

王佳星,陈家扬,申婷婷,等. 基于网络药理和动物实验探讨活血通络方治疗脊髓损伤的作用机制 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 1-13.

WANG J X, CHEN J Y, SHEN T T, et al. Exploring the mechanism of action of Huoxue Tongluo prescription for the treatment of spinal cord injury based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 1-13.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.001

基于网络药理和动物实验探讨活血通络方治疗 脊髓损伤的作用机制

王佳星¹, 陈家扬^{2,3}, 申婷婷^{2,3}, 王智慧^{2,3}, 任晓平^{1,2*}

(1. 广西大学医学院, 南宁 530004; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011;
3. 广西中医药大学, 南宁 530200)

【摘要】 目的 采用网络药理学、分子对接技术和体内实验, 探讨活血通络方 (Huoxue Tongluo prescription, HXTLP) 治疗脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的潜在作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 检索 HXTLP 的活性成分, 瑞士化合物靶点预测数据库 (Swiss target prediction) 获取作用靶点, 构建“活性成分-靶点”网络。SCI 相关靶点通过访问在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 和人类基因数据库 (GeneCards) 获得。基于基因与蛋白质相互作用网络分析数据库 (STRING) 建立 HXTLP 与 SCI 共同靶点的蛋白互作网络 (PPI)。Metascape 数据库用于京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 和基因本体 (GO) 富集分析共同靶点, Autodock 1.5.7 软件进行活性成分与关键靶点的分子对接, Pymol 2.4.0 软件进行结果可视化。最后通过动物实验验证 HXTLP 治疗 SCI 的效果。结果 研究共获得 184 个交集靶点, 关键靶点涉及丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 kDa alpha, class A member 1, HSP90AA1)、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基- α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、磷酸肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、GTP 酶 (harvey ras, HRAS)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等。分子对接结果表明核心活性成分和关键靶点之间具有较高的结合亲和力。动物实验结果显示, 与模型组相比, 活血通络方组小鼠行为学评分升高 ($P < 0.05$), 后肢运动功能改善, 损伤区域组织学形态更完整。蛋白免疫印迹 (Western Blot) 结果显示 HXTLP 可有效的抑制关键靶点蛋白 HSP90AA1 和磷酸化 STAT3 (phospho-STAT3, P-STAT3) 表达, 促进磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶 (phospho-phosphatidylinositol-3-kinase, P-PI3K), 磷酸化 AKT 1 (phospho-AKT1, P-AKT1) 的表达。结论 本研究验证了 HXTLP 有多组成、多靶点、多途径协同作用治疗 SCI 的特点, 为 SCI 临床用药及进一步研究提供实验理论依据。

【关键词】 活血通络方; 脊髓损伤; 网络药理; 分子对接; 动物实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0001-13

【基金项目】 国家自然科学基金 (82060874), 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21196062), 广西中医药大学 2023 年研究生教育创新计划项目 (YCSY2023042)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82060874), Focus on Research and Development Projects in Guangxi (Guike AB21196062), 2023 Graduate Education Innovation Plan of Guangxi University of Chinese Medicine (YCSY2023042).

【作者简介】 王佳星, 女, 硕士, 研究方向: 脊髓损伤与修复重建。Email: 13645533129@163.com

【通信作者】 任晓平, 男, 学士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合防治骨科疾病临床研究。Email: chinarenxg@126.com

Exploring the mechanism of action of Huoxue Tongluo prescription for the treatment of spinal cord injury based on network pharmacology and molecular docking technology

WANG Jiaxing¹, CHEN Jiayang^{2,3}, SHEN Tingting^{2,3}, WANG Zhihui^{2,3}, REN Xiaoping^{1,2*}

(1. Department of Medicine School, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China; 3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)
Corresponding author: REN Xiaoping. E-mail: chinarenxg@126.com

[Abstract] Objective This study preliminarily investigated the potential mechanisms of the Huoxue Tongluo prescription (HXTLP) in treating spinal cord injury (SCI) through a combination of network pharmacology, molecular docking technology, and *in vivo* experimental verification. **Methods** The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) were utilized to select the active ingredients, targets of action were obtained from Swiss target prediction database, and an “active ingredients-targets” network was constructed. SCI-related targets were obtained by accessing online mendelian inheritance in man (OMIM) and human gene database (GeneCards), and a protein interaction network of the common targets of HXTLP and SCI was established based on the search tool for the retrieval of interacting genes/protein (STRING) database. The Metascape database was used in KEGG pathway enrichment and GO analyses of the common targets. Molecular docking of active ingredients and key targets was performed through Autodock 1.5.7 software, and the results were visualized with Pymol 2.4.0 software. Finally, the effect of HXTLP on SCI was verified by animal experiments. **Results** A total of 184 intersection targets were obtained, and the key targets were serine/threonine kinase (AKT1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), heat shock protein 90 kDa alpha, class A member 1 (HSP90AA1), phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1), harvey ras (HRAS), estrogen receptor 1 (ESR1), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), and epidermal growth factor receptor (EGFR). Molecular docking result showed strong binding abilities between the core active components and key targets. In the animal experiments, the behavioral scores of mice in the HXTLP group increased ($P < 0.05$), the motor function of hind limbs was improved, and the histological morphology of the injured area was more complete compared with those of the model group. Western Blot result revealed that HXTLP effectively inhibited the key target protein (HSP90AA1) and the expression of phospho-STAT3 (P-STAT3) and promoted the expression of phospho-phosphatidylinositol-3-kinase (P-PI3K) and phospho-AKT1 (P-AKT1). **Conclusions** This study verified that HXTLP has multi-component, multi-target, and multi-pathway synergistic effects in the treatment of SCI and has provided experimental and theoretical bases for further clinical medication research for SCI.

[Keywords] Huoxue Tongluo prescription; spinal cord injury; network pharmacology; molecular docking; animal experiments

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

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种严重的中枢神经系统损伤,可引起主要的运动、感觉和自主神经功能障碍^[1]。SCI 后,大量细胞死亡并伴随血脊髓屏障破坏,随后免疫细胞浸润,引发一系列炎症反应,导致少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元的继发性细胞死亡,以及脱髓

鞘病变致使胶质瘢痕形成^[2-3]。这些继发性损伤阻碍了轴突再生,严重影响神经修复与功能恢复。因此,开发针对神经炎症和 SCI 继发性损伤的疗法和药物,对于促进神经功能的恢复至关重要。

中医将 SCI 归类为“痿症”,认为其与督脉相

关,病因是“瘀血”,病机为“督脉枢机不利”,故中医治疗多以行气活血通络,疏通督脉为要点^[4]。国内研究表明,活血化瘀类中药有保护受损脊髓神经功能、营养神经以及抑制细胞凋亡等疗效^[5]。活血通络方(Huoxue Tongluo prescription, HXTLP)是在治疗早期脊髓型颈椎病的有效经验方活血方的基础上化裁而来,由丹参、当归、川芎、黄芪和红花组成活血方已证实具有调节神经元可塑性和促进损伤功能修复的作用,且临床上也取得明显疗效^[6-7]。在此基础上加入祛痰散结类中药半夏、利水消肿类中药防己,推测能通过活血化瘀、抗炎抗氧化以及保护神经等多重机制,协同促进损伤脊髓的恢复。

网络药理学是研究中草药与疾病之间复杂关系的有效方法,故本研究拟通过网络药理学与分子对接技术以及动物实验验证来探讨 HXTLP 多成分、多靶点、多通路的协同作用机制和治疗 SCI 潜在的药效物质基础,为将来的研究和临床应用奠定基础^[8]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实 验 动 物

SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 30 只,体质量(20 ± 2)g,6 ~ 8 周龄,购买自长沙市天勤生物技术有限公司【SCKX(湘)2022-0011】,于广西中医药大学临床医学院动物房【SYXK(桂)2019-0001】饲养,温度 22 ~ 25 °C,相对湿度 40% ~ 60%,给予 12 h 光照/黑暗循环暴露,自由摄食水和饲料。本研究已获得广西中医药大学动物福利伦理委员会批准(DW20230830-177)。

1.1.2 药 物

HXTLP 由丹参 15 g、当归 12 g、川芎 15 g、黄芪 30 g、防己 15 g、半夏 12 g 组成,饮片购于广西中医药大学附属瑞康医院。参照中药汤剂煎煮规范方法^[9]制备活血通络方煎煮液,加 10 倍量水浸泡 30 min,文火加热,煮沸 1 h,过滤,再加 8 倍量水,保持煮沸 1 h,过滤,合并 2 次滤液。浓缩滤液至生药量 2 g/mL,为活血通络方组的浓度。

1.1.3 主要试剂与仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(GlpBio, GK10009);内参一抗 GAPDH(Affinity, AF7021);

二抗 Goat Anti-Rabbit Ig G(H + L) HRP(Affinity, S0001); PI3K(Affinity, AF6242); P-PI3K 抗体(Affinity, AF3242); AKT 抗体(Affinity, AF6261); P-AKT1 抗体(Abclonal, AP0637); HSP90AA1 抗体(Abclonal, A23880); P-STAT3 抗体(无锡东林, DL91113A); ECL 超敏发光液(莫纳生物, PW30701S); RIPA 裂解液(P0013B)、封闭液(P0252)、一抗稀释液(P0256)、二抗稀释液(P0258)均购自碧云天生物技术有限公司。

多功能微孔板检测仪(帝肯,中国);超声波细胞粉碎仪(新芝,中国);多用脱色摇床(其林贝尔,中国);通用电泳仪(Bio-Rad,美国);化学发光成像系统(勤翔,中国)。

1.2 方 法

1.2.1 HXTLP 有效成分及潜在靶点的筛选

由丹参、当归、川芎、黄芪、防己、半夏 6 味中药组成的 HXTLP,通过 TCMSp 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和药物相似性(drug-likeness, DL)为指标来筛选相应中药活性成分,阈值设为 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 。将收集的活性成分导入简化分子线性输入规范系统(simplified molecular input line entry system, SMILE),获得 SMILE 号后输入 Swiss target prediction 数据库,以可能性 > 0.1 的筛选标准获得相应的靶基因。

1.2.2 构建 HXTLP 活性成分-靶点网络

中药活性成分和潜在靶点输入 Cytoscape 3.10.0 软件绘制“中药活性成分-靶点”网络图,根据“度值”筛选出在网络中最重要的 5 个有效活性成分。

1.2.3 SCI 疾病靶点获取

以“脊髓损伤”为关键词,使用 OMIM(<https://omim.org/>)和 GeneCards(<http://www.genecards.org/#>)数据库且需要满足 relevance score ≥ 10 来筛选与 SCI 相关的疾病靶点。

1.2.4 构建 PPI 网络

将获得的交集靶点导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>),物种选择“Homo sapiens”,设置靶点相互作用值(interaction score) > 0.9,忽略孤立靶点,将数据以 TSV 格式保存并导出。应用 Cytoscape 3.10.0 软件绘制蛋白相互作用网络,利用软件内置的 Cytoscape 网络分析插

件(cytoscape network analyzer, Cyto NCA)插件进行拓扑分析,并通过“度值”算法排序来筛选出关键靶点,其数值越大则越重要。

1.2.5 京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集和基因本体(gene ontology, GO)分析

使用 Metascape 数据库(<https://metascape.org/>)对收集到的交集基因进行 KEGG 分析和 GO 分析,限制种属为“H. sapiens”,进行个性化分析。将分析得到的数据导入微生物在线网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>),以网页默认值为富集分析统计学过滤值,绘制富集气泡图。KEGG 按照基因在信号通路上富集的可信度大小,即 $-\log_{10}$ 值绘制出前 20 条气泡图。GO 分析包括分子功能(molecular function, MF),生物过程(biological process, BP)和细胞组分(cellular component, CC)分析 3 个部分,选取各自分析结果前十的条目进行绘图。

1.2.6 分子对接验证

为了验证核心活性成分与关键靶点间的作用关系,使用 AtuoDockTools 1.5.7 软件计算两两间的结合能。TCMSP 数据库导出格式为 mol2 的核心活性成分结构,PyMol 2.4.0 对小分子加全氢,设置为配体,自动分布电荷,处理后导出为 pdbqt 格式。从蛋白质结构数据库(protein data bank, PDB)(<https://www.rcsb.org/search>)下载格式为 pdb 的靶点 3D 结构,以构象分辨率在 2.5 Å 之内选取。将获得的靶点结构导入 PyMol 进行去除水分子、加全氢等处理,导出为 pdbqt 格式。使用 AtuoDockTools 设置对接盒子,导出为 gpf 格式,运行 Autogrid4,设置对接参数及运算方法,运行 Autodock4,计算结合能,导出为 pdbqt 格式。利用 OpenBabel 3.1.1 软件将 pdbqt 格式转化为 pdb 格式,PyMol 对最终对接结果进行可视化。

1.2.7 动物造模、分组及给药

将适应性喂养 1 周的小鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham group)、模型组(Model group)、活血通络方组(HXTLP group),每组 10 只。构建动物脊髓完全横断模型,假手术组去除 T10 椎板后,对脊髓不做任何处理;模型组、活血通络方组去除 T10 椎板后,对脊髓进行完全横断操作。活血通络方组每只小鼠按 30 g/kg 混悬液灌胃,假

手术组与模型组均予等量生理盐水灌胃,各组小鼠造模成功的次日开始给药,每组每日灌胃 1 次,连续给药 21 d 后心脏灌注取材。

1.2.8 样本采集

术后 21 d,为确保脊髓组织完整并防止变性,对小鼠进行心脏灌注取材。0.6%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠(10 mL/kg),匀速(12 mL/min)推注生理盐水经左心室灌注固定,取脊髓横断部位上下各 0.5 cm 的组织于 -80°C 保存,获得 Western Blot 检测所需样本($n = 6$)。病理组织学观察的组织($n = 4$)以相同步骤用 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)灌注,取材于 4% PFA 固定。

1.2.9 行为学评估

根据贝索小鼠评分标准(Basso mouse scale, BMS)^[10]评估各组小鼠后肢运动功能恢复情况。BMS 评分范围为 0 ~ 9 分(0 分表示完全瘫痪,9 分表示完全正常),是基于观察小鼠的协调性、踝关节活动程度、足底和脚背的触觉、脚的位置、躯干的稳定性和尾部的位置等因素来进行评分。评估由两名经过盲态培训的独立评估者执行,评分时间点分别为术后 1、3、7、14 和 21 d,每次评估重复 3 次以增强结果的可靠性。

1.2.10 病理组织学检查

脊髓组织固定 24 h 后,乙醇梯度脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋;处理成 4 μm 厚的组织切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,风干封片后使用光学显微镜观察组织结构和细胞形态并拍照。

1.2.11 Western Blot 法检测蛋白表达水平

提取各组脊髓组织总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测蛋白浓度,12.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,将分离的蛋白样品转印至 PVDF 膜,封闭 15 min 后 TBST 洗膜 3 次。加入一抗:PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT1、P-STAT3、HSP90AA1、GAPDH,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,HRP 标记山羊抗兔二抗室温孵育 1 h,洗膜 3 次。化学发光成像系统采集图像,Image J 1.47 进行量化评估,各指标灰度值通过 GAPDH 均一化后,计算蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

应用 Graph Pad Prism 8.0 软件,单因素方差

分析和 LSD 方法进行统计学分析,用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 HXTLP 有效成分和潜在靶点

检索到丹参有效活性成分 64 个,黄芪有效活

性成分 20 个,当归有效活性成分 2 个,川芎有效活性成分 7 个,半夏有效活性成分 13 个,防己有效活性成分 3 个,主要化合物信息见表 1。通过 Swiss target prediction 数据库检索筛选去除重复值和部分无靶标化合物后,共得到 898 个药物靶点基因。

表 1 活血通络方主要化合物信息

Table 1 Key compound information of HXTLP

中药名 Chinese medicinal name	Mol 编号 Mol ID	化合物 Compound	口服利用度/% OB/%	药物相似性 DL
当归 Angelicae sinensis radix	MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76
	MOL000358	β -谷甾醇 β -sitosterol	36.91	0.75
	MOL000358	β -谷甾醇 β -sitosterol	36.91	0.75
防己 Stephaniae tetrandrea radix	MOL002333	四烯酸 A Tetraneurin A	35.40	0.31
	MOL002341	橙皮素 Hesperetin	70.31	0.27
	MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75
川芎 Chuanxiong rhizoma	MOL002157	川芎萜内酯 Wallichilide	42.31	0.71
	MOL000433	脂肪酸 FA	68.96	0.71
	MOL002670	卡维汀 Cavidine	35.64	0.81
半夏 Arum ternatum thumb	MOL003578	环阿屯醇 Cycloartenol	38.69	0.78
	MOL001755	24-乙基-4-胆甾烯-3-酮 24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76
	MOL000379	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷 9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	36.74	0.92
	MOL000211	丁香香萜 Mairin	55.38	0.78
黄芪 Hedysarum multijugum maxim	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-二甲基-17-[(2R,5S)-5-丙烷-2-基辛烷-2-基]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-十二氢-1H-环戊烷[a]菲-3-醇 (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
	MOL006824	α -香树脂醇 α -amyrin	39.51	0.76
丹参 Radix salviae	MOL001659	多孔甾醇 Poriferasterol	43.83	0.76
	MOL002776	黄芩苷 Baicalin	40.12	0.75

2.2 “活性成分-靶点”网络

中药活性成分-靶点网络图如图 1 所示,通过度值排名前五的中药活性成分为 MOL000358(β -谷甾醇)、MOL002670(卡维汀)、MOL006957((3S,6S)-3-(苜基)-6-(4-羟苜基)哌嗪-2,5-醌)、MOL002714(黄芩素)、MOL001494(扁桃醇)。

2.3 HXTLP-SCI 交集靶点

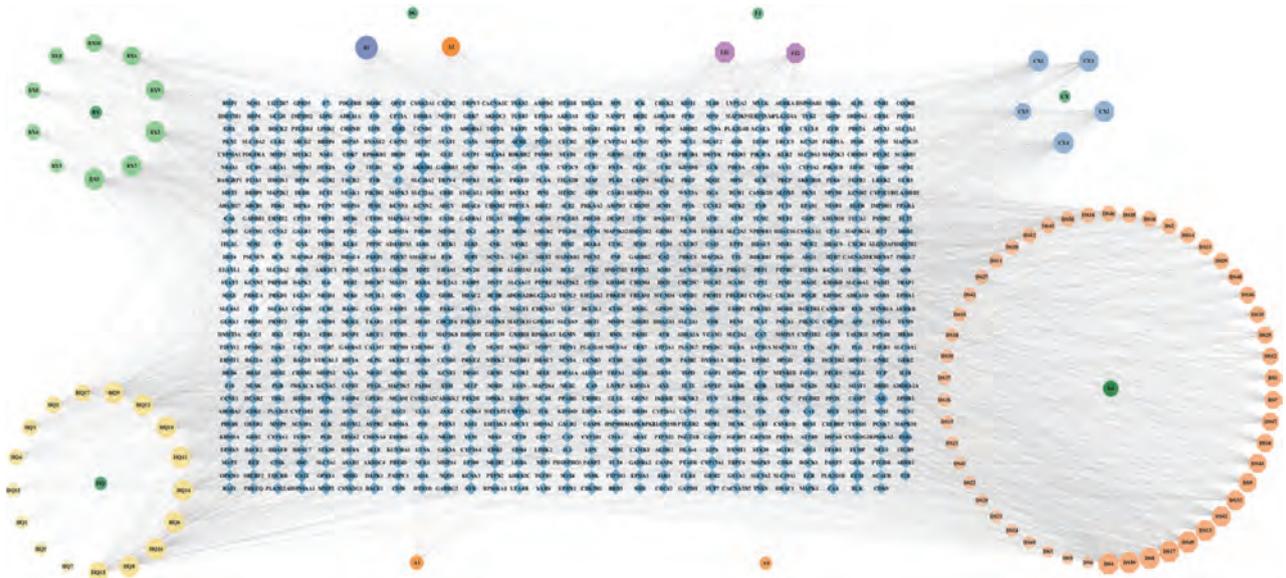
通过 OMIM 数据库、GeneCards 数据库检索,剔除重复靶点后共得到 1051 个 SCI 疾病相关靶点,其中 OMIM 数据库 102 个、GeneCards 数据库 970 个。使用在线 VENNY 2.1 软件分别导入药物靶点和 SCI 疾病靶点,绘制韦恩图,获得交集靶点 184 个,见图 2。

2.4 蛋白质互作网络及其分析

根据韦恩图结果,将交集靶点构建 PPI 网络,共同靶点进行可视化,使用 Cytoscape 3.10.0 软件分析,度值越高,则为核心靶点的可能性越大。在这里,节点度值大小、面积和偏向红色程度均成正比,且面积越大,表明该靶点在网络中的地位越重要,见图 3。根据度值、中间中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC) 选出 9 个目标靶点,以供下一步研究(表 2)。

2.5 KEGG 分析和 GO 分析结果

为进一步研究 HXTLP 治疗 SCI 的作用机制,基于 Metascape 数据库对潜在靶点进行 KEGG 和 GO 富集分析,共获得 164 条 KEGG 通路和 673 条



注:DG:当归;FJ:防己;CX:川芎;BX:半夏;HQ:黄芪;DS:丹参;A1:丹参和半夏两种中药共有成分;A2:当归和半夏两种中药共有成分;A3:川芎和黄芪两种中药共有成分;B1:当归、防己和半夏三种中药共有成分。

图 1 活血通络方活性成分-靶点网络图

Note. DG. Angelicae sinensis radix. FJ. Stephaniae tetrandrae radix. CX. Chuanxiang rhizoma. BX. Arum ternatum thunb. HQ. Hedysarum multijugum maxim. DS. Radix salviae. A1. Two common components of Radix salviae and Arum ternatum thunb. A2. Two common components of Angelicae sinensis radix and Arum ternatum thunb. A3. Two common components of Chuanxiang rhizoma and Hedysarum multijugum maxim. B1. Three common components of Angelicae sinensis radix, Stephaniae tetrandrae radix and Arum ternatum thunb.

Figure 1 Active ingredients-targets network diagram of HXTLP

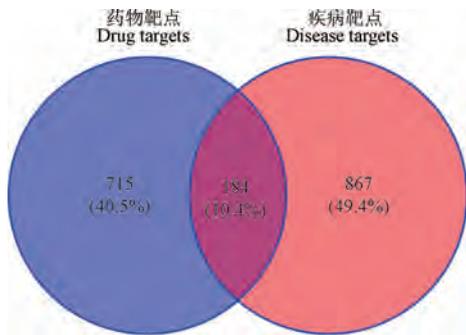


图 2 疾病靶点及药物-疾病共同靶点筛选

Figure 2 Screening of disease target and drug-disease common target

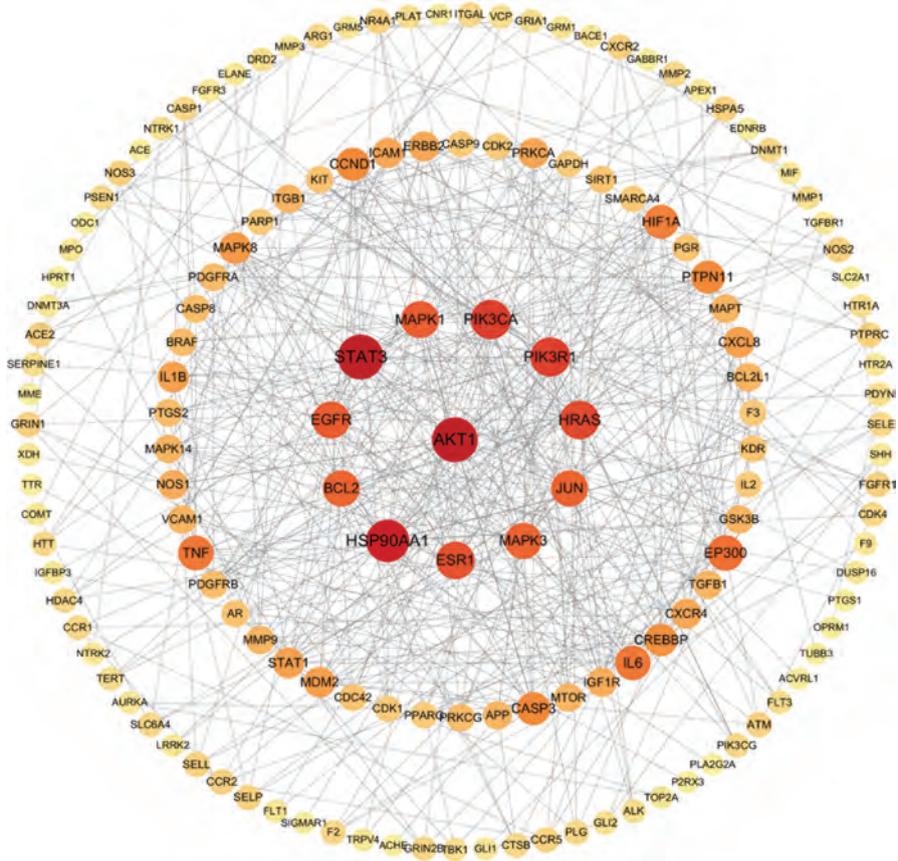
表 2 蛋白互作网络中度值高的 9 个靶点信息

Table 2 Information on the 9 targets with high degree values in the protein interaction network

靶点 Target	度值 Degree	中间中心性 Betweenness centrality	接近中心性 Closeness centrality
AKT1	30	0.159 299 962	0.440 476 190
STAT3	30	0.106 379 332	0.416 901 408
HSP90AA1	27	0.111 898 518	0.400 000 000
PIK3CA	23	0.038 502 931	0.366 336 634
PIK3R1	23	0.048 715 752	0.373 737 374
HRAS	22	0.094 761 572	0.389 473 684
ESR1	21	0.014 326 914	0.386 422 977
MAPK1	20	0.044 207 410	0.407 713 499
EGFR	20	0.051 367 690	0.400 000 000

GO 富集条目 (其中涉及 BP441 条, CC103 条, MF129 条)。随后根据度值对这些条目进行排序,在微生信平台分别导入 KEGG 分析排名前二十的条目和 GO 富集分析每个部分排名前十的条目,结果以气泡图或三合一柱状图形式进行可视化展示。见图 4,5。KEGG 富集通路主要涉及高级糖基化终末产物-受体信号通路、叉头转录因子家族 (forkhead box O, FoxO) 信号通路、P53 信号

通路、爱帕琳肽 (apelin)、神经退行性变-多重疾病、坏死性凋亡、钙信号通路、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、神经活性配体-受体相互作用的调节等。GO 分析结果如图 5 所示:(1)生物学过程中主要涉及细胞对脂多糖的反应,外界刺激反应的正向调节、磷酸化的正向调节、积极调节细胞迁移等;(2)在细胞



注:圆形图标代表靶点,连线代表靶点之间具有作用关系;面积越大,在网络中重要性越强,其颜色越深代表度值越高,越存在显著性。

图 3 活血通络方治疗脊髓损伤的靶点蛋白网络

Note. Circular symbols represent the targets, and the line represents the action relationship between the targets; the larger the area, the stronger the importance in the network, and the darker the color represents the higher degree of value, the more significance exists.

Figure 3 Target protein network of HXTLP in spinal cord injury treatment

组分中主要涉及膜筏、细胞器外膜、远端轴突、树突等;(3)分子功能中主要涉及白介素的信号传导、积极调节细胞迁移、细胞对氮化合物的反应等。

2.6 分子对接结果

一般在自然条件下对接,结合能 < -5 kJ/mol 视为对接效果良好。5 个核心活性成分和 9 个核心靶点两两对接结合能大小如表 3 所示。结果显示,除扁桃醇外,其余 4 种活性成分都与关键靶点有良好的对接活性,结合能越小,活性成分和关键靶点之间相互作用越稳定,故选取结合能最小的前 3 个对接结果进行可视化,见图 6。

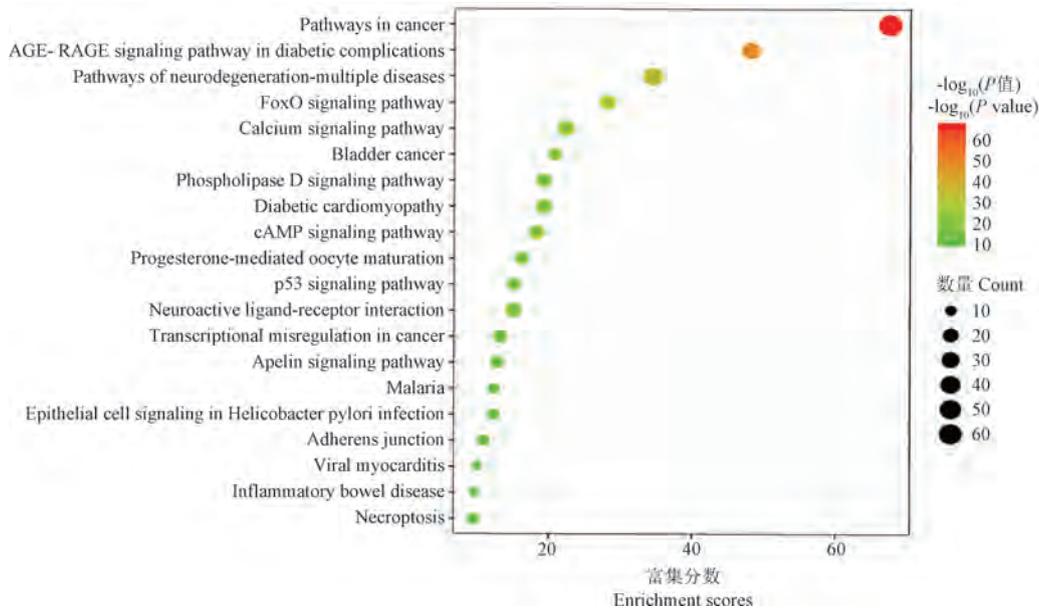
2.7 HXTLP 对小鼠运动功能恢复的影响

BMS 评分结果显示,假手术组评分保持在 9 分,其他两组与其相比,BMS 评分均显著降低。

但是与模型组相比,活血通络方组评分有所升高 ($P < 0.05$),表明小鼠后肢运动功能得到一定程度改善,见图 7。

2.8 HXTLP 对小鼠病理组织结构的影响

HE 染色结果显示,假手术组脊髓结构完整清晰,神经纤维数量丰富,未见明显脱髓鞘,神经元数量丰富(蓝色箭头);模型组脊髓组织层次排列混乱,脊髓空洞形成,排列不规则(黄色箭头),明显脱髓鞘,可见较大量巨噬细胞浸润(绿色箭头),神经组织中可见较大量的神经纤维肿胀(红色箭头),少见神经纤维坏死溶解(黑色箭头);活血通络方组脊髓结构相对模型组更清晰完整,形态有所改善,白质空洞减少,神经组织中可见少量的神经纤维肿胀,少见神经纤维坏死溶解,见图 8。

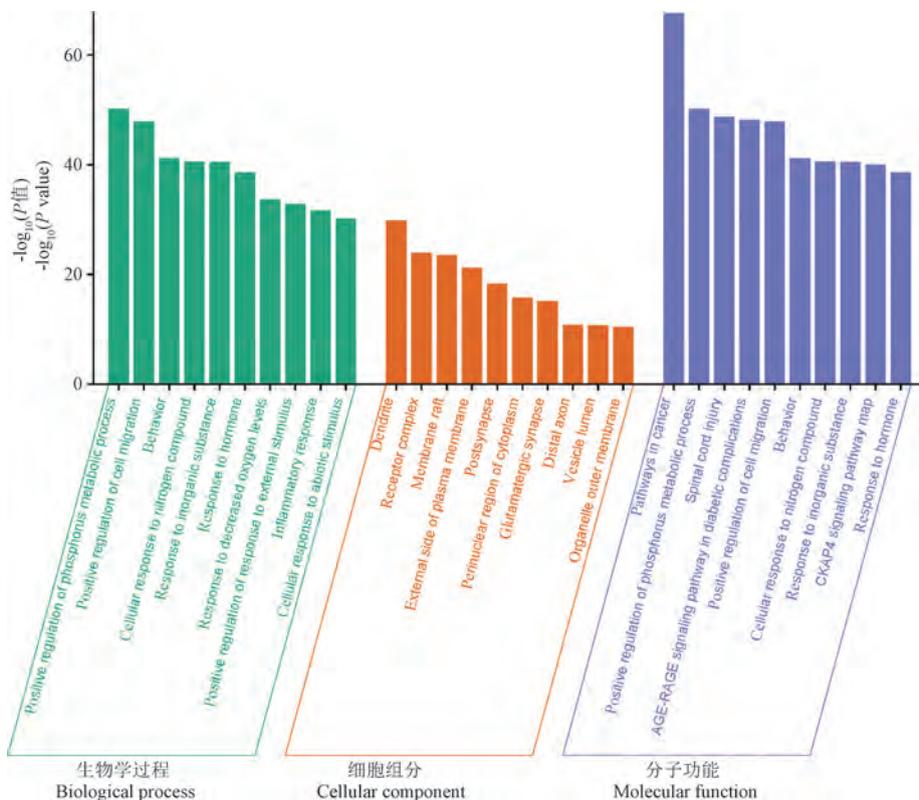


注:气泡面积大小代表富集基因的数量;气泡颜色代表富集显著性。

图 4 活血通络方治疗脊髓损伤的靶点 KEGG 分析

Note. Size of the bubble area corresponds to the number of enriched genes. Bubble color indicates the enrichment significance.

Figure 4 KEGG analysis of target of HXTLP in spinal injury treatment

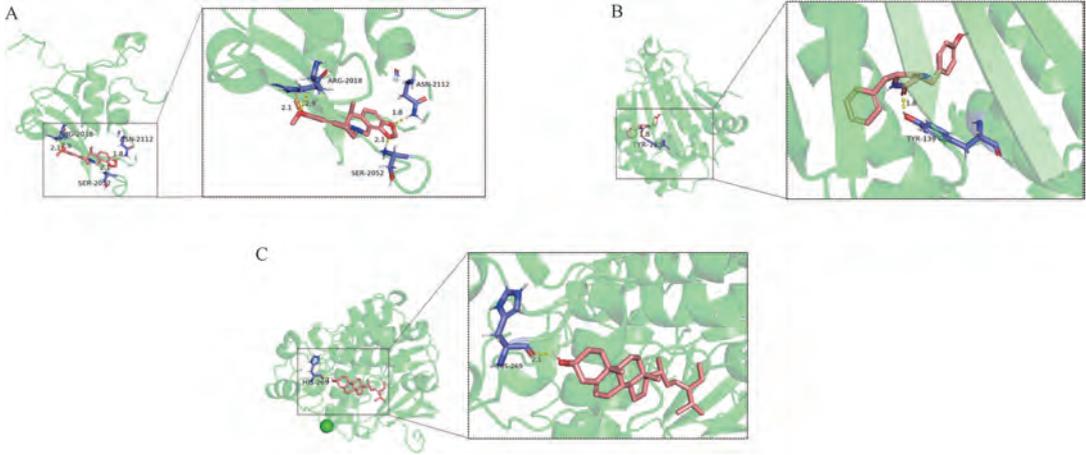


注:纵坐标:富集分数;柱状图越高代表条目富集程度的显著性越高。

图 5 活血通络治疗脊髓损伤的靶点 GO 分析

Note. Vertical coordinates. Enrichment scores. Higher the bar represents the higher significance of the degree of enrichment of the entries.

Figure 5 GO analysis of target of HXTLP in spinal cord injury treatment



注:A: Mol002670 与 HRAS 的分子对接; B: Mol00957 与 HSP90AA1 的分子对接; C: Mol000358 与 MAPK1 的分子对接。

图 6 活血通络方治疗脊髓损伤核心成分和关键靶点分子对接模型

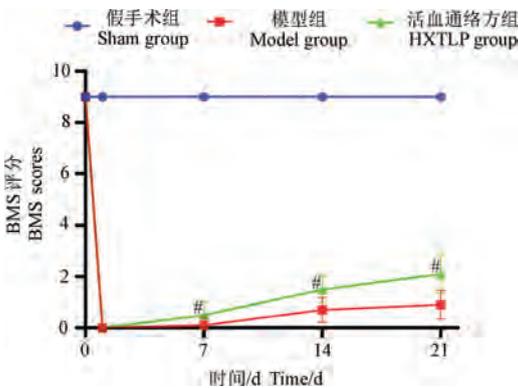
Note. A. Molecular docking of Mol002670 with HRAS. B. Molecular docking of Mol00957 with HSP90AA1. C. Molecular docking of Mol000358 with MAPK1.

Figure 6 Molecular docking modeling of core components and key targets of HXTLP in spinal cord injury treatment

表 3 核心活性成分对接关键靶点结合能/(kJ/mol)

Table 3 Binding energy of core active ingredients to key targets/(kJ/mol)

成分 Ingredient	AKT1	STAT3	HSP90AA1	PIK3CA	PIK3R1	HRAS	ESR1	MAPK1	EGFR
Mol000358	-21.63	-18.74	-25.86	-20.67	-16.65	-24.31	-20.00	-26.53	-15.27
Mol002670	-19.79	-17.57	-24.69	-23.97	-11.84	-29.33	-18.07	-23.01	-21.80
Mol006957	-19.54	-19.96	-27.49	-17.66	-13.85	-25.10	-13.93	-22.30	-15.23
Mol002714	-15.40	-18.37	-19.54	-16.82	-15.48	-21.88	-17.49	-23.60	-10.25
Mol001494	-3.22	-7.49	-10.71	-6.57	-4.06	-15.44	0.50	-6.99	-6.40



注:与模型组相比, $^*P < 0.05$ 。(下同)

图 7 各组小鼠行为学评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

Figure 7 Comparison of behavioral scores in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.9 HXTLP 对小鼠关键蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组小鼠的脊髓组织显示 HSP90AA1 和 P-STAT3 蛋白的表达水平显著增加, P-PI3K/PI3K 和 P-AKT/AKT 比值显著降

低;在接受 HXTLP 治疗之后, HSP90AA1 和 P-STAT3 的蛋白表达水平显著下降, P-PI3K/PI3K 和 P-AKT/AKT 的比值显著提高,见图 9。结果显示, HXTLP 可能通过影响包括 STAT3、HSP90AA1 和 AKT1 在内的关键靶点,对 SCI 的治疗产生积极作用,进一步证实了预测的准确性。

3 讨论

在创伤导致的 SCI 中,脊髓组织首先经历原发性损伤,这一阶段主要与轴突和神经元的破坏有关,随后,继发性损伤由神经炎症引起,导致水肿、细胞凋亡和自由基生成等,造成组织坏死和功能缺陷^[11]。因此,应对和治疗 SCI 继发性损伤仍是一项挑战。HXTLP 含有多种活性成分,涉及多个靶点,在 SCI 领域展现出应用潜力,但是相关作用机制尚未明确。本研究通过网络药理学和分子对接技术、动物实验,从成分、靶点、通路多个层面探索 HXTLP 治疗 SCI 的作用机制。

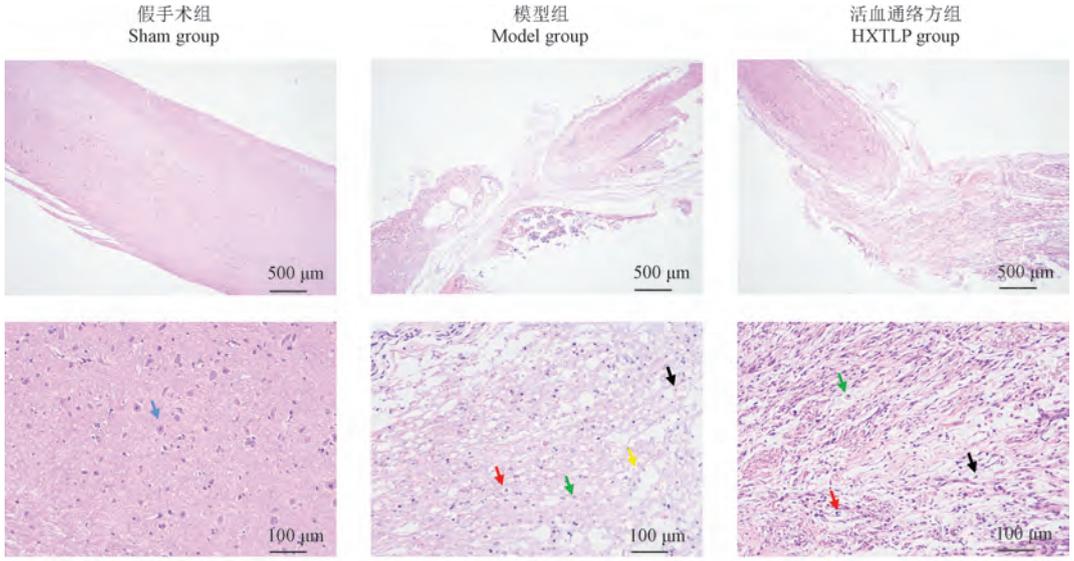
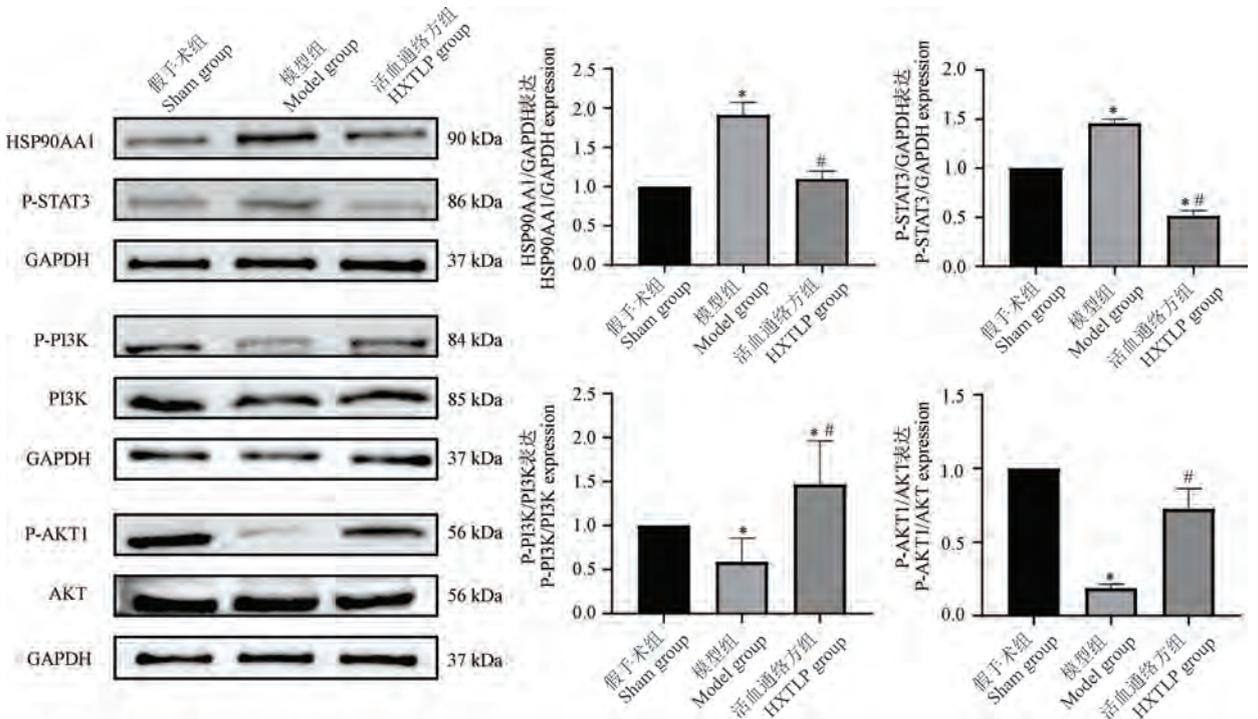


图 8 各组小鼠病理组织 HE 染色结果

Figure 8 HE staining results of pathological tissues of mice in each group



注:与假手术组相比, * $P < 0.05$ 。

图 9 活血通络方对各组小鼠关键蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$.

Figure 9 Effect of HXTLP on the expression of key proteins in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

从中药活性成分-靶点网络图上来看,β-谷甾醇、卡维汀、(3S,6S)-3-(苜基)-6-(4-羟基苜基)哌嗪-2,5-醌、黄芩素、扁桃醇处于网络中的核心位置,表明它们可能是 HXTLP 治疗 SCI 的核心成分。其中 β-谷甾醇是当归、半夏、防己三种中药

均含有的,作为一种植物类固醇,具有抗炎作用,研究显示,它具有和糖皮质激素地塞米松相似的药代动力学特性,可以用来治疗炎症性疾病^[12]。卡维汀同样具有良好的抗炎活性,可以通过抑制促炎细胞因子肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis

factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的产生以及核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活, 对多脂糖诱导的小鼠急性肺损伤具有保护作用^[13]。而在 SCI 中, 抑制 NF- κ B 信号通路可以阻止小胶质细胞表达促炎细胞因子, 如 IL-6、TNF- α 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等, 从而减少炎症引起的继发性损伤^[14]。汉黄芩素则可以通过抑制 STAT3 信号通路减轻 SCI 后神经元炎症反应、细胞凋亡, 促进神经功能恢复的治疗作用^[15]。以上研究表明 HXTLP 可能通过这些关键活性成分对 SCI 后的炎症反应起到抑制作用。现阶段关于其他有效成分对 SCI 的治疗作用的相关报道较少, 未来需进一步研究。

HXTLP 和 SCI 靶点交集筛选出 AKT1、STAT3、HSP90AA1、PIK3CA、PIK3R1、HRAS、ESR1、MAPK1、EGFR 等核心靶点。其中作为 PPI 网络中最重要的靶点 AKT1 参与的 PI3K-AKT 信号通路是一种细胞内信号转导途径, 在促进细胞增殖、粘附、侵袭、调节代谢以及维持细胞存活等多样细胞活动中扮演着至关重要的角色, 另一方面, 磷酸化的 AKT 促进细胞骨架细丝的组装和轴突的生长^[16-17]。动物实验表明, P-PI3K/PI3K 和 P-AKT/AKT 的比值显著提高, 表明磷酸化 AKT 被激活, 提示 HXTLP 可能促进 SCI 后轴突的发芽生长。HSP90AA1 是热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90) 的一种亚型, Hsp90 是广泛的细胞信号通路网络的关键调节因子。研究表明, 在动脉粥样硬化、心血管疾病和肺损伤中, Hsp90 抑制剂能够减轻炎症反应^[18]。STAT3 是酪氨酸蛋白激酶/信号转导与转录激活因子 (janus activated kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 信号通路的关键成员, 在活化的小胶质细胞介导的神经炎症中 JAK/STAT 通路发挥关键作用, 并且被认为是治疗神经炎症的有效靶点^[19]。通过动物实验验证最关键的 3 个靶点的蛋白表达, 符合实验预期, 体内实验进一步证明关键靶点的筛选是可靠的。MAPK1 则在细胞信号转导中起关键作用, 调控其活性可能促进 SCI 后运动功能恢复^[20]。另一关键靶点 EGFR 在中枢神经系统中调控细胞活化, 抑制其信号转导有助于调节 SCI 后炎症反应, 降低小胶

质细胞和星形胶质细胞活化, 减轻组织水肿, 最终促进 SCI 大鼠的形态和功能恢复^[21]。目前 HRAS、ESR1 与 SCI 的关系报道较少, 提示两者可能是修复 SCI 的新靶点。

GO 生物过程分析表明, HXTLP 的靶点主要涉及细胞对脂多糖的反应, 外界刺激反应的正向调节、磷酸化的正向调节、积极调节细胞迁移等多个生物过程, 表明 HXTLP 的有效成分可能通过调节细胞炎症反应、抑制氧化应激以及调控细胞凋亡等途径来治疗 SCI。KEGG 富集分析结果体现出, HXTLP 治疗 SCI 作用机制涉及 FoxO、P53、钙、cAMP、坏死性凋亡等信号通路。其中 FoxO 参与并涉及广泛的细胞功能, 包括细胞分化、凋亡、抗氧化应激, 其信号通路主要与 PI3K/AKT 途径相互作用。研究表明, 通过调控磷酸化 EGFR 和 AKT, 选择性地降低脊髓星形胶质细胞中 FoxO1 和 FoxO3a 的表达, 进而可以影响炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的释放^[22]。P53 信号通路在调控细胞周期阻滞和细胞凋亡等细胞过程具有显著影响, 研究报道, 牵张性 SCI 后受损神经元和少突胶质细胞的功能和结构可能是通过 P53 信号通路介导^[23]。cAMP 信号通路则是环核苷酸信号传导通路的一种, 已被证明可以控制炎症反应并驱动神经元和少突胶质细胞的内源性再生^[24]。此外, 研究证实刺激 cAMP 信号可增加受损感觉轴突的内在生长能力, 可能有助于促进 SCI 后的再生^[25]。

本研究利用网络药理学揭示了 HXTLP 治疗 SCI 的潜在关键活性成分和核心靶点, 为治疗 SCI 提供了指导, 并为新药研发提供理论依据, 有助于开发更好疗效的 SCI 治疗药物。分子对接结果验证了网络药理学预测的可信度和准确度, 同时动物实验结果进一步支持了 HXTLP 在减轻 SCI 发展方面的潜在效果。但是网络药理学作为一种计算与预测的学科, 可能存在一定的假阳性, 因此相关结果仍需进一步扩大样本量的实验研究和临床研究加以论证。

参 考 文 献 (References)

- [1] HUTSON T H, DI GIOVANNI S. The translational landscape in spinal cord injury: focus on neuroplasticity and regeneration [J]. Nat Rev Neurol, 2019, 15 (12): 732-745.

- [2] LIU D, LU G, SHI B, et al. ROS-scavenging hydrogels synergize with neural stem cells to enhance spinal cord injury repair via regulating microenvironment and facilitating nerve regeneration [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12 (18): e2300123.
- [3] SUN X, LIU H, TAN Z, et al. Remodeling microenvironment for endogenous repair through precise modulation of chondroitin sulfate proteoglycans following spinal cord injury [J]. *Small*, 2023, 19(6): e2205012.
- [4] 贺丰, 穆晓红, 付玲玲, 等. 脊髓损伤的中医研究现状 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2017, 12(3): 440-444.
HE F, MU X H, FU L L, et al. Present situation of TCM research on spinal cord injury [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2017, 12(3): 440-444.
- [5] 齐英娜, 吴鑫杰, 王延雷, 等. 从督论治脊髓损伤的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(6): 1425-1427.
QI Y N, WU X J, WANG Y L, et al. Research progress on treatment of spinal cord injury from Du [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2018, 29(6): 1425-1427.
- [6] 韦坚, 韦贵康, 陈峰, 等. 补肾活血中药对兔慢性颈脊髓压迫的电生理影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22 (1): 75-76.
WEI J, WEI G K, CHEN F, et al. Electrophysiological effects of Chinese herbs for tonifying kidney and promoting blood circulation on chronic cervical spinal cord compression in rabbits [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2007, 22(1): 75-76.
- [7] 陈锋, 黄有荣, 崔伟, 等. 活血方对脊髓型颈椎病脊髓微循环的影响 [J]. *广西中医药*, 2014, 37(3): 75-77.
CHEN F, HUANG Y R, CUI W, et al. Effect of Huoxue recipe on spinal microcirculation of cervical spondylotic myelopathy [J]. *Guangxi J Tradit Chin Med*, 2014, 37 (3): 75-77.
- [8] 杨明, 王朝平, 雷志强, 等. 川芎挥发油治疗心绞痛的网路药理学研究及实验验证 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(7): 867-878.
YANG M, WANG C P, LEI Z Q, et al. Network pharmacological study and experimental validation of Rhizoma Chuanxiong volatile oil in the treatment of angina pectoris [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(7): 867 -878.
- [9] 中华中医药学会. 中药汤剂煎煮规范. T/CACM1366-2021 [S]. 北京: 中国标准出版社; 2021.
Chinese Association of Traditional Chinese Medicine. Specification of traditional Chinese medicine decoction. T/ CACM1366-2021 [S]. Beijing: Standards Press of China; 2021.
- [10] BASSO D M, FISHER L C, ANDERSON A J, et al. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains [J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(5): 635-659.
- [11] STERNER R C, STERNER R M. Immune response following traumatic spinal cord injury: pathophysiology and therapies [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1084101.
- [12] MARAHATHA R, GYAWALI K, SHARMA K, et al. Pharmacologic activities of phytosteroids in inflammatory diseases: mechanism of action and therapeutic potentials [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 5103-5124.
- [13] NIU X, LIU F, LI W, et al. Cavidine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via NF- κ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Inflammation*, 2017, 40(4): 1111-1122.
- [14] ZHOU H J, WANG L Q, XU Q S, et al. Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKK β -NF- κ B signaling pathway activating microglial cells [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(1): 60-67.
- [15] SHAO W, ZHANG C, LI K, et al. Wogonin inhibits inflammation and apoptosis through STAT3 signal pathway to promote the recovery of spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2022, 1782: 147843.
- [16] 李志超, 李念虎, 薛海鹏, 等. 自噬及相关信号通路在脊髓损伤中的作用机制研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(8): 98-103.
LI Z C, LI N H, XUE H P, et al. Research progress on the mechanism of autophagy and relevant signaling pathways in spinal cord injury [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(8): 98-103.
- [17] AKRAM R, ANWAR H, JAVED M S, et al. Axonal regeneration: underlying molecular mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (12): 3186.
- [18] POCKLEY A G. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2002, 105 (8): 1012-1017.
- [19] ZHOU Z L, XIE H, TIAN X B, et al. Microglial depletion impairs glial scar formation and aggravates inflammation partly by inhibiting STAT3 phosphorylation in astrocytes after spinal cord injury [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(6): 1325-1331.
- [20] ZHANG C, WANG M M, ZHANG Y, et al. Downregulation of miRNA-127-5p aggravates spinal cord injury through activating MAPK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10617-10622.
- [21] YAN P, WU X, LIU X, et al. A causal relationship in spinal cord injury rat model between microglia activation and EGFR/MAPK detected by overexpression of microRNA-325-3p [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 68(2): 181-190.
- [22] XIA M, ZHU Y. FOXO3a involvement in the release of TNF- α stimulated by ATP in spinal cord astrocytes [J]. *J*

- Mol Neurosci, 2013, 51(3): 792-804.
- [23] HAN B, LIANG W, HAI Y, et al. Elucidating the potential mechanisms underlying distraction spinal cord injury-associated neuroinflammation and apoptosis [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 839313.
- [24] MUSSEN F, BROECKHOVEN J V, HELTINGS N, et al. Unleashing spinal cord repair: the role of cAMP-specific PDE inhibition in attenuating neuroinflammation and boosting regeneration after traumatic spinal cord injury [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8135.
- [25] ROBICHAUX W G 3rd, CHENG X. Intracellular cAMP sensor EPAC: physiology, pathophysiology, and therapeutics development [J]. Physiol Rev, 2018, 98(2): 919-1053.

[收稿日期] 2024-07-03

《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!

林晓瑛,张萌,周星辰,等. 两种表达人促甲状腺激素受体的质粒电穿孔诱导 Graves 病小鼠模型比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 14-22.

LIN X Y, ZHANG M, ZHOU X C, et al. Comparative study of two plasmid vectors expressing the human thyroid stimulating hormone receptor used to induce a mouse model of Graves' disease via electroporation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 14-22.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.002

两种表达人促甲状腺激素受体的质粒电穿孔诱导 Graves 病小鼠模型比较研究

林晓瑛,张萌,周星辰,吴梦芝,许华阳,王玲,伍丽萍*,施秉银*

(西安交通大学第一附属医院内分泌代谢科,西安 710061)

【摘要】 目的 本研究旨在通过比较在两种表达人促甲状腺激素受体(thyrotropin receptor, TSHR) A 亚单位基因的质粒载体在电穿孔介导下诱导 Graves 病动物模型的效果,为探索 Graves 病防治方法提供更为有效的研究工具。方法 构建表达 TSHR A 亚单位的两种质粒 pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR A,通过对 BALB/c 小鼠肌内注射并立即电穿孔的方式诱导 Graves 病,每3周1次,共4次。对照组小鼠使用 PBS。在第2次电穿孔后1周采血测定血清 TSHR 抗体(thyrotropin receptor antibodies, TRAb)。末次电穿孔后3周对小鼠进行心脏超声检查。末次电穿孔后4周处死小鼠,收集血液、甲状腺及眼眶组织,测定血清总甲状腺素(total thyroxine, TT4)并进行组织病理学检查。结果 pcDNA3.1-TSHR A 组($n = 15$)和 pTriEx1.1-TSHR A 组($n = 13$)小鼠血清 TRAb 平均值分别为 (6.9 ± 2.0) U/L 和 (7.5 ± 2.2) U/L。后者显著高于对照组 (4.9 ± 0.5) U/L ($P = 0.033$)。pcDNA3.1-TSHR A 组和 pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 平均值分别为 (41.4 ± 23.8) ng/mL 和 (63.2 ± 53.7) ng/mL,均高于对照组 (20.2 ± 4.0) ng/mL ($P < 0.01$)。甲状腺病理显示模型组小鼠甲状腺滤泡上皮增生并且有 T 细胞浸润。心脏超声显示 pTriEx1.1-TSHR A 组的左心室质量高于对照组($P = 0.007$)和 pcDNA3.1-TSHR A 组($P = 0.012$)。眼眶病理显示模型组小鼠的眼外肌中存在纤维化改变。结论 表达 TSHR A 亚单位的 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 均能通过电穿孔法成功诱导 Graves 病小鼠模型,且诱导甲状腺功能亢进和甲亢眼病的效能相近。pTriEx1.1-TSHR A 诱导甲状腺毒症性心脏病的效能优于 pcDNA3.1-TSHR A。

【关键词】 Graves 病;质粒;电穿孔;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0014-09

Comparative study of two plasmid vectors expressing the human thyroid stimulating hormone receptor used to induce a mouse model of Graves' disease via electroporation

LIN Xiaoying, ZHANG Meng, ZHOU Xingchen, WU Mengzhi, XU Huayang, WANG Ling, WU Liping*, SHI Bingyin*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: WU Liping. E-mail: plwzw999@163.com; SHI Bingyin. E-mail: shibingy@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金(82170805,81670725,81873638,81970679)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82170805,81670725,81873638,81970679)。

【作者简介】 林晓瑛,女,在读博士研究生,研究方向:甲状腺自身免疫疾病。Email: lxy1024@stu.xjtu.edu.cn

【通信作者】 施秉银,男,教授,主任医师,硕士,研究方向:甲状腺自身免疫疾病,内分泌代谢性疾病。Email: shibingy@126.com;

伍丽萍,女,副研究员,主治医师,博士,研究方向:甲状腺自身免疫疾病。Email: plwzw999@163.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to provide a more effective method for researching the prevention and treatment of Graves' disease by comparing the effects of two plasmid vectors expressing the human thyrotropin receptor (TSHR) A subunit gene in inducing an animal model of Graves' disease via electroporation. **Methods** Plasmids pcDNA3.1-TSHR A, and pTriEx1.1-TSHR A expressing the TSHR A subunit were constructed and used to induce Graves' disease by intramuscular injection with immediate electroporation once every 3 weeks for a total of 4 times. Mice in the control group were injected with PBS. One week after the second electroporation, blood was collected to measure serum thyrotropin receptor antibody (TRAb). Three weeks following the last electroporation, echocardiography was performed on the mice. Mice were sacrificed 4 weeks after the last electroporation; blood, thyroid, and orbital tissues were collected; serum total thyroxine (TT4) was measured; and histological examination was performed. **Results** The average concentrations of serum TRAb in the pcDNA3.1-TSHR A group ($n = 15$) and the pTriEx1.1-TSHR A group ($n = 13$) were (6.9 ± 2.0) U/L and (7.5 ± 2.2) U/L, respectively. The latter was significantly higher than that in the control group (4.9 ± 0.5) U/L ($P = 0.033$). The average concentrations of serum TT4 in the pcDNA3.1-TSHR A group and pTriEx1.1-TSHR A group were (41.4 ± 23.8) ng/mL and (63.2 ± 53.7) ng/mL, respectively, both higher than that in the control group: (20.2 ± 4.0) ng/mL ($P < 0.01$). Thyroid pathology showed thyroid follicular epithelial hyperplasia with T-cell infiltration in the model group. Echocardiography showed that the left ventricle mass in the pTriEx1.1-TSHR A group was higher than those in the control group ($P = 0.007$) and pcDNA3.1-TSHR A group ($P = 0.012$). Orbital pathology showed fibrotic changes in the extraocular muscles of mice in the model groups. **Conclusions** Both pcDNA3.1 and pTriEx1.1 expressing the TSHR A subunit were able to induce Graves' disease in mice by electroporation, and the efficiency of the two plasmids in inducing hyperthyroidism and Graves' ophthalmopathy was similar. The efficiency of pTriEx1.1-TSHR A in inducing thyrotoxic heart disease was better than that of pcDNA3.1-TSHR A.

【Keywords】 Graves' disease; plasmid; electroporation; mice

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

Graves 病是一种累及甲状腺和全身多器官的自身免疫病,是导致甲状腺功能亢进最常见的原因^[1]。甲状腺功能亢进会导致新陈代谢和能量消耗增加的一系列症状^[2-3]。此外,Graves 病还可能伴有甲状腺毒症性心脏病和眼病的症状^[4-5]。Graves 病现有的治疗方法包括抗甲状腺药物、碘 131 治疗和手术治疗,各有优劣^[6-9]。因此,Graves 病仍然有待进一步研究。

小鼠模型是研究 Graves 病的重要工具。和人类不同,小鼠不会自发发生 Graves 病,不同的研究人员采用了许多不同的方法诱导小鼠出现 Graves 病表型。过去最常用的方法是用腺病毒作为促甲状腺激素受体(thyrotropin receptor, TSHR) A 亚单位的表达载体,肌肉注射诱导小鼠 Graves 病,重复 3 次可以诱导小鼠 Graves 病甲亢表型^[10],随着重复次数的增加可以诱导小鼠 Graves 病眼病表型^[11]。但腺病毒的包装过程复杂且包装后的效能并不稳定,为了优化造模方法,有研究者开始尝试使用质粒作为载体诱导 Graves 病小鼠模型,质粒的制备与腺病毒相比更加简单且

稳定。但是直接注射质粒难以高效地诱导 Graves 病小鼠模型^[12]。所以有研究者在注射质粒的同时,对小鼠进行电穿孔,通过电场的作用,将质粒转染进入小鼠细胞内,这种方法提高了质粒的转染效能,并成功诱导了 Graves 病小鼠模型。

最早在电穿孔辅助下使用质粒作为 TSHR A 亚单位的载体成功诱导 Graves 病动物模型的是日本 KANEDA 等^[13]在 80% ~ 90% 的小鼠中诱导出了甲亢。随后,PAUL BANGA 的研究团队采用了新的质粒 pTriEx-1.1 Neo 进行造模^[14],稳定地诱导小鼠出现 Graves 病甲亢和甲亢并发症眼病表型^[15-22]。同时,pcDNA3.1 质粒也被报道可以作为载体,诱导小鼠出现 Graves 病甲亢和眼病表型^[23-26]。然而,pcDNA3.1 是一种能够在哺乳动物细胞中高效表达的质粒,pTriEx1.1 是一种能够在多种表达系统中高效表征靶基因的质粒,两者的造模情况并未进行比较。因此,本研究旨在比较这两种质粒载体的诱导效果,为之后使用表达 TSHR A 亚单位的质粒电穿孔方法诱导 Graves 病模型时质粒载体的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 38 只雌性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体重 17 ~ 20 g, 购于西安交通大学实验动物中心【SCXK(陕)2023-002】。小鼠饲养在西安交通大学实验动物中心【SYXK(陕)2023-004】, 温度 20 ~ 22 °C, 湿度 24% ~ 28%, 每日 12 h 光照/12 h 黑暗, 能够自由获得食物和水。本研究方案经西安交通大学医学部动物实验伦理审查批准(2018-159)。

1.1.2 主要试剂与仪器

pcDNA3.1 (汉恒生物, 上海, 中国); pTriEx1.1 (淼灵生物, 武汉, 中国); DH5 α 化学感受态细胞(擎科生物, 北京, 中国); 兔抗 CD3 多克隆抗体, 兔抗 CD4 多克隆抗体, HRP 标记的山羊抗兔免疫组化多聚二抗(赛维尔生物, 武汉, 中国); EndoFree Plasmid Mega Kits(凯杰, 德国); 人血清促甲状腺素受体自身抗体放射受体分析试剂盒(协和医药, 天津, 中国); 碘【125I】-甲状腺

素放射免疫分析药盒(协和医药, 天津, 中国)。

Nanodrop 分光光度计(赛默飞, 美国); ECM 830 系统(哈佛仪器 BTX, 美国); 7 mm 镊子电极(哈佛仪器 BTX, 美国); Vevo 1100 小动物超声成像系统(VisualSonics, 加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 表达 TSHR289 质粒 DNA 的准备和克隆

使用了两种质粒表达载体, 分别是: (1) pcDNA3.1, 一种高效的哺乳动物表达载体; (2) pTriEx1.1, 一种多系统表达质粒。扩增人 TSHR A 亚单位(氨基酸残基 22 ~ 289)用于克隆。使用表 1 中的引物分别将 TSHR A 亚单位 cDNA 区克隆到 pcDNA3.1 的 EcoR I 和 Cla I 限制性位点之间和 pTriEx1.1 的 BamH I 和 Not I 限制性位点之间, 构建重组质粒 pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR A, 并且对两个重组质粒均进行全测序。

质粒转化到 DH5 α 化学感受态细胞中进行扩增, 并使用 EndoFree Plasmid Mega Kits 纯化。将纯化的质粒重悬于无菌双蒸水中, 使用 Nanodrop 分光光度计测量浓度, 并在 4 °C 下储存。

表 1 用于构建重组质粒的引物序列

Table 1 Sequence of primers used in the construction of recombinant plasmids

重组质粒 Recombinant plasmids	引物序列(5'-3') Sequence of primers(5'-3')
pcDNA3.1-TSHR A	F: TAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGTTGAATTCCTCCCGAGTCCCGTGGAAAAT R: ATCGCAGATCCTTACTAGTATCGATTCTAGATATCAGTATGGTGGTGGT
pTriEx1.1-TSHR A	F: TGGCGATATCCCGGGAGCTCCTGGATCCATGAGGCGATTTCGGAGGAT R: GCACGTGTATACAGCTGTGCGGCCGCTTACTGATTCTTAAAAGCACAG

1.2.2 活体肌内注射质粒 DNA 和电穿孔免疫诱导 Graves 病

小鼠随机分为 3 组, 对照组 10 只以及两个模型组 pcDNA3.1-TSHR A 组和 pTriEx1.1-TSHR A 组分别 15 只和 13 只。小鼠麻醉后剃去双侧后腿股二头肌(大腿)的毛发, 用胰岛素注射器双腿分别注射 50 μ L 含 1 mg 质粒的 PBS, 对照组注射不含质粒的 PBS。并立即在注射部位用 ECM 830 系统和 7 mm 镊子电极以 200 V/cm 的电场强度进行电穿孔, 共施加 10 个方波脉冲, 每次持续时间为 20 ms, 频率 1 Hz, 导致明显的肌肉抽搐。电穿孔结束观察动物从麻醉中恢复过来, 并监测是否有痛苦的迹象。小鼠每隔 3 周进行 1 次肌内注

射并电穿孔, 共进行 4 次。在第 2 次电穿孔后 1 周采血, 将血清样本存储在 -80 °C, 直至测定血清 TSHR 抗体 (thyrotropin receptor antibodies, TRAb)。末次电穿孔后 3 周对小鼠进行心脏超声检查。在最后 1 次干预后 4 周处死小鼠, 并收集血液、甲状腺及眼眶组织(图 1), 将血清样品储存在 -80 °C, 直至测定血清总甲状腺素 (total thyroxine, TT4)。

1.2.3 小鼠心脏超声

末次电穿孔后 3 周, 小鼠在异氟烷麻醉下用 Vevo 1100 小动物超声成像系统进行心脏超声检查。检查指标包括舒张末期室间隔厚度, 收缩末期室间隔厚度, 左心室舒张末期内径, 左心室舒

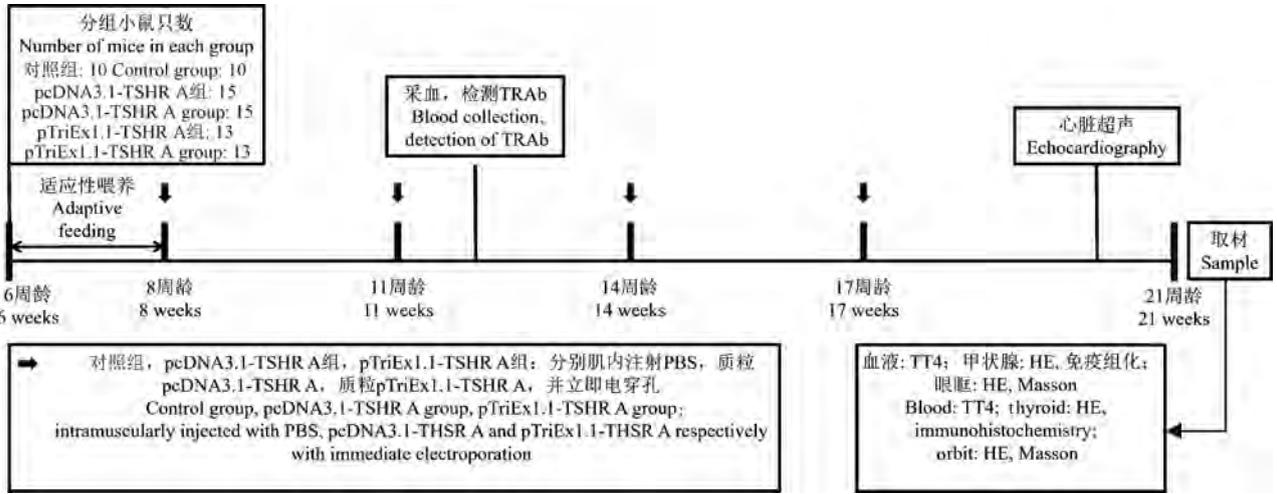


图 1 实验流程

Figure 1 Experiment process

张末期内径,舒张末期左心室后壁厚度,收缩末期左心室后壁厚度,射血分数,短轴缩短率,左心室质量,左心室舒张末期容积,左心室收缩末期容积和心率。

1.2.4 血清 TRAb 和 TT4 的测量

分别使用人血清促甲状腺素受体自身抗体放射受体分析试剂盒和碘¹²⁵I-甲状腺素放射免疫分析药盒测量血清 TRAb 和血清 TT4。

1.2.5 甲状腺和眼眶组织的组织学检查

收集甲状腺组织固定在 4% 甲醛中。甲状腺组织包埋在石蜡中,并切片进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色以及 CD3 和 CD4 免疫组化染色。眼眶组织包埋在石蜡中,脱蜡后将切片进行 HE 染色和 Masson 染色。

1.3 统计学分析

统计分析采用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行。实验结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。评估所有连续变量的正态性,对正态分布的数据使用单因素方差分析比较组间差异,对非正态分布的数据使用 Kruskal-Wallis 检验比较组间差异。对二分类变量使用 fisher 精确检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

为了确定重组质粒是否构建成功,对两个重组质粒进行测序,并将测序结果在 Genbank 中和已发表的人 TSHR A 亚单位的 mRNA 序列 NM_

000369.5 比对,比对结果显示序列一致(图 2)。

2.2 小鼠甲状腺功能水平

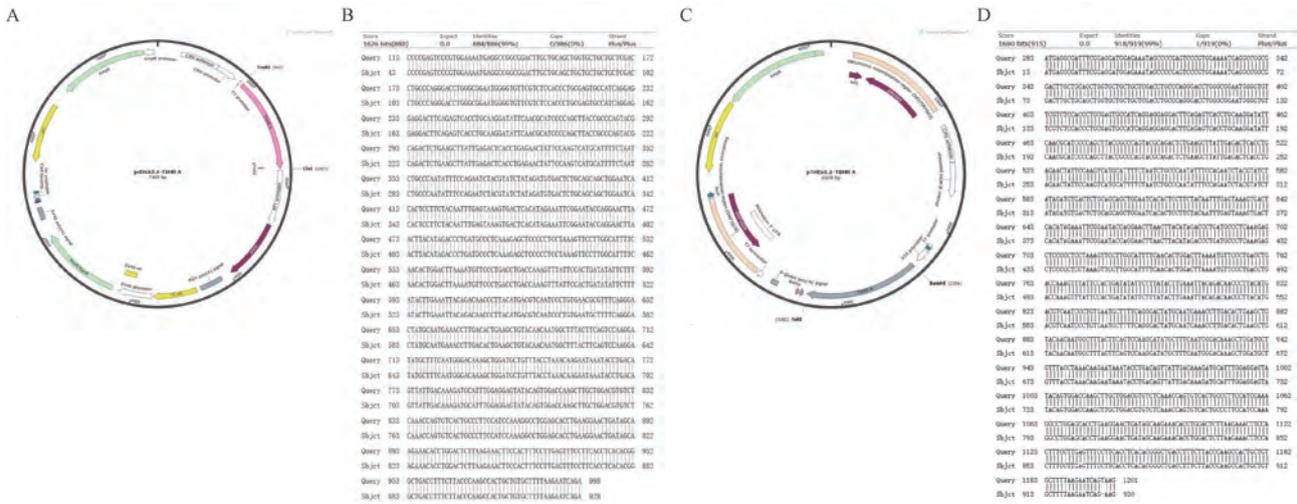
2.2.1 血清 TRAb 水平

对照组小鼠血清 TRAb 为 (4.9 ± 0.5) U/L, pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 为 (7.5 ± 2.2) U/L, 显著高于对照组 ($P = 0.033$), pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 为 (6.9 ± 2.0) U/L, 与对照组和 pTriEx1.1-TSHR A 组均无显著性差异(图 3A)。

以对照组小鼠血清 TRAb 的 $(\bar{x} + 2s)$ 为正常上限,即 6.0 U/L, 超出正常上限为 TRAb 阳性, pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 的阳性率为 71.4% ($P = 0.015$), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TRAb 的阳性率为 66.7% ($P = 0.015$), 差异均具有显著性,两模型组间无显著性差异(图 3B)。

2.2.2 血清 TT4 水平

造模结束后测得对照组小鼠血清 TT4 平均值为 (20.2 ± 4.0) ng/mL, pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 平均值为 (41.4 ± 23.8) ng/mL ($P = 0.001$), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 平均值为 (63.2 ± 53.7) ng/mL ($P < 0.001$), 差异均具有显著性。两个模型组之间没有显著性差异 ($P = 0.152$) (图 3C)。以对照组小鼠血清 TT4 的 $(\bar{x} + 2s)$, 即 28.2 ng/mL 为正常上限, 超出正常上限为 TT4 阳性, pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 的阳性率为 73.3% ($P < 0.001$), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠血清 TT4 的阳性率为 91.7% ($P <$

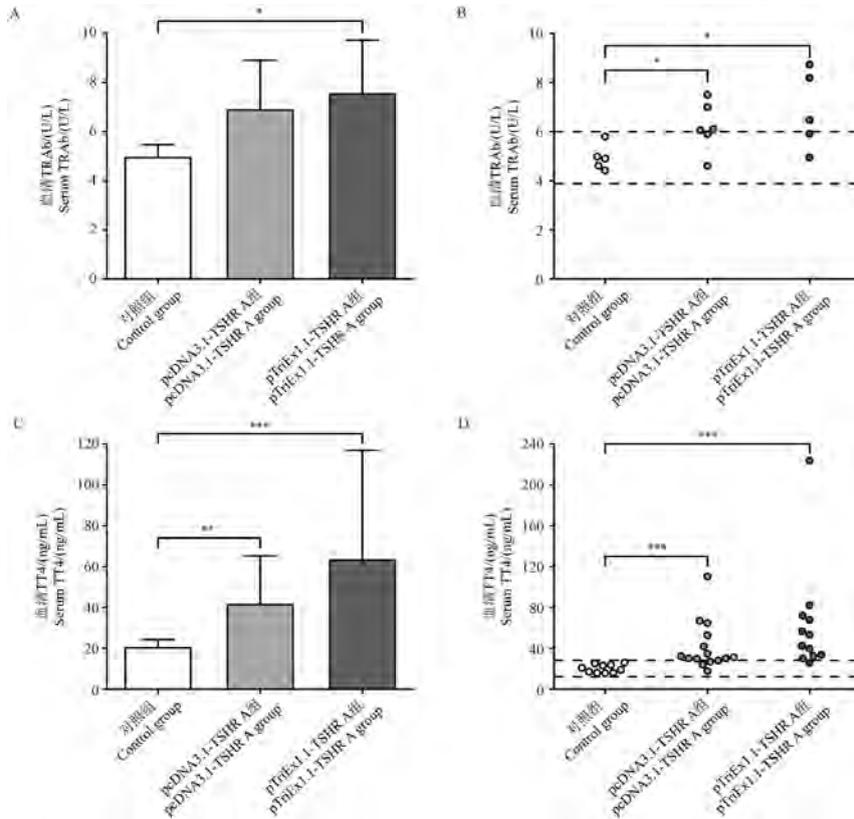


注:A:pcDNA3.1-TSHR A的质粒图谱;B:pcDNA3.1-TSHR A测序结果与人TSHR A亚单位的mRNA序列之间的比对;C:pTriEx1.1-TSHR A的质粒图谱;D:pTriEx1.1-TSHR A测序结果与人TSHR A亚单位的mRNA序列之间的比对。

图2 表达TSHR A的重组质粒的构建和鉴定

Note. A. Plasmid profile of pcDNA3.1-TSHR A. B. Alignment between sequencing results of pcDNA3.1-TSHR A and the mRNA sequence of human TSHR A subunit. C. Plasmid profile of pTriEx1.1-TSHR A. D. Alignment between sequencing results of pTriEx1.1-TSHR A and the mRNA sequence of human TSHR A subunit.

