导致其异质二聚化, 然后通过 TLR2/4 及其衔接蛋白 SCIMP (SLP65/SLP76, csk-interacting membrane protein, SCIMP) - 酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, Lyn) - 脾酪氨酸激酶 (spleen tyrosine kinase, Syk) - 瞬时感受器电位阳离子通道 (transient receptor potential melastain 2, TRPM2) 轴促进 Ca²⁺ 内流、ROS 产生、NADPH 氧化酶活化和 Caspase-8 激

活^[15]。尽管 Caspase-8 是激活替代 NLRP3 炎症小体的关键上游分子, 但其确切机制尚不清楚。

1.4 细胞焦亡启动的其他途径

在特定条件下, 受肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、GSDME 高表达或某些化疗药物的影响, Caspase-3 能够诱导 GSDME 相关的焦亡。GSDME 在细胞凋亡和化疗药物诱导的焦亡之间充当了一个关键开关, 当 GSDME 高表达时, 发生焦亡; 在 GSDME 低表达时, 凋亡被触发^[16]。此外, 除了 GSDMD 和 GSDME 之外, GSDMA/B/C 也在膜穿孔和细胞焦亡中发挥重要作用^[17]。随着研究深入, 学者们相继报道了 Caspase-3 依赖途径和 Caspase-free 通路的作用^[18], 拓展了对细胞焦亡机制的认识, 也为进一步探索焦亡与疾病关系提供了坚实的基础。

2 NLRP3-细胞焦亡与实验性脓毒症肺损伤

肺是脓毒症引起的多器官损害中最易受损的器官, 导致炎症反应、氧化应激、线粒体损伤、内质网应激及其引起的坏死、凋亡、焦亡、铁死亡等多种细胞死亡方式^[19-20]。在脓毒症引起 ALI/ARDS 过程中, 致病因素 (如细菌和病毒攻击、外伤、腹膜炎等) 激活循环免疫细胞, 使其释放大量炎症介质和细胞因子, 损害血管内皮细胞。受损的肺毛细血管内皮细胞, 激活肺组织的各类免疫细胞, 释放出大量炎症介质, 加剧肺部炎症反应。同时, 细胞因子介导大量免疫细胞聚集、浸润至肺组织, 尤其以中性粒细胞和巨噬细胞积聚为主, 过度活化的免疫细胞激活胞内多条信号转导通路, 释放大量细胞因子, 形成炎症细胞活化与炎症介质释放的恶性循环, 最终导致炎症风暴, 引起肺组织细胞损伤, 破坏肺泡毛细血管内皮屏障结构的完整性, 增加肺通透性, 导致中性粒细胞浸润和弥漫性肺水肿, 发生脓毒症肺损伤^[2]。近年来的实验研究显示, NLRP3-细胞焦亡在脓毒症肺损伤过程中起关键作用。

2.1 实验性脓毒症肺损伤过程中细胞焦亡的生物学特征与启动因素

2.1.1 细胞焦亡的生物学特征

细胞焦亡类似但不同于细胞凋亡, 最显著特点是受微生物感染与内源性损伤相关信号的双重激活, 依赖于炎症囊泡和炎症 Caspases 参与, 从而破坏细胞膜完整性和通透性, 导致细胞肿胀、破裂和胞质内容物外泄^[3]。在焦亡过程中, 细胞核也发生显

著变化,包括核染色质边缘皱缩、DNA 断裂和核体积的减小^[21]。此外,焦亡细胞会引起 IL-1 β 、IL-18 等大量促炎因子释放,引起过度炎症反应,进一步损伤受损细胞周围组织。同时,影响细胞器的功能和结构,这一变化与细胞死亡信号通路激活和能量代谢紊乱有关^[22]。

2.1.2 细胞焦亡的启动因素

多种因素引起的细胞焦亡参与了脓毒症肺损伤的发生过程。药理抑制剂 (necrosulfonamide, NSA) 是一种小分子化合物,可作为细胞焦亡关键分子之一 GSDMD 的抑制剂。NSA 直接与 GSDMD 的 Cys191 结合,抑制 p30-GSDMD 毒性和 GSDMD-N 端在体外和体内的寡聚化,从而阻止毒性孔形成,抑制 IL-1 β 等炎症因子释放^[23]。这表明 NSA 可以特异性抑制炎症细胞死亡下游的炎性囊泡激活,从而减轻了由 GSDMD 介导的细胞焦亡。补体 C3 是补体激活途径的核心,裂解过程中产生 C3a 和 C3b。补体 C3a-C3aR 轴与 Caspase-11 的相互作用会加剧细胞焦亡程度,而阻断 C3a-C3aR 信号通路可以抑制细胞焦亡的发展,从而减轻脓毒症小鼠肺损伤,这说明补体途径在脓毒症中发挥促焦亡作用^[24]。另外,高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 是一种内源性促炎介质,通过晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) 依赖的途径诱导细胞焦亡。在这个过程中, HMGB1 通过 RAGE 作用于巨噬细胞,诱导 HMGB1 动力蛋白依赖性内吞作用,进而启动了一系列细胞和分子事件,包括组织蛋白酶 B (cathepsin, CatB) 激活并从破裂的溶酶体中释放出来,最终形成焦亡小体、激活 Caspase-1,从而导致细胞焦亡^[25]。在众多导致细胞焦亡的因素中, NLRP3-细胞焦亡机制的研究尤为广泛,因此我们更为关注 NLRP3 介导细胞焦亡的发生。

2.2 实验性脓毒症肺损伤过程中发生焦亡的细胞类型

在脓毒症引起的 NLRP3-细胞焦亡中,已发现多种细胞参与了焦亡过程,包括肺实质性细胞 (如肺上皮细胞、肺微血管内皮细胞) 以及免疫细胞 (如巨噬细胞、中性粒细胞)。这些不同类型细胞的焦亡在脓毒症肺损伤中都发挥着重要作用,多种细胞类型的参与使得焦亡过程更加复杂,也为深入理解脓毒症肺损伤的发病机制提供了更多的视角。

2.2.1 肺实质细胞

肺泡上皮细胞损伤是脓毒症肺损伤的结构基

础,由细菌和病毒入侵、酸中毒、高氧或缺氧环境等多种因素引起^[26],通过过度焦亡释放大量促炎因子,加剧了炎症反应,并促使更多的免疫细胞聚集在受损区域,引起炎症瀑布效应。焦亡导致的肺上皮细胞损伤加重了肺泡屏障功能丧失,严重影响气体交换,引发肺水肿与呼吸功能障碍^[27]。研究表明,内源性抗菌肽 (endogenous antimicrobial peptides, LL-37) 对肺上皮细胞具有重要的抗焦亡作用。当肺泡上皮细胞在 LPS 和 ATP 的共同刺激下发生焦亡时, LL-37 表达显著上升,有效减轻炎症反应,从而缓解由于过度焦亡引起的肺损伤^[28]。

内皮细胞焦亡以 Caspase-11 依赖的细胞裂解、GSDMD 激活及促炎细胞因子释放为特征。LPS 激活 Caspase-4/5/11,进而触发焦亡并导致肺内皮屏障破坏及肺损伤的典型症状; Caspase-11 上调在 LPS 诱导内皮细胞焦亡中起核心作用,内皮细胞 Caspase-11 缺失能显著减轻 ALI^[29]。另一方面,长链非编码 RNA OPA 相互作用蛋白 5 反义转录物 1 (OPA-interacting protein 5 antisense transcript 1, OIP5-AS1) 通过 miR-1297/NLRP3 轴加重脓毒症 ALL,敲低 OIP5-AS1 可减轻 LPS 处理的人肺微血管内皮细胞焦亡、炎症反应和氧化应激^[30]。

2.2.2 免疫细胞

肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs) 持续过度炎症是脓毒症肺损伤发生机制的关键因素之一。LPS 刺激可激活 Caspase-1 和 NLRP3 炎症小体,导致 AMs 焦亡以及 AMs 迅速减少和间质巨噬细胞 (interstitial macrophages, Ims) 浸润,剩余的 AMs 和募集的 IMs 向 M1 型极化^[31]。M1 型巨噬细胞和焦亡的 AMs 释放大量促炎细胞因子和趋化因子,与 AMs 相互作用进一步放大炎症损伤,破坏肺泡内皮和上皮结构^[32]。同时,核蛋白 HMGB1 作为一种 DAMP,通过正反馈机制激活了 NLRP3 和 Caspase-1,促进细胞焦亡发生,加重脓毒症肺损伤^[33]。

中性粒细胞是免疫系统抵御病原体入侵的重要细胞成分。在感染或炎症期间,大量的中性粒细胞从骨髓中逸出,并释放由脱氧核糖核酸、组蛋白、髓过氧化物酶和其他成分组成的颗粒,形成中性粒细胞胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs), NETs 可以有效捕获循环中的入侵病原体^[34]。然而,中性粒细胞长时间过度激活会导致脓毒症肺损伤。研究表明,由 NLRP3 介导的细胞焦亡中,高表达的中性粒细胞中趋化因子 (C-X-C chemokine

ligand 12, CXCL 12) 诱导中性粒细胞迁移,加重肺损伤^[35]。除了 NLRP3 介导的焦亡,中性粒细胞丝氨酸蛋白酶(neutrophil elastase, ELANE)能够通过不依赖 Caspase1/11 的途径切割半胱氨酸,直接激活 GSDMD,从而触发中性粒细胞焦亡^[36]。

在脓毒症肺损伤中,肺巨噬细胞与中性粒细胞之间存在复杂的相互作用机制。中性粒细胞在激活状态下释放 NETs 不仅作为免疫细胞之间的桥梁,还能诱导巨噬细胞发生焦亡。NETs 增加导致巨噬细胞内部产生大量 ROS,这些 ROS 通过参与 NLRP3 炎症小体的去泛素化和组装过程,触发 Caspase-1 激活以及随后的巨噬细胞焦亡^[37]。另一方面,通过破坏 NETs 或干预 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达,可以有效阻止巨噬细胞的焦亡,从而减轻肺损失^[38]。

2.3 NLRP3-细胞焦亡参与脓毒症肺损伤的信号通路

基于 NLRP3-细胞焦亡在脓毒症肺损伤中的关键作用,学者们揭示了 NF-κB、Janus 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2)/信号转导及转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein

kinase, MAPK) 信号通路在 NLRP3-细胞焦亡参与脓毒症肺损伤中的作用机制(图 1),为靶向 NLRP3-细胞焦亡探寻防治脓毒症肺损伤的新措施发挥了积极作用。

2.3.1 NF-κB 信号通路

在脓毒症患者的外周血单核细胞和肺泡巨噬细胞中,NF-κB 信号被激活,并且与脓毒症的严重程度密切相关^[39]。NF-κB 不仅是脓毒症诱导肺损伤中肺泡损伤与修复的经典信号通路,还是激活 NLRP3 炎症小体的主要转录因子。在脓毒症动物模型中,NF-κB 信号通路通常由细菌感染、LPS 攻击或盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP) 激活。LPS 引起 NF-κB 中 p65 磷酸化和易位,导致炎症小体相关成分(NLRP3、pro-IL-1β 和 pro-IL-18) 转录上调,进而激活 Caspase-1; 随后,ASC 和 Caspase-1 被招募并组装成炎症复合体,NLRP3 和 IL-1β mRNA 和蛋白表达增加,NF-κB p65 磷酸化增强,IL-1β 和 IL-18 活化,并诱导细胞焦亡。而 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082 可降低 pro-caspase-1、pro-IL-1β、NLRP3、剪切的 Caspase-1 表达以及血清、肺组织 IL-1β 和 IL-18 水平^[40-41]。CLP 在引起脓毒症小鼠肺组织损伤的同时,提高了肺组织 p-NF-κB、

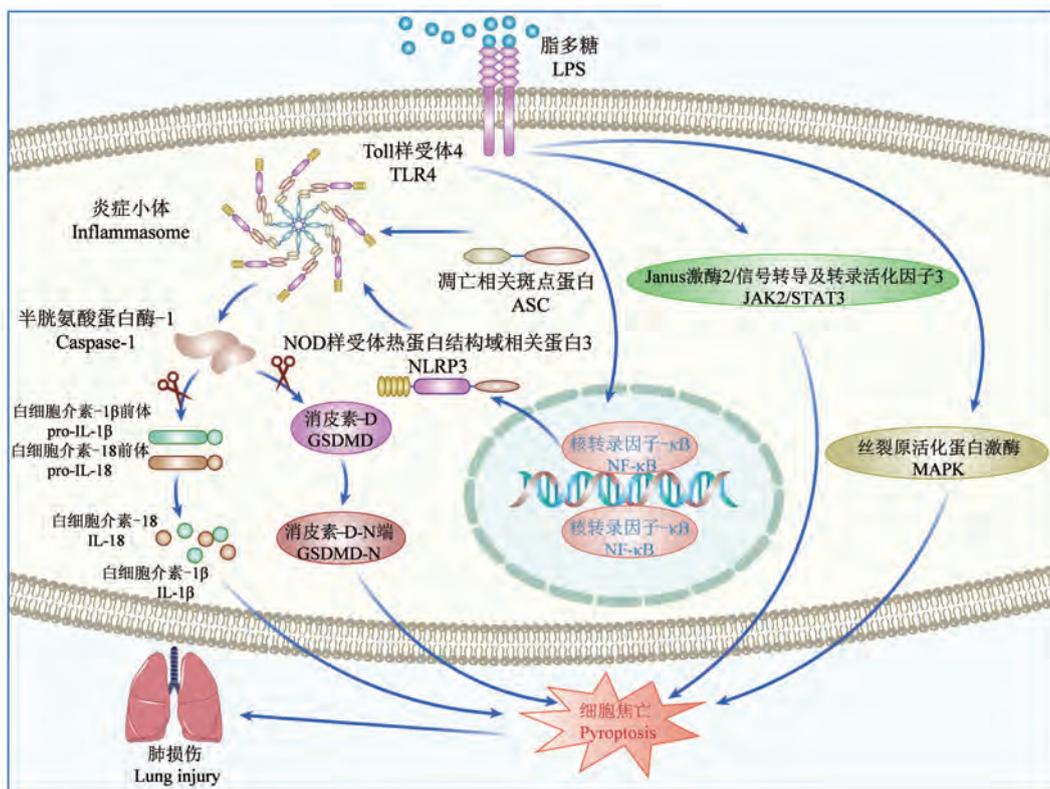


图 1 NLRP3-细胞焦亡在脓毒症肺损伤中的作用

Figure 1 Role of NLRP3-pyroptosis in sepsis-induced lung injury

ASC、NLRP3、Caspase-1 和磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 水平, Akt 通过增强 NF- κ B 核转位来增加促炎细胞因子的产生, 引起焦亡^[42]。这些结果说明 NF- κ B 参与了 NLRP3-细胞焦亡介导脓毒症肺损伤的发生机制。

2.3.2 JAK2/STAT3 信号通路

在 LPS 诱导肺损伤小鼠模型中, 肺组织 JAK2 和 STAT3 磷酸化显著下降; 促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 在上调 JAK2 和 STAT3 磷酸化的同时, 显著降低了肺干湿比、支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 总蛋白和髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 浓度, 抑制了 NLRP3 炎症小体活化, 降低了 NLRP3 和 IL-1 β mRNA 和蛋白表达, 减少了 IL-1 β 和 IL-18 产生; EPO 有益作用可被细胞表面 EPO 受体 (EPOR) 抑制剂 EMP-9、JAK2 抑制剂 Fedratinib、STAT3 抑制剂 NSC-74859 以及 NLRP3 基因敲除消除。这一结果说明 JAK/STATs 参与了 NLRP3 介导脓毒症肺损伤的发生机制^[41], 但与细胞焦亡的关系仍需要新的证据。

2.3.3 p38 MAPK 信号通路

MAPK 信号通路参与了 LPS 诱导肺组织炎症反应的过程, 包括在肺损伤中发挥关键作用的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6, 主要是通过 p38 MAPK 信号通路产生的。在 LPS 诱导肺损伤动物模型中, ROS 诱导了 p38 MAPK 磷酸化和 NLRP3 活化, 被激活的 NLRP3 可进一步活化 Caspase-1, 促进成熟的 IL-1 β 和 IL-18 分泌, 引起强烈的炎症反应, 加剧肺部损伤^[43]。多种药物通过阻断 MAPK 途径或磷酸化可抑制 LPS 引起的炎症反应, 阻断 p38 MAPK 可降低内皮细胞或上皮细胞凋亡, 从而保护肺泡-毛细血管屏障^[44]。巨噬细胞焦亡释放促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18, 是 LPS 诱导肺损伤炎症反应失控的部分原因。动物实验和细胞实验证实, LPS 处理伴随着 p38 MAPK 信号通路激活, NLRP3 炎症小体和 IL-1 β 、IL-18 的表达以及 Caspase-1 的裂解显著升高; p38 MAPK 抑制剂 SB203580 显著抑制了肺损伤动物和过度炎症反应, 降低 NLRP3 和 IL-1 β 和剪切的 Caspase-1 表达; SB203580 预处理大鼠 NR8383 巨噬细胞株, 亦可显著降低焦亡细胞的数量和 NLRP3/IL-1 β 表达^[43]。综上所述, 阻断 p38 MAPK 信号通路可能通过抑制巨噬细胞 NLRP3-焦亡改善脓毒症诱导的肺损伤。

在脓毒症肺损伤复杂的发病机制中, 除了上述通路参与 NLRP3-焦亡过程外, 还有多个关键分子在肺损伤的发生和进展中发挥重要作用, 如 RAGE、IL-6、血管生成素 2 (angiopoietin 2, Ang 2) 等^[45]。另外, 激活雷帕霉素靶点 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路能够有效改善内皮细胞焦亡现象, 抑制 Notch 信号通路能减少 M1 型巨噬细胞活化, 减轻脓毒症引起的炎症反应^[46-47]。这些通路和分子在特定实验模型中展现出了它们各自的不同作用, 但大多数研究还是局限于特定模型来探讨特定通路的作用。这些信号分子之间是否存在协同或对抗效应, 以及它们的相对作用强度, 受到多种因素的影响。因此, 要全面理解这些通路和分子在脓毒症肺损伤中的综合作用, 还需要从整体水平进一步研究。揭示这些信号分子或通路之间的作用或机制, 有望为脓毒症肺损伤及相关疾病的治疗带来新的希望。

3 靶向 NLRP3-细胞焦亡治疗脓毒症肺损伤

鉴于 NLRP3 和细胞焦亡在脓毒症肺损伤中的关键作用, 针对 NLRP3 和细胞焦亡的相关信号通路, 探索靶向细胞焦亡的治疗新策略, 有望控制或减轻脓毒症肺损伤, 改善脓毒症患者的预后和生存率, 也将为开发新的药物提供潜在机会。

3.1 药物干预

Physalin B (PB) 是从金登龙 (*P. alkekengi*) 中分离出的一种活性甾体成分。PB 预处理降低脓毒症小鼠的肺湿重/干重比以及血液和 BALF 中的 MPO 活性和 ROS 水平, 降低血液、BALF 和肺组织促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量及其 mRNA 表达, 并减轻 LPS 诱导的肺组织炎症细胞浸润。PB 预处理后, PB 可通过清除 ROS 抑制 NLRP3 激活, 抑制了 NF- κ B 和 NLRP3 的活性, 且与 PI3K/Akt 途径有关, 并下调细胞焦亡相关蛋白的表达, 从而显著减轻了脓毒症引起的肺损伤^[48]。

五味子素 (Schisandrin, Sch) 是五味子木脂素的主要成分。Sch 摄入可以减轻脓毒症动物肺组织炎症介质产生和病理损伤; Sch 及 JAK2/STAT3 通路抑制剂 AG490 能抑制细胞 p-JAK2 和 p-STAT3 表达, Sch 预处理显著抑制了 NLRP3 炎症小体激活, 降低了 IL-1 β 、IL-18 和 IL-6 水平, 改善了 LPS 诱导的细胞焦亡^[49]。结果说明 Sch 减轻肺损伤的作用与抑制 NLRP3 和 JAK2/STAT3 炎症通路激活密切

相关。前述研究也表明, EPO 通过 JAK2/STAT3 信号转导通路抑制 NLRP3 炎症小体活化减轻细胞焦亡, 从而缓解 LPS 诱导的肺损伤^[41]。

黄芩苷是从中草药黄芩根中分离得到的主要有效成分。黄芩苷显著降低了脓毒症大鼠肺组织 p38 MAPK、NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达, 从而减轻细胞焦亡与肺组织损伤; p38 MAPK 特异性阻断剂 SB203580 取得了与黄芩苷相同的结果, 说明黄芩苷减轻 LPS 引起肺损伤的作用是通过抑制 p38 MAPK/NLRP3 实现的^[50]。

GGY4137 是一种缓释硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 供体, 腹腔注射 GGY4137 可改善 CLP 小鼠 7 d 生存率, 减少中性粒细胞浸润, 减轻器官损伤, 降低炎症因子产生, 并增加了 BALF 和外周血中抗炎因子水平, 显著抑制肺组织 p-NF- κ B、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 p-Akt 蛋白表达, 从而降低了 NLRP3 炎症小体活性, 减轻了细胞焦亡^[42]。

4-羟基壬烯酸 (4-hydroxynonenal, HNE) 不仅是脂质过氧化产物, 而且作为一种重要的信号分子, 在生理浓度下, 可以选择性抑制小鼠和人巨噬细胞 NLRP3 炎症小体激活, 抑制炎症反应, 减轻细胞焦亡。HNE 可独立于核因子红细胞 2 相关因子 7 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 和 NF- κ B 信号通路, 阻断小鼠巨噬细胞和人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中 NLRP3 炎症介导的细胞焦亡和 IL-1 β 释放; 亦可直接与 NLRP3 结合, 抑制 NLRP3 与 NEMA 相关激酶 7 (never in mitosis gene a-related kinase 7, NEK7) 的相互作用^[51]。

3.2 针刺干预

足三里穴是足阳明胃经的主要穴位之一, 针刺足三里具有抗炎和免疫调节的作用。肺俞穴则是足太阳膀胱经的重要穴位, 常用于治疗肺疾病。研究显示, 疏波 2 Hz 和密波 15 Hz 的电针刺刺激脓毒症大鼠的足三里和肺俞穴, 显著降低肺组织损伤评分和肺含水量, 下调肺组织 NLRP3、ASC、pro-caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白表达, 降低 IL-1 β 和 IL-18 含量; NLRP3 激活剂抑制了针刺减轻肺损伤及改善相关损伤的良好作用^[52]。结果表明, 电针刺刺激足三里穴和肺俞穴可能通过抑制 NLRP3 介导的、Caspase-1 依赖的经典细胞焦亡途径, 从而减轻脓毒症大鼠肺损伤。

3.3 NLRP3 抑制剂干预

从 3.1 和 3.2 进展中可以看出, 抑制 NLRP3 介

导的细胞焦亡对于减轻脓毒症肺损伤具有重要作用。因此, 研究 NLRP3 炎症小体的选择性抑制剂成为热点。针对 NLRP3 炎症小体 NACHT 结构域的研究发现, NLRP3 有效抑制剂 CY-09 专注于 NACHT 结构域^[53], 曲尼司特可直接结合 NACHT 结构域, 并通过阻碍 NLRP3 寡聚化而直接抑制 NLRP3 活化^[54]。一些天然植物的有效成分也被证明对 NLRP3 炎症小体有抑制作用, 如冬凌草甲素 (oridonin, Ori) 是 NLRP3 的共价抑制剂, 直接靶向 NLRP3 的 NACHT 结构域^[55], 发挥抗炎作用; 麦角内酯 (ergolide, ERG) 通过不可逆的结合 NLRP3 的 NACHT 结构域, 阻止 NLRP3 炎症小体组装和激活, 从而显著降低脓毒症小鼠的死亡率, 减轻 LPS 诱导的肺损伤^[56]。由于许多抑制剂靶向 NACHT 结构域或干扰 NLRP3 的 ATP 酶活性, NACHT 结构域被认为是 NLRP3 小分子抑制剂最容易发挥作用的靶点, 也成为抗炎药物的开发靶点。

