

曹琳娜,李铭哲,施展豪,等. 气滞血瘀型小鼠肝癌皮下移植瘤模型的建立与探索 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1505-1514.

CAO L N, LI M Z, SHI Z H, et al. Establishment and exploration of a subcutaneous transplanted tumor model of hepatocellular carcinoma in mice with Qi stagnation and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1505-1514.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.001

气滞血瘀型小鼠肝癌皮下移植瘤模型的建立与探索

曹琳娜,李铭哲,施展豪,王香香,潘志强*,彭佩克*

(上海中医药大学中医学院,上海 201203)

【摘要】 目的 探索气滞血瘀型小鼠肝癌皮下移植瘤模型的建立方法。**方法** 通过气滞血瘀证候造模(7 d)联合肝癌皮下移植瘤造模(20 d),将 40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组:空白组、气滞血瘀组、移植瘤组和复合模型组,观察造模后小鼠的证候表现以及肿瘤大小与重量。**结果** (1)体重变化:造模第 7 天,气滞血瘀组和复合模型组体重较空白组显著降低($P < 0.05$)。(2)体温变化:造模第 7 天,与空白组相比,气滞血瘀组体温显著降低($P < 0.05$),移植瘤组体温升高($P < 0.05$);造模第 27 天,复合模型组体温较空白组明显降低($P < 0.05$)。(3)证候表现:根据证候评分表进行打分,造模第 7 天,气滞血瘀组和复合模型组小鼠均出现气滞血瘀证候($P < 0.05$)。随着造模时间的延长,移植瘤组小鼠的评分随肿瘤的成型而上升;复合模型组的评分较其余 3 组均显著上升($P < 0.05$)。(4)爪部瘀点:与空白组相比,3 组造模小鼠的爪部瘀点均明显增多($P < 0.05$),且复合模型组爪部瘀点最多。(5)爪部 r 值:与空白组相比,3 组造模小鼠爪部 r 值均显著降低($P < 0.05$),且复合模型组爪部 r 值始终低于其余 3 组。(6)旷场活动度:与空白组相比,复合模型组小鼠的垂直和水平旷场活动度显著降低($P < 0.05$)。(7)凝血 4 项指标:与空白组相比,复合模型组活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time,APTT)缩短、凝血酶时间(thrombin time,TT)缩短、纤维蛋白原(fibrinogen,FIB)明显增多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(8)肿瘤大小与重量:与移植瘤组相比,复合模型组肿瘤大小和瘤重显著增加($P < 0.05$)。**结论** 本研究成功构建了气滞血瘀型小鼠肝癌皮下移植瘤模型,表明肝癌病程中会出现气滞血瘀证候;此外,诱发气滞血瘀证候的病因,会进一步促进肝癌的进展。

【关键词】 肝癌;气滞血瘀;证候模型;病-证结合

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1505-10

Establishment and exploration of a subcutaneous transplanted tumor model of hepatocellular carcinoma in mice with Qi stagnation and blood stasis syndrome

CAO Linna, LI Mingzhe, SHI Zhanhao, WANG Xiangxiang, PAN Zhiqiang*, PENG Peike*

(School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: PENG Peike. E-mail:ppkppk_731@126.com;PAN Zhiqiang. E-mail:pzq527@163.com

【Abstract】 Objective To explore the establishment of a subcutaneously transplanted tumor model of hepatocellular carcinoma in mice with Qi stagnation and blood stasis syndrome. **Methods** Forty male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: NC group, QZXY group, Tumor group, and QZXY + Tumor group. They were categorized based on

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82004000)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82004000).

【作者简介】 曹琳娜,女,在读博士研究生,研究方向:中医药防治肿瘤的基础。Email:cln77c@163.com

【通信作者】 彭佩克,男,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:实验中医教学与中医基础实验研究。Email:ppkppk_731@126.com;

潘志强,男,教授,博士,博士生导师,研究方向:实验中医教学与中医基础实验研究。Email:pzq527@163.com。

* 共同通信作者

the modeling of Qi stagnation and blood stasis syndrome (7 days) combined with the modeling of subcutaneous transplantation of hepatocellular carcinoma tumor (20 days). Observations were conducted of the syndrome manifestations as well as the tumor size and weight of the mice after modeling. **Results** (1) Body weight: on the 7th day of modeling, the weights of the QZXY group and QZXY + Tumor group were significantly lower than that of the NC group ($P < 0.05$). (2) Body temperature: on the 7th day of modeling, body temperature significantly decreased in the QZXY group ($P < 0.05$), while it increased in the Tumor group ($P < 0.05$) compared with the NC group. On the 27th day of modeling, the temperature of the QZXY + Tumor group was significantly lower than that of the NC group ($P < 0.05$). (3) Syndrome manifestations: according to the syndrome scoring table, mice in both the QZXY group and QZXY + Tumor group exhibited Qi stagnation and blood stasis syndrome on the 7th day of modeling ($P < 0.05$). As modeling time extended, the score of mice in the Tumor group increased with the formation of the tumor, and the score of mice in the QZXY + Tumor group was significantly higher than that of the other three groups ($P < 0.05$). (4) Claw petechiae: the number of claw petechiae significantly increased in all three groups of modeled mice compared with the NC group ($P < 0.05$), with the QZXY + Tumor group showing the highest number. (5) Claw r value: the r value of the claw was significantly lower in all three groups of modeled mice than that in the NC group ($P < 0.05$). Additionally, the r value of the claw in the QZXY + Tumor group was consistently lower than that of the other three groups. (6) Open field activity: the vertical and horizontal activity of mice in the QZXY + Tumor group decreased significantly compared with that of the NC group ($P < 0.05$). (7) Coagulation indexes: APTT, TT, and FIB were significantly increased in the QZXY + Tumor group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared with those in the NC group. (8) Tumor size and weight: compared with the Tumor group, the QZXY + Tumor group showed significantly increased tumor size and weight ($P < 0.05$). **Conclusions** This study successfully established a subcutaneous transplanted tumor model of hepatocellular carcinoma in mice with Qi stagnation and blood stasis syndrome. The findings indicated that Qi stagnation and blood stasis syndrome may occur during the course of liver cancer. Besides, the causes inducing the Qi stagnation and blood stasis syndrome will further accelerate the progression of liver cancer.

【Keywords】 hepatocellular carcinoma; Qi stagnation and blood stasis; syndrome model; disease-syndrome combination

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

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 是全球常见的恶性肿瘤之一。最新癌症统计表明,我国肝癌新发病例数 36.8 万人,死亡 31.7 万人,是我国第二大肿瘤致死病因^[1]。随着中医药的不断发展,临床上往往采用中西医结合的治疗手段参与肝癌发病的整个病程,有望为患者争取到更高的生存时间及生活质量。虽然祖国医学中没有肝癌的直接记载,但从其症状表现来看,与中医的“肝著”“臃胀”“痞癖”“癥瘕”等病名相类似^[2]。关于肿瘤的病机,学术界普遍认为属于“整体正气亏虚、局部邪气壅实”的范畴。肝藏血主调达,肝癌的本质是由于脏腑功能失调、气血阴阳失衡,进一步导致气滞、血瘀、湿热、痰毒等蕴结于肝而形成。

肝癌的中医辨证分型在临床报道众多,但目前仍缺乏统一标准。大量肝癌相关文献与流行病学调查表明,气滞血瘀是肝癌最常见的证型^[3]。上海中医药大学方肇勤教授团队^[4]通过临床流行病学调查,发现 2492 例肝癌病例中气滞血瘀型最多,占总病例数的 23.11%。此外,气滞血瘀证候与肝癌

的分期密切相关,有学者发现在肿瘤淋巴转移 (tumor node metastases, TNM) 分期的早中期,肝癌患者中气滞证的占比最高,而后期患者的血瘀证表现更加突出^[5]。临床上认为气滞血瘀证是原发性肝癌最主要的证型,贯穿肝癌发展的整个病程。因此,临床常采用行气活血治法的方药治疗肝癌,并取得良好的治疗效果。此外,也有研究表明丹参、川芎、赤芍等行气活血药对肿瘤的转移存在促进作用^[6-7],但活血化瘀药是否对于肝癌的增殖与转移具有双向调节作用仍存在争议。基于此,本研究以 C57BL/6 小鼠为受试对象,通过气滞血瘀证候造模联合肝癌皮下移植瘤造模,探索气滞血瘀证肝癌模型小鼠证候的发展和演变,为中医药防治肝癌提供合适的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 40 只,SPF 级,体重

16 ~ 18 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2022-0004】。饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室【SYXK(沪)2020-0009】，室温 22 ~ 25 ℃，湿度 50% ~ 60%，12 h 明暗交替，给予自由饮水，普通饲料喂养。本实验方案已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会审议批准(PZSHUTCM2311230008)。

1.1.2 主要试剂与仪器

盐酸肾上腺素注射液(批号:10221001), 上海禾丰制药有限公司; 柠檬酸三钠(批号:20121009), 国药集团化学试剂有限公司; 0.9% 氯化钠注射液(批号:S2308134), 上海百特医疗用品有限公司; 活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)测定试剂盒(批号:230202000)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定试剂盒(批号:230505801)、凝血酶时间(thrombin time, TT)测定试剂盒(批号:220508500)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)测定试剂盒(批号:230506800), 上海长岛生物技术有限公司。

CP225D 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; MC-246 电子体温计, 大连欧姆龙有限公司; DSC-W800 数码相机, 日本 SONY 公司; 5417R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; C3100 全自动凝血分析仪, 深圳迈瑞生物医疗有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组

将 40 只 C57BL/6 雄性小鼠, 按照随机数字表法随机分为 4 组, 空白组(NC group)10 只, 气滞血瘀组(QZXY group)10 只, 移植瘤组(Tumor group)10 只, 复合模型组(QZXY + Tumor group)10 只。气滞血瘀证候造模: 每天上午 10:00 进行小鼠颈背部皮下注射 0.1% 盐酸肾上腺素(0.1 mg/kg)0.2 mL, 同时用绷带细条束缚小鼠四肢, 并加笼外木棒敲击 5 min, 每天 1 次, 共 7 d。肝癌皮下移植瘤造模: 将肝癌细胞 Hepa1-6 以每毫升 2.0×10^6 个的浓度重悬于 PBS 中, 采用皮下注射的方式在小鼠腋窝下每只接种肿瘤细胞悬液 0.2 mL。各组小鼠处理方法如下, 空白组: 不给予任何刺激, 与其他 3 组小鼠按相同的条件喂养; 气滞血瘀组: 给予皮下注射盐酸肾上腺素 + 四肢捆绑束缚刺激 + 笼外木棒敲击 5 min, 共 7 d; 移植瘤组: 第 7 天在小鼠腋窝下接种肝癌肿瘤细胞悬液; 复合模型组: 给予皮下注射盐酸肾上腺素 + 四肢捆绑束缚刺激 + 笼外木棒敲击

5 min, 共 7 d; 7 d 后在小鼠腋窝下接种肝癌肿瘤细胞悬液。

1.2.2 小鼠体重、体温的观察

实验过程中, 各组小鼠每 4 d 进行 1 次体重和体温的测量。小鼠腋温测定方法: 将电子体温计插入小鼠左前肢腋下, 待数值上升到不再上升为止, 读出相应的腋温数值。

1.2.3 小鼠证候观察

实验过程中, 根据证候评分表对小鼠的精神状态、呼吸、气味、眼睛、粪便、舌、耳、毛发、二便等情况进行证候评分, 每 4 d 一次, 评分标准见表 1。

1.2.4 小鼠爪部 r 值计算及爪上瘀血点观察

每 4 d 对小鼠的爪面进行显微拍照, 采用 Photoshop 7.0 软件, 选取爪面右上侧趾基肉垫的上缘和右侧缘为取景的上缘和右侧缘, 以左下趾基肉垫的下缘为取景的下缘, 以左上侧趾基肉垫的左侧缘为取景的左侧缘, 作红绿蓝(red green blue, RGB)色度的提取分析。在相应区域划定后, 读取记录 RGB 分量值(国际标准的定量, R 代表红色, G 代表绿色, B 代表蓝色), 得到原始爪部 RGB 分量值。将 RGB 值代入公式 $r = R / (R + G + B)$, 求出 r 值, 通过爪部红色程度反映小鼠血盛衰度。随后对爪部照片瘀血点进行计数, 以反映小鼠的血瘀程度。

1.2.5 小鼠旷场活动度观察

每 4 d 将小鼠置于铺设有 4.5 cm × 5.5 cm 透明塑料板的旷场笼中, 录像并统计小鼠 1 min 内水平和垂直运动的次数; 后肢移动的格子数记为水平运动, 前肢离地的次数记为垂直运动, 通过旷场活动度反映小鼠气盛衰度。

1.2.6 凝血 4 项检测

造模结束后(第 27 天), 取血 1.5 mL 于柠檬酸钠(9:1)抗凝剂中, 以 3000 r/min 离心 15 min 去除血小板, 分离血浆, 并根据试剂盒说明书, 采用全自动凝血分析仪检测 APTT、PT、TT、FIB。

1.2.7 皮下瘤观察及瘤重测量

在皮下移植瘤接种 20 d 后, 将小鼠处死, 剥离瘤体, 并对瘤体进行称重。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计学软件和 GraphPad Prism V.5 进行统计学分析。实验结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本间比较采用单因素方差分析, 通过 t 检验检查两组之间的差异。P < 0.05 表示具有统计学意义。

表 1 小鼠气滞血瘀证候评分表

Table 1 Qi stagnation and blood stasis syndrome scores of mice

证候 Syndrome	评估标准 Standard of accessment	评分/分 Score/point
精神状态 State of mind	正常:活动迅速,目光有神 Normal: quick movement, bright eyes	0
	轻度异常:精神倦怠、懒动,自发活动减少 Mild abnormality: mental fatigue, laziness, decreased spontaneous activity	1
	明显异常:逃避,攻击行为明显减少 Obvious abnormality: significant reduction in avoidance and aggression	2
	无明显变化 No significant changes	0
呼吸 Breathe	增加 Increased	1
	减少 Reduced	2
	笼内垫料无异味 No foul smell in the bedding of the cage	0
气味 Smell	轻微骚臭 Slightly foul smell	1
	明显恶臭 Obviously foul smell	2
眼睛 Eyes	红亮有神 Bright eyes	0
	黯淡无神 Dull eyes	1
	眼睛睁大,灵活 Eyes wide open and alert	2
	正常:舌底色微青,舌静脉主干长度不超过 3/4 Normal: tongue appears slightly bluish, the main vein on the tongue does not exceed three-fourths of its length	0
舌 Tongue	轻度紫暗:舌底色紫暗或舌静脉主干长度超过 3/4 Mild cyanotic: tongue appears mild cyanotic or the main vein on the tongue exceeds three-fourths of its length	1
	明显紫暗:舌底色紫暗且舌静脉主干长度超过 3/4 Obvious cyanotic: tongue appears obvious cyanotic and the main vein on the tongue exceeds three-fourths of its length	2
	无瘀点,血管数量适中 No petechiae, the number of blood vessels is moderate	0
	有 1 ~ 2 个瘀点,血管数量略有增加 There are 1 ~ 2 petechiae, and the number of blood vessels is slightly increased	1
耳 Ear	有 3 ~ 4 个瘀点,血管数量明显增加 There are 3 ~ 4 petechiae, and the number of blood vessels is obviously increased	2
	均匀细腻,光滑柔顺 Even and fine, smooth and soft	0
	稍乱,干燥,枯黄 Slightly rough, dry, yellow	1
	毛发杂乱,稀少 Obviously rough, reduced	2
毛发 Fur	无明显异常 No obvious abnormality	0
	尿微黄,量少 Slightly yellow, small amount of urine	1
	尿赤,量少 Obviously red, small amount of urine	2
	大便成形,粪质柔软 Stool is formed and soft	0
尿液 Urine	粪便稀溏,部分不成形 Stool is partially formed and loose	1
	粪便稀溏,完全不成形 Stool is completely formed and loose	2
	粪便稀溏,完全不成形 Stool is completely formed and loose	2
总分 Total score	-	-

2 结果

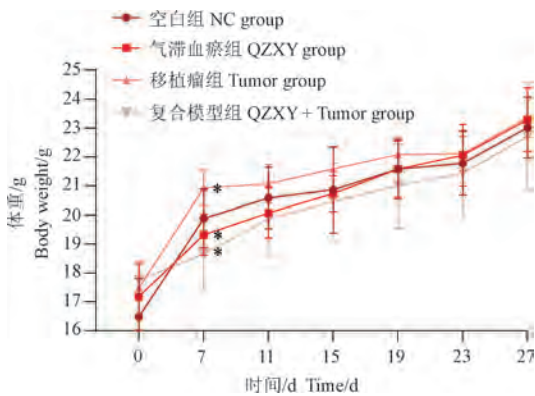
2.1 小鼠体重变化

造模第 7 天,气滞血瘀组和复合模型组小鼠体重较空白组显著降低($P < 0.05$)。随着造模时间的延长,各组小鼠体重逐步上升,但复合模型组小鼠平均体重低于空白组小鼠(图 1)。

2.2 小鼠体温的变化

造模第 7 天,与空白组相比,气滞血瘀组小鼠体

温明显降低($P < 0.05$),与此同时,经皮下移植瘤造模后,移植瘤组小鼠体温较空白组明显上调($P < 0.05$),但复合模型组小鼠体温较空白组无显著性差异。随造模时间的延长,气滞血瘀组体温逐渐恢复至正常,移植瘤组体温逐渐降低,复合模型组体温维持较低水平。造模第 27 天,与空白组相比,移植瘤组和复合模型组小鼠的体温明显降低($P < 0.05$)(图 2)。

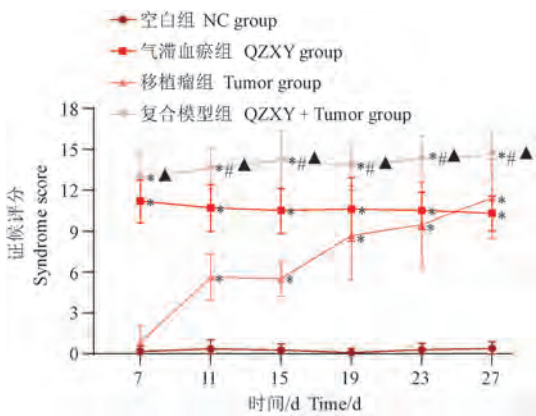


注:与空白组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 1 小鼠体重

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

Figure 1 Body weight of mice



注:与气滞血瘀组相比, # $P < 0.05$;与移植瘤组相比, ▲ $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 小鼠气滞血瘀证候评分

Note. Compared with QZXY group, # $P < 0.05$. Compared with tumor group, ▲ $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Qi stagnation and blood stasis syndrome scores of mice

2.4 小鼠爪部 r 值的检测与分析

随着造模时间的延长,与空白组相比,其余 3 组小鼠爪部的 r 值显著降低($P < 0.05$);其中,复合模型组小鼠爪部的 r 值始终低于其余 3 组(图 4)。

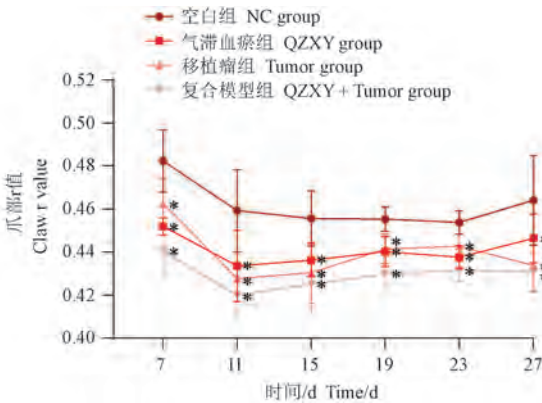


图 4 小鼠爪部 r 值

Figure 4 Claw r value of mice

2.3 小鼠气滞血瘀证候的评分观察

造模第 7 天,空白组和移植瘤组小鼠一般行为无明显变化;气滞血瘀组和复合模型组小鼠出现明显的精神倦怠、懒动等攻击行为降低的表现,出现呼吸减弱,舌质明显紫黯、耳有瘀点、毛发干燥,大便稀溏等气滞血瘀证候($P < 0.05$)。随着造模时间的延长,气滞血瘀组小鼠精神状态、呼吸等症状较第 7 天轻微减轻,但与空白组相比,仍具有气滞血瘀证候($P < 0.05$);移植瘤组小鼠随肿瘤的成型逐渐出现精神倦怠等攻击行为降低,舌质和耳部出现瘀点等气滞血瘀证候;复合模型组小鼠证候评分较空白组显著上升,小鼠舌质明显紫黯,耳部瘀点增多,被毛稍稀疏,且毛燥呈枯黄,并出现粪便稀溏不成形的表现($P < 0.05$),且复合模型组小鼠的证候评分较气滞血瘀组和移植瘤组小鼠均显著上升,证候表现更加明显($P < 0.05$)(图 3)。

2.5 小鼠爪部瘀点数的观察与计数

造模第 7 天,气滞血瘀组和复合造模组小鼠爪部瘀点数较多,随着造模时间的延长,气滞血瘀组小鼠爪部瘀点数轻微减少,仍显著多于空白组;而移植瘤组和复合模型组小鼠的爪部瘀点均明显增多($P < 0.05$),且复合模型组爪部瘀点数明显多于其余 3 组(图 5)。

2.6 小鼠旷场活动度的变化

造模第 7 天,与空白组相比,复合模型组小鼠的

垂直和水平旷场活动度均明显下降($P < 0.05$);随着造模时间的延长,气滞血瘀组、移植瘤组和复合模型组小鼠的垂直和水平旷场活动度逐渐降低,并在造模第 27 天,各组小鼠活动度较空白组均显著下降($P < 0.05$)(图 6)。

2.7 小鼠凝血 4 项的检测与分析

小鼠凝血 4 项结果显示,与空白组相比,气滞血

瘀组小鼠 PT 和 TT 明显缩短($P < 0.05$);移植瘤组小鼠的 FIB 明显增多($P < 0.05$);复合模型组小鼠的 APTT 缩短、TT 缩短、FIB 明显增多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表 2)。

2.8 小鼠皮下移植瘤的大小和瘤重变化

与移植瘤组相比,复合模型组小鼠的肿瘤大小和瘤重显著增加($P < 0.05$)(图 7)。

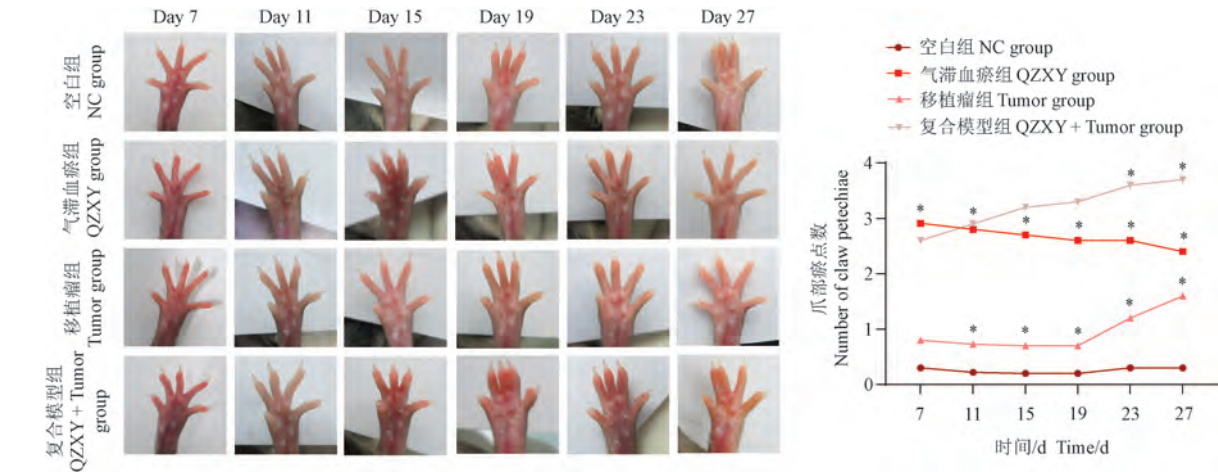
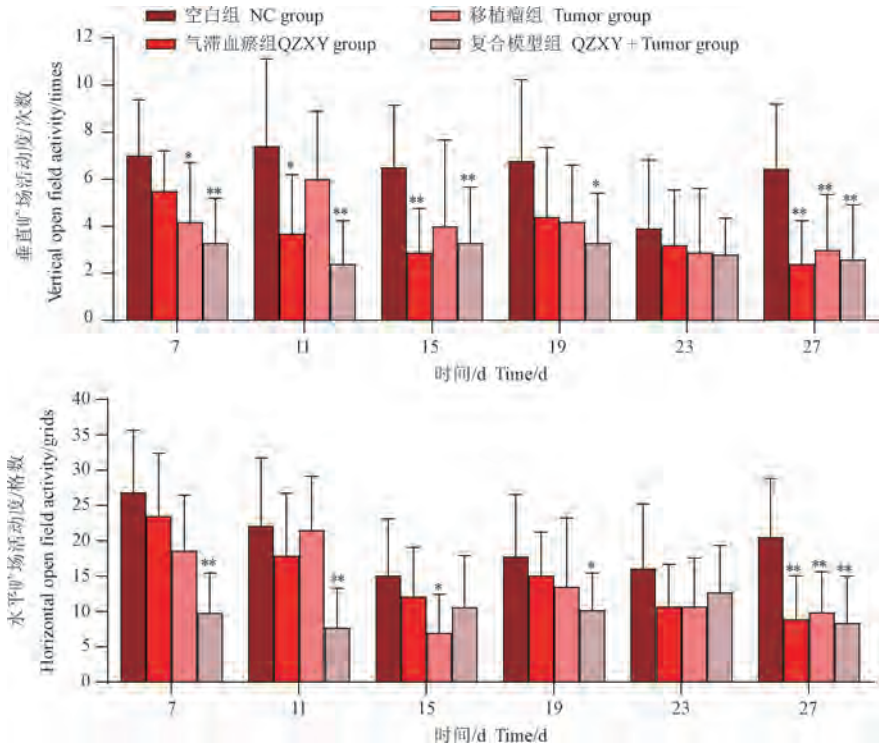


图 5 小鼠爪部瘀点数
Figure 5 Number of claw petechiae in mice



注:与空白组相比, ** $P < 0.01$ 。(下表同)

图 6 小鼠旷场活动度

Note. Compared with NC group, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

Figure 6 Open field activity of mice

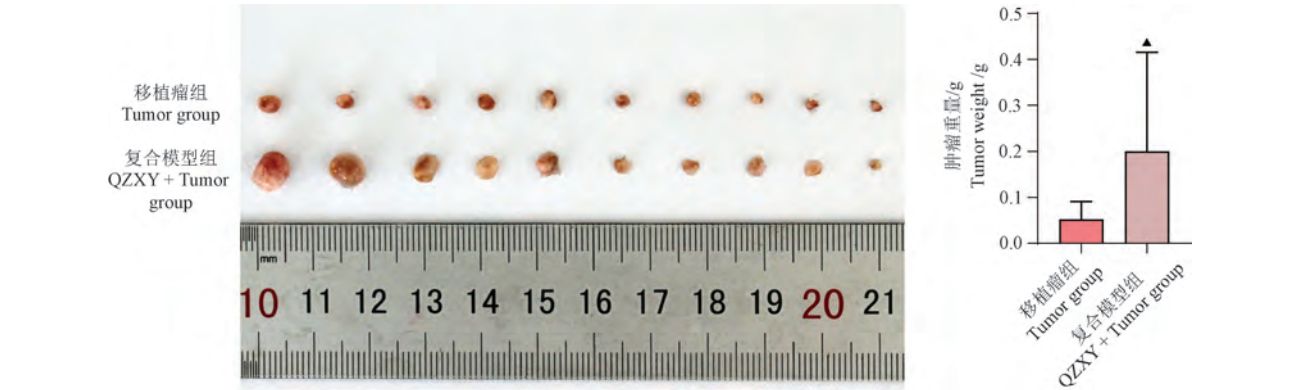


图 7 小鼠肿瘤及瘤重
Figure 7 Tumor size and weight of mice

表 2 小鼠凝血 4 项指标 Table 2 Four coagulation indexes of mice				
组别 Groups	活化部分凝血活酶时间/s APTT/s	凝血酶原时间/s PT/s	凝血酶时间/s TT/s	纤维蛋白原/(g/L) FIB/(g/L)
空白组 NC group	28.33 ± 2.77	10.08 ± 1.47	36.35 ± 4.76	2.56 ± 0.44
气滞血瘀组 QZXY group	27.60 ± 1.24	9.51 ± 0.84 *	33.07 ± 2.67 *	2.82 ± 0.68
移植瘤组 Tumor group	27.10 ± 0.90	9.92 ± 0.30	32.75 ± 5.60	2.73 ± 0.23 *
复合模型组 QZXY + Tumor group	26.33 ± 1.03 *	9.78 ± 0.36	29.82 ± 4.88 **	2.68 ± 0.24 *

3 讨论

原发性肝癌作为全球致死率第三大的恶性肿瘤,近几十年的发病率不断上升^[8]。肝癌发病隐匿、发展迅速,许多患者在首诊时即中晚期,只能通过系统药物治疗来抑制肿瘤生长^[9]。此外,大部分患者伴有乙肝、丙肝及肝硬化等基础肝病,也使得肝癌术后复发率居高不下,总体生存期相对较短^[10]。对于中晚期肝癌及术后肝癌复发,中医药治疗通过针对肝癌机体的全身反应来控制病情发展,其可增强免疫力、副作用小,在控制疾病进展和延长肝癌患者生存等方面具有重要作用^[11]。动物模型作为研究疾病发生发展和筛选治疗药物的重要工具,对于中医药基础研究而言,构建出符合中医病证特征和西医诊断标准的肝癌动物模型可为中医药防治肝癌研究提供重要支持。

气滞血瘀证型作为贯穿肝癌发展整个病程最主要的证型,惠友谊等^[12]对国家知识基础设施数据库(China national knowledge infrastructure, CNKI)、中国学术期刊数据库(China science periodical database, CSPD)、中文科技期刊数据库(Chinese citation database, CCD)自建库至 2021 年 4 月关于原

发性肝癌的证型和证素进行归纳分析,发现气滞血瘀是原发性肝癌最常见病机,气滞、瘀、血瘀为最常见证素。七情中的怒为血瘀证常见病因之一,本研究参考梁爱华等^[13]和刘校彤等^[14]气滞血瘀动物模型的造模方法,建立了符合临床实际的病证结合动物模型,采用皮下注射肾上腺素和四肢捆绑束缚,并笼外木棒敲击联合刺激 7 d,将小鼠诱导成气滞血瘀证;7 d 证候造模结束后,在小鼠腋窝皮下接种肿瘤细胞,建立气滞血瘀证肝癌小鼠复合模型。本模型参考已报道的临床气滞血瘀证诊断量表^[15],对小鼠的精神状态、呼吸、气味、眼睛、舌、耳、毛发,以及二便等情况进行观测并评分,发现在造模第 7 天,经过气滞血瘀证候造模的小鼠体重和体温较空白组小鼠都明显下降,并且出现攻击行为降低、呼吸减弱、舌质紫暗黯、耳部与爪部有瘀点、毛发干燥,以及大便稀溏等明显的气滞血瘀症状。在造模第 27 天,气滞血瘀组小鼠仍具有明显的气滞血瘀证候;移植瘤组小鼠的体温较空白组存在明显下调,并且随着肿瘤的成型,出现气滞血瘀证候等明显症状;此外经过复合造模的小鼠,相较于单独造模的小鼠来说,气滞血瘀的证候更加明显,耳部和爪部瘀点明显增多。结果表明复合模型较以往单纯移植

瘤模型加剧了小鼠气滞血瘀的证候表现,能够让研究者从小鼠的证候表现、凝血 4 项等指标更直观地观察行气活血药物对肝癌小鼠的治疗效果。

课题组长期开展实验小鼠四诊与辨证方法学,通过检测相关指标,对各虚证各模型四诊进行比较,以期建立明确的小鼠证候模型^[16-17]。本研究通过对小鼠爪部图像的 RGB 分量值得到 r 值,以及小鼠旷场活动度水平,对小鼠的血盛和气盛情况进行检测,从结果可得,经过气滞血瘀证候造模和肝癌皮下移植瘤造模的小鼠爪部红色度均显著降低,且经过复合造模的荷瘤小鼠爪部红色度明显低于皮下移植瘤造模的小鼠,提示皮下移植瘤小鼠会发生明显的血虚证候,且具有气滞血瘀证的小鼠会加深血虚证候的表现。此外,从对小鼠旷场活动度的检测发现,在第 27 天时,气滞血瘀组、移植瘤组和复合模型组小鼠的水平和垂直旷场活动度较空白组都显著降低,结果提示荷瘤小鼠有明显的气虚和血虚证候表现,这与先前的文献报道一致^[18-19],在荷瘤小鼠的证候发展中,气虚证和血虚证随着时间日益加深。当肝气长期郁结,气机不畅,必将血行瘀塞,而血为气之母,当血瘀日久,不能载气,必将出现气虚和血虚的证候表现。

凝血功能异常作为血瘀症的重要病理表现,研究者常常通过检测凝血 4 项 APTT、PT、TT、FIB 来诊断动物模型的凝血功能水平^[20-21]。本研究发现,与空白组相比,气滞血瘀组小鼠血浆 PT 和 TT 明显缩短,PT 常用于外源凝血系统的筛选指标,TT 则表示为血浆内添加凝血酶后血液凝固的时长,提示小鼠血液样本中有微小凝块,或有血栓形成^[22-23];移植瘤组小鼠血浆 FIB 明显增多,FIB 是一种凝血功能蛋白质,参与凝血机制、连接血小板聚集等过程^[24-25],当 FIB 水平升高,提示血液处于高凝状态;复合模型组小鼠血浆 APTT 和 TT 缩短、FIB 明显增多,APTT 作为内源性凝血系统检查的主要指标,当时间缩短,提示血液处于高凝状态^[26]。有研究发现,FIB 在气滞血瘀型肝癌患者血浆中异常增高,易导致血栓形成^[27]。此外,FIB 能促使血小板黏附于肿瘤细胞,形成血小板-肿瘤细胞聚集体,逃避免疫监视,促进肿瘤细胞的增殖与转移^[28]。肿瘤细胞亦可分泌促凝因子使 FIB 转化为纤维蛋白,进一步加重血液高凝状态^[29]。本研究结果表明,气滞血瘀证候造模和肝癌皮下移植瘤造模均会增强小鼠血浆 FIB 的表达,并且复合模型组小鼠的皮下肿瘤大小

和瘤重明显大于移植瘤组小鼠,提示造模小鼠血浆处于高凝状态,并会促进肝癌皮下肿瘤的生长。这与肝癌的病理病机有很深的联系,肝癌是由于脏腑功能失调、气血阴阳失衡,进一步致气滞、血瘀、湿热、痰毒等蕴结于肝所成,气滞血瘀证的发展进一步加深这些病理因子在肝集结,从而促进肿瘤的生长与发展。气滞血瘀证候作为肝癌发展整个病程最主要的证型,临床上常采用行气活血治法方药进行治疗,本研究结果证实在肝癌移植瘤发展的过程中,小鼠会出现明显的气滞血瘀证候,并且诱发气滞血瘀证候的病因,会进一步促进肝癌的进展。复合模型的建立更直观地表现了气滞血瘀证候在肝癌发展中的作用,突出了其证候特点,以期能有效评估行气活血治法方药对肝癌的治疗效果。

综上所述,本研究成功构建气滞血瘀型小鼠肝癌皮下移植瘤模型,表明肝癌病程中会出现气滞血瘀证候;此外,诱发气滞血瘀证候的病因,会进一步促进肝癌的进展。此外,病-证结合动物模型的建立与应用符合中医药研究发展的趋势,本研究在中医证候模型的基础上构建疾病模型,以期为中医药肝癌防治研究提供更加理想的动物模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] 王少明,郑荣寿,韩冰峰,等. 2022 年中国人群恶性肿瘤发病与死亡年龄特征分析 [J]. 中国肿瘤, 2024, 33(3): 165-174.
WANG S M, ZHENG R S, HAN B F, et al. Age distribution of cancer incidence and mortality in China in 2022 [J]. Chin Cancer, 2024, 33(3): 165-174.
- [2] 宁天宇,刘松江. 基于“三焦气化”探析原发性肝癌的中医动态病机观 [J]. 吉林中医药, 2024, 44(2): 144-148.
NING T Y, LIU S J. Exploring the dynamic pathogenesis of primary liver cancer in traditional Chinese medicine based on the “triple energizer gasification” theory [J]. Jilin J Chin Med, 2024, 44(2): 144-148.
- [3] 邵峰,曾普华,曾光,等. 628 例中晚期原发性肝癌患者中医证素分布特点 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3439-3442.
SHAO F, ZENG P H, ZENG G, et al. Distribution characteristics of TCM syndrome elements of 628 cases primary hepatocellular carcinoma during medium and advanced stage [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(8): 3439-3442.
- [4] 李永健,方肇勤,邸若虹,等. 2492 例肝癌辨证分型临床报道的统计分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(6): 69-71.
LI Y J, FANG Z Q, DI R H, et al. Statistical analysis of clinically reported syndromes differentiation of 2492 PHC cases

- [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2001, 7(6): 69-71.
- [5] 黄婉婷, 郭涛, 张晶, 等. 原发性肝癌气滞血瘀证的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(11): 3724-3727.
- HUANG W T, GUO T, ZHANG J, et al. Research advance in primary liver cancer of qi stagnation and blood stasis pattern [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(11): 3724-3727.
- [6] 孙满强, 胡凯文, 杨新阶, 等. 高剂量丹参、川芎对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤的影响及机制研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(10): 1333-1335, 1360.
- SUN M Q, HU K W, YANG X J, et al. Effect and metabolism of high-dose Danshen and Chuanxiong on tumor invasive and metastasis in Lewis lung cancer mouse [J]. World J Integr Tradit West Med, 2018, 13(10): 1333-1335, 1360.
- [7] 丁罡, 宋明志, 于尔辛. 丹参、赤芍对大鼠 Walker 256 癌肝转移影响机制的研究[J]. 中国癌症杂志, 2001, 11(4): 364-366.
- DING G, SONG M Z, YU E X. Study on the mechanism of Danshen, Chishao affecting Walker 256 liver metastasis in experimental rats [J]. Chin Oncol, 2001, 11(4): 364-366.
- [8] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [9] 安澜, 曾红梅, 冉显会, 等. 肝细胞癌和肝内胆管细胞癌流行病学研究进展[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(11): 879-884.
- AN L, ZENG H M, RAN X H, et al. Progress on epidemiology of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Chin Cancer, 2020, 29(11): 879-884.
- [10] TABRIZIAN P, ABDELRAHIM M, SCHWARTZ M. Immunotherapy and transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2024, 80(5): 822-825.
- [11] 侯俐, 方肇勤. 原发性肝癌的辨证论治进展[J]. 河南中医, 2007, 27(2): 78-81.
- HOU L, FANG Z Q. A summary of the combination of western medicine and TCM treatment for primary hepatocarcinoma [J]. Henan Tradit Chin Med, 2007, 27(2): 78-81.
- [12] 惠友谊, 薛敬东, 高改娅, 等. 原发性肝癌中医证型及证素的文献研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(3): 401-405.
- HUI Y Y, XUE J D, GAO G Y, et al. Literature study on TCM syndromes and syndrome elements of primary liver cancer [J]. World Chin Med, 2023, 18(3): 401-405.
- [13] 梁爱华, 杨洪军, 刘建勋. 血瘀证动物模型的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(2): 55-58.
- LIANG A H, YANG H J, LIU J X. A general situation of the researches on blood stasis syndrome animal models [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2003, 9(2): 55-58.
- [14] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- LIU X T, LYU G H, WANG Q Z, et al. Research progress of blood stasis syndrome animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 371-380.
- [15] 王阶, 高嘉良, 陈光, 等. 气滞血瘀证诊断量表的研制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 16-20.
- WANG J, GAO J L, CHEN G, et al. Constructing diagnosis scale for qi stagnation and blood stasis syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(15): 16-20.
- [16] 卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 等. 小鼠气、血、阴、阳、虚等八种模型四诊的比较和评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(6): 433-438.
- LU W L, FANG Z Q, PAN Z Q, et al. Comparison and evaluation of four diagnoses of eight models of Qi, blood, Yin, Yang and deficiency in mice [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2006, 12(6): 433-438.
- [17] 谢海纳, 潘志强, 曹琳娜. 双侧卵巢切除术和他莫昔芬给药诱发的潮热模型大鼠证候评价[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1545-1554.
- XIE H N, PAN Z Q, CAO L N. Evaluation of hot-flash model rats induced by bilateral oophorectomy and tamoxifen administration [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1545-1554.
- [18] 方肇勤, 侯俐, 卢文丽, 等. 荷瘤小鼠证候的发生、演变、兼证及预后[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(1): 57-62.
- FANG Z Q, HOU L, LU W L, et al. Occurrence, development, accompanying symptoms and prognosis of syndromes in tumor-bearing mice [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2007, 41(1): 57-62.
- [19] 潘志强, 方肇勤, 卢文丽. 荷瘤裸鼠证候特征的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(9): 135-138.
- PAN Z Q, FANG Z Q, LUN W L. Research of symptoms and signs in nude mice with tumour [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2008, 10(9): 135-138.
- [20] 杨会珍. 血府逐瘀汤调节慢性气滞血瘀大鼠模型的物质基础研究[D]. 北京: 中国中医科学院; 2022.
- YANG H Z. Study on the material basis of Xue-Fu-Zhu-Yu Decoction in regulating the rat model of chronic qi stagnation and blood stasis [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2022.
- [21] 张蕊, 郝春华, 孙双勇, 等. 舒脑欣滴丸对寒凝气滞血瘀证大鼠血小板聚集和血液流变学指标的影响[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 206-211.
- ZHANG R, HAO C H, SUN S Y, et al. Effects of Shunaoxin Drop Pills on platelet aggregation and hemorheology in rats with cold qi stagnation of blood stasis syndrome [J]. Drugs Clin, 2020, 35(2): 206-211.
- [22] 杨艳艳. 凝血四项指标检测对肝硬化患者的临床价值[J]. 实用检验医师杂志, 2023, 15(4): 426-429.
- YANG Y Y. Clinical value of coagulation four items testing in patients with cirrhosis [J]. Chin J Clin Pathol, 2023, 15(4): 426-429.
- [23] 郭占元, 宋铜庆, 孙燕. PT、APTT、TT 的参考值范围调查及临床作用[J]. 实用临床医学, 2001, 2(2): 94.
- GUO Z Y, SONG T Q, SUN Y. Investigation on reference value range of PT, APTT and TT and its clinical function [J]. Pract Clin Med, 2001, 2(2): 94.

[24] 张文丽, 高秋菊, 宗朋, 等. 血小板参数和凝血四项在肝硬化患者中的应用价值 [J]. 标记免疫分析与临床, 2023, 30 (9): 1495-1499.
ZHANG W L, GAO Q J, ZONG P, et al. The practical value of platelet parameters and coagulation in patients with cirrhosis [J]. Labeled Immunoass Clin Med, 2023, 30(9): 1495-1499.

[25] 燕启田. D-二聚体、纤维蛋白原水平与肝癌根治术后患者预后的相关性 [J]. 中国民康医学, 2023, 35(17): 127-129.
YAN Q T. Correlations among D-dimer and fibrinogen levels and prognosis of patients after radical resection of liver cancer [J]. Med J Chin People's Health, 2023, 35(17): 127-129.

[26] 张彦清, 任伟娟, 陈霏, 等. 凝血 4 项指标诊断乙型肝炎相关肝癌的检验价值 [J]. 贵州医药, 2022, 46(4): 635-636.
ZHANG Y Q, REN W J, CHEN F, et al. Diagnostic value of four indexes of coagulation in hepatitis B-related liver cancer [J]. Guizhou Med J, 2022, 46(4): 635-636.

[27] 阳国彬. 基于数据挖掘的原发性肝癌辨治规律研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学; 2019.
YANG G B. Study on diagnosis and treatment rule of primary liver cancer based on data mining [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine; 2019.

[28] 胡潘宜, 钱叶本. 术前纤维蛋白原和全身炎症反应指数与可切除肝细胞癌的临床病理特征及预后的关系 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2022, 38(5): 599-603, 606.
HU P Y, QIAN Y B. Relationship between preoperative fibrinogen and systemic inflammatory response index and clinicopathological features and prognosis of resectable hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Clin Exp Pathol, 2022, 38 (5): 599-603, 606.

[29] 史青苗, 薛晨, 何玉婷, 等. 肝细胞肝癌患者血浆纤维蛋白原、D-二聚体改变的临床意义 [J]. 河南医学研究, 2018, 27 (23): 4232-4234.
SHI Q M, XUE C, HE Y T, et al. The clinical significance of changes of plasma fibrinogen and D-dimer in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Henan Med Res, 2018, 27(23): 4232-4234.

[收稿日期] 2024-03-22

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

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

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

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



朱栋伟,赵琪,柏乐,等. 博来霉素诱导小鼠实验性肺纤维化方法的优化[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1515–1523.
ZHU D W, ZHAO Q, BAI L, et al. Optimized modeling of experimental lung fibrosis induced by bleomycin in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1515–1523.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.002

博来霉素诱导小鼠实验性肺纤维化方法的优化

朱栋伟^{1,2}, 赵琪^{1,2}, 柏乐^{1,2}, 潘婷钰^{1,2}, 王晶¹, 魏云¹, 王志超¹, 徐泳^{3*}, 周贤梅^{1*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023; 3. 南京中医药大学中医学院, 南京 210023)

【摘要】 目的 比较腰穿针气管内滴注及气溶胶气管内雾化两种不同方式, 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的影响, 以便探索出更佳的造模方法。**方法** 将 72 只 C57BL/6J 小鼠按体重随机分为空白对照组、腰穿针模型组和气溶胶模型组, 每组 24 只。空白对照组气管内滴注生理盐水, 腰穿针模型组使用腰穿针气管内滴注博来霉素, 气溶胶模型组使用肺部雾化给药装置气管内雾化吸入博来霉素; 分别于造模后第 14 和 21 天检测小鼠的肺部影像学病变、组织病理学改变、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)、I 型胶原(collogen I, COL I)表达水平和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达量, 以评价各组小鼠肺纤维化程度。**结果** 与空白对照组相比, 腰穿针模型组和气溶胶模型组小鼠均精神萎靡、扎堆喜卧。与空白对照组相比, 腰穿针模型组和气溶胶模型组在 14 和 21 d, 小鼠体重均显著下降($P < 0.001$)。Micro-CT 扫描结果显示腰穿针模型组白色阴影围绕在气管周围, 而气溶胶模型组白色阴影则分布更为弥散。肺组织肺炎及肺纤维化程度均以气溶胶模型组最高, 且以 21 d 更为显著。腰穿针模型组和气溶胶模型组造模后 14 和 21 d 羟脯氨酸含量均显著升高($P < 0.05$), 且 21 d 羟脯氨酸的增加更显著、更稳定($P < 0.001$)。腰穿针模型组和气溶胶模型组造模 21 d 后 COL I 的表达均显著增加, 且以气溶胶模型组更为显著($P < 0.001$)。 α -SMA 蛋白检测结果显示, 腰穿针模型组和气溶胶模型组造模 21 d 后肺组织中 α -SMA 的蛋白表达量较空白对照组均明显升高($P < 0.001$), 但两组间无显著性差异。**结论** 综合多种因素, 气溶胶气管内雾化法可以作为肺纤维化模型构建的优选方案。

【关键词】 造模方法; 肺纤维化; 博来霉素; 动物模型; 气管内雾化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1515-09

Optimized modeling of experimental lung fibrosis induced by bleomycin in mice

ZHU Dongwei^{1,2}, ZHAO Qi^{1,2}, BAI Le^{1,2}, PAN Tingyu^{1,2}, WANG Jing¹,
WEI Yun¹, WANG Zhichao¹, XU Yong^{3*}, ZHOU Xianmei^{1*}

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. the First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese medicine, Nanjing 210023, China;
3. School of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Corresponding author: ZHOU Xianmei. E-mail: zhouxianmeijs@aliyun.com; XU Yong. E-mail: njzyyxuyong@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82074358), 国家自然科学基金青年项目(82405312), 江苏省自然科学基金项目(BK20240731), 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX23_0783)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82074358), Youth Fund of the National Natural Science Foundation (82405312), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20240731), Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX23_0783).

【作者简介】 朱栋伟, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗呼吸系统疾病。Email: zdongwei777@163.com

【通信作者】 周贤梅, 女, 教授, 研究方向: 中西医结合治疗呼吸系统疾病。Email: zhouxianmeijs@aliyun.com;

徐泳, 男, 讲师, 研究方向: 中西医结合治疗呼吸系统疾病。Email: njzyyxuyong@163.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To compare the effects of intratracheal instillation by lumbar spinal needle and intratracheal atomization on bleomycin-induced pulmonary fibrosis modeling in mice, to determine the optimal modeling method. **Methods** Seventy-two C57BL/6J mice were divided randomly into control, lumbar spinal needle and aerosolization groups, according to body weight ($n = 24$ mice per group). Mice in the control and lumbar spinal needle groups received intratracheal instillation of saline or bleomycin, respectively, and mice in the aerosolization group received aerosolized bleomycin intracheally by microsyringe aerosolizer. Micro-computed tomography (CT), histopathological changes, hydroxyproline (HYP) levels, Collagen I (COL I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) protein expression were examined on days 14 and 21 to evaluate the degree of pulmonary fibrosis in each group. **Results** Mice in the two model groups showed listlessness, slow responses, and decreased body weights on days 14 and 21, compared with the control group ($P < 0.001$). Micro-CT showed white shadows surrounding the trachea in the lumbar spinal needle group, while the shadows were more diffuse in the aerosol group. The degrees of alveolitis and pulmonary fibrosis were highest in the aerosolization group, with a time-dependent trend. The hydroxyproline contents were significantly increased in the two model groups on days 14 and 21 after modeling ($P < 0.05$), with the increase on day 21 being more significant and stable ($P < 0.001$). COL I expression was significantly increased in both the lumbar spinal needle group and aerosolization group on days 21 after modeling, especially in the aerosolization group ($P < 0.001$). Expression levels of α -SMA were significantly higher in the lumbar spinal needle group and aerosolization group compared with the control group on days 21 ($P < 0.001$); however, there was no significant difference between the two model groups. **Conclusions** intratracheal atomization of bleomycin is the optimal method for establishing a mouse model of pulmonary fibrosis.

[Keywords] modeling method; pulmonary fibrosis; bleomycin; animal model; intratracheal atomization

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明、慢性、不可逆性且预后不良的慢性间质性肺疾病。2009 年 1 月至 2020 年 4 月, 全球特发性肺纤维化发病率和患病率分别约为 0.09 ~ 1.30/1 万、0.33 ~ 4.51/1 万, 其中韩国最高^[1]。在美国, 新诊断为特发性肺纤维化患者的中位年龄为 62 岁, 男性占比 54%^[2]。作为特发性间质性肺炎最常见和最严重的类型, IPF 诊断后的中位生存期仅为 3 ~ 5 年^[3]。此外, 有研究表明, 约三分之一的重症 COVID-19 康复患者出现新冠后肺纤维化, 其肺功能及生活质量受到严重影响^[4]。

目前临床上由于伦理的限制, 很难获得 IPF 患者的肺组织样本。尽管尚无任何一种动物模型能够贴合人类 IPF 的所有特征, 但动物模型仍然可以部分再现 IPF 的临床影像和病理特点, 是进行基础研究的重要先决条件^[5]。因此, 建立稳定且易于操作的动物模型对于探索肺纤维化病理机制、寻求新型有效的治疗药物具有重要意义。

博来霉素 (bleomycin, BLM) 是目前公认且使用最广泛的肺纤维化诱导药物, 其诱导的模型能够体现出肺纤维化患者的典型体征和症状, 且可重复性高、易于操作^[6]。本课题组前期经过反复的比较和研究, 发现腰穿针气管插管造模法是最佳的肺纤维化造模方法^[7]。然而, 腰穿针的进针深度难以控

制, 过短则易引起 BLM 的回流, 过长则容易损伤气管, 增加小鼠的死亡率, 这会引起模型构建的不稳定性。而且, 病理学结果显示腰穿针气管插管造模法获得的病灶分布欠均匀、程度不一, 以气管和支气管周围为主^[7], 不能准确模拟临床特发性肺纤维化病变弥漫性分布的特点。近年来新型肺部液体雾化给药装置的研发, 为药物经口气管灌注提供了更优的方案, 其可以输送定量的气溶胶到小鼠气管内, 提供较好的药物分布^[8]。本研究将构建一种气溶胶气管内雾化的给药方式, 并将其与腰穿针气管内滴注法进行比较。另外, 对于 BLM 给药后小鼠模型制备周期的问题, 之前的诸多基础研究也各不相同^[9-11], 这会增加研究结果的偏倚。因此, 为了优化肺纤维化的建模方法, 本实验研究了博来霉素的两种给药方法和两个周期, 以期提供更稳定且更快捷的造模方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 (6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 22 g, 购自浙江省杭州医学院【SCXK (浙) 2019-0002】), 饲养于南京中医药大学动物实验中心的 SPF 级啮齿动物设施中【SYXK (苏) 2023-

0077】，环境温度 20 ~ 22 ℃，相对湿度 40% ~ 70%，12 h 明暗交替，自由获取食物和水，适应性饲养 1 周后进行动物实验。所有动物实验程序均经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准后进行（IACUC-202303A084）。

1.1.2 主要试剂与仪器

硫酸博来霉素（TCI, B3972-50MG），PBS 溶液（Servicebio, G4202），4% 多聚甲醛（Biosharp, BL539A），75% 无水乙醇（Macklin, E809056），异氟烷（瑞沃德, R510），羟脯氨酸（hydroxyproline, HYP）试剂盒（南京建成生物工程研究所, A030-2-1），BCA 蛋白定量检测试剂盒（Thermo, 23227），蛋白酶抑制剂（Beyotime, ST506），磷酸酶抑制剂（Biosharp, BL615A），SWE 快速高分辨电泳缓冲液（Servicebio, G2081），快速转膜液（NCM Biotech, WB4600）， α -平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA）（Proteintech, 14395-1-AP）， β -微管蛋白（ β -Tublin）（ImmunoWay, YM3030）。

肺部雾化给药装置（YuYan, YAN30012, 中国），7 号腰穿针（Qionghua, 中国），小型手电筒（掌坤, 中国），小动物麻醉机（YuYan, ABS-4, 中国），小鼠气管插管平台（YuYan, 中国），INFINITE 200 PRO 型多功能酶标仪（Teacan, 瑞士），Quantum GX Micro-CT 型小动物活体 CT 影像系统（PerkinElmer, 美国）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组以及模型制备

将 72 只小鼠打耳标编号，适应性饲养 1 周后，按体重随机分为空白对照组、腰穿针模型组和气溶胶模型组，每组 24 只。空白对照组气管内滴注生理

盐水，腰穿针模型组的操作步骤参照课题组前期探索出的方法^[7]，气溶胶模型组采用以下阐述的具体方法进行肺纤维化模型构建。记录小鼠的一般情况、体重变化以及存活率。造模后 14 和 21 d 每组进行 Micro-CT 扫描后处死小鼠，取出一叶肺组织置于多聚甲醛中固定，其余肺组织置于液氮中速冻，后-80 ℃保存。造模后 14 d 小鼠肺组织进行苏木素-伊红（HE）染色、Masson 染色以及 HYP 水平检测。21 d 小鼠肺组织进行 HE 染色、Masson 染色、HYP 水平、免疫组化测定 I 型胶原（collogen I，COL I）以及 α -SMA 蛋白表达量检测。

1.2.2 气溶胶气管内雾化造模方法

将小鼠放入小动物麻醉机中进行异氟烷吸入性麻醉，待小鼠麻醉后将其置于气管插管平台上，呈 45°仰卧正位。麻醉程度的判断：小鼠整个身体开始呈规则的胸腹式呼吸，瞳孔稍扩大、对光反射迟钝，无口腔反射。体位摆好后，主操人员用眼科镊子夹住小鼠舌尖后向外一侧拉出，助手用小型手电筒垂直照射小鼠颈部，同时拉直尾巴避免气管弯曲。然后主操人员通过气溶胶雾化喷射头紧贴小鼠舌根中央同时上压，在光源下找到会厌部不断开合的声门，待声门打开时将喷射头准确插入气管中，随后助手快速推进高压注射器使得 BLM 雾化喷入气管中（5 mg/kg 的剂量溶于 75 μ L 生理盐水中），给药结束后停留 1 ~ 2 s 再缓慢退出喷射头，此雾化过程在 12 s 内进行（见图 1）。之后助手将小鼠立起保持直立姿势，并水平前后左右轻轻摇晃数次，后放置于垫料上，使其呈头高脚低位。待小鼠自然苏醒后，将其归笼。

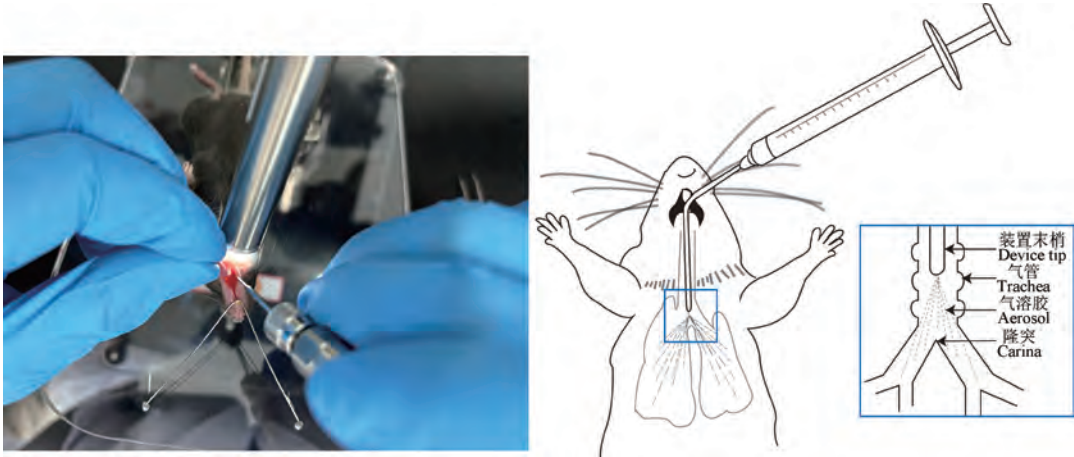


图 1 气溶胶气管内雾化操作示意图和机制图
Figure 1 Schematic and mechanism diagrams of intratracheal atomization

1.2.3 体重、存活率的测量

在整个实验过程中,每天记录小鼠的死亡率,每 3 d 对所有小鼠的体重进行一次测量并记录。

1.2.4 肺部影像学观察

每只小鼠在气麻机中吸入异氟烷麻醉后,将其放入 Micro-CT 仪器中,设置参数:电压 90 kV,电流 88 μ A,调整视野后开始扫描,从而观察小鼠肺部影像学病变。

1.2.5 肺组织病理学分析

将右中肺固定在多聚甲醛中 24 h,用乙醇脱水,使用石蜡包埋固定好的肺组织,降温冷冻后使用石蜡切片机制成 3 ~ 5 μ m 的切片,进行 HE 染色以及 Masson 染色,光学显微镜下观察肺泡炎症及肺组织纤维化程度。

1.2.6 肺组织 HYP 含量检测

取出冻存的肺组织,匀浆,按照南京建成试剂盒说明书的步骤操作,检测 HYP 的含量。

1.2.7 免疫组化法观察肺组织 COL I 表达

将制备好的肺组织蜡块进行切片,然后脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、细胞核复染、脱水封片,最后进行封片拍照,以观察肺组织 COL I 表达。

1.2.8 Western Blot 检测肺组织中 α -SMA 蛋白表达水平

肺组织称重后加入蛋白裂解液(RIPA:PMSF = 100:1),利用匀浆机充分研磨,超声后冰上静置 30 min,然后 13 000 r/min 离心 30 min,收集上清。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度以及稀释变性。将得到的上样蛋白样品进行凝胶电泳,随后转膜、封闭,然后与 α -SMA 抗体(1:1000)、 β -Tublin 抗体(1:5000)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,第 2 天再

与二抗孵育 1 h。最后使用 ECL 在蛋白成像仪上进行可视化,并借助 Image J 1.54 软件半定量分析 α -SMA 蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

实验相关数据采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计处理,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行正态性检验和方差齐性检验。符合正态分布且方差齐性的数据采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

2.1.1 生存状况

空白对照组小鼠毛发浓密,皮毛光滑鲜亮,动作敏捷、反应迅速,饮食正常,精神状态正常。BLM 气管灌注后,腰穿针模型组和气溶胶模型组小鼠毛色晦暗,毛发疏松,精神萎靡,行动迟缓、乏力懒动,喜扎堆蜷卧,进食量减少。

2.1.2 体重变化

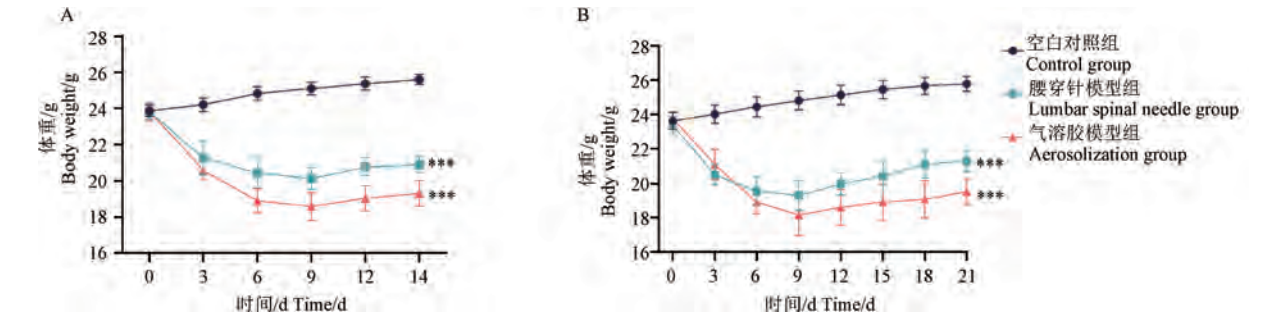
与空白对照组相比,腰穿针模型组和气溶胶模型组在 14 和 21 d,小鼠体重均明显下降,差异具有显著性($P < 0.001$),见图 2。

2.2 存活率

空白对照组小鼠无死亡。腰穿针模型组小鼠 14 和 21 d 存活率均为 66.6%;气溶胶模型组小鼠 14 d 存活率为 83.3%,21 d 存活率为 75%,见图 3。

2.3 Micro-CT 影像学

小鼠 Micro-CT 结果显示,与空白对照组相比,腰穿针模型组和气溶胶模型组肺组织中黑色阴影均减少,而白色阴影均显著增多,提示两组肺纤维

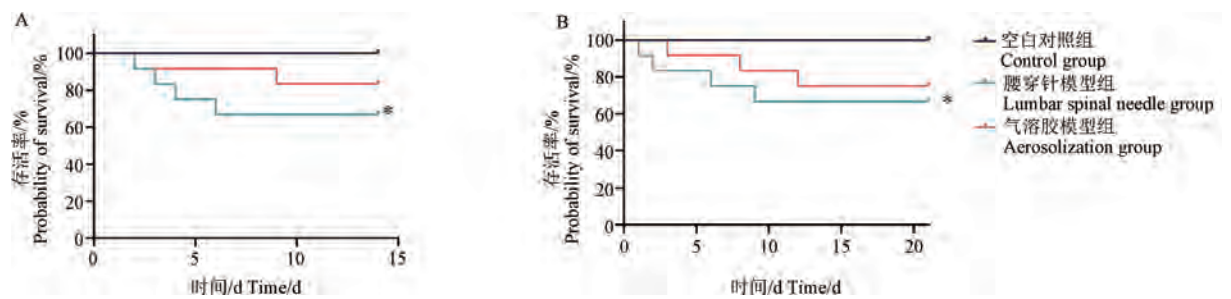


注:A:造模后 14 d 各组小鼠的体重变化;B:造模后 21 d 各组小鼠的体重变化;与空白对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 小鼠体重变化情况

Note. A. Body weight changes of mice in each group after modelling for 14 d. B. Body weight changes of mice in each group after modelling for 21 d. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Body weight changes of mice



注:A:造模后 14 d 各组小鼠的存活率;B:造模后 21 d 各组小鼠的存活率;与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 造模后 14 和 21 d 各组小鼠的存活率

Note. A. Survival rate of mice in each group after modelling for 14 d. B. Survival rate of mice in each group after modelling for 21 d. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Survival rate of mice in each group after modelling for 14 and 21 d

化模型均构建成功。第 14 和 21 天,气溶胶模型组的白色阴影面积均明显大于腰穿针模型组。而且,腰穿针模型组白色阴影围绕在气管周围,而气溶胶模型组白色阴影则分布更为弥散(见图 4)。

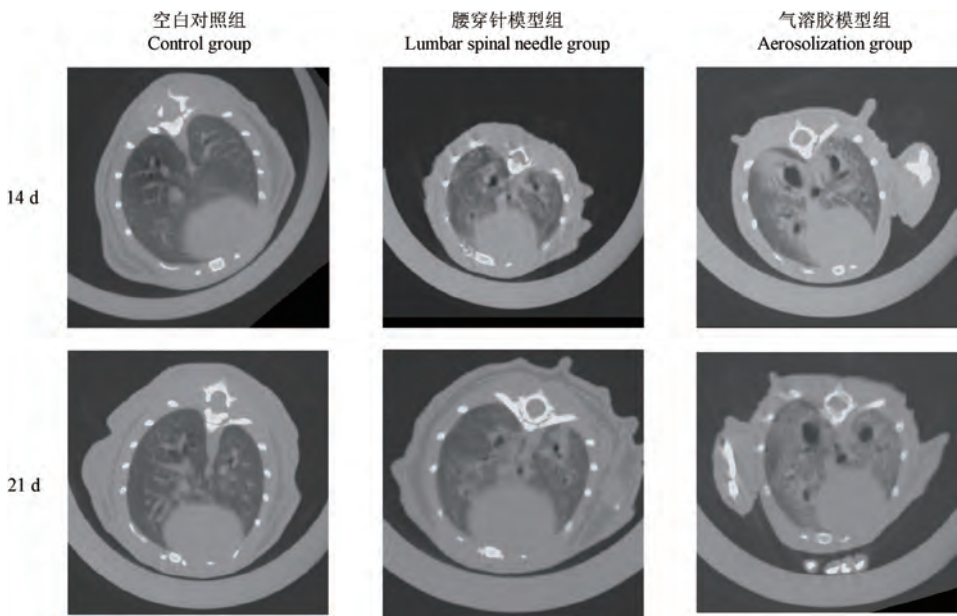


图 4 造模后第 14 和 21 天各组小鼠的 Micro-CT 影像

Figure 4 Micro-CT images of mice in each group on day 14 and 21 after modelling

2.4 组织病理学

HE 和 Masson 染色结果显示,空白对照组小鼠肺泡结构正常,肺泡间隔纤细,无明显淋巴细胞浸润,无明显蓝色纤维组织增生。两个模型组均出现肺纤维化的典型病理特征,包括不同程度的炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,肺泡腔增大,肺泡结构紊乱甚至消失,肺泡上皮非典型增生,间质组织中胶原蛋白的过度沉积。其中气溶胶模型组造模后第 21 天的炎症和胶原增殖程度最为严重。对于腰穿针模型组,造模后第 21 天病理特征更明显,病灶分布欠均匀,主要集中在气管附近,向边缘扩散。对于气溶胶模型组,造模后第 21 天病理特征更明显,可见

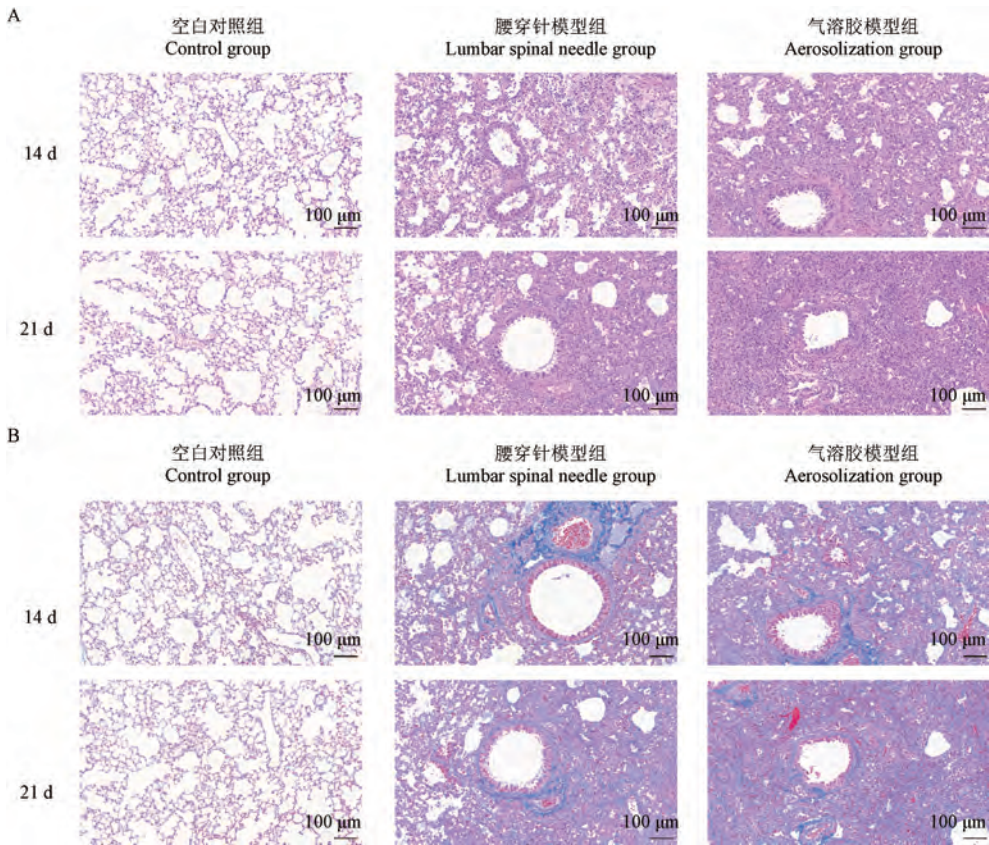
大片的淋巴细胞浸润和蓝色纤维组织增生,且分布比腰穿针模型组更为弥散而均匀,但仍以气管周围最为显著(见图 5)。

2.5 HYP 水平表达

通过碱水法检测肺组织 HYP 水平,发现 14 和 21 d 后,腰穿针模型组和气溶胶模型组 HYP 含量均显著升高($P < 0.05$)。与第 14 天相比,第 21 天两组模型组 HYP 浓度的增加更显著、更稳定($P < 0.001$)(见图 6)。

2.6 免疫组化

胶原蛋白的过度沉积是评价肺纤维化模型的重要证据^[12]。选取 3 组气管内灌注后第 21 天的肺

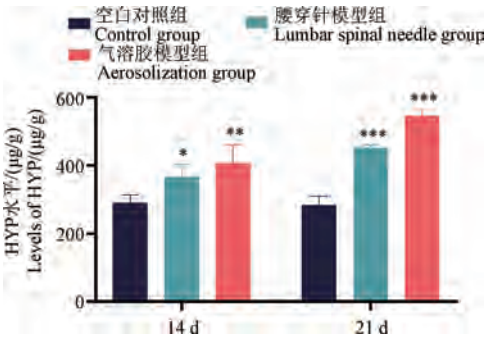


注:A;HE 染色;B;Masson 染色。

图 5 造模后 14 和 21 d 小鼠肺组织的病理变化

Note. A. HE staining. B. Masson staining.