Figure 2 Construction and identification of recombinant plasmids expressing TSHR A



注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图3 甲状腺功能的对比

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

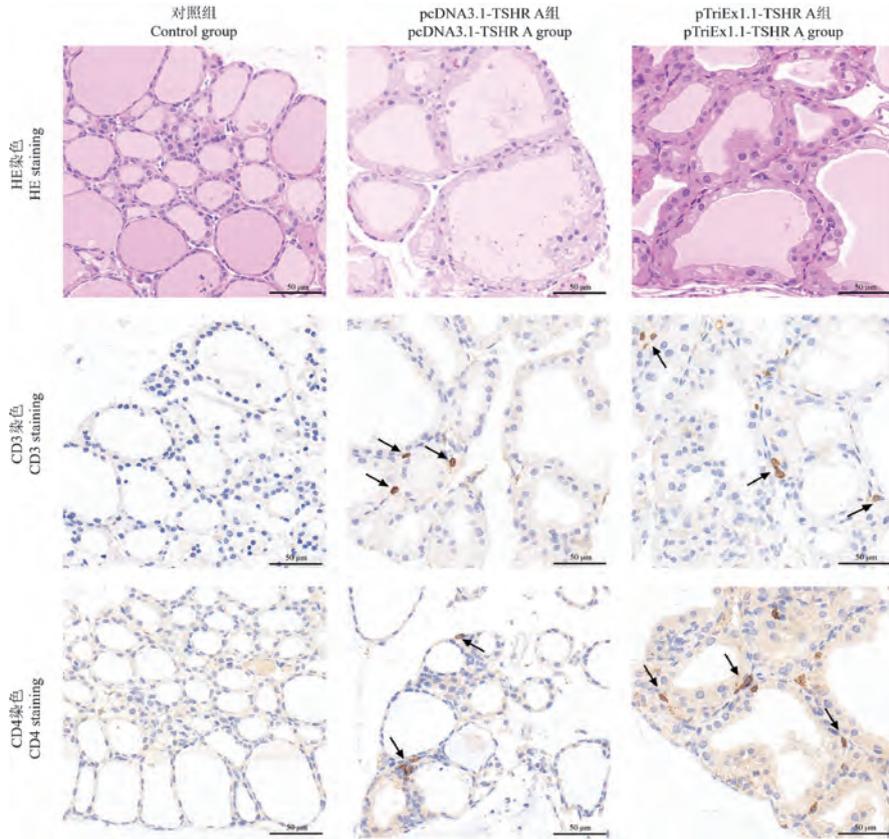
Figure 3 Comparison of thyroid function

0.001), 差异均具有显著性, 两模型组间无显著性差异(图 3D)。

2.3 小鼠甲状腺病理改变

小鼠甲状腺标本 HE 染色和免疫组化染色结果在光镜下 40 倍观察可见(图 4): 对照组小鼠甲状腺滤泡上皮细胞呈扁平状, 模型组小鼠甲状腺

滤泡上皮细胞显著增生呈立方状或高柱状, 部分滤泡细胞形成乳头状折叠向滤泡腔内突起, 滤泡间隙可见 T 淋巴细胞浸润。其中 pcDNA3.1-TSHR A 组小鼠甲状腺增生比例为 45.5% (5/11), pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠甲状腺增生比例为 60% (3/5)。



注: 箭头: 免疫组化染色阳性细胞。

图 4 甲状腺的病理改变

Note. Arrow. Cells positive for immunohistochemical staining.

Figure 4 Pathologic change of thyroid

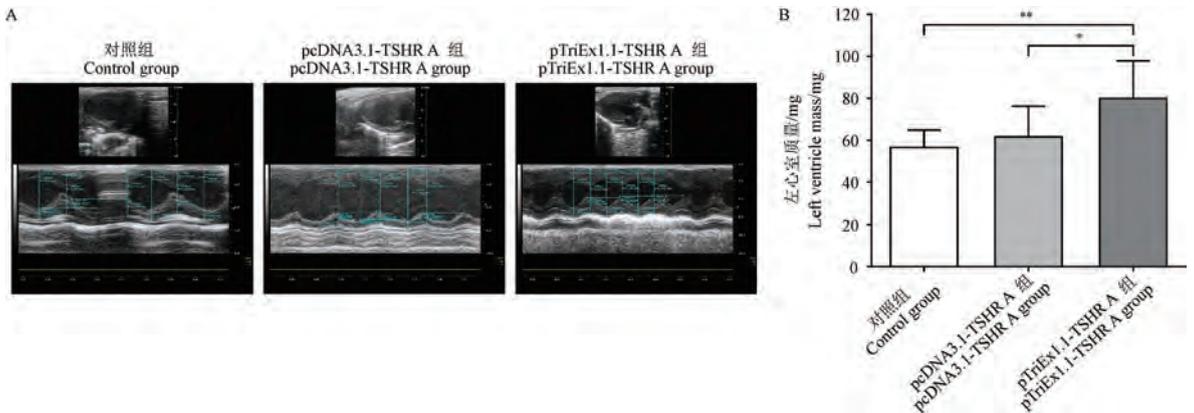


图 5 心脏超声的对比

Figure 5 Comparison of echocardiography

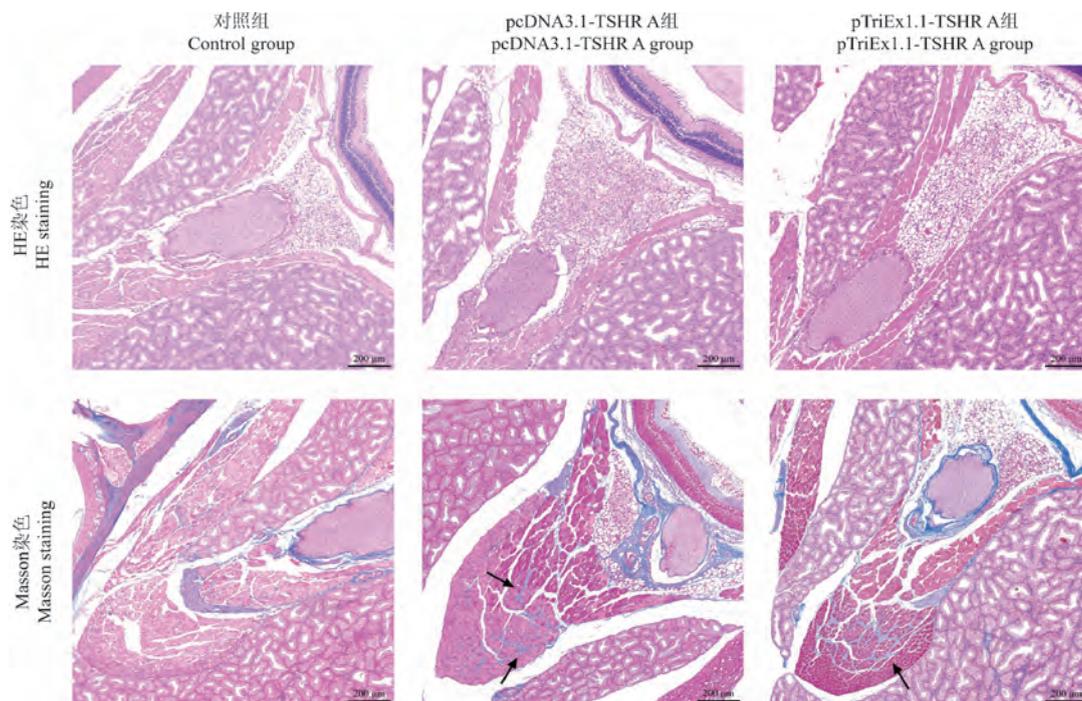
2.4 模型组小鼠心脏超声的改变

pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠左心室质量平均值为 (79.9 ± 17.9) mg, 高于对照组 (56.5 ± 8.4) mg ($P = 0.007$) 和 pcDNA3.1-TSHR A 组 (61.6 ± 14.7) ($P = 0.012$) (图 5)。提示 pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠存在左心室心肌肥厚。其余指标

各组间无明显差异。

2.5 模型组小鼠眼眶组织学改变

小鼠眼眶标本 HE 和 Masson 染色结果在光镜下 10 倍观察见(图 6):HE 染色可见模型组小鼠球后脂肪增多, Masson 染色在模型组小鼠的眼外肌中观察到纤维化改变, 肌肉间隙胶原纤维增多。



注:箭头:眼外肌中的纤维化改变。

图 6 眼眶的病理改变

Note. Arrow. Fibrosis in extraocular muscles.

Figure 6 Pathologic change of orbit

3 讨论

小鼠模型是 Graves 病的重要研究手段。通过在鼠体内表达 TSHR A 亚单位使小鼠产生 TRAb 是诱导小鼠发生 Graves 病的有效方法。本研究在电穿孔介导下通过两种表达人 TSHR A 亚单位基因的质粒载体成功诱导 Graves 病甲亢表型和眼病表型, 同时还比较了两种质粒的效果, 并且首次在该模型中发现甲状腺毒症性心脏病表型。

Graves 病是由于机体产生了 TRAb, 与甲状腺上的 TSHR 结合, 刺激甲状腺, 导致甲状腺激素过量合成和分泌, 从而表现出甲状腺功能亢进的一系列症状^[27]。本研究检测小鼠血清 TRAb 和 TT4, 发现 pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR

A 早期即可引起 TRAb 升高, 并最终分别诱导 73.3% 和 91.7% 的小鼠出现 Graves 病甲亢表型, 符合 Graves 病在人体发展模式。此外, 和之前的研究一样^[14,24], 本研究观察到了甲状腺滤泡上皮增生伴淋巴细胞浸润。而之前在 KANEDA 等^[13]使用 pC1-IRES- Δ CD4 和 pBacMam-2 作为载体的模型中没有观察到淋巴细胞浸润, 说明不同质粒作为载体的造模效果可能并不一致, 而 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 诱导的模型更接近人体的病理变化。

此外, 本研究首次报道了质粒电穿孔诱导的 Graves 病模型的超声改变, pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠跟对照组和 pcDNA3.1-TSHR A 组相比, 有更高的左心室质量。左心室质量的升高提示存在左心室心肌肥厚, 符合甲状腺毒症性心脏病

早期的表现。其他检测指标并未显示出差异,可能是由于检查是在麻醉下进行的,其他指标受麻醉影响可能无法反映真实水平^[28]。pcDNA3.1-TSHR A 和 pTriEx1.1-TSHR A 造模小鼠心脏超声的差异再次证明不同质粒作为载体的造模效果可能并不一致,在诱导甲状腺毒症性心脏病方面 pTriEx1.1-TSHR A 的效能优于 pcDNA3.1-TSHR A。

本研究还检测了眼眶的病理,在 pcDNA3.1-TSHR A 组和 pTriEx1.1-TSHR A 组小鼠中均观察到眼外肌中纤维化改变,并非所有表现出甲亢表型的小鼠均出现了眼病表型。Graves 眼病可能和胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R) 抗体的产生有关^[29]。虽然本研究中并未检测,但之前的研究表明使用 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 作为载体时,小鼠体内产生 TRAb 和 IGF1R 抗体并不是平行的^[14],因此并非所有甲亢小鼠都出现眼病。

值得注意的是,血清 TT4 的检测及组织病理学检查的结果显示 pTriEx1.1 作为 TSHR A 亚单位的载体在诱导 Graves 病甲亢表型和眼病表型方面有优于 pcDNA3.1 的趋势。本次研究的结果并未显示统计学意义,考虑可能与实验样本量不足有关,未来将增加实验小鼠只数进一步比较两种质粒诱导 Graves 病模型的效果。此外,本研究由于取材的失误,并未取得足够的甲状腺和眼眶组织样本,这可能是导致组织学检查没有显著性差异的原因。

总的来说,本研究表明 pcDNA3.1 和 pTriEx1.1 作为 TSHR A 亚单位的载体都在电穿孔的辅助下通过重复 4 次注射能够诱导小鼠出现 Graves 病甲亢表型及眼病表型,并首次报道了使用 pTriEx1.1 作为载体时可以同时诱导出甲状腺毒症性心脏病表型。以质粒作为表达载体诱导 Graves 病的模型极好地模拟了 Graves 病在人体的发病过程,可以作为将来 Graves 病研究的可靠方法。

参 考 文 献 (References)

[1] ROSS D S, BURCH H B, COOPER D S, et al. 2016 American thyroid association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis [J]. *Thyroid*, 2016, 26(10): 1343-1421.

[2] SMITH T J, HEGEDUS L. Graves' disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(16): 1552-1565.

[3] LEE S Y, PEARCE E N. Hyperthyroidism: a review [J]. *JAMA*, 2023, 330(15): 1472-1483.

[4] 滕卫平, 单忠艳, 孙殿军, 等. 甲状腺学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社; 2021.

TENG W P, SHAN Z Y, SUN D J, et al. *Thyroidology* [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press; 2021.

[5] BAHN R S. Graves' ophthalmopathy [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(8): 726-738.

[6] ABRAHAM P, AVENELL A, MCGEOCH S C, et al. Antithyroid drug regimen for treating Graves' hyperthyroidism [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, 1: CD003420.

[7] VITTI P, RAGO T, CHIOVATO L, et al. Clinical features of patients with Graves' disease undergoing remission after antithyroid drug treatment [J]. *Thyroid*, 1997, 7(3): 369-375.

[8] ALLAHABADIA A, DAYKIN J, HOLDER R L, et al. Age and gender predict the outcome of treatment for Graves' hyperthyroidism [J]. 2000, 85(3): 1038-1042.

[9] KAHALY G J. Management of Graves thyroidal and extrathyroidal disease: an update [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(12): 3704-3720.

[10] CHEN C R, PICHURIN P, NAGAYAMA Y, et al. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1897-1904.

[11] ZHANG M, DING X, WU L P, et al. A promising mouse model of Graves' orbitopathy induced by adenovirus expressing thyrotropin receptor A subunit [J]. *Thyroid*, 2021, 31(4): 638-648.

[12] 伍丽萍, 施秉银, 旬利茹, 等. Graves 病动物模型诱导方法及持续时间的探讨 [J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(10): 793-797.

WU L P, SHI B Y, XUN L R, et al. An exploration of induction methodology and experimental duration of Graves disease animal model [J]. *Chin J Intern Med*, 2012, 51(10): 793-797.

[13] KANEDA T, HONDA A, HAKOZAKI A, et al. An improved Graves' disease model established by using *in vivo* electroporation exhibited long-term immunity to hyperthyroidism in BALB/c mice [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(5): 2335-2344.

[14] ZHAO S X, TSUI S, CHEUNG A, et al. Orbital fibrosis in a mouse model of Graves' disease induced by genetic immunization of thyrotropin receptor cDNA [J]. *J Endocrinol*, 2011, 210(3): 369-377.

- [15] PHILIPP S, HORSTMANN M, HOSE M, et al. An early wave of macrophage infiltration intertwined with antigen-specific proinflammatory T cells and browning of adipose tissue characterizes the onset of orbital inflammation in a mouse model of Graves' orbitopathy [J]. *Thyroid*, 2022, 32(3): 283–293.
- [16] PARK M, BANGA J P, KIM G J, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorate orbital adipogenesis in female mice models of Graves' ophthalmopathy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 246.
- [17] SCHLÜTER A, ECKSTEIN A K, BRENZEL A, et al. Noninflammatory diffuse follicular hypertrophy/hyperplasia of Graves disease; morphometric evaluation in an experimental mouse model [J]. *Eur Thyroid J*, 2018, 7(3): 111–119.
- [18] PARK M, KIM J Y, KANG J M, et al. PRL-1 overexpressed placenta-derived mesenchymal stem cells suppress adipogenesis in Graves' ophthalmopathy through SREBP2/HMGCR pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 304.
- [19] MASETTI G, MOSHKELGOSHA S, KÖHLING H L, et al. Gut microbiota in experimental murine model of Graves' orbitopathy established in different environments may modulate clinical presentation of disease [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 97.
- [20] SCHLÜTER A, HORSTMANN M, DIAZ-CANO S, et al. Genetic immunization with mouse thyrotrophin hormone receptor plasmid breaks self-tolerance for a murine model of autoimmune thyroid disease and Graves' orbitopathy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 191(3): 255–267.
- [21] ENDO T, KOBAYASHI T. Immunization of mice with a newly identified thyroid-stimulating hormone receptor splice variant induces Graves'-like disease [J]. *J Autoimmun*, 2013, 43: 18–25.
- [22] MOSHKELGOSHA S, SO P W, DEASY N, et al. Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-*in vivo* electroporation [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 3008–3015.
- [23] XIA N, YE X, HU X, et al. Simultaneous induction of Graves' hyperthyroidism and Graves' ophthalmopathy by TSHR genetic immunization in BALB/c mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174260.
- [24] ZHENG W, WANG R, TAN J, et al. An improved method for the establishment of a model of Graves' disease in BALB/c mice [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1471–1478.
- [25] WANG X, LIU W, RUI Z, et al. Immunotherapy with a biologically active ICAM-1 MAb and an siRNA targeting TSHR in a BALB/c mouse model of Graves' disease [J]. *Endokrynol Pol*, 2021, 72(6): 592–600.
- [26] WU R, LI N, WANG X, et al. Mouse model of Graves' orbitopathy induced by the immunization with TSHR A and IGF-1R α subunit gene [J]. *J Endocrinol Invest*, 2024, 47(10): 2507–2519.
- [27] DAVIES T F, ANDERSEN S, LATIF R, et al. Graves' disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 53.
- [28] ROTH D M, SWANEY J S, DALTON N D, et al. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282(6): H2134–H2140.
- [29] SMITH T J. TSH-receptor-expressing fibrocytes and thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(3): 171–181.

[收稿日期] 2024–10–11

张琦,隋国媛,宋囡,等. 基于 ApoA-I 调控胆固醇逆向转运探讨磷脂酰胆碱对高脂血症小鼠的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 23-33.

ZHANG Q, SUI G Y, SONG N, et al. Based on the regulation of cholesterol reverse transport by ApoA-I, to explore the effect of phosphatidylcholine on hyperlipidemic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 23-33.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.003

基于 ApoA-I 调控胆固醇逆向转运探讨磷脂酰胆碱对高脂血症小鼠的影响

张琦,隋国媛,宋囡,贾连群*

(辽宁中医药大学,沈阳 110847)

【摘要】 目的 基于载脂蛋白 a-I (apolipoprotein a-I, ApoA-I) 基因敲除小鼠探究磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 改善胆固醇逆向转运的作用及机制。方法 采用随机数字表法将 30 只 ApoA-I^{-/-} 小鼠分为 ApoA-I^{-/-} 组、ApoA-I^{-/-} + HFD 组、ApoA-I^{-/-} + HFD + PC 组; 30 只 C57BL/6J 小鼠作为对照分为 WT 组、WT + HFD 组、WT + HFD + PC 组, 每组 10 只。ApoA-I^{-/-} 组和 WT 组给予基础饲料饲喂, 其余组给予高脂饲料饲喂 8 周建立高脂血症模型。于第 9 周开始, ApoA-I^{-/-} + HFD + PC 组及 WT + HFD + PC 组给予 PC 2.5 g/(kg·d), 其余小鼠给予生理盐水灌胃, 共干预 4 周。全自动分析仪检测小鼠血清血脂水平, 苏木素-伊红 (HE) 染色及油红 O 染色观察小鼠肝组织病理形态学变化, COD-PAP 法检测小鼠肝组织中胆固醇水平, ELISA 法检测小鼠血清中卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) 水平, RT-qPCR 法及 Western Blot 检测肝组织中 ATP 结合盒转运子 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)、ATP 结合盒转运子 G1 (ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1)、LCAT、肝酯酶 (hepatic lipase, HL)、B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-B1) 及低密度脂蛋白胆固醇受体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) mRNA 及蛋白表达。结果 与 WT 组比较, WT + HFD 组小鼠血清中血脂水平显著升高 ($P < 0.01$), LCAT 水平显著降低 ($P < 0.05$), 肝细胞脂肪空泡明显, 肝脂质沉积显著, 肝组织中 TC 水平显著升高 ($P < 0.01$), ABCA1、ABCG1、LCAT、SR-B1、HL 及 LDL-R mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 WT + HFD 组比较, WT + HFD + PC 组小鼠血清中血脂水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), LCAT 水平显著升高 ($P < 0.05$), 肝细胞脂肪空泡显著减少, 肝脂质沉积减轻, 肝组织中 TC 水平显著减低 ($P < 0.05$), ABCA1、LCAT、SR-B1、HL 及 LDL-R mRNA 及蛋白表达显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); ApoA-I^{-/-} + HFD 组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平显著升高, LCAT、HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 肝细胞发生气球样变, 肝脂质沉积显著加重, 肝组织中 TC 水平显著升高 ($P < 0.05$), ABCA1、LCAT、HL mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 WT + HFD + PC 组比较, ApoA-I^{-/-} + HFD + PC 组小鼠血清中血脂水平显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), LCAT 水平显著降低 ($P < 0.05$), 肝细胞脂肪空泡明显, 肝脂质沉积显著, 肝组织中 TC 水平显著升高 ($P < 0.05$), ABCA1、ABCG1、LCAT、SR-B1 及 HL mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 磷脂酰胆碱通过干预 ApoA-I 进而调控胆固醇逆向转运从而改善高脂血症小鼠血脂异常。

【关键词】 载脂蛋白 a-I; 磷脂酰胆碱; 胆固醇逆向转运; 血脂异常; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0023-11

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (82374423, 82074145, 81974548), 辽宁省高校黄大年式教师团队, 辽宁省教育厅高校基本科研项目 (LJ232410162027)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82374423, 82074145, 81974548), Huang Danian Style Teacher Team in Liaoning Province's Universities, Liaoning Provincial Department of Education University Fundamental Research Project (LJ232410162027).

【作者简介】 张琦, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医结合防治心血管疾病。Email: 1552409924@qq.com

【通信作者】 贾连群, 女, 教授, 博士, 研究方向: 中西医结合防治心血管疾病。Email: jliq-8@163.com

Based on the regulation of cholesterol reverse transport by ApoA-I , to explore the effect of phosphatidylcholine on hyperlipidemic mice

ZHANG Qi, SUI Guoyuan, SONG Nan, JIA Lianqun *

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

Corresponding author: JIA Lianqun. E-mail: jllq-8@163.com

[Abstract] Objective Based on apolipoprotein a-I (Apoa-I) gene knockout mice, the role and mechanism of phosphatidylcholine (PC) in improving cholesterol reverse transport were explored. **Methods** Thirty Apoa-I^{-/-} mice were randomly divided into an Apoa-I^{-/-} group, Apoa-I^{-/-} + HFD group, and Apoa-I^{-/-} + HFD + PC group using the random number table method ; 30 C57BL/6J mice were randomly divided into a WT group, WT + HFD group, and WT + HFD + PC control groups, with 10 mice in each group. The Apoa-I^{-/-} group and WT groups were fed basic feed, while the other groups were fed high-fat feed for 8 weeks to establish a hyperlipidemia model. From the 9th week, the WT + HFD + PC group and Apoa-I^{-/-} + HFD + PC group were given PC 2.5 g/(kg·d), while the remaining mice were given physiological saline by gavage for a total of 4 weeks of intervention. The serum lipid levels of the mice were detected using a fully automated analyzer. Hematoxylin and eosin and Oil red O staining were used to observe pathological and morphological changes, and the COD-PAP method was used to detect cholesterol levels in mouse liver tissue. The ELISA method was used to detect LCTA levels in mouse serum, and RT-qPCR and Western Blot method were used to detect the mRNA and protein expression of cholesterol ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1), ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1), lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT), hepatic lipase (HL), scavenger receptor class B type I (SR-B1), and low-density lipoprotein receptor (LDL-R) in liver tissue. **Results** Compared with the WT group, the serum lipid levelsof WT + HFD group mice were significantly increased ($P < 0.01$), LCAT levels were significantly reduced ($P < 0.05$), hepatic fat vacuoles were obvious, hepatic lipid deposition was significant, and liver tissue TC levels were significantly increased ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression of ABCA1, ABCG1, LCAT, SR-B1, HL, and LDL-R were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the WT + HFD group, serum lipid levels in the WT + HFD + PC group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LCAT levels were significantly increased ($P < 0.05$), hepatic fat vacuoles were significantly reduced, hepatic lipid deposition was alleviated, and liver tissue TC levels were significantly reduced ($P < 0.05$); mRNA and protein expression of ABCA1, LCAT, SR-B1, HL and LDL-R were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum levels of TC, TG, and LDL-C were significantly increased, while the levels of LCAT/HDL-C were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the Apoa-I^{-/-} + HFD group mice. Hepatocytes underwent balloon-like transformation, liver lipid deposition was significantly aggravated, and liver tissue TC levels were significantly increased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of ABCA1, LCAT and HL were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the WT + HFD + PC group mice, the Apoa-I^{-/-} + HFD + PC group mice showed a significant increase in serum lipid levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LCAT levels were significantly reduced ($P < 0.05$), significant hepatic lipid vacuoles, significant hepatic lipid deposition, and a significant increase in TC levels in liver tissue ($P < 0.05$). Their mRNA and protein expression of ABCA1, ABCG1, LCAT, SR-B1, and HL were also significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** Phosphatidylcholine can improve dyslipidemia by interfering with ApoA-I and thus regulating cholesterol reverse transport.

[Keywords] apolipoprotein a-I; phosphatidylcholine; cholesterol reverse transport; dyslipidemia; mice

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

据《中国心血管健康与疾病报告 2022 概要》统计,心血管病(cardiac vascular disease, CVD)占

城乡居民疾病死亡构成比首位,患病人数约为 3.3 亿,且患病率下降拐点尚未出现,CVD 严重危

害人类健康并对社会造成巨大经济负担^[1]。血脂异常是 CVD 发生发展的重要危险因素^[2], 中国成人血脂异常患病率高达 35.6%, 且仍处于上升阶段^[3], 因此, 改善血脂异常是 CVD 及其相关疾病的防治关键。

磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 是哺乳动物细胞膜重要组成成分, 亦为高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 最主要磷脂组分, 在改善血脂异常、防治动脉粥样硬化和心脑血管疾病等方面具有优势。报道显示 PC 对于改善血脂异常尤其是降低胆固醇 (cholesterol, TC) 水平具有积极作用^[4]。课题组前期进行肠道微生物组学和脂质组学关联分析, 结果提示 PC 代谢异常与脂代谢紊乱密切相关^[5], 其机制为 PC 调控 HDL 最主要载脂蛋白——载脂蛋白 a-I (apolipoprotein a-I, Apo-a-I) 影响胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 从而改善血脂异常^[6]。Apo-a-I 对于体内脂代谢稳态尤其是胆固醇代谢稳态具有重要意义^[7], 本研究采用 Apo-a-I 全身敲除小鼠模型, 旨在探讨 PC 是否通过干预 Apo-a-I 调控 RCT 途径, 进而防治高脂血症小鼠血脂异常。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级雄性 Apo-a-I^{-/-} 小鼠 (遗传背景 C57BL/6J), 6 ~ 8 周龄, 体质量约 (20 ± 2) g, 购自江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK (苏) 2023-0009】。30 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6 ~ 8 周龄, 体质量约 (20 ± 2) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司【SCXK (辽) 2020-0001】。均饲养于辽宁中医药大学实验动物中心【SYXK (辽) 2024-0006】。饲养期间不限制饮水及进食。饲养环境: 昼夜各 12 h, 温度 (25 ± 2) °C, 湿度 (55 ± 5) %, 本实验所有操作均经过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审批 (21000042022064)。

1.1.2 主要试剂与仪器

高脂饲料 (D12492, 60% 脂肪) 购自小黍有泰 (北京) 生物科技有限公司; 维持饲料购自沈阳茂华生物科技有限公司; PC 购自上海麦克林生化科技有限公司; TC 检测试剂盒购自南京建成生物科

技有限公司; ATP 结合盒转运子 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT)、低密度脂蛋白胆固醇受体 (low density lipoprotein receptor, LDL-R) 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司; ATP 结合盒转运子 G1 (ATP binding cassette transporter G1, ABCA1)、B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-B I)、肝酯酶 (hepatic lipase, HL) 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 所用引物由北京赛百盛基因技术有限公司根据设计合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度/bp Product length/bp
ABCA1	F: GTTACGGCAGATCAAGCATCC R: TGGAAGGGACAAATTTGTGCTG	103
ABCG1	F: GCTCCATCGTCTGTACCATCC R: ACGCATTGCTCTGACTTAGG	88
LCAT	F: GCTTGGGGAATCGGCTAGAAG R: CCTCTGTCTTACGGTAGCACAT	75
HL	F: GGACGCCATTCATACCTT R: ATCAACTCGCCGATGTCT	591
SR-B1	F: GCCTGTTTGTGGGATGAA R: ATCTTGCTGACTCCGTTCC	112
LDL-R	F: CAGCGTATCTGTGGCTGACA R: AGTGTGCACTTCTCTAGGCT	511
β-actin	F: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCC R: ATGCCACAGGATCCATACC	105

全自动生化分析仪购自日本日立公司; 垂直电泳槽、电泳仪、实时荧光定量 PCR 仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

Apo-a-I^{-/-} 小鼠随机分为敲除 (Apo-a-I^{-/-}) 组、高脂 (Apo-a-I^{-/-} + HFD) 组、磷脂酰胆碱 (Apo-a-I^{-/-} + HFD + PC) 组; C57BL/6J 小鼠作为对照, 随机分为对照 (WT) 组、高脂对照 (WT + HFD) 组、磷脂酰胆碱对照 (WT + HFD + PC) 组, 每组 10 只。WT 组和 Apo-a-I^{-/-} 组予以普通饮食喂养; 其余组均予以高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 喂养, 喂饲 12 周。参照文献^[8], 于第 9 周开始, Apo-a-I^{-/-} + HFD + PC 组和 WT + HFD + PC 组小鼠予以 PC 灌胃, 剂量为 2.5 g/(kg·d), 其余小鼠予以生理盐水灌胃。第 12 周末取材。末次给药后禁食不

禁水,收集血清以及肝组织用于后续检测。

1.2.2 形态指标测试及取材

末次给药后禁食不禁水,收集血清以及肝组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于后续检测。

1.2.3 全自动生化分析仪检测

收集全血后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min , 3000 r/min 离心 10 min ,取上层血清,采用全自动生化分析仪检测小鼠血清中血脂水平。

1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理形态

将小鼠肝组织石蜡包埋后切片,二甲苯中脱蜡,乙醇中梯度脱水,进行 HE 染色。中性树脂封固后于 M8 数字显微成像系统观察组织形态。

1.2.5 油红 O 染色观察肝组织脂质沉积

将小鼠肝组织脱水后冷冻切片,厚度约 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。采用常规方法进行油红 O 染色。甘油明胶封固后于 M8 数字显微成像系统观察组织形态。

1.2.6 COD-PAP 法检测肝组织 TC 水平

称取 0.05 g 肝组织,加入 $450\text{ }\mu\text{L}$ 生理盐水进行机械匀浆,于 3000 r/min 离心 10 min ,BCA 法对上清液进行蛋白定量检测。按操作说明书进行加样, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后测定吸光度,按说明书公式计算肝组织 TC 水平。

1.2.7 ELISA 法检测血清中 LCAT 水平

将试剂盒拿出复温,检查试剂是否完整,标准品孔加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 相应标准品,样品孔 5 倍稀释后上样,按说明书进行操作,在最后加入终止液后立即在 450 nm 波长下检测 OD 值,绘制标准品曲线后计算血清中 LCAT 水平。

1.2.8 RT-qPCR 法检测肝组织基因水平

称取 0.02 g 肝组织,离心柱法提取总 RNA,反转录为 cDNA 后加入扩增反应体系,按试剂盒说明书设置扩增条件。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。

1.2.9 Western Blot 法检测肝组织蛋白水平

制备肝组织裂解液,称取 0.05 g 肝组织,低温条件下进行机械匀浆,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,BCA 法对上清液进行蛋白定量检测。用 $2\times$ Loading buffer 使蛋白变性,以每孔 $60\text{ }\mu\text{g}$ 等质量上样, 180 V 电泳 35 min 后进行转膜、封闭、一抗、二抗最后配置发光液进行曝光。AlphaView SA 3.4.0 软件分析灰度值。

1.3 统计学分析

采用 Prism 9.4.0 软件进行统计学处理,数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间数据比较用 ANOVA 方差分析,组间两两比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血脂水平变化

与 WT 组相比,WT + HFD 组血清中 TG、TC、HDL-C 及 LDL-C 水平显著升高($P < 0.01$);给予 PC 干预后上述指标显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 WT + HFD 组相比,Apoa-1^{-/-} + HFD 组血清中 TC、TG、LDL-C 水平显著升高,HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 WT + HFD + PC 组相比,Apoa-1^{-/-} + HFD + PC 组血清中 TC、TG、LDL-C 水平显著升高,HDL-C 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 1。

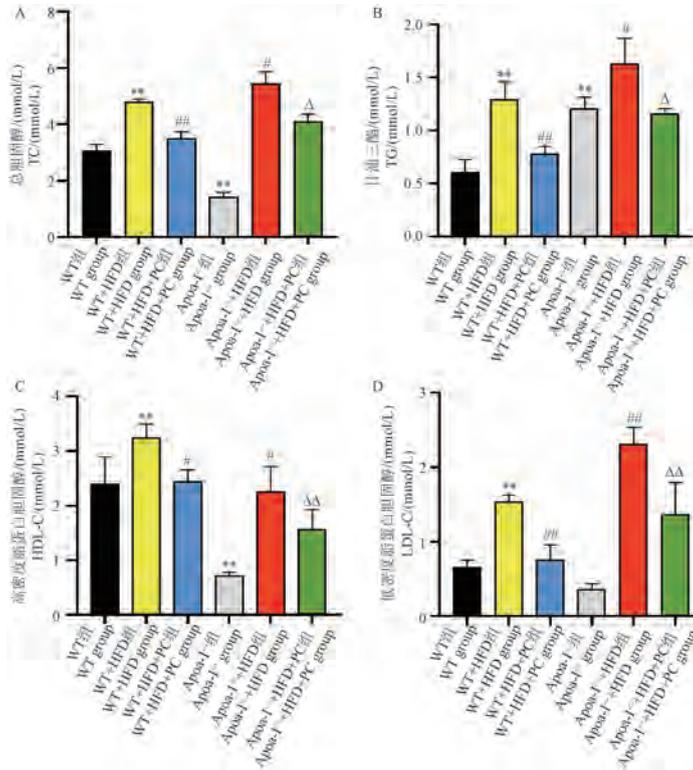
2.2 各组小鼠肝组织病理变化及脂质沉积情况

HE 染色:WT + HFD 组肝组织相较于 WT 组,细胞排列紊乱,细胞质疏松,脂肪空泡明显;给予 PC 干预后,细胞质疏松程度减轻,脂肪空泡显著减少。Apoa-1^{-/-} + HFD 组相较于 WT + HFD 组,细胞质疏松成网状,脂肪空泡显著增多;给予 Apoa-1^{-/-} + HFD 组 PC 干预后,细胞质疏松程度减轻,脂肪空泡改善,但改善程度不及 WT + HFD + PC 组,见图 2。

油红 O 染色:WT + HFD 组肝组织相较于 WT 组,肝细胞形态异常,橘红色脂滴增多,脂肪空泡明显;给予 PC 干预后,橘红色脂滴显著减少,脂肪空泡显著减少。Apoa-1^{-/-} + HFD 组相较于 WT + HFD 组,视野内出现弥漫性橘红色脂滴,脂肪空泡显著增多;给予 PC 干预后,橘红色脂滴沉积情况改善,但改善程度不及 WT + HFD + PC 组,见图 3。

2.3 各组小鼠肝组织中 TC 水平

与 WT 组相比,WT + HFD 组肝组织中 TC 水平显著升高($P < 0.01$);给予 PC 干预后,TC 水平显著降低($P < 0.05$)。与 WT + HFD 组相比,Apoa-1^{-/-} + HFD 组肝组织中 TC 水平显著升高($P < 0.01$)。与 WT + HFD + PC 组相比,Apoa-1^{-/-} + HFD + PC 组肝组织中 TC 水平显著升高($P < 0.05$),见图 4。



注:与 WT 组相比, ** $P < 0.01$;与 WT + HFD 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与 WT + HFD + PC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 各组小鼠血清 TC、TG、HDL-C 及 LDL-C 水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with WT group, ** $P < 0.01$. Compared with WT + HFD group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with WT + HFD + PC group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Serum TC, TG, HDL-C and LDL-C levels in each group of mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 各组小鼠血清中 LCAT 水平

与 WT 组相比, WT + HFD 组小鼠血清中 LCAT 表达水平显著降低($P < 0.05$);给予 PC 干预后, LCAT 表达水平显著升高($P < 0.05$)。Apoa-1^{-/-} + HFD 组相较于 WT + HFD 组, LCAT 表达水平显著降低($P < 0.01$);与 WT + HFD + PC 组相比, Apoa-1^{-/-} + HFD + PC 组血清中 LCAT 表达水平显著降低($P < 0.05$), 见图 5。

2.5 各组小鼠肝组织中胆固醇流出相关因子表达情况

与 WT 组相比, WT + HFD 组小鼠肝组织中 ABCA1 和 ABCG1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);给予 PC 干预后, ABCA1 和 ABCG1 mRNA 及蛋白表达水平显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。Apoa-1^{-/-} + HFD 组相较于 WT + HFD 组, ABCA1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$), ABCG1 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$), 蛋白表达水平有降低趋势。与 WT +

HFD + PC 组相比, Apoa-1^{-/-} + HFD + PC 组肝组织中 ABCA1 和 ABCG1 mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 6。

2.6 各组小鼠肝组织中胆固醇酯化相关因子表达情况

与 WT 组相比, WT + HFD 组小鼠肝组织中 LCAT mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);给予 PC 干预后, LCAT mRNA 及蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。Apoa-1^{-/-} + HFD 组相较于 WT + HFD 组, LCAT mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);与 WT + HFD + PC 组相比, Apoa-1^{-/-} + HFD + PC 组肝组织中 LCAT mRNA 及蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$), 见图 7。

2.7 各组小鼠肝组织中胆固醇摄取相关因子表达情况

与 WT 组相比, WT + HFD 组小鼠肝组织中 SR-B1、HL、LDL-R mRNA 及蛋白表达水平显著降

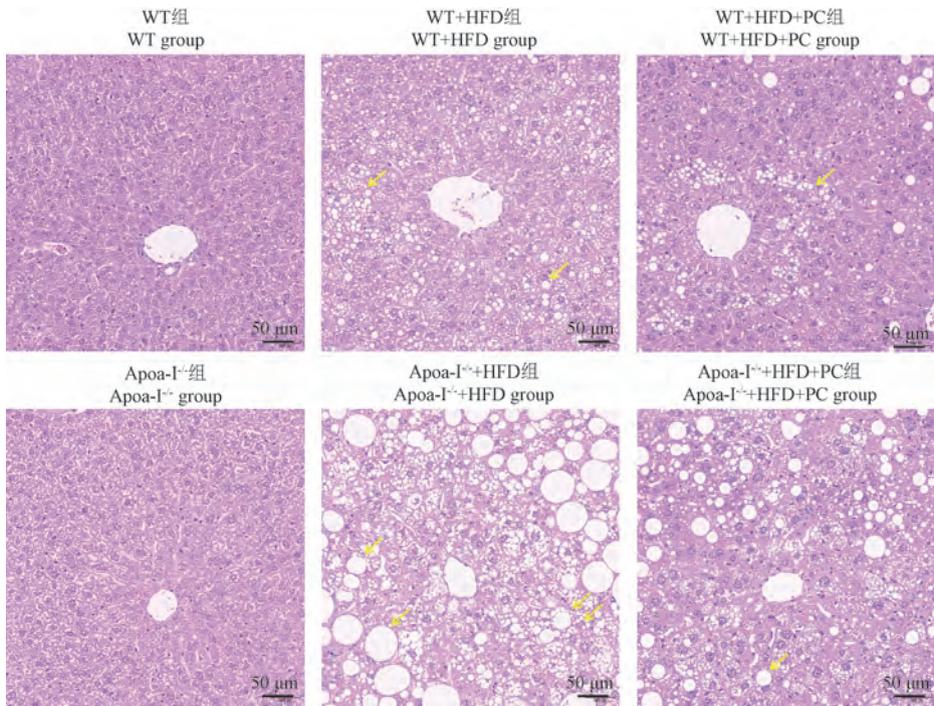


图 2 各组小鼠肝组织 HE 染色

Figure 2 HE staining of liver tissue in each group of mice

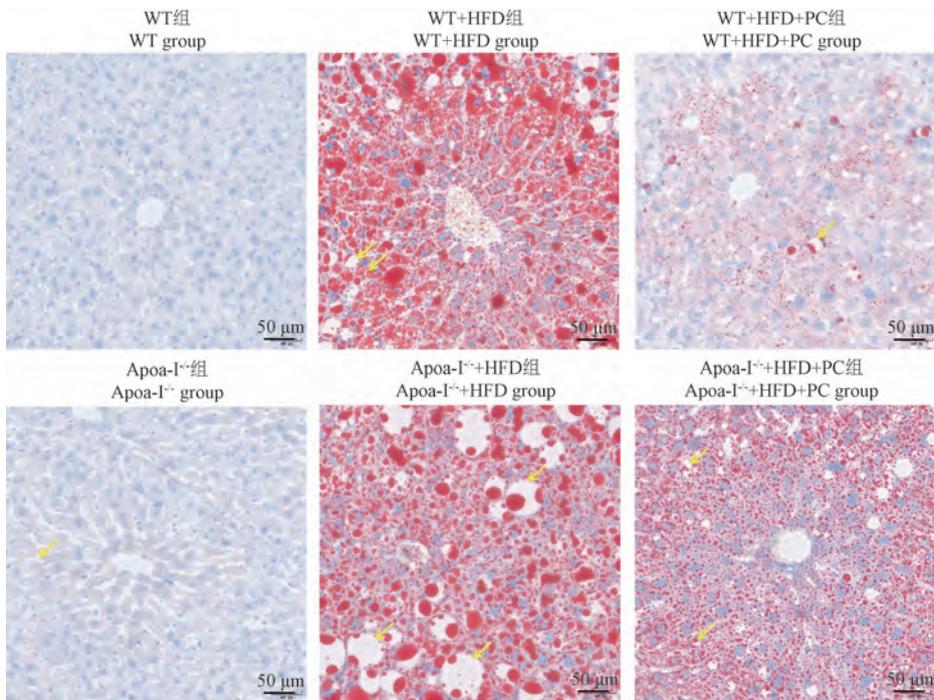


图 3 各组小鼠肝组织油红 O 染色

Figure 3 Oil red O staining of liver tissue in each group of mice

低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 给予 PC 干预后, SR-B1、HL、LDL-R mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Apoa-1^{-/-}+HFD 组相较于 WT+HFD 组, HL、LDL-R mRNA 表达水平显著降低

($P < 0.05$), SR-B1、HL 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 WT+HFD+PC 组相比, Apoa-1^{-/-}+HFD+PC 组肝组织中 SR-B1、HL mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), LDL-R mRNA

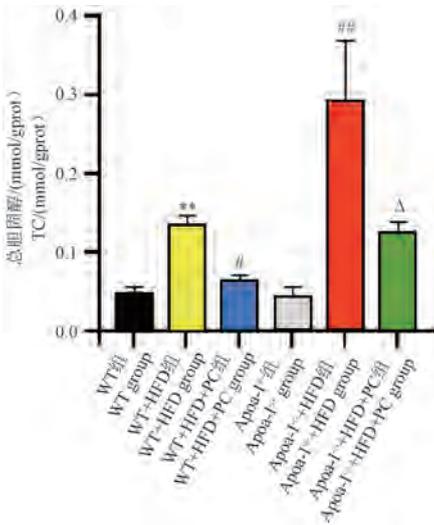


图 4 各组小鼠肝组织 TC 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 4 TC levels in liver tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

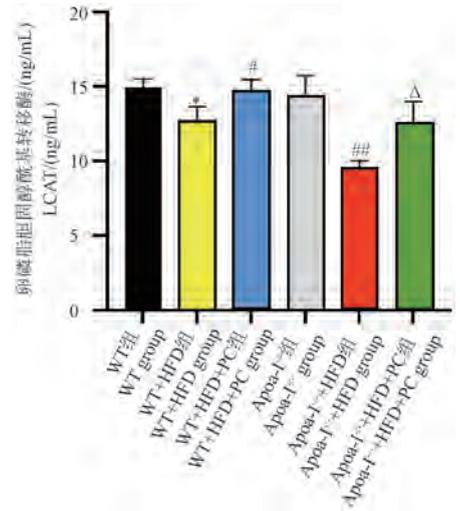
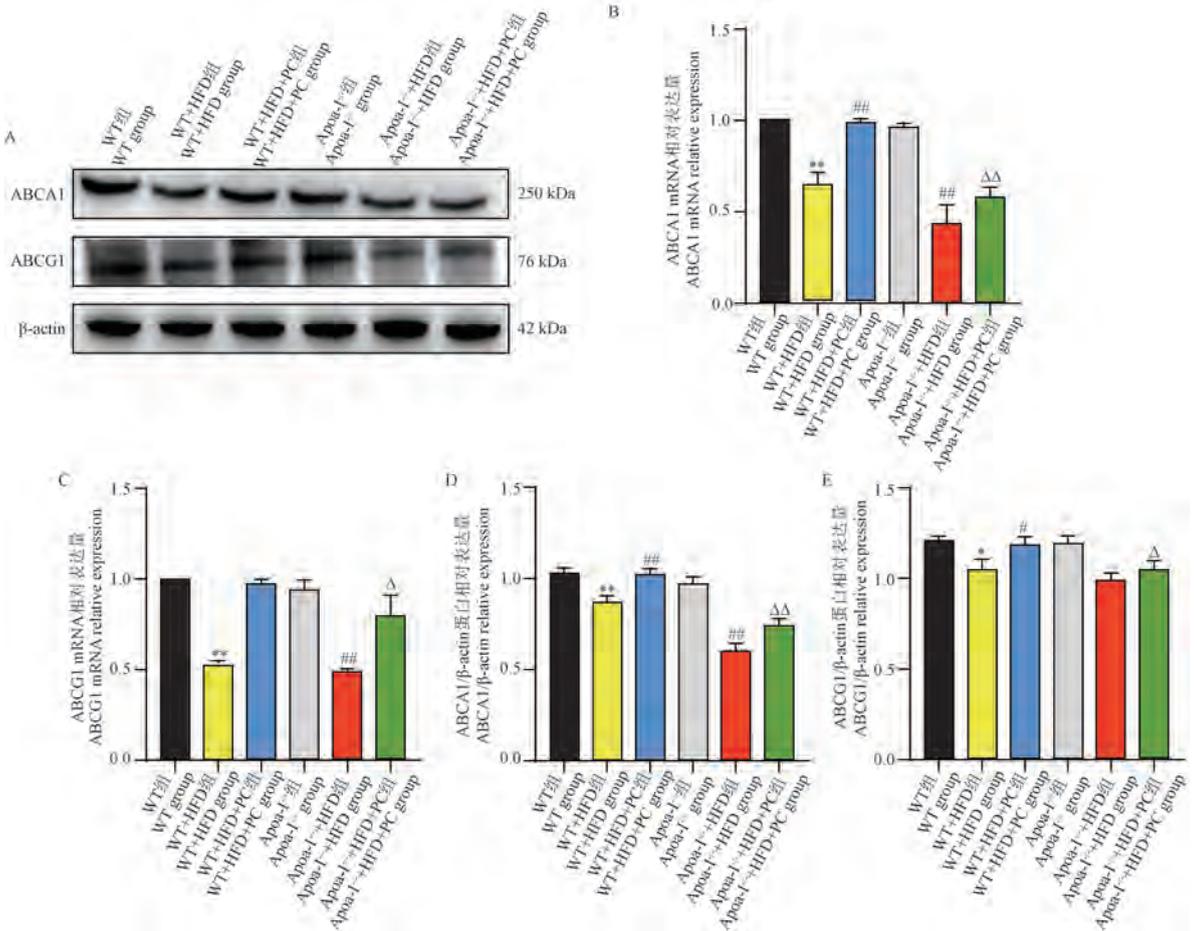


图 5 各组小鼠血清中 LCAT 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 5 Serum LCAT levels in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注:与 WT 组相比, * $P < 0.05$ 。(下同)

图 6 各组小鼠肝组织胆固醇流出相关因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

Figure 6 Expression of cholesterol efflux related factors in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

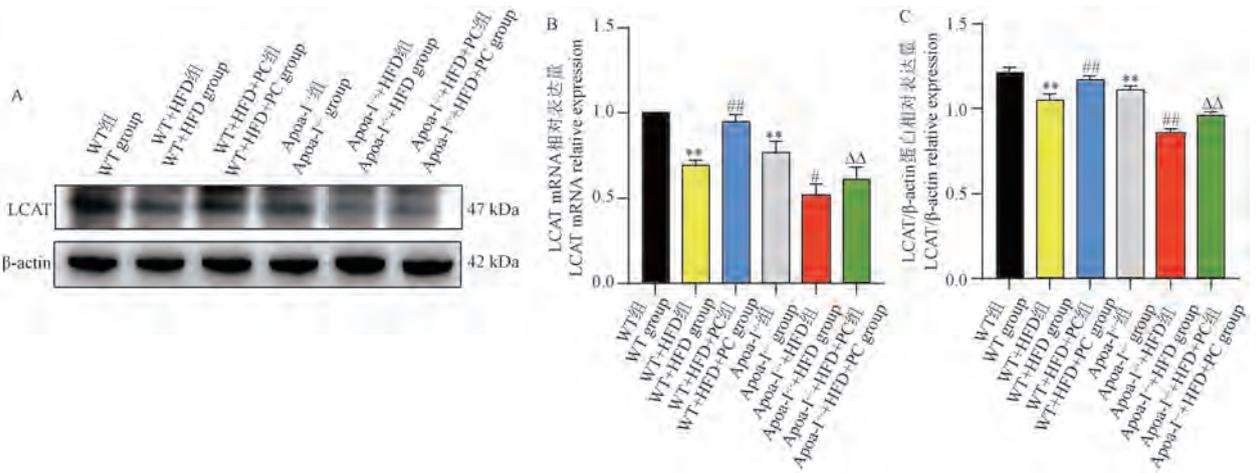


图 7 各组小鼠肝组织胆固醇酯化相关因子表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 7 Expression of cholesterol esterification related factors in liver tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表达水平显著降低($P < 0.01$), 蛋白表达水平有降低趋势, 见图 8。

3 讨论

血脂异常是脂质代谢障碍的表现, 通常指血浆中 TC 和(或)TG 水平升高, 高胆固醇血症为血脂异常最主要类型且为心血管疾病发生的独立危险因素^[9]。TOKEDE 等^[10]认为, PC 在降低血脂异常方面具有潜在优势, 尤其是对于高胆固醇血症效果更为显著。本实验结果显示, WT + HFD 组小鼠血脂水平显著升高, 肝出现脂肪空泡以及橘红色脂滴且 TC 水平显著升高, 提示高脂血症模型复制成功; 给予 PC 干预后, 血脂水平显著降低, 肝脂肪空泡以及脂滴显著减少且 TC 水平显著降低, 说明 PC 可以改善血脂异常尤其是胆固醇代谢紊乱。

有研究发现, PC 改善血脂异常的机制与 ApoA-I 调控 RCT 途径相关^[11]。ApoA-I 为 HDL 最主要的载脂蛋白, 在血脂异常、动脉粥样硬化等疾病发生发展中具有重要生物学功能, 前期研究结果表明, WT 组小鼠在高脂喂饲情况下, 肝组织中 ApoA-I mRNA 及蛋白表达水平显著降低^[12], 报道显示, ApoA-I 在 RCT 途径中发挥核心作用^[13-14]。RCT 途径是指是将异常沉积的胆固醇从周围组织细胞转运至肝进行转化及代谢, 是机体维持脂代谢稳态的重要机制。本实验利用 ApoA-I 基因敲除小鼠模型, 验证 PC 是否以 ApoA-I 为靶点调控 RCT 途径。

胆固醇流出为 RCT 初始阶段, 主要由 ABCA1 和 ABCG1 共同介导, 使巨噬细胞内胆固醇流出与 ApoA-I 结合形成 pre β -HDL^[15]。CUKIER 等^[16]发现, PC 使 ABCA1 介导胆固醇流出能力增强。本研究结果显示, WT + HFD 组小鼠胆固醇流出能力减弱, 给予 PC 干预后, 肝组织中 ABCA1、ABCG1 mRNA 及蛋白表达显著升高, 说明 PC 促进胆固醇流出。ApoA-I 亦可促进 ABCA1 表达^[17], 本研究中 ApoA-I^{-/-} + HFD 组相比于 WT + HFD 组, ABCA1、ABCG1 mRNA 及蛋白表达显著降低。敲除 ApoA-I 能够使 PC 促进胆固醇流出作用发生逆转, 表明 PC 介导胆固醇流出与上调 ApoA-I 表达有关。

胆固醇酯化为 RCT 关键环节, LCAT 作为胆固醇酯化的重要催化酶, 将 pre β -HDL 酯化为胆固醇酯(cholesterol ester, CE)^[18]。本研究结果显示, WT + HFD 组血清及肝组织中 LCAT 表达显著降低, 给予 PC 干预后, 胆固醇酯化能力上调, 说明 PC 促进胆固醇酯化。ApoA-I 为 LCAT 激活剂^[19], 本研究中 ApoA-I^{-/-} + HFD 组相比于 WT + HFD 组, LCAT 表达显著降低。与 WT + HFD + PC 组相比, ApoA-I^{-/-} + HFD 组给予 PC 干预后, LCAT 表达显著降低, 表明 PC 通过上调 ApoA-I 表达介导胆固醇酯化。

胆固醇摄取为 RCT 途径的终末环节, HL、SR-B1 及 LDL-R 为胆固醇摄取的关键受体, 未酯化 TC 被 HL 摄取, HDL 内剩余的 CE 被 SR-B1 及 LDL-R 摄取^[20]。本研究结果显示, WT + HFD 组

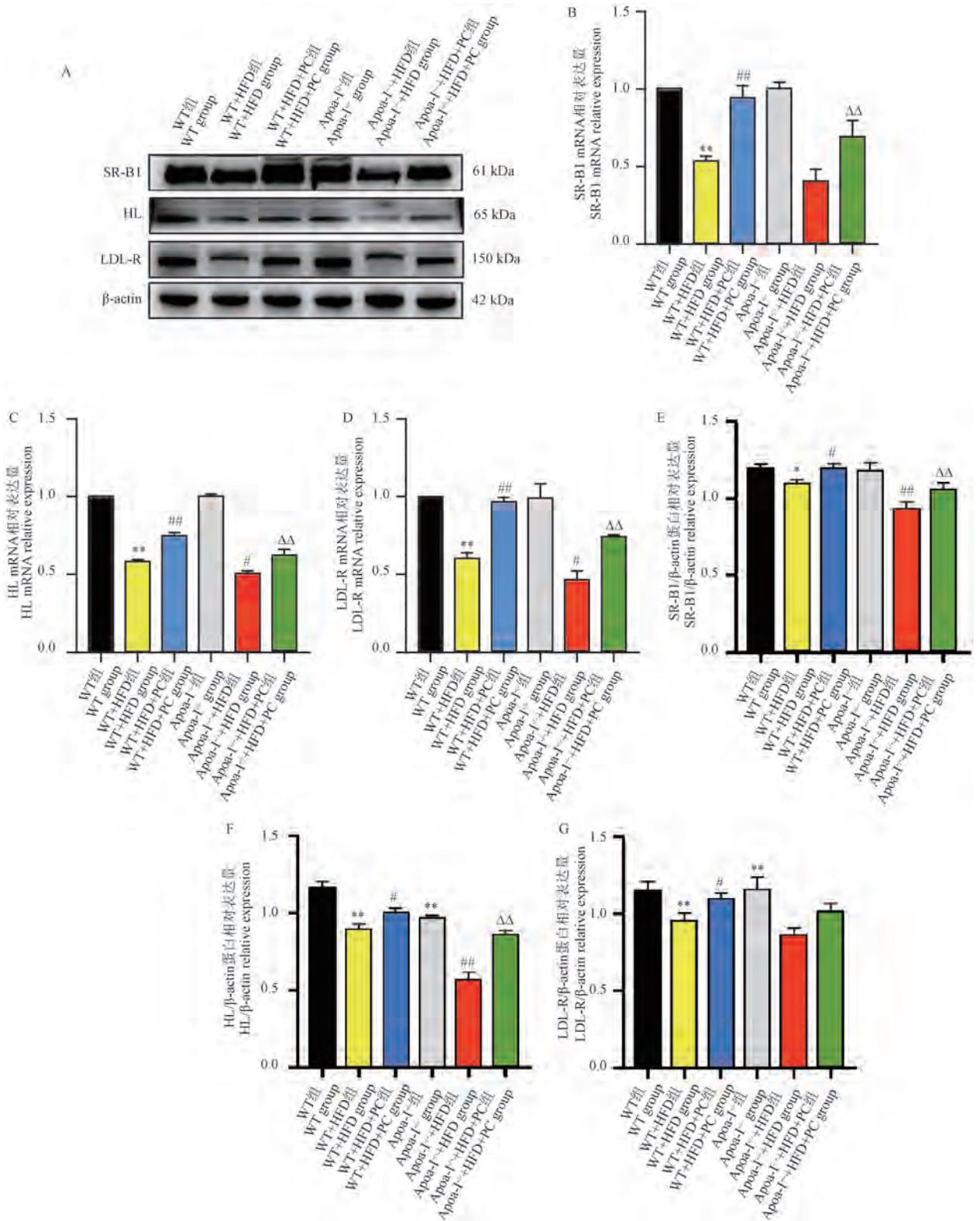


图 8 各组小鼠肝组织胆固醇摄取相关因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 8 Expression of cholesterol uptake related factors in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胆固醇摄取能力下调, 给予 PC 干预后, 肝组织中 SR-B1、HL 及 LDL-R mRNA 及蛋白表达显著升高, 表明 PC 促进胆固醇摄取。TEMEL 等^[21]发现

Apoa-1^{-/-}鼠中 SR-B1 胆固醇摄取能力下降, 本研究中 Apoa-1^{-/-} + HFD 组相比于 WT + HFD 组, SR-B1、HL 及 LDL-R mRNA 及蛋白表达显著降低, 与

既往研究结果相符。给予 Apoa-I^{-/-} + HFD 组 PC 干预后,PC 促进胆固醇摄取作用发生逆转,表明 PC 介导胆固醇流出与上调 Apoa-I 表达有关。

综上所述,本研究的实验结果表明 PC 对高脂血症小鼠血脂紊乱、肝病理改变具有保护作用;促进 RCT 相关因子表达。在敲除 Apoa-I 后,PC 改善血脂紊乱、肝病理改变及调节 RCT 相关因子表达的作用减弱,进而表明 PC 改善高脂血症小鼠血脂异常与上调 Apoa-I 表达有关。但本实验未对外周巨噬细胞中 ABCA1 和 ABCG1 进行检测,仍具有一定的局限性和不足,课题组后续拟提取小鼠腹腔巨噬细胞进行检测,开展进一步探讨。

参 考 文 献 (References)

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要 [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6): 583-612.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2022; an updated summary [J]. Chin Circ J, 2023, 38(6): 583-612.
- [2] LIBBY P, BURING J, BADIMÓN L, et al. Atherosclerosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5: 1-18.
- [3] 王增武, 刘静, 李建军, 等. 中国血脂管理指南(2023 年) [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(3): 237-271.
WANG Z W, LIU J, LI J J, et al. Chinese guidelines for lipid management (2023) [J]. Chin Circ J, 2023, 38(3): 237-271.
- [4] HUNTER P M, HEGELE R A. Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia [J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(5): 278-288.
- [5] JIA L, JU X, MA Y, et al. Comprehensive multiomics analysis of the effect of ginsenoside Rb1 on hyperlipidemia [J]. Aging, 2021, 13(7): 9732-9747.
- [6] 赵娜, 贾连群, 隋国媛, 等. 从肠道菌群驱动磷脂酰胆碱/Apoa-I/HDL 亚类代谢探讨“脾虚膏脂传输障碍”的分子生物学基础 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 16-18.
ZHAO N, JIA L Q, SUI G Y, et al. Basis of molecular biology of “spleen deficiency leading to dysfunction of grease transfer” from subclasses metabolism of phosphatidylcholine/Apoa-I/HDL driven by intestinal flora [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(2): 16-18.
- [7] SU X, PENG D. The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity [J]. Clin Chim Acta, 2020, 503: 128-135.
- [8] LEE H S, NAM Y, CHUNG Y H, et al. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice [J]. Life Sci, 2014, 118(1): 7-14.
- [9] PIRILLO A, CASULA M, OLMASTRONI E, et al. Global epidemiology of dyslipidaemias [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(10): 689-700.
- [10] TOKEDE O A, ONABANJO T A, YANSANE A, et al. Soya products and serum lipids: a meta-analysis of randomised controlled trials [J]. Br J Nutr, 2015, 114(6): 831-843.
- [11] TORKHOVSKAYA T I, KUDINOV V A, ZAKHAROVA T S, et al. High density lipoproteins phosphatidylcholine as a regulator of reverse cholesterol transport [J]. Russ J Bioorg Chem, 2018, 44(6): 608-618.
- [12] 张琦, 隋国媛, 宋茵, 等. 加味香砂六君子汤调控高脂血症小鼠 apoa-I 改善内质网应激的作用机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(9): 1236-1246.
ZHANG Q, SUI G Y, SONG N, et al. The mechanism of modified Xiangsha Liujunzi Decoction in regulating Apoa-I and improving endoplasmic reticulum stress in hyperlipidemic mice [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(9): 1236-1246.
- [13] COCHRAN B J, ONG K L, MANANDHAR B, et al. APOA1; a protein with multiple therapeutic functions [J]. Curr Atheroscler Rep, 2021, 23(3): 11.
- [14] XU X, SONG Z, MAO B, et al. Apolipoprotein A1-related proteins and reverse cholesterol transport in antiatherosclerosis therapy: recent progress and future perspectives [J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022: 4610834.
- [15] FRAMBACH S J C M, DE HAAS R, SMEITINK J A M, et al. Brothers in arms: ABCA1- and ABCG1-mediated cholesterol efflux as promising targets in cardiovascular disease treatment [J]. Pharmacol Rev, 2020, 72(1): 152-190.
- [16] CUKIER A M O, THEROND P, DIDICHENKO S A, et al. Structure-function relationships in reconstituted HDL: focus on antioxidative activity and cholesterol efflux capacity [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(9): 890-900.
- [17] CHEN L, ZHAO Z W, ZENG P H, et al. Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux [J]. Cell Cycle, 2022, 21(11): 1121-1139.
- [18] POWNALL H J, ROSALES C, GILLARD B K, et al. High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherogenesis [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(10): 712-723.
- [19] GORSHKOVA I N, MEI X, ATKINSON D. Arginine 123 of apolipoprotein A-I is essential for lecithin: cholesterol acyltransferase activity [J]. J Lipid Res, 2018, 59(2):

348-356.

- [20] OUI MET M, BARRETT T J, FISHER E A. HDL and reverse cholesterol transport [J]. Circ Res, 2019, 124 (10): 1505-1518.
- [21] TEMEL R E, WALZEM R L, BANKA C L, et al. Apolipoprotein A-I is necessary for the *in vivo* formation of

high density lipoprotein competent for scavenger receptor BI-mediated cholesteryl ester-selective uptake [J]. J Biol Chem, 2002, 277(29): 26565-26572.

[收稿日期] 2024-08-06

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评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。



薛静波,杨金凤,黄恺,等. 三种非酒精性脂肪肝炎模型病证特点的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 34-43.