4 总结与展望

NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡在脓毒症肺损伤的发生机制中发挥关键作用, NLRP3 炎症小体活化介导细胞焦亡不同途径在脓毒症肺损伤中的作用仍需进一步详细研究。炎症反应、氧化应激、细胞死亡等均为脓毒症肺损伤的致病因素, NF- κ B、JAK2/STAT3、MAPK 等信号通路参与了 NLRP3 介导的细胞焦亡, 靶向 NLRP3-细胞焦亡及其相关信号通路, 中西医药物、物理方法以及抑制剂的使用发挥了良好的抗脓毒症肺损伤作用, 但这些治疗措施的详细作用机制或靶点还不十分清晰。此外, 针对 NACHT 结构域探寻 NLRP3 炎症小体特异性抑制剂也取得了一些进展, 但这些抑制剂对于脓毒症及其肺损伤的整体作用还需要深入研究。也应看到, 目前靶向 NLRP3-细胞焦亡在脓毒症肺损伤的相关研究多集中在动物实验或细胞实验层面, 如何将研究成果转化应用于临床, 开发新的药物, 改善脓毒症患者的预后和生存率, 形成脓毒症肺损伤的防治新策略, 还有很长的路要走。未来可以把针对 NLRP3 炎症小体的药物研发置于优先位置, 通过特异性 NLRP3 抑制手段, 有效地减轻细胞焦亡, 降低脓毒症肺损伤程度。总之, 脓毒症肺损伤是一个复杂的病理生理过程, 单一疗法防治脓毒症肺损伤可能会遇到难以突破的瓶颈, 需多学科合作, 探索新的综合治疗方案和特异性治疗方案。

参考文献:

- [1] RUDD K E, JOHNSON S C, AGESA K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990 – 2017; analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10219): 200–211.
- [2] KIM J S, LEE J Y, YANG J W, et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19 [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 316–329.
- [3] PAIK S, KIM J K, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141–1160.
- [4] SWANSON K V, DENG M, TING J P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477–489.
- [5] SONG H, ZHAO C, YU Z, et al. UAF1 deubiquitinase complexes facilitate NLRP3 inflammasome activation by promoting NLRP3 expression [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6042.
- [6] REN G, ZHANG X, XIAO Y, et al. ABRO1 promotes NLRP3 inflammasome activation through regulation of NLRP3 deubiquitination [J]. *EMBO J*, 2019, 38(6): e100376.
- [7] ESPITIA-CORREDOR J A, BOZA P, ESPINOZA-PEREZ C, et al. Angiotensin II triggers NLRP3 inflammasome activation by a Ca²⁺ signaling-dependent pathway in rat cardiac fibroblast ang-II by a Ca²⁺-dependent mechanism triggers NLRP3 inflammasome in CF [J]. *Inflammation*, 2022, 45(6): 2498–2512.
- [8] PAN Y G, HUANG M T, SEKAR P, et al. Decoy receptor 3 inhibits monosodium urate-induced NLRP3 inflammasome activation *via* reduction of reactive oxygen species production and lysosomal rupture [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 638676.
- [9] LI S, WANG L, XU Z, et al. ASC deglutathionylation is a checkpoint for NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(9): e20202637.
- [10] KONG X, ZHAO Y, WANG X, et al. Loganin reduces diabetic kidney injury by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 382: 110640.
- [11] CASSON C N, YU J, REYES V M, et al. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(21): 6688–6693.
- [12] ZANGIABADI S, ABDUL-SATER A A. Regulation of the NLRP3 inflammasome by posttranslational modifications [J]. *J Immunol*, 2022, 208(2): 286–292.
- [13] PELEGRIN P. P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome: Partners in crime [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 187: 114385.
- [14] HE Y, HARA H, NUNEZ G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1012–1021.
- [15] GONG T, ZHOU R. ApoC3: an ‘alarmin’ triggering sterile inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(1): 9–11.
- [16] YAO F, JIN Z, ZHENG Z, et al. HDAC11 promotes both NLRP3/caspase-1/GSDMD and caspase-3/GSDME pathways causing pyroptosis via ERG in vascular endothelial cells [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 112.
- [17] DING J, WANG K, LIU W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111–116.
- [18] ZHOU Z, HE H, WANG K, et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells [J]. *Science*, 2020, 368(6494): eaaz7548.
- [19] QIAN M, LOU Y, WANG Y, et al. PICK1 deficiency exacerbates sepsis-associated acute lung injury and impairs glutathione synthesis via reduction of xCT [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 118: 23–34.
- [20] TANG J, XU L, ZENG Y, et al. Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 91: 107272.
- [21] LINKERMANN A, STOCKWELL B R, KRAUTWALD S, et al. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(11): 759–767.
- [22] CHEN L, DENG H, CUI H, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(6): 7204–7218.
- [23] RATHKEY J K, ZHAO J, LIU Z, et al. Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis [J]. *Sci Immunol*, 2018, 3(26): eaat2738.
- [24] LI Z F, WANG Y C, FENG Q R, et al. Inhibition of the C3a receptor attenuates sepsis-induced acute lung injury by suppressing pyroptosis of the pulmonary vascular endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 184: 208–217.
- [25] XU J, JIANG Y, WANG J, et al. Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(8): 1229–1239.
- [26] BURGOYNE R A, FISHER A J, BORTHWICK L A. The role of epithelial damage in the pulmonary immune response [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2763.
- [27] MEYER N J, GATTINONI L, CALFEE C S. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 2021, 398(10300): 622–637.
- [28] WANG Q, WEN W, ZHOU L, et al. LL-37 improves sepsis-induced acute lung injury by suppressing pyroptosis in alveolar epithelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 129: 111580.
- [29] CHENG K T, XIONG S, YE Z, et al. Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(11): 4124–4135.
- [30] LIU Q Y, JIANG X X, TIAN H N, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 plays an oncogenic role in ovarian cancer through targeting miR-324-3p/NFIB axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(13): 7266–7275.
- [31] CORRY J, KETTENBURG G, UPADHYAY A A, et al. Infiltration of inflammatory macrophages and neutrophils and

- widespread pyroptosis in lung drive influenza lethality in nonhuman Primates [J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18(3): e1010395.
- [32] LIU B, WANG Z, HE R, et al. Buformin alleviates sepsis-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis through an AMPK-dependent pathway [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(4): 273–289.
- [33] HOU L, YANG Z, WANG Z, et al. NLRP3/ASC-mediated alveolar macrophage pyroptosis enhances HMGB1 secretion in acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(8): 1052–1064.
- [34] HIDALGO A, LIBBY P, SOEHNLEIN O, et al. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(13): 2737–2753.
- [35] PENG Y, WU Q, TANG H, et al. NLRP3 regulated CXCL12 expression in acute neutrophilic lung injury [J]. *J Inflamm Res*, 2020, 13: 377–386.
- [36] KAMBARA H, LIU F, ZHANG X, et al. Gasdermin D exerts anti-inflammatory effects by promoting neutrophil death [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(11): 2924–2936.
- [37] CHEN X, LI Y, QIN L, et al. Neutrophil extracellular trapping network promotes the pathogenesis of neutrophil-associated asthma through macrophages [J]. *Immunol Invest*, 2021, 50(5): 544–561.
- [38] CUI Y, YANG Y, TAO W, et al. Neutrophil extracellular traps induce alveolar macrophage pyroptosis by regulating NLRP3 deubiquitination, aggravating the development of septic lung injury [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 861–877.
- [39] CHENG Y J, TIAN X L, ZENG Y Z, et al. Esculetin protects against early sepsis via attenuating inflammation by inhibiting NF- κ B and STAT1/STAT3 signaling [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(6): 432–441.
- [40] AN Y, ZHANG H, WANG C, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12515–12527.
- [41] CAO F, TIAN X, LI Z, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome by erythropoietin via the EPOR/JAK2/STAT3 pathway contributes to attenuation of acute lung injury in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 306.
- [42] LI J, MA J, LI M, et al. GYY4137 alleviates sepsis-induced acute lung injury in mice by inhibiting the PDGFR β /Akt/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 271: 119192.
- [43] LI D, REN W, JIANG Z, et al. Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4399–4409.
- [44] XU X, ZHU Q, NIU F, et al. A2BAR activation attenuates acute lung injury by inhibiting alveolar epithelial cell apoptosis both *in vivo* and *in vitro* [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(4): C558–C570.
- [45] GONG H, CHEN Y, CHEN M, et al. Advanced development and mechanism of sepsis-related acute respiratory distress syndrome [J]. *Front Med*, 2022, 9: 1043859.
- [46] PENG F, CHANG W, SUN Q, et al. HGF alleviates septic endothelial injury by inhibiting pyroptosis via the mTOR signalling pathway [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 215.
- [47] BAI X, LI J, LI L, et al. Extracellular vesicles from adipose tissue-derived stem cells affect Notch-miR148a-3p axis to regulate polarization of macrophages and alleviate sepsis in mice [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1391.
- [48] ZHONG R, XIA T, WANG Y, et al. Physalin B ameliorates inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice by inhibiting NF- κ B and NLRP3 via the activation of the PI3K/Akt pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284: 114777.
- [49] LI W, HUANG Q, YU J, et al. Schisandrin improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(7): e14141.
- [50] 夏金婵, 从人愿, 袁静, 等. 黄芩苷通过 p38 MAPK/NLRP3 通路对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(02): 79–86.
- XIA J C, CONG R Y, YUAN J, et al. Baicalin alleviates LPS-induced acute lung injury in rats through p38 MAPK/NLRP3 pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(2): 79–86.
- [51] HSU C G, CHAVEZ C L, ZHANG C, et al. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits NLRP3 inflammasome activation and macrophage pyroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(9): 1790–1803.
- [52] 张昊, 苏乾, 史佳, 等. 电针通过 NLRP3/caspase-1 通路介导的细胞焦亡途径减轻脓毒症大鼠急性肺损伤 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2023, 29(6): 814–818.
- ZHANG H, SU Q, SHI J, et al. Electroacupuncture attenuates acute lung injury induced by sepsis via NLRP3/caspase-1 pathway mediated pyrocytosis pathway [J]. *Chin J Surg Integr Tradit West Med*, 2023, 29(6): 814–818.
- [53] JIANG H, HE H, CHEN Y, et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(11): 3219–3238.
- [54] HUANG Y, JIANG H, CHEN Y, et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(4): e8689.
- [55] HE H, JIANG H, CHEN Y, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2550.
- [56] REN M, CHEN J, XU H, et al. Ergolide covalently binds NLRP3 and inhibits NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110292.

吴强,杨悦,李鹏,等. 蜂毒研究进展:炎症性皮肤病治疗新型药物候选库 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 148-155, 166.
Wu Q, Yang Y, Li P, et al. Advances in bee venom research: novel drug candidate library for the treatment of inflammatory skin diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 148-155, 166.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.017

蜂毒研究进展:炎症性皮肤病治疗新型药物候选库

吴强¹,杨悦²,李鹏¹,顾佳婕²,董德刚^{2*},易军^{2*}

(1.南昌医学院,南昌 330052;2.江西中医药大学,南昌 330004)

【摘要】 炎症性皮肤病(inflammatory skin disease,ISD)的特点是持续的炎症浸润和缠绵难愈的皮肤病变。皮质类固醇激素是目前治疗 ISD 的主要药物,但因 ISD 复发性与顽固性等特点,长期服用这些激素药物对患者产生较大副作用。近年来,越来越多研究证实,蜂毒具有显著的抗炎、抗凋亡、抗纤维化、抗菌与抗氧化等作用,从而有效治疗 ISD。本文就蜂毒主要活性组分及其抗炎机制,及蜂毒治疗包括痤疮、特应性皮炎、银屑病、过敏性接触性皮炎等 ISD 的新进展进行综述,为 ISD 的基础研究与临床治疗提供借鉴与参考。

【关键词】 蜂毒;活性成分;炎症性皮肤病;机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0148-08

Advances in bee venom research: novel drug candidate library for the treatment of inflammatory skin diseases

WU Qiang¹, YANG Yue², LI Peng¹, GU Jiajie², DONG Degang^{2*}, YI Jun^{2*}

(1. Nanchang Medical College, Nanchang 330052, China. 2. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

【Abstract】 Inflammatory skin diseases (ISD) are characterized by persistent inflammatory cell infiltration and lingering and intractable skin lesions. At present, corticosteroids are the main drugs used in the treatment of ISD. However, due to the characteristics of recurrent and intractable ISD, long-term use of these hormone drugs may cause serious side effects in patients. In recent years, increasingly more studies are confirming that bee venom has significant anti-inflammatory, anti-apoptosis, anti-fibrosis, antibacterial, and other effects and could effectively treat ISD. In this paper, the main active components and anti-inflammatory mechanisms of bee venom are reviewed. The latest attempts to use bee venom for acne, atopic dermatitis, psoriasis, urticaria, and systemic lupus erythematosus are discussed, providing a reference for basic research and the clinical treatment of ISD.

【Keywords】 bee venom; active components; inflammatory skin diseases; mechanism

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

皮肤是人体最大的器官,且处于身体表面,极易受到外界环境中细菌、病毒的侵袭,以及自身遗传、炎症发生或免疫紊乱等因素影响,产生各种皮

肤疾病。炎症性皮肤病(inflammatory skin disease, ISD)是一类复杂、慢性、多因素的皮肤疾病,其特征是通过产生促炎细胞因子激活先天性与适应性免

【基金项目】 国家自然科学基金(82260937);江西省中医药管理局科技计划(2023B0191)。

【作者简介】 吴强(1983—),硕士,讲师,研究方向:中西医结合基础。E-mail:wq44160129@163.com

【通信作者】 董德刚(1982—),男,硕士,副教授,硕士生导师,研究方向:中药药理与毒理。E-mail:andydau@126.com

易军(1988—),男,硕士,主治医师,研究方向:中医外科学研究。E-mail:971045671@qq.com * 共同通信作者

疫系统^[1]。轻者表现为皮肤红斑、纹理粗乱、瘙痒,影响美观,重者皮肤皴裂、水肿、渗出、糜烂等,且反复发作,甚至终生不愈。环境、遗传和免疫等因素在 ISD 发病机制中发挥重要作用。最近的研究表明,ISD 也与心血管疾病^[2-3]、抑郁症^[4-5]等精神疾病密切相关。因此,ISD 严重影响患者生活质量,给患者及家属带来生理与心理的沉重负担,探究 ISD 的有效治疗具有重要的社会意义。

ISD 是皮肤病学中呈高发病率的一类疾病,包括湿疹、脂溢性皮炎、接触性皮炎、特应性皮炎、银屑病及痤疮等多种皮肤病。然而,目前针对 ISD 主要采用局部皮质类固醇、抗组胺以及免疫抑制剂等药物进行治疗。这些药物能有效缓解 ISD 症状,但无法达到治愈 ISD 的目的,患者长期使用,难以避免产生机体二次损害,因此,急需探求 ISD 新的替代或补充疗法。越来越多的实验显示蜂毒在治疗 ISD 方面具有巨大潜力^[6]。蜂毒作为一种生物毒素,具有广泛的毒理与药理学特性。目前,蜂疗已被应用于慢性炎症、结缔组织疾病(如风湿病和关节炎)、肿瘤以及皮肤疾病的治疗^[7]。本文综述了蜂毒在治疗 ISD 方面的最新研究成果,以期 ISD 的临床治疗及蜂毒资源开发与应用提供参考。

1 蜂毒成分与蜂毒疗法

1.1 蜂毒主要活性成分

蜂毒是由蜜蜂腹腔腺体分泌的一种无味透明的酸性液体,是蜜蜂防御捕食者的工具。新鲜蜂毒约含有 88% 的水,其余包括酶、肽、磷脂、生物胺、氨基酸、糖、挥发物和矿物质。蜂毒含有 5 种主要酶:磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂)、磷脂酶 B (PLAB)、透明质酸酶、酸性磷酸酶和 α-葡萄糖苷酶;肽类包括蜂毒肽(melittin)、阿帕明肽(apamin)、安度肽(adolapin)、赛卡品(secapin)、托肽品(tertiapin)及肥大细胞脱粒肽(mast cell degranulating peptide, MCDP)等;生物活性如组胺、肾上腺素等^[8]。其中,melittin 是蜂毒中最主要的成分,由 26 种氨基酸组成,占其成分的 40%~50%;PLA₂ 和 MCDP 分别占蜂毒的 10%~12% 和 2%~3%^[9]。

蜂毒各成分具有广泛的毒理与药理两方面的活性。melittin 既是蜂毒产生溶血、过敏反应及引起细胞质膜和内膜的裂解的细胞毒性等不良反应的主要成分^[10],也是蜂毒起到抗炎、抗微生物、抗真菌

和抗肿瘤活性等作用的主要原因^[11]。MCDP 是一种致癫痫的神经毒素,是钾离子通道的重要抑制剂,可引起大鼠血压的显著降低,它还是一种强大的抗炎剂^[12-13]。PLA₂ 是蜂毒中最致敏的成分,在 57%~97% 的过敏患者中致敏^[14]。同时,PLA₂ 是一种新型的调节性 T 细胞诱导剂,通过调节神经炎症反应来保护多巴胺能神经元^[15]。apamin 是蜂毒中最小的神经毒素,能够穿过血脑屏障,通过不同的作用方式影响中枢神经系统的功能^[7],apamin 也通过抑制人角质形成细胞(HaCaT)中的 NF-κB 信号通路和 STAT 来抑制肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)和干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)诱导的炎症细胞因子和趋化因子水平^[16]。蜂毒透明质酸酶约占蜂毒干重的 1.5%~2%,被称为“传播因子”,能通过影响组织结构完整性并增加该区域血流量,促进了其他蜂毒成分穿透细胞,导致蜂毒活性成分更快地扩散到受侵害组织^[17]。

总之,虽然蜂毒是一种生物毒素,会引起一些不良反应,但一方面蜂毒一般只有大剂量作用下才有致命的风险^[18];另一方面蜂毒各成分具有广泛的生物与药理活性。因此,蜂毒在临床疾病治疗方面具有较为广阔的前景和深入探究的价值。蜂毒主要成分及其生物活性见表 1。

1.2 蜂毒疗法

蜂毒的药用在我国已有几千年的历史,是将蜂毒注入人体的医学应用,用于一些疾病的治疗,包括直接蜂蜇和间接应用(提取蜂毒后注入体内)。其中蜜蜂直接蜇刺(特定穴位)治疗被认为是一种传统的有效治疗方法,缺点是受试者被蜇后会引发疼痛和炎症,难以维持其在血液中的正常浓度,而且蜂毒肽半衰期短,需要长期进行蜇伤或注射,给患者使用带来不便^[28]。此外提取出的蜂毒属蛋白质性质,易被胃、肠道酶类消化,因此口服途径给药效果欠佳^[6]。蜂毒还可以通过其他方式给药,如注射纯化和无菌的蜂毒,制作蜂毒软膏、乳膏、丸剂、滴剂等制剂,以及蜂毒电泳疗法和超声透入疗法,但蜂毒相对较短的血浆半衰期以及使用剂量问题仍然较难解决。基于此,研究人员陆续开发新型蜂毒药物剂型,例如与聚合物和纳米颗粒结合使用,将蜂毒装载到这些聚合物上,通过改变聚合物的类型、数量和分子量,可以增强蜂毒缓释性及其疗效,且能规避频繁注射给药的弊端^[29]。

研究表明,蜂毒可以保护由 1-甲基-4-苯基-

表 1 蜂毒的主要成分及其生物活性

Table 1 Main components of bee venom and their biological activities

成分 Compound	成分类别 Component class	干粉丰度/% Dry powder abundance	药理或毒理活性 Pharmacological or toxicological activity
蜂毒肽 ^[19-21] Melittin	多肽 Polypeptide	40~50	抗炎、抗癌、抗病毒、抑制线粒体自噬、抑制铁死亡等 Anti-inflammatory, anti-cancer, antiviral, inhibit mitochondrial autophagy, inhibit iron death, etc.
磷脂酶 A ₂ ^[6,22] PLA ₂	酶类 Enzymes	10~12	抗炎、抗癌、抗病毒、神经保护、过敏原、致痛等 Anti-inflammatory, anti-cancer, antiviral, neuroprotective, allergen, pain, etc.
透明质酸酶 ^[6,23] Hyaluronidase	酶类 Enzymes	1.5~3.0	扩散因子、过敏原等 Diffusion factors, allergens, etc.
阿帕明肽 ^[6,24] Apamin	多肽 Polypeptide	1.0~3.0	抗炎、抗肿瘤、神经保护、抗纤维化等 Anti-inflammatory, anti-tumor, neuroprotective, anti-fibrosis, etc.
安度肽 ^[15,25] Adolapin	多肽 Polypeptide	<1.0	解热镇痛、抗炎、过敏原等 Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory, allergen, etc.
赛卡品 ^[6,26] Secapin	多肽 Polypeptide	1.0~2.0	抗纤维蛋白溶解、抗弹性纤维溶解和抗微生物活性等 Anti-fibrinolysis, anti-elastic fibrinolysis and anti-microbial activity, etc.
肥大细胞脱粒肽 ^[13,27] MCDP	多肽 Polypeptide	1.0~3.0	抗炎、神经毒性等 Anti-inflammatory, neurotoxic, etc.