Figure 5 Pathological changes in lung tissue of mice on day 14 and 21 after modelling



注:与空白对照组相比,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 6 各组小鼠肺组织中 HYP 水平($n = 3$)

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

Figure 6 Levels of HYP inlung tissue of mice in each group ($n = 3$)

组织进行 COL I 免疫组化检测。结果显示,与空白对照组相比,腰穿针模型组和气溶胶模型组小鼠肺组织种阳性区域明显增多,说明 COL I 的表达显著增加(见图 7)。而且,COL I 以气溶胶模型组更为显著($P < 0.001$)。

2.7 肺组织 α -SMA 蛋白表达量

选取气管内给药后第 21 天的肺组织进行 α -SMA 蛋白表达量检测。与空白对照组相比,两组模型组小鼠肺组织中 α -SMA 的蛋白表达量明显升高,差异具有显著性($P < 0.001$)。两组模型组之间差异无显著性(见图 8)。

3 讨论

博来霉素是一种由轮枝链霉菌产生的毒素,临床上主要用于治疗多种肿瘤性疾病^[13]。这种物质具有可能致命的肺部副作用,会反复刺激肺间质性炎症,进而诱发严重的肺纤维化^[14]。1978 年,HOLoyE 等^[15]对死于博来霉素的患者肺组织切片进行电镜观察,镜下显示,肺组织中 I 型肺泡上皮细胞减少、II 型肺泡上皮细胞增殖、嗜酸性粒细胞浸润、大量胶原沉积、间质水肿、胸膜纤维化等,这与以往临床发现的 IPF 病变相似。博来霉素诱导的动物肺纤维化模型与人类肺纤维化具有最相似的组织病理学变化^[16],因此成为了目前肺纤维化基础研究最流行的方法。

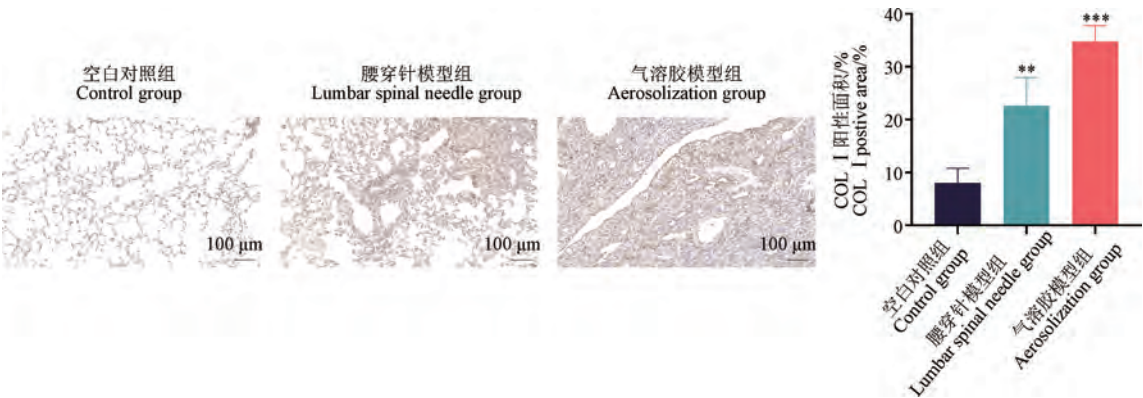


图 7 造模后 21 d 各组小鼠肺组织中 COL I 蛋白水平($n = 3$)

Figure 7 Levels of COL I proteins in lung tissue of mice on day 21 after modelling($n = 3$)

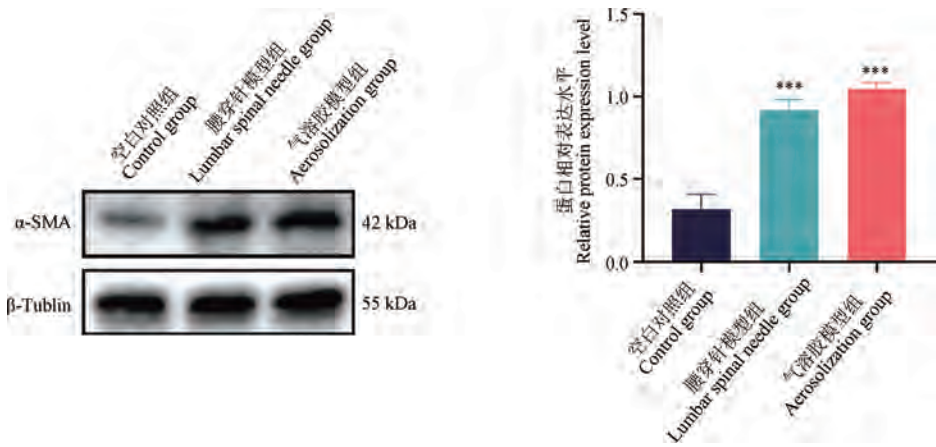


图 8 各组小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白表达水平($n = 3$)

Figure 8 α-SMA protein expression levels in lung tissue of mice in each group($n = 3$)

快捷稳定的动物模型是探索肺纤维化发病机制的重要基础,为进一步研究新型有效的治疗药物并实现成果向临床转化提供了重要前提。BLM 可以通过腹膜内、尾静脉、气管内注入、经鼻滴注等方式诱导肺纤维化模型^[17]。目前基础研究中应用最广泛的造模方法是经口咽部无创气管内滴注,然而具体的气管给药途径及周期参差不齐^[18-20]。因此,寻找稳定高效的肺纤维化造模方法至关重要。本课题组前期经反复探索发现,腰穿针气管插管法是 3 种气管内给药法中的最佳造模途径,然而其进针深度难以控制,且滴注范围局限,病灶集中于肺门和气管周围^[7]。近年来本课题组通过进一步多次实验发现,新型肺部雾化给药装置可能具有更优、更稳定的造模效果,且熟练后操作较腰穿针更为简单快捷。因此,本实验首次将这两种建模方法进行比较。

实验结果可见,气溶胶气管内雾化给药 21 d 获得的小鼠肺纤维化模型的组织损伤与纤维化程度

最高,且分布较腰穿针模型组更为弥散、更为均匀。首先,HE 染色显示气溶胶模型组 21 d 的小鼠肺泡炎症水平最高;Masson 染色显示气溶胶模型组小鼠 21 d 的胶原沉积面积最广。重要的是,病理结果可见,气溶胶模型组小鼠 21 d 的病灶分布更为广泛而均匀,而腰穿针模型组的病灶则集中在气管和支气管周围。其次,在存活率方面,气溶胶模型组的存活率要高于腰穿针模型组。紧接着,通过 HYP 检测,发现与 BLM 给药后 14 d 相比,第 21 天 HYP 浓度的增加更显著、更稳定,这表明 BLM 诱导的模型在第 21 天时具有更稳定的纤维化表型。因此,本研究选取 3 组造模后 21 d 的肺组织进行 COL I 免疫组化和 α-SMA 蛋白表达量检测。免疫组化结果显示造模后第 21 天,气溶胶模型组具有更高水平的胶原表达。α-SMA 是成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的标志物^[21]。Western Blot 结果显示,腰穿针模型组和气溶胶模型组造模后 21 d 的小鼠肺组织中 α-SMA 蛋白表达量均上升,但两组之间无显著性差

异。综合各种因素,气溶胶气管雾化法是优于腰穿针气管插管法的建模方法,且 21 d 是较稳定的造模周期。

值得一提的是,研究人员在反复的建模实验中总结了一些观点:(1)肺纤维化造模成功的小鼠当场大多会有呛咳、鼻孔冒泡等表现;其体重主要会在前 6 d 急剧下降,多降至 20 g 左右甚至 20 g 以下,且存在毛发竖立起、反应迟钝等体征;(2)气管内单次给药后 21 d 左右可能是肺纤维化最严重的时段,随后纤维化具有一定自限性;(3)气溶胶气管雾化法和腰穿针气管插管法均属于经口咽部无创气管内给药法,对操作者技术均有一定要求,最大的难点在于操作者能否在光源下看到声门并掌握时机准确从声门插入气管。为方便操作者能够清楚看到声门,掌握好小鼠的麻醉深度则很重要。麻醉深度过浅,则来不及进针操作,且不易看到声门的位置;麻醉深度过深,则小鼠容易死亡。具体操作过程中,当观察到小鼠整个身体开始呈规则的胸腹式呼吸、瞳孔对光反射迟钝时,这种程度下的麻醉则可以便于操作者清晰地看到一张一合的声门;(4)腰穿针针体坚硬、进针深度难以掌握,针身进入过长则容易损伤气管,且整体操作时间较长,这会增加小鼠的死亡率;而肺部雾化给药装置喷射头顶端圆滑的设计,可保证其安全、温和地插入气管内,且进针深度基本固定,一般使针身弯曲的前端部分全部进入小鼠口中即可。另外,肺部雾化给药装置呈手持式一体设计,插入气管后即可快速给药,整体操作时间较短。故气溶胶气管雾化法小鼠存活率高于腰穿针气管插管法;(5)气溶胶气管雾化法和腰穿针气管插管法虽同为经口无创气管给药,但气溶胶雾化给药优势明显。肺部雾化给药装置能够深入气管的同时,以气溶胶的方式将药物温和均匀的喷洒进各个支气管内,并可到达外周肺组织,病变范围显然比腰穿针局部气管滴注法要更为弥散。

研究人员还总结了一些关于肺部雾化给药装置的操作经验:(1)用于肺部雾化的 BLM 剂量和体积一般要根据小鼠的体重和 BLM 的纯度来决定,这需要操作者在预实验中摸索好,以便正式造模后呈现出较稳定的纤维化病变以及较低的死亡率;(2)小鼠麻醉后需使其呈倾斜仰卧位,这可以使得药液充分进入气管内;(3)使用给药装置前,应用药液润洗针体内部 2 ~ 3 次,以减少误差。给药装置推进

时应该迅速果断,否则药物喷洒范围较局限。装置推进完后针头往往会残留一滴药液,因此最后需在气管内停留 1 ~ 2 s;(4)药液雾化完毕后抓取小鼠使其呈直立姿势,并水平前后左右轻轻摇晃,以助 BLM 更均匀分布在气管内,同时避免药液堵塞气道;(5)使用完后针头应及时用 75%乙醇超声清洗,以防下次使用时出现堵针情况。

综上,相对于腰穿针气管插管法,气溶胶气管雾化法构建的模型具有病灶分布更为弥散而均匀、纤维化程度更高、存活率更高等优势,是更为适用于博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型建立的选择。

参 考 文 献(References)

- [1] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 197.
- [2] MORTIMER K M, BARTELS D B, HARTMANN N, et al. Characterizing health outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis using US health claims data [J]. *Respiration*, 2020, 99(2): 108-118.
- [3] SHAPANIS A, JONES M G, SCHOFIELD J, et al. Topological data analysis identifies molecular phenotypes of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2023, 78(7): 682-689.
- [4] MCGRODER C F, SALVATORE M M, D'SOUZA B M, et al. Improved pulmonary function and exercise tolerance despite persistent pulmonary fibrosis over 1 year after severe COVID-19 infection [J]. *Thorax*, 2024, 79(5): 472-475.
- [5] YE X, ZHANG M, GU H, et al. Animal models of acute exacerbation of pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 296.
- [6] GUL A, YANG F, XIE C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1): 91.
- [7] 王志超, 冯凡超, 武琦, 等. 三种方法气管灌注博来霉素诱导小鼠肺纤维化的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 51-57.
WANG Z C, FENG F C, WU Q, et al. Comparison of three methods to establish a mouse model of pulmonary fibrosis induced by intratracheal instillation of bleomycin [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(5): 51-57.
- [8] ABIDI A, BAHRI S, BEN KHAMSA S, et al. A comparative study of intratracheal and aerosolization instillations of bleomycin inducing experimental lung fibrosis in rat [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29(2): 75-85.
- [9] LI J, LI K, TIAN Y, et al. Effective-compounds of Jinshui Huanxian formula ameliorates fibroblast activation in pulmonary fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154604.
- [10] DENG L, OUYANG B, SHI H, et al. Icariside II attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating macrophage

polarization [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116810.

[11] EZZ ELDEEN N, MOUSTAFA Y M, ALWAILI M A, et al. Synergistic power of piceatannol and/or vitamin D in bleomycin-induced pulmonary fibrosis *in vivo*: a preliminary study [J]. Biomedicines, 2023, 11(10): 2647.

[12] LI R F, CHEN X Y, XU Y, et al. Inhibitory effects of alkaline extract from the pericarp of *Citrus reticulata* Blanco on collagen behavior in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113761.

[13] 王搏, 宋庆华, 唐会猛, 等. 博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1617-1628.

WANG B, SONG Q H, TANG H M, et al. Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1617-1628.

[14] 燕苗苗, 赵亚昆, 王搏, 等. 博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 179-186.

YAN M M, ZHAO Y K, WANG B, et al. Comparison and evaluation of different doses of bleomycin? induced pulmonary fibrosis models in mice and rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 179-186.

[15] HOLOYE P Y, LUNA M A, MACKAY B, et al. Bleomycin hypersensitivity pneumonitis [J]. Ann Intern Med, 1978, 88(1): 47-49.

[16] YANG X, HUANG X J, CHEN Z, et al. A novel quantification method of lung fibrosis based on Micro-CT images developed with the optimized pulmonary fibrosis mice model induced by bleomycin [J]. Heliyon, 2023, 9(3): e13598.

[17] 李智慧, 余学庆, 杨曙光, 等. 特发性肺纤维化实验模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 118-127.

LI Z H, YU X Q, YANG S G, et al. Research progress on experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 118-127.

[18] WU Z, SHI R, YAN S, et al. Integrating network pharmacology, experimental validation and molecular docking to reveal the alleviation of Yinhuang granule on idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155368.

[19] LI X, WANG Y, LIANG J, et al. Bergenin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting TGF- β 1 signaling pathway [J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5808-5822.

[20] XUE Z, ZHAO F, SANG X, et al. Combination therapy of tanshinone IIA and puerarin for pulmonary fibrosis via targeting IL6-JAK2-STAT3/STAT1 signaling pathways [J]. Phytother Res, 2021, 35(10): 5883-5898.

[21] XU Y, WANG X, HAN D, et al. Revealing the mechanism of Jiegeng decoction attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via PI3K/Akt signaling pathway based on lipidomics and transcriptomics [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154207.

[收稿日期] 2024-04-09

闫华箏,高建雄,张楠,等. 一种 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠品系体内 GFP⁺ 细胞的表达特征和对白喉毒素的反应特征 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1524-1531.

YAN H Z, GAO J X, ZHANG N, et al. Expression of GFP⁺ cells and their response to diphtheria toxin in a *Lyz2* IRES DTREGFP mice strain *in vivo* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1524-1531.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.003

一种 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠品系体内 GFP⁺ 细胞的表达特征和对白喉毒素的反应特征

闫华箏^{1,2},高建雄^{1,2},张楠^{1,2},卞明明^{1,2},许瑶妹^{1,2},
张霖^{1,2},周诗雨^{1,2},方壹万^{1,2},吕合作^{1,2*}

(1. 蚌埠医科大学第一附属医院检验科,安徽 蚌埠 233004;2. 蚌埠医科大学慢性疾病免疫学基础与临床安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233030)

【摘要】 目的 观察 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠体内绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 阳性髓系细胞 (主要为单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞) 的表达特征和对白喉毒素 (diphtheria toxin receptor, DT) 反应规律。**方法** 随机选取 6 ~ 8 周龄 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠和相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠,进行腹腔注射 DT (25 ng/g),连续 3 d。分别取骨髓、外周血和脾,做成单细胞悬液,以 GFP 和 CD11b 为标志,采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测给药前后不同时间点这些组织中 GFP 阳性细胞 (GFP⁺) 占总髓系细胞 (CD11b⁺) 比例的变化规律。**结果** 外周血 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞在 DT 注射前占 CD11b⁺ 细胞的 (24.62 ± 5.655)%,注射后逐渐减少,第 3 天达到最低 (7.982 ± 2.729)%;脾和骨髓中其比例在 DT 注射前分别为 (13.73 ± 2.994)% 和 (65.23 ± 4.261)%,在注射后第 1 天减少最明显,分别为 (3.468 ± 0.5862)% 和 (50.98 ± 7.957)%,之后逐渐恢复。**结论** DT 可以有效地减少 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠体内单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的比例,且不同的组织的变化规律有所不同。

【关键词】 转基因鼠;白喉毒素;白喉毒素受体;耗竭实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1524-08

Expression of GFP⁺ cells and their response to diphtheria toxin in a *Lyz2* IRES DTREGFP mice strain *in vivo*

YAN Huazheng^{1,2}, GAO Jianxiong^{1,2}, ZHANG Nan^{1,2}, BIAN Mingming^{1,2},
XU Yaomei^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2}, ZHOU Shiyu^{1,2}, FANG Yiwan^{1,2}, LYU Hezuo^{1,2*}

(1. Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China;
2. Anhui Key Laboratory of Basic and Clinical Immunology of Chronic Diseases, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China)

Corresponding author: LYU Hezuo. E-mail:lh233003@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression characteristics of green fluorescent protein (GFP)-positive myeloid cells (mainly monocytes, macrophages, and neutrophils) and their pattern of response to diphtheria toxin (DT) in *Lyz2* internal ribosome entry site (IRES) DT receptor/enhanced GFP (DTREGFP) mice. **Methods** Transgenic *Lyz2* IRES DTREGFP mice (6 ~ 8 weeks old) and C57BL/6J mice with the same genetic background were selected randomly

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (82072416), 蚌埠医科大学第一附属医院高水平科技创新团队资助项目 (BYFFY2022TD001).
Funded by the National Natural Science Foundation of China (82072416), the High-Level Scientific and Technological Innovation Team Fund of the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University (BYFFY2022TD001).

【作者简介】 闫华箏,女,在读硕士研究生,研究方向:神经免疫。Email:3248633078@qq.com

【通信作者】 吕合作,男,博士,教授,硕士生导师,研究方向:神经免疫。Email:lh233003@163.com

and injected intraperitoneally with DT (25 ng/g) for 3 consecutive days. Bone marrow, peripheral blood, and spleen cells were separated and made into single-cell suspensions with GFP and CD11b as markers. Changes in the proportion of GFP⁺ cells to total myeloid cells (CD11b⁺) was detected in these tissues at different time points before and after drug administration, using flow cytometry. **Results** Peripheral blood CD11b⁺ GFP⁺ cells accounted for (24.62 ± 5.655) % of CD11b⁺ cells before DT injection, and this proportion gradually decreased after injection and reached a minimum of (7.982 ± 2.729) % on the third day. The proportions in spleen and bone marrow were (13.73 ± 2.994) % and (65.23 ± 4.261) % before DT injection, respectively, decreased most significantly on the first day after injection to (3.468 ± 0.5862) % and (50.98 ± 7.957) %, respectively, and then gradually recovered. **Conclusions** DT effectively reduced the proportions of monocytes, macrophages, and neutrophils in *Lyz2* IRES DTREGFP mice, but the pattern of change varied among tissues.

[Keywords] transgenic mouse; diphtheria toxin; diphtheria toxin receptor; depletion assay

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

髓系细胞主要包括粒细胞、单核细胞、树突状细胞、肥大细胞等,是人体先天免疫系统的主要组成成分,在不同的自身免疫性疾病的发病机制中发挥着关键的作用^[1]。在炎症、肿瘤等病理条件下,多种髓系细胞可靶向炎症微环境。例如,在心血管疾病中,髓系细胞会分泌一些相关蛋白,参与调解炎症反应、纤维化、血管内皮障碍等病理过程,在其中起到举足轻重的作用^[2-3]。在肿瘤中,癌细胞还会与髓系细胞相互作用,导致肿瘤的转移,影响 M1 型巨噬细胞的极化^[4]。由于髓系细胞在免疫微环境中扮演着重要的角色,因此了解髓系细胞在先天免疫系统中发挥的具体作用及可能的相关机制是十分必要的。

随着基因编码技术的日益成熟,转基因小鼠在科研生物领域应用已经十分广泛。利用 CRISPR/Cas9 技术,可以获得基因定点插入 IRES DTREGFP 的小鼠,作为研究某类细胞或者基因比较成熟的工具^[5]。通过将灵长类白喉毒素受体(diphtheria toxin receptor, DTR)引入特定小鼠细胞中,可以使此类细胞群对白喉毒素(diphtheria toxin, DT)敏感,并在 DT 注射时诱导这些细胞死亡,从而达到细胞的特异性耗竭^[6]。该转基因鼠就是通过基因编辑让目的细胞表达 DTR,然后通过 DT 实现细胞的选择性剔除^[7]。

在本实验中选择一种 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠。其中,由 *Lyz2* 基因编码的溶菌酶是一种蛋白质类防御因子,是动物自身的重要免疫因子^[8]。能广泛地表达于单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞,因此长期以来被用作小鼠髓系细胞的特异性标志物^[9]。也因此,本实验后续提到的髓系细胞特指单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞。该小鼠通过将 *Dtr* 基因与增强型绿色荧光蛋白(enhanced

green fluorescent protein, EGFP) 基因结合成为 DTREGFP 基因,通过同源重组的方式将 DTREGFP 插入到小鼠的 *Lyz2* 基因位点。插入 DTREGFP 基因的小鼠,能在髓系细胞上特异性地表达 DTR 和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),在连续 3 d 腹腔注射 DT 后^[10],便能与 DT 结合,特异性地减少髓系细胞,通过检测 GFP 阳性(GFP⁺)细胞的变化情况,便能够观察 DT 对目的细胞的影响。本实验旨在通过流式细胞术观察 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠体内 GFP⁺ 髓系细胞的表达特征和对 DT 的反应规律,以进一步探索髓系细胞在先天免疫系统中发挥的关键作用及相关机制,为以后的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

自上海南方模式生物科技有限公司购入 6 ~ 8 周龄 SPF 级 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠【SCXK(沪)2017-0010】,遗传背景是 C57BL/6J 小鼠。小鼠饲养于蚌埠医科大学实验动物中心【SYXK(皖)2023-009】。保持室温在 22 ~ 26 ℃,湿度在 45 ~ 65 %,保证食物及水源充足,在正常昼夜环境下饲养,体重达到 20 g 后随机选取 28 只基因鼠,雌雄各半进行分组。野生型(wild type, WT)小鼠为基因鉴定之后筛选出的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,共 8 只,雌雄各半,6 ~ 8 周龄,体重 20 g,来源及饲养环境同 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠。实验期间所有操作均经过蚌埠医科大学伦理委员会审批(2020-050)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DT(lits labs, 15047A1); Rat anti-CD11b antibody

(Invitrogen, 130-113-238); 通用组织温和酶解试剂盒 (瑞沃德, DHGT-5004); 红细胞裂解液 (ThermoFisher, 00-4300-54); DMEM 培养基 (Gibco, 612302); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (ExCell Bio, FSP500); PBS 缓冲液 (Biosharp, BL302A); 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) (Biosharp, BL539A); 10 × TBE 溶液 (biosharp, BL540A); DNA 提取试剂盒 (Vazyme, PD101-01); SuperRed/GelRed (BIOMIKY, MK002A)。

高速离心机 (Eppendorf, 德国); 单细胞悬液制备仪 (瑞沃德, 中国); 流式细胞仪 (Cyttek Biosciences, 美国); Power Pac Basic 基础电泳仪 (Bio-rad, 美国); Milli-QSynthesisA-10 纯水仪 (Millipore, 美国); 凝胶成像仪 (Bio-rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及基因型鉴定

以 C57BL/6J 为阴性对照组 (blank group), 以 Lyz2 IRES DTREGFP 基因鼠为实验组 (sham group)。实验组按照 25 ng/g 的剂量腹腔注射 DT, 连续 3 d, 每天一次。

小鼠 DNA 的提取: 取 3 周龄小鼠脚趾组织于 1.5 mL Ep 管中, 加入 200 μL 裂解液 (1 × mouse tissue lysis buffer 200 μL + proteinase K 4 μL), 使组织完全浸入裂解液中, 55 °C 水浴 20 min, 95 °C 金属浴 5 min, 灭活 proteinase K 后, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 取上清。上清液即为所提取的 DNA。

以所提 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: 2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)^a 25 μL, ddH₂O 16 μL, DNA 模板 5 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL。PCR 扩增条件: 95 °C, 5 min, 预变性, 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 重复 35 个循环, 72 °C 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 所得结果在凝胶成像系统中拍照分析。引物由上海生工生物公司合成, 引物序列如表 1。

表 1 小鼠基因型鉴定 PCR 引物设计方案及产物长度

Table 1 PCR primer design scheme and product length for mouse genotyping

工具鼠 Omnipotent	引物 Primer	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length/bp		
			野生型 C57BL/6J	杂合子 Lyz2 IRES DTREGFP ^{+/−}	纯合子 Lyz2 IRES DTREGFP ^{+/+}
Lyz2 IRES DTREGFP	P1	F:GAGCACACTGTCAAAACCGAGAT	326	326	-
	P2	R:TCCTGGCTGAAGAACTGACCTAC			
	P3	F:TTCTTCAAGGACGACGCAACTA	-	512	512
	P4	R:GAGGGGAAATCGAGGGAATGTGAC			

1.2.2 外周血制备及处理

实验开始前配制好所需试剂: SB 缓冲液 (胎牛血清与 1 × PBS 的比例为 1:19); 1 × 红细胞裂解液 (10 × RBC 裂解缓冲液与超纯水的比例为 1:9)。

用小鼠固定器固定小鼠, 用 75% 乙醇擦拭小鼠尾巴, 剪掉小鼠尾部约 1 cm 进行取血, 将采集的血液置于 EDTAK 抗凝管中, 以防血液凝结。取 50 μL 血液, 置于流式管内, 然后加入 1 mL 红细胞裂解液, 抽吸混匀, 静置 3 min。待液体透亮后放入超低温离心机中 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min。加入 SB 缓冲液, 抽吸混匀后再次 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 此过程重复 2 次, 洗去红细胞裂解液。每管中加入 50 μL 的 SB 缓冲液重悬细胞沉淀后, 加入 CD11b 抗体, 冰上避光孵育 30 min 后, 离心, 弃上清。最后加入 2% 的 PFA 固定, 置于 4 °C 避光保存, 等待上机检测。

1.2.3 骨髓细胞制备及处理

处死小鼠后, 用酒精棉球将后肢擦拭干净, 从股骨头接合处将后肢剪下。将毛发及皮肤清理干净, 然后将胫骨和股骨中的肌肉和结缔组织去除, 浸入 SB 缓冲液中清洗干净。切断股骨和胫骨的两端, 用注射器将骨髓冲洗出来, 可冲洗多次。

用 70 μm 的尼龙网过滤细胞悬液至离心管中, 进行 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 弃上清。加入红细胞裂解液, 吹打混匀, 静置 5 min, 之后再次 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min。加入 SB 缓冲液, 重悬后进行 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 洗去红细胞裂解液。加入 CD11b 抗体, 冰上避光孵育 30 min。之后每管加入 SB 缓冲液, 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min。洗去未结合的抗体。经 70 μm 尼龙网再次过滤于流式管中。最后每管内加入 2% 的 PFA 固定, 置于 4 °C 避光保存, 等待上机检测。

1.2.4 肝、肺和脾单细胞悬液的制备及处理

用 5% 的戊巴比妥钠, 按照 50 mg/kg 的剂量腹

腔注射小鼠,待小鼠完全麻醉后,固定于手术台上。剪掉胸腹部皮肤,经心脏灌注。灌注结束之后,剪下小鼠的肝、脾和肺。按照试剂盒的要求称取相应重量的组织。将小鼠组织剪碎,按照说明书加入对应体积的预混试剂,一并放入组织处理管中。将组织处理管置于单细胞悬液制备仪 DSC-400 的管套中,选择对应程序。

程序结束后,取 70 μm 尼龙网对制备好的单细胞悬液进行过滤,置于离心管中,1200 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清。加入红细胞裂解液,静置 5 min 后,加入 DMEM 终止消化,1500 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 再次离心 5 min。加入 SB 缓冲液后进行离心,将红细胞裂解液洗去。加入 CD11b 抗体,冰上避光孵育 30 min。加入 SB 缓冲液 1000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$,离心 5 min,经 70 μm 尼龙网再次过滤于 BD Falcon 流式管中。最后每管内加入 200 μL 的 2% 的 PFA 固定,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,等待上机检测。

1.3 统计学分析

运用 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用两独立样本 t 检验,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的基因鉴定结果

Lyz2 IRES DTREGFP 小鼠是在 *Lyz2* 基因终止密码子之后定点敲入 IRES DTREGFP 表达框的基因重组小鼠。通过 PCR 检测 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠的基因型,含有 DTREGFP 基因的实验组小鼠在 326 bp 和 512 bp 的位置有条带,阴性对照组仅在 326 bp 处有条带,在 512 bp 处无条带,如图 1。

2.2 小鼠肺、肝、脾、骨髓和外周血中 GFP⁺细胞所占比例

取小鼠肝、肺、脾、骨髓和外周血进行流式检测,观察 GFP 阳性细胞所占比例。如图 2 结果所示,小鼠肝、肺、脾、骨髓和外周血中均能表达 GFP 阳性细胞,其比例分别为 (3.887 $\pm$ 1.457)%、(8.223 $\pm$ 6.069)%、(21.03 $\pm$ 12.28)%、(62.87 $\pm$ 16.88)和 (40.47 $\pm$ 5.835)%,其中肺和肝中 GFP 阳性细胞所占比例最少,而外周血、骨髓和脾中所占比例较多。所以本实验后续仅针对外周血、骨髓和脾进行流式检测,进一步观察 DT 对 GFP 阳性细胞的影响。

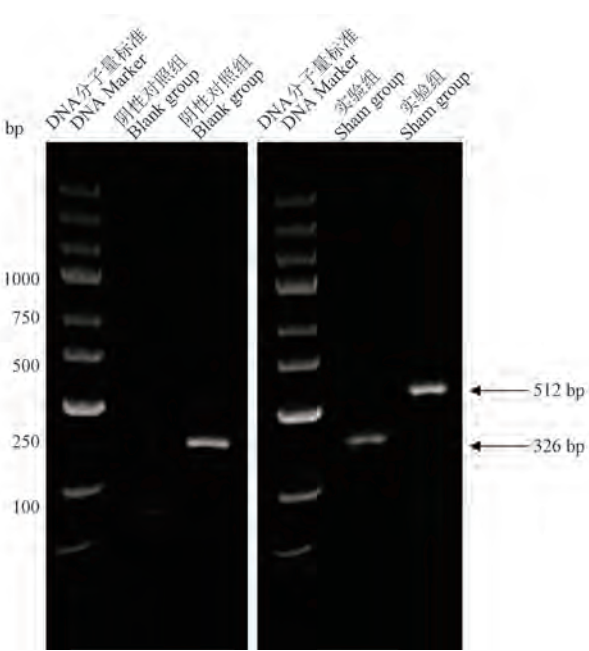


图 1 小鼠基因型 PCR 鉴定
Figure 1 Genetic identification of mice by PCR

2.3 小鼠注射 DT 后不同时间点脾中 CD11b⁺GFP⁺细胞的变化规律

流式细胞术检测实验组注射 DT 后 1、3 和 5 d 的脾组织中 CD11b⁺GFP⁺细胞的变化规律。CD11b 为单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的标志物,因此本文将 CD11b⁺GFP⁺定义为单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的标志。如图 3 所示,实验组与阴性对照组相比,脾中 CD11b⁺GFP⁺细胞的所占比为 (13.73 $\pm$ 2.994)%。并且在实验组注射 DT 后,脾中的 CD11b⁺GFP⁺细胞所占比例明显减少到 (10.27 $\pm$ 1.246)% ($P < 0.01$)。在注射 DT 后 1 d, GFP⁺ 细胞被迅速减少达到 (3.468 $\pm$ 0.5862)%,证明 DT 能成功减少 70% 左右的 CD11b⁺GFP⁺细胞,但之后细胞会逐渐开始恢复。由此结果表明,DT 能成功减少脾中 CD11b⁺GFP⁺的细胞,并且与注射 DT 前相比,在注射后 1 d 具有显著性差异($P < 0.01$)。

2.4 小鼠注射 DT 后不同时间点外周血中 CD11b⁺GFP⁺细胞的变化规律

如图 4 所示,实验组与阴性对照组相比,外周血中能成功表达 CD11b⁺GFP⁺细胞。并且在注射 DT 后,外周血中的 CD11b⁺GFP⁺细胞所占比例明显减少 (14.64 $\pm$ 1.986)%。在注射完 DT 后,CD11b⁺GFP⁺细胞开始减少 (14.27 $\pm$ 4.541)%,并且持续到注射后 3 d。在注射后 3 d 时,CD11b⁺GFP⁺细胞所

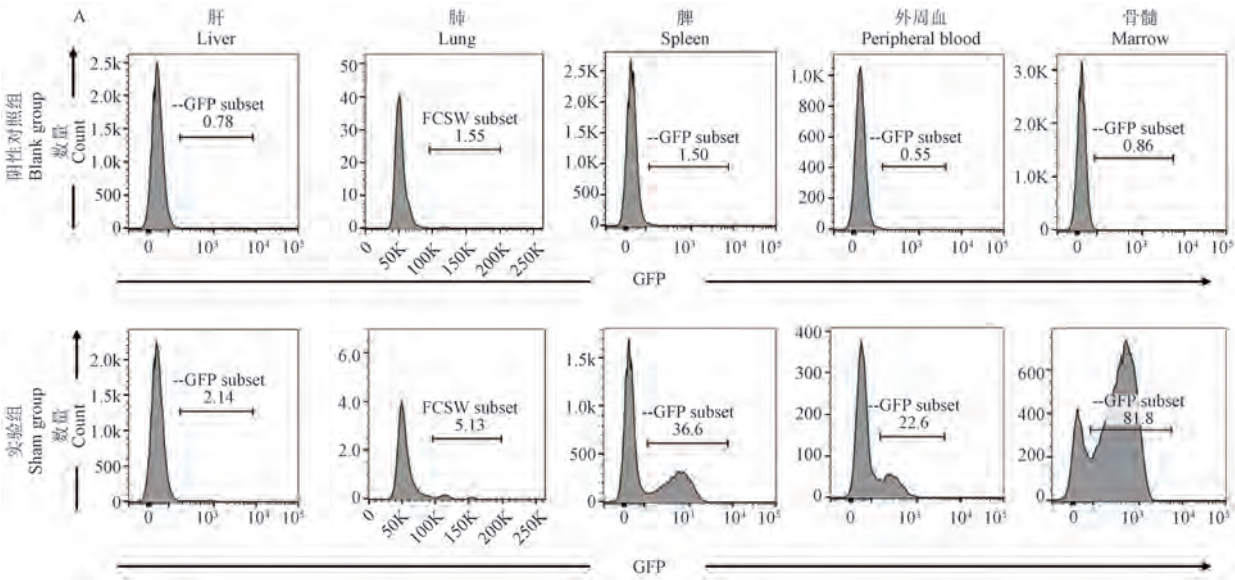
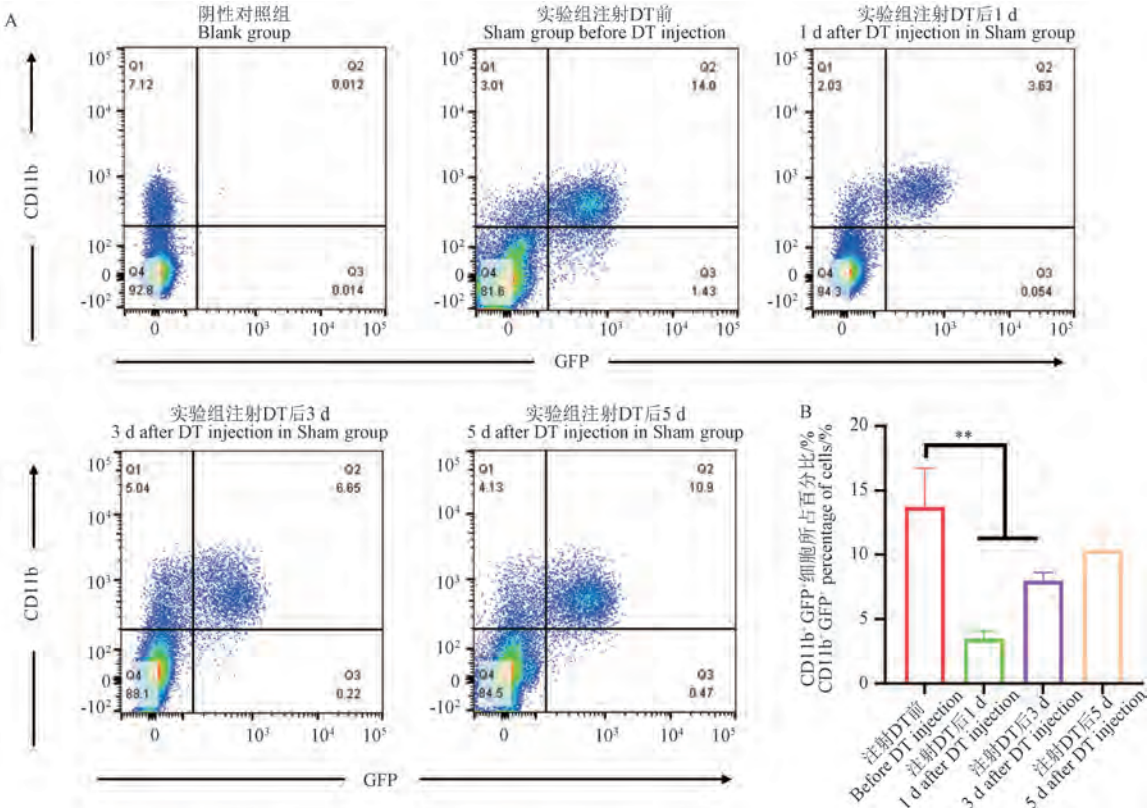


图 2 肝、肺、脾、外周血和骨髓中 GFP 阳性细胞所占比例($n = 3$)

Figure 2 Proportion of GFP⁺ cells in liver, lung, spleen, peripheral blood and marrow($n = 3$)



注:A:流式检测阴性对照组与实验组在未注射 DT 与注射 DT 后脾中 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞的代表性图片;B:实验组注射 DT 后不同时间点 CD11b⁺ GFP⁺ 统计图;与注射 DT 前相比, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 脾中 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞随时间变化的规律($n = 6$)

Note. A. Representative images of CD11b⁺ GFP⁺ cells in the spleen of blank group and sham group before and after DT injection by flow assay. B. Statistics of CD11b⁺ GFP⁺ at different time points after DT injection in sham group. Compared with before DT injection, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

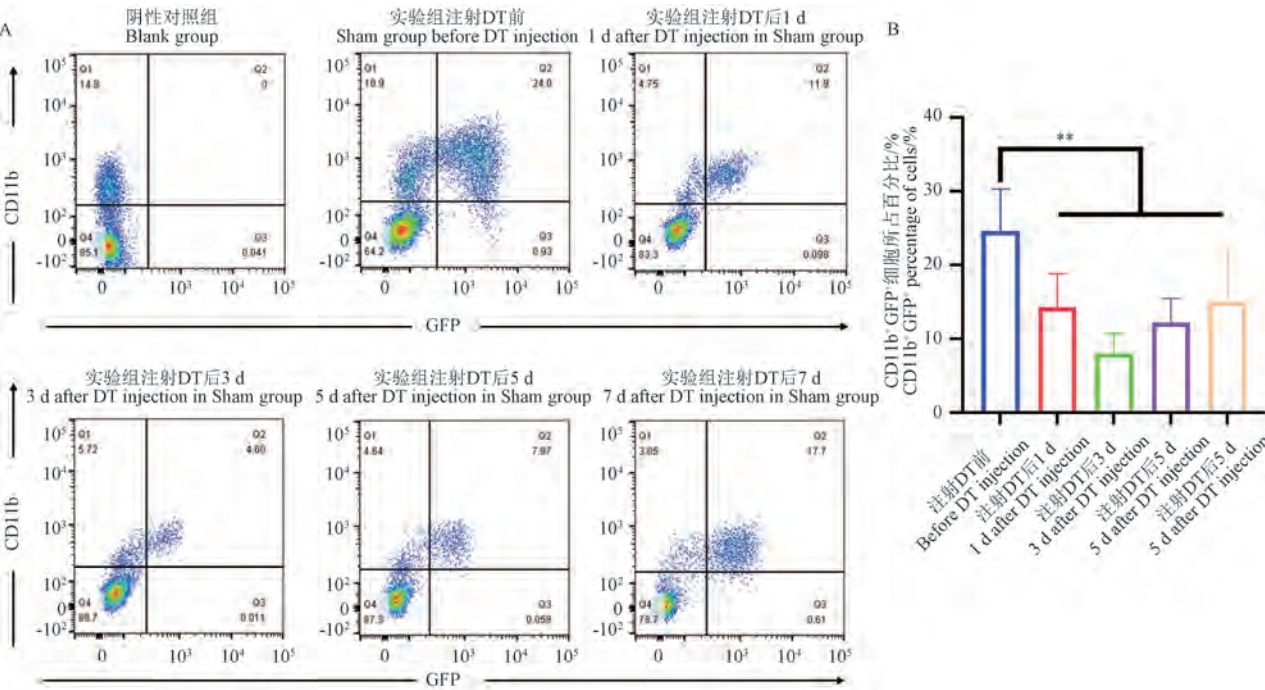
Figure 3 Pattern of CD11b⁺ GFP⁺ cells in the spleen over time($n = 6$)

占比例达到最低 (7.982 ± 2.729)%, 与注射 DT 前有显著性差异 ($P < 0.01$), 证明 DT 能成功减少外周血中 60% ~ 70% 的 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞, 之后细胞会逐渐开始恢复。由此结果表明, DT 能成功减少外周血中 CD11b⁺ GFP⁺ 的细胞, 并且在注射后 3 d 时达到最低值。

2.5 小鼠注射 DT 后不同时间点骨髓中 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞的变化规律

如图 5 所示, 实验组与阴性对照组相比, 骨髓中

能成功表达 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞; 脾中 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞的比例为 (65.23 ± 4.261)%。并且在注射 DT 后, 骨髓细胞中的 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞所占比例明显减少 (14.25 ± 3.685)%。在注射后 1 d 时, CD11b⁺ GFP⁺ 细胞被迅速减少, 最少可达到 (50.98 ± 7.957)%, 且 DT 能成功减少 20% 左右的 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞, 在此之后细胞会逐渐开始恢复。由此结果表明, DT 能成功减少骨髓中 CD11b⁺ GFP⁺ 的细胞, 并且在注射后 1 d 时达到最低值。



注: A: 流式检测阴性对照组与实验组在未注射 DT 与注射 DT 后外周血中 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞的代表图片; B: 实验组注射 DT 后不同时间点 CD11b⁺ GFP⁺ 统计图。

图 4 外周血中 CD11b⁺ GFP⁺ 细胞随时间变化的规律 ($n = 6$)

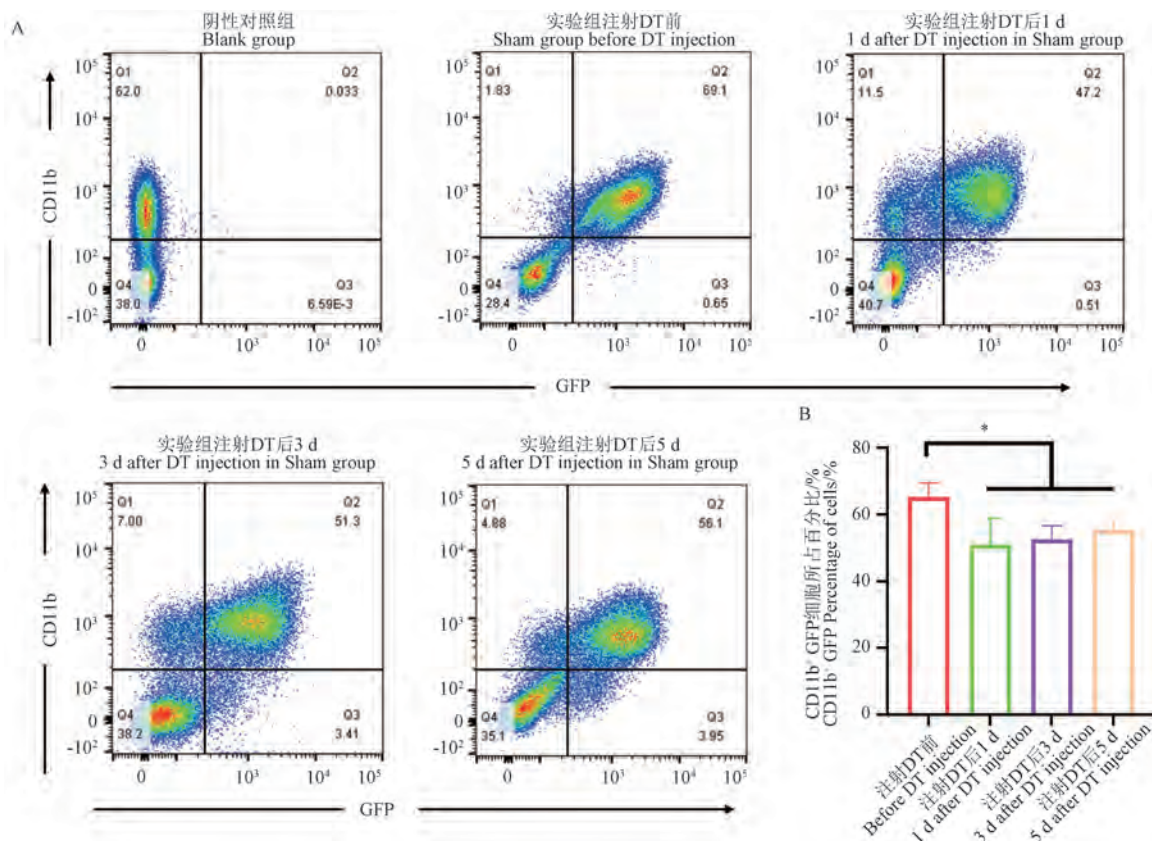
Note. A. Representative pictures of CD11b⁺ GFP⁺ cells in peripheral blood of blank group and sham group without and after DT injection by flow assay. B. Statistics of CD11b⁺ GFP⁺ at different time points after DT injection in sham group.

Figure 4 Patterns of CD11b⁺ GFP⁺ cells in peripheral blood over time ($n = 6$)

3 讨论

先天免疫系统包括一系列的细胞及其相关机制, 是抵御入侵病原体的第一道防线^[11]。在各种免疫系统疾病中, 髓系细胞发挥着重要作用。其中, 中性粒细胞在循环的白细胞中占主要比例, 也是先天免疫中最主要的细胞成分, 同时也是最先到达感染部位或受伤组织的细胞^[12]。中性粒细胞的颗粒中含有多种毒素, 可以杀死或抑制细菌、真菌的生长, 通过其独特的效应功能 (如吞噬作用和细胞外陷阱) 来对抗病原体, 执行各种效应机制来介导先

天免疫^[13-14]。巨噬细胞作为最有效率的吞噬细胞, 可以吞噬很大数量的微生物或其他细胞, 细菌物质分子与巨噬细胞表面受体的结合会触发巨噬细胞对细菌的包裹作用和杀伤作用^[15-16]。此外, 免疫细胞的存活和功能还会受到氧化还原的控制, 并且取决于活性氧/活性氮 (reactive oxygen species/reactive nitrogen species, ROS/RNS) 的细胞内和细胞外水平^[17]。因此, 免疫代谢还与氧化还原反应密不可分。在病理状态下, 髓系细胞还会分泌一些相关蛋白和细胞因子, 在急性炎症的发生、发展和消退中



注:A:流式检测阴性对照组与实验组在未注射DT与注射DT后骨髓中CD11b⁺GFP⁺细胞的代表图片;B:实验组注射DT后不同时间点CD11b⁺GFP⁺统计图;与注射DT前相比,**P* < 0.05。

图5 骨髓中CD11b⁺GFP⁺细胞随时间变化的规律(*n* = 6)

Note. A. Representative pictures of CD11b⁺ GFP⁺ cells in bone marrow of blank group and sham group without and after DT injection by flow assay. B. Statistics of CD11b⁺ GFP⁺ at different time points after DT injection in sham group. Compared with before DT injection, * *P* < 0.05.

Figure 5 Pattern of CD11b⁺ GFP⁺ cells in bone marrow over time(*n* = 6)

至关重要^[18]。例如,肿瘤浸润性髓系细胞,主要包括巨噬细胞、骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)和中性粒细胞,通过分泌多种促血管生成因子来调节肿瘤血管的生成^[19]。不仅如此,髓系细胞还在多种疾病中发挥了关键性的作用。例如,在急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)中,中性粒细胞弹性蛋白酶和M2巨噬细胞的比例会增加^[20]。在组织愈合过程中,有来自NaV1.8的感觉神经元通过髓系细胞促进组织愈合^[21]。尽管已知巨噬细胞和中性粒细胞在组织受伤或感染时会最先发生反应,但它们对某些疾病确切的发病机制仍然难以确定^[22]。因此,想要明确的获得髓系细胞在各种病理条件下发挥的具体功能,还需要对髓系细胞进行更为精确的研究。因此,本研究选择了一种新的DTR转基因小鼠品系Lyz2 IRES DTREGFP。

白喉毒素是一种由白喉杆菌释放的蛋白质,肝

素结合性表皮生长因子(heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)充当DTR,但小鼠HB-EGF前体不能有效地与DT结合。因此,小鼠细胞对DT诱导的细胞死亡表现不明显。通过将灵长类DTR引入特定小鼠细胞中,可以使此类细胞群对DT敏感,并在DT注射时诱导这些细胞死亡,从而达到细胞的特异性耗竭^[23]。该小鼠就是通过将DTR与EGFP结合后通过同源重组的方式将DTREGFP插入到小鼠的Lyz2基因位点。插入DTREGFP基因的小鼠,在髓系细胞上就能特异性的表达带有绿色荧光的DTR,在注射DT后,便能与DT结合,达到髓系细胞的特异性耗竭。

本实验结果表明,在小鼠肝、肺、脾、外周血和骨髓中存在GFP⁺细胞,并且CD11b也能成功检测到在GFP阳性细胞上表达。Lyz2 IRES DTREGFP小鼠经过DT连续3 d的腹腔注射,CD11b⁺GFP⁺细胞明显减少,并且在脾和骨髓细胞中,CD11b⁺GFP⁺

细胞在注射后 1 d 时就开始减少,随后开始恢复。在外周血中,CD11b⁺ GFP⁺细胞在注射后 3 d 时比例达到最少,之后也开始逐渐恢复,或许与 DT 的应用时间、骨髓每天能产生大量的髓系细胞以及没有完全耗竭髓系细胞有密切关系。因此,髓系细胞的连续减少需要持续低剂量的注射 DT 来维持,该结果也与之前的一些耗竭实验的结果相似^[24-25]。综上所述,白喉毒素对 *Ly2z* IRES DTREGFP 小鼠体内单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞具有一定耗竭作用,且不同的部位作用的最佳时间不同。这为之后研究髓系细胞在多个层面的功能及机制提供了良好的工具,以及对耗竭条件方面的研究提供参考依据。

参 考 文 献(References)

[1] WANG H, LIU S, ZHAN J, et al. Shaping the immune-suppressive microenvironment on tumor-associated myeloid cells through tumor-derived exosomes [J]. *Int J Cancer*, 2024, 154 (12): 2031–2042.

[2] XUE P, CHANG Z, CHEN H, et al. Macrophage membrane (MMs) camouflaged near-infrared (NIR) responsive bone defect area targeting nanocarrier delivery system (BTNDS) for rapid repair: promoting osteogenesis via phototherapy and modulating immunity [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 87.

[3] OESTERLE A, BOWMAN M A. S100A12 and the S100/calgranulins: emerging biomarkers for atherosclerosis and possibly therapeutic targets [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(12): 2496–2507.

[4] FAN X, YAN Z, LIN Y, et al. Mechanism exploration of zoledronic acid combined with PD-1 in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2024, 73(4): 62.

[5] CHEN M, WU G, LU Y, et al. A p21-ATD mouse model for monitoring and eliminating senescent cells and its application in liver regeneration post injury [J]. *Mol Ther*, 2024, 32(9): 2992–3011.

[6] GILLIS C M, REBER L L. PMNDTR mice: a new model to study neutrophils *in vivo* [J]. *Med Sci*, 2018, 34(4): 339–343.

[7] BUCH T, HEPPNER F L, TERTILT C, et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration [J]. *Nature methods*, 2005, 2(6): 419–426.

[8] SINHA P, CHI H H, KIM H R, et al. Mouse lysozyme-M knockout mice reveal how the self-determinant hierarchy shapes the T cell repertoire against this circulating self antigen in wild-type mice [J]. *J Immunol*, 2004, 173(3): 1763–1771.

[9] LU N, WANG L, CAO H, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (3): 1013–1023.

[10] TIAN X, WANG Y, LU Y, et al. Conditional depletion of macrophages ameliorates cholestatic liver injury and fibrosis via lncRNA-H19 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 646.

[11] SADEGHI M, DIVANGAHI M. Discovering adaptive features of innate immune memory [J]. *Immunol Rev*, 2024, 323(1): 186–196.

[12] LIU Q, WU Y, CHEN G, et al. Umbilical cord blood-derived neutrophils possess higher viability than peripheral blood derived neutrophils [J]. *Am J Cancer Res*, 2024, 14(3): 1190–1203.

[13] LIEW P X, KUBES P. The neutrophil’s role during health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1223–1248.

[14] JIA M, FU H, JIANG X, et al. DEL-1, as an anti-neutrophil transepithelial migration molecule, inhibits airway neutrophilic inflammation in asthma [J]. *Allergy*, 2024, 79(5): 1180–1194.

[15] SÉVOZ-COUCHE C, LIAO W, FOO H Y C, et al. Direct vagus nerve stimulation: a new tool to control allergic airway inflammation through α7 nicotinic acetylcholine receptor [J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(13): 1916–1934.

[16] WU K, YUAN Y, YU H, et al. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice [J]. *Blood*, 2020, 136(4): 501–515.

[17] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363–383.

[18] ENDO-UMEDA K, NAKASHIMA H, KOMINE-AIZAWA S, et al. Liver X receptors regulate hepatic F4/80⁺ CD11b⁺ Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9281.

[19] WEIS S M, CHERESH D A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1359–1370.

[20] SONG P, YAKUFUJIANG Y, ZHOU J, et al. Identification of important genes related to aniois in acute myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(8): e18264.

[21] LU Y Z, NAYER B, SINGH S K, et al. CGRP sensory neurons promote tissue healing via neutrophils and macrophages [J]. *Nature*, 2024, 628(8008): 604–611.

[22] SOLDANO S, SMITH V, MONTAGNA P, et al. Nintedanib downregulates the profibrotic M2 phenotype in cultured monocyte-derived macrophages obtained from systemic sclerosis patients affected by interstitial lung disease [J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1): 74.

[23] IWAMOTO R, HIGASHIYAMA S, MITAMURA T, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity [J]. *EMBO J*, 1994, 13(10): 2322–2330.

[24] PARK I, GODDARD M E, COLE J E, et al. C-type lectin receptor CLEC4A2 promotes tissue adaptation of macrophages and protects against atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 215.

[25] CHUNG J Y, KRAPP N, WU L, et al. Interleukin-1 receptor 1 deletion in focal and diffuse experimental traumatic brain injury in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(2): 370–379.

刘凯慧,郭亚茜,杜晓鹏,等. 不同移植途径及粪便状态对肠道菌群结构丰度的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1532-1542.

LIU K H, GUO Y X, DU X P, et al. Effects of different transplantation routes and fecal status on structural abundance of gut microbiota [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1532-1542.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.004

不同移植途径及粪便状态对肠道菌群结构丰度的影响

刘凯慧,郭亚茜,杜晓鹏,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,国家卫生健康委员会
人类疾病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 评估粪便状态和移植方式对肠道微生物群移植无菌小鼠后肠道菌群结构的影响。**方法** 将 36 只 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组:新鲜粪便灌胃移植组(A 组)、冷冻粪便灌胃移植组(B 组)和冷冻粪便直肠移植组(C 组)。分别于移植后 2、4 和 6 周采集粪便,并于 6 周时处死各组小鼠分别取小肠内容物和大肠内容物。通过 16 S rRNA 测序分析肠道菌群结构和功能及菌群的动态变化趋势。**结果** α 多样性分析,与 B 组相比,A 组和 C 组小肠微生物的多样性均无显著性差异($P > 0.05$),大肠微生物的多样性均显著升高($P < 0.001$)。 β 多样性分析,A 组和 B 组小肠的各样本聚类在相同区域,其微生物群组成具有相似性($P > 0.05$),大肠的各样本分布在不同区域,差异具有显著性($P < 0.001$);B 组和 C 组的小肠和大肠各样本分布在不同区域,差异具有显著性($P < 0.001$)。线性判别分析(linear discriminant analysis effect size,LEfSe),拟杆菌门(*Bacteroidota*)在 A 组中占相对优势,疣微菌门(*Verrucomicrobiota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)在 B 组中占相对优势,厚壁菌门(*Firmicutes*) in C 组中占相对优势。基于重建未观察状态群落系统发育调查(PICRUSt2)功能预测显示,粪便状态和移植方式没有引起微生物群落功能的改变。**结论** 与冷冻粪便灌胃移植相比,新鲜粪便灌胃移植和冷冻粪便直肠移植提高了大肠微生物多样性。粪便状态不影响菌群的肠道功能和定植趋势,而移植方式影响菌群定植趋势,但不影响菌群肠道功能。

【关键词】 肠道菌群;人源化菌群模型;16 S rRNA 测序;菌群结构

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1532-11

Effects of different transplantation routes and fecal status on structural abundance of gut microbiota

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

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & National Center of Technology Innovation for Animal Model, Peking Union Medical College, PUMC, NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine,
National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China)

Corresponding author: ZHU Hua. E-mail: zhuh@cnilas.org

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of fecal status and transplantation method on the intestinal flora structure after fecal microbiota transplantation in germ-free mice. **Methods** Thirty-six C57BL/6 mice were divided randomly into three groups: fresh fecal gavage transplantation (group A), frozen fecal gavage transplantation (group B), and frozen fecal rectal transplantation groups (group C). Feces were collected at 2, 4 and 6 weeks after transplantation.

【基金项目】国家重点研发计划项目(2022YFF071060001)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF071060001).

【作者简介】刘凯慧,女,技师,硕士,研究方向:实验病理。Email: lkh838535773@163.com

【通信作者】朱华,女,主任技师,硕士,研究方向:疾病与肠道微生态。Email: zhuh@cnilas.org

All mice were sacrificed at 6 weeks to obtain the contents of the small and large intestines. The structure and function of the gut microbiota and dynamic trends in microbial changes were analyzed by 16 S rRNA sequencing. **Results** The diversity of the small intestine microbes in both the group A and group C were similar to those in the group B, according to α -diversity analysis ($P > 0.05$), but the diversity of large intestine microbes was significantly increased ($P < 0.001$). According to β -diversity analysis, small intestine samples from the group A and group B clustered in the same area, indicating that the microbial community compositions were similar ($P > 0.05$), but samples from the large intestine were distributed in different areas, showing significant differences ($P < 0.001$). Small and large intestine samples from the group B and group C were distributed in different areas, with significant differences ($P < 0.001$). Linear discriminant analysis effect size showed that *Bacteroidota* were relatively dominant in the group A, while *Verrucomicrobiota* and *Proteobacteria* were relatively dominant in the group B and *Firmicutes* were relatively dominant in the group C. Functional prediction using PICRUST2 software showed that neither fecal status nor the method of transplantation affected the functions of the microbial community. **Conclusions** Both fresh fecal gavage and frozen fecal rectal transplantation can enhance the microbial diversity of the large intestine, compared with frozen fecal gavage transplantation. Fecal status does not affect the gut function and colonization trends of the microbiota, whereas the method of transplantation affects the colonization trends but not the functions of the microbiota.

[Keywords] intestinal flora; human flora-associated model; 16 S rRNA sequencing; flora structure
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肠道微生物群是由各种细菌、真菌、病毒和原生动物组成的复杂且稳定的系统,在食物的消化吸收、营养代谢、肠道屏障完整性、宿主免疫和神经心理行为的调节等许多生理过程中发挥着重要作用^[1-4]。微生物群的稳态对人类健康至关重要,生态失调可引发代谢途径中断,肠道免疫功能减弱,微生物定植能力受损等,与各种疾病的发生密切相关^[5]。由于直接利用人肠道菌群进行疾病研究存在伦理道德风险,且实验动物肠道菌群组成及代谢活性与人体肠道菌群有明显差异^[6],因此,构建人源化菌群(human flora-associated, HFA)动物模型至关重要。基于高通量测序技术在肠道微生物群中的发展和应用,利用无菌小鼠通过肠道微生物群移植(fecal microbiota transplantation, FMT)构建人源菌群动物模型为菌群与疾病关系研究提供了新思路^[7]。目前已有多种 HFA 动物模型用于人类疾病的研究,如阿尔茨海默症、肥胖与糖尿病、冠心病和抑郁症等^[6,8-10]。然而,构建人源菌群小鼠 FMT 模型的供体筛选、储存及移植方式等技术尚未建立统一的标准,因此有必要研究粪便状态和移植方式对人源菌群小鼠 FMT 模型构建的影响。本研究将健康志愿者的新鲜和冷冻粪便样本制成悬液后通过灌胃和直肠移植到 C57BL/6 无菌小鼠,通过 16 S rRNA 测序技术对肠道微生物物种相对丰度分析、多样性分析、肠道功能分析以及 FMT 后肠道菌群的动态分析来解释其对 FMT 的影响,为 FMT 模型的构建提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无菌级 C57BL/6 小鼠 36 只,体重 18 ~ 22 g, 8 ~ 10 周龄,均为雌性,本课题组繁育并饲养于无菌隔离设施中【SYXK(京)2023-0037】,动物实验期间隔离器内温度 22 ~ 25 ℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗交替 12 h/12 h。动物在隔离器内自由摄食饮水。实验所用无菌小鼠饲料经 50 kGy ⁶⁰Co- γ 射线辐照灭菌,饲育用饮水、垫料、笼具、灌胃针等经 126 ℃ 30 min 高温高压灭菌处理。本研究经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会(IACUC)批准(ZH24002)。

1.1.2 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), 无菌 PBS(北京酷来搏科技有限公司, SL61002)。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), 医用超低温冰箱(松下, MDF-382E), 海尔冰箱(海尔, BCD-215KADZ), 分析天平(梅特勒-托利多, ME104)。

1.1.3 粪便菌悬液的制备

采集 1 位健康志愿者的粪便置于-80 ℃ 冷冻保存 3 个月。该健康志愿者取样前 3 个月内未服用任何益生菌、抗生素,同期内未患胃肠道疾病。粪便

移植第 1 天采集同一志愿者的新鲜粪便,将前期-80 ℃冷冻保存的冷冻粪便于移植前 1 d 置于 4 ℃解冻。人粪便样本获得国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院伦理委员会批准(24/120-4400)。无菌条件下分别称取 2 g 新鲜粪便样本和 2 g 冷冻粪便样本,分别加入无菌 PBS 20 mL,充分震荡均匀,静置 5 min 后分别吸取上清于 50 mL 灭菌离心管得到新鲜粪便粪菌悬液和冷冻粪便粪菌悬液,用于当天的粪便移植,余下的分装至 2 mL 的离心管中,置于-80 ℃保存,用于后续 2 d 的粪便移植。

1.2 方法

1.2.1 模型建立

将 36 只雌性小鼠随机分为 3 组,A 组使用新鲜粪便进行灌胃移植,B 组使用冷冻粪便进行灌胃移植,C 组使用冷冻粪便进行直肠移植,按表 1 所示进行粪菌移植,每天 1 次,每只 200 μL,连续 3 d。

表 1 实验分组($n = 12$)			
Table 1 Experimental grouping($n = 12$)			
分组 Groups	粪便保存方法 Storage methods	移植途径 Transplantation methods	剂量/μL Doses/μL
A 组 Group A	新鲜粪便 Fresh feces	灌胃 Gavage	200
B 组 Group B	冷冻粪便 Frozen feces	灌胃 Gavage	200
C 组 Group C	冷冻粪便 Frozen feces	直肠 Rectum	200

1.2.2 样本采集

分别于粪菌移植后的 2、4 和 6 周采集各组小鼠的粪便,并于 6 周时将各组小鼠处死,分别取小肠内

容物(small intestine contents)和大肠内容物(large intestine contents),-80 ℃保存备用。

1.2.3 测序及数据分析

取上述冻存样本寄送诺禾致源生物科技有限公司测序。提取 DNA 后使用 Illumina 测序平台对样本中细菌 16 S rDNA-V3 区进行测序,相似度 $\geq 97\%$ 的序列被分配到相同的操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),筛选每个 OTU 的代表性序列,并用 QIIME2 进行物种注释。基于加权 UniFrac 距离(weighted-unifrac)、bray-curtis 距离(bray-curtis distance)进行主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)和非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)分析。

1.3 统计学分析

通过 t 检验分析组间 α 多样性统计学意义,通过多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, Adonis)检验组间 β 多样性统计学意义。检测结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 测序质量评估

对收集到的 86 个样本进行测序共得到 9 221 671 条原始序列,其中 8 609 478 条可用于 OTU 的划分。比较 A 组和 B 组、B 组和 C 组的原始序列、有效序列、有效序列占比、错误率小于 1% 碱基占比,各组间无显著性差异(表 2)。

表 2 数据过滤统计分析表($\bar{x} \pm s$)					
Table 2 Data filtering statistical analysis($\bar{x} \pm s$)					
分组 Groups	部位 Position	原始序列 Raw reads	有效序列 Clean reads	有效序列占比/% Effective/%	错误率小于 1% 碱基占比/% Q20 bases rate/%
A 组 Group A	小肠 Small intestine	105 684.00 $\pm$ 4631.37	101 628.00 $\pm$ 4760.93	96.15 $\pm$ 0.79	99.00 $\pm$ 0.06
	大肠 Large intestine	109 743.00 $\pm$ 8079.90	98 748.00 $\pm$ 7640.47	96.75 $\pm$ 0.69	98.67 $\pm$ 0.25
B 组 Group B	小肠 Small intestine	106 973.00 $\pm$ 4703.93	103 048.00 $\pm$ 4751.43	96.32 $\pm$ 0.49	99.03 $\pm$ 0.04
	大肠 Large intestine	109 913.00 $\pm$ 9046.67	104 935.00 $\pm$ 9761.10	95.46 $\pm$ 0.75	98.77 $\pm$ 0.21
C 组 Group C	小肠 Small intestine	100 935.00 $\pm$ 2077.48	95 135.00 $\pm$ 1964.95	96.56 $\pm$ 1.20	98.56 $\pm$ 0.16
	大肠 Large intestine	108 713.00 $\pm$ 14 105.15	96 577.00 $\pm$ 9056.33	96.38 $\pm$ 4.30	98.60 $\pm$ 0.34

2.2 肠道微生物群落多样性分析

2.2.1 α 多样性分析

α 多样性是对群落内物种分布的均匀度和多样性的分析。基于 OTU 物种和丰度计算物种丰富度指数 (Ace、Chao1、Shannon 和 Simpson) 衡量 α 多样性。

粪便状态对 FMT 影响的结果显示, A 组小肠肠道菌群的 OTUs、Chao1、Shannon、Simpson 指数与 B 组无显著性差异 ($P > 0.05$)。A 组大肠肠道菌群的 OTUs、Chao1、Shannon、Simpson 指数极显著高于 B 组 ($P < 0.001$)。提示相较于新鲜粪便移植, 冷冻粪

便移植后, 小肠肠道菌群的物种总数和多样性没有显著变化, 大肠肠道菌群的物种总数和多样性降低 (表 3)。

移植方式对 FMT 影响的结果显示, C 组小肠肠道菌群的 OTUs、Chao1、Shannon、Simpson 指数与 B 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。C 组大肠肠道菌群的 OTUs、Chao1、Shannon、Simpson 指数显著高于 B 组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。提示相较于直肠移植, 灌胃移植后, 小肠肠道菌群的物种总数和多样性没有显著变化, 大肠肠道菌群的物种总数和多样性降低 (表 3)。

表 3 小鼠肠道菌群 α 多样性分析指数比较

Table 3 Comparison of the results of α-diversity analysis of gut microbiota in mice					
分组 Groups	部位 Position	OTU 数目 OTUs	Chao1 指数 Chao1	Shannon 指数 Shannon	Simpson 指数 Simpson
A 组 Group A	小肠 Small intestine	472	483.667	2.057	0.635
	大肠 Large intestine	290 ^{###}	296.667 ^{###}	3.944 ^{###}	0.874 ^{###}
B 组 Group B	小肠 Small intestine	382	392.357	1.572	0.560
	大肠 Large intestine	111	114.929	1.792	0.588
C 组 Group C	小肠 Small intestine	493	502.118	3.184	0.772
	大肠 Large intestine	289 ^{##}	302.182 ^{##}	3.501 ^{###}	0.829 ^{###}

注: 与 B 组相比, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。
Note. Compared with group B, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

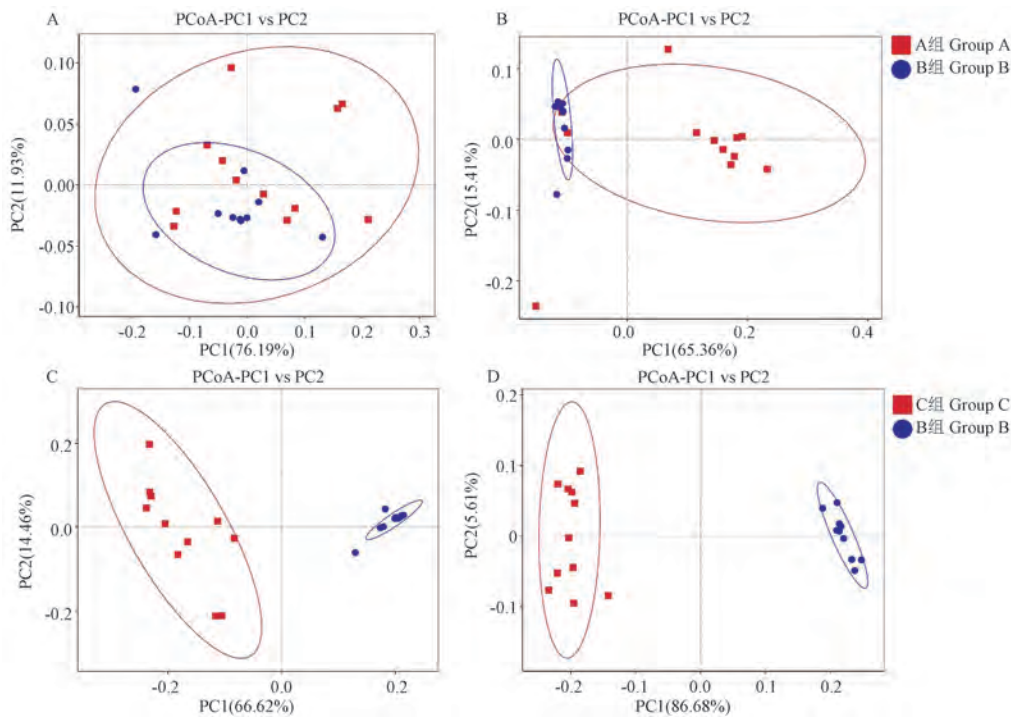
2.2.2 β 多样性分析

为了进一步显示样品间物种多样性的差异, 采用 weighted-UniFrac 距离对所有样品进行 PCoA 和 UPGMA 聚类分析。PCoA 结果显示, A 组和 B 组小肠的各样本聚类在一起, 表明它们在小肠的微生物群组成相似, 而大肠的各样本明显分为两组, 表明它们在大肠的微生物群存在显著性差异 (图 1A, 1B)。B 组和 C 组不论是小肠样本还是大肠样本, 都明显分为两组, 表明它们的肠道微生物群存在显著性差异 (图 1C, 1D)。同时, Adonis 分析也显示, A 组和 B 组小肠微生物群落差异无显著性 ($R^2 = 0.0974$, $P > 0.146$), 而大肠的微生物群落差异具有显著性 ($R^2 = 0.3191$, $P < 0.001$)。B 组和 C 组小肠 ($R^2 = 0.6410$, $P < 0.001$) 和大肠 ($R^2 = 0.7833$, $P < 0.001$) 的微生物群均具有显著性差异。UPGMA 反映了各组肠道微生物基于门水平分类群相对丰度的聚类。与 PCoA 结果一致, UPGMA 树图表明 A 组和 B 组在门水平上小肠微生物群具有相似性, 大

肠微生物具有显著差异 (图 2A, 2B)。B 组和 C 组小肠和大肠微生物群均有显著差异 (图 2C, 2D)。

2.3 肠道微生物群落组成分析

物种相对丰度的分析结果显示, A 组和 B 组在小肠的优势菌群均为大肠埃氏菌属-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*) (41.02% 和 55.32%)、阿克曼菌属 (*Akkermansia*) (46.07% 和 39.54%) 和副拟杆菌属 (*Parabacteroides*) (3.82% 和 1.90%)。 *Parasutterella* (6.00%) 为 A 组所特有菌种, 其丰度显著高于 B 组 ($P < 0.05$) (图 3A, 3E)。A 组在大肠的优势菌群主要为 *Parabacteroides* (30.84%)、*Akkermansia* (20.00%) 和 *Escherichia-Shigella* (18.07%), B 组 *Escherichia-Shigella* (57.00%) ($P < 0.001$) 和 *Akkermansia* (31.49%) ($P < 0.05$) 的丰度均显著高于 A 组。 *Parabacteroides* (30.84%) 为 A 组所特有菌种 (图 3C, 3G), 其丰度显著高于 B 组 ($P < 0.01$); C 组在小肠的菌群结构与 B 组具有显著性差异, 苏黎世杆菌属 (*Turicibacter*) (43.52%)

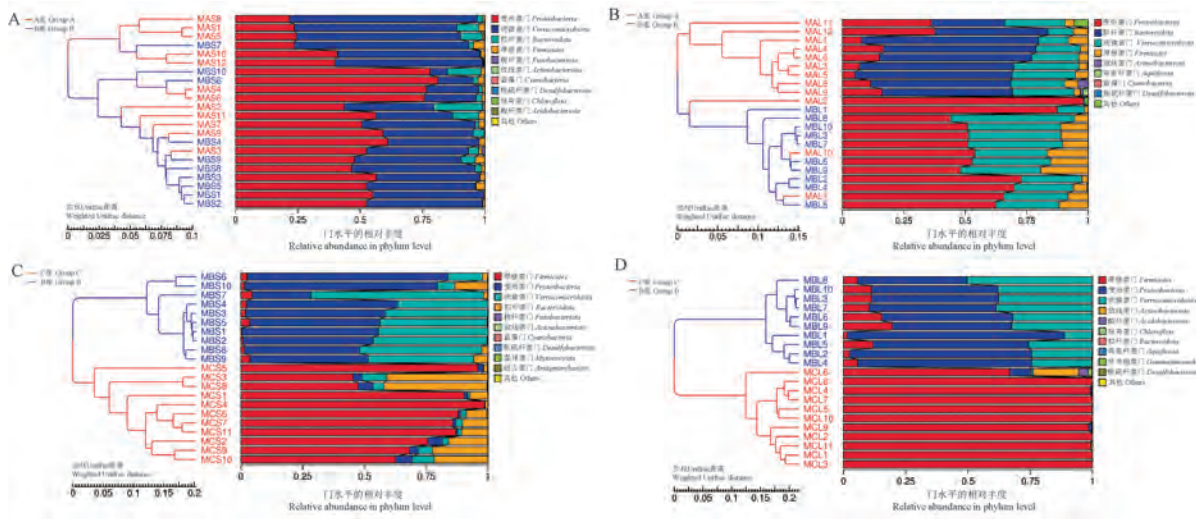


注:A;A 组和 B 组小肠内容物的 PCoA 分析;B:A 组和 B 组大肠内容物的 PCoA 分析;C;B 组和 C 组小肠内容物的 PCoA 分析;D;B 组和 C 组大肠内容物的 PCoA 分析。

图 1 PCoA 分析

Note. A. PCoA analysis of small intestinal contents in group A and group B. B. PCoA analysis of large intestine contents in group A and group B. C. PCoA analysis of small intestinal contents in the group B and the group C. D. PCoA analysis of large intestine contents in the group B and the group C.