XUE J B, YANG J F, HUANG K, et al. Comparison research of disease characteristics in three non-alcohol steatohepatitis models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 34-43.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.004

三种非酒精性脂肪肝炎模型病证特点的比较研究

薛静波¹, 杨金凤¹, 黄恺¹, 彭渊¹, 陶艳艳^{1*}, 刘成海^{1,2,3*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 上海 201203; 2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 3. 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的 比较四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)注射复合高脂饲料饮食(high fat diet, HFD)、蛋氨酸胆碱缺乏饮食(methionine and choline deficient diet, MCD)以及高脂高糖高胆固醇饮食(aymlin liver NASH, AMLN)诱导的三种非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)模型血清学及病理学特征。**方法** 分别采用CCl₄注射复合高脂饲料饮食(CCl₄+HFD)、MCD、AMLN喂养10、8和6周,制备小鼠NASH模型。比色法检测血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和血糖(glucose, GLU)的水平及肝组织甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性;酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清胰岛素(fasting insulin, FINS)含量并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistant, HOMA-IR);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、天狼猩红染色及油红O染色观察肝组织炎症、脂滴生成及胶原沉积情况,并根据非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)活动度评分(NAFLD activity score, NAS)对肝组织脂肪性肝炎分级评分。**结果** 与各正常组小鼠相比,3种模型组小鼠血清ALT、AST活性、肝TG、TC、MDA含量及SOD活性均有显著上升;其中AMLN模型组及CCl₄+HFD模型组小鼠的血清FINS、GLU的含量显著升高,HOMA-IR指数显著升高;MCD模型组小鼠血清FINS、GLU的含量及HOMA-IR指数显著下降。HE染色、油红O染色及NAS评分结果显示,3种模型组小鼠的肝组织均已进展到脂肪性肝炎阶段,且CCl₄+HFD模型组小鼠肝组织胶原沉积最明显,AMLN模型组小鼠肝脂滴最丰富。**结论** 上述三种模型均可稳定模拟人类NASH疾病的血清学及病理学变化,其中AMLN模型可模拟人类的发病过程及机制,且胰岛素抵抗、氧化应激等全身代谢紊乱表现,但耗时较长,纤维化进展较慢。MCD饮食8周即可模拟NASH的血清及病理学特征,但无肥胖胰岛素抵抗发生。CCl₄复合HFD模型10周即可诱导NASH模型,能模拟其血清学及病理学变化,且肝组织纤维沉积与氧化应激损伤明显。

【关键词】 非酒精性脂肪肝炎;MCD模型;AMLN模型;胰岛素抵抗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025)01-0034-10

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82274305),上海市临床重点专科建设项目(shslczdzk01201)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82274305), Shanghai Key Clinical Specialty of Traditional Chinese Medicine (shslczdzk01201)。

【作者简介】 薛静波,女,硕士,研究方向:慢性肝病。Email:iamcynthiaxue@163.com

【通信作者】 陶艳艳,女,博士,研究员,硕士生导师,研究方向:中医药治疗慢性肝病的基础。Email:taoyanyan1023@126.com;

刘成海,男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中医药治疗慢性肝病的基础与临床。

Email:chenghailiu@hotmail.com。

* 共同通信作者

Comparison research of disease characteristics in three non-alcohol steatohepatitis models

XUE Jingbo¹, YANG Jinpeng¹, HUANG Kai¹, PENG Yuan¹, TAO Yanyan^{1*}, LIU Chenghai^{1,2,3*}

(1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Ministry of Education), Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: TAO Yanyan. E-mail:taoyanyan1023@126.com; LIU Chenghai. E-mail:chenghailiu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To compare the serological and pathological characteristics of 3 nonalcoholic steatohepatitis (NASH) models: high-fat diet (HFD) with carbon tetrachloride (CCl₄) injection, methionine and choline deficient diet (MCD), and Amlin liver NASH (AMLN) diet-induced NASH models. **Methods** 3 NASH models were established by feeding mice an HFD with CCl₄ injection for 10 weeks, MCD for 8 weeks and NASH for 26 weeks. After feeding, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose (GLU), liver triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activity were measured. Insulin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the homeostasis model assessment of insulin resistant (HOMA-IR) index was calculated. Hematoxylin-eosin (HE), Sirius red, and oil red staining were used to indicate pathological changes to the liver. The NAS score was used to grade the pathology. **Results** Compared to each normal control (NC) group mice, all mice in the 3 model groups had an obvious increase in serum transaminase and liver TG, TC, MDA levels and SOD activity. The levels of serum FINS, GLU and the HOMA-IR index were significantly increased in the AMLN and CCl₄+ HFD model groups but decreased in the MCD model group. According to the HE, oil red staining and NAS score, mice in all 3 groups had NASH phenotypic changes. Liver collagen deposition was most obvious in mice in the CCl₄+ HFD model group. Liver lipid droplets were most abundant in the AMLN model group. **Conclusions** All the above 3 animal models can stably simulate the serological and pathological changes of NASH in human. The AMLN model can simulate the progress and mechanism of the disease, as well as systemic metabolic disorders such as insulin resistance and oxidative stress. However, it is time-consuming and the fibrosis progression rate is slow. The MCD diet can simulate the serological and pathological features of NASH in 8 weeks, but no obesity or insulin resistance occurred. The CCl₄ combined with HFD model can induce NASH model in 10 weeks, which can simulate its serological and pathological changes, and the liver has obvious fibrous deposition and oxidative stress damage.

【Keywords】 non-alcoholic steatohepatitis; MCD model; amylin model; insulin resistance

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

非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发病率逐年升高, 其可从单纯脂肪肝逐渐进展为非酒精性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化, 甚至导致肝硬化、肝癌、肝功能衰竭等终末期肝病, 已成为全球最常见的肝病^[1]。但是目前尚无 NASH 治疗药物获批。NASH 的新药研发依赖合适的动物模型, 目前常见的 NASH 动物模型主要分为纯饲料诱导、饲料复合化学药物诱导以及基因编辑动物模型三类。高脂饮食 (high fat diet, HFD) 模型是一种常见的扰乱脂质代谢, 导致脂肪肝变性, 诱

导 NASH 发生的造模方法。小鼠对高脂饲料较敏感, 长期喂养后容易出现高脂血症、高胰岛素血症异常的变化, 从而模拟人类 NAFLD 的组织病理学和发病机制; 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 能诱导肝发生氧化应激反应, 导致有毒脂质和过氧化产物的积累, 造成广泛性肝损伤, 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 的水平也明显升高^[2]。CCl₄ 与 HFD 相结合制备复合 NASH 模型, 可以促进小鼠 NASH 和肝纤维化的发展^[3]。蛋氨酸胆碱缺乏饮

食(methionine and choline deficient diet, MCD)模型的脂肪肝发展速度快,其病理病变与人类 NASH 类似,其发病机制是由于蛋氨酸和胆碱的缺乏,导致低密度脂蛋白胆固醇合成减少,因此无法将甘油三酯运出肝外而在肝内累积形成脂肪肝^[4-5]。并且胆碱缺乏也会引起肝线粒体内部活性氧增加,最终导致肝的氧化应激损伤^[6]。含高脂高糖高胆固醇(amylin liver NASH, AMLN)饮食模型由 Amylin Pharmaceuticals 公司研发的一种西方饮食(western diet, WD)模型,能快速稳定增加小鼠体质量与脂肪,其含有的反式脂肪也能促进小鼠肝脂肪变性^[7-8]。

本研究比较了 CCl₄ 复合高脂饮食(CCl₄+HFD)、蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)及高脂高糖高胆固醇饮食(AMLN)三种常用的小鼠 NASH 模型,并初步探讨上述模型的病理特征及发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只,6 周龄,18 ~ 20 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【SYXK(沪)2020-0009】,在恒温(22 ~ 25 ℃),恒湿(相对湿度 50% ~ 60%),12 h 循环照明的 SPF 级环境下饲养,自由饮食和水。本实验通过上海中医药大学伦理委员会审批(PZSHUTCM210813009)。

1.1.2 主要试剂与仪器

高脂饲料(60 kcal%脂肪热量高脂鼠粮,货号 HF60-5 kg)、蛋氨酸及胆碱缺乏饲料(货号 MCD-5 kg)、蛋氨酸及胆碱充足饲料(MCD 对照鼠粮,货号 MCS-5 kg)和高脂高糖高胆固醇饲料(反式脂肪(40%)胆固醇(2%)果糖(22%),货号 AMLN-10kg),以上均购自 DYETS 公司;普通饲料购自普路腾公司;ALT 测试盒(Cat No. C009-1)、AST 测试盒(Cat No. C010-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(Cat No. A001-3-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、血糖(glucose, GLU)试剂盒(Cat No. A154-2-1)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(Cat No. 10004160)、油红 O 染色试剂盒(Cat No. D027-1-2),均购自南京

建成生物研究所;TG 试剂盒(Cat No. A0-10027)、TC 试剂盒(Cat No. A0-10017),购自浙江东瓯诊断产品有限公司。

3-18KS 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);BSA3202SCW 型电子天平(德国 Sartorius 公司);数字病理扫描仪(日本 Olympus 公司);ASP300 自动脱水机、EG1160 石蜡包埋机、RM2035 切片机、CM1850 冰冻切片机、HI1220 烤片机(德国 LEICA 公司);全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Powerwave XS 全波长酶标仪(美国 Biotek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法

(1) CCl₄+HFD 模型:雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,随机分为 CCl₄+HFD 正常组与 CCl₄+HFD 模型组,每组 10 只。CCl₄+HFD 正常组小鼠给予普通饲料;CCl₄+HFD 模型组小鼠给予 HFD 4 周,于第 5 周开始腹腔注射 2 mL/kg 15% CCl₄,第 6 周开始腹腔注射 2 mL/kg 10% CCl₄,每周 2 次,同时高脂饲料喂养 10 周。

(2) MCD 模型:雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,随机分为 MCD 正常组和 MCD 模型组,每组 10 只。MCD 正常组小鼠给予蛋氨酸胆碱充足饲料(methionine-choline sufficient, MCS);MCD 模型组小鼠 MCD 喂养 8 周。

(3) AMLN 模型:雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,随机分为 AMLN 正常组与 AMLN 模型组,每组 10 只。AMLN 正常组小鼠给予普通饲料;AMLN 模型组给予 AMLN 喂养 26 周。

1.2.2 动物处理

所有小鼠采用 3%戊巴比妥钠以 30 mg/kg 腹腔注射进行麻醉,打开腹腔,下腔静脉取血,室温静置 2 h,以 4 ℃,3000 r/min,离心 15 min,收集血清,4 ℃保存。采血后剪断下腔静脉,摘取小鼠的肝、脾并称量记录。留取约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 大小肝组织,10%甲醛溶液固定,另留取约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 大小肝组织,OCT 包埋冷冻,其余肝组织于-80 ℃保存。

1.2.3 观察指标及检测方法

(1) HE 染色:选取肝最大叶中部同区域 5 mm 见方组织 1 块,10%中性福尔马林固定,自动脱水机逐级乙醇脱水,二甲苯透明,包埋,切

片,观察肝组织的病理变化。采用 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 NAFLD 活动度积分 (NAFLD activity score, NAS) 评分。

(2) 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^[9],见表 1。纤维化等级评价采用 2005 年美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组优化的 NAFLD 分级评分标准^[9],详见表 2。

表 1 非酒精性脂肪性肝病 NAS 评分表

项目 Item	评分标准 Standard of scoring			
	0 分 0 point	1 分 1 point	2 分 2 points	3 分 3 points
肝细胞脂肪变比例/% Proportion of steatosis grade/%	< 5%	5% ~ 33%	34% ~ 66%	> 66%
小叶内炎症坏死灶数量/个(× 20) Number of lobular inflammation/numbers(× 20)	0	< 2	2 ~ 4	> 4
肝细胞气球样变 Ballooning degeneration	无 None	少见 Few	多见 Many	-

表 2 肝纤维化分级标准

Table 2 Liver fibrosis grading

分级 Grade	纤维化程度 Fibrosis stage
F0	无 None
F1a	轻度,3 区窦周 Mild, zone 3, perisinusoidal
F1b	中度,3 区窦周 Moderate, zone 3, perisinusoidal
F1c	汇管区 Portal/peripoportal
F2	汇管区周围窦周 Portal/peripoportal and perisinusoidal
F3	桥接 Bridging
F4	肝硬化 Cirrhosis

(3) 油红 O 染色:将准备好的 OCT 冰冻组织切片后,室温回温 10 min,放入装有试剂 1 应用液的染缸中染色 10 ~ 15 min,用 37 °C 蒸馏水洗 5 ~ 20 s。试剂 2 复染液染色 3 ~ 5 min,水洗 30 ~ 60 s,未待表面水干透,即可滴加已 60 °C 预热至液态的试剂 3 水性封固剂于玻片表面,进行封片。

(4) 天狼星红染色:肝组织固定,常规脱水包埋;切片,常规脱蜡至水,天狼星红染色液滴染,流水冲洗,去除切片表面染液, Mayer 苏木素染色

液染细胞核,流水冲洗,常规脱水透明,中性树脂胶封固。

(5) 血清生化指标检测:血清 ALT 活性通过试剂盒采用赖氏法检查;血清 AST 活性通过试剂盒采用比色法检测。

(6) 血清 GLU、胰岛素、脂联素:GLU 含量通过试剂盒采用葡萄糖氧化酶法检查;血清胰岛素 (fasting insulin, FINS) 和脂联素 (adiponectin, ADP) 含量通过 ELISA 检查。胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment of insulin resistant, HOMA-IR) 计算公式为: $HOMA - IR = GLU \times FINS / 22.5$ 。

(7) 肝脂质含量检测:肝组织 TG、TC 含量测定,取肝组织制备为肝组织匀浆,通过试剂盒进行检测。

(8) 肝脂质过氧化指标检测:取肝组织制备为肝组织匀浆,通过试剂盒,检测 SOD、MDA 等指标。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad prism 9.0 软件对数据进行统计分析。统计描述中的测量数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并使用计数数据。当满足方差的正态性和同质性时,通过两组间 *t* 检验比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。等级分组资料的比较通过 Radit 分析来计算;计量资料多组间比较,采用单因素方差分析 (One way ANOVA)。

2 结果

2.1 三种 NASH 模型小鼠的一般情况

造模期间,各正常组小鼠状态良好,毛发光泽,反应敏锐,体质量缓慢增加。各模型组小鼠造模后活动量减少,精神状态变差,毛发欠光滑,反应迟钝。CCl₄ + HFD 及 AMLN 模型组小鼠体质量较其正常组增长快;而 MCD 模型组小鼠体质量较正常组减少明显,小鼠均无死亡。AMLN 模型组小鼠的肝体比较 AMLN 正常组显著增加,而在另外两个模型组中,肝体比无显著变化(详见表 3)。

2.2 三种 NASH 模型小鼠血清生化及肝脂质含量的比较

三种 NASH 模型小鼠的血清 ALT、AST 水平与肝组织 TG、TC 含量均显著增加(表 4)。其中在 AMLN 模型组小鼠血清 ALT、AST、GLU 水平、

表 3 各组造模前后体质量及肝体比($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Body weight before and after modeling and liver body mass ratio in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	造模前体质量/g Body mass before modeling/g	造模后体质量/g Body mass after modeling/g	肝体比/% Liver body mass ratio/%
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	22.02 ± 0.55	28.77 ± 1.90	4.69 ± 0.16
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	23.36 ± 1.21	30.21 ± 1.64	4.86 ± 0.68
MCD 正常组 MCD NC group	25.28 ± 1.29	27.06 ± 1.11	4.31 ± 0.29
MCD 模型组 MCD model group	25.69 ± 1.47	14.85 ± 0.67 ^{##}	4.06 ± 0.45
AMLN 正常组 AMLN NC group	22.80 ± 1.30	32.05 ± 3.34	4.24 ± 0.27
AMLN 模型组 AMLN model group	22.93 ± 1.57	41.29 ± 2.92 ⁺⁺	8.57 ± 1.61 ⁺⁺

注:与 MCD 正常组相比,^{##} $P < 0.01$;与 AMLN 正常组相比,⁺⁺ $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with MCD NC group,^{##} $P < 0.01$. Compared with AMLN NC group,⁺⁺ $P < 0.01$. (The same in the following tables)

表 4 各组血清 ALT、AST 水平及肝组织 TG、TC 含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Serum ALT、AST and liver TG、TC level in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	谷丙转氨酶/(U/L) ALT/(U/L)	谷草转氨酶/(U/L) AST/(U/L)	总胆固醇/(mg/g) TC/(mg/g)	甘油三酯/(mg/g) TG/(mg/g)
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	22.64 ± 9.26	24.39 ± 5.70	2.93 ± 1.57	15.08 ± 2.93
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	247.74 ± 61.23 ^{**}	112.92 ± 43.58 ^{**}	5.14 ± 1.62 [*]	29.91 ± 3.25 ^{**}
MCD 正常组 MCD NC group	13.87 ± 8.15	21.69 ± 11.57	2.37 ± 0.73	21.84 ± 0.33
MCD 模型组 MCD model group	137.78 ± 41.73 ^{##}	65.96 ± 26.53 ^{##}	3.31 ± 1.27	33.02 ± 3.53 ^{##}
AMLN 正常组 AMLN NC group	13.21 ± 2.11	17.51 ± 2.70	2.34 ± 0.31	35.73 ± 3.91
AMLN 模型组 AMLN model group	170.20 ± 66.03 ⁺⁺	68.33 ± 30.48 ⁺⁺	9.55 ± 2.07 ⁺⁺	53.67 ± 4.92

注:与 CCl₄+ HFD 正常组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with CCl₄+ HFD NC group,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$. (The same in the following tables)

HOMA-IR 指数和肝 TC 含量增加最为显著,较正常组分别升高约 15、10、0.5、2.5 和 3.0 倍。在 CCl₄+ HFD 模型组中,小鼠血清 FINS 水平和肝 TG 含量上升最为显著,约为 CCl₄+ HFD 正常组的 1 倍,且 SOD 与 MDA 的变化尤为显著。而 AMLN 模型小鼠的肝 TC 含量增加最为明显,约为 AMLN 正常组的 3 倍,且其血清 GLU 及 HOMA-IR 指数上升最为显著(表 5)。

2.3 三种 NASH 模型小鼠血糖代谢的比较

如表 6 可见,CCl₄+ HFD 模型组和 AMLN 模型组小鼠的血清 GLU、FINS、HOMA-IR 等指标均有显著增加($P < 0.05$),且 AMLN 模型组比 CCl₄+ HFD 模型组的上升更为明显(表 5)。但在 MCD 诱导的 NASH 模型中,GLU、FINS 含量及

HOMA-IR 指数显著下降(见表 6)。在 MCD 模型组及 AMLN 模型组中,小鼠血清 ADP 较其正常组均有下降,而在 CCl₄+ HFD 模型组中,ADP 水平没有显著差异(见表 5,7)。

2.4 三种造模方法小鼠肝组织脂滴形成的变化

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,对三种造模方法进行比较 NAS 评分(详见表 7)。结果显示三种 NAS 模型成功建立,其中 MCD 模型组的 NAS 评分最高,AMLN 模型组的 NAS 评分比其余两组略低。三种模型组的 HE 染色及油红 O 染色,均可见肝细胞有明显脂肪变性,小叶内有大量炎症细胞浸润、胞内有大小不一的脂滴形成(图 1),其中

AMLN 模型组形成的脂滴最多最大, CCl₄ + HFD 模型组的炎性浸润和纤维化程度最严重, 详见表 5。

表 5 各模型组与其正常组相比的血清生化和肝脂质含量的变化率($n = 10$, %)

Table 5 Level change in serum biochemical indexes and liver lipid in each model group compared with the NC group($n = 10$, %)

指标 Item	CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	MCD 模型组 MCD model group	AMLN 模型组 AMLN model group
谷丙转氨酶变化率 ΔALT	↑ 994.30	↑ 893.40	↑ 1503.00
谷草转氨酶变化率 ΔAST	↑ 359.20	↑ 204.10	↑ 979.00
总胆固醇变化率 ΔTC	↑ 75.40	↑ 39.70	↑ 308.10
甘油三酯变化率 ΔTG	↑ 98.30	↑ 51.20	↑ 50.20
葡萄糖变化率 ΔGLU	↑ 18.60	↓ 49.06	↑ 48.40
胰岛素变化率 ΔFINS	↑ 100.00	↓ 92.03	↑ 141.50
胰岛素抵抗指数变化率 ΔHOMA-IR	↑ 98.70	↓ 95.51	↑ 257.10
超氧化物歧化 酶变化率 ΔSOD	↓ 24.81	↓ 13.00	↓ 22.16
丙二醛变化率 ΔMDA	↑ 120.60	↑ 48.30	↑ 76.50
脂联素变化率 ΔADP	↓ 0.21	↓ 14.43	↓ 16.14

注: ↑: 增加; ↓: 下降。
Note. ↑. Up. ↓. Down.

2.5 三种 NASH 模型小鼠肝组织胶原沉积的比较

肝纤维化等级评价采用 2005 年美国国立卫生研究院 NASH 临床研究网病理工作组优化的 NAFLD 分级评分标准^[9]。三种 NASH 模型的肝纤维化分级, 其中 CCl₄ + HFD 模型组的纤维化评分最高, MCD 模型组小鼠肝纤维化评分最低(表 8)。结合天狼猩红染色可见, CCl₄ + HFD 模型组较其余两组胶原纤维沉积更明显(图 2)。

2.6 三种 NASH 模型小鼠脂质过氧化的比较

如表 9 可见, 三种模型组小鼠肝组织 SOD 活性均有所下降, 同时 MDA 含量均有所增加($P <$

表 7 三种非酒精性脂肪性肝炎模型的 NAS 评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 NAS score in three of NASH animal models ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	NAS 评分 NAS score
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	0.00 ± 0.00
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	6.10 ± 1.29**
MCD 正常组 MCD NC group	0.00 ± 0.00
MCD 模型组 MCD model group	6.73 ± 0.65##
AMLN 正常组 AMLN NC group	0.00 ± 0.00
AMLN 模型组 AMLN model group	4.78 ± 0.78**

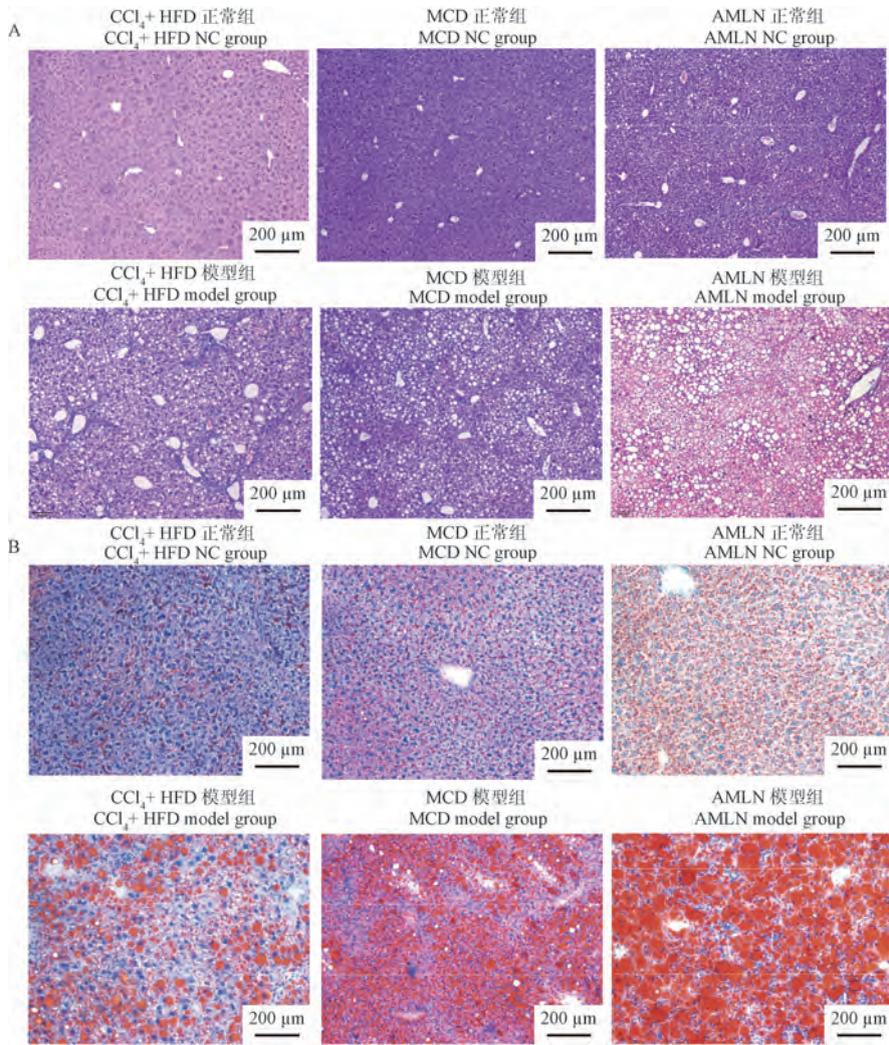
表 6 各组 GLU、FINS、HOMA-IR 和 ADP 水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 GLU, FINS, HOMA-IR and ADP level in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	葡萄糖/(mmol/L) GLU/(mmol/L)	胰岛素/(ng/mL) FINS/(ng/mL)	胰岛素指数 HOMA-IR	脂联素/(ng/mL) ADP/(ng/mL)
CCl ₄ + HFD 正常组 CCl ₄ + HFD NC group	6.98 ± 0.94	2.38 ± 0.88	0.75 ± 0.17	145.29 ± 17.06
CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	8.28 ± 1.10**	4.76 ± 1.05**	1.49 ± 0.34**	144.99 ± 17.70
MCD 正常组 MCD NC group	7.99 ± 0.95	2.51 ± 2.67	0.89 ± 0.20	150.08 ± 24.85
MCD 模型组 MCD model group	4.07 ± 1.03##	0.20 ± 0.15##	0.04 ± 0.01##	128.43 ± 12.93#
AMLN 正常组 AMLN NC group	8.82 ± 1.78	1.42 ± 0.76	0.56 ± 0.13	291.10 ± 39.41
AMLN 模型组 AMLN model group	13.09 ± 2.71**	3.43 ± 1.35**	2.00 ± 0.46**	244.13 ± 40.38

注: 与 MCD 正常组相比, * $P < 0.05$ 。(下表同)

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



注:A:HE染色;B:油红O染色。

图1 三种NASH模型小鼠肝HE及油红O染色

Note. A. HE staining. B. Oil red staining.

Figure 1 Mice liver HE and oil red staining in three of NASH models

表8 小鼠肝纤维化程度分期评价($n = 10$)

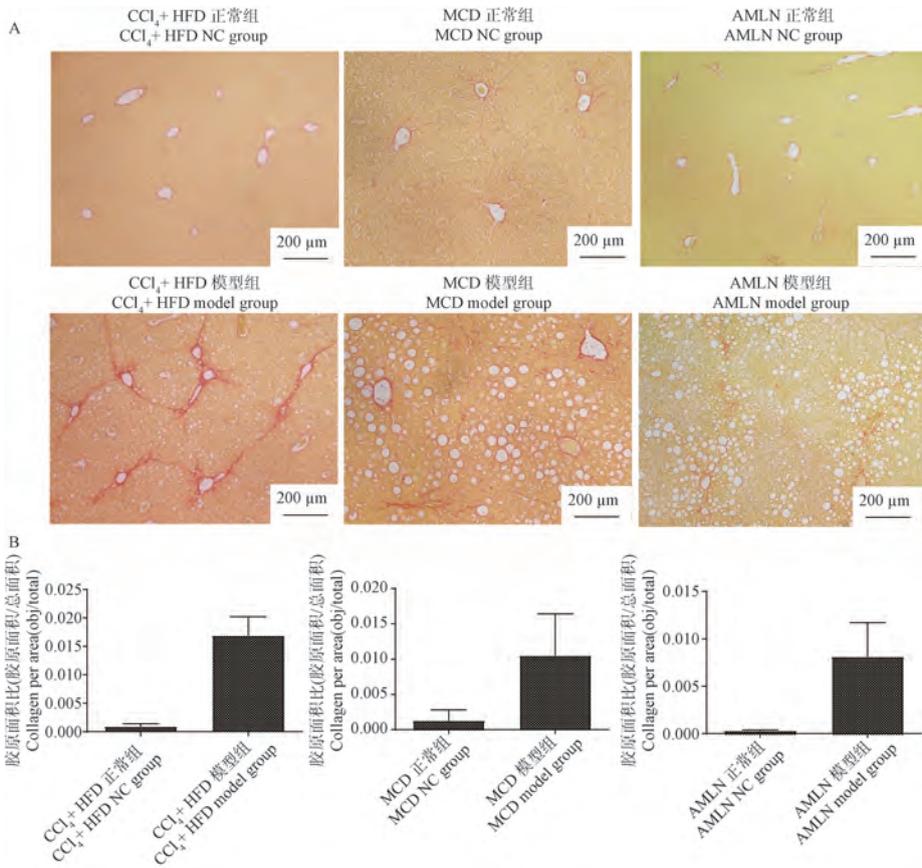
Table 8 Liver fibrosis staging evaluation of mice($n = 10$)

组别 Groups	胶原纤维增生程度分级 Liver fibrosis staging evaluation					R
	F0	F1	F2	F3	F4	
	CCl ₄ +HFD 正常组 CCl ₄ +HFD NC group	10	0	0	0	
CCl ₄ +HFD 模型组 CCl ₄ +HFD model group	0	0	0	8	2	0.000**
MCD 正常组 MCD NC group	10	0	0	0	0	-
MCD 模型组 MCD model group	2	6	1	1	0	0.000##
AMLN 正常组 AMLN NC group	10	0	0	0	0	-
AMLN 模型组 AMLN model group	2	7	1	0	0	0.000++

表9 小鼠肝组织MDA含量和SOD活性($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 9 Liver MDA level and SOD activity in

组别 Groups	mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
	超氧化物歧化酶/(U/mgprot) SOD/(U/mgprot)	丙二醛/(nmol/mgprot) MDA/(nmol/mgprot)
	CCl ₄ +HFD 正常组 CCl ₄ +HFD NC group	245.37 ± 17.06
CCl ₄ +HFD 模型组 CCl ₄ +HFD model group	184.49 ± 21.64#	4.39 ± 1.38#
MCD 正常组 MCD NC group	255.51 ± 5.51	2.42 ± 0.10
MCD 模型组 MCD model group	222.29 ± 13.88##	3.59 ± 0.40#
AMLN 正常组 AMLN NC group	203.32 ± 8.14	1.66 ± 0.51
AMLN 模型组 AMLN model group	158.27 ± 27.06##	2.93 ± 1.31#



注:A:天狼星红染色;B:胶原面积半定量图。

图 2 三种非酒精性脂肪性肝炎模型的天狼星红染色及胶原面积半定量

Note. A. Sirius red staining. B. Collagen semi-quantitative area.

Figure 2 Mice liver sirius red staining and collagen semi-quantitative area in three of NASH models

表 10 三种 NASH 模型的特征比较

Table 10 Characteristic comparison in three of NASH animal models

指标 Item	CCl ₄ + HFD 模型组 CCl ₄ + HFD model group	MCD 模型组 MCD model group	AMLN 模型组 AMLN model group
体质量 Body mass	+	-	++
炎症 Inflammation	++	+	+++
脂肪积聚 Adiposis	++	+	++
纤维化 Fibrosis	++	+	+
过氧化 Peroxidation	+++	+	++
胰岛素抵抗 Insulin resistant	+	-	++
耗时 Time cost	+	+	++

注:+++;强阳性;++;中等阳性;+,弱阳性;-:阴性。

Note. +++. Strong positive. ++. Moderate positive. +. Weak positive. -. Negative.

0.05); CCl₄+ HFD 模型组与 AMLN 模型组小鼠的指标变化更为显著(见表 10)。

3 讨论

3.1 常用 NASH 动物模型现状

目前常见的 NASH 动物模型主要分为纯饲料诱导、饲料复合化学药物诱导和基因编辑诱导这三类。纯饲料诱导模型中常用的是 WD 模型和营养缺乏模型。常见的 WD 模型又分为 HFD 模型、高脂高胆固醇饮食 (high-fat high-cholesterol HFHC) 模型、高脂高糖饮食 (american lifestyle-induced obesity syndrome, ALIOS) 模型、AMLN 模型等。这些 WD 饮食诱导模型接近人类肥胖致病的过程,模拟了疾病代谢特征,但造模时间普遍较长,需要 26 周以上^[10]。其中 AMLN 模型综合了 HFD 模型、ALIOS 模型、HFHC 模型的特点,含有高脂肪(含反式脂肪)高糖高胆固

醇,是广泛使用的纯饲料诱导模型。本研究造模 26 周,出现了炎症、脂肪变及轻度纤维化等 NASH 典型特征,但在病理上出现了一定的异质性,与文献一致^[7],如想要更严重的纤维沉积,可能需要延长模型到 30 周以上。由于 2018 年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)和欧洲开始禁止使用反式脂肪作为食品添加剂, AMLN 饲料的改良版 Gubra Amylin NASH(GAN) 饲料应运而生,用棕榈油取代反式脂肪。GAN 模型的脂肪变性、NAS 评分和纤维化程度与 AMLN 模型相似,可完美替代^[11-12]。MCD 模型是最常见的营养缺乏饮食诱导 NASH 模型,可在短期内(8 周)发展出与人类 NASH 类似的病理病变,如脂肪变性、炎症以及纤维化等。由于蛋氨酸与胆碱的缺乏,负责运输 TG 的低密度脂蛋白胆固醇合成下降,脂肪在肝内累积并导致活性氧的增加造成肝损伤^[4-6]。其发病机制却与人类大相径庭,模型小鼠体质量下降明显,且没有胰岛素抵抗^[4,13]。本研究用 MCD 诱导造模 8 周,病理可见明显的炎症、脂肪变性与轻度纤维化,但没有胰岛素抵抗,与文献一致。

目前常用的饲料复合化学药物诱导 NASH 模型是链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导模型和 CCl₄ 诱导模型,两者均须复合高脂饮食饲养。STZ 诱导模型常见于诱导 I 型糖尿病,胰岛 β 细胞功能被破坏,约 12 周内出现脂肪性肝炎与纤维化,20 周时可高发肝癌。该模型与人类 NASH 组织病理学相似,但不会导致胰岛素抵抗^[14]。CCl₄ 单独诱导模型仅能导致肝纤维化,而不发生肥胖和胰岛素抵抗等病变,但联合高脂饲料后,CCl₄ 可促进高脂饮食对 NASH 和肝纤维化的发展^[15]。但此模型小鼠体质量下降,与人类肥胖导致 NASH 的成因不同。

ob/ob 和 db/db 小鼠是最常见的基因编辑诱导的 NASH 模型,一般与高脂饲料联用,可用于诱导 II 型糖尿病。肥胖基因(OB 基因)表达瘦素可调节体质量和脂肪沉积,而糖尿病相关基因(DB 基因)表达瘦素受体。因此 OB 或 DB 纯合小鼠由于瘦素缺失极易引起肥胖和胰岛素抵抗,造成肝脂质蓄积、炎症和纤维化^[16],然而先天性瘦素缺乏或瘦素抵抗在人类 NASH 患者中并不多见。

3.2 三种 NASH 模型的生化、病理特点及潜在

机制的比较

本研究中 AMLN 模型组小鼠 ALT、AST 及 TC 水平升高最为显著,约为其正常组小鼠的 15、10 和 3 倍,且从油红 O 染色来看,其肝内形成的脂滴液最多。AMLN 模型组小鼠的血清 GLU、FINS 及 HOMA-IR 指数的上升最为显著。以上这些表明模型组小鼠与人类肥胖致病相似,产生了明显的炎症、脂肪变型与胰岛素抵抗^[16]。HFD 复合 CCl₄ 模型组小鼠 TG 升高和肝纤维化最为明显,且其肝 SOD 和 MDA 的变化最为显著,提示氧化应激可能是造成此模型肝损伤的主要机制。CCl₄ 经 P450 酶代谢激活,生成自由基及一系列过氧化产物诱发肝持续产生氧化应激,造成过氧化产物的积累从而导致肝损伤^[15]。与另外两种模型不同,MCD 模型组小鼠体质量与血清中的 GLU、FINS 含量明显减少,没有产生胰岛素抵抗,与之前报道一致。其发病机制与人类不同,是由于蛋氨酸和胆碱的缺乏,影响小鼠体内脂肪和胆固醇代谢,从而促进脂质在肝内蓄积^[13,4]。

另外三个模型中,AMLN 模型在炎症、脂肪蓄积和胰岛素抵抗上,最接近人类发病过程,但其耗时最长,造模 26 周后,肝的胶原沉积比较轻微,要想看到显著纤维化可能需要造模 30 周以上。MCD 模型与 HFD 复合 CCl₄ 模型耗时较少,但 MCD 模型完全没有胰岛素抵抗,而 HFD 复合 CCl₄ 模型在诱发肝纤维化方面的优势比较明显。

综上所述,三种方法均可成功建立 NASH 模型,各组在生化指标、肝病理及基本机制上各有特点。可根据临床具体研究方向来挑选适合的一种或多种模型来进行实验。针对非肥胖型的脂肪肝研究可选择 MCD 模型,由于毒物引起的脂肪肝研究可优先选择 HFD 复合 CCl₄ 模型,而由高脂饮食引起的传统脂肪肝研究可优先考虑 AMLN 模型,更接近人类肥胖胰岛素抵抗的发病机制。

参 考 文 献(References)

- [1] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.
- [2] ZHAN Y Y, WANG J H, TIAN X, et al. Protective effects of seed melon extract on CCl₄-induced hepatic fibrosis in

- mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 531–537.
- [3] KUBOTA N, KADO S, KANO M, et al. A high-fat diet and multiple administration of carbon tetrachloride induces liver injury and pathological features associated with non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(7): 422–430.
- [4] ITAGAKI H, SHIMIZU K, MORIKAWA S, et al. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(12): 2683–2696.
- [5] JHA P, KNOPF A, KOEFELER H, et al. Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(7): 959–970.
- [6] HENSLEY K, KOTAKE Y, SANG H, et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(5): 983–989.
- [7] CLAPPER J R, HENDRICKS M D, GU G, et al. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(7): G483-G495.
- [8] TREVASKIS J L, GRIFFIN P S, WITTMER C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(8): G762-G772.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] BOLAND M L, ORÓ D, TØLBØL K S, et al. Towards a standard diet-induced and biopsy-confirmed mouse model of non-alcoholic steatohepatitis; impact of dietary fat source [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(33): 4904–4920.
- [12] HANSEN H H, ÆGIDIUS H M, ORÓ D, et al. Human translatability of the GAN diet-induced obese mouse model of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1): 210.
- [13] RINELLA M E, GREEN R M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance [J]. *J Hepatol*, 2004, 40(1): 47–51.
- [14] FUJII M, SHIBAZAKI Y, WAKAMATSU K, et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma [J]. *Med Mol Morphol*, 2013, 46(3): 141–152.
- [15] 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.
- [16] TRAK-SMAYRA V, PARADIS V, MASSART J, et al. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet [J]. *Int J Exp Pathol*, 2011, 92(6): 413–421.

[收稿日期] 2024-01-17

张秋菊,王宇,凌必时,等. 自发性高血压大鼠的中医证型特点及其代谢物质基础研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 44-53.

ZHANG Q J, WANG Y, LING B S, et al. Study on the characteristics of Chinese medicine syndromes and its basic metabolites of spontaneously hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 44-53.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.005

自发性高血压大鼠的中医证型特点及其代谢物质基础研究

张秋菊^{1,2}, 王宇^{1,2}, 凌必时¹, 司美龙¹, 孟浩先¹, 田萌媛¹, 张铭¹,
连妮妮¹, 康万荣^{1,2}, 金华^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000)

【摘要】 **目的** 探究自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)的中医证型特点及可能的代谢物质基础。**方法** 10周龄SPF级SHR及同品系同周龄WKY大鼠,分SHR组和WKY组,每组8只大鼠。通过综合动态观察和检测SHR的一般状态、性情、周围血管充盈度、舌象、饮食饮水量、尿量、粪便量与性状、血压、心率、呼吸频率、痛阈和旷场实验,以辨别其可能的中医证型。同时,利用液相色谱串联质谱技术(liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)对血清代谢物进行非靶向检测分析,以初步揭示引起血压升高和中医证型表现的物质基础。**结果** 与WKY组相比,SHR组大鼠毛色暗黄、易激惹程度及周围毛细血管充盈评分较高($P < 0.0001$);舌色赤红,舌质干、津液少;24 h饮食饮水量及尿量、粪便量少($P < 0.05$),粪便含水率较低($P < 0.001$);收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、心率(heart rate, HR)、呼吸频率(respiratory rate, RR)均明显较高($P < 0.05$);痛阈较低($P < 0.0001$);旷场实验显示,边缘运动距离和停留时间较长($P < 0.001$)。血清非靶向代谢组学结果显示,与WKY组相比,SHR组大鼠具有显著性差异的代谢物共有114种($P < 0.05$),这些差异代谢物主要为脂质和类脂分子(40.35%)、有机酸及其衍生物(22.8%)、有机杂环化合物(15.79%)。差异代谢物通过京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库富集分析共得到25条代谢通路,进一步差异丰度得分分析,其中16条通路被激活,仅4条通路被抑制,5条通路未见明显变化;而其中与神经系统兴奋性相关的3条通路中,谷氨酸能突触(glutamatergic synapse)和 γ -氨基丁酸能突触(GABAergic synapse)被激活,而5-羟色胺能突触(serotonergic synapse)则被抑制。**结论** SHR有急躁易怒、周围血管扩张侧支循环形成、球结膜充血膨出、舌色赤红、舌质干、便秘、小便少而赤黄、心率、呼吸频率增快等表现,这些均提示SHR表现为高血压肝阳上亢证,其物质基础除了与脂类、氨基酸、碳水化合物代谢增强有关外,还可能与谷氨酸能、 γ -氨基丁酸能及血清素能等神经通路代谢紊乱有关。

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82160886, 81860832), 甘肃省级重点人才基金资助项目(2023RCXM28), 甘肃省自然科学基金项目(21JR7RA566), 甘肃中医药大学中医学一级学科“岐黄英才”导师专项基金资助项目(ZYXKBD-202203), 甘肃省中医药研究中心专项课题(zyzx-2020-zx7), 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zyz-2022-05)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82160886, 81860832), Gansu Provincial Key Talent Fund Supported Project (2023RCXM28), Gansu Provincial Natural Science Foundation Project (21JR7RA566), Gansu University of Chinese Medicine First-Level Discipline of Chinese Medicine “Qihuang Yingcai” Mentor Special Fund Supported Project (ZYXKBD-202203), Gansu Province Traditional Medicine Research Center Special Project (zyzx-2020-zx7), Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the University of Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine (zyz-2022-05).

【作者简介】 张秋菊,女,副教授,在读博士研究生,研究方向:心脑血管疾病及其危险因素的中医药防治。Email: zqj@gszy.edu.cn

【通信作者】 金华,男,教授,主任医师,研究方向:心脑血管疾病及其危险因素的中医药防治。Email: lanzhoujinhua@126.com

【关键词】 高血压;病证结合动物模型;自发性高血压大鼠;肝阳上亢证;非靶向代谢组
【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2025)01-0044-10

Study on the characteristics of Chinese medicine syndromes and its basic metabolites of spontaneously hypertensive rats

ZHANG Qiuju^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, LING Bishi¹, SI Meilong¹, MENG Haoxian¹, TIAN Mengyuan¹,
ZHANG Ming¹, LIAN Nini¹, KANG Wanrong^{1,2}, JIN Hua^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: JIN Hua. E-mail: lanzhoujinhua@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics of Chinese medicine syndromes and the possible metabolic substance basis of spontaneously hypertensive rat (SHR). **Methods** 10-week-old SPF SHR and WKY of the same strain were divided into SHR group and WKY group with 8 rats in each group. The general state, temperament, peripheral vascular filling, tongue characteristics, diet, water intake, urine and feces volume and characteristics, blood pressure, heart rate, respiratory rate, pain threshold, and open field behavior of SHR rats were observed and tested comprehensively to identify the possible syndrome types of Chinese medicine. At the same time, liquid chromatography tandem mass spectrometry was used to analyze non-targeted serum metabolites to preliminarily reveal the material basis of blood pressure elevation and Chinese medicine syndrome manifestations. **Results** Compared with WKY group, the scores of dark yellow hair color, irritable degree and peripheral capillary filling were higher in SHR group ($P < 0.0001$). Red tongue color, dry tongue, little body fluid; 24 h diet and water intake, urine volume and fecal volume were less ($P < 0.05$), fecal water content was lower ($P < 0.001$); systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and respiratory rate (RR) were significantly higher ($P < 0.05$); Lower pain threshold ($P < 0.0001$); The open field experiment shows that the moving distance and residence time of the edge are longer ($P < 0.001$). Serum non-targeted metabolomics result showed that, compared with WKY group, the SHR group had 114 metabolites with significant differences ($P < 0.05$). These differential metabolites were mainly lipids and lipid-like molecules (40.35%), organic acids and derivatives (22.8%), and organoheterocyclic compounds (15.79%). A total of 25 metabolic pathways were identified by KEGG enrichment analysis. Further differential abundance analysis showed that 16 pathways were activated, only 4 pathways were inhibited, and 5 pathways were not significantly changed. The glutamatergic synapse and GABAergic synapse were activated, while the serotonergic synapse was inhibited. **Conclusions** The symptoms of SHR include impatience and irritability, peripheral vascular dilation and collateral circulation formation, bulbar conjunctival congestive swelling, red tongue coloration, a dry tongue, constipation, red-yellow urine of low volume, and a rapid heart rate and high respiratory rate. All these suggest that SHR is a syndrome of hypertension with hyperactivity of liver-yang. The material basis of SHR is not only related to lipid, amino acid, and carbohydrate metabolism disorders, but also may be related to metabolic disorders of glutaminergic, GABAergic, and serotonergic neural pathways.

【Keywords】 hypertension; disease and syndrome combined with animal model; spontaneously hypertensive rat; hyperactivity of liver yang; non-target metabolome

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

自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 是国际上公认的最接近人类原发性高血压的实验动物模型, 是研究原发性高血压病因、发病机制及治疗等领域不可或缺

模式动物。近年来, SHR 在中医药防治高血压的研究领域也得到了广泛应用^[1-2], 中医独特的整体观念和辨证论治的思想决定了“病”和“证”结合的动物模型更能反映并认识疾病的规律和特

点^[3],然而,目前对于 SHR 的证型特征尚缺乏深入的观察和研究。为弥补这一不足,本研究对 SHR 的行为表现和生理状态进行了动态观察,包括一般状态、性情、周围血管充盈情况以及舌象等。此外,本研究还运用了液相色谱-串联质谱(liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)技术,对 SHR 大鼠血清中的代谢物成分进行了鉴定和功能预测。这些研究结果不仅丰富了对 SHR 证型特征的认识,而且为中医药在高血压治疗研究中的精准应用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 周龄 SPF 级雄性 SHR 大鼠 8 只,及 SPF 级雄性同品系同周龄 WKY (Wistar-Kyoto, WKY) 大鼠 8 只,体质量为(200 ± 20) g,分 SHR 组和 WKY 组。两组动物均购自于北京维通利华实验动物技术有限责任公司【SCXK(京)2021-0006】,饲养于甘肃中医药大学科研实验中心 SPF 级动物房【SYXK(甘)2020-0009】,恒温 25 °C,恒湿(55 ± 5)%,人工光照明暗各 12 h,自由饮食饮水。动物共观察 4 周。本实验经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审批(2021-018)。

1.1.2 主要试剂与仪器

乙腈(Fisher Chemical, 4L A955-4)、乙酸铵(Sigma, 73594)、甲醇(Fisher, A456-4)、氨水(Fisher, A470-500)。BP-98A 型动物无创血压计(日本软隆株式会社)、IITC model33(series8)红外痛觉测试仪(Artisan Technology Group)、WPB PLT-UNR-RT-2 动物肺功能检测系统(EMKA Beschlagteile)、大鼠代谢笼(上海玉研科学仪器有限公司)、OFT-100 型开场活动实验视频分析系统(成都泰盟科技有限公司)、Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(Agilent)、AB Triple TOF 6600 质谱仪(AB SCIEX)、色谱柱(Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm column)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠一般状态及性情的观察及评分

将大鼠置于安静且恒温恒湿的环境中,固定于每日 15:00 观察其在安静状态下或抓取时的性

情变化,参照并改进鄢东红等^[4]、胡淑平等^[5]的大鼠易激惹程度定量评分标准,见表 1,将大鼠性情状态分为 0 ~ III 级,于 0 ~ 16 之间进行赋分。评分方法:3 位参与课题的科研人员分别打分,取其平均值(后同)。连续记录 4 周。

表 1 大鼠易激惹程度定量评分表

Table 1 Quantitative evaluation table of irritability

in rats		
分级 Grades	性情状态 Temperament state	评分 Score
0	安静、喜睡觉;捉持颈部或提尾时基本无反抗行为 Quiet, like to sleep; no resistance when holding the neck or lifting the tail	0 ~ 4
I	活动明显增加、喜抓笼;捉持颈部或提尾时有明显反抗 Activity increased significantly, like to catch the cage; obvious resistance when holding the neck or lifting the tail	5 ~ 8
II	烦躁不安、有同笼打斗现象;捉持颈部或提尾时出现尖叫、惊跳 Restlessness, fighting with the rats of same cage; screaming and jumping when holding the neck or lifting the tail	9 ~ 12
III	喜跳跃、咬笼、频繁打斗,甚至出现咬人行为;捉持颈部或提尾时尖叫、惊跳、咬人、甚至咬尾行为;shriek, jump, or bite when holding the neck or lifting the tail	13 ~ 16

1.2.2 大鼠周围血管充盈状态的观察及评分

将大鼠置于光线充足的实验台上,观察安静状态下大鼠双眼、双耳、头颈部、躯干、四肢等毛细血管的颜色、充盈状态、侧支循环的数量。参照并改进黄文权等^[6]大鼠周围血管充盈状态评分标准,将周围血管充盈状态分为 0 ~ III 级,于 0 ~ 16 之间进行赋分,见表 2。每周记录 1 次,连续 4 周。

1.2.3 大鼠舌象的观察及评估

脏腑的病变可通过舌象变化来反映。实验中,大鼠麻醉后,用镊子轻轻拉出其舌头,分别请 3 位有临床经验的中医医师对舌象进行观察、评估、描述,并对 2 组大鼠的舌象表现进行统计分析。大鼠舌象参照中医学评判标准^[7],见表 3。每周记录 1 次,连续 4 周。

1.2.4 大鼠体质量、饮食、饮水量及尿量、粪便量及粪便含水率的测量

相同饲养环境下,将大鼠置于动物代谢笼

表 2 大鼠周围血管充盈状态的观察及评分

Table 2 Observation and score of peripheral vascular filling state in rats

分级 Grades	周围血管充盈情况 Peripheral vascular filling state	评分 Score
0	双眼、双耳及头颈部毛细血管无充盈 No filling of capillaries in the eyes, ears, head and neck	0 ~ 4
I	双眼、双耳及头颈部毛细血管充盈、侧支形成明显 Capillaries of both eyes, ears, head and neck were full and the lateral branches were formed obviously	5 ~ 8
II	在 I 级基础上双眼膨出、加躯干部毛细血管充盈 Basis on the grade I, both eyes were enlarged, the capillaries of the trunk were filled	9 ~ 12
III	在 II 级基础上加四肢毛细血管充盈腹壁静脉轻度扩张 Basis on the grade II, the capillary filling of the extremities was added, the abdominal wall veins were slightly dilated	13 ~ 16

表 3 舌象观察指标及特征

Table 3 Observation indexes and characteristics of tongue image

观察指标 Observational index	舌色 Tongue color	舌苔 Coated tongue	
		苔质 Coating nature	苔色 Coating colour
特点 Characteristic	淡白色、红舌、绛舌、青紫舌 Light white, red tongue, crimson tongue, blue tongue	薄厚、润燥、腐腻 Thin and thick, moistening, dryness	白苔、黄苔、灰黑苔 White fur, yellow fur, gray and black fur

中,单鼠单笼,定量给予充足的食、水,记录大鼠 24 h 的饮食、饮水量及尿量、粪便量,同时观察尿液、粪便的颜色、性状,放入代谢笼前后均测量体质量。每周于固定时间收集 1 次。将收集 24 h 内大鼠粪便称其湿重后,置于恒温干燥箱 65 ℃ 干燥 12 h 后再次称其干重,计算粪便含水率:粪便含水率(%) = (粪便湿重 - 粪便干重) / 粪便湿重 × 100%。每周记录 1 次,连续 4 周。

1.2.5 大鼠血压及心率的测量

BP-98A 型动物无创血压计测量大鼠收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、心率(heart rate, HR)。血压测量

均于下午时段,提前 30 min 将大鼠转移至实验台上并保持周围环境安静,测量时让大鼠钻入提前预热至 37 ℃ 恒温的避光固定桶中,待大鼠进入安静状态,开始加压测量,分别记录 SBP、DBP、MAP 和 HR,每只大鼠重复测量血压及心率 3 次取其平均值^[8]。每周记录 1 次,连续 4 周。

1.2.6 大鼠呼吸频率的检测

应用动物肺功能检测仪记录大鼠清醒、安静状态下的呼吸频率(respiratory rate, RR),选取 5 min 连续、平稳的呼吸时段计算大鼠的平均 RR,每周记录 1 次,连续 4 周。

1.2.7 大鼠痛阈的检测

用红外甩尾痛觉测试仪检测各组大鼠的痛阈,检测前提前 30 min 将大鼠转移至实验台上,保持周围环境安静,将大鼠尾部下 1/3 处放置于测试仪的凹槽中的激光灯下,记录大鼠从开始至尾巴甩出凹槽的时间,即为大鼠痛阈值。每只大鼠重复测 3 次,间隔 5 min。于每周固定时间记录 1 次,连续 4 周。

1.2.8 旷场实验(open field test, OFT)

将清醒、情绪稳定状态的大鼠轻轻放入旷场实验区,应用红外探测记录并分析大鼠在旷场边缘的运动距离和停留时间,每只动物记录 5 min。一只动物实验结束后均用 75% 乙醇擦拭旷场消除残留气味后再放入下一只动物。每只动物于相同时间点每周记录 1 次,连续 4 周。

1.2.9 大鼠血清代谢物的非靶向检测

大鼠于第 4 周末麻醉,心尖部穿刺取血,分离血清。将血清样本用预冷甲醇:乙腈:水溶液(2:2:1)处理,超高效液相色谱系统分离,用质谱仪进行质谱分析^[9-10]。样本队列中插入 QC 样品,用于监测和评价系统稳定性及实验数据的可靠性。将检测到的代谢物于中科新生命本地自建标准品数据库(shanghai applied protein technology)搜库,对生物样本中的代谢物进行结构鉴定^[11]。

1.3 统计学分析

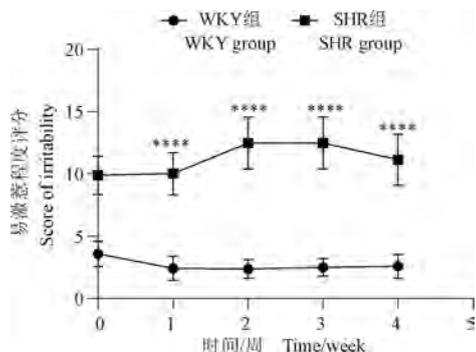
本研究数据均为计量资料,应用 GraphPad 9.0 进行数据分析及图表绘制。首先对数据进行正态分布检验,对符合正态分布的数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间的比较采用双因素方差分析(Two way ANOVA)。若不服从正态

分布;通过数据转换可转换为正态分布时,以“几何均数 \pm 对数值的标准差”表示,转换后数据的组间比较同上;若不能转换,以“中位数 \pm 四分位间距($M \pm Q$)”表示,组间的比较采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠易激惹程度的观察与评分

WKY 组大鼠毛发顺滑有光泽、安静喜睡、轻捉持其颈部或提尾时基本无反抗行为;而 SHR 组大鼠毛色暗黄、活动明显增加、烦躁不安、有同笼打斗现象,捉持颈部或提尾时多会尖叫、惊跳、甚至出现咬人行为。根据大鼠激惹程度定量评分,SHR 组大鼠评分均明显高于 WKY 组 ($P < 0.0001$),但 2 组动物各自的评分随时间均未出现明显变化 ($P > 0.05$),结果见图 1。



注:与 WKY 组相比,**** $P < 0.0001$ 。(下同)

Figure 1 Comparison of the degree of irritability of rats between SHR and WKY groups

Note. Compared with WKY group, **** $P < 0.0001$.

(The same in the following figures)

2.2 两组大鼠周围血管充盈状态的观察与评分

WKY 组大鼠双眼、双耳、头颈部、躯干、四肢等的毛细血管呈颜色暗红,未见充盈状态及侧支循环形成;SHR 组大鼠以上部位的毛细血管呈不同程度的充盈、扩张,暗红色,有较多侧支循环形成,尤其以双眼、耳背最为明显,部分 SHR 组大鼠眼球膨出明显。定量评分结果显示,SHR 组大鼠均高于 WKY 组 ($P < 0.0001$),结果见图 2。

2.3 两组大鼠舌象的观察

通过 4 周的观察,发现 WKY 组大鼠舌色淡红、舌质湿润,舌体大小适中;SHR 组大鼠中,大

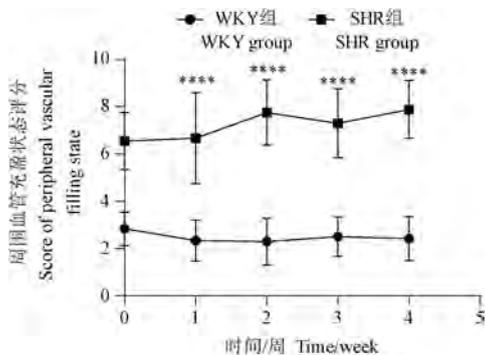


Figure 2 Comparison of peripheral vascular filling state of rats between SHR and WKY groups

多数 (75%) 舌象表现为舌色赤红,舌质干、少津液,2 只 (25%) 出现舌象呈暗紫色,结果见图 3。



Figure 3 Observation of the tongue image characteristics of rats in SHR and WKY groups

Figure 3 Observation of the tongue image characteristics of rats in SHR and WKY groups

2.4 两组大鼠体质量、饮食、饮水量、尿量、粪便量及粪便含水率的比较

与 WKY 组相比,SHR 组大鼠饮食饮水量及尿量、粪便量均较少,尿液颜色赤黄,粪便干燥颜色苍白,颗粒小且分明,粪便含水率明显偏低 ($P < 0.001$),结果见图 4。

2.5 两组大鼠的血压及心率的比较

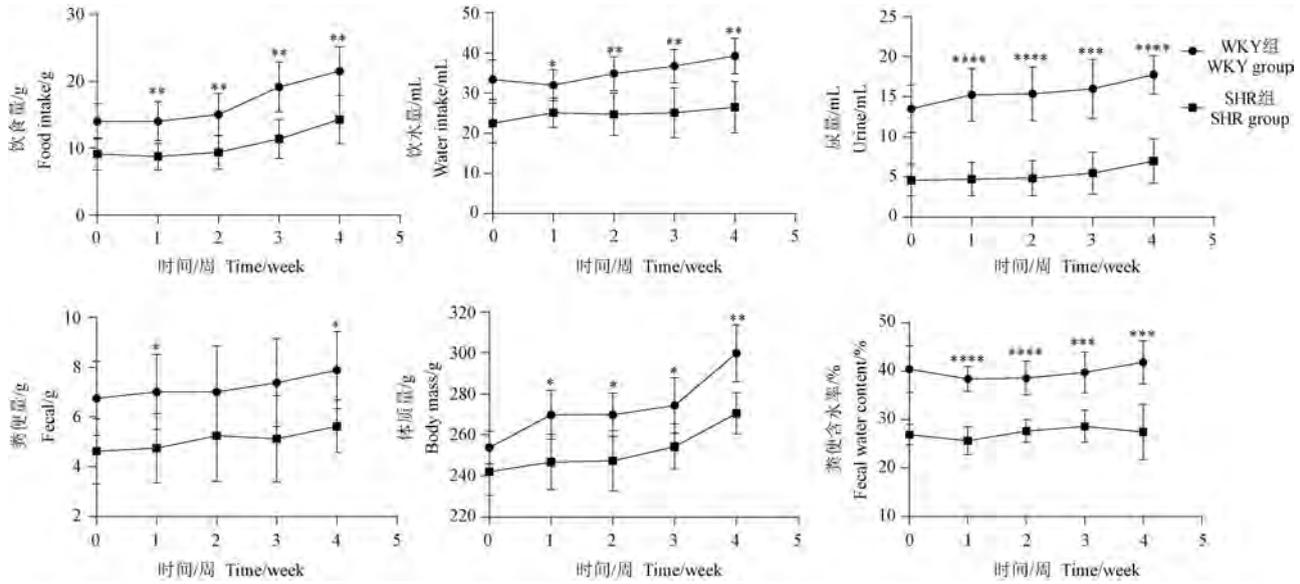
连续 4 周动态检测 WKY、SHR 组大鼠 SBP、DBP、MAP、HR,SHR 组大鼠血压心率均高于 WKY 组,Two-way ANOVA 分析显示,各时间点组间均具有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见图 5。

2.6 两组大鼠呼吸频率的比较

动物肺功能测试系统检测结果显示,在清醒状态下,SHR 组大鼠的呼吸频率明显高于 WKY 组大鼠 ($P < 0.0001$),结果见图 6。

2.7 两组大鼠痛阈的比较

大鼠甩尾痛阈检测结果显示,与 WKY 组大鼠相比,SHR 组大鼠的痛阈显著降低 ($P < 0.0001$),结果见图 7。



注:与 WKY 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 4 SHR 组与 WKY 组大鼠体质量、饮食、饮水量、尿量、粪便量及粪便含水率的比较

Note. Compared with WKY group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Comparison of the body mass, food intake, water intake, urine, fecal and fecal water content of rats between SHR and WKY groups

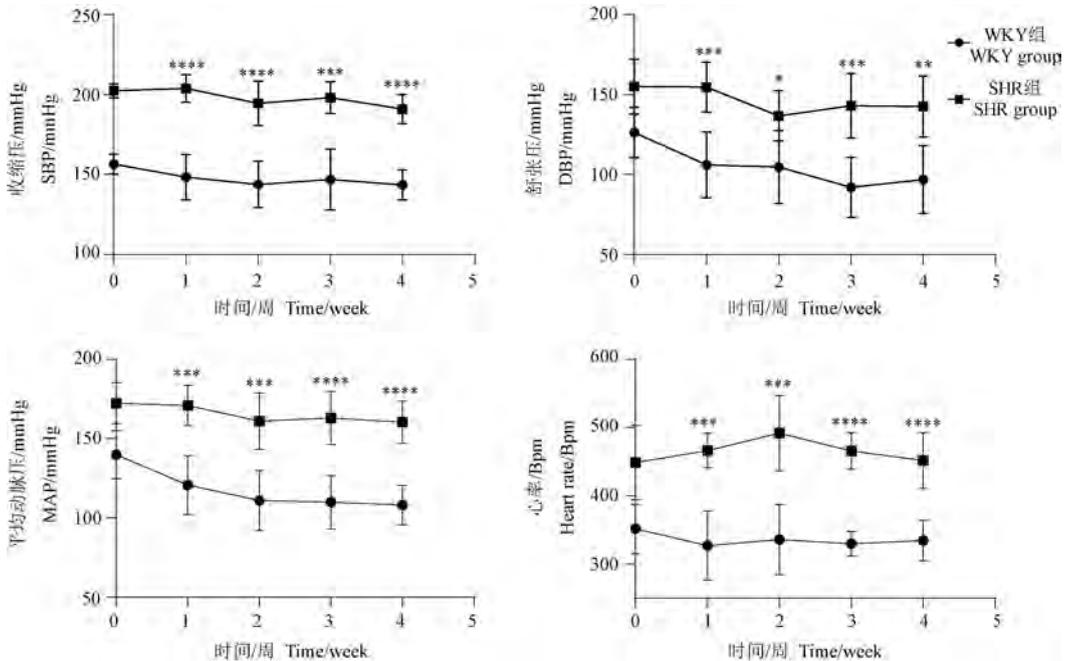


图 5 SHR 组与 WKY 组大鼠血压和心率的比较

Figure 5 Comparison of blood pressure and heart rate of rats between SHR and WKY groups

2.8 两组大鼠边缘运动距离和边缘运动时间的比较

旷场实验结果表明,与 WKY 组大鼠比较,SHR 组大鼠运动距离较大,且多贴旷场边缘,边缘运动距离和边缘运动时间均显著增加 ($P <$

0.001),结果见图 8。

2.9 两组大鼠血清代谢特点的比较

血清非靶代谢组学分析显示,在正负离子模式下,共鉴定出代谢物 1318 种。与 WKY 组大鼠相比,应用 T 检验和偏最小二乘判别分析 (PLS-

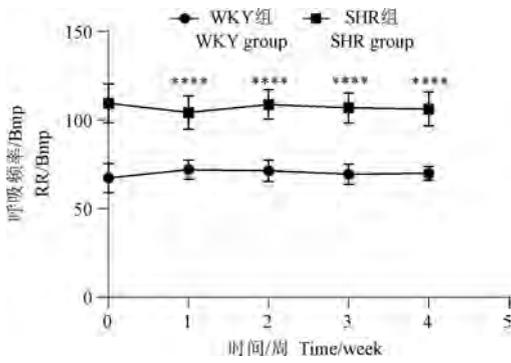


图 6 SHR 组与 WKY 组大鼠呼吸频率的比较

Figure 6 Comparison of respiratory rate of rats between SHR and WKY groups

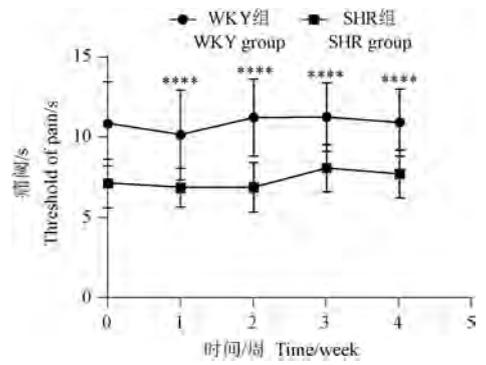


图 7 SHR 组与 WKY 组大鼠痛阈的比较

Figure 7 Comparison of pain threshold of rats between SHR and WKY groups

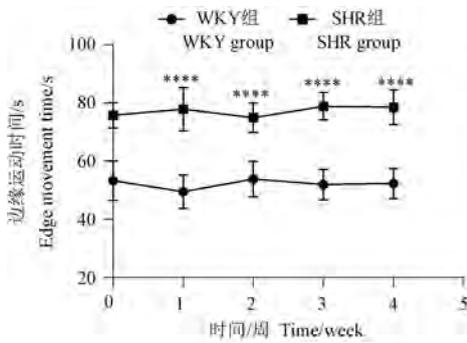


图 8 SHR 组与 WKY 组大鼠边缘运动距离和边缘运动时间的比较

Figure 8 Comparison of edge movement distance and edge movement time of rats between SHR and WKY groups

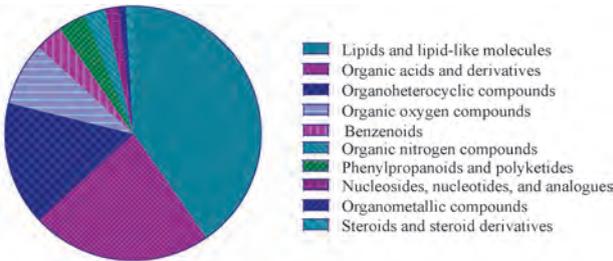
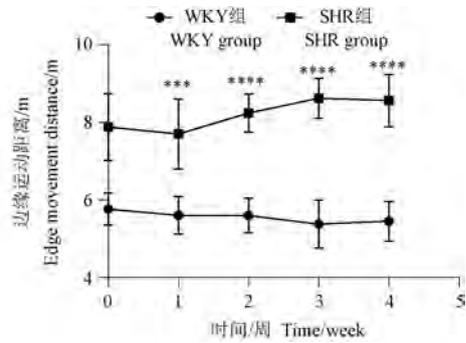


图 9 SHR 组与 WKY 组大鼠血浆差异代谢物分类图

Figure 9 Classification of plasma differential metabolites of rats in SHR and WKY groups

DA) 2 种统计学方法, 分别计算其 P 值和 VIP 值 (variable important in projection, VIP), 并以 $P < 0.05$ 和 $VIP \geq 1.00$ 为标准筛选出差异代谢物 114 种。这些差异代谢物主要归类为脂质和类脂分子 (40.35%)、有机酸及其衍生物 (22.8%)、有机杂环化合物 (15.79%), 结果见图 9。

进一步应用 KEGG 通路富集差异代谢物, 共得到 25 条可能的代谢通路。通过差异丰度得分 (differential abundance score, DAS) 评估了这些代

谢通路上所有差异代谢物的共同作用及其引起的整体变化趋势: $DAS < 0$, 说明代谢通路被可能抑制; $DAS = 0$, 说明代谢通路无明显变化趋势; $DAS > 0$, 说明代谢通路可能被激活^[12]。结果显示: 谷氨酸能突触, D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢, 氮代谢等 16 条代谢通路被激活 ($DAS > 0$), 而癌症中的胆碱代谢, 血清素突触能代谢, 甘油磷脂代谢等 4 条代谢通路被抑制 ($DAS < 0$), 其中有 3 条代谢通路与神经系统代谢相关: 谷氨酸能突触 ($DAS > 0$)、血清素突触 ($DAS < 0$)、GABA 能突触 ($DAS < 0$)。结果见图 10。

3 讨论

由于中医的整体观念和辨证论治的思想, 形成了与现代医学不同的认识疾病的独特视角, 这一视角强调疾病同时具有“病”与“证”的特征。因此, 一个同时具有证候和疾病特征的动物模型, 是中医药体内研究开展的基本条件^[13-14]。SHR 是 1963 年日本学者 OKAMOTO 等^[15]利用生

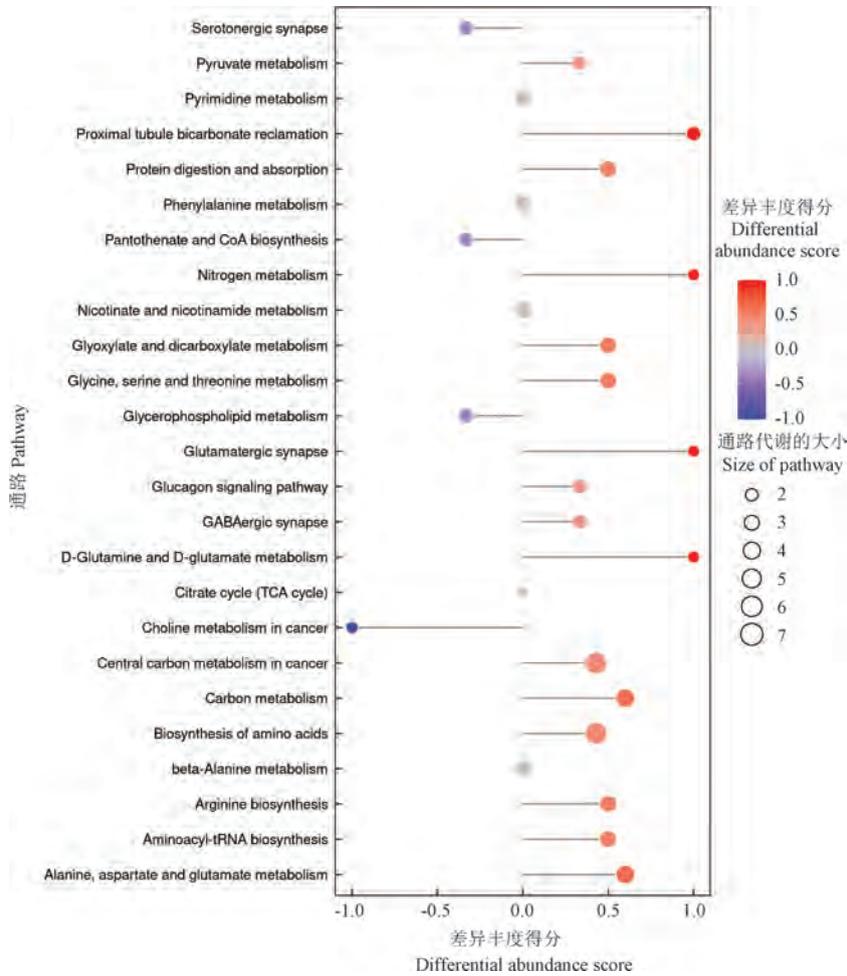


图 10 SHR 组与 WKY 组大鼠血清差异代谢通路差异丰度得分

Figure 10 Differential abundance scores of plasma differential metabolic pathways of rats in SHR and WKY groups

物遗传和变异特性自然发展而成的动物模型,属遗传性高血压大鼠品系,其病理表现与人原发性高血压高度相似,是国际上公认的原发性高血压实验研究的最佳动物模型^[16]。近年来,虽然 SHR 作为模型动物也被广泛应用于中医药防治高血压的研究中,为中医药在防治高血压的药理作用和机制的研究提供了支撑^[1,17-18],但是,对 SHR 中医证型的认识仍非常有限,目前亦尚未见到相关报道。为了解这一问题,本研究从不同角度对 SHR 进行了观察和检测。

在中医学中,高血压病属于“眩晕”范畴。根据卫生部颁布的《中药新药临床研究指导原则(试行)2002》,将眩晕(高血压)分为肝火亢盛(肝阳上亢)证、阴虚阳亢证、阴虚阳亢证和痰瘀互结证等 4 个证型^[19-20],每种证型都有其特定的主、次症状。基于高血压不同证型的特点,本研究收集了 SHR 大鼠的一般状态及性情、周围血管

充盈、舌象、饮食、进水量及尿量、粪便量及粪便含水率等信息,并将其与高血压证型进行了比对。

应用定量或半定量的观察方法,发现 SHR 表现出明显的易激惹状态、痛阈显著降低、OFT 中边缘运动距离、边缘停留时间均较长等典型的焦虑样行为,这些特点与肝阳上亢型高血压患者的急躁易怒症状高度契合,因此,初步推断,SHR 可能为高血压(眩晕)肝阳上亢证的动物模型。为了验证这一推断,本研究进一步观察了 SHR 的次要症状,首先是二便与进食进水情况,与 WKY 组相比,SHR 组大鼠饮水、进食及大、小便量均减少,小便颜色赤黄,粪便含水率明显偏低,二便特点亦与高血压肝阳上亢证的便秘、溲赤的特点相符;其次,SHR 大鼠外周毛细血管呈不同程度的扩张、侧支循环形成、眼球充血、膨出,舌色赤红,质干、少津液,以上特点亦与高血压肝阳上亢证患者的口干、面红、目赤、舌红等相同。血压和呼

吸频率测量结果显示,SHR 组大鼠 SBP、DBP、MBP 均比 WKY 组大鼠高,且 HR、RR 也较快;SHR 测得为体循环动脉压高且心率快,说明 SHR 大鼠存在脉弦数的特点。

医学家们发现高血压患者存在脂肪酸、氨基酸、神经递质等代谢紊乱的现象^[10],且不同中医证型的高血压患者代谢紊乱的特征亦有所不同,因此,有学者建议可将代谢组学作为辨别高血压证型的一种手段^[20]。因此,为进一步探索 SHR 高血压(眩晕)肝阳上亢证的物质基础,本研究应用 LC-MS/MS 对其血清中的代谢物进行了非靶向的鉴定、分类和功能富集,最终筛选出差异代谢物 114 种,这些差异代谢物主要为:脂质和类脂分子(40.35%),有机酸及其衍生物(22.8%)和有机杂环复合物(15.79%)。提示这 3 种物质的代谢紊乱可能在血压发生发展及肝阳上亢证的形成中起到了重要作用^[21-23]。这一实验结果与吴佳芸等^[24]、李超等^[25]的临床和实验结果基本一致。

应用 KEGG 通路富集和差异丰度得分法进一步对检测结果进行分析,富集得到差异代谢通路 25 条,其中的 16 条均被激活,仅 4 条被抑制,这一结果充分说明了 SHR 大鼠的能量代谢明显比 WKY 活跃。深入分析还发现,有 3 条代谢通路直接参与了机体兴奋性及焦虑样行为的形成:谷氨酸能突触、血清素突触、GABA 能突触。差异丰度得分显示,谷氨酸能突触和 GABA 能突触的代谢通路被激活,而血清素神经突触代谢通路则被抑制,因此基于以上结果推测,SHR 大鼠高血压(眩晕)肝阳上亢表现的原因可能与其物质代谢增强及神经兴奋性紊乱相关。

然而,由于人类疾病证型与动物之间可能存在差异,某些较为主观的指标如头晕、疼痛等无法在模型动物上得到准确反映,且对各种症状的观察评估目前还缺乏客观量化的指标。因此,虽然初步判断 SHR 可能表现为高血压肝阳上亢证,但仍需进一步完善其评价体系及相关物质基础。

参 考 文 献(References)

[1] 王玉妹,唐纯志,李景,等. 针刺“太冲”对自发性高血压大鼠血压影响的时效性[J]. 中医杂志, 2019, 60(22): 1964-1967.
WANG Y M, TANG C Z, LI J, et al. Effects of acupuncture

at “Taichong” (LR3) on time-effect of lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60(22): 1964-1967.