1,2,3,6-四氢吡啶诱导的小鼠帕金森模型中的多巴胺能神经元^[30]。在临床试验方面,蜂毒针灸组在帕金森病评定量表、Berg 平衡量表和 30 m 步行时间方面均有显著改善^[31],而且蜂毒还可以抑制神经退行性疾病模型小鼠阿尔茨海默病的进展,通过减少神经炎症来保护脑组织^[32]。蜂毒生物活性与针灸的机械刺激相结合能增强治疗作用,用蜂毒针灸可以减少大鼠的寒冷异常性疼痛和机械性异常性疼痛^[33-34]。此外,在临床上发现,蜂毒针灸治疗能减轻中枢性中风后患者的疼痛^[35],急性踝关节扭伤患者的疼痛^[36],还能改善化疗诱发的周围神经病变患者的生活质量^[37]。蜂毒在临床上作为皮肤病化妆品的应用也有很多,如制剂类型有蜂毒润肤剂^[38]、冷无菌水稀释的纯化蜂毒、水和氢氧化铝吸附的纯化蜂毒毒液制剂等^[39]。

2 蜂毒成分的抗炎机制

炎症是免疫反应的一个主要过程,由感染、受伤和暴露于对体内平衡构成实际或感知威胁的污染物等刺激所触发^[40]。melittin 的抗炎活性是由多种机制产生的,主要包括抑制 toll 样受体(toll-like receptors, TLRs) 2、白细胞分化抗原 14(cluster of differentiation, CD14)和血小板衍生生长因子受体 β(PDGF-β)的信号通路,降低 p38 蛋白激酶

(p38MAPK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、蛋白激酶 B(PKB)、人磷酯酶 Cγ 链(PLCγ1)的活性以及 NF-κB 向细胞核的易位。这种抑制作用减少了皮肤、动脉、关节、肝和神经组织的炎症^[10,41]。

Apamin 肽能够抑制环氧化酶-2(cyclooxygenase, COX-2),降低 TNF-α、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和 NO 的水平^[42]。此外,另有研究表明,在抑制 NF-κB 和信号传导及转录激活因子通路 STAT 的激活的同时,apamin 还能抑制 Th2 相关趋化因子和其他促炎细胞因子^[16]。

MCDP 在低浓度下引起肥大细胞脱颗粒和组胺释放^[1],在高浓度下,MCDP 作为一种抗炎化合物,能够抑制组胺的释放^[43]。MCDP 与 IgE 可建立分子间二硫配合物,引起 IgE 的构象改变,抑制信号向 IgE 的高亲和力受体 FcεRI 的传递。也有研究强调 MCDP 可以与这些受体结合,从而抑制这些受体与 IgE 的结合,最终避免组胺的释放^[44]。

此外,蜂毒及其成分调控宿主的免疫反应是其抗炎的重要机制。Bourgeois 等^[45]研究证实蜂毒毒液可通过 CD1a 蛋白激活人类 T 细胞,临床研究表明,人体皮下注射蜂毒 PLA₂ 后引起脂质含量的局部改变,并将非抗原物质转化为较小的脂质,这些脂质具有 CD1 蛋白介导的 T 细胞抗原性,这些发现

对于阐释蜂毒 PLA₂ 调节 T 细胞介导的皮肤屏障感知以及炎症性皮肤病的机制具有重要意义。

因此,蜂毒各成分主要通过调节过度免疫反应以及抑制炎症相关信号等机制起到抗炎的作用(见图 1),从而实现其对 ISD 的治疗效果。

3 蜂毒成分在 ISD 治疗中的应用

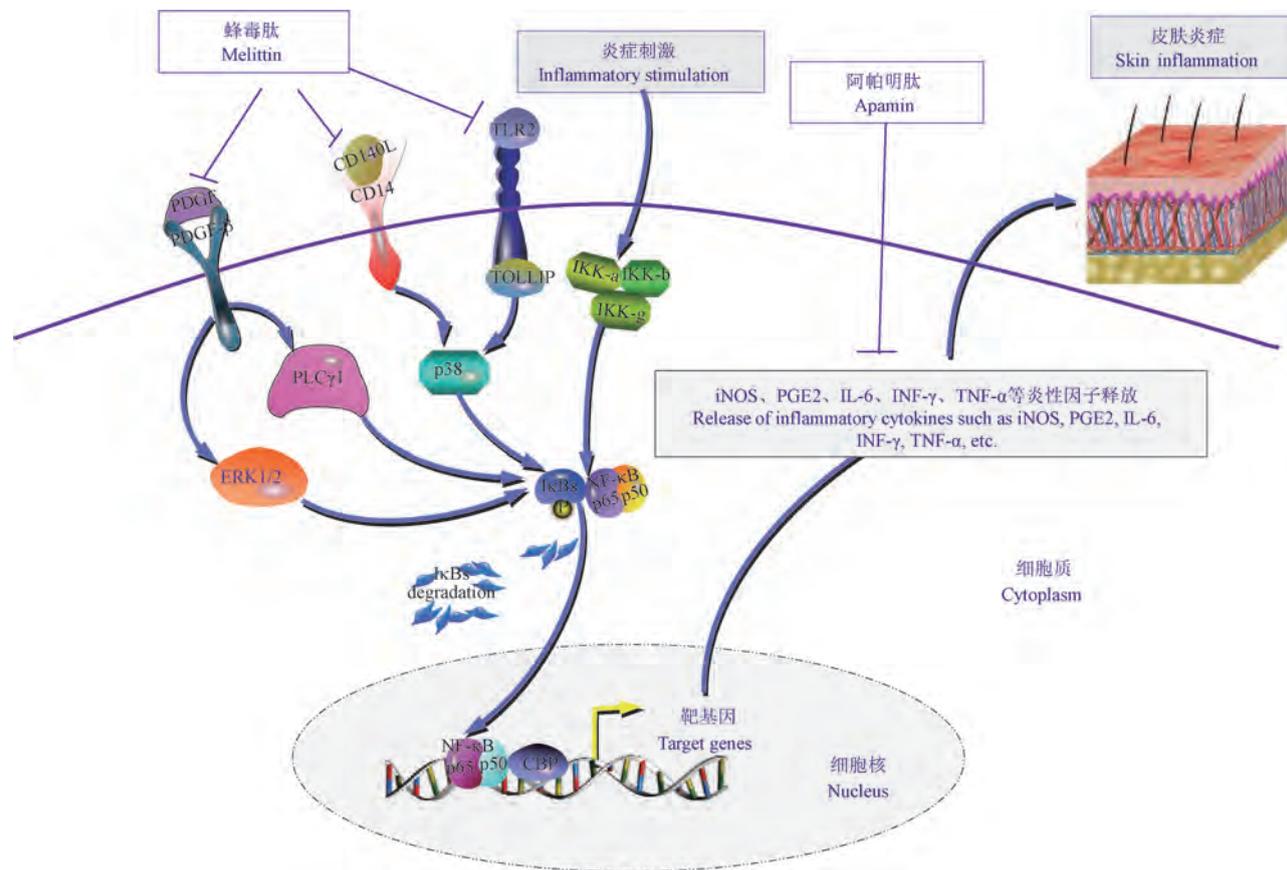
3.1 痤疮(或青春痘)

痤疮以丘疹、脓疱和结节的发展为标志,是一种发生在皮脂腺单位的炎症性疾病^[46]。通过抗生素杀死致病菌来抑制炎症是痤疮常用治疗手段。然而,频繁使用抗生素必定会带来副作用,人们尝试寻找高效、低副作用的痤疮治疗手段^[47]。痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)被认为是痤疮主要致病菌,该菌本是皮肤中普遍存在的细菌,但其过度增殖在炎性痤疮的发展中起着关键作

用,其通过刺激角质形成细胞、皮脂细胞和炎症细胞产生炎症细胞因子促进痤疮的炎症反应^[48-49]。

现有研究证实,蜂毒及其成分具有有效治疗痤疮的潜力^[50-51]。An 等^[52]将痤疮丙酸杆菌皮内注射到小鼠耳朵中诱导痤疮模型,结果表明,用蜂毒外涂治疗显著减少该菌引起浸润炎症的细胞数量,降低 TNF- α 和白细胞介素(IL)-1 β 的表达水平,抑制注射组织中 Toll 样受体(TLR)2、CD14 水平,且核因子- κ B(NF- κ B)和激活蛋白(AP)-1 的结合活性也显著受到抑制。

Gu 等^[53]的研究表明蜂毒及其主要成分 melittin 通过阻断 Akt/mTOR/SREBP 信号通路,抑制脂肪生成和促炎因子表达水平,达到改善痤疮皮肤杆菌和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)诱导的寻常痤疮症状的目的。可见,蜂毒及其成分是潜在的天然抗痤疮药物,抗脂肪生成、抗



注:皮肤白细胞和非白细胞之间相互作用是皮肤炎症进展的主要机制,蜂毒各成分通过与细胞表面受体结合,介导 p38 MAPK、NF- κ B 等炎症信号,从而抑制细胞炎症因子水平,达到抗 ISD 的作用。

图 1 蜂毒成分抗皮肤炎症机制

Note. The interaction between skin leukocytes and non-leukocytes is the main mechanism for the progression of skin inflammation. The components of bee venom bind to cell surface receptors, mediating the activation of inflammatory signaling pathways such as p38 MAPK and NF- κ B, thereby suppressing the levels of inflammatory cytokines and achieving an anti-ISD effect.

Figure 1 Anti-skin inflammation mechanism of bee venom components

炎和抗痤疮丙酸杆菌活性是其抗痤疮的主要作用机制。

3.2 特应性皮炎

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种慢性 and 复发性炎症性皮肤病, 由遗传、炎症和免疫异常引起, 其特征是皮肤屏障缺陷、湿疹、瘙痒、皮肤干燥以及 IgE 介导的对多种外部抗原的异常过敏反应^[54]。抗组胺药、类固醇、非甾体抗炎药和免疫抑制剂已被用于治疗 AD。遗憾的是, 这些药物有严重的不良反应, 如肾毒性和神经毒性^[55]。目前, 研究者们尝试从天然物质寻找 AD 替代治疗剂, 其中蜂毒已被证实治疗 AD 具有临床安全有效的显著优势。Lee 等^[56]发现蜂毒治疗显著降低了邻苯二甲酸酐 (phthalic anhydride, PA) 诱发的 AD 小鼠的临床评分、背部和耳部表皮厚度, 抑制了皮肤组织中的 IgE 水平, 改善了免疫细胞浸润, 降低了血清中炎症细胞因子的水平。此外, 蜂毒还抑制皮肤组织中诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达以及 PA 诱导的丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 和 NF- κ B 的激活。消除了 RAW 264.7 和 HaCaT 细胞中脂多糖或 TNF- α /IFN- γ 诱导的 NO 产生、iNOS 和 COX-2 的表达以及 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 这些结果表明蜂毒可能是 AD 的潜在治疗大分子。

Gu 等^[57]探讨了蜂毒对卵清蛋白 (OVA) 诱导的 AD 样皮肤病变的进展及其机制, 结果显示通过腹膜内接种施用蜂毒有效减轻 AD 症状, 抑制了嗜酸性粒细胞和肥大细胞浸润。Kim 等^[58]发现皮下注射蜂毒治疗 1-氯-2,4-二硝基苯 (DNCB) 诱导的 AD 样小鼠, 降低了血清 C3 转化酶和膜攻击复合物的水平, 促进 CD55 的表达, 认为蜂毒通过诱导 CD55 使补体系统失活, 以改善 AD 症状。

Sur 等^[59]探讨了蜂毒针灸 (BVA) 对偏苯三酸酐 (TMA) 诱导的 AD 皮肤损伤小鼠模型治疗作用, 在膝后双侧皮下注射蜂毒 (0.3 mg/kg), 持续 5 d, 结果显示 BVA 治疗显著抑制 AD 小鼠耳部皮肤和淋巴结中 1 型辅助 T 细胞 (Th1) 和 Th2 细胞因子的表达水平, 显著缓解了 AD 样小鼠的如耳部皮肤症状和厚度、炎症和淋巴结重量等临床症状, 表明特定穴位注射蜂毒能抑制炎症和过敏反应, 有效改善 AD 样皮肤病变。

3.3 银屑病

银屑病是一种常见的具有特征性皮损的、慢性

易于复发的 ISD, 其特征是边界明确的红斑斑块, 上面覆盖着银白色鳞屑。炎症细胞因子 (包括 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β) 的活性被认为是银屑病发生的原因, 因此降低它们的水平可能有助于改善疾病^[60]。Eltaher 等^[61]使用蜂毒作为顽固性局限性斑块状银屑病 (RLPP) 的替代治疗剂, 研究结果显示, 经过 12 次蜂毒治疗后, RLPP 对蜂疗组和安慰剂组的治疗反应存在显著差异 ($P < 0.001$)。与安慰剂组相比, 蜂疗组 92% 的患者获得完全缓解, TNF- α 显著下降, 且蜂疗组未观察到复发, 结果提示蜂毒可以安全有效地治疗 RLPP。在 Hegazi 等^[62]的研究中, 患者接受皮下注射蜂毒和口服蜂胶后, 银屑病面积、严重程度指数评分和血清 IL-1 β 水平均显著降低, 认为两种方法是治疗局部斑块状银屑病安全有效、副作用最小的方法, 且发现皮内注射蜂毒比口服或局部蜂胶有更好的治疗效果。

3.3 其他炎症性皮肤病

接触过敏性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 是由过敏原特异性 T 细胞活化引起的 IV 型迟发型超敏反应^[63]。效应 T 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-4 是引发 ACD 炎症反应的主要细胞因子^[64]。抑制效应 T 细胞的增殖和活化成为治疗 ACD 的有效且有前途的策略。有研究人员开发了一种基于 DC 靶向 α -蜂毒肽-纳米颗粒 (nanoparticles, NPs) 的新型纳米免疫治疗方法, 用于治疗不局限于病变区域的过敏性皮肤病, 低剂量 α -蜂毒肽-NPs 抑制过敏原刺激的 DC 激活, 并进一步抑制过敏原特异性 T 细胞增殖和活化, 从而有效控制过敏性接触性皮炎中 Th1 和 Th2 细胞驱动的免疫反应^[65]。

硬皮病是一种独特的炎症性疾病, 会影响皮肤和皮下组织, 导致胶原蛋白过度堆积, 最终导致纤维化。硬皮病有时会发痒, 但无痛^[66]。硬皮病的确切发病机制尚不清楚, 通常认为硬皮病的病因是免疫激活和炎症反应、纤维化和结节形成。目前, 没有推荐的硬皮病的药物治疗。Hwang 等^[67]研究了蜂毒治疗硬皮病的成功结果, 患者经过蜂毒治疗, 瘙痒减轻, 皮肤状态也有所改善, 与正常皮肤相似, 表明蜂毒有潜力用作硬皮病的局部治疗。

头发被认为是人外表最重要的部分, 脱发与头皮炎症密切相关, 调查发现 74.1% 脱发患者表现为炎症性疾病, 如特应性皮炎和接触性皮炎等^[68]。Park 等^[69]研究了蜂毒对脱发的预防作用, 研究显示蜂毒通过降低 5 α -还原酶的水平来促进退行期小鼠

毛发生长,刺激毛囊增殖,此外,蜂毒刺激人真皮乳头细胞(hDPC)中 IGF-1R、VEGF、FGF2、FGF7 等生长因子的表达,且呈剂量依赖性,认为蜂毒是一种潜在有效毛发生长促进剂。

综上所述,蜂毒及其成分已在临床、动物以及细胞水平上验证了其在痤疮、特应性皮炎、银屑病、过敏性接触性皮炎、脱发和硬皮病等 ISD 中的广泛应用(见表 2),且普遍从调节免疫、炎症信号通路等角度探讨其治疗 ISD 的作用机制。蜂毒在抗 ISD 的确切分子机制尚未阐明,有待进一步的深入探究。

4 结语与展望

尽管痤疮、特应性皮炎、银屑病、脱发等 ISD 临床症状迥然不同,但普遍具有皮肤慢性炎症的特征,且均表现反复发作,久治难愈。因现有 ISD 药物治疗效果有限,且副作用的发生率不断上升,迫切需要更好的治疗方法来缓解 ISD 症状。本综述将蜂毒及其主要成分纳入 ISD 的治疗中,并且深入阐释了蜂毒及其主要成分对 ISD 的药理作用和机制,有

助于促进蜂毒的开发和临床应用。蜂毒的各种活性成分,如蜂毒肽、蜂毒明肽、肥大细胞脱颗粒肽、磷脂酶 A2、透明质酸酶等具有多种不同的药理作用和广泛的临床应用,这可归因于其多靶点和多通路的特点,可以作为一种炎症调节剂影响 ISD 发生、发展。另一方面,与传统 ISD 治疗药物相比,作为天然物质的蜂毒主要表现出过敏性等一过性副作用,而其持续性的副作用相对较小,因此,即使蜂毒在某些 ISD 治疗中疗效低于常规疗法,如果能够充分改善疾病症状,它作为 ISD 治疗剂也具有深入探究的价值。

然而,虽然蜂毒治疗 ISD 的作用已被证明,但其安全性仍然是一个重点考虑的因素。蜂毒的不良反应范围从几天后恢复的轻微皮肤反应到危及生命的严重或致命的过敏反应,包括免疫反应、局部瘙痒或肿胀、过敏、疼痛及非特异性反应等。因而有必要针对不同 ISD 制定特定的蜂毒给药方案以及关注其安全性,以尽量减少过敏反应或不良反应,同时兼顾其较好的抗 ISD 活性。另一方面应加强蜂

表 2 蜂毒及其成分抗炎性皮肤作用

Table 2 Anti-inflammatory skin effects of bee venom and its components

炎症性皮肤病 Inflammatory dermatosis	蜂毒成分及给药 Bee venom ingredients and administration	作用机制或临床应用效果 Mechanism of action or clinical application effect
痤疮 ^[52-53] Acne	蜂毒及其成分 Melittin 外涂 Bee venom and its ingredient Melittin coated	抑制 Toll、NF-κB 等炎症信号,及脂肪生成,改善痤疮皮肤杆菌介导痤疮症状 Inhibiting Toll, NF-κB and other inflammatory signals, and lipogenesis, improving acne symptoms mediated by dermatobacter acnes
特应性皮炎 ^[56-59] Atopic dermatitis	蜂毒注射或针灸 Bee venom injection or acupuncture	抑制嗜酸性粒细胞和肥大细胞等免疫细胞浸润,诱导补体系统失活,减轻 RAW 264.7 和 HaCaT 细胞炎症,改善 AD 样皮肤病变 Inhibit the infiltration of immune cells such as eosinophils and mast cells, induce the inactivation of complement system, reduce the inflammation of RAW 264.7 and HaCaT cells, and improve AD-like skin lesions
银屑病 ^[61-62] Psoriasis	蜂毒注射 Bee venom injection	抑制 TNF-α、IL-1β 表达,降低银屑病面积和严重程度指数评分 Expression of TNF-α and IL-1β was inhibited, and the score of psoriasis area and severity index was decreased
接触过敏性皮炎 ^[65] Allergic contact dermatitis	蜂毒肽-纳米颗粒 Melittin-nanoparticles	抑制 T 细胞增殖和活化,从而降低 Th1 和 Th2 细胞驱动的免疫反应 Inhibits T cell proliferation and activation, thereby reducing Th1 and Th2 cell-driven immune responses
硬皮病 ^[67] Scleroderma	蜂毒针灸 Bee venom acupuncture	硬皮病患者瘙痒减轻,皮肤状态改善,可硬皮病的局部治疗 Pruritus of scleroderma patients is reduced, the skin condition is improved, and scleroderma can be treated locally
脱发 ^[69] Alopecia	蜂毒外涂 Bee venom on top	降低 5α-还原酶水平,刺激 hDPC 细胞 IGF-1R、VEGF、FGF2、FGF7 等生长因子表达,以促进毛发生长,刺激毛囊增殖 Reduce the level of 5α-reductase and stimulate the expression of IGF-1R, VEGF, FGF2, FGF7 and other growth factors in hDPC cells to promote hair growth and stimulate hair follicle proliferation

毒活性成分,尤其是微量成分的分析与鉴定,有利于探索蜂毒抗 ISD 的新型先导化合物或抗 ISD 作用新靶点。此外,积极探索蜂毒和其他药物的结合,以做到对 ISD 减毒增效。最后,蜂毒疗法在 ISD 中的临床应用还有很长的路要走,需要各领域学者协同创新,相信蜂毒及其化合物会最终成为 ISD 高效安全替代治疗药物。

参考文献:

- [1] SÁ D C, FESTA C. Inflammasomes and dermatology [J]. An Bras Dermatol, 2016, 91(5): 566–578.
- [2] BULGER D A, MINHAS S, ASBEUTAH A A, et al. Chronic systemic inflammatory skin disease as a risk factor for cardiovascular disease [J]. Curr Probl Cardiol, 2021, 46(5): 100799.
- [3] WU H, LUO Z, LIU J, et al. Association between psoriasis and coronary artery calcification: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 1044117.
- [4] FARZANFAR D, DOWLATI Y, FRENCH L E, et al. Inflammation: a contributor to depressive comorbidity in inflammatory skin disease [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2018, 31(5): 246–251.
- [5] IANNONE M, JANOWSKA A, PANDURI S, et al. Impact of psychiatric comorbidities in psoriasis, hidradenitis suppurativa and atopic dermatitis: The importance of a psychodermatological approach [J]. Exp Dermatol, 2022, 31(6): 956–961.
- [6] CARPENA M, NUÑEZ-ESTEVEZ B, SORIA-LOPEZ A, et al. Bee venom; an updating review of its bioactive molecules and its health applications [J]. Nutrients, 2020, 12(11): 3360.
- [7] KHALIL A, ELESAWY B H, ALI T M, et al. Bee venom: from venom to drug [J]. Molecules, 2021, 26(16): 4941.
- [8] WEHBE R, FRANGIEH J, RIMA M, et al. Bee venom; overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests [J]. Molecules, 2019, 24(16): 2997.
- [9] SON D J, LEE J W, LEE Y H, et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds [J]. Pharmacol Ther, 2007, 115(2): 246–270.
- [10] LEE G, BAE H. Anti-inflammatory applications of melittin, a major component of bee venom: detailed mechanism of action and adverse effects [J]. Molecules, 2016, 21(5): 616.
- [11] RADY I, SIDDIQUI I A, RADY M, et al. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy [J]. Cancer Lett, 2017, 402: 16–31.
- [12] HANSON J M, MORLEY J, SORIA-HERRERA C. Anti-inflammatory property of 401 (MCD-peptide), a peptide from the venom of the bee *Apis mellifera* (L.) [J]. Br J Pharmacol, 1974, 50(3): 383–392.
- [13] BANKS B E, DEMPSEY C E, VERNON C A, et al. Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulation *in vivo* [J]. Br J Pharmacol, 1990, 99(2): 350–354.
- [14] JAKOB T, RAFEI-SHAMSABADI D, SPILLNER E, et al. Diagnostik der Hymenopterengiftallergie: aktuelle Konzepte und Entwicklungen mit besonderem Fokus auf die molekulare Allergiediagnostik [J]. Allergo J, 2017, 26(3): 33–50.
- [15] CHUNG E S, LEE G, LEE C, et al. Bee venom phospholipase A2, a novel Foxp3 + regulatory T cell inducer, protects dopaminergic neurons by modulating neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease [J]. J Immunol, 2015, 195(10): 4853–4860.
- [16] KIM W H, AN H J, KIM J Y, et al. Apamin inhibits TNF- α - and IFN- γ -induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF- κ B signaling pathway and STAT in human keratinocytes [J]. Pharmacol Rep, 2017, 69(5): 1030–1035.
- [17] HOSSEN M S, SHAPLA U M, GAN S H, et al. Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses [J]. Molecules, 2016, 22(1): 25.
- [18] ABDU AL-SAMIE MOHAMED ALI M. Studies on bee venom and its medical uses [J]. Int J Adv Res, 2012, 1(2): 69–83.
- [19] LIU F, CHEN F, YANG L, et al. Melittin acupoint injection in attenuating bone erosion in collagen-induced arthritis mice via inhibition of the RANKL/NF- κ B signaling pathway [J]. Quant Imaging Med Surg, 2023, 13(9): 5996–6013.
- [20] ZHANG H Q, SUN C, XU N, et al. The current landscape of the antimicrobial peptide melittin and its therapeutic potential [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1326033.
- [21] ZAN H, LIU J, YANG M, et al. Melittin alleviates sepsis-induced acute kidney injury by promoting GPX4 expression to inhibit ferroptosis [J]. Redox Rep, 2024, 29(1): 2290864.
- [22] SOLTAN-ALINEJAD P, ALIPOUR H, MEHARABANI D, et al. Therapeutic potential of bee and scorpion venom phospholipase A2 (PLA2): a narrative review [J]. Iran J Med Sci, 2022, 47(4): 300–313.
- [23] GULIYEVA G, HUAYLLANI M T, KRAFT C, et al. Allergic complications of hyaluronidase injection: risk factors, treatment strategies, and recommendations for management [J]. Aesthetic Plast Surg, 2024, 48(3): 413–439.
- [24] KUZMENKOV A I, PEIGNEUR S, NASBURG J A, et al. Apamin structure and pharmacology revisited [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 977440.
- [25] KOBUROVA K, MIKHAĬLOVA S, SHKENDEROV S. Antipyretic effect of a polypeptide from bee venom—adolapin [J]. Eksp Med Morfol, 1984, 23(3): 143–148.
- [26] LEE K S, KIM B Y, YOON H J, et al. Secapin, a bee venom peptide, exhibits anti-fibrinolytic, anti-elastolytic, and anti-microbial activities [J]. Dev Comp Immunol, 2016, 63: 27–35.
- [27] YE X, GUAN S, LIU J, et al. Activities of venom proteins and peptides with possible therapeutic applications from bees and WASPS [J]. Protein Pept Lett, 2016, 23(8): 748–755.