Figure 1 PCoA analysis

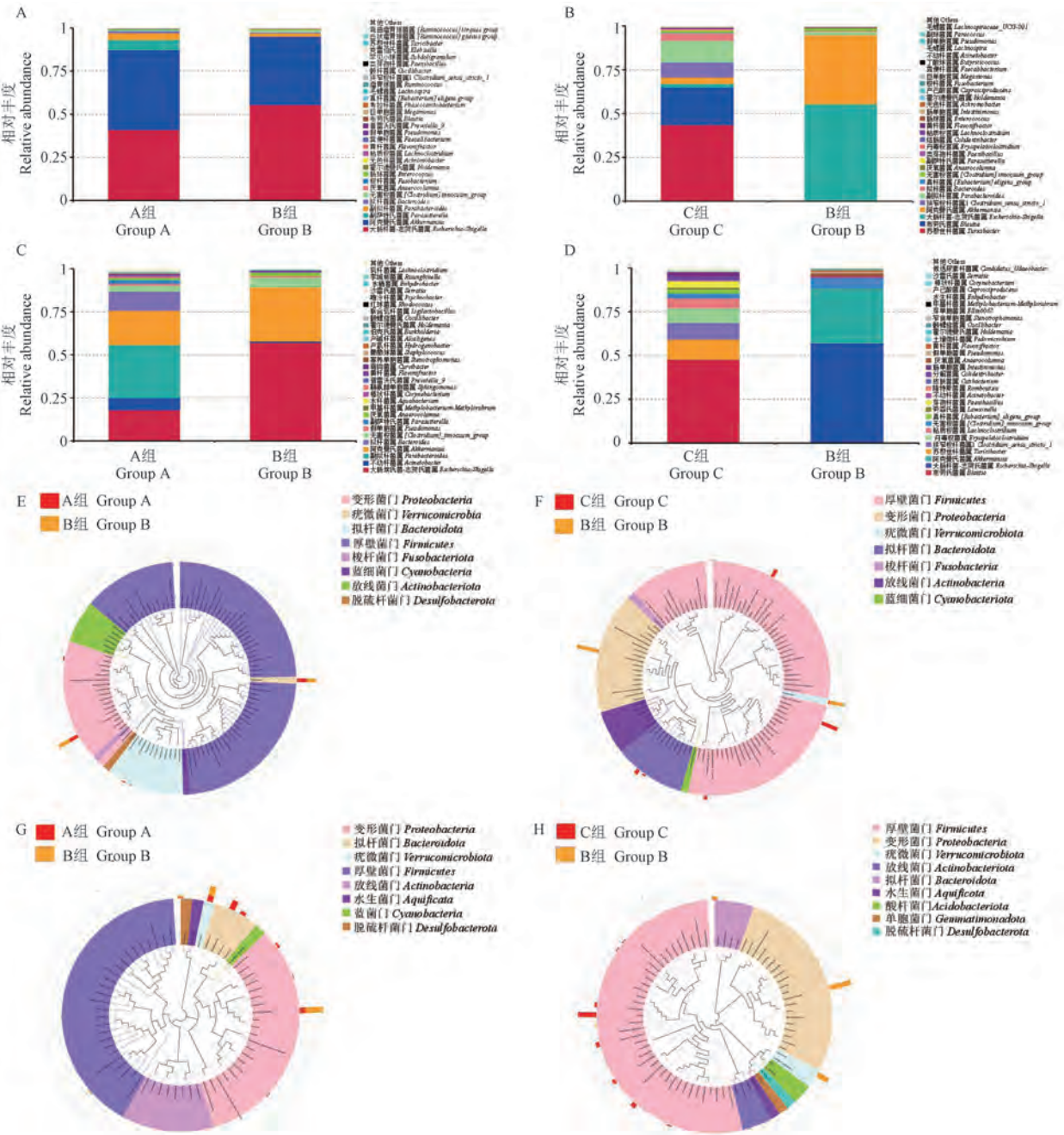


注:A;A 组和 B 组小肠内容物的 UPGMA 分析;B:A 组和 B 组大肠内容物的 UPGMA 分析;C;B 组和 C 组小肠内容物的 UPGMA 分析;D;B 组和 C 组大肠内容物的 UPGMA 分析。

图 2 UPGMA 分析

Note. A. UPGMA analysis of small intestinal contents in group A and group B. B. UPGMA analysis of large intestine contents in group A and group B. C. UPGMA analysis of small intestinal contents in the group B and the group C. D. UPGMA analysis of large intestine contents in the group B and the group C.

Figure 2 UPGMA analysis



注:A;A 组和 B 组小肠内容物的物种相对丰度柱形图;B;B 组和 C 组小肠内容物的物种相对丰度柱形图;C;A 组和 B 组大肠内容物的物种相对丰度柱形图;D;B 组和 C 组大肠内容物的物种相对丰度柱形图;E;A 组和 B 组小肠内容物的 top100 物种进化树圈图;F;B 组和 C 组小肠内容物的 top100 物种进化树圈图;G;A 组和 B 组大肠内容物的 top100 物种进化树圈图;H;B 组和 C 组大肠内容物的 top100 物种进化树圈图。

图 3 肠道菌群在属水平上的构成

Note. A. Histogram of species relative abundance of small intestinal contents in group A and group B. B. Histogram of species relative abundance of small intestinal contents in the group B and the group C. C. Histogram of species relative abundance of large intestine contents in group A and group B. D. Histogram of species relative abundance of large intestine contents in the group B and the group C. E. Top100 species evolutionary tree diagram of small intestine contents in group A and group B. F. Top100 species evolutionary tree diagram of small intestinal contents in group B and group C. G. Top100 species evolutionary tree of large intestine contents in group A and group B. H. Top100 species evolutionary tree diagram of large intestine contents in group B and group C.

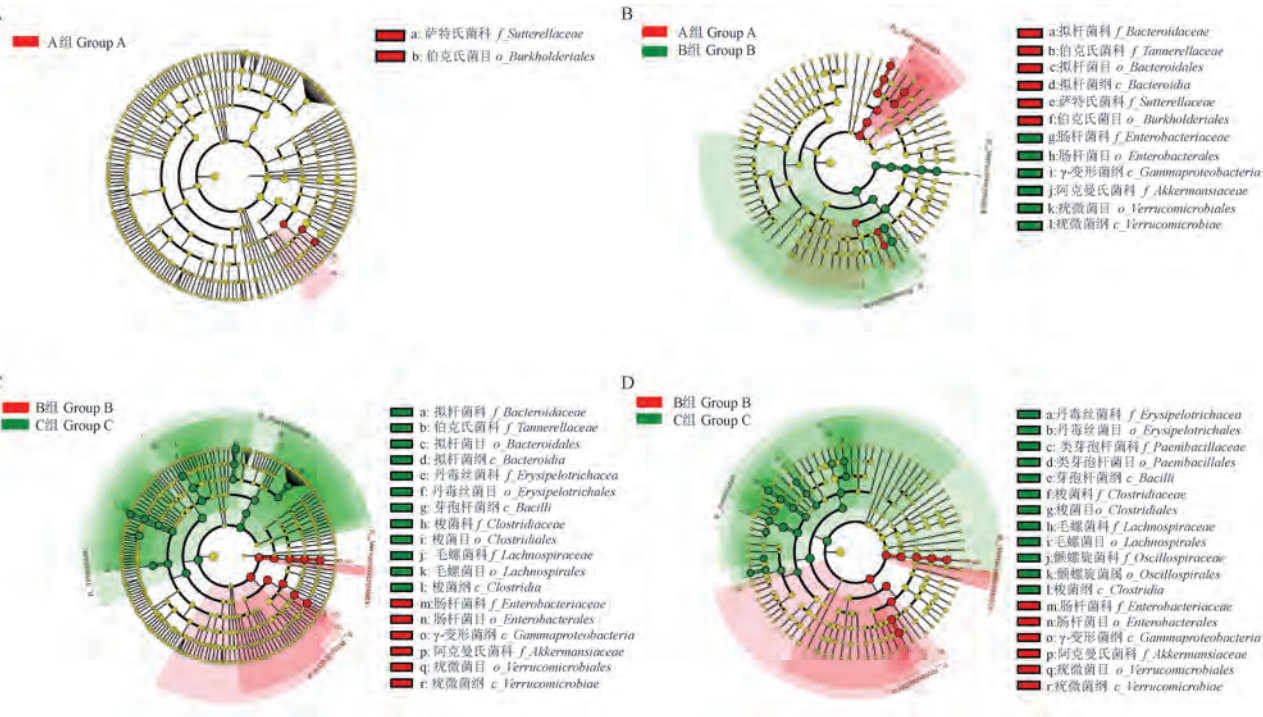
Figure 3 Gut microbiota distribution at the genus level

($P < 0.001$)、布劳氏菌属 (*Blautia*) (21.37%) ($P < 0.05$) 和 *Parabacteroides* (12.20%) ($P < 0.01$) 的丰度都显著高于 B 组,且都为其所特有菌种(图 3B, 3F)。同样, C 组在大肠的优势菌群 *Blautia* (47.61%) ($P < 0.001$)、*Turicibacter* (11.50%) ($P < 0.05$) 丰度都显著高于 B 组(图 3D, 3H)。因此, A 组和 B 组、B 组和 C 组肠道的群落结构存在显著性差异,这表明粪便状态和移植途径都能够影响 FMT 后肠道菌群的定植。

2.4 肠道菌群 LEfSe 分析

LEfSe 是一种利用效应量测量来识别细菌分类

群作为生物标志物的方法,用于探索不同微生物水平上的显著性差异。各组样本分析结果显示,从粪便状态对 FMT 的影响来看,小肠微生物物种无明显差异(图 4A)。而在大肠, *Bacteroidota* (从门到种) 在 A 组中占相对优势, *Verrucomicrobiota* (从门到种)、*Proteobacteria* (从门到种) 在 B 组中占相对优势(图 4B);从移植方式对 FMT 的影响来看,无论是小肠还是大肠微生物, *Firmicutes* (从门到科) 在 C 组中占相对优势, *Verrucomicrobiota* (从门到种)、*Proteobacteria* (从门到种) 在 B 组中占相对优势(图 4C, 4D)。



注:A:A 组和 B 组小肠内容物的 LEfSe 分析;B:A 组和 B 组大肠内容物的 LEfSe 分析;C:B 组和 C 组小肠内容物的 LEfSe 分析; D:B 组和 C 组大肠内容物的 LEfSe 分析。

图 4 LEfSe 组间差异分析图

Note. A. LEfSe analysis of small intestinal contents in group A and group B. B. LEfSe analysis of large intestine contents in group A and group B. C. LEfSe analysis of small intestinal contents in the group B and the group C. D. LEfSe analysis of large intestine contents in the group B and the group C.

Figure 4 Analysis diagram of difference between LEfSe groups

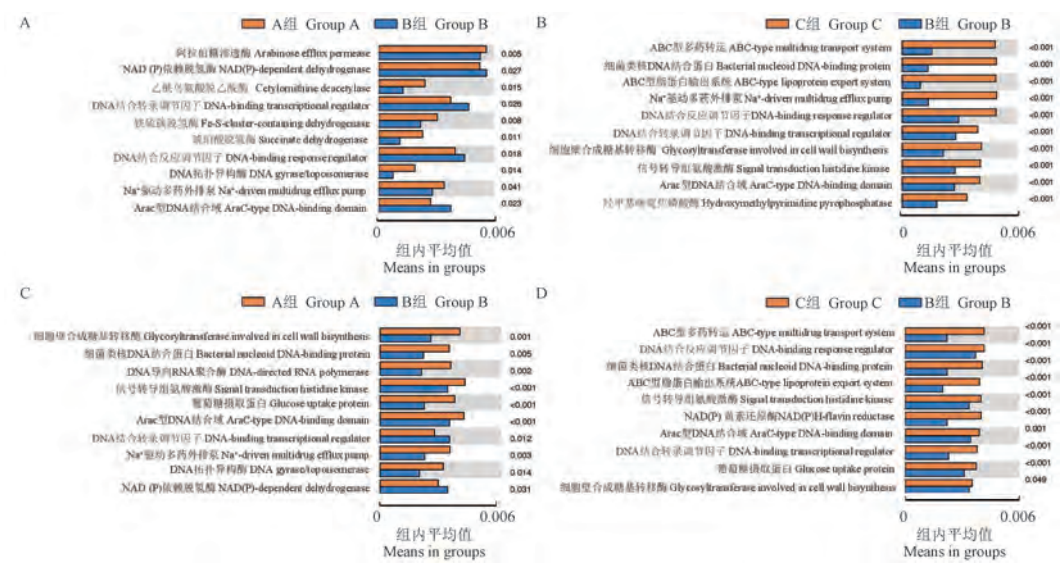
2.5 肠道微生物群落功能预测

利用 PICRUS2 进行微生物群落功能预测分析,并与同源蛋白簇数据库 (cluster of orthologous groups, COG) 进行对比,得到相应的 COG 功能注释及其丰度。结果可见,粪便状态和移植方式没有引起微生物群落功能的改变,都主要集中于跨膜信号转导、膜转运、基因表达调控、糖代谢、脂代谢和细胞进程(图 5)。灌胃移植时相比于新鲜粪便,冷冻

粪便导致微生物群落功能丰度显著降低 ($P < 0.05$);使用冷冻粪便时相比于直肠移植,灌胃移植会导致微生物群落功能丰度显著降低 ($P < 0.001$)。

2.6 粪便微生物动态分析

从粪便状态对微生物群落的影响来看(图 6),随着时间的推移,在 α 多样性指数上, A 组和 B 组的动态趋势相似,两者 Chao1 指数均差异无显著性 ($P > 0.05$),Shannon 指数均在 4 周时显著增加 (P

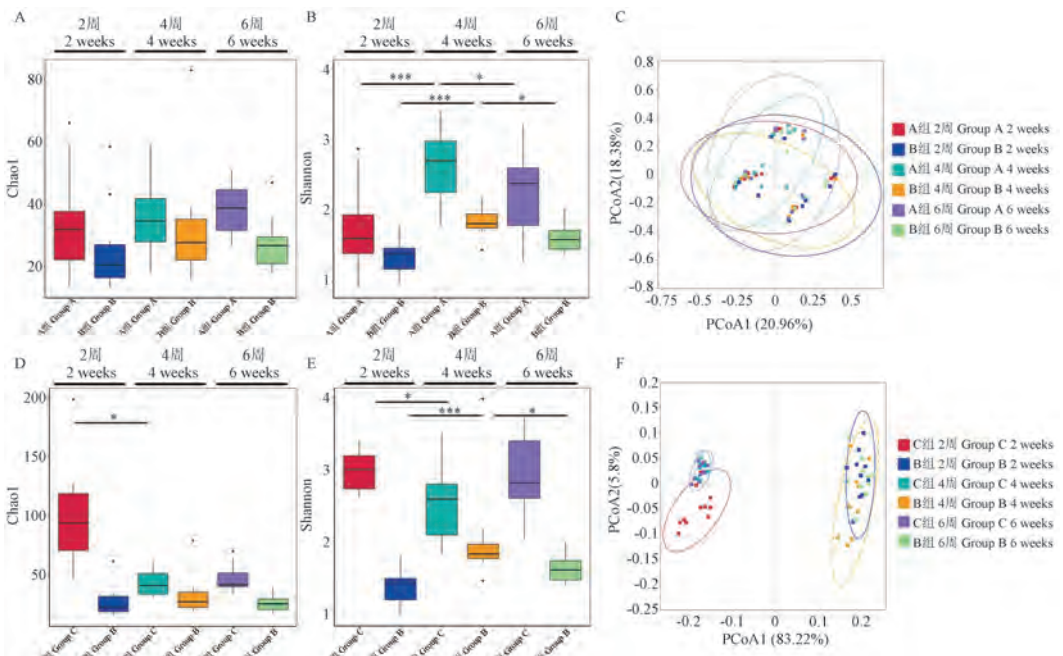


注:A:A 组和 B 组小肠内容物的 PICRUSt2 功能预测分析;B:B 组和 C 组小肠内容物的 PICRUSt2 功能预测分析;C:A 组和 B 组大肠内容物的 PICRUSt2 功能预测分析;D:B 组和 C 组大肠内容物的 PICRUSt2 功能预测分析。

图 5 PICRUSt2 功能预测分析

Note. A. PICRUSt2 function prediction analysis of small intestinal contents in group A and group B. B. PICRUSt2 function prediction analysis of small intestinal contents in the group B and the group C. C. PICRUSt2 function prediction analysis of large intestine contents in group A and group B. D. PICRUSt2 function prediction analysis of large intestine contents in the group B and the group C.

Figure 5 PICRUSt2 function prediction analysis



注:A ~ C:A 组和 B 组肠道微生物移植后 2、4 和 6 周小鼠粪便的 Chao1、Shannon 和 PCoA 分析;D ~ F:C 组和 B 组移植后 2、4 和 6 周小鼠粪便的 Chao1、Shannon 和 PcoA 分析。与 4 周相比,* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 FMT 2、4 和 6 周后 α 多样性和 β 多样性分析

Note. A ~ C. Chao1, Shannon and PCoA analysis of mice feces of 2, 4 and 6 weeks after FMT in group A and group B. D ~ F. Chao1, Shannon and PCoA analysis of mice feces of 2, 4 and 6 weeks after FMT in group C and group B. Compared with 4 weeks, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Analysis of α and β -diversity at 2, 4 and 6 weeks after FMT

< 0.001), 于 6 周显著降低 ($P < 0.05$) (图 6A, 6B); 在 β 多样性上, PCoA 结果显示, A 组和 B 组在 FMT 后 2、4 和 6 周的样本聚集在一起 (图 6C), 说明它们在不同时期的微生物群落具有相似性, 与此一致, Adonis 分析结果显示差异不显著 ($P > 0.001$)。综上所述, 粪便状态对 FMT 后小鼠粪便微生物群落的定植趋势没有显著影响。

从移植方式对微生物群落的影响来看, 随着时间的推移, C 组 Chao1 指数在 4 周时显著降低 ($P < 0.05$), 在 6 周时维持动态平衡。Shannon 指数于 4 周时显著降低 ($P < 0.05$), 于 6 周时维持动态平衡 (图 6D, 6E)。B 组如前文所述。在 β 多样性上, PCoA 结果显示, C 组和 B 组在 FMT 后 2、4 和 6 周的样本明显聚集成两组 (图 6F), 说明它们在不同时期的微生物群落具有显著性差异, 与此一致, Adonis 分析结果显示差异具有显著性 ($P < 0.001$)。

综上所述, 移植方式对 FMT 后小鼠粪便微生物群落的定植趋势具有显著影响。

3 讨论

利用动物模型模拟人类疾病是研究疾病病因及发病机制的重要方法之一。无菌小鼠微生物背景清晰, 通过 FMT 可控制宿主微生物群落, 克服了人体实验中遗传、环境和饮食等不确定因素的影响^[7,11]。在临床上, FMT 是一种有效的治疗方法。有研究表明, FMT 是复发性艰难梭菌感染最成功的治疗选择^[12-13]。但由于供体粪便移植前需要进行筛选并检测是否存在潜在的病毒感染, 采集后无法直接进行 FMT, 常常需要将粪便冷冻储存^[14-15]。FMT 可选用多种方式移植, 鼻胃管给药易于操作且成本低, 但微生物群会受到首过效应或胃酸和胰酶的降解^[16], 口服胶囊可能会使粪菌过早释放, 有时不能达到肠道目标位置^[17], 灌肠移植侵入性小, 简便易行, 其粪便回收率超过 80% ~ 90%^[13-14,18-19]。在本文中, 通过 16 S rRNA 测序技术分别比较了冷冻与新鲜粪便、灌胃与直肠移植对构建人源菌群小鼠 FMT 模型的影响。

研究发现, 从粪便状态对 FMT 的影响来看, 在肠道微生物多样性上, 冷冻粪便移植后小肠微生物的多样性都与新鲜粪便移植存在相似性, 大肠微生物多样性显著低于新鲜粪便移植。在功能预测上, 冷冻粪便移植没有引起微生物的功能的改变。在微生物群落的动态变化趋势上, 冷冻粪便和新鲜粪

便保持一致。RAMAI 等^[20]和 ERICSSON 等^[21]的研究表明, 尽管冷冻粪便储存后微生物的数量和多样性下降, 但其总体疗效与新鲜粪便相比没有显著差异, 不会对治疗产生实质性的负面影响, 这与本文中的研究结果一致。有研究显示, 厌氧菌占人体肠道微生物群的绝大多数, 氧气暴露会抑制兼性厌氧菌的生长, 对专性厌氧菌可能是致命的^[22-28]。本文对粪便样本的处理并未在厌氧条件下进行, 可能导致活菌水平下降, 这可能与冷冻粪便移植后微生物多样性的降低有关。其次, 从粪便的移植方式对 FMT 的影响来看, 在肠道微生物多样性上, 直肠移植的小肠和大肠微生物多样性都显著高于灌胃移植。在功能预测上, 直肠移植和灌胃移植的肠道微生物功能相似。在微生物群落的动态变化趋势上, 随着时间的变化, 直肠移植的 Chao1 指数和 Shannon 指数先显著下降后趋于稳定, 灌胃移植 Chao1 指数随时间变化差异不显著, Shannon 指数先显著升高再降低。直肠移植导致的物种总数下降可能是菌群竞争的结果, 优势菌群定植后物种总数趋于稳定。JIANG 等^[29]的研究证明, 口服冻干胶囊与灌肠给予冷冻产品之间的疗效没有显著性差异, 本文中直肠移植后小鼠肠道微生物多样性显著高于灌胃移植, 这可能是本文移植所用的粪菌悬液缺乏胶囊材料的保护, 使粪便中的肠道微生物被胃酸和胰酶等所降解从而导致多样性下降。

在健康成人中, 肠道微生物群在门水平上大体相似, 主要由 *Bacteroidota* 和 *Firmicutes* 组成, 还有少量的 *Proteobacteria* 和 *Actinobacteria*^[30-31]。然而, 肠道微生物群在属和种水平上是独一无二的, 都有其自身的独特性^[32]。通过 LEfSe 分析了新鲜粪便与冷冻粪便、灌肠移植与灌胃移植后在门水平上的肠道微生物的主要亚群, *Bacteroidota* 在新鲜粪便灌胃移植中占相对优势, *Verrucomicrobiota* 和 *Proteobacteria* 在冷冻粪便灌胃中占相对优势, *Firmicutes* 则在冷冻粪便直肠移植占相对优势。人类微生物群定植小鼠并不能完全恢复与微生物群相关的针对某些病原体的定植抗性^[33-34], 在本文中, 研究结果显示, *Bacteroidota* 和 *Firmicutes* 分别在新鲜粪便灌胃移植和冷冻粪便直肠移植肠道微生物更能有效地传递供体粪便, *Proteobacteria* 则在冷冻粪便灌胃移植中实现更有效的传递。

综上所述, 通过 16 S rRNA 测序技术, 分别从物种相对丰度、 α 多样性、 β 多样性、功能预测和肠道

微生物动态分析 5 个方面比较了新鲜与冷冻粪便、灌胃与直肠移植后小鼠肠道微生物的结构,结果显示冷冻粪便降低了肠道微生物的多样性,但对肠道微生物的功能和动态变化趋势并没有显著影响;直肠移植的肠道微生物多样性和动态变化与灌胃移植有显著差异,可能与灌胃移植途径胃酸对供体粪菌的降解有关。本研究为 FMT 供体的储存方式和移植途径、人源菌群小鼠 FMT 模型的构建方法提供了参考。

参 考 文 献(References)

[1] SHAH Y R, ALI H, TIWARI A, et al. Role of fecal microbiota transplant in management of hepatic encephalopathy: Current trends and future directions [J]. World J Hepatol, 2024, 16 (1): 17-32.

[2] BOKOLIYA S C, DORSETT Y, PANIER H, et al. Procedures for fecal microbiota transplantation in murine microbiome studies [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 711055.

[3] SHI N, LI N, DUAN X, et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system [J]. Mil Med Res, 2017, 4: 14.

[4] 宋园园, 施伟领, 章啸君, 等. 猪粪便微生物移植小鼠肠道菌群结构演替分析 [J]. 动物营养学报, 2022, 34 (10): 6758-6767.

SONG Y Y, SHI W L, ZHANG X J, et al. Succession analysis of intestinal microbiota structure of mice with pig fecal microbiota transplantation [J]. Chin J Anim Nutr, 2022, 34 (10): 6758 -6767.

[5] LIU Y H, CHEN J, CHEN X, et al. Factors of faecal microbiota transplantation applied to cancer management [J]. J Drug Target, 2024, 32 (2): 101-114.

[6] 朱华, 李卓, 苏磊, 等. 冠心病病人源肠道菌群小鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27 (6): 716-724.

ZHU H, LI Z, SU L, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27 (6): 716-724.

[7] DONG S, ZENG B, HU L, et al. Effect of a humanized diet profile on colonization efficiency and gut microbial diversity in human flora-associated mice [J]. Front Nutr, 2021, 8: 633738.

[8] 陈杏云, 曾本华, 魏泓, 等. 高脂饮食对菌群人源化小鼠肠道菌群结构的影响 [J]. 食品科学, 2013, 34 (17): 278 -283.

CHEN X Y, ZENG B H, WEI H, et al. Effect of high-fat diet on the structure of gut microbiota in human flora-associated mice

[J]. Food Sci, 2013, 34 (17): 278-283.

[9] 朱华, 刘小海, 李卓, 等. 建立阿尔茨海默症人源肠道菌群动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29 (1): 55-62.

ZHU H, LIU X H, LI Z, et al. Establishment of a human flora-associated mouse model correlated with Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29 (1): 55-62.

[10] ZHENG P, ZENG B, ZHOU C, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism [J]. Mol Psychiatry, 2016, 21 (6): 786-796.

[11] TURNBAUGH P J, RIDAURA V K, FAITH J J, et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice [J]. Sci Transl Med, 2009, 1 (6): ra14.

[12] YADEGAR A, PAKPOOR S, IBRAHIM F F, et al. Beneficial effects of fecal microbiota transplantation in recurrent Clostridioides difficile infection [J]. Cell Host Microbe, 2023, 31 (5): 695-711.

[13] LEE C H, STEINER T, PETROF E O, et al. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent clostridium difficile infection: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2016, 315 (2): 142 -149.

[14] SATOKARI R, MATTILA E, KAINULAINEN V, et al. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection-an observational cohort study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41 (1): 46-53.

[15] YOUNGSTER I, SAUK J, PINDAR C, et al. Fecal microbiota transplant for relapsing Clostridium difficile infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study [J]. Clin Infect Dis, 2014, 58 (11): 1515-1522.

[16] DUTTA S K, GIROTRA M, GARG S, et al. Efficacy of combined jejunal and colonic fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014, 12 (9): 1572-1576.

[17] VERDIER C, DENIS S, GASC C, et al. An oral FMT capsule as efficient as an Enema for microbiota reconstruction following disruption by antibiotics, as assessed in an in vitro human gut model [J]. Microorganisms, 2021, 9 (2): 358.

[18] MATTILA E, RAIJA UUSITALO SEPPÄLÄ, WUORELA M, et al. Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent Clostridium difficile infection [J]. Gastroenterology, 2012, 142 (3): 490-496.

- [19] 周小珏, 冯婧, 张安仁, 等. 粪菌移植途径的临床应用现状 [J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(9): 1104–1108.
ZHOU X J, FENG J, ZHANG A R, et al. Clinical application of fecal bacteria transplantation approaches [J]. Chin J Microecol, 2021, 33(9): 1104–1108.
- [20] RAMAI D, ZAKHIA K, OFOSU A, et al. Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness [J]. Ann Gastroenterol, 2019, 32(1): 30–38.
- [21] ERICSSON A C, PERSONETT A R, TURNER G, et al. Variable colonization after reciprocal fecal microbiota transfer between mice with low and high richness microbiota [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 196.
- [22] FLINT H J, SCOTT K P, LOUIS P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 9(10): 577–589.
- [23] QIN J, LI R, RAES J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59–65.
- [24] ROLFE R D, HENTGES D J, CAMPBELL B J, et al. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 1978, 36(2): 306–313.
- [25] LU Z, IMLAY J A. When anaerobes encounter oxygen: mechanisms of oxygen toxicity, tolerance and defence [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(12): 774–785.
- [26] BÉNARD M V, ARRETXE I, WORTELBOER K, et al. Anaerobic feces processing for fecal microbiota transplantation improves viability of obligate anaerobes [J]. Microorganisms, 2023, 11(9): 2238.
- [27] BELLALI S, LAGIER J C, RAOULT D, et al. Among live and dead bacteria, the optimization of sample collection and processing remains essential in recovering gut microbiota components [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1606.
- [28] 孙诗琪, 刘路, 胡二元, 等. 基于小鼠粪菌移植临床前研究影响因素的讨论 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 100–117.
SUN S Q, LIU L, HU S Y, et al. Discussion of factors influencing preclinical studies based on fecal bacteria transplantation in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 100–117.
- [29] JIANG Z D, JENQ R R, AJAMI N J, et al. Safety and preliminary efficacy of orally administered lyophilized fecal microbiota product compared with frozen product given by Enema for recurrent *Clostridium difficile* infection: a randomized clinical trial [J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0205064.
- [30] BÄUMLER A J, SPERANDIO V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut [J]. Nature, 2016, 535(7610): 85–93.
- [31] FADDA H M. The route to palatable fecal microbiota transplantation [J]. AAPS PharmSciTech, 2020, 21(3): 114.
- [32] AHRODIA T, DAS S, BAKSHI S, et al. Structure, functions, and diversity of the healthy human microbiome [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2022, 191(1): 53–82.
- [33] CHUNG H, PAMP S J, HILL J A, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota [J]. Cell, 2012, 149(7): 1578–1593.
- [34] LE ROY T, DEBÉDAT J, MARQUET F, et al. Comparative evaluation of microbiota engraftment following fecal microbiota transfer in mice models: age, kinetic and microbial status matter [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 3289.

[收稿日期] 2024-05-06

李旭涛,王四园,阮天音,等. 基于转录组学分析复方胆草颗粒对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1543-1555.

LI X T, WANG S Y, RUAN T Y, et al. Transcriptomics-based analysis of the effect of compound Dancao granules on hepatocyte apoptosis in mice with non-alcoholic steatohepatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1543-1555.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.005

基于转录组学分析复方胆草颗粒对非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝细胞凋亡的影响

李旭涛^{1#},王四园^{1#},阮天音¹,张昊^{2,3},彭渊¹,刘成海^{1,4},陶艳艳^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院·肝病研究所,上海 201203;2. 新乡医学院,河南 新乡 453003;
3. 上海泓文生物科技有限公司,上海 201403;4. 上海市中医临床重点实验室,上海 201203)

【摘要】 目的 通过转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)分析复方胆草颗粒干预高脂饲料复合四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的非酒精性脂肪性肝炎的作用机制。**方法** 45只雄性C57BL/6J小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、奥贝胆酸组(10 mg/(kg·d))、复方胆草颗粒低、高剂量组(3.74 g/(kg·d)、7.48 g/(kg·d)),每组9只。正常对照组喂养普通饲料,其余各组小鼠给予高脂饲料并复合CCl₄皮下注射,首次注射100% CCl₄溶液(4 mL/kg),之后40% CCl₄-橄榄油溶液(2 mL/kg),每周2次,共6周。奥贝胆酸组、复方胆草颗粒低、高剂量组从第3周开始给药,共给药4周。末次给药12 h后,取各组小鼠血清和肝组织,生化试剂盒检测小鼠血清肝功能;苏木素-伊红(HE)、天狼猩红及油红O染色观察小鼠肝组织病理学变化;酶联免疫吸附实验(ELISA)检测小鼠肝组织白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和转化生长因子-β(transforming growth factor beta, TGF-β)水平;免疫组化观察小鼠肝组织α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)的表达;应用RNA-seq分析差异基因并进行功能富集分析、采用荧光定量逆转录PCR(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)验证差异基因mRNA的表达,再以脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)染色检测凋亡情况。**结果** 与正常对照组比较,模型对照组小鼠血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、甘油三酯(triglyceride, TG)水平均明显升高($P < 0.01$),肝组织炎性细胞浸润明显,汇管区及小叶间胶原沉积,油红O染色显示红色脂滴面积显著增加($P < 0.01$),肝组织IL-6和TNF-α水平明显升高($P < 0.01$),IL-10和TGF-β水平下降($P < 0.01$),α-SMA的表达明显升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,复方胆草颗粒低、高剂量组和奥贝胆酸组小鼠ALT、AST、TC和TG水平显著降低($P < 0.01$),肝组织炎性细胞浸润,汇管区及小叶间胶原沉积和红色脂滴面积减少($P < 0.01$),肝组织IL-6和TNF-α水平明显降低($P < 0.01$),IL-10和TGF-β水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),α-SMA的表达明显降低($P < 0.01$)。RNA-seq测序结果显示,正常对照组与模型对照组差异表达的基因共2819个,上调基因543个,下调基因2276个;模型对照组与复方胆草颗粒组差异表达的基因共240个,上调基因206个,下调基因34个。两组交集基因221个,功能富集主要集中在细胞周期(*Cdt1*, *Plk1*, *Bub1b*, *Ttk*, *Kn1*, *Esco2*, *Cdc6*, *Ndc80*, *Cdc25b*, *Sgo1*, *Ccnb2*, *Esp1*, *Ccne1*, *Mcm4*, *Mcm5*, *Fbxo5*, *Bub1*, *Mcm2*),凋亡(*Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apa1*, *Bak*, *Caspase8*), P53信号通路(*P53*, *Ccnb2*, *Apa1*, *Bak*, *Bax*, *Gtse1*, *Caspase3*, *Ccne1*),花生四烯酸代谢通路(*Hpgds*, *Cyp2c54*, *Cyp2b10*, *Tbxas1*, *Cyp2c50*),半乳糖代谢(*Hk3*, *Gla*, *Hk2*, *Akr1b7*)等信号通路。RNA-seq测序分析发现复方胆草颗粒主要调控凋亡信号通路,并以qRT-PCR证实:相较于正常对照组,模型对照组肝组织*Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apa1*, *Bak*和*Caspase8* mRNA表达明显升高($P < 0.05$);与模型对照组比较,复

【基金项目】上海市科委创新项目(19401901500)。
Funded by the Shanghai Science and Technology Commission Innovation Project(19401901500).

【作者简介】李旭涛,男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病的临床与基础。Email:1848452154@qq.com;
王四园,男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病的临床与基础。Email:wangsiyuan2021@126.com。
#共同第一作者

【通信作者】陶艳艳,女,博士,研究员,研究方向:中医药防治肝病的临床与基础。Email:taoyanyan1023@126.com

方胆草颗粒各组肝组织 *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* 和 *Caspase8* mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$); TUNEL 染色结果表明复方胆草颗粒各组肝细胞细胞核固缩及凋亡小体数量减少 ($P < 0.01$)。结论 复方胆草颗粒对高脂饲料复合 CCl_4 致非酒精性脂肪性肝炎具有显著的保护作用, 其作用机制可能与调节凋亡相关基因有关。

【关键词】 复方胆草颗粒; 非酒精性脂肪性肝炎; 转录组测序; 凋亡

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2024) 12-1543-13

Transcriptomics-based analysis of the effect of compound Dancao granules on hepatocyte apoptosis in mice with non-alcoholic steatohepatitis

LI Xutao^{1#}, WANG Siyuan^{1#}, RUAN Tianyin¹, ZHANG Hao^{2,3}, PENG Yuan¹,
LIU Changhai^{1,4}, TAO Yanyan^{1*}

(1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China; 3. Shanghai Hongwen Biotechnology Technology Co., Ltd., Shanghai 201403, China; 4. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: TAO Yanyan. E-mail: taoyanyan@shutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective Transcriptome sequencing technology (RNA-seq) was used to analyze the mechanism of compound Dancao granules as an intervention for high-fat feed combined with carbon tetrachloride (CCl_4)-induced non-alcoholic steatohepatitis. **Methods** 45 male C57BL/6J mice were split into two groups at random: normal control group, model control group, obeccholic acid group 10 mg/(kg·d), and compound Dancao granules low- and high-dose groups 3.74 g/(kg·d) and 7.48 g/(kg·d), with 9 mice in each group. Normal diet was made available to the control group, and the mice in the model group were given a high-fat diet combined with the subcutaneous injection of CCl_4 , with 100% CCl_4 solution (4 mL/kg) in the first application, and 40% CCl_4 -olive oil solution (2 mL/kg) in the second application, twice a week for a total of 6 weeks. Each drug group was administered the respective drug from week 3 for a total of 4 weeks. 12 h after the last administration, the serum and liver tissues of mice in each group were collected, and a biochemical kit was used to detect serum liver function. Hematoxylin-eosin (HE), sirius scarlet, and oil red O staining were used to examine histopathological changes to the liver. The levels of IL-6, IL-10, TNF- α and TGF- β in mice liver were detected via ELISA, and the expression of α -SMA was observed by immunohistochemistry. Differential gene expression was analyzed by RNA-seq and functional enrichment analysis. To verify the differential expression of mRNA, quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was used. TDT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining was employed to identify apoptosis. **Results** The model control groups had significantly higher levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), and triglycerides (TG) than normal control group ($P < 0.01$). Additionally, there was obvious inflammatory cell infiltration in the liver tissue, collagen deposition in the sink and interlobule areas, and a significant increase in lipid droplet area ($P < 0.01$). The levels of IL-6 and TNF- α in liver tissue were significantly increased ($P < 0.01$), the levels of IL-10 and TGF- β were decreased ($P < 0.01$), and the expression of α -SMA was significantly increased ($P < 0.01$). The levels of TC, TG, ALT, and AST were significantly lower in groups that received compound Dancao granules and obeccholic acid than the model control group ($P < 0.01$), and inflammatory cell infiltration, collagen deposition, and fat accumulation in the sink and interlobule areas were improved ($P < 0.01$). The levels of IL-6 and TNF- α in liver tissue were significantly decreased ($P < 0.01$), the levels of IL-10 and TGF- β were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of α -SMA was significantly decreased ($P < 0.01$). RNA-seq sequencing result showed that 2819 genes in the normal control group were differentially expressed compared with the model control group, with 543 up-regulated and 2276 down-regulated genes. In a comparison of the model control group and compound Dancao granules group, 240 genes were differentially expressed, including 206 up-regulated genes and 34 down-regulated genes. There were 221 genes with overlapping expression in the 2 groups and functional enrichment highlighted cell cycle (*Cdt1*, *Plk1*, *Bub1b*, *Ttk*, *Knl1*, *Esco2*, *Cdc6*, *Ndc80*, *Cdc25b*, *Sgo1*, *Ccnb2*, *Esp1*, *Ccne1*, *Mcm4*, *Mcm5*, *Fbxo5*, *Bub1*, *Mcm2*), apoptosis (*Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak*, *Caspase8*), the P53 signaling pathway (*P53*, *Ccnb2*, *Apaf1*, *Bak*, *Bax*, *Gtsel*, *Caspase3*, *Ccne1*), arachidonic acid metabolism

(*Hpgds*, *Cyp2c54*, *Cyp2b10*, *Tbxas1*, *Cyp2c50*), galactose metabolism (*Hk3*, *Gla*, *Hk2*, *Akr1b7*) and other signaling pathway genes. RNA-seq sequencing analysis showed that compound Danicao granules mainly regulated the apoptosis signaling pathway, and qRT-PCR confirmed that the mRNA expression of *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* and *Caspase8* in the liver tissue of the model control group was increased compared with that of the normal control group ($P < 0.01$). Compared with the model control group, the compound Dancao granules group showed decreased mRNA expression of *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* and *Caspase8* in liver tissue ($P < 0.01$). TUNEL staining showed that the number of cells showing nuclear shrinkage and apoptotic bodies decreased in the compound Dancao granule administration group.

Conclusions Compound Dancao granules had a significant protective effect against non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat feed combined with CCl_4 , and its mechanism might be connected to the control of genes linked to apoptosis.

【 Keywords 】 compound Dancao granules; non-alcoholic steatohepatitis; transcriptome sequencing technology; apoptosis

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

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种由高水平的游离脂肪酸导致的病理状态,肝细胞内脂质沉积,从而引发脂肪变性,NAFLD 疾病谱包括非酒精性肝脂肪变、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝细胞癌^[1]。2016 年数据显示,中国的非酒精性脂肪性肝炎病例为 3261 万,相关建模预计 2030 年发病率将增长 48%,达到 4826 万^[2]。非酒精性脂肪性肝炎已经成为 21 世纪肝病领域第二大肝疾病,预计未来 10 年非酒精性脂肪性肝炎可能逐渐成为终末期肝病、肝移植和原发性肝癌主要的致病因素之一^[3],然而目前缺乏针对性药物。

NASH 在中医上属于“肝癖”的范畴,肝失疏泄、脾运失健、湿热内蕴和气血郁滞是主要病机,治法治则以补气健脾疏肝、清热燥湿、活血化瘀为主^[4]。复方胆草颗粒全方由龙胆草、鸡血藤、红花、当归和黄芪组成,具有益气疏肝、活血化瘀、清热燥湿的功效,契合肝癖主要病机。本研究构建小鼠 NASH 模型,基于转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq),分析复方胆草颗粒干预 NASH 的重要调控因子,并进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 45 只,体重 (23 ± 2)g,由上海吉辉实验动物饲养有限公司提供【SCXK(沪)2022-0009】。饲养环境:自由饮食,昼夜 12 h 循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25 ℃,相对湿度 40% ~ 60%,饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】,本实验经上海中医药大学实验动物福利伦理委员会批准

(PZSHUTCM2311100006)。

1.1.2 药物

复方胆草颗粒由龙胆草 1500 g (辽宁抚顺,批号:20200801)、鸡血藤 1500 g (云南昭通,批号:20210701)、当归 1500 g (甘肃定西,批号:20210601)、红花 1500 g (新疆伊犁,批号:20210801)、黄芪 1500 g (甘肃陇西,批号:20210603),均购自于桂林中南(亳州)药业科技有限公司。上述药材置于清水中浸泡 2 h,加热回流提取 2 次。第 1 次用水质量为总药材质量的 10 倍,第 2 次用水质量为总药材质量的 8 倍;每次 1.5 h,两次滤液合并,浓缩、55 ~ 60 ℃ 干燥至得膏率为 17.45%;奥贝胆酸(批号:HY-12222),购自美国 Med Chem Express 公司。

1.1.3 主要试剂及仪器

高脂饲料(批号:D190723;组成百分比为:14% 蛋白、47% 碳水化合物、29% 脂肪)购自戴茨生物科技(无锡)有限公司;谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)试剂盒(批号:C009-1-1、C010-1-1),购自南京建成生物工程研究所;总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)检测试剂盒(批号:A0-10027、A0-10017),购自浙江东瓯诊断产品有限公司;四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)(批号:10006480),购自国药集团;TRIzol Reagent、总 RNA 提取试剂盒(批号:F919KB3054、B518811),购自上海生工生物工程股份有限公司;反转录试剂盒、扩增试剂盒(批号:AJ92014A、AJF0343A),购自日本 TaKaRa 公司;ApopTag 过氧化氢酶原位凋亡检测试剂盒(批号:S7100),购自德国 MERCK 公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号:ab124964),购自

英国 Abcam 公司;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) ELISA 试剂盒(批号: 88-7064-88、88-7105-88、88-7324-88、88-8350-22), 购自美国赛默飞世尔科技公司。

IX70 显微图像分析系统(日本 Olympus 公司); Bio-Tek Power Wave XS 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); ABI VIIA 荧光定量逆转录 PCR(quantitative reverse transcription PCR, q-RT-PCR) 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 病理脱水机(SPP300)、包埋机(EG1140)、切片机(CM1850)、展片水浴锅(HI 1210), 均购自德国 LEICA 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

45 只小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、复方胆草颗粒低、高剂量组及奥贝胆酸组, 每组 9 只。模型制备参考既往方法^[5], 首次给予 100% CCl₄ 溶液 4 mL/kg 皮下注射, 然后给予 40% CCl₄-橄榄油溶液 2 mL/kg 皮下注射, 每周 2 次, 共 6 周。模型对照组、复方胆草颗粒低、高剂量组及奥贝胆酸组小鼠全程给予高脂饲料, 正常对照组给予普通饲料, 第 3 周开始, 奥贝胆酸组、复方胆草颗粒低、高剂量组分别以奥贝胆酸 10 mg/(kg·d)、复方胆草颗粒 3.74 g/(kg·d) 和 7.48 g/(kg·d) 的剂量灌胃, 共 4 周, 正常对照组和模型对照组灌胃相同体积的生理盐水。

1.2.2 获取标本

6 周末, 小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(3 mg/kg) 麻醉、打开腹腔、下腔静脉取血、离心后血清置于 -80 ℃ 保存, 用于检测血清肝功二项(AST、ALT) 和生化二项(TC、TG)。摘取肝、脾并分别称重; 切取小鼠肝右叶约 0.5 cm × 1.0 cm 大小组织置入 10% 中性福尔马林缓冲液中固定。此外, 取肝组织各 100 mg 存于 TRIzol 中, 用于提取 RNA。

1.2.3 各组小鼠肝组织 NAFLD 活动度积分(NAFLD activity score, NAS) 评分及胶原面积和油红面积半定量分析

采用苏木素-伊红(HE) 染色观察肝组织学损伤, 由本研究所两位病理专家盲法阅片计算 NAS 评分, 采用美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组指南的 NAS 积分^[6](表 1)。胶原面积和

油红面积半定量分析; 使用软件 Image J 1.8.0 分析天狼猩红染色和油红染色中的胶原纤维面积比和脂滴面积比, 即红色胶原和红色脂肪滴的总面积占所使用的整个 20 倍放大图像面积的百分比来完成胶原和油红定量。

Table 1 Nonalcoholic fatty liver disease NAS scale				
项目 Item	评分/分 Scale/points			
	0	1	2	3
肝细胞脂肪样变比例/% Proportion of hepatocytes with steatosis/%	0 ~ 5	5 ~ 33	34 ~ 66	66 ~ 100
小叶内炎症病灶个数/个 Number of inflammatory lesions in the lobule/number	0	0 ~ 2	2 ~ 4	> 4
肝细胞气球样变 Hepatocellular ballooning	无 None	少见 Few	多见 Many	-

1.2.4 肝组织炎症因子检测

采用酶联免疫吸附试验(ELISA) 试剂盒检测肝组织中 IL-6、IL-10、TNF- α 和 TGF- β 的浓度。在 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH = 7.4) 中, 在冰水浴中匀浆, 并在 4 ℃ 下 3000 r/min 离心 15 min, 获得肝匀浆。每次检测时, 对所有小鼠的 100 μ L 肝匀浆进行连续稀释, 以确保所得值在每个试剂盒提供的标准值的线性范围内, ELISA 实验过程严格遵循试剂说明书操作。

1.2.5 免疫组化法检测肝组织 α -SMA 表达

将肝组织石蜡切片分级脱蜡复水, 柠檬酸盐缓冲液高压热修复, 3% 双氧水去除内源性酶, 5% BSA 室温下封闭 30 min, 使用一抗 α -SMA(1 : 1000), 4 ℃ 摇床孵育过夜。PBS 洗涤, 滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H + L) 二抗(1 : 50), 室温孵育 1 h。PBS 洗涤, 滴加 SABC 链霉素室温孵育 30 min。加入 DAB 显色液, 在显微镜下控制显色, 苏木素复染细胞核, 冲洗返蓝, 0.4% 盐酸乙醇分化, 中性树胶封片。数字病理扫描仪采集图片, 使用 Image J 1.8.0 软件分析肝组织 α -SMA 表达情况。

1.2.6 脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 染色检测小鼠肝细胞凋亡

将肝组织石蜡切片分级脱蜡复水, 使用蛋白酶 K(20 μ g/mL) 预处理组织后, 3% 双氧水去除内源性

酶,按照试剂说明书步骤进行染色,结束后使用甲基绿染色复染细胞核,显微镜下观察,封片后数字病理扫描仪采集图片,使用 Image J 1.8.0 软件,分析肝组织细胞凋亡情况。

1.2.7 肝组织转录组测序

首先提取肝组织的 RNA,对提取的 RNA 进行纯度检测,并检测其浓度,RNA 质检合格后,用 Illumina HiSeq X Ten 测序仪进行测量。使用 Trimmomatic v0.32 软件进行质控,筛除掉低质量碱基,得到高质量的 Clean Reads,使用 HISAT2 v2.2.1 和 Bowtie2 v2.3.2 软件,将 Clean Reads 与参考转录本进行比对,计算出基因的每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数值,并对表达量进行差异分析。得到差异表达基因后,设定筛选条件为 $P < 0.05$,以及差异倍数 (fold change,FC) $|\log FC| > 2$ 。使用 R 语言筛选出差异常基因后,进行 GO 和 KEGG 信号通路分析。

1.2.8 qRT-PCR 检测相关基因表达

通过 TRIzol 法提取各组小鼠肝组织总 RNA,根据制造商的说明书使用逆转录试剂盒 (TaKaRa) 逆转录为 cDNA,取 cDNA 2 μ L,加入上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L,DEPC 水 6.8 μ L,2 $\times$ SYBR Premin Ex Taq 10 μ L,50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.4 μ L,共 20 μ L,进入扩增程序,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s 后,以 95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 34 s 为 1 次,循环 40 次。各组设 3 个复孔, β -actin 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组样本 mRNA 的相对表达量,引物由 NCBI 在线引物设计软件 Primer-Blast 设计(表 2)。

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	长度/bp Length/bp
Caspase3	F: AGTGGGACTGATGAGGAGATGGC	140
	R: ATGCTGCAAAGGGACTGGATGAAC	
Bax	F: GCTACAGGGTTTCATCCAGGATCG	127
	R: TGCTGTCCAGTTCATCTCCAATTCCG	
P53	F: ACCGCCGACCTATCCTTACCATC	89
	R: GGCACAAACACGAACCTCAAAGC	
Apa1	F: CTGACGGGACTTTAAGGCTTTGGG	117
	R: TCACGATCACCTCCACATCCTCTG	
Caspase8	F: GCATCCTGACTGGCGTGAAC	81
	R: AGGTGGGCTGTGGCATCTG	
Bak	F: CGGGAATGCCTACGAACCTTCAC	100
	R: ACGGTAGCCAAAGCCCAGGAG	
β -actin	F: AGGTGGTGTGAACGGATTTC	153
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 进行数据分析,Graph Pad Prism 10 绘制图片。结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 胆草颗粒对小鼠血清生化指标的影响

相较于正常对照组,模型对照组血清 ALT、AST、TC、TG 水平明显升高($P < 0.01$);与模型对照组相比,复方胆草颗粒低、高剂量组和奥贝胆酸组血清 ALT、AST、TC、TG 水平显著降低($P < 0.01$);相比于奥贝胆酸组,复方胆草颗粒高剂量组 TC 水平降低($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 各组小鼠肝组织炎症、胶原沉积和脂肪蓄积比较

与正常对照组比较,模型对照组小鼠肝组织炎症细胞浸润明显,出现大量脂肪空泡,油红 O 染色显示红色脂滴面积明显增大,汇管区及小叶间胶原沉积明显,大量肝细胞呈气球样变,NAS 评分明显升高($P < 0.01$);与模型对照组相比,复方胆草颗粒各剂量组和奥贝胆酸组小鼠肝组织炎症浸润、肝细胞气球样变、胶原沉积、油红染色面积均不同程度减少($P < 0.01$),NAS 评分降低($P < 0.01$);相比于奥贝胆酸组,复方胆草颗粒各剂量组给药后油红面积减少($P < 0.01$),脂肪蓄积改善(表 3、图 2)。

2.3 各组小鼠肝组织炎症因子水平比较

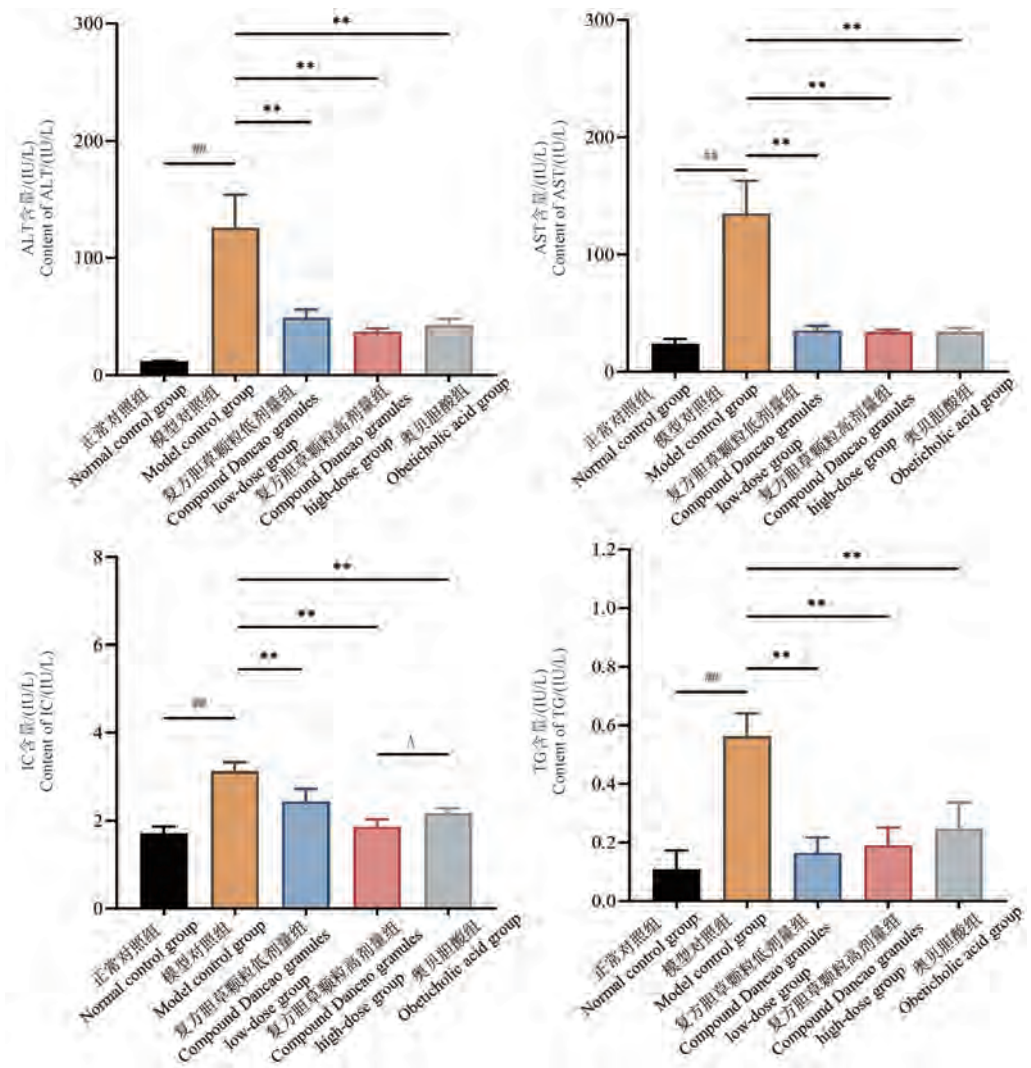
与正常对照组比较,模型对照组小鼠肝组织中 IL-6 和 TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$),IL-10 和 TGF- β 水平下降($P < 0.01$);给药后,复方胆草颗粒各剂量组和奥贝胆酸组小鼠肝组织 IL-6 和 TNF- α 水平明显降低($P < 0.01$),IL-10 和 TGF- β 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)(图 3)。

2.4 各组小鼠肝组织 α -SMA 含量比较

免疫组化法检测肝组织 α -SMA 表达结果如图 4 所示。与正常对照组比较,模型对照组小鼠肝组织中 α -SMA 的表达明显升高($P < 0.01$);与模型对照组相比,复方胆草颗粒各剂量组和奥贝胆酸组小鼠肝组织 α -SMA 的表达明显降低($P < 0.01$)。

2.5 差异基因表达筛选结果

使用 R 语言对各组标准化之后的数据进行差异表达分析,结果显示,与正常对照组相比,模型对照组小鼠表达显著上调的基因有 543 个,2276 个基



注:与正常对照组相比,##*P* < 0.01;与模型对照组相比,***P* < 0.01;与奥贝胆酸组相比,^*P* < 0.05。(下图/表同)

图 1 各组小鼠血清 ALT、AST、TC 和 TG 水平比较(*n* = 9)

Note. Compared with normal control group,##*P* < 0.01. Compared with model control group,***P* < 0.01. Compared with obeticholic acid group,^*P* < 0.05. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Comparison of ALT、AST、TC and TG level in serum of mice in each group(*n* = 9)

表 3 各组小鼠 NAS 评分及半定量分析比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Comparison of NAS score and semi-quantitative analysis in each group($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别 Groups	NAS 评分/分 NAS score/points	胶原面积/% Collagen per area/%	油红面积/% Oil red per area/%
正常对照组 Normal control group	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	0.616 ± 0.358
模型对照组 Model control group	6.57 ± 0.79 ^{##}	4.581 ± 1.549 ^{##}	44.830 ± 3.419 ^{##}
复方胆草颗粒低剂量组 Compound Dancao granules low-dose group	3.42 ± 0.79 ^{**}	2.275 ± 0.639 ^{**}	26.570 ± 1.988 ^{** ^ ^}
复方胆草颗粒高剂量组 Compound Dancao granules high-dose group	4.00 ± 1.41 ^{**}	2.496 ± 1.156 ^{**}	23.570 ± 2.071 ^{** ^ ^}
奥贝胆酸组 Obeticholic acid group	3.43 ± 0.78 ^{**}	2.283 ± 0.751 ^{**}	31.710 ± 3.592 ^{**}

注:与奥贝胆酸组相比,^^*P* < 0.01。(下图同)

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

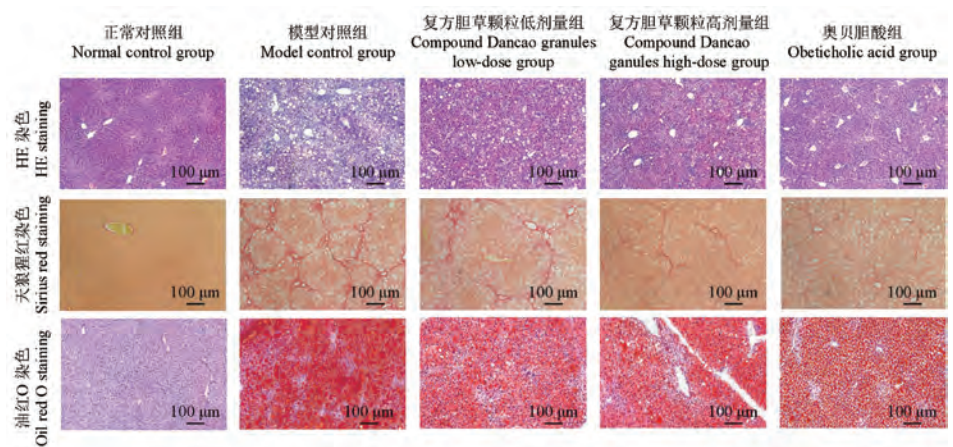
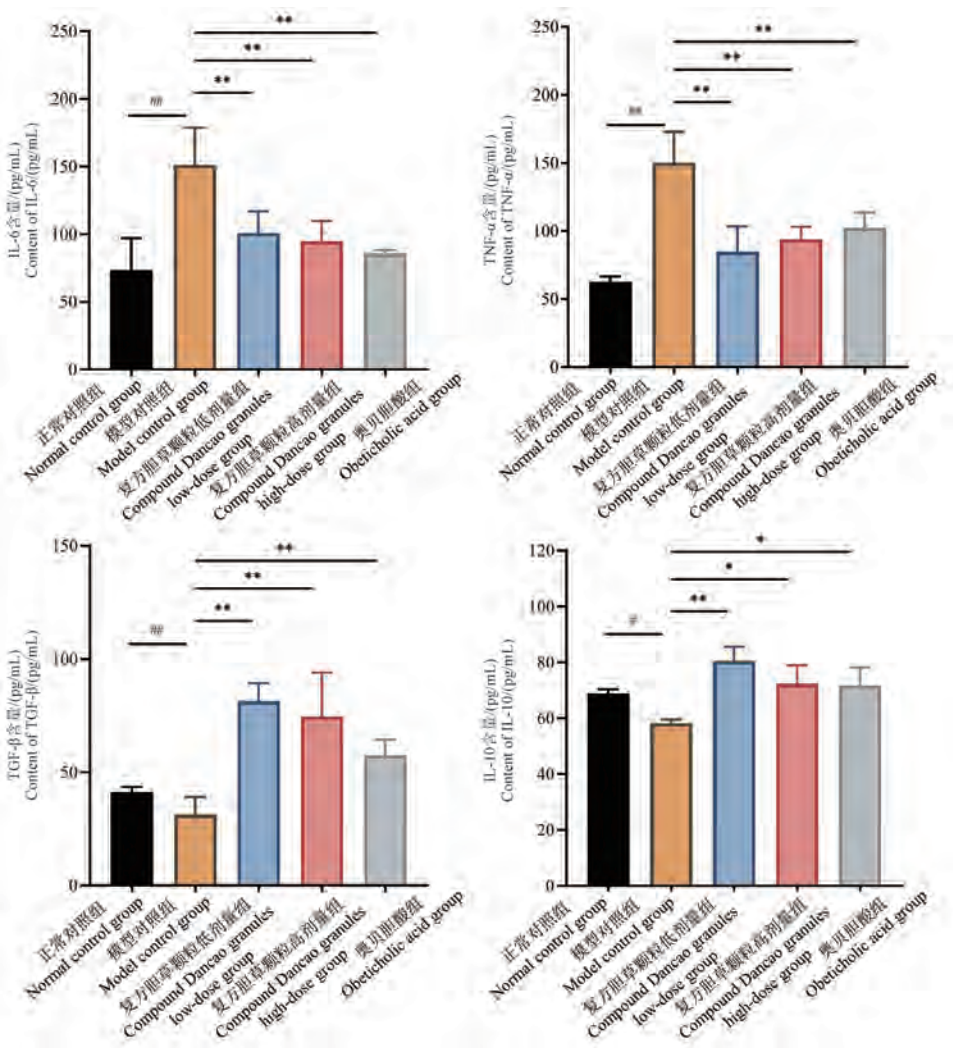


图 2 各组小鼠肝组织炎症、胶原沉积和脂肪蓄积比较($n = 9$)

Figure 2 Comparison of inflammation ,collagen deposition and neutral lipid accumulation in liver tissue of mice in each group ($n = 9$)



注：与正常对照组相比， $^{\#}P < 0.05$ ；与模型对照组相比， $^{*}P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠肝组织炎症因子 IL-6、TNF- α 、TGF- β 和 IL-10 比较($n = 9$)

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

Figure 3 Comparison of IL-6、TNF- α 、TGF- β and IL-10 in liver tissue of mice in each group ($n = 9$)

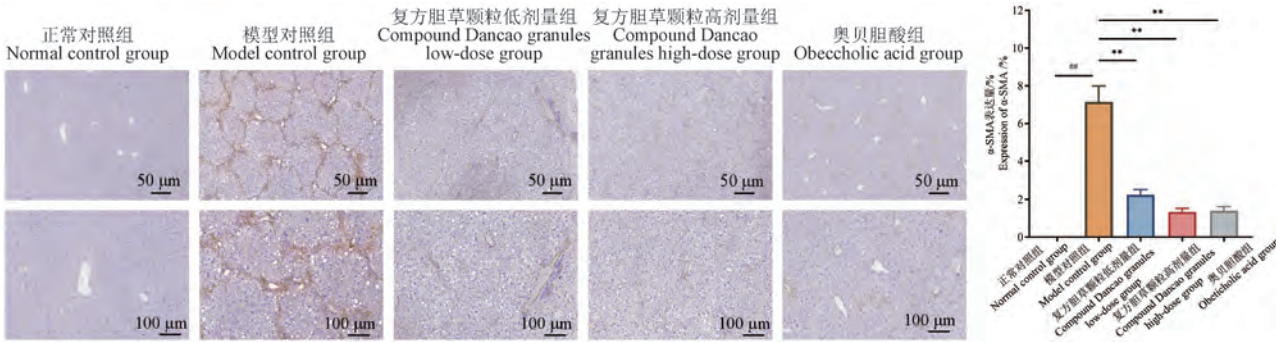


图 4 免疫组化法检测肝组织 α-SMA 表达及半定量分析

Figure 4 Immunohistochemical to detect of α-SMA expression and semi-quantitative analysis in liver

因表达显著下调;与模型对照组比较,复方胆草颗粒高剂量组小鼠肝显著上调的基因共 206 个,显著下调的基因共 34 个;对 2 组的差异基因取交集,显示差异基因共有 221 个(图 5)。

2.6 差异富集基因的 GO 功能和 KEGG 富集分析

差异表达基因 GO 功能预测本研究中 221 个差异表达基因比对到 30 个 GO 条目中($P < 0.05$),多数基因主要富集在细胞周期和细胞分裂等方面(图 6A)。KEGG 分析结果显示差异基因主要富集于 12 条信号通路中($P < 0.05$),其中细胞周期 (cell

cycle),马达蛋白 (motor proteins),细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction),凋亡 (apoptosis),P53 信号通路 (P53 signaling pathway),花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism),半乳糖代谢 (galactose metabolism) 等在 KEGG 中显著富集(图 6B)。差异基因 KEGG 结果分析见表 4。

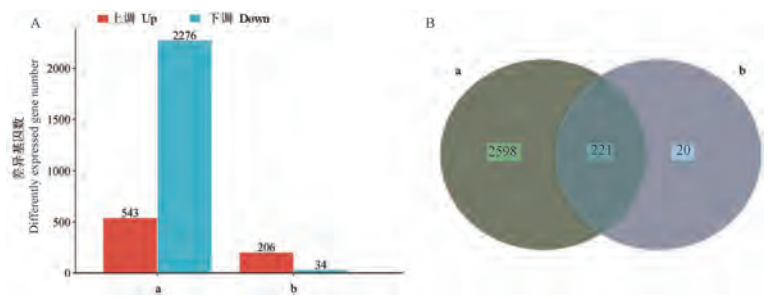
2.7 qRT-PCR 检测差异基因的表达

在表达的差异基因中选择与凋亡相关的差异基因,通过 qRT-PCR 验证转录组测序结果的可靠性,结果提示,与正常对照组比较,模型对照组小鼠

表 4 差异基因 KEGG 富集信号通路(部分)

Table 4 KEGG enrichment signaling pathway (Part)

KEGG 通路 KEGG pathway	P 值 P value	基因 Gene
细胞周期 Cell cycle	1. 19E-12	<i>Cdt1, Plk1, Bub1b, Ttk, Knl1, Escv2, Cdc6, Ndc80, Cdc25b, Sgo1, Ccnb2, Esp1, Ccne1, Mcm4, Mcm5, Fbxo5, Bub1, Mcm2</i>
马达蛋白 Motor proteins	3. 64E-04	<i>Cenpe, Tubb2b, Kif18b, Kifc1, Kif14, Myo5a, Kif22, Kif20a, Kif11, Kif4</i>
细胞因子相互作用 Cytokine-cytokine receptor interaction	5. 97E-03	<i>Ccr1, Csf2rb2, Il1rn, Ccl6, Inhbb, Tnfrsf11a, Il7r, Eda2r, Ccr2, Pgf4</i>
P53 信号通路 P53 signaling pathway	1. 37E-03	<i>P53, Ccnb2, Apaf1, Bak, Bax, Gtse1, Caspase3, Ccne1</i>
卵母细胞减数分裂 Oocyte meiosis	4. 26E-04	<i>Sgo1, Ccnb2, Esp1, Ccne1, Plk1, Fbxo5, Bub1, Aurka</i>
凋亡 Apoptosis	6. 80E-03	<i>Apaf1, Caspase8, Caspase3, Bak, Bax, P53</i>
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	1. 55E-02	<i>Hpgds, Cyp2c54, Cyp2b10, Tbxas1, Cyp2c50</i>
类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	2. 17E-02	<i>Cyp2c54, Srd5a1, Cyp2b10, Cyp2c50, Akr1c18</i>
视黄醇代谢 Retinol metabolism	2. 40E-02	<i>Cyp2c54, Cyp2b10, Aox3, Cyp2c50, Bco1</i>
蛋白消化与吸收 Protein digestion and absorption	3. 38E-02	<i>Kcnk5, Slc7a8, Col5a2, Atp1a3, Kcnn4</i>
果糖与甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	7. 65E-03	<i>Hk3, Fbp2, Hk2, Akr1b7</i>
半乳糖代谢 Galactose metabolism	5. 49E-03	<i>Hk3, Gla, Hk2, Akr1b7</i>

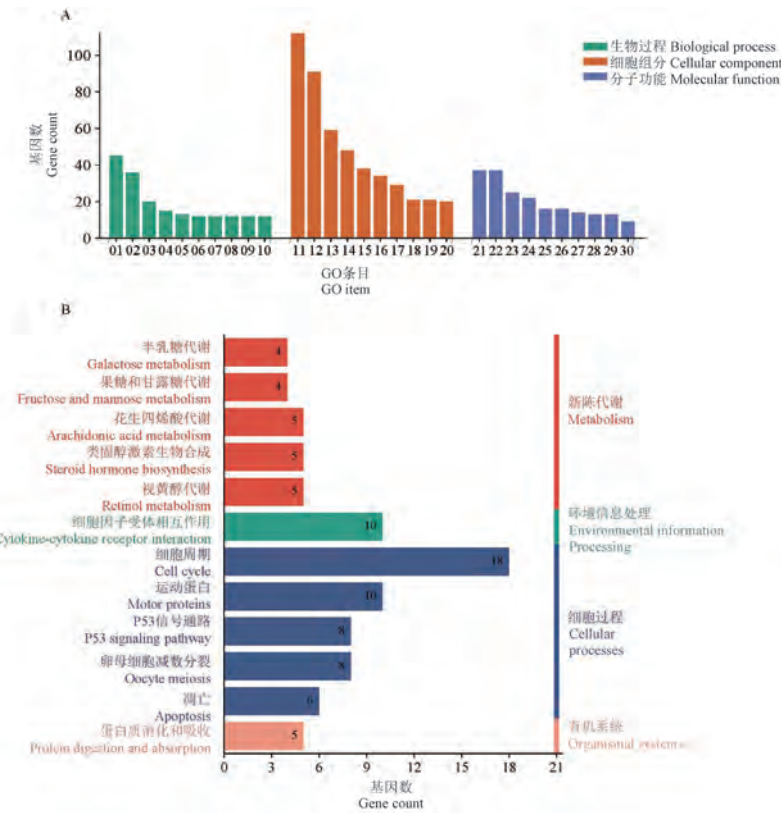


注:A:差异基因柱状图;B:韦恩图;a:正常对照组与模型对照组相比;b:模型对照组与复方胆草颗粒高剂量组相比。

图 5 差异基因表达筛选结果

Note. A. Differently expressed gene histogram. B. Venn diagram. a. Normal control vs model control group. b. Model control group vs compound Dancao granules high-dose group.