- [2] 徐晓雨, 龚帆影, 张春芹, 等. 潜阳育阴颗粒对阴虚阳亢型高血压合并高脂血症患者血管弹性功能的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 865-870.
XU X Y, GONG F Y, ZHANG C Q, et al. Clinical study on the effect of Qianyang Yuyin Granules on vascular elasticity function of hypertension combined with hyperlipidemia with Yin deficiency and Yang excess syndrome [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2021, 37(6): 865-870.
- [3] 任志鑫, 王雨, 张冰, 等. 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 897-908.
REN Z X, WANG Y, ZHANG B, et al. Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 897-908.
- [4] 鄢东红, 金益强, 肖纯, 等. 自发性高血压大鼠肝阳上亢证模型的复制[J]. 湖南中医学院学报, 1999, 19(4): 35-38.
YAN D H, JIN Y Q, XIAO C, et al. Replication of liver yang hyperactivity syndrome model in spontaneously hypertensive rats [J]. J Hunan Univ Chin Med, 1999, 19(4): 35-38.
- [5] 胡淑平, 吕圭源, 于平野, 等. 肝阳上亢型高血压模型及评价初探[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5): 698-701.
HU S P, LYU G Y, YU P Y, et al. Evaluation to hypertension model of hyperaction of liver Yang [J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2008, 32(5): 698-701.
- [6] 黄文权, 肖鸿, 袁林贵. 肝阳上亢证型实验动物模型研究初探[J]. 中国中医急症, 1996, 5(1): 36-37.
HUANG W Q, XIAO H, YUAN L G. Preliminary study on experimental animal model of hyperactivity of liver Yang syndrome [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 1996, 5(1): 36-37.
- [7] 陈金水. 中医学[M]. 北京: 人民卫生出版社; 2018.
Chen J S. Traditional chinese medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2018.
- [8] 赵健清, 丁露, 曾俊义, 等. 自发性高血压大鼠心肌纤维化时序动态变化[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 724-729.
ZHAO J Q, DING L, ZENG J Y, et al. Chronological changes in myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 724-729.
- [9] HAN Y, SUN H, ZHANG A, et al. Chinmedomics, a new strategy for evaluating the therapeutic efficacy of herbal medicines [J]. Pharmacol Ther, 2020, 216: 107680.

- [10] 陈帅, 韦姗姗, 贾勇, 等. 代谢组学在高血压研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 210-217.
CHEN S, WEI S S, JIA Y, et al. Overview of metabolomics in research of hypertension [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(2): 210-217.
- [11] 李佳佳. 西达本胺通过靶向能量代谢协同顺铂杀伤卵巢癌细胞及卵巢癌耐药细胞的代谢组学研究 [D]. 长春: 吉林大学; 2023.
LI J J. Synergy between Chidamide and cisplatin in killing ovarian cancer cells via targeting energy metabolism and metabolomics-based analysis on chemoresistance of ovarian cancer cells [D]. Changchun: Jilin University; 2023.
- [12] HAKIMI A A, REZNIK E, LEE C H, et al. An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma [J]. Cancer Cell, 2016, 29(1): 104-116.
- [13] 李思汉, 李书楠, 周福, 等. 关于中医证候动物模型研究的思考 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3357-3361.
LI S H, LI S N, ZHOU F, et al. Thought on study of animal models of traditional Chinese medicine syndromes [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(8): 3357-3361.
- [14] 李缘缘, 高碧珍. 中医证候动物模型的发展现状、问题与对策思考 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(1): 49-53.
LI Y Y, GAO B Z. Current status, problems and countermeasures of animal models for traditional Chinese medicine syndromes [J]. Chin J Tradit Chin Med, 2024, 39(1): 49-53.
- [15] OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats [J]. Jpn Circ J, 1963, 27: 282-293.
- [16] 屈会化, 赵琰, 王庆国. 自发性疾病动物模型的中医证候特征辨析思路与方法 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(12): 2506-2508.
QU H H, ZHAO Y, WANG Q G. Thinking train and method in differentiate and analyse research of spontaneously disease animal model with the characteristic of Chinese medical syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25(12): 2506-2508.
- [17] 秦钦, 时拥月, 姚佳梅, 等. 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠 p38 MAPK/HSP27 通路影响的研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(12): 1694-1705.
QIN Q, SHI Y Y, YAO J M, et al. Study on the effect of Tianma Gouteng Decoction on the p38 MAPK/HSP27 pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(12): 1694-1705.
- [18] 靳冉, 张志聪, 岳枫, 等. 安宫降压丸对自发性高血压大鼠的降压作用及机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4801-4804.
JIN R, ZHANG Z C, YUE F, et al. Antihypertensive effect and mechanism of Angong Jiangya Pills on spontaneously hypertensive rats [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(8): 4801-4804.
- [19] 何彦虎, 金华, 靳利梅, 等. 高血压不同中医证候患者脑白质病变评估研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6): 826-835.
HE Y H, JIN H, JIN L M, et al. Research assessment of white matter lesions in hypertensive patients with different traditional Chinese medicine syndromes [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(6): 826-835.
- [20] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行) [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
ZHENG X Y. Guiding principles of clinical research on new Chinese medicine (Trial) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.
- [21] BLOODA J, CANNON C P, GORDON W J, et al. Results of a remotely delivered hypertension and lipid program in more than 10000 patients across a diverse health care network [J]. JAMA Cardiol, 2023, 8(1): 12-21.
- [22] CHANDRA A, AYERS C R, NEELAND I J. Temporal changes in body fat distribution and hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(25): 3357-3359.
- [23] PÉREZ DE ISLA L, WATTS G F, ALONSO R, et al. Lipoprotein (a), LDL-cholesterol, and hypertension; predictors of the need for aortic valve replacement in familial hypercholesterolaemia [J]. Eur Heart J, 2021, 42(22): 2201-2211.
- [24] 吴佳芸, 李玲玲, 乔佳君, 等. 持续高血压状态自发性高血压大鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 428-439.
WU J Y, LI L L, QIAO J J, et al. A serum metabolomics-based study on persistent hypertensive SHR [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 428-439.
- [25] 李超, 鞠建庆, 潘文慧, 等. 基于血清代谢组学的高血压病中医证型代谢模式差异分析 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5515-5520.
LI C, JU J Q, PAN W H, et al. Analysis of the difference in the metabolic patterns of hypertension TCM syndromes based on serum metabolomics [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(9): 5515-5520.

罗佳欣,詹扬,孙登龙,等. 基于网络药理学、分子对接与实验验证探讨参灵草口服液抑制非小细胞肺癌的作用机制 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 54-69.

LUO J X, ZHAN Y, SUN D L, et al. Mechanisms of Shenlingcao oral liquid against non-small cell lung cancer by network pharmacology combined with molecular docking and experimental verification [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 54-69.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.006

基于网络药理学、分子对接与实验验证探讨参灵草口服液抑制非小细胞肺癌的作用机制

罗佳欣^{1,2}, 詹扬^{2,3}, 孙登龙^{2,3}, 伍振鹏^{1,2}, 刘宇清^{1,2}, 刘文君^{1,2,3*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 经典名方现代中药创制全国重点实验室, 南昌 330096; 3. 江中药业股份有限公司, 南昌 330096)

【摘要】 目的 通过网络药理学预测参灵草口服液 (Shenlingcao oral liquid, SLC) 抑制非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的作用机制, 并利用分子对接和体内动物实验进行初步验证。方法 利用数据库及文献查找获得 SLC 活性成分和对应靶点以及 NSCLC 对应靶点; 取 SLC 和 NSCLC 共同靶点构建蛋白质相互作用网络, 并进行基因本体分析 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书分析 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析和分子对接。构建 Lewis 肺癌小鼠模型, 设置模型组 (Model 组)、SLC 高剂量组 (SH 组) 和 SLC 低剂量组 (SL 组), SH 组和 SL 组分别按冻干粉 8.75 g/kg 和 3.50 g/kg 剂量灌胃给药。连续灌胃给药 14 d 后, 观察荷瘤小鼠肿瘤生长情况、肿瘤组织病理变化以及肿瘤细胞凋亡情况, 检测小鼠血常规指标变化, 检测小鼠肿瘤组织中磷酸化蛋白激酶 B (phospho-protein kinase B, p-AKT)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phospho-phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达情况, 验证 KEGG 富集的结果。结果 网络药理学分析表明 SLC 活性成分 77 个, 潜在作用靶点 618 个, NSCLC 潜在作用靶点 1498 个, 药物与疾病交集靶点 179 个。交集靶点富集分析表明, 主要富集在磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B 信号通路 (phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B signaling pathway, PI3K-AKT)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (mitogen-activated protein kinase signaling pathway, MAPK) 等相关通路。分子对接显示前 10 位核心成分与前 10 位核心靶点具有较好的结合能力。动物实验结果显示, 与模型组比较, SH 组和 SL 组肿瘤体积和肿瘤重量显著减小 ($P < 0.05, P < 0.01$), 白细胞 (white blood cell, WBC)、中性粒细胞 (neutrophil, Neut)、单核细胞 (monocytes, Mono) 数量显著减少 ($P < 0.01, P < 0.001$), 红细胞 (red blood cell, RBC)、血小板 (platelet, PLT)、血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 数量显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$), 肿瘤组织早期凋亡细胞显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 Bcl-2/GAPDH 蛋白表达水平显著减低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。PI3K、AKT1 和 Bcl-2 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 SLC 对 NSCLC 发挥抑制作用, 其机制可能与激活 PI3K-AKT 通路、促进细胞凋亡有关。

【关键词】 参灵草口服液; 非小细胞肺癌; 网络药理学; PI3K-AKT 信号通路; 动物实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0054-16

【基金项目】 江西省技术创新引导类计划项目 (20232BBH80009)。

Funded by the Jiangxi Provincial Technology Innovation Guidance Program (20232BBH80009).

【作者简介】 罗佳欣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: ljx161802@163.com

【通信作者】 刘文君, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 中药药效及物质基础。Email: crjzliuwenjun@163.com

Mechanisms of Shenlingcao oral liquid against non-small cell lung cancer by network pharmacology combined with molecular docking and experimental verification

LUO Jiaxin^{1,2}, ZHAN Yang^{2,3}, SUN Denglong^{2,3}, WU Zhenpeng^{1,2}, LIU Yuqing^{1,2}, LIU Wenjun^{1,2,3*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. State Key Laboratory for the Modernization of Classical and Famous Prescriptions of Chinese Medicine, Nanchang 330096, China; 3. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd, Nanchang 330096, China)

Corresponding author: LIU Wenjun. E-mail: crjzliuwenjun@163.com

【Abstract】 Objective In this study, we aimed to predict the inhibitory mechanism of Shenlingcao oral liquid (SLC) in non-small cell lung cancer (NSCLC) by network pharmacology and verify it by molecular docking and *in vivo* experiments. **Methods** The active ingredients and corresponding targets of SLC and NSCLC were obtained by database and literature search. Targets of SLC common to NSCLC were selected to construct the protein interaction network, and GO and KEGG enrichment analysis and molecular docking were performed. A Lewis lung cancer mouse model was constructed and divided into Model group, SH group, and SL group. The latter two groups were intragastrically administered 8.75 g SLC lyophilized powder/kg and 3.50 g SLC lyophilized powder/kg, respectively. After 14 days of drug intervention, tumor growth, pathological changes in tumor tissue, and apoptosis in tumor tissue were observed in tumor-bearing mice; changes in blood routine indexes and the tumor tissue expression of p-AKT, AKT, p-PI3K, PI3K, and Bcl-2 protein of mice were detected. The result of the KEGG enrichment analysis were verified. **Results** Network pharmacological analysis showed that there were 77 active ingredients, 618 potential targets, 1498 potential targets for NSCLC, and 179 drug and disease intersection targets. Target intersection enrichment analysis showed that they were mainly concentrated in the phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and other related pathways. Molecular docking showed that the top 10 core components had good bonding ability with the top 10 core targets. In the animal experiments, compared with the Model group, SH group and SL group had significantly decreased tumor volume and weight ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and significantly decreased white blood cell, neutrophil, and monocyte numbers ($P < 0.01$, $P < 0.001$). Red blood cells, platelets, and hemoglobin were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); apoptotic cells were significantly increased in early tumor tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expression levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and Bcl-2/GAPDH were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression levels of *PI3K*, *AKT1*, and *Bcl-2* genes were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusions** The mechanisms of SLC activity against NSCLC may be related to the activation of the PI3K-AKT pathway and the promotion of apoptosis.

【Keywords】 Shenlingcao oral liquid; NSCLC; network pharmacology; PI3K-AKT signaling pathway; animal experiment

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

肺癌是全球范围内常见的癌症之一^[1],其发病可能由吸烟、环境、家族遗传倾向、特定基因突变、自身免疫以及个人饮食习惯等多种因素共同作用导致^[2]。肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌两大类,其中非小细胞肺癌约占整体肺癌的 85%,是中国癌症相关死亡的主要原因之一^[3]。化疗作为治疗非小细胞肺癌的常规疗法,虽然能有效抑制肿瘤发展,但常伴随免疫抑制、

骨髓抑制、肝肾功能损害等,这些不良反应均可严重影响患者的预后和生活质量^[4]。中草药作为抗癌辅助治疗手段,在联合化疗、放疗、靶向治疗时,能够潜在地增强这些抗癌疗法的敏感性,促进机体免疫系统的调节与恢复,从而有助于减少不良反应和并发症的发生^[5]。

参灵草口服液是由西洋参、灵芝、发酵虫草菌粉、知母和玫瑰花五味中草药制成的保健食

品。其中西洋参补气,灵芝安神,两者共为君药;冬虫夏草填精,为臣药;知母为佐药;玫瑰花为使药,处方做到了精气神同补,五脏并调的功效。参灵草口服液包含了各药材的主要有效成分,质量稳定、可靠^[6]。西洋参成分复杂,主要有皂苷、多糖、挥发油等成分,其中皂苷在很多研究中被证实有抗肿瘤作用。西洋参总皂苷治疗非小细胞肺癌,可显著抑制肿瘤生长,提高小鼠的免疫功能^[7]。灵芝具有调节机体免疫、抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡等作用^[8]。冬虫夏草作为国内名贵中草药,在免疫调节、抗肿瘤等方面发挥药理作用。虫草酸能够抑制裸鼠肺癌细胞的生长,促进肿瘤细胞凋亡^[9]。前期公开的多中心随机对照实验已经证实在接受辅助化疗的非小细胞肺癌患者中,补充参灵草口服液治疗相比单独化疗可显著改善患者生活质量,减少患者癌症相关并发症^[10]。由于参灵草口服液治疗非小细胞肺癌的作用机制尚不明确,本研究基于网络药理学方法筛选药物活性成分、发现药物靶标,预测药物和疾病的作用和联系,通过体内实验进一步验证,明确其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 32 只,雄性,4 ~ 6 周龄,体质量 15 ~ 18 g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。在江中药业动物实验中心 SPF 级环境中饲养【SYXK(赣)2020-0004】,温度:20 ~ 26 °C、相对湿度:50% ~ 70%、12 h 循环照明,小鼠自由进食和饮水。本动物实验经江中药业股份有限公司实验动物管理和伦理委员会批准(20230509)。

1.1.2 细胞

小鼠 Lewis 肺癌细胞(LLC 细胞)购于中国科学院细胞库(目录号:SCSP-5252)。

1.1.3 主要试剂与仪器

参灵草口服液(国食健字 G20080675;规格:每瓶 200 mL;批号 20091002;江中药业股份有限公司);氯化钠注射液(国药准字 H10983065;江西科伦药业有限公司);胶原酶(CSA:9001-12-1;德国 Sigma 公司);DMEM 培养基(批号 2764635;

赛默飞世尔科技公司);胎牛血清(批号 2859322P;赛默飞世尔科技公司);PBS 缓冲液(货号 P1022;北京索莱宝科技有限公司);二甲基亚砜(CAS:67-68-5;北京索莱宝科技有限公司);胰蛋白酶-ETDA 消化液(CAS:9002-07-7;北京索莱宝科技有限公司);青链霉素混合液(货号 P1400;北京索莱宝科技有限公司);Bcl-2 Rabbit mAb(货号 3498S;美国 Cell Signaling Technology 公司);重组 Anti-AKT1 + AKT2 + AKT3 抗体(货号 ab179463;英国 Abcam 公司);重组 Anti-AKT1(PS473) + AKT2(PS474) + AKT3(PS472) 抗体(货号 ab192623;英国 Abcam 公司);重组 Anti-PI3Kinase p85 alpha(货号 ab191606;英国 Abcam 公司);重组 Anti-PI3Kinase p85 alpha(phospho Y607)(货号 ab182651;英国 Abcam 公司);GAPDH Rabbit mAb(货号 A19056;武汉爱博泰克生物科技有限公司);二抗(货号 PR30011;武汉三鹰生物技术有限公司);Omni-Easy™ 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(货号 PG211;上海雅酶生物医药科技有限公司);加强型 RIPA 裂解液(货号 C1053 + ;北京普利莱基因技术有限公司);蛋白酶抑制剂混合物通用型(货号 P1275;北京普利莱基因技术有限公司);磷酸酶抑制剂混合物通用型(货号 P1260;北京普利莱基因技术有限公司);蛋白上样缓冲液(货号 WB2001;苏州新赛美生物科技有限公司);ECL 化学发光超敏显色试剂盒(货号 36208ES60;翌圣生物科技股份有限公司);QuickBlick™ Western 封闭液(货号 P0252;碧云天生物技术有限公司);超纯水由法国密理博公司超纯水仪制备;荧光定量 PCR 试剂盒(货号 Q712-02;南京诺唯赞生物科技股份有限公司)和逆转录试剂盒(货号 R222-01;南京诺唯赞生物科技股份有限公司);RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒(离心柱式)(货号 R0027;碧云天生物技术有限公司)。

数显游标卡尺(型号 DL91150;得力集团有限公司);超纯水仪(型号 Direct-Q5UV;法国密理博公司);千分之一天平(型号 BCE423i-1CCN;德国塞德利斯公司);组织研磨仪(型号 JXFSTPRP-CL;上海净信实业发展有限公司);金属浴(HB120-S;大龙兴创实验仪器北京有限公司);倒置显微镜(型号 DMILLED;德国徕卡公司);细胞

计数仪器(型号 Countstar Mira BF;上海睿钰生物科技有限公司);三气培养箱(型号 MCO-170MUVHL-PC;美国赛默飞公司);恒温水浴槽(型号 SDminiN;日本 TAITEC 公司);生物安全柜(型号 HFsafe-1200LC;力康生物医疗科技控股有限公司);台式冷冻离心机(型号 ST1R Plus;美国赛默飞公司);圆周摇床(型号 SK-0180-F;大龙兴创实验仪器股份有限公司);凝胶成像系统(型号 800UV;Cytiva 思拓凡公司);电泳仪(型号 1658033;美国伯乐公司);双开门冰箱(型号 BCD-606WKPZM(E);美的集团股份有限公司);医用低温保存箱(型号 DW-86L338J;海尔集团公司);流式细胞仪(型号 CytoFLEX;美国 BECKMEN COULTER 公司);动物血球分析仪(型号 BC-5000VET;迈瑞医疗国际股份有限公司);PCR 仪(型号 C100;美国 Bio-Rad 公司);荧光定量 PCR 仪(型号 CFX Connect;美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.4 数据库、平台及软件

中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSp, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>);有机小分子生物活性数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>);小分子药物靶点预测数据库(Swiss Target Prediction, <http://swisstargetprediction.ch/>);蛋白质数据库(Universal Protein, UniProt, <https://www.uniprot.org/>);人类孟德尔遗传数据库(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, <https://www.omim.org/>);人类基因数据库(The Human Gene Database, GeneCards, <https://www.genecards.org/>);治疗靶点数据库(Therapeutic Target Database, TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>);韦恩图绘制在线平台(Venny 2.1.0, <https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/>);DrugBank 数据库(DrugBank, <https://go.drugbank.com/>);蛋白质相互作用网络数据库(STRING, <https://string-db.org/>);注释、可视化和综合发现数据库(The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>);结构生物信息学蛋白质数据库(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank, RCSB

PDB, <https://www.rcsb.org/search>);在线生物信息学分析、可视化云平台(微生信, <http://www.bioinformatics.com.cn>);一体化网络数据集成、分析和可视化软件 Cytoscape 3.10.1;分子对接软件 AutoDock Tools 1.5.6;分子对接软件 Pymol 2.5.5;作图软件 Origin 2021;PCR 引物数据库(PrimerBank, <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>)。

1.2 方法

1.2.1 基于网络药理学预测 SLC 治疗 NSCLC 的作用机制

(1) SLC 化学成分作用靶点和 NSCLC 疾病靶点的筛选:利用 TCMSp 数据库设置条件为口服生物利用度(oral bio availability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 检索参灵草口服液活性成分^[11], Swiss Target Prediction 数据库进行靶点预测。挖掘 GeneCards 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库、Swiss Target Prediction 数据库和 DrugBank 数据库中与非小细胞肺癌相关的靶点信息。合并 5 个数据库的疾病靶点,删除重复靶点利用 UniProt 数据库对靶点进行标准化^[12]。

(2) 筛选 SLC 与 NSCLC 交集靶点:采用 Cytoscape 3.10.1 软件将筛选到的 SLC 成分靶点绘制“药物-化合物-靶点”网络图。通过 Venny 2.1.0 将 SLC 成分靶点和 NSCLC 疾病靶点取交集,绘制韦恩图。

(3) PPI 网络构建及分析:将 SLC 和 NSCLC 的交集靶点导入 STRING 数据库,构建靶标蛋白之间的相互作用网络。Cytoscape 3.10.1 软件做进一步可视化处理^[12]。

(4) GO 功能及 KEGG 通路富集分析:使用 DAVID 数据库进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析。并利用线上平台“微生信”进行可视化处理^[13]。

(5) 分子对接实验:小分子药物活性成分 3D 结构于 PubChem 数据库下载,大分子蛋白 PDB 文件于 RCSB PDB 下载。小分子需要加氢、检测扭转键和扭转中心并设为配体,大分子需要加氢、去水并设为受体,以上步骤均在 AutoDock Tools 1.5.6 软件上完成。选择其中结合能低(低于 -5 kJ/mol)且有氢键的构象用于分析^[14]。利用 Pymol 2.5.5 软件做图。

1.2.2 基于动物实验验证 SLC 治疗 NSCLC 的作用机制

(1) SLC 冻干粉的制备、受试物的配制方法及浓度:4 瓶 SLC(每瓶 200 mL)经冷冻干燥制备约得 48 g 冻干粉的样品,即每毫升 SLC 相当于冻干粉 0.06 g。

SLC 低剂量:取 0.7 g 冻干粉用超纯水配制成 0.35 g/mL 的药液;SLC 高剂量:取 1.75 g 冻干粉用超纯水配制成 0.875 g/mL 的药液。

(2) Lewis 肺癌小鼠模型构建及分组干预:将小鼠右臀上背部毛发刮掉,用酒精棉球擦拭小鼠右臀上背部后,轻微摇晃盛放细胞悬液的离心管至细胞分散均匀。注射器吸取 0.2 mL 的 LLC 细胞悬液(1×10^6 /mL)后向消毒处皮下注射。接种后第 5 天肿瘤体积达到 50 ~ 100 mm³ 且无溃破时,将成瘤的 24 只小鼠按随机数字表分为 3 组,每组 8 只,设为模型组(Model 组)、SLC 高剂量组(SH 组)和 SLC 低剂量组(SL 组),另取 8 只正常小鼠设为正常对照组(Control 组)。SH 组和 SL 组分别按冻干粉 8.75 g/kg 和 3.50 g/kg 灌胃给药,Model 组和 Control 组灌胃等量超纯水,各组的给药体积均为 0.1 mL/10 g,连续给药 14 d 后次日处死小鼠。

(3) SLC 治疗 Lewis 肺癌小鼠药效评估:造模后第 5、8、11、14、17、20 天测量并记录肿瘤组织长、宽直径变化,计算瘤体积($V = 0.5 \times \text{长径} \times \text{宽径} \times \text{宽径}^{[15]}$)。第 20 天处死小鼠,完整剥离皮下瘤体称重,计算抑瘤率($\% = (\text{模型组瘤块重量} - \text{给药组瘤块重量}) / \text{模型组瘤块重量} \times 100\%^{[15]}$)。并对固定的肿瘤组织进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,观察其病理组织变化情况。

(4) 血液学指标检测:末次给药后取外周血,采用动物血球分析仪检测白细胞(white blood cell, WBC)、中性粒细胞(neutrophil, Neut)、单核细胞(monocytes, Mono)、红细胞(red blood cell, RBC)、血小板(platelet, PLT)、血红蛋白(hemoglobin, HGB)。

(5) 流式细胞技术检测细胞凋亡:根据膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)试剂盒说明书操作,Model 组、SL 组和 SH 组各取 1×10^5 个细胞,染色 20 min 后于流式

细胞仪检测。以 Annexin V-FITC 阳性、PI 阴性细胞数作为细胞凋亡率计算细胞数。

(6) 蛋白质印迹(Western Blot)检测通道蛋白的表达:Model 组、SL 组和 SH 组各称取 20 mg 肿瘤组织,加入 2 mL 蛋白裂解液裂解,二喹啉甲酸法(BCA 法)测定蛋白浓度^[15]。7.5% SDS-PAGE 电泳,湿转至 PVDF 膜,快速封闭液封闭,一抗孵育 4 °C 过夜,二抗(1:10 000)室温孵育 1 h。超敏 ECL 化学发光液染色,凝胶成像系统成像,Image J1. x 软件定量分析^[16]。

(7) 实时定量反转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)检测基因表达:Model 组、SL 组和 SH 组各称取 20 mg 肿瘤组织,使用动物 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,使用反转录试剂盒合成 cDNA。根据序列信息用 PCR 引物数据库设计引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。序列信息如表 1 所示。使用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行实验,使用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法计算 RNA 的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因 Gene	引物序列(5' -3') Primer sequence(5' -3')
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
AKT1	F: ATGAACGACGTAGCCATTGTG
	R: TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT
PI3K	F: GCAGAGGGCTACCACTACAGA
	R: CTGAATCCAAGTGCCACTAAGG
Bcl-2	F: GTCGCTACCGTCGTGACTTC
	R: CAGACATGCACCTACCCAGC

1.3 统计学分析

所有数据均用 SPSS 27.0 统计软件,用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据之间采用 *t* 检验分析其差异性, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 SLC 活性成分分析及作用靶点筛选

通过 TCMSP 数据库检索,文献补充及 PubChem 校准后共获得 SLC 5 味药物潜在活性成分 77 个,其中西洋参 10 个、发酵虫草菌粉 11 个、

灵芝 37 个、知母 12 个、玫瑰花 7 个。多味药重复的活性成分有一个 Beta-sitosterol(表 2)。对以上活性成分进行靶点预测,筛掉重复值,共获得 618 个靶点基因。

表 2 SLC 的主要潜在有效活性成分

Table 2 Main potential active ingredients of SLC

中药来源 Source of Chinese medicine	活性成分 Active ingredients
西洋参 <i>Panax quinquefolius</i> L.	聚乙炔 PQ-2 ^[17] Polyacetylene PQ-2 ^[17]
	罂粟碱 ^[18] Papaverine ^[18]
	人参皂苷 rh2 Ginsenoside rh2
	股金醇棕榈酸酯 20-hexadecanoylingenol
	豆甾烷-3,5-二烯-7-酮 Stigmasta-3,5-dien-7-one
	豆甾-7-烯醇 Stigmast-7-enol
	胡萝卜甾醇 Daucosterol
	曼陀罗灵 Daturilin
	人参皂苷 Rg1 Ginsenoside Rg1
	花生四烯酸 Arachidonic acid 乙酸亚油醇酯 Linoleyl acetate 胆固醇 Cholesterol
发酵虫草菌粉 Fermented <i>Cordyceps sinensis</i> powder	5'单磷酸腺苷 Adenosine 5'-monophosphate 甘露醇 Mannitol
	环磷酸腺苷 Cyclic adenosine monophosphate 海藻糖 Trehalose
	酪氨酸 ^[19] Tyrosine ^[19]
	腺苷 ^[19] Adenosine ^[19]
	鸟苷 Guanosine
	麦角甾-7,22E-二烯-3β Campesta-7,22E-dien-3beta-ol
	5α-羊毛甾-7,9(11),24-三烯-15α,26-二羟基-3-酮
	5alpha-Lanosta-7,9(11),24-triene-15alpha,26-dihydroxy-3-one
	麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮 Ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one
	麦角甾-7,9(11),22-三亚乙基四胺-3β,5α,6α-醇
	Ergosta-7,9(11),22-trien-3β,5α,6α-triol
	灵芝醇 B Ganoderal B
	丹芝酸 E Ganolucidic acid E
	灵芝醛 B Lucialdehyde B
	赤芝酸 F 甲酯 Methyl lucidenate F 赤芝酸 A 甲酯 Methyl lucidenate A 赤芝酮 A Lucidone A 赤芝酸 Q 甲酯 Methyl lucidenate Q
啤酒甾醇 Cerevisterol (22E)麦角甾醇-7,22-二烯-3β (22E)-Ergosta-7,22-diene-3beta-ol	
鞣酸 Ellagic acid	

续表 2

中药来源 Source of Chinese medicine	活性成分 Active ingredients
知母 <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bge.	灵芝烯酸 A ^[20] Ganoderenic acid A ^[20]
	灵芝烯酸 C ^[19] Ganoderenic acid C ^[19]
	灵芝烯酸 D Ganoderenic acid D
	灵芝烯酸 H ^[19] Ganoderenic acid H ^[19]
	灵芝酸 A ^[19] Ganoderic acid A ^[19]
	灵芝酸 B ^[21] Ganoderic acid B ^[21]
	灵芝酸 C1 ^[22] Ganoderic acid C1 ^[22]
	灵芝酸 C2 ^[19] Ganoderic acid C2 ^[19]
	灵芝酸 C6 ^[19] Ganoderic acid C6 ^[19]
	灵芝酸 D ^[19] Ganoderic acid D ^[19]
	灵芝酸 F ^[19] Ganoderic acid F ^[19]
	灵芝酸 H ^[19] Ganoderic acid H ^[19]
	灵芝酸 I ^[19] Ganoderic acid I ^[19]
	灵芝酸 J ^[19] Ganoderic acid J ^[19]
	灵芝酸 Z ^[23] Ganoderic acid Z ^[23]
	丹芝酸 B ^[23] Ganolucidic acid B ^[23]
	丹芝酸 D ^[19] Ganolucidic acid D ^[19]
	赤芝酸 D ^[20] Lucidenic acid D ^[20] 赤芝酸 E ^[20] Lucidenic acid E ^[20] 赤芝酸 F ^[20] Lucidenic acid F ^[20] 赤芝酸 N ^[20] Lucidenic acid N ^[20]
	色氨酸 Tryptophan
知母皂苷 B III Timosaponin B III	灰绿曲霉酰胺 Asperglaucide
	山柰酚 Kaempferol
	淫羊藿苷元 Anhydroicaritin
	知母皂苷 F Anemarsaponin F
	小星蒜碱 Hippeastrine
	知母皂苷 B III Timosaponin B III
	豆甾醇 Stigmasterol
	淫羊藿次苷 I Icaritin I
	知母皂苷 C Anemarsaponin C
	顺式-N-阿魏酰酪胺 N-cis-feruloyltyramine
顺式-N-对香豆酰酪胺 cis-N-p-coumaroyltyramine	
玫瑰花 <i>Rosa rugosa</i> Thunb.	谷甾醇 Sitosterol
	花色苷 Cyanin
	维生素 E Vitamin-E
	去甲基茵陈色原酮 Demethoxycapillarisin
西洋参、灵芝、发酵虫草菌粉、玫瑰花 <i>Panax quinquefolius</i> L., <i>Ganoderma lucidum</i> (Leyss. Ex Fr.) Karst., Fermented <i>Cordyceps sinensis</i> powder, <i>Rosa rugosa</i> Thunb.	β-胡萝卜素 Beta-Carotene
	槲皮素 Quercetin
	谷固醇 Beta-sitosterol

2.2 药物-化合物-靶点网络图构建

利用 Cytoscape 3. 10. 1 软件分析并绘制 SLC 活性成分和作用靶点的关系网络(图 1), 该网络中共有 664 个节点, 2832 条边, 包括 77 个活性成分, 618 个潜在靶点。其中橙黄色六边形表示发酵虫草菌粉活性成分(命名为 CS 1-9)、蓝色六边形表示玫瑰花活性成分(命名为 MGH 1-6)、紫色六边形表示西洋参活性成分(命名为 XYS 1-9)、红色六边形表示灵芝活性成分(命名为 LZ 1-36)、粉红色六边形表示知母活性成分(命名为

ZM 1-12), 浅黄色六边形表示西洋参、发酵虫草菌粉、灵芝和玫瑰花共有的活性成分, 命名为 A, 绿色菱形表示潜在靶点。根据 Degree 筛选出 SLC 中作用靶点排名前 10 的活性物质为 Quercetin、Beta-sitosterol、Lucidenic acid F、Ganolucidic acid D、Ganolucidic acid B、Ganoderic acid Z、Ganoderic acid J、Ganoderic acid I、Ganoderic acid D、Ganoderic acid C6, 推测这十个活性成分为治疗 NSCLC 较为有效的活性成分。

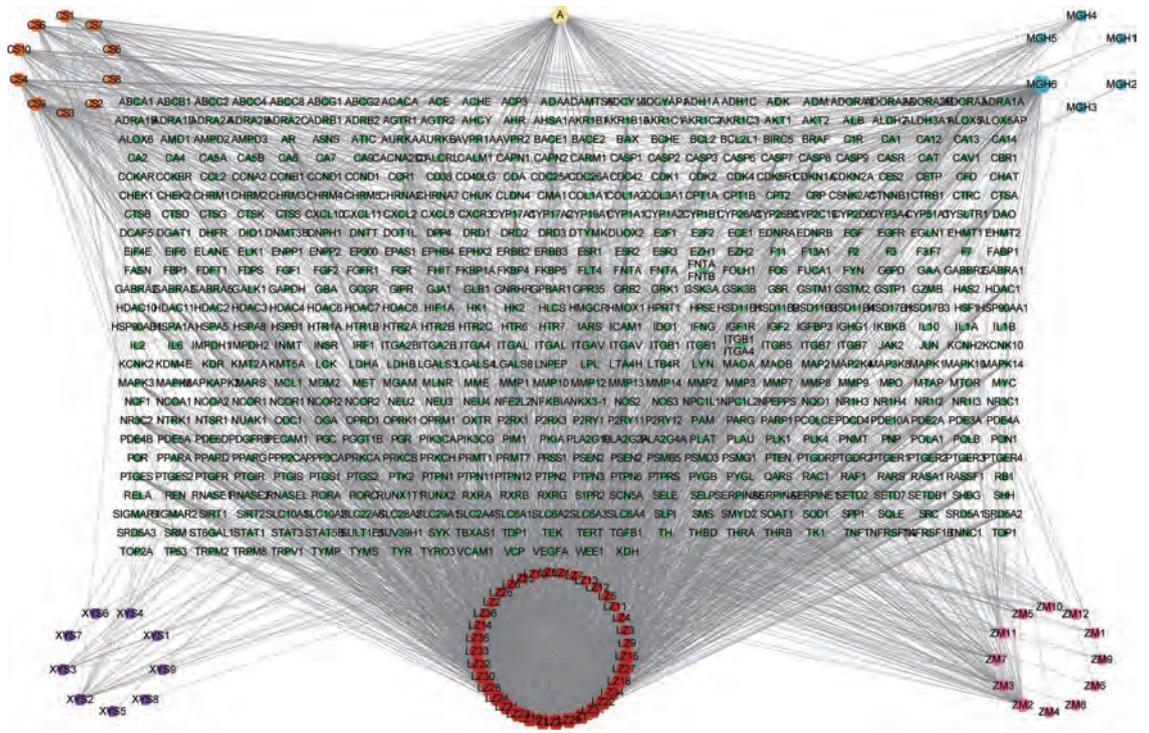


图 1 SLC “药物-化合物-靶点”网络图

Figure 1 SLC “drug-compound-target” network diagram

2.3 非小细胞肺癌靶点检索与 SLC 药物共同靶点的获取

GeneCards 数据库 (relevance score > 4 倍中位值) 获取 1842 个靶点, OMIM 数据库获得 117 个靶点, TTD 数据库获得 95 个靶点, Swiss Target Prediction 数据库获得 88 个靶点和 DrugBank 数据库获得 43 个靶点。合并删除重复值, 共获得 1499 个靶点。使用 Venny 2. 1. 0 平台将 618 个药物靶点基因和 1498 个疾病靶点基因取交集, 得到 179 个交集靶点(图 2)。

2.4 PPI 网络构建及分析

从 STRING 数据库中获得 179 个交集基因的

互作网络图。该网络图包括 177 个节点 (node), 5935 条边 (edge)。导入 Cytoscape 3. 10. 1 软件进行分析 (删掉 Degree < 90 的靶点进行展示, 图 3), 其中节点代表靶点基因, 节点形状越大、颜色越深代表 Degree 值越高。Degree 值排名前 10 的靶点基因分别为 *GAPDH*、*TP53*、*AKT1*、*EGFR*、*IL6*、*STAT3*、*MYC*、*CTNNB1*、*BCL2*、*TNF*。这些靶点被认为是 SLC 对 NSCLC 进行干预的主要靶基因。

2.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对交集基因进行 GO 与 KEGG 通路富集分析, 并且分别对其进行可视化处理。根据 GO 分析结果(图 4A), SLC 在生物过

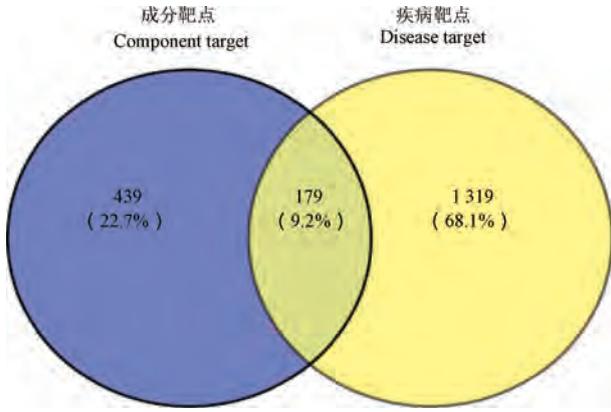


图 2 SLC 活性成分靶点与 NSCLC 靶点的韦恩图
Figure 2 Venn diagram of SLC active ingredient targets and NSCLC targets

程 (biological process, BP) 中可能参与了凋亡过程的负调控; 细胞组成 (cell component, CC) 在细胞核、胞液等起作用; 分子功能 (molecular function, MF) 激活了酶结合等。KEGG 富集得到 176 条通路结果, 显示主要富集在癌症通路、PI3K-AKT 信号通路和 MAPK 信号通路等 (图 4B)。

PI3K-AKT 信号通路作为一条细胞内信号传导途径, 在细胞存活、生长中发挥着重要作用。此途径核心基因为磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT), PI3K 被激活后, 产生磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸酯 (phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate, PIP3) 并激活 AKT。激活的

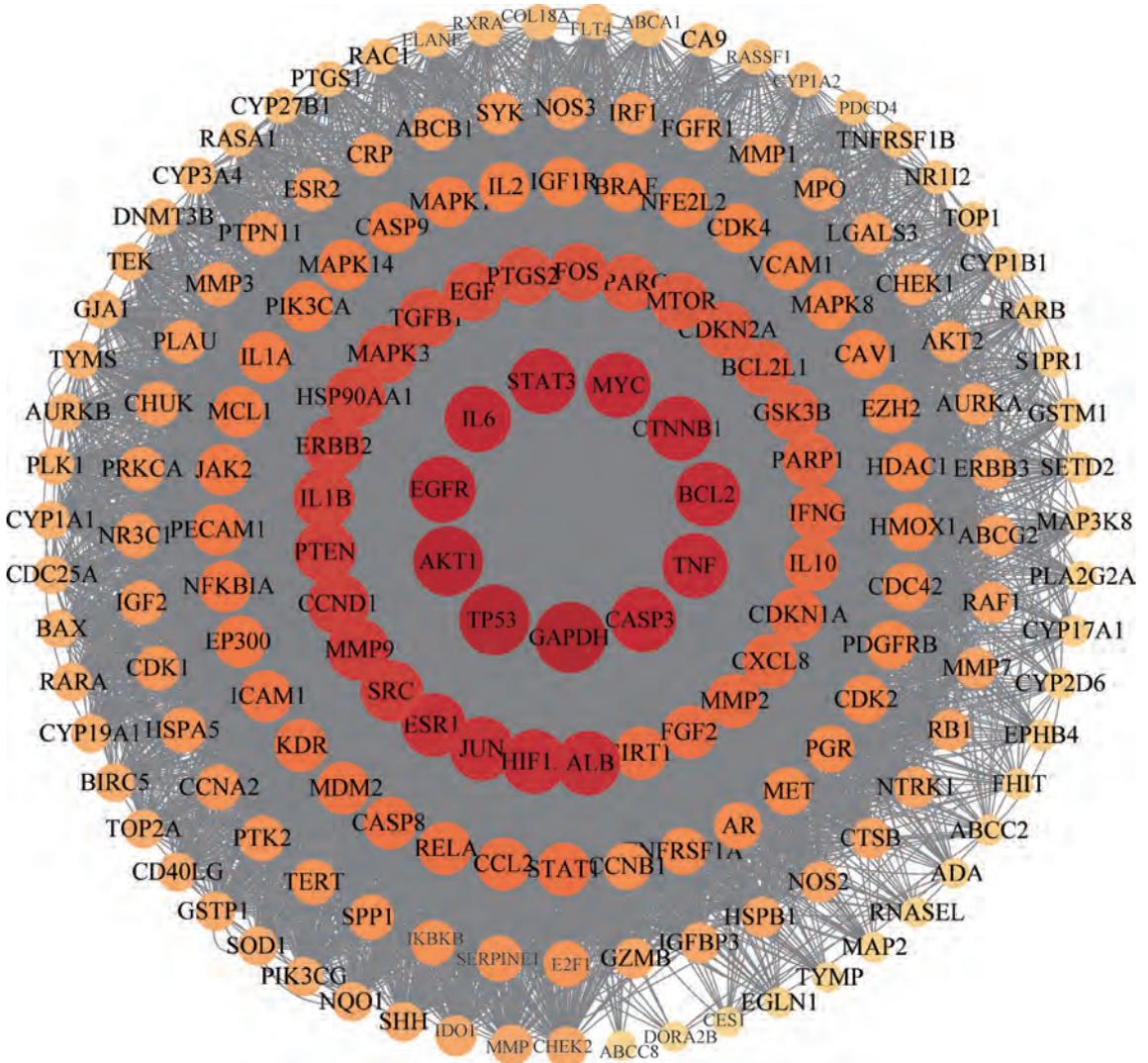
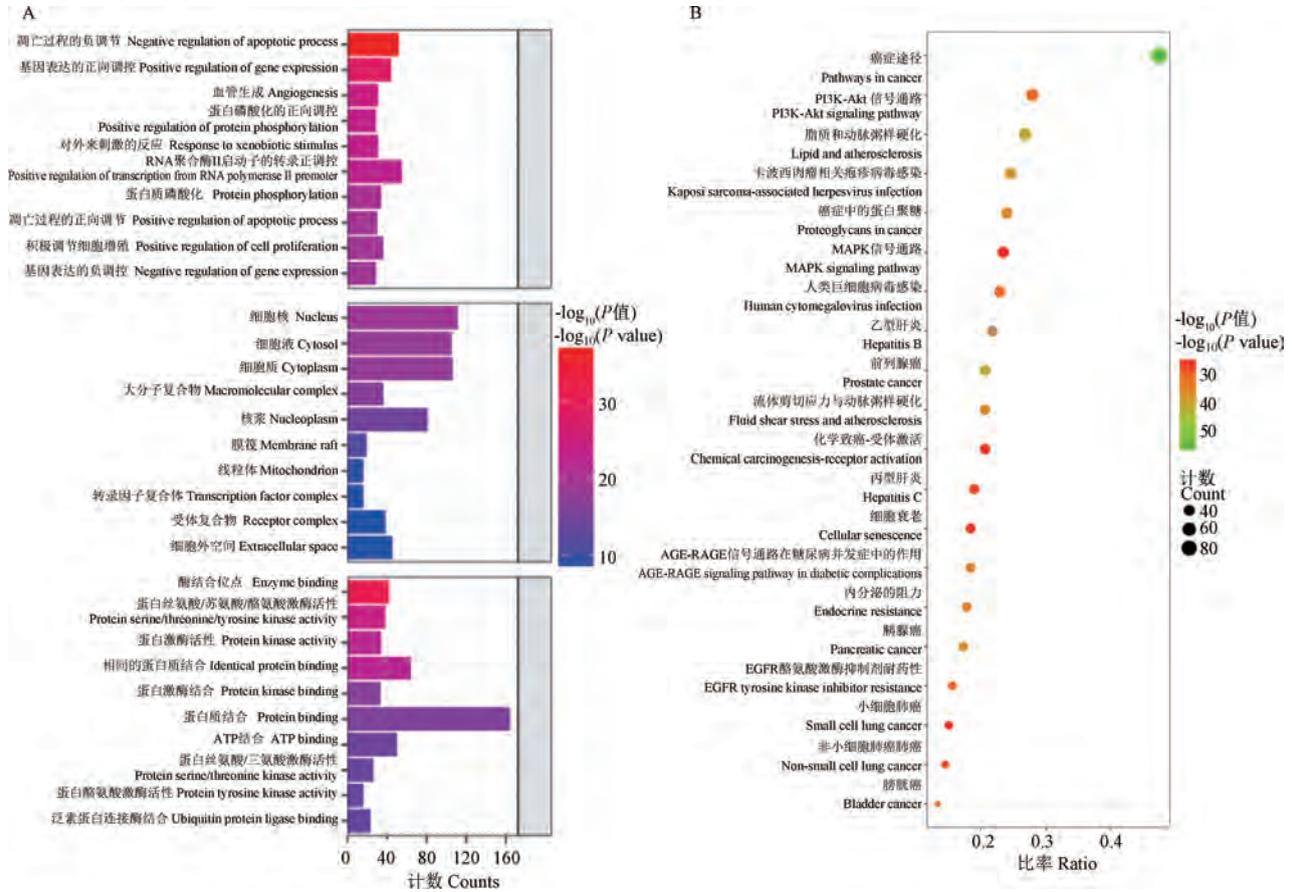


图 3 SLC 与 NSCLC 交集靶点 PPI 网络图
Figure 3 PPI network diagram of SLC and NSCLC intersection targets



注:A:GO 功能富集分析;B:KEGG 通路富集分析

图 4 基因富集分析结果

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

Figure 4 Results of gene enrichment analysis

AKT 影响下游基因表达,从而多途径多方面地调控疾病进展。

PI3K-AKT 信号通路在多种癌症的肿瘤进展、耐药和预后中起重要的作用。PI3K-AKT 信号通路可调节一系列凋亡因子,从而抑制肿瘤细胞的凋亡。激活的 AKT 可调节 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族成员的活性,比如抑制促凋亡作用的 B 细胞淋巴瘤-2 基因相关 X 蛋白 (Bcl2-associated X protein, Bax)、B 细胞淋巴瘤-2 基因相关死亡启动子 (Bcl-2 associated death promoter, Bad) 等蛋白表达。肿瘤蛋白 P53 (tumor protein 53, TP53) 可促进 Bcl-2 家族中 Bax 的表达,磷酸化的 AKT 可阻断 TP53 基因表达,从而造成 Bcl-2/Bax 比例失衡,产生抑制细胞凋亡的作用^[24]。并且活化的 AKT 也可直接抑制半胱天冬酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 家族蛋白表达,从而影响细胞内源性和外源性的

凋亡^[25]。PI3K-AKT 信号通路对癌细胞的侵袭、迁移也有影响。激活的 AKT 可以促进上皮间质转化标志物如上皮细胞钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin)、神经钙粘素 (neural cadherin, N-cadherin) 等表达,从而促进肿瘤细胞的迁移与侵袭^[26]。

2.6 分子对接验证

选取 PPI 富集 SLC 治疗 NSCLC 的前 10 个核心靶点与 SLC 中作用靶点排名前 10 的活性物质进行分子对接,结果显示其有效活性成分与核心靶点蛋白的结合能均 < 0 kJ/mol,说明蛋白与活性成分自发结合且稳定性较好(图 5),展示核心靶点 AKT1 和 Bcl-2 与 SLC 中作用靶点 Degree 值排名前 2 的活性物质 Quercetin 和 Beta-sitosterol 的对接代表图(图 6)。

2.7 荷瘤小鼠肿瘤生长情况

小鼠造模后第 5、8、11、14、17 和 20 天测量并

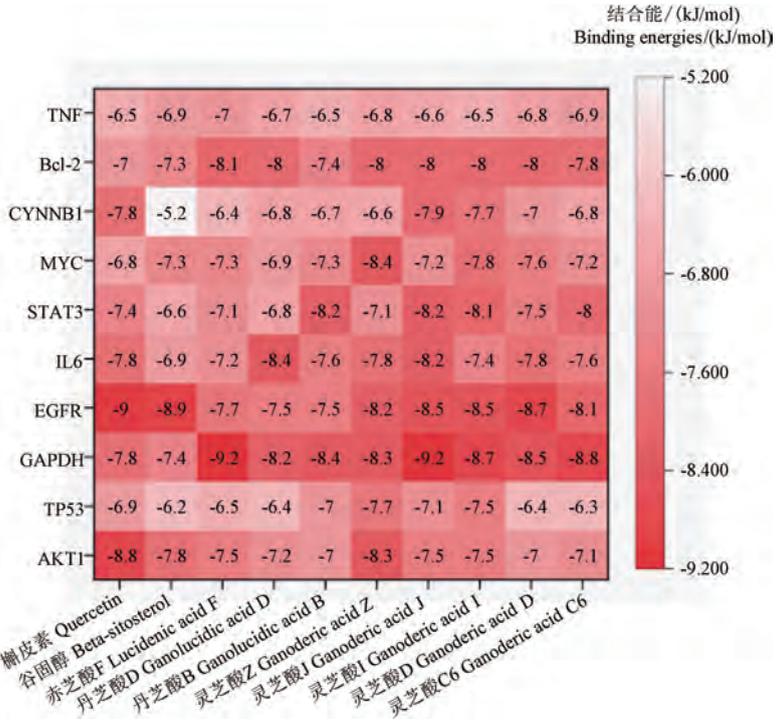


图 5 SLC 核心活性成分与核心靶点分子结合能热图

Figure 5 Heat map of binding energy between SLC core active ingredients and core target molecules

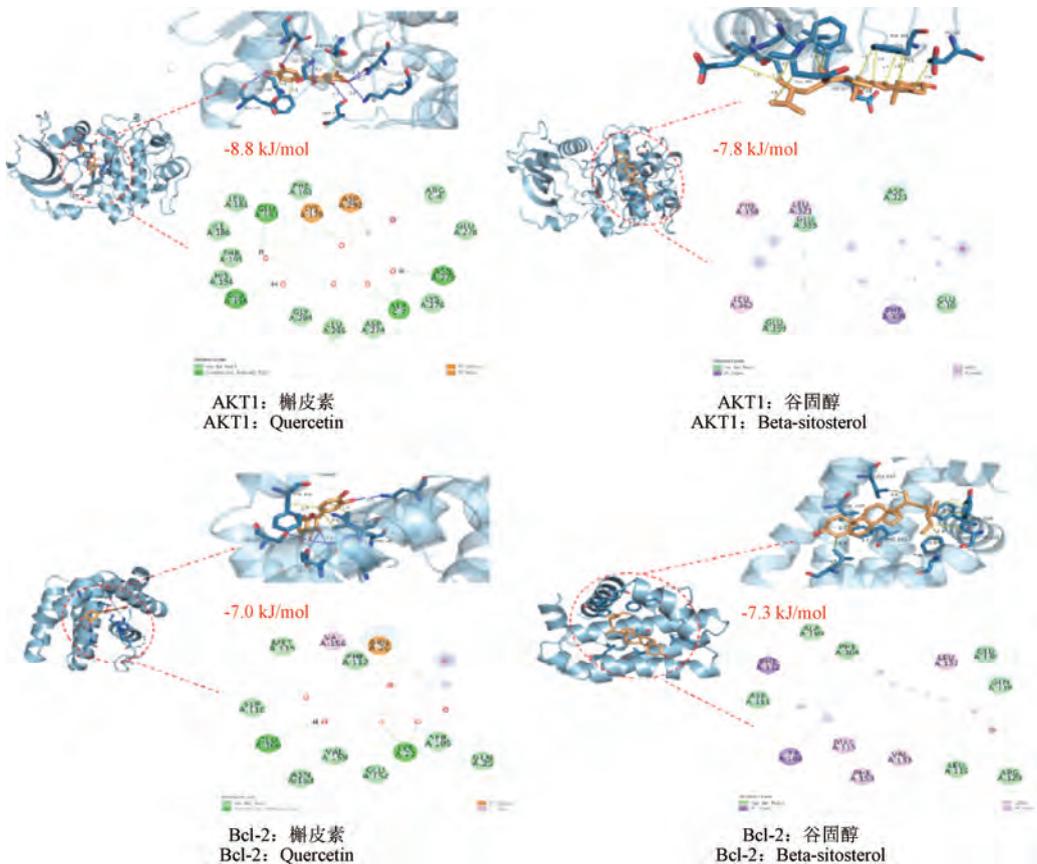
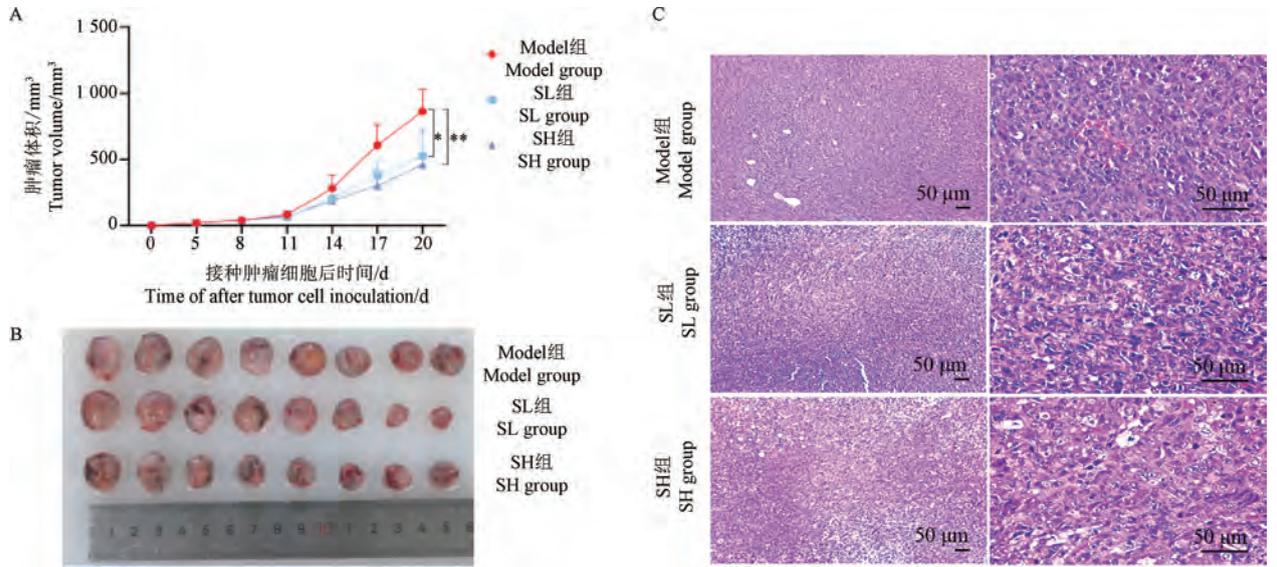


图 6 AKT1 和 Bcl-2 与槲皮素和谷固醇对接图

Figure 6 AKT1 and Bcl-2 docking diagram with quercetin and beta-sitosterol



注:A:肿瘤体积变化;B:剥离下来的小鼠移植瘤;C:荷瘤小鼠肿瘤组织病理学变化;与 Model 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 7 荷瘤小鼠肿瘤生长情况及组织病理学变化($n = 8$)

Note. A. Tumor volume change. B. Transplanted tumor from a stripped mouse. C. Tumor histopathological changes of tumor-bearing mice. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 7 Tumor growth and histopathological changes of tumor-bearing mice ($n = 8$)

表 3 荷瘤小鼠瘤重及肿瘤抑制率结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Results of tumor weight and tumor inhibition rate in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	瘤重/g Tumor weight/g	肿瘤生长抑制率/% Tumor growth inhibition rate/%
Model 组 Model group	2.0300 ± 0.5660	-
SL 组 SL group	1.3510 ± 0.6399*	33.31
SH 组 SH group	1.0350 ± 0.5080**	48.92

记录肿瘤组织长、宽直径变化。显示荷瘤小鼠在接种肿瘤细胞后瘤块体积随接种时间逐渐增加。在造模后第 20 天,与 Model 组相比,SL 组和 SH 组肿瘤体积显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),见图 7A。造模后第 20 天剥离下来的小鼠移植瘤,见图 7B。病理切片可见 Model 组肿瘤细胞生长状态良好,呈类圆形,细胞核分布均匀、排列紧密;SL 组肿瘤细胞排列明显规律,异型性较小,细胞核大小不一,局部区域肿瘤细胞坏死,胞核固缩或溶解;SH 组肿瘤细胞大面积坏死,坏死细胞结构紊乱,排列松散,核细胞明显固缩或溶解,见图 7C。在造模后第 20 天,表 3 显示 SH 组和 SL 组

抑瘤率分别为 48.92%,33.31%。

2.8 小鼠血常规结果

由表 4 可知,与 Control 组相比,荷瘤小鼠各组红细胞、血红蛋白和血小板均降低,白细胞均增加。但相比 Model 组,给药组红细胞、血红蛋白和血小板数量显著增加($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),白细胞数量显著减低($P < 0.01, P < 0.001$)。

2.9 SLC 对荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响

通过 AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒检测,由图 8 可见 Model 组活细胞数量最多,凋亡细胞数量少。随着药物浓度升高,凋亡细胞数量显著增多,其中 SL 组细胞凋亡率为 48.93%,SH 组细胞凋亡率为 56.01%。

2.10 Western Blot 法检测 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K 和 Bcl-2 蛋白的表达

Western Blot 法测定小鼠肿瘤组织中 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K 和 Bcl-2 蛋白表达情况(图 9)。SH 组比 Model 组肿瘤细胞中 p-AKT、p-PI3K 的表达显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),表明 PI3K-AKT 通路可能是 SLC 发挥抑制非小细胞肺癌作用的通路,与网络药理学功能富集结果一致。

表 4 小鼠外周血常规检测结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Results of peripheral blood routine test in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	白细胞/ ($10^9/L$) WBC($10^9/L$)	中性粒细胞/ ($10^9/L$) Neut($10^9/L$)	红细胞/ ($10^{12}/L$) RBC($10^{12}/L$)	血小板/ ($10^9/L$) PLT($10^9/L$)	血红蛋白/ (g/L) HGB(g/L)	单核细胞/ ($10^9/L$) Mono($10^9/L$)
Control 组 Control group	6.49 ± 1.27	1.31 ± 0.17	9.66 ± 0.31	620.25 ± 131.31	161.62 ± 6.02	0.22 ± 0.06
Model 组 Model group	12.03 ± 1.53 ^{###}	5.75 ± 1.65 ^{###}	4.48 ± 0.84 ^{###}	229.00 ± 46.70 ^{###}	134.75 ± 7.38 ^{###}	0.46 ± 0.15 ^{###}
SL 组 SL group	9.08 ± 1.51 ^{**##}	3.43 ± 1.45 ^{**#}	5.44 ± 0.41 ^{**##}	358.37 ± 60.63 ^{###}	131.00 ± 5.39 ^{###}	0.43 ± 0.11 ^{##}
SH 组 SH group	8.30 ± 1.29 ^{***}	2.82 ± 0.49 ^{**}	8.00 ± 0.48 ^{***}	447.25 ± 128.69 ^{**##}	144.37 ± 6.94 ^{***}	0.20 ± 0.05 ^{***}

注:与 Control 组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$;与 Model 组相比,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$. Compared with the model group, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$.