- [28] PARK M H, KIM J H, JEON J W, et al. Preformulation studies of bee venom for the preparation of bee venom-loaded PLGA particles [J]. *Molecules*, 2015, 20(8): 15072–15083.
- [29] LIU X, CHEN D, XIE L, et al. Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome [J]. *J Control Release*, 2003, 93(3): 293–300.
- [30] DOO A R, KIM S N, KIM S T, et al. Bee venom protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic cell death [J]. *Brain Res*, 2012, 1429: 106–115.
- [31] CHO K H, KIM T H, JUNG W S, et al. Pharmacopuncture for idiopathic Parkinson's disease: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 3671542.
- [32] YE M, CHUNG H S, LEE C, et al. Neuroprotective effects of bee venom phospholipase A2 in the 3xTg AD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 10.
- [33] YOON H, KIM M J, YOON I, et al. Nicotinic acetylcholine receptors mediate the suppressive effect of an injection of diluted bee venom into the GV3 acupoint on oxaliplatin-induced neuropathic cold allodynia in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(5): 710–714.
- [34] CHOI J, JEON C, LEE J H, et al. Suppressive effects of bee venom acupuncture on paclitaxel-induced neuropathic pain in rats: mediation by spinal α -adrenergic receptor [J]. *Toxins*, 2017, 9(11): 351.
- [35] KIM M, HAN C H. Pharmacopuncture for stroke survivors: a systematic review of randomized controlled trials in South Korea [J]. *Complement Ther Clin Pract*, 2020, 40: 101179.
- [36] LEE M S, PITTLER M H, SHIN B C, et al. Bee venom acupuncture for musculoskeletal pain: a review [J]. *J Pain*, 2008, 9(4): 289–297.
- [37] YOON J, JEON J H, LEE Y W, et al. Sweet bee venom pharmacopuncture for chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. *J Acupunct Meridian Stud*, 2012, 5(4): 156–165.
- [38] YOU C E, MOON S H, LEE K H, et al. Effects of emollient containing bee venom on atopic dermatitis: a double-blinded, randomized, base-controlled, multicenter study of 136 patients [J]. *Ann Dermatol*, 2016, 28(5): 593–599.
- [39] SEPPÄLÄ U, FRANCESE S, TURILLAZZI S, et al. *In situ* imaging of honeybee (*Apis mellifera*) venom components from aqueous and aluminum hydroxide-adsorbed venom immunotherapy preparations [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(5): 1314–1320.
- [40] NATHAN C. Points of control in inflammation [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 846–852.
- [41] KIM W H, AN H J, KIM J Y, et al. Anti-inflammatory effect of melittin on *Porphyromonas gingivalis* LPS-stimulated human keratinocytes [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 332.
- [42] LEE Y M, CHO S N, SON E, et al. Apamin from bee venom suppresses inflammation in a murine model of gouty arthritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112860.
- [43] BUKU A, PRICE J A. Further studies on the structural requirements for mast cell degranulating (MCD) peptide-mediated histamine release [J]. *Peptides*, 2001, 22(12): 1987–1991.
- [44] BUKU A, MENDLOWITZ M, CONDIE B A, et al. Partial alanine scan of mast cell degranulating peptide (MCD): importance of the histidine- and arginine residues [J]. *J Pept Sci*, 2004, 10(6): 313–317.
- [45] BOURGEOIS E A, SUBRAMANIAM S, CHENG T Y, et al. Bee venom processes human skin lipids for presentation by CD1a [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(2): 149–163.
- [46] JAPPE U. Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy [J]. *Acta Derm Venereol*, 2003, 83(4): 241–248.
- [47] OCHSENDORF F. Systemic antibiotic therapy of acne vulgaris [J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2010, 8(Suppl 1): S31–S46.
- [48] LIU P F, HSIEH Y D, LIN Y C, et al. *Propionibacterium acnes* in the pathogenesis and immunotherapy of acne vulgaris [J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16(4): 245–254.
- [49] LEE E H, SHIN J H, KIM S S, et al. Suppression of *Propionibacterium acnes*-Induced skin inflammation by *Laurus nobilis* extract and its major constituent eucalyptol [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3510.
- [50] CAO H, YANG G, WANG Y, et al. Complementary therapies for acne vulgaris [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 1(1): CD009436.
- [51] KIM H, PARK S Y, LEE G. Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: a literature review [J]. *Toxins*, 2019, 11(7): 374.
- [52] AN H J, LEE W R, KIM K H, et al. Inhibitory effects of bee venom on *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory skin disease in an animal model [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(5): 1341–1348.
- [53] GU H, AN H J, GWON M G, et al. Bee venom and its major component melittin attenuated *Cutibacterium acnes*- and IGF-1-Induced acne *Vulgaris* via inactivation of Akt/mTOR/SREBP signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3152.
- [54] LEE H J, LEE S H. Epidermal permeability barrier defects and barrier repair therapy in atopic dermatitis [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2014, 6(4): 276–287.
- [55] FRIEDMAN E S, LANATRA N, STILLER M J. NSAIDs in dermatologic therapy: review and preview [J]. *J Cutan Med Surg*, 2002, 6(5): 449–459.
- [56] LEE Y J, OH M J, LEE D H, et al. Anti-inflammatory effect of bee venom in phthalic anhydride-induced atopic dermatitis animal model [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(1): 253–263.
- [57] GU H, KIM W H, AN H J, et al. Therapeutic effects of bee venom on experimental atopic dermatitis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3711–3718.

史亚瑾,李寒冰,李根林,等. 基于中西医临床病证特点的银屑病性关节炎动物模型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 156-166.

Shi YJ, Li HB, Li GL, et al. Analysis of animal model of psoriatic arthritis based on Chinese and Western medicine characteristics [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 156-166.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.018

基于中西医临床病证特点的银屑病性关节炎 动物模型分析

史亚瑾,李寒冰,李根林,吴宿慧*

(河南中医药大学,河南省健康衰老产业工程研究中心,郑州 450046)

【摘要】 近年来,随着银屑病性关节炎在我国的发病率逐渐升高且其无法治愈,已经成为了医学事业上的一大难题。本研究基于中西医临床病证特点,积极探索银屑病性关节炎的发病病机,总结目前现有的动物模型并进行分析评价。对当前所查询到符合本题的文献进行整理归纳总结,通过银屑病性关节炎的中西医病因病机研究、中西医的诊断标准和动物模型的特点及与临床吻合度的分析,给予现有动物模型吻合度评分。本论述发现人白细胞抗原转基因鼠模型、多重杂交转基因小鼠模型以及甘露聚糖诱导的小鼠模型吻合度评分最高。由于银屑病性关节炎多见于欧洲,目前动物模型的制备方法多由国外传来,中医病证特点制备的动物模型极少,因此,西医诊断的模型吻合度评分整体高于中医诊断的吻合度评分。希望未来可以结合中医的独特诊疗方法,进一步完善银屑病性关节炎的动物模型种类,为中西医结合治疗银屑病性关节炎构建更理想的动物模型提供基础。

【关键词】 银屑病性关节炎;临床病证特点;动物模型;吻合度

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0156-11

Analysis of animal model of psoriatic arthritis based on Chinese and Western medicine characteristics

SHI Yajin, LI Hanbing, LI Genlin, WU Suhui*

(Henan University of Chinese medicine, Henan Health Aging Industry Engineering Research Center, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 In recent years, psoriatic arthritis has become a major problem in the medical field, with cases gradually increasing in China, and it is still incurable. Here, we summarize the pathogenesis and clinical characteristics of currently available animal models of psoriatic arthritis based on Chinese and Western medical evidence. Literature in line with this topic was collated and summarized. The etiology and pathogenesis according to Chinese and Western medicine of existing psoriatic arthritis models were given agreement scores; the diagnostic criteria of Chinese and Western medicine were compared; and the models' characteristics and degree of agreement with clinical observations were assessed. This study found that the human leukocyte antigen transgenic mouse model, the multiple hybridization transgenic mouse model, and the mannan-induced mouse model had the highest agreement scores. As psoriatic arthritis is more common in Europe, methods for the preparation of animal models have been mostly imported from abroad, and very few animal models have the

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2020YFE0201800);河南省中医药科学研究专项(20-21ZY1041);河南省科技攻关项目(232102311191)。

【作者简介】 史亚瑾(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理学研究。E-mail:834049152@qq.com

【通信作者】 吴宿慧(1979—),女,博士,教授,研究方向:神经退行性疾病的中医药防治。E-mail:wusuhui@hactcm.edu.cn

characteristics of Chinese medicine; therefore, the model fitness scores of Western diagnoses were higher than those of Chinese diagnoses as a whole. We hope to leverage the unique diagnosis and treatment method of Chinese medicine further to improve the types of psoriatic arthritis animal models available. This study provides a basis for the construction of improved animal models of psoriatic arthritis with combined traditional Chinese and Western medicine characteristics.

【Keywords】 psoriatic arthritis; clinical characteristics; animal model; coincidence degree

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

银屑病性关节炎 (psoriatic arthritis, PsA) 是银屑病的延伸性疾病, 发病率较高, 约占银屑病患者的 20%, 属于自身免疫性疾病的一种慢性疾病, 以指趾肿胀、关节受损、软组织僵硬、活动受限等为主要症状^[1]。大部分患者伴有银屑病皮损的临床表现, 严重者可能导致残疾或引发心血管疾病, 与类风湿关节炎的症状极为相似, 常以附着点炎症的骨骼超声和风湿因子的测定等作为区分^[2-3]。PsA 现代医学不可治愈, 严重影响了患者的正常生活, 目前无法确定银屑病及 PsA 的具体发病机制, 也没有合适的治疗药物且容易反复发作, 因此, 适宜的动物模型是探讨发病机制和寻找治疗药物的关键。目前 PsA 动物模型主要包括自发性模型、基因工程模型、诱导性模型以及关节炎相关模型^[4]。随着近年来 PsA 发病率的上升, 临床样本量得到有效的积累, 为我们评价动物模型的临床吻合度提供了有效参考。本文通过查阅多个中外文献数据库并结合相关资料分别从中西医角度探讨 PsA 的病因病机、辩证诊断标准、动物模型的吻合度 3 个方面对现有 PsA 动物模型进行分析, 以期建立完善的评价体系, 为后期 PsA 动物实验模型的建立提供新的思路和参考。

1 PsA 的病因病机

1.1 西医病因病机

目前 PsA 现代医学的具体发病机制还不明确, 一般多因炎症反应、免疫介导、家族遗传、环境因素、饮食习惯、其他疾病并发等原因导致^[5]。IL-23/IL-17 轴失调是当下较为认可的 PsA 发病机制, IL-23/IL-17 轴被认为与机体的炎症反应和免疫功能密切相关^[6]。IL-23/IL-17 轴被激活时, 末端驻留细胞被活化从而诱导大量炎症细胞的聚集, 进而导致关节的退化、破坏以及滑膜炎, 同时, 这种改变会进一步促进免疫细胞的聚集, 加重此类反应^[7]。有研究表明, B 细胞、T 细胞 (CD4⁺ 和 CD8⁺) 以及 TNF- α 因子也是参与该过程的重要一环^[8]。

1.2 中医病因病机

PsA 在中医中没有具体的范畴, 一般是指多由

银屑病皮损受累后所出现的痹症。PsA 中银屑病的皮损属于中医中的“白庖”, 皮损形状如同松皮, 表层银白皮屑下搔之有似红斑的鳞屑, 俗称“牛皮癣”^[9]。PsA 的关节性病变在中医中属于“顽痹”“尪痹”“历节病”“骨痹”的范畴^[10]。明《医林绳墨·痹》记载:“久风入中, 肌肉不仁”;《素问·长刺节论》中曰:“病在骨, 骨重不可举, 骨髓酸痛, 寒气至其次”, 皆是古人对 PsA 的早期认识。中医认为, 风寒、风湿、热邪、血瘀、肝肾亏虚皆可成为 PsA 的发病病因, 病邪侵入肌表, 伤及经络、骨节, 体内血行不通, 气血瘀滞, 不得上行肌肤失养, 不得下行痹阻经络, 以致肌肤不荣, 筋脉不得通利^[11-12]。

2 PsA 的中西医诊断标准

2.1 西医诊断标准

PsA 现代医学的临床诊断并没有确切的“黄金标准”, 根据目前国际银屑病和银屑病性关节炎研究和评估组的建议 CASPAR 分类标准^[13]为主, 以 PsA 的疾病活动度 (DAPSA) 和银屑病性关节炎诊治指南^[14-15]为辅, 归纳 PsA 的临床症状、一般检查、病理改变和实验室检查 4 部分作为 PsA 诊断标准, 总结西医临床诊断标准结果, 见表 1。

由于临床症状最易观察, 将其作为评估动物模型赋值的主要参考 (①、②、③、⑤、⑦), 动物实验中常见的一般检查 (⑥、⑦) 和实验室检查 (④、⑧) 作为辅助参考, 汇总赋值项如下: ①炎症性关节炎 (关节、脊柱或附着点); ②银屑病症状 (确诊银屑病、银屑病家族史、银屑病个人史); ③甲营养不良; ④类风湿因子阴性; ⑤指 (趾) 炎 (病史); ⑥影像学显示大关节有边界不清的骨化; ⑦关节压痛、肿胀; ⑧ C 反应蛋白 (CRP) 等炎症因子升高; 临床上 PsA 的典型表现为关节炎和银屑病样病变, 即①、②归为核心指标, 其余赋值项归为相关指标, 根据文献^[16], 符合主要症状①、②吻合度每项分别赋值为 30%, 符合其余六项吻合度每项分别赋值为 6.67%, 总分为 100%。

表 1 PsA 西医诊断标准
Table 1 Diagnostic criteria of PsA Western medicine

分类 Classification	表现 Presentation
临床症状 Clinical symptoms	①关节发热、疼痛、肿胀、有压痛;②在头皮、躯干、四肢处出现银白色皮屑,皮屑易脱落,有红色肿块;③指甲可能会形成小凹痕(凹面)、碎裂或从甲床上脱落;④手指和脚趾肿胀;⑤并发视觉减退、脊椎炎、心脑血管疾病等。 ①Heat, pain, swelling, and tenderness in the joints; ②Silver-white flakes on the scalp, trunk, and limbs, which are easy to peel off, and red bumps; ③Nails may form small indentations (concave surfaces), chip, or fall off from the nail beds; ④Swelling of the fingers and toes; ⑤Complications such as visual loss, spondylitis, and cardiovascular disease.
一般检查 General inspection	①与类风湿关节炎(RA)比,银屑病性关节炎的关节压痛可能较轻;②患者有家族史或银屑病的既往史;③影像学检查:射线和CT扫描显示软骨消失,关节面凹凸不平,有关节炎症而形成新骨的迹象。 ①Psoriatic arthritis may have less joint tenderness than rheumatoid arthritis (RA); ②Patient has a family history or a past history of psoriasis; ③Imaging tests: radiographs and CT scans show loss of cartilage, unevenness of the articular surfaces, and signs of new bone formation due to joint inflammation.
病理改变 Pathological changes	病变早期滑膜细胞轻度增生和肥大,伴少量纤维素样物渗出;病变中期滑膜细胞下轻度水肿和纤维组织增生,小血管明显增生、充血,伴少量淋巴细胞、浆细胞浸润;病变晚期滑膜纤维组织明显增多,残留小血管增厚、管腔狭窄。 Early lesions of synovial cells mild proliferation and hypertrophy, with a small amount of fibrin-like material exudation; middle lesions of synovial cells under the mild edema and fibrous tissue hyperplasia, small blood vessels obvious hyperplasia, congestion, with a small number of lymphocytes, plasma cells infiltration; lesions of advanced synovial fibrous tissue increased significantly, residual small blood vessel thickening, lumen narrowing.
实验室检查 Laboratory examination	①血沉加快、炎症因子增加、补体水平增高;②炎症标志物C反应蛋白(CRP)升高;③滑膜液中中性粒细胞和白细胞数增多;④类风湿因子阴性。 ①Accelerated blood sedimentation, increased inflammatory factors, and increased complement levels; ②Elevated C-reactive protein (CRP), a marker of inflammation; ③Increased neutrophil and leukocyte counts in synovial fluid; ④Negative rheumatoid factor.

2.2 中医诊断标准

以中国中西医结合学会第十六届风湿学术年会总结的《银屑病性关节炎的中医辨证用药治疗分析》^[17]及各位名医大家治疗PsA经验要谈^[18-22]为依据,归纳PsA的中医辨证分型如下:湿热痹阻证、热毒蕴结证、肝肾阴虚证、寒湿阻络证、阴虚血燥证和血热风燥证。根据文献^[16,23]及上述依据汇总的诊断标准对PsA模型相应分型赋值,将中医临床诊断标准分为主证和次证,分别计算主证吻合数及次证吻合数,符合主证两项(关节异常、鳞屑样病变)吻合度每项分别赋值30%,符合次证六项(瘙痒、活动度、寒热、毛发、大小便等)吻合度每项分别赋值6.67%,总分值100%,中医各证型的模型具体诊断标准结果见表2。

3 PsA 动物模型的吻合度分析和模型的选择

3.1 PsA 模型动物的选择

目前用于PsA动物实验的模型较多,包括PsA大小鼠模型、PsA兔模型、PsA狗模型等,它们都具有关节数量多且复杂、皮毛丰富的特点。在野生环境中,研究已发现部分食肉动物及灵长类动物有类

似PsA的症状发生,但考虑到造模成本和实验的可行性,一般选用PsA大、小鼠模型作为主要的实验对象^[24]。

3.2 PsA 动物模型中西医吻合度的评价分析

PsA是在银屑病的基础上所诱导的一种关节炎性疾病,通过CNKI、万方、PubMed等多个数据库搜索“psoriasis arthropathica”“psoriatic arthritis”等关键词,得知PsA动物模型大多由银屑病动物模型和多种关节炎性动物模型发展而来,以转基因、杂交、诱导的手段造模最为常见^[25]。分析发现,西医临床症状吻合度在43.4%~93.5%,中医临床症状吻合度在30%~80%,其中以HLA-B27转基因大小鼠模型、K5.Stat3C:F759转基因小鼠以及甘露聚糖诱导的小鼠模型中西医综合评分较高,吻合度约在83%~87%,症状符合度高,但有造模的成功率偏低、造价偏高的缺点。PsA动物模型的动物名称、具体构建方法、模型优缺点以及中西医模型临床吻合度分析见表3。

3.3 中西医吻合度评价PsA动物模型的观测标准

本研究参考相关文献^[26-27]根据2.1、2.2诊断标准的赋值情况评估PsA动物模型中西医临床吻

表 2 PsA 中医证候诊断标准

Table 2 Diagnostic criteria for TCM syndromes of PsA

分型 Typing	主证 Main symptom	次证 Secondary symptom	舌脉 Pulse and tongue
湿热痹阻证 Damp-heat paralysis syndrome	①疹多色鲜红,多厚重鳞屑,伴点状出血明显;②手指、足趾关节红肿疼痛、压痛,活动不利 ① Rash color bright red, thick scales, with pitting hemorrhage obvious; ② Fingers, toes joints red, swollen, pain, pressure pain, adverse activities	①瘙痒;②毛发掉落;③口渴;④大便干;⑤小便短赤;⑥心烦易怒 ① Itching; ② Hair loss; ③ Thirst; ④ Dry stools; ⑤ Short and red urine; ⑥ Upset and irritable	舌质红,苔黄腻,脉弦滑 Red tongue, yellow fur, slippery pulse
热毒蕴结证 Heat-toxin amassment pattern	①反复大片红斑鳞屑;②关节处屈伸不利,蹲起困难 ① Repeated large erythematous scales; ② Unfavorable flexion and extension of the joints, squatting difficulties	①双手晨僵;②握力减退;③腕膝关节疼痛;④纳差;⑤寐欠安;⑥大便干 ① Morning stiffness of hands; ② Loss of grip strength; ③ Pain in wrist and knee joints; ④ Poor appetite; ⑤ Poor sleep; ⑥ Dry stools	舌质黯,苔黄腻,脉弦滑 Dull tongue, yellowish greasy moss, stringy and slippery pulse
肝肾阴虚证 Liver-kidney Yin deficiency	①病程日久,症见皮损色暗或淡红;②关节僵硬疼痛,或变形 ① Disease for a long time, see the skin lesions dark or reddish; ② Joints stiff and painful, or deformed	①肌肉拘急;②潮热盗汗;③心烦失眠;④形寒肢冷;⑤腰背酸痛;⑥小便清长 ① Muscle constriction; ② Hot flashes and night sweats; ③ Heartburn and insomnia; ④ Coldness; ⑤ Lumbar and back pain; ⑥ Prolonged urination	舌质淡红,苔少白,脉沉细 Tongue pale red, moss less white, pulse sunken and fine
寒湿阻络证 Syndrome of cold-dampness blocking collaterals	①皮损颜色暗红并伴有鳞屑,呈蛎壳状关节;②关节红肿疼痛,痛有定处,遇冷加重 ① Skin lesions dark red color with scales, oyster shell joints; ② Joints red, swollen and painful, the pain has a fixed place, aggravated by the cold	①畏寒肢冷;②筋肉拘急;③活动受限;④口渴欲饮;⑤腹胀;⑥便溏 ① Cold feet and limbs; ② Muscle and flesh constriction; ③ Restriction of movement; ④ Thirst and desire to drink; ⑤ Abdominal distension; ⑥ Loose stools	舌质淡,苔白,脉沉缓 Tongue pale, moss white, pulse dull and slow
痰瘀互结证 Accumulation of phlegm stasis	①皮损为暗红色斑块,鳞屑肥厚且附着较紧;②关节处剧烈刺痛而位置相对固定不移 ① Lesions are dark red plaques with thick and tightly attached scales; ② Severe tingling in the joints with a relatively fixed location	①瘙痒;②面色晦暗;③唇色青紫;④体倦乏力;⑤食欲减退;⑥饮不解渴 ① Itching; ② Dullness of the face; ③ Blue lips; ④ Tiredness; ⑤ Loss of appetite; ⑥ Drinking does not quench thirst	舌质紫暗并伴有瘀斑,苔白腻,脉沉涩 Purple and dark tongue with petechiae, white greasy moss, dull and astringent pulse
血热风燥证 Signs of heat in the blood and dryness in the wind	①淡红色斑块,上覆银白色鳞屑肥厚干燥;②关节红肿热痛,遇热痛剧,触之温度升高 ① Reddish plaque, covered with silver-white scales, hypertrophy and dryness; ② Joints red, swollen, hot and painful, when the heat pain is sharp, the temperature rises when touched	①皮肤瘙痒;②指甲甲下增厚且有皱襞;③夜寐不安,烦躁易醒;④皮肤干燥;⑤小便色黄,排尿时有灼热感;⑥大便干结 ① Itchy skin; ② Thickening and folds under the fingernails; ③ Sleeplessness at night, restlessness and easy to wake up; ④ Dry skin; ⑤ Yellow urine, burning sensation when urinating; ⑥ Dry and knotty stools	舌质红,苔黄,脉弦数 Red tongue, yellow moss, stringy pulse

合度,所总结的 PsA 模型中西医观测标准如下:(1) 西医:①关节炎症状(脊柱关节炎、踝腕关节炎、指趾关节炎、关节肿痛、软骨破坏等);②银屑病症状(银屑病样皮损、脱皮退毛、表皮增厚、真皮炎症伴有渗出物等);③甲病变(甲凹陷、趾甲碎裂脱落等);④生化指标(C 反应蛋白、炎症因子、血沉、类风湿因子);⑤影像学检查(X 光、CT、核磁);(2) 中

医:①皮肤斑块鳞屑(鳞屑厚度、皮疹颜色、温度、干燥程度);②关节损伤(活动度、疼痛类型、肿胀程度、寒热);③伴随症状(瘙痒、寒热、筋肉活动度、指甲病变、腹胀、睡眠、大小便等)。现阶段关于 PsA 的研究以临床病例分析以及动物实验为主要方法,由于人类与实验动物临床表现的差异,可能还需要进一步完善。