Figure 5 Results of differential gene expression screening



注:A:差异表达基因 GO 功能分析;B:KEGG 分析结果;01:细胞周期;02:细胞分裂;03:染色体分离;04:细胞对 DNA 损伤刺激的反应;05:凋亡过程;06:有丝分裂姐妹染色单体分离;07:有丝分裂细胞周期;08:细胞周期的调节;09:蛋白质磷酸化;10:凋亡过程负向调控;11:细胞质;12:细胞核;13:细胞液;14:核浆;15:细胞骨架;16:染色体;17:细胞外区域;18:染色体,着丝粒区;19:微管;20:着丝粒;21:ATP 结合;22:核苷酸结合;23:水解酶活性;24:微管结合;25:氧化还原酶活性;26:钙离子结合;27:ATP 酶活化;28:蛋白激酶结合;29:激酶活化;30:肌动蛋白结合。

图 6 差异基因的 GO 富集分布图和 KEGG 通路富集分析

Note. A. Analysis of differential expression gene ontology. B. Analysis of KEGG. 01. Cell cycle. 02. Cell division. 03. Chromosome segregation. 04. Cellular response to DNA damage stimulus. 05. Apoptosis process. 06. Mitotic sister chromatid segregation. 07. Mitotic cell cycle. 08. Regulation of cell cycle. 09. Protein phosphorylation. 10. Negative regulation of apoptotic process. 11. Cytoplasm. 12. Nucleus. 13. Cytosol. 14. Nucleoplasm. 15. Cytoskeleton. 16. Chromosome. 17. Extracellular region. 18. Chromosome, centromeric region. 19. Microtubule. 20. Kinetochore. 21. ATP binding. 22. Nucleotide binding. 23. Hydrolase activity. 24. Microtubule binding. 25. Oxidoreductase activity. 26. Calcium ion binding. 27. ATPase activity. 28. Protein kinase binding. 29. Kinase activity. 30. Actin binding.

Figure 6 Distribution of GO enrichment for differentially expressed gene and KEGG pathway enrichment

的 *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* 和 *Caspase8* mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型对照组相比, 复方胆草颗粒各剂量组小鼠的 *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* 和 *Caspase8* mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$) (图 7)。

2.8 复方胆草颗粒对各组小鼠肝细胞的凋亡影响
TUNEL 染色及半定量分析结果表明, 与模型对照组相比, 复方胆草颗粒治疗后, 小鼠肝细胞核固缩及凋亡小体数量减少 ($P < 0.01$), 提示凋亡在复方胆草颗粒治疗 NASH 小鼠中的关键作用 (图 8,9)。

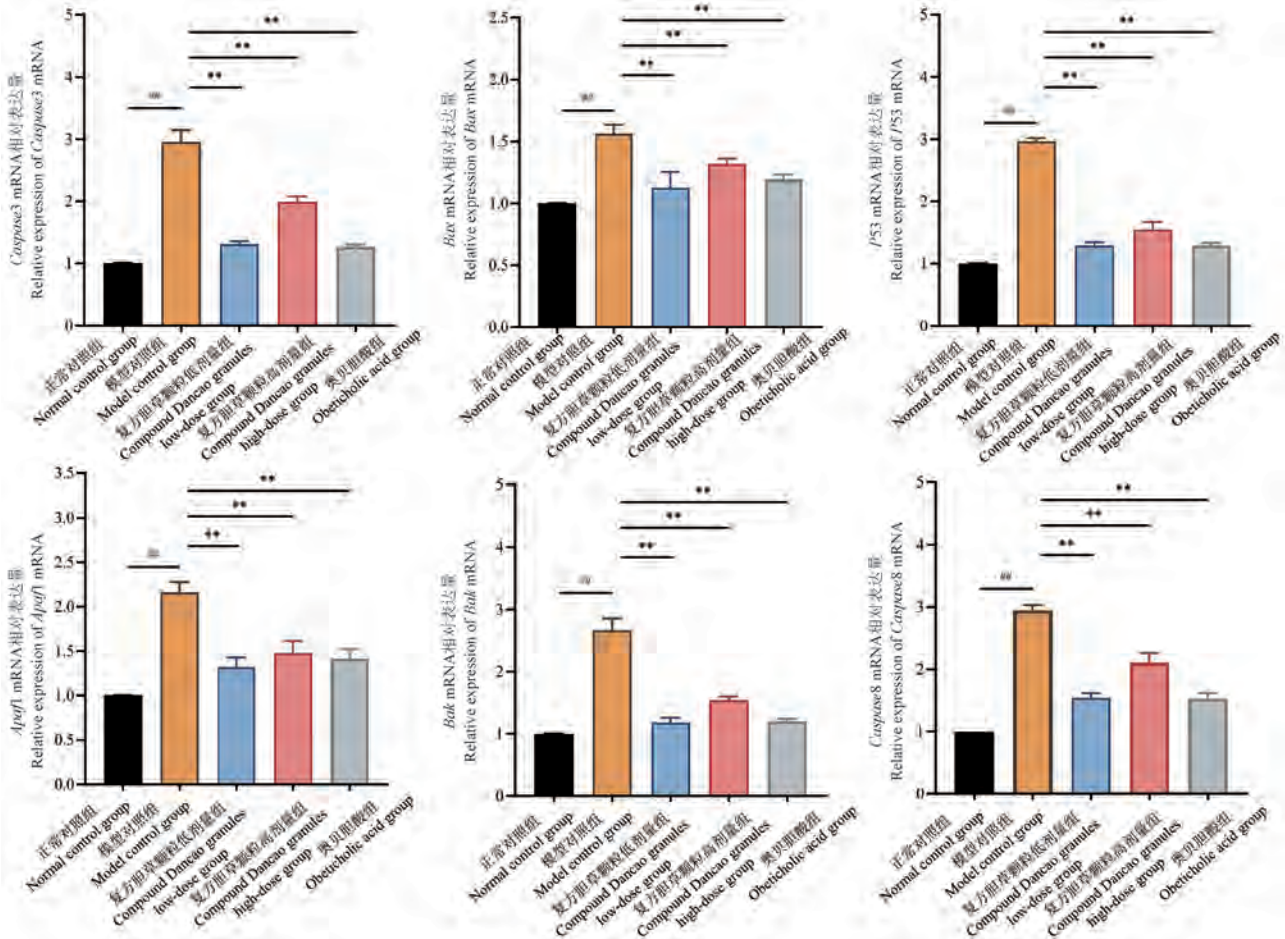


图 7 各组小鼠肝组织 *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* 和 *Caspase8* mRNA 表达的比较
Figure 7 Comparison of *Caspase3*, *Bax*, *P53*, *Apaf1*, *Bak* and *Caspase8* mRNA expressions in liver tissue of mice in each group

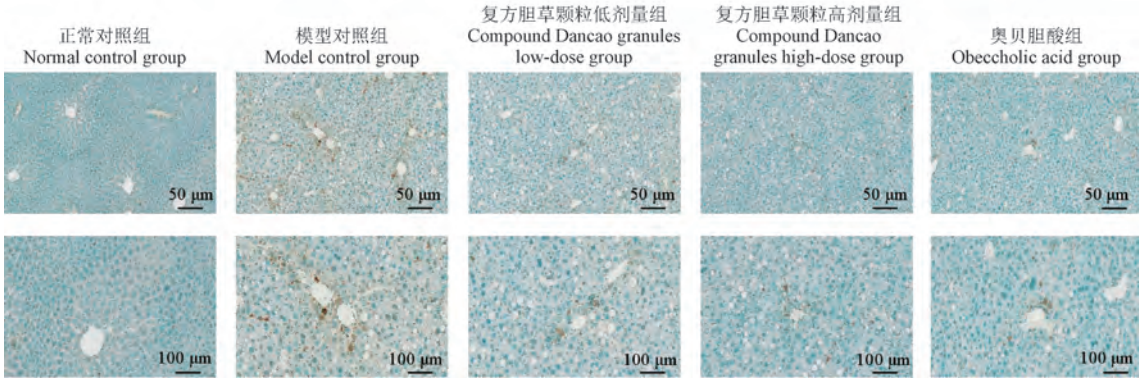


图 8 各组 TUNEL 染色结果
Figure 8 Results of TUNEL staining in each group

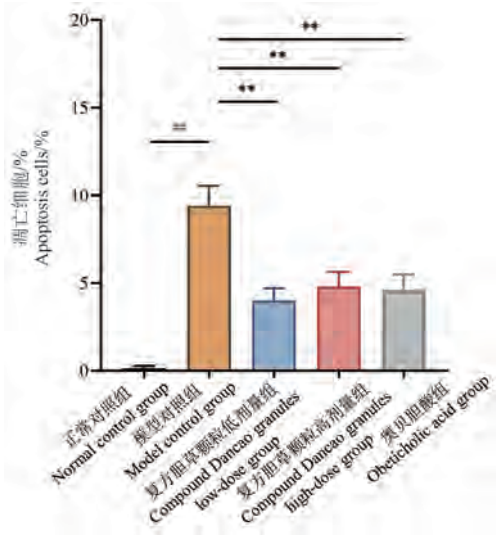


图 9 肝细胞的凋亡率半定量分析($n = 9$)
Figure 9 Semi-quantitative analysis of apoptosis rate of hepatocytes($n = 9$)

3 讨论

参照中医辨证论治的思想观点,NASH 可分为 4 个证型:肝郁脾虚证,痰湿内阻证,湿热蕴结证和痰瘀互结证。治疗方剂以逍遥散、二陈汤、葛根芩连汤和下淤血汤为代表^[7]。临床上 NASH 常多证兼夹,最新的专家共识认为湿热和淤血是 NASH 的主要病理因素^[4]。本研究使用的复方胆草颗粒全方由龙胆草、鸡血藤、红花、当归和黄芪组成^[8],其中龙胆草清热燥湿、泻肝胆火;鸡血藤活血补血;红花活血通经、疏肝理气;当归补血活血;黄芪补气升阳、益卫固表,共奏清热燥湿、活血化瘀、益气疏肝之功,契合肝癖主要病机。同时现代药理研究进一步表明上述中药活性成分除具有保肝利胆^[9]、减轻纤维化^[10-11]、抗氧化的作用外,还具有抗细胞凋亡^[12-15]的作用,病理条件下的肝细胞凋亡在造成肝损伤的同时推进 NASH 的进展^[16],因此复方胆草颗粒能否通过调节肝细胞凋亡改善 NASH 值得进一步研究。

动物实验结果显示复方胆草颗粒可以明显减轻小鼠血清 ALT、AST、TC 和 TG 指标,降低肝组织 IL-6 和 TNF- α 的水平,升高 IL-10 和 TGF- β 的水平,病理结果表明其可以减少炎症细胞浸润,改善肝脂肪变性,减少胶原纤维的沉积,降低肝组织 α -SMA 的表达水平对 NASH 的改善具有显著作用。转录组学可以在基因水平上监测复方胆草颗粒对 NASH 的影响,并确定与之相关的潜在干预靶点,GO 和

KEGG 富集分析结果发现复方胆草颗粒主要影响细胞周期、凋亡、P53 信号通路,花生四烯酸和半乳糖代谢等。

细胞凋亡是为维持细胞自身内环境稳定而进行的一种自发的死亡过程^[17]。病理条件下的肝细胞凋亡是造成肝损伤和 NAFLD 进展的最基本的中心环节^[16]。肝细胞凋亡与炎症和纤维化进展密切相关,随着研究的不断深入,研究人员将细胞凋亡的途径分为线粒体途径^[18]、内质网应激途径^[19]和死亡受体途径^[20],Bax、Bak 和 Apaf-1 在线粒体途径中发挥重要作用,研究发现 Bax 和 Bak 可以深入线粒体外膜形成寡聚膜孔,促进细胞色素 C 的释放^[21],Apaf-1 和细胞色素 C 结合可以最终导致 Caspase3 的激活^[22-23]。P53 蛋白可以上调 Apaf1 的表达进而使细胞对线粒体凋亡途径更加敏感^[24]。Caspase8 是死亡受体途径中的关键因子,死亡配体与死亡受体结合后可以激活 Caspase8,进而激活 Caspase3,最终导致细胞凋亡^[20]。临床数据表明,应用 TUNEL 法检查 NASH 患者肝组织活检标本时,发现肝细胞凋亡数量与患者肝炎症和纤维化程度呈正相关^[25],这一点在 NASH 小鼠上得到了进一步验证^[26-27]。

本实验通过 qRT-PCR 发现,参与凋亡的相关基因 *Caspase3*,*Bax*,*P53*,*Apaf1*,*Bak* 和 *Caspase8* mRNA 的表达在模型对照组小鼠中明显升高,复方胆草颗粒可以显著减少上述基因的表达,TUNEL 染色结果进一步证实凋亡在 NASH 中的关键作用。综上所述,复方胆草颗粒对高脂饲料复合 CCl₄ 诱导的 NASH 小鼠模型具有较好的保护作用,其机制可能与调控小鼠肝细胞凋亡相关基因表达相关。

参 考 文 献(References)

[1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 年最新版) [J]. 临床肝胆病杂志,2018,34 (5) : 947-957.

National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association Fatty Liver Expert Committee. Chinese Medical Doctor Association. Guidelines of prevention and treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a 2018 update [J]. Chin J Clin Hepatol, 2018, 34 (5) : 947-957.

[2] ESTES C, ANSTEE Q M, ARIAS-LOSTE M T, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030 [J]. J Hepatol, 2018, 69 (4) : 896-904.

- [3] 赵文霞, 许二平, 王宪波, 等. 非酒精性脂肪性肝炎中医诊疗指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(5): 1041-1048.
- ZHAO W X, XU E P, WANG X B, et al. Diagnosis and treatment guideline for Chinese medicine on non-alcoholic steatohepatitis [J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(5): 1041-1048.
- [4] 张莉, 季光. 非酒精性脂肪性肝炎中医诊疗专家共识 (2023) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2024, 32(1): 1-7.
- ZHANG L, JI G. Expert consensus on traditional chinese medicine diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease (2023) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2024, 32(1): 1-7.
- [5] 陶艳艳, 陈园, 陈高峰, 等. 当归补血汤不同配比组方的抗肝纤维化作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(1): 40-44.
- TAO Y Y, CHEN Y, CHEN G F, et al. Anti-hepatic fibrosis effect of "Danggui Buxue Decoction" with different proportions of Radix astraga and Angelica sinensis in rats [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2008, 22(1): 40-44.
- [6] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [7] 梁欣宇, 林素琴, 王一斌, 等. 中药干预非酒精性脂肪性肝炎的机制研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(4): 384-392.
- LIANG X Y, LIN S Q, WANG Y B, et al. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine in the intervention of nonalcoholic steatohepatitis [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2023, 39(4): 384-392.
- [8] 宋贝婕, 宋卫忠, 华吉涛, 等. 一种治疗脂肪性肝病的中药复方药物: 202111021988.6 [P]. 2022-02-11.
- SONG B J, SONG W Z, HUA J T, et al. A traditional Chinese medicine compound drug for the treatment of fatty liver disease: 202111021988.6 [P]. 2022-02-11.
- [9] 包玉华, 巴图德力根, 乌恩宝音, 等. 德都红花-7 味散保肝利胆及调节免疫功能的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1575-1578.
- BAO Y H, BATUDELIGEN, WUENBAOYIN, et al. Rharmacodynamic research on protecting liver and gallbladder and immune regulating function of deduhonghua-7 powder [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2013, 31(7): 1575-1578.
- [10] 韩云雪, 李丽梅, 石洁琼. 鸡血藤提取物对大鼠纤维化肝细胞中胶原蛋白表达及 TGF- β 1/p38MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(21): 2608-2612, 2618.
- HAN Y X, LI L M, SHI J Q. Effects of caulis spatholobixtract on collagen expression and TGF- β 1/p38MAPK signaling pathway in rat fibrotic hepatocytes [J]. Chin J Immunol, 2020, 36(21): 2608-2612, 2618.
- [11] 巴图德力根, 韩志强, 娜日苏. 德都红花-7 味散对 CCl₄ 诱导实验性肝纤维化疗效和 IL-1、IL-6、TNF- α 的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(4): 316-322.
- BATUDELIGEN, HAN Z Q, NARISU. The effects of Deduhonghua-7 pill on the degree of CCl₄ induced experimental hepatic fibrosis and cytokines IL-1, IL-6, TNF-A [J]. Chin J Immunol, 2012, 28(4): 316-322.
- [12] 吕晓梅, 卢任玲, 马月宏, 等. 红花对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的保护作用及其机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(11): 943-949.
- LYU X M, LU R L, MA Y H, et al. Protective effect of Honghua (Safflower, Flos Carthami) on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats and mechanism study [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2018, 41(11): 943-949.
- [13] 李志芳, 贺晓云, 许孟霞, 等. 龙胆苦苷对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝损伤、肝纤维化、氧化应激和 Nrf2 通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(6): 1405-1410.
- LI Z F, HE X Y, XU M X, et al. Effects of gentiopicrin on liver injury, liver fibrosis, oxidative stress and Nrf2 pathway in CCl₄-induced liver fibrosis rats [J]. Chin J Geront, 2024, 44(6): 1405-1410.
- [14] LI Y, ZHENG D, SHEN D, et al. Protective effects of two safflower derived compounds, kaempferol and hydroxysafflower yellow A, on hyperglycaemic stress-induced podocyte apoptosis via modulating of macrophage M1/M2 polarization [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 2462039.
- [15] 王伊雯, 郭真, 杜曾, 等. 茵陈蒿汤和黄芪汤调控线粒体途径细胞凋亡防治胆汁淤积性肝损伤的比较研究 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 155-160.
- WANG Y W, GUO Z, DU Z, et al. Comparative study of Yinchenhao Decoction and Huangqi Decoction by regulating apoptosis via the mitochondrial pathway in treatment and prevention of chronic cholestatic liver injury [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(1): 155-160.
- [16] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.
- [17] KANDA T, MATSUOKA S, YAMAZAKI M, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(25): 2661-2672.
- [18] JEONG S Y, SEOL D W. The role of mitochondria in apoptosis [J]. BMB Rep, 2008, 41(1): 11-22.
- [19] ZHANG J, GUO J, YANG N, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1051.
- [20] ARDUINI A, SERVIDDIO G, TORMOS A M, et al. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases [J]. Front Biosci, 2012, 4(6): 2233-2252.
- [21] FLORES-ROMERO H, DADSENA S, GARCÍA-SÁEZ A J. Mitochondrial pores at the crossroad between cell death and inflammatory signaling [J]. Mol Cell, 2023, 83(6): 843-856.
- [22] SCHWABE R F, LUEDDE T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(12): 738-752.
- [23] JIANG X, WANG X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(40): 31199-31203.
- [24] YUN T, YU K, YANG S, et al. Acetylation of p53 protein at

lysine 120 up-regulates apaf-1 protein and sensitizes the mitochondrial apoptotic pathway [J]. J Biol Chem, 2016, 291 (14): 7386-7395.

[25] FELDSTEIN A E, CANBAY A, ANGULO P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gastroenterology, 2003, 125 (2): 437-443.

[26] NASIRI-ANSARI N, NIKOLOPOULOU C, PAPOUTSI K, et al. Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in high fat diet fed ApoE^{-/-} mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 818.

[27] ZHOU J, HUANG N, GUO Y, et al. Combined obeticholic acid and apoptosis inhibitor treatment alleviates liver fibrosis [J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(3): 526-536.

[收稿日期] 2024-04-26

《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)综合性医药卫生类的核心期刊!

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

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

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



何志勇,李竣,王线,等. 大鼠下肢静脉曲张动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1556–1564.

HE Z Y, LI J, WANG X, et al. Establishment of a rat model of varicose veins of the lower limbs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1556–1564.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.006

大鼠下肢静脉曲张动物模型的建立

何志勇¹, 李竣², 王线³, 陈丹丹², 全志文², 戴加伟², 黄先菊^{2*}

(1. 中南民族大学 实验教学与工程训练中心, 创新创业学院, 武汉 430074; 2. 中南民族大学 药学院, 武汉 430074; 3. 武汉润禾生物医药有限公司, 武汉 430040)

【摘要】目的 通过手术构建一种接近临床的大鼠下肢静脉曲张动物模型, 为评价药物治疗提供理论支持。**方法** SD 大鼠 30 只, 雌雄各半, 随机分为对照组和手术组。手术组采用改良的下肢静脉结扎手术对大鼠下肢静脉结扎(包括小隐静脉和股静脉), 即小隐静脉合并股静脉完全结扎手术, 形成血栓导致下肢深静脉内压持久升高, 从而引起下肢静脉曲张症状。手术组大鼠手术后第 6 周, 对大鼠静脉曲张进行评分, 评选出造模成功大鼠, 然后将造模成功大鼠随机分为模型组和迈之灵组。迈之灵组使用迈之灵 62.5 mg/kg 灌胃每日一次, 对照组和模型组每日给予等体积生理盐水灌胃, 连续 20 d, 给药前 1 d、给药后 7、14 和 20 d 时分别对大鼠小腿部位进行微距拍照、评分, 给药结束后模型组和迈之灵组取手术侧下肢踝关节以上大隐静脉约 1 cm 长, 对照组取相同侧下肢对应部位大隐静脉进行病理组织观察。组织包埋蜡块分成两份, 一份用于苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色, 另一份用于免疫组化(immunohistochemistry, IHC)检查白细胞介素 2(interleukin 2, IL-2)和金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1)检测。**结果** 手术组 22 只大鼠, 有 20 只造模成功, 造模成功率为 91%。根据大鼠下肢小腿静脉扩张、曲张和红肿表现, 与对照组相比, 模型组静脉曲张评分增加, 具有显著性差异($P < 0.01$), 给予治疗剂量的迈之灵后, 与模型组相比, 迈之灵组静脉曲张评分减少, 具有显著性差异($P < 0.01$)。病理检查显示模型组可见明显的静脉曲张样改变, 有轻度炎症; 迈之灵组静脉曲张改变和炎症减轻。**结论** 成功建立了一种下肢静脉曲张大鼠模型, 为下肢静脉曲张疾病相关药物和治疗方法的研究提供了新的研究方法。

【关键词】 下肢静脉曲张; 动物模型; 迈之灵

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1556-09

Establishment of a rat model of varicose veins of the lower limbs

HE Zhiyong¹, LI Jun², WANG Xian³, CHEN Dandan², QUAN Zhiwen², DAI Jiawei², HUANG Xianju^{2*}

(1. Experimental Teaching and Engineering Training Center and Innovation and Entrepreneurship College, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China; 3. Wuhan Runhe Biopharmaceutical Co., Ltd, Wuhan 430040, China)

Corresponding author: HUANG Xianju. E-mail: xianju@mail.scuec.edu.cn

【Abstract】Objective To construct an accurate clinical model of lower limb varicose veins in rats through surgery that provides theoretical support for evaluating drug therapy. **Methods** 30 SD rats, 15 males and 15 females, were randomly divided into a control group and surgical group. In the surgical group, the rats lower limb veins (including the small saphenous vein and femoral vein) were ligated via improved lower limb vein ligation, i. e., the small saphenous vein was completely ligated with the femoral vein, and the thrombosis resulted in a lasting increase in the internal pressure of the deep veins of the lower limb, causing varicose symptoms. On the 6th week after surgery, the varicose veins of the rats

【基金项目】 湖北省重点研发计划(2024BCA002, 2022BCA053)。

Funded by Key R&D Program Project of Hubei Province (2024BCA002, 2022BCA053)。

【作者简介】 何志勇, 男, 实验师, 学士, 研究方向: 民族药物有效性与安全。Email: 475543704@qq.com

【通信作者】 黄先菊, 女, 教授, 博士, 研究方向: 民族药物药理学和毒理学。Email: xianju@mail.scuec.edu.cn

in the surgical group were scored to select those that were successfully modeled. Then, the successfully modeled rats were randomly divided into a model group and Maizhiling group. Maizhiling 62.5 mg/kg was orally administered to the treatment group once a day, while the control and model group received an equal volume of physiological saline orally every day for 20 consecutive days. On the day before administration and 7 d, 14 d and 20 d after administration, macro photography and scoring were performed on the lower limbs of the rats. After completion, an approximately 1 cm long saphenous vein above the ankle joint of the lower limb on the surgical side was removed from the model group and Maizhiling group rats, while from the control group, the corresponding saphenous vein of the lower limb on the same side was removed. Pathological tissue observation was performed using HE staining, Masson staining, and immunohistochemical examination for interleukin-2 (IL-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1). **Results** Of the 22 rats in the surgical group, 20 were successfully modeled, with a success rate of 91%. According to the manifestations of venous dilation, varicose veins, and redness in the lower limbs of rats, the varicose vein score of the model group increased significantly compared with that of the control group ($P < 0.01$). After the therapeutic dose of Maizhiling was administered, the varicose vein score in the Maizhiling group decreased significantly compared with that of the model group ($P < 0.01$). Pathological examination showed significant varicose-vein-like changes and mild inflammation in the model group. The Maizhiling group showed reduced varicose veins and inflammation. **Conclusions** A rat model of lower limb varicose veins was successfully established, providing a new research method for the study of drugs and treatment method related to lower limb varicose diseases.

[Keywords] varicose veins of lower limbs; animal model; Maizhiling

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

下肢静脉曲张是指下肢浅静脉伸长、迂曲而呈曲张状态,多与静脉壁软弱、静脉瓣膜缺陷及遗传因素有关^[1]。长期站立、重体力劳动、妊娠、习惯性便秘、慢性咳嗽等因素导致下肢静脉压增高^[2],从而引起静脉迂曲、扩张及相应出现的一系列临床表现,其临床症状多为下肢静脉扩张、曲张、肿胀、皮肤瘙痒、色素沉着和溃疡等,严重影响患者的生活质量^[3]。虽然目前治疗下肢静脉曲张的方法多种多样,但在药物治疗有效性研究中,急需一种合适的下肢静脉曲张动物模型,建立下肢静脉曲张动物模型具有重要意义^[4]。

下肢静脉曲张疾病由于长期的静脉高压和血液蓄积可使静脉壁扩张、瓣膜受损,血管内皮细胞因静脉高压而受损,导致长期慢性炎症和产生较多的基质金属蛋白酶^[5]。炎症细胞因子依照其作用机制可分为促炎症细胞因子和抗炎症细胞因子,其中促炎症细胞因子包括白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin 1, IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 和白细胞介素 8 (interleukin 8, IL-8) 等^[6]。研究表明金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1)^[7] 广泛存在于人体组织与体液中,可由多种细胞因子例如 TNF- α 、IL-1 诱导生成,其作为基质降解抑制因子,在曲张静脉中表达增加。下肢静脉曲张患者血

清 TIMP-1^[8]、D-二聚体 (D-dimer)、IL-2 含量升高,联合检测上述血清指标可作为下肢静脉曲张患者筛查指标,对疾病的早期诊断具有一定临床价值,且血清 TIMP-1、D-二聚体 (D-dimer) 可反映患者疾病症状严重程度^[6]。

下肢静脉曲张模型在动物种类选择、造模方法、评分标准、成模时间、成模临床症状观察等方面都有待研究。本实验通过手术对大鼠下肢静脉结扎,形成血栓导致下肢静脉内压持久升高,从而引起下肢静脉曲张症状。再进一步采用临床治疗静脉曲张药物迈之灵检验模型是否成功,最终形成大鼠下肢静脉曲张模型的造模方法、评分标准、成模临床症状观察及药物有效性判断等方面参数标准。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SD 大鼠, SPF 级, 30 只, 雌雄各半, 由湖北省实验动物研究中心提供【SCXK(鄂)2020-0018】, 实验动物饲养于中南民族大学实验动物中心【SYXK(鄂)2021-0089】。动物手术开始的年龄范围约为 6 月龄; 体重: 雌鼠 300 ~ 360 g, 雄鼠 500 ~ 600 g, 且动物体重不超出平均体重的 20%。雌性动物须未育、未孕。实验动物分笼饲养于 SPF 级标准饲养间, 饲养室保持在常规温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 和空气湿度

(60 ± 10)%下,暗/明周期为 12/12 h。普通饲料喂养,进食、饮水自由。本研究实验内容和过程获中南民族大学实验动物伦理委员会的批准(2021-scuec-048)。

1.1.2 主要材料与仪器

异氟烷(批号:21040101,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);注射用氨苄西林钠(批号:201221,华北制药集团动物保健品有限责任公司);0.9%氯化钠注射液(批号:201231803,武汉滨湖双鹤药业有限公司)。

照相机(型号:A6000,索尼(中国)有限公司);小动物麻醉机(型号:R500IE,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);手术剪(批号:191201,上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂);眼科镊(批号:201901,上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂);持针器(批号:J32040,上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂);手术缝针(批号:YHJ-048,上海元洪医疗器械有限公司);3-0 医用真丝非吸收缝线(批号:20210423,扬州市金环医疗器械厂)。组织标本病理切片在武汉赛维尔生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 大鼠下肢静脉曲张造模方法

30 只大鼠适应性饲养 3 d,按照体重随机分为对照组 8 只,雌雄各半,其余 22 只进行手术。大鼠术前 12 h 禁食,不限饮水。异氟烷麻醉机麻醉,麻醉生效后常规备皮、消毒、铺巾。手术组采用小隐静脉合并股静脉完全结扎术构建静脉曲张模型,雌雄各半,造模后第 6 周对大鼠进行静脉曲张评分,评选出造模成功大鼠。小隐静脉合并股静脉完全结扎手术方法如下(结扎小隐静脉、股静脉为同一侧下肢进行手术):

小隐静脉完全结扎法:在小腿外侧即踝关节上方靠后 0.5 cm 处,找到小隐静脉,剪开皮肤,小隐静脉与周围筋膜结合紧密不易分离,且位置表浅,因此不必分离小隐静脉,确认位置后,可以将穿有 3-0 非吸收手术缝合线的手术缝针直接穿过小隐静脉下方并打结,注意手术缝针穿过的组织除小隐静脉外包含其他组织尽量少,逐层缝合皮肤,皮下洒少许注射用氨苄西林钠粉末;

股静脉完全结扎法^[9]:经大鼠腹股沟部斜切口,分开肌肉和筋膜,充分显露股静脉,腹股沟静脉下方穿过 3-0 非吸收手术缝合线并结扎,逐层缝合

肌肉和皮肤,肌肉及皮下撒少许注射用氨苄西林钠粉末^[10]。

所有实验大鼠术后保暖,保持环境温度在 25 ℃ 左右。单独饲养,麻醉清醒后少量饮水并给予食物。手术后一周内观察伤口生长情况有无感染,术后每周观察一次大鼠手术侧小腿外侧浅静脉。

1.2.2 临床观察

手术后,观察手术恢复情况;每周观察各组大鼠手术侧下肢浅静脉一次;在手术后第 6 周进行微距拍照,并观察下肢静脉曲张表现。分别于给药前 1 d(D0)、给药第 7 天(D7)、给药第 14 天(D14)和给药第 20 天(D20)对大鼠下肢小腿部位进行微距拍照和评分。

1.2.3 大鼠下肢静脉曲张评分量表

评估患者静脉曲张临床-病因-解剖学-病理生理(clinical etiology anatomy pathophysiology, CEAP)分级和静脉临床严重程度评分(venous clinical severity score, VCSS)是既往常用的下肢静脉曲张分级标准和评价方法^[5]。根据临床下肢静脉曲张 CEAP 分级中的 C 标准分级^[11],结合大鼠下肢静脉曲张模型临床表现,自制大鼠下肢静脉曲张评分量表,将大鼠下肢静脉曲张模型严重程度进行分级评分:包括 C0、C1、C2、C3 四大项,为 18 分制。单个下肢只能评每大项中对应表现的一项,各大项评分需叠加。完全正常 = 0 分,最严重 = 18 分(表 1)。评分时采用单盲设计,至少两名实验人员进行评定,每只大鼠需剃净观察部位毛发,观察两次,并取其平均值。术后 6 周,评分为 6 ~ 18 分的大鼠方可认为造模成功。未达标准者予以继续饲养,一月内如未达标准予以剔除并重新造模补入。

1.2.4 迈之灵对下肢静脉曲张模型大鼠的影响

手术后第 6 周,大鼠下肢静脉曲张分值 ≥ 6 为造模成功,随机将造模成功大鼠分为模型组和迈之灵组各 8 只,雌雄每组各取相等数量。术后第 6 周开始灌胃给药迈之灵,按照迈之灵临床剂量推算大鼠给药量为 62.5 mg/(kg·d),给药期间自由进食饮水,给药体积为 5 mL/kg,连续给药 20 d。模型组和对照组给等体积 0.9%的氯化钠注射液。

1.2.5 大隐静脉病理检测

给药第 20 天取模型组和迈之灵组大鼠手术侧下肢踝关节以上大隐静脉约 1 cm 长,对照组取同侧下肢对应部位大隐静脉约 1 cm 长,用 4%多聚甲醛固定 24 h,脱水后常规石蜡包埋,苏木素-伊红

表 1 大鼠下肢静脉曲张评分量表

Table 1 Lower limb varicose vein scoring scale for rats

分级 Grade of classification	大鼠下肢静脉曲张评分标准 Scoring criteria for varicose veins in the lower limbs of rats	评分/分 Score/points
C0: 无持久性扩张的皮下浅静脉 C0: Subcutaneous superficial vein without persistent dilation	—	0
C1: 毛细血管扩张, 持久性扩张的皮下浅静脉, 呈线状、丝状、网状 C1: Telangiectasia, persistent dilation of superficial subcutaneous veins, presenting as linear, filamentous, and reticular structures	小腿外侧肉眼可见表浅毛细血管, 呈线状, 丝状, 局部少量出现 Superficial capillaries are visible to the naked eye on the outer side of the lower leg, appearing in linear and filamentous shapes, with a small amount appearing locally	1
	小腿外侧肉眼可见表浅毛细血管, 呈线状, 丝状, 出现面积为小腿外侧一半左右或者布满小腿外侧, 但不连接成网 Superficial capillaries visible to the naked eye on the outer side of the lower leg are linear and filamentous, with an area of about half of the outer side of the lower leg or covering the outer side of the lower leg, but not connected into a network	2
	小腿外侧肉眼可见表浅毛细血管, 呈网状, 布满小腿外侧 Superficial capillaries are visible to the naked eye on the outer side of the lower leg, forming a network and covering the outer side of the lower leg	3
	小腿外侧肉眼可见表浅毛细血管扩张, 呈扭曲状, 较少, 局部一条或者一段血管出现 Superficial capillary dilation is visible to the naked eye on the outer side of the lower leg, appearing in a twisted shape with few, and one or a segment of blood vessels appearing locally	4
	小腿外侧肉眼可见表浅毛细血管, 呈扭曲状, 两条或者两条以上血管出现, 但未布满整个小腿外侧 Superficial capillaries visible to the naked eye on the outer side of the calf are twisted, with two or more blood vessels appearing, but not covering the entire outer side of the calf	5
C2: 静脉曲张, 是皮下浅静脉持久性扩张, 凸起, 扭曲状, 累及膝下隐静脉系统 C2: Varicose veins are persistent dilation, protrusion, and twisting of the superficial subcutaneous veins that extend to the subgenicular saphenous vein system	小腿外侧肉眼可见表浅毛细血管, 呈扭曲状, 较多, 布满整个小腿外侧 Superficial capillaries visible to the naked eye on the outer side of the lower leg are twisted and numerous, covering the entire outer side of the lower leg	6
	较轻, 红肿面积占整个小腿外侧小于三分之一 Mild, with less than one-third of the area of redness and swelling on the outer side of the entire calf	7
	明显较重, 红肿面积占整个小腿外侧一半左右, 在三分之一到三分之二之间 It is significantly heavier, with a redness and swelling area accounting for about half of the entire outer leg, ranging from one-third to two-thirds	8
C3: 红肿 C3: Red and swollen	严重, 红肿面积占整个小腿外侧三分之二以上 Severe, the area of redness and swelling accounts for more than two-thirds of the entire outer leg	9

(HE) 染色、马松 (Masson) 染色、免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 检查 IL-2 和 TIMP-1, 40 倍光学显微镜下观察。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 重复测量数据采用重复测量资料的方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

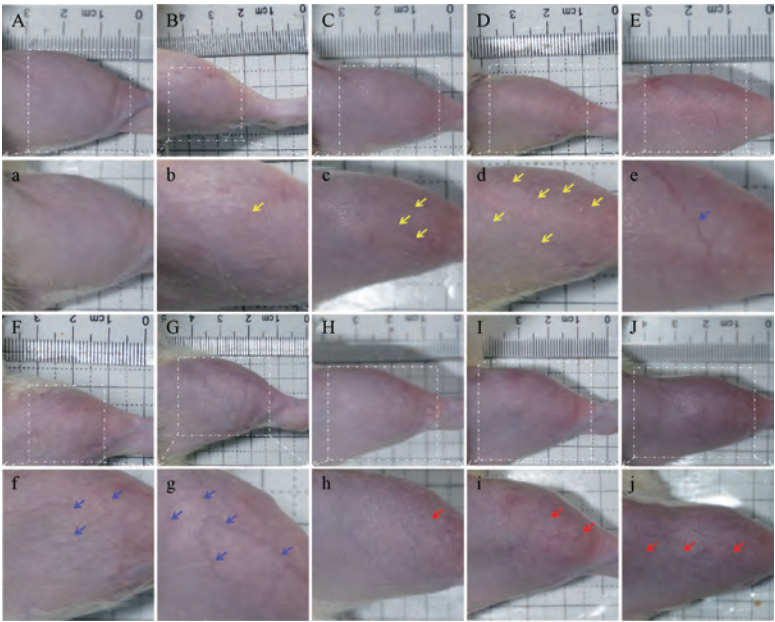
2.1 大鼠下肢静脉曲张临床表现

大鼠手术后开始出现下肢静脉曲张临床表现, 并随时间逐渐加重。图 1A 为正常大鼠小腿外侧(0

分), 为大鼠下肢静脉曲张评分量表 C0; 图 1B~1D 出现毛细血管扩张, 毛细血管扩张程度评分分别为 1、2、3 分, 为大鼠下肢静脉曲张评分量表 C1; 图 1E~1G 出现静脉曲张, 静脉曲张程度评分分别为 4、5、6 分, 为大鼠下肢静脉曲张评分量表 C2; 图 1H~1J 出现红肿, 红肿程度评分分别为 7、8、9 分, 为大鼠下肢静脉曲张评分量表 C3。每张图只评出其中一种典型表现。

2.2 造模成功率

术后第 6 周对手术组大鼠进行评分, 每只大鼠观察两次, 取其平均值。评分结果为 0~5 分的为 2 只, 6~9 分的为 6 只, 10~18 分的为 14 只。静脉曲张评分 6~18 的大鼠为造模成功, 造模成功大鼠



注:黄色箭头:静脉毛细血管扩张;蓝色箭头:静脉曲张;红色:表示红肿。

图 1 大鼠下肢静脉曲张模型临床表现

Note. Yellow arrow. Venous capillary dilation. Blue arrow. Varicose veins. Red arrow. Redness and swelling.

Figure 1 Clinical manifestations of rat lower limb varicose vein model

为 20 只,因此手术组造模成功率为 91%(表 2)。未造模成功的大鼠,可能需要成模的时间更久,或者跟个体差异和手术结扎部位的高低有关,后者需要重新手术。

表 2 术后第 6 周手术组静脉曲张评分统计表

Table 2 Statistical table of varicose vein scores in the surgical group at the 6th week after surgery

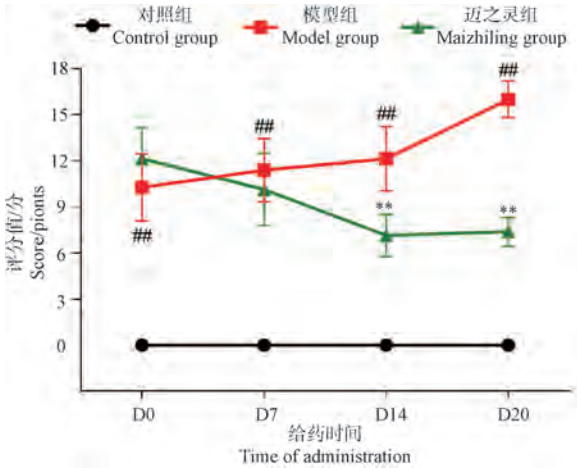
静脉曲张评分范围 Varicose vein scoring range	大鼠只数/只 Number of rats/number	百分比/% Percentage/%
0 ~ 5	2	9. 1
6 ~ 9	6	27. 3
10 ~ 18	14	63. 6

2.3 迈之灵对大鼠下肢静脉曲张的影响

模型组与对照组相比,给药前大鼠下肢小腿外侧逐渐出现不同程度的毛细血管扩张、静脉曲张和红肿表现,并且随时间推移病程加重,到给药第 20 天时,毛细血管扩张、静脉曲张和红肿表现加重最明显,静脉曲张评分增加,具有显著性差异($P < 0.01$);迈之灵组与模型组相比,随给药时间增长静脉曲张症状被抑制,给药第 7 天无显著性差异,到给药第 14 天和第 20 天时,毛细血管扩张、静脉曲张和红肿表现明显减轻,静脉曲张评分减少,具有显著性差异($P < 0.01$)(图 2、3)。

2.4 大隐静脉病理变化

用 40 倍光学显微镜观察大隐静脉,可见 HE 染



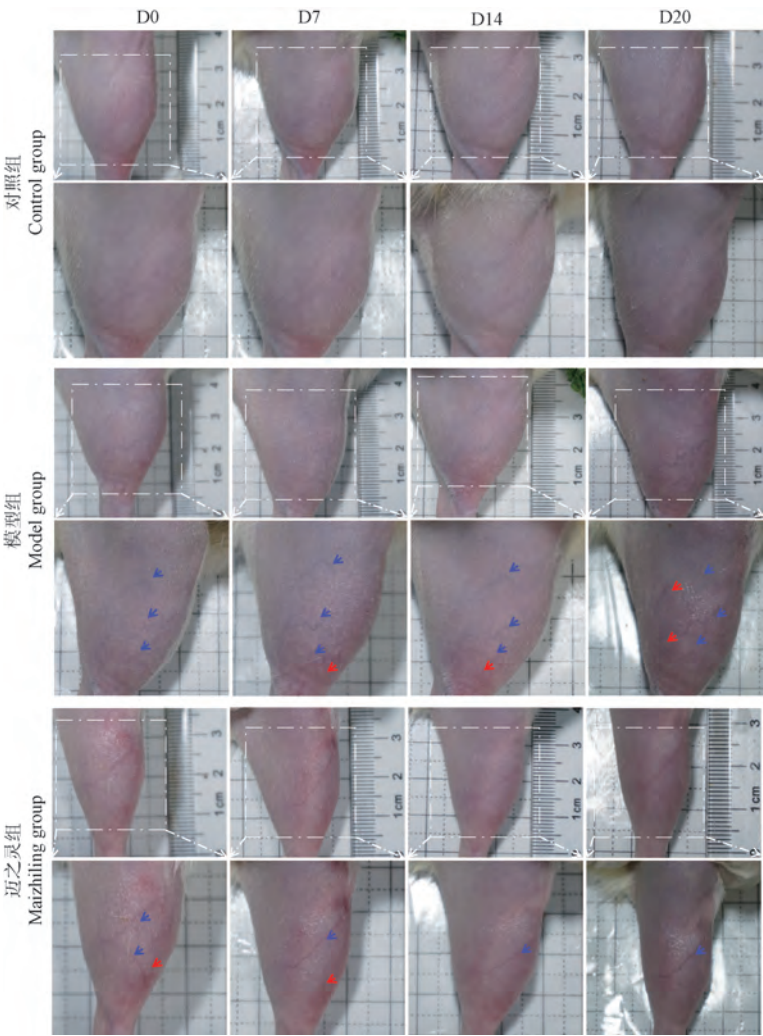
注:与对照组相比,## $P < 0.01$,与模型组比较** $P < 0.01$ 。

图 2 迈之灵对下肢静脉曲张模型大鼠静脉曲张评分影响($n = 8$)

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

Figure 2 Effect of Maizhiling on varicose vein score in lower limb varicose vein model rats ($n = 8$)

色对照组内皮细胞无明显坏死脱落,平滑肌结构清晰,排列规则;模型组静脉管腔增大,管壁变薄,血管壁厚薄不均,部分内皮细胞脱落缺失,平滑肌细胞结构不清,胞质淡染,可见平滑肌细胞增生、肥大,排列紊乱,出现大量泡沫细胞,迈之灵组管壁增厚,管腔较模型组变小,内皮细胞脱落不明显,少量



注：蓝色箭头：静脉曲张；红色箭头：红肿。

图 3 大鼠给药后临床表现

Note. Blue arrow. Varicose veins. Red arrow. Swollen area.

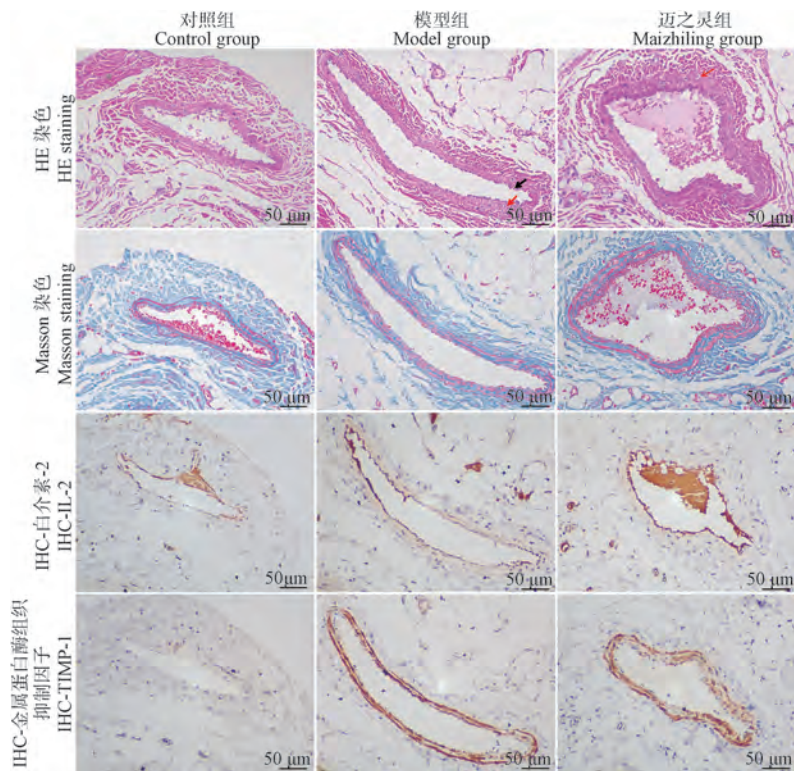
Figure 3 Clinical manifestations of rats after administration

散在泡沫细胞；Masson 染色对照组可见胶原纤维结构清晰，排列规则，胶原纤维分布于平滑肌细胞之间；模型组可见平滑肌细胞排列紊乱，细胞间胶原纤维聚集，排列倒错，粗细不均，红染的平滑肌、细胞结构丰富，蓝染的胶原纤维比例较对照组减少；迈之灵组较模型组胶原纤维有所增加。IHC 检查显示对照组和迈之灵组 IL-2 呈阴性反应，模型组呈弱阳性，对照组 TIMP-1 呈阴性反应，模型组呈强阳性反应，迈之灵组阳性表现较模型组弱（图 4）。

3 讨论

临床上下肢静脉曲张的发病机制复杂，通常可由年龄增大、肥胖、妊娠、重体力劳动、长久站立、吸烟、糖尿病、高血压和高胆固醇血症、静脉炎等多种

原因诱发^[13]，静脉壁薄弱、静脉瓣膜功能不全和静脉内压力增高是原发性下肢静脉曲张三大主要原因^[14]，文献研究表明下腔静脉结扎法^[15]和股静脉阻断法能有效形成下肢深静脉血栓^[16]，可导致下肢静脉内压力增高和皮肤病变^[17]，具有临床手术方法参考价值，但大多文献没有对实验继续观察，进一步研究动物下肢静脉曲张。本实验采用小隐静脉合并股静脉完全结扎手术，对大鼠下肢静脉结扎，能形成血栓导致下肢深静脉内压持久升高，有效形成持续性真皮内静脉扩张，逐渐淤血隆起，从而引起下肢静脉曲张症状，包括：小腿外侧皮下毛细血管扩张、静脉曲张和红肿等。本研究发现，对大鼠的小隐静脉和股静脉同时进行结扎，可以出现下肢静脉曲张症状。在对大鼠的股静脉进行结扎时，结



注:黑色箭头:脱落缺失的内皮细胞;红色箭头:泡沫细胞。

图 4 给药第 20 天大隐静脉病理组织学检查结果

Note. Black arrow. Lost of endothelial cell. Red arrow. Foam cell.

Figure 4 Results of histopathological examination of great saphenous vein on the 20th day of administration

扎位置的高低对手术成功率等有影响。结扎部位越高越靠近髂外静脉,结扎位置越低有可能会结扎在股静脉分支静脉之间,容易形成交通支,导致结扎阻断血流效果不强,这有可能是影响手术成功率的原因之一。因此,较优的方式是对大鼠的股静脉进行全结扎时结扎的位置相对靠近髂外静脉。

由于动物静脉曲张文献少有报道,结合临床下肢静脉曲张 CEAP 分级^[18]中 C 标准分级^[19],根据大鼠下肢静脉曲张模型临床表现,研究发现大鼠的下肢静脉曲张模型进展跟临床病人的进展分期 C0 到 C3 期非常相似,C4 到 C6 期由于药物治疗效果较差^[20],本实验并未研究观察,有待后期进一步研究。因此,将大鼠下肢静脉曲张模型严重程度进行分级评分:包括 C0、C1、C2、C3 四大项,形成了一套有效的拟临床动物模型评分标准。根据造模成功率结果显示,手术组成功率为 91%,能成功形成下肢静脉曲张模型。

本研究中发现,与正常对照组相比,模型组大鼠手术侧下肢小腿外侧出现不同程度的毛细血管扩张、静脉曲张和红肿表现,并且随时间推移病程加重,静脉曲张评分增加;与模型组相比,迈之灵组

下肢静脉曲张症状有明显的抑制作用,静脉曲张评分减少。证明小隐静脉合并股静脉完全结扎术能有效导致大鼠下肢静脉曲张,迈之灵能有效减轻大鼠下肢静脉曲张症状。大鼠大隐静脉的 HE 染色和 Masson 染色结果显示,模型组较对照组组织结构改变明显,成功出现下肢静脉曲张长期静脉高压的病理改变,迈之灵组较模型组组织结构病理性改变有所减轻。大隐静脉免疫组化检查结果显示对照组和迈之灵组 IL-2 呈阴性,模型组 IL-2 呈弱阳性,可以反映出模型组炎症较对照组和迈之灵组重,有慢性炎症反应;模型组 TIMP-1 呈强阳性反应,迈之灵组阳性表现较模型组弱,能进一步反映出模型组下肢静脉曲张症状较重,而迈之灵组经过 20 d 治疗,下肢静脉曲张症状明显减轻。

综上,本研究成功建立了一种下肢静脉曲张大鼠模型。有效地解决了下肢静脉曲张模型实验方法、临床症状观察及评分标准等方面问题,为研究下肢静脉疾病发病机制及探索新的药物和治疗方式提供新的研究对象和基础依据。

参 考 文 献 (References)

[1] 张伟康. 四妙勇安汤加减联合激光腔内闭合术治疗下肢静脉

- 曲张临床研究 [J]. 实用中医药杂志, 2024, 40(4): 656-659.
- ZHANG W K. Clinical study on the treatment of lower limb varicose veins with modified Simiao Yong'an Decoction addition and subtraction combined with laser intracavitary closure surgery [J]. J Practical Traditional Chin Med, 2024, 40(4): 656-659.
- [2] 中国医师协会血管外科医师分会静脉学组. 常见静脉疾病诊治规范(2022 年版) [J]. 中华血管外科杂志, 2022, 7(1): 12-29.
- Venology Group of Vascular Surgery Branch of Chinese Medical Doctor Association. Diagnosis and treatment standards for common venous diseases (2022 edition) [J]. Chin J Vascular Surg, 2022, 7(1): 12-29.
- [3] 师龙, 高翔, 李锰, 等. 下肢静脉曲张患者生活质量量表评价研究 [J]. 血管与腔内血管外科杂志, 2022, 8(1): 27-30.
- SHI L, GAO X, LI M, et al. Evaluation of quality of life scale for patients with lower extremity varicose vein [J]. J Vas Endovasc Surg, 2022, 8(1): 27-30.
- [4] CAROLINE A, THOMAS K. Drug-based therapy of varicose veins from the perspective of experimental models [J]. Praxis, 2019, 108(01): 31-36.
- [5] 中华医学会外科学分会血管外科学组, 中国医师协会血管外科医师分会, 中国医疗保健国际交流促进会血管外科分会, 等. 中国慢性静脉疾病诊断与治疗指南 [J]. 中华医学杂志, 2019, 99(39): 3047-3061.
- Vascular Surgery Group of the Surgery Branch of the Chinese Medical Association, Vascular Surgery Branch of Chinese Medical Doctor Association, Vascular Surgery Branch of China Healthcare International Exchange Promotion Association, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of chronic venous diseases in China [J]. Natl Med J Chin, 2019, 99(39): 3047-3061.
- [6] 朱雪峰, 俞士刚, 吴一峰. 血清金属蛋白酶组织抑制因子、白细胞介素 2 与白细胞介素 10 和 D-二聚体对下肢静脉曲张的诊断价值 [J]. 中国临床保健杂志, 2021, 24(5): 683-686.
- ZHU X F, YU S G, WU Y F. The diagnostic value of serum TIMP-1, IL-2, IL-10 and D-dimer for lower extremity varicose veins [J]. Chin J Clinical Healthc, 2021, 24(5): 683-686.
- [7] SCHOEPS B, FRÄDRICH J, KRÜGER A. Cut loose TIMP-1: an emerging cytokine in inflammation [J]. Trends in Cell Biol, 2023, 33(5): 413-426.
- [8] 袁晓庆. 下肢静脉曲张血管重塑基质金属蛋白酶的表达水平及意义 [D]. 青岛: 青岛大学; 2022.
- YUAN X Q. Expression level and significance of matrix metalloproteinase in vascular remodeling of varicose veins of lower extremities [D]. Qingdao: Qingdao University; 2022.
- [9] 张静秋, 陆永萍, 他林昆, 等. 内皮损伤后血栓模型制备方法的比较 [J]. 昆明医科大学学报, 2024, 45(1): 35-40.
- ZHANG J Q, LU Y P, TA L K, et al. Comparison of methods for generating thrombotic models after the endothelial injury [J]. J Kunming Med University, 2024, 45(1): 35-40.
- [10] 谷艳, 臧鹏, 李进霞, 等. 基于超高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱的深静脉血栓模型大鼠血浆代谢组学分析 [J]. 色谱, 2022, 40(8): 736-745.
- GU Y, ZANG P, LI J X, et al. Plasma metabolomics in a deep vein thrombosis rat model based on ultra-high performance liquid chromatography-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Chin J Chromatography, 2022, 40(8): 736-745.
- [11] 宋小军, 叶炜. 下肢静脉曲张病因、表现及治疗方法 [J]. 血管与腔内血管外科杂志, 2020, 6(5): 460-462.
- SONG X J, YE W. Etiology, manifestations and treatment of varicose veins of lower limbs [J]. J Vascular Endovasc Surg, 2020, 6(5): 460-462.
- [12] 袁宇航. 腔内激光与传统手术治疗原发性大隐静脉曲张的疗效对比研究 [D]. 南充: 川北医学院; 2021.
- YUAN Y H. Comparative study on the efficacy of endovenous laser ablation and conservative surgery in the treatment of great saphenous vein varicosity [D]. Nanchong: North Sichuan Medical College; 2021.
- [13] 王晓涛, 孟彬, 刘剑峰, 等. 超声引导泡沫硬化联合手术对下肢静脉曲张疗效及患者血流动力学 VCSS 评分炎症状态的改善作用观察 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(1): 15-19.
- WANG X T, MENG B, LIU J F, et al. Effect of ultrasound-guided foam sclerotherapy combined with surgery on varicose veins of lower extremities and improvement of hemodynamics, VCSS score and inflammatory state [J]. Chin Remedies Clin, 2020, 20(1): 15-19.
- [14] 陈晓玲, 郑多安, 郑漫漫. 下肢大隐静脉曲张的病因及改良手术治疗 [J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(11): 198.
- CHEN X L, ZHENG D A, ZHENG M M. Etiology and improved surgical treatment of varicose veins of great saphenous vein of lower limbs [J]. J Prev Med Chin PLA, 2019, 37(11): 198.
- [15] 冯涛, 李晶, 潘金强, 等. MiR-5189-3p 在下腔深静脉血栓形成的调控机制的研究 [J]. 临床外科杂志, 2021, 29(5): 478-481.
- FENG T, LI J, PAN J Q, et al. Study on the regulatory mechanism of miR-5189-3p in deep venous thrombosis of lower extremities [J]. J Clinical Surg, 2021, 29(5): 478-481.
- [16] 岳莹, 郝文立, 甘永康. 依那普利尿酸干预下肢静脉栓塞模型大鼠血管内皮细胞活性及血管紧张素 II、血管紧张素转换酶的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(24): 3877-3882.
- YUE Y, HAO W L, GAN Y K. Effects of enalapril folic acid on vascular endothelial cell activity and angiotensin II and angiotensin converting enzyme levels in a rat model of lower extremity venous embolism [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(24): 3877-3882.
- [17] 蒋玉洁, 赵珺, 梅家才, 等. 下肢静脉高压大鼠后肢皮肤病变的组织学研究 [J]. 中国血管外科杂志(电子版), 2019, 11(2): 132-138.
- JIANG Y J, ZHAO J, MEI J C, et al. Histological study of

- pathological tissues in the lower extremity venous hypertension rats [J]. Chin J Vascular Surge (Electronic), 2019, 11(2): 132-138.
- [18] 杨启智. 下肢静脉曲张 CEAP 分级及超声指标与中医舌下络脉征象的相关性研究 [D]. 福州: 福建中医药大学; 2020.
- YANG Q Z. Correlation between CEAP classification and ultrasound indexes of varicose veins of lower extremities and signs of sublingual collaterals in traditional chinese medicine [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [19] 李龙. 下肢慢性静脉疾病 CEAP 分类系统和报告标准 2020 年修订版的解读 [J]. 中国普通外科杂志, 2021, 30(6): 639-647.
- LI L. Interpretation of the 2020 updated and revised edition of the CEAP classification system and reporting standards for lower extremity chronic venous disorders [J]. Chin J Gen Surg, 2021, 30(6): 639-647.
- [20] 刘明, 林鸿国, 何宜斌, 等. 下肢静脉曲张的外科治疗进展 [J]. 中国当代医药, 2022, 29(1): 27-32.
- LIU M, LIN H G, HE Y B, et al. Progress in surgical treatment of varicose veins of lower extremities [J]. Chin Mod Med, 2022, 29(1): 27-32.
- [收稿日期] 2024-06-26

《中国实验动物学报》2025 年征订启事

《中国实验动物学报》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

开设栏目:研究报告和研究进展。

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

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

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

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

师玉玉,邵奇,王雪茜. 不同剂量下 PM_{2.5} 介导的肺组织氧化损伤与上皮屏障破坏 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1565-1571.

SHI Y Y, SHAO Q, WANG X Q. Oxidative damage and epithelial barrier disruption of lung tissue mediated by PM_{2.5} at different doses [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1565-1571.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.007

不同剂量下 PM_{2.5} 介导的肺组织氧化损伤 与上皮屏障破坏

师玉玉,邵奇,王雪茜*

(北京中医药大学中医学院,北京 100029)

【摘要】 目的 采用不同浓度 PM_{2.5} 造模探讨 C57BL/6 小鼠炎症、氧化应激、上皮屏障破坏的剂量依赖性。**方法** 将 36 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、PM_{2.5} 5.0 组、PM_{2.5} 7.5 组、PM_{2.5} 10.0 组,7 d 采用不同浓度进行染毒;对照组气管滴注生理盐水,末次染毒后将动物处死。苏木素-伊红(HE)染色法观察肺组织的病理学改变;ELISA 试剂盒检测 4 组小鼠血清中白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-1 β 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 炎症细胞因子水平。使用生化试剂盒及 ELISA 试剂盒检测 4 组小鼠氧化应激一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平;脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色观察上皮细胞凋亡水平;免疫组化法(immunohistochemis, IHC)检测上皮屏障紧密连接蛋白的表达。**结果** PM_{2.5} 急性暴露导致小鼠肺泡间隔增宽,炎性细胞渗出;血清中炎性细胞因子 IL-4、IL-1 β 和 TNF- α 及肺组织中 NO、MDA 含量升高, SOD 降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);上皮细胞凋亡程度加深;上皮屏障紧密连接蛋白表达剂量依赖性升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** 急性暴露于 PM_{2.5} 颗粒物中,通过促进肺组织的炎症释放和诱导氧化抗氧化失衡,导致小鼠急性肺损伤。此外,PM_{2.5} 的暴露导致上皮细胞凋亡,特别是在造模剂量为 10 mg/kg 时表现得尤为显著,破坏了上皮屏障的紧密连接,进一步加剧小鼠肺损伤。

【关键词】 PM_{2.5};肺损伤;上皮屏障

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1565-07

Oxidative damage and epithelial barrier disruption of lung tissue mediated by PM_{2.5} at different doses

SHI Yuyu, SHAO Qi, WANG Xueqian*

(College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine,
Beijing 100029, China)

Corresponding author: WANG Xueqian. E-mail: shirlyding@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the dose-dependence of inflammation, oxidative stress and epithelial barrier disruption in C57BL/6 mice using different concentrations of PM_{2.5}. **Methods** A total of 36 male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, PM_{2.5} 5.0 group, PM_{2.5} 7.5 group and PM_{2.5} 10.0 group. The trachea of the control group was instilled with normal saline, and the animals were sacrificed after the last poisoning. Hematoxylin-eosin (HE)

【基金项目】 北京中医药大学-优莎纳联合研究中心(BURC)基金项目(BUCM-2022-JS-KF-017)

Funded by Beijing University of Chinese Medicine-Usana Joint Research Center Fund Project (BUCM-2022-JS-KF-017)

【作者简介】 师玉玉,女,在读硕士研究生,研究方向:经方配伍规律与作用机制。Email:1938962741@qq.com

【通信作者】 王雪茜,女,博士,教授,博士生导师,研究方向:经方治疗常见病、疑难病;经方、验方的效应机制及物质基础。
Email: shirlyding@163.com

staining was used to observe the pathological changes of lung tissue. The ELISA kit was used to detect the levels of IL-4, IL-1 β and TNF- α inflammatory cytokines in the serum of four groups of mice. Biochemical kits and ELISA kits were used to detect the levels of oxidative stress nitrogen monoxide (NO), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in four groups of mice. Deoxyribonucleotide terminal transferase-mediated nick end labeling was used by TUNEL staining to observe the level of apoptosis of epithelial cells. Immunohistochemistry was used to detect the expression of epithelial barrier tight junction proteins. **Results** Acute exposure to PM_{2.5} led to widening of alveolar septum and exudation of inflammatory cells, increased serum levels of inflammatory cytokines IL-4, IL-1 β and TNF- α and NO and MDA in lung tissue, and decreased SOD ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). increased apoptosis of epithelial cells; The expression of epithelial barrier tight junction protein was dose-dependent ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusions** Acute exposure to PM_{2.5} particulate matter can lead to acute lung injury in mice by promoting the release of inflammation in lung tissue and inducing oxidative and antioxidant imbalance. In addition, PM_{2.5} exposure led to epithelial cell apoptosis, especially at a modeled dose of 10 mg/kg, which disrupted the tight junctions of the epithelial barrier and further exacerbated lung injury in mice.