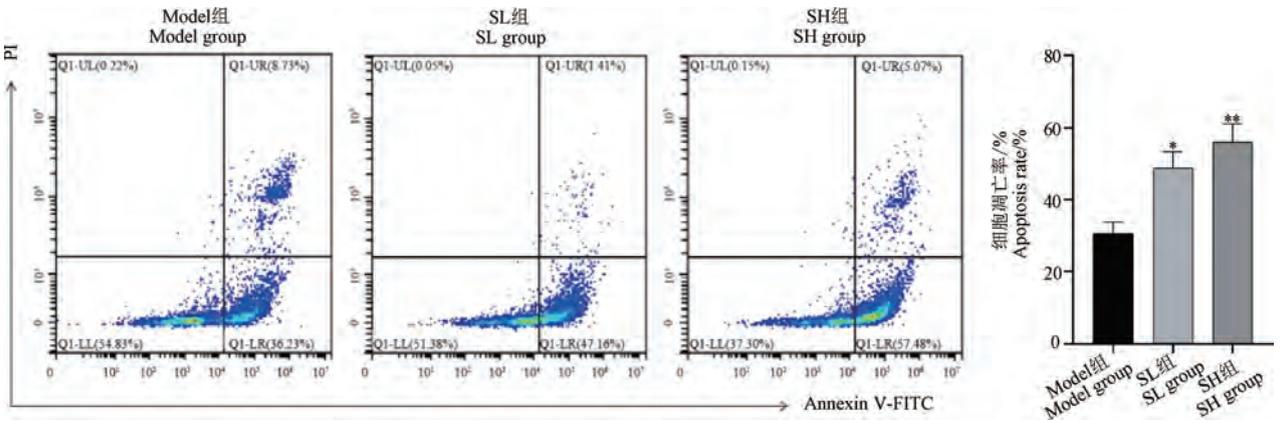


图 8 SLC 对肿瘤组织中细胞凋亡的影响($n = 5$)

Figure 8 Effect of SLC on apoptosis in tumor tissues ($n = 5$)

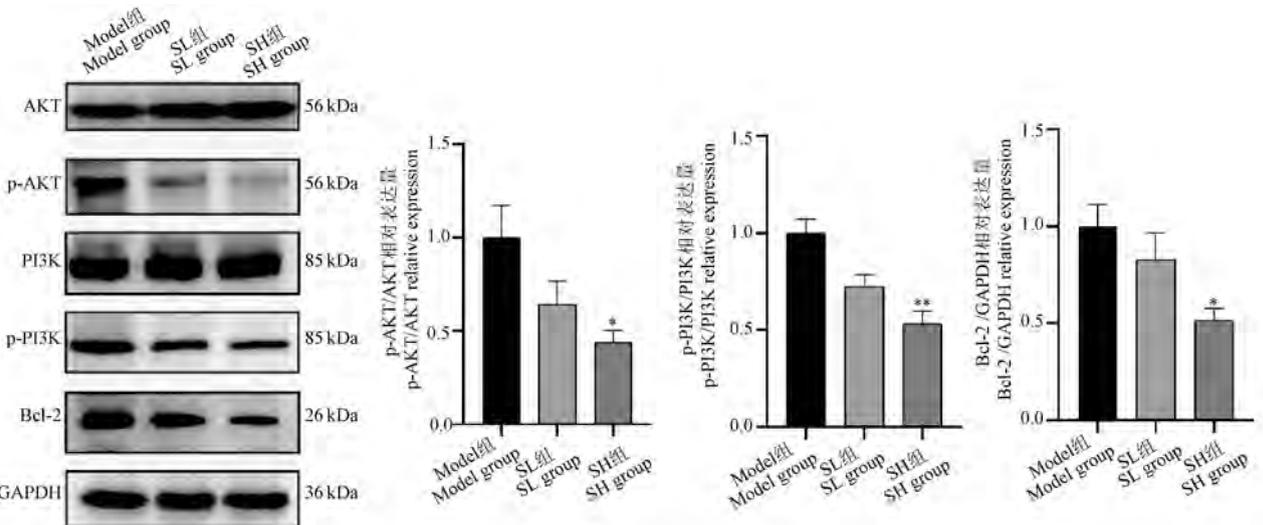


图 9 SLC 对荷瘤小鼠肿瘤中 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 和 Bcl-2 蛋白表达情况($n = 3$)

Figure 9 Expression of AKT, p-AKT, PI3K, p-PI3K and Bcl-2 protein in tumor of tumor-bearing mice induced by SLC ($n = 3$)

2.11 qRT-PCR 法检测 *AKT1*、*PI3K* 和 *Bcl-2* 基因的表达

采用 qRT-PCR 测定小鼠肿瘤组织中 *AKT1*、

PI3K 和 *Bcl-2* 基因表达情况(图 10)。SH 组比 Model 组肿瘤细胞中 *AKT1*、*PI3K* 和 *Bcl-2* 基因的表达显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

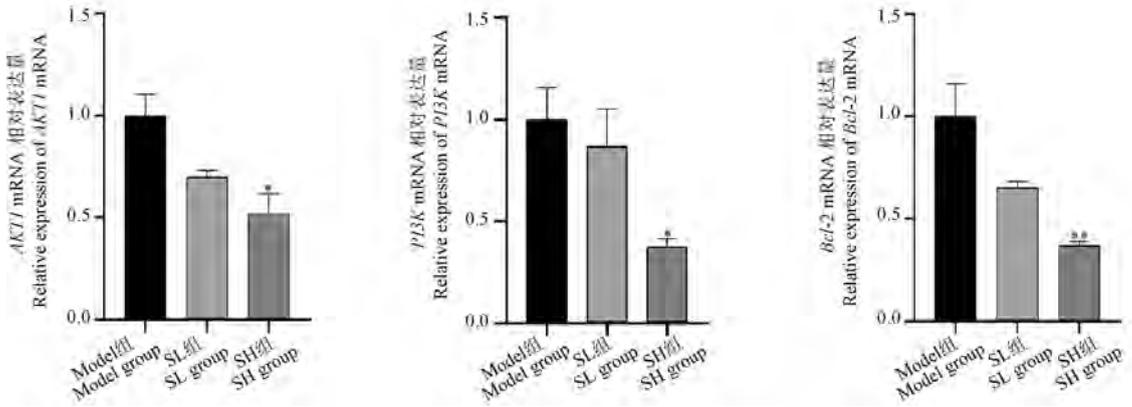


图 10 SLC 对荷瘤小鼠肿瘤中 *AKT1*、*PI3K* 和 *Bcl-2* 基因表达情况($n = 3$)

Figure 10 Expression of *AKT1*, *PI3K* and *Bcl-2* genes in tumor of tumor-bearing mice induced by SLC ($n = 3$)

3 讨论

肺癌作为最常见的恶性肿瘤,在我国的发病率、病死率均居首位,对人们的健康造成极大威胁,而以铂类为基础的化疗是临床 NSCLC 的主要治疗方法,它通常会诱导产生耐药性^[27],并具有显著的化疗毒性^[28]。因此,迫切需要新的有针对性的替代策略为临床 NSCLC 患者带来更好的获益。

中医药作为我国文化瑰宝,随着不断研究与开发,运用越来越广泛,在预防和治疗肿瘤上也发挥了极重要的作用^[29]。SLC 具有提高缺氧耐受性^[30]、缓解体力疲劳^[31]、增强免疫力^[32]等多种保健功能。本研究通过网络药理学和动物实验的方法来研究 SLC 治疗 NSCLC 的作用机制。通过网络药理学分析得到 77 个活性成分。其中 Degree 排名前十的活性成分如赤芝酸 F (Lucidenic acid F)、丹芝酸 D (Ganolucidic acid D)、灵芝酸 Z (Ganoderic acid Z) 等都具有抗肿瘤、提高机体免疫力的作用^[8]。得到的核心靶点为 *GAPDH*、*TP53*、*AKT1*、*EGFR*、*IL6*、*STAT3*、*MYC*、*CTNNB1*、*BCL2*、*TNF*。其中 *AKT1* 作为 *AKT* 基因中重要亚型,活化后可调节多种底物参与细胞存活、细胞周期调控和细胞生长。作为 *PI3K*-*AKT* 信号通路的核心基因,磷酸化的 *AKT1* 可以激活下游炎症、凋亡、自噬等信号通路,从而影响着疾

病的发展。*Bcl-2* 基因作为 *Bcl-2* 家族的一员,主要功能是抑制程序性细胞死亡(凋亡),并且调控细胞周期来延长细胞存活。

KEGG 富集分析表明 *PI3K*-*AKT* 信号通路可能是 SLC 对抗非小细胞肺癌的主要信号通路之一。*PI3K*-*AKT* 通路能调控与细胞增殖和凋亡相关的蛋白表达,在治疗肿瘤疾病中发挥着重要的影响。研究发现西洋参中人参皂苷、灵芝中灵芝酸和发酵虫草菌粉中虫草素均可作用于 *PI3K*-*AKT* 信号通路,调控细胞的增殖和凋亡、迁移和侵袭来发挥着抑瘤作用。如人参皂苷 Rg3 在体外和体内均能显著抑制非小细胞肺癌细胞株 A549、NCI-H1299 细胞活力,抑制体外细胞和体内动物中 p-*PI3K*/*PI3K* 和 p-*AKT*/*AKT* 的比值,降低 *Bcl-2*/*Bax* 比例,从而通过诱导细胞凋亡来发挥抑瘤作用^[33]。人参皂苷和人参多糖通过减少 E-cadherin、N-cadherin 和纤维连接蛋白的表达,抑制 p-*PI3K* 和 p-*AKT* 的表达,影响着肿瘤细胞的侵袭和迁移^[34]。灵芝酸 A 诱导升高促凋亡蛋白 (*Bax*) 水平,降低抗凋亡蛋白 (*Bcl-2*) 水平,降低 p-*PI3K* 和 p-*AKT* 的表达,从而促进肿瘤细胞凋亡和自噬^[35]。虫草素在体内外实验中通过降低 p-*AKT*、p-*PI3K* 和 *Bcl-2* 表达,增高 *Bax* 表达发挥抑制非小细胞肺癌的作用^[36]。

本研究体内实验发现 SLC 可抑制荷瘤小鼠肿瘤体积和肿瘤重量的增加,改善荷瘤小鼠外周

血中 WBC、Neut、RBC、PLT、HGB 和 Mono 等血液指标异常表达。通过肿瘤组织 HE 染色发现,给药组肿瘤细胞胞核固缩或溶解、局部区域肿瘤细胞出现坏死,SH 组肿瘤细胞坏死最显著。且给药组凋亡率显著比模型组高,给药组中 Bcl-2 蛋白表达显著降低,SLC 通过抑制 Bcl-2 表达来发挥促进肿瘤细胞凋亡的作用。最后 Western Blot 验证了 PI3K-AKT 信号通路的关键靶点,发现给药组 p-PI3K 和 p-AKT 表达均降低。qRT-PCR 结果显示,给药干预可下调 *PI3K*、*AKT1* 和 *Bcl-2* mRNA 的相对表达量。由此得出 SLC 通过抑制 PI3K 和 AKT 活化,降低 Bcl-2 表达来抑制非小细胞肺癌。进一步验证得到 PI3K-AKT 信号通路可能是 SLC 发挥抑瘤作用的主要信号通路。

综上所述,本研究基于网络药理学、分子对接技术和体内实验初步验证 SLC 主要作用于 *AKT*、*PI3K*、*Bcl-2* 等核心靶点来发挥抑制非小细胞肺癌的作用,其作用机制可能与 PI3K-AKT 信号通路有关。本研究结果可为 SLC 治疗 NSCLC 深入研究提供科学依据,但由于 NSCLC 发病机制复杂,SLC 确切的药效物质基础及所涉及的分子机制和关键靶点还有待进一步深入研究。

参 考 文 献(References)

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] WU F, WANG L, ZHOU C. Lung cancer in China: current and prospect [J]. Curr Opin Oncol, 2021, 33(1): 40-46.

[3] SIEGEL R, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73: 17-48.

[4] 陈倩倩,王海龙,郭政钰,等. 消岩汤姑息治疗中晚期非小细胞肺癌的回顾性临床研究 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1620-1626.

CHEN Q Q, WANG H L, GUO Z Y, et al. Retrospective clinical study of Xiaoyan Decoction in palliative treatment of advanced non-small cell lung cancer [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(5): 1620-1626.

[5] WANG Y, ZHANG Q, CHEN Y, et al. Antitumor effects of immunity-enhancing traditional Chinese medicine [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109570.

[6] 刘文琴,王燕霞,陈芳,等. 参灵草口服液 HPLC 指纹图谱及质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23): 83-88.

LIU W Q, WANG Y X, CHEN F, et al. HPLC fingerprint analysis and quality evaluation of shenlingcao oral liquid

[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(23): 83-88.

[7] 张慧琼,李刚敏,陈俊仁,等. 西洋参总皂苷联合顺铂对 Luc-A549 肺癌小鼠瘤体生长的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 50-55.

ZHANG H Q, LI G M, CHEN J R, et al. Effect of total saponins in panacis quinquefolii Radix combined with cisplatin on tumor growth in mice bearing Luc-A549 cells [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(3): 50-55.

[8] 马欣宇,徐蓓蕾,宋辉,等. 灵芝化学成分及防治肿瘤的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58(16): 1437-1446.

MA X Y, XU B L, SONG H, et al. Research progress on chemical constituents of *Ganoderma lucidum* and its prevention and treatment of tumor diseases [J]. Chin Pharm J, 2023, 58(16): 1437-1446.

[9] WANG J, CHEN H, LI W, et al. Cordyceps acid alleviates lung cancer in nude mice [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(3): e22670.

[10] LIU Y, LUO X, LIU J, et al. Shenlingcao oral liquid for patients with non-small cell lung cancer receiving adjuvant chemotherapy after radical resection: a multicenter randomized controlled trial [J]. Phytomedicine, 2023, 113: 154723.

[11] 蔡可珍,郑琴,朱徐东,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证探讨四君子汤治疗阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1620-1631.

CAI K Z, ZHENG Q, ZHU X D, et al. Mechanism of Sijunzi Decoction in treatment of Alzheimer's disease based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology, and experimental verification [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(6): 1620-1631.

[12] 李媛媛,王思斯,法缇玛·瑟菲迪肯,等. UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学及实验验证研究深绿卷柏富含双黄酮部位治疗喉癌的作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(20): 2248-2258.

LI Y Y, WANG S S, FATEMA S F D K, et al. UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology and experimental validation to study the mechanism of action of *Selaginella doederleinii* hieron. rich in biflavonoids in the treatment of laryngeal cancer [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(20): 2248-2258.

[13] 邸学士,陈昭,贾育松,等. 基于网络药理学探讨青娥丸治疗绝经后骨质疏松症的作用机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 364-371.

DI X S, CHEN Z, JIA Y S, et al. Investigation of the mechanism of the effect of Qinge pill on postmenopausal osteoporosis based on network pharmacology [J]. Chin J Osteoporosis, 2021, 27(3): 364-371.

[14] 张金华,田园,杨晓萍,等. 基于网络药理学和分子对接

- 探讨北沙参-麦冬药对治疗肺癌的作用机制 [J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2023, 32(6): 717-725.
- ZHANG J H, TIAN Y, YANG X P, et al. Mechanisms of drug pair of Coastal *Glehnia* root and *Radix* ophiopogonis in the treatment of lung cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. J Yunnan Minzu Univ Nat (Sci Ed), 2023, 32(6): 717-725.
- [15] 姚健, 信红亚, 曾贵荣, 等. 中药康莱特联合放疗对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用及机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(11): 956-962.
- YAO J, XIN H Y, ZENG G R, et al. Effect and mechanism of a Chinese medicine Kanglaite combined with chemoradiotherapy on Lewis lung cancer mice [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(11): 956-962.
- [16] 张其海, 余卓伦, 樊昊雯, 等. 西黄丸下调 HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 信号通路抑制脑胶质瘤细胞血管生成拟态形成的作用及其机制 [J]. 药学学报, 2023, 58(5): 1256-1266.
- ZHANG Q H, YU Z L, FAN H W, et al. The effect and mechanism of Xihuang pill inhibits the formation of vasculogenic mimicry in human glioblastoma cells by down-regulating HIF-1 α /VEGFA/VEGFR2 signaling pathway [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(5): 1256-1266.
- [17] FUJIMOTO Y, SATOH M, TAKEUCHI N, et al. Cytotoxic acetylenes from *Panax quinquefolium* [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(2): 521-523.
- [18] KAKU T, MIYATA T, URUNO T, et al. Chemico-pharmacological studies on saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer. II. Pharmacological part [J]. Arzneimittelforschung, 1975, 25(4): 539-547.
- [19] BISWAL R P, DANDAMUDI R B, PATNANA D P, et al. Metabolic fingerprinting of *Ganoderma* spp. using UHPLC-ESI-QTOF-MS and its chemometric analysis [J]. Phytochemistry, 2022, 199: 113169.
- [20] ADOTEY G, ALOLGA R N, QUARCOO A, et al. Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS)-based metabolomic analysis of mycelial biomass of three *Ganoderma* isolates from the lower volta river basin of ghana [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 205: 114355.
- [21] QIAN Z, ZHAO J, LI D, et al. Analysis of global components in *Ganoderma* using liquid chromatography system with multiple columns and detectors [J]. J Sep Sci, 2012, 35(20): 2725-2734.
- [22] SEO H W, HUNG T M, NA M, et al. Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(11): 1573-1579.
- [23] LIU J, CHEN G, YANG J, et al. Deciphering the chemical composition of *Ganoderma lucidum* from different geographical origins by mass spectrometry molecular networking coupled with multivariate analysis [J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37(1): e5506.
- [24] 张格松, 蒋士卿. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨中医药治疗肺癌研究进展 [J]. 中医学报, 2024, 39(1): 77-83.
- ZHANG G S, JIANG S Q. Research progress in traditional Chinese medicine treatment of lung cancer based on PI3K/AKT signaling pathway [J]. Acta Chin Med, 2024, 39(1): 77-83.
- [25] 周慧, 海广范, 张涛, 等. 癌症治疗中 PI3K/AKT/mTOR 通路及靶向抑制剂研究进展 [J]. 中国药业, 2023, 32(5): 127-135.
- ZHOU H, HAI G F, ZHANG T, et al. Research progress of PI3K/AKT/mTOR pathway and its targeted inhibitors in cancer treatment [J]. Chin Pharm, 2023, 32(5): 127-135.
- [26] 季娟娟, 王谦, 朱佳. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨莲甲散结方对肺癌 H1975 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响 [J]. 中医药信息, 2023, 40(6): 15-22.
- JI J J, WANG Q, ZHU J. Effects of Lianjia Sanjie formula on proliferation, migration, invasion and apoptosis of lung cancer H1975 cells based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. Inform TCM, 2023, 40(6): 15-22.
- [27] RAMPIONI VINCIGUERRA G L, CAPECE M, DISTEFANO R, et al. Role of the miR-301a/Fra-2/GLIPR1 axis in lung cancer cisplatin resistance [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 37.
- [28] HENDRIKS L E, KERR K M, MENIS J, et al. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2023, 34(4): 358-376.
- [29] ZHANG X, QIU H, LI C, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2021, 15(5): 283-298.
- [30] 许锦珍, 刘文君, 付玉梅, 等. 参灵草口服液提高缺氧耐受力的临床研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2017, 29(4): 81-84.
- XU J Z, LIU W J, FU Y M, et al. Clinical study on improving hypoxia tolerance of shenlingcao oral liquid [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2017, 29(4): 81-84.
- [31] 刘志刚, 张佳丽, 张召锋, 等. “参灵草”牌参灵草口服液复合粉缓解小鼠体力疲劳的实验研究 [A]. 中国食品科学技术学会第八届年会暨第六届东西方食品业高层论坛论文摘要集 [C]; 2011.
- LIU Z G, ZHANG J L, ZHANG Z F, et al. Experimental study of “Shenlingcao” brand Shenlingcao oral liquid compound powder alleviating physical fatigue in mice [A]. Abstract collection of papers of the 8th annual meeting of China society of food science and technology and the 6th east-west food industry high-level forum [C]; 2011.
- [32] 张佳丽, 杨睿悦, 王楠, 等. 参灵草复合粉增强小鼠免疫功能实验研究 [A]. 中国食品科学技术学会第八届年会暨第六届东西方食品业高层论坛论文摘要集

- [C]; 2011.
- ZHANG J L, YANG R Y, WANG N, et al. Experimental study on enhancing immune function of mice with Shenlingcao compound powder [A]. Abstract collection of papers of the 8th annual meeting of China society of food science and technology and the 6th east-west food industry high-level forum [C]; 2011.
- [33] XIE Q, WEN H, ZHANG Q, et al. Inhibiting PI3K-Akt signaling pathway is involved in antitumor effects of ginsenoside Rg3 in lung cancer cell [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 16-21.
- [34] YANG Y, QIU S, QIAN L, et al. OCF can repress tumor metastasis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition involved in PTEN/PI3K/AKT pathway in lung cancer cells [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0174021.
- [35] CHENG Y, XIE P. Ganoderic acid A holds promising cytotoxicity on human glioblastoma mediated by incurring apoptosis and autophagy and inactivating PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2019, 33(11): e22392.
- [36] LIAO X, TAO L, GUO W, et al. Combination of cordycepin and apatinib synergistically inhibits NSCLC cells by down-regulating VEGF/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Front Oncol, 2020, 10: 1732.

[收稿日期] 2024-05-22

欢迎关注《中国实验动物学报》微信公众号

为方便作者投稿和随时查询稿件状态,方便读者免费下载本刊已发表论文,《中国实验动物学报》微信公众号已于 2025 年 1 月份上线,微信用户可通过搜索公众号“中国实验动物学报”或扫描以下二维码添加关注。届时,您将及时收到本刊定期发布的“目录”“文章推荐”“专题盘点”等学术前沿消息,并可通过链接登录本刊官网完成投稿、查稿等操作。欢迎各位读者、作者及专家关注!



张晨曦,李继娟,张飞程,等. MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 70-81.

ZHANG C X, LI J J, ZHANG F C, et al. Characterization of intestinal flora and transcriptomics in rats with gastric cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 70-81.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.007

MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征分析

张晨曦,李继娟,张飞程,高田宇,梁新月,潘丽佳*

(河北中医药大学针灸推拿学院,石家庄 050200)

【摘要】 目的 分析 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 胃癌大鼠与正常大鼠肠道菌群差异、转录组学差异,以探究 MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征,并分析二者的相关性,为以 MNNG 胃癌大鼠为模型的相关研究提供参考。**方法** 12 只 Wistar 大鼠随机分为正常 (Normal, NM) 组、胃癌 (Gastric cancer, GC) 组,GC 组给予浓度 20 mg/mL 的 MNNG 灌胃,剂量为 100 g/mL,每天 1 次,NM 组给予相同剂量的生理盐水灌胃,连续干预 16 周后取材检测。取大鼠胃组织,苏木素-伊红 (HE) 染色观察两组大鼠胃黏膜形态变化,转录组测序检测差异基因的表达水平;无菌 Ep 管收集盲肠内容物用于 16S rRNA 测序。**结果** (1) 肉眼观察及 HE 结果:肉眼观察,NM 组大鼠胃组织黏膜体积正常,表面有光泽,胃壁有弹性,黏膜皱襞走向有规律,无增生无出血点,GC 组大鼠胃组织胃黏膜体积缩小,胃壁变薄,弹性变差,皱襞走向错乱无规律,出现隆起且伴有黄黑色角质增生;HE 染色,NM 组胃黏膜鳞状上皮层、粘膜下层、粘膜肌层层层清晰,无增生和角化,GC 组胃粘膜层次和细胞极性紊乱,细胞形态不一,鳞状上皮层被破坏,鳞状上皮细胞增生和角化,并向下增殖侵入肌层,造模成功;(2) 肠道菌群测序结果显示,MNNG 胃癌大鼠阿克曼氏菌和乳杆菌的丰度显著减少,瘤胃球菌科、普雷沃氏菌、布劳特氏菌的丰度显著增加;(3) 转录组学测序:京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析得到的 3 条关键通路分别是阿米巴病、系统性红斑狼疮和酯酰肌醇 3 激酶-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase-RAC- α serine/threonine-protein kinase, PI3K-Akt) 信号通路,富集到这 3 条通路的 5 个差异基因分别是 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D;(4) 肠道菌群与转录组学联合分析结果显示,瘤胃球菌科_UCG-005、普雷沃氏菌_UCG-003 和布劳特氏菌可能与阿米巴病、系统性红斑狼疮和 PI3K-Akt 信号通路呈正相关。**结论** 经 MNNG 灌胃形成的胃癌大鼠在肠道菌群丰度方面与正常大鼠之间存在差异,上调的 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D 可能是 MNNG 灌胃诱发胃癌的差异基因,肠道菌群与差异基因联合分析推测 MNNG 致癌的机制可能主要与胃粘膜破坏,引起炎症反应有关。

【关键词】 胃癌;胃癌模型;肠道菌群;转录组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025)01-0070-12

Characterization of intestinal flora and transcriptomics in rats with gastric cancer

ZHANG Chenxi, LI Jijuan, ZHANG Feicheng, GAO Tianyu, LIANG Xinyue, PAN Lijia*

【基金项目】 河北省自然科学基金 (H2023423029), 河北省中医药管理局科研计划项目 (2022361, 2021095), 河北中医药大学 2022 年博士科研基金项目 (BSZ2022006)。

Funded by the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2023423029), Scientific Research Program Project of Hebei Administration of Traditional Chinese Medicine (2022361, 2021095), Doctoral Research Fund Project of Hebei University of Traditional Chinese Medicine in 2022 (BSZ2022006).

【作者简介】 张晨曦,女,在读硕士研究生,研究方向:刺灸法效应特异性和灸法的抗肿瘤机制。Email: zhangchenxi@hebcm.edu.cn

【通信作者】 潘丽佳,女,副教授,硕士生导师,研究方向:刺灸法效应特异性和灸法的抗肿瘤机制。Email: panlijia@hebcm.edu.cn

(College of Acupuncture and Massage, Hebei University of Traditional Chinese Medicine,
Shijiazhuang 050200, China)

Corresponding author: PAN Lijia. E-mail: panlijia@hebcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze differences in the intestinal microbiota and transcriptomics between N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) gastric cancer rats and normal rats and to analyze the correlation between the two, so as to provide a reference for related studies using MNNG gastric cancer rats as a model. **Methods** A total of 12 Wistar rats were randomly divided into normal (NM) and gastric cancer (GC) groups. The GC group was given a concentration of 20 mg/mL of MNNG by gavage with a dose of 100 g/mL once a day, and the NM group was given the same amount of normal saline by gavage. Samples were collected for testing after 16 weeks of continuous intervention. The gastric tissues were collected and stained by HE staining to observe morphological changes in the gastric mucosa of the two groups, and the expression levels of differential genes were detected by transcriptome sequencing. The cecal contents were collected for 16S rRNA sequencing. **Results** (1) Visual observation and HE results showed that the volume of gastric mucosa in the NM group was normal, the surface was glossy, the gastric wall was elastic, the direction of the mucosal folds was regular, there were no hyperplasia or hemorrhagic spots. In the GC group, the volume of gastric mucosa was reduced, the gastric wall was thinned, elasticity was poor, the direction of the folds was disordered and irregular, and there was a bulge accompanied by yellow-black keratotic hyperplasia. In the NM group, the squamous epithelial layer, submucosa, and muscular layer of the gastric mucosa were clear, with no hyperplasia and keratinization. In the GC group, the gastric mucosa had disorganized layers and cell polarity, with different cell morphologies; the squamous epithelial layer was destroyed, and squamous epithelial cells were hyperplastic, keratinized, and had invaded the muscular layer by proliferation. The modeling was considered successful. (2) The results of intestinal microbiota sequencing showed that the abundance of Akkermansia and Lactobacillus in MNNG gastric cancer rats decreased significantly, and the abundance of the rumen coccaceae Prevonella, and Blauter increased significantly. (3) The three key pathways obtained by transcriptomic sequencing and KEGG pathway enrichment analysis were amebiasis, systemic lupus erythematosus, and the PI3K-Akt signaling pathway, and five genes differentially enriched in these three pathways were those for MCPT8I2, IGH-6, IGHG1, ACTN2, and VEGF-D. (4) Combined analysis of intestinal microbiota and transcriptomics showed that _UCG-005, Prevonella _UCG-003 and Brautella were positively correlated with amebiasis, systemic lupus erythematosus, and the PI3K-Akt signaling pathway. **Conclusions** The abundance of intestinal microbiota in gastric cancer rats formed by MNNG gavage is different from that of normal rats. The genes for MCPT8I2, IGH-6, IGHG1, ACTN2 and VEGF-D may be up-regulated in gastric cancer induced by MNNG gavage. Combined analysis of intestinal microbiota and differential genes suggested that the mechanism of MNNG carcinogenesis may be mainly related to the destruction of gastric mucosa and the inflammatory response.

【Keywords】 gastric cancer; gastric cancer model; intestinal flora; transcriptomics

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

胃癌(gastric cancer, GC)是全球第五大常见恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的第四大原因^[1],尽管目前胃癌的发病率下降,但仍是世界上重要的公共卫生问题^[2]。饮食、环境、遗传和幽门螺杆菌感染等因素都是胃癌发病的潜在危险因素,但没有明确的定论^[3]。有研究表明,胃肠道疾病的致癌性主要归因于微生物失调^[4],肠道共生菌在生理状态下形成微生物屏障,可以抵御致病菌的入侵,然而由于肠道菌群的失调,微生物屏障

被破坏,微生物及其代谢产物侵入肠道上皮细胞,引起炎症甚至凋亡,破坏肠道生理功能,使消化道功能紊乱,导致胃癌的发生、发展^[5-6]。高通量测序技术的发展和应用于胃癌的诊断和靶向治疗提供了技术支持,如通过高通量测序发现胃癌发病过程中的融合基因 LRP5-LITAF,为胃癌辅助诊断及靶向治疗提供了初步实验依据^[7],半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SN(cystatin SN, CST1)高表达能够保护胃癌细胞免于铁死亡,促进胃癌转移,

所以 CST1 可能作为一种新的肿瘤标志物和胃癌转移的潜在治疗靶点^[8]。基因测序和转录组测序的大量应用为学者探究人体生理病理状态下与胃肠菌群之间的相关性提供了广泛的研究空间。以 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 诱导的胃癌大鼠模型是研究胃癌最常用的动物模型^[9], 然而目前对 MNNG 胃癌大鼠的肠道菌群及转录组的分析研究较少, 因此本研究通过分析正常大鼠与 MNNG 胃癌大鼠肠道菌群与转录组学的差异、胃癌大鼠肠道菌群与转录组学特征及二者的相关性, 旨在为以 MNNG 胃癌大鼠为模型的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 20 只, 体质量 160 ~ 180 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。所有动物均饲养于河北省中医针灸优势病证国际联合研究中心【SYXK(冀)2022-010】, 环境温度为 (23 ± 1) °C, 湿度为 40% ~ 70%, 每日 12 h 交替照明, 适应性饲养 1 周后进行干预。所有动物实验程序都遵循河北中医药大学动物伦理原则并获得批准(DWLL2020016)。

1.1.2 主要试剂与仪器

MNNG(日本东京株式会社), 生理盐水(石家庄思耀有限公司), 戊巴比妥钠(美国圣路易斯), 多聚甲醛固定(武汉 Servicebio), TRIzol(美国 Thermo), NEBNext® UltraTM 文库制备试剂盒(美国 NEB), QIAamp DNA Mini Kit(德国 Qiagen Hilden), Lecia 显微镜(德国 Lecia DM2000), Illumina HiSeq 测序平台(美国 Illumina), Illumina Novaseq 平台(美国 Illumina), 转录组测序仪(Illumina Novaseq)。

1.2 方法

1.2.1 造模制备和干预

将 20 只大鼠按随机数字表随机分为 2 组: 正常(Normal, NM)组和胃癌(Gastric cancer, GC)组, 每组各 10 只。通过灌胃 MNNG 建立胃癌模型。GC 组给予新鲜配制的浓度为 20 mg/mL

MNNG(将 1 g MNNG 溶解于 50 mL 蒸馏水), 灌胃剂量为 100 g/mL, 每天 1 次^[10], 共 16 周。NM 组给予相同剂量的 100 g/mL 生理盐水灌胃。以出现胃黏膜层次紊乱, 前胃鳞状上皮增生, 并向下侵入肌层为模型成功标准^[11], 连续干预 16 周后取材检测。在实验过程中, GC 组大鼠由于 MNNG 造模导致的副作用死亡 4 只。

1.2.2 取材和检测

肉眼及苏木素-伊红(HE)染色观察胃组织形态: 末次治疗结束后, 所有大鼠禁食 24 h, 禁食期间不禁水, 使用浓度为 10 g/L 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 摘取大鼠全胃, 纵切胃大弯, 充分暴露胃腔, 氯化钠溶液(0.9%)充分清洗, 肉眼观察胃组织形态变化。沿胃大弯长轴方向于胃窦部和胃体部剪取 0.2 cm × 1.5 cm 的条状组织标本, 氯化钠溶液冲洗, 中性多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片(4 μm), 将切片脱蜡水化后, 苏木素、伊红染色, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明后, 中性树脂封片, 使用 Lecia 显微镜系统对染色标本进行观察拍照; NM 组和 GC 组分别剪取部分胃组织和胃部瘤体, 随后迅速放入液氮中速冻, 保存于 -80 °C 冰箱中, 用于转录组测序检测; 无菌 EP 管收集盲肠内容物并储存在 -80 °C 冰箱中用于 16S rRNA 测序。

16S rRNA 基因测序分析: 通过 QIAamp DNA Mini Kit 从粪便样本中提取总细菌基因组 DNA。通过通用引物 319F 和 806R: 319F: 5'-ACTCCTA CGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTAC HVGGGTWCTAAT-3' 扩增总粪便 DNA 的 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域^[12]。对其产物进行纯化、定量和均一化以形成测序文库, 对构建的文库进行质量测试。基于 Illumina HiSeq 测序平台, 利用双末端测序的方法, 进行测序。聚类序列的相似性为 97%, 所有序列中的 0.005% 作为阈值过滤 OTU, 并基于 Silva 分类学数据库对 OTU 进行分类学注释。

转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)分析: 将样本用 TRIzol 提取其总 RNA, 按送检要求稀释后交由北京百迈克云科技有限公司完成质检并进行转录组测序。用 Illumina Novaseq 平台进行测序。使用 edgeR 3.8.6 软件, 参数 FDR = 0.05, FC = 2 对样本进行基因定量分析, 以筛选

出差异表达基因 (differently expression genes, DEGs), 通过火山图分析总览 DEGs 分布情况、差异大小及差异显著性等信息; 对 DEGs 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释、KEGG 通路功能注释, 根据注释结果筛选出相关的 DEGs 进行富集分析, 寻找与肠道菌群相关的信号通路。

1.3 统计学分析

肠道菌群数据分析: 使用 Mothur (version v. 1.30) 软件计算 ACE、Shannon、Simpson 指数, 并绘制稀释性曲线。对 α 多样性的组间差异进行分析。使用 QIIME 1.8.0 软件计算 Unifrac 距离进行 β 多样性分析, 绘制主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA) 图和具有算术平均值的未加权配对组方法的层次聚类 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)。在属水平上, 选择 TOP 20 的物种丰度进行分类注释和差异分析, 并采用 Wilcoxon 检验进行组间比较。线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 效应大小 (linear discriminant analysis, LDA) 方法用于鉴定每个实验组中具有相对差异丰度的分类群, 通过 LEfSe 软件完成, 设置 LDA > 3.5。采用 IBM SPSS 27.0 软件对数据进行分析处理, 计量资料用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 满足正态性和方差齐性检验, 采用独立样本 t 检验方法进行组间数据比较, 不符合正态分布且方差不齐者, 采用两个独立样本检验, 数据以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

转录组学数据分析: 使用 Nanodrop 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 采用 Illumina Novaseq 平台进行文库构建测序。得到原始测序数据后, 筛选出 Q20 > 85%、Q30 > 80% 的高质量序列 (clean reads)。使用 StringTie 对所有样本的 clean reads 进行从头组装, 用整合基因组浏览器 (integrative genomics viewer, IGV) 进行可视化浏览。通过 RSEM 计算基因表达量。使用 edgeR 进行组间表达量差异分析, 以 FDR = 0.05, FC = 2 作为筛选条件, 筛选出两组的 DEGs。使用 GOseq R 包对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析。

转录组与肠道菌群联合分析: 采用 Graph Pad Prism 9.5.1 对差异菌群和差异基因进行 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 胃组织形态肉眼观察结果

NM 组大鼠胃组织胃黏膜体积正常, 表面有光泽、胃壁有弹性、黏膜皱襞走向有规律, 无增生无出血点。GC 组大鼠胃组织胃黏膜体积缩小, 胃壁变薄, 弹性变差, 皱襞走向错乱无规律, 出现隆起且伴有黄黑色角质增生 (见图 1)。

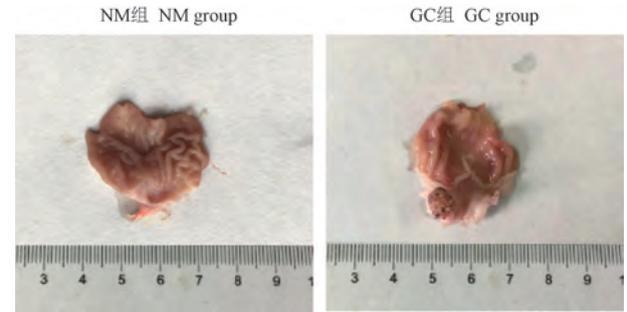


图 1 大鼠胃组织形态肉眼观察

Figure 1 Gross observation of gastric morphology of rats

2.2 HE 染色观察大鼠胃黏膜病理变化

HE 染色镜下观察, NM 组胃黏膜鳞状上皮层、粘膜下层、粘膜肌层层次清晰, 无增生和角化。GC 组胃粘膜层次和细胞极性紊乱, 细胞形态不一, 鳞状上皮层被破坏, 鳞状上皮细胞增生和角化, 并向下增殖侵入肌层, 造模成功^[11], 见图 2。

2.3 肠道菌群结果分析

2.3.1 α 多样性分析

α 多样性分析, 包括 α 多样性指数、稀释曲线, 如图 3 所示。图 3A 表明随着测序量的增加, 曲线趋于平缓, 表明样品序列充足, 可以进行数据分析。NM 组和 GC 组之间肠道菌群在菌群丰度方面具有显著性差异 (图 3B~3D)。ACE 指数表明 GC 组大鼠的肠菌菌群在菌群丰度方面与 NM 组大鼠具有差异性 ($P < 0.05$), 即 MNNG 灌胃能够显著改变肠道菌群的丰度; Shannon 和 Simpson 指数发现 NM 组和 GC 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明胃癌大鼠肠道菌群的多样性与正常大鼠相似。

2.3.2 β 多样性分析

β 多样性分析, 包括 PCoA 分析、聚类分析 (未加权算术平均法)。图 4A 可看出, 两组平面分布区域分界清晰, 组间物种多样性存在差异。

使用 UPGMA 对样本进行聚类,以确定样本间物种组成的相似性。在图 4B 中,正常大鼠与胃癌

大鼠的肠道菌群存在差异,表明 MNNG 给药后,两组样本的菌群和数量发生了变化。

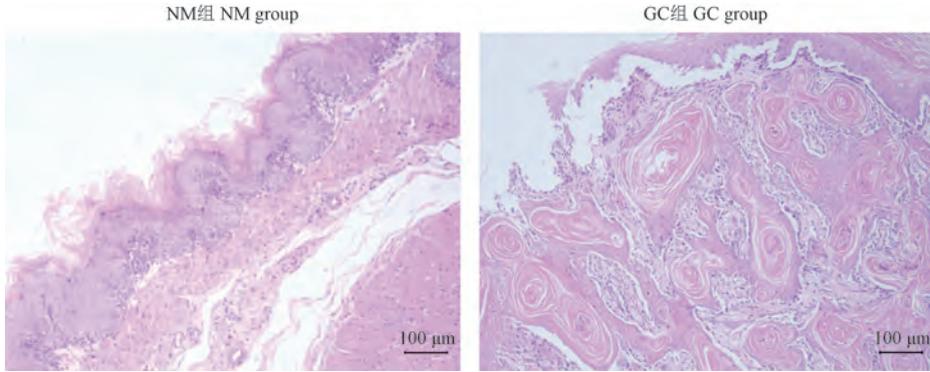
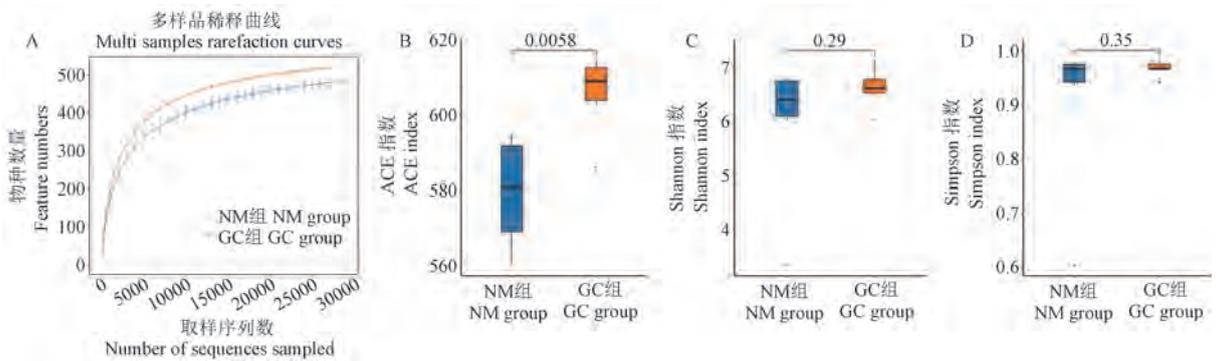


图 2 大鼠胃组织 HE 染色

Figure 2 HE staining of rat gastric tissue



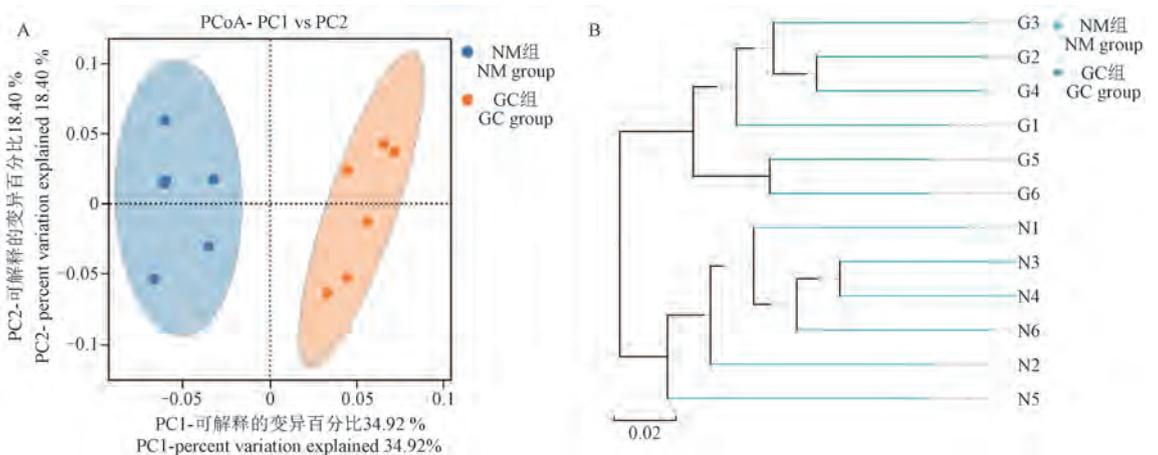
注:A:稀释曲线;B:ACE 指数;C:Shannon 指数;D:Simpson 指数;与 NM 组相比, $*P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 NM 组和 GC 组肠道菌群的 α 多样性分析($n = 6$)

Note. A. Dilution curve. B. ACE index. C. Shannon index. D. Simpson index. Compared with NM group, $*P < 0.05$.

(The same in the following figures)

Figure 3 α diversity analysis of intestinal flora in normal and gastric cancer groups($n = 6$)



注:A:主坐标分析(PCoA 分析);B:UPGMA 样本聚类分析。

图 4 β 多样性分析($n = 6$)

Note. A. Principal coordinate analysis (PCoA analysis). B. UPGMA cluster analysis of the samples.

Figure 4 β diversity analysis of intestinal flora in normal group and gastric cancer group($n = 6$)

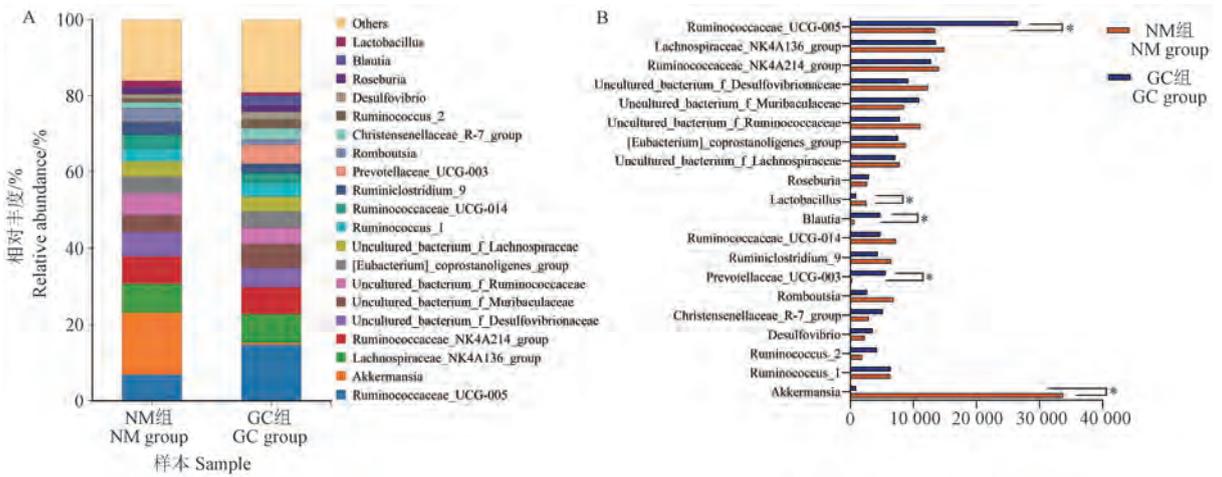
2.3.3 差异菌群分析

选择属水平上 TOP20 的物种丰度进行分类注释和差异分析。两组之间的阿克曼氏菌 (Akkermansia)、乳杆菌 (Lactobacillus)、瘤胃球菌 _UCG-005 (Ruminococcaceae_ UCG-005)、普雷沃氏菌 _UCG-003 (Prevotallaceae_ UCG-003)、布劳特氏菌 (Blautia) 存在显著性差异 (图 5A)。NM 组中阿克曼氏菌 (16.2%) ($P < 0.05$)、乳杆菌 (1.7%) ($P < 0.05$) 较 GC 组显著增加。GC 组中瘤胃球菌 _UCG-005、普雷沃氏菌 _UCG-003 (5.0%) ($P < 0.05$)、布劳特氏菌 (2.6%) ($P < 0.05$) 较 NM 组显著增加 (图 5B)。结果表明胃癌大鼠肠道菌群的组成与正常大鼠有显著性差异,

MNNG 灌胃可以显著减少阿克曼氏菌和乳杆菌的丰度,并显著增加瘤胃球菌科、普雷沃氏菌、布劳特氏菌的丰度。

2.3.4 优势菌群分析

为了验证和进一步确定每组中各不相同的显著肠道菌群,进行了 LEfSe 分析,如图 6 所示。当 LDA > 3.5 时 NM 组中优势菌群为 f_消化球菌科 (f_Peptococcaceae)、g_未培养细菌_f_消化球菌科 (g_uncultured_bacterium_f_Peptococcaceae)、s_未培养细菌_f_消化球菌科 (s_uncultured_bacterium_f_Peptococcaceae);GC 组中的优势菌群为 s_未培养细菌_g_瘤胃球菌 _UCG-005 (s_uncultured_bacterium_g_Ruminococcaceae_ UCG-

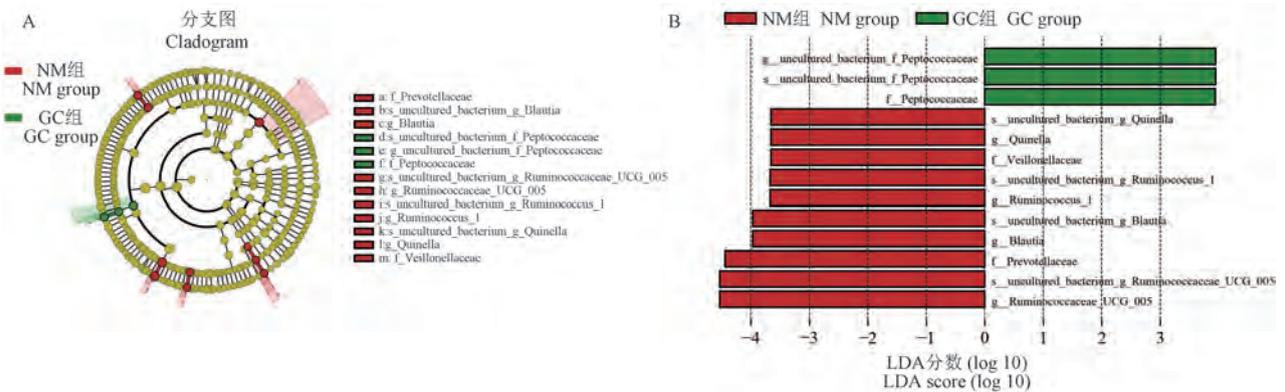


注:A:属水平肠道菌群的群落成分;B:属水平物种丰度。

图 5 胃癌对肠道菌群在属水平上的影响 ($n = 6$)

Note. A. Community components of intestinal flora at genus level. B. Genus level species abundance.

Figure 5 Effects of gastric cancer on intestinal flora at the generic level ($n = 6$)



注:A:16S rRNA 测序分析获得的分类分支图;B:LDA 值分布柱状图。

图 6 LEfSe 分析肠道菌群群落组成特征 ($n = 6$)

Note. A. Taxonomic branching diagram obtained by 16S rRNA sequencing analysis. B. Histogram of LDA value distribution.

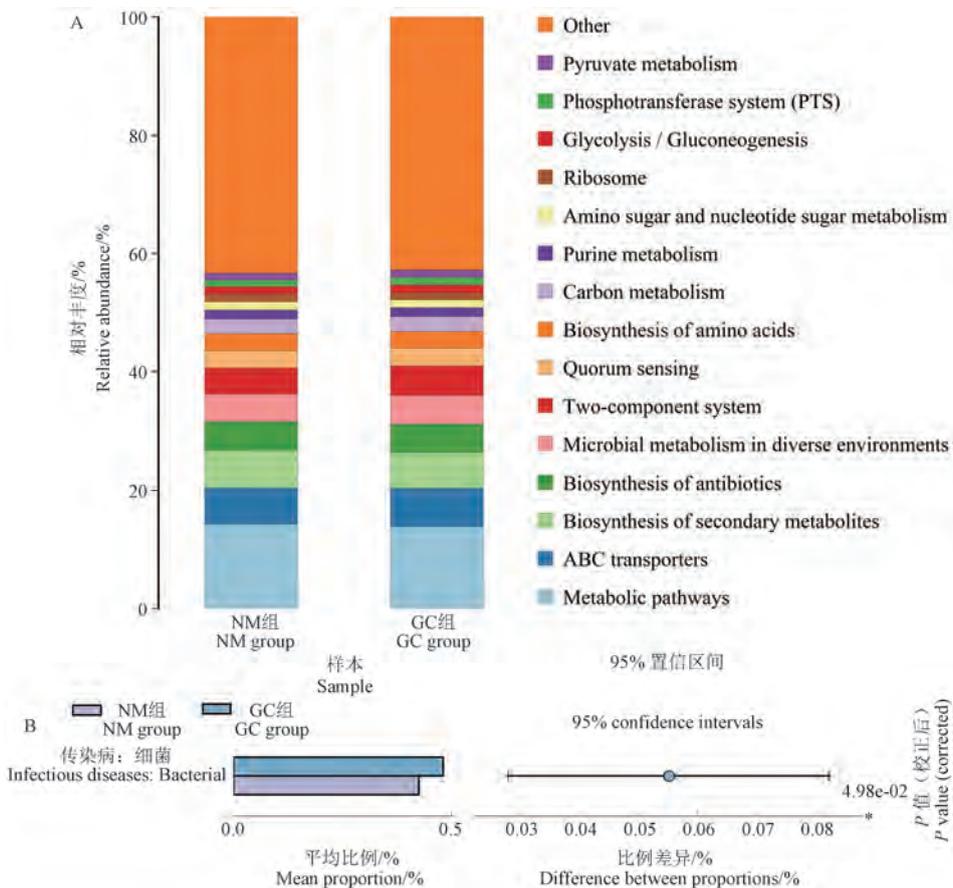
Figure 6 Microbial community composition characteristics analyzed by LEfSe ($n = 6$)

005)、g_瘤胃球菌_UCG-005(g_Ruminococcaceae_UCG-005)、f_普雷沃氏菌科(f_Preyotellaceae)、g_布劳特氏菌(g_Blautia)、s_未培养细菌_g_布劳特氏菌(s_uncultured_bacterium_g_Blautia)、s_未培养细菌_g_酸乳球菌_1(s_uncultured_bacterium_g_Ruminococcus_1)、g_酸乳球菌_1(g_Ruminococcus_1)、s_未培养细菌_g_昆氏菌属(s_uncultured_bacterium_g_Quinella)、f_韦荣氏菌科(f_Veillonellaceae)、g_奎因氏菌(g_Quinella)。LEfSe 分析进一步证明了 MNNG 灌胃的胃癌模型改变了大鼠肠道菌群的种类和丰度。

2.3.5 Tax4Fun 功能预测

基于 Tax4Fun 功能预测(图 7A), NM 组和

GC 组肠道菌群的基因功能主要通过以下途径表达(按相对丰度由高到低排列):代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物的生物合成、抗生素的生物合成、不同环境下的微生物代谢、双组分系统、群体感应、氨基酸的生物合成、碳代谢、嘌呤代谢、氨基糖和核苷酸糖的代谢、核糖体、糖酵解/糖异生、磷酸转移酶系统(PTS)、丙酮酸代谢和其他代谢途径。其中代谢途径、ABC 转运蛋白、次生代谢物的生物合成、抗生素的生物合成表达最多。进一步分析 GC 组与 NM 组的特异性差异代谢途径(图 7B), 结果发现胃癌大鼠肠道菌群的差异功能表达主要集中在细菌感染疾病方面($P < 0.05$)。



注:A:功能组成预测;B:功能差异预测。

图 7 NM 组与 GC 组的功能预测($n = 6$)

Note. A. Functional composition prediction. B. Functional difference prediction.

Figure 7 Functional prediction of normal group and gastric cancer group($n = 6$)

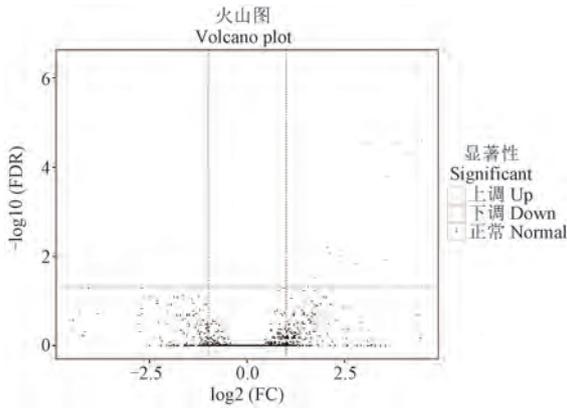
2.4 转录组测序分析

2.4.1 差异表达基因分析

经 NM 组与 GC 组对比分析,共获得 44 个

DEGs,其中 GC 组高于 NM 组的上调基因有 19 个,GC 组低于 NM 组的下调基因 25 个(图 8)。

2.4.2 差异表达基因功能富集分析



注:红色:上调基因;绿色:下调基因。

图 8 差异基因火山图($n = 6$)

Note. Red. Up-regulated genes. Green. Down-regulated genes.

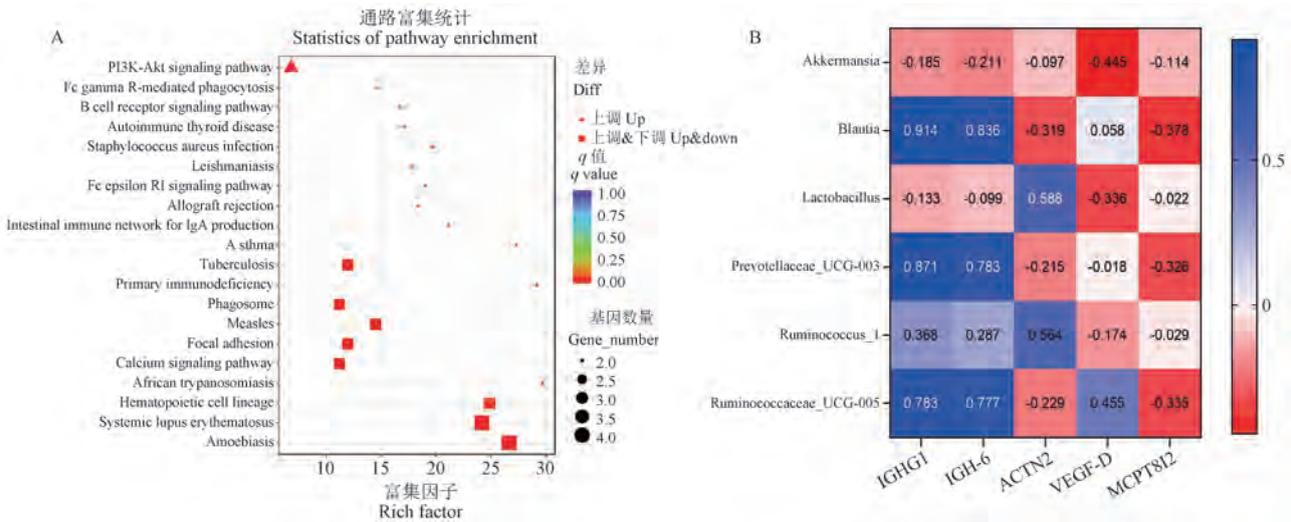
Figure 8 Differential gene volcano map($n = 6$)

通过 KEGG 通路富集分析,可以得到三条关键通路分别是阿米巴病、系统性红斑狼疮和 PI3K-Akt 信号通路($P < 0.01$)(图 9A)。其中阿米巴病、系统性红斑狼疮是上下调通路,而 PI3K-Akt 信号通路是上调通路。对关键通路富集的差异基因进行分析,阿米巴病富集的差异基因包括 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1 和 ACTN2;系统性红斑

狼疮富集的差异基因与阿米巴病富集的差异基因相同;PI3K-Akt 信号通路富集的差异基因有 VEGF-D、IGH-6 和 IGHG1。

2.5 肠道菌群与转录组学联合分析

为探究大鼠 MNNG 溶液灌胃形成胃癌后关键通路所富集的差异基因与差异肠道菌群(differential gut microbiotas, DGMs)的交互特征,选取这 5 位差异基因以及具有显著性差异的 6 个菌群进行分析,如图 9B 所示。Pearson 相关性分析表明,多个 DEGs 与 DGMs 显著相关。其中,IGHG1、IGH-6 与瘤胃球菌科_UCG-005、普雷沃氏菌_UCG-003 和布劳特氏菌呈显著正相关;ACTN2 与瘤胃球菌_1、乳杆菌呈正相关,与布劳特氏菌呈负相关;而 MCPT8I2 与瘤胃球菌_1、乳杆菌无明显相关性,与布劳特氏菌、普雷沃氏菌_UCG-003、瘤胃球菌科_UCG-005 呈负相关;VEGF-D 与阿克曼氏菌、乳杆菌呈显著负相关,与布劳特氏菌和普雷沃氏菌_UCG-003 无明显相关性。因 5 个 DEGs 富集到不同的通路上,而 DEGs 与 DGMs 之间存在显著的相关性,综合分析显示瘤胃球菌_UCG-005、普雷沃氏菌_UCG-003、布劳特氏菌分别



注:A:KEGG 通路富集分析(▲代表上调;■代表上调和下调;●代表基因数量;q值从紫色到红色表示q值越来越低);B:横坐标为差异表达基因,纵坐标为差异肠道菌群; $P < 0$ 为二者呈负相关; $P = 0$ 为二者无相关性; $P > 0$ 为二者呈正相关。

图 9 DEGs 在 KEGG 途径的功能富集分析聚类热图和 DEGs 与 DGMs 的相关性热图分析

Note. A. KEGG pathway enrichment analysis. (▲ represents up-regulation, ■ represents up-regulation and down-regulation, ● represents number of genes, the q value from purple to red indicates that the q value is getting lower and lower) B. Abscissa is the differentially expressed genes, and the ordinate is the differential intestinal microbiota. $P < 0$ was negative correlation. $P = 0$ was no correlation. $P > 0$ was positive correlation.

Figure 9 Functional enrichment analysis of DEGs in the KEGG pathway, cluster heatmap and correlation heatmap analysis of DEGs and DGMs

与阿米巴病、系统性红斑狼疮、PI3K-Akt 信号通路呈正相关。

3 讨论

3.1 MNNG 灌胃成功复制大鼠胃癌模型

MNNG 是一种活性的 N-亚硝基化合物,具有很强的诱变能力,对大鼠前胃有很高的亲和力,能够直接作用于胃黏膜,使 DNA 链上的碱基发生烷基化,引起癌变^[13-14]。目前胃癌的发病病理变化为:正常胃黏膜-慢性浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌^[15]。SUGIMURA 等^[16]以 MNNG 持续性饮用诱导大鼠胃腺癌模型后,以 MNNG 为基础的造模法便广泛用于建立胃癌等动物模型。N-亚硝基化合物主要来源于腌制、熏制的食物,本研究以持续灌胃 MNNG 模拟胃中硝酸盐的长期摄入,MNNG 通过 DNA 损伤表现出遗传毒性和致癌作用,是导致胃癌发生的主要化学物质^[17-18]。GC 组与 NM 组比较,肉眼即可发现 GC 组的胃组织黏膜体积缩小,胃壁变薄,皱襞走向错乱无规律,出现隆起且伴有角质增生;HE 病理可观察到 GC 组胃粘膜层次和细胞极性紊乱,细胞形态不一,鳞状上皮细胞增生和角化,并向下增殖侵入肌层,病理观察确认大鼠胃癌模型成功。

3.2 MNNG 使有益菌减少,增加潜在有害菌的丰度

本实验通过分析正常大鼠与胃癌大鼠的肠道菌群,发现 MNNG 灌胃显著减少了阿克曼氏菌和乳杆菌的丰度,并增加了瘤胃球菌科、普雷沃氏菌、布劳特氏菌的丰度。阿克曼氏菌是一种黏蛋白降解革兰阴性厌氧菌,能够促进杯状细胞分泌黏蛋白,维持肠腔黏液黏蛋白的动态平衡,增强肠黏膜的屏障功能,促进黏膜的完整性^[19-20]。有研究表明胃癌的进展与阿克曼氏菌的耗竭有关^[21],因此推测胃癌大鼠由于阿克曼氏菌的减少,胃内黏膜屏障破坏,影响胃浅层的完整性,促进胃癌的形成^[22]。普雷沃氏菌目前发现广泛存在于人体的各个部位,包括皮肤、口腔、阴道和肠道等^[23],通过激活 Toll 样受体 2 (toll-like receptor2, TLR2),导致抗原呈递细胞产生 Th17 极化细胞因子,引起炎症反应^[24]。瘤胃球菌能够作用于肠道屏障,激发肠道免疫细胞释放大量促炎

细胞因子,如白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6),而 IL-6 的过度表达会使肠道内环境失衡,刺激肠上皮通透性升高^[25]。由此推测,MNNG 灌胃增加了普雷沃氏菌、瘤胃球菌的丰度,二者可能通过升高胃黏膜通透性,使胃黏膜屏障受损,引起炎症,而促进胃癌的发生。通过对 MNNG 胃癌大鼠肠道菌群的分析可以得出 MNNG 的致癌效应不仅表现在直接的 DNA 损伤上,还通过调控肠道菌群,影响机体的免疫反应和炎症状态。

3.3 差异基因和信号通路在胃癌发展中的作用

通过转录组测序共获得了 44 个差异表达基因和 3 条关键通路。3 条关键通路分别是阿米巴病、系统性红斑狼疮和 PI3K-Akt 信号通路,而富集到 3 条通路的差异基因有 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D。免疫球蛋白 G1 重链 (immunoglobulin heavy constant gamma 1, IGHG1) 在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[26],在卵巢癌中能够通过调节 EMT 促进卵巢癌细胞的迁移和侵袭^[27],激活 AKT 通路促进乳腺癌的恶性发展^[28],靶向沉默 IGHG1 的表达后能够明显抑制前列腺癌细胞的增殖并诱发早期凋亡^[29]。IGHG1 上调是胃癌细胞的特征,通过上调 AKT/GSK-3 β / β -连环蛋白通路促进胃癌肿瘤细胞增殖、迁移和化疗耐药^[30]。血管内皮生长因子 D (vascular endothelial growth factor D, VEGF-D) 也被称为 c-fos 诱导的生长因子 (c-fos induced growth factor, FIGF),能够与血管内皮细胞上的受体 VEGFR-2、VEGFR-3 结合,并且通过 LncRNA CRART16/miR-122-5p/FOS 轴上调 VEGF-D 表达促进胃癌血管生成^[31-32]。通过对 KEGG 通路的分析,发现 VEGF-D、IGHG1 富集在 PI3K-Akt 通路上。在癌细胞中,PI3K-Akt 信号通路中致癌基因重新编程细胞代谢,促进异常生长细胞的合成代谢^[33],因此推测 PI3K-Akt 通路中上调的 VEGF-D、IGHG1 基因通过促进胃癌中异常细胞的合成代谢进而促进胃癌的生长、转移。肌动蛋白 $\alpha 2$ (α -actinin-2, ACTN2) 编码 α -actinin-2,在人心脏和骨骼肌中表达的蛋白质^[34]。在头颈鳞状细胞癌^[35]、肝细胞癌^[36]中被认为是风险基因,对肿瘤的进展具有促转移作用。最近的一项研究发现 ACTN2 是胃癌细胞中核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号转导的直接靶基因,通过

丝状伪足促进原发性肿瘤生长和骨髓转移^[37],证明了 ACTN2 在胃癌发展中的促进作用。

3.4 肠道菌群与差异基因之间的关联

通过对肠道菌群与差异基因的联合分析,发现普雷沃氏菌、瘤胃球菌科等与系统性红斑狼疮、PI3K-Akt 信号通路呈正相关。有研究表明系统性红斑狼疮患者的瘤胃球菌总体表现是其他患者的 5 倍^[38],而乳杆菌菌株对系统性红斑狼疮具有抗炎和免疫调节作用^[39]。本研究中瘤胃球菌与系统性红斑狼疮呈显著正相关,而系统性红斑狼疮通路富集的 ACTN2 基因与乳杆菌呈正相关,推测乳杆菌减少可能抑制 ACTN2 基因从而对系统性红斑狼疮的发生发展产生抑制作用。有研究证实普雷沃氏菌定植的微生物群小鼠肠道屏障受损,促进了脂多糖的产生和易位,进而激活 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 依赖性 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路,PI3K-Akt 通路活化生成的内源性硫化氢,抑制肠道动力、加速肠道的通透损伤及细菌移位,导致机体严重的炎症反应和致癌过程^[40-41]。VEGF 家族成员(包括 VEGF-D)可以通过与 VEGF 受体结合启动包括 PI3K-Akt 在内的下游信号通路,从而促进细胞增殖、迁移和血管生成等过程^[42],因此研究人员推测普雷沃氏菌的增加可能通过增强了 VEGF-D 和 IGHG1 的表达,激活 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路,从而促进了肿瘤细胞的增殖和血管生成。

综上所述,本实验通过肠道菌群测序和转录组学的联合分析将微生物与基因及通路进行联系,证明了经 MNNG 灌胃形成的胃癌大鼠在肠道菌群丰度方面与正常大鼠之间存在差异,研究推测 MNNG 通过改变肠道菌群的组成,削弱了肠道和胃黏膜的屏障功能,进而通过 PI3K-Akt-NF- κ B 信号通路引发炎症反应,最终促进胃癌的发生和发展。上调的 MCPT8I2、IGH-6、IGHG1、ACTN2、VEGF-D 可能是 MNNG 致癌作用的核心调控因素,研究结果可以为 MNNG 胃癌大鼠为模型的相关机制研究提供依据。

本研究虽然通过 MNNG 灌胃成功复制了胃癌大鼠模型,并通过转录组学和 16S rRNA 测序揭示了肠道菌群与胃癌相关基因的关系,但尚未通过功能性实验直接验证这些菌群或基因在胃

癌进程中的具体作用机制,在未来的研究中可针对本研究发现的关键差异菌群和差异基因,通过基因敲除或过表达等功能性实验,进一步验证其在胃癌发生和发展的具体作用机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 57.
- [2] GRAD C, GRAD S, FĂRCAȘ R A, et al. Changing trends in the epidemiology of gastric cancer [J]. *Med Pharm Rep*, 2023, 96(3): 229-234.
- [3] 梁维仁. 胃癌患者胃肠道微生态结构与多样性研究 [D]. 杭州: 浙江大学; 2019.
LIANG W R. Research on composition and diversity of Gastrointestinal microbiota in gastric cancer patients [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2019.
- [4] MENG C, BAI C, BROWN T D, et al. Human gut microbiota and gastrointestinal cancer [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, 16(1): 33-49.
- [5] HUANG S, HE J, CHEN Y, et al. Effect of Huangqin decoction on regulating intestinal flora in colitis mice characterized as inhibition of the NOD2-dependent pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 108-118.
- [6] LIU Y, BABA Y, ISHIMOTO T, et al. Gut microbiome in gastrointestinal cancer: a friend or foe? [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(10): 4101-4117.
- [7] 徐晓凤, 王建江, 叶金松, 等. 高通量测序法检测胃癌患者融合基因 LRP5-LITAF [J]. *临床检验杂志*, 2014, 32(11): 828-830.
XU X F, WANG J J, YE J S, et al. Determination of LRP5-LITAF fusion gene in gastric cancer by transcriptome analysis [J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 2014, 32(11): 828-830.
- [8] LI D, WANG Y, DONG C, et al. CST1 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer metastasis by regulating GPX4 protein stability via OTUB1 [J]. *Oncogene*, 2023, 42(2): 83-98.
- [9] 纪润璧, 马吉春, 闻向梅, 等. 大鼠胃炎癌转化模型建立与早期诊断方法探索 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 444-447.
JI R B, MA J C, WEN X M, et al. Construction of gastritis transformation into cancer model of rat and preliminary exploration of early diagnosis of gastric cancer [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(4): 444-447.
- [10] LI Y, HU Y, SHI S, et al. Evaluation of antioxidant and immuno-enhancing activities of purslane polysaccharides in gastric cancer rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 68: 113-116.
- [11] HIROSE M, FUKUSHIMA S, KURATA Y, et al.

- Modification of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced forestomach and glandular stomach carcinogenesis by phenolic antioxidants in rats [J]. *Cancer Res*, 1988, 48(18): 5310-5315.
- [12] PAN L J, MA S Y, WEN J, et al. Direct contact moxibustion promotes apoptosis of gastric cancer cells in rats by regulating intestinal flora [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41(6): 943-952.
- [13] 张永欣, 曾勇, 王婷, 等. MNNG 亚慢性暴露致大鼠胃损伤及炎症反应机制研究 [J]. *毒理学杂志*, 2023, 37(1): 12-17, 30.
ZHANG Y X, ZENG Y, WANG T, et al. Mechanism of gastric injury and inflammatory response induced by sub-chronic exposure to MNNG in rats [J]. *J Toxicol*, 2023, 37(1): 12-17, 30.
- [14] 王颖, 矫健鹏, 徐晶钰, 等. 胃癌前病变病证结合动物模型研究进展 [J]. *现代中医药*, 2024, 44(1): 1-4.
WANG Y, JIAO J P, XU J Y, et al. Research progress on animal models combined with disease and syndrome of gastric precancerous lesions [J]. *Mod Chin Med*, 2024, 44(1): 1-4.
- [15] 曹芝郡, 姜永珊, 李吉彦, 等. 胃癌前病变细胞模型的建立及其在中医药研究中的应用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(7): 1208-1212.
CAO Z J, JIANG Y S, LI J Y, et al. Establishment of cell model for gastric precancerous lesions and its application in traditional Chinese medicine research [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(7): 1208-1212.
- [16] SUGIMURA T, FUJIMURA S. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine [J]. *Nature*, 1967, 216(5118): 943-944.
- [17] LUO Y, LIANG M, YAO W, et al. Functional role of lncRNA LOC101927497 in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced malignantly transformed human gastric epithelial cells [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 93-103.
- [18] XU J, SHEN W, PEI B, et al. Xiao Tan He Wei Decoction reverses MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma *in vivo* and *in vitro*; Regulation of apoptosis through NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 95-102.
- [19] 黄桥深, 张永康, 汪水平, 等. 嗜黏蛋白阿克曼氏菌治疗疾病的潜力与作用机制研究进展 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(9): 3360-3373.
HUANG Q S, ZHANG Y K, WANG S P, et al. Potential and mechanism of *Akkermansia muciniphila* in disease treatment [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2023, 63(9): 3360-3373.
- [20] LUO Z W, XIA K, LIU Y W, et al. Extracellular vesicles from *Akkermansia muciniphila* elicit antitumor immunity against prostate cancer via modulation of CD8⁺ T cells and macrophages [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 2949-2963.
- [21] YU C, SU Z, LI Y, et al. Dysbiosis of gut microbiota is associated with gastric carcinogenesis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110036.
- [22] PARK J Y, SEO H, KANG C S, et al. Dysbiotic change in gastric microbiome and its functional implication in gastric carcinogenesis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4285.
- [23] 李宗岩, 胡云霏, 赵昌会, 等. 肠道普雷沃菌与人类相关疾病关系研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2024, 36(1): 100-104.
LI Z Y, HU Y F, ZHAO C H, et al. The relationship between intestinal *Prevotella* and human related diseases; research progress [J]. *Chin J Microecol*, 2024, 36(1): 100-104.
- [24] LARSEN J M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease [J]. *Immunology*, 2017, 151(4): 363-374.
- [25] 王敦方, 朱琳, 冯雪, 等. AOM/DSS 结肠癌模型优化及其肠道菌群变化探究 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(2): 151-160.
WANG D F, ZHU L, FENG X, et al. Optimization of the azomethane oxide and dextran sodium sulfate model of colitis-associated colon cancer and changes in the intestinal microbiota [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(2): 151-160.
- [26] 丁洋, 林堃, 王纯, 等. IGHG1 在胃癌中的表达及其临床意义的生物信息学分析 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2023, 44(10): 1214-1219.
DING Y, LIN K, WANG C, et al. Bioinformatics analysis of the expression and clinical significance of IGHG1 in gastric cancer [J]. *Med J Wuhan Univ*, 2023, 44(10): 1214-1219.
- [27] QIAN J, JI F, YE X, et al. IGHG1 promotes motility likely through epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(2): 282-290.
- [28] JIN Y, QIU L, BAO W, et al. High expression of IGHG1 promotes breast cancer malignant development by activating the AKT pathway [J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(6): 718-731.
- [29] 潘斌. 免疫球蛋白 G 在前列腺癌细胞的表达及 RNA 干扰 IGHG1 基因表达对前列腺癌细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 广州: 南方医科大学; 2012.
PAN B. Expression of IgG in human prostate cancer cell lines and the effect of IGHG1 gene RNAi on prostate cancer cell proliferation and apoptosis [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2012.