表 3 PsA 动物模型的特点及与临床吻合度的分析

Table 3 Characteristics of animal models of PsA and analysis of the degree of agreement with the clinic

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	制备方式 Preparation method	模型评价 Model evaluation	模型临床吻合度 Consistency with clinical symptoms
自发/遗传基因突变模型 ^[28-29] Spontaneous/genetic mutation models	自发性 DBA/1 小鼠 Spontaneity DBA/1 model mice	通过 DBA/1 品系小鼠的近亲繁殖而来 Inbred through inbreeding in the DBA/1 strain of mice	优点: 发病率高; 操作简单 Advantages: high morbidity; easy to operate 缺点: 无大关节损伤; 皮肤病变出现较少 Disadvantages: no major joint damage; fewer skin lesions present	(1) 表征: 后爪周围关节的强直附着点炎 (AE), 并伴有脚趾骨炎和甲受累; 可自发出现银屑病样皮损; (2) 西医临床吻合 ①②③⑤⑦, 综合赋值 80%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①②, 次证①②③, 综合赋值 80%。 (1) Characteristics: ankylosing attachment point inflammation (AE) of the joints around the hind claws, accompanied by osteitis of the toes and nail involvement; psoriasiform skin lesions may appear spontaneously; (2) Clinical match in Western medicine ①②③⑤⑦, with a combined value of 80%; (3) Clinical match in Chinese medicine (CM): Damp-heat paralysis type, with the primary symptom①②, and the secondary symptom①②③, with a combined value of 80%.
基因突变模型 ^[30] Gene mutation model	C57BL/10 小鼠 C57BL/10 mice	老年雄性 C57BL/10 小鼠中出现的 B10. BR (H-2k) 小鼠 B10. BR (H-2k) mice arising in aged male C57BL/10 mice	优点: 关节炎表现明显; 有肠道菌群紊乱 Advantages: joint inflammation is evident; there are disorders of intestinal flora 缺点: SPF 环境发病率低; 无皮肤病变 Disadvantages: low environmental incidence of SPF; no skin lesions	(1) 表征: 强直性附着点病症状明显, 关节僵硬, 可观察到炎症细胞浸润及关节处骨质侵蚀; (2) 西医临床吻合 ①③⑥⑦⑧, 综合赋值 56.68%; (3) 中医临床吻合: 热毒蕴结型, 主证②, 次证①②③, 综合赋值 50%。 (1) Characterization: Ankylosing attachment point disease symptoms, joint stiffness, inflammatory cell infiltration and bone erosion at the joints can be observed; (2) Western clinical match ①③⑥⑦⑧ with a combined value of 56.68%; (3) Chinese medicine clinical match: heat-toxin accumulation type, primary ②, secondary ①②③, with a combined value of 50%.
转基因模型 Transgenic model	HLA-DR4 转基因小鼠 ^[31] HLA-DR4 transgenic mice	敲除内源性 MHC II 类基因, 并转移 HLA-DR4 基因 Knockdown of endogenous MHC class II genes and transfer of the HLA-DR4 gene	优点: 发病率较高; 关节组织病理学和影像学表现与人类相似 Advantages: high prevalence; joint histopathology and imaging similar to humans 缺点: 无皮损和关节炎等典型表现; 作用机制不明确 Disadvantages: no typical manifestations such as skin lesions and joint inflammation; mechanism of action unclear	(1) 表征: 指 (趾) 炎及指甲病变显著, 有严重的骨受损, 周围表皮增厚, 出现“香肠样”脚趾, 雌性多发; (2) 西医临床吻合, ①③⑥⑦⑧ 综合赋值 56.68%; (3) 中医临床吻合: 血热风燥型, 主证①, 次证①②, 综合赋值 43.34%。 (1) Characteristics: significant finger (toe) inflammation and nail lesions, severe bone damage, thickening of the surrounding epidermis, and the appearance of “sausage-like” toes, which are more frequent in females; (2) Clinical match in Western medicine, ①③⑥⑦⑧, with a combined value of 56.68%; (3) Clinical match in Chinese medicine: blood-heat-wind-dryness type, primary symptom ①, secondary symptom ①②, with a combined value of 43.34%.
	HLA-B27 转基因大鼠小鼠模型 ^[32] HLA-B27 transgenic rat mouse model	将 HLA-B27 和人类 β2 微球蛋白基因导入大鼠小鼠体内 Introduction of HLA-B27 and human β2 microglobulin genes into large mice	优点: 起病迅速, 与人类发病症状相似 Advantages: rapid onset of disease, similar to human onset symptoms 缺点: 发病率较低, 造模时间较长 Disadvantages: lower incidence, longer molding time	(1) 表征: 关节炎症状明显并伴有银屑病样皮损, 同时出现了炎性肠病和甲病变, 雄性多发, 具有遗传特性; (2) 西医临床吻合, ①②③④⑤⑦⑧ 综合赋值 93.35%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①②, 次证①②④, 综合赋值 80%。 (1) Characteristics: arthritis with psoriasiform lesions, inflammatory bowel disease and nail lesions, androgenic, with genetic characteristics; (2) Clinical match in Western medicine, ①②③④⑤⑦⑧, 93.35% of the total value; (3) Clinical match in Traditional Chinese Medicine (TCM): Damp-heat paralysis type, the main symptom ①②, the secondary symptom ①②④, with a combined value of 80%.

续表3

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	制备方式 Preparation method	模型评价 Model evaluation	模型临床吻合度 Consistency with clinical symptoms
JunB/c-Jun 转基因型小鼠模型 ^[33] JunB/c-Jun transgenic mouse model		敲除 JunB 和 c-Jun 双基因或是将携带 JunB 和 c-Jun 基因的小鼠与 K5-Cre-ERT 转基因小鼠杂交并注射他莫昔芬 Knockout of JunB and c-Jun dual genes or crossing of mice carrying JunB and c-Jun genes with K5-Cre-ERT transgenic mice and injection of tamoxifen	优点: 起病迅速, 皮损明显 Advantages: rapid onset, visible skin lesions 缺点: 价格昂贵, 无大关节炎症 Disadvantages: expensive, no major joint inflammation	(1) 表征: 银屑病皮损较为典型, 小关节炎明显, 影像学可观察到骨侵蚀; (2) 西医临床吻合, ①②③④⑤⑥综合赋值 86.68%; (3) 中医临床吻合: 血热风燥型, 主证①②, 次证①②, 综合赋值 73.34%。 (1) Characterization: psoriasis lesions are typical, inflammation of small joints is obvious, and bone erosion can be observed on imaging; (2) Clinical match in Western medicine, ①②③④⑤⑥, with a combined value of 86.68%; (3) Clinical match in Traditional Chinese Medicine (TCM): blood-heat and wind-drying type, primary symptom ①②, secondary symptom ①②, with a combined value of 73.34%.
K14-AREG 转基因模型小鼠 ^[34] K14-AREG transgenic model mice		将 K14 启动子和鼠编码基因 AREG 插入到鼠基因组内, 控制其过表达 Insertion of the K14 promoter and the murine coding gene AREG into the murine genome to control its overexpression	优点: 皮损症状明显, 无性别差异 Advantages: obvious symptoms of skin lesions, no gender differences 缺点: 操作困难, 价格较高, 存活率低 Disadvantages: difficult to operate, more expensive, low survival rate	(1) 表征: 皮肤脱毛, 有红色斑块且覆有鳞屑, 关节处出现炎性浸润及滑膜炎, 是 PsA 的前期表现; (2) 西医临床吻合①②④, 综合赋值 66.7%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①②, 次证②, 综合赋值 66.7%。 (1) Symptoms: skin hair loss, red plaques with scales, inflammatory infiltration and synovitis in joints, which is a pre-presentation of PsA; (2) Clinical match in Western medicine ①②④, with a combined value of 66.7%; (3) Clinical match in Chinese medicine: Damp-heat paralysis obstruction type, primary symptom ①②, secondary symptom ②, with a combined value of 66.7%.
BMPs-6 基因过表达小鼠 ^[35] BMPs-6 gene overexpressing mice		将表达 BMP 的 cDNA 引入质粒中, 以角蛋白 10 为表达载体, 构建具有高 BMPs 表达的转基因小鼠 Transgenic mice with high expression of BMPs were constructed by introducing BMP-expressing cDNA into the plasmid and using keratin 10 as the expression vector	优点: 起病迅速, 无性别差异 Advantages: rapid onset, no gender differences 缺点: 价格昂贵, 无大关节炎症及银屑病皮损 Disadvantages: expensive, no major joint inflammation or psoriasiform lesions	(1) 表征: 指(趾)肿胀及甲受累, 表皮炎性浸润增厚并伴随脱皮褪毛的表现; (2) 西医临床吻合, ①③⑤综合赋值 43.4%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①, 次证①②, 综合赋值 43.4%。 (1) Symptoms: finger (toe) swelling and nail involvement, epidermal inflammatory infiltration and thickening accompanied by desquamation and hair loss; (2) Clinical match in Western medicine, ①③⑤, with a combined value of 43.4%; (3) Clinical match in Traditional Chinese Medicine (TCM): Damp-heat paralysis type, primary symptom ①, secondary symptom ①②, with a combined value of 43.4%.
K5. Stat3C; F759 转基因小鼠 ^[36] K5. Stat3C; F759 transgenic mice		Gp130F759 转基因小鼠与 K5. Stat3C 转基因小鼠杂交而来 Gp130F759 transgenic mice were crossed with K5. Stat3C transgenic mice	优点: 组织病理学与人类相似, 发作迅速 Advantages: histopathology similar to humans, rapid onset of symptoms 缺点: 操作复杂, 无大关节炎症 Disadvantages: complex operation, no major joint inflammation	(1) 表征: 出现皮肤银屑病鳞屑厚重(牡蛎壳样), 指甲畸形以及附着点炎症和关节弯曲、变形; (2) 西医临床吻合, ①②③④⑤⑦⑧综合赋值 93.35%; (3) 中医临床吻合: 寒湿阻络型, 主证①②, 次证②③, 综合赋值 73.34%。 (1) Symptoms: thick psoriasis-like scales on the skin (oyster shell-like), deformed nails, inflammation of the attachment points, and flexion and deformation of the joints; (2) Clinical match in Western medicine, ①②③④⑤⑦⑧, 93.35% of the total value; (3) Clinical match in Chinese medicine: cold and dampness blocking the collaterals, the main symptom ①②, and the secondary symptom ②③, with a combined value of 73.34%.
R26STAT3 Cstopfl/flCD4Cre 转基因小鼠 ^[37] R26STAT3 Cstopfl/flCD4Cre transgenic mice		R26STAT3C 转基因小鼠与 C57BL/6J 小鼠回交, 随后与 CD4Cre 小鼠杂交得来 R26STAT3C transgenic mice were backcrossed to C57BL/6J mice and subsequently crossed to CD4Cre mice	优点: 起病迅速, 无性别差异 Advantages: rapid onset, no gender differences 缺点: 价格昂贵, 无大关节炎症及银屑病皮损 Advantages: expensive, no major joint inflammation or psoriasiform lesions	表征: 皮肤干燥且蜕皮严重, 表面有厚重银屑病样病变, 模型鼠自发出现滑膜炎、附着点炎以及不明显的关节炎炎症病变; (2) 西医临床吻合, ①②⑤⑥⑦⑧综合赋值 86.68%; (3) 中医临床吻合: 血热风燥型, 主证①②, 次证①②, 综合赋值 73.34%。 (1) Characteristics: dry skin with severe molting, thick psoriasis-like lesions on the surface, spontaneous synovitis, adhesion point inflammation and inconspicuous inflammatory lesions in the joints of the model rats; (2) Clinical match in Western medicine, ①②⑤⑥⑦⑧, with a combined value of 86.65%; (3) Clinical match in Chinese medicine: blood-heat and wind-dryness type, primary symptom ①②, secondary symptom ①②, with a combined value of 73.74%.

续表3

模型类型 Model type	动物名称 Animal name	制备方式 Preparation method	模型评价 Model evaluation	模型临床吻合度 Consistency with clinical symptoms
	IL-23 过表达小鼠 ^[38]	将编码 IL-23 的微环 DNA 导入小鼠, 在小鼠体内过表达 IL-23 基因	优点: 可靠性较强, 发病率 高 Advantages: greater reliability, high morbidity 缺点: 银屑病皮损发生率 低 Disadvantages: Low incidence of psoriasiform lesions	(1) 表征: 骨骼、关节、爪甲被破坏, 发生滑膜炎及附着点炎, 部分小鼠出现银屑病样皮肤病变; (2) 西医临床吻合, ①②③⑥⑦⑧综合赋值 86.68%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①②, 次证①, 综合赋值 66.67%。 (1) Characterization: bones, joints, paw nails were destroyed, synovitis and attachment point inflammation occurred, and psoriasis-like skin lesions appeared in some mice; (2) Clinical match in Western medicine ① ② ③ ⑥ ⑦ ⑧, with a combined value of 86.68% of the total value; (3) Clinical match in Chinese medicine: Damp-heat paralytic blockage, the main symptom ① ②, and the secondary symptom ①, with a combined value of 66.67%.
诱导性模型 Induced model	I 型/II 型胶原诱导 DBA/1 小鼠模型 (CIA) ^[39] Type I/II collagen-induced DBA/1 mouse model (CIA)	将 DBA/1 小鼠皮内注射溶解在 CFA/ICFA 中的 I 型/II 型胶原蛋白, 三周后腹膜内注射同型胶原蛋白 DBA/1 mice were injected intradermally with type I/II collagen dissolved in CFA/ICFA, and homogeneous collagen was injected intraperitoneally three weeks later	优点: 造模成功率高, 成本 较低 Advantages: high molding success rate, lower costs 缺点: 无银屑病皮损, 发病 晚 Disadvantages: no psoriasiform lesions, late onset of disease	(1) 表征: 爪子发红肿胀, 有滑膜炎和骨侵蚀的表现, 多见于雄性; (2) 西医临床吻合, ①③⑦⑧综合赋值 50%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①, 次证①, 综合赋值 36.67%。 (1) Characterization: red and swollen paws with synovial inflammation and bone erosion, mostly seen in males; (2) Clinical match in Western medicine ①③⑦⑧, with a combined value of 50%; (3) Clinical match in Chinese medicine: Damp-heat paralysis obstruction type, primary symptom ①, secondary symptom ①, with a combined value of 36.67%.
	β-葡聚糖诱导 SKG 小鼠模型 ^[40] β-glucan induced SKG mouse model	将 SKG 小鼠腹膜内注射 Zymosan SKG mice were injected intraperitoneally with Zymosan	优点: 模型构建简单, 无 性别差异 Advantages: simple model construction, no gender differences 缺点: 银屑病皮损症状发 病晚 Disadvantages: late onset of psoriasiform lesion symptoms	(1) 表征: 有脊柱关节炎, 指趾炎, 回肠炎和银屑病皮肤病变 (表皮增厚), 多见于雌性; (2) 西医临床吻合, ①④⑤⑦综合赋值 50%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①, 次证无, 综合赋值 30%。 (1) Characteristics: spondyloarthritis, dactylitis, ileitis and psoriasis skin lesions (thickening of the epidermis), mostly in females; (2) Clinical match in Western medicine ① ④ ⑤ ⑦, with a combined value of 50%; (3) Clinical match in Traditional Chinese Medicine (TCM): Damp-heat paralysis, primary symptom ①, secondary symptom none, with a combined value of 30%.
	甘露聚糖诱导的小鼠模型 ^[41] Mouse models of mannan-induced	给易感小鼠腹腔注射酿酒酵母产生的甘露聚糖 Intraperitoneal injection of mannan produced by brewer's yeast in susceptible mice	优点: 症状全面, 成熟的 炎症模型 Advantages: comprehensive symptoms, proven inflammatory modeling 缺点: 发病率较低 Disadvantages: low prevalence	(1) 表征: 皮肤出现炎症性银屑病皮损, 有轻度脱发, 多关节出现红肿疼痛; (2) 西医临床吻合, ①②③④⑤⑦⑧综合赋值 93.35%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①②, 次证①②, 综合赋值 73.34%。 (1) Characteristics: inflammatory psoriasis-like skin lesions, mild moulting hair loss, redness, swelling and pain in many joints; (2) Clinical match in Western medicine ①②③④⑤⑦⑧, with a combined value of 93.35%; (3) Clinical match in Traditional Chinese Medicine: Damp-heat paralysis type, the main symptom ①②, the secondary symptom ①②, with a combined value of 73.34%.
	IL-23 腺病毒诱导小鼠模型 ^[42] IL-23 adenovirus-induced mouse model	将 IL-23 的腺病毒载体通过尾静脉注射到 NOD/shijl 雌性小鼠体内 Adenoviral vectors for IL-23 were injected into NOD/shijl female mice through the tail vein	优点: 起病迅速, 症状明 显 Advantages: rapid onset of symptoms 缺点: 造价高, 重复性低 Disadvantages: High cost and low repeatability	(1) 表征: 全身性皮肤出现银屑病样病变, 腰膝关节骨被破坏, 多见于雌性; (2) 西医临床吻合, ①③⑦⑧综合赋值 50%; (3) 中医临床吻合: 湿热痹阻型, 主证①, 次证①, 综合赋值 36.67%。 (1) Symptoms: generalized psoriasis-like skin lesions, destruction of the bones of the lumbar and knee joints, mostly in females; (2) Western clinical match ①③⑦⑧, with a combined value of 50%; (3) Chinese medicine clinical match: damp-heat paralysis blockage type, the main symptom ①, the secondary symptom ①, with a combined value of 36.67%.

4 讨论

PsA 是银屑病后关节受累导致的一种炎性病变,对关节有着不可逆的损伤,与脊柱性关节炎、类风湿关节炎的关节症状相似,但由于部分病人鳞屑样皮肤表征不明显,甚至没有皮肤症状,误诊的情况时有发生^[43]。目前现代医学对 PsA 的研究虽然很多,但仍未确定其发病机制和诊断标准,能用于临床的研究也是少之又少,目前尚未寻找到适宜的药物。临床上常以非甾体抗炎药、糖皮质激素注射,口服环孢素、来氟米特等药物治疗,但复发率极高、副作用大^[44]。因此,通过结合中医的特色诊疗方法,深入研究 PsA 的作用机理,开发相关新药物迫在眉睫。

考虑到病理学相似度、操作难度和经济情况,多选用啮齿类动物用于 PsA 模型构造,但考虑到与人类临床症状表达的差异性,研究后期可采用将与人类身体机能、病理表现较为相似的灵长类动物。现阶段吻合度较高的 PsA 动物模型大多为银屑病转基因动物模型和关节炎转基因动物模型杂交而来(HLA-B27、K5、Stat3C; F759),虽然造模成本增高,但 PsA 发病率和临床症状的完整度都较高。部分 PsA 动物模型有性别差异,不利于药物的综合开发,如 CIA 诱导的小鼠模型、自发关节炎小鼠、基因突变 C57BL/10 小鼠的雄性发病率高,而 HLA-B27 转基因小鼠雌性发病率高。大多 PsA 动物模型虽两大主要症状(银屑病皮肤病变、多类型关节炎)皆能具备,但程度往往一高一低,且发病率较低,如 HLA-DR4 转基因小鼠、CIA 诱导的小鼠模型无典型的鳞屑样皮肤变化, BMPs-6 基因过表达小鼠、JunB/c-Jun 转基因型小鼠模型、IL-23 腺病毒诱导小鼠模型等无大关节的炎性病变,只有小关节的破坏和附着点炎症的发生。除此之外,个别动物模型还受到环境因素的影响,病情也并不稳定。因此,现有的 PsA 模型局限性较大,但未来可针对性地探究不同病因导致的 PsA,“不求全,但求精”,以方便研究者可根据不同病症表现实验的需求来选择合适的动物模型方式。

对现阶段 PsA 动物模型进行吻合度评价,发现中医临床吻合综合赋值低于西医临床吻合综合赋值,其中的原因可能是:(1)几乎没有关于 PsA 的中医药造模方式,探讨中药对于 PsA 的作用大多也是选用的西医的诊断标准;(2)PsA 中医的临床表现是根据“望闻问切”理论得到准确判断,这在动物模

型中无法通过问诊达到症状补充,如筋肉挛急、心烦易怒、皮肤刺痛等;(3)实验过程中对于中医诊断指标的部分次证容易忽视,如寒热、二便、是否腹胀等;(4)现如今中医关于 PsA 的诊断标准未有明确,且中医病机中的先天因素、环境因素和情志因素无法把控;(5)动物与人类症状表达的差异。以上原因使得中医临床吻合度得出的结论难度增大,也存在一定的差异性^[45]。通过观察和指标转换,仅可反映部分中医证候。观察到模型动物搔痒次数增多,能够反映模型动物皮肤的搔痒程度;改变模型动物生活条件,例如温度,判断其证型是属于寒证还是热证;给予模型动物运动刺激,观察其运动后状态,观察其证型是属于实证还是虚证等。因此,本研究建议将中医临床特点结合现有的 PsA 动物模型,体现“四诊”的中医特点,构建更适合中西医诊疗的动物模型。

综上所述,为给予中西医结合治疗 PsA 提供更有力的支撑,本文对现有的 PsA 动物模型吻合度分析并完善,考虑在中西医吻合度较高的 HLA-B27 转基因大小鼠模型、K5、Stat3C; F759 转基因小鼠模型以及甘露聚糖诱导的小鼠模型基础上,叠加中医患病因素,如造模过程中增加冰水刺激诱导寒湿阻络型 PsA 模型^[46]、增加高脂高糖饮食诱导湿热体质形成湿热痹阻型 PsA 模型^[47]或对模型动物灌服肾上腺皮质激素加夹尾激怒致肝肾阴虚型 PsA 模型^[48],以提高中医临床吻合度。此外,也可以考虑对现有 PsA 动物模型施加患病因素,通过模仿人患病的日常致病因素,模拟相关环境,达到破坏免疫力而完善动物模型的患病表现。如大小鼠的饲养过程中减少更换垫料或多只(超出正常容纳范围)共同饲养模拟个人卫生情况;模型动物的饲养环境中加入香烟烟雾模拟吸烟环境;通过击打、单笼饲养、夹尾等方式刺激模型动物的情绪模拟人类日常生活中的情感波动等^[49]。根据疾病的个性化自由组合造模方法,模拟病情变化,更符合中医理论中“辩证施治”的概念。由于病情的发展多变且因人而异,多种疾病的经典造模方法都是数个造模手段共同作用形成的,这使得动物模型更贴近临床证候,更好地评价药物疗效。

而今西医对于 PsA 的治愈率极低,且临床患者日益增多,我们迫切在中西医结合疗法中找寻新的出路,通过上述中西医的临床诊断标准,本研究将模型符合度进行量化评分,对现阶段用于实验的 PsA

模型进行吻合度评价分析,以期寻找更适宜的 PsA 模型用于病理机制研究和药物的开发。

参考文献:

- [1] KARMACHARYA P, CHAKRADHAR R, OGDIE A. The epidemiology of psoriatic arthritis: a literature review [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2021, 35(2): 101692.
- [2] ALIVERNINI S, BRUNO D, TOLUSSO B, et al. Differential synovial tissue biomarkers among psoriatic arthritis and rheumatoid factor/anti-citrulline antibody-negative rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 116.
- [3] KAELEY G S, EDER L, AYDIN S Z, et al. Dactylitis: a hallmark of psoriatic arthritis [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2018, 48(2): 263-273.
- [4] 晏少琛, 史琳丽, 戴生明, 等. 关节病型银屑病动物模型的发展现状 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2023, 37(6): 611-616.
- YAN S C, SHI L L, DAI S M, et al. Development and current situation of animal models of psoriasis arthropathica [J]. *Chin J Dermatovenereology*, 2023, 37(6): 611-616.
- [5] ESPINOZA L R, VAN SOLINGEN R, CUELLAR M L, et al. Insights into the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis [J]. *Am J Med Sci*, 1998, 316(4): 271-276.
- [6] BLAUVELT A, CHIRICOZZI A. The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 55(3): 379-390.
- [7] VEALE D J, FEARON U. The pathogenesis of psoriatic arthritis [J]. *Lancet*, 2018, 391(10136): 2273-2284.
- [8] VECCELLIO M, HAKE V X, DAVIDSON C, et al. The IL-17/IL-23 axis and its genetic contribution to psoriatic arthritis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 596086.
- [9] 蔺依, 朱泽兵, 齐若舟, 等. 气血津液辨证结合分期论治寻常型银屑病 [J]. *环球中医药*, 2023, 16(7): 1420-1423.
- LIN Y, ZHU Z B, QI R Z, et al. Treatment of psoriasis vulgaris by stages based on syndrome differentiation of Qi, blood and body fluid [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2023, 16(7): 1420-1423.
- [10] 邓婉莹, 陆泽楷, 黄树宏, 等. 查旭山教授运用通脉四逆汤加减治疗关节型银屑病经验 [J]. *四川中医*, 2018, 36(4): 20-22.
- DENG W Y, LU Z K, HUANG S H, et al. Professor CHA xushan's experience in treating psoriatic arthritis by using Tongmai Sini Decoction [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2018, 36(4): 20-22.
- [11] 王义军. 胡荫奇教授治疗银屑病关节炎经验 [J]. *环球中医药*, 2013, 6(11): 841-842.
- WANG Y J. Professor Hu yinqi's experience in treating psoriatic arthritis [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2013, 6(11): 841-842.
- [12] 刘燕婷, 吴迪, 王占琴, 等. 腰腿痛贴膏联合温针对关节型银屑病患者中医证候评分、Th17 细胞因子及生活质量的影响 [J]. *海南医学*, 2023, 34(7): 933-937.
- LIU Y T, WU D, WANG Z Q, et al. Effect of Yaotuitong Plaster combined with warm needling on TCM symptom scores, Th17 cytokines, and quality of life of patients with psoriatic arthritis [J]. *Hainan Med J*, 2023, 34(7): 933-937.
- [13] TAYLOR W, GLADMAN D, HELLIWELL P, et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8): 2665-2673.
- [14] PROFT F, SCHALLY J, BRANDT H C, et al. Evaluation of the Disease Activity index for Psoriatic Arthritis (DAPSA) with a quick quantitative C reactive protein assay (Q-DAPSA) in patients with psoriatic arthritis: a prospective multicentre cross-sectional study [J]. *RMD Open*, 2022, 8(2): e002626.
- [15] 中华医学会风湿病学分会. 银屑病关节炎诊治指南(草案) [J]. *中华风湿病学杂志*, 2004, 8(3): 181-183.
- Chinese Rheumatology Association. Guidelines for the diagnosis and treatment of psoriatic arthritis (draft) [J]. *Chin J Rheumatol*, 2004, 8(3): 181-183.
- [16] 田硕, 曹利华, 苗明三, 等. 基于临床中西医病症特点的中医药动物模型评价新方法 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(6): 165-169.
- TIAN S, CAO L H, MIAO M S, et al. A new method for the evaluation of animal models used in traditional Chinese Medicine based on the clinical characteristics of Chinese and Western medicine [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2017, 33(6): 165-169.
- [17] 刘维, 李培虎. 银屑病关节炎的中医辨证用药治疗分析 [A]. 第十六届中国中西医结合风湿病学术年会论文集 [C]. 中国中西医结合学会风湿类疾病专业委员会; 2018.
- LIU W, LI P H. Analysis of Chinese medicine therapy for psoriatic arthritis by identification and use of medicines [A]. *Proceedings of the Sixteenth Annual Conference of Chinese Integrated Rheumatology and Western Medicine in China* [C]. Chinese Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Rheumatology Professional Committee; 2018.
- [18] 王晶亚, 朴勇洙, 贺春雪, 等. 国医大师卢芳自拟抑免汤治疗湿热血瘀型银屑病关节炎经验 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(8): 849-852.
- WANG J Y, PIAO Y Z, HE C X, et al. Experience of professor Lu Fang in treating psoriatic arthritis of damp-heat and blood stasis type with self-made yimian decoction [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2018, 38(8): 849-852.
- [19] 陈一帆, 周彩云, 张羽, 等. 基于“络脉痹阻”病机分期论治银屑病关节炎 [J]. *江苏中医药*, 2021, 53(11): 40-43.
- CHEN Y F, ZHOU C Y, ZHANG Y, et al. Treatment of psoriatic arthritis by stages based on the pathogenesis of "collateral obstruction" [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2021, 53(11): 40-43.
- [20] 李伟凡, 王萍. 中医辨证论治及中西医结合治疗关节病性银屑病 47 例临床分析 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(10): 928-931.
- LI W F, WANG P. Clinical analysis of 47 patients with psoriasis arthropathy treated by traditional Chinese medicine syndrome

- differentiation and integrative medicine [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2008, 28(10): 928-931.
- [21] 朱慧婷, 王萍, 娄卫海, 等. 张志礼中西医结合辨治银屑病临床经验 [J]. *北京中医药*, 2020, 39(8): 819-822.
ZHU H T, WANG P, LOU W H, et al. Research on Professor ZHANG Zhi-li's experience in the treatment of severe dermatosis [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2020, 39(8): 819-822.
- [22] 吴晓云, 王晓华, 李应宏. 身痛逐瘀汤联合西药治疗银屑病关节炎瘀血痹阻证患者疗效观察 [J]. *内科*, 2017, 12(4): 480-483.
WU X Y, WANG X H, LI Y H. Efficacy of Shentong Zhuyu Decoction combined with western medicine in patients with blood stasis of psoriatic arthritis [J]. *Intern Med*, 2017, 12(4): 480-483.
- [23] 狄瑛琰, 张双丽, 康乐, 等. 基于中西医临床病证特点的病毒性肺炎动物模型分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(10): 123-129.
DI P Y, ZHANG S L, KANG L, et al. Analysis of animal models of viral pneumonia based on clinical syndrome characteristics of traditional Chinese and Western medicines [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(10): 123-129.
- [24] BAI L K, SU Y Z, NING Z D, et al. Challenges and opportunities in animal models of psoriatic arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(6): 1291-1301.
- [25] WEITZ J E, RITCHLIN C T. Mechanistic insights from animal models of psoriasis and psoriatic arthritis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2013, 15(11): 377.
- [26] 苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药动物模型研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 141-146.
MIAO M S, MA L N, PENG M F, et al. Animal model research and applications in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(1): 141-146.
- [27] 王珊珊, 袁嘉丽, 牛海涛. 基于中西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(8): 1114-1120.
WANG S S, YUAN J L, NIU H T. Analysis of animal models of rheumatoid arthritis based on theories of traditional Chinese and Western medicine [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(8): 1114-1120.
- [28] EBIHARA S, DATE F, DONG Y, et al. Interleukin-17 is a critical target for the treatment of ankylosing enthesitis and psoriasis-like dermatitis in mice [J]. *Autoimmunity*, 2015, 48(4): 259-266.
- [29] LORIES R J, MATTHYS P, DE VLAM K, et al. Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoprositis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(5): 595-598.
- [30] EULDERINK F, IVANYI P, WEINREICH S. Histopathology of murine ankylosing enthesopathy [J]. *Pathol Res Pract*, 1998, 194(11): 797-803.
- [31] BÁRDOS T, ZHANG J, MIKECZ K, et al. Mice lacking endogenous major histocompatibility complex class II develop arthritis resembling psoriatic arthritis at an advanced age [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(9): 2465-2475.
- [32] LORIES R J. Animal models of spondyloarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2006, 18(4): 342-346.
- [33] ZENZ R, EFERL R, KENNER L, et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins [J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 369-375.
- [34] COOK P W, BROWN J R, CORNELL K A, et al. Suprabasal expression of human amphiregulin in the epidermis of transgenic mice induces a severe, early-onset, psoriasis-like skin pathology: expression of amphiregulin in the basal epidermis is also associated with synovitis [J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13(6): 347-356.
- [35] BLESSING M, SCHIRMACHER P, KAISER S. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions [J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(1): 227-239.
- [36] YAMAMOTO M, NAKAJIMA K, TAKAISHI M, et al. Psoriatic inflammation facilitates the onset of arthritis in a mouse model [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(2): 445-453.
- [37] YANG L, FANOK M H, MEDIERO-MUNOZ A, et al. Augmented Th17 differentiation leads to cutaneous and synovio-enthesal inflammation in a novel model of psoriatic arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(6): 855-867.
- [38] CHEN Y, OUYANG J, YAN R, et al. Silencing SOCS3 markedly deteriorates spondyloarthritis in mice induced by minicircle DNA expressing IL23 [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2641.
- [39] ANTONELLI A, FERRARI S M, GIUGGIOLI D, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)₁₀ in autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(3): 272-280.
- [40] JEONG H, BAE E K, KIM H, et al. Spondyloarthritis features in zymosan-induced SKG mice [J]. *Joint Bone Spine*, 2018, 85(5): 583-591.
- [41] LI Y, LI Z, NANDAKUMAR K S, et al. Human NCF1^{90H} variant promotes IL-23/IL-17-dependent mannan-induced psoriasis and psoriatic arthritis [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(7): 1348.
- [42] FLORES R R, CARBO L, KIM E, et al. Adenoviral gene transfer of a single-chain IL-23 induces psoriatic arthritis-like symptoms in NOD mice [J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9505-9515.
- [43] VERHEUL M K, FEARON U, TROUW L A, et al. Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis [J]. *Clin Immunol*, 2015, 161(1): 2-10.
- [44] VIVEKANANTHAM A, MCGAGH D, COATES L C. Current treatments and recommendations for Psoriatic Arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2021, 35(2): 101680.
- [45] 苗明三, 彭孟凡, 刘思哲, 等. 基于文献分析的中医药动物模型评价方法介绍 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 132-140.

- MIAO M S, PENG M F, LIU S Z, et al. Introduction of evaluation methods of animal models of traditional Chinese medicine on the basis of literature analysis [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(1): 132-140.
- [46] 缪希红, 冯晓静, 杨新蕊, 等. 佛香饮方对寒凝血瘀型痛经模型大鼠痛反应及血液流变学的影响 [J]. *河北医学*, 2017, 23(11): 1791-1795.
- MIAO X H, FENG X J, YANG X R, et al. Foxiangyin on the model rats with cold coagulation and blood stasis dysmenorrhea pain reaction and blood rheology [J]. *Hebei Med*, 2017, 23(11): 1791-1795.
- [47] 甘斌, 李华南, 李松, 等. 基于脂代谢和炎症反应探讨两种湿热证痛风性关节炎大鼠模型的构建 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(1): 26-33.
- GAN B, LI H N, LI S, et al. Establishment of two rat models of gouty arthritis with damp-heat syndrome based on lipid metabolism and proinflammatory factors [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(1): 26-33.
- [48] 王赛, 白明, 苗明三. 阴虚证动物模型诊断指标及分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 132-137.
- WANG S, BAI M, MIAO M S. Diagnostic index and analysis of an animal model of Yin deficiency syndrome [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(1): 132-137.
- [49] 施学丽, 黄辰杰, 范丽丽, 等. 酸枣仁-合欢花对抑郁模型大鼠海马内质网应激 IRE1 α /ASK1/JNK 通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(2): 200-207.
- SHI X L, HAUNG C J, FAN L L, et al. Effects of Ziziphi Spinosae Semen-Albiziae Flos on the IRE1 α /ASK1/JNK pathway of endoplasmic reticulum stress in hippocampus of depression model rats [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2024, 35(2): 200-207.

[收稿日期]2023-09-14

(上接第 155 页)

- [58] KIM Y, LEE Y W, KIM H, et al. Bee venom alleviates atopic dermatitis symptoms through the upregulation of decay-accelerating factor (DAF/CD55) [J]. *Toxins*, 2019, 11(5): 239.
- [59] SUR B, LEE B, YEOM M, et al. Bee venom acupuncture alleviates trimellitic anhydride-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 38.
- [60] MIZUTANI H, OHMOTO Y, MIZUTANI T, et al. Role of increased production of monocytes TNF- α , IL-1 β and IL-6 in psoriasis; relation to focal infection, disease activity and responses to treatments [J]. *J Dermatol Sci*, 1997, 14(2): 145-153.
- [61] ELTAHER S, MOHAMMED G F, YOUNES S, et al. Efficacy of the apitherapy in the treatment of recalcitrant localized plaque psoriasis and evaluation of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) serum level; a double-blind randomized clinical trial [J]. *J Dermatolog Treat*, 2015, 26(4): 335-339.
- [62] HEGAZI A G, ABD RABOH F A, RAMZY N E, et al. Bee venom and propolis as new treatment modality in patients with localized plaque psoriasis [J]. *Int Res J Med Med Sci*, 2013, 1(1): 27-33.
- [63] CHEN L, SHEN Z. Tissue-resident memory T cells and their biological characteristics in the recurrence of inflammatory skin disorders [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(1): 64-75.
- [64] KAPLAN D H, IGYÁRTÓ B Z, GASPARI A A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(2): 114-124.
- [65] LIU Z, FAN Z, LIU J, et al. Melittin-carrying nanoparticle suppress T cell-driven immunity in a murine allergic dermatitis model [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(7): e2204184.
- [66] FETT N M. Morphea (localized scleroderma) [J]. *JAMA Dermatol*, 2013, 149(9): 1124.
- [67] HWANG J H, KIM K H. Bee venom acupuncture for circumscribed morphea in a patient with systemic sclerosis; a case report [J]. *Medicine*, 2018, 97(49): e13404.
- [68] HUANG K P, MULLANGI S, GUO Y, et al. Autoimmune, atopic, and mental health comorbid conditions associated with alopecia areata in the United States [J]. *JAMA Dermatol*, 2013, 149(7): 789-794.
- [69] PARK S, ERDOGAN S, HWANG D, et al. Bee venom promotes hair growth in association with inhibiting 5 α -reductase expression [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(6): 1060-1068.

[收稿日期]2024-02-26

郭冬静,潘文超,王思嘉,等. 神经免疫炎症交互作用在中医药治疗抑郁症中研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 167-177.

Guo DJ, Pan WC, Wang SJ, et al. Research development on the interaction between neuroimmunity and inflammation in the treatment of depressive disorder by traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 167-177.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.019

神经免疫炎症交互作用在中医药治疗抑郁症中的研究进展

郭冬静¹, 潘文超³, 王思嘉⁴, 毛前程¹, 张洪秀^{2*}, 马柯^{1*}

(1. 山东中医药大学 中医学院, 济南 250355; 2. 济南市疾病预防控制中心, 济南 250021;
3. 山东中医药大学 第一临床医学院, 济南 250014; 4. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

【摘要】 抑郁症作为常见的心境障碍, 发病机制复杂, 近年来随着人们生活节奏的加快, 患病率逐年攀升, 引起人们的广泛关注。外界应激和炎症共同损害血管和脑区功能, 诱发免疫失调, 引起小胶质细胞活化和促炎性细胞因子及其受体表达增加, 炎症反应持续发生, 影响神经递质系统的正常代谢和分子通路的正常运行, 导致脑细胞和神经异变, 进一步形成的免疫-炎症-神经循环路径成为抑郁症发生发展的重要机制。大量研究表明中医药治疗可以通过恢复神经免疫炎症稳态改善抑郁症状, 本文从神经免疫炎症角度出发, 阐述其与抑郁症及其发病机制的密切联系, 并对多种中医疗法通过调节神经免疫炎症改善和治疗抑郁症的作用进行综述, 以期对抑郁症的精准治疗以及中医药免疫靶向药物研发提供新视角。

【关键词】 抑郁症; 神经免疫炎症; 中医药; 交互作用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0167-11

Research development on the interaction between neuroimmunity and inflammation in the treatment of depressive disorder by traditional Chinese medicine

GUO Dongjing¹, PAN Wenchao³, WANG Sijia⁴, MAO Qiancheng¹, ZHANG Hongxiu^{2*}, MA Ke^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.

2. Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250021. 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, First Clinical Medical College, Jinan 250014. 4. Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Depression, a common mood disorder, has a complex pathogenesis. In recent years, the accelerated pace of life has been accompanied by an increase in the prevalence rate of depression, leading to extensive attention being given to this condition. External stress and inflammation synergize to damage blood vessel and brain functions, induce immune disorders, cause microglia activation, and increase the expression of pro-inflammatory cytokines and their

【基金项目】 山东省自然科学基金 (ZR2023QH052); 山东省高校青创人才引进计划 (鲁教人字[2019]9号-202); 山东省中医药高层次人才培养项目专项经费 (卫函[2023]14号); 上海科技发展基金会专项基金科研项目 (2013-701627); 国家自然科学基金 (81903948)。

【作者简介】 郭冬静 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 方证结合病症机制研究。E-mail: 2022110063@sdutcm.edu.cn

【通信作者】 马柯 (1988—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 情志病郁证神经生物学基础及干预治疗新方法。E-mail: make19880710@163.com

张洪秀 (1989—), 博士, 主管技师, 研究方向: 中医证候客观化物质基础。E-mail: 87667400@qq.com * 共同通信作者

receptors. Inflammatory reactions continue to escalate, which affects the normal metabolism and metabolism of the neurotransmitter system. The abnormal functioning of molecular pathways leads to mutations in brain cell and nerve genes, and further formation of the immune-inflammation-neuron cycle pathway becomes an important mechanism in the occurrence and development of depression. A large number of studies have shown that traditional Chinese medicines can improve depression symptoms by restoring neuroimmune inflammation homeostasis. This article explains neuroimmune inflammation's close connection with depression and its pathogenesis and reviews the role of various traditional Chinese medical therapies in improving and treating depression by participating in the regulation of neuroimmune inflammation. This review provides new perspectives on the precise treatment of depression and the development of immune-targeted drugs.

【Keywords】 depression; neuroimmune inflammation; traditional Chinese medicine; interaction

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

抑郁症是一种神经-内分泌-免疫紊乱性疾病,目前全球已约有 3.5 亿人的抑郁症患者,新冠肺炎疫情大流行,也令全球范围内的抑郁症患者以及焦虑病例数量比之前增加了 1/4 以上^[1],严重影响了社会精神健康和人民福祉。抑郁症发病机制复杂,假说众多,近年来神经免疫炎症机制受到人们的广泛关注,其代表性机制是应激事件通过脑-肠-轴、模式识别受体等方式引起中枢与外周的双向免疫调节障碍、神经免疫互动、小胶质细胞极化和中枢外周炎症反应导致神经元损伤、NLRP3 炎性小体的激活、Notch 和核因子 κ B 信号通路激活等诱发抑郁症^[2-4]。

目前抑郁症的治疗主要是服用各类抗抑郁药物,但仅使部分患者受益,且存在疗效慢、副作用多、严重者会引起自杀等缺陷。中医药具有多靶点、副作用小、整体调节等优势,逐渐获得世界的认可,在抑郁症的防治中,中医药治疗特色显著^[5]。其次中医药全面整体调节的功效恰符合抑郁症发病机制复杂的疾病本质,在调节机体神经免疫炎症、恢复神经免疫稳态平衡作用显著,在发挥抗抑郁作用具有明显优势和极大的发展空间。笔者将从神经免疫炎症假说致抑郁的机制和中医通过调节神经免疫炎症发挥抗抑郁作用角度出发,希望为科学有效地防治抑郁症以及指导抗抑郁药物研发提供参考。

1 神经免疫与抑郁症

1.1 神经免疫炎症与抑郁症假说

抑郁症发病机制错综复杂,目前主流的假说有单胺类神经递质假说、氧化应激假说等,但临床上根据单一假说开发的抗抑郁药物只有大约 1/3 的患者得到缓解^[6],因此找到各种假说的交叉点或者关键因素意义重大。众多研究揭示神经免疫炎症可

以涵盖下丘脑-垂体-肾上腺轴假说(hypothalamic pituitary adrenal axis, HPA axis)、单胺假说、神经可塑性假说,有望成为未来防治抑郁症的突破点。

1.1.1 单胺假说与神经免疫炎症

单胺类神经递质假说至今在抑郁症发病机制中占据重要位置,该假说认为去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)降低是抑郁症发病的重要原因。基础研究和临床实验表明色氨酸-犬尿氨酸途径(tryptophan-kynurenine, TRP-KYN)代谢途径被过度激活会使 5-HT 前体色氨酸合成减少,产生具有神经毒性的代谢产物也是诱发抑郁症的重要介质,如喹啉酸、3-羟基犬尿氨酸等,其诱发的毒性症状强度与炎症水平高低有关,导致 TRP-KYN 通路中吲哚胺 2,3-双加氧酶和色氨酸 2,3-双加氧酶主要代谢酶的活性被提高与炎症诱导相关^[7]。

1.1.2 HPA 轴假说与神经免疫炎症

HPA 轴是机体重要的神经内分泌轴,也是协调应激反应的关键,HPA 轴亢进和负反馈调节功能失调诱发糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)水平升高发生级联反应是抑郁症发生的重要点^[8]。多项动物实验中发现促炎细胞因子的协同下,升高小鼠的 GCs 能够激活先天免疫 TLR 信号通路并增加 TLR2/TLR4 的表达;此外,还可增加 P2Y2 嘌呤和 NLR3 炎性小体基因的表达,加剧体内炎症反应,形成恶性循环^[9]。正常情况下,糖皮质激素具有很好的抗炎性,免疫调节作用更是具有广泛性、复杂性、多方面性,但是研究表明急慢性应激状态下神经炎症所产生的促炎因子使 GCs 的含量过高其功能被破坏,HPA 轴的负反馈调节功能失调并且其促炎作用超过其抗炎作用,展示出促炎性^[7]。由此看来,神经炎症在 HPA 轴亢进发挥着重要的作用。

1.1.3 神经可塑性假说与神经免疫炎症

神经可塑性假说认为反复持续的刺激导致脑

源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 生成减少以及 mTORC1 信号通路传导障碍引起的神经可塑性损伤或受限与抑郁症存在着密不可分的联系;近年最新的证据表明小胶质细胞的激活是诱发神经元损伤并影响神经可塑性的关键参与者^[10-11]。急慢性应激通过不同路径激活不同大脑区域的小胶质细胞 (microglia, MG), 过度激活的促炎型 MG 分泌促炎细胞因子和炎症介导神经炎症发生, 成为神经炎症的标志物并影响神经可塑性致使抑郁症发生^[2]。此外, Liddelow 等^[12]通过体内体外实验提出并证实反应性小胶质细胞诱导产生出具有神经毒性的 A1 表型的星形胶质细胞 (astrocyte, AS), 另一篇文献报道称该细胞会引起并加剧神经炎症和神经变性, 同时释放白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎细胞因子, 减少神经营养因子的产生, 影响神经元的功能和形态, AS-神经元互作参与抑郁症的发生发展^[13]。Li 等^[14]建立慢性应激抑郁小鼠模型揭示了小胶质细胞过表达的炎症小体 NLRP3 是通过 caspase-1 信号通路致使神经毒性 A1 型星形胶质细胞的形成, 诱发抑郁样行为。由此可知小胶质细胞是神经元和星形胶质细胞导致神经炎症诱发抑郁症的发生的中间点。