【Keywords】 PM_{2.5}; lung injury; epithelial barrier

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

空气污染对公共卫生的影响仍然是全球关注的核心问题^[1]。PM_{2.5} 作为我国空气污染物主要成分之一,其直径小于或等于 2.5 μm ,属于可入肺颗粒物。作为重要的环境风险因素,长期以来一直被对人类健康构成巨大威胁^[2]。以往对空气污染的研究主要集中在其对呼吸系统和心血管系统的影响上^[3]。肺泡上皮屏障在肺部屏障功能中扮演着至关重要的角色,而黏附蛋白和紧密连接蛋白则构成了其不可或缺的组成部分,其中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、闭合蛋白(occludin)和闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1,ZO-1)等蛋白被认为是上皮屏障重要组成蛋白。上皮屏障的功能对于维持气体交换、液体转运以及防止有害物质侵入肺组织具有重要的生理意义^[4-6]。作为维护肺结构稳定和免疫稳态的关键组成部分,上皮屏障在肺部健康中起到至关重要的作用^[7]。上皮细胞与气道中的免疫细胞相互作用复杂^[8]。因此,一旦上皮屏障受损,将导致组织通透性的提高和免疫激活的增加,从而引发一系列相关疾病^[9]。本研究旨在从氧化应激和炎症的角度深入探讨 PM_{2.5} 梯度造模对 C57BL/6 小鼠肺上皮屏障功能的影响,为研究 PM_{2.5} 非暴露式气管滴注引起的急性肺损伤中上皮屏障破坏提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

C57BL/6 雄性小鼠 36 只,SPF 级,4 ~ 6 周龄,体重 20 ~ 22 g,购买于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】,C57BL/6 小鼠适应性

喂养 7 d,饲喂条件:光照时间 12 h/12 h,相对湿度 45% ~ 50%,环境温度 22 ~ 23 $^{\circ}\text{C}$;所有小鼠自由饮水和采食,饲养于北京中医药大学动物实验中心【SYXK(京)2023-0011】。本研究获得了北京中医药大学学术委员会实验动物伦理分委员会批准(BUCM-2022053001-2128)。

1.1.2 主要试剂与仪器

PM_{2.5} 标准品(东莞市百顺生物科技有限公司,中国 深圳);ELISA 试剂盒白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ,IL-4,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α (MB-2776A,MB-3400A,MB-2868A,塞思博尔生物科技有限公司,中国 北京);氧化应激一氧化氮(nitric oxide,NO)试剂盒(S0021S,碧云天);丙二醛(malondialdehyde,MDA)(CEA597Ge,酶联免疫吸附法,兰博利德商贸有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)(A001-3-2,南京建成);E-cadherin (20874-1-AP, Proteintech); occludin (27260-1-AP, Proteintech); ZO-1 (27260-1-AP, abcam)。脱水机(JT-12K,武汉俊杰电子有限公司,中国 北京);脱色摇床(WD-9405A,北京六一仪器厂,中国 北京);移液枪(KE0003087/KA0056573,Dragon);普通光学显微镜(CX-21,OLYMPUS);倒置显微镜(Q-IMAGING,MicroPublisher)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及 PM_{2.5} 染毒

先将实验动物适应性喂养 1 周,后随机分为 4 组:对照组;PM_{2.5} 5.0 组;PM_{2.5} 7.5 组;PM_{2.5} 10.0 组;使用戊巴比妥钠(20 mg/kg)麻醉小鼠,然后分别在第 1、4 和 7 天通过采用微量注射器和静脉留置针气管内滴注 PM_{2.5} 标准品方式造模,滴注后迅速

抽出留置针,将小鼠取下,直立并旋转小鼠,以使药液均匀地分布在双肺内。随后将小鼠放置在电热毯上,待麻醉剂作用消退、小鼠清醒可自主呼吸时,将小鼠放回鼠笼中即造模完成。对照组气管滴注生理盐水为 10 mg/kg。PM_{2.5} 暴露 1 周后,通过颈椎脱臼法处死所有小鼠。

1.2.2 提取小鼠血液及分离肺组织以进行相关指标检测

最后一次造模结束 24 h 后,使用戊巴比妥钠 (20 mg/kg) 麻醉小鼠,心脏穿刺取血,然后分离肺组织,左肺在液氮中快速冷冻并储存在 -80 ℃ 冰箱以备后续生化检测;右肺在多聚甲醛溶液中固定以备后续病理切片。按照 ELISA 检测试剂盒说明书测定 IL-4、IL-1β 和 TNF-α 在血清中的水平。按照生化试剂盒和 ELISA 试剂盒说明书测定 NO、MDA 和 SOD 在肺组织中的水平。

1.2.3 肺组织苏木素-伊红(HE)染色

通过 HE 染色来反映肺组织病理变化。石蜡切片脱蜡至水,将切片放入染液,染色以显示肺结构,显微镜镜检,图像采集分析。

1.2.4 脱氧核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色

通过 TUNEL 染色来反映肺上皮细胞凋亡程度。使用二甲苯和乙醇将石蜡切片脱蜡水化,使用蛋白

酶 K 抗原修复,滴加 TUNEL 反应液避光孵育,DAPI 复染细胞核,随后使用抗荧光淬灭封片剂封片,最后镜检拍照,切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像。紫外激发波长 330 ~ 380 nm,发射波长 420 nm;FITC 绿光激发波长 465 ~ 495 nm,发射波长 515 ~ 555 nm。

1.2.5 肺组织免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色

使用 IHC 染色来反映肺上皮紧密连接蛋白的损伤程度。切片、脱蜡、水化和染色。室温封闭 1 h,与一抗在 4 ℃ 孵育过夜。然后 PBS 清洗 3 次。二抗在室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 次,随后将切片放在中性树胶密封在显微镜下观察。

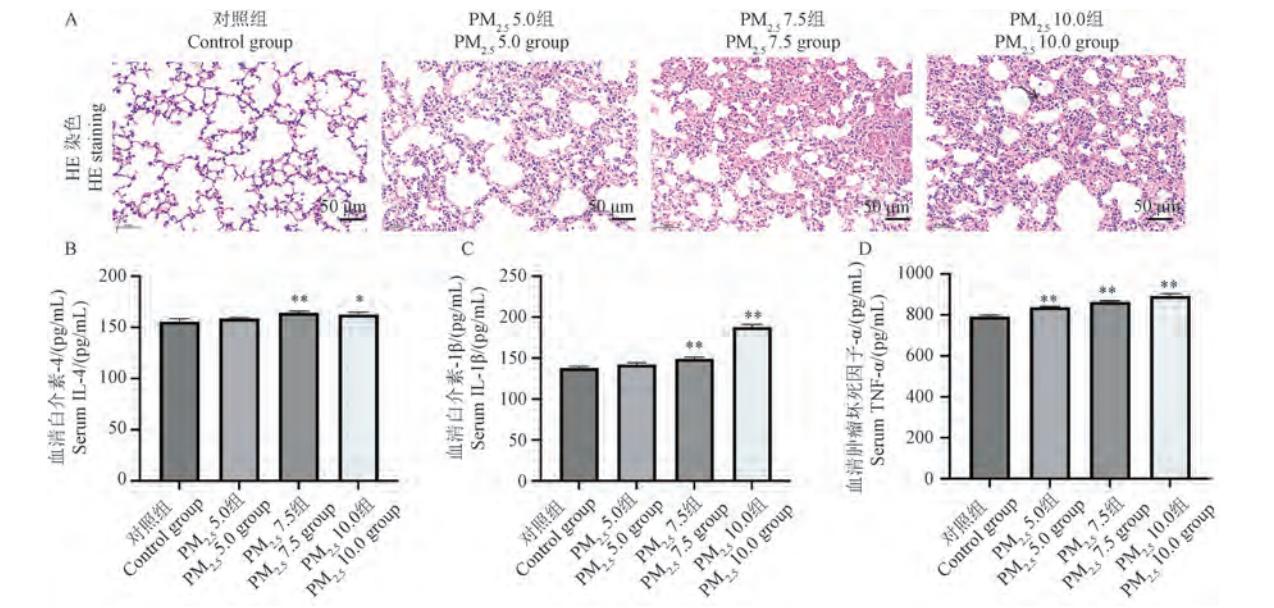
1.3 统计学分析

所有实验都至少重复了 3 次。数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。SPSS 29.0 用于统计分析。通过单因素方差分析数据。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 PM_{2.5} 对 C57BL/6 小鼠肺组织 HE 染色和血清炎症细胞因子表达的影响

如图 1A 所示,为了评估 PM_{2.5} 对肺组织影响的程度,切片用 HE 染色。与对照组相比,PM_{2.5} 暴露



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 PM_{2.5} 对 C57BL/6 小鼠肺组织 HE 染色和血清炎症细胞因子表达的影响

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

Figure 1 Effect of PM_{2.5} on HE staining of lung tissue and expression of inflammatory cytokines in serum of C57BL/6 mice

的小鼠表现出严重肺泡间隔增宽,肺泡结构破坏,伴有炎性渗出。随着造模剂量的不断增加,呈现出逐渐加重的趋势,在造模剂量为 7.5 和 10 mg/kg 时炎症浸润最明显。由此可见 PM_{2.5} 可造成肺病理损伤。与对照组相比,PM_{2.5} 小鼠血清中炎症细胞因子 IL-4、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 TNF- α 水平也显著高于对照组小鼠,具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6 小鼠的氧化应激的影响

如图 2 所示,与对照组相比,PM_{2.5} 处理小鼠肺组织中 NO 和 MDA 水平升高,SOD 水平降低,具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.3 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6 小鼠的上皮细胞凋亡的影响

如图 3 所示,与对照组小鼠相比,PM_{2.5} 染毒组

细胞凋亡程度逐渐加深,绿色凋亡细胞数量明显增加,以 PM_{2.5} 造模浓度为 10 mg/kg 时最为明显,凋亡细胞主要是支气管上皮细胞。

2.4 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6 小鼠上皮屏障紧密连接蛋白的影响

如图 4A 所示,在暴露于 PM_{2.5} 时,E-cadherin、occludin 和 ZO-1 的棕色阳性蛋白面积表达高于对照组,有剂量依赖性。通过半定量统计发现 E-cadherin 在 PM_{2.5} 造模剂量为 7.5 和 10 mg/kg 时具有统计学意义(图 4B, $P < 0.01$),occludin 在 PM_{2.5} 造模剂量为 10 mg/kg 时具有统计学意义(图 4C, $P < 0.05$),ZO-1 在 PM_{2.5} 造模剂量为 7.5 mg/kg 和 10 mg/kg 时有升高趋势,但无统计学意义(图 4D)。综上,肺上皮屏障在 PM_{2.5} 造模剂量为 10 mg/kg 时破坏最为明显。

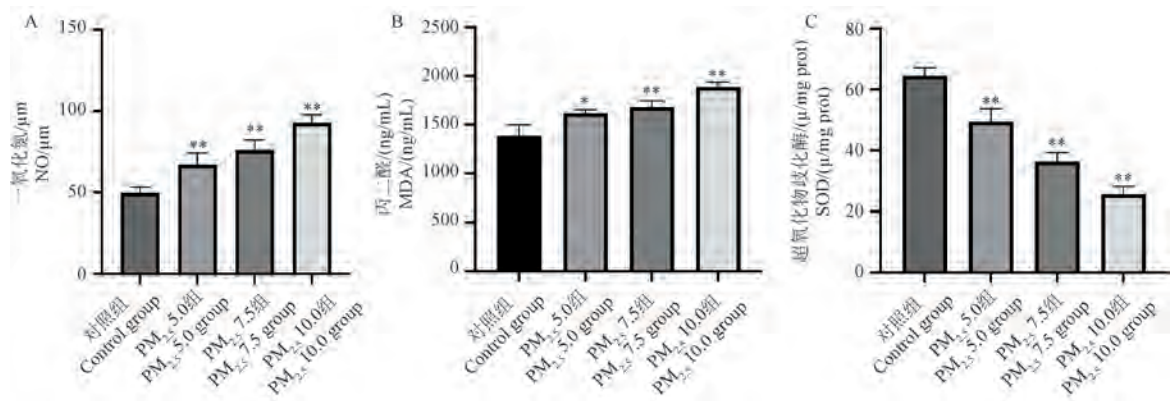
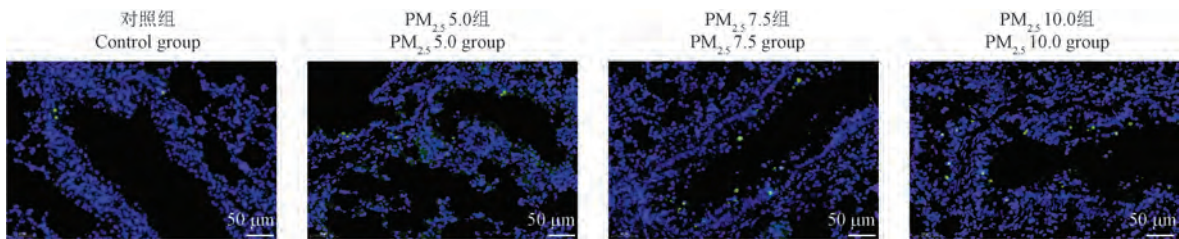


图 2 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6 小鼠氧化应激的影响
Figure 2 Effect of PM_{2.5} exposure on oxidative stress in C57BL/6 mice



注:蓝染:细胞核;绿染:脱落的细胞。
Note. Blue staining. Nucleus. Green staining. Detached cells.

图 3 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6 小鼠上皮细胞凋亡的影响
Figure 3 Effect of PM_{2.5} exposure on epithelial cell apoptosis in C57BL/6 mice

3 讨论

最新发表于《柳叶刀》的全球疾病负担研究结果表明,东亚地区的 PM_{2.5} 污染在健康危险因素中

位列第四^[10]。因 PM_{2.5} 颗粒具备粒径微小、毒性高、停留时间长、运输距离遥远等特性,而人体并不具备对其进行过滤和阻拦的能力。因此,PM_{2.5} 得以随着呼吸进入人体内,并在到达肺泡后沉积,阻

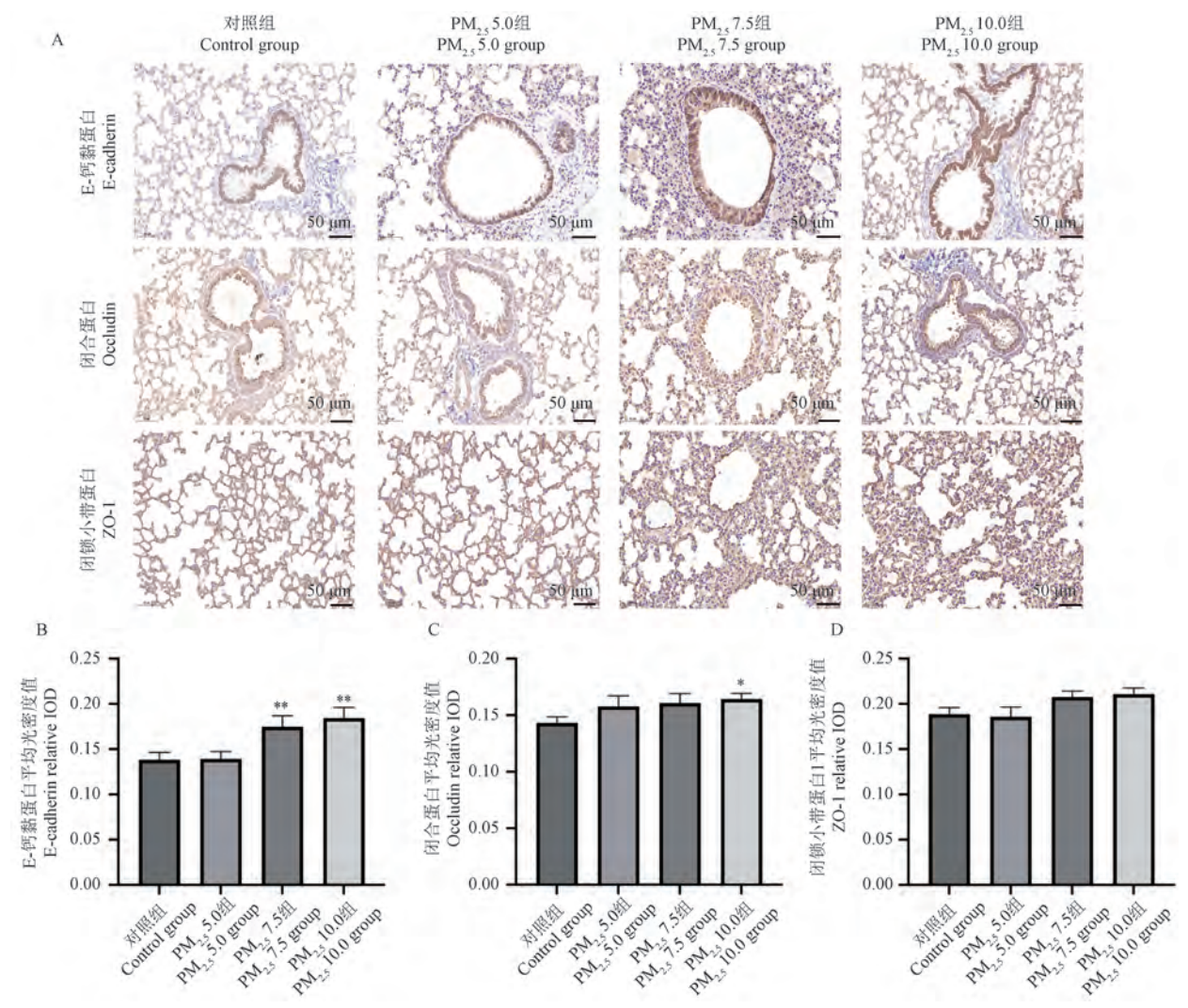


图4 C57BL/6 小鼠急性接触 PM_{2.5} 会引起上皮屏障的破坏

Figure 4 Acute exposure to PM_{2.5} C57BL/6 in mice can cause damage to the epithelial barrier

碍气体交换的正常进行,由此引发呼吸系统疾病。世界卫生组织(World Trade Organization,WTO)发布的有关 PM_{2.5} 水平的初阶标准,即 24 h 平均 PM_{2.5} 浓度为 75 μg/m³^[11]。因此,根据该标准并结合实验小鼠的生理参数,研究团队选取了 10 mg/kg 的 PM_{2.5} 浓度作为进行本次急性 PM_{2.5} 暴露研究的最高剂量。

通过对小鼠肺组织进行 HE 染色切片观察,本研究发现,相较于对照组,暴露于 PM_{2.5} 的小鼠出现肺泡间隔明显增宽、肺泡结构受损,并伴有显著的炎性渗出。随着暴露剂量的逐渐增加,这一趋势呈现逐渐加重的特征。急性 PM_{2.5} 暴露还导致血清中炎症细胞因子 IL-4、IL-1β 和 TNF-α 的水平升高。以上研究结果揭示,急性 PM_{2.5} 暴露引起小鼠肺组织广泛发生炎症反应,其中促炎因子 IL-1β 和

TNF-α 以及抗炎因子 IL-4 的显著升高与现有研究结果一致^[12-13]。此外,本实验结果表明,PM_{2.5} 暴露显著提升了肺组织中 MDA、NO 的表达水平,并降低了 SOD 的活性,这进一步提示机体内活性氧水平和内源性抗氧化能力的失衡。MDA 作为脂质过氧化产物,被广泛应用于评估氧化应激损伤的程度,其水平间接反映了细胞遭受自由基攻击的程度^[14]。SOD 则作为机体抗氧化防御系统的重要组成部分^[15],具有清除超氧阴离子自由基、羟基和过氧化氢的功能,这些结果揭示了 PM_{2.5} 对生物体内氧化还原平衡的不良影响。NO 分子途径与内皮功能紧密相关,特定的 NO 分子通路 with 支气管上皮细胞的凋亡、坏死和增殖密切相关^[16]。NO 通常在免疫反应过程中产生,可直接参与防御病原体入侵和化学或者物理因素引起的免疫反应^[17]。本研究通过

TUNEL 染色观察发现,PM_{2.5} 染毒组凋亡细胞数量明显增加,以 PM_{2.5} 造模浓度为 10 mg/kg 时最为明显,与对照组小鼠相比,凋亡细胞主要位于支气管上皮细胞中。现有研究表明促炎因子 TNF- α 可诱导支气管上皮细胞损伤^[18]。由此可见炎症细胞因子上皮细胞凋亡中发挥重要作用。气道上皮屏障是气道上皮细胞(airway epithelial cells, AECs)在气道和外界之间所形成的,处于免疫的第一线。除了有效地阻止各类吸入病原体的入侵外, AECs 在先天免疫和适应性免疫反应的调控中扮演着至关重要的角色^[19]。为探寻 PM_{2.5} 暴露致肺上皮屏障破坏的剂量相关性,研究进一步采用免疫组化法评估了急性 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6J 小鼠上皮屏障紧密连接蛋白表达水平的影响。肺上皮屏障持续充当抵御外部有害物质的第一道防线。这种屏障维持肺的生理稳态,是防御炎症和外来刺激物的关键调节剂^[20]。本研究发现,PM_{2.5} 暴露导致小鼠肺组织上皮细胞紧密连接蛋白表达代偿性升高,现有研究也有类似发现^[21-23],然而,其中的机制尚不明确,猜测可能是在疾病早期上皮屏障受到刺激时的一种代偿反应。这一结论需要进一步深入研究和讨论。具体在实验过程中可以表现为增加 PM_{2.5} 的给药剂量从 10 mg/kg 变为 20 mg/kg,延长造模时间,从 1 周变成 2 周,观察不同条件下的肺上皮屏障破坏程度,看上皮屏障黏附蛋白和紧密连接蛋白是否有失代偿性的变化,具体可表现为上皮屏障黏附蛋白和紧密连接蛋白的表达降低。

综上所述,PM_{2.5} 暴露能诱导氧化应激和炎症的发生。氧化应激和炎症相关介质的释放在 PM_{2.5} 诱导上皮细胞凋亡和上皮屏障损伤中发挥重要作用,最终得出结论在 PM_{2.5} 造模剂量为 10 mg/kg 时,肺上皮屏障破坏最为明显。

参 考 文 献(References)

- [1] CUI X, LAI W, ZHAO Y, et al. The exosome-mediated cascade reactions for the transfer and inflammatory responses of fine atmospheric particulate matter in macrophages [J]. Environ Sci Technol, 2023, 57(21): 7891-7901.
- [2] ZHAO C, WANG Y, SU Z, et al. Respiratory exposure to PM_{2.5} soluble extract disrupts mucosal barrier function and promotes the development of experimental asthma [J]. Sci Total Environ, 2020, 730: 139145.
- [3] JIN L, DENG L, BARTLETT M, et al. A novel herbal extract blend product prevents particulate matters-induced inflammation by improving gut microbiota and maintaining the integrity of the intestinal barrier [J]. Nutrients, 2022, 14(10): 2010.
- [4] GUAN R, WANG J, LI D, et al. Hydrogen sulfide inhibits cigarette smoke-induced inflammation and injury in alveolar epithelial cells by suppressing PHD2/HIF-1 α /MAPK signaling Pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81: 105979.
- [5] MA Q, QIAN Y, JIANG J, et al. IL-33/ST2 axis deficiency exacerbates neutrophil-dominant allergic airway inflammation [J]. Clin Transl Immunology, 2021, 10(6): e1300.
- [6] ZHAO T, YAN J, ZHANG M, et al. The Elk1/MMP-9 axis regulates E-cadherin and occludin in ventilator-induced lung injury [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 233.
- [7] WANG J, XUE X, ZHAO X, et al. Forsythiaside A alleviates acute lung injury by inhibiting inflammation and epithelial barrier damages in lung and colon through PPAR- γ /RXR- α complex [J]. J Adv Res, 2024, 60: 183-200.
- [8] HEWITT R J, LLOYD C M. Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(6): 347-362.
- [9] ZHANG Y, YANG J, LIU P, et al. Regulatory role of ncRNAs in Pulmonary epithelial and endothelial barriers: molecular therapy clues of influenza-induced acute lung injury [J]. Pharmacol Res, 2022, 185: 106509.
- [10] LIM S S, VOS T, FLAXMAN A D, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010; a systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2224-2260.
- [11] ZHANG Y, HU H, SHI Y, et al. ¹H NMR-based metabolomics study on repeat dose toxicity of fine particulate matter in rats after intratracheal instillation [J]. Sci Total Environ, 2017, 589: 212-221.
- [12] LI J, HU Y, LIU L, et al. PM_{2.5} exposure perturbs lung microbiome and its metabolic profile in mice [J]. Sci Total Environ, 2020, 721: 137432.
- [13] RAN Z, AN Y, ZHOU J, et al. Subchronic exposure to concentrated ambient PM_{2.5} perturbs gut and lung microbiota as well as metabolic profiles in mice [J]. Environ pollut, 2021, 272: 115987.
- [14] GUO C, LYU Y, XIA S, et al. Organic extracts in PM_{2.5} are the major triggers to induce ferroptosis in SH-SY5Y cells [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 249: 114350.
- [15] QU M, ZHAO X, WANG Q, et al. PIEZO mediates a protective mechanism for nematode *Caenorhabditis elegans* in response to nanoplastics caused dopaminergic neurotoxicity at environmentally relevant concentrations [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 269: 115738.
- [16] BAYARRI M A, MILARA J, ESTORNUT C, et al. Nitric oxide system and bronchial epithelium; more than a barrier [J]. Front physiol, 2021, 12: 687381.
- [17] CAO Y, TENG Y, LIU H, et al. *Rhopilema esculentum* polysaccharides enhance epithelial cell barrier in vitro and alleviate chronic colitis in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 241: 124560.

- [18] WANG Y, YU Y, YU W, et al. IL-35 inhibits cell pyroptosis and attenuates cell injury in TNF- α -induced bronchial epithelial cells via P38 MAPK signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 1758–1766.
- [19] HIEMSTRA P S, MCCRAY P B Jr, BALS R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease [J]. Eur Respir J, 2015, 45(4): 1150–1162.
- [20] JIA D, HUAN Z, HAN J, et al. HSF1 enhances the attenuation of exosomes from mesenchymal stem cells to hemorrhagic shock induced lung injury by altering the protein profile of exosomes [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 123: 110693.
- [21] LI J, WANG K, HUANG B, et al. The receptor for advanced glycation end products mediates dysfunction of airway epithelial barrier in a lipopolysaccharides-induced murine acute lung injury model [J]. Int Immuno Pharmacol, 2021, 93: 107419.
- [22] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival [J]. Ann N Y Acad Sci, 2022, 1514(1): 21–33.
- [23] YU Y, ZHU T, LI Y, et al. Repeated intravenous administration of silica nanoparticles induces pulmonary inflammation and collagen accumulation via JAK2/STAT3 and TGF- β /Smad3 pathways *in vivo* [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 7237–7247.

[收稿日期] 2024-01-04

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

任梦娇,严怡婷,张瑜,等. 基于过敏进程的“特应性皮炎-哮喘”小鼠模型的建立与优化 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32 (12): 1572-1580.

REN M J, YAN Y T, ZHANG Y, et al. Establishment and optimization of an “atopic dermatitis-asthma” mouse model based on allergic march [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1572-1580.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.008

基于过敏进程的“特应性皮炎-哮喘”小鼠模型的建立与优化

任梦娇,严怡婷,张瑜,瞿旻晔*,刘涛*

(南京中医药大学中医学院,南京 210023)

【摘要】 目的 比较卵清蛋白(ovalbumins, OVA)及钙泊三醇(calcipotriol, MC903)单独或联合造模条件下模型小鼠皮肤及肺组织敏化进展情况,建立并优化“特应性皮炎-哮喘”过敏进程(atopic march, AM)动物模型。**方法** 6~8周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只,随机分为空白组、模型 A 组、模型 B 组和模型 C 组。三组模型小鼠分别以 MC903、MC903 + OVA 和 OVA 为造模药物,通过 2 次皮肤敏化激发和 1 次呼吸道敏化激发建立 AM 模型。运用皮肤敏化严重程度评分系统、免疫组化和酶联吸附试验等方法,进行皮损形貌学比较、皮肤和肺组织病理学及免疫表型比较。**结果** 与 OVA 或 MC903 单独造模相比较,MC903 联合 OVA 构建的 AM 小鼠模型皮损形貌学改变更为显著、小鼠皮肤敏化严重程度评分更高、皮肤及气道炎症细胞浸润更为严重、相关炎症因子胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)、白介素 4(interleukin 4, IL-4)、白介素-13(interleukin 13, IL-13)及白介素-10(interleukin 10, IL-10)的表达变化更为显著($P < 0.05$)。**结论** 运用 MC903 联合 OVA 优化的 AM 动物模型构建成功,为 AM 机制研究提供了良好的方法学基础。

【关键词】 特应性皮炎;哮喘;过敏进程;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1572-09

Establishment and optimization of an “atopic dermatitis-asthma” mouse model based on allergic march

REN Mengjiao, YAN Yiting, ZHANG Yu, QU Minye*, LIU Tao*

(School of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Corresponding author: QU Minye. E-mail: minye2008@126.com; LIU Tao. E-mail: 13952091103@139.com

【Abstract】 Objective To establish and optimize an animal model of atopic march (AM), skin and lung tissue sensitization under single or combined modeling of ovalbumins (OVA) and calcipotriol (MC903) was compared. **Methods** 40 SPF BALB/c mice aged 6~8 weeks were randomly divided into a control group, model group A, model group B and

【基金项目】 江苏省自然科学基金(BK20230449),江苏省中医药科技发展计划青年基金项目(QN202010),国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目资助(国中医药人教函[2023]85号)。

Funded by Natural Science Foundation of Jiangsu Province(BK20230449), Development Plan of Traditional Chinese Medicine Technology in Jiangsu Province (QN202010), NATCM's Project of High-Level Construction of Key TCM Disciplines Warm Disease (Chinese Medicine Education Letter [2023] No. 85).

【作者简介】 任梦娇,女,在读硕士研究生,研究方向:变态反应性疾病。Email: 20220005@njucm.edu.cn

【通信作者】 瞿旻晔,女,讲师,博士,研究方向:变态反应性疾病。Email: minye2008@126.com;

刘涛,男,教授,博士,研究方向:神经退行性疾病。Email: 13952091103@139.com。

* 共同通信作者

model group C. The 3 of AM models were established with MC903, MC903 + OVA and OVA, respectively, through skin sensitization (twice) and respiratory sensitization (once). Skin sensitization severity scoring system, immunohistochemistry, and enzyme-linked adsorption assay were used to compare skin lesion morphology, skin or lung histopathology, and immunophenotype. **Results** Compared to OVA or MC903 modeling alone, MC903 + OVA modeled mice showed more significant changes in skin morphology, a higher score for skin sensitization severity, more severe skin and airway inflammatory cell infiltration, and more significant changes in the expression of the related inflammatory factors thymic stromal lymphopoietin (TSLP), interleukin 4 (IL-4), IL-13 and IL-10 ($P < 0.05$). **Conclusions** An AM animal model optimized by MC903 combined with OVA was successfully constructed that provides a good method ological basis for AM mechanism research.

【Keywords】 atopic dermatitis; asthma; atopic march; animal model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

过敏性疾病是儿童常见病、多发病。早在 21 世纪初,世界卫生组织已确认过敏是发达国家儿童排名第一的环境流行性疾病^[1]。近十年间,随着我国生产生活水平提高,过敏性疾病的发病率呈指数级上涨,患者数以亿计,给防治工作带来巨大压力^[2]。过敏进程,亦称为特应性进程(atopic march, AM),揭示了过敏性疾病间的内在联系和时序性发展^[3]。特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)作为 AM 的首发疾病,通常出现于婴幼儿时期,表现为皮肤红肿、瘙痒、干燥脱屑,甚至渗出和结痂等^[4-5]。随年龄增长,相当部分 AD 患儿在学龄期可进展为过敏性哮喘(allergic asthma, AA),症状包括喘息、咳嗽、胸闷及呼吸困难,尤以夜间、清晨、接触过敏原或运动后加剧^[6-7]。至青春期,上述患儿罹患变应性鼻炎(allergic rhinitis, AR)的风险加倍,出现鼻塞、流涕、喷嚏及眼痒等症状,部分患儿甚至伴发 AA 加剧,形成“上下气道共病”模式^[8-9]。

构建稳定且贴近人类病理生理过程的 AM 动物模型是探讨过敏性疾病发病机制及潜在治疗策略的必要前提。常用的 AD 的造模方法包括致敏原经皮激发、半抗原涂抹诱导等;AA 的标准模型制备为致敏原腹腔注射结合鼻腔激发^[10-11]。然而,目前尚无公认的 AM 动物模型构建方法,简单机械地联用 AD、AA 造模方法构建共病模型不符合 AM 从皮肤到呼吸道的序贯发展规律;单纯依靠致敏原反复激发又存在成模率低、稳定性差等问题。因此,本研究以小鼠为研究对象,聚焦“皮肤敏化”向“呼吸道敏化”的转归机制,运用致敏原、半抗原单独或联合造模的方法构建“AD-AA”敏化进展模型,并通过对比病理改变、免疫炎症表型等优化造模方案。相关数据的积累,以期为后续发病机制探索、治疗策略开发提供坚实的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,40 只,体重 22 ~ 25 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2022-0004】,饲养于南京中医药大学动物实验中心 SPF 级动物室【SYXK(苏)2023-0076】。饲养环境:温度 20 ~ 25 ℃ ,相对湿度(50 ± 5)%,常规饲料饲养,自由饮食,12 h 光暗周期。实验方案严格遵守《实验动物管理与使用指南》,符合南京中医药大学实验动物伦理审查要求(202401A014)。

1.1.2 药物制备

选用卵清蛋白(ovalbumins, OVA)(Sigma-Aldrich,美国),钙泊三醇(MC903,MCE 公司,美国)为造模药物。OVA 溶于磷酸盐缓冲液(PBS),经皮肤给药,造模剂量为每只 200 μg;经鼻腔注射给药,造模剂量为每只 50 μg。MC903 溶于乙醇(Ethanol, EtOH),经皮肤给药,造模剂量为每只 2 nmol。

1.1.3 主要试剂与仪器

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司, G1076-500ML),胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)、白介素 4(interleukin 4, IL-4)、白介素-13(interleukin 13, IL-13)及白介素-10(interleukin 10, IL-10) ELISA 试剂盒(均购自武汉华美生物工程有限公司, CSB-EL025141MO、CSB-E04634m、CSB-E04602m 及 CSB-E04594m)。

AUW120D 精微电子天平(SHIMADZU CORPORATION, 日本), ELx800 光吸收酶标仪(BIOTEK, 美国), LTF-K 脱水机(派斯杰, 中国),

HistoCore 包埋机 (Leica, 德国), RM2125 RTS 石蜡切片机 (Leica, 德国), 小动物气体麻醉机 (上海玉研科学仪器有限公司, 中国), HH-4 水浴锅 (江苏省金坛市友联仪器研究所, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

根据造模用药的不同, 将实验动物随机分为空白对照组、模型 A 组、模型 B 组和模型 C 组, 每组 10 只。分组见表 1。

1.2.2 造模步骤

阶段 1(首次皮肤敏化激发): 剔除小鼠背部毛

发裸露约 2 cm², 在造模第 0 ~ 10 天用 2 nmol MC903 和 200 μg OVA 分别或交叉间隔涂抹于裸露的背部皮肤, 诱导皮肤急性敏化炎症。

阶段 2(再次皮肤敏化激发): 首次皮肤敏化激发 2 周后, 在造模第 26 ~ 32 天用 200 μg OVA 每隔 1 d 涂抹于背部皮肤, 诱导皮肤慢性敏化炎症。

阶段 3(呼吸道敏化激发): 首次皮肤敏化激发 4 周后, 在造模第 48 ~ 51 天用 50 μg OVA 连续 4 d 经鼻腔注射给药, 诱导呼吸道敏化。于造模第 52 天处死小鼠并进行相关指标检测。

造模步骤如图 1 所示。

表 1 动物分组与造模给药

分组 Groups	阶段 Stages		
	阶段 1	阶段 2	阶段 3
	首次皮肤敏化激发	再次皮肤敏化激发	呼吸道敏化激发
	Stage 1	Stage 2	Stage 3
	First skin sensitization	Second skin sensitization	Respiratory sensitization
空白对照组 Control group	无水乙醇 EtOH	磷酸盐缓冲液 PBS	磷酸盐缓冲液 PBS
模型 A 组 Model group A	卵清蛋白 OVA	卵清蛋白 OVA	卵清蛋白 OVA
模型 B 组 Model group B	卵清蛋白 + 钙泊三醇 OVA + MC903	卵清蛋白 OVA	卵清蛋白 OVA
模型 C 组 Model group C	钙泊三醇 MC903	卵清蛋白 OVA	卵清蛋白 OVA

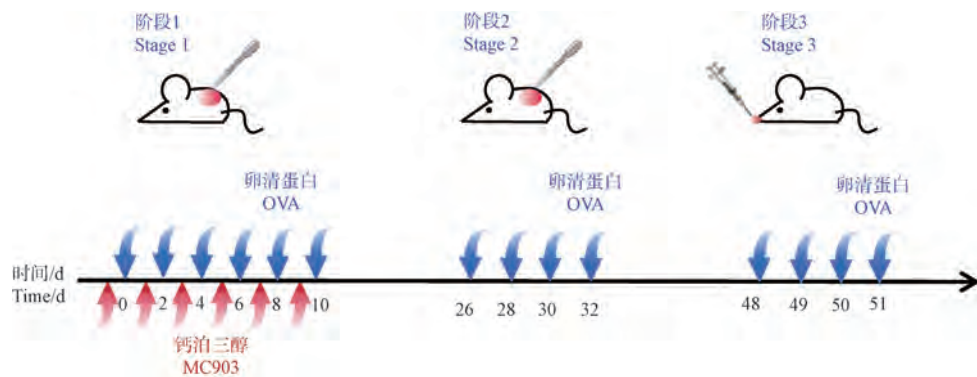


图 1 3 阶段 AM 模型示意图

Figure 1 Schematic diagram of three-stage AM model

1.2.3 皮肤敏化情况评估

(1) 小鼠皮损形貌学观察与严重程度评分: 分别在三次敏化阶段后, 对比观察各组小鼠皮损部位红斑、渗出、结痂和干燥/脱屑和增生的情况, 进行皮肤敏化严重程度评分 (按病情严重程度分值分为: 0-无、1-轻度、2-中度、3-重度和 4-非常严重, 总分 20 分)。

(2) 小鼠皮损组织 HE 染色: 造模结束后, 提取

各组小鼠背部皮肤组织, 用 4% 多聚甲醛固定 48 h, 后进行脱水、石蜡包埋, 制成 5 μm 石蜡切片, 按 HE 染色试剂盒说明书进行 HE 染色, 显微镜扫描并进行不同视野下拍照, 观察分析组织病理学改变。

(3) 小鼠皮损组织 TSLP、IL-4、IL-13 及 IL-10 的 ELISA 检测: 造模结束后, 提取各组小鼠背部皮肤组织, 剪碎、研磨后加入预冷 PBS 进行匀浆, 4 ℃ 离心机中 5000 r/min 离心 10 min, 提取上清备测。按照

ELISA 试剂盒说明步骤进行 TSLP、IL-4、IL-13 以及 IL-10 指标检测,根据标准曲线计算蛋白含量。

1.2.4 气道敏化情况评估

(1)小鼠肺组织 HE 染色:造模结束后,提取各组小鼠左肺组织,固定、包埋、切片后进行 HE 染色并扫描(试剂及实验方法同 1.2.3)。

(2)小鼠肺组织 TSLP、IL-4、IL-13 及 IL-10 的 ELISA 检测:造模结束后,提取各组小鼠右肺组织,制备组织上清(方法同 1.2.3)。按照 ELISA 试剂盒说明步骤进行 TSLP、IL-4、IL-13 以及 IL-10 指标检测,根据标准曲线计算蛋白含量。

1.3 统计学分析

用 Graphpad Prism 10.0 软件进行统计分析。检测结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 三种造模条件下小鼠皮损形貌学比较

肉眼观测下,在两次皮肤敏化激发阶段,3 组模型小鼠均出现明显的红斑、渗出、结痂和干燥,且再

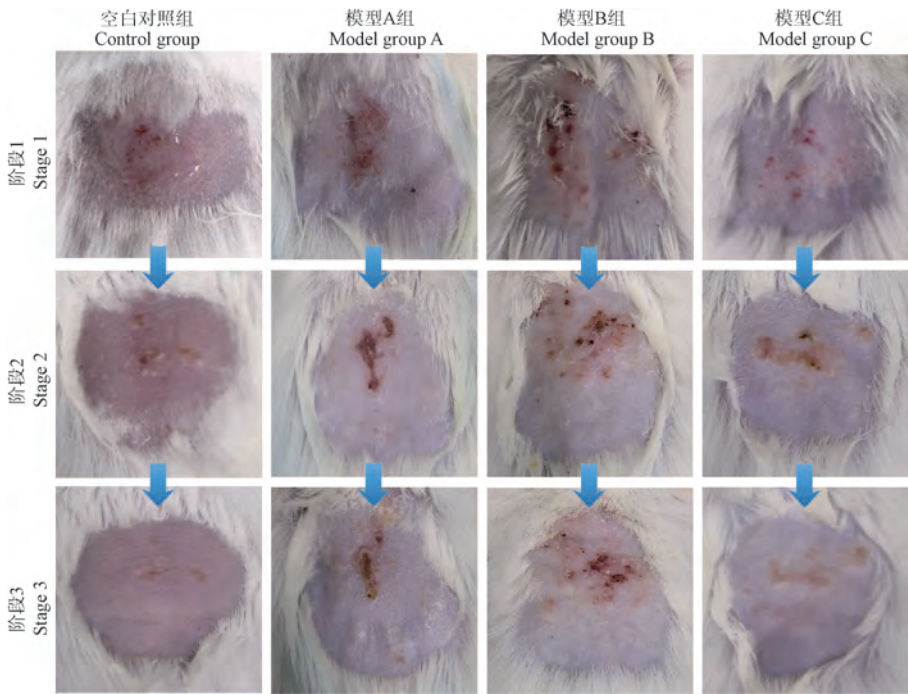
次皮肤敏化激发所诱导的皮损较首次激发范围更大、渗出点更多、并伴有增生及脱屑。在呼吸道敏化激发阶段,模型 A 组与模型 C 组小鼠皮损范围均较前次皮肤敏化激发阶段有所缩小,表现为红斑变淡、结痂脱落、水肿渐消,趋于愈合;而模型 B 组小鼠在呼吸道敏化激发阶段,其皮损形貌较皮肤敏化激发阶段未见明显改善,仍表现为红斑、结痂、增生、脱屑等,提示皮肤慢性炎症迁延。小鼠皮损形貌学比较见图 2。

2.2 三种造模条件下小鼠皮肤敏化严重程度评分

结果显示,敏化激发前各组小鼠皮肤敏化严重程度评分无统计学意义。敏化激发后,各模型组小鼠皮肤敏化严重程度评分均高于同阶段空白对照组(与同阶段空白对照组相比较, $P < 0.05$),且同一阶段各组间评分高低均表现为模型 B 组 > 模型 A 组 > 模型 C 组(同阶段模型 B 组与模型 C 组间比较, $P < 0.05$;阶段 1、阶段 3 模型 B 组与模型 A 组比较, $P < 0.05$)。(见图 3)。

2.3 三种造模条件下小鼠皮损病理学观察

皮损病理显示,与空白对照组相比,三组模型小鼠均有不同程度的表皮角化不全伴浆痂、角质层

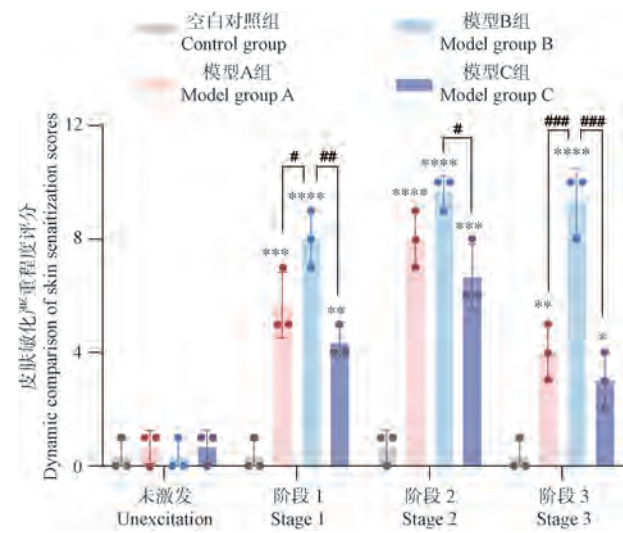


注:阶段 1:首次皮肤敏化;阶段 2:再次皮肤敏化;阶段 3:呼吸道敏化。(下图同)

图 2 不同造模条件下小鼠各阶段皮损形貌学比较

Note. Stage 1. First skin sensitization. Stage 2. Second skin sensitization . Stage 3. Respiratory sensitization. (The same in the following figures)

Figure 2 Comparison of skin morphology of mice at different stages under different modeling conditions



注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$;造模各组组间相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。(下同)

图3 不同造模条件下小鼠皮肤过敏严重程度评分动态比较($n = 3$)

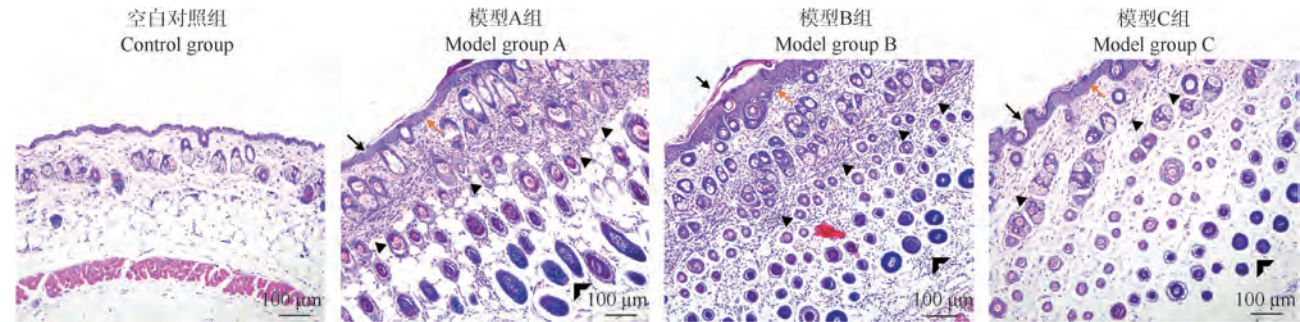
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared between model groups, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 3 Dynamic comparison of skin sensitization severity scores of mice under different modeling conditions($n = 3$)

及棘细胞层增厚、真皮层炎症细胞浸润(图4)。其中,角质层增厚及真皮层炎症浸润程度:模型B组>模型A组>模型C组。

2.4 三种造模条件下小鼠皮肤炎症因子表达情况

提取小鼠皮肤组织进行ELISA检测(图5A),



注:▲:表皮角化不全;▲:角质层增厚;■:棘细胞层增厚;▼:炎症细胞浸润。

图4 不同造模条件下小鼠皮损病理学观察

Note. ▲. Epidermal hypokeratosis. ▲. Stratum corneum thickens. ■. Acanthocyte layer thickens. ▼. Inflammatory cell infiltration.

Figure 4 Pathological observation of skin lesions in mice under different modeling conditions

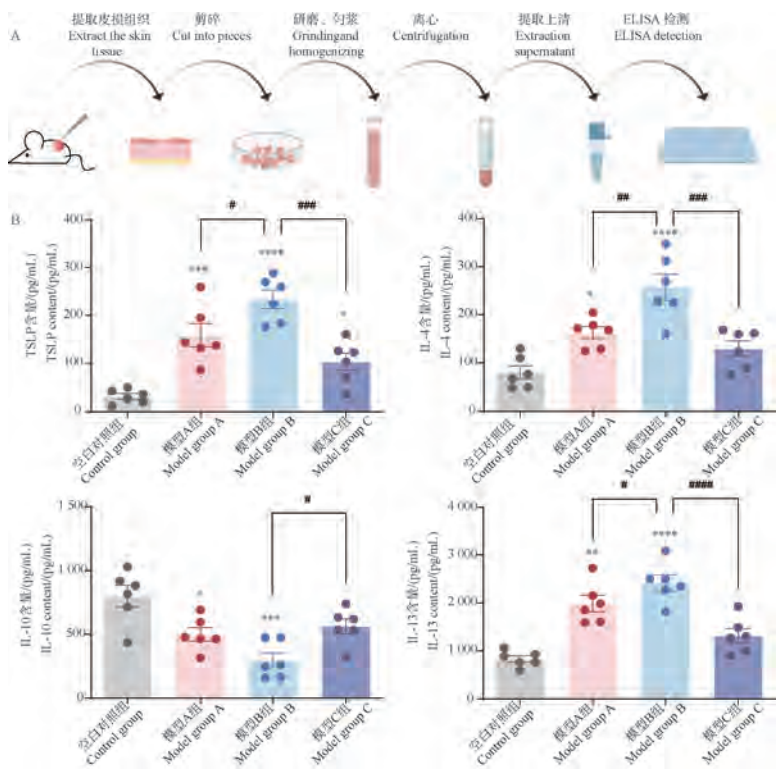
结果所示,三组模型小鼠皮损组织中前炎症因子TSLP及辅助型T细胞2(T helper 2,Th2)型细胞因子IL-4、IL-13的表达均有不同程度升高,其中以模型B组表达更为显著(图5B)。在TSLP表达方面,模型B组与模型A组相比($P < 0.05$),与模型C组相比($P < 0.001$);在IL-4表达方面,模型B组与模型A组相比($P < 0.01$),与模型C组相比($P < 0.001$);在IL-13表达方面,模型B组与模型A组相比($P < 0.05$),与模型C组相比($P < 0.0001$)。模型A组与模型B组小鼠皮损组织中免疫耐受相关细胞因子IL-10的表达均有降低,尤以模型B组更为显著。模型A组与空白对照组相比($P < 0.05$);模型B组与空白对照组相比($P < 0.001$)。

2.5 三种造模条件下小鼠肺组织病理学观察

肺组织病理显示,与空白对照组相比,三组模型小鼠的肺组织中均出现较多的炎症细胞浸润,并伴有气道结构紊乱、黏液分泌以及血管增生。其中,模型B组小鼠气道炎症最为显著,见气管壁周围多层粒细胞浸润,管腔内黏液分泌部分实变(图6)。

2.6 三种造模条件下小鼠肺组织炎症因子表达情况

对小鼠肺组织进行ELISA检测(图7A)三种造模方案所诱导的AM小鼠肺组织中前炎症因子TSLP及Th2型细胞因子IL-4、IL-13的表达均明显升高,免疫耐受相关细胞因子IL-10表达均有不同程度抑制($P < 0.05$)。其中,模型B组小鼠肺组织中TSLP表达量显著高于模型A组、模型C组($P < 0.0001$);模型B组小鼠肺组织中IL-4表达量与模型A组、模型C组相比升高($P < 0.05$);模型B组

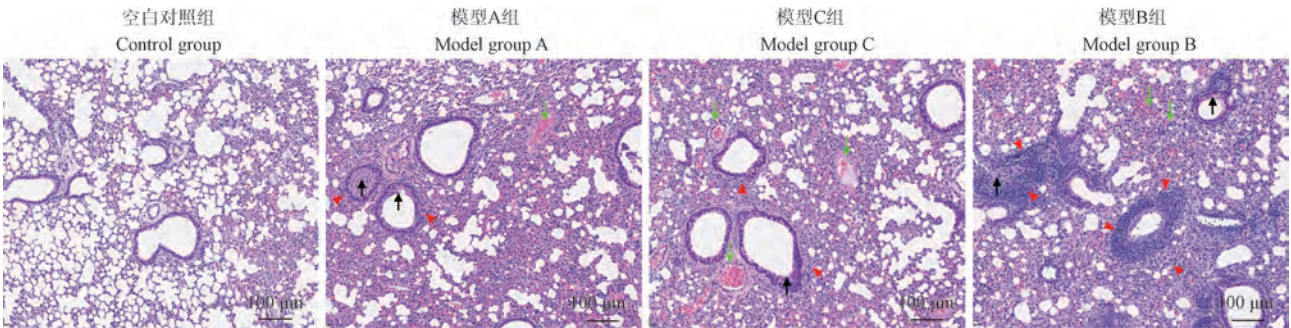


注:A:小鼠皮损组织提取行 ELISA 检测流程;B:小鼠皮损组织炎症因子表达;造模各组组间相比,**** $P < 0.0001$ 。

图 5 不同造模条件下小鼠皮损组织炎症因子表达情况($n = 6$)

Note. A. Procedure for extraction of mouse skin tissue and ELISA detection. B. Expression of inflammatory factors in mouse skin lesions. Compared between model group, **** $P < 0.0001$.

Figure 5 Expression of inflammatory factors in mice skin lesions under different modeling conditions($n = 6$)



注: ↑:黏液分泌;▲:炎症细胞浸润;↓:血管增生。

图 6 不同造模条件下小鼠肺组织病理学观察

Note. ↑. Epidermal hypokeratosis. ▲. Inflammatory cell infiltration. ↓. Angiogenesis.

Figure 6 Lung histopathology of mice under different modeling conditions

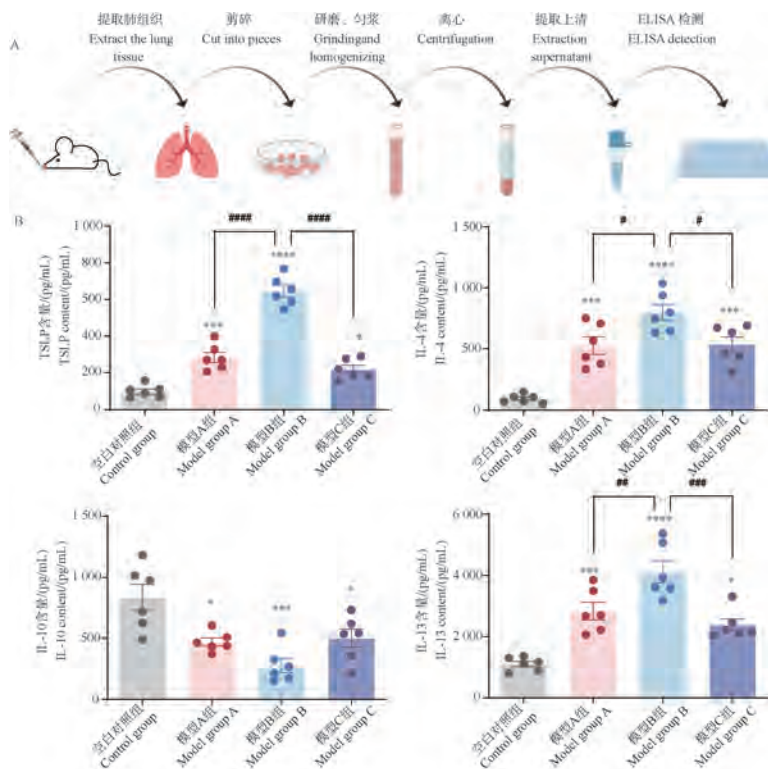
小鼠肺组织中 IL-13 表达量与模型 A 组相比升高 $P < 0.01$),与模型 C 组相比显著升高 $P < 0.001$)(结果见图 7B)。

3 讨论

纵观过敏性疾病的自然进程,遵循由皮肤过敏至呼吸道过敏的“外-内”传导规律^[12-13]。列队研究显示,大约一半的 AD 患儿在学龄期会出现 AA,三

分之二的重度 AD 患儿在青春期会出现 AR^[14]。动物模型的研究也证实,通过胶带剥脱、抗原激发等多种方法诱导的 AD 样皮损能够激活机体免疫,增强后续呼吸道致敏的易感性^[15]。因此,探索 AD 不良预后与其他过敏性疾病发生的潜在关联,有望解开 AM“敏化传导”的机制迷团,为过敏性疾病的防控和治疗打开新思路。

TSLP 是过敏性疾病起始阶段最重要的上皮衍



注:A:小鼠肺组织提取行 ELISA 检测流程;B:小鼠肺组织炎症因子表达。

图 7 不同造模条件下小鼠肺组织中炎症因子表达情况($n = 6$)

Note. A. Procedure for extraction of mouse lung tissue and ELISA detection. B. Expression of inflammatory factors in mouse lung tissue.

Figure 7 Expression of inflammatory factors in lung tissue of mice under different modeling conditions($n = 6$)

生细胞因子,其通过激活 DC,诱导 $CD4^+$ T 细胞向 Th2 分化,促进 Th2 型适应性免疫是过敏性疾病发生的共同免疫学基础^[16]。动物模型的研究为 TSLP 参与敏化进展提供了可靠依据。研究发现,通过皮内注射 TSLP 的方法能够成功诱导全身性 Th2 型炎症反应并促发严重的呼吸道过敏;而抑制皮肤源性 TSLP 的表达或诱导 Th2 细胞急剧衰竭均能够显著的改善气道炎症的进展^[17]。因此,皮肤源性 TSLP 是推动敏化进展的关键分子,其通过诱导 Th2 偏移,促进构建炎症优势免疫微环境,可能是 AM 发生的潜在机制。

目前认为,机体免疫耐受机制的缺陷是 Th2 极化难以控制的深层原因^[18]。Treg 细胞是机体应对炎症反应的负反馈调节机制。生理状态下,其通过分泌抑炎因子、调节 DC 分化等维持自身耐受并防止炎症反应过度损伤机体^[18]。然致敏条件下,Treg 的功能通常是削弱的。一方面,Th2 细胞大量活化增值,竞争结合 IL-12,诱导 Treg 凋亡;另一方面,Th2 型细胞因子的高表达,又抑制了 Treg 的负反馈调节功能^[18-19]。众多的临床研究已证实,特应性患者外周循环中存在 Th2 的偏移与 Treg 的抑制^[20-22]。

较新的机制研究也发现,抑制皮肤源性 Treg 扩增能够促进局部炎症反应迅速向致命的全身状态扩散^[23]。因此,Th2 介导的炎症反应与 Treg 介导的免疫耐受更能客观反映机体在致敏刺激下的免疫失衡状态。

综上,在本实验中,将 TSLP、Th2 型炎症因子 IL-4、IL-13,及 Treg 相关炎症因子 IL-10 纳入检测指标,通过检测相关炎症因子的表达情况,分析 AM 模型气道和呼吸道的敏化炎症情况,以筛选最优造模方案。

在造模方案的设计上,有文献报道以致敏原配合胶带剥脱诱发皮肤急性变态反应性炎症,再经雾化吸入致敏原以增强气道反应性的 AM 造模方法^[24-26]。OVA 作为过敏性疾病最常用的致敏原,具有敏感性高、成本较低等优势,然若单独皮肤或呼吸道给药而不配合佐剂腹腔注射,则需要较长周期且引起的炎症较轻^[26]。MC903 作为维生素 D 衍生物能够诱导皮肤角质形成细胞过度表达 TSLP,从而诱发 AD 样皮损^[27]。基于 TSLP 在 AM 中的重要启动作用,本研究在 OVA 皮肤初次致敏的基础上加用 MC903,通过增强诱导皮肤源性 TSLP 的表达,模拟

皮肤炎症损伤对后续敏化进展的影响。由于 AM 进展年限跨度较大,涉及 AD 急性发作、慢性迁延以及 AA 发生。因此,本研究设计了 3 阶段致敏方案:包括皮肤急性致敏,皮肤慢性致敏和呼吸道致敏。在诱导气道敏化的实验设计上,由于雾化吸入实验条件难以控制,因此改用经鼻腔注射的方法,以便控制实验条件的均一。为客观反映优化造模方案的可行性,以传统 OVA 造模方法及 MC903 单独给药造模方法作为对照。

研究发现,三种造模方法均能成功诱导皮肤过敏向呼吸道过敏进展。其中,MC903 联合 OVA 构建的 AM 模型小鼠皮损更为严重,气道炎症细胞浸润更为剧烈,皮肤及肺部的促炎症因子的表达更为显著、抑炎因子表达更为抑制。因此,我们认为运用 MC903 联合 OVA 优化的 AM 动物模型成功。综上,本研究动物模型的成功建立为 AM 机制研究及防治工作提供了必要条件和良好的方法学基础。

参 考 文 献(References)

- [1] GUILBERT J J. The world health report 2002-reducing risks, promoting healthy life [J]. Educ Health, 2003, 16(2): 230.
- [2] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016 年版) [J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(3): 167-181.
- Respiratory Group, Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, Guidelines for diagnosis. Prevention and treatment of bronchial asthma in children (2016 edition) [J]. Chin J Pediatr, 2016, 54(3): 167-181.
- [3] MRKIĆ KOBAL I, PLAVEC D, VLAŠIĆ LONČARIĆ Ž, et al. Atopic March or atopic multimorbidity-overview of current research [J]. Medicina, 2023, 60(1): 21.
- [4] MAIELLO N, COMBERIATI P, GIANNETTI A, et al. New directions in understanding atopic March starting from atopic dermatitis [J]. Children, 2022, 9(4): 450.
- [5] 王成硕,王向东,张罗.《变应性鼻炎及其对哮喘的影响(ARIA)》指南 2016 年修订版解读 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 53(10): 798-800.
- WANG C S, WANG X D, ZHANG L. An introduction to Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision [J]. Chin J Otorhinolaryngol Head Neck Surg, 2018, 53(10): 798-800.
- [6] WAN J, WANG S, SHIN D B, et al. Incident asthma, asthma exacerbations, and asthma-related hospitalizations in patients with atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2024, 12(2): 421-430.
- [7] 渠莉田,苏惠春,程波. 特应性皮炎与系统性疾病相关性的研究进展 [J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54(5): 463-466.
- QU L T, SU H C, CHENG B. Associations between atopic dermatitis and systemic diseases [J]. Chin J Dermatol, 2021, 54(5): 463-466.
- [8] DAVIDSON W F, LEUNG D Y M, BECK L A, et al. Report from the national institute of allergy and infectious diseases workshop on “atopic dermatitis and the atopic march: mechanisms and interventions” [J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 143(3): 894-913.
- [9] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 上-下气道慢性炎症性疾病联合诊疗与管理专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(26): 2001-2022.
- Asthmatic Group, Society of Respiratory, Chinese Medical Association. Expert consensus on joint diagnosis, treatment and management of chronic inflammatory diseases of upper and lower airway [J]. Natl Med J China, 2017, 97(26): 2001-2022.
- [10] 邵钺超,魏明镜,万昊悦,等. 特应性皮炎的细胞、皮肤模型构建方法研究进展 [J]. 山东医药, 2024, 64(8): 111-115.
- SHAO Z C, WEI M J, WAN H Y, et al. Research progress on cell and skin model construction methods of atopic dermatitis [J]. Shandong Med J, 2024, 64(8): 111-115.
- [11] NIALS A T, UDDIN S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge [J]. Dis Model Mech, 2008, 1(4/5): 213-220.
- [12] GUTTMAN-YASSKY E, ZHOU L, KRUEGER J G. The skin as an immune organ: Tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions [J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 144(2): 362-374.
- [13] 瞿晔晔,袁晓琳,马健. 特应性皮炎发病过程及其机制研究现状探讨 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2015, 29(10): 1085-1087.
- QU M Y, YUAN X L, MA J. Current research on pathogenesis and mechanism of atopic dermatitis [J]. Chin J Dermatovenereology, 2015, 29(10): 1085-1087.
- [14] PALLER A S, SPERGEL J M, MINA-OSORIO P, et al. The atopic March and atopic multimorbidity: Many trajectories, many pathways [J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 143(1): 46-55.
- [15] KIMITSU T, KAMIJO S, YOSHIMURA T, et al. Antigen protease activity on intact or tape-stripped skin induces acute itch and T helper sensitization leading to airway eosinophilia in mice [J]. JID Innov, 2024, 4(1): 100239.
- [16] 李渤,祝戎飞. 抗胸腺基质淋巴细胞生成素治疗在 2 型炎症通路相关疾病的应用及展望 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2023, 17(3): 258-265.
- LI L, ZHU R F. Anti-thymic stromal lymphopoietin therapy in type 2 inflammatory pathway-related diseases: Applications and

- perspectives [J]. *Chin J Allergy Clin Immunol*, 2023, 17(3): 258–265.
- [17] LEYVA-CASTILLO J M, HENER P, JIANG H, et al. TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic March in mice [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(1): 154–163.
- [18] SHARMA A, RUDRA D. Regulatory T cells as therapeutic targets and mediators [J]. *Int Rev Immunol*, 2019, 38(5): 183–203.
- [19] GOCHER-DEMSKE A M, CUI J, SZYMCAK-WORKMAN A L, et al. IFN γ -induction of Th1-like regulatory T cells controls antiviral responses [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(5): 841–854.
- [20] 王相华, 李冬芹, 张金凤, 等. Th1/Th2/Th17/Treg 平衡在特应性皮炎中的变化规律 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2018, 32(5): 503–506.
- WANG X H, LI D Q, ZHANG J F, et al. Study on the Th1/Th2/Th17/treg balance in atopic dermatitis [J]. *Chin J Dermatovenereology*, 2018, 32(5): 503–506.
- [21] 韩飞燕, 许肖杰, 王英. 脂肪间充质干细胞来源分泌体通过 mTOR 通路调节变应性鼻炎患者外周血 Th2/Treg 平衡 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2024, 38(2): 140–145.
- HAN F Y, XU X J, WANG Y. Adipose-derived stem cell-derived exosomes regulate Th2/Treg balance in peripheral blood of AR patients through the mTOR pathway [J]. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2024, 38(2): 140–145.
- [22] 时国朝, 万欢英. 支气管哮喘的免疫发病机制-从 Th1/Th2 细胞失衡到 Th2/Treg 细胞失衡 [J]. *内科理论与实践*, 2011, 6(2): 92–95.
- SHI G C, WAN H Y. Immunopathogenesis of bronchial asthma- from Th1/Th2 cell imbalance to Th2/Treg cell imbalance [J]. *J Intern Med Concepts Pract*, 2011, 6(2): 92–95.
- [23] KASHIWAGI M, HOSOI J, LAI J F, et al. Direct control of regulatory T cells by keratinocytes [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(3): 334–343.
- [24] 窦侠, 刘小明, 李子卓, 等. 粉尘螨诱导建立“特应性皮炎-哮喘”小鼠模型 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2018, 32(3): 275–280.
- DOU X, LIU X M, LI Z Z, et al. A mouse model of atopic March induced by epicutaneous immunization with house dust mite allergen: a preliminary study [J]. *Chin J Dermatovenereology*, 2018, 32(3): 275–280.
- [25] 罗承慧, 高江瑞, 陈俊威, 等. 尘螨诱导特应性皮炎小鼠模型和哮喘小鼠模型的构建 [J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55(3): 1257–1267.
- LUO C H, GAO J R, CHEN J W, et al. Construction of mouse model of dust mite induced atopic dermatitis and asthma [J]. *Acta Vet Zootechnica Sin*, 2024, 55(3): 1257–1267.
- [26] SHARMA S, SETHI G S, NAURA A S. Curcumin ameliorates ovalbumin-induced atopic dermatitis and blocks the progression of atopic March in mice [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 358–369.
- [27] MOOSBRUGGER-MARTINZ V, SCHMUTH M, DUBRAC S. A mouse model for atopic dermatitis using topical application of vitamin D3 or of its analog MC903 [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1559: 91–106.