- [30] LI X, CHEN W, YANG C, et al. IGHG1 upregulation promoted gastric cancer malignancy via AKT/GSK-3 β / β -Catenin pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 397.
- [31] PAN T, JIN Z, YU Z, et al. Cathepsin L promotes angiogenesis by regulating the CDP/Cux/VEGF-D pathway in human gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2020, 23(6): 974–987.
- [32] ZHANG J, PANG X, LEI L, et al. LncRNA CRART16/miR-122-5p/FOS axis promotes angiogenesis of gastric cancer by upregulating VEGFD expression [J]. *Aging*, 2022, 14(9): 4137–4157.
- [33] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [34] RANTA-AHO J, OLIVE M, VANDROUX M, et al. Mutation update for the ACTN2 gene [J]. *Hum Mutat*, 2022, 43(12): 1745–1756.
- [35] YOU Y, DU Z, XU G, et al. Identification of exosome-related genes associated with prognosis and immune infiltration features in head-neck squamous cell carcinoma [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(6): 958.
- [36] LO L H, LAM C Y, TO J C, et al. Sleeping beauty insertional mutagenesis screen identifies the pro-metastatic roles of CNPY2 and ACTN2 in hepatocellular carcinoma tumor progression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 541: 70–77.
- [37] WANG C, XIE B, YIN S, et al. Induction of filopodia formation by α -Actinin-2 via RelA with a feedforward activation loop promoting overt bone marrow metastasis of gastric cancer [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 399.
- [38] KIM J W, KWOK S K, CHOE J Y, et al. Recent advances in our understanding of the link between the intestinal microbiota and systemic lupus erythematosus [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4871.
- [39] WANG W, FAN Y, WANG X. Lactobacillus: friend or foe for systemic lupus erythematosus? [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 883747.
- [40] 李萍, 唐哲, 徐三鹏, 等. 益髓破血方对脑出血小鼠肠道菌群和 PI3K/Akt 信号通路调节的作用机制研究 [J]. *中医药学报*, 2024, 52(6): 24–30.
- LI P, TANG Z, XU S P, et al. Mechanism of yisui poxue formula on regulating intestinal microbiota and PI3K/Akt signaling pathway in mice with cerebral hemorrhage [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2024, 52(6): 24–30.
- [41] HAN J X, TAO Z H, QIAN Y, et al. ZFP90 drives the initiation of colitis-associated colorectal cancer via a microbiota-dependent strategy [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1–20.
- [42] MALEKAN M, HAASS N K, ROKNI G R, et al. VEGF/VEGFR axis and its signaling in melanoma: Current knowledge toward therapeutic targeting agents and future perspectives [J]. *Life Sci*, 2024, 345: 122563.

[收稿日期] 2024-07-17

何宏星,廖乃顺. 2型糖尿病合并肝纤维化大鼠模型构建的初探[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 82-88.

HE H X, LIAO N S. Establishment and evaluation of rat model of type 2 diabetes with liver fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 82-88.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.008

2型糖尿病合并肝纤维化大鼠模型构建的初探

何宏星¹, 廖乃顺^{2*}

(1. 福建医科大学实验动物中心,福州 350004;2. 福建医科大学孟超肝胆医院,
福建省孟超肝胆技术创新重点实验室,福州 350028)

【摘要】目的 采用高脂高糖膳食联合四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)与链脲佐菌素诱导法构建2型糖尿病合并肝纤维化动物模型。**方法** SD大鼠按体质量随机分为肝纤维化组、糖尿病合并肝纤维化组及正常对照组,每组10只。肝纤维化组、糖尿病合并肝纤维化组大鼠饲喂高脂高糖饲料4周后,肝纤维化组按体质量5 mL/kg腹腔注射20% CCl₄(1次/周),诱导肝纤维化模型,糖尿病合并肝纤维化组大鼠分别按体质量5 mL/kg腹腔注射20% CCl₄、25 mg/kg链脲佐菌素(1次/周),两组动物继续高脂高糖喂养4周。尾静脉取血检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)含量。酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血液中胰岛素(insulin, INS)与糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)含量。血清生化分析检测谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素(total bilirubin, Tbil)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)水平。肝组织匀浆、生化分析羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量。苏木素-伊红(HE)染色、Masson染色检查肝组织形态改变。**结果** 与正常对照组和肝纤维化组比较,糖尿病合并肝纤维化组大鼠FBG、HbA1c含量和胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)显著升高,INS含量显著减少。与正常对照组比较,肝纤维化组、糖尿病合并肝纤维化组血清的ALT、AST、Tbil和HA水平,肝组织的HYP含量显著增加,且呈炎症细胞浸润、纤维化增生病变,肝组织炎症分级在G1级、G2级,纤维化分期主要在S2期。**结论** 高脂高糖膳食联合CCl₄与链脲佐菌素诱导法可构建2型糖尿病合并肝纤维化大鼠模型。

【关键词】 2型糖尿病;肝纤维化;糖尿病合并肝纤维化;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025)01-0082-07

Establishment and evaluation of rat model of type 2 diabetes with liver fibrosis

HE Hongxing¹, LIAO Naishun^{2*}

(1. Laboratory Animal Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. the United Innovation of Mengchao Hepatobiliary Technology Key Laboratory of Fujian Province, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350028, China)

Corresponding author: LIAO Naishun. E-mail: liaons046@fjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a rat model of type 2 diabetes mellitus with hepatic fibrosis using a high-lipid-sugar diet (HLSD) combined with inducement with carbon tetrachloride (CCl₄) and streptozotocin. **Methods** SD rats were randomly divided into a liver fibrosis (LF) group, type 2 diabetes combined with liver fibrosis (DLF) group, and normal group, with 10 rats in each group. All rats in the LF or DLE group were fed an HLSD for 4 weeks;

【基金项目】福建省自然科学基金项目(2020J011152)。

Funded by the Natural Science Foundation of Fujian (2020J011152).

【作者简介】何宏星,男,实验师,本科,研究方向:动物模型制作、动物实验。Email: hhx761115@fjmu.edu.cn

【通信作者】廖乃顺,男,助理研究员,博士,研究方向:肝病诊疗新技术研发。Email: liaons046@fjmu.edu.cn

then, all rats were intraperitoneally injected with 20% CCl_4 (once a week) according to body weight (5 mL/kg) to induce hepatic fibrosis for another 4 weeks. During CCl_4 treatment, rats in the DLF group were also intraperitoneally injected with 25 mg/kg STZ (once a week). After STZ treatment, the contents of FBG, INS, HOMA-IR, and HbA1c were evaluated once a week. The level of FBG was detected by blood glucose meter, and INS and HbA1c contents were detected by ELISA. Biochemical analysis was used to analyze the serum levels of AST, ALT, Tbil, and HA, as well as the HYP content in liver tissues. HE and Masson staining were used to evaluate pathological changes in liver tissues. **Results** The contents of FBG, HbA1c, and HOMA-IR were significantly increased, while the INS content was significantly decreased in the DLF group compared with those in the normal or LF group. Compared with the normal group, the LF group and DLF group showed higher levels of ALT, AST, Tbil, HA, and HYP, as well as fibrotic changes and inflammation in the liver tissue. **Conclusions** HLSL combined with CCl_4 and STZ inducement is an effective strategy for establishing a rat model of type 2 diabetes mellitus with liver fibrosis.

【Keywords】 type 2 diabetes mellitus; liver fibrosis; mellitus with liver fibrosis; rats

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

2 型糖尿病是一种以高血糖、炎症、胰岛素抵抗为特征的代谢性疾病,常引发糖尿病肝病、糖尿病肾病、糖尿病病足等多种并发症,严重危害人类健康^[1]。研究表明,肝病(如非酒精性脂肪肝、肝纤维化)与 2 型糖尿病的发生发展密切相关^[2]。肝作为糖代谢的主要场所,是调节葡萄糖体内平衡的重要器官。一方面,肝组织损伤可影响糖代谢异常,并造成肝源性糖尿病^[3];另一方面,血糖及胰岛素抵抗可促进病毒性肝炎、自身免疫性肝病等肝病进展,并成为原发性肝癌的独立危险因素^[4-6]。肝纤维化是慢性肝病发展的必经阶段,在 2 型糖尿病合并肝病者中,约 30% ~ 40% 进展为 2 型糖尿病合并肝纤维化^[7]。然而,目前缺乏 2 型糖尿病合并肝纤维化的动物模型,严重阻碍了针对该病的机制分析与新药开发研究。因此,建立 2 型糖尿病合并肝纤维化动物模型可为深入探究疾病的发病机制、病理生理变化及诊疗新技术研发等提供重要支撑。

高脂高糖膳食联合链脲佐菌素是一种常用于诱导构建 2 型糖尿病动物模型的方法^[8],本研究将以高脂高糖膳食、链脲佐菌素和四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)为诱导剂,构建 2 型糖尿病合并肝纤维化大鼠模型,以期对 2 型糖尿病合并肝纤维化的实验研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只雄性 SD 大鼠(SPF 级,体质量(180 ±

20) g, 6 ~ 7 周龄)购于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2022-0004】,饲养于福建医科大学实验动物中心【SYXK(闽)2022-0003】。屏障环境温度 20 ~ 26 °C、相对湿度 40% ~ 70%、光照/黑暗各 12 h,昼夜交替。动物经适应性饲养 1 周后,开始实验。本研究动物实验获福建医科大学孟超肝胆医院实验动物伦理中心审批(MCHH-AEC-2022-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器

高脂高糖饮食参考已发表文献^[9-10],饲料配方由 59.2% 基础饲料、20% 蔗糖、18% 猪油、2.5% 胆固醇、0.3% 胆酸钠组成,购于北京华阜康生物科技股份有限公司;链脲佐菌素、蛋白定量试剂盒、4% 多聚甲醛购于上海碧云天生物技术有限公司;0.001 mol/L PBS 购自 Hyclone 公司; CCl_4 购自国药集团化学试剂有限公司;生化试剂盒(包括谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, Tbil)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)购自南京建成生物工程研究所有限公司;戊巴比妥钠购自 Sigma-Aldrich 公司;血糖试纸购自 Roche 公司;胰岛素(insulin, INS)、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于上海酶联生物科技有限公司。

台式冷冻离心机(Thermo, 美国);纯水仪(Millipore, 美国);M5e 型多功能酶标仪(Molecular Devices, 美国);KFBIO 全自动多功能

切片扫描仪(江丰,中国);Accu-Check Performa 血糖仪(Roche,瑞士);多样品组织研磨机(净信,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

SD 大鼠按体质量随机分成肝纤维化组、糖尿病合并肝纤维化组和正常对照组,每组 10 只。肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠饲喂高脂高糖饲料,正常对照组大鼠饲喂普通饲料。

1.2.2 动物造模

肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠饲喂高脂高糖饲料 4 周后,肝纤维化组大鼠按体质量 5 mL/kg 腹腔注射 20% CCl_4 , 1 次/周,继续高脂高糖喂养,连续 4 周;糖尿病合并肝纤维化组大鼠按照体质量 5 mL/kg 腹腔注射 20% CCl_4 、25 mg/kg 链脲佐菌素,1 次/周,继续高脂高糖喂养,连续 4 周。正常对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,并饲喂普通饲料。造模过程通过尾静脉采血动态检测糖尿病相关指标;造模结束后肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组继续饲喂高脂高糖饲料 2 周,收集血液与肝组织进行相关指标检测。

1.2.3 糖尿病指标测定

注射 CCl_4 、链脲佐菌素开始到造模结束,每周尾静脉采血,检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)含量,并采用 ELISA 检测分析血液中 HbA1c、INS 含量,胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) = $\text{FBG}(\text{mmol/L}) \times \text{INS}(\mu\text{U/L})/22.5$ 。

1.2.4 血清生化分析

大鼠经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,经眼眶静脉采血。经室温静置 1 h 后,在 3500 r/min、4 °C 条件下离心 10 min,收集血清。按照 ALT、AST、Tbil、HA 试剂盒说明书进行加样、孵育与显色反应,并多功能酶标仪分别记录样本在 510 nm 和 450 nm 处的吸收波长,计算血清 ALT、AST、Tbil 和 HA 水平。

1.2.5 肝组织 HYP 含量检测

肝组织经生理盐水清洗后,进行组织匀浆处理,经 4000 r/min、4 °C,离心 10 min,取上清;上清液经 BCA 蛋白定量后,采用生化分析检测肝组织匀浆液中 HYP 含量。

1.2.6 肝组织病理形态学检查

离体肝组织迅速投入 4% 多聚甲醛固定,并分别进行 75% ~ 100% 乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、石蜡切片。肝组织切片分别经苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色后,光学显微镜下观察肝组织炎症浸润、纤维组织增生等形态学变化,进行肝组织病理炎症分级和纤维化分期,并采用全自动多功能切片扫描病理切片。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 进行柱状图作图、SPSS 22.0 软件统计学分析处理。计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, LSD 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 2 型糖尿病指标变化

如图 1 所示,与正常对照组和肝纤维化组比较,经链脲佐菌素诱导后,糖尿病合并肝纤维化组大鼠的 FBG、HbA1c、HOMA-IR 呈显著性增加($P < 0.05$),INS 呈显著性减少($P < 0.05$),说明糖尿病合并肝纤维化组大鼠呈高血糖、胰岛素抵抗状态;且末次链脲佐菌素诱导结束 2 周后,糖尿病合并肝纤维化组大鼠维持高血糖、胰岛素抵抗状态,说明高脂高糖膳食联合 CCl_4 与链脲佐菌素可用于大鼠 2 型糖尿病模型造模,且 2 周内大鼠的 2 型糖尿病指标相对稳定。

2.2 血清肝功能水平

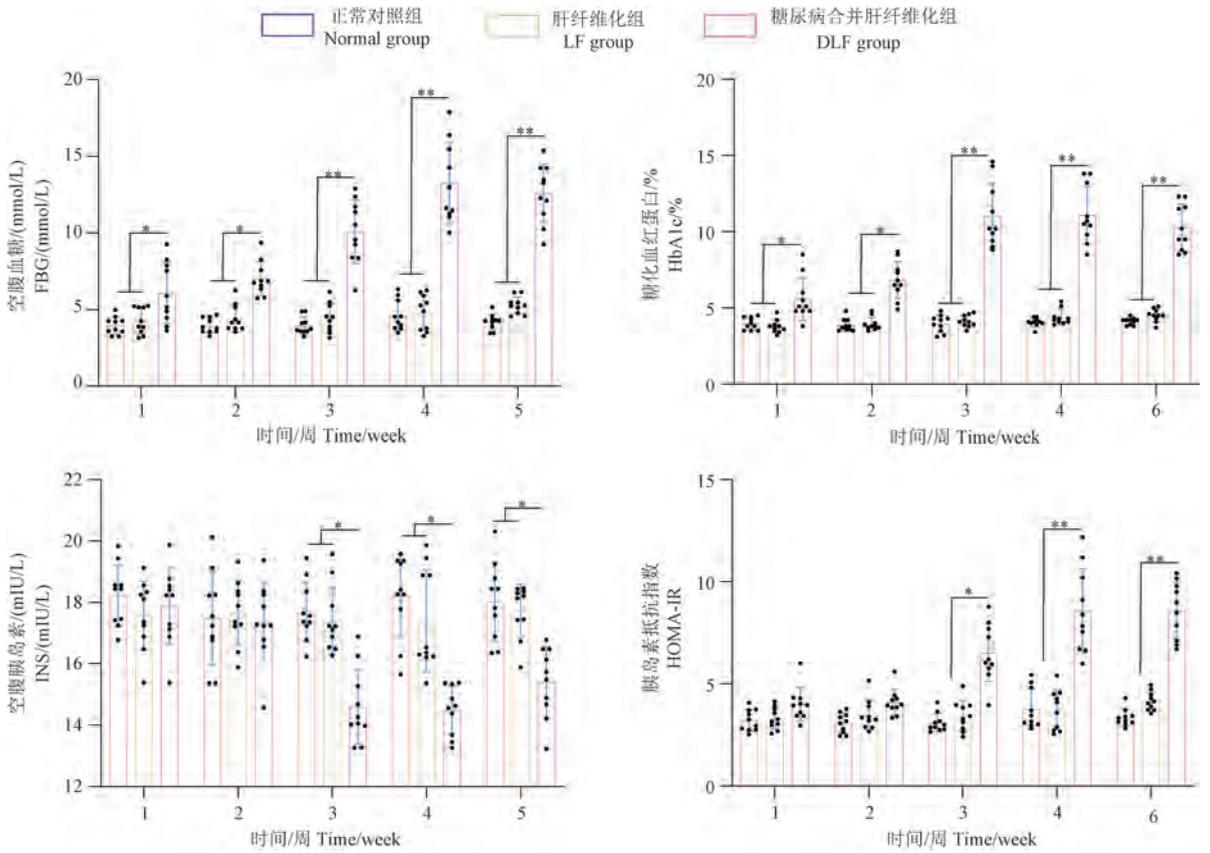
与正常对照组比较,肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠的 ALT、AST、Tbil 水平呈显著性增加($P < 0.01$),说明肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠呈肝功能损伤状态(图 2)。

2.3 HA 与 HYP 含量

与正常对照组比较,肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠的 HA、HYP 含量呈显著性增加($P < 0.01$),说明肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠呈肝纤维组织增生病变(图 3)。

2.4 肝组织病理学改变

为了进一步评估各组肝组织的形态学变化,收集肝组织进行 HE、Masson 染色。与正常对照组比较,肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠肝组织呈炎症细胞浸润,及纤维化病理形态学



注:两组间相比, * P < 0.05, ** P < 0.01。(下同)

图 1 各组大鼠 FBG、HbA1c、INS 和 HOMA-IR 含量变化

Note. Compared between groups, * P < 0.05, ** P < 0.01. (The same in the following figures)

Figure 1 Contents of FBG, HbA1c, INS and HOMA-IR in rats

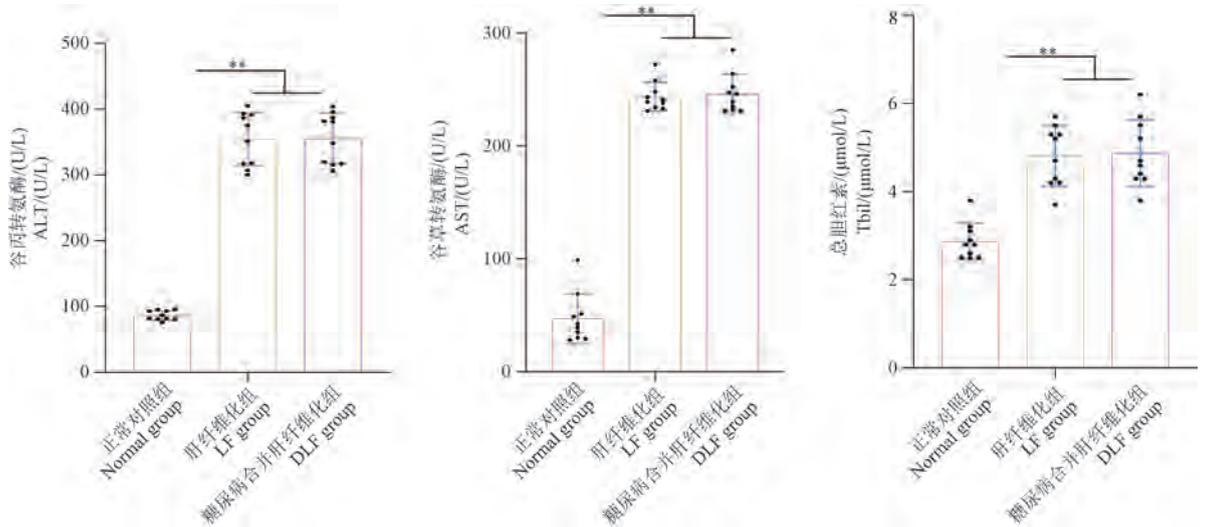


图 2 各组大鼠血清 ALT、AST 和 Tbil 水平变化

Figure 2 Serum levels of ALT, AST and Tbil in rats

改变(图 4A)。

Masson 染色进一步证实,肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组大鼠肝组织呈纤维样增生的

病理学改变(图 4B)。通过对大鼠肝组织进行肝组织炎症分级与纤维化分期,发现肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组肝炎症分级在 G1 级、G2

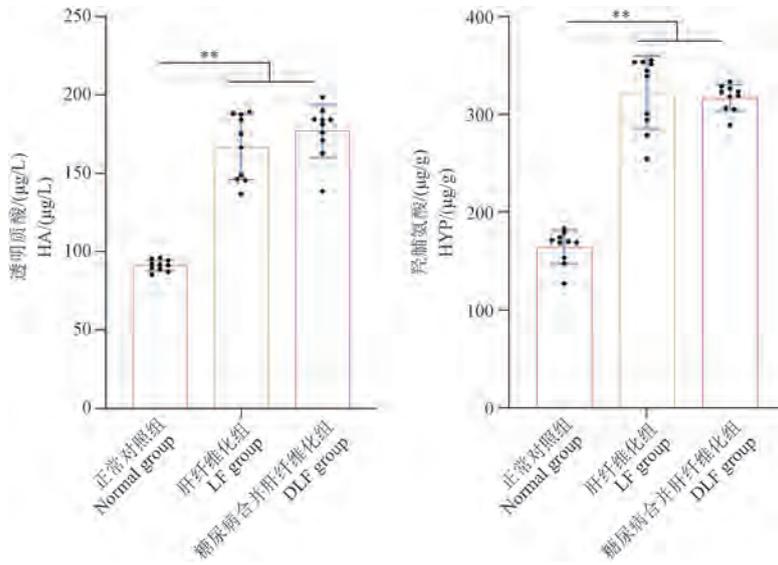
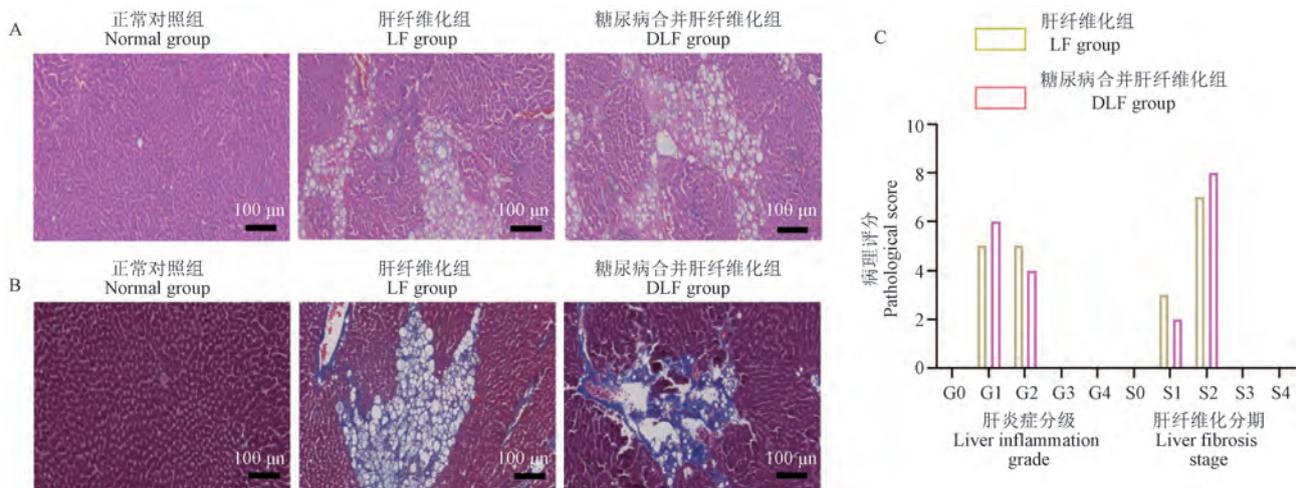


图 3 各组大鼠 HA 和 HYP 含量变化

Figure 3 Contents of HA and HYP in rats



注:A:各组肝组织 HE 染色结果;B:各组肝组织 Masson 染色结果;C:不同组大鼠的肝组织炎症分级和纤维化分期。

图 4 肝组织病理学检查

Note. A. HE staining results of liver tissues in each groups. B. Masson staining results of liver tissues in each groups. C. Liver inflammation grade and fibrosis stage in different groups of rats.

Figure 4 Liver histopathology examination

级,纤维化分期主要在 S2 期(图 4C)。这些结果表明,高脂高糖膳食联合 CCl₄ 与链脲佐菌素可用于大鼠肝纤维化造模。

3 讨论

2 型糖尿病的动物模型主要分为两大类:一类是自发性动物模型,包括 NSY 小鼠、OLETF 大鼠和 Zucker 大鼠等;另一类是实验性动物模型,通过高脂高糖饮食联合胰岛素受体拮抗剂(链脲佐菌素)诱导^[11-14]。自发性动物模型主要通过基

因突变导致了胰岛素信号通路的缺陷,从而造成糖尿病的发生,它主要用于具有遗传背景下的糖尿病研究^[15]。高脂高糖饮食联合链脲佐菌素通过破坏体内的糖、脂质代谢,造成胰岛 β 细胞功能不全,并产生胰岛素抵抗,与临床多数 2 型糖尿病患者的发病过程相吻合^[16]。本实验利用高脂高糖饮食 8 周,并于第 4 周开始联合链脲佐菌素诱导发现,在链脲佐菌素诱导后第 3、4 周,大鼠呈高血糖、胰岛素抵抗状态,且造模结束后 2 周,维持其高血糖、胰岛素抵抗特征。HbA1c 是 2 型糖

尿病的另一关键检测指标^[17-18],本研究通过对 HbA1c 的动态检测,发现高脂高糖饮食联合链脲佐菌素也可提高大鼠 HbA1c 含量,并在链脲佐菌素诱导 1 周后,大鼠体内的 HbA1c 含量与 FBG 同步升高。这些结果均证实了 2 型糖尿病模型的成功构建。

肝纤维化是慢性肝病最常见的病理学特征之一。在炎症、氧化应激等因素的刺激下,激活肝星状细胞成肌成纤维细胞,导致纤维组织增生^[19-21]。本研究通过高脂高糖饮食联合 CCl₄ 与链脲佐菌素诱导发现,大鼠可呈现肝组织纤维增生,肝组织 HYP、血清 HA 的含量也增加,说明高脂高糖饮食联合 CCl₄ 与链脲佐菌素可用于肝纤维化造模。另外,本研究进一步发现肝纤维化组与糖尿病合并肝纤维化组的肝组织形态学,HYP、HA 含量无显著性差异,说明高脂高糖饮食与 CCl₄ 诱导可进行肝纤维化造模,而进一步联合链脲佐菌素不会引起额外的肝组织纤维化病理学改变。采用高脂高糖饮食联合链脲佐菌素进行 2 型糖尿病动物造模时,链脲佐菌素的给药剂量为 30 mg/kg^[22-24],而本研究使用的剂量 25 mg/kg。因此,本研究使用链脲佐菌素不引起大鼠额外的肝组织损伤可能跟其低剂量相关。

在前期研究中,萧自智等^[25]已采用了高脂饮食联合链脲佐菌素构建 2 型糖尿病合并肝纤维化,经高脂饮食 4 周后,进行 2 次链脲佐菌素,评估其血糖符合 2 型糖尿病指征后,持续高脂饮食至 36 周后才发现大鼠肝纤维化改变。该法评估糖尿病与肝纤维化是在不同时间内进行的,且在肝纤维改变(36 周)的同时,缺乏对血糖指标的监测。有学者分析认为,要进行糖尿病合并症造模时,链脲佐菌素的干预至少要持续 7 周,才能维持动物高血糖状态^[26]。而本研究在高脂高糖饮食的基础上,进行链脲佐菌素干预持续 4 周,并进一步联合 CCl₄ 造模,在造模结束(停药)后 2 周,观察到大鼠的持续高血糖与肝纤维化病理学改变,符合 2 型糖尿病合并肝纤维化的相关指征要求。

综上,本研究结果表明,高脂高糖饮食联合 CCl₄ 与链脲佐菌素可诱导大鼠高血糖、胰岛素抵抗、肝纤维化病理学改变,可用于 2 型糖尿病合并肝纤维化造模。

参 考 文 献(References)

- [1] ZHENG Y, LEY S H, HU F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 88-98.
- [2] CASTERA L, CUSI K. Diabetes and cirrhosis: current concepts on diagnosis and management [J]. Hepatology, 2023, 77(6): 2128-2146.
- [3] KUMAR R, GARCÍA-COMPEÁN D, MAJI T. Hepatogenous diabetes: knowledge, evidence, and skepticism [J]. World J Hepatol, 2022, 14(7): 1291-1306.
- [4] XIE J, LIN X, FAN X, et al. Global burden and trends of primary liver cancer attributable to comorbid type 2 diabetes mellitus among people living with hepatitis B: an observational trend study from 1990 to 2019 [J]. J Epidemiol Glob Health, 2024, 14(2): 398-410.
- [5] YU Y, TONG K, HU G, et al. Love-hate relationship between hepatitis B virus and type 2 diabetes: a mendelian randomization study [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1378311.
- [6] KIM H, LEE D S, AN T H, et al. Metabolic spectrum of liver failure in type 2 diabetes and obesity: from NAFLD to NASH to HCC [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4495.
- [7] SALUNKHE S A, CHITKARA D, MAHATO R I, et al. Lipid based nanocarriers for effective drug delivery and treatment of diabetes associated liver fibrosis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173: 394-415.
- [8] CASSANO V, LEO A, TALLARICO M, et al. Metabolic and cognitive effects of ranolazine in type 2 diabetes mellitus: data from an *in vivo* model [J]. Nutrients, 2020, 12(2): 382.
- [9] PAN F, LIAO N, ZHENG Y, et al. Intrahepatic transplantation of adipose-derived stem cells attenuates the progression of non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 3725-3733.
- [10] LIAO N, PAN F, WANG Y, et al. Adipose tissue-derived stem cells promote the reversion of non-alcoholic fatty liver disease: an *in vivo* study [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(5): 1389-1396.
- [11] AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 9051426.
- [12] HEYDEMANN A. An overview of murine high fat diet as a model for type 2 diabetes mellitus [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 2902351.
- [13] PANDEY S, DVORAKOVA M C. Future perspective of diabetic animal models [J]. Endocr Metab Immune Disord

- Drug Targets, 2020, 20(1): 25–38.
- [14] RAI V, MOELLMER R, AGRAWAL D K. Clinically relevant experimental rodent models of diabetic foot ulcer [J]. Mol Cell Biochem, 2022, 477(4): 1239–1247.
- [15] WANG Y W, SUN G D, SUN J, et al. Spontaneous type 2 diabetic rodent models [J]. J Diabetes Res, 2013, 2013: 401723.
- [16] SKOVSTØ S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin [J]. J Diabetes Investig, 2014, 5(4): 349–358.
- [17] YUAN Y, ZHOU X, JIA W, et al. The association between self-monitoring of blood glucose and HbA1c in type 2 diabetes [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1056828.
- [18] VURAL KESKINLER M, TAKIR M, CAKLILI O T, et al. The frequency and determinants of HbA1c variability in type 2 diabetic patients [J]. Metab Syndr Relat Disord, 2021, 19(7): 372–377.
- [19] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(10): 633–646.
- [20] DHAR D, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer [J]. Exp Biol Med, 2020, 245(2): 96–108.
- [21] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397–411.
- [22] SALMANOGLU D S, GURPINAR T, VURAL K, et al. Melatonin and L-carnitin improves endothelial dysfunction and oxidative stress in Type 2 diabetic rats [J]. Redox Biol, 2016, 8: 199–204.
- [23] MANAER T, YU L, ZHANG Y, et al. Anti-diabetic effects of shubat in type 2 diabetic rats induced by combination of high-glucose-fat diet and low-dose streptozotocin [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 169: 269–274.
- [24] MA C, LONG H. Protective effect of betulin on cognitive decline in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats [J]. Neurotoxicology, 2016, 57: 104–111.
- [25] 萧自智, 施红, 饶焕文, 等. 石斛合剂序贯法对糖尿病合并肝纤维化的作用机制研究 [J]. 康复学报, 2019, 29(2): 44–49.
- XIAO Z Z, SHI H, RAO H W, et al. Mechanism of DMOC in diabetes mellitus with liver fibrosis [J]. Rehabil Med, 2019, 29(2): 44–49.
- [26] FURMAN B L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. Curr Protoc, 2021, 1(4): e78.

[收稿日期] 2024-05-30

《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:生物学、医学、药学、环保、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员及相关的生产者、院校师生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,160 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。

宋玲,高云航,李晗,等. 雾化吸入脂多糖导致的大鼠急性肺炎模型不同标本中炎性因子比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 89-98.

SONG L, GAO Y H, LI H, et al. Comparative research of inflammatory factors in different specimens from a rat model of aspiration pneumonia induced by lipopolysaccharide [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 89-98.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.009

雾化吸入脂多糖导致的大鼠急性肺炎模型不同标本中炎性因子比较研究

宋玲,高云航,李晗,陈腾飞,侯红平,叶祖光*,张广平*

(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

【摘要】 目的 探究通过雾化吸入脂多糖(LPS)所诱发的大鼠急性肺炎模型中,肺泡灌洗液、肺组织以及血清中炎性因子的变化情况。方法 通过连续3 d、每天雾化吸入15 min 4 mg/mL的LPS来诱导大鼠急性肺炎模型,并同步监测LPS的粒径分布及气溶胶浓度,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠肺病理学形态变化,显微镜观察肺泡灌洗液涂片白细胞及计数;超敏多因子电化学发光法测肺组织、血清及肺泡灌洗液干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、角质形成细胞衍生趋化因子(keratinocyte-derived chemokine/growth-regulated oncogene,KC/GRO)炎性因子。结果 LPS诱导的肺炎模型组织病理学,肺可见局灶或弥漫、肺泡上皮坏死伴脱落、炎性细胞浸润。测定雾化LPS累积粒度分布达到10%、50%及90%对应的粒径(diameter of 10%, 50% and 90% volume distribution, Dv(10), Dv(50)及Dv(90))分别为0.6974 μ m、3.387 μ m和8.836 μ m,气溶胶浓度为4.08 g/m³,计算大鼠的吸入剂量为47.10 mg/kg。在肺泡灌洗液中,模型组的中性粒细胞数量显著增加($P < 0.01$);同时模型组肺组织中的炎性因子IL-1 β 、IL-6、KC/GRO水平显著上升($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。肺泡灌洗液中的炎性因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量也显著增高($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$)。而血清中的炎性因子则未见明显变化。结论 在雾化吸入LPS构建的急性肺炎模型中,IL-1 β 、IL-6、KC/GRO以及TNF- α 等炎性因子在肺组织和肺泡灌洗液中均出现了显著变化,而血清中的炎性因子则未见明显变化。这表明该模型主要引发的是肺部局部的炎症反应。

【关键词】 急性肺炎模型;脂多糖;雾化吸入;炎性因子;白细胞分类计数

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025)01-0089-10

Comparative research of inflammatory factors in different specimens from a rat model of aspiration pneumonia induced by lipopolysaccharide

SONG Ling, GAO Yunhang, LI Han, CHEN Tengfei, HOU Hongping, YE Zuguang*, ZHANG Guangping*

【基金项目】 中药研究所中药药理创新团队项目(CI2021B015),中国中医科学院创新工程项目(CI2021A04615),国家自然科学基金青年项目(82204740)。

Funded by Scientific and Technological Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021B015), Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04615), Youth Project of the National Natural Science Foundation of China (82204740).

【作者简介】 宋玲,女,硕士,助理研究员,研究方向:中药呼吸系统药理。Email:lsong@icmm.ac.cn

【通信作者】 叶祖光,男,硕士,研究员,研究方向:中药药理与毒理学。Email:yezuguang@sina.com;

张广平,男,博士,研究员,研究方向:中药呼吸系统药理。Email:gpzhang@icmm.ac.cn。

* 共同通信作者

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 10070, China)

Corresponding author: YE Zuguang. E-mail: yezuguang@sina.com; ZHANG Guangping. E-mail: gpzhang@icmm.ac.cn

【Abstract】 Objective To investigate the changes of inflammatory factors in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung tissue, and serum of a rat pneumonia model induced by inhalation of lipopolysaccharides (LPS). **Methods** Three days after modeling by LPS 4 mg/mL inhalation, 15 min/d, was conducted while monitoring the particle size distribution and aerosol concentration of LPS, the degree of inflammation in lung tissues of rats in each group was observed via HE staining, and neutrophils in BALF were counted by microscope. The contents of interferon gamma (IFN- γ), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and KC/GRO in lung tissue, serum, and BALF were detected by Meso Scale Discovery. **Results** The lung histopathology of model rats displayed focal and diffuse alveolar epithelial necrosis with shedding and the aggregation and infiltration of inflammatory cells. The particle size distribution of atomized LPS was as follows, $D_v(10) = 0.6974 \mu\text{m}$, $D_v(50) = 3.387 \mu\text{m}$, $D_v(90) = 8.836 \mu\text{m}$. The aerosol concentration of LPS was 4.08 g/m^3 , and the calculated inhalation dose for rats was 47.10 mg/kg . The neutrophil count ($P < 0.01$) and contents of IL-1 β , IL-6, and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$) in the BALF, and the contents of IL-1 β , IL-6, and KC/GRO in lung tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), of model rats were significantly increased. No biologically significant changes were observed in inflammatory factor levels in the serum. **Conclusions** In the acute pneumonia model induced by inhalation of LPS, significant changes in inflammatory factors such as IL-1 β , IL-6, KC/GRO, and TNF- α were observed in both lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), while no notable changes in these inflammatory factors were detected in serum. This indicates that the inflammation responses are primarily localized in the lungs.

【Keywords】 acute pneumonia model; lipopolysaccharide; aspiration; inflammatory factors; neutrophils count
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由于各种致病因素导致肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞受到损伤。这些损伤进而引发肺泡的弥漫性损伤,包括肺水肿和透明膜的形成。临床上主要表现为呼吸窘迫和低氧血症。最近的研究揭示炎症反应在 ALI/ARDS 的发病过程中起着关键作用,尽管其确切发病机制尚未完全明确。在疾病过程中大量促炎因子、迁移因子和炎性介质过表达,形成免疫应激反应,诱发炎症风暴,严重者出现呼吸窘迫综合征。其中,促进炎症反应的平衡作用,避免炎症因子过度活跃,对于恢复机体正常生理功能至关重要。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁外膜的主要成分,可诱使炎症因子的释放^[1-2],常作为 ALI 的诱导剂,也是目前公认的诱导动物急性肺炎模型的药物^[3-4]。已有研究表明 LPS 进入生物体内后,可以激活相关炎症信号通路^[5],导致炎症联级反应^[6],从而促进炎症因子的释放,如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等均在 ALI/

ARDS 病程进展中有非常重要的作用^[7]。但是在 LPS 诱导的肺损伤模型炎症因子检测的样本灌洗液、肺组织、血清和炎性因子的选择不尽相同。本课题组前期构建了雾化吸入 LPS 致大鼠肺炎模型,大鼠肺部损伤程度一致,病理变化表现稳定^[8],本研究比较 LPS 诱导的肺炎模型肺组织、肺泡灌洗液和血清中炎性因子的影响,较系统研究了模型炎症变化特点,在此基础上进一步确定了 LPS 致大鼠急性肺炎模型的建立方法,为后续的肺炎发病机制研究以及发病早期诊断等提供一定的实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级 Wistar 大鼠,6 ~ 8 周龄,170 ~ 190 g,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】,饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房【SYXK(京)2023-0077】。饲养条件为 12 h 明暗交替,温度

(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (50 ± 15)%, 自由饮水及进食。饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。本研究通过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会的审查(2019B021)。

1.1.2 主要试剂与仪器

LPS(Sigma, 127M4030V, 美国), 地塞米松磷酸钠注射液(贵州天地药业有限责任公司, 19110802A, 中国), 戊巴比妥钠(北京索莱宝科技有限公司, 20150412, 中国), 甲醛(福晨(天津)化学试剂有限公司, 20190920, 中国), 生理盐水(石家庄四药有限公司, 2006192110, 中国), V-PLEX Proinflammatory Panel 2 大鼠试剂盒(Meso Scale Discovery, K15059D-1, 美国), 蛋白浓度测定(bicinchoninic Acid Assay, BCA)试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司, VJ312549, 美国), RIPA 裂解液(北京康为世纪生物生物科技有限公司, 01406/17923, 中国)。口鼻暴露吸入塔(上海梅理实验科技有限公司, Melton Inhalogic NIES, 中国), 离心机(Eppendorf, Centrifuge 5810R, 德国), 电子天平(Sartorius, BSA3202S-CW, 德国), 显微镜及图像分析系统(Olympus, BX51, 日本), 雾化器(PARI, Turbo BOY N, 德国), CEL-712 Microdust Pro 监测仪(CASELLA 公司, CEL-712, 英国), Spraytec 实时喷雾粒度分析仪(马尔文, Spraytec, 英国), 多因子电化学发光分析仪(Meso Scale Discovery, MSD)(MSD 公司, SQ120, 美国), 脱水机(樱花, VIP-6, 日本), 包埋机(科迪仪器设备有限公司, KD-BM, 中国), 病理切片机(徕卡, RM2016, 德国), 组织摊片机(科迪仪器设备有限公司, KD-P, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备

Wistar 大鼠适应性喂养 5 d, 根据体质量随机分为 3 组: 空白对照组、模型组、阳性对照组, 每组 10 只。模型组和阳性对照组均吸入 LPS 溶液(4 mg/mL) 15 min 进行造模, 每次雾化药液体积约为 5 mL, 连续 3 d, 空白对照组雾化吸入生理盐水 15 min, 阳性对照组连续 3 d 静脉注射地塞米松(3.6 mg/kg), 第 4 天早上即第 3 次造模后 16 h 各组进行取材。

1.2.2 LPS 雾化气溶胶浓度测定及粒径测定

将 CEL-712 Microdust Pro 监测仪插入到

Melton Inhalogic NIES 口鼻式吸入暴露系统的暴露孔, 对雾化气溶胶进行浓度分析, 待气溶胶浓度即时值基本稳定后再测量 5 min, 测量完毕后计算气溶胶浓度的平均值。激光衍射仪的配置方式如下: 维持雾化器与雾化压缩机稳定连接, 避免两者脱离, 并在设定的气体流速和压力下工作。将 4 mg/mL 的 LPS 溶液装入雾化器中。激光衍射仪进口与雾化气溶胶的出口相连, 出口则与外置过滤器相接, 外置过滤器与真空泵相连。进口连接流量计, 用真空泵调控入口气体流速至 ($15 \pm 5\%$) L/min。启动计算机上的 Spraytec software 软件(版本 3.20), 并按照以下标准作业程序进行设置: 选择连续模式, 设定颗粒的折光系数为 1.33, 指定分散介质为空气且其折光系数为 1.00。完成设置后即可开始执行光路背景的测试。在背景测试通过后, 需将雾化器与入口端进行连接。然后, 启动压缩机开始雾化, 在此过程中, 对气溶胶的粒径进行测试, 当气溶胶浓度出现明显下降时, 应立即停止测试, 并关闭雾化器。在分析过程中, 需对 $D_v(10)$, $D_v(50)$ 及 $D_v(90)$ 和激光强度进行持续性的监测。

1.2.3 样本采集

造模后 16 h 用 0.8% 戊巴比妥钠(经 0.22 μm 滤膜过滤除菌)麻醉(0.6 mL/100 g), 腹主动脉采血, 暴露胸腔, 右叶结扎, 用生理盐水灌洗左肺, 缓缓打入, 静止平衡 30 s, 缓缓抽出, 每次 1 mL, 灌洗 2 次, 灌洗速度 2 mL/min(每次 30 s), 合并灌洗液(回收率 > 70%)。从腹主动脉抽取的动脉血静置数分钟后, 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 分装后保存。瑞氏-姬姆萨染色法观察肺泡灌洗液中炎症细胞(巨噬细胞、中性粒细胞)含量。右肺用 4% 甲醛固定, 室温保存, 待进一步病理检测, 制备石蜡切片供组织学检查。取适量肺组织, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗去血污, 剪成小块放入研磨管中并加入适量 PBS, 加入钢珠放入组织研磨仪中制成匀浆, 6861 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min 后取上清, 用于炎症因子检测。同时采用 Bicinchoninic Acid Assay BCA 法对上清液进行蛋白定量。

1.2.4 检测指标与方法

(1) 肺组织病理形态学检查: 将肺组织进行梯度乙醇脱水 70%、80%、95%、100% 各 30 min。

置于二甲苯进行组织透明,共 2 次,每次 20 min。石蜡浸蜡共 2 次,每次 12 min。石蜡包埋,切片厚度约 4 μm 。苏木素-伊红(HE)染色:①脱蜡,二甲苯脱蜡 2 次,每次 8 min;100%乙醇脱蜡 2 次,每次 8 min;90%乙醇、80%乙醇、60%乙醇各 8 min;②苏木素染色 4 min,流水清洗;③盐酸乙醇分化 2 ~ 3 s,流水清洗;④0.5%氨水 20 s,流水清洗,上镜观察;⑤0.5%伊红染色 1 min;⑥80%乙醇、90%乙醇各分化 3 ~ 5 s,95%乙醇分化 5 min,100%乙醇分化 3 次,每次 5 min,二甲苯分化 2 次,每次 5 min;⑦中性树脂胶封固后镜观。制成的肺组织病理切片在光学显微镜下进行观察,进行肺组织病理损伤评分。

(2)肺泡灌洗液中性粒细胞计数:肺泡灌洗液离心,将重悬后的肺泡灌洗液稀释,制成均匀的细胞悬液,取 10 μL 加至细胞计数板上,静止 3 min,待细胞完全沉淀后,在低倍镜下数四角中 10 个小方格的细胞数,记为 N 。有核细胞总数 = $(N/4) \times 10 \times 20 \times 10^6/L$,计算肺泡灌洗液中白细胞总数。将离心后的细胞沉淀用生理盐水重悬,沉淀混匀后,吸取 10 μL 细胞悬液涂片,待涂片风干后,至无水乙醇中固定 10 min 晾干,进行瑞氏-吉姆萨染色,于显微镜(油镜)下计数 100 个细胞,计算中性粒细胞所占百分比,再乘以白细胞总数计算肺泡灌洗液中性粒细胞量。

(3)炎症因子检测:采用 MSD 分别检测肺组织、血清及肺泡灌洗液中的 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-4 、 IL-5 、 IL-6 、 IL-10 、 IL-13 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 KC/GRO 。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件对实验数据进行独立样本 T 检验(T -检验),统计数据以平均值 \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 雾化 LPS 浓度及粒径测定结果

检测结果显示,雾化 LPS 气溶胶平均浓度为 4.08 g/m^3 ,即代表单位体积中所含雾化 LPS 气溶胶的质量为 4.08 g,根据公式,计算得出大鼠吸入 LPS 的剂量为 47.10 mg/kg 。

粒径测定结果显示,LPS 雾化气溶胶粒径: $D_v(10) = 0.6974 \mu\text{m}$, $D_v(50) = 3.387 \mu\text{m}$, $D_v(90) = 8.836 \mu\text{m}$,透过率 = 39.4%,结果见图 1。 $D_v(10)$ 、 $D_v(50)$ 及 $D_v(90)$ 指的是累积粒度分布达到 10%、50% 及 90% 时对应的粒度,可以反映雾化粒径的均匀程度。 $D_v(50)$ 为中位粒径,雾化 LPS 气溶胶中位粒径可达 3 μm ,表明该条件下的 LPS 气溶胶可以较稳定地沉积到大鼠肺部。

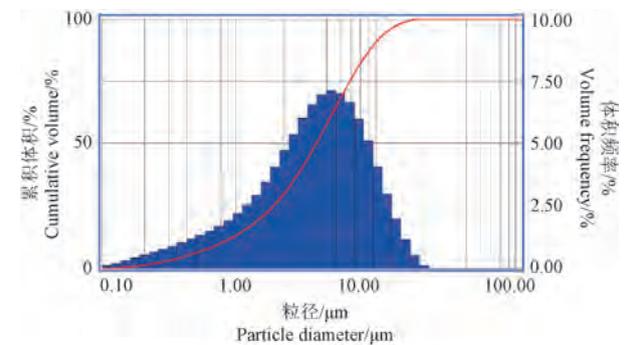


图 1 雾化 LPS 气溶胶粒径分布图

Figure 1 Particle size distribution of LPS aerosols

雾化 LPS 气溶胶粒径持续监测图见图 2。从图中可以看出,随着雾化时间的增加,雾化粒径逐渐平稳,最终保持稳定。

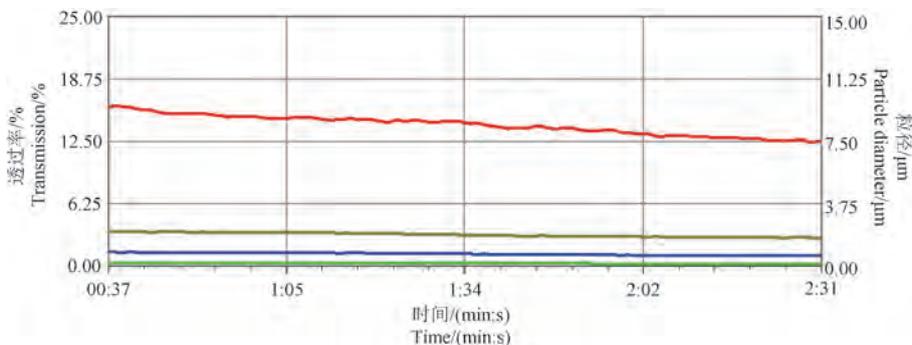


图 2 雾化 LPS 气溶胶粒径持续监测图

Figure 2 Continuous monitoring map of aerosol size during LPS atomization

2.2 肺组织病理学结果比较

光镜病理观察:镜下显示空白对照组各结构正常,连续、清晰,支气管上皮完整,粘膜光滑,各层结构清晰,偶见散在炎性细胞,无渗出。模型组肺可见局灶或弥漫性肺泡上皮变性坏死伴脱落,炎细胞浸润(中性粒细胞和单核细胞为主)等改变,整体上呈现出明显的肺损伤。阳性对照组未见上皮细胞坏死脱落,有轻度炎性细胞浸润。

肺组织病理半定量评分比较:模型组、阳性对照组上皮细胞坏死脱落发生率分别为:8/10、0/10。从损伤程度来看,模型组 2 只动物为重度肺

泡上皮坏死脱落,阳性对照组未见肺泡上皮坏死脱落及炎性细胞浸润。模型组、阳性对照组中性粒细胞浸润在全部动物肺出现,但从程度上来看,模型组中性粒细胞浸润发生率为 10/10,均为中度以上,阳性对照组主要为轻度以下,模型组中度中性粒细胞浸润发生率为 8/10。可见,阳性对照组可不同程度减轻炎性细胞浸润的程度,其中,阳性对照组炎性细胞浸润为轻度改变,多数动物肺泡上皮坏死脱落轻度以下,治疗保护较好。模型组局灶性化脓性坏死发生率为 2/10,阳性对照组未见局灶性化脓性坏死。见表 1,图 3。

表 1 急性肺炎大鼠肺主要病变统计

Table 1 Statistics of main pathological changes in lungs of rats with acute pneumonia

脏器 Organs	病变 Pathology	程度 Grade	模型组 Model group	阳性对照组 Positive control group
肺 Lung	中性粒细胞浸润 Neutrophil infiltration	+	0	4
		++	0	6
		+++	8	0
		++++	2	0
		合并 Total	10/10	10/10
	上皮细胞坏死脱落 Epithelial cells necrotic shedding	+	0	0
		++	0	0
+++		6	0	
	++++	2	0	
	合并 Total	8/10	0/10	

注: + :轻微; ++ :轻度; +++ :中度; ++++ :重度。

Note. + . Slight. ++ . Mild. +++ . Moderate. ++++ . Severe.

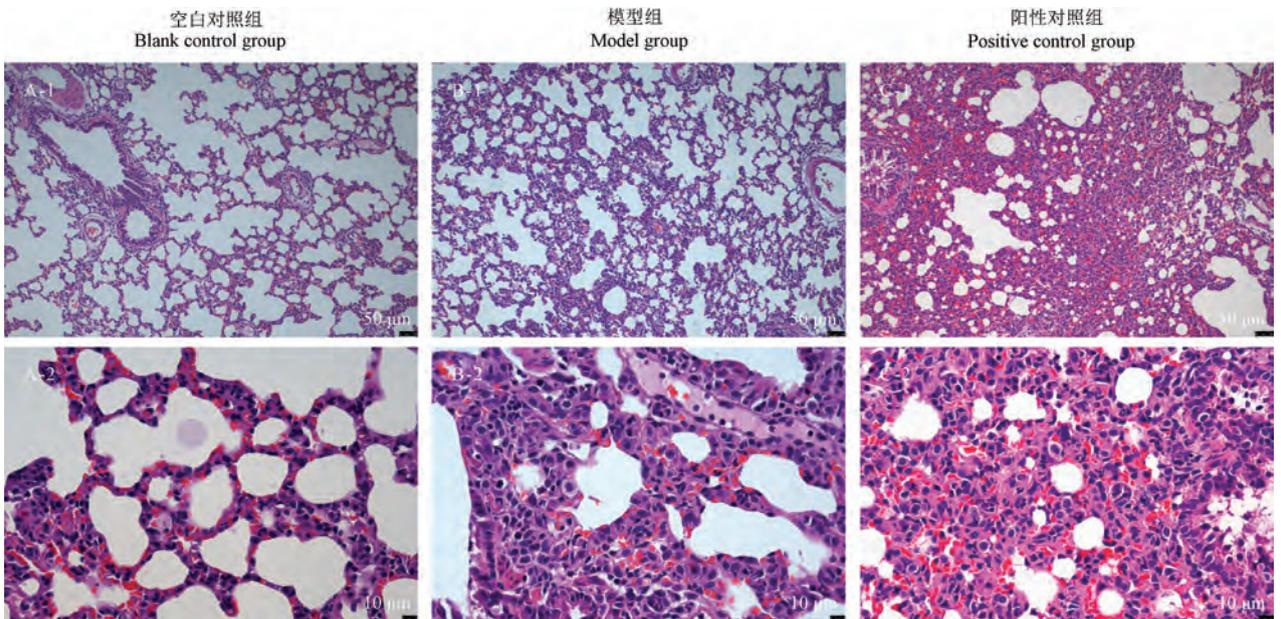


图 3 急性肺炎大鼠肺病理图片

Figure 3 Pathological picture of lung in rats with acute pneumonia

2.3 肺泡灌洗液中性粒细胞数

与空白对照组比较,模型组中性粒细胞显著升高($P < 0.01$)。从模型组的肺泡灌洗液涂片可以看出,模型组涂片出现了较多的中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。见表 2 和图 4。

2.4 炎症因子

2.4.1 肺组织炎症因子的变化

与空白对照组比较,模型组的 IL-1 β 、IL-6 和 KC/GRO 含量显著性升高($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组 TNF- α 含量虽有升高,但差异无显著性($P > 0.05$)。其他炎症因子变化较小,均无显著性变化。见表 3。

2.4.2 肺泡灌洗液炎症因子的变化

与空白对照组比较,模型组的 IL-1 β 、IL-6 和

TNF- α 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$), IL-13 与 IL-4 在肺泡灌洗液中未检出。模型组其他炎症因子均无显著性变化。对比表 3 发现,模型组肺泡灌洗液的炎症因子含量均比肺组织的低。见表 4。

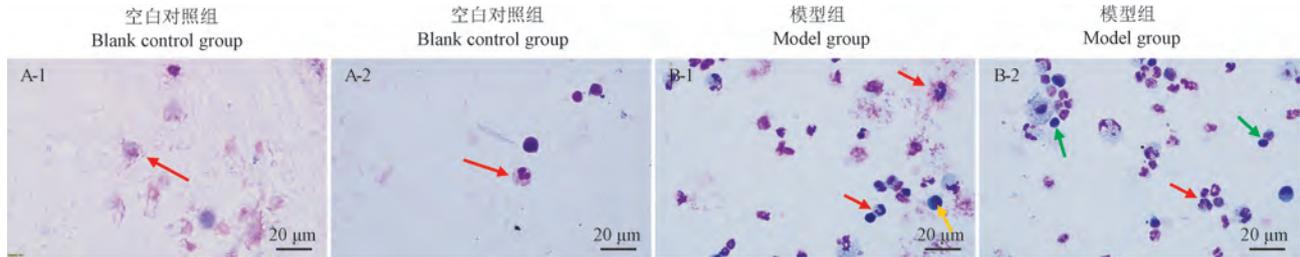
表 2 急性肺炎大鼠肺泡灌洗液中性粒细胞数($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Number of bronchoalveolar lavage fluid neutrophil in rats with acute pneumonia($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组 Groups	中性粒细胞数/($\times 10^9/L$) Number of neutrophil/($\times 10^9/L$)
空白对照组 Blank control group	0.19 \pm 0.06
模型组 Model group	1.24 \pm 0.43**

注:与空白对照组相比,** $P < 0.01$ 。(下表同)

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



注:红色箭头:中性粒细胞;黄色箭头:巨噬细胞;绿色箭头:淋巴细胞。

图 4 肺泡灌洗液涂片

Note. Red arrow. Neutrophil. Yellow arrow. Macrophages. Green arrow. Lymphocyte.

Figure 4 Bronchoalveolar lavage fluid smear

表 3 肺组织炎症因子统计结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Statistical results of inflammatory factors in lung tissue($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

炎症因子 Inflammatory factor	空白对照组/(pg/mL) Blank control group/(pg/mL)	模型组/(pg/mL) Model group/(pg/mL)
IFN- γ	12.33 \pm 2.47	11.88 \pm 3.23
IL-10	2.24 \pm 0.52	2.15 \pm 1.41
IL-13	1.62 \pm 0.45	1.33 \pm 1.06
IL-1 β	43.07 \pm 5.12	227.96 \pm 107.18**
IL-4	2.34 \pm 0.40	2.01 \pm 0.18
IL-5	14.97 \pm 2.58	13.92 \pm 4.82
IL-6	408.22 \pm 270.13	1391.75 \pm 1416.57*
KC/GRO	131.68 \pm 49.29	1113.29 \pm 711.09**
TNF- α	7.46 \pm 1.97	25.87 \pm 22.08

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$ 。(下表同)

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

2.4.3 血清炎症因子的变化

与空白对照组相比,模型组血清炎症因子均

未见显著性变化。说明该模型对血清炎症因子影响较小,全身炎症反应较轻。见表 5。

表 4 肺泡灌洗液炎症因子统计结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Statistical results of inflammatory factors in bronchoalveolar lavage fluid($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

炎症因子 Inflammatory factor	空白对照组/(pg/mL) Blank control group/(pg/mL)	模型组/(pg/mL) Model group/(pg/mL)
IFN- γ	0.59 \pm 0.27	0.67 \pm 0.58
IL-10	0.45 \pm 0.63	0.40 \pm 0.66
IL-13	-	-
IL-1 β	13.80 \pm 15.51	32.98 \pm 18.80*
IL-4	-	-
IL-5	5.04 \pm 2.95	5.57 \pm 1.49
IL-6	32.78 \pm 22.53	136.18 \pm 75.87***
KC/GRO	167.31 \pm 39.92	220.66 \pm 105.49
TNF- α	2.86 \pm 2.73	12.83 \pm 5.95***

注:与空白对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

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

表 5 血清炎症因子统计结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Statistical results of inflammatory factors in serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

炎症因子 Inflammatory factor	空白对照组/(pg/mL) Blank control group/(pg/mL)	模型组/(pg/mL) Model group/ (pg/mL)
IFN- γ	5.08 \pm 0.13	4.99 \pm 0.27
IL-10	6.00 \pm 0.57	5.48 \pm 0.43
IL-13	5.98 \pm 0.46	5.99 \pm 0.30
IL-1 β	0.58 \pm 0.23	1.10 \pm 1.42
IL-4	1.67 \pm 0.16	1.65 \pm 0.18
IL-5	18.68 \pm 2.71	21.23 \pm 1.48
IL-6	399.57 \pm 32.90	412.39 \pm 39.13
KC/GRO	89.30 \pm 27.40	80.70 \pm 14.99
TNF- α	2.34 \pm 0.40	2.01 \pm 0.18

3 讨论

ALI 不仅仅是一个独立的疾病,其导致的炎症是很多肺部疾病(如急性呼吸窘迫综合征、慢阻肺及肺纤维化等)的早期病变和启动的诱因。在呼吸道疾病的发生发展过程中炎症是其最为基本的病理变化,而 LPS 诱导的肺损伤模型是研究肺部炎症最为常用的动物模型之一。前期通过比较 LPS 不同的给药方式成功的构建了雾化吸入给药的模型^[8],雾化吸入法是通过自主呼吸给药,操作简单、成模率高、重复性好,接近肺炎发病的过程,在造模中具有一定的优势^[9]。在雾化吸入给药中,雾化粒径大小与其沉积的部位密切相关。一般而言,粒径 $< 5 \mu\text{m}$ 的颗粒能到达肺气管、各级支气管及肺部。当吸入气溶胶粒径在 $1 \sim 4 \mu\text{m}$ 时,随着粒径的增大,肺部的药物沉积量会减少^[10]。而粒径大小与药物浓度、理化性质有关。因此后续筛选确定 LPS 浓度为 4 mg/mL ,保证溶液有较好的溶解性且容易满足。实验中对雾化气溶胶浓度的监测结果显示雾化 1 min 内给药腔体的气溶胶浓度达到饱和并呈现稳定浓度。

LPS 诱导的 ALI 模型除了肺系数、肺功能等评价指标外,炎症因子检测也是非常重要的指标。目前对于炎症因子指标的评价标本包括肺组织、肺泡灌洗液和血清。雾化给药为肺部靶向给药,药物作用于气管和肺组织,同时肺作为呼吸器官,其炎症反应可能还会反应在全身,因此本实验系统观察比较了肺泡灌洗液、肺组织和血

清炎症因子的改变以确定该造模方式下的炎症因子指标及其敏感指标。

炎症因子是一类由免疫细胞分泌的可以调节免疫、调控细胞迁移及炎症反应的小分子蛋白质。机体受到外界刺激后,原始的 $\text{CD4}^+\text{T}$ 辅助细胞分化为 Th1 细胞和 Th2 细胞。Th1 免疫反应介导细胞毒性和局部炎症有关的免疫应答,促进炎症;Th2 免疫反应则是通过分泌 Th2 细胞因子刺激 B 细胞增生,产生抗体,抑制炎症反应^[11]。感染肺炎后,细胞因子构成的调节网络失控,促炎和抑炎因子平衡失调。IFN- γ 属于特征型的 Th1 型细胞因子,促进 Th 细胞分化成 Th1 细胞,抑制 Th 细胞向 Th2 细胞转化^[11]。IL-10 也是一种强免疫抑制因子,它可以抑制很多细胞因子的合成及分泌^[12-13]。IL-13 促进嗜酸性趋化因子的释放,诱导血管内皮细胞黏附分子的表达^[14-15]。IL-1 β 属于早期的促炎细胞因子,可以激活内皮细胞,促进完成多形核白细胞 (poly morphonuclear neutrophil, PMN) 黏附行为^[16-17]。IL-4 可以使 Th2 型细胞因子过度表达^[18] 导致气道慢性炎症。IL-5 可以特异性的选择并趋化嗜酸性粒细胞,引导其向呼吸道炎症部位聚集,增强对炎症部位的浸润作用;还可以选择性的作用于血管内皮及嗜酸性细胞,增加它们之间的粘附性,使其更容易脱颗粒,引起气道炎症及高反应性^[19]。IL-6 是急性期合成的重要介质^[20],可以诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的增殖分化,增强自然杀伤细胞 (NK 细胞) 活性,参与炎症反应^[21]。研究表明,IL-6 升高是最早出现的感染指标^[22]。KC/GRO 是一种强效的嗜中性趋化因子,为单核细胞和中性粒细胞的化学诱导物,可能在炎症中以自分泌方式对内皮细胞发挥作用^[23]。TNF- α 是由活化的单核巨噬细胞产生的^[24],可以促进局部炎症反应,改变血管内皮细胞通透性,趋化中性粒细胞,从而启动炎症反应^[25]。TNF- α 还可以诱发其他炎症因子(如 IL-5、IL-6 等)的释放,活化单核、巨噬细胞,强化抗原呈递能力^[25]。LPS 诱发的肺损伤,其形成机制主要涉及两个方面。首先,LPS 可以直接对内皮细胞产生作用,通过增加细胞因子、粘附分子和组织因子的表达,引发内皮细胞的损伤及凋亡。其次,LPS 还能激活宿主的获得性防御反应,这一过程中涉及细胞因子和体液因子的

广泛参与,最终引发大规模的炎症介质释放^[26-28]。其过程涉及大量血管外 PMN 的聚集与活化,进而释放出大量的炎症因子,所以本研究中选取了 IFN- γ 、IL-10、IL-13、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、KC/GRO、TNF- α 炎症因子进行检测。

本实验中模型的炎症具体观察指标包括组织病理显微观察、肺泡灌洗液白细胞计数以及肺组织、肺泡灌洗液和血清中的炎性因子。病理结果显示,模型组大鼠出现了较严重的上皮细胞脱落坏死以及肺中性粒细胞浸润,偶见局灶性化脓性坏死。同时,肺泡灌洗液中的中性粒细胞数量对肺炎的评价也非常重要^[29]。对肺泡灌洗液炎性细胞进行统计,与空白对照组比较,模型组的中性粒细胞总数显著升高($P < 0.01$)。上述结果提示模型成功。

炎性因子检测结果显示,模型组血清所测 9 种炎性因子均未出现显著性变化,而在肺组织中,IL-1 β 、IL-6 和 KC/GRO 都明显升高,肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 均明显升高。肺组织和肺泡灌洗液中产生变化的炎性因子主要是 IL-1 β 、IL-6、KC/GRO 以及 TNF- α ,推测主要是 Th1 细胞因子占主导作用,Th2 细胞因子分泌相对较少,导致机体朝着炎症方向发展。结合 LPS 的致炎机理进一步分析推断,LPS 吸入肺部后,与脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)、LPS 受体 14(cluster of differentiation 14, CD14)分子结合形成 LPS-LBP-CD14 复合物,再与 Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)结合,信号传至细胞内,激活转接分子髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88),使白细胞介素-1 受体(interleukin-1 β receptor, IL-1R)相关蛋白激酶磷酸化,传递信号至核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)这两条通路,最终诱导产生了 TNF- α 、IL-6 以及一些趋化因子等。同时 NF- κ B 还可以激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎性小体,进一步促进含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase-1, caspase-1)的激活,对 IL-1 β 进行加工,释放促炎细胞因子 IL-1 β ,激

活内皮细胞,促进完成 PMN 黏附行为^[30]。而趋化因子 KC/GRO 的升高,会诱导中性粒细胞等募集至肺部,加重肺炎的炎症程度。这也说明 LPS 吸入诱导的肺炎为局部靶向模型,其病变部位主要是在肺部局部,全身的炎症反应并不明显。从检测结果还可以看出,与空白对照组相比,早期促炎因子 IL-1 β 在肺组织中的变化比在肺泡灌洗液中的变化更显著(肺组织中 $P < 0.01$,肺泡灌洗液中 $P < 0.05$),即 IL-1 β 在肺组织中的变化更敏感;而 IL-6 和 TNF- α 则是在肺泡灌洗液中的变化比肺组织中的变化更显著(IL-6 在肺泡灌洗液中($P < 0.001$),在肺组织中($P < 0.05$));TNF- α 在肺泡灌洗液中($P < 0.001$),在肺组织中($P > 0.05$),说明 IL-6 和 TNF- α 在肺泡灌洗液中的变化更敏感。趋化因子 KC/GRO 在肺组织中有显著性变化($P < 0.01$),肺泡灌洗液中则无显著性变化($P > 0.05$),说明 KC/GRO 主要在肺组织中起作用。

LPS 诱导的 ALI 是一个非常复杂的过程,机制尚不完全清楚。本实验炎性因子检测结果发现,雾化吸入 LPS 诱导大鼠 ALI 模型中血清炎性因子无明显变化,说明该模型全身反应较轻;肺组织和肺泡灌洗液中炎性因子变化都比较明显,但是不同炎性因子在二者中的敏感性并不相同。具体可根据实验需要选择合适的样本对相关的炎性因子进行检测。

参 考 文 献 (References)

- [1] KAPOOR K, SINGLA E, SAHU B, et al. PARP inhibitor, olaparib ameliorates acute lung and kidney injury upon intratracheal administration of LPS in mice [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400(1/2): 153-162.
- [2] XU X P, HUANG L L, HU S L, et al. Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing angiotensin II type 2 receptor increases cell migration to injured lung in LPS-induced acute lung injury mice [J]. Stem Cells Transl Med, 2018, 7(10): 721-730.
- [3] KONG G, HUANG X, WANG L, et al. Astilbin alleviates LPS-induced ARDS by suppressing MAPK signaling pathway and protecting pulmonary endothelial glycocalyx [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 36: 51-58.
- [4] LV H, LIU Q, WEN Z, et al. Xanthohumol ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via induction of AMPK/GSK3 β -Nrf2 signal axis [J]. Redox Biol, 2017, 12: 311-324.

- [5] ZHANG Y, XU T, PAN Z, et al. Shikonin inhibits myeloid differentiation protein 2 to prevent LPS-induced acute lung injury [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(5): 840-854.
- [6] LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151.
- [7] CHEN X, TANG J, SHUAI W, et al. Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Inflamm Res, 2020, 69(9): 883-895.
- [8] 唐思璇, 肖芳. 脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 864-869.
- TANG S X, XIAO F. Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 864-869.
- [9] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 82-88.
- ZHANG Y P, ZHANG G P, SU P, et al. Selection of acute pneumonia rat models induced by lipopolysaccharide with different inhalation pathways [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(7): 82-88.
- [10] 张鹏飞, 余珊珊, 曹瑾, 等. 吸入药物非临床毒性评价特点与要求 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18(6): 570-574, 578.
- ZHANG H F, YU S S, CAO J, et al. Features and requirements of non-clinical toxic evaluation of inhalable drugs [J]. Chin J Pharmacovigil, 2021, 18(6): 570-574, 578.
- [11] 韩光, 张慧, 谢丛华, 等. Th1/Th2 免疫失衡与放射性肺损伤 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(11): 3241-3244.
- HAN G, ZHANG H, XIE C H, et al. Th1/Th2 immune imbalance and radiation-induced lung injury [J]. Chin J Clin (Electron Ed), 2011, 5(11): 3241-3244.
- [12] 潘黎明, 王跃, 张海英. IL-10 在小儿支原体肺炎发病机制中的作用 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(3): 376-378.
- PAN L M, WANG Y, ZHANG H Y. The effects of IL-10 on Mycoplasma pneumoniae in children [J]. Chin J Lab Diagn, 2009, 13(3): 376-378.
- [13] 王振华, 李丽红, 于侠. 肺炎支原体性肺炎患儿血清中 IL-6、IL-10 水平测定及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2005, 20(21): 2802-2803.
- WANG Z H, LI L H, YU X. Detection and significance of serum interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Matern Child Health Care Chin, 2005, 20(21): 2802-2803.
- [14] 邓连瑞, 金辉. 血清 IL-13、IL-18 及 TNF- α 在支原体肺炎儿童血清中的表达及临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(20): 2832-2834.
- DENG L R, JIN H. Expression in the serum and the instruction value of interleukin-13, interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Int J Lab Med, 2017, 38(20): 2832-2834.
- [15] 郇银芳, 张莉. IL-13 和 VEGF 在肺炎支原体肺炎伴喘息儿童血清中检测及意义 [J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(1): 92-94.
- LI Y F, ZHANG L. Expression and its significance of IL-13 and VEGF in serum of infants with Mycoplasma pneumoniae pneumonia complicated with wheezing [J]. J Clin Pulm Med, 2014, 19(1): 92-94.
- [16] 桂明珠, 王俊芳, 曾娜, 等. 白细胞介素-6、-8、-1 β 在不同肺炎患儿血清及支气管肺泡灌洗液中的变化及临床意义 [J]. 儿科药学杂志, 2020, 26(7): 1-4.
- GUI M Z, WANG J F, ZENG N, et al. Changes and clinical significance of interleukin in serum and bronchoalveolar lavage fluid of children with different pneumonia [J]. J Pediatr Pharm, 2020, 26(7): 1-4.
- [17] 丁军颖, 丁雪霏, 卢幼然, 等. 芪归银对铜绿假单胞菌致肺炎大鼠免疫调节作用初探 [J]. 河北中医药学报, 2019, 34(2): 1-5.
- DING J Y, DING X F, LU Y R, et al. Preliminary study on the immunomodulatory effect of qiguiyin on *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in rats [J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 2019, 34(2): 1-5.
- [18] 郭玲, 刘伟, 刘丰梅. 哮喘患者 IFN- γ /IL-4 的失衡及相应肺功能变化 [J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(4): 497-498.
- GUO L, LIU W, LIU F M. Investigation of the changes of IFN- γ /IL-4 levels and pulmonary function of asthmatic patients [J]. J Clin Pulm Med, 2005, 10(4): 497-498.
- [19] 夏云芳, 陈敬国, 林蕾, 等. 蒲地蓝消炎口服液对肺炎支原体肺炎喘息患儿血清 IL-5 的影响 [J]. 航空航天医学杂志, 2013, 24(7): 840-841.
- XIA Y F, CHEN J G, LIN Q, et al. Effect of pudilan Xiaoyan oral liquid on serum IL-5 in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia and wheezing [J]. J Aerosp Med, 2013, 24(7): 840-841.
- [20] 钱建刚, 马云宝, 张晓懿. 支气管肺炎患儿血清 6 种细胞因子测定 [J]. 放射免疫学杂志, 2005, 18(5): 333-335.
- QIAN J G, MA Y B, ZHANG X Y. Measurement of serum levels of six cytokines (IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , IGF- II) in pediatric patients with bronchopneumonia [J]. J Radioimmunology, 2005, 18(5): 333-335.