影响 5-HT、HPA 轴和神经可塑性的免疫炎症或神经炎症是由于急慢性应激刺激外周免疫系统的固有免疫反应和适应性免疫反应过度以及以激活的 MG 为主的中枢免疫所致, 即外周免疫反应过度激活引起促炎细胞因子大量释放可直接导致犬鸟氨酸生成增多, 5-HT 生成减少, 又可使 HPA 轴亢进, 负反馈调节失败, GCs 升高, 同时促炎因子增加了血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的通透, 因此进入中枢引起 MG 极化和中枢神经炎症, 一方面产生具有神经毒性的 AS 影响神经元再生和神经可塑性功能, 另一方面极化的 MG 分泌也可分泌促炎细胞因子和趋化因子穿过 BBB 渗出到外周加剧炎症反应并形成恶性循环^[14-15]。故炎症参与了调控 TRP-KYN 代谢途径使 5-HT 生成减少, 既是 HPA 轴异常和糖皮质激素高分泌的原因, 又可能是 HPA 轴异常的结果; HPA 轴和免疫应答系统之间的串扰致使神经发生减少以及神经可塑性变弱, 从而诱发抑郁症^[16]。此外神经元结构和功能的异常又会使 HPA 轴和 5-HT 代谢调控失衡^[17], 因此神经免疫失衡是抑郁症发病的关键因素, 二者失衡诱发的炎症

是三者联合起来互扰的共性病症结果, 炎症又成为致病因素, 使三者形成恶性闭环, 导致病情加重。反之, 临床上对抑郁症患者进行抗炎治疗, 其症状得到明显改善, 也有证据证明常规抗抑郁药具有抗炎作用^[18]。其次, 炎症所诱发 MG 极化的动态演变过程是抑郁症治疗和转归的重要节点, 同时 MG 极化也参与了 TRP-KYN 代谢途径、HPA 轴异常以及神经元的损伤^[10], 因此对 MG 表型进行调控一方面能使中枢神经炎症得到缓解, 另一方面又阻碍了促炎因子进入外周减缓炎症反应, 扭转恶性循环的局面, 从而影响抑郁症的转归。

1.2 小胶质细胞极化在抑郁症发病中的作用

由上述可知神经免疫联动失调, 内分泌系统紊乱, 三者互扰诱发的炎症与抑郁症密切相关。具有高度可塑性的小胶质细胞作为中枢神经系统的第一道免疫防线是调节大脑微环境紊乱和神经炎症的重要细胞, 故抑郁症也被认为是小胶质细胞疾病^[19]; MG 极化是神经炎症的具体表现形式, 当机体受到外周或中枢免疫反应产生的促炎因子和抗炎因子影响被激活极化成相应 M1/M2 型 MG 发挥相应的神经毒性和神经保护调控中枢神经炎症。M1 型 MG 的表面抗原 CD68、iNOS 和 COX-2 等会激活下游信号通路分泌各种炎症细胞因子加剧炎症反应, 而选择性表达的 M2 型会表达白细胞分化抗原 CD163、CD36、Arg-1 等, 一方面释放抗炎细胞因子抑制 M1 型导致的过度炎症反应; 另一方面 M2 型 MG 增加神经营养因子的分泌, 促进海马的神经发生和组织重构, 缓解神经炎症。

Stenovec 等^[20]在尸检研究中发现, 抑郁症自杀病人的扣带回和前额叶中存在大量激活态的 MG, 且这些部位的炎性介质水平显著升高, 提示抑郁症患者的大脑中存在炎症状态。动物实验中, 大量的各种抑郁症模型与小胶质细胞的关系研究发现抑郁状态下老鼠的前额叶、海马、伏隔核等脑区都存在不同程度的炎症, 通过免疫荧光、蛋白免疫印迹、聚合酶链式反应等技术手段检测出 M1 型表达显著增加以及促炎性因子 (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、INF- γ 和 iNOS) 上升^[21], M1 型诱发瀑布似的神经炎症引起脑结构和突触可塑性的变化可触发神经变性, 神经变性和海马神经发生减少诱导抑郁。体外细胞实验中培育原代 MG 或小胶质细胞系通过不同诱导剂 (LPS、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 等) 促使 MG 向突触变短、胞体增大变粗和阿米巴样的 M1 促炎型和胞体

细长、突触变短的 M2 抗炎型方向极化发挥相应的促炎和抗炎功效的应答从而调控神经炎症,可能通过炎症小体的产生和 Notch 信号通路的激活诱发抑郁症^[22]。

尸检、体外和体内实验共同表明 MG 极化是抑郁症发生发展的重要因素。而且小胶质细胞是目前研究抑郁症发病机制体外实验常用的细胞之一, LPS 诱导 MG 极化构建神经炎症性的抑郁症体外实验模型是探究神经免疫炎症致郁发病机制以及抗抑郁药物疗效的重要手段^[23]。此外体内实验中通过给小鼠注射 LPS 诱导神经炎症性抑郁症模型,发现模型组存在以 M1 型居多的小胶质细胞极化情况,而槲皮素、异银杏素等中药有效成分既可以抑制小胶质细胞 M1 极化,又可促进其向 M2 抗炎型 MG 转化利于缓解神经炎症^[24-26]。因此调节 MG 功能表型或将成为一种抑郁症治疗的新策略。

2 中医药抗抑郁的神经免疫炎症机制

2.1 中医调节神经免疫炎症抗抑郁的理论基础

近年来,人们逐渐认识到抑郁过程前后出现氧化应激、神经免疫炎症等反应会累及整个机体,而不仅仅是局限于大脑,是一种全身性的疾病^[27];研究抑郁症也逐渐从“重局部、轻整体”到聚焦整体,开始重视人作为一个整体各系统之间互相影响而致抑郁的这一过程。从宏观层面讲,神经免疫炎症致抑郁恰是中枢与外周动态反馈失败,机体相对动态平衡状态被打破,交互作用于脑部而产生的,这与中医的整体观相契合。

阴阳是中医学最朴素、最根本的理论基础,也是中医整体观的反应,如《黄帝内经》有云:“夫自古通天者,生之本,本于阴阳”“夫阴阳者,有名而无形”。目前已有诸多学者拓展了阴阳属性在现代医学领域的研究。有研究认为人体面对外界应激导致免疫过度而产生炎症的本质是免疫细胞产生的促炎因子引起机体损伤与激活其抗损伤的斗争过程,促炎与抗炎这一对基本矛盾,可将其归属于“阴阳”的矛盾体系^[28],即炎症导致抑郁症的发生可从阴阳角度解释。依据极化理论,介导神经炎症反应的关键细胞 MG 可被激活为 M1 促炎型或 M2 抗炎型;朱潇旭等^[29]认为在抑郁症的进展过程中, M1 型以促炎为主属阴,而 M2 型则以抗炎为主属阳。抑郁症发病的过程基本上处于一种持续慢性炎症状态,即 M1 型 MG 持续活跃,阴阳的动态平衡被打

破,故抑郁障碍当属中医学阴阳学说中的阳虚阴盛^[30]。

由上述可知, MG 极化是神经免疫失调的重要动态演变过程,此过程中中枢以及外周产生炎症,但抗炎失败(如分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子)进而诱发为抑郁症。因此,治疗神经免疫炎症诱导的抑郁症不能仅仅只关注其炎症反应一味地控制或者消灭炎症,而忽略自身抗炎失败也是抑郁症发生的原因。从中医角度出发,寻找抑郁症发生的关键点(如 MG 活化)^[31],用中医方式治疗既要控制炎症又要恢复和提高其自身抗炎能力(如补正气、提高免疫力),整体调控,恢复抗炎和促炎这对基本阴阳矛盾的动态平衡。且中医药在治疗神经精神疾病具有长期的实践基础和丰富的实践经验,对于指导抗抑郁药物研发也具有重要意义^[32]。中医药已经在调节和抑制神经炎症而发挥抗抑郁作用展示出极大优势^[33-36],它既能改善症状,又可针对原发病灶进行治疗,具有标本兼治的双重疗效(如图 1)。

2.2 中医药调控小胶质细胞极化改善抑郁症

临床研究中,中医药介入治疗抑郁患者效果显著,可针对不同患者辨证施治,具有不良反应少、患者接受度较高、费用较低等优势^[37]。中药组方可从药物的君臣佐使配伍,调节抑郁患者阴阳失衡的病态。复方中多使用疏肝理气、行气解郁的药物,药理学研究表明,逍遥散组方中的八味中药有 133 种活性成分,具有显著的抗抑郁疗效^[38]。同样地,杨皓然等^[39]研究发现逍遥散逆转了小胶质细胞的 Iba-1/iNOS 共表达阳性细胞数及其蛋白表达且下调了炎症因子水平,抑制小胶质细胞 M1 极化,起到抗炎和抗抑郁焦虑作用。戴建业等^[40]研究发现加味温胆汤通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路,使 MG 转化为 M2 抗炎极化表型,修复神经元,改善神经功能和抑郁。张震等^[41]观察到柴胡疏肝散能改善慢性不可预测的轻度应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型大鼠肝血流动力学指标,抑制 MG 极化,调节 BDNF、TrkB/p-ERK 信号通路,发挥抗抑郁的作用。

Zhang 等^[42]首次发现人参皂苷 Rb1 能通过激活 PPAR γ 信号通路诱导前神经源性 MG 转化为 M2 样表型,并抑制 M1 表型,减轻中枢神经的炎症反应来发挥抗抑郁的作用。马丹凤等^[43]研究结果显示木犀草素通过抑制 JAK1/STAT3 信号通路的激活,

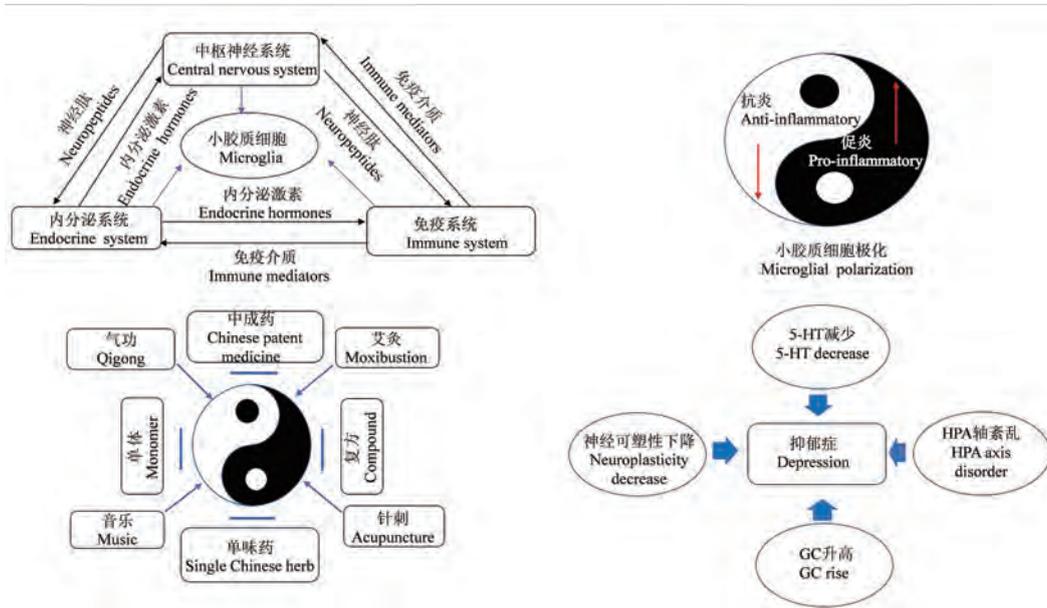


图 1 神经免疫内分泌互作致郁以及中医调控恢复小胶质细胞阴阳动态平衡

Figure 1 Neuroimmune-endocrine interaction induces depression and TCM regulation restores the dynamic balance of yin and yang in microglia

进而抑制 MG 向 M1 型极化发挥抗炎作用,减轻 CUMS 联合孤养的大鼠模型的抑郁症状。此外, Tao 等^[44]研究发现厚朴酚能够上调 CUMS 抑郁小鼠模型大脑中白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)及 Iba-1/CD206 共表达的含量,下调 NLRP3、胱天蛋白酶、白介素 1β、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、含量及 Iba-1 与 CD16/32 共表达数,通过阻断炎症小体 NLRP3 活化途径抑制 M1 极化,促进向 M2 型转化,以减轻神经炎症,改善抑郁症状。

2.3 中药单味药以及单体抗抑郁作用

鉴于中药单体的安全性和有效性,目前对于中药单体抗抑郁作用机制的研究较多。动物实验中,其中远志寡糖酯类^[45-46]、人参总皂苷^[47-49]、山奈酚^[50]、绒叶仙茅苷 H^[51]和槲皮素^[52-55]、淫羊藿苷^[56]抗抑郁作用途径多,既可以抑制促炎因子释放、改善神经炎症,又可增加 BDNF 表达、促神经发生,还可调节 HPA 轴和单胺类神经递质。目前为止,杜仲总黄酮^[57]、白芍苷^[58]、石菖蒲水提物^[59]作用靶点相对单一,是单独上调 5-HT 表达或者整体调节脑内单胺类神经递质含量从而达到抗抑郁的目的。夏枯草水提物^[60]、益母草碱^[61]、知母总皂苷^[62]则在增加单胺类神经递质的同时会降低某些炎症因子的蛋白水平的表达。临床上,圣约翰草提取物通过提高突触间隙单胺类神经递质的浓度和

改善氧化应激损伤治疗卒中后抑郁临床效果显著^[63-64]。

除了单体,中药中的一些单药也对抑郁症具有一定的治疗作用。柴胡、半夏、白芍、白术 4 味中药均可通过增强神经递质含量、保护神经细胞可塑性、抑制炎症因子分泌发挥抗抑郁作用^[65]。其中柴胡为治疗抑郁症代表药之一,与白芍、当归、郁金和远志分别组成的药对是治疗抑郁症常用的组合^[66]。

2.4 中药组方抗抑郁作用

中药组方始终遵循中医的辨证论治和整体观两大基本特点,恰好契合抑郁症此种病因复杂的异性质疾病。中医经典名方更是凭借其组方结构固定、精选药物、配伍得当的显著优势,协调诸药及扬长避短在抑郁症的防治方面凸显出明显优势。于冰清等^[65]使用数据挖掘的方式整理归纳了 163 首抗抑郁复方,发现除了调和药性的甘草外柴胡使用频次最高,以柴胡为君药的逍遥散研究最多,该方既可以抑制 MG 向 M1 方向极化改善神经炎症,又可降低血清中炎症因子水平、提高 5-HT、BDNF 的水平^[67-68,36]。此外小柴胡汤及其类方(柴胡疏肝散、柴胡加龙骨牡蛎汤、四逆散)在抑制炎症因子、调节单胺类神经递质和 BDNF、影响神经可塑性等方面发挥着多靶点、多途径抗抑郁功效^[68-70];亦有大量的动物实验研究发现半夏厚朴汤和酸枣仁汤可通过多种方式调节神经免疫炎症^[68,71]。

此外一些非经典名方和研制的中成药也具有不错的治疗效果。曲苏晨等^[33]通过研究发现开心散可以通过调控神经炎症而起到抗抑郁的作用。枳菊解郁汤和化浊解毒疏肝方的抗抑郁机制与二者都因其具有较好的神经保护作用有关^[72-73]。越鞠丸、柴胡舒肝丸、逍遥丸、巴戟天寡糖胶囊、疏肝解郁胶囊等中成药治疗抑郁症也具有显著的临床效果^[67]。刘欣等^[74]临床研究中巴戟天寡糖联合帕罗西汀治疗老年抑郁症患者发现能够降低促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 水平。疏肝解郁胶囊联合阿戈美拉汀也在临床试验中能使患者血清中 IL-2 降低^[75]。

2.5 其他中医疗法抗抑郁作用

现阶段对于中药药物疗法大多数是与抑郁症的常规疗法相配合使用,致使其研究并未深入展开。但是中医非药物疗法比如针刺、艾灸、音乐、气功等在干预和防治抑郁症或者其他治疗方式联合

作为辅助方式治疗抑郁症具有一定的效果^[76]。其中针灸治疗抑郁症研究中,发挥的抗炎作用^[77-78]、调控 5-HT 系统^[79]已经被证实。此外于姚等^[80]通过 Meta 分析发现五行音乐疗法改善抑郁症效果明显,利于临床抑郁症治疗工作的开展。

综上所述,中医药能起到抗抑郁作用的机制和通路不胜枚举,中医药调节神经免疫炎症引起的抑郁症,有着西医治疗不可睥睨的优势,这也从侧面说明神经免疫炎症在抑郁症发病机制中十分重要。神经免疫炎症假说囊括了抑郁症单胺假说、HPA 轴假说与神经可塑性假说阐述的发病机制,所以参与人体神经免疫炎症活动过程中发挥抗抑郁作用的方式是调节 HPA 轴、抑制炎症细胞因子释放、减缓炎症反应、调节神经递质代谢、保护神经细胞及促进其发生以及调节小胶质细胞极化。中药单体、单药、组方作用方式见表 1。

表 1 中医药调节神经免疫炎症作用方式归纳总结
Table 1 Summary of traditional Chinese medicine regulating neuroimmune inflammation

分类 Classification	中医药 Traditional Chinese medicine	作用途径 Mode of action
单体 ^[45-56] Monomer	远志寡糖酯类、人参总皂苷、山奈酚、绒叶仙茅苷 H、槲皮素、淫羊藿苷 Polygala oligosaccharides esters, total ginsenosides, kaempferol, velvet cinchoid H, quercetin, icariin	HAP 轴、单胺类神经递质及其受体、炎性细胞因子、神经细胞 HAP axis, monoamine neurotransmitters and their receptors, inflammatory cytokines, nerve cell
单体 ^[57-59] Monomer	杜仲总黄酮、石菖蒲水提物、白芍苷 Total flavonoids of eucommia ulmoides, aqueous extract of Acorus tatarinowii, paeoniflorin	5-羟色胺或者单胺类神经递质 5-HT or monoamine neurotransmitters
单体 ^[60-62] Monomer	夏枯草水提物、益母草碱、知母总皂苷 Aqueous extract of Prunella vulgaris, motherwort, anemarrhena total saponins	单胺类神经递质、炎症细胞因子 Monoamine neurotransmitters, inflammatory cytokines
单味药 ^[65] Single Chinese herb	柴胡、半夏、白芍、白术 Bupleurum, Pinellia ternata, radix paeoniae alba, bighead atractylodes rhizome	神经递质、神经细胞、炎性因子 Neurotransmitters, nerve cell, inflammatory cytokine
单味药 ^[66-67] Single Chinese herb	石菖蒲、白芍 Acorus gramineus, radix paeoniae alba	5-羟色胺 5-HT
组方 ^[36, 65-71] Compound	逍遥散、小柴胡汤及其类方、酸枣仁汤、半夏厚朴汤 Xiaoyao San, minor bupleurum decoction and similars, Sour jujube kernel soup, Banxia magnolia soup	单胺类神经递质及其受体、HPA 轴、神经可塑性、神经免疫炎症反应 Monoamine neurotransmitters and their receptors, HAP axis, neuroplasticity, neuroimmune inflammatory responses
中成药 ^[33, 72-73] Chinese patent medicine	开心散、枳菊解郁汤、化浊解毒疏肝汤 Kaixin powder, Zhijieyu decoction, Huazhuojiedu decoction	神经炎症(开心散)、神经保护作用(后二) Neuroimmune inflammatory(kaixin powder), neuroprotection (the latter two)
其他 ^[76-80] Others	针灸、五行音乐 Acupuncture, five elements music	抗炎作用(针灸)、五行音乐(机制不明) Anti-inflammatory effect(acupuncture), five elements music (mechanism unknown)

3 结论和展望

目前已有诸多文献对抑郁症的发病机制、小胶质细胞或神经免疫与抑郁症的关系以及中医药治疗抑郁症进行了总结,但缺乏对其中关系及前因后果的探讨。本文阐述了神经免疫是诱发抑郁症宏观层面上的因素,炎症是二者失衡的具体表现形式,小胶质细胞是中枢外周“沟通”的桥梁,小胶质细胞极化的演变过程是抑郁症和神经免疫稳态沟通的关键,也是抑郁症单胺类神经递质假说、HPA 轴假说和神经可塑性假说的交叉点,同时影响着抑郁症的发生发展和转归。基于神经免疫炎症的大前提,在整体观念的中医理论指导下,本文从阴阳角度去诠释抑郁症的神经免疫炎症诱发机制,而中医药凭借着多靶点调节的优势控制神经炎症的发生发展,不仅仅关注抑郁过程中抗炎失败的因素,而是恢复其自身抗炎和促炎能力的动态平衡。与西药的起效途径单一、副作用大不同,中医药中无论是单体、单药、复方还是非中药疗法,根据现有研究它们通过调节 HPA 轴、神经递质代谢途径、MG 极化等多种方式改善神经免疫炎症所导致抑郁症状以及状态。

中药治疗抑郁症虽然兼顾了不同发病机制学说,也契合抑郁症具有异质性的疾病特点,从多个靶标进行干预,加上中医的辨证论治特色让抑郁症治疗实现个性化治疗成为可能。但是事实上它的独特优势也是中医治疗抑郁症研究事业的难题,目前中医药在调节神经免疫炎症和调节小胶质细胞表型发挥抗抑郁作用大多停留在定性阶段,从宏观层面解释论证其作用,定量的机制研究不够,临床研究较少,不利于中国丰富中医药资源的充分利用。靶点途径众多、通路复杂也在一定程度加大了研究难度和临床试验周期。

未来要发挥中医的天然优势,合理利用现代科学技术;加大加快对中医药抗抑郁作用的微观定量研究、动态评价、活态传承、生物医疗和物理医疗交叉使用,中西医互补,实现中医药对抑郁症的精准化干预。

参考文献:

[1] COVID-19 MENTAL DISORDERS COLLABORATORS. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic [J]. *Lancet*, 2021, 398(10312): 1700-1712.

[2] 孙恽泽, 赵海滨, 王哲义. 应激诱导小胶质细胞激活在抑郁症中的机制研究及中药的调节作用 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(16): 4285-4294.
SUN Y Z, ZHAO H B, WANG Z Y. Mechanism of stress-induced microglial activation in depression and traditional Chinese medicine regulation [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(16): 4285-4294.

[3] 郭潇潇, 周寿红. 小胶质细胞极化在抑郁症发病中的作用 [J]. *生理科学进展*, 2018, 49(2): 134-138.
GUO X X, ZHOU S H. Role of microglia polarization in the pathogenesis of depression [J]. *Prog Physiol Sci*, 2018, 49(2): 134-138.

[4] YAO K, ZU H B. Microglial polarization: novel therapeutic mechanism against Alzheimer's disease [J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(1): 95-110.

[5] 宁婕, 王新, 马柯. 经典名方治疗抑郁症的临床研究现状与规律 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(8): 108-111.
NING J, WANG X, MA K. Research progress on classical traditional Chinese medicine formula in treatment of depression [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(8): 108-111.

[6] DREVETS W C, WITTENBERG G M, BULLMORE E T, et al. Immune targets for therapeutic development in depression: towards precision medicine [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(3): 224-244.

[7] SARNO E, MOESER A J, ROBISON A J. Neuroimmunology of depression [J]. *Adv Pharmacol*, 2021, 91: 259-292.

[8] 尹一淑, 刘军莲, 王佳平, 等. 抑郁症相关发病机制研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28(12): 2368-2372.
YIN Y S, LIU J L, WANG J P, et al. Research progress in pathogenesis of depression [J]. *Med Recapitul*, 2022, 28(12): 2368-2372.

[9] 陈倩. 雌激素对抑郁症神经炎症调节的作用机制研究进展 [J]. *微循环学杂志*, 2022, 32(4): 85-89.
CHEN Q. The progress of estrogen on the regulation of neuroinflammation in depression [J]. *Chin J Microcirc*, 2022, 32(4): 85-89.

[10] 何瓔, 邹蔓姝, 韩远山, 等. 小胶质细胞活化介导的神经元损伤与抑郁症的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(1): 12-15.
HE Y, ZOU M S, HAN Y S, et al. Research progress of neuronal injury mediated by microglial activation and depression [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(1): 12-15.

[11] PRICE R B, DUMAN R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(3): 530-543.

[12] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.