[收稿日期] 2024-07-23

郑泽民,刘可,张延英,等. PADI2 在自身免疫性疾病中的作用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1581-1587.
ZHENG Z M, LIU K, ZHANG Y Y, et al. Research progress on the role of PADI2 in autoimmune diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1581-1587.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.009

PADI2 在自身免疫性疾病中的作用研究进展

郑泽民^{1,2}, 刘可^{1,2}, 张延英¹, 赵亚^{2*}, 师长宏^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 肽基精氨酸脱亚胺酶 2 (peptidylarginine deiminases 2, PADI2) 是一种可以催化蛋白质肽链上精氨酸残基转化为瓜氨酸残基的水解酶, 其异常活化后, 可导致过度的组织炎症和免疫反应, 并最终促进自身免疫性疾病 (autoimmune diseases, ADs) 的进程。PADI2 可以通过调节蛋白质瓜氨酸化, 改变其结构和免疫原性, 一方面促进自身免疫蛋白的形成, 另一方面影响包括中性粒细胞和巨噬细胞在内的多种免疫细胞的活性, 进而调节自身免疫和炎症反应, 参与 ADs 的发生发展。因此, 本文综述了 PADI2 的功能及其在 ADs 的作用, 以期揭示 ADs 的发病机制, 以及相关疾病的治疗提供新的靶点和策略。

【关键词】 肽基精氨酸脱亚胺酶 2; 瓜氨酸化; 自身免疫性疾病; 炎症反应; 免疫细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1581-07

Research progress on the role of PADI2 in autoimmune diseases

ZHENG Zemin^{1,2}, LIU Ke^{1,2}, ZHANG Yanying¹, ZHAO Ya^{2*}, SHI Changhong^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Corresponding author: ZHAO Ya. E-mail: zhaoya1992@fmmu.edu.cn; SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Peptidylarginine deiminases 2 (PADI2) is an enzyme that catalyzes the conversion of arginine residues to citrulline on protein peptides. Aberrant activation of PADI2 can induce excessive tissue inflammation and immune responses, thereby exacerbating the progression of autoimmune diseases (ADs). Through citrullination, PADI2 modifies protein structure and immunogenicity, influencing the production of autoantibodies and regulating the activity of immune cells such as neutrophils and macrophages. This review provides an overview of PADI2's functions and its pivotal role in ADs, with the objective of elucidating the mechanisms underlying ADs pathogenesis and identifying novel therapeutic targets and strategies for related diseases.

【Keywords】 peptidylarginine deiminases 2; citrullination; autoimmune disease; inflammatory response; immune cells

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

肽基精氨酸脱亚胺酶 2 (peptidylarginine deiminases 2, PADI2) 是一种受高浓度 Ca^{2+} 调控, 可催化精氨酸残基转换为瓜氨酸残基的水解酶^[1]。

蛋白质发生瓜氨酸化后, 其结构和功能会发生显著改变, 进而影响机体的免疫炎症反应、细胞的增殖凋亡等过程^[2]。在自身免疫性疾病 (autoimmune

【基金项目】 国家自然科学基金 (32300428), 陕西省创新能力的支持计划 (2022PT-42), 军队实验动物专项课题 (SYDW2020-20)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (NSFC) Young Scientists Fund project (32300428), Shaanxi Province Innovation Capacity Support Plan (2022PT-42), Special Topic of Military Experimental Animals (SYDW2020-21).

【作者简介】 郑泽民, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: PADI2 敲除小鼠糖尿病模型的制备与评价。Email: 2371961091@qq.com

【通信作者】 赵亚, 女, 硕士, 助教, 研究方向: 疾病动物模型制备与评价。Email: zhaoya1992@fmmu.edu.cn;

师长宏, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 疾病动物模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn。

* 共同通信作者

diseases, ADs)、癌症和慢性炎症相关疾病等多种疾病进程中,均发现 PADI2 含量的改变^[3-4],提示 PADI2 可能参与多种疾病的发生发展。PADI2 作为一种关键的调控因子,在多种细胞中通过催化蛋白瓜氨酸化,改变细胞生理过程进而影响 ADs 的发生发展^[5-7],已有大量研究发现 PADI2 与 ADs 之间密切相关^[8],PADI2 可以通过瓜氨酸化蛋白从而促进自身抗体的形成,并影响炎症免疫细胞的功能和活性,最终诱发和加重 ADs。

综上所述,靶向 PADI2 可能是 ADs 治疗的新型方法。但鲜有文章详细综述 PADI2 的功能及其在 ADs 中的作用。因此,本文通过综述 PADI2 在自身免疫调节和炎症反应中的功能,以及其在 ADs 的进程中发挥的调节作用,以期后续 PADI2 相关研究和 ADs 的治疗提供策略和参考。

1 免疫失调和炎症反应是自身免疫性疾病的主要特征

ADs 的本质是免疫系统的异常激活和功能失调。免疫系统无法区分致病因子和自身抗原,使得正常组织被错误的攻击和破坏从而加重组织损伤,导致疾病的迁延不愈,甚至使疾病激发加重^[9]。在某些因子的刺激和催化后,可导致一些正常蛋白结构发生异构化如蛋白的瓜氨酸化,这些异构化的蛋白会增加免疫系统的错误识别几率,从而诱发免疫失调并促进 ADs 的进展^[10-11]。因此,降低非必要的异构化蛋白的产生以减少自身抗体的形成,平衡免疫系统的功能失调和减轻免疫细胞所导致的炎症损伤是防治 ADs 的有效策略。

2 PADI2 发挥作用的机制

PADI2 通过修饰蛋白质多肽链上的精氨酸残基瓜氨酸化后,一方面导致自身抗原的形成和暴露进而引发免疫系统的异常活化;另一方面,还影响部分免疫细胞的功能加重免疫失调和炎症反应,可参与类风湿性关节炎、多发性硬化症等多种 ADs 的进程^[12-13](图 1)。已有实验证实了 PADI2 催化的瓜氨酸化蛋白可以作为新抗原的丰富来源^[14],靶向 PADI2 以及瓜氨酸化的新抗原在免疫治疗中具有重要意义^[15]。此外,PADI2 在中性粒细胞、巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞的活化与发挥功能的过程中也起到关键作用,这对于维持免疫系统的平衡和正常的免疫应答至关重要^[6,16]。

2.1 PADI2 催化蛋白瓜氨酸化促进自身抗瓜氨酸肽抗体形成诱发 ADs

PADI2 可以催化蛋白质中的精氨酸残基转化为瓜氨酸残基,使蛋白结构发生异构化,从而产生新的抗原性蛋白质。这些瓜氨酸化的蛋白质可能被免疫系统错误地识别为外源性抗原,从而引发自身免疫反应。抗瓜氨酸肽抗体(anti-citrullinated peptide antibodies, ACPA)可识别蛋白质中的瓜氨酸^[17],是具有不同种型用途即:免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 的自身抗体的集合,也是类风湿性关节炎的标志性抗体之一^[18]。研究发现,可自我瓜氨酸化的 ECV340 细胞系表达高水平的 PADI2,并且可以产生多种被类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者的 ACPA 识别的瓜氨酸化抗原;利用蛋白组学分析,ECV304 细胞系可以鉴定出 RA 患者血清中一些特定瓜氨酸化自身抗原的出现顺序并监测其在 RA 的不同时期的变化^[19],表明 ECV304 细胞系可作为检测具有高诊断特异性的 ACPA,并允许鉴定单个 RA 血清靶向的特定瓜氨酸化蛋白的基础和临床研究工具,有可能成为检测 RA 进程的有效方法。此外,RA 相关表达“共享表位”的人类白细胞抗原 DR(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)等位基因与 ACPA 的产生有关,HLA-DR 限制性 T 细胞有助于抗体对已知可被 ACPA 识别的众多瓜氨酸化蛋白产生反应。选择正常的 C57 小鼠和转入 HLA-DR4 的人源化小鼠,分别用 PADI2 重组蛋白免疫后发现,瓜氨酸化肽特异性 B 细胞内化 PADI2/瓜氨酸化肽复合物,并将 PADI2 肽呈递给 T 细胞,有助于 ACPA 产生^[20]。通过研究 PADI2 调节的瓜氨酸化蛋白在胶原诱导的关节炎中的作用发现,虽然 PADI2 对于浆细胞、T 细胞的活化无显著作用,但是高水平抗胶原抗体的产生和维持离不开 PADI2 的作用^[8]。并且,在化脓性汗腺炎(hidradenitis suppurativa, HS)中,PADI2 也可能通过催化蛋白瓜氨酸化促进自身 ACPA 的形成,参与 HS 的发生发展。有研究表明 HS 患者血清中检测到了 ACPA 的存在,进一步研究发现瓜氨酸化波形蛋白、瓜氨酸化纤维蛋白原、瓜氨酸化丝聚蛋白和瓜氨酸化烯醇化酶的抗体含量显著升高,并且 PADI2 基因以及蛋白表达量均升高^[21],提示 PADI2 在 HS 病变中发挥了重要作用,并可能有助于 ACPA 的产生。

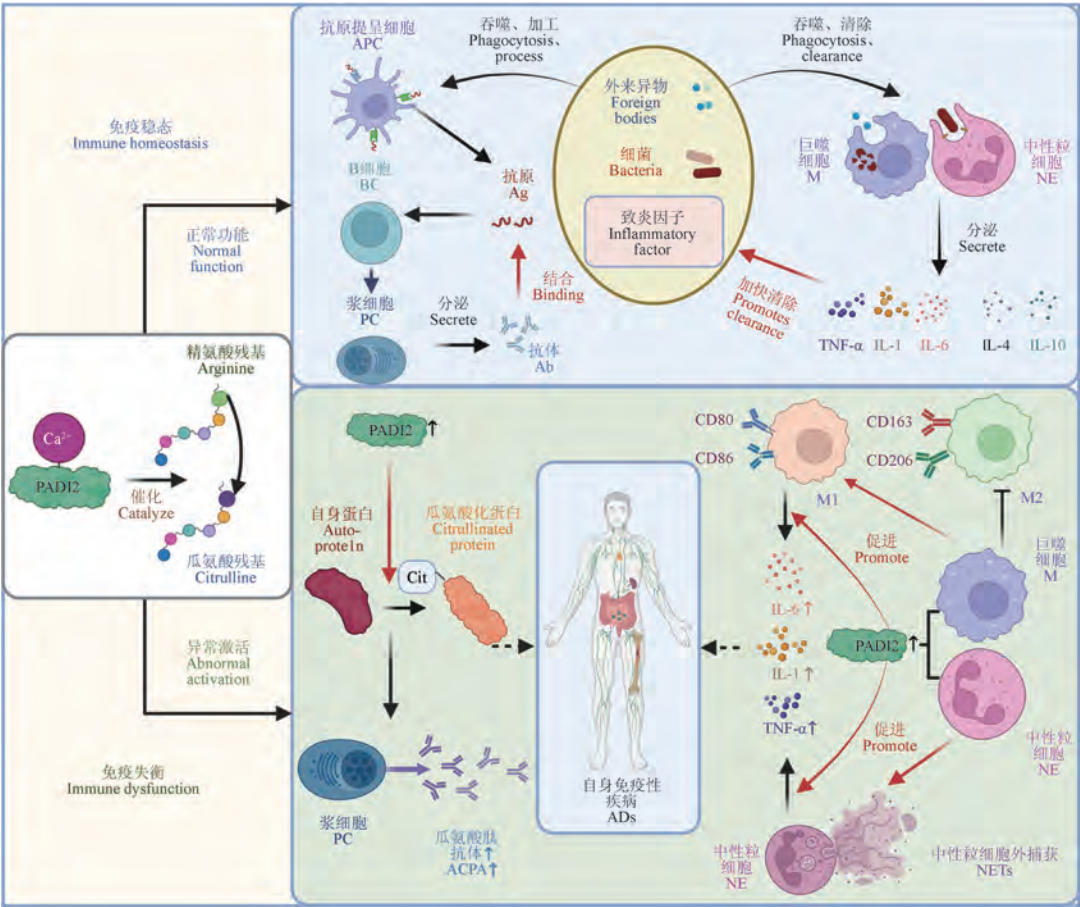


图 1 PADI2 调节自身免疫和炎症反应影响 ADs 的进程

Figure 1 PADI2 regulates autoimmune and inflammatory responses and affects the progression of ADs

ADs 可能与阿尔茨海默病有关,但其关联尚不清楚^[22-23]。在痴呆型阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 患者 (DAT) 的血清中也存在 ACPA,这可能是由于 DAT 患者星形胶质细胞的蛋白发生瓜氨酸化后获得新抗原性,进而导致了 ACPA 的产生^[24]。

总之, PADI2 通过催化蛋白瓜氨酸化促进 ACPA 的产生在自身免疫性疾病进程中发挥重要作用,可能为 ADs 的诊断和治疗提供新思路。

2.2 PADI2 调节免疫细胞活性和免疫炎症反应加重 ADs

ADs 的过程中存在多种免疫细胞的增殖、迁移、活化甚至极化,这些细胞可通过释放炎症因子等诱发或加重局部的炎症损伤,加剧 ADs 的进程。大量实验证实了 PADI2 在免疫细胞的活性以及炎症反应的调节中发挥重要作用。

2.2.1 PADI2 调节中性粒细胞外捕获和炎症反应加重 ADs

中性粒细胞 (neutrophil), 是人体含量最多的白

细胞,发挥吞噬杀灭细菌和参与炎症反应的作用。活化的中性粒细胞可向细胞外释放由解聚的染色质和细胞内颗粒蛋白组成的细胞捕获网,以捕获和杀死病原体^[25]。PADI2 是中性粒细胞细胞外捕获 (neutrophil extracellular traps, NETs) 过程的重要因子之一,主要通过调节组蛋白等蛋白的瓜氨酸化影响 NETs 形成及其炎症因子的释放。PADI2 主要通过调节 NETs 进而影响了系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 的进展。与健康对照者相比, SLE 患者血清中的 NETs 复合物明显升高^[26]。一些 NETs 的残余物可以作为 SLE 患者结局的预测指标^[27]。PADI2 抑制剂治疗可以改善狼疮肾炎小鼠的血管、肾以及皮肤损伤,体内和体外实验研究发现其机制主要是通过减少 NETs 的形成^[28],进一步探索 PADI2 抑制剂治疗对 NETs 的异常生成的改善作用有助于 SLE 的防治。

除了影响 NETs 外, PADI2 还可通过调节一些蛋白质瓜氨酸化间接影响中性粒细胞炎症因子的合成、释放和活性。在炎症过程中,中性粒细胞可

以释放肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等多种炎症因子。抑制 PADI2 可以通过减少 NETs 的形成,进而减少血液中 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的含量减轻全身炎症反应^[29],这为 RA 的治疗提供了借鉴^[30]。

2.2.2 PADI2 促进巨噬细胞 M1 型活化加重 ADs

PADI2 在巨噬细胞中也发挥一定作用。研究发现,巨噬细胞内的 PADI2 对于细胞的分化、表型转化和炎症因子的释放均具有重要调节作用。PADI2 在巨噬细胞的分化过程中表达增加,敲除或抑制 PADI2 后,可以减少胞内蛋白的瓜氨酸化进而抑制巨噬细胞分化,并减少炎症因子的释放^[31-32]。PADI2 是 THP-1 巨噬细胞内含量最高的 PADI2 分子亚型。沉默或抑制 THP-1 巨噬细胞中的 PADI2 后可以减少巨噬细胞向 M1 表型的转变并促进其向 M2 表型的转变^[6]。PADI2 对于巨噬细胞的吞噬能力和黏附能力也有影响作用。纤维蛋白原可以通过促进 PADI2 的表达进而增强肺部巨噬细胞的活性和吞噬能力,敲除 PADI2 后,纤维蛋白原暴露的小鼠肺组织中巨噬细胞的数量和吞噬能力均下降^[33]。PADI2 敲除后还可以损害巨噬细胞的黏附能力^[32]。

PADI2 可通过促进巨噬细胞 M1 型极化从而驱动 ADs 的发生和进展。PADI2 催化的瓜氨酸化的滑膜蛋白和纤维蛋白原显著激活了巨噬细胞的 M1 极化,加重了 RA 患者滑膜组织的炎症反应及纤维化^[12]。抑制 PADI2 活性通过下调瓜氨酸化蛋白表达抑制巨噬细胞的 M1 型极化并减少了促炎因子的含量^[31]。

2.2.3 PADI2 调节 T 细胞功能和活性加重 ADs

PADI2 还可以调节 T 细胞功能和细胞活性。PADI2 可以通过调节 T 细胞内蛋白的瓜氨酸化影响细胞活性和细胞的表型分化、识别能力,并最终改变 ADs 的进展。在 Jurkat T 细胞中过表达 PADI2 后,会降低细胞活力并促进细胞凋亡^[34]。另一研究发现,PADI2 主要通过促进了第五蛋白如波形蛋白在 T 细胞表面的表达,进而促进 Jurkat T 细胞的凋亡^[35]。PADI2 可以调节 T 细胞向 TH1 和 TH17 的促炎表型分化参与 SLE 的发生发展,PADI2 敲除后可降低 T 细胞的促炎分化以及免疫复合物形成最终改善 SLE 的免疫失调和器官损伤^[16]。近来研究还发现,PADI2 介导的蛋白质瓜氨酸化可以增加胰

腺组织中 T 细胞的活化和抗原识别,并进一步促进自身免疫影响 I 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)的发生^[36]。在 T1DM 中,PADI2 催化葡萄糖调节蛋白发生瓜氨酸化后显著影响 CD8⁺ T 细胞的抗原识别能力,这从侧面反映出了 PADI2 可能通过调节 T 细胞的功能影响 ADs 的发展^[37]。

免疫失调后的自身抗体形成和免疫炎症损伤贯穿于 ADs 的进程,而 PADI2 在促进自身抗体形成和调节免疫炎症反应中扮演着不可或缺的角色。这都提示出 PADI2 可能在 ADs 中起到关键性作用,未来继续针对 PADI2 调控的生理及病理性生物学过程展开深入研究将有助于 ADs 的治疗和预后改善。

2.3 PADI2 调节其他生物学过程参与 ADs

除了常见的通过促进自身抗体形成和调节免疫细胞活性以外,也有一些研究报道 PADI2 可以通过催化组织中的特异性胞内及胞外蛋白的瓜氨酸化进而影响 ADs 的发生发展。

RA 患者关节滑液中的纤维蛋白原存在较高水平的瓜氨酸化,体外实验使用人重组 PADI2 同样可以瓜氨酸化纤维蛋白原并鉴定出了一些瓜氨酸化位点,这些瓜氨酸化的位点可为 RA 的诊断和治疗提供帮助^[38]。缺氧可以调节缺氧诱导因子的产生影响人成纤维细胞样滑膜细胞中的某些蛋白瓜氨酸化和 PADI2 的表达^[39],提示缺氧可能通过调控 PADI2 表达进而调节蛋白瓜氨酸化,参与 RA 进程。SLE 患者外周血单核细胞中的自噬以及蛋白瓜氨酸化水平显著升高,免疫抑制剂治疗后可以通过减少 PADI2 的表达含量、瓜氨酸化的波形蛋白数目并且调节自噬来干预 SLE 的发生^[40]。有研究鉴定出了星形胶质细胞特异性标志蛋白胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和波形蛋白也可被修饰成瓜氨酸化蛋白,在阿尔茨海默症的发病过程中,PADI2 显著增强 GFAP 瓜氨酸化,通过串联质谱仪发现了 GFAP 的两个独立瓜氨酸化位点(R270Cit 和 R416Cit)^[41]。PADI2 可通过促进髓鞘碱性蛋白的瓜氨酸化促进多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)的发生发展,高水平的雌二醇会显著增加 C6 神经胶质瘤细胞中 PADI2 的活性影响 MS 的进展,而维生素 D 对于 MS 具有保护作用可能是因为它发挥了降低 PADI2 活性的功能^[42]。

还有一些研究仅发现了 PADI2 和某些 ADs 间存在一定的相关性,但 PADI2 在这些 ADs 发病中的

具体作用机制未做深入探讨。转录组学分析发现了间歇性复发型和继发性进展型 MS 患者均存在 PADI2 基因的差异性表达,并且都表现出一定的炎症特征和神经元修复的损伤^[43]。抑制 PADI2 的活性或可改善 MS 所导致的部分损伤和功能障碍^[44-45]。PADI2 在肠道黏膜的分化过程中表达增多,但在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)发病过程中或肠道上皮的异型性增生时往往表达显著降低,这提示 PADI2 的低表达与患者的不良预后之间存在相关性^[46]。通过对炎性和非炎性 UC 患者进行结肠活检并进行转录组学分析,筛选出 PADI2 是 UC 患者炎症相关的关键组蛋白修饰基因之一,这或许有助于 UC 患者的个性化治疗和管理^[47]。也有文章表明 PADI2 对于 UC 存在潜在的改善作用。有研究通过大规模的数据集筛选,鉴定出了包括 PADI2 在内的多个有助于肠道黏膜屏障修复的标志基因^[48]。PADI2 在 ADs 进展中具体的作用机制,仍需进一步去探讨和验证,以期为疾病的治疗提供新的思路和方法。

3 总结与展望

自身免疫性疾病是目前危害机体健康的重要因素,给患者和社会都带来了重大负担。深入了解 ADs 的病因和发病分子机制可以为疾病的防治提供更有效策略。由于免疫系统异常激活攻击自身抗原和免疫细胞介导的免疫炎症反应贯穿在 ADs 进程中,改善免疫系统失衡和减轻炎性损伤成为防治 ADs 的有效手段。

PADI2 主要通过调节蛋白多肽链上精氨酸残基的瓜氨酸化调节自身抗体的形成、免疫细胞的功能并且改变正常蛋白的免疫原性,促进 NETs、炎性细胞因子释放、细胞极化等病理生理过程,进而参与 ADs 进程。因此,敲除 PADI2 或抑制其活性是治疗 ADs 的潜在有效方法。已有实验使用 PADI2 泛抑制剂或者 PADI2 选择性抑制剂来进行疾病防治和发病机制的研究^[31,49-50]。但 PADI2 抑制剂相关研究仍处于初步阶段,PADI 泛抑制剂虽然适用性更广泛但其浓度过高后会损伤细胞。PADI2 的特异性抑制剂具有更少的脱靶效应和细胞毒性但作用相对有限。因此需要进一步研究和改进已有的 PADI2 抑制剂,并对其安全性和有效性进行系统评估后,开展相关的临床研究和试验,应用于 ADs 的治疗。并且,寻找和研发针对 PADI2 的药物将有助于更好

的区分 PADI2 在正常生理和病理状态下的功能,从而为 ADs 的防治和改善患者预后提供经验和策略。

参 考 文 献(References)

- [1] LI H, MUHETAER G, XIE Y, et al. Identification of super-enhancer-driven peptidyl arginine deiminases as potential biomarkers and therapeutic targets for osimertinib-resistant non-small cell lung cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1071365.
- [2] SAIPI M A, HO I C. Citrullination of matrisomal proteins in health and diseases [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2023, 378(1890): 20220244.
- [3] SÁNCHEZ-TIRADO E, AGÜÍ L, SÁNCHEZ-PANIAGUA M, et al. Serum autoantibody biomarkers for management of rheumatoid arthritis disease [J]. *Biosensors*, 2023, 13(3): 381.
- [4] XUE T, LIU X, ZHANG M, et al. PADI2-catalyzed mek1 citrullination activates ERK1/2 and promotes IGF2BP1-mediated sox2 mRNA stability in endometrial cancer [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(6): 2002831.
- [5] MERCER A, JAUNMUKTANE Z, HRISTOVA M, et al. Differential, stage dependent detection of peptidylarginine deiminases and protein deimination in lewy body diseases-findings from a pilot study [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13117.
- [6] STACHOWICZ A, PANDEY R, SUNDARARAMAN N, et al. Protein arginine deiminase 2 (PAD2) modulates the polarization of THP-1 macrophages to the anti-inflammatory M2 phenotype [J]. *J Inflamm*, 2022, 19(1): 20.
- [7] KIM S E, PARK J W, KIM M J, et al. Accumulation of citrullinated glial fibrillary acidic protein in a mouse model of bile duct ligation-induced hepatic fibrosis [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0201744.
- [8] MERGAERT A M, DENNY M F, KINGSTAD-BAKKE B, et al. Peptidylarginine deiminase 2 in murine antiviral and autoimmune antibody responses [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 5258221.
- [9] WANG L, WANG F S, GERSHWIN M E. Human autoimmune diseases; a comprehensive update [J]. *J Intern Med*, 2015, 278(4): 369-395.
- [10] CURRAN A M, GIRGIS A A, JANG Y, et al. Citrullination modulates antigen processing and presentation by revealing cryptic epitopes in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1061.
- [11] MCELWEE M K, DILEEPAN T, MAHMUD S A, et al. The CD4⁺ T cell repertoire specific for citrullinated peptides shows evidence of immune tolerance [J]. *J Exp Med*, 2023, 220(12): e20230209.
- [12] WANG M, WU J, LEI S, et al. Genome-wide identification of RNA modification-related single nucleotide polymorphisms

- associated with rheumatoid arthritis [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 153.
- [13] ENGSTRÖM M, ERIKSSON K, LEE L, et al. Increased citrullination and expression of peptidylarginine deiminases independently of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in gingival tissue of patients with periodontitis [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 214.
- [14] KATAYAMA H, KOBAYASHI M, IRAJIZAD E, et al. Protein citrullination as a source of cancer neoantigens [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(6): e002549.
- [15] CHOUDHURY R H, SYMONDS P, PASTON S J, et al. PAD-2-mediated citrullination of nucleophosmin provides an effective target for tumor immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(2): e003526.
- [16] LIU Y, LIGHTFOOT Y L, SETO N, et al. Peptidylarginine deiminases 2 and 4 modulate innate and adaptive immune responses in TLR-7-dependent lupus [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(23): e124729.
- [17] KUROWSKA W, KUCA-WARNAWIN E H, RADZIKOWSKA A, et al. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Cent Eur J Immunol*, 2017, 42(4): 390–398.
- [18] 陈丽川, 段波, 喻昭, 等. 穴位埋线通过 PD-1/OX40 信号通路影响类风湿关节炎的炎症水平 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(10): 8–14, 80.
- CHEN L C, DUAN B, YU Z, et al. Acupoint catgut embedding affects the level of inflammation in rheumatoid arthritis through the PD-1/OX40 signaling pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(10): 8–14, 80.
- [19] DE FRANÇA N R, MÉNARD H A, LORA M, et al. Characterization and use of the ECV304 autoantigenic citrullinome to understand anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 23.
- [20] HEMON M F, LAMBERT N C, ROUDIER J, et al. PAD2 immunization induces ACPA in wild-type and HLA-DR4 humanized mice [J]. *Eur J Immunol*, 2022, 52(9): 1464–1473.
- [21] BYRD A S, CARMONA-RIVERA C, O' NEIL L J, et al. Neutrophil extracellular traps, B cells, and type I interferons contribute to immune dysregulation in hidradenitis suppurativa [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(508): eaav5908.
- [22] YEUNG C H C, AU YEUNG S L, SCHOOLING C M. Association of autoimmune diseases with Alzheimer's disease: a Mendelian randomization study [J]. *J Psychiatr Res*, 2022, 155: 550–558.
- [23] 栾晶, 胡峰瑞, 郭慧芳, 等. APP/PS1ΔE9 阿尔茨海默症小鼠脾免疫细胞以及相关干细胞比例与正常小鼠的差异研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 482–487.
- LUAN J, HU F R, GUO H F, et al. Differences in the proportion of splenic immune cells and related stem cells between Alzheimer's model (APP/PS1ΔE9) mice and normal mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 482–487.
- [24] SATOH K, KAWAKAMI A, SHIRABE S, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP antibody) is present in the sera of patients with dementia of Alzheimer's type in Asian [J]. *Acta Neurol Scand*, 2010, 121(5): 338–341.
- [25] THIAM H R, WONG S L, QIU R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(13): 7326–7337.
- [26] CASEY K A, SMITH M A, SINIBALDI D, et al. Modulation of cardiometabolic disease markers by type I interferon inhibition in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(3): 459–471.
- [27] WHITTALL-GARCIA L P, NADERINABI F, GLADMAN D D, et al. Circulating neutrophil extracellular trap remnants as a biomarker to predict outcomes in lupus nephritis [J]. *Lupus Sci Med*, 2024, 11(1): e001038.
- [28] KNIGHT J S, SUBRAMANIAN V, O' DELL A A, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2199–2206.
- [29] WU Z, DENG Q, PAN B, et al. Inhibition of PAD2 improves survival in a mouse model of lethal LPS-induced endotoxic shock [J]. *Inflammation*, 2020, 43(4): 1436–1445.
- [30] LI B, LI P, BI L. Igaratimod dose dependently inhibits the expression of citrullinated proteins and peptidylarginine deiminases 2 and 4 in neutrophils from rheumatoid arthritis patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2020, 39(3): 899–907.
- [31] LAI N S, YU H C, TUNG C H, et al. Increased peptidylarginine deiminases expression during the macrophage differentiation and participated inflammatory responses [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 108.
- [32] YU H C, TUNG C H, HUANG K Y, et al. The essential role of peptidylarginine deiminases 2 for cytokines secretion, apoptosis, and cell adhesion in macrophage [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5720.
- [33] LI F J, SUROLIA R, SINGH P, et al. Fibrinogen mediates cadmium-induced macrophage activation and serves as a predictor of cadmium exposure in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2022, 322(4): L593–L606.

[34] YANG Y F, WANG C M, HSIAO I H, et al. Peptidylarginine deiminase 2 promotes T helper 17-like T cell activation and activated T cell-autonomous death (ACAD) through an endoplasmic reticulum stress and autophagy coupling mechanism [J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 19.

[35] HSU P C, LIAO Y F, LIN C L, et al. Vimentin is involved in peptidylarginine deiminase 2-induced apoptosis of activated Jurkat cells [J]. Mol Cells, 2014, 37(5): 426–434.

[36] MARRE M L, MCGINTY J W, CHOW I T, et al. Modifying enzymes are elicited by ER stress, generating epitopes that are selectively recognized by CD4⁺ T cells in patients with type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2018, 67(7): 1356–1368.

[37] AZOURY M E, SAMASSA F, BUITINGA M, et al. CD8⁺ T cells variably recognize native versus citrullinated GRP78 epitopes in type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2021, 70(12): 2879–2891.

[38] SHARMA M, DAMGAARD D, SENOLT L, et al. Expanding the citrullinome of synovial fibrinogen from rheumatoid arthritis patients [J]. J Proteomics, 2019, 208: 103484.

[39] YU R, LI C, SUN L, et al. Hypoxia induces production of citrullinated proteins in human fibroblast-like synoviocytes through regulating HIF1α [J]. Scand J Immunol, 2018, 87(4): e12654.

[40] COLASANTI T, SPINELLI F R, BARBATI C, et al. Belimumab decreases autophagy and citrullination in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. Cells, 2022, 11(2): 262.

[41] ISHIGAMI A, MASUTOMI H, HANDA S, et al. Mass spectrometric identification of citrullination sites and immunohistochemical detection of citrullinated glial fibrillary acidic protein in Alzheimer’s disease brains [J]. J Neurosci Res, 2015, 93(11): 1664–1674.

[42] GHASEMPOUR G, ZAMANI-GARMSIRI F, SHOJAEI S, et al. Vitamin D3 and estradiol alter PAD2 expression and activity levels in C6 glioma cells [J]. Mult Scler Relat Disord, 2021, 56: 103221.

[43] NALI L H, OLIVAL G S, SOUSA F T G, et al. Whole transcriptome analysis of multiple Sclerosis patients reveals active inflammatory profile in relapsing patients and downregulation of neurological repair pathways in secondary progressive cases [J]. Mult Scler Relat Disord, 2020, 44: 102243.

[44] SARSWAT A, WASILEWSKI E, CHAKKA S K, et al. Inhibitors of protein arginine deiminases and their efficacy in animal models of multiple sclerosis [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25(9): 2643–2656.

[45] TEJEDA E J C, BELLO A M, WASILEWSKI E, et al. Noncovalent protein arginine deiminase (PAD) inhibitors are efficacious in animal models of multiple sclerosis [J]. J Med Chem, 2017, 60(21): 8876–8887.

[46] CANTARIÑO N, MUSULÉN E, VALERO V, et al. Downregulation of the deiminase PADI2 is an early event in colorectal carcinogenesis and indicates poor prognosis [J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(9): 841–848.

[47] YE S, LYU Y, CHEN L, et al. Construction of a molecular inflammatory predictive model with histone modification-related genes and identification of CAMK2D as a potential response signature to infliximab in ulcerative colitis [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1282136.

[48] ZHAO X H, ZHAO P, DENG Z, et al. Integrative analysis reveals marker genes for intestinal mucosa barrier repairing in clinical patients [J]. iScience, 2023, 26(6): 106831.

[49] SUN B, CHANG H H, SALINGER A, et al. Reciprocal regulation of Th2 and Th17 cells by PAD2-mediated citrullination [J]. JCI Insight, 2019, 4(22): e129687.

[50] MARTÍN MONREAL M T, REBAK A S, MASSARENTI L, et al. Applicability of small-molecule inhibitors in the study of peptidyl arginine deiminase 2 (PAD2) and PAD4 [J]. Front Immunol, 2021, 12: 716250.

[收稿日期] 2024-06-06

张越,李湘茹,权金强,等. SNP 检测方法在实验动物遗传质量检测中的研究进展和应用[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1588-1593.

ZHANG Y, LI X R, QUAN J Q, et al. Research progress and application of single nucleotide polymorphism detection methods for genetic quality testing of laboratory animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1588-1593.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.010

SNP 检测方法在实验动物遗传质量检测中的研究进展和应用

张越¹, 李湘茹¹, 权金强^{1*}, 高彩霞^{2*}, 夏长友², 赵生国¹

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 动物疫病防控全国重点实验室, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 国家禽类实验动物资源库, 哈尔滨 150069)

【摘要】 实验动物作为生命科学研究的重要实验材料,其质量的均一性对实验结果的准确性和可靠性起到关键作用,而实验动物的遗传质量检测是评价实验动物遗传质量高低的重要环节。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为分子标记已被广泛应用于实验动物遗传检测,随着现代生物技术的进步,实验动物的 SNP 遗传质量检测方法也一直在更新。本文主要梳理了目前 SNP 检测方法在实验动物遗传质量检测中的研究进展和应用,以及各种检测方法的优缺点,以期实验动物的遗传质量检测提供参考依据。

【关键词】 实验动物;遗传质量;SNP;检测方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1588-06

Research progress and application of single nucleotide polymorphism detection methods for genetic quality testing of laboratory animals

ZHANG Yue¹, LI Xiangru¹, QUAN Jinjiang^{1*}, GAO Caixia^{2*}, XIA Changyou², ZHAO Shengguo¹

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. National Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, Heilongjiang Provincial Key

Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, National Poultry Laboratory Animal

Resource Center, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural

Sciences(CAAS), Harbin 150069, China)

Corresponding author: QUAN Jinjiang. E-mail:quanjinjiang@163.com;GAO Caixia. E-mail:gaocaixia@caas.cn

【Abstract】 Laboratory animals provide an important experimental resource for life science research, and their uniformity plays a key role in the accuracy and reliability of the experimental result. Genetic quality testing of laboratory animals is thus essential to evaluate the genetic quality of laboratory animals. Progress in modern biotechnology has led to improvements in the method of genetic testing of experimental animals. Single nucleotide polymorphisms, as molecular markers, have been widely used in genetic testing of laboratory animals, and method for their detection in laboratory

【基金项目】 国家重点研发计划项目(2021YFF0703000),国家生猪技术创新中心先导科技项目(NCTIP-XD1C09),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610302022018)。

Funded by National Key Research and Development Program of China(2021YFF0703000), Pilot Technology Project of National Pig Technology Innovation Center(NCTIP-XD1C09), Central Public Welfare Basic Scientific Research Institutes were Special(1610302022018)。

【作者简介】 张越,女,在读硕士研究生,研究方向:动物遗传育种与繁殖。Email:1830299867@qq.com

【通信作者】 权金强,男,博士,讲师,研究方向:动物遗传育种与繁殖。Email:quanjinjiang@163.com;

高彩霞,女,博士,副研究员,研究方向:实验动物质量控制。Email:gaocaixia@caas.cn。

* 共同通信作者

animals have been updated, in line with biotechnology advances. In this paper, we review current research progress and the application of SNP detection method for genetic quality testing of laboratory animals, and discuss the advantages and disadvantages of various detection method, with a view to providing a reference basis for genetic quality testing of laboratory animals.

【Keywords】 laboratory animal; genetic quality; SNP; detection method

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

实验动物作为生命科学研究的重要材料,其质量的均一性对实验结果的准确性和可靠性起着决定性作用,而遗传质量是影响实验动物质量高低的重要因素之一。早期研究中,动物遗传检测方法主要从形态学、细胞学、免疫学以及分子水平上进行遗传检测^[1]。免疫学标记是在动物所具有的免疫特性的基础上进行的,主要检测方法有血细胞凝集反应、细胞毒试验、同系异体组织移植法等^[2]。生化标记基因检测法也称同工酶法,这一方法检测主要根据不同位点的电泳速度来判定表型,再根据表型鉴别品系和分析封闭群体的遗传结构^[3]。虽然各种检测方法都能提供一些部分的有价值的遗传信息,但它们都具有各自的局限性,如下颌骨测定法用来遗传标记的位点非常有限,并且需要较长时间的饲养和观察,取下颌骨的操作也较为繁琐^[4]。

随着现代生物技术的发展,在分子水平对实验动物进行遗传检测的方法弥补了传统检测方法的许多不足,并且结果准确性高、检测所需时间短、费用低^[3]。尤其是单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测是目前实验动物遗传质量控制过程中最主要的研究方法,也是评价实验动物遗传质量的重要指标^[5]。SNP 作为一种经典的遗传分子标记检测,在生物学、医学和遗传学等^[6-7]领域具有广泛的应用价值,其具有高准确性、高灵敏度和快速等优点,可以在 DNA 序列中识别和区分不同的等位基因,为实验动物的遗传质量评估提供有力支持。目前已知的 SNP 检测方法有 DNA 测序法、基因芯片、Snapshot 法、质谱技术、KASP 等技术。本文将主要探讨实验动物 SNP 检测方法的研究进展及其应用,并分析其局限性和未来发展趋势,以期为实验动物遗传质量检测提供更加高效、便捷和精准的技术手段。

1 实验动物 SNP 检测方法

1.1 DNA 测序法

自 1977 年 SANGER^[8]建立“双脱氧链终止测序法(又称 Sanger 测序法)”以来,DNA 测序是 20 世

纪生物学研究中最重要发明之一,极大地推动了生物学和医学的发展,特别是在基因组学、遗传学和医学研究等领域。Sanger 测序是 DNA 序列分析的经典方法,可直接获取核酸序列信息。该方法采用 4 种不同颜色的荧光染料来标记四种双脱氧核苷酸终止子,代替了之前的同位素标记引物方法,在一个反应管中可同时进行四个末端终止反应。利用聚丙烯酰胺凝胶分离终止反应的产物后,采用计算机荧光检测系统读取四种双脱氧核苷酸终止子,提高了测序的速度。

随着人类基因组计划的圆满完成,正式步入了后基因组时代,即功能基因组时代。在这一阶段,科研人员对基因功能的深入探索以及大规模基因组测序的需求日益增长,传统的测序方法因其在测序深度、速度及成本方面的局限性,已无法满足这一新时代的需求。因此,第二代测序技术以其高通量、高效率、低成本和准确性高等显著优势,迅速成为基因组学、转录组学、表观遗传学等领域研究的重要工具。主要包括罗氏 454 公司的 GSFLX 测序平台^[9]、Illumina 公司的 Solexa Genome Analyzer 测序平台^[10]和 ABI 公司的 SOLiD 测序平台^[11]。DNA 第三代测序技术,即单分子测序技术,彻底革新了 DNA 测序的方式。第三代测序技术主要以 PacBio 公司的单分子实时测序(SMRT)^[12]和 Oxford Nanopore Technologies 公司的纳米孔测序技术(nanopore sequencing)^[13]为代表。与传统的测序方法相比,第三代测序在测序过程中无需依赖 PCR 扩增,而是直接对每一条 DNA 分子进行单独测序。这种技术也被称为从头测序技术或单分子实时 DNA 测序,它提供了更高的测序速度和更低的测序成本^[14-16]。通过直接读取单分子的序列信息,第三代测序技术能够更准确地揭示基因组的复杂性和多样性。尽管近年来随着新技术的不断发展,第三代单分子测序技术已被逐渐应用于生命科学相关的研究中^[17],但作为第一代经典的 Sanger 测序因其高分辨率、高精准度、结果直观、便于分析等优点仍然被广泛使用,这些优点使得它在许多领域中仍然保

持着不可替代的地位。可惜的是第三代测序技术的超长读长和直接测序的特点,使得在 SNP 检测过程中能够更准确地识别出变异位点,减少误判和漏判。同时,提高了 SNP 检测的效率。但该方法未见普遍的应用在实验动物遗传质量检测中。

1.2 基因芯片检测

基因芯片 (gene chip) 是利用核酸杂交原理建立的一种高通量 SNP 检测平台,属于生物芯片的一种。

它是一种基于微阵列技术的检测方法,其设计基础包括基因连锁、限制性长度的多态性及连锁不平衡等基因定位方法,工作原理主要依赖于同源 DNA 分子杂交。在测序过程中,基因芯片采用的是杂交测序方法。在芯片上,数以万计的特定序列的 DNA 片段 (基因探针) 被有规律地排列和固定。这些探针能与来自 DNA 样本的特定基因序列发生特异性杂交。当带有荧光标记的核酸序列与基因芯片上对应位置的核酸探针产生互补匹配时,通过确定荧光强度最强的探针位置,可以获得一组序列完全互补的探针序列。据此,可以重组出靶核酸的序列。目前,美国 Nanogene 公司研制的 Nanochip 电子微阵列^[18-19],可极大提高检测的灵敏度和反应速度,使花费数小时的杂交反应只需要 23 s 即可完成。

1.3 Snapshot 法

Snapshot 是一种由美国应用生物公司 (ABI) 开发的商业技术,它基于荧光标记的单碱基延伸原理,建立了一种称为小测序的分型方法^[18]。该技术的关键在于设计引物,其 3' 末端应紧挨着 SNP 位点,同时针对不同的 SNP 位点,可以设计不同长度的延伸引物。这样,通过引物的长度差异,就可以区分不同的 SNP 位点。在检测过程中,多重 PCR 扩增在一个含有测序酶和四种荧光标记的 ddNTP 体系中进行。由于加入的是双脱氧核糖核苷酸,因此引物延伸一个碱基就会终止。延伸产物通过测序仪检测,根据峰移动的位置可以确定延伸产物对应的 SNP 位点,而根据峰的颜色则可以确定 SNP 位点的碱基种类。

Snapshot 法具有操作简单、经济实惠的优点,可以在多种遗传分析仪上进行快速、准确的基因分型^[20],该技术实现了 SNP 分析的自动化,可以方便高效地用于高通量的 SNP 验证及中通量的 SNP 筛选,且每次反应可以检测多个 SNP 位点,具有更高的检测效率。

1.4 质谱法

质谱法是一种基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 的检测方法^[21-22],发展于 20 世纪末期^[23],其检测过程中,需将样品与芯片基质共价结合形成结晶后,经过质谱仪的激光激发 DNA 分子片段。由于飞行时间与离子的质量成反比,于是可利用飞行时间判断 DNA 片段的分子量大小,从而确定 SNP 位点。其检测原理同样使用了单碱基延伸技术,在多重 PCR 扩增时,其扩增产物将在 SNP 位点上终止延伸,形成不同分子量的检测产物,再利用质谱分析获得图谱,而不同分子量的延伸产物,在其对应的分子量位置上可查看检测峰图,由此确定 SNP 位点。

质谱法广泛应用于高通量的 SNP 检测中,并已经取得了突破性进展,理论上准确率可高达 100%^[24-25]。此方法的特点是应用质谱法进行 SNP 分析,根据不同的分子量可以将等位基因排序:如产物中存在两个单核苷酸多态性位点,但由于质谱法是利用多重 PCR 反应的原理实现对多个 SNP 位点的同时检测,过多的引物在一个反应体系中容易形成引物二聚体,增加引物设计的难度。目前质谱检测技术是测定 SNP 最为准确的方法之一。

1.5 竞争性等位基因特异性 PCR

竞争性等位基因特异性 PCR (kompetitive allele specific PCR, KASP) 是 SNP 分析的第三代分子标记技术,是在已知 SNP 的终端荧光条件下,通过读取判断终端荧光的基因分型技术^[26-27]。传统的 Sanger 测序需要较长的 DNA 片段才能进行准确的分析,而 KASP 技术则可以在较短的 DNA 片段上进行检测,这使得分析过程更加快速,且 KASP 的结果更加精准。由于 KASP 采用的是通用探针,可以与各种不同的基因特异引物配合使用,而不需要针对每个特定的位点进行探针合成,这极大降低了试验成本^[28]。ZHANG 等^[29]采用 KASP 方法来鉴别野生型等位基因和相关缺陷等位基因在荷斯坦牛的 8 种常见遗传缺陷,这表明 KASP 检测对于检测多种遗传缺陷是简单、快速和可靠的。在 SHI 等^[30]的研究中,KASP 被用于对影响农药抗性的基因型进行高通量基因分型,首次被验证为表征农药抗性位点基因型的有效方法,其分型结果与 Sanger 测序结果一致。国外于 2012 年首次报道 KASP 适用于大样

本($N > 10\,000$)的少量 SNP^[31]。但 KASP 也存在一些不足之处,荧光定量处理时存在分型错误,且不能直接测序发现未知 SNP 位点。相较于其他检测方法,KASP 技术在动物遗传育种方向的应用还是较少,相信随着技术的不断成熟,其应用会更加广泛。

2 SNP 检测方法在实验动物遗传质量检测中的应用

实验动物遗传检测的方法多种多样,这些方法各有优缺点,但都有其特定的应用场景和发展前景。SNP 是继限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、简单重复序列标记(simple sequence repeats, SSR)之后的第三代分子标记^[32-33],与之前两代标记不同,SNP 标记的来源不受个体组织时间与空间的限制,它具有数量多、在全基因组分布广泛、遗传多样性丰富以及遗传稳定等特点^[34],被广泛应用于各种遗传学研究领域。同样,SNP 的检测方法也在不断创新,为了更好地发挥遗传检测在实验动物中的作用,需要不断优化和完善现有的检测方法,并探索新的检测技术。

利用高通量测序技术对实验动物的基因组进行深度测序,以发现更多的单核苷酸多态性和结构变异;还可以利用生物信息学方法对遗传数据进行深入分析,以发现更多的遗传标记和基因组特征。如 REUVENI 等^[35]开发了一个小鼠 SNP 数据库——Mouse SNP,采用 Ensembl 注释的基因组序列来编译小鼠 SNP 数据库,同时该数据库还提供来自 SymAtlas、Gene Ontology 和 OMIM 数据库的基因表达和功能注释,以进一步评估候选表型致突变。ZHANG 等^[34]从文献和公共数据库中收集了相关的 SNP 数据,以创建一个鱼类 SNP 数据库 Fish SNP,并使用统一的分析通路来处理文献作者未执行 SNP 的原始数据,以获得高可靠性的 SNP。此外,还需要将各种遗传检测方法联合起来,优势互补。可以将基因芯片和全基因组重测序结合起来^[36],以全面地了解实验动物的遗传背景和亲缘关系;还可将基因组测序和表型检测结合起来,以更准确地评估实验动物的育种潜力和适应能力。

小鼠通用基因分型芯片(mouse universal genotyping chip, MUGA)、MegaMUGA、GigaMUGA 和小鼠分集阵列(mouse diversity array, MDA)^[37-40],通过高通量测序或杂交技术,实现对基因组中大量

SNP 位点进行检测,旨在捕获小鼠群体中的常见遗传变异。该方法具备高通量、高灵敏度、高特异性等优势,特别适用于大规模的遗传检测。例如,BROMAN 等^[41]使用来自 291 只多样性远交小鼠的 MegaMUGA 阵列数据,成功揭示单个小鼠或单个 SNP 标记水平的问题。并采用 X 和 Y 染色体上 SNP 的微阵列探针强度来确认每只小鼠的性别,检查了 SNP 基因型频率,并根据其初始菌株的次要等位基因频率分组。这些基因芯片平台通过高通量测序或杂交技术,实现对基因组中大量 SNP 位点的并行检测,具备高通量、高灵敏度、高特异性等优势,特别适用于全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)等大规模遗传学研究。不过,芯片制作成本较高,且操作需专业设备和人员。

除芯片检测外,WANG 等^[42]采用两个茎环引物和两个不同的通用荧光引物对基因组 DNA 进行等位基因特异性 PCR 扩增,在小鼠中验证了 4 个 SNP 位点,该方法中蓝色和绿色荧光信号可方便地在 DNA 测序仪上检测到,且仅需在一个管中进行一次反应,适用于多重基因分型,进行遗传检测,这一方法大大降低了为每个 SNP 设计不同荧光探针的成本,操作相对于芯片的制作而言方便,快捷。

为了促进基于 SNP 基因分型的广泛应用,研究者们开发了一种创新的方法,称为靶标 SNP-seq。靶标 SNP-seq 技术的核心优势在于其融合了固相芯片技术的高稳定性和可靠性与测序技术的高灵活性和低成本,为中等规模的 SNP 基因分型提供了一种既灵活又成本效益高且准确性高的解决方案^[43]。相较于传统的方法,靶标 SNP-seq 方法基于全基因组变异组分析(即不同种质的全基因组序列数据),利用精确的 SNP 进行基因分型。它不仅具备高通量和低成本的特性,而且对检测平台的要求相对较低,从而极大地拓宽了其应用范围。

这种通过靶向测序进行基因分型的方法常有不同的命名,如 SHS、GBTS、Target SNP-seq、MRASeq 等^[44],它们均体现了针对不同目标序列进行高效、精确测序的共同特点。ZHANG 等^[45]基于 GBTS 技术,在猪中开发了 50K 面板“GBTS50K”。还评估了 GBTS50K 在群体遗传结构分析、选择特征检测、全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)、基因分型插补、遗传选择(genetic selection, GS)等应用中的效率。结果表明,GBTS50K 可以成为猪潜在遗传结构和分子育种的有力工具。目前,

靶标 SNP-seq 技术已在植物领域具有广泛应用,但在实验动物中使用较少,随着技术的不断进步,靶标 SNP-seq 有望在实验动物遗传检测领域得到更广泛的应用。这将提供更精准、高效的基因分型方法,有助于更深入地了解实验动物的遗传背景和遗传特征,为相关研究领域提供更为有力的支持。

3 实验动物遗传检测的展望

随着实验动物在医学和生物学领域的应用日益广泛,无论是在药物研发、药效测试、疾病模型建立,还是在基础生物学、生物医学研究等方面,都发挥着不可替代的作用。然而,实验动物的遗传变异可能会对实验结果产生影响,甚至导致实验结果的可靠性受到质疑。因此,实验动物遗传检测的重要性也就不言而喻了。遗传检测就像遗传质量控制的“眼睛”,它能够发现潜在的问题并提前预警。通过遗传检测,可以了解实验动物的基因型和遗传背景,评估其是否符合实验要求,从而确保实验结果的准确性和可靠性。此外,遗传检测还可以为实验动物的健康和福利提供保障,因为某些遗传变异可能会影响实验动物的生长、繁殖和疾病抵抗力等。

在实验动物研究中,遗传检测是保证实验结果真实性和可靠性的重要手段之一。为了更好地发挥遗传检测在实验动物中的作用,需要不断优化和完善现有的检测方法,并积极探索新的检测技术。只有这样,才能更好地利用实验动物进行科学研究,为人类的健康和发展做出更大的贡献。

参 考 文 献(References)

- [1] 宋国华,陈朝阳,刘田福,等. 中国小鼠线粒体基因组与卫星遗传标记的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 4-5, 15.
- SONG G H, CHEN Z Y, LIU T F, et al. Study of mitochondrial genomes and molecular genetic marker of microsatellite in Chinese hamster [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(5): 4-5, 15.
- [2] 杜小燕,霍学云,陈振文. 实验动物遗传质量监测技术研究进展与应用[J]. 实验动物科学, 2021, 38(4): 1-5.
- DU X Y, HUO X Y, CHEN Z W. Research progress and application of genetic quality detection technology in laboratory animal [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(4): 1-5.
- [3] 张晓晴,王妍,谢飞,等. 建立 6 种近交系大鼠遗传质量检测及品系鉴别的单核苷酸多态性组合[J]. 实验动物科学, 2024, 41(3): 26-32.
- ZHANG X Q, WANG Y, XIE F, et al. Establishment of genetic quality testing and strain identification SNP panel for six classes inbred rats [J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(3): 26-32.
- [4] 段天林. DNA 指纹技术对近交系小鼠生产扩大群的遗传检测[D]. 兰州: 甘肃农业大学; 2008.
- DUAN T L. DNA fingerprinting in genetic monitoring of production expansion colony of inbred strain mice [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University; 2008.
- [5] 董磊. 基于全基因组重测序技术发掘晋汾白猪特异 SNP 位点[D]. 太谷: 山西农业大学; 2020.
- DONG L. Discovery of specific SNP sites in jinfen white pig based on whole genome resequencing [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University; 2020.
- [6] RYU S M, LEE Y, BANG S, et al. On-site SNP discrimination of Monkeypox viral DNA at room temperature using dCas9-enhanced extended-gate field-effect transistor [J]. Sens Actuators B Chem, 2024, 414: 135967.
- [7] PAIJMANS A J, BERTHELSSEN A L, NAGEL R, et al. Little evidence of inbreeding depression for birth mass, survival and growth in Antarctic fur seal pups [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 12610.
- [8] SANGER F, NICKLEN S, COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [9] MITRA R D, CHURCH G M. In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(24): e34.
- [10] SHENDURE J, PORRECA G J, REPPAS N B, et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome [J]. Science, 2005, 309(5741): 1728-1732.
- [11] MITRA R D, SHENDURE J, OLEJNIK J, et al. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies [J]. Anal Biochem, 2003, 320(1): 55-65.
- [12] ARDUI S, AMEUR A, VERMEESCH J R, et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(5): 2159-2168.
- [13] MACKENZIE M, ARGYROPOULOS C. An introduction to nanopore sequencing: past, present, and future considerations [J]. Micromachines, 2023, 14(2): 459.
- [14] MIKHEYEV A S, TIN M M Y. A first look at the oxford nanopore minion sequencer [J]. Mol Ecol Resour, 2014, 14(6): 1097-1102.
- [15] FAN X, TANG D, LIAO Y, et al. Single-cell RNA-seq analysis of mouse preimplantation embryos by third-generation sequencing [J]. PLoS Biol, 2020, 18(12): e3001017.
- [16] YU S C Y, DENG J, QIAO R, et al. Comparison of single molecule, real-time sequencing and nanopore sequencing for analysis of the size, end-motif, and tissue-of-origin of long cell-free DNA in plasma [J]. Clin Chem, 2023, 69(2): 168-179.
- [17] ATHANASOPOULOU K, BOTI M A, ADAMOPOULOS P G, et al. Third-generation sequencing: the spearhead towards the radical transformation of modern genomics [J]. Life, 2021, 12(1): 30.
- [18] SOSNOWSKI R G, TU E, BUTLER W F, et al. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,

- 1997, 94(4): 1119–1123.
- [19] EDMAN C F, RAYMOND D E, WU D J, et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4907–4914.
- [20] FONDEVILA M, BØRSTING C, PHILLIPS C, et al. Forensic SNP genotyping with SNaPshot: Technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays [J]. *Forensic Sci Rev*, 2017, 29(1): 57–76.
- [21] ROSS P, HALL L, SMIRNOV I, et al. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(13): 1347–1351.
- [22] BRAY M S, BOERWINKLE E, DORIS P A. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise [J]. *Hum Mutat*, 2001, 17(4): 296–304.
- [23] DEMIREV P A, HO Y P, RYZHOV V, et al. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches [J]. *Anal Chem*, 1999, 71(14): 2732–2738.
- [24] GAYE P M, NDIAYE E H I, DOUCOURÉ S, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry traces the geographical source of *Biomphalaria pfeifferi* and *Bulinus forskalii*, involved in schistosomiasis transmission [J]. *Infect Dis Poverty*, 2024, 13(1): 11.
- [25] WISE C A, PARIS M, MORAR B, et al. A standard protocol for single nucleotide primer extension in the human genome using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(11): 1195–1202.
- [26] SIVA P, BUYARAPU R, IBROKHIM Y, et al. *Plant Breeding* [M]. Uzbekistan: IntechOpen Ltd; 2012.
- [27] 刘学峰, 张立春, 朱贵, 等. 绵羊 *FecB* 基因 KASP 检测方法的建立及其在肉羊育种中的应用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(7): 58–61, 66, 159.
- LIU X F, ZHANG L C, ZHU G, et al. Establishment of KASP detection method for *fecB* gene in sheep and its application in mutton breeding [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2020(7): 58–61, 66, 159.
- [28] SEMAGN K, BABU R, HEARNE S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement [J]. *Mol Breed*, 2014, 33(1): 1–14.
- [29] ZHANG Y, LIANG D, HUANG H, et al. Technical note: Development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(1): 619–624.
- [30] SHI P, SHEN X J, CHEN J C, et al. KASP genotyping and semi-quantitation of G275E mutation in the $\alpha 6$ subunit of *Thrips palmi* nAChR gene conferring spinetoram resistance [J]. *Pest Manag Sci*, 2023, 79(5): 1777–1782.
- [31] 马士龙, 谢书琼, 刘益丽, 等. KASP 技术及其在牛 SNP 分型中的应用研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(11): 31–37.
- MA S L, XIE S Q, LIU Y L, et al. Research progress of KASP technology and its application in SNP typing of cattle [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2022, 50(11): 31–37.
- [32] RAFALSKI J A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches [J]. *Plant Sci*, 2002, 162(3): 329–333.
- [33] SCHLÖTTERER C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(1): 63–69.
- [34] ZHANG L, LI H, SHI M, et al. FishSNP: a high quality cross-species SNP database of fishes [J]. *Sci Data*, 2024, 11(1): 286.
- [35] REUVENI E, RAMENSKY V E, GROSS C. Mouse SNP Miner: an annotated database of mouse functional single nucleotide polymorphisms [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 24.
- [36] LI X, YANG J, SHEN M, et al. Whole-genome resequencing of wild and domestic sheep identifies genes associated with morphological and agronomic traits [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2815.
- [37] SIGMON J S, BLANCHARD M W, BARIC R S, et al. Content and performance of the MiniMUGA genotyping array: a new tool to improve rigor and reproducibility in mouse research [J]. *Genetics*, 2020, 216(4): 905–930.
- [38] GATTI D M, SVENSON K L, SHABALIN A, et al. Quantitative trait locus mapping methods for diversity outbred mice [J]. *G3*, 2014, 4(9): 1623–1633.
- [39] MORGAN A P, FU C P, KAO C Y, et al. The mouse universal genotyping array: from substrains to subspecies [J]. *G3*, 2015, 6(2): 263–279.
- [40] YANG H, DING Y, HUTCHINS L N, et al. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(9): 663–666.
- [41] BROMAN K W, GATTI D M, SVENSON K L, et al. Cleaning genotype data from diversity outbred mice [J]. *G3*, 2019, 9(5): 1571–1579.
- [42] WANG M, XU F, CHEN K, et al. A multiplex SNP genotyping by allele-specific PCR based on stem-loop and universal fluorescent primers of *Chr1daxin* mice [J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(11): 1600–1605.
- [43] ZHANG J, YANG J, WEN C. A new SNP genotyping technology by target SNP-seq [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2638: 365–371.
- [44] MENG Y, ZHANG W, CHENG Y, et al. Development and verification of a 10K liquid chip for Hainan black goat based on genotyping by pinpoint sequencing of liquid captured targets [J]. *BMC Genom Data*, 2024, 25(1): 44.
- [45] ZHANG Z P, XING S Y, QIU A, et al. The development of a porcine 50K SNP panel using genotyping by target sequencing and its application [EB/OL]. [2023–7–23]. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.07.033>.

张婧,董宝强,林星星,等. 非特异性腰痛动物模型述评 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1594–1605.

ZHANG Q, DONG B Q, LIN X X, et al. A review of animal models of non-specific lower back pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1594–1605.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.011

非特异性腰痛动物模型述评

张婧,董宝强*,林星星,刘紫薇,王垒钊,张峰,张丹凝,张凯旋

(辽宁中医药大学针灸推拿学院,沈阳 110847)

【摘要】 非特异性腰痛是临床常见疾病,其发病机制及致病原因尚不明晰,治疗方案的应用模式尚未达成共识。目前本病的研究多限于临床,亟需动物实验来剖析其内在机制。构建动物模型是研究非特异性腰痛发病进程以及探寻治疗方法的重要手段,但目前该病的模型建立存在一定局限性与滞后性。因此,本文对非特异性腰痛动物模型的动物选择、构建方法及相关指标的评价方法进行综述,并对当前各类模型的优缺点进行分析,理清本病目前基础研究所存在的问题路径,并尝试提供新思路,旨在为非特异性腰痛的机制研究及治疗策略的改进奠定理论基础。

【关键词】 非特异性腰痛;述评;造模方法;动物模型;评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1594-12

A review of animal models of non-specific lower back pain

ZHANG Qiang, DONG Baoqiang*, LIN Xingxing, LIU Ziwei, WANG Leichao, ZHANG Feng,
ZHANG Danning, ZHANG Kaixuan

(School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

Corresponding author: DONG Baoqiang. E-mail: peterbaoqiang@163.com

【Abstract】 Non-specific lower back pain is a common clinical disease whose pathogenesis and causes are still unclear, and the advantages and disadvantages of various therapeutic programs are controversial. Current research on this disease is mostly limited to clinical studies, and there is an urgent need to invest in a large number of animal experiments to analyze its underlying mechanisms. The construction of animal models is an important means to study the pathogenesis of non-specific lower back pain and to explore therapeutic method, but there are certain limitations and delays in the establishment of models for this disease. Therefore, this paper reviews the selection of animals, construction method, and evaluation method of relevant indexes of animal models of non-specific lower back pain, and the advantages and disadvantages of various models, to clarify existing problems in current basic research of this disease. We provide new research ideas and aim to lay a theoretical foundation for studies into the mechanisms of non-specific lower back pain and improved therapeutic strategies.

【Keywords】 non-specific low back pain; review; modeling method; animal model; evaluation methodology

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

【基金项目】 辽宁省“兴辽英才计划”科技创新领军人才项目 (XLYC1902115), 辽宁省科技厅重点研发项目 (2019JH2/10300012), 辽宁省教育厅重点项目 (LJKZ0902), 辽宁省科技厅创新能力提升联合基金项目 (2022-NLTS-13-04), 辽宁省重大重点科研项目团队培育项目 (2024-JYTCB-053), 辽宁省青创团队后备培育项目-育苗项目 (2024-JYTCB-026)。

Funded by Liaoning Province “Xingliao Talent Program” Leading Talents in Science and Technology Innovation (XLYC1902115), Liaoning Provincial Department of Science and Technology Key Research and Development Project (2019JH2/10300012), Liaoning Provincial Department of Education Key Project (LJKZ0902), Liaoning Provincial Department of Science and Technology Joint Fund for the Enhancement of Innovative Capability Project (2022-NLTS-13-04), Team Cultivation Program for Major Key Scientific Research Projects in Liaoning Province (2024-JYTCB-053), Reserve Cultivation Program for Young Creative Teams in Liaoning Province-Seedling Program (2024-JYTCB-026).