- [21] 李国保, 李沛. 动态监测重症肺炎患者血液和支气管肺泡灌洗液中 IL-6、IL-8、IL-10 的含量及其意义 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(16): 6-8.
LI G B, LI P. The dynamic monitor critically ill pneumonia patient blood and the bronchial tube pulmonary alveolus fill in the cleaning solution IL-6, IL-8, the IL-10 content and significance [J]. Chin Pract Med, 2009, 4(16): 6-8.
- [22] 曾赛丽, 游晓星, 刘良专, 等. 衣原体肺炎患者支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6 及 IL-10 的检测及临床意义 [J]. 当代医学, 2011, 17(34): 15-16.
ZENG S L, YOU X X, LIU L Z, et al. Detection and clinical significance of TNF- α , IL-6 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chlamydia pneumonia [J]. Contemp Med, 2011, 17(34): 15-16.
- [23] WUYTS A, GOVAERTS C, STRUYF S, et al. Isolation of the CXC chemokines ENA-78, GRO alpha and GRO gamma from tumor cells and leukocytes reveals NH₂-terminal heterogeneity. Functional comparison of different natural isoforms [J]. Eur J Biochem, 1999, 260(2): 421-429.
- [24] 刘斌, 何礼贤, 瞿介明. 大鼠卡氏肺孢菌肺炎肺泡灌洗液中炎性细胞及 TNF α 水平变化 [J]. 上海免疫学杂志, 2000, 20(2): 110-112.
LIU B, HE L X, QU J M. Significances of assesement for the inflammatory cells and the concentration of TNF α in bronchial aleveolar lavage fluids of rats with *Pneumocystis carinii* pneumonia and bacterial pneumonia [J]. Shanghai J Immunol, 2000, 20(2): 110-112.
- [25] 赵少岚, 张德雄, 邱木桐. 肺炎支原体肺炎血清 TNF- α 水平测定及临床意义 [J]. 现代医院, 2006, 6(7): 70-71.
ZHAO S L, ZHANG D X, QIU M T. Measurement of cellular cytokine (TNF- α) with Mycoplasma Pneumonia and its clinical meaning [J]. Mord Hospit, 2006, 6(7): 70-71.
- [26] BANNERMAN D D, GOLDBLUM S E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(6): L899-L914.
- [27] K L B, MEYRICK B. Endotoxin and lung injury [J]. Am Rev Respir Dis, 1986, 133(5): 913-927.
- [28] WELBOURN C R, YOUNG Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators [J]. Br J Surg, 1992, 79(10): 998-1003.
- [29] MATUTE-BELLO G, DOWNEY G, MOORE B B, et al. An official American thoracic society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 725-738.
- [30] CIESIENSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233-1261.

[收稿日期] 2024-01-17

邢燕子,赵菊梅,师长宏. PDO 异种移植模型在肿瘤精准化治疗研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33 (1): 99-107.

XING Y Z, ZHAO J M, SHI C H. Progress in application of patient-derived organoid xenograft model in cancer precision therapy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 99-107.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.010

PDO 异种移植模型在肿瘤精准化治疗研究中的应用进展

邢燕子^{1,2}, 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

(1. 延安大学基础医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 精准化治疗已成为现代医疗的重要手段,其目标是根据患者的特征进行个体化治疗。精准化治疗的成功发展依赖于临床前肿瘤模型的应用。病患来源的肿瘤类器官(patient-derived organoids, PDO)异种移植模型结合了体外 PDO 模型和体内人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型的特点,不仅能维持原始肿瘤的异质性,还具有体外大规模培养、高通量药物筛选和体内药物敏感性测试的优点,是一种创新性、精准化的临床前疾病模型。本文综述了 PDO 异种移植模型的基本特征,分析了其构建方法及影响因素,重点探讨了其在肿瘤精准化治疗中的应用,以期为患者个体化治疗提供可靠的临床前实验工具。

【关键词】 病患来源的肿瘤类器官;异种移植;精准治疗;肿瘤异质性;药物敏感性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0099-09

Progress in application of patient-derived organoid xenograft model in cancer precision therapy

XING Yanzi^{1,2}, ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China;

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

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

ZHAO Jumei. E-mail: jzm2003.stu@163.com

【Abstract】 Precision therapy has become an important approach in modern medicine, with the goal of providing individualized treatment according to the characteristics of individual patients. The successful development of precision medicine depends on the application of preclinical cancer models. Patient-derived organoid (PDO) xenograft models display characteristics of both PDO models and *in vivo* patient-derived tumor xenograft models. This type of model can not only maintain the heterogeneity of the original tumor, but also has additional advantages, such as large-scale cultivation, high-throughput drug screening *in vitro* and drug sensitivity testing *in vivo*. It is an innovative, precise preclinical disease model. In this review, we summarize the basic characteristics of the PDO xenograft model, analyze its construction method and influencing factors, further discuss its application in precision therapy, with the aim of providing a reliable preclinical experimental tool for individualized cancer treatment.

【基金项目】 国家自然科学基金(32070532,32270566)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(32070532,32270566).

【作者简介】 邢燕子,女,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤分子病理与药物。Email:18791686309@163.com

【通信作者】 师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email:changhong@fmmu.edu.cn;

赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物。Email:jzm2003.stu@163.com。

* 共同通信作者

【Keywords】 patient-derived tumor organoids; xenograft; precision medicine; tumor heterogeneity; drug susceptibility

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

肿瘤治疗通常使用手术、化学疗法、靶向治疗及免疫治疗等方式^[1-4]。但由于肿瘤的异质性导致患者对药物治疗反应不一,且随着肿瘤的演进可能产生耐药抵制作用或引发不良反应^[5-8]。这些临床反应的出现推动了肿瘤个体化、精准化治疗的研究。所谓肿瘤的精准化治疗就是根据个体患者的特定疾病亚型和对特定药物的反应来定制个体化治疗方案,预测患者对药物的敏感性,选择最可能有效的药物,以优化疗效和减少不良反应^[9]。

准确再现肿瘤生物学和异质性特征的临床前模型将有助于设计出针对个体患者有效的精准化治疗方案^[5,7]。目前常用的临床前模型有永生化的二维细胞系、人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型、病患来源的肿瘤类器官(patient-derived organoids, PDO)以及 PDO 异种移植模型等^[10-13]。永生化的二维细胞系可通过体外培养大量获取,但经过广泛传代,通常会被遗传修饰和克隆化选择,不能展现肿瘤异质性和原始肿瘤的药物反应^[10]。PDX 模型维持了原发性肿瘤的生物学特性,但其培养周期长、成本较高、移植成功率较低且不适用于高通量的药物筛选^[11]。PDO 模型能够准确反映原始肿瘤组织的生物学特征、维持患者肿瘤细胞的异质性,且具有体外大规模培养和高通量药物筛选的优势,但是依旧是体外模型,存在缺乏血管组织、无法模拟对药物的代谢吸收等不足^[12]。PDO 异种移植模型结合了体外 PDO 和体内 PDX 模型的优点,可保留原始肿瘤特征,具有高通量药物筛选以及在体内验证等优点,是癌症精准化治疗的重要临床前模型^[13-14]。

1 PDO 异种移植模型的基本特征

PDO 在研究中常被用作体外癌细胞系和异种移植之间的中间模型^[15]。进一步将 PDO 移植到免疫功能缺陷动物体内,获得 PDO 异种移植模型,可以较好地保留原始肿瘤的生物学特征,药物敏感性和肿瘤侵袭性^[16-18]。此外,该模型与

CRISPR/Cas9 技术和高通量药物筛选技术结合,可用于耐药机制研究、高通量药物筛选和不同药物疗效验证^[19-21]。这些特征使得 PDO 异种移植模型成为肿瘤精准化临床前模型,可能为肿瘤患者提供个体化治疗方案。与其他模型相比,PDO 异种移植模型具有明显的优势,包括比 PDX 模型生长快且成功率高,特别是对于 PDX 成功率较低的癌症类型,这种差异更显著^[16, 22-23]。此外,对 PDO 进行原位移植,可提高单位体积内肿瘤细胞的数量,再现肿瘤的侵袭和转移特征^[24]。使用穿刺或针吸活检提取的少量样本,利用 PDO 在体外大规模培养,再将其进行移植形成 PDO 异种移植模型可以解决临床肿瘤样本来源稀少的问题^[25-26]。与 PDO 模型相比,PDO 异种移植模型的转录组和表观基因组与患者肿瘤具有更好地相似性,例如,LEE 等^[27]发现膀胱癌类器官在培养时显示出不同的表型,而在进行异种移植后恢复了其亲本肿瘤的表型。此外,对于某些靶向药物治疗,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制剂,由于其主要是通过抑制血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的激酶活性来发挥抑制肿瘤血管生成的作用,PDO 模型缺乏血管组织,因此不适合在该类模型中进行测试,而 PDO 的异种移植模型则可用于评估这些药物的疗效,突出了其作为体内模型的重要价值^[28]。

2 PDO 异种移植模型的建立及影响因素

PDO 异种移植模型主要是通过将培养成功的 PDO 与一定比例的基质胶混合后注射到免疫缺陷小鼠体内获得,该模型的成功建立不仅需要稳定、良好的 PDO,更需要诸多因素的协同作用。

2.1 PDO 异种移植模型的建立

PDO 异种移植模型的建立首先需要在体外成功培养获得稳定的 PDO^[29]。包括对新鲜的患者肿瘤组织进行清洗、剪碎、消化、过滤等步骤分离出肿瘤干细胞,根据获得的肿瘤细胞数量选择

一定比例基质胶 (Matrigel 或胶原凝胶) 接种于孔板中,待其固化后给接种孔板加入特定培养基进行体外长期培养^[30-31]。在 PDO 培养成功后,将 PDO 与一定比例的基质胶混合并注射到免疫缺陷小鼠体内观察肿瘤生长情况^[27]。按照移植部位可分为原位移植和皮下移植^[13,32]。与原位植入相比,皮下植入具有植入方法简单、肿瘤大小监测准确等优点^[13]。原位植入在技术上更具挑战性,手术操作难度大,耗时长,但肿瘤植入部位更接近人类肿瘤的生长环境,有利于原发肿瘤的基因和生物学特性的表达^[32]。此外,原位移植可增加移植瘤转移的发生,是肿瘤转移模型的最佳选择^[4]。

2.2 影响 PDO 异种移植模型成功的因素

PDO 异种移植模型的建立涉及多个步骤和外界因素,其关键是 PDO 的成功培养和移植方法的选择^[13,29,32]。PDO 的成功培养是异种模型建立的第一要素^[29]。在使用患者来源的肿瘤样本构建肿瘤类器官时,为避免样本中混杂的残余正常组织对肿瘤类器官的影响,需要获取高质量的肿瘤组织进行培养^[33]。此外,供类器官黏附并支持其生长的细胞外基质 (extra-cellular matrix, ECM) 含有的非人源成分可能会影响类器官对人体器官的模拟效果,但是目前还无法做到完全依靠人源成分制备 ECM^[34-35]。除了容易受到杂质细胞和基质中非人源成分的影响外,肿瘤类器官培养基中添加的生长因子也存在差别^[36]。根据不同的癌症类型,会在生长介质中添加额外的特定因子,例如,神经调节蛋白 1 被证明可以有效地生成乳腺癌类器官,并维持长期的扩增^[2];较高浓度的双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 对于维持特定类型前列腺癌类器官的活性具有重要意义^[37]; Rho 相关蛋白激酶 (Rho-associated protein kinase, ROCK) 抑制剂、胰岛素、转铁蛋白和硒能够长期维持和稳定胆管癌类器官培养^[38]。因此,选择不同癌症类型所需的生长因子是提高 PDO 成功率的重要因素之一。

在体外成功培养肿瘤类器官后进行异种移植,移植方法的选择对 PDO 异种移植模型的成功建立具有重要意义^[13]。在移植时选择适宜的类器官数量有助于提高移植效率,较高的数量可能加快肿瘤的生长,并且细胞间的直接接触和信号

传递可以增强肿瘤细胞间的相互作用,从而促进肿瘤的形成^[32]。通过结合 Matrigel 的用量调整细胞数量及密度,以实现最佳的肿瘤生长效果^[39]。在类器官异种移植模型中,Matrigel 被用来包裹类器官,利于其在注射部位的定植,提高肿瘤形成的效率,此外,Matrigel 中的某些成分可能促进移植部位的血管化,影响宿主的移植排斥反应^[40]。另外,类器官传代次数可能会对其移植成功率产生影响,多次传代可能导致细胞特性发生变化,如干细胞特性的丢失或分化状态的改变,从而影响移植后的稳定性和成功率,且随着传代次数的增加,类器官可能对培养条件的适应性发生变化,需要调整培养方案以维持其活力和稳定性^[16]。通常,在进行异种移植时,选择较低传代次数且稳定的类器官可以更好的保持原始肿瘤异质性,提高移植成功率^[41]。对于移植部位的选择,最常使用皮下注射,方法简单且便于操作;而观察肿瘤的侵袭和转移特征,可选择原位移植,这强调了从 PDO 衍生出 PDO 的异种移植模型时选择肿瘤注射部位的重要性^[4]。

综上所述,在建立 PDO 异种移植模型时需要综合考虑样本质量、细胞外基质和生长因子的影响,同时,移植方法和部位、类器官的传代次数等因素也需要关注,综合考量上述因素以便获得更高的成功率和更好的模拟效果。

3 PDO 异种移植模型在肿瘤精准化治疗中的应用

肿瘤的精准化治疗强调患者的特异性,旨在根据个体内在的生物学信息,为患者确定最佳治疗方案^[7]。PDO 异种移植模型的诸多优势使其成为癌症精准化治疗重要的临床前模型^[13-14]。目前 PDO 异种移植模型主要用于药物敏感性测试、药物作用机制研究和高通量药物筛选以及病理机制研究。

3.1 用于肿瘤精准治疗指导下的药物敏感性测试

PDO 异种移植模型可对化疗药物、分子靶向药物进行药物敏感性测试,并且显示出与相应肿瘤患者相似的药物反应,在减轻毒副作用、提升治疗效果方面体现出独特的优势,可以有效指导

患者个体化用药。

3.1.1 评估化疗药物敏感性

化疗药物通常属于细胞毒类药物,可以损害肿瘤细胞的 DNA,阻止其复制和分裂,其作用通常是广泛的,不仅针对特定的肿瘤细胞,也会影响正常细胞,从而产生一定的副作用^[42]。因此,基于 PDO 的异种移植模型开展体内化疗药敏检测,判断药物对其他器官或系统的潜在毒副作用,可以最大限度地提升治疗效果、减轻毒副作用,为患者选择最佳治疗药物。

PDO 异种移植模型对临床相关化疗反应与患者的临床反应具有很好的相关性,可用于判断化疗方案的可行性。GANESH 等^[4]从手术活检的直肠癌患者样本中建立了类器官模型,将其原位移植模拟肿瘤的发生、侵袭和转移,评估对于 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、亚叶酸和奥沙利铂化疗方案的反应,结果显示,将侵袭性较弱的直肠癌类器官移植小鼠,形成的肿瘤对化疗敏感,肿瘤体积显著减少,实验结果与个体患者的临床病程一致,可用于反映患者对化疗的敏感性。此外,在直肠癌治疗中使用新辅助放疗(neoadjuvant chemoradiotherapy, CRT),可用于缩小肿瘤体积,使其更容易被手术切除,并减少局部复发率,主要包括短程放疗(short course radiotherapy, SCRT)和长程放化疗(long course chemoradiotherapy, LCRT)^[43-44]。短程放疗通常给予小辐射剂量;而长程放化疗通常给予大辐射剂量,并伴随氟嘧啶类药物的化疗^[45]。FELCHLE 等^[46]利用基因工程小鼠模型在体外培养出直肠癌类器官,并将其原位移植到小鼠的远端结肠和直肠粘膜下,在肿瘤成功植入后对小鼠进行放射治疗,监测不同治疗组小鼠的生存率、体质量变化以及与疾病进展相关的临床症状(如腹泻腹胀、直肠肿胀等),结果显示,该模型能够更好地模拟人类直肠癌治疗反应,综合使用放疗和化疗可以提高治疗效果,为患者提供了一种在治疗前评估其反应潜力的方法,有助于优化治疗方案并可能改善患者的治疗结果。

3.1.2 测试靶向药物敏感性

与化疗药物相比,靶向药物的作用更为精准,可以特异性地针对肿瘤细胞上的特定分子靶点,干预癌细胞的异常信号通路来发挥作用,减

少对正常细胞的影响,从而降低副作用^[47]。PDO 的异种移植模型能模拟原始肿瘤的异质性,为不同亚型的癌症患者提供更为精确的治疗选择。

类器官在体外培养中保留了原始肿瘤的致瘤潜力,并且在移植后可以形成具有与亲本肿瘤相似特征^[32]。KUSAKABE 等^[48]使用宫颈小细胞癌类器官建立异种移植模型,并对该模型评估,发现神经内分泌标志物的表达恢复,表明其小细胞癌的特征,维持了原始肿瘤的异质性,对靶向药物曲美替尼的治疗疗效进行体内测试,发现与对照组相比,治疗组小鼠肿瘤生长被显著抑制,为人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)阳性的宫颈小细胞癌患者提供了潜在的个性化治疗选项。针对一些靶向药物,需要考虑它们的具体作用位点和作用机制,如抗血管生成靶向药物,由于体外培养的肿瘤类器官缺乏血管结构,因此不能单独使用肿瘤类器官来评估抗血管生成药物的药物敏感性^[28]。仑伐替尼的抗肿瘤疗效主要归功于其抗血管生成活性,原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)的 PDO 模型在体外对仑伐替尼产生耐药,但在所有测试的 PDO 异种移植模型中均有效,表明 PLC 的 PDO 异种移植模型可以有效验证抗血管生成靶向药物的疗效,可作为预测个体患者对特定靶向药物治疗的有效模型^[12]。此外,在结直肠癌研究中发现,转录因子 Kruppel 样因子 14(Kruppel-like factor 14, KLF14)和早期生长反应基因 2(early growth response 2, EGR2)在其 PDO 异种移植模型中活性增加,肝配蛋白受体 A4(heparin receptor A4, EPHA4)作为 KLF14 和 EGR2 的下游靶基因,其表达受到这两个转录因子的直接调控,而 EPHA4 等下游基因的差异表达可能会改变对靶向治疗药物 MEK 抑制剂的敏感性,该研究结果揭示了染色质重塑在肿瘤发展和药物反应中的潜在作用^[22]。上述实验提示 PDO 异种移植模型中的染色质重塑和基因表达变化为患者对特定治疗反应提供了线索,有助于预测患者对特定药物的治疗结果。

3.2 研究药物的作用机制

治疗诱导的耐药是肿瘤临床治疗面临的一个重要的挑战^[49]。只有明确药物的作用机制,了解耐药性产生的原因,才有可能制定相应的治疗

策略以克服这种耐药性。此外,明确药物的靶点及其在体内的作用路径,有针对性地研究和筛选新的候选药物,从而提高药物研发的成功率,形成更加精准的治疗方案,推动个体化治疗的发展。

3.2.1 克服耐药性

不论是靶向药物治疗、化疗或免疫治疗,药物作用一段时间后,由于肿瘤的异质性和进化导致癌症患者出现耐药且预后较差,因此需要探索药物的耐药抵抗机制^[49]。使用 PDO 的异种移植模型,可追踪肿瘤治疗前后的耐药演进,此外,还可以结合 CRISPR/Cas9 技术来研究特定基因对耐药机制的作用。

为研究瑞戈非尼对直肠癌患者可能的耐药机制,VLACHOGIANNIS 等^[50]利用瑞戈非尼治疗前后的直肠癌患者的肝转移肿瘤组织建立了 PDO 异种移植模型,通过 CD31 免疫组化染色评估瑞戈非尼治疗后肿瘤微血管密度的变化。结果发现与敏感患者相比,耐药患者的 PDO 的异种移植模型显示出更明显的替代性组织生长模式 (replacement histopathological growth patterns, rHGP),利用现有血管网络来支持其生长和转移^[51]。这些发现强调了替代 HGP 在耐药性中可能发挥的作用,提示血管选择可能是瑞戈非尼原发性耐药的机制,因此,并在开发针对耐药肿瘤的新型治疗策略时,需要考虑肿瘤的微环境和血管共用现象。PARP 抑制剂 (PARP inhibitors, PARPi) 在治疗同源重组缺陷 (homologous recombination deficiency, HRD) 的癌症中取得了成功,尤其是针对缺乏肿瘤抑制因子乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 或乳腺癌易感基因 2 (breast cancer susceptibility gene 2, BRCA2) 功能的肿瘤,但药物抗性限制了其长期疗效^[52]。DUARTE 等^[32]从基因工程小鼠模型 (engineered murine models, GEMMs) 中衍生出 BRCA1 和 BRCA2 缺陷的乳腺癌类器官,使用 CRISPR/Cas9 技术在类器官中敲除 Trp53bp1 基因,并对其进行原位移植以重现上皮形态并保留原发肿瘤的药物反应,观察基因编辑对肿瘤生长的影响和奥拉帕尼 (一种选择性 PARP1/2 抑制剂) 在体内的药物疗效,结果显示,与对照肿瘤相比,敲除 Trp53bp1 基因后的肿瘤对奥拉帕尼高度敏感,这为理解 BRCA1 和 BRCA2 缺陷肿瘤的生

物学特性和耐药性机制提供了重要信息,强调了 PDO 异种移植模型在研究治疗抵抗性中的重要性。

3.2.2 指导新药开发

目前,新药研发的成功率比较低,通常只有不到 10% 的药物能通过临床试验和审批流程,耗时久,成本高^[53]。在新药研发过程中, PDO 异种移植模型能够模拟患者的遗传和病理学特征,用于预测药物的疗效和潜在毒性,评估药物的疗效和安全性,可能为药物研发提供一种新的方法。

VLACHOGIANNIS 等^[50]利用结直肠癌和食管癌患者的 PDO 异种移植模型进行了基因型分析和药物筛选,并将筛选结果与患者的实际临床反应进行了比较。研究发现, PDO 异种移植模型的分子特征和药物反应与患者的临床结果高度一致,显示出该模型作为临床前试验模型的可靠性,证实了 PDO 异种移植模型在预测临床结果方面的潜力。此外,对于罕见基因突变疾病,由于患者群体小,药物开发成本高,且临床试验参与者难以招募,导致许多罕见病缺乏有效的治疗药物^[54]。通过 PDO 异种移植模型模拟患者的遗传和病理特征,能够在实际用药前预测药物的疗效和安全性,从而降低患者承受不良反应的风险和药物无效的可能性^[55]。

总之,通过对药物作用机制的深入研究,结合 PDO 异种移植模型,可以准确理解肿瘤的耐药机制,并为患者提供更有效的治疗策略。从而为新药的开发提供了强有力的支持,推动了肿瘤个性化医疗的发展。

3.3 开展高通量药物筛选

高通量药物筛选技术具有快速、灵敏、高特异性的特点,在患者来源的肿瘤类器官上进行高通量药物筛选,可预测患者对多种药物产生的反应,为个体患者找到合适的药物治疗方案^[39]。然而,在体外 PDO 模型中测试产生的数据通常是初步的,需要进一步的验证和优化。PDO 异种移植模型可以结合 PDO 体外高通量筛选和体内验证的特点,进一步评估体外筛选鉴定出的药物在体内的抗肿瘤效果,分析其潜在的作用机制。

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是胰腺最常见的肿瘤,是最致命的癌症之一,手术切除是早期确诊 PDAC

的首选治疗方法,但大多数患者在诊断时已处于疾病晚期,不适合手术^[1]。此外,在接受手术的患者中,绝大多数患者仍会复发^[56]。PDAC 的药物治疗主要基于联合化疗方案吉西他滨、白蛋白结合型紫杉醇(FOLFIRINOX 或 Gem-Abraxane),但大多数患者会迅速出现耐药,对化疗方案的应答相对较差^[57]。在有关分子靶向药物对胰腺癌的治疗效果的临床实验研究中发现,只有 EGFR 抑制剂厄洛替尼在总生存期方面具有中等获益^[58]。因此,需要更有效的药物来治疗 PDAC。HIRT 等^[39]使用体外 PDO 模型对多种临床药物进行抗肿瘤活性筛选,鉴定出了 26 种药物对胰腺导管癌具有潜在抗肿瘤活性,其中包含强心苷(ouabain)和抗原虫药(emetine)。利用 PDO 异种移植模型反映体内缺氧环境对药物的影响,发现 emetine 和 ouabain 的作用机制是通过干扰胰腺导管癌细胞对缺氧的响应来抑制肿瘤细胞生长,显示出对胰腺导管癌肿瘤生长具有良好的抑制作用,这为胰腺导管癌的治疗提供了新的见解。对于研究治疗抵抗性胰腺癌,通过在患者来源的 PDO 中进行高通量筛选,发现 Aurora 激酶(Aurora kinases)、检查点激酶 1 (check point kinase, CHK)、雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)和 Polo 样激酶(Polo-like kinase, PLK)抑制剂具有降低 PDO 活性的潜能,而在对吉西他滨治疗有抵抗性的 PDO 中,CHK 抑制剂普瑞色替(prexasertib)可降低其活性,在 PDO 的皮下移植模型中,prexasertib 能有效抑制肿瘤生长,并且在治疗过程中没有观察到严重的体重减轻,这表明它在体内具有较好的抗肿瘤效果和耐受性,提示该模型在胰腺癌个性化治疗药物发现方面发挥了重要作用^[59]。

3.4 研究疾病的病理机制

由于 PDO 的异种移植模型可以较好地体现肿瘤的异质性^[13],准确反映肿瘤的生物学特性,因此,可用于探索肿瘤发展的分子机制。包括肿瘤发生、发展和治疗抵抗的分子途径,最终为研究肿瘤的病理发展提供了一个有力的工具。

胃肠胰神经内分泌肿瘤(gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms, GEP-NENs)是发生在胃肠道的罕见癌症,具有独特的组织病理学特征,包括管状结构的丧失和神

经内分泌标志物的弥漫性表达^[60]。KAWASAKI 等^[61]建立了 25 个 GEP-NEN 患者来源的 PDO 并进行全面的分子特征分析,全基因组测序揭示了 TP53 和 RB1 基因的频繁改变以及特征性的全染色体杂合性丢失,这些都是 GEP-NENs 的关键分子特征,有利于研究肿瘤发生机制。此外,FANG 等^[62]通过建立患者源性恶性腹膜间皮瘤(malignant peritoneal mesothelioma, MPM)的 PDO 异种移植模型,不仅能在体外模拟 MPM 的生物学特性,还能在体内模型中再现 MPM 的病理机制,包括肿瘤的形成、侵袭、转移和对药物的反应。综上,使用 PDO 异种移植模型可以观察模型中肿瘤的生长和转移,深入了解癌症的病理机制,提供更接近临床反应的数据,助力新药的开发和验证,并评估潜在的治疗方案。

4 总结与展望

PDO 异种移植模型不仅保持了原始肿瘤的生物学特征,药物敏感性和肿瘤侵袭性等基本特点,而且与其他临床前模型相比,具有周期短、成功率高、维持肿瘤异质性等优势,是理想的临床前模型,可用于精准化治疗中药物敏感性测试、药物作用机制的研究、高通量药物筛选以及病理机制研究。此外,将 PDO 异种移植模型与 CRISPR/Cas9 技术结合,不仅可以研究特定基因对疾病发展的影响,也将为患者提供基于个体基因组的定制化治疗方案,未来可针对特定基因突变进行靶向药物治疗研究,以提高治疗的针对性和效果,帮助开发癌症精准治疗新策略。

未来基于 PDO 异种移植模型的应用,还存在一些挑战,如建模过程中类器官的标准化问题。类器官的标准化,应涉及从类器官的制备方法,体外培养条件(包括肿瘤干细胞的提取和培养基中内源性或外源性因子的选择)、鉴定过程等一系列的参数条件。类器官的标准化对于 PDO 异种移植模型高度异质性的展现和成功建立至关重要,这将促进实现个性化治疗,加速治疗方案的临床转化。

综上所述,PDO 异种移植模型在肿瘤精准化治疗研究中发挥了重要作用,使用该模型能有效预估临床治疗的反应,为临床方案的制定提供可靠的参考依据,推动精准化治疗的发展。

参 考 文 献 (References)

- [1] PANCHAL K, SAHOO R K, GUPTA U, et al. Role of targeted immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment; an overview [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107508.
- [2] SACHS N, DE LIGT J, KOPPER O, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity [J]. *Cell*, 2018, 172(1/2): 373–386.
- [3] MAHADEVAN K K, MCANDREWS K M, LEBLEU V S, et al. KRASG12D inhibition reprograms the microenvironment of early and advanced pancreatic cancer to promote FAS-mediated killing by CD8⁺ T cells [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(9): 1606–1620.
- [4] GANESH K, WU C, O'ROURKE K P, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (10): 1607–1614.
- [5] DEL N J FLORES-TÉLLEZ T, BAENA E. Experimental challenges to modeling prostate cancer heterogeneity [J]. *Cancer Lett*, 2022, 524: 194–205.
- [6] LABRIE M, BRUGGE J S, MILLS G B, et al. Therapy resistance: opportunities created by adaptive responses to targeted therapies in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 (6): 323–339.
- [7] ZHU L, JIANG M, WANG H, et al. A narrative review of tumor heterogeneity and challenges to tumor drug therapy [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(16): 1351.
- [8] STEINBICHLER T B, DUDÁS J, SKVORTSOV S, et al. Therapy resistance mediated by cancer stem cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 53: 156–167.
- [9] WANG R C, WANG Z. Precision medicine: disease subtyping and tailored treatment [J]. *Cancers*, 2023, 15 (15): 3837.
- [10] TRASTULLA L, NOORBAKHS J, VAZQUEZ F, et al. Computational estimation of quality and clinical relevance of cancer cell lines [J]. *Mol Syst Biol*, 2022, 18 (7): e11017.
- [11] BEN-DAVID U, HA G, TSENG Y Y, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(11): 1567–1575.
- [12] XIAN L, ZHAO P, CHEN X, et al. Heterogeneity, inherent and acquired drug resistance in patient-derived organoid models of primary liver cancer [J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(5): 1019–1036.
- [13] KOPPER O, DE WITTE C J, LÔHMUSSEAR K, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (5): 838–849.
- [14] ABDOLAH S, GHAZVINIAN Z, MUHAMMADNEJAD S, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 206.
- [15] TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology [J]. *Science*, 2019, 364(6444): 952–955.
- [16] FUJII M, SHIMOKAWA M, DATE S, et al. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 827–838.
- [17] GAO D, VELA I, SBONER A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer [J]. *Cell*, 2014, 159(1): 176–187.
- [18] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 324–338.
- [19] ROPER J, TAMMELA T, CETINBAS N M, et al. *In vivo* genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 569–576.
- [20] O'ROURKE K P, LOIZOU E, LIVSHITS G, et al. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 577–582.
- [21] ZEHIR A, BENAYED R, SHAH R H, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10, 000 patients [J]. *Nat Med*, 2017, 23(6): 703–713.
- [22] XIANG K, WANG E, MANTYH J, et al. Chromatin remodeling in patient-derived colorectal cancer models [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(16): e2303379.
- [23] GUILLEN K P, FUJITA M, BUTTERFIELD A J, et al. A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology [J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(2): 232–250.
- [24] LAI Y, WEI X, LIN S, et al. Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 106.
- [25] ROIFE D, KANG Y A, WANG L, et al. Generation of patient-derived xenografts from fine needle aspirates or core needle biopsy [J]. *Surgery*, 2017, 161(5): 1246–1254.
- [26] 王洁, 赵菊梅, 魏晓阳, 等. 基于 PDX 模型的胃癌转移相关基因研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27 (5): 663–667.
- [27] WANG J, ZHAO J M, WEI X L, et al. Research of metastasis-related genes based on the patient-derived gastric cancer xenograft model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 663–667.
- [27] LEE S H, HU W, MATULAY J T, et al. Tumor evolution

- and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 515–528.
- [28] KISSEL M, BERNDT S, FIEBIG L, et al. Antitumor effects of regorafenib and sorafenib in preclinical models of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 107096–107108.
- [29] 李鹏, 黄敏丽, 谭邓旭, 等. 胰腺癌类器官模型的构建与应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(6): 40–46.
LI P, HUANG M L, TAN D X, et al. Construction and application of patient-derived pancreatic tumor organoid model [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(6): 40–46.
- [30] REN X, CHEN W, YANG Q, et al. Patient-derived cancer organoids for drug screening: basic technology and clinical application [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37(8): 1446–1454.
- [31] DEKKERS J F, VAN VLIET E J, SACHS N, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(4): 1936–1965.
- [32] DUARTE A A, GOGOLA E, SACHS N, et al. BRCA-deficient mouse mammary tumor organoids to study cancer-drug resistance [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(2): 134–140.
- [33] WU H, UCHIMURA K, DONNELLY E L, et al. Comparative analysis and refinement of human PSC-derived kidney organoid differentiation with single-cell transcriptomics [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 869–881.
- [34] CRUZ-ACUÑA R, KARIUKI S W, SUGIURA K, et al. Engineered hydrogel reveals contribution of matrix mechanics to esophageal adenocarcinoma and identifies matrix-activated therapeutic targets [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(23): e168146.
- [35] SPAGNOL G, SENSI F, DE TOMMASI O, et al. Patient derived organoids (PDOs), extracellular matrix (ECM), tumor microenvironment (TME) and drug screening: state of the art and clinical implications of ovarian cancer organoids in the era of precision medicine [J]. *Cancers*, 2023, 15(7): 2059.
- [36] YANG R, YU Y. Patient-derived organoids in translational oncology and drug screening [J]. *Cancer Lett*, 2023, 562: 216180.
- [37] SERVANT R, GARIONI M, VLAJNIC T, et al. Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens [J]. *J Pathol*, 2021, 254(5): 543–555.
- [38] MAIER C F, ZHU L, NANDURI L K, et al. Patient-derived organoids of cholangiocarcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8675.
- [39] HIRT C K, BOOIJ T H, GROB L, et al. Drug screening and genome editing in human pancreatic cancer organoids identifies drug-gene interactions and candidates for off-label treatment [J]. *Cell Genom*, 2022, 2(2): 100095.
- [40] RIOS A C, CLEVERS H. Imaging organoids: a bright future ahead [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(1): 24–26.
- [41] NAMEKAWA T, IKEDA K, HORIE-INOUE K, et al. Application of prostate cancer models for preclinical study: advantages and limitations of cell lines, patient-derived xenografts, and three-dimensional culture of patient-derived cells [J]. *Cells*, 2019, 8(1): 74.
- [42] KNEZEVIC C E, CLARKE W. Cancer chemotherapy: the case for therapeutic drug monitoring [J]. *Ther Drug Monit*, 2020, 42(1): 6–19.
- [43] BAHADOER R R, DIJKSTRA E A, VAN ETTEN B, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(1): 29–42.
- [44] CONROY T, BOSSET J F, ETIENNE P L, et al. Neoadjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX and preoperative chemoradiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer (UNICANCER-PRODIGE 23): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(5): 702–715.
- [45] GILLESPIE M A, STEELE C W, LANNAGAN T R M, et al. Pre-clinical modelling of rectal cancer to develop novel radiotherapy-based treatment strategies [J]. *Oncol Rev*, 2021, 15(1): 511.
- [46] FELCHLE H, BRUNNER V, GROLL T, et al. Novel tumor organoid-based mouse model to study image guided radiation therapy of rectal cancer after noninvasive and precise endoscopic implantation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2024, 118(4): 1094–1104.
- [47] KELLEY R K, BRIDGEWATER J, GORES G J, et al. Systemic therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 353–363.
- [48] KUSAKABE M, TAGUCHI A, TANIKAWA M, et al. Application of organoid culture from HPV18-positive small cell carcinoma of the uterine cervix for precision medicine [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(7): 8476–8489.
- [49] CATALANO A, IACOPETTA D, CERAMELLA J, et al. Multidrug resistance (MDR): a widespread phenomenon in pharmacological therapies [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 616.
- [50] VLACHOGIANNIS G, HEDAYAT S, VATSIOU A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of

- metastatic gastrointestinal cancers [J]. *Science*, 2018, 359(6378): 920–926.
- [51] BRIDGEMAN V L, VERMEULEN P B, FOO S, et al. Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models [J]. *J Pathol*, 2017, 241(3): 362–374.
- [52] RISDON E N, CHAU C H, PRICE D K, et al. PARP inhibitors and prostate cancer: to infinity and beyond BRCA [J]. *Oncologist*, 2021, 26(1): e115–e129.
- [53] SUN D, GAO W, HU H, et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(7): 3049–3062.
- [54] PEARSON C, SCHAPIRO L, PEARSON S D. The next generation of rare disease drug policy: ensuring both innovation and affordability [J]. *J Comp Eff Res*, 2022, 11(14): 999–1010.
- [55] BERKERS G, VAN MOURIK P, VONK A M, et al. Rectal organoids enable personalized treatment of cystic fibrosis [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(7): 1701–1708.
- [56] SPRINGFELD C, FERRONE C R, KATZ M H G, et al. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(5): 318–337.
- [57] VAZIRI-GOHAR A, HUE J J, ABBAS A, et al. Increased glucose availability sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3823.
- [58] MOORE M J, GOLDSTEIN D, HAMM J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(15): 1960–1966.
- [59] WATANABE S, YOGO A, OTSUBO T, et al. Establishment of patient-derived organoids and a characterization-based drug discovery platform for treatment of pancreatic cancer [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 489.
- [60] SEIDLITZ T, STANGE D E. Gastrointestinal cancer organoids-applications in basic and translational cancer research [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(10): 1459–1470.
- [61] KAWASAKI K, TOSHIMITSU K, MATANO M, et al. An organoid biobank of neuroendocrine neoplasms enables genotype-phenotype mapping [J]. *Cell*, 2020, 183(5): 1420–1435.
- [62] FANG X, SHU L, CHEN T, et al. Organoids derived from patients provide a new opportunity for research and individualized treatment of malignant peritoneal mesothelioma [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 12.

[收稿日期] 2024-07-01

安昊杰,高江梅,钟秀玲,等. 罗伊氏乳杆菌降胆固醇的作用与机制研究进展[J]. 中国实验动物学报,2025,33(1):108-116.

AN H J, GAO J M, ZHONG X L, et al. Progress in studies on the action and mechanism of *Lactobacillus reuteri* in lowering cholesterol [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 108-116.

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2025. 01. 011

罗伊氏乳杆菌降胆固醇的作用与机制研究进展

安昊杰^{1,2}, 高江梅¹, 钟秀玲¹, 颜青³, 龙程^{2*}, 饶军华^{1*}

(1. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室,
广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260;

2. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; 3. 株洲市中心医院, 湖南 株洲 412007)

【摘要】 由高胆固醇血症引起的动脉粥样硬化心血管疾病已成为影响人类生命健康的主要威胁之一。近年来, 具有降胆固醇作用的益生菌已成为研究热点。研究表明, 罗伊氏乳杆菌能够通过调节宿主肝与肠上皮细胞固醇调节元件结合蛋白2、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶、胆固醇7 α 羟化酶等的基因表达, 减少内源胆固醇合成、调节胆固醇转运和促进胆固醇分解, 从而降低宿主血清中总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的水平。本文对已报道的罗伊氏乳杆菌降胆固醇作用与机制的研究进行综述, 旨在为高胆固醇血症的治疗及降胆固醇益生菌的研发提供参考。

【关键词】 益生菌; 罗伊氏乳杆菌; 降胆固醇; 作用与机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025) 01-0108-09

Progress in studies on the action and mechanism of *Lactobacillus reuteri* in lowering cholesterol

AN Haojie^{1,2}, GAO Jiangmei¹, ZHONG Xiuling¹, YAN Qing³, LONG Cheng^{2*}, RAO Junhua^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou

510260, China; 2. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3. Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou 412007, China)

Corresponding author: RAO Junhua. E-mail: Raojh@giz.gd.cn; LONG Cheng. E-mail: Longcheng@m.scnu.edu.cn

【Abstract】 Cardiovascular diseases that develop from hypercholesterolemia-induced atherosclerosis have emerged as a significant threat to human health. Recently, probiotics exhibiting cholesterol-lowering properties have emerged as a prominent area of research. Numerous studies have demonstrated that *Lactobacillus reuteri* can effectively reduce endogenous cholesterol synthesis, regulate cholesterol transport, and promote cholesterol degradation by

【基金项目】 国家自然科学基金(82200966), 广东省科学院科技发展专项(2022GDASZH-2022010110)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82200966), GDAS Special Project of Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010110).

【作者简介】 安昊杰, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肠道菌群与高脂血症。Email: 2022022938@m.scnu.edu.cn

【通信作者】 饶军华, 男, 硕士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向: 人类疾病灵长类动物模型、肠道菌群作用与机制。

Email: Raojh@giz.gd.cn;

龙程, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经科学与电生理。Email: Longcheng@m.scnu.edu.cn。

* 共同通信作者

modulating the expression of key genes, such as sterol-regulatory element binding protein 2, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and cholesterol 7 alpha-hydroxylase, in both the liver and intestinal epithelial cells of the host. This leads to a notable decrease in total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels in the host serum. The present paper offers a comprehensive overview of the underlying mechanisms responsible for the cholesterol-lowering effects exerted by *L. reuteri*, aiming to provide valuable insights into the treatment of hypercholesterolemia and the development of probiotics with cholesterol-lowering properties.

【Keywords】 probiotics; *Lactobacillus reuteri*; cholesterol-lowering; action and mechanisms

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

高胆固醇血症是一类胆固醇代谢疾病,血清中过高的总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平是影响动脉粥样硬化心血管疾病最重要的风险因素^[1-3]。益生菌是指一类活的微生物,当摄入足够数量时对宿主起有益健康的作用^[4-5]。以乳杆菌属为主的多种益生菌均被证实具有降低 TC 和 LDL-C 的功效^[6-8]。近年来,具有降胆固醇作用的益生菌已成为研究热点之一,其降胆固醇机制主要包括:调节肠道中短链脂肪酸含量、促进胆盐水解酶表达、调节胆固醇转运、抑制胆固醇重吸收等^[8-10]。

罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*, *L. reuteri*)呈白色短棒状,是乳杆菌科(Lactobacillaceae)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)的一种革兰氏阳性菌,2003年被正式批准为保健益生菌^[11-13]。临床前研究表明,*L. reuteri* NCIMB 30242^[14]、*L. reuteri* MG5149^[15]、*L. reuteri* A9^[16]、*L. reuteri* HI120^[17]等多个菌株均具有降低高脂血症啮齿类动物血清中 TC 和 LDL-C 的作用,能够有效缓解肝脂质累积与病变^[18],并发挥保护肠粘膜屏障^[19-21]、调节宿主免疫^[22-24]、改善肠道菌群^[25-26]的作用。临床研究发现:相较于服用安慰剂,患者连续 9 周服用 *L. reuteri* NCIMB 30242,其血清 TC (9.14%, $P < 0.001$) 和 LDL-C (11.64%, $P < 0.001$) 水平明显降低,且无不良反应发生^[27]。

近年来研究发现,*L. reuteri* 可以通过调节啮齿类动物肝细胞中固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol-regulatory element binding proteins-2, SREBP-2) 和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, HMGCR) 的基因表达来减少内源胆固醇的合成^[14,17],通过调节肝细胞和肠上皮细胞中低密度

脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR)、ATP 结合盒转运体 G5/8 (ATP-binding cassette transporters G5/8, ABCG5/8)、ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporters A1, ABCA1)、类尼曼-匹克 C1 蛋白 1 (niemann-pick C1 like 1, NPC1L1) 等的基因表达调节胆固醇摄入与排出^[16,18],并经上调肝细胞中甾醇 27 羟化酶 (sterol 27-hydroxylase, CYP27A1) 等的基因表达水平促进胆固醇的分解^[28-29]。本文结合近年来的相关报道,首次对 *L. reuteri* 降胆固醇的作用 (表 1) 与机制进行综述,旨在为高胆固醇血症的治疗及降胆固醇益生菌的研发提供参考。

1 减少胆固醇的合成

固醇调节元件结合蛋白 (sterol-regulatory element binding proteins, SREBPs) 是肝细胞胆固醇合成、摄取,脂质代谢等生理活动的主要调控因子^[37-39]。SREBPs 具有三个亚型,其中 SREBP-2 蛋白参与 *LDLR*、*HMGCR* 等基因的转录调控,进而调节胆固醇稳态^[40-42]。*HMGCR* 是内源性胆固醇合成的重要限速酶,可将 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原成甲羟戊酸,*HMGCR* 基因表达增强将促进内源性胆固醇的合成^[42-43]。

研究发现,*L. reuteri* 可下调宿主肝细胞中 *SREBP-2* 和 *HMGCR* 基因转录和表达水平。*L. reuteri* NCIMB 30242^[14]、*L. reuteri* A9^[16]、*L. reuteri* HI120^[17] 和 *L. reuteri* DSM20016^[17] 等多个菌株可明显下调高脂血症 SD 大鼠和 C57BL/6 小鼠肝细胞中 *SREBP-2* ($P < 0.05$) 和 *HMGCR* ($P < 0.05$) 基因与肠上皮细胞中 *SREBP-2* ($P < 0.05$) 基因转录和表达水平。肝细胞中 *SREBP-2* 基因表达水平降低可能导致高尔基体膜上

表 1 不同 *L. reuteri* 菌株降胆固醇的作用与机制比较Table 1 Comparison of the action and mechanism of *L. reuteri* strains on cholesterol-lowering

菌株 Bacterial strain	来源 Source	实验动物 Laboratory animal	血脂水平 Blood lipid level				基因转录与表达 Gene transcription and expression	参考文献 Reference
			TC	TG	LDL-C	HDL-C		
<i>L. reuteri</i> NCIMB30242	猪粪便 Pig feces	SD 大鼠 (雄性) SD rats (male)	↓	↓	↓	↑	<i>SREBP-2</i> 和 <i>HMGR</i> 基因转录和表达水平降低, <i>CYP7A1</i> 、 <i>LDLR</i> 基因转录和表达水平升高(肝) Decreased transcription and expression levels of <i>SREBP-2</i> and <i>HMGR</i> genes, increased transcription and expression levels of <i>CYP7A1</i> and <i>LDLR</i> genes (liver)	[14]
<i>L. reuteri</i> SY523	小鼠粪便 Mouse feces	C57BL/6 (雄性) C57BL/6 (male)	↓	↓	↓	↑	未检测 Not done	[30]
<i>L. reuteri</i> Fn041	人类母乳 Human breast milk	C57BL/6N (雄性) C57BL/6N (male)	↓	-	↓	-	<i>CYP7A1</i> 、 <i>LXR</i> 基因转录水平升高(肝); <i>SLC10A2</i> 基因转录水平降低(回肠) Increased transcription levels of <i>CYP7A1</i> and <i>LXR</i> genes (liver); decreased transcription level of <i>SLC10A2</i> gene (ileum)	[19,28]
<i>L. reuteri</i> CGMCC 17942	成人粪便 Adult feces	C57BL/6J (雄性) C57BL/6J (male)	↓	↓	↓	-	<i>CYP7A1</i> 和 <i>CYP7B1</i> 基因转录水平显著降低, <i>CYP27A1</i> 基因转录水平显著升高(肝) Decreased transcription and expression levels of <i>CYP7A1</i> and <i>CYP7B1</i> genes, increased transcription and expression levels of <i>CYP27A1</i> gene (liver)	[29]
<i>L. reuteri</i> MJM60668	婴儿粪便 Infant feces	C57BL/6 (雄性) C57BL/6 (male)	↓	↓	未检测 Not done	-	<i>SREBP</i> 基因转录和表达水平降低(肝) Decreased transcription and expression levels of <i>SREBP</i> gene (liver)	[31]
<i>L. reuteri</i> CCFM8631	人类粪便 Human feces	C57BL/6J (雌性) C57BL/6J (female)	↓	-	↓	-	未检测 Not done	[32]
<i>L. reuteri</i> FYNLJ109L1	猪粪便 Pig feces	C57BL/6J (雄性) C57BL/6J (male)	-	-	↓	-	未检测 Not done	[33]
<i>L. reuteri</i> FGSZY33L6	儿童粪便 Children feces	C57BL/6 (雄性) C57BL/6 (male)	↓	-	↓	-	未检测 Not done	[34]
<i>L. reuteri</i> FGSYC2L3	成人粪便 Adult feces	C57BL/6 (雄性) C57BL/6 (male)	-	-	↓	-	未检测 Not done	[34]
<i>L. reuteri</i> 8513d	未知 Unknown	SD 大鼠 SD rats	↓	-	-	-	<i>ABCA1</i> 基因转录水平降低, <i>LDLR</i> 和 <i>ABCG5</i> 基因转录水平升高(肝) Decreased transcription and expression levels of <i>ABCA1</i> gene, increased transcription and expression levels of <i>LDLR</i> and <i>ABCG5</i> genes (liver)	[18]
<i>L. reuteri</i> HI120	儿童粪便 Children feces	C57BL/6 (雄性) C57BL/6 (male)	↓	-	未检测 Not done	未检测 Not done	<i>NPC1L1</i> 和 <i>SREBP-2</i> 基因转录和表达水平降低(小肠); <i>SREBP-2</i> 、 <i>HMGR</i> 基因转录和表达水平降低, <i>CYP7A1</i> 基因转录和表达水平不变(肝) Decreased transcription and expression levels of <i>NPC1L1</i> and <i>SREBP-2</i> genes (small intestine); decreased transcription and expression levels of <i>SREBP-2</i> and <i>HMGR</i> genes, unchanged in <i>CYP7A1</i> gene (liver)	[17]

续表 1

菌株 Bacterial strain	来源 Source	实验动物 Laboratory animal	血脂水平 Blood lipid level				基因转录与表达 Gene transcription and expression	参考 文献 Reference
			TC	TG	LDL-C	HDL-C		
<i>L. reuteri</i> DSM20016	人类粪便 Human feces	C57BL/6 (雄性)	↓	-	未检测	未检测	<i>NPC1L1</i> 和 <i>SREBP-2</i> 基因转录和表达水平降低(小肠); <i>SREBP-2</i> 、 <i>HMGCR</i> 基因转录和表达水平降低, <i>CYP7A1</i> 基因转录和表达水平不变(肝)	[17]
		C57BL/6 (male)			Not done	Not done		
<i>L. reuteri</i> A9	老人粪便 Elderly feces	Wistar 大鼠 (雄性)	↓	-	↓	-	<i>SREBP-2</i> 和 <i>LDLR</i> 转录水平升高, <i>LXR</i> 、 <i>CYP7A1</i> 转录 水平不变(肝)	[16]
		Wistar rats (male)						
<i>L. reuteri</i> GMNL-263	未知 Unknown	SD 大鼠 (雄性)	↓	↓	未检测	未检测	未检测 Not done	[35]
		SD rats (male)			Not done	Not done		
<i>L. reuteri</i> GMNL-263	未知 Unknown	金黄地鼠 (雄性)	↓	↓	↓	↑	未检测 Not done	[36]
		Golden Syrian hamsters (male)						

注: TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; ↑: 升高或增加; ↓: 降低或减少; -: 无差异。

Note. TG. Triglyceride. HDL-C. High-density lipoprotein cholesterol. ↑. Indicates increase or elevation. ↓. Indicates decrease or reduction. -. Indicates no difference.

SREBP-2 无法被裁切形成 n-*SREBP2* (图 1, 路径①), 进而引起 *HMGCR* 基因转录和表达水平降低 (图 1, 路径②), 肝内源性胆固醇合成受阻 (图 1, 路径③)。SUN 等^[17] 经体外实验证明, *L. reuteri* 可能将肠道中的亚油酸转变为共轭亚油酸, 从而发挥降低血清中 TC 水平的作用。

2 促进胆固醇的分解

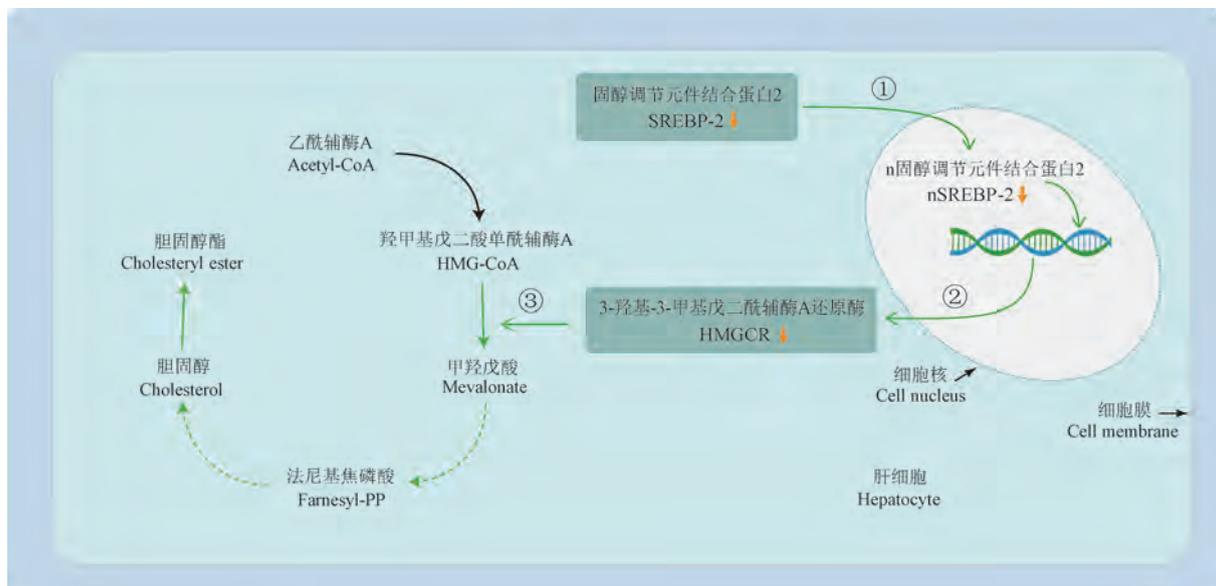
胆固醇在肝中被分解为胆汁酸是胆固醇代谢的主要途径, 根据胆固醇被羟基化的方式可以分为经典途径和替代途径^[44]。在经典途径中, 胆固醇被胆固醇 7 α 羟化酶 (cholesterol 7 α -hydroxylase, *CYP7A1*) 羟基化为 7 α -羟基胆固醇, 并最终形成胆酸和脱氧胆酸^[45-46]。研究发现, *L. reuteri* 可促进 *CYP7A1* 基因转录与表达, 促进胆固醇分解为胆汁酸, 并抑制胆汁酸的重吸收。研究发现, 经 *L. reuteri* NCIMB 30242^[14] 和 *L. reuteri* Fn041^[28] 干预, 高脂饮食诱导的啮齿类动物肝中 *CYP7A1* 基因转录和表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 表明 *L. reuteri* 可通过经典途径促进胆固

醇的降解 (图 2, 路径①)^[13]。此外, LU 等^[28] 发现, 经 *L. reuteri* Fn041 干预的高脂饮食诱导的 C57BL/6 N 小鼠粪便中总胆汁酸含量显著上升 ($P < 0.01$), 且回肠中与胆汁酸重吸收有关的溶质转运蛋白家族 10 成员 2 (solute carrier family 10 member 2, *SLC10A2*) 的基因转录水平降低 ($P < 0.05$)。

在替代途径中, 胆固醇经 *CYP27A1* 羟基化并由氧固醇 7 α 羟化酶 (oxysterol 7- α -hydroxylase, *CYP7B1*) 等催化后, 主要形成脱氧胆酸^[47-48]。此外, *L. reuteri* 可通过上调 *CYP27A1* 基因表达, 促进胆固醇经替代途径分解。YE 等^[29] 研究发现: *L. reuteri* CGMCC 17942 可显著降低高胆固醇 C57BL/6J 小鼠肝中 *CYP7A1* 基因转录水平 ($P < 0.05$), *CYP27A1* 基因转录水平显著升高 ($P < 0.05$), 表明 *L. reuteri* 可能通过促进胆固醇降解的替代途径生成胆汁酸 (图 2, 路径②)。

3 调节胆固醇的转运

肝和肠上皮细胞负责胆固醇跨膜运输的膜

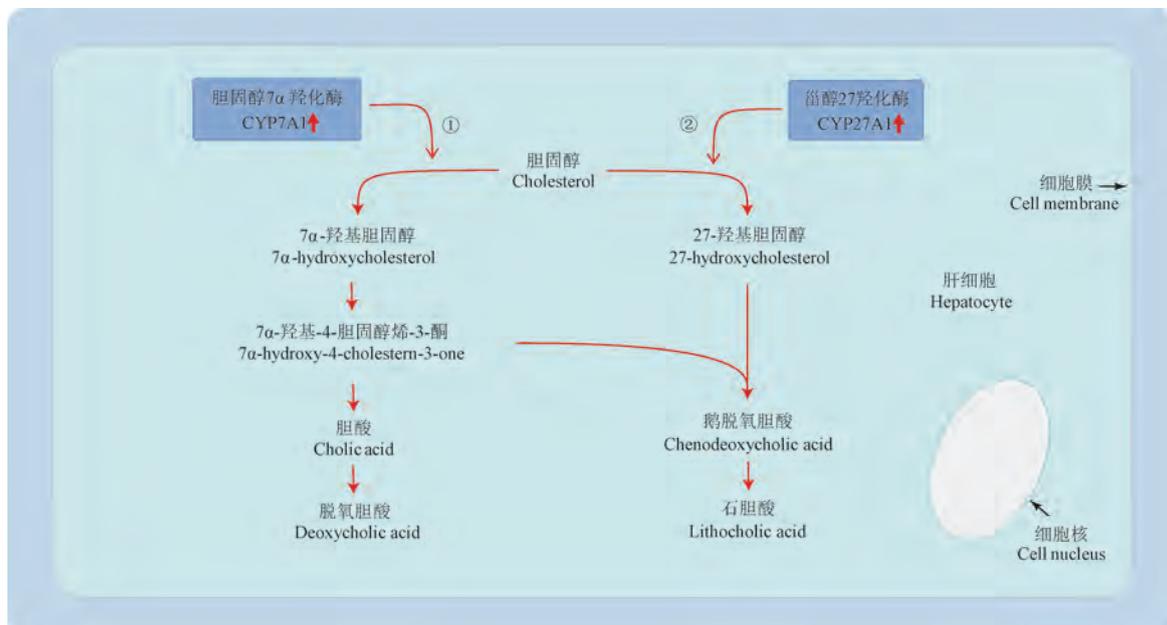


注:①:*SREBP-2* 基因表达量降低,进而导致细胞核内 nSREBP-2 水平降低;②:nSREBP-2 水平降低导致 *HMGCR* 基因表达下调;③:*HMGCR* 水平降低导致 HMG-CoA 合成甲羟戊酸受阻,影响内源性胆固醇合成。

图 1 *L. reuteri* 减少内源性胆固醇合成的作用机制

Note. ①. Expression of *SREBP-2* is downregulated, resulting in a reduction in the nuclear levels of nSREBP-2. ②. Reduction in nSREBP-2 levels results in the downregulation of *HMGCR* gene expression. ③. Reduction in *HMGCR* levels results in compromised synthesis of HMG-CoA, consequently impacting the biosynthesis of endogenous cholesterol.

Figure 1 Mechanism of *L. reuteri* on decreasing the synthesis of endogenous cholesterol



注:①:*CYP7A1* 基因表达量升高,促进胆固醇被催化为 7 α -羟基胆固醇(经典途径);②:*CYP27A1* 基因表达量升高,促进胆固醇被催化为 27 α -羟基胆固醇(替代途径)。

图 2 *L. reuteri* 促进胆固醇分解的作用机制

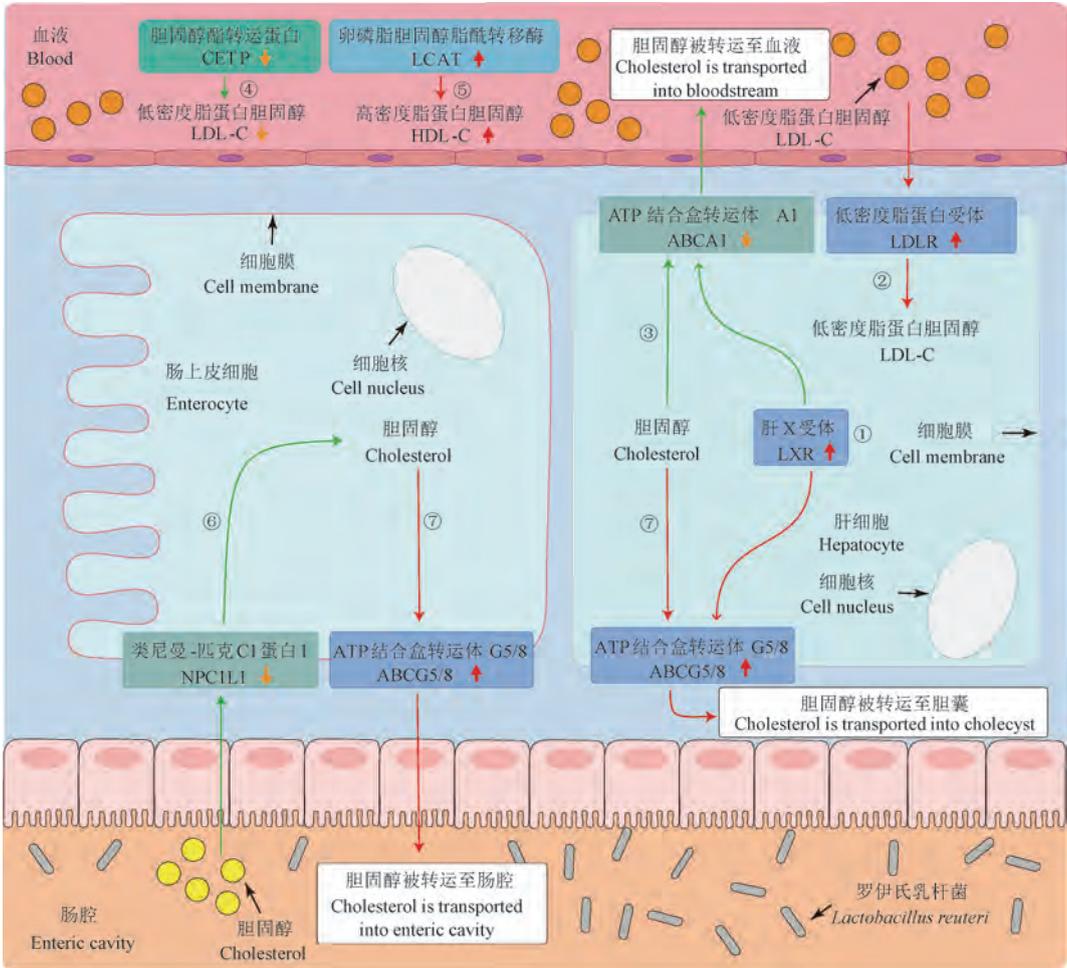
Note. ①. Expression of the *CYP7A1* gene is upregulated, thereby enhancing the catalytic conversion of cholesterol into 7 α -hydroxycholesterol (classical pathway). ②. Expression of the *CYP27A1* gene is elevated, thereby facilitating the catalytic conversion of cholesterol to 27 α -hydroxycholesterol (alternative pathway).

Figure 2 Mechanism of *L. reuteri* on promoting the degradation of cholesterol

蛋白主要有 ABC 超家族 (ABCA1、ABCG5 和 ABCG8 等)、LDLR、NPC1L1 等^[49-51]。其中 ABCA1 与 ATP 结合盒转运体 G1 (ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1) 可将胞内多余胆固醇向血液排放^[49-50], ABCG5 与 ABCG8 可将胆固醇排至胆囊和肠腔^[49,51], 而 LDLR 可从血液中吸收 LDL-C^[52], NPC1L1 可吸收小肠中的外源胆固醇^[53], 这些跨膜转运蛋白共同维持胆固醇在各

脏器之间的转运与平衡。此外,肝 X 受体(liver X receptor, LXR)作为 ABC 超家族重要的调控因子, 与配体结合后可调控 ABCA1、ABCG5、ABCG8 等基因的表达^[54]。

研究发现,经 *L. reuteri* 干预的高脂血症啮齿类动物体内胆固醇转运发生变化, 血清中 TC 和 LDL-C 的含量降低, 粪便和肠道中胆固醇的含量升高^[28]。其可能的机制是:(1)肝对血清中胆固醇



注:①:肝细胞的 *LXR* 基因表达量升高,调控 ABC 超家族的转录与表达;②:肝细胞的 *LDLR* 基因表达量升高,促进肝细胞回收 LDL-C;③:肝细胞 *ABCA1* 基因表达量降低,减少向血液中排出胆固醇;④:血液中 CETP 含量升高,减少 LDL-C 的合成;⑤:血液中 LCAT 含量升高,促进 HDL-C 的合成;⑥:肠上皮细胞 *NPC1L1* 表达量降低,减少从肠腔中摄入胆固醇;⑦:肝细胞和肠上皮细胞的 *ABCG5/8* 基因表达量升高,促进胆固醇排出至肠腔和胆囊。

图 3 *L. reuteri* 调节胆固醇转运的作用机制

Note. ①. Elevated *LXR* gene expression in hepatocytes regulates ABC superfamily transcription and expression. ②. Elevated *LDLR* gene expression in hepatocytes promotes the recycling of LDL-C by hepatocytes. ③. Decreased *ABCA1* gene expression in hepatocytes reduces cholesterol efflux into the bloodstream. ④. Elevated levels of CETP in the blood reduce LDL-C synthesis. ⑤. Elevated levels of LCAT in the blood promote HDL-C synthesis. ⑥. Decreased expression of the *NPC1L1* gene in enterocytes reduces the uptake of cholesterol from the enteric cavity. ⑦. Elevated expression of the *ABCG5/8* genes in the hepatocytes and enterocytes promotes the efflux of cholesterol to the enteric cavity and the cholecystic.