[13] 刘燕, 彭梦薇, 张文娟, 等. 脑内星形胶质细胞-神经元相互作用参与抑郁症发病研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(3): 124-129.
LIU Y, PENG M W, ZHANG W X, et al. Research progress of

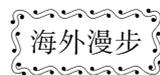
- brain astrocyte-neuron interactions involved in the pathogenesis of depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(3): 124-129.
- [14] LI S, FANG Y, ZHANG Y, et al. Microglial NLRP3 inflammasome activates neurotoxic astrocytes in depression-like mice [J]. *Cell Rep*, 2022, 41(4): 111532.
- [15] 孙瑞, 殷歌, 孙定亚, 等. 神经免疫在抑郁症发病机制中的研究进展 [J]. *中华精神科杂志*, 2023, 56(2): 137-143.
SUN R, YIN G, SUN D Y, et al. Research progress of neuroimmune response in the pathogenesis of the depressive disorder [J]. *Chin J Psychiatry*, 2023, 56(2): 137-143.
- [16] TROUBAT R, BARONE P, LEMAN S, et al. Neuroinflammation and depression: a review [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 151-171.
- [17] 何沙潼, 蒋梦若, 陈嘉豪, 等. 抑郁的中枢神经炎症机制相关研究进展 [J]. *生命的化学*, 2022, 42(7): 1315-1321.
HE S T, JIANG M R, CHEN J H, et al. Research progress on the mechanisms of central nervous system inflammation in depression [J]. *Chem Life*, 2022, 42(7): 1315-1321.
- [18] 杨会增, 杨程皓. 抑郁症抗炎治疗的研究进展 [J]. *临床精神医学杂志*, 2022, 32(6): 492-496.
YANG H Z, YANG C H. Research progress on anti-inflammatory treatment of depression [J]. *J Clin Psychiatry*, 2022, 32(6): 492-496.
- [19] YIRMIYA R, RIMMERMAN N, RESHEF R. Depression as a microglial disease [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(10): 637-658.
- [20] STENOVEC M, LI B, VERKHRATSKY A, et al. Astrocytes in rapid ketamine antidepressant action [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 173: 108158.
- [21] WANG H, HE Y, SUN Z, et al. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 132.
- [22] 万腾, 高雪, 刘顺峰, 等. 小胶质细胞极化与抑郁症关系的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48(12): 1404-1413.
WAN T, GAO X, LIU S F, et al. Research progress on the relationship between microglia polarization and depression [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2021, 48(12): 1404-1413.
- [23] 邢玉琦, 李妍, 王扬, 等. 抑郁症细胞模型的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(7): 1097-1103.
XING Y Q, LI Y, WANG Y, et al. Research progress on cell models of depression [J]. *Chin J Cell Biol*, 2023, 45(7): 1097-1103.
- [24] HAN X, XU T, FANG Q, et al. Quercetin hinders microglial activation to alleviate neurotoxicity via the interplay between NLRP3 inflammasome and mitophagy [J]. *Redox Biol*, 2021, 44: 102010.
- [25] LI P, ZHANG F, LI Y, et al. Isoginkgetin treatment attenuated lipopolysaccharide-induced monoamine neurotransmitter deficiency and depression-like behaviors through downregulating p38/NF- κ B signaling pathway and suppressing microglia-induced apoptosis [J]. *J Psychopharmacol*, 2021, 35(10): 1285-1299.
- [26] ZHANG L, PREVIN R, LU L, et al. Crocin, a natural product attenuates lipopolysaccharide-induced anxiety and depressive-like behaviors through suppressing NF- κ B and NLRP3 signaling pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 142: 352-359.
- [27] 姜若琳. 抑郁症与其他系统之间关系的研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2022, 19(1): 179-183.
JIANG Y L. Research progress on the relationship between depression and other systems [J]. *Med Innov China*, 2022, 19(1): 179-183.
- [28] 刘松, 牟浩亚, 卢云, 等. 炎症的中医治疗思路 [J]. *亚太传统医药*, 2018, 14(10): 68-70.
LIU S, MOU H Y, LU Y, et al. Traditional Chinese medicine treatment thoughts of inflammation [J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2018, 14(10): 68-70.
- [29] 朱潇旭, 杨芙蓉, 鄢黎, 等. 从中医阴阳理论探讨小胶质细胞活化现象对抑郁症的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(10): 5758-5762.
ZHU X X, YANG F R, YAN L, et al. Discussion on the effect of microglia activation on depression from the theory of Yin and Yang in TCM [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(10): 5758-5762.
- [30] 崔晓萍, 张庆文, 陈玉娟, 等. 雌雄激素与中医阴阳及抑郁障碍的相关性研究 [J]. *陕西中医*, 2007, 28(7): 862-864.
CUI X P, ZHANG Q W, CHEN Y J, et al. Study on the correlation among sex hormones, Yin-Yang and depression [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2007, 28(7): 862-864.
- [31] 白方方, 王豆, 冯卫星. 小胶质细胞在抑郁症发病中的作用机制及其相关抗抑郁药物应用研究进展 [J]. *山东医药*, 2022, 62(17): 97-100.
BAI F F, WANG D, FENG W X. Research progress on the mechanism of microglia in the pathogenesis of depression and the application of related antidepressants [J]. *Shandong Med J*, 2022, 62(17): 97-100.
- [32] 张立娟, 张进强, 贺慧, 等. 丹参抗抑郁的神经免疫机制研究探讨 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(8): 1289-1293.
ZHANG L J, ZHANG J Q, HE H, et al. Antidepressant effects of *Salvia* through neuroinflammatory signaling related to neurogenesis [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2017, 19(8): 1289-1293.
- [33] 曲苏晨. 开心散调控中枢神经炎症系统抗抑郁作用机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
QU S C. Study on antidepressant mechanism of Kai-Xin-San in regulating central nervous inflammatory system [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2021.
- [34] WANG X L, CHEN F, SHI H, et al. Oxymatrine inhibits neuroinflammation by Regulating M1/M2 polarization in N9 microglia through the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108139.
- [35] SU P, WU M, YIN X, et al. Modified Xiaoyao San reverses lipopolysaccharide-induced depression-like behavior through

- suppressing microglia M1 polarization via enhancing autophagy involved in PI3K/Akt/mTOR pathway in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 315: 116659.
- [36] 王慧慧, 卢仁睿, 张莉, 等. 地黄中地黄苷 D 通过调控小胶质细胞 M1/M2 极化抑制神经炎症 [J]. *中药材*, 2021, 44(11): 2683-2687.
- WANG H H, LU R R, ZHANG L, et al. *Rehmannia glutinosa* D inhibits neuroinflammation by regulating M1/M2 polarization of microglia [J]. *J Chin Med Mater*, 2021, 44(11): 2683-2687.
- [37] 侯季秋, 安莹, 陈雅丽, 等. 中药治疗对冠心病合并焦虑抑郁患者炎症因子影响的系统评价及 Meta 分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(13): 153-163.
- HOU J Q, AN Y, CHEN Y L, et al. Systematic review and meta-analysis of traditional Chinese medicine on inflammatory factors in patients with coronary heart disease complicated with anxiety and depression [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(13): 153-163.
- [38] JIAO H, YANG H, YAN Z, et al. Traditional Chinese formula Xiaoyaosan alleviates depressive-like behavior in CUMS mice by regulating PEBP1-GPX4-mediated ferroptosis in the hippocampus [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 17: 1001-1019.
- [39] 杨皓然, 刘丽娜, 葛飞, 等. 基于海马小胶质细胞 M1 型极化研究逍遥散对 OVX 联合 CUS 焦虑抑郁模型大鼠的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(20): 4964-4970.
- YANG H R, LIU L N, GE F, et al. Effect of Xiaoyao San on OVX combined with CUS anxiety and depression model rats based on hippocampal microglia M1 polarization [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(20): 4964-4970.
- [40] 戴建业, 张齐, 张曼, 等. 加味温胆汤对抑郁大鼠 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路及小胶质细胞极化的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(5): 723-727.
- DAI J Y, ZHANG Q, ZHANG M, et al. Effect of modified Wendan Decoction on HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway and microglia polarization in depression rats [J]. *J Basic Chin Med*, 2022, 28(5): 723-727.
- [41] 张震, 赵博, 刘焯鉴, 等. 柴胡疏肝散对 CUMS 大鼠眶额叶皮层的保护作用机制 [J]. *中药材*, 2021, 44(7): 1713-1718.
- ZHANG Z, ZHAO B, LIU C J, et al. Study on the protective mechanism of Chaihu Shugan Powders on the orbitofrontal cortex of CUMS rats [J]. *J Chin Med Mater*, 2021, 44(7): 1713-1718.
- [42] ZHANG L, TANG M, XIE X, et al. Ginsenoside Rb1 induces a pro-neurogenic microglial phenotype via PPAR γ activation in male mice exposed to chronic mild stress [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 171.
- [43] 马丹凤, 陈蕾, 张传香, 等. 木犀草素调控 JAK1/STAT3 通路对抑郁症大鼠海马小胶质细胞极化的影响 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(12): 2587-2594.
- MA D F, CHEN L, ZHANG C X, et al. Effect of luteolin on polarization of hippocampal microglia in depression rats by regulating JAK1/STAT3 pathway [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(12): 2587-2594.
- [44] TAO W, HU Y, CHEN Z, et al. Magnolol attenuates depressive-like behaviors by polarizing microglia towards the M2 phenotype through the regulation of Nrf2/HO-1/NLRP3 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153692.
- [45] 谢婷婷, 孙艳, 王东晓, 等. 远志 YZ-50 对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及血清 CRH ACTH 和 COR 的影响 [J]. *解放军药理学学报*, 2008, 24(2): 95-98.
- XIE T T, SUN Y, WANG D X, et al. Effect of *Polygala tenuifolia* wild YZ-50 on behavior and CRH ACTH and COR in blood serum of chronic stress depression rats [J]. *Pharm J Chin People's Liberation Army*, 2008, 24(2): 95-98.
- [46] 章主恒, 王静, 付宇, 等. 中药远志抗抑郁有效成分及其作用机制研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(12): 1797-1801.
- ZHANG Z H, WANG J, FU Y, et al. Advanced research on the antidepressant actions of *Radix Polygala* and its mechanism [J]. *J Basic Chin Med*, 2018, 24(12): 1797-1801.
- [47] KANG A, HAO H, ZHENG X, et al. Peripheral anti-inflammatory effects explain the ginsenosides paradox between poor brain distribution and anti-depression efficacy [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 100.
- [48] DANG H, CHEN Y, LIU X, et al. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33(8): 1417-1424.
- [49] 刘丽琴, 罗艳, 张瑞睿, 等. 人参皂苷对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及 HPA 轴、BDNF 的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(10): 1342-1347.
- LIU L Q, LUO Y, ZHANG R R, et al. Effects of ginsenosides on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(10): 1342-1347.
- [50] 张胜, 张尧, 李彪, 等. 山奈酚对 CUMS 抑郁模型大鼠海马神经元过度自噬和氧化应激损伤的保护作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(2): 146-150, 155.
- ZHANG S, ZHANG Y, LI B, et al. Protective effects of kaempferol on autophagy-and oxidative stress-mediated injury of hippocampal neuron in CUMS-induced depression model rats [J]. *Chin J Immunol*, 2019, 35(2): 146-150, 155.
- [51] 张月. 绒叶仙茅苷 H 对慢性应激诱发大鼠抑郁行为的影响及机制研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- ZHANG Y. Effect of Crassifoside H on rats with depressive behaviors induced by chronic unpredictable mild stress and its mechanism [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2016.
- [52] MEHTA V, PARASHAR A, UDAYABANU M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress [J]. *Physiol Behav*, 2017, 171: 69-78.
- [53] TSAI M C, HUANG T L. Increased activities of both superoxide

- dismutase and catalase were indicators of acute depressive episodes in patients with major depressive disorder [J]. *Psychiatry Res*, 2016, 235: 38-42.
- [54] 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*, 2020, 10: 1544.
- [55] KHAN K, NAJMI A K, AKHTAR M. A natural phenolic compound quercetin showed the usefulness by targeting inflammatory, oxidative stress markers and augment 5-HT levels in one of the animal models of depression in mice [J]. *Drug Res*, 2019, 69(7): 392-400.
- [56] 张芷菁, 姚建平, 郭子伊, 等. 淫羊藿苷延缓衰老及抗抑郁症研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(16): 276-282.
- ZHANG Z J, YAO J P, GUO Z Y, et al. Advances in study of icarrin for Anti-aging and Anti-depression: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(16): 276-282.
- [57] 辛卫云. 杜仲总黄酮对大、小鼠 PMS 模型的影响 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.
- XIN W Y. Effects of total flavonoids from *Eucommia ulmoides* oliv. on PMS model in rats and mice [D]. Zhengzhou: Henan University of Chinese Medicine, 2017.
- [58] 崔广智, 金树梅. 芍药苷对利血平诱导抑郁模型的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22): 272-274.
- CUI G Z, JIN S M. Effect of paeoniflorin on reserpine-induced depression model in mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2012, 18(22): 272-274.
- [59] 李腾飞, 孙秀萍, 高江晖, 等. 石菖蒲水提物对获得性无助模型的抗抑郁作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2): 132-135.
- LI T F, SUN X P, GAO J H, et al. Antidepressant effect of the water extract of *acori tatarinowii* rhizoma in the learned helplessness rat mode [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2012, 18(2): 132-135.
- [60] 刘亚敏, 栗俞程, 李寒冰, 等. 夏枯草水提物抗抑郁作用研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(4): 440-444.
- LIU Y M, LI Y C, LI H B, et al. Antidepressant effects of the water extracts from *Prunella vulgaris* L [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2017, 28(4): 440-444.
- [61] 刘治军, 李林, 叶翠飞, 等. 二苯乙炔苷对脑缺血啮齿动物脑 NMDA 受体及细胞内钙离子的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(10): 1112-1115.
- LIU Z J, LI L, YE C F, et al. Effects of tetrahydroxystilbene on NMDA receptors and intracellular calcium ions in brain of ischemia rodent [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2003, 19(10): 1112-1115.
- [62] 龚林, 邱彦, 刘静, 等. 知母总皂苷对血管性抑郁小鼠抑郁行为和脑组织病理学的影响 [J]. *中国药物应用与监测*, 2017, 14(2): 88-92.
- GONG L, QIU Y, LIU J, et al. Effects of saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bge. on the depressive behaviors of vascular depression mice and brain tissue pathology [J]. *Chin J Drug Appl Monit*, 2017, 14(2): 88-92.
- [63] 李传斌, 夏磊. 圣约翰草提取物对卒中后抑郁患者氧化应激损伤的影响 [J]. *临床心身疾病杂志*, 2022, 28(4): 100-103.
- LI C B, XIA L. Effects of St. John's wort extract on oxidative stress injury in patients with post-stroke depression [J]. *J Clin Psychosom Dis*, 2022, 28(4): 100-103.
- [64] 关放, 陈洪琳. 圣约翰草提取物治疗脑卒中后抑郁临床效果分析 [J]. *智慧健康*, 2024, 10(7): 134-137.
- GUAN F, CHEN H L. Clinical effect analysis of St. John's wort extract in the treatment of post-stroke depression [J]. *Smart Healthc*, 2024, 10(7): 134-137.
- [65] 于冰清, 邵欣欣, 付晓凡, 等. 抗抑郁中药复方的组方特点及作用机制研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3344-3352.
- YU B Q, SHAO X X, FU X F, et al. Study on composition characteristics and mechanism of anti-depression traditional Chinese medicine compound based on literature mining and correlation analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(11): 3344-3352.
- [66] 熊霞军, 胡志希, 钟森杰, 等. 基于国家专利的中药复方治疗抑郁症用药规律研究 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(22): 3242-3246.
- XIONG X J, HU Z X, ZHONG S J, et al. Medication rules of Chinese patent medicine compounds in treatment of depression [J]. *World Chin Med*, 2022, 17(22): 3242-3246.
- [67] 陈颖, 袁勇贵. 中药单体、药对、复方、中成药治疗抑郁症研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(5): 586-593.
- CHEN Y, YUAN Y G. Research progress in the treatment of depression with monome of Chinese herb, drug pairs, compound prescriptions and Chinese patent drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2021, 26(5): 586-593.
- [68] 尚立芝, 李耀洋, 谢文英, 等. 抗抑郁仲景方药的作用机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(24): 25-32.
- SHANG L Z, LI Y Y, XIE W Y, et al. Action mechanisms of zhongjing's antidepressant prescriptions: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2021, 27(24): 25-32.
- [69] 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 similar prescriptions in treatment of depression [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2023, 41(6): 69-73.
- [70] 张英美, 王亚丽, 常人瑞, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗抑郁症的研究进展 [J]. *江苏中医药*, 2022, 54(10): 79-82.
- ZHANG Y M, WANG Y L, CHANG R R, et al. Review of Chaihu Longgu Muli Decoction in treating depression [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2022, 54(10): 79-82.
- [71] 张明远, 许二平, 尚立芝, 等. 酸枣仁汤及其组分治疗抑郁症的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(6): 48-54.

- ZHANG M Y, XU E P, SHANG L Z, et al. Research progress of Suanzaoren Decoction and its components in treatment of depression [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(6): 48-54.
- [72] 芦晔, 裴林, 关振伟, 等. 化浊解毒疏肝方对慢性应激小鼠的抗抑郁作用及对 BDNF-Rac1-cofilin 通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2089-2093.
- LU Y, PEI L, GUAN Z W, et al. Effects of Huazhuo Jiedu Shugan Formula anti-depression on chronic mild stress-induced depression mice and on BDNF-Rac1-cofilin pathway [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(5): 2089-2093.
- [73] 史建勋. 中药复方枳菊解郁汤的抗抑郁作用及其机制 [D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2014.
- SHI J X. Antidepressant effect and mechanism of Zhiju Jieyu Decoction, a compound Chinese medicine [D]. Qufu: Qufu Normal University, 2014.
- [74] 刘欣, 唐颖, 王亚男, 等. 巴戟天寡糖联合帕罗西汀对老年抑郁症患者血清 FGF-22 及 ACTH 表达的影响 [J]. 西部中医药, 2024, 37(1): 128-131.
- LIU X, TANG Y, WANG Y N, et al. Influence of *Morinda citrifolia* oligosaccharide joined with paroxetine on the expressions of serum FGF-22 and ACTH in senile patients with depression [J]. West J Tradit Chin Med, 2024, 37(1): 128-131.
- [75] 王萍, 高朝, 陈茹, 等. 疏肝解郁胶囊联合阿戈美拉汀对抑郁症患者汉密尔顿抑郁量表评分及孤啡肽、白细胞介素-2 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(5): 73-76.
- WANG P, GAO Z, CHEN R, et al. Effects of Shugan Jieyu capsule combined with agomelatine on HAMD score and OFQ and IL-2 in patients with depression [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(5): 73-76.
- [76] 谢奇, 杨秋莉, 王子旭, 等. 中医非药物疗法治疗抑郁症的
研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(3): 491-494.
- XIE Q, YANG Q L, WANG Z X, et al. Study on the treatment of depression with non-drug therapy of traditional Chinese medicine [J]. J Basic Chin Med, 2022, 28(3): 491-494.
- [77] 李晓艳, 王红梅, 赵雅, 等. 针刺对慢性应激抑郁大鼠前额叶皮层小胶质细胞活化的影响 [J]. 针刺研究, 2021, 46(1): 52-57.
- LI X Y, WANG H M, ZHAO Y, et al. Effect of acupuncture on microglia activation in prefrontal cortex of chronic stress-induced de-pression rats [J]. Acupunct Res, 2021, 46(1): 52-57.
- [78] 杨柳笛, 王文军. 针灸抑制神经炎症反应治疗抑郁症的作用机制研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(8): 52-54.
- YANG L D, WANG W J. Research progress on treatment of depression with acupuncture and moxibustion by inhibiting neuroinflammation [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2022, 36(8): 52-54.
- [79] 陈欣怡, 李永丰, 徐晨曦, 等. 针刺干预抑郁症在中枢 5-羟色胺系统的效应机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 150-154.
- CHEN X Y, LI Y F, XU C X, et al. Research progress on effect mechanism of acupuncture intervention on depression in central 5-HT system [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(7): 150-154.
- [80] 于姚, 赵钟辉, 李阳, 等. 五行音乐对抑郁症患者干预效果的 Meta 分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(12): 27-31.
- YU Y, ZHAO Z H, LI Y, et al. Meta-analysis on clinical effects of five elements of music in patients with depression [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2020, 47(12): 27-31.

[收稿日期]2024-03-28



赴日参访札记——学术会议交流观感

赵宏旭

(中国实验动物学会,北京 100021)

2024年5月28日~6月1日,我随中国实验动物学会代表团,赴日本参加了“第71届日本实验动物学会年会”,并参观考察了日本京都大学医学研究科附属实验动物机构和日本国立脑心血管研究中心。

“第71届日本实验动物学会年会”于2024年5月29日~31日在日本京都举办。本次大会的主题是“实验动物科学的新时代——科技与医疗创新”。学术交流内容主要围绕实验动物相关领域展开。会议形式多样,本次大会有8场座谈会、3场实验动物科学研讨会、最佳演讲奖的口头报告、一般口头报告和墙报展示等内容。

通过参加日本实验动物学会年会,有以下几点感想:

(1)日本的实验动物学会年会,与国内学会举办的年会大致相同,每年举办一次,时间基本上固定在每年的5月下旬,由日本国内各个实验动物机构轮流承办,该机构负责人担任大会主席。本届年会是由日本京都大学实验动物机构承办,浅野雅秀教授担任大会主席,地点在日本京都。

(2)不论是日本还是我国,举办学术年会的目的都是将从事实验动物科技领域的科技工作者召集在一起,相互交流近年来在学术上开展的科学研究、取得的科研成果,从而达到相互学习、共同进步的目的。

(3)我国不论是实验动物研究领域还是其他科研领域,每年也都举办大型的学术年会,邀请知名专家做主题报告,组织分会场做专题报告,其会议形式与日本大致相同。近年来,通过视频方式的线上会议逐渐增多。由于疫情原因,这两年国内的各种学术会议呈井喷式爆发,科研人员参加学术会议

已应接不暇。然而,这种为了开会而开会的现象,取得的实际效果又如何呢?与日本的学术会议相比,我们的学术会议或许更多的是追求形式主义。

(4)这次去日本参会,我个人感觉他们参加会议是真正为交流学术而参加的。首先表现在每个会场都是座无虚席,会场外几乎没有人闲聊。其次在场内,台上演讲者、台下听众都非常认真。报告开始后,灯光关闭,场内静悄悄的,学术氛围很浓厚,交头接耳、玩手机、刷视频、打电话的完全没有。

(5)学术年会一个很重要的交流形式就是墙报交流,我们国家也有这种形式。日本年会上,由于会期很短,不能安排所有的研究者都进行口头报告。为了展示自己的科研成果,更多的人选择以墙报形式进行交流。大会也会安排作者定时等候在那里,解答观看者提出的问题。观看者也是非常认真地阅读论文内容,对感兴趣或不明白的问题,认真地用本子记录下来。而在我们的年会上,很少看到这种现象。首先,关注墙报交流、提交墙报交流论文的研究者就不多。其次,作者也不按时等候在那里解答问题。再有,即使遇到感兴趣的文章,大部分也是匆匆地用手机拍照下来,回去是否再看也不得而知了。

总体感觉,我们国内参加学术会议的人员,从学习交流的态度上讲,与日本同行有很大的差距。我们注重的是见面交谈、联络感情,而深入探讨学术问题次之。这样就使得没能在学术问题上进行深入交流,举办学术会议没有达到应有的效果。希望今后我国的科技工作者能够真正利用参加学术会议的机会,学习到更多的知识,解决更多的实际问题,让学术会议的含金量更高一些。