【作者简介】 张婧,女,硕士,研究方向:针灸推拿结合运动康复防治疾病的机理与临床。Email: 1987250839@qq.com

【通信作者】 董宝强,男,博士,教授,研究方向:针灸推拿结合运动康复防治疾病的机理与临床。Email: peterbaoqiang@163.com

腰痛(low back pain, LBP)是指腰骶部的急性或慢性疼痛,伴或不伴有下肢放射性疼痛^[1]。据调查显示,该病是导致全球负担升高的 10 个关键病种之一,影响了全球约 5.68 亿人^[2]。LBP 具有特异性和非特异性之分,前者指由肿瘤、骨折、内脏病变、感染以及脊柱畸形等明确病因所引起的症状,约占腰痛患者 10%,大多数仍然属于非特异性腰痛(non-specific low back pain, NLBP),病因不明,病程长呈慢性且较难治疗^[3]。研究显示 NLBP 是全球最普遍和最致残的疾病之一,终生患病率可达 84%^[4],预计还将上升,严重威胁患者身心健康。迄今为止, NLBP 尚无统一的诊断标准,常通过详尽的病史采集与体格检查以排除特异性病因来确定。因此,建立高质量的动物模型来探索本病的发病机制进而发掘有效治疗方法,具有重要的现实意义与科学价值。

1 NLBP 模型动物选择

模型动物的选择是实验研究的重要基础工作。目前已有鼠、兔、犬、猪、羊以及灵长类等十余种动物被应用于构建 NLBP 动物模型^[5]。其中猴、猩猩等灵长类动物因其在生理构造和脊柱生物力学特性上与人类存在较高的相似性,被视为研究脊柱类疾病的理想模型动物。然而受动物来源、实验经费及伦理道德等多重因素的制约,且缺乏有效的疼痛行为监测,在模型成功的评估手段上也颇受掣肘,较少应用于动物实验。这也是其他大型哺乳动物的共性问题。兔和鼠等小型动物模型以其成本低、易饲养等优点在实验研究中发挥着越来越重要的作用。其中,实验兔关节病变过程中软骨生化指标与人类相似,且关节面宽度适中、取材量大、为手术操作提供了极大便利,更便于实验人员对椎间盘及小关节源性 NLBP 进行干预和检测研究。大鼠的生理学和解剖学特性与人类存在高度相似性,对各类干预方法的耐受性优良,被广泛用于建立各种临床前模型,也是本病最常见的模型动物。小鼠解剖组织相对较小,机械损伤性造模方法及手术操作易对周围组织造成严重破坏,影响实验的准确性,少见干常规实验。但由于其拥有与人类基因 99% 相似度的基因特点,在基因敲除逐渐成为研究热点的当下,是其首选的模型动物,具有可控性强、稳定性好等优点。

综合来看,鼠和兔在 NLBP 模型建立中各有优

势。但人与四足动物行为活动方面存在明显差异,人的腰椎作为主要承重骨骼之一,长期受到轴向应力的影响,而四足动物则无此问题。故如何降低轴向应力的差异性问题是未来 NLBP 模型研究中要着重考量的部分。

2 NLBP 模型性质分析

中国疼痛研究协会在对 NLBP 的评估和管理共识中将 NLBP 的临床病理类型分为椎间盘源性腰痛、小关节源性腰痛和腰背肌软组织来源性腰痛等^[6]。椎间盘源性腰痛并非由椎间盘突出症引发,而是源于椎间盘内部结构的改变。当椎间盘内部发生损伤,加之炎性介质和生物力学等多重因素,导致疼痛产生,但影像学检查多无神经根受压和椎间盘外部形态改变。小关节源性腰痛被认为是由腰椎小关节结构病变引起的疼痛。当腰椎小关节反复受压或累积性低水平创伤就会诱发局部炎症,引起关节囊扩张,刺激分布在小关节突关节上的神经末梢,引发疼痛反应。腰椎周围的肌肉、筋膜等软组织增强脊柱的稳定性、平衡性和灵活性方面发挥着重要作用。当骨骼肌受损出现纤维化、纤维转变和脂肪浸润等病理变化时,其支撑力量明显减弱,运动的协调性和控制能力也随之下降,易致使脊柱结构失稳,进而引发腰痛。腰痛又可诱发椎旁肌的保护性痉挛,减少活动,进一步加剧椎旁肌的易疲劳性。为了补偿原发部位病变后的功能障碍,对应肌肉会产生相应的适应性变化。长此以往,肌肉将由局部对应补偿调节逐渐演变为全面的系列补偿调节,损伤范围从点到面、从外到内、从筋到骨逐步扩大,形成恶性循环^[7]。

纵观当前的基础研究多集中在椎间盘源性腰痛和小关节源性腰痛,且具有较为成熟的动物模型^[5],主要是采用机械或化学手段造成椎间盘或小关节损伤以诱发 NLBP,但是经皮穿刺所致的软组织、血管及神经损伤等干扰需要进一步思考如何规避。而腰背肌软组织来源性痛的基础研究较少,按其致病机制可归于肌筋膜疼痛综合征的范畴,但此类疾病的实验研究多选取的是下肢骨骼肌如股内侧肌^[8]、腓肠肌^[9]。王良夫^[10]参考肌筋膜疼痛综合征造模方法采用打击结合离心运动建立大鼠非特异性腰痛模型,镜下能观察到大量炎性细胞浸润,筋膜组织形态结构成结节样改变,但对于肌肉损伤的范围和深度无法精确控制,且由于部位的特殊性

和腰椎的脆弱度,腰椎前接脏腑,旁靠脊柱,主要呈柱状分布而非平面,故而造模方法的适用性以及打击的具体强度等量化标准还需要进行更深入的实验研究。笔者从骨骼肌损伤的角度入手进行相关文献检索,亦面临造模部位罕有腰部的问题。有研究通过布比卡因注射建立多裂肌损伤模型^[11],但多数仅针对骨骼肌损伤及修复机制进行研究,少有其疼痛机制展开探讨。故此,在后续研究中应当重视腰背肌软组织来源性腰痛的基础研究,以完善本病的整体发生机制,对后续的治疗方案研究大有裨益。

3 NLBP 动物模型研究现状

3.1 自发模型

自发模型是指不予实验动物任何人为干预,通过自然衰老的方式形成的 NLBP。VINCENT 等^[12]对 150 只 3 ~ 23 个月大的小鼠进行观察,发现椎间盘高度随年龄的增长而下降,且与小鼠活动性及热痛觉过敏呈正相关。姚重界等^[13]选取 12 月龄老年大鼠建立自发模型,发现其与 2 月龄青年大鼠相比,运动能力低下,痛阈大幅降低,相关炎症因子水平也显著升高,此研究也符合中医肾虚腰痛模型特点。自发性模型操作简单、无创伤,但存在观察成本较高、模型的可控性差等弊端。

3.2 诱发模型

诱发模型易于控制模型的病理进程和稳定性,最常应用于动物实验,分为直接诱导模型和间接诱导模型。

3.2.1 直接诱导模型

直接诱导模型主要采用机械或化学方法直接破坏局部组织结构,诱导 NLBP 病理表现产生。

机械损伤模型多通过穿刺^[14]、打击^[15]等干预手段造成局部组织结构性损伤。由于其建模方法简单、成功率高,使用较为广泛。早期多为外科手术式建模,近些年随着科学技术的不断发展,CT 和超声等仪器逐渐成为造模的辅助手段,使造模部位更为精准和微创。如椎间盘源性腰痛自初期采用刀片刺入椎间盘以损伤纤维环^[16],到如今 X 线引导下椎间盘穿刺^[17]。也有学者^[18]通过向髂总动静脉和右髂腰静脉注射彩色灌注液,准确定位椎间盘,使穿刺位置直观,减少出血。但是这种破坏结构的干预方法并不能百分百产生疼痛。KIM 等^[19]采用纤维环穿刺法成功构建相应模型,发现损伤部

位的椎旁组织存在压力痛觉过敏,但大鼠后足并未出现异常疼痛。这可能表明,机械损伤着重于破坏解剖结构,而非绝对导致疼痛发生。

化学损伤模型则是通过向椎间盘、关节腔或椎旁软组织注射化学物质。常用的试剂有尿纤溶酶原激活物^[20]、碘乙酸钠溶液^[21]、完全弗氏佐剂^[22]等。REED 等^[23]在第 0 和 5 天在麻醉大鼠左侧第 5 腰椎棘突外 3 mm 处注射神经生长因子 50 μL ,造模后将 Von Frey 机械丝应用于患侧后爪及躯干,均出现机械超敏反应。化学损伤模型操作相对简单,造模时间较短、可重复性强。然而化学损伤模型虽然能够产生 NLBP 的病理特点,但与人类真实疾病发展不尽相同。且当前研究中注射剂量标准主要是按不同动物类别界定,少有按体重计算的精细标准,其实验过程可能存在个体差异性,提高动物死亡率,影响实验结果。同时,目前实验多采用单点注射,其对组织中分散浓度的掌控也值得进一步研究和思考。

3.2.2 间接诱导模型

间接诱导模型主要是通过机械载荷、腰椎失稳等力学改变而间接诱发,更符合人类体重负荷或长期劳损所导致的 NLBP。

机械负荷包括压缩应力^[24]、拉伸应力^[25]及剪切应力^[26],主要是在腰椎安装特殊器械,通过施加不同的力来改变腰椎的机械负荷。有学者对轴向加压的频率及压力强度进行探讨,发现当以较低的频率或较高的压力条件干预后,髓核细胞中蛋白聚糖含量上升,髓核和纤维环细胞的死亡率也相应提高^[27]。体外实验也表明应力能够对椎间盘细胞的生长、增殖和存活造成影响^[28]。过度负荷是 NLBP 形成的重要风险因素之一,机械负荷模型能够很好的模拟人体负重、扭转等不良姿势对腰椎压迫所引起疼痛的病程,具有很大应用前景。但是对负荷的大小、频率及持续时间都需要投入更为缜密的实验。当前的机械负荷模型主要研究单一应力对 NLBP 的影响,但腰椎在日常的生活中多承受复合载荷,单一应力的机械负荷模型与人类腰椎受力真实环境存在一定差异,如何模拟多种应力对 NLBP 的作用仍需进一步研究。

直立负荷模型从造模思路上来说也可归于加压模型范畴,通过构建模型动物被动站立,模拟人类脊柱负荷特点,使四足动物拥有与人类相似的应力环境,更贴近 NLBP 发病进程。早期研究对幼鼠

前肢进行截肢或结扎,通过调整饲料和水的位置,强迫直立行走^[29],此法在伦理上存在争议。后有学者进行改良,利用鼠天生畏水的特性,将小鼠置入有限的水中,诱导双足站立^[30],或将模型动物固定于直立管道中^[31],同样取得良好效果。BAI 等^[32]在强迫兔直立的同时,于其颈部额外增加 600 g 负重,可加快模型建立进程。但作者同时指出,尽管负重能够进一步增加腰椎轴向应力,但其负重额度和持续时间不宜过高,否则可能引发动物的愤怒、食欲减退及腹泻等不良反应。单纯被动直立可以作为模型建立的一个辅助干预方法,一方面能够降低模型动物与人类腰椎轴向压力的差异性,同时又能加强其他诱导方法的损伤程度,促进生物力学进一步失衡。

除了负荷模型之外,失稳模型也是诱导腰椎生物力学失衡的常用模型。脊柱稳定性源于其两大组成部分的协同作用:一是内源性稳定,涵盖椎体、椎间盘及韧带等关键结构,共同维系脊柱静态平衡;二是外源性稳定,主要由肌肉系统调节与控制,确保脊柱动态平衡得以维持。两者相辅相成,共同保障脊柱的稳定与功能。静力失稳模型是通过切除腰椎棘上韧带、棘间韧带和关节突关节的方式,破坏脊柱的静力平衡状态^[33];动力失稳模型则涉及多节段剥离骶棘肌和关节突附着肌肉,或直接切断竖脊肌,从而达到破坏椎旁肌动力平衡的目的^[34]。与静力失稳模型作用于骨关节和韧带相比,动力失稳模型干预部位更为表浅,相对创伤较小,但造模周期较长。有研究通过切除脊柱旁肌肉组织和韧带以及部分小关节以破坏腰椎静态和动态稳定。结果发现模型组机械痛阈和热痛阈均降低^[35]。

总的来说,直接诱导模型更偏向于从病理角度建立模型,机械干预可以模拟 NLBP 结构损伤,但未必引发疼痛,化学干预则多以诱发疼痛为主,不符合发病机制,故此类造模方法主要针对其发病特征以及后续治疗研究。而间接诱导模型虽操作复杂、造模时间相对较长,且会由于术后感染等一系列并发症导致实验脱落率提高,但能够较好的模拟人类脊柱生理特性,更符合 NLBP 的病理进程,适用于对疾病本身的机制探索。

3.3 基因敲除模型

近年来,基因工程领域取得了显著进展,其中基因敲除技术的出现为基础研究提供了新的可能性。基因敲除模型主要利用基因技术对实验动物

的特定基因进行精确敲除,以便在单一分子水平上对 NLBP 的发病机制进行深入研究,并为本病的靶向治疗提供新思路。研究发现富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)在椎间盘组织中存在阳性表达,能够通过干扰细胞外基质内环境中的合成与分解代谢平衡,最终影响细胞与细胞外基质的相互作用和细胞外基质的重塑,在椎间盘源性 NLBP 的基础研究中发挥重要作用^[36]。KAWARAI 等^[37]对 SPARC 基因敲除小鼠进行了疼痛行为测量,结果发现基因鼠与同龄野生型鼠相对比,对寒冷刺激更敏感,且 SPARC 基因敲除模型的多裂肌存在结缔组织增厚、炎性因子高表达等病理性改变^[38]。国外相关研究也证实了 Wnt16^[39]、NFAT1^[40]等基因与 NLBP 的诱发关系密切。基因工程是新兴产业,目前各项条件尚不成熟,鉴于其涉及的病理改变主要由基因缺陷所引发,对于能否全面模拟人类 NLBP 的发病机制,仍然值得商榷,多用于靶向研究,不适宜作为工具模型大量使用。

3.4 中医模型

中医动物模型是指根据中医证型的特点和临床表现,遵循中医整体观念及辨证论治原则,结合中医病因病机理论,参照人类疾病模型构建方法,建立与中医证候临床表现相符的动物模型。中医肾包含现代医学的性腺功能,性激素水平下降可反映肾气的衰退,并且下丘脑-垂体-靶腺轴的功能紊乱是肾虚证的主要病理基础^[41]。故有学者采用去卵巢致肾虚原理,选择雌性小鼠或大鼠麻醉后切除双侧卵巢建立腰痛模型^[42]。雷鸣等^[43]使用玛福尔人工气候培养箱模拟寒湿环境,建立寒湿痹阻腰痛大鼠模型。总体来说,中医领域对腰痛的基础研究主要是对“病”的模型的复刻,而缺少对于证候的相关研究,所建立的模型未经详细的模型评价及比较,存在一定的局限性,而更具中医特色的“病-证”结合模型更是匮乏,不能较好的模拟中医理论指导下的辨证论治思路。专家认为可以参考脊柱类疾病的模型构建思路,如寒湿型颈型颈椎病模型是在疾病模型基础上改良,保证颈部前屈牵拉的同时于颈椎两侧敷上保湿冰袋^[44],以此建立“病-证”结合模型。相信随着中医药现代化研究的不断深化,会建立以中医理论为指导、充分体现中医特色的腰痛相关病因病机模型,将为中医干预手段在腰痛防治方面的应用提供更为坚实和可靠的理论支撑。

3.5 复合模型

由于单一因素造模的固有缺陷,以及 NLBP 的成因多样性,因此部分研究者根据研究需要,将多种因素相结合,以构建更稳定和更精准的动物模型。韩忠晓等^[45]对大鼠椎间盘采用机械穿刺的同时辅以炎性佐剂注射,保证了结构损伤和疼痛产生二者兼备,更符合 NLBP 致病特征,对比单一造模效果显著,且明显缩短造模周期。卢晶晶等^[46]采用垂直打击结合强迫长时坐位建立大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型,在损伤肌群同时结合人体工程力学更符合临床 NLBP 的发病进程。李源^[47]在完成腰椎失稳造模四周后驱使小鼠被动直立,发现造模小鼠痛敏增强,活动度降低,有效促进腰痛产生。除了强迫直立之外,离心运动^[10]等辅助方法也可应

用于 NLBP 的模型建立。近年来,随着对脊柱关节、肌肉组织生物力学的深入研究,人们对腰痛的认识已经由单纯的结构病理变化上升到“结构病理”与“功能病理”变化的平衡统一。临床研究显示 90% 以上的腰背疼痛源于关节、肌肉组织力学问题导致的脊柱“筋骨平衡”功能态异常^[48]。中医经筋理论也认为:“经筋拘急”可导致脊柱局部软组织应力异常,限制经筋“束骨而利机关”功能,诱发脊柱“筋骨平衡”功能态异常和疼痛。因此复合模型在近年来逐步应用于基础研究中,能够从在腰部解剖结构损伤的基础上,致使力线进一步失稳,从而实现结构与功能的多位受损。但是刺激量的累加是否会造成反作用,还需要投入大量研究。

以上各模型的建模方法及特点见表 1。

表 1 非特异性腰痛建模方法及特点

Table 1 Non-specific low back pain modeling methods and characteristics				
建模方法 Modeling method		优势 Dominance	不足 Deficiency	参考文献 Reference
自发模型 Spontaneous model	自然衰老 Natural aging	操作简单、无创伤 Simple, non-invasive operation	观察成本较高、模型稳定性差 Higher observation costs and poor model stability	[12-13]
	机械损伤 Mechanical damage	耗时短,操作简便,能够模拟 NLBP 病理特征 Time-consuming, easy to perform, and able to mimic NLBP pathologic features	不符合 NLBP 发病进程 Not consistent with NLBP pathogenesis	[14-18]
直接诱发模型 Direct evoked model	化学药物注射 Chemical injections			[20-23]
	施加机械负荷 Applying mechanical loads	能够模拟人体负重、扭转等不良姿势对腰椎压迫及力线失衡的发病过程 Able to simulate the pathogenesis of lumbar spine compression and force imbalance due to poor postures such as weight-bearing and torsion.	操作复杂、造模时间相对较长,且会由于术后感染等一系列并发症导致实验脱落率提高 Complicated operation, relatively long molding time, and increased experimental dropout rate due to a series of complications such as postoperative infections	[24-26]
	间接诱发模型 Indirectly induced models			[29-32]
	被动直立 Passive upright			[33-35]
诱发模型 Evoked model	腰椎失稳 Lumbar instability			
		成功率高、耗时短、适用于靶向研究 High success rate, short time, suitable for targeted research	技术复杂、难以全面模拟本病的发病机制,不适宜作为工具模型大量使用 Technically complex, difficult to fully simulate the pathogenesis of the disease, unsuitable for extensive use as a tool model	[37-40]
基因敲除模型 Knockout model	基因敲除 Gene knock-out			
	双侧卵巢摘除 Bilateral ovary removal	能够模拟中医不同证型所导致的 NLBP Ability to simulate NLBP caused by different types of TCM certificates	单纯根据证候进行造模,疾病特异性低,且造模过程中易引发其他病症,可能对研究结果造成干扰 Modeling based on evidence alone has low disease specificity and is prone to cause other conditions during the modeling process, which may interfere with the results of the study	[42]
中医模型 Chinese medicine model	寒湿环境培养 Cultivation in cold and wet environments			[43]
自发模型 Spontaneous model	自然衰老 Natural aging	操作简单、无创伤 Simple, non-invasive operation	观察成本较高、模型稳定性差 Higher observation costs and poor model stability	[12-13]

续表 1

建模方法 Modeling method	优势 Dominance	不足 Deficiency	参考文献 Reference
复合模型 Composite model	机械穿刺结合椎间盘注射 Mechanical puncture combined with intervertebral disc injection of		[45]
	打击结合强迫坐位 Percussion combined with forced sitting	满足 NLBP 的成因多样性,更符合 NLBP 致病特征 Meet the diversity of NLBP causes and better characterize NLBP pathogenesis	[46]
	腰椎失稳结合被动直立 Lumbar spine instability combined with passive uprighting		[47]
	打击结合离心运动 Percussion combined with centrifugal motion		[10]

4 NLBP 动物模型评价方法

4.1 疼痛行为学检测

NLBP 最基本的特点是疼痛和运动受限,实验中通常利用疼痛行为学检测进行间接量化,分为痛阈检测和行为学检测。前者主要采用热缩足反射潜伏期^[49]、机械足反射阈值^[50]和丙酮激发实验^[51]等常规痛阈检测法评估模型的冷热痛和机械痛改变,但是缺乏部位特异性。有学者采用悬尾实验诱发大鼠轴性不适^[52],较常规的痛阈检查手段更具有针对性。但是由于受重量因素影响,可用于检测的模型动物多局限于实验鼠。随着压痛测试仪、软组织张力测定器^[53]的研发和应用,可以直接对病灶部位进行痛阈检测,使疼痛来源性更为准确。行为学检测多采用 Cat Walk 步态分析,通过观察实验动物步行速度、足底接触面积及足底压强改变,更客观的分析动物活动情况^[54]。受体积重量等多方面因素影响,疼痛行为学的检测仪器多局限于实验鼠等小型动物,大型动物只能采取一些客观性较弱的量表评分,此举也在一定程度上限制了本病的动物选择。故在后续研究中可以加强对相关检测仪器的研发操作,用来检查行为学变化,并使其能够量化。

4.2 分子生物学检测

动物对于痛觉敏感程度的个体差异性较大,研究者对于动物行为的判断也带有较多的主观色彩,故而相比于宏观层面对疼痛表征进行评价,微观层面对致痛因子的检测更具备实验客观性。研究表明,白细胞介素-8(interleukin 8, IL-8)、肿瘤坏死因

子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白细胞介素-1β(interleukin 1β, IL-1β)等炎症因子在 NLBP 模型中存在高表达^[55],P 物质和降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)在外周炎症与疼痛感知方面也具有重要作用^[56],可作为疼痛的“生物标记物”,通过酶联免疫吸附法检测相关因子含量^[57],Western Blot、PCR 等常规分子生物学检测也可观测致痛因子的表达^[13]。将其结果与疼痛行为学指标结合,可作为辅助鉴别疼痛模型的有效手段。同时,腰痛相关生物标记物在疾病的病理进程中亦存在差异。除了对疾病本身的评估外,还可以参与急慢性期 NLBP 的鉴别^[58],对早期诊断、病情评估与疗效判断均起到重要作用,但是针对 NLBP 的特异性致痛因子仍需要投入更多基础研究进行测定和分析。

4.3 影像学检测

非特异性腰痛无影像学改变的论断具有一定滞后性。早年对 NLBP 腰椎行 X 线等检查确无椎间盘突出等明显骨性改变,而随着科技的不断发展,影像学技术也不断的广泛和精密,从主要对骨骼进行检测,逐渐覆盖到肌肉等软组织^[59],其在 NLBP 中的应用也日趋成熟。其中磁共振具有非侵入性、无辐射的优点,常用于对 NLBP 椎间盘的结构变化进行检测,可见模型大鼠椎间隙高度丢失、椎间盘信号的减低等特征,多作为椎间盘源性 NLBP 造模成功的鉴定标准^[45]。高级磁共振成像可通过椎旁肌和椎体骨髓脂肪定量椎旁肌功能评估等技术对整个层面的肌肉活动、功能代谢和肌肉形态的变化

进行观察^[52,59],使 NLBP 影像学研究不仅局限于对椎间盘和小关节等椎体本身的评估。肌骨超声等操作技术可以有效而客观地评估肌肉、筋膜厚度和横截面积,并对筋膜的弹性模量进行检测和分析^[60],有望在未来进一步打破桎梏,为 NLBP 肌肉骨骼病理改变非侵入性评估提供新手段。无论是临床还是实验, NLBP 的影像学检查都在不断创新和变革,但是影像学病理表现多存在于慢性 NLBP,且特异性表现依旧缺乏。故想要加强建议影像学检查在 NLBP 模型评价中的决策作用还有很长的研究道路要走。

4.4 组织形态学检测

在影像学检测相对局限的现状下,组织形态学常作为一个较为客观的检测手段用于佐证 NLBP 模型建立成功,这也是 NLBP 动物研究最常见的评价手段。最经典的苏木精-伊红(HE)染色在椎间盘^[45]、腰椎小关节软骨^[61]、椎旁肌^[62]乃至筋膜^[10]中均适用。番红 O 固绿染色颜色鲜明,对比清晰,便于区分椎间盘中各成分的变化情况,镜下可见纤维环裂隙生成,软骨样细胞增多,软骨终板高度降

低^[47]。也有研究采用 Masson 染色观察腰部骨骼肌纤维化情况^[63]。

4.5 电生理学检测

经过深入研究本病在临床中的常用检测手段,笔者发现肌电图可以从静态姿势和动态活动两方面入手,全面、深入地分析神经肌肉功能水平、肌肉疲劳程度以及协调性,在本病的诊断和疗效评估中得到了广泛应用,临床认同度较高^[64]。此类方法也已被成功应用于其他疾病的基础研究,其实施难度和成本均不高。鉴于此,建议在 NLBP 的研究中加强肌电图的应用,以期从电生理学的角度深入探索本病的发病机制,完善本病的基础研究。

以上各评价方法的优势和不足见表 2。

5 总结

疾病动物模型是疾病本质研究的有效工具,而模型的制备则是开展动物实验的关键前提。目前 NLBP 模型动物多以鼠和兔为主,但是作为四足动物,其脊椎生理构造及力学特性与人类相差甚远,故此可以采用被动直立等方法,使其模拟与人类腰

表 2 非特异性腰痛评价方法
Table 2 Non-specific low back pain assessment methods

评价方法 Evaluation method	测量指标 Indicators of measurement	优势 Dominance	不足 Deficiency	参考文献 References	
机械刺激反应阈值测定 Measurement of mechanical stimulus response thresholds	后爪机械痛阈情况 Mechanical pain threshold condition of the hind paw	间接量化动物的痛觉敏化情况 Indirect quantification of nociceptive sensitization in animals	缺乏部位特异性 Lack of site specificity	[49]	
热刺激反应阈值测定 Measurement of thermal stimulus response thresholds	后爪热痛阈情况 Limbs grip, endurance, suspension ability			[50]	
疼痛行为学评价 Behavioral evaluation of pain	丙酮检测 Acetone testing	后爪冷痛阈情况 Cold pain threshold condition of the hind paw	受重量因素影响,可用于检测的模型动物多局限于实验鼠	[51]	
	悬尾检测 Hanging tail detection	轴向痛阈情况 Axial pain threshold conditions		[52]	
			更客观的分析动物活动情况 More objective analysis of animal activity	可用于检测的模型动物多局限于实验鼠	[54]
	步态分析 Gait analysis	步态参数 Gait parameter		Model animals available for testing are mostly limited to laboratory rats	
分子生物学评价 Molecular biology evaluation	酶联免疫吸附实验 ELISA	相关炎症因子和镇痛物质的表达情况 Expression of relevant inflammatory factors and analgesic substances	更符合实验客观性 More consistent with experimental objectivity	腰痛的“生物标记物”尚无标准 No standardized “biomarker” for low back pain	[57]

续表 2

评价方法 Evaluation method	测量指标 Indicators of measurement	优势 Dominance	不足 Deficiency	参考文献 References
影像学评价 Imaging evaluation	磁共振成像 Magnetic resonance imaging	椎间盘退变情况、骨骼肌 面积、质量、脂肪含量 Disc degeneration, skeletal muscle area, mass, fat content	准确度高、无辐射、软组织分 辨率高 High accuracy, no radiation, high soft tissue resolution.	扫描时间长、设备成本高 Long scanning times and high equipment costs [45, 52]
	肌骨超声 Muscle and bone ultrasound	肌肉及筋膜厚度和横截面 积、筋膜的弹性模量 Muscle and fascia thickness and cross-sectional area, elastic modulus of fascia	能够清晰显示肌肉、韧带等浅 表软组织结构 Ability to clearly display superficial soft tissue structures such as muscles and ligaments	对操作者依赖性较大,操 作者的手下压强易对结 果产生影响 It is highly operator- dependent, and the pressure under the operator's hands is prone to influence the results [60]
	苏木精-伊红染色 Hematoxylin-eosin stain	各组织形态学变化情况 Morphological changes in the tissues	简单易行,能够清晰地显示组 织结构 Simple and easy to use, with the ability to clearly show organizational structure	不能提供特定蛋白质或 分子的信息 Cannot provide information on specific proteins or molecules [45, 61]
组织形态 学评价 Histomorp- hometric evaluation	番红 O 固绿染色 Saffron O solid green stain	椎间盘中各成分的 变化情况 Changes in the components of the intervertebral disc	色彩鲜艳,红绿颜色对比明显 Bright colors, contrasting red and green colors	对于某些特殊结构或细 胞类型的详细描述相对 较少 There are relatively few detailed descriptions of particular structures or cell types [47]
	马松染色 Masson stain	腰部骨骼肌纤维化情况 Skeletal muscle fibrosis in the lumbar region	颜色对比鲜明,能较好地反映 纤维组织的形态 Sharp color contrast, can better reflect the morphology of the fibrous tissue	染色结果的定量分析难 度较大 Quantitative analysis of staining results is difficult [63]

椎相似的应力环境,在一定程度上降低动物与人类腰椎轴向压力的差异性,或配合离心运动等辅助造模方法,提高生物力学在 NLBP 的重要作用,加快造模进程,但辅助造模方法的作用程度还需进行进一步研究。

对于 NLBP 动物模型的制备研究,其方法可以分为自发模型、诱发模型、基因调控模型、中医模型和复合模型 5 大类。在构建动物模型的过程中,各类方法表现出不同的造模周期、操作难度及模型稳定性,并在研究重点及实验经费方面存在显著性差异,优缺点并存。因此科研人员在选择和应用时,需要灵活选择,审慎思考,根据实验目标及可用资源,深入分析和比较各类方法的适用性,筛选更贴切自身研究方向的动物模型。当前国内外基础研究以诱发模型最为常见,造模部位多集中在椎间盘和小关节等内层骨面,忽略了对腰背肌软组织源性腰痛的研究,在一定程度上制约了对 NLBP 实质的全面揭示。同时在对内层骨面造模的逐层突破过程中不可避免对外层组织造成干扰性损伤。与之相似,在间接诱导模型中,无论是机械负荷模型

还是失稳模型,文中各样“剥离椎旁肌”“逐层分离”“充分暴露关节面”等操作描述,无疑说明其对椎旁软组织的高度破坏,对 NLBP 的来源性问题造成严重干扰,缺乏科研严谨性。有研究表明,行腰椎后路手术所导致的腰部肌肉的损伤是引起手术后腰痛的一个主要因素^[65-66],这也说明了对侵入式造模对外层组织的干扰性损伤并非空穴来风。因此不妨把从内向外的思路转换成从外向内,对肌肉筋膜层施以干预方法建立 NLBP 模型。最大程度排除手术创伤出血及炎症等干扰。同时也便于对本病整体的产生机制进行补充完善。

NLBP 的模型评价主要以疼痛行为学和组织形态学为主,缺乏“金标准”的评价方法,故应在后续研究中加强影像学的决策作用研究,同时增加电生理学的评估手段,旨在多角度多方位进行模型探索。此外,还应注重蛋白组学、分子生物学等多方面指标,以实现宏观表征与客观指标的联合运用及协同判定,致力于完善 NLBP 模型评价体系。

鉴于此,面对 NLBP 发病原因及干预起效机制不明等问题,应总结前人的优势经验,完善对本病

的来源性研究,减少侵入式造模的干扰因素,持续深化 NLBP 的基础研究,规范造模方法与评价标准,构建稳定的 NLBP 模型,并研发高效且可靠的治疗方案,无疑成为未来研究的迫切需求与核心方向。

参 考 文 献 (References)

- [1] KNEZEVIC N N, CANDIDO K D, VLAHEYEN J W S, et al. Low back pain [J]. *Lancet*, 2021, 398(10294): 78–92.
- [2] Gbd Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204–1222.
- [3] KREINER D S, MATZ P, BONO C M, et al. Guideline summary review: an evidence-based clinical guideline for the diagnosis and treatment of low back pain [J]. *Spine J*, 2020, 20(7): 998–1024.
- [4] KUO A, LOURDESAMY J, NICHOLSON J R, et al. Assessment of the anti-hyperalgesic efficacy of J-2156, relative to clinically available analgesic/adjutant agents in a rat model of mild to moderate chronic mechanical low back pain (LBP) [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(12): 1912–1922.
- [5] 柯嵩, 徐钢, 李忠海. 慢性非特异性腰痛的动物模型相关研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28(7): 629–633.
- KE S, XU G, LI Z H. Research progress in animal models of nonspecific low back pain [J]. *Orthop J Chin*, 2020, 28(7): 629–633.
- [6] MA K, ZHUANG Z G, WANG L, et al. The Chinese association for the study of pain (CASP): consensus on the assessment and management of chronic nonspecific low back pain [J]. *Pain Res Manag*, 2019, 2019: 8957847.
- [7] HODGES P W, DANNEELS L. Changes in structure and function of the back muscles in low back pain: different time points, observations, and mechanisms [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2019, 49(6): 464–476.
- [8] 刘阅阅, 郑林遥, 陈佳彦, 等. 电针干预远端穴位对筋膜疼痛综合征模型大鼠致痛物质、巨噬细胞及相关炎症因子的影响 [J]. *中医杂志*, 2023, 9(17): 1799–1806.
- LIU Y Y, ZHENG L Y, CHEN J Y, et al. Effect of electroacupuncture at proximal and distal acupoints on pain-inducing substances, macrophages and related inflammatory factors in myofascial pain syndrome model rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 9(17): 1799–1806.
- [9] 朱玉昌, 马健辉, 侯璐璐, 等. 针刺触点对筋膜疼痛综合征大鼠痛阈改变的机制研究 [J]. *潍坊医学院学报*, 2023, 45(3): 169–173.
- ZHU Y C, MA J H, HOU L L, et al. Mechanism of acupuncture trigger point treatment on pain threshold changes in rats with myofascial pain syndrome [J]. *Acta Acad Med Weifang*, 2023, 45(3): 169–173.
- [10] 王良夫. 针刺结筋病灶点对非特异性腰痛大鼠胸腰筋膜 PI3K/AKT 信号通路的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2023.
- WANG L F. Effect of acupuncture at the focus of tendon knot on PI3K/AKT signal pathway in thoracolumbar fascia of rats with nonspecific low back pain [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [11] 陈玉佩, 刘通, 邹德辉, 等. 局部注射布比卡因建立大鼠骨骼肌损伤模型的组织形态学评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(18): 2615–2621.
- CHEN Y P, LIU T, ZOU D H, et al. Histomorphological assessment of a rat model of skeletal muscle injury induced by local injection of bupivacaine [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2016, 20(18): 2615–2621.
- [12] VINCENT K F, BUNDOCK J, DONA C P G, et al. Loss of lumbar disc height with age and its impact on pain and sensitivity associated behaviors in mice [J]. *Eur Spine J*, 2023, 32(3): 848–858.
- [13] 姚重界, 黄瑞信, 汤程, 等. 按揉“肾俞”穴对自然衰老大鼠腰椎间盘退变及相关疼痛的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(8): 4360–4365.
- YAO C J, HUANG R X, TANG C, et al. Effects of acupressure at ‘Shenshu’ (BL 23) on lumbar intervertebral disc degeneration and related pain in aging rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(8): 4360–4365.
- [14] NAKAMURA A, RAMPERSAUD Y R, NAKAMURA S, et al. MicroRNA-181a-5p antisense oligonucleotides attenuate osteoarthritis in facet and knee joints [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(1): 111–121.
- [15] 陈欢, 彭博, 李富运, 等. 电针对兔腰肌急性钝挫伤后组织修复与碱性成纤维细胞生长因子/细胞外信号调节激酶信号通路的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2014, 20(3): 215–220.
- CHEN H, PENG B, LI F Y, et al. Effects of electroacupuncture on morphology repairment and basic fibroblast growth factor/extracellular signal-regulated kinase signal pathway of rabbits with acute lumbar muscle contusion [J]. *Chin J Rehabil Theory Pract*, 2014, 20(3): 215–220.
- [16] LIPSON S J, MUIR H. 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration [J]. *Spine*, 1981, 6(3): 194–210.
- [17] 王鹏, 徐海孺, 骆国钢, 等. 经皮穿刺纤维环法诱导兔腰椎间盘退变模型 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2009, 19(11): 668–670.
- WANG P, XU H R, LUO G G, et al. Establishment of the lumbar intervertebral disk cataplasia model of rabbits by percutaneous puncturing the anulus fibrosus at surface allocation [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*, 2009, 19(11): 668–670.
- [18] ZHANG L, DU G, TENG B, et al. Vascular anatomy-based localization of intervertebral discs assisting needle puncture for constructing a mouse model of mechanical injury-induced lumbar intervertebral disc degeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 634: 196–202.

- [19] KIM J S, KROIN J S, LI X, et al. The rat intervertebral disk degeneration pain model: relationships between biological and structural alterations and pain [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(5): R165.
- [20] MONTERA M A, GOINS A E, ALLES S R A, et al. Urokinase-type plasminogen activator-induced mouse back pain model [J]. *J Vis Exp*, 2023(199): 1–10.
- [21] MARUYAMA T, NAKAMAE T, KAMEI N, et al. Development of a novel animal model of lumbar vertebral endplate lesion by intervertebral disk injection of monosodium iodoacetate in rats [J]. *Eur Spine J*, 2024, 33(5): 2116–2128.
- [22] MARCIANO C L, HILAND T A, JACKSON K L, et al. Soft tissue manipulation alters RANTES/CCL5 and IL-4 cytokine levels in a rat model of chronic low back pain [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14392.
- [23] REED N R, REED W R, SYRETT M, et al. Somatosensory behavioral alterations in a NGF-induced persistent low back pain model [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 418: 113617.
- [24] HONG S W, WANG K Z, ZHOU X C, et al. Manual therapy for a chronic non-specific low back pain rat model [J]. *J Vis Exp*, 2023, 198: 1–8.
- [25] YANG M, FENG C, ZHANG Y, et al. Autophagy protects nucleus pulposus cells from cyclic mechanical tension-induced apoptosis [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2): 750–758.
- [26] MOON C S, LIM T H, HONG J, et al. Assessment of a discogenic pain animal model induced by applying continuous shear force to intervertebral discs [J]. *Pain Physician*, 2023, 26(3): E181-E189.
- [27] WALSH A J L, LOTZ J C. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading [J]. *J Biomech*, 2004, 37(3): 329–337.
- [28] 王超, 石志才, 李明. 应力对椎间盘细胞调控作用的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29(7): 624–627.
WANG C, SHI Z C, LI M. Research progress in stress regulation of intervertebral disc cells [J]. *Orthop J Chin*, 2021, 29(7): 624–627.
- [29] CASSIDY J D, YONG-HING K, KIRKALDY-WILLIS W H, et al. A study of the effects of bipedism and upright posture on the lumbosacral spine and paravertebral muscles of the Wistar rat [J]. *Spine*, 1988, 13(3): 301–308.
- [30] LI M, XIE W Q, HE M, et al. Characterization of the subchondral bone and pain behavior changes in a novel bipedal standing mouse model of facet joint osteoarthritis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8861347.
- [31] 张超, 李宁宁, 胡朝晖. 间断直立位下兔椎间盘退变模型的影像及病理表现 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(4): 679–682.
ZHANG C, LI N N, HU Z H. Pathology and imaging performance of a rabbit intervertebral disc degeneration model induced by the intermittent upright position [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2012, 16(4): 679–682.
- [32] BAI X, WANG D, ZHOU M, et al. Noninvasive cumulative axial load may induce intervertebral disc degeneration-a potential rabbit model [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1438–1446.
- [33] LIU S, SUN Y, DONG J, et al. A mouse model of lumbar spine instability [J]. *J Vis Exp*, 2021, 170: 1–10.
- [34] 谢瑞. 基于筋伤理论探讨退行性腰椎失稳的力学、病理学机制及手法干预研究 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2021.
XIE R. Based on JinShang theory to explore the mechanical and pathological mechanism of degenerative lumbar spinal instability and manipulation intervention study [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2021.
- [35] XIE W, LI F, HAN Y, et al. Calcitonin gene-related peptide attenuated discogenic low back pain in rats possibly via inhibiting microglia activation [J]. *Heliyon*, 2024, 10(3): e25906.
- [36] 马云龙, 宋春雨, 刘晓光, 等. 富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白基因敲除动物模型在腰椎间盘退变所致下腰痛研究中的应用 [J]. *中国微创外科杂志*, 2020, 20(8): 750–754.
MA Y L, SONG C Y, LIU X G, et al. Application of cysteine-rich secretory acidic protein gene knockout animal model in the study of low back pain caused by lumbar disc degeneration [J]. *Chin J Minim Invasive Surg*, 2020, 20(8): 750–754.
- [37] KAWARAI Y, JANG S H, LEE S, et al. Exercise attenuates low back pain and alters epigenetic regulation in intervertebral discs in a mouse model [J]. 2021, 21(11): 1938–1949.
- [38] JAMES G, KLYNE D M, MILLECAMPS M, et al. ISSLS Prize in Basic science 2019: Physical activity attenuates fibrotic alterations to the multifidus muscle associated with intervertebral disc degeneration [J]. *Eur Spine J*, 2019, 28(5): 893–904.
- [39] WU C, YU J, XU G, et al. Wnt16 protects chondrocytes from lumbar facet joint osteoarthritis through the Wnt/ β -catenin pathway in low back pain patients [J]. *Somatosens Mot Res*, 2021, 38(4): 339–346.
- [40] WANG J, LU Q, MACKAY M J, et al. Spontaneous facet joint osteoarthritis in NFAT1-mutant mice: age-dependent histopathologic characteristics and molecular mechanisms [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2022, 104(10): 928–940.
- [41] 沈自尹. 从肾阳虚证的研究谈中医药走向世界 [J]. *中国中医药信息杂志*, 1997, 4(4): 5–6.
SHEN Z Y. Discussion on Chinese medicine going to the world from the study of kidney-Yang deficiency syndrome [J]. *Chin J Inf TCM*, 1997, 4(4): 5–6.
- [42] 肖志锋. 椎间盘退变与椎体骨质疏松的关系及补肾中药对其小鼠模型的干预作用 [D]. 广州: 广州中医药大学; 2018.
XIAO Z F. The correlation of intervertebral disc degeneration with vertebral osteoporosis and the intervenetional effect of Bushen herbs on its mouse model [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine; 2018.
- [43] 雷鸣, 周杰, 王美元, 等. 腰痹舒胶囊对寒湿痹阻腰痛模型大鼠血液流变学等相关指标的影响 [J]. *中国中医急症*, 2021, 30(11): 1936–1939.
LEI M, ZHOU J, WANG M Y, et al. Effect of yaobishu capsules on hemorheology and related indexes in rats with cold-dampness blockage of lumbar pain [J]. *J Emerg Tradit Chin*

- Med, 2021, 30(11): 1936–1939.
- [44] 李沅骋, 宋子琪, 万成雨, 等. 长期低头位与寒湿刺激建立颈型颈椎病动物模型的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 210–215, 279–282.
- LI Y C, SONG Z Q, WAN C Y, et al. Establishment of an animal model for cervical spondylosis by prolonged low head position and cold-damp stimulation [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(10): 210–215, 279–282.
- [45] 韩忠晓, 欧雅滢, 庄薪晴, 等. 机械穿刺结合肿瘤坏死因子 α 及完全弗氏佐剂构建大鼠椎间盘源性腰痛模型 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(11): 1672–1677.
- HAN Z X, OU Y Y, ZHUANG X Q, et al. Mechanical puncture combined with tumor necrosis factor alpha and complete Freund's adjuvant to construct a rat discogenic low back pain model [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(11): 1672–1677.
- [46] 卢晶晶, 张弛, 张驰名, 等. 新型大鼠腰部慢性骨骼肌复合损伤模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1399–1407.
- LU J J, ZHANG C, ZHANG C M, et al. Establishment of a novel composite rat model of chronic skeletal muscle injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1399–1407.
- [47] 李源. 过度应力通过上调软骨终板 BDNF 表达介导小鼠椎间盘退变及腰痛的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2023.
- LI Y. Study on the mechanism of excessive stress mediating intervertebral disc degeneration and low back pain in mice by up-regulating the expression of BDNF in cartilage endplate [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2023.
- [48] BARREY C Y, LE HUEC J C, SURGERY F S. Chronic low back pain; relevance of a new classification based on the injury pattern [J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2019, 105(2): 339–346.
- [49] 吕智桢, 朱清广, 孔令军, 等. 手法加载对慢性下腰痛模型大鼠降钙素基因相关肽和神经生长因子的影响 [J]. 中国骨伤, 2021, 34(3): 282–287.
- LYU Z Z, ZHU Q G, KONG L J, et al. Effects of manual loading on calcitonin gene related peptide and nerve growth factor in rats with chronic low back pain [J]. Chin J Orthop Traumatol, 2021, 34(3): 282–287.
- [50] JIAO Y, YUAN Y, LIN Y, et al. *Propionibacterium acnes* induces discogenic low back pain via stimulating nucleus pulposus cells to secrete pro-algesic factor of IL-8/CINC-1 through TLR2-NF- κ B p65 pathway [J]. J Mol Med, 2019, 97(1): 25–35.
- [51] 杨铠文. 康复运动改善盘源性腰痛椎旁肌肉脂肪浸润的功能磁共振研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学; 2022.
- YANG K W. Functional magnetic resonance imaging study of rehabilitation exercise in improving fat infiltration in paraspinal muscles of discogenic low back pain [D]. Kunming: Kunming Medical University; 2022.
- [52] 罗保发. 盘源性腰痛大鼠模型的建立及其椎旁肌改变的磁共振评估 [D]. 昆明: 昆明医科大学; 2022.
- LUO B F. Establishment of rat model of discogenic low back pain and MRI evaluation of paravertebral muscle changes [D]. Kunming: Kunming Medical University; 2022.
- [53] 蒋全睿, 刘丹, 潘杰灵, 等. 不同部位按法对慢性疼痛激痛点大鼠模型的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(7): 1008–1019.
- JIANG Q R, LIU D, PAN J L, et al. Established a rat model of discogenic low back pain for evaluating the paravertebral muscle functional magnetic resonance dynamic changes [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(7): 1008–1019.
- [54] 吕智桢, 孔令军, 程艳彬, 等. 基于 Cat Walk 评价脊柱推拿干预慢性下腰痛模型大鼠步态行为 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3475–3479.
- LYU Z Z, KONG L J, CHENG Y B, et al. Evaluation of spinal Tuina for gait behavior in chronic low back pain model rats based on Cat Walk [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(6): 3475–3479.
- [55] HENRY J L, YASHPAL K, VERNON H, et al. Lumbar facet joint compressive injury induces lasting changes in local structure, nociceptive scores, and inflammatory mediators in a novel rat model [J]. Pain Res Treat, 2012, 2012: 127636.
- [56] 蒋全睿, 吴琼, 匡小霞, 等. 按压对大鼠肌筋膜激痛点软组织张力的影响及其作用机制研究 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(5): 335–341.
- JIANG Q R, WU Q, KUANG X X, et al. The effect of pressing on the soft tissue tension of myofascial trigger points in rats and its mechanism [J]. Chin J Pain Med, 2021, 27(5): 335–341.
- [57] 吕游, 王祖强, 侯树勋. 持续动态机械加压诱导腰椎关节突关节源性腰痛大鼠模型的建立和观察 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(11): 817–825.
- LYU Y, WANG Z Q, HOU S X. Establishment and observation of a rat model of lumbar facet joint-derived low back pain induced by intraspinal persistent compressive injury [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(11): 817–825.
- [58] 郭美玉, 李忠海. 腰痛相关生物标记物的研究进展 [J]. 中国骨与关节杂志, 2018, 7(9): 716–719.
- GUO M Y, LI Z H. Research progress of related biomarkers for low back pain [J]. Chin J Bone Jt, 2018, 7(9): 716–719.
- [59] 张佳, 张洪, 蒋元明, 等. 不同强度运动后腰椎旁肌肉磁共振功能成像分析 [J]. 临床放射学杂志, 2020, 39(7): 1393–1397.
- ZHANG J, ZHANG H, JIANG Y M, et al. Functional magnetic resonance imaging analysis of lumbar paravertebral muscles after different intensity exercises [J]. J Clin Radiol, 2020, 39(7): 1393–1397.
- [60] 于鹏, 李保卫, 杨智, 等. 剪切波弹性成像技术评价兔腰大肌激光消融灶的实验研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2019, 35(11): 1038–1041.
- YU P, LI B W, YANG Z, et al. Visualization of laser ablation treated lesions on rabbit psoas muscle using shear wave elastography [J]. Chin J Ultrasound Med, 2019, 35(11): 1038–1041.

[61] 刘博, 高天君, 马远征, 等. 垂直振动对大鼠腰椎小关节退变及骨密度影响的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1246-1250.

LIU B, GAO T J, MA Y Z, et al. An experimental study on the effects vertical vibration on lumbar facet joint degeneration and bone mineral density in rats [J]. Chin J Osteoporos, 2016, 22(10): 1246-1250.

[62] 陈莉, 徐菁, 李霞, 等. 电针“委中”穴对腰多裂肌损伤大鼠血小板衍生生长因子 CC 及受体 α 表达的影响 [J]. 针刺研究, 2021, 46(5): 397-403.

CHEN L, XU J, LI X, et al. Effect of electroacupuncture at “Weizhong” (BL40) on expression of muscular PDGF-CC, PDGFR- α and MMP-1 in rats with lumbar multifidus muscle injury [J]. Acupunct Res, 2021, 46(5): 397-403.

[63] 鲁曼, 徐菁, 李欣怡, 等. 电针“委中”穴对大鼠腰多裂肌损伤后 TGF- β 1、CTGF、Vimentin 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(3): 386-390.

LU M, XU J, LI X Y, et al. Effect of electro-acupuncture at Weizhong point on the expression of TGF- β 1, CTGF and vimentin in rats with lumbar polysplit muscle injury [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2020, 29(3): 386-390.

[64] CALATAYUD J, ESCRICHE-ESCUDER A, CRUZ-MONTECINOS C, et al. Tolerability and muscle activity of core muscle exercises in chronic low-back pain [J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(19): 3509.

[65] KAWAGUCHI Y, MATSUI H, TSUJI H. Back muscle injury after posterior lumbar spine surgery. A histologic and enzymatic analysis [J]. Spine, 1996, 21(8): 941-944.

[66] 高勇, 王哲享, 罗继. 健步汤联合五点支撑法治疗 LDH 术后残余腰痛 23 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(9): 67-69.

GAO Y, WANG Z X, LUO J. Clinical observation on 23 cases of residual low back pain after LDH treated by Jianbu decoction combined with five-point support method [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2023, 39(9): 67-69.

[收稿日期] 2024-04-18

优化糖尿病肾病动物模型-来自 Meta 分析的启示

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是一种由糖尿病代谢异常引起的肾小球硬化,也是全身性微血管病变的一种表现。DKD 影响 20% ~ 40% 的 1 型或 2 型糖尿病患者,是终末期肾疾病的主要原因。糖尿病肾病的临床症状包括持续蛋白尿、血压升高和肾小球滤过降低。全球疾病负担调查显示,男性和女性的年龄标准化 DKD 患病率分别为 15.48/1000 和 16.50/1000。因此,建立理想的糖尿病肾病动物模型对于开发有效的治疗药物至关重要。本综述讨论了近 10 年来各类糖尿病动物模型的优缺点,并对未来糖尿病肾病模型的优化进行了展望。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5):433-451. doi: 10.1002/ame2.12350)。

李媛,张依莎,游典,等. 氧化应激在卵巢功能障碍中的作用机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1606-1615.

LI Y, ZHANG Y S, YOU D, et al. Research on mechanisms of oxidative stress in ovarian dysfunction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1606-1615.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.012

氧化应激在卵巢功能障碍中的作用 机制研究进展

李媛,张依莎,游典,童凯雯,项盈盈,陈怡辰,裴弈闻,张婷*

(湖州师范学院 湖州市重大慢性病精准防控重点实验室,浙江 湖州 313000)

【摘要】 氧化应激(oxidative stress, OS)在年龄相关性卵巢衰老中起关键作用,其潜在机制复杂。近年来有研究表明氧化应激介导多种病理过程诱发衰老下的卵巢功能障碍,如线粒体功能障碍、慢性炎症、细胞凋亡以及端粒的缩短均在氧化应激导致的卵巢衰老中发挥作用,通过抗氧化治疗有助于改善氧化应激下的卵巢功能。

【关键词】 氧化应激;卵巢衰老;线粒体稳态;线粒体功能障碍;炎症微环境;细胞凋亡;染色体端粒

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1606-10

Research on mechanisms of oxidative stress in ovarian dysfunction

LI Yuan, ZHANG Yisha, YOU Dian, TONG Kaiwen, XIANG Yingying, CHEN Yichen,
PEI Yiwen, ZHANG Ting*

(Huzhou Key Laboratory of Precise Prevention and Control of Major Chronic Diseases,
Huzhou University, Huzhou 313000, China)

Corresponding author: ZHANG Ting. E-mail: grapechang@zjhu.edu.cn

【Abstract】 Age-related ovarian aging is significantly influenced by oxidative stress, which has intricate underlying mechanisms. Studies conducted recently have demonstrated that oxidative stress is a mediator of several pathological processes that lead to ovarian dysfunction in aging. These processes include telomere shortening, chronic inflammation, apoptosis, and mitochondrial dysfunction. Under oxidative stress, antioxidant treatment can assist in enhancing ovarian function.

【Keywords】 oxidative stress; ovarian aging; mitochondrial homeostasis; mitochondrial dysfunction; inflammatory microenvironment; apoptosis; telomeres

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

卵巢衰老是以细胞周期停滞为特征的过程,其机制较复杂,与年龄相关的氧化应激被认为是最关键的因素^[1-5]。氧化应激引起卵巢衰老的机制包括线粒体功能障碍、慢性炎症、细胞凋亡以及端粒的缩短等^[6-8]。本文将对氧化应激对卵巢功能影响的有关机制及干预措施进行综述。

1 氧化应激概述

自由基是有氧代谢过程中产生的高活性促氧化分子基团,包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)。ROS的产生与抗氧化机制的不平衡会诱发氧化应激,并被证明与卵巢衰老及多种疾病有关^[6]。ROS

【基金项目】 国家级大学生创新创业训练计划(202310347064)。

Funded by National College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program(202310347064)。

【作者简介】 李媛,女,在读本科生,研究方向:动物繁殖学。Email: 2863480921@qq.com

【通信作者】 张婷,女,教授,硕士生导师,研究方向:病理学。Email: grapechang@zjhu.edu.cn

包括羟基自由基、超氧自由基阴离子、过氧自由基、烷氧基、过氧化氢、过羟基自由基和单线态氧。RNS 包括一氧化氮、过氧亚硝酸根阴离子、亚硝酸、二氧化氮、亚硝酰基阴离子^[9-10]。

ROS 的来源可分为外源性及内源性。前者包括化疗、紫外线、电离辐射、重金属污染物、烟草和某些药物,而后者主要来自线粒体氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)。在外源微环境中,缺氧导致的卵巢慢性炎症及线粒体 ROS 的过量产生将导致氧化应激,进而介导 DNA 损伤、蛋白质和膜脂氧化损伤,最终诱导卵巢衰老^[11]。

氧化应激被定义为氧化和抗氧化系统不平衡,过量自由基的持续产生超过其消除能力的不良应激反应^[5]。自由基具有双向调节作用,一方面,适量 ROS 不仅参与生物活性物质的合成还广泛参与细胞信号转导,促进细胞增殖和分化^[12];另一方面,过度的 ROS 产生将导致氧化损伤和组织功能障碍,降低卵巢功能^[5]。除此之外,抗氧化屏障的破坏也会导致氧化还原反应失衡并诱发体内氧化应激状态^[13]。卵巢的氧化损伤一般由脂质过氧化引起,严重影响卵泡生成和排卵,最终导致卵巢衰老^[14]。

2 氧化应激导致的线粒体稳态失衡对卵巢功能的影响

线粒体是执行和协调细胞内各种代谢过程的重要细胞器,在卵母细胞减数分裂成熟中起关键作用^[15]。线粒体数量和分布异常、线粒体膜电位降低和 DNA 序列的改变会影响小鼠卵母细胞的质量,并对胚胎发育产生重要影响^[16]。

线粒体稳态失衡导致线粒体功能障碍,是细胞衰老的原因和结果^[17]。线粒体稳态是一个复杂的调节网络,协调各种细胞途径^[18]。线粒体生物发生为细胞提供新合成的线粒体而功能失调的线粒体通常会通过线粒体自噬被清除^[19]。线粒体生物发生和线粒体自噬之间的相互作用有利于线粒体的质量控制。氧化应激下线粒体自噬水平下调,细胞无法有效清除受损的线粒体,线粒体稳态破坏^[20]。线粒体功能障碍会改变氧化还原平衡,并导致衰老和代谢改变。线粒体电子传递链(electron transport chain, ETC)耦合 OXPHOS 负责卵母细胞中大部分 ATP 的生成。然而, OXPHOS 的副产品之一是产生具有潜在破坏性的活性氧,活性氧可以作为细胞信号传导的介质,且 OXPHOS 持续产生的低水平内源

活性氧可通过诱导自噬从而保护机体免受氧化应激损伤^[21-22]。但如果活性氧的产生不受控制,机体内氧化机制的失衡会导致氧化损伤。

线粒体 DNA (mitochondria DNA, mtDNA) 缺乏组蛋白的保护,容易受到活性氧的攻击。活性氧水平过高会诱导 mtDNA 突变,减少 mtDNA 合成和线粒体生物合成^[23]。在功能失调的线粒体电子传递链解耦联,能量供应减少,而 ROS 的产生增加,这种存在于不同组织和细胞中的“ROS 恶性循环”会导致氧化应激随着年龄的增长而呈指数加速,最终这种一系列的放大损伤会对卵巢功能产生严重的不利影响^[24-26](图 1)。

3 氧化应激导致的炎症微环境对卵巢功能的影响

氧化应激可以诱发卵巢炎症,慢性炎症反应会进一步降低卵巢功能。研究表明,持续较长时间的氧化应激损伤可通过 M2 巨噬细胞修复引起卵巢间质纤维化导致卵巢功能低下^[27]。

大量研究证明氧化应激与慢性低度炎症密切相关。氧化应激下受损的 mtDNA 片段充当损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP)并被 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) 的模式结合识别受体识别,并与其他炎症体中存在的衔接蛋白 ASC 结合形成复合物。该复合物募集含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteiny l aspartate specific proteinase-1, caspase-1) 并使之成熟,这种被激活的成熟蛋白酶可裂解白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 前体进而分泌 IL-1 β 和 IL-18,以促进炎症过程和氧化应激^[14]。ROS 还可激活核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B),而各种炎症性细胞因子包括 IL-1 β 和 IL-18,以及炎症小体 NLRP3 和 caspase-1 相关基因,都受到 NF- κ B 激活的转录调节^[28]。

活化的巨噬细胞通过 NF- κ B 转录因子产生肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),在卵巢内 TNF- α 可以促进 DNA 断裂和卵泡凋亡,促进局部炎症反应的增加。由于 TNF- α 在激活和维持炎症反应中发挥核心作用,以自我调节的方式激活 NF- κ B,导致持续的低度炎症,而慢性低度炎症又能进而促进氧化应激,最终加速卵巢的衰老^[29]。

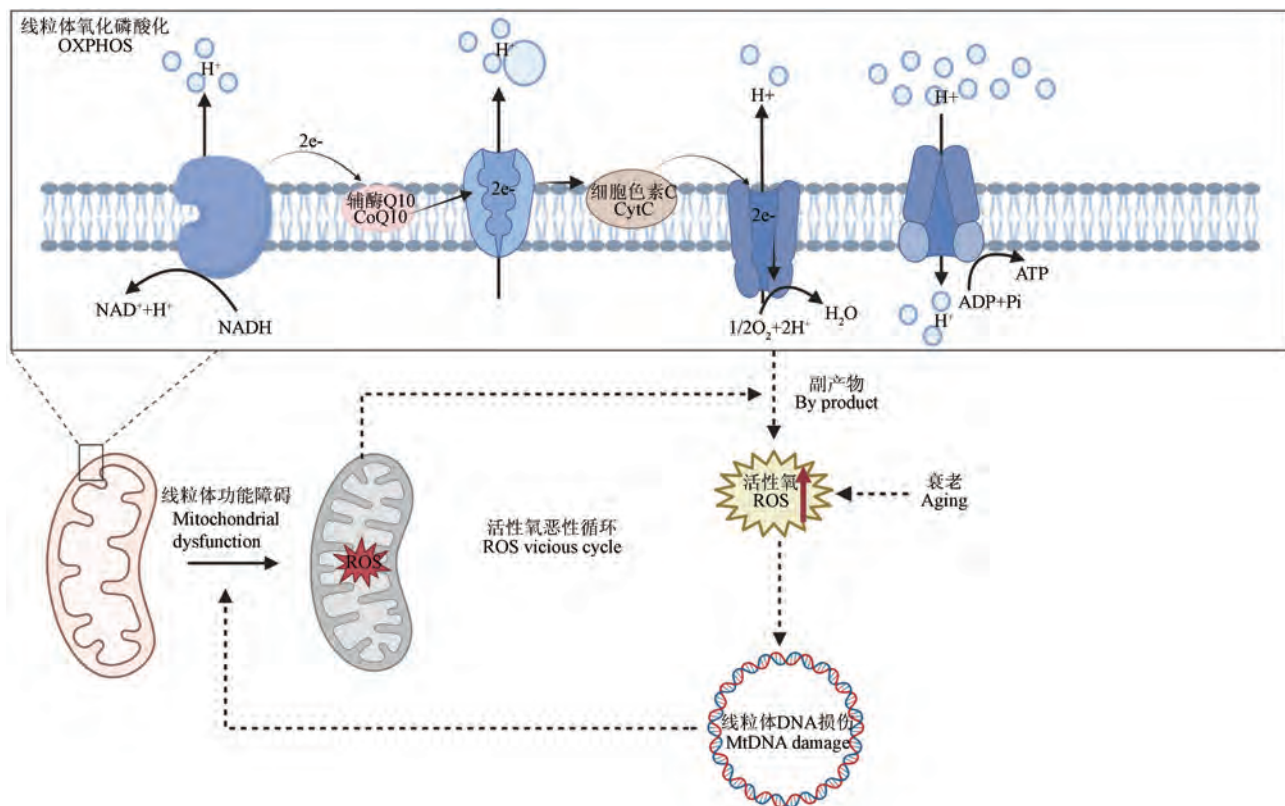


图 1 线粒体功能障碍-ROS 产生过多-mtDNA 损伤的恶性循环

Figure 1 Mitochondrial dysfunction-excessive ROS production-mtDNA damage vicious cycle

NLRP3 通路和 NF- κ B 通路之间存在串扰。氧化应激可通过 NLRP3 通路产生的 IL-1 β 和 IL-18 细胞因子间接激活炎症转录因子 NF- κ B, 另一方面, 氧化应激激活 NF- κ B 并产生 TNF- α , 通过转录调节 NLRP3 基因, 从而进一步上调 NLRP3 炎症体通路^[30]。这些过程最终导致免疫系统激活, 从而加剧氧化损伤, 引起卵巢衰老 (图 2)。

PAGLIARO 等^[31]研究表明 NLRP3 抑制剂如姜黄素可以减少氧化应激和炎症, 进而阻断 ASC, 抑制 NF- κ B 并减少活性氧的产生。HAN 等^[32]研究表明槲皮素是一种天然黄酮类化合物, 具有抗炎和抗氧化特性, 通过促进线粒体自噬, 增强受损线粒体的消除, 从而减少 mtROS 积累并减轻 NLRP3 炎症小体激活。ZHENG 等^[33]研究表明 β -胡萝卜素作为一种具有多种生物功能的微量营养素, 具有明显的抗炎作用, 可以显著下调炎症细胞因子 TNF- α 的水平。

4 氧化应激导致的细胞凋亡对卵巢功能的影响

氧化应激诱导的 DNA 损伤和细胞凋亡会导致

卵母细胞质量和受精潜力下降。卵巢细胞凋亡可引起广泛的卵泡闭锁或退化, 被认为是卵巢衰老的最重要机制之一^[14]。有 2 种明确的细胞凋亡途径: 线粒体途径 (也称为内源性途径) 以及死亡受体诱导途径 (也称为外源性途径)^[34-35]。

4.1 氧化应激导致的内源性细胞凋亡途径

内源性细胞凋亡途径由 BCL-2 蛋白家族成员控制, BCL-2 蛋白家族的抗凋亡和促凋亡分子之间的相互作用决定细胞的生存或死亡^[36-37]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路由细胞凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) 选择性触发, 被认为是激活细胞凋亡的主要调节因子。JNK 激活可以抑制抗凋亡蛋白 BCL-2 和 BCL-xl 表达并诱导促凋亡蛋白 BAX 表达^[38]。氧化应激诱导的细胞凋亡是由 ASK1-JNK 信号轴介导的, 是调节细胞增殖和凋亡的主要信号通路。

由活性氧过载介导的微环境稳态失衡启动内在细胞凋亡途径, 产生细胞内信号, 促凋亡蛋白以非常高的亲和力与所有抗凋亡 BCL-2 蛋白结合间接激活 BAX 和 BAK^[39], 激活后, 效应蛋白从惰性单体转化为膜透化寡聚体, 改变线粒体膜电位

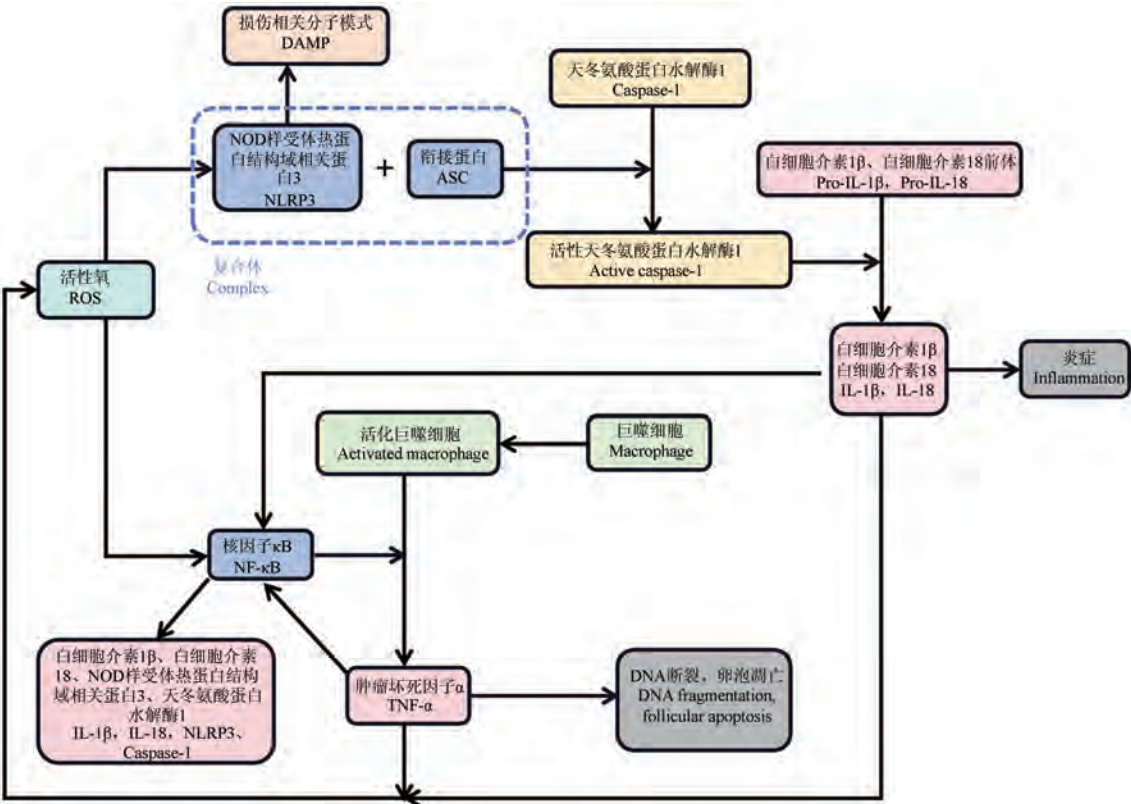


图2 氧化应激导致卵巢炎症微环境的信号通路串扰

Figure 2 Crosstalk of signaling pathways in ovarian inflammatory microenvironment caused by oxidative stress

(mitochondrial membrane potential, MMP), 是线粒体发生外膜透化 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), 导致细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 从线粒体基质释放到细胞质中^[40-41]。Cyt C 与凋亡蛋白酶激活因子 (apoptotic protease activating factor-1, APAF-1) 形成多聚体复合物, 持续激活 caspase-3 和 caspase-9, 并上调 Bax/Bcl-2 比率以及下调抗氧化酶, 从而诱导细胞凋亡^[42]。

4.2 氧化应激导致的外源性细胞凋亡途径

外源性细胞凋亡途径由膜结合死亡受体 (例如 FAS、TNFR1) 的同源配体 (FASL、TNF) 激活, 并招募 caspase-8 形成死亡诱导信号复合物 (death-inducing signaling complex, DISC), 该复合物激活 caspase-8 和 caspase-10 前体。激活的 caspase-8 随后激活 caspase-3、6、7 并裂解细胞存活所需的各种下游细胞内底物从而诱导细胞凋亡。激活的 caspase-3 是内源性和外源性途径中的细胞凋亡执行者^[43]。

此外, 死亡受体和线粒体之间存在串扰通路。外在途径可以通过激活的 caspase-8 介导的 BID 蛋白水解, 通过裂解形成的 tBID 与内在途径交叉对

话, 从而触发凋亡因子的释放, 激活 BAX 和 BAK 从而导致线粒体释放 Cyt C 并诱导线粒体途径的细胞凋亡^[27] (图 3)。

补充抗氧化剂可以通过 ROS-ASK1-JNK 途径减少 ROS 对卵巢的损伤老化作用。双特异性磷酸酶 16 (dual specificity phosphatase 16, DUSP16) 被证明可靶向调节 JNK 来调节 JNK 途径的细胞凋亡^[43]。另外有研究表明 BAX 抑制剂可结合并变构以抑制 BAX 激活^[44]。

5 氧化应激导致的端粒缩短对卵巢功能的影响

氧化应激被认为是端粒缩短的主要原因, 端粒长度已被建议作为慢性氧化应激的生物标志物。端粒缩短及功能失调可导致卵巢细胞衰老, 因此氧化应激被认为与卵巢功能障碍密切相关^[45]。

端粒易被 ROS 氧化且端粒重复序列对氧化损伤非常敏感, 是 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoguanine, 8-oxoG) 形成的首选位点。端粒酶可以在端粒 DNA 合成过程中插入 8-oxoG, 但受损的核苷酸会充当端粒酶链终止子, 从而损害端粒延长。若损伤广泛, DDR

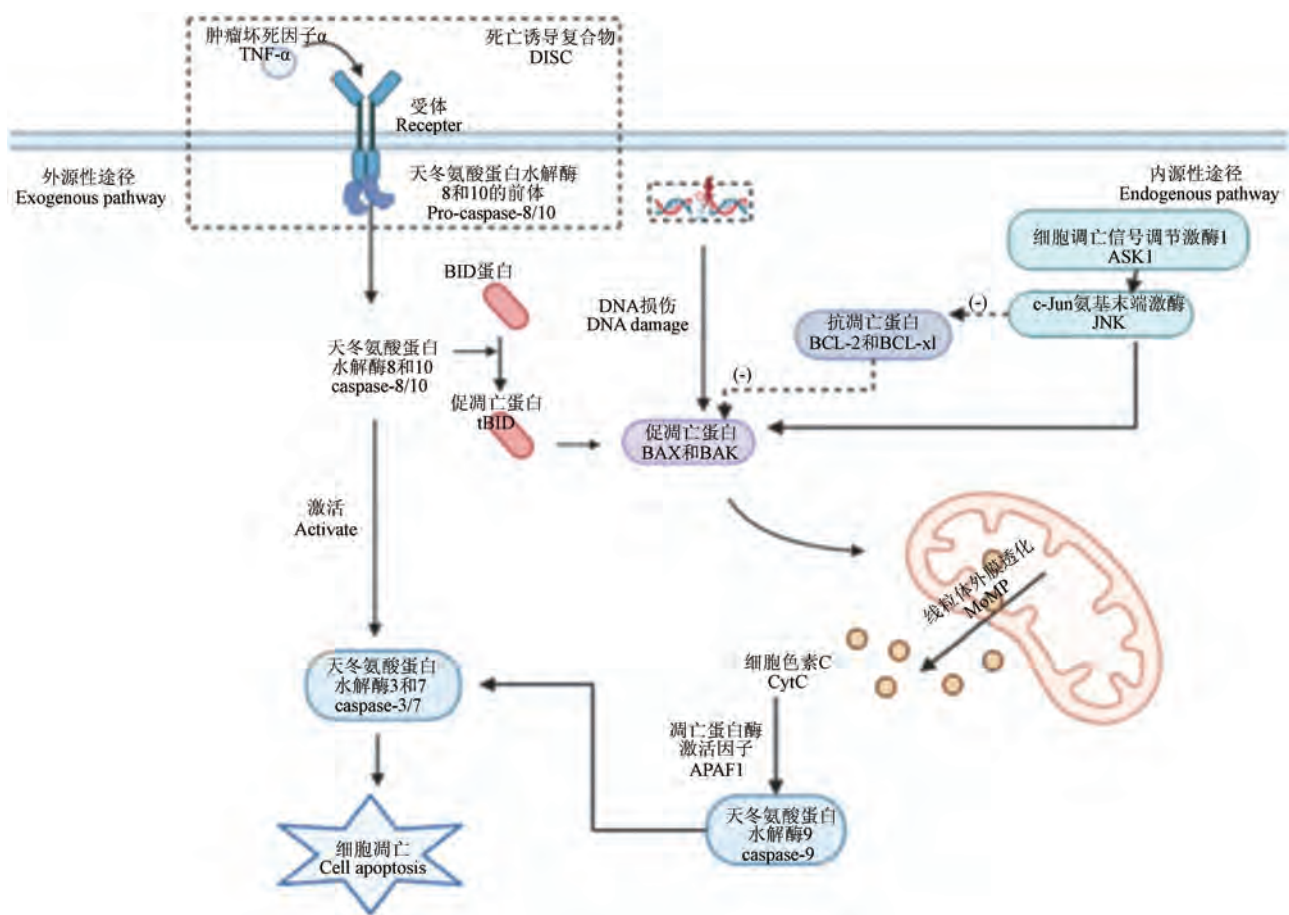


图 3 细胞凋亡内源性途径与外源性途径的信号通路串扰

Figure 3 Signaling crosstalk between the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis

信号传导会驱动细胞周期停滞和生长抑制,从而导致卵巢细胞衰老^[46-48]。多功能酶 MTH1 对于清除细胞中受损的核苷酸非常重要,在端粒长度调节中发挥作用,MTH1 缺陷小鼠 DNA 的氧化损伤增加。MTH1 将脱氧核糖核苷三磷酸 8-oxo-dGTP 水解为单磷酸 8-oxo-dGMP,从而阻止 8-oxoG 掺入 DNA,以保护卵巢细胞 DNA 免受氧化应激损伤^[49]。

碱基切除修复酶 OGG1 参与端粒氧化鸟嘌呤损伤的修复,切除损伤碱基位点并诱导无嘌呤位点的形成^[50]。然而,8-oxoG 可以与 C 和 A 碱基配对,若插入腺嘌呤会造成 8-oxoG:A 错配突变,DNA 糖基化酶 MUTHYH 负责识别并去除 8-oxoG:A 位点上的腺嘌呤,从而防止 DNA 突变^[51](图 4)。

端粒酶是一种逆转录酶,能够有效维持端粒结构的完整性。端粒酶活性会随着年龄的增长而下降,诱导端粒酶活性可抵消端粒缩短。研究表明,黄芪提取物 HRE 诱导端粒酶表达并导致端粒酶依赖性延伸。此外,给予富马酸二甲酯会提高老年小鼠卵巢中端粒酶的 mRNA 和蛋白质表达水平,并增

加原始卵泡的数量^[13]。

6 抗氧化治疗策略

如前文所述,氧化应激可以通过线粒体功能障碍、慢性炎症状态、细胞凋亡以及端粒缩短的机制促进卵巢衰老,故对抗氧化应激是延缓卵巢衰老的关键靶点。目前抗氧化剂可分为两大类,非酶促类抗氧化剂和酶促类抗氧化剂。主要的非酶促类抗氧化剂包括褪黑素、维生素、白藜芦醇(resveratrol, RES)、富马酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)、类胡萝卜素、瑞香素、姜黄素、槲皮素等;主要的酶促类抗氧化剂包括辅酶 Q10(coenzyme Q10, CoQ10)、线粒体去乙酰化酶(sirtuin, SIRT)、烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide, NMN)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、亚麻木酚素(secoisolaricresinol diglucoside, SDG)等^[10]。

6.1 非酶促类抗氧化剂

6.1.1 褪黑素

松果体释放的褪黑素已在小鼠中被证明可直

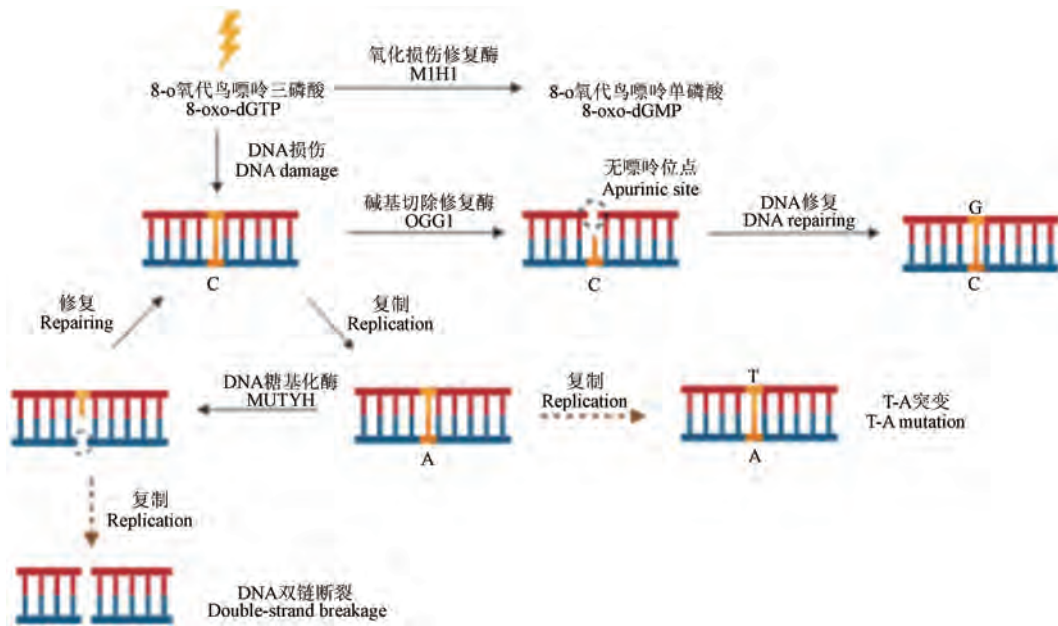


图 4 端粒 8-oxoG 氧化损伤及损伤修复机制

Figure 4 Telomere 8-oxoG oxidative damage and damage repair mechanism

接清除 ROS 以抵消氧化应激,褪黑素还通过间接抗氧化特性,激活抗氧化酶及抑制促氧化酶,间接减少氧化应激^[52]。研究表明,褪黑素介导 SIRT3/SOD2 信号通路,激活抗氧化酶,从而减少线粒体氧化损伤^[53],并通过介导 SIRT1 通路发挥抗炎活性^[54]。总而言之,褪黑激素具有保护线粒体功能、对抗炎症反应、减轻氧化应激的功能,有益于延缓衰老过程。

6.1.2 维生素

研究表明,维生素 C 通过介导 Nrf2-ARE 信号通路对抗衰老引起的氧化应激,可改善卵巢功能^[55]。维生素 E 主要以 α -生育酚的形式存在,可破坏脂质过氧化反应,从而对抗卵巢氧化应激^[14]。此外,维生素 D 可以诱导 Nrf2 表达,减轻氧化应激并延缓细胞衰老^[56]。吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是一种水溶性维生素类化合物,亦可激活 Nrf2-ARE 信号通路,具有很强的抗氧化能力^[57]。研究表明 PQQ 可减轻卵巢功能障碍小鼠的氧化应激损伤,保护卵巢功能^[58]。

6.1.3 白藜芦醇

白藜芦醇是桑树、花生和葡萄等植物中富含的天然成分,具有多种生物活性,包括抗氧化、抗炎、免疫调节、细胞保护、抗肿瘤、抗衰老等。白藜芦醇可通过两种不同的机制调节细胞氧化还原平衡,一方面,它直接充当自由基的有效清除剂;另一方面,还可通过激活 Nrf2 通路,以及促进 SIRT1 的激活,

减少 ROS 的产生,间接发挥抗氧化作用^[59-60]。研究表明,白藜芦醇对大鼠氧化应激模型的脂质过氧化、氧化应激和 DNA 损伤具有保护作用,并可通过降低 TNF- α 水平改善卵泡功能^[61]。

6.1.4 DMF

大鼠氧化应激模型的研究表明 DMF 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制氧化应激^[62-63]。Nrf2 是负责调节细胞内氧化还原平衡的重要转录因子,通常情况下, Nrf2 与 Keap1 蛋白处于失活状态, DMF 通过氧化 Keap1 的巯基激活 Nrf2,促进抗氧化基因的表达从而减少氧化应激^[64]。

6.1.5 其它非酶促类抗氧化剂

瑞香素作为一种天然中草药,可以激活 Nrf2 并抑制 NLRP3 激活,发挥抗氧化作用^[38]。姜黄素可显著降低细胞内脂质过氧化,增强氧化应激抵抗力,减少氧化应激从而延长线虫的寿命;姜黄素还可通过 Nrf2/Keap1 信号通路显著增强抗氧化酶的活性,减少氧化应激^[65-66]。槲皮素作为一种天然无毒黄酮类化合物,可通过靶向调节 SIRT1 延缓细胞衰老^[67]。类胡萝卜素是天然存在的脂溶性多不饱和化合物,其中番茄红素的抗氧化效率最高,已被证明可抑制 TNF- α 和 NF- κ B 的激活并增强细胞的抗氧化能力^[33,68]。

6.2 酶促类抗氧化剂

6.2.1 CoQ10

CoQ10 是唯一的内源合成的脂溶性抗氧化剂,

在线粒体电子传递链中充当电子载体,其不仅对于线粒体产生能量至关重要,还作为抗氧化剂维持体内氧化还原稳态^[60,69]。泛醇是 CoQ10 的还原形式,可以对抗脂质过氧化,具有抗氧化功能^[70]。除此之外,CoQ10 有助于抗氧化剂如维生素 C 和维生素 E 的再生,提高机体抗氧化能力^[71]。研究发现,CoQ10 的抗氧化特性将为改善排卵、逆转卵巢功能障碍提供新方向^[72]。

6.2.2 SIRT

研究表明,SIRT 可以通过协同或拮抗的方式防止卵巢细胞衰老。SIRT1 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)依赖性脱乙酰酶家族的成员,作为衰老相关性疾病的潜在治疗靶点被广泛研究^[67]。SIRT3 的表达在卵巢中表现出年龄依赖性的下降,SIRT3 缺乏会导致衰老卵母细胞中超氧化物的积累并伴有线粒体功能障碍^[73]。SIRT6 可维持细胞氧化还原稳态,被认为在卵母细胞端粒的稳定中发挥重要作用^[48]。值得注意的是,SIRT1 和 SIRT6 都可通过激活 Nrf2,调节抗氧化基因表达,从而对抗氧化应激损伤^[74]。

6.2.3 NMN

NAD^+ 是维持 SIRT1 脱乙酰化活性的关键底物,也是 SIRT3 的必要辅助因子。研究表明,NMN 可增强 NAD^+ /SIRT1 活性,在一定程度上改善脓毒症引起的氧化应激^[75]。NMN 还可通过介导 NAD^+ /SIRT3 通路缓解线粒体功能障碍并延缓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)的衰老^[76]。研究表明,对肥胖小鼠补充 NMN 可提高 SIRT3 的转录并保护卵母细胞免受氧化应激^[77]。

6.2.4 GSH 和 SDG

GSH 由甘氨酸、半胱氨酸和谷氨酸组成,可将过氧化氢中和成水,在对抗氧化应激损伤中发挥着关键作用^[78-79]。SDG 可以防止端粒缩短和线粒体 DNA 复制的减少,并具有自由基清除能力,可减少 ROS 的产生,通过抑制氧化应激改善衰老小鼠模型的卵巢储备^[4]。

7 结语

氧化应激通过介导线粒体功能障碍、慢性炎症、细胞凋亡以及端粒缩短在卵巢衰老中发挥作用。关于线粒体功能障碍,活性氧过载会攻击 mtDNA 使得线粒体功能障碍,功能失调的线粒体中活性氧的产生进一步增加造成 ROS 恶性循环,这在

卵巢衰老中发挥关键作用^[22]。关于慢性炎症,氧化应激介导 NLRP3 通路和 NF- κ B 通路维持卵巢慢性低度炎症状态从而损害卵巢功能^[12]。关于细胞凋亡,氧化应激通过线粒体途径以及死亡受体诱导途径介导细胞凋亡。关于端粒缩短,氧化应激诱导端粒 TTAGGG 重复序列氧化损伤形成 8-oxoG,造成端粒缩短。值得注意的是,不同机制之间存在串扰通路,小鼠实验研究表明线粒体功能障碍下受损的 mtDNA 片段充当 DAMP 并被 NLRP3 的模式结合识别受体识别诱导炎症^[80]。内源性凋亡途径通过线粒体释放 Cyt C 介导,而炎症产生的 TNF 亦可启动外源性凋亡。此外有研究表明线粒体或端粒的应激会引起线粒体和细胞核的双重损伤,这意味着两者之间存在串扰^[81]。

氧化应激介导上述病理过程在卵巢衰老中发挥作用,这一系列病理过程会导致细胞功能障碍从而加重氧化应激,这一恶性循环进一步驱动卵巢衰老的发生^[6]。由于氧化应激机制在年龄相关性卵巢衰老中起关键作用,故抗氧化应激是延缓卵巢衰老的有效措施:第一,利用抗氧化剂可直接清除自由基以对抗氧化应激,使机体处于氧化还原平衡状态。第二,氧化应激介导线粒体功能障碍以及慢性炎症状态,促进细胞凋亡以及端粒缩短,抗氧化剂可间接通过维持线粒体稳态、对抗炎症反应、抑制细胞凋亡以及促进端粒的延长对抗氧化应激,抑制氧化应激恶性循环事件的发生从而延缓卵巢衰老。

对抗氧化应激是介导长寿动物模型的常见机制^[8],抗氧化剂 α -硫辛酸(α -lipoic acid, α -LA)可对抗大鼠胚胎成纤维细胞中的氧化应激,延缓细胞衰老^[1]。益生菌补充剂可以对抗与衰老相关的细胞氧化应激,延长实验小鼠的寿命^[7]。大量动物实验研究支持抗氧化应激策略对于延缓卵巢衰老具有较好效果,值得进一步研究开发。

参 考 文 献(References)

- [1] BAEERI M, BAHADAR H, RAHIMIFARD M, et al. α -lipoic acid prevents senescence, cell cycle arrest, and inflammatory cues in fibroblasts by inhibiting oxidative stress [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 214-223.
- [2] WU J, LIU Y, SONG Y, et al. Aging conundrum: a perspective for ovarian aging [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 952471.
- [3] DENG J, TANG Y, LI L, et al. MiR-143-3p promotes ovarian granulosa cell senescence and inhibits estradiol synthesis by targeting UBE2E3 and LHCGR [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (16): 12560.
- [4] HE X, WANG Y, WU M, et al. Secoisolariciresinol diglucoside

- improves ovarian reserve in aging mouse by inhibiting oxidative stress [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 806412.
- [5] ZHANG C, GUO Y, YANG Y, et al. Oxidative stress on vessels at the maternal-fetal interface for female reproductive system disorders: update [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1118121.
- [6] FORMAN H J, ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(9): 689–709.
- [7] SHARMA R, PADWAD Y. Probiotic bacteria as modulators of cellular senescence: emerging concepts and opportunities [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(3): 335–349.
- [8] VATNER S F, ZHANG J, OYDANICH M, et al. Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress [J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101194.
- [9] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR S Y, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging [J]. *Arch Toxicol*, 2023, 97(10): 2499–2574.
- [10] DARVIN M E, LADEMANN J, VON HAGEN J, et al. Carotenoids in human skin *in vivo*: antioxidant and photoprotectant role against external and internal stressors [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(8): 1451.
- [11] NEBBIOSO M, FRANZONE F, LAMBIASE A, et al. Oxidative stress implication in retinal diseases-a review [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1790.
- [12] HONG W, WANG B, ZHU Y, et al. Female germline stem cells: aging and anti-aging [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 79.
- [13] YAN F, ZHAO Q, LI Y, et al. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 100.
- [14] CAMAIONI A, UCCI M A, CAMPAGNOLO L, et al. The process of ovarian aging: it is not just about oocytes and granulosa cells [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2022, 39(4): 783–792.
- [15] NG M Y W, WAI T, SIMONSEN A. Quality control of the mitochondrion [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 881–905.
- [16] JIA Z Z, ZHANG J W, ZHOU D, et al. Deltamethrin exposure induces oxidative stress and affects meiotic maturation in mouse oocyte [J]. *Chemosphere*, 2019, 223: 704–713.
- [17] MIWA S, KASHYAP S, CHINI E, et al. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(13): e158447.
- [18] LI M, YU Y, XUE K, et al. Genistein mitigates senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via ERR α -mediated mitochondrial biogenesis and mitophagy in ovariectomized rats [J]. *Redox Biol*, 2023, 61: 102649.
- [19] MANEVSKI M, MUTHUMALAGE T, DEVADOSS D, et al. Cellular stress responses and dysfunctional Mitochondrial-cellular senescence, and therapeutics in chronic respiratory diseases [J]. *Redox Biol*, 2020, 33: 101443.
- [20] ZHOU J, LI X Y, LIU Y J, et al. Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation [J]. *Autophagy*, 2022, 18(6): 1240–1255.
- [21] LLIBEROS C, LIEW S H, MANSELL A, et al. The inflammasome contributes to depletion of the ovarian reserve during aging in mice [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 628473.
- [22] MAGALHAES-NOVAIS S, BLECHA J, NARAIN R, et al. Mitochondrial respiration supports autophagy to provide stress resistance during quiescence [J]. *Autophagy*, 2022, 18(10): 2409–2426.
- [23] ZHAO M, WANG Y, LI L, et al. Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance [J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1845–1863.
- [24] LIU Y, HUANG Y, XU C, et al. Mitochondrial dysfunction and therapeutic perspectives in cardiovascular diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 16053.
- [25] FRANCI L, TUBITA A, BERTOLINO F M, et al. MAPK15 protects from oxidative stress-dependent cellular senescence by inducing the mitophagic process [J]. *Ageing Cell*, 2022, 21(7): e13620.
- [26] WANG X, WANG L, XIANG W. Mechanisms of ovarian aging in women: a review [J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 67.
- [27] STRINGER J M, ALESI L R, WINSHIP A L, et al. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life [J]. *Hum Reprod Update*, 2023, 29(4): 434–456.
- [28] REITER R J, SHARMA R, ROMERO A, et al. Aging-related ovarian failure and infertility: melatonin to the rescue [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(3): 695.
- [29] MCGARRY T, BINIECKA M, VEALE D J, et al. Hypoxia, oxidative stress and inflammation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 125: 15–24.
- [30] YANG L, CHEN Y, LIU Y, et al. The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 617843.
- [31] PAGLIARO P, PENNA C. Inhibitors of NLRP3 inflammasome in ischemic heart disease: focus on functional and redox aspects [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(7): 1396.
- [32] 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.
- [33] ZHENG W V, XU W, LI Y, et al. Anti-aging effect of β -carotene through regulating the KAT7-P15 signaling axis, inflammation and oxidative stress process [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 86.
- [34] KE F S, HOLLOWAY S, UREN R T, et al. The BCL-2 family member BID plays a role during embryonic development in addition to its BH3-only protein function by acting in parallel to BAX, BAK and BOK [J]. *EMBO J*, 2022, 41(15): e110300.
- [35] KALONI D, DIEPSTRATEN S T, STRASSER A, et al. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy [J].

- Apoptosis, 2023, 28(1/2): 20–38.
- [36] SINGH G, GUIBAO C D, SEETHARAMAN J, et al. Structural basis of BAK activation in mitochondrial apoptosis initiation [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 250.
- [37] ROBIN A Y, MILLER M S, IYER S, et al. Structure of the BAK-activating antibody 7D10 bound to BAK reveals an unexpected role for the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop in BAK activation [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(9): 1757–1768.
- [38] WANG L, WANG C, TAO Z, et al. Curcumin derivative WZ35 inhibits tumor cell growth via ROS-YAP-JNK signaling pathway in breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 460.
- [39] LAUTERWASSER J, FIMM-TODT F, OELGEKLAUS A, et al. Hexokinases inhibit death receptor-dependent apoptosis on the mitochondria [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(33): e2021175118.
- [40] GIACOMELLO M, PYAKUREL A, GLYTOSU C, et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 204–224.
- [41] KING L E, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ R, PEDLEY R, et al. Apoptotic priming is defined by the dynamic exchange of Bcl-2 proteins between mitochondria and cytosol [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(11): 2262–2274.
- [42] SHELLING A N, AHMED NASEF N. The role of lifestyle and dietary factors in the development of premature ovarian insufficiency [J]. Antioxidants, 2023, 12(8): 1601.
- [43] LOW H B, WONG Z L, WU B, et al. DUSP16 promotes cancer chemoresistance through regulation of mitochondria-mediated cell death [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2284.
- [44] GARNER T P, AMGALAN D, REYNA D E, et al. Small-molecule allosteric inhibitors of BAX [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(4): 322–330.
- [45] MILLAN A L, TROBO S I, DIOS A D, et al. MODY patients exhibit shorter telomere length than non-diabetic subjects [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2021, 37(2): e3374.
- [46] BARNES R P, ROSA M D, THOSAR S A, et al. Telomeric 8-oxo-guanine drives rapid premature senescence in the absence of telomere shortening [J]. Nat Struct Mol Biol, 2022, 29(7): 639–652.
- [47] TIRE B, OZTURK S. Potential effects of assisted reproductive technology on telomere length and telomerase activity in human oocytes and early embryos [J]. J Ovarian Res, 2023, 16(1): 130.
- [48] MALDONADO E, MORALES-PISON S, URBINA F, et al. Aging hallmarks and the role of oxidative stress [J]. Antioxidants, 2023, 12(3): 651.
- [49] DING Y, GUI X, CHU X, et al. MTH1 protects platelet mitochondria from oxidative damage and regulates platelet function and thrombosis [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4829.
- [50] JUN Y W, ALBARRAN E, WILSON D L, et al. Fluorescence imaging of mitochondrial DNA base excision repair reveals dynamics of oxidative stress responses [J]. Angew Chem Int Ed, 2022, 61(6): e202111829.
- [51] NELSON S R, KATHE S D, HILZINGER T S, et al. Single molecule glycosylase studies with engineered 8-oxoguanine DNA damage sites show functional defects of a MUTYH polyposis variant [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(6): 3058–3071.
- [52] TCHEKALAROVA J, TZONEVA R. Oxidative stress and aging as risk factors for Alzheimer's disease and Parkinson's disease: the role of the antioxidant melatonin [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 3022.
- [53] CARRETERO V J, RAMOS E, SEGURA-CHAMA P, et al. Non-excitatory amino acids, melatonin, and free radicals: examining the role in stroke and aging [J]. Antioxidants, 2023, 12(10): 1844.
- [54] BOCHEVA G, SLOMINSKI R M, JANJETOVIC Z, et al. Protective role of melatonin and its metabolites in skin aging [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1238.
- [55] LEE J M, LEE J H, SONG M K, et al. NXP032 ameliorates aging-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice through activation of Nrf2 signaling [J]. Antioxidants, 2022, 11(1): 130.
- [56] SOSA-DÍAZ E, HERNÁNDEZ-CRUZ E Y, PEDRAZA-CHAVERRI J. The role of vitamin D on redox regulation and cellular senescence [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 193(1): 253–273.
- [57] LI J, ZHANG J, XUE Q, et al. Pyrroloquinoline quinone alleviates natural aging-related osteoporosis via a novel MCM3-Keap1-Nrf2 axis-mediated stress response and Fbn1 upregulation [J]. Aging Cell, 2023, 22(9): e13912.
- [58] DAI X, YI X, WANG Y, et al. PQQ dietary supplementation prevents alkylating agent-induced ovarian dysfunction in mice [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 781404.
- [59] SHAHCHERAGHI S H, SALEMI F, SMALL S, et al. Resveratrol regulates inflammation and improves oxidative stress via Nrf2 signaling pathway: Therapeutic and biotechnological prospects [J]. Phytother Res, 2023, 37(4): 1590–1605.
- [60] GHERARDI G, CORBIOLI G, RUZZA F, et al. CoQ₁₀ and resveratrol effects to ameliorate aged-related mitochondrial dysfunctions [J]. Nutrients, 2022, 14(20): 4326.
- [61] ZEMHERI-NAVRUZ F, INCE S, ARSLAN-ACAROZ D, et al. Resveratrol alleviates pyraclostrobin-induced lipid peroxidation, oxidative stress, and DNA damage in rats [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2023, 30(3): 6414–6423.
- [62] SONG G, WANG J, LIU J, et al. Dimethyl fumarate ameliorates erectile dysfunction in bilateral cavernous nerve injury rats by inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis of nerve via activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Redox Biol, 2023, 68: 102938.
- [63] ABU-HALAKA D, SHPAIZER A, ZEIGERMAN H, et al. DMF-activated Nrf2 ameliorates palmitic acid toxicity while potentiates ferroptosis mediated cell death: protective role of the NO-donor S-nitroso-N-acetylcysteine [J]. Antioxidants, 2023,

12(2): 512.

[64] HU X, LI C, WANG Q, et al. Dimethyl fumarate ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the Nrf2 pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 872057.

[65] XU J, DU P, LIU X, et al. Curcumin supplementation increases longevity and antioxidant capacity in *Caenorhabditis elegans* [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1195490.

[66] CHEN Y, WANG J, JING Z, et al. Anti-fatigue and anti-oxidant effects of curcumin supplementation in exhaustive swimming mice via Nrf2/Keap1 signal pathway [J]. Curr Res Food Sci, 2022, 5: 1148–1157.

[67] CUI Z, ZHAO X, AMEVOR F K, et al. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism [J]. Front Immunol, 2022, 13: 943321.

[68] CRUPI P, FAIENZA M F, NAEEM M Y, et al. Overview of the potential beneficial effects of carotenoids on consumer health and well-being [J]. Antioxidants, 2023, 12(5): 1069.

[69] MANTLE D, HARGREAVES I P. Coenzyme Q10 and endocrine disorders; an overview [J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 514.

[70] ARSLANBAEVA L, TOSI G, RAVAZZOLO M, et al. UBIAD1 and CoQ10 protect melanoma cells from lipid peroxidation-mediated cell death [J]. Redox Biol, 2022, 51: 102272.

[71] SHI Y Q, ZHU X T, ZHANG S N, et al. Premature ovarian insufficiency: a review on the role of oxidative stress and the application of antioxidants [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1172481.

[72] NIE X, DONG X, HU Y, et al. Coenzyme Q10 stimulate reproductive vatality [J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 2623–2637.

[73] ZHU J, YANG Q, LI H, et al. Sirt3 deficiency accelerates ovarian senescence without affecting spermatogenesis in aging mice [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 193(2): 511–525.

[74] WU Q J, ZHANG T N, CHEN H H, et al. The sirtuin family in health and disease [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 402.

[75] LI H R, LIU Q, ZHU C L, et al. β -nicotinamide mononucleotide activates NAD⁺/SIRT1 pathway and attenuates inflammatory and oxidative responses in the hippocampus regions of septic mice [J]. Redox Biol, 2023, 63: 102745.

[76] CHU X, RAJU R P. Regulation of NAD⁺ metabolism in aging and disease [J]. Metabolism, 2022, 126: 154923.

[77] JIANG Y, WANG D, ZHANG C, et al. Nicotinamide mononucleotide restores oxidative stress-related apoptosis of oocyte exposed to benzyl butyl phthalate in mice [J]. Cell Prolif, 2023, 56(8): e13419.

[78] KUMAR P, OSAHON O W, SEKHAR R V. GlyNAC (Glycine and N-acetylcysteine) supplementation in mice increases length of life by correcting glutathione deficiency, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, abnormalities in mitophagy and nutrient sensing, and genomic damage [J]. Nutrients, 2022, 14(5): 1114.

[79] VERDÚ D, VALLS A, DÍAZ A, et al. Pomegranate extract administration reverses loss of motor coordination and prevents oxidative stress in cerebellum of aging mice [J]. Antioxidants, 2023, 12(11): 1991.

[80] BILLINGHAM L K, STOOLMAN J S, VASAN K, et al. Mitochondrial electron transport chain is necessary for NLRP3 inflammasome activation [J]. Nat Immunol, 2022, 23(5): 692–704.

[81] WANG L, LU Z, ZHAO J, et al. Selective oxidative stress induces dual damage to telomeres and mitochondria in human T cells [J]. Aging Cell, 2021, 20(12): e13513.

[收稿日期] 2024-02-27

马春霞,陈振东,田旭东. 非酒精性脂肪性肝病动物模型制备及病证结合研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1616-1625.

MA C X, CHEN Z D, TIAN X D. Research progress on the preparation of animal models of non-alcoholic fatty liver disease and combination of disease and syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1616-1625.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.013

非酒精性脂肪性肝病动物模型制备及病证结合研究进展

马春霞¹, 陈振东^{1*}, 田旭东^{2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

【摘要】 非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指多种致病因素引起的, 以脂肪在肝细胞内过度沉积为主要病变特征的代谢综合征。目前, NAFLD 的发病机制尚未完全清楚, 临床上缺乏针对 NAFLD 的特效药物。因此, 建立理想动物模型在 NAFLD 发病机制的明确、特效药物研制及治疗方面显得极为重要。近五年来, 除 NAFLD 动物模型被热议外, 随着中医药事业的不断更新、发展, 与 NAFLD 相关的病证结合模型也相继增多, 现将近五年来常用的 NAFLD 动物模型及其制备和评价方法作一总结, 以期为同道在今后 NAFLD 动物模型制备及病证结合研究方面提供参考。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病; 动物模型; 病证结合模型; 模型评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1616-10

Research progress on the preparation of animal models of non-alcoholic fatty liver disease and combination of disease and syndrome

MA Chunxia¹, CHEN Zhendong^{1*}, TIAN Xudong^{2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: CHEN Zhendong. E-mail: clzdy66@163.com; TIAN Xudong. E-mail: xytxd@163.com

【Abstract】 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a metabolic syndrome caused by a variety of pathogenic factors and characterized by the excessive deposition of fat in liver cells. At present, the pathogenesis of NAFLD is not fully understood, and there is a lack of specific drugs for NAFLD in clinical practice. Therefore, the establishment of an ideal animal model is extremely important for clarifying the pathogenesis of NAFLD and developing specific drugs and treatments. In addition to NAFLD animal models, an increasing number of disease-syndrome combined models related to NAFLD has

【基金项目】 甘肃省科技计划资助-青年科技基金项目 (23JRRA1728), 甘肃省教育厅高校教师创新基金项目 (2023A-093), 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目 (2022KCYB-10), 甘肃省名中医传承工作室 (国中医药规财函 [2021] 242 号), 甘肃中医药大学 2024 年大学生创新创业训练计划项目 (S202410735030)。

Funded by Science and Technology Program of Gansu Province-Youth Science and Technology Fund Project (23JRRA1728), Gansu Provincial Department of Education Innovation Fund for University Teachers (2023A-093), Scientific Research and Innovation Fund of Gansu University of Traditional Chinese Medicine (2022KCYB-10), Gansu Province Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio (Circular on Planning and Finance of Traditional Chinese Medicine Administration [2021] No. 242), Gansu University of Traditional Chinese Medicine College Students' Innovative Entrepreneurial Training Program in 2024 (S202410735030).

【作者简介】 马春霞, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治消化系统疾病。Email: 2824160184@qq.com

【通信作者】 陈振东, 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 中西医结合防治慢性代谢性疾病。Email: clzdy66@163.com;

田旭东, 男, 学士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中西医结合防治消化系统疾病。Email: xytxd@163.com。

* 共同通信作者

emerged with the continuous renewal and development of traditional Chinese medicine over the past five years. This article summarizes the NAFLD animal models commonly used within the past five years, as well as their preparation and evaluation method, to provide a reference for future studies in NAFLD animal model preparation and modeling a combination of disease and syndrome.

[Keywords] non-alcoholic fatty liver disease; animal model; disease-syndrome combination model; evaluation of model

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

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外由酒精和其他对肝有明确损害致病因素所引起的, 以脂肪在肝细胞内过度沉积为主要病变特征的代谢综合征^[1]。其涵盖从脂肪肝变性 (nonalcoholic fatty liver, NAFL) 到非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、不同程度的肝纤维化、肝硬变和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的广泛病理范围^[2]。NAFLD 发病率呈逐年上升趋势, 据统计, 罹患 NAFLD 的人数约占全球总人口的四分之一, 而中国的患病率已超过 29%, 并且呈发展状态^[3-4]。NAFLD 发病机制尚未完全清楚, 目前, 研究认为胰岛素抵抗是 NAFLD 主要的病理生理机制^[5], 同时研究也指出遗传易感性、宿主代谢紊乱和环境因素相互作用的结果也会导致 NAFLD 的形成^[6]。此外, 近年来, 有证据表明肠道微生物参与 NAFLD 的发病机制的调节, 其发病机制随着肠道微生物群的组成而变化并且肠道微生物群及其代谢产物在促进免疫抑制环境的形成方面也发挥作用^[7]。故 NAFLD 被认为是一种复杂的代谢性疾病, 影响其临床表现和疾病进展因素有很多, 包括种族、遗传易感性、饮食习惯、代谢、免疫、肠道菌群和其他因素^[6]。因为是代谢综合征, 所以既往研究发现 47.3% ~ 63.7% 的 2 型糖尿病患者和高达 80% 的肥胖者中可以见到 NAFLD^[8-9]。现阶段尚无针对 NAFLD 的特效药物, 主要从保肝、抗氧化等方面切入治疗, 可以预见未来 NAFLD 将成为医学界的一个重大挑战^[8-10]。研究发现动物模型有助于探索新的治疗方法, 并且理想的动物模型可以能够非常逼真地再现人类疾病的复杂病理机制^[11], 因此制备有效动物模型在 NAFLD 发病机制的明确、特效药物研制及治疗方面显得极为重要。目前研究人员利用 NAFLD 动物模型及病证结合模型开展了很多关于 NAFLD 的发病机制、靶向药物的研究, 且取得了一定的成果。本文从动物与模型选择、模型制备方法、模型评价方法等方面对 NAFLD 动物模型制备及

病证结合研究进行综述。

1 动物选择

NAFLD 动物模型制备常用动物以啮齿动物中的大鼠和小鼠为主, 其中以 SD 大鼠、Wistar 大鼠和 C57BL/6 小鼠使用最为广泛。此外, 近年来沙鼠、金黄地鼠也常用于构建 NAFLD 模型。

SD 大鼠生长发育周期较长, 但生长发育速度快, 繁殖能力强且性周期稳定, 此外其适应性和抗病能力强, 喂养过程中不易因外界环境和疾病而影响实验结果。Wistar 大鼠性周期稳定、具有生长发育快、自发性肿瘤发生率低、对传染性疾病的抵抗力较强等特点, 并且其解剖和生理与人类相似, 因此可以更好的反映人类疾病。C57BL/6 小鼠易于繁殖、干预方便, 但研究发现在使用其不同亚系进行 NAFLD 研究时, 所表现出的疾病病理严重程度是不同的, KAWASHITA 等^[12]对 C57BL/6J (BL6J)、C57BL/6N (BL6N) 两种小鼠亚系进行了比较分析, 他们发现在四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的 NASH 模型中, BL6J 小鼠在肝中表现出比 BL6N 小鼠更严重的氧化应激和纤维化, 而在高脂饮食 (high fat diet, HFD) 诱导的 NASH 模型中, 相比 BL6N 小鼠, BL6J 小鼠的肝甘油三酯 (triglyceride, TG) 积累更多, 但体重增加和肝损伤更少, 因此在使用 C57BL/6 小鼠进行 NAFLD 研究时, 应考虑到不同小鼠亚系对疾病的影响。沙鼠是一种对脂肪敏感的动物, 易受膳食胆固醇 (cholesterol, TC) 的影响, 形成高胆固醇血症和非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL), 有研究显示雄性沙鼠在喂食 HFD 2 周后, 其血清中的总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平迅速显著升高^[13]。但也有研究表明即使没有膳食 TC, 其对膳食脂肪酸的血浆脂质反应也比人类更敏感, 除此之外沙鼠有自发发展为糖尿病的倾向, 且既往研究表明 NASH 与代谢综合征有关^[14], 因此沙鼠常用于研

究 NASH 和肝硬化。金黄地鼠表达胆固醇酯转移蛋白,该动物可以更好地复制人类脂蛋白代谢,并且有研究表明该动物对评估药物对脂蛋白代谢的影响更具预测性,因此,与大鼠和小鼠相比,其对促进 NASH 的饮食反应更好,能表现出明显的炎症,肝细胞膨胀和纤维化^[15]。鉴于以上动物特性,故在 NAFLD 模型动物选择时常以上述 4 种啮齿动物为主。

2 模型制备方法

常见的动物模型制备方法有饮食诱导、药物诱导、基因敲除和基因诱导突变等,其中饮食诱导模型制备方法简单,原料容易获取,但其造模周期长且形成的 NAFLD 病理变化有限。药物诱导模型造模周期短,模型小鼠往往表现出较重的病理变化,并且大多数药物能够加速疾病向肝硬化和肝癌的进展。基因敲除或基因诱导突变模型造模周期短,能够在较短时间内成模,与饮食诱导模型饮食结合后能更好的反映 NAFLD 疾病表现及发病过程。

2.1 NAFL 模型

2.1.1 饮食诱导模型

(1) HFD 模型: HFD 是诱导 NAFLD 动物模型的常用饮食,一般由脂肪(60% kcal)组成,主要特点是容易导致模型动物肥胖。肥胖易导致脂肪细胞功能障碍,释放大量促炎因子和瘦素,使游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)转移到肝中,FFA 从脂肪组织到肝的外排增加可能会诱导胰岛素信号传导途径的缺陷并导致胰岛素抵抗,进而促进肝损伤及其炎症反应^[16]。MENG 等^[17]用(60% kcal 脂肪 + 等量水)喂养 6 周龄雄性 C57 BL/6J 小鼠,12 周后小鼠体重增加, TG 和 TC 水平增高,且在小鼠肝中观察到脂质蓄积和脂肪变性显著增加,特征为气球样变、空泡化和肝细胞肥大。该类模型的优点是造模原料简单,容易获取,制备方法简单可行,可以较好的模拟人类 NAFLD 的发病机制且能表现出与 NAFLD 肝损伤相一致的病理特征,但其缺点是造模周期长且表现出的 NAFLD 症状较轻。

(2) 高脂、高果糖、高胆固醇饮食(high fat, high fructose, high cholesterol diet, HFFCD)模型: HFFCD 与其他饮食不同在于其含有 TC,通常由高脂高果糖(high fat and high fructose, HFHF)饮食及 TC 构建,其中添加 TC 的量随实验目的不同而变化。近年来,研究发现游离胆固醇(free cholesterol, FC)具有

高度肝毒性,0.5%的 TC 含量似乎足以在合理的时间范围内促进脂肪性肝炎和纤维化的发展,0.2%和 1.0%的 TC 促进自发性肝肿瘤的发展^[18]。ZHAO 等^[19]给金黄地鼠喂食 HFFCD 或对照饮食 6 周。结果表明,模型组动物体重、腹脂、肝指数显著增加, TC、TG、LDL-C 水平显著升高,高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平显著降低。肝组织中的脂质沉积形成大小不一的脂肪空泡。肝代谢组学分析显示,模型大鼠鞘脂、甘油磷脂和精氨酸生物合成的代谢途径紊乱。该模型制备方法简单、耗时短、统一性好,可以模拟常见饮食因素引起的早期脂肪肝,为 NAFLD 的初步发病机制和治疗药物的研究提供了理想的模型。

2.1.2 基因突变模型

db/db 小鼠模型:瘦素(leptin, Lep)是由脂肪组织分泌的一种激素,其在血清中的含量与动物脂肪组织大小成正比^[20],Lep 通过增加饱腹感以减少对食物的脂质摄入来发挥其调节能量平衡的作用。既往研究表明尽管 Lep 水平正常,但瘦素受体(leptin receptor, LEPR)功能损伤后,仍会导致 Lep 信号传导受损,使其同样不能发挥作用。db/db 小鼠由于受体基因中携带点突变,因而可以导致 LEPR 功能受损。ZHANG 等^[21]给小鼠喂食普通饲料,12 周后, db/db 小鼠肝血清天冬氨酸转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)或碱性磷酸酶水平显著升高,并且表现出严重的肝脂肪变性,显示 NAFLD 模型建立成功。该模型可以自发的出现肝损伤的表现,并且能够较好的展现人类 NAFLD 的发病过程,但缺点在于这些小鼠在喂食普通食物时不会发生纤维化,故不能很好的用于研究 NASH。

2.2 NASH 模型

2.2.1 饮食诱导模型

(1) 胆碱缺乏型 L-氨基饮食(choline deficient amino acid defined diet, CDAA)模型: CDAA 是构建 NASH 小鼠模型的常用饮食,一般由蛋白质(11%)和脂肪(31%)构建,不含有 TC 和胆碱。胆碱和蛋氨酸均为必须营养素,二者缺乏可导致极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)颗粒产生受损,造成肝损伤。胆碱缺乏后肝 VLDL 的分泌功能受损,造成肝细胞坏死、肝内脂肪堆积;此外也可导致肝氧化应激以及细胞、脂肪因子发生变化,造成肝发生炎症和纤维化,进而加速肝损伤。蛋氨酸缺

乏后通过转硫途径减少谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的生物合成,其后引起氧化应激进而导致脂肪肝病进展^[22]。TØLBØL 等^[23]给雄性 Wistar 大鼠喂食不含 TC 的 CDAA (蛋白质 11%,脂肪 31%,碳水化合物 58%),结果显示 CDAA 喂养 4 周后,大鼠已经出现显著的肝肿大和纤维化。该模型优点在于可以在较短时间内出现严重的肝纤维化,能够很好的反映了人类 NASH 表型和疾病进展^[24],并且表型可以在较短时间内稳定诱导,因此该模型可以作为表征 NASH 新治疗的有价值的工具。

(2) 蛋氨酸和胆碱缺乏饮食 (methionine choline deficient, MCD) 模型: MCD 常由高糖以及适量脂肪组成,除与 CDAA 饮食一样缺乏胆碱外,还缺乏蛋氨酸。胆碱和蛋氨酸均为必须营养素,二者缺乏可导致 VLDL 颗粒产生受损,造成肝损伤。蛋氨酸缺乏后通过转硫途径减少 GSH 的生物合成,然后引起氧化应激并促进脂肪肝病进展^[22]。LI 等^[25]用 MCD 饮食喂养雄性 C57BL/6 小鼠 4 周,小鼠表现典型的 NASH 特征,如肝脂肪变性和炎症细胞浸润,并且小鼠肝中 TG 含量增加。有研究表明肠道微生物群在 NASH 的发生发展中起着关键作用,调节微生物组是可作为治疗 NASH 的一种有前途的策略^[11]。该实验证实了 MCD 饮食喂养可诱导肠道菌群失调,即小鼠的厚壁菌门和拟杆菌门的比例显著增加,故 MCD 模型已被用于研究肠道微生物群和免疫反应在 NAFLD 中的作用。

(3) 动脉粥样硬化模型饮食 (Atherogenic diet, ATH) 模型: ATH 通常由高 TC 和高胆酸盐构成。TC 及胆酸盐饮食可导致氧化应激和脂质过氧化,进而造成肝损伤,既往常用于制备 ATH 模型。OMAGARI 等^[26]将 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为 N 组 (正常饮食, 69.5% MF) 与 H 组 (HFC 饮食, 28.75% 棕榈油、1.25% TC 和 0.5% 胆酸钠) 两组进行喂养,9 周后结果显示,肝重量/体重比、AST、ALT 水平,以及肝 TG 和 TC 浓度 H 组显著高于 N 组,此外 H 组的肝脂肪变性、小叶炎症、肝细胞气球样变和纤维化明显高于 N 组。该模型的优点在于可以表现出与人类 NAFLD 相一致的病理结果,产生 NAFLD 特征性的病变,如肝细胞气球样与纤维化,缺点是体重减轻,代谢模式与 NAFLD 不一致。

(4) 高脂肪、高糖饮食 (high fat, high carbohydrate diet, HFFD) 模型: HFFD 原料简单,在 NAFLD 小鼠模型制备中常用,由 60% kcal 脂肪和

30% v/v (体积比) 高果糖玉米糖浆组成。肝是果糖代谢的主要场所,近 60% 的果糖在肝被氧化,同时果糖会对肝造成有害损伤^[11]。有研究发现果糖和葡萄糖的混合物可能比单独的果糖更有效地促进肝脂肪变性。高果糖玉米糖浆为游离葡萄糖和果糖的独特组合,其在脂肪生成和增加肝脂肪变性方面要比单糖作为蔗糖结合在一起时更有效^[18]。WAYAL 等^[27]用含 60% kcal 脂肪的高脂肪和 30% v/v (体积比) 的高果糖玉米糖浆的饮食喂养 C57BL/6 小鼠,8 周后小鼠身体、肝和脾重量的显著增加,血清 ALT、TG、TC、FFA 和 VLDL 水平显著增加,长期喂养出现内脏肥胖、肝损伤、空腹高血糖、高胰岛素血症和高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG)。另外有研究指出感染会增加 HFFD 喂养的仓鼠中 NAFLD 的严重程度^[28]。该模型的优点是造模周期较 HFD 模型短,NAFLD 相关指标显著增加,炎症表现明显,并且既往研究表明 HFFD 模型能很好地概括 NAFLD 的人类表型^[29]。

2.2.2 基因敲除模型

(1) 载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 基因敲除模型: APOE 是一种双亲性血浆蛋白,其主要作用是通过与膜受体结合介导循环脂蛋白和组织之间的脂质转移^[30]。ApoE 敲除后的小鼠,血浆中 TC 和脂蛋白调节出现异常,使其抗炎和抗氧化能力低下。于温温等^[31]用高脂饲料 (10.0% 猪油、20.0 蔗糖、10.0% 蛋黄粉、0.5% 胆酸钠) 喂养 ApoE 基因敲除 (APOE^{-/-}) 小鼠,7 周后,结果显示 HFD 诱导的 APOE^{-/-}小鼠体重及体重增长率显著增高,血清中 TG、TC 水平极显著分别升高,并且组织形态学显示小鼠肝可见大小不均的脂质液泡弥散分布,证明存在显著的肝脂肪变性,表明 NAFLD 模型成功建立。载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, ApoA5) 主要由肝合成和分泌,是脂蛋白脂肪酶活性和富含甘油三酯脂蛋白的关键调节剂。研究发现用常规饮食喂食缺乏 ApoA5 的金黄地鼠后,地鼠出现 HTG, TG 水平显著升高,肝脂肪变性, HFD 喂食后, ApoA5 地鼠易患重度 HTG 和 NASH^[32]。该模型不足在于动物不会自发的出现 NAFLD 相关表现,但在喂食 HFD 的情况下能促进肝脂肪变性,炎症的发展。

(2) miR-223 基因敲除模型: 脂毒性肝细胞周围的中性粒细胞浸润是 NASH 的标志,其在促进肝细胞损伤中起着重要的作用。微小核糖核酸

(microRNA, miRNA) 作为表观遗传因子调节着中性粒细胞活化和功能, 其中抗炎 *microRNA-223* (*miR-223*) 在中性粒细胞中以最高水平表达, 在减弱中性粒细胞成熟和活化中起关键作用。HE 等^[33] 给雄性 *miR-223*^(-/y) (雄性 *miR-223* KO) 小鼠喂食 HFD (60 kcal% 脂肪), 发现与野生型 *miR-223*^(+/y) 小鼠相比, 雄性 *miR-223* KO 小鼠出现更严重的 NASH 伴纤维化特征, 并且 *miR-223* KO 小鼠对肝癌具有更大的易感性, 长期 HFD 喂养后表现出更强的肝纤维化和炎症反应。既往研究显示, *miR-223* 的基因缺失促进了小鼠中 HFD 或 MCD 诱导的 NASH 以及长期 HFD 诱导的肝癌的进展^[30]。

2.3 NASH 肝硬化模型

2.3.1 饮食诱导模型

高脂肪、高胆固醇饮食 (high fat, high cholesterol diet, HFHCD) 模型: LI 等^[14] 给沙鼠喂食 HFHCD 24 周, 结果显示与对照组相比 9 周后沙鼠的 ALT、AST、TG、TC、空腹血糖和体重升高, 12 周后 Kupffer 细胞增加显著, 在形态学观察中发现沙鼠肝肿胀变硬变淡黄色, 肝缘变钝状, 肝表面出现形状不规则的结节, 且肝组织学显示肝细胞中有许多脂肪滴和液泡的形成。Kupffer 细胞和肝星状细胞通常被认为是纤维化和肝硬化形成中的关键细胞, 由此沙鼠 NAFLD 肝硬化模型建立成功。由于沙鼠的本身对脂肪敏感的特性加之饮食作用使该模型具有稳定的纤维化阶段, 故可用于研究进展期 NAFLD, 特别是肝硬化阶段, 以更好地了解疾病的病理生理过程。

2.3.2 药物诱导模型

(1) CCl_4 + HFHCD 模型: CCl_4 是一种肝毒性化学物质, 研究发现其可导致实验动物肝损伤、肝纤维化和肝硬化^[11], 进入动物体内 CCl_4 可直接进入肝细胞, 溶解线粒体膜脂质, 影响线粒体的结构和功能, 减少酶蛋白的合成, 引起酶的破坏和释放, 从而影响代谢和能量的产生, 最终使肝细胞变性坏死^[34]。西方饮食 (western diet, WD) 是一种包含高脂、高糖和 TC 的饮食模式, 此种饮食模式与肠道微生物相互作用产生的代谢产物, 通常会加速 NAFLD 的发展。TSUCHIDA 等^[35] 给雄性 C57BL/6J 小鼠喂食 WD (21.1% 脂肪、41% 蔗糖和 1.25% TC) + 腹腔内注射 CCl_4 (0.2 $\mu\text{L/g}$ 体重的剂量), 持续 12 周和 24 周。结果显示喂养 12 周和 24 周后小鼠的肝重量增加, 血清 ALT 和 AST 升高, 12 周时发生 3 期纤维化, 24 周时发生 HCC。此类模型优势在于其易用

性和可重复性高、制备时间短, 能够很好的概括了人类脂肪肝疾病的进展阶段, 即从简单的脂肪变性到炎症、纤维化和癌症, 并且此类模型中基因表达和免疫异常的功能途径与人类疾病非常相似, 但是该模型小鼠显示出胰岛素抵抗减弱, 使其在相关胰岛素抵抗机制研究中使用受限。

(2) FFC + 链脲霉素 (streptozotocin, STZ) 模型: STZ 可以对胰岛 β 细胞产生毒性作用, 导致胰岛损伤和发生炎症反应, 最终使胰岛素分泌障碍, 发生糖尿病。FFC 和 WD 相似, 是一种富含高脂、高糖与高 TC 饮食模式。研究发现, STZ 可加速 FFC 诱导的肝功能障碍和代谢紊乱, ZHENG 等^[36] 用 FFC (高脂、高果糖和高 TC 饮食) 喂养的 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 + 腹腔内注射 150 mg/kg STZ, 12 周后小鼠的体重急剧下降, 血清 ALT、AST、TC 显著增加, 组织学结果显示小鼠各肝小叶出现大量脂质沉积, 并伴有气球样变性和肝细胞肿胀坏死。20 周时脂肪性肝炎和轻度纤维化伴偶尔 HCC。该模型优势在于造模周期短, 肝病理组织学表现明显且可出现 HCC, 不足在于 NAFLD 相关表现较重。

(3) DIAMOND 模型: DIAMOND 小鼠具有 C57BL6/J 和 S129S1/svImJ 小鼠的稳定等基因品系, 其中近 60% 的基因来自 C57BL6/J 背景, 其不含任何已知的基因突变^[37]。ASGHARPOUR 等^[37] 给该模型小鼠喂食具有生理学相关 TC 的 HFD, 结果显示小鼠发展为进行性 NAFLD, 导致 NASH 伴晚期纤维化和 HCC, 肝组织学检查显示 4 周后出现大泡性脂肪变性, 8 ~ 16 周后进展为脂肪性肝炎伴炎症、肝细胞气球样变和 Mallory-Denk 小体形成。DIAMOND 小鼠模型优点是可以发生与人类 NASH 一致肥胖、胰岛素抵抗、血脂异常和转氨酶升高。

2.4 中医病证结合模型制备方法

近年来随着中医药事业的发展, 中医病证结合模型逐渐兴起, 该模型将西医学的“病”和中医学的“证”很好的结合在一起, 对深入研究中医学证的本质和加深西医对特定疾病的认识具有重要的临床价值。此外, 有学者也指出建立病证结合的动物模型相较于单纯的疾病模型或单纯的证候模型而言更有说服力, 更符合中医辨病辨证结合的诊疗特色, 促进中药新药开发与药效机制的研究^[38]。目前 NAFLD 病症结合模型研究较少, 主要以肝郁脾虚证、痰湿证、脾虚瘀滞证、气滞血瘀证模型等为主。

2.4.1 肝郁脾虚证模型

NAFLD 肝郁脾虚证患者多表现为右肋肋部胀满或走窜作痛,每因烦恼抑郁而诱发,腹胀、便溏、腹痛欲泻、乏力、胸闷、善太息等症状。李若瑜等^[39]用高脂高糖饲料 + 饥饱失常法 + 慢性束缚应激刺激 + 夹尾法建立 NAFLD 肝郁脾虚证模型,结果显示大鼠出现明显厌食、体重减轻、行动迟缓、弓背静卧、体毛散乱无光泽、粪便溏软,肝细胞胞质内有大小不等的脂肪空泡、肝小叶、门管区炎细胞浸润;肝郁脾虚证指标检测结果:血糖、血脂升高、去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和 D-木糖排泄率显著降低。该模型中饥饱失常法易致大鼠脾胃功能失司、进而发展为脾胃虚弱;慢性束缚应激 + 夹尾法刺激可激怒大鼠,使其相互厮打而烦躁恼怒,最终导致大鼠气机不畅、肝气郁滞,出现厌食、体重减轻、粪便溏软等表现,上述一系列表现表明 NAFLD 肝郁脾虚证模型建立成功。

2.4.2 痰湿证模型

NAFLD 痰湿证患者兼有痰和湿两种病理产物,故多表现为右肋肋部胀痛、胸脘痞满、疲乏、恶心、纳呆、周身困重、大便黏腻、舌质红、苔黄腻等症状。古人有言“肥人多痰多湿”,故痰湿证多见于肥胖患者。张浩然等^[40]用高脂饲料(基础饲料 + 2% TC、10% 猪油)喂养大鼠,8 周后,大鼠的体质量、肝重、血清 TC、TG、ALT、AST 较正常组明显偏高,大鼠嗜睡、毛松散暗淡无光、活动量减少、大便黏腻臭秽。该模型中大鼠体重增加,肥胖、大鼠嗜睡、活动量减少、大便黏腻臭秽等表现符合湿阻气机、湿性黏滞的特征,故 NAFLD 痰湿证模型成功建立。

2.4.3 脾虚瘀滞证模型

NAFLD 作为慢性病,根据“久病多虚,久病多瘀”理论,该病患者常出现虚和淤诸证,其中以脾虚瘀滞证最为常见,该证患者表现为右肋肋部痞块、食欲减退、腹胀、乏力、大便稀淌、面色暗沉,舌淡暗等。刘梦瑶等^[41]用 HFFD 喂养 + 腹腔注射 30 mg/kg STZ 制备 NAFLD 脾虚瘀滞证模型,结果显示大鼠体重先增加后减轻、多饮、多食、排泄次数增加且质溏、皮毛黄暗沉坠缺少光泽、精神状态不佳、少动易惊、爪甲暗淡温低、且大鼠血清 ALT、AST、TC、TG、LDL-C 水平升高,肝细胞胞浆中存在炎性浸润。脾胃为后天之本、气血生化之源,脾虚运化失常,饮食消化吸收障碍,故大鼠出现体重先增加后减轻、

排泄次数增加且质溏等表现;脾虚无力行血,血液淤滞,导致大鼠皮毛黄暗沉坠缺少光、爪甲暗淡温低。上述特征符合脾虚瘀滞证表现,因此 NAFLD 脾虚瘀滞证模型构建成功。

2.4.4 气滞血瘀证模型

NAFLD 为本虚标实之证,随着疾病的发展,多累及气血,临床多表现为烦躁易怒、胸胁胀闷、走窜疼痛,甚或刺痛、痛处固定,大便溏结不调、面色晦暗、舌质紫暗或有瘀斑、脉涩等。石贺^[42]以高脂饲料配合绑腿刺激及试剂干预法制备 NAFLD 气滞血瘀型模型,8 周后大鼠出现毛色暗淡、皮毛光泽度降低、情绪暴躁易怒、粪便时干时稀、肝指数升高、弥漫性肝细胞脂肪浸润、不同程度的大泡性、小泡性脂肪变性及两者混合变性,偶见炎性细胞浸润及坏死灶。大鼠出现气滞血瘀证表现如:毛色暗淡、情绪暴躁易怒、粪便时干时稀,同时具有与 NAFLD 一致的病理表现,由此表明 NAFLD 气滞血瘀型模型成功建立。

3 模型评价方法

现阶段对于动物模型的评价主要从血液生化、组织病理学,肝脂质、肝弹性成像等等方面进行。

血液生化评价方面主要包括肝功能及血脂异常,ALT 是肝细胞中丰富的酶,肝细胞损伤后血清 ALT 水平升高,AST 是另一种肝损伤的生化标志物,在肝损伤后释放到血流中,因此,ALT 和 AST 通常是 NAFLD 患者肝炎症和损伤的标志,血清中 ALT 和 AST 水平常用于评估肝功能^[43]。NAFLD 组织学特征主要包含脂肪变性、肝细胞气球样变、炎症和纤维化^[44]。其中 NAFL 最常见的特征是肝脂肪变性(> 5% 的肝细胞具有脂肪浸润)而没有额外的肝细胞损伤^[1]。脂质含量,肝功能及病理学显示肝脂肪变性常作为该疾病阶段模型建立成功与否的评价指标。如 MENG 等^[17]用 HFD 喂养 6 周龄雄性 C57 BL/6J 小鼠,12 周后结果显示小鼠体重增加, TG 和 TC 水平增高,且病理显示小鼠肝中脂质蓄积和脂肪变性显著增加,特征为气球样变、空泡化和肝细胞肥大,即 NAFL 模型建立成功。NASH 的特征性是脂肪变性、球囊增生和小叶炎症,其他组织学改变,包括门静脉炎症、多形核浸润、Mallory-Denk 小体、凋亡小体^[45]。随着病情的进展,NASH 患者通常会在单个或肝细胞群周围出现典型的“鸡丝状”纤维化,称为“细胞周围纤维化”,它可以进一步

扩散到门静脉区域,随后导致隔膜纤维化甚至肝硬化^[44]。除上述组织学表现外,近年来研究者常用苏木素-伊红(HE)染色,油红“O”染色(ORO)、免疫组化、天狼猩红染色或马松(Masson)染色来评价模型建立情况,通过 HE 和 Masson 染色评估肝脂肪变性、炎症和纤维化,采用 ORO 和脂质提取分析检测小鼠肝脂肪含量,用免疫组化观察炎症因子的表达。HUANG 等^[46]给 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠喂食 MCD 以诱导 NASH,5 周后模型组小鼠肝/体重比的增加,HE 染色肝切片表现出中度脂质积累,Masson 染色显示模型组队列中有明显的肝胶原沉积,ORO 结果显示,肝中性脂质的积累,且脂质提取分析证实了这一点,此外小鼠的 TG 和 TC,ALT 和 AST 水平升高,故该模型建立成功。YANG 等^[47]用 HFFD 喂食大鼠 16 周后,与对照组相比,模型组的肝系数显著增加($P < 0.01$),肝切片有肝细胞肿胀、气球变性、不同大小的脂滴和肝髓变化,ORO 染色在模型组的肝切片中观察到弥漫性和颗粒状脂滴,Masson 三色染色表明模型组大鼠没有出现肝纤维化。除侵入性肝活检检查外,非侵入性检查也常用于模型评价,一维瞬时弹性成像(transient elastography,TE)是一种基于非侵入性超声的方法,它使用横波速度,提供受控衰减参数(controlled attenuation parameter,CAP)来评估脂肪变性,相比于肝活检,TE 好处在于测量的区域更大^[48]。

中医病证结合模型评价主要从血液生化、血液流变学、血黏度等方面进行评价。

血液生化指标,特别是脂质、肝功能等与中医证型关系密切。脂质代谢紊乱是 NAFLD 的重要特征之一,既往有研究表明中医痰湿证与其发生发展密切相关。一项研究通过对痰湿证大鼠进行脂质组学研究,发现 NAFLD 患者肝及血清中 TG、甘油二酯、磷脂与肝氧化应激反应、线粒体和过氧化酶功能异常存在相关性,故作者推测这些脂质有可能作为 NAFLD 痰湿证的重要标志物^[40]。肝郁脾虚证 NAFLD 大鼠也存在脂质代谢方面的异常,冯立辉等^[49]建立肝郁脾虚证 NAFLD 大鼠,发现模型组大鼠血清中 TC、TG、FFA、ALT、AST 的水平明显增高。此外,现代医学研究认为,脑组织神经递质分泌紊乱和小肠吸收功能异常是肝郁脾虚证的本质,而 NE、5-HT 是反应神经变化的主要神经递质,D-木糖排泄率可用于诊断脾虚,故 NE 和 5-HT 可用于评价 NAFLD 肝郁脾虚证模型,李若瑜等^[39]用建立

NAFLD 肝郁脾虚证模型,结果显示:血糖、血脂升高、NE、5-HT 和 D-木糖排泄率显著降低,表明其模型构建成功。

血液流变学、血黏度等常作为中医血瘀证的检测指标。NAFLD 常伴随脂质代谢的紊乱,这导致大量脂质与蛋白质结合形成脂蛋白,脂蛋白在红细胞表面吸附导致红细胞之间形成桥联,减少了红细胞表面负电荷,增加了红细胞的刚性,降低了其变形能力,使其容易相互聚集;同时,NAFLD 存在胰岛素抵抗,造成的高血糖可使红细胞膜上的脂蛋白成分改变,红细胞变得僵硬,增加了全血黏度和其他血液流变学的改变。因此在 NAFLD 模型制备过程中,检测血液流变学指标的水平,有利于对模型进行评价。此外,有研究表示 NAFLD 患者均存在血液流变学变化,且血液流变学变化与中医血瘀证关联,提示血液流变学指标可作为非酒精性脂肪性肝病早期血瘀证诊断的客观指标之一^[50]。故在建立血瘀证相关模型时可以将血液流变学指标变化作为模型成功建立的指标,如朱晓宁等^[51]采用 HFD + 伤湿法 + 外界声光刺激等构建 NAFLD 痰瘀互结模型,10 周后模型组动物体重增长迅速,形体肥胖,舌象评分、肝酶学指标、血脂、血液流变学指标均升高,符合 NAFLD 和中医痰瘀互结证表现,提示模型建立成功。

4 总结

NAFLD 是以肝细胞内脂肪过度沉积为特征的一类病理综合征,研究发现,其与代谢紊乱有关,胰岛素抵抗、缺血性肥胖、2 型糖尿病或血脂异常在其发病机制中起着至关重要的作用^[52]。NAFLD 作为内科常见慢性病之一,若早期未进行干预治疗,将严重威胁到病人健康,甚至发展为 HCC。动物模型作为近年来的研究热点,其在更好的理解疾病的发生发展以及寻求更加安全有效治疗方式中起着至关重要的作用。鼠类动物作为与人类病理生理相似的啮齿动物之一,广泛用于疾病于研究中。用于构建 NAFLD 动物模型包括饮食诱导模型、药物诱导模型、基因模型以及病证结合模型,其中饮食诱导模型制备最为简单且成本低,但其造模周期较长;药物诱导模型加快 NAFLD 向肝硬化、HCC 的发展;基因模型大多与饮食相结合,其造模周期短且疾病表现与 NAFLD 相似度高,但因基因缺陷动物造价高且获得途径来源少,故该模型制备常受限。中

医病症结合模型能够很好的将西医学的“病”与中医学的“证”相结合,对中西医对 NAFLD 的研究提供了一个很好的途径,但因国内外对其研究较少,尚缺乏统一的评判标准,不能很好的推广使用。为了优化 NAFLD 动物模型,研究者常从血液生化、组织病理学,肝脂质、肝弹性成像以及血液流变学,血黏度出发对模型进行评价,以突出其优缺点。综上,尽管各类动物模型的制备都有其局限性,且模型评价方法尚缺乏统一的评价指标,但其仍是现阶段 NAFLD 发病机制以及治疗方法研究的关键途径。因此在今后的研究中,仍需研究者进行大量实验,以期获得与 NAFLD 病理及疾病表现更为相似的低成本,短造模周期动物模型。

参 考 文 献(References)

[1] CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE J E, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the american association for the study of liver diseases [J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 328–357.

[2] BERNÁ G, ROMERO-GOMEZ M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: pathophysiology and management [J]. *Liver Int*, 2020, 40: 102–108.

[3] COTTER T G, RINELLA M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158 (7): 1851–1864.

[4] ZHOU J, ZHOU F, WANG W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851–1864.

[5] POUWELS S, SAKRAN N, GRAHAM Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss [J]. *BMC Endocr Disord*, 2022, 22(1): 63.

[6] RONG L, ZOU J, RAN W, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 13: 1087260.

[7] MOURIES J, BRESCIA P, SILVESTRI A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development [J]. *J Hepatol*, 2019, 71 (6): 1216–1228.

[8] POLYZOS S A, KOUNTOURAS J, MANTZOROS C S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 82–97.

[9] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793–801.

[10] ISSA D, PATEL V, SANYAL A J. Future therapy for non-

alcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2018, 38(1): 56–63.

[11] FANG T, WANG H, PAN X, et al. Mouse models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(15): 5681–5697.

[12] KAWASHITA E, ISHIHARA K, NOMOTO M, et al. A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 204.

[13] LI C, GUO H, DAI F, et al. SREBP-2 expression pattern contributes to susceptibility of mongolian gerbils to hypercholesterolemia [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3288–3296.

[14] LI W, GUAN Z, BRISSET J C, et al. A nonalcoholic fatty liver disease cirrhosis model in gerbil: the dynamic relationship between hepatic lipid metabolism and cirrhosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(1): 146–157.

[15] BRIAND F, BROUSSEAU E, QUINSAT M, et al. Obeticholic acid raises LDL-cholesterol and reduces HDL-cholesterol in the diet-induced NASH (DIN) hamster model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 449–456.

[16] 肖伟松, 乐滢玉, 曾胜澜, 等. 非酒精性脂肪性肝病的发病机制研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(8): 1874–1879.

XIAO W S, LE Y Y, ZENG S L, et al. Research advances in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Hepatol*, 2020, 36(8): 1874–1879.

[17] MENG F, SONG C, LIU J, et al. Chlorogenic acid modulates autophagy by inhibiting the activity of ALKBH5 demethylase, thereby ameliorating hepatic steatosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(41): 15073–15086.

[18] ENG J M, ESTALL J L. Diet-induced models of non-alcoholic fatty liver disease: food for thought on sugar, fat, and cholesterol [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1805.

[19] ZHAO C Z, JIANG L, LI W Y, et al. Establishment and metabonomics analysis of nonalcoholic fatty liver disease model in golden Hamster [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2022, 77(5–6): 197–206.

[20] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908–922.

[21] ZHANG Y, WU X, XU M, et al. Comparative proteomic analysis of liver tissues and serum in db/db mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9687.

[22] KIM S H, LIM Y, PARK J B, et al. Comparative study of fatty liver induced by methionine and choline-deficiency in C57BL/6N

- mice originating from three different sources [J]. *Lab Anim Res*, 2017, 33(2): 157–164.
- [23] TØLBØL K S, STIERSTORFER B, RIPPMMANN J F, et al. Disease progression and pharmacological intervention in a nutrient-deficient rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(5): 1238–1256.
- [24] FARRELL G, SCHATTENBERG J M, LECLERCQ I, et al. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis: toward optimization of their relevance to human nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2019, 69(5): 2241–2257.
- [25] LI C, ZHOU W, LI M, et al. *Salvia-Nelumbinis naturalis* extract protects mice against MCD diet-induced steatohepatitis via activation of colonic FXR-FGF15 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111587.
- [26] OMAGARI K, UCHIDA M, TAGAWA Y, et al. Influence of fasting time on serum and hepatic lipid profiles in a sprague-dawley rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2022, 68(5): 409–419.
- [27] WAYAL V, HSIEH C C. Bioactive dipeptides mitigate high-fat and high-fructose corn syrup diet-induced metabolic-associated fatty liver disease via upregulation of Nr1h2/HO-1 expressions in C57BL/6J mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115724.
- [28] CHAIDEE A, ONSURATHUM S, INTUYOD K, et al. *Opisthorchis viverrini* infection augments the severity of nonalcoholic fatty liver disease in high-fat/high-fructose diet-fed hamsters [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2019, 101(5): 1161–1169.
- [29] IM Y R, HUNTER H, DE GRACIA HAHN D, et al. A systematic review of animal models of NAFLD finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD [J]. *Hepatology*, 2021, 74(4): 1884–1901.
- [30] HUEBBE P, RIMBACH G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 37: 146–161.
- [31] 于温温, 张金华, 刘云娜, 等. 贻贝多糖对高脂饮食诱导的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠非酒精性脂肪肝的改善作用 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(24): 369–376.
- YU W W, ZHANG J H, LIU Y N, et al. Improvement effect of mussel polysaccharide α -D-glucan on non-alcoholic fatty liver apolipoprotein E knockout mice induced by high fat diet [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(24): 369–376.
- [32] GUO J, MIAO G, ZHANG W, et al. Depletion of ApoA5 aggravates spontaneous and diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by reducing hepatic NR1D1 in hamsters [J]. *Theranostics*, 2024, 14(5): 2036–2057.
- [33] HE Y, HWANG S, CAI Y, et al. MicroRNA-223 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and cancer by targeting multiple inflammatory and oncogenic genes in hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2019, 70(4): 1150–1167.
- [34] LIU T, TAN F, LONG X, et al. Improvement effect of Lotus leaf flavonoids on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(2): 41.
- [35] TSUCHIDA T, LEE Y A, FUJIWARA N, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(2): 385–395.
- [36] ZHENG Q, ZHU M, ZENG X, et al. Comparison of animal models for the study of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Lab Invest*, 2023, 103(7): 100129.
- [37] ASGHARPOUR A, SANYAL A J. Generation of a diet-induced mouse model of nonalcoholic fatty liver disease [M]. New York, NY: Springer US, 2022.
- [38] 黄越燕. 病证结合动物模型的研究现状与思考 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(10): 1459–1462.
- HUANG Y Y. Research status and thoughts on the animal model of the integration of disease and syndrome [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2018, 13(10): 1459–1462.
- [39] 李若瑜, 苗宇船, 苏赵威, 等. 基于 ¹H-NMR 技术寻找非酒精性脂肪肝脾郁脾虚证的差异代谢标志物 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(3): 334–336, 357.
- LI R Y, MIAO Y C, SU Z W, et al. Exploration of differential metabolic markers on the non alcoholic fatty liver liver stagnation and spleen deficiency syndrome on the basis of ¹H-NMR technology [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2018, 24(3): 334–336, 357.
- [40] 张浩然, 李毓秋, 田琪, 等. 基于 LC-MS 技术非酒精性脂肪肝病痰湿证大鼠肝的脂质组学分析 [J]. *环球中医药*, 2023, 16(10): 1959–1966.
- ZHANG H R, LI Y Q, TIAN Q, et al. Lipidomic analysis of the liver in rats with nonalcoholic fatty liver disease with syndrome of phlegm-dampness based on LC-MS [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2023, 16(10): 1959–1966.
- [41] 刘梦瑶, 张贺芳, 牛明明, 等. 健脾理气活血方对 2 型糖尿病大鼠非酒精性脂肪肝病的保护作用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(23): 3246–3251, 3268.
- LIU M Y, ZHANG H F, NIU M M, et al. Protective effects of decoction for strengthening spleen, tonifying Qi, activating blood in rats with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 31(23): 3246–3251, 3268.
- [42] 石贺. 化痰软肝胶囊对气滞血瘀型非酒精性脂肪性肝病大鼠糖脂代谢相关酶及氧化产物的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药

大学; 2019.

SHI H. Effect of HYRG capsule on glucose and lipid metabolism-related enzymes oxidation products in rats with qi and blood stasis type nonalcoholic fatty liver disease [D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine; 2019.

[43] CHEN G, WANG X, ZHU Y, et al. Zbtb14 promotes non-alcoholic fatty liver disease-associated fibrosis in gerbils via the β -catenin pathway [J]. *Front Biosci*, 2023, 28(9): 205.

[44] JIANG M, WU N, CHEN X, et al. Pathogenesis of and major animal models used for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(4): 1453–1466.

[45] XU X, POULSEN K L, WU L, et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH) [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 287.

[46] HUANG R, GUO F, LI Y, et al. Activation of AMPK by triptolide alleviates nonalcoholic fatty liver disease by improving hepatic lipid metabolism, inflammation and fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153739.

[47] YANG J M, SUN Y, WANG M, et al. Regulatory effect of a Chinese herbal medicine formula on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(34): 5105–5119.

[48] CAMPOS-MURGUÍA A, RUIZ-MARGÁIN A, GONZÁLEZ-REGUEIRO J A, et al. Clinical assessment and management of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(39): 5919–5943.

[49] 冯丽辉, 万雪峰, 郑忠蕊, 等. 柴苓术芍饮对肝郁脾虚型非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织氧化应激及炎症因子的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2022, 29(3): 360–363.

FENG L H, WAN X F, ZHENG Z R, et al. Effects of chailing Zhushao Decoction on oxidative stress and inflammatory factors in liver tissue of non-alcoholic fatty liver disease rats with liver stagnation and spleen deficiency [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2022, 29(3): 360–363.

[50] 汤江磊. 基于血液流变学指标变化研究非酒精性脂肪性肝病与血瘀证关系[D]. 昆明: 云南中医药大学; 2021.

TANG J L. Study on the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and blood stasis syndrome based on the changes of hemorheological indicators [D]. Kunming: Yunnan University of Chinese Medicine; 2021.

[51] 朱晓宁, 汪静, 郑丁, 等. 非酒精性脂肪性肝病痰瘀互结证大鼠模型的构建及评价 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(22): 1953–1956.

ZHU X N, WANG J, ZHENG D, et al. Construction and evaluation of rat model of nonalcoholic fatty liver disease with intermingled phlegm and blood stasis syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 58(22): 1953–1956.

[52] TOKUSHIGE K, IKEJIMA K, ONO M, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020 [J]. *J Gastroenterol*, 2021, 56(11): 951–963.

[收稿日期] 2024-2-25