Figure 3 Mechanism of *L. reuteri* on regulating the transportation of cholesterol

醇的摄入量升高、排出量降低; (2) 肠道对胆固醇的摄入量降低、排出量升高。

L. reuteri 可降低血浆中与 LDL-C 合成相关蛋白的含量, 促进肝细胞从血清中摄取 LDL-C, 减少肝细胞向血清中排出胆固醇, 进而降低血清中 TC 和 LDL-C 水平。LU 等^[28] 研究发现, 经 *L. reuteri* Fn041 干预的高胆固醇血症 C57BL/6 N 小鼠肝细胞中 *LXR* 基因的转录和表达水平升高 ($P < 0.05$), 进而调控下游 ABC 超家族转录与表达 (图 3, 路径①)。据报道, 经 *L. reuteri* NCIMB 30242^[14]、*L. reuteri* A9^[16] 和 *L. reuteri* 8513d^[18] 干预后, 高胆固醇血症啮齿类动物肝细胞中 *LDLR* 基因转录与表达水平上调 ($P < 0.05$, 图 3, 路径②), *ABCA1* 基因转录与表达水平下调 ($P < 0.01$, 图 3, 路径③), 加快肝细胞从血液中吸收 LDL-C, 减少向血液中排出胆固醇^[50]。此外, LEE 等^[14] 研究发现, 当 *L. reuteri* NCIMB 30242 的浓度达到 10^{10} CFU/mL 时, 能显著降低高胆固醇血症 SD 大鼠血浆中胆固醇酯转运蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) 含量 ($P < 0.05$), 通过减少 LDL-C 合成, 降低 LDL-C 水平 (图 3, 路径④)^[14,55]; 显著升高卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) 含量 ($P < 0.05$), 提高血清中 HDL-C 水平 (图 3, 路径⑤)^[14,56]。

L. reuteri 还可通过减少从胆囊和肠腔中摄入胆固醇, 并促进肠上皮细胞向胆囊和肠腔中排出胆固醇。SUN 等^[17] 研究发现, *L. reuteri* HI120 和 *L. reuteri* DSM20016 可降低高胆固醇血症 C57BL/6 小鼠小肠上皮细胞中 *NPC1L1* 基因表达水平 (图 3, 路径⑥), 减少外源性胆固醇摄入。此外, LEW 等^[18] 研究发现, 采用 *L. reuteri* 8513 d 干预衰老高胆固醇血症 SD 大鼠后, 大鼠肝和小肠上皮细胞中 *ABCG5* 基因转录 ($P < 0.05$) 水平显著升高 (图 3, 路径⑦), 促进胆固醇排向肠腔和胆囊。

4 总结与展望

L. reuteri 可通过多种不同的途径降低血清中胆固醇水平, 研发成为益生菌的潜力巨大。目前, 部分 *L. reuteri* 降胆固醇的机制尚不明确; 不同来源的 *L. reuteri* 菌株降胆固醇效果差异较大^[57]; 缺乏在非人灵长类实验动物上的验证研究。针

对上述问题, 亟待围绕以下领域开展深入研究: (1) 利用无菌鼠、转基因鼠、非人灵长类动物等进行降胆固醇作用与机制研究; (2) 筛选降胆固醇效果更好的 *L. reuteri* 菌株, 并将其纳入降胆固醇益生菌的菌种库; (3) 通过宏基因组学、代谢组学、转录组学等多组学技术深度解析 *L. reuteri* 降胆固醇的作用与机制; (4) 通过合成生物学等技术获得具有降胆固醇功效的靶向代谢物质, 为临床治疗高胆固醇血症提供安全有效的策略。

参 考 文 献 (References)

- [1] 王增武, 郭远林. 中国血脂管理指南 (基层版 2024 年) [J]. 临床心血管病杂志, 2024, 40(4): 249-256.
WANG Z W, GUO Y L. Chinese guideline for lipid management (primary care version 2024) [J]. J Clin Cardiol, 2024, 40(4): 249-256.
- [2] SONG Y, LIU J, ZHAO K, et al. Cholesterol-induced toxicity: an integrated view of the role of cholesterol in multiple diseases [J]. Cell Metab, 2021, 33(10): 1911-1925.
- [3] WU F, JUONALA M, JACOBS D R Jr, et al. Childhood non-HDL cholesterol and LDL cholesterol and adult atherosclerotic cardiovascular events [J]. Circulation, 2024, 149(3): 217-226.
- [4] SNIGDHA S, HA K, TSAI P, et al. Probiotics: potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan [J]. Pharmacol Ther, 2022, 231: 107978.
- [5] GU Q, YIN Y, YAN X, et al. Encapsulation of multiple probiotics, synbiotics, or nutrabiobiotics for improved health effects: a review [J]. Adv Colloid Interface Sci, 2022, 309: 102781.
- [6] MU J, GUO X, ZHOU Y, et al. The effects of probiotics/synbiotics on glucose and lipid metabolism in women with gestational diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Nutrients, 2023, 15(6): 1375.
- [7] DAI Y, QUAN J, XIONG L, et al. Probiotics improve renal function, glucose, lipids, inflammation and oxidative stress in diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Ren Fail, 2022, 44(1): 862-880.
- [8] JIA B, ZOU Y, HAN X, et al. Gut microbiome-mediated mechanisms for reducing cholesterol levels: implications for ameliorating cardiovascular disease [J]. Trends Microbiol, 2023, 31(1): 76-91.
- [9] WU H, CHIOU J. Potential benefits of probiotics and prebiotics for coronary heart disease and stroke [J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2878.
- [10] TANG C, KONG L, SHAN M, et al. Protective and

- ameliorating effects of probiotics against diet-induced obesity: a review [J]. *Food Res Int*, 2021, 147: 110490.
- [11] MU Q, TAVELLA V J, LUO X M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 757.
- [12] YU Z, CHEN J, LIU Y, et al. The role of potential probiotic strains *Lactobacillus reuteri* in various intestinal diseases; new roles for an old player [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1095555.
- [13] WANG L, REN B, WU S, et al. Current research progress, opportunities, and challenges of *Limosilactobacillus reuteri*-based probiotic dietary strategies [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 26: 1–21.
- [14] LEE M, PARK J, KIM O K, et al. *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 (LRC) inhibits cholesterol synthesis and stimulates cholesterol excretion in animal and cell models [J]. *J Med Food*, 2023, 26(8): 529–539.
- [15] CHOI S I, YOU S, KIM S, et al. *Weissella cibaria* MG5285 and *Lactobacillus reuteri* MG5149 attenuated fat accumulation in adipose and hepatic steatosis in high-fat diet-induced C57BL/6J obese mice [J]. *Food Nutr Res*, 2021, 27: 65.
- [16] JIANG J, FENG N, ZHANG C, et al. *Lactobacillus reuteri* A9 and *Lactobacillus mucosae* A13 isolated from Chinese superlongevity people modulate lipid metabolism in a hypercholesterolemia rat model [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2019, 366(24): fnz254.
- [17] SUN Y, TANG Y, HOU X, et al. Novel *Lactobacillus reuteri* HI120 affects lipid metabolism in C57BL/6 obese mice [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 560241.
- [18] LEW L C, HOR Y Y, JAAFAR M H, et al. *Lactobacillus* strains alleviated hyperlipidemia and liver steatosis in aging rats via activation of AMPK [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5872.
- [19] LI S, QI C, ZHU H, et al. *Lactobacillus reuteri* improves gut barrier function and affects diurnal variation of the gut microbiota in mice fed a high-fat diet [J]. *Food Funct*, 2019, 10(8): 4705–4715.
- [20] MAO B, XIANG Q, TANG X, et al. *Lactobacillus reuteri* CCFM1175 and *Lactobacillus paracasei* CCFM1176 could prevent capsaicin-induced ileal and colonic injuries [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2023, 15(4): 797–812.
- [21] WU H, XIE S, MIAO J, et al. *Lactobacillus reuteri* maintains intestinal epithelial regeneration and repairs damaged intestinal mucosa [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(4): 997–1014.
- [22] HUANG K, SHI W, YANG B, et al. The probiotic and immunomodulation effects of *Limosilactobacillus reuteri* RGW1 isolated from calf feces [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1086861.
- [23] LUO Z, CHEN A, XIE A, et al. *Limosilactobacillus reuteri* in immunomodulation; molecular mechanisms and potential applications [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1228754.
- [24] LIN Z, WU J, WANG J, et al. Dietary *Lactobacillus reuteri* prevent from inflammation mediated apoptosis of liver via improving intestinal microbiota and bile acid metabolism [J]. *Food Chem*, 2023, 404: 134643.
- [25] PENG Y, MA Y, LUO Z, et al. *Lactobacillus reuteri* in digestive system diseases; focus on clinical trials and mechanisms [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1254198.
- [26] MONTGOMERY T L, ECKSTROM K, LILE K H, et al. *Lactobacillus reuteri* tryptophan metabolism promotes host susceptibility to CNS autoimmunity [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 198.
- [27] JONES M L, MARTONI C J, PRAKASH S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2012, 66(11): 1234–1241.
- [28] LU M, SUN J, ZHAO Y, et al. Prevention of high-fat diet-induced hypercholesterolemia by *Lactobacillus reuteri* Fn041 through promoting cholesterol and bile salt excretion and intestinal mucosal barrier functions [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 851541.
- [29] YE X, HUANG D, DONG Z, et al. FXR signaling-mediated bile acid metabolism is critical for alleviation of cholesterol gallstones by *Lactobacillus* strains [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5): e0051822.
- [30] SHAN S, QIAO Q, YIN R, et al. Identification of a novel strain *Lactobacillus reuteri* and anti-obesity effect through metabolite indole-3-carboxaldehyde in diet-induced obese mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(7): 3239–3249.
- [31] WERLINGER P, NGUYEN H T, GU M, et al. *Lactobacillus reuteri* MJM60668 prevent progression of non-alcoholic fatty liver disease through anti-adipogenesis and anti-inflammatory pathway [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(11): 2203.
- [32] WANG Q, HE Y, LI X, et al. *Lactobacillus reuteri* CCFM8631 alleviates hypercholesterolaemia caused by the paigen atherogenic diet by regulating the gut microbiota [J]. *Nutrients*, 2022, 14(6): 1272.
- [33] YANG B, ZHENG F, STANTON C, et al. *Lactobacillus reuteri* FYN1J109L1 attenuating metabolic syndrome in mice via gut microbiota modulation and alleviating inflammation [J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2081.
- [34] ZHENG F, WANG Z, STANTON C, et al. *Lactobacillus rhamnosus* FJSYC4-1 and *Lactobacillus reuteri* FGSZY331L6 alleviate metabolic syndrome via gut microbiota regulation [J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 3919–3930.

- [35] HSIEH F C, LAN C C, HUANG T Y, et al. Heat-killed and live *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 exhibit similar effects on improving metabolic functions in high-fat diet-induced obese rats [J]. *Food Funct*, 2016, 7(5): 2374–2388.
- [36] HUANG W C, CHEN Y M, KAN N W, et al. Hypolipidemic effects and safety of *Lactobacillus reuteri* 263 in a *Hamster* model of hyperlipidemia [J]. *Nutrients*, 2015, 7(5): 3767–3782.
- [37] LI N, LI X, DING Y, et al. SREBP regulation of lipid metabolism in liver disease, and therapeutic strategies [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12): 3280.
- [38] CHANDRASEKARAN P, WEISKIRCHEN R. The role of SCAP/SREBP as central regulators of lipid metabolism in hepatic steatosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1109.
- [39] WANG X, CHEN Y, MENG H, et al. SREBPs as the potential target for solving the polypharmacy dilemma [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1272540.
- [40] LEBEAU P F, BYUN J H, PLATKO K, et al. Caffeine blocks SREBP2-induced hepatic PCSK9 expression to enhance LDLR-mediated cholesterol clearance [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 770.
- [41] MENG C, ZHOU L, HUANG L, et al. Chlorogenic acid regulates the expression of NPC1L1 and HMGCR through PXR and SREBP2 signaling pathways and their interactions with HSP90 to maintain cholesterol homeostasis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155271.
- [42] LUO J, YANG H, SONG B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 225–245.
- [43] FANG C, PAN J, QU N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 970292.
- [44] JIA W, XIE G, JIA W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(2): 111–128.
- [45] LIM M Y C, HO H K. Pharmacological modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) as a therapeutic strategy for hypercholesterolemia [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 220: 115985.
- [46] CAO K, ZHANG K, MA M, et al. *Lactobacillus* mediates the expression of *NPC1L1* *CYP7A1* and *ABCG5* genes to regulate cholesterol [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(12): 6882–6891.
- [47] RIZZOLO D, KONG B, TAYLOR R E, et al. Bile acid homeostasis in female mice deficient in *Cyp7a1* and *Cyp27a1* [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3847–3856.
- [48] BYRNES K, BLESSINGER S, BAILEY N T, et al. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1): 33–49.
- [49] ALAM A, LOCHER K P. Structure and mechanism of human ABC transporters [J]. *Annu Rev Biophys*, 2023, 52: 275–300.
- [50] MATSUO M. ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2022, 148(2): 197–203.
- [51] KING R J, SINGH P K, MEHLA K. The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer [J]. *Trends Immunol*, 2022, 43(1): 78–92.
- [52] YU Q, ZHENG H, ZHANG Y. Inducible degrader of LDLR: a potential novel therapeutic target and emerging treatment for hyperlipidemia [J]. *Vascul Pharmacol*, 2021, 140: 106878.
- [53] FONG V, PATEL S B. Recent advances in ABCG5 and ABCG8 variants [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2021, 32(2): 117–122.
- [54] ZHANG R, LIU W, ZENG J, et al. Recent advances in the screening methods of NPC1L1 inhibitors [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113732.
- [55] BALLANTYNE C M, DITMARSCH M, KASTELEIN J J, et al. Obicetrapib plus ezetimibe as an adjunct to high-intensity statin therapy: a randomized phase 2 trial [J]. *J Clin Lipidol*, 2023, 17(4): 491–503.
- [56] YANG K, WANG J, XIANG H, et al. LCAT-targeted therapies: progress, failures and future [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112677.
- [57] 郑富莉. 罗伊氏乳杆菌对高脂饮食诱导的代谢综合征小鼠的干预研究 [D]. 无锡: 江南大学; 2021.
- ZHENG F L. The intervention study of *Lactobacillus reuteri* on metabolic syndrome in mice induced by high-fat diet [D]. Wuxi: Jiangnan University; 2021.

[收稿日期] 2024-07-25

杨森,张勇,周志雄,等. 肌少症小鼠模型运动功能测评方法的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 117-126.

YANG S, ZHANG Y, ZHOU Z X, et al. Research progress of motor function evaluation methods in animal models of sarcopenia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 117-126.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.012

肌少症小鼠模型运动功能测评方法的研究进展

杨森^{1,2}, 张勇², 周志雄^{3*}, 曾平^{4*}

(1. 首都体育学院体育教育训练学院,北京 100191;2. 中国医学科学院基础医学研究所
北京协和医学院基础学院,北京 100005;3. 首都体育学院体育人工智能研究院,
北京 100191;4. 中国医学科学院北京协和医院保健医疗部,北京 100730)

【摘要】 肌少症是一种与年龄相关的肌肉退化性疾病。自然衰老小鼠是研究肌少症的常用动物模型。由于肌少症的核心病理特征是骨骼肌质量和肌肉力量的显著减少,运动行为实验是其主要的评估方式。目前,肌少症小鼠运动功能检测方法基于肌肉耐力、力量、平衡和协调能力为主要特征进行设计,常用方法包括跑台力竭、自愿转轮、抓力、倒置网格、转棒和平衡木等测试。通过整理国内外关于肌少症小鼠运动功能测评方法,对其检测原理、测试程序、优缺点、评价指标和适用疾病模型等进行系统总结,提出可操作的测评方案,有助于研究者根据研究目的选择适当的测评方法。同时也对运动功能测评技术的创新特征进行归纳,有助于运动功能测评技术的不断更新,对肌少症的深入研究具有指导意义。

【关键词】 肌少症;小鼠;运动功能测评

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0117-10

Research progress of motor function evaluation methods in animal models of sarcopenia

YANG Sen^{1,2}, ZHANG Yong², ZHOU Zhixiong^{3*}, ZENG Ping^{4*}

(1. Institute of Physical Education and Training, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China; 3. Institute of Artificial Intelligence in Sports, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China; 4. Health and Medical Department, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China)

Corresponding author: ZHOU Zhixiong. E-mail: zhouzhixiong@cupes.edu.cn; ZENG Ping. E-mail: magsie@126.com

【Abstract】 Sarcopenia is an age-related skeletal muscle degenerative disease. Physiologically aging mice are the most commonly used animal model for studying sarcopenia. As sarcopenia is characterized by decreased skeletal muscle mass and reduced muscle strength, exercise performance as a reflection of muscle function is widely used to

【基金项目】 中央高水平医院临床科研专项(2022-PUMCH-B-133),国家重点研发项目资助(2022YFA0806002)。

Funded by the Grants of the National High Level Hospital Clinical Research Funding (2022-PUMCH-B-133), the National Key R&D Program of China (2022YFA0806002).

【作者简介】 杨森,男,在读博士研究生,研究方向:肌少症与运动健康促进。Email:yangsen2023@cupes.edu.cn

【通信作者】 周志雄,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:运动与健康促进。Email:zhouzhixiong@cupes.edu.cn;

曾平,女,博士,副主任医师,研究方向:肌少症与健康老龄化。Email:magsie@126.com。

* 共同通信作者

evaluate sarcopenia. Methods of evaluating the motor function of sarcopenia mouse models are generally designed based on muscle endurance, muscle strength, coordination, and balance. The method include tests such as treadmill exhaustion, voluntary wheel use, grip strength, horse grid, bars and balance beam tests. By collating recent publications, we have systematically summarized the method used for evaluating motor function, including the tests' principles, procedures, evaluation indexes, advantages, and disadvantages. We then propose an operational program for evaluating the sarcopenia phenotype, which will be of help to researchers wishing to choose evaluation method appropriate to their specific research purposes. Further innovative technology for assessing motor function that could be instructive in the evaluation of skeletal muscle function and diagnosis of sarcopenia is summarized.

【Keywords】 sarcopenia; mice; motor function assessment

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

近年来,随着全球人口老龄化的加剧,肌少症已成为老龄化社会面临的重要公共健康问题。肌少症不仅严重影响老年群体的生活质量,还显著增加了跌倒、骨折、残疾甚至死亡的风险,加重了社会医疗系统的负担。而自然衰老小鼠由于在生理和遗传特性方面与人类衰老相似,被广泛应用于肌少症的相关研究,成为探讨骨骼肌萎缩机制的常用动物模型^[1]。在肌少症小鼠模型的研究中,运动能力的测评至关重要,它能够准确反应肌肉功能状态,为深入理解肌少症发病机制和评估干预效果提供关键的数据支持。然而,目前尚未有研究系统地对肌少症小鼠的运动测评方法进行全面的归纳总结。测评方法在标准化方面仍存在明显不足,不同实验之间的测试程序各异,导致结果缺乏可比性^[2]。此外,许多测评方式依赖于主观观察,增加了数据解读的不一致性和偏差性,限制了研究结果的可信性。同时,随着多学科交叉研究的需求增加,现有的测评方法亟需进一步创新与优化,才能更好服务于多样化的研究目标。因此,针对这些问题,通过整合肌少症小鼠模型的多种运动功能测试方法,对具体测试方法的程序、优缺点、评价指标与适用模型提出相关建议,并探讨测评技术的创新方向,推动肌少症的深入研究。

1 运动功能测评常用方法

1.1 跑台力竭实验(treadmill test)

跑台力竭实验是测试肌少症小鼠耐力的一种常用方法。通过让小鼠在跑台上逐渐增加速度和坡度,迫使小鼠达到力竭状态,通常以小鼠无法继续运动为标准,记录运动时间、距离和电击强度,来评估小鼠的耐力和疲劳水平。相关研

究发现,激活转录因子 4(activating transcription factor 4, ATF4) 的缺失或过度表达会导致骨骼肌的退化和萎缩^[3]。在 22 月龄的 ATF4 mKO 小鼠模型中,以 5 m/min 的速度,坡度为 0°,持续跑 5 min,适应 2 d。第 3 天以 0.2 mA 的电击,坡度为 10°,前 5 min 的速度为 5 m/min,之后每 2 min 增加 2 m/min,直到小鼠接触电击栅 10 s 后停止进行测试^[4]。超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1) 缺乏会导致细胞受到氧化损伤,加速骨骼肌萎缩与退化。在 SOD1KO 小鼠模型中,以 4~5°坡度适应 3 d,每天跑 10 min,速度为 7~10 m/min。正式实验时,以 7 m/min 的初始速度开始,每分钟增加 1 m/min,直到小鼠在带有约 3 Hz 频率脉冲的电击网上滞留 3 s 后无法继续,记录其跑步时间与跑步距离^[5]。在高脂饮食和后肢固定的肌少症模型中,适应 2 d 后,以 8 m/min 的速度跑 20 min,然后每隔一段时间将速度增加 0.2 m/min,直到后肢在电网上停留超过 10 s 被视为力竭^[6]。同样,在 7 周龄雄性 db/db 小鼠作为 2 型糖尿病(type 2 diabetes) 相关肌肉减少症的动物模型中,训练阶段以 5 m/min,坡度为 20°进行适应训练。正式测试时,以 8 m/min 的速度开始跑步,每 2 min 速度增加 2 m/min,直到小鼠连续 3 次电刺激未能重新攀爬被视为筋疲力尽,记录小鼠的跑步时间和距离来评估耐力^[7]。在 18 个月的自然衰老小鼠中,适应 10 min 后,正式测试速度为 15 m/min,总时间 30 min,当小鼠达到疲惫标准(总共 50 次网格接触、每分钟超过 20 次电击或超过 15 s 未能继续跑步)时,记录跑步时间和网格接触次数^[8]。

通过总结文献,不同类型的肌少症小鼠模型在训练适应天数、训练时间与速度、正式测试时

间与速度、跑步机坡度和电击设置及力竭标准上存在差异。总结如下:(1)因模型种类和适应能力不同,一般进行 2 ~ 3 d 的训练适应;(2)适应阶段每天训练 5 ~ 20 min,速度为 5 ~ 10 m/min;(3)正式测试持续至小鼠力竭,起始速度 5 ~ 8 m/min,速度增加幅度可自行调整;(4)坡度根据模型和实验目的进行设置(一般为 0°、4 ~ 5°、10°、20°),电击通常为 0.2 mA 或根据需要调整;(5)力竭常用标准包括接触电击栅 10 s、连续 3 次电刺激未能重新攀爬、在电击网上休息 3 s 或达到一定次数的电击。由于尚无统一标准,研究者可根据实验需要调整参数来建立跑台力竭运动模型评估运动能力。

1.2 抓力实验(grip strength test)

抓力仪测试是一种常用于评估小鼠肌肉力量的一种实验方法。实验中,小鼠用前肢或后肢抓住弹性金属条,施加最大抓力时记录读数。通过多次重复测量,可评估小鼠的肌肉力量。前肢抓力测试被认为是评估肌少症的首选无创测量方法,因为它能在动物自主活动状态下测量到最大收缩力^[9]。在正式测试前,小鼠先适应仪器,测试时拉动尾部直至前肢松开以记录最大力,重复若干次,记录最大值或平均值^[10]。通常进行 3 或 5 次的成绩测量,且每次测量完后休息 1 min^[11-12]。在地塞米松(dexamethasone)诱导的肌萎缩模型中,进行 5 次测试,每次测试间休息 5 min,从测试结果中去除最高和最低值,取剩余值进行平均^[13]。此外,有研究通过对小鼠后肢进行 3 次抓力测试记录其最大值^[14]。另一种方法则是重复测试 6 至 10 次取最大值作为最终结果^[15]。除了常规的前后肢力量测试外,四肢抓力测试也可以测定整体肌力^[16-17]。一项研究将小鼠置于握力计中央稳固四肢后均匀拉尾,3 次测试取最大值^[18]。

通过总结文献,肌少症小鼠模型在测试肢体选择、测试次数、间歇时间、评估标准方面存在差异。总结如下:(1)一般采取前肢握力测试,但针对特定肢体或全身影响的疾病或治疗效果研究,应选择相应的肢体或四肢进行测试;(2)一般进行 3 ~ 5 次抓力测量,但也有研究选择 5 ~ 10 次的测量;(3)每次测量之后进行 1 ~ 5 min 的休息;(4)抓力强弱一般选择多次测试数据的平均

值或者最大值作为评价标准。由于尚无统一标准,研究者可根据实验需要调整参数来建立抓力测试模型评估运动能力。

1.3 转棒实验(rotarod test)

转棒测试是评估肌少症小鼠平衡和协调性的一种重要方法。实验中,小鼠被放置在旋转的圆棒上,观察其在棒上行走或保持平衡的时间。通过记录小鼠能够维持平衡的时间和其掉落的次数,评估其运动能力和协调性。该方法广泛应用于神经疾病、运动障碍相关研究。在 28 周龄雄性快速衰老小鼠-8(senescence-accelerated mice prone 8)模型中,转棒测试每 2 周进行 1 次,参数设置为 300 s,从 4 r/min 升至 40 r/min,记录掉落时间^[19]。在另一项研究中,从 4 r/min 增加到 30 r/min,持续 5 min,记录总停留时间^[20]。在骨骼肌特异性 DJ-1 敲除小鼠模型中,转棒测试设定为 5 min 内从 0 r/min 加速至 20 r/min,记录并分析每只小鼠的最长停留时间^[21]。在链脲佐菌素(streptozotocin)诱导的糖尿病性肌少症模型中,经过 3 d 40 r/min 的适应训练后,正式测试记录 3 次跌落潜伏期并计算平均值^[22]。另一研究中,初始速度设定为 4 r/min,10 min 内逐渐增加至 40 r/min,记录小鼠 3 次测试中的最长跌落时间^[23]。同样,自然衰老的肌少症小鼠模型在测试前适应旋转后,正式测试以 5 r/min 开始,每 0.2 r/min 增加速率,3 次测试取最好两次平均值^[24];在 24 月龄模型中,以 5 r/min 开始,在 5 min 内增至 40 r/min,记录 3 次跌落时间取平均值^[25];在 28 月龄模型中,测试前进行 2 d 随机训练,测试以 4 r/min 开始,5 min 内增至 30 r/min,3 次测试取最佳成绩^[26]。

通过总结文献,不同类型肌少症小鼠模型的转棒测试方案在适应训练、初始速度、加速方式和评价指标等方面存有差异。总结如下:(1)在正式测试前进行为期 2 ~ 3 d 的适应训练;(2)初始速度范围在 0 ~ 5 r/min 之间;(3)通常采用测试过程中逐渐增加转速的方式,一般从 4 r/min 逐渐增加至 20 ~ 40 r/min,持续 5 min;(4)多次记录小鼠在转棒测试中的停留时间、跌落潜伏期以及总停留时间等,取平均值或最佳值作为评价成绩。由于尚无统一标准,研究者可根据实验需要调整参数来建立转棒运动模型评估平衡和协

调能力,确保测试方法适应不同肌少症小鼠模型的特定需求。

1.4 倒置网格实验 (inverted screen test)

倒置网格测试通过记录小鼠在倒置网格上的悬挂时间和表现来评估其四肢肌力。实验中,小鼠被置于倒置的网格上,需用四肢抓住网格并保持悬挂状态,直到因疲劳或无法继续抓握而失去平衡。通过记录保持抓握的时间,来评估其肌肉力量和耐力。一项研究通过对 27 ~ 28 个月大的 C57BL/6 小鼠进行两次间隔 20 min 的倒置网格实验,以平均得分评估其虚弱程度^[27];另一研究对 22 个月大的 C57BL6/J 雄性小鼠进行 3 次间隔 15 min 的测试,网格距衬垫表面 40 ~ 50 cm,记录脱落潜伏期,取平均值作为最终得分^[28]。在核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) 基因敲除小鼠模型中,小鼠被放置在离地 80 cm 的倒置网格上,通过记录脱落时间评估肌力^[17]。在通过高脂饮食和链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病肌少症研究中,测试时放置在 55 cm 高的网格中心,每次测试间隔超过 30 min,记录 3 次脱落时间并取平均值^[7]。研究蜂王浆预防老年小鼠肌少症的实验中,将 24 个月的小鼠置于倒置的金属网格上,记录 3 次悬挂时间并计算平均值^[29]。为评估敲除 Tribbles 同源物 3 (tribbles homolog 3) 对自然衰老肌少症小鼠肌肉功能的影响,研究在距地面 50 cm 的高度上,对小鼠进行 3 次实验且每次间隔时间超过 30 min,记录悬挂时间并取平均值^[30]。

通过总结文献,不同类型肌少症小鼠模型在网格设置高度、实验重复次数、间歇休息时间及记录指标等方面有所不同。总结如下:(1) 网格高度设置通常在 40 ~ 80 cm 之间,以保护小鼠免受伤害;(2) 实验重复次数一般为 2 ~ 3 次;(3) 每次实验间隔时间约为 15 ~ 30 min;(4) 悬挂时间作为主要记录指标,通过多次试验的平均值进行分析。由于尚无统一标准,研究者可根据实验需要调整参数来建立倒置网格实验运动模型评估肌力,确保测试方法适应不同肌少症小鼠模型的特定需求。

1.5 自愿转轮实验 (voluntary wheel running test)

自愿转轮实验能够使小鼠自发地进行跑步,

适用于骨骼肌慢性疾病的长期评估^[31]。通常以转轮转动次数、距离和速度来评估小鼠耐力^[32]。实验中,将小鼠放置在可自由转动的圆形运动轮上,小鼠可根据自身意愿开始跑步。通过记录小鼠在一定时间内的跑步距离、持续时间或运动频率,评估其自主运动能力、耐力水平以及对运动疲劳的反应。一项研究通过自愿转轮实验测试缺失 SOD1 小鼠的氧化应激对其自愿运动行为和骨骼肌功能的影响,记录每天转轮转数并转换为距离,每周评估小鼠的活跃程度和耐力变化^[33]。另一项研究评估 Myonectin 对骨骼肌功能的保护作用,通过自愿转轮实验测试自然衰老、类固醇诱导和去神经诱导的肌少症小鼠模型,5 d 适应期后每天收集其转轮跑动数据^[16]。在研究肌细胞缺失维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 诱导肌少症的实验中,经过 24 h 适应跑轮后,正式测试 24 h 内的跑步距离、速度和时间比例来评估 VDR 缺失对小鼠肌肉功能的影响^[34]。另一项研究对 27 ~ 28 月龄的 C57BL/6 小鼠进行自愿转轮实验,记录一周内的平均每日跑步距离 (km/d) 作为体力活动得分^[27]。此外,有研究通过 4 周自愿转轮实验评估运动对卫星细胞活化的影响,记录 23 个月龄的老年小鼠的每日和总跑步距离^[35]。

通过总结文献,不同类型肌少症小鼠模型在适应训练天数和记录指标等方面有所不同。总结如下:(1) 一般进行 1 ~ 5 d 的适应时间,期间逐步增加跑轮活动时间;(2) 通过记录小鼠每日在转轮上的转数,并转换为跑步距离,以评估小鼠的自愿运动行为和运动能力。目前,在参数控制上,对运动速度和距离一般不做干预,仅控制总运动持续时间^[36]。由于尚无统一标准,研究者可根据实验需要调整参数来建立自愿转轮运动模型评估耐力,确保测试方法适应不同肌少症小鼠模型的特定需求。

1.6 平衡木实验 (balance beam test)

平衡木用于评估啮齿动物精细运动时的协调和平衡能力^[37]。在平衡木测试中,使用狭窄的高架梁连接两个平台,通过观察和记录小鼠完成任务所需的时间、掉落次数、嗅探次数或步态表现,来评估其平衡控制能力和运动协调性^[38]。一项研究将自然衰老的肌少症小鼠放置在 6 mm 直

径的横梁一端,引导其走向目的地,间歇时间为 15 s 适应装置 1 d 后,3 d 内进行 3 次横梁穿越测试,记录穿越时间和脚滑次数^[39]。也有研究进行 3 d 测试,每天进行 6 次实验(前 3 次在 12 mm 宽横梁上,后 3 次在 6 mm 宽横梁上),最终记录第 3 天小鼠穿越 6 mm 横梁的平均时间、行走比例及脚滑和跌落次数^[40]。为评估饮食干预对自然衰老肌少症小鼠运动功能的影响,使用平衡木实验测量其运动协调和平衡能力,小鼠熟悉环境后进行 3 次测试,每次间隔 5 min,测量穿越时间和跌落次数^[41]。一项研究则采取在训练阶段多次引导穿越平衡木,正式测试阶段进行连续 3 d,每次进行 3 ~ 5 次实验,记录穿越时间、脚滑次数和速度^[42]。另一研究则采取实验前训练小鼠穿越平衡木 6 次,每次间歇 15 s,正式测试时记录每只小鼠穿越的总时间^[43]。有实验利用 12 mm 和 6 mm 宽的平衡木,对肌少症小鼠每天测量 3 次,每次间隔 10 min,前 2 d 为训练,从第 3 天开始记录数据^[44]。另一实验首先训练小鼠 3 d,每天训练 3 次,间歇时间 30 s,第 4 天开始测试,记录小鼠穿越时间^[45]。

通过总结文献,不同类型肌少症小鼠模型在测试设备与环境准备、训练与适应阶段、正式测试阶段和记录指标等方面有所不同。总结如下:(1)通常使用 6 或 12 mm 直径狭窄的高架梁;实验应在光线较暗的房间进行,起始点设置高强度白光灯作为负面刺激物,末端为较暗区域或者设置一个暗箱作为正面刺激物;(2)实验前进行 1 ~ 3 d 的训练,每天进行 3 次训练,每次在红房子(或暗箱)内休息 15 s;(3)测试期间,每天进行 3 ~ 6 次实验,每次实验之间休息 5 ~ 10 min;(4)记录小鼠穿越平衡木所需的时间、脚滑次数以及跌落次数。由于尚无统一标准,研究者可根据实验需要调整参数来建立平衡木运动模型评估协调和平衡能力,确保测试方法适应不同肌少症小鼠模型的特定需求。

1.7 其他测评方法

强迫游泳实验(forced swimming test)是评价运动诱发的疲劳和耐力的代表性实验。实验中,小鼠被放置在充满水的圆桶或高玻璃缸中,无法逃脱。起初,小鼠会尝试游泳和寻找逃生路径,但随着时间推移,它会变得更加疲劳,最终进入

静止或漂浮状态。通过测量小鼠在水中游泳和静止的时间,评估其应激反应和行为耐受度。一项研究使用自然衰老的肌少症小鼠模型,通过强迫游泳实验持续至小鼠耗尽体力,疲惫被定义为小鼠无法在 5 s 内上升到表面呼吸的状态。总活动时间表示为该组小鼠的平均值^[46]。另一项研究则将小鼠尾部绑上重物,放置于泳池内,在其 5 s 内无法浮出水面时记录其游泳时间^[47]。也有通过旷场实验(open field test)来评估小鼠的运动能力。每只小鼠被放置在开放场的中心,自由探索 30 s 后进行 5 min 的测试时间。通过记录小鼠在测试期间的活动轨迹和探索距离,评估其探究活动和体力功能参数^[48,17]。举重实验(weightlifting test)也可用来评估肌少症小鼠的肌肉力量。在测试前,小鼠每天训练一次,持续 2 周。正式测试时,小鼠用前爪抓住不同重量的链环,根据其举起的重量和持续时间评分,取每只小鼠三次测量的平均值,并根据体重进行标准化^[49]。这些方法也从不同角度全面评估了肌少症小鼠的运动功能,为相关研究提供了多样的实验手段。

综上所述,在肌少症小鼠的运动功能测评中,跑台力竭、强迫游泳和自愿转轮实验主要评估肌肉耐力,抓力、倒置网格和举重实验检测肌肉力量,转棒和平衡木实验侧重平衡与协调(见表 1)。由于单一方法的局限,各测试手段在应用中也互为补充,例如抓力实验弥补了跑台力竭无法评估的力量不足,自愿转轮和跑台测试结合能更全面地评估耐力。目前各测评方法尚无统一标准,研究者需根据实验需求灵活调整参数,建立多种运动模型,确保测试方法适应不同肌少症小鼠模型的特定需求。然而,这些传统方法因具有依赖单一指标、操作繁琐且无法动态监测等问题,难以全面反映小鼠的整体运动功能。为克服这些局限性,亟需引入高效、自动化和全面的创新测评系统,以提升测评精度与效率,更好地推动肌少症研究的发展。

2 运动功能测评的创新特征

2.1 高通量自动化测评系统的应用

在现有的肌少症小鼠运动功能测评中,多个测评方法各自独立,操作较为繁琐且耗时较长。

表 1 肌少症小鼠运动功能测评方法

Table 1 Measurement methods of motor function in sarcopenic mice

运动能力 Motor function	测评方法 Assessment method	评估指标 Assessment indicators	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	适用疾病模型 Applicable disease model
肌力 Muscle strength	抓力仪实验 Grip strength	前肢抓力;四肢抓力;最大抓力;平均抓力 Forelimb grip strength; four-limb grip strength; maximum grip strength; average grip strength	简单快速;可重复性高;适用性广;指标明确 Simple and fast; high reproducibility; wide applicability; clear indicators	需要预训练;结果存在主观误差 Requires pre-training; results may have subjective bias	运动训练模型;神经肌肉疾病模型;衰老模型;心血管疾病模型;代谢疾病模型 Exercise training model; neuromuscular disease model; aging model; cardiovascular disease model; metabolic disease model
	倒置网格实验 Inverted screen test	悬挂时间;悬挂表现;掉落次数 Hanging time; hanging performance; number of falls	操作简便;设备成本低;非侵入性;评价结果直观且易获取 Easy to operate; low equipment cost; non-invasive; evaluation results are intuitive and easy to obtain	结果具有主观性;可重复性差 Results are subjective; poor reproducibility	
	举重实验 Weightlifting test	最大举重量;举重次数;举重速度;举重持续时间;恢复时间;成功率 Maximum lifting strength; number of lifts; lifting speed; lifting duration; recovery time; success rate	直接评估肌肉力量;数据量化明确 Direct assessment of muscle strength; clear and quantifiable data	设备复杂;实验过程可能引起应激 Complex equipment; experimental process may induce stress	
耐力 Endurance	跑台力竭实验 Treadmill test	跑步时间;跑步距离;电击次数 Running time; running distance; number of shocks	测试条件可精确控制;可多次重复 Testing conditions can be precisely controlled; experiment can be repeatedly performed	设备相对昂贵;需要预训练;结果受应激反应影响 Equipment is relatively expensive; requires pre-training; results are influenced by stress responses	运动训练模型;神经肌肉疾病模型;老龄化研究模型;心血管疾病模型;代谢疾病模型 Exercise training model; neuromuscular disease model; aging model; cardiovascular disease model; metabolic disease model
	自愿转轮实验 Voluntary running wheel test	跑步时间;跑步距离;转速 Running time; running distance; rotation speed	操作简单;结果直观;可重复性 Simple to operate; intuitive results; reproducibility	需要预训练;结果受应激反应影响;限制动物种类 Requires pre-training; results are influenced by stress responses; limited animal species	
	强迫游泳实验 Forced swimming test	不动时间;游动时间;挣扎时间 Immobilization time; swimming time; struggling time	操作简便;快速评估;非侵入性;适合高通量筛选研究 Easy to operate; rapid assessment; non-invasive; suitable for high-throughput screening research	易受应激反应影响;结果具有主观性 Susceptible to stress responses; results are subjective	
平衡与协调 Balance and coordination	转棒实验 Rotarod test	保持时间;最大速度;平均速度;跌落次数 Hold time; maximum speed; average speed; number of falls	操作简便;高灵敏度;广泛适用性 Easy to operate; high sensitivity; wide applicability	需要预训练;结果受应激反应影响 Requires pre-training; results are influenced by stress responses	神经退行性疾病模型;神经肌肉疾病模型;中枢神经系统损伤模型;衰老模型;运动障碍模型;基因突变模型 Neurodegenerative disease model; neuromuscular disease model; central nervous system injury model; aging model; movement disorder model; genetic mutation model
	平衡木实验 Balance beam test	通过时间;跌落次数;步态参数;后肢滑落次数 Passage time; number of falls; gait parameters; number of hind limb slips	操作简单;直观评价;低成本 Easy to operate; intuitive evaluation; low cost	需要预训练;结果受应激反应影响 Requires pre-training; results are influenced by stress responses	

续表 1

运动能力 Motor function	测评方法 Assessment method	评估指标 Assessment indicators	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	适用疾病模型 Applicable disease model
整体运动能力 Overall motor function	旷场实验 Open field test	总移动距离;活动时间; 静止时间;进入中心区 域的次数;在中心区域 的停留时间;边缘活动; 活动速度 Total distance traveled; active time;inactive time;number of entries into the central area;time spent in the central area; edge activity; movement speed	非侵入性;实验简便易 行;能够整体评估运动 能力;适用性广泛 Non-invasive;easy to operate;capable of assessing overall motor function; wide applicability	环境影响较大;指标解 释复杂 Significant environmental influence;complex interpretation of indicators	运动训练模型;焦虑和 抑郁模型;神经退行性 疾病模型;代谢疾病模 型;遗传模型 Exercise training model; anxiety and depression model; neurodegenerative disease model;metabolic disease model; genetic model

而高通量自动化测评系统集成多种传感器和自动化控制技术,通过实时记录小鼠运动轨迹、速度和加速度,实现全面精确的运动行为测量与分析,对运动功能评估展现显著潜力。研究表明,该系统采用模块化软件架构,灵活训练和监控小鼠,收集详细运动数据^[50]。该系统可精确评估小鼠运动功能和协调性,同时评估多只小鼠,提高实验效率^[51-52]。相关文献指出,其可用于评估候选药物和基因敲除对小鼠运动功能的影响,提高实验效率和数据精确性,为肌少症及其他运动功能障碍研究提供重要支持^[53]。未来研究可通过结合高通量自动化测评系统与人工智能技术,利用机器学习和深度学习算法对运动数据进行精确分析与模型预测,同时结合图像处理技术与传感器数据分析,更全面地捕捉运动功能细节,如步态和协调性。此外,利用自主学习算法可根据实时反馈调整运动功能实验条件,提升灵活性与精确性。

2.2 多维度综合评估体系的构建

现有的测评方法多是针对特定的运动能力进行单一指标的测试,难以全面反映肌肉功能的整体状态。目前,通过整合传统测评方法与现代影像技术,可获得更全面的运动能力评估数据。虽然生物电阻抗分析(bioelectrical impedance analysis)、计算机断层扫描(computed tomography)和双能 X 射线吸收测量法(dual-energy X-ray absorptiometry)能够提供有价值的骨骼肌质量数据,但这些结果应与握力测试等其他诊断措施相结合,才能获取全面的结果^[54]。一项研究发现,结合使用握力测试和核磁共振(magnetic resonance imaging),可以更全面地评估小鼠肌肉

萎缩的程度和运动能力的强弱^[55]。一项研究则通过跑步机测试与超声波监测的结合,实时评估了小鼠在运动过程中的骨骼肌状态和整体的运动能力^[56]。此外,也有研究将双能 X 射线吸收测定法与握力测试和跑步机实验相结合,整体评估肌少症小鼠的骨骼肌能力^[57]。因此,多维度的综合评估系统可以为肌少症的骨骼肌健康状况和运动能力提供全面的评估结果。

2.3 动态监测技术的应用

传统的运动功能测评方法通常只能捕捉到某个特定时间点的功能状态,如通过抓力实验测得某一瞬时的肌肉力量,但这难以反映肌少症在小鼠中的动态发展过程。近年来,通过自动化行为追踪、运动传感器和三维运动捕捉等动态监测技术,能够实时、非侵入性地记录小鼠的运动特征。这些技术已在神经退行性疾病和代谢性疾病等研究领域取得显著成果^[58]。相关文献利用 AI 驱动的微型运动传感器系统通过持续监测小鼠日常的运动行为来追踪生活周期中的运动功能变化趋势^[59]。有研究利用 CatWalk 自动步态分析系统监测小鼠轻微的运动障碍和步态异常来提供高精度的运动功能评估,同时也能动态监测康复过程中运动功能的改善状况^[60-61]。在迷宫实验、跑步机测试和开放场实验等,使用 EthoVision 视频追踪系统可用于监测小鼠的活动轨迹、速度、距离等关键参数,来测评小鼠的运动功能和行为表现^[62]。因此,这些动态监测技术的应用,可显著提升对肌少症小鼠运动功能变化的捕捉与分析能力,为探索肌少症疾病的病理机制和治疗方案提供有效工具。

3 小结与展望

在肌少症研究中,不同运动能力测评方法有不同的测试程序、优缺点和评价指标体系。但目前的研究中更多关注于肌肉力量和耐力能力的测评,而在平衡和协调能力、整体运动能力以及长期运动功能评估等方面存在一定不足。且现有的运动测评方法也存在测试标准不同,测试条件多样、评价指标不一等问题,难以提供全面、科学的评估结果。因此,对测评方案进行总结并提出建议,可满足多学科研究人员需求的基础上,利于测评方案的规范化。

未来有关肌少症小鼠的运动能力测评应朝着更加精准、全面和智能化的方向发展。首先,需要优化运动任务设计,结合不同的运动能力维度,建立多元化的新运动任务范式,以全面评估肌少症小鼠的运动能力。其次,依托高通量自动化测评系统的应用,结合大数据与人工智能,实现对运动能力的实时追踪,捕捉细微的运动变化,提升运动功能测评的效率与准确性。此外,通过机器学习算法,可在大规模运动功能数据中挖掘潜在的生物标志物,提高研究的精确性与干预效果。最后,未来应加强跨学科合作,将基础医学、生物力学、运动科学和数据科学等领域的最新成果引入肌少症研究,促进运动功能测评方案的规范化,推动肌少症防治的科学进步。

参 考 文 献(References)

[1] PIAO L, HUANG Z, INOUE A, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells ameliorate aging-associated skeletal muscle atrophy and dysfunction by modulating apoptosis and mitochondrial damage in SAMP10 mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 226.

[2] BEAUDART C, MCCLOSKEY E, BRUYÈRE O, et al. Sarcopenia in daily practice: assessment and management [J]. *BMC Geriatr*, 2016, 16(1): 170.

[3] EBERT S M, MONTEYS A M, FOX D K, et al. The transcription factor ATF4 promotes skeletal myofiber atrophy during fasting [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(4): 790-799.

[4] MILLER M J, MARCOTTE G R, BASISTY N, et al. The transcription regulator ATF4 is a mediator of skeletal muscle aging [J]. *Geroscience*, 2023, 45(4): 2525-2543.

[5] TONG L, OZES B, MOSS K, et al. AAV1. NT-3 gene therapy in the SOD1KO mouse model of accelerated

sarcopenia [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, 14(5): 2204-2215.

[6] SONG J, LIU J, CUI C, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate diabetes-induced muscle atrophy through exosomes by enhancing AMPK/ULK1-mediated autophagy [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, 14(2): 915-929.

[7] CAO Y, LI Y, HAN W, et al. Sodium butyrate ameliorates type 2 diabetes-related sarcopenia through IL-33-independent ILC2s/IL-13/STAT3 signaling pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 343-358.

[8] LIN C H, YANG H, XUE Q L, et al. Losartan improves measures of activity, inflammation, and oxidative stress in older mice [J]. *Exp Gerontol*, 2014, 58: 174-178.

[9] XIE W Q, HE M, YU D J, et al. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(3): 538-554.

[10] LAURETANI F, RUSSO C R, BANDINELLI S, et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5): 1851-1860.

[11] AISHWARYA R, ABDULLAH C S, REMEX N S, et al. Pathological sequelae associated with skeletal muscle atrophy and histopathology in G93A * SOD1 mice [J]. *Muscles*, 2023, 2(1): 51-74.

[12] SONG M, CHEN F F, LI Y H, et al. Trimetazidine restores the positive adaptation to exercise training by mitigating statin-induced skeletal muscle injury [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(1): 106-118.

[13] WANG B Y, HSIAO A W, SHIU H T, et al. Mesenchymal stem cells alleviate dexamethasone-induced muscle atrophy in mice and the involvement of ERK1/2 signalling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 195.

[14] 阴均涛, 张红丽, 闫欣, 等. 不同行为学测试方法在家族性肌萎缩侧索硬化小鼠模型中的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(1): 57-60, 90.

YIN J T, ZHANG H L, YAN X, et al. Comparison of different behavioral tests in amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(1): 57-60, 90.

[15] 尚画雨, 孙君志, 丁海丽, 等. 运动结合补充亮氨酸通过抑制炎症反应促进 C26 荷瘤小鼠骨骼肌蛋白质沉积研究 [J]. *首都体育学院学报*, 2019, 31(5): 474-480.

SHANG H Y, SUN J Z, DING H L, et al. Exercise in combination with leucine supplementation promoting skeletal muscle protein deposition in C26 tumor bearing mice via inhibiting inflammatory response [J]. *J Cap Univ Phys Educ Phys*, 2019, 31(5): 474-480.

[16] OZAKI Y, OHASHI K, OTAKA N, et al. Myonectin

- protects against skeletal muscle dysfunction in male mice through activation of AMPK/PGC1 α pathway [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 4675.
- [17] HUANG D D, FAN S D, CHEN X Y, et al. Nrf2 deficiency exacerbates frailty and sarcopenia by impairing skeletal muscle mitochondrial biogenesis and dynamics in an age-dependent manner [J]. Exp Gerontol, 2019, 119: 61–73.
- [18] 熊伯成, 黎上明, 但丁, 等. 肌萎缩侧索硬化症模型小鼠脑干蛋白质组学分析 [J]. 中南医学科学杂志, 2023, 51(5): 630–634.
- XIONG B C, LI S M, DAN D, et al. Proteomic analysis of brainstem in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Med Sci J Cent South Chin, 2023, 51(5): 630–634.
- [19] 傅泽铤, 李仲豪, 李伦宇, 等. 抗阻运动对 SAMP8 小鼠骨骼肌 lncRNA 和 mRNA 基因表达谱的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 286–296.
- FU Z T, LI Z H, LI L Y, et al. Effects of resistance exercise on long non-coding RNA and mRNA expression profiles of skeletal muscle in senescence accelerated-prone 8 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 286–296.
- [20] OROZCO-AGUILAR J, TACCHI F, AGUIRRE F, et al. Ursodeoxycholic acid induces sarcopenia associated with decreased protein synthesis and autophagic flux [J]. Biol Res, 2023, 56(1): 28.
- [21] ZHANG S, YAN H, DING J, et al. Skeletal muscle-specific DJ-1 ablation-induced atrogenes expression and mitochondrial dysfunction contributing to muscular atrophy [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2023, 14(5): 2126–2142.
- [22] ZHAO W, ZHAO B, MENG X, et al. The regulation of MFG-E8 on the mitophagy in diabetic sarcopenia via the HSPA1L-Parkin pathway and the effect of D-pinitol [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2024, 15(3): 934–948.
- [23] DENG C, LU C, WANG K, et al. Celecoxib ameliorates diabetic sarcopenia by inhibiting inflammation, stress response, mitochondrial dysfunction, and subsequent activation of the protein degradation systems [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1344276.
- [24] OZES B, TONG L, MYERS M, et al. AAV1. NT-3 gene therapy prevents age-related sarcopenia [J]. Aging, 2023, 15(5): 1306–1329.
- [25] GARRATT M, LEANDER D, PIFER K, et al. 17- α estradiol ameliorates age-associated sarcopenia and improves late-life physical function in male mice but not in females or castrated males [J]. Aging Cell, 2019, 18(2): e12920.
- [26] GRABER T G, FANDREY K R, THOMPSON L V. Novel individualized power training protocol preserves physical function in adult and older mice [J]. Geroscience, 2019, 41(2): 165–183.
- [27] LIU H, GRABER T G, FERGUSON-STEGALL L, et al. Clinically relevant frailty index for mice [J]. 2014, 69(12): 1485–1491.
- [28] FERRARO E, PIN F, GORINI S, et al. Improvement of skeletal muscle performance in ageing by the metabolic modulator Trimetazidine [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2016, 7(4): 449–457.
- [29] NIU K, GUO H, GUO Y, et al. Royal jelly prevents the progression of sarcopenia in aged mice *in vivo* and *in vitro* [J]. 2013, 68(12): 1482–1492.
- [30] SHANG G K, HAN L, WANG Z H, et al. Sarcopenia is attenuated by TRB3 knockout in aging mice via the alleviation of atrophy and fibrosis of skeletal muscles [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2020, 11(4): 1104–1120.
- [31] ALLEN D L, HARRISON B C, MAASS A, et al. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse [J]. J Appl Physiol, 2001, 90(5): 1900–1908.
- [32] GOH J, LADIGES W. Voluntary wheel running in mice [J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2015, 5(4): 283–290.
- [33] MULLER F L, SONG W, LIU Y, et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(11): 1993–2004.
- [34] GIRGIS C M, CHA K M, SO B, et al. Mice with myocyte deletion of vitamin D receptor have sarcopenia and impaired muscle function [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(6): 1228–1240.
- [35] FUJIMAKI S, HIDAKA R, ASASHIMA M, et al. Wnt protein-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running [J]. J Biol Chem, 2014, 289(11): 7399–7412.
- [36] AHLES C P, SINGH H, JOO W, et al. High volumes of resistance exercise are not required for greater bone mineral density during growth [J]. Med Sci Sports Exerc, 2013, 45(1): 36–42.
- [37] SONG Y N, LI H Z, ZHU J N, et al. Histamine improves rat rota-rod and balance beam performances through H2 receptors in the cerebellar interpositus nucleus [J]. Neuroscience, 2006, 140(1): 33–43.
- [38] LUONG T N, CARLISLE H J, SOUTHWELL A, et al. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam [J]. J Vis Exp, 2011(49): 2376.
- [39] GILL J F, SANTOS G, SCHNYDER S, et al. PGC-1 α affects aging-related changes in muscle and motor function by modulating specific exercise-mediated changes in old mice [J]. Aging Cell, 2018, 17(1): e12697.
- [40] GEMIKONAKLI G, MACH J, TRAN T, et al. Probing

- polypharmacy, ageing and sex effects on physical function using different tests [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2024, 38(3): 561–574.
- [41] ALCALDE-ESTÉVEZ E, SOSA P, ASENJO-BUENO A, et al. Dietary phosphate restriction prevents the appearance of sarcopenia signs in old mice [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, 14(2): 1060–1074.
- [42] ORENDUFF M C, REZELI E T, HURSTING S D, et al. Psychometrics of the balance beam functional test in C57BL/6 mice [J]. *Comp Med*, 2021, 71(4): 302–308.
- [43] 蔡瑜, 王璐婉, 谢冬琳, 等. 小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(11): 71–77.
- CAI Y, WANG L W, XIE D L, et al. Establishment of chronic alcoholic brain injury model in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(11): 71–77.
- [44] 袁婷婷, 李燊, 吴燕, 等. 长期自由选择饮酒小鼠模型的建立及其行为学评价 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2023, 55(2): 315–323.
- YUAN T T, LI S, WU Y, et al. Establishment and behavioral evaluation of a mouse model of long-term free-choice alcohol drinking [J]. *J Peking Univ (Health Sci)*, 2023, 55(2): 315–323.
- [45] 张睿, 张竞丹, 舒瑶, 等. CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(11): 75–85.
- ZHANG R, ZHANG J D, SHU Y, et al. Effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(11): 75–85.
- [46] JEON H, LEE K, KIM Y T, et al. Effect of HY7602 fermented Deer antler on physical fatigue and antioxidant activity in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3318.
- [47] QIN Y, LI H, ZHANG Y, et al. Retigabine promotes ketamine's antidepressant effect in the forced swim test in male and female C57BL/6J mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2023, 230: 173590.
- [48] CELLA P S, MATOS R L N, MARINELLO P C, et al. Doxorubicin causes cachexia, sarcopenia, and frailty characteristics in mice [J]. *PLoS One*, 2024, 19(4): e0301379.
- [49] CAMPOS F, ABRIGO J, AGUIRRE F, et al. Sarcopenia in a mice model of chronic liver disease: role of the ubiquitin-proteasome system and oxidative stress [J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(10): 1503–1519.
- [50] PODDAR R, KAWAI R, ÖLVECZKY B P. A fully automated high-throughput training system for rodents [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83171.
- [51] HUBBARD R, DUNTHORN J, O' BRIEN R J, et al. Evaluating skilled prehension in mice using an auto-trainer [J]. *J Vis Exp*, 2019(151): e59784.
- [52] SHENK J, LOHKAMP K J, WIESMANN M, et al. Automated analysis of stroke mouse trajectory data with traja [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 518.
- [53] BROWN S D M, HOLMES C C, MALLON A M, et al. High-throughput mouse phenomics for characterizing mammalian gene function [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(6): 357–370.
- [54] LIU D, WANG S, LIU S, et al. Frontiers in sarcopenia: advancements in diagnostics, molecular mechanisms, and therapeutic strategies [J]. *Mol Aspects Med*, 2024, 97: 101270.
- [55] BAEK K W, JUNG Y K, PARK J S, et al. Two types of mouse models for sarcopenia research: senescence acceleration and genetic modification models [J]. *J Bone Metab*, 2021, 28(3): 179–191.
- [56] TAGLIAFICO A S, BIGNOTTI B, TORRI L, et al. Sarcopenia: how to measure, when and why [J]. *Radiol Med*, 2022, 127(3): 228–237.
- [57] WANG B Y, HSIAO A W, WONG N, et al. Is dexamethasone-induced muscle atrophy an alternative model for naturally aged sarcopenia model? [J]. *J Orthop Translat*, 2023, 39: 12–20.
- [58] HAMERS F P, LANKHORST A J, VAN LAAR T J, et al. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(2): 187–201.
- [59] LIU Y, CHEN M, CHAN C, et al. AI-enabled micro motion sensors for revealing the random daily activities of caged mice [J]. *Adv Intell Syst*, 2023, 5(4): 2200220.
- [60] WALTER J, KOVALENKO O, YOUNSI A, et al. The CatWalk XT® is a valid tool for objective assessment of motor function in the acute phase after controlled cortical impact in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 392: 112680.
- [61] HENRY R J, MEADOWS V E, STOICA B A, et al. Longitudinal assessment of sensorimotor function after controlled cortical impact in mice: comparison of beamwalk, rotarod, and automated gait analysis tests [J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37(24): 2709–2717.
- [62] SPINK A J, TEGELENBOSCH R A, BUMA M O, et al. The EthoVision video tracking system-A tool for behavioral phenotyping of transgenic mice [J]. *Physiol Behav*, 2001, 73(5): 731–744.

王俊伟,耿兴超,李伟. 类风湿性关节炎实验模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 127-140.

WANG J W, GENG X C, LI W. Advances in experimental models of rheumatoid arthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 127-140.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.013

类风湿性关节炎实验模型研究进展

王俊伟^{1,2}, 耿兴超^{1*}, 李伟^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院 安全评价研究所, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;
2. 中国药科大学 多靶标天然药物全国重点实验室, 南京 210009)

【摘要】 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种严重影响关节的慢性自身免疫性疾病, 实验模型是研究 RA 发生机制、药理毒理机制和药物筛选评价的重要工具。目前常用的 RA 实验模型分为动物模型和体外模型, 随着生物技术和生物材料的发展, RA 实验模型已从诱导性模型和 2D 体外模型发展至自发性基因修饰模型和 3D 体外模型, 中医病证结合模型的研究也取得了一定的进展。本文对 RA 实验模型的造模、监测和评价方法的研究进展进行总结, 以期对 RA 相关研究提供参考。

【关键词】 类风湿性关节炎; 动物模型; 体外模型; 诱导性模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0127-14

Advances in experimental models of rheumatoid arthritis

WANG Junwei^{1,2}, GENG Xingchao^{1*}, LI Wei^{1*}

(1. Institute for Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China; 2. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Corresponding author: GENG Xingchao. E-mail: gengxch@nifdc.org.cn; LI Wei. E-mail: liwei@nifdc.org.cn

【Abstract】 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that significantly impacts joints. Experimental models are crucial tools for studying the pathogenesis and pharmaco-toxicological mechanisms of RA and screening RA drugs. Commonly used experimental RA models include animal models and *in vitro* models. With advancements in biotechnology and biomaterials, experimental RA models have evolved from induced and 2D *in vitro* models to spontaneous gene modification and 3D *in vitro* models. Moreover, some progress has been made in the study of traditional Chinese medicine disease and syndrome combination models. This paper summarizes the research progress made in the modeling, monitoring, and evaluation of experimental RA models to provide a reference for related research.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; animal model; *in vitro* model; inducible model

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

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病因未明的慢性、以滑膜炎为主的自身免疫性疾病, 并逐渐导致关节破坏、畸形、残疾和并发

症, 包括心血管疾病、间质性肺病、骨质疏松症和代谢综合征等。RA 的发生主要与遗传易感性、表观遗传修饰和环境因素相互作用产生的抗原

【基金项目】 药品监管科学全国重点实验室项目 (2023SKLDRS0126)。

Funded by National Key Laboratory of Drug Regulatory Science (2023SKLDRS0126).

【作者简介】 王俊伟, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物临床前安全性评价。Email: wjw_cpu@163.com

【通信作者】 耿兴超, 男, 博士, 研究员, 研究生导师, 研究方向: 药物安全性评价。Email: gengxch@nifdc.org.cn;

李伟, 男, 博士, 主任药师, 研究方向: 药物临床前安全性评价。Email: liwei@nifdc.org.cn。

* 共同通信作者

与自身抗体导致的免疫系统紊乱有关,细胞和体液免疫反应的异常导致大量炎症因子产生,炎症细胞向滑膜组织聚集,最终导致持续的关节炎、软骨和骨质破坏,但其确切机制尚不明确。RA 的全球发病率约 0.5% ~ 1%,中国约有 500 万 RA 患者^[1]。

实验模型是研究 RA 发生机制、药理毒理机制和药物筛选的重要工具,目前常用的 RA 实验模型包括诱导性模型、自发性基因修饰模型、中医病证结合模型等动物模型和 2D、3D 体外模型,各模型均具有与人 RA 类似的关节肿胀、滑膜炎和骨侵蚀等经典特征,但在诱导机制、发病速度、病程和严重程度存在差异。RA 的发生机制复杂,现有的实验模型只能反映 RA 的部分特征,因此,对现有模型的深入研究与改良,建立一种能科学全面反映 RA 临床特征的实验模型对于 RA 的发病机制研究和药物筛选评价具有重要意义。本文对近 5 年来 RA 实验模型的造模、监测和评价方法的研究进展进行了总结,并比较了常用的诱导性和基因工程模型与人 RA 的异同,以期对 RA 相关研究和治疗药物的筛选评价提供参考。

1 动物模型

1.1 诱导性模型

以胶原和佐剂性关节炎模型为代表的诱导性模型具有与人 RA 相似度较高、发病快和成本较低的特点,在 RA 相关发病机制研究和药物开发中应用广泛,目前使用较多的诱导剂包括 II 型胶原 (collagen type II, CII)、完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA)、甲基化牛血清白蛋白 (methylated bovine serum albumin, m-BSA) 和胶原抗体等,其中胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型和佐剂关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 模型在 RA 发病机制研究及药物开发和评价中应用最为广泛。

1.1.1 胶原诱导的关节炎模型

CIA 模型是主动免疫诱导 RA 的经典模型,T 细胞的过度激活、促炎因子上调和 CII 特异性抗体的产生是 CIA 发病的主要机制,同源或异源 CII 均可诱导 CIA,对 CII 敏感的动物品系包括 SD、Wistar、BB/DR、Lewis 大鼠和 DBA/1 小鼠等^[2]。CIA 模型与人 RA 的关节炎表现、发病机

制和病理学改变相似,均表现为增生性滑膜炎,易感性均与主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 的 II 类分子表达有关,均有血管翳形成、单核细胞浸润、细胞免疫和体液免疫紊乱,CIA 与人 RA 之间最显著的区别是 CIA 中不存在类风湿因子,也不出现复发情况,持续时间较短^[3]。CIA 模型的发病率和严重程度存在较大的个体和性别差异^[4],使用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或抗 CII/CD3 双特异抗体联合 CII 建立的改良 CIA 方案个体与传统方案相比差异更小、发病率更高^[5-6]。非人灵长类动物在生理和遗传背景方面相比啮齿类动物更接近人类,NA 等^[7]使用鸡 CII 成功在 *Gogo-B*01* 阳性的食蟹猴上建立 CIA 模型,并提出了一个新的关节炎评分系统。

为研究关节炎模型定量预测抗关节炎药物治疗活性的能力,WONG 等^[8]基于转化药代动力学-药效学分析,研究了吡罗美辛、甲氨蝶呤、依那西普、托法替尼和地塞米松对 CIA 和 AA 模型大鼠的疗效与 RA 患者临床疗效之间的关系,结果显示各药物的临床前疗效排名与报告的临床疗效一致,两种动物模型均适用于 RA 治疗药物的筛选与评价。滑膜细胞凋亡在 RA 的病理生理过程中起着至关重要的作用,SO 等^[9]开发了一种用于体外和体内成像的细胞凋亡成像探针,用于体内成像时相较于膜联蛋白 V 灵敏度更高。X 线、超声和磁共振成像是 RA 临床评估的常用方法,但较高的使用难度和成本限制了其在 RA 动物模型中的应用,最近基于体内显微 CT 技术、红外热成像和光声/超声双模式成像的新方法为 RA 的临床前研究提供了新的选择,可用于 RA 模型动物体温、血管生成和滑膜侵蚀的监测,与传统方法相比灵敏度更高,成本更低,误差更小^[10-12]。总的来说,CIA 在发病机制和临床表现方面与 RA 较为相似,是目前国际公认的研究 RA 发病机制和药物评价的较为理想的模型。

1.1.2 佐剂性关节炎模型

AA 模型是一种由灭活分枝杆菌诱导的急性关节炎模型,由 CD4⁺ T 细胞介导并与 MHC 相关,对 CFA 敏感的动物品系包括 Lewis、Wistar、SD、BN 大鼠等^[13]。李日许等^[14]的对比研究表明 AA 模型的稳定性与成模率与 CIA 模型相当,5.0、7.5

以及 10 mg/mL 3 种剂量的 CFA 均可诱导建立 AA 模型,其中 10 mg/mL CFA 为最佳剂量^[15]。RA 相关慢性疼痛与感觉神经元的自发活动增强有关,INGRAM 等^[16]开发了一种基于体内钙成像、用于评估感觉神经元自发活动的体外监测方法,用于评估 AA 模型小鼠的慢性疼痛时,准确率可达 90%。RA 是一种需要长期管理的慢性疾病,LIU 等^[17]开发了一种用于实时炎症监测和协同治疗的可重构集成智能设备,并在 AA 模型中得到验证。AA 模型造模方法简单,发病迅速,累及多个关节;病理学检查可观察到血管翳的形成、中性粒细胞和单核细胞浸润、软骨和软骨下骨侵蚀,并存在明显的细胞免疫功能紊乱,是研究 RA 发病机制和药理毒理研究的常用模型,此外,在大鼠 AA 模型中还观察到心肌肥厚、纤维化、心肌结构改变和心肌炎症等 RA 相关心脏疾病^[18],因此,AA 模型还可用于研究 RA 相关的心血管和心肌损伤^[19]。RA 患者多同时表现出体液和细胞免疫功能的异常,但 AA 模型动物的体液免疫功能没有显著改变,缺乏慢性病过程,且具有自限性,使用 AA 模型单独研究 RA 还存在一些局限性。

1.1.3 抗原诱导的关节炎模型

m-BSA 通过与免疫球蛋白 G Fc 段受体结合并沉积于关节软骨表面,激活单核细胞导致持续的关节炎^[20],将 m-BSA 与 CFA 乳化后进行皮内免疫,再通过关节腔内注射 m-BSA 可建立抗原诱导的关节炎 (antigen-induced arthritis, AIA) 模型^[21]。TOPPING 等^[22]建立了一种制备抗原乳化剂的标准化方法,适用于 AIA 和 CIA 等模型乳化剂的制备。AIA 模型的特征是明显的 T 细胞受累且不影响对侧关节,组织病理学表现与 RA 相似,包括滑膜增生、淋巴细胞浸润、血管翳形成和软骨侵蚀^[23]。FREY 等^[24]发现来自 AIA 小鼠的成纤维细胞样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 能够诱导重度联合免疫缺陷小鼠发生慢性关节炎,为研究 FLS 诱导慢性关节炎的分子机制提供了一种重要工具。与 CIA 模型相比,AIA 重复性好、发病率可达 100%、严重程度可控,个体差异小,易感性不受 MHC II 类基因的限制,可以在大多数小鼠品系中诱导,但与人 RA 的慢性多关节炎特征相比,AIA 模型炎症持续时间短,仅能

影响注射关节,在药物开发中应用较少^[25]。

1.1.4 胶原抗体诱导的关节炎模型

胶原抗体通过与关节滑膜中的 C II 表位结合,激活、募集免疫细胞并促进炎症因子释放,导致关节炎的发生,胶原抗体诱导的关节炎 (collagen antibody-induced arthritis, CAIA) 模型通过注射 C II 单克隆抗体混合物与 LPS 诱导建立,与 1.5 mg 单抗相比,3 mg C II 单抗诱导的 CAIA 小鼠关节炎更显著、均一,且未造成过度的关节破坏^[26]。C II 抗体诱导的疼痛依赖于组织抗原识别和局部免疫复合物的形成^[27],微阵列分析发现了 CAIA 模型小鼠背根神经节中存在差异调控的 120 个 circRNA 基因,这些变化可能与炎症诱导的慢性疼痛有关^[28]。SU 等^[29]的研究发现 CAIA 的关节疼痛与溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 激活卫星胶质细胞 (satellite glial cells, SGC) 有关,干扰 LPA 信号传导或 SGC 激活可能是缓解 RA 炎性疼痛的靶点。随着小型化光纤探针的发展,在体内应用拉曼光谱成为可能,WALTHER 等^[30]开发了一种基于拉曼光谱的非侵入性、不含电离辐射的体外监测方法,用于评估骨破坏与软组织损伤,为 RA 动物模型评价提供了一种新选择。CAIA 模型的关节炎发生迅速,48 h 内即快速发生,可重复性好、发病率高,且不受 MHC II 类基因的限制,可以在大多数小鼠品系中诱导,CAIA 模型的致病特征与人 RA 相似,包括单核细胞浸润、血管翳形成、软骨破坏和骨侵蚀,但其不受 T 细胞和 B 细胞反应介导、缺乏慢性病程,同时较高的成本也限制 CAIA 模型的应用^[31]。

用于 RA 动物模型研究的新方法总结见表 1。

1.2 自发性基因修饰模型

经过一定基因修饰的模型动物能够自发形成关节炎,与 RA 发病的多基因特征相比,单个靶向基因缺陷导致的自发性疾病模型发病机制更简单,对于研究 RA 的发病机制和特定基因在 RA 中的作用具有重要意义。

1.2.1 K/BxN 模型

K/BxN 转基因小鼠由 T 细胞受体转基因 KRN 小鼠与自身免疫缺陷的非肥胖型糖尿病 (NOD) 小鼠杂交而得,K/BxN 小鼠在 4 周龄即发生关节炎^[32],其发病机制主要与表达 KRN

表 1 用于 RA 动物模型研究的新方法

Table 1 New methods for RA animal model studies

方法 Methods	应用 Application	特点 Characteristic
凋亡成像探针 Apoptosis imaging probe	体外和体内细胞凋亡成像 <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> apoptosis imaging	用于体内成像时相较于膜联蛋白 V 灵敏度更高, 体外成像时灵敏度相当 Used for <i>in vivo</i> imaging compared with membrane protein V higher sensitivity, <i>in vitro</i> imaging sensitivity
体内钙成像 <i>In vivo</i> calcium imaging	评估感觉神经元自发活动 Evaluation of sensory neurons spontaneous activity	与传统电生理学方法相比成像速度更快、效率更高 Compared with the traditional electrophysiological method, the imaging speed is faster and more efficient
红外热成像 Infrared thermal imaging	体温监测 Temperature monitoring	准确性和可靠性较高, 方法简易、成本低 High accuracy and reliability, simple method, low cost
光声/超声成像 Photoacoustic/ultrasonic imaging	滑膜侵蚀和血管生成评估 Assessment of synovial erosion and angiogenesis	不需外源性造影剂, 灵敏度高, 关节炎早期即可观察到滑膜侵蚀 Without exogenous contrast, high sensitivity, arthritis early can be observed in synovial erosion
体内显微 CT <i>In vivo</i> micro-computed tomography	骨侵蚀和关节肿胀评估 Evaluation of bone erosion and joint swelling	精确度高、误差更小、辐射较少 High accuracy, less error, less radiation
体内拉曼光谱 <i>In vivo</i> raman spectroscopy	骨侵蚀和滑膜炎评估 Evaluation of bone erosion and synovial inflammation	同时监测骨和软组织病变, 且无电离辐射 Bone and soft tissue lesions were monitored simultaneously without ionizing radiation
集成智能设备 Reconfigurable integrated smart device	实时炎症监测和协同治疗 Real-time inflammatory monitoring and collaborative therapy	监测炎症的同时可进行经皮电刺激和给药 Transcutaneous electrical stimulation and drug administration can be performed concurrently with inflammation monitoring

TCR 的 T 细胞识别 MHC II 类抗原呈递细胞上 NOD 衍生的葡萄糖-6-磷酸异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase, G6PI) 有关^[33], K/BxN 模型与人 RA 相似度高、重复性好、发病率可达 100%。将从 K/BxN 小鼠中提取纯化的免疫球蛋白 G 或血清注射至健康的 BALB/c 等小鼠体内可诱发短暂的关节炎^[34], 来自 K/BxN 小鼠的抗 G6PI 抗体与存在于正常小鼠关节表面的 G6PI 结合并形成免疫复合物 (immune complexes, IC), G6PI/G6PI IC 与中性粒细胞和巨噬细胞的相互作用是导致关节炎发生的主要原因^[35]。K/BxN 血清转移性关节炎发病迅速, 与 RA 在组织病理学和促炎因子改变等方面相似度高。

1.2.2 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 转基因模型

TNF 是 RA 炎症反应中最重要的促炎因子之一, TNF 可通过诱导促炎细胞因子级联、调控 Th1 及 Th17 细胞生长、破骨细胞分化和抗体产生以及参与表观遗传修饰促进 RA 的发生^[36]。TNF 转基因 (TNF-Tg) 小鼠模型是将人 TNF 基因片段整合至 CBA 与 C57BL/6 杂交的第 2 代小鼠受精卵内而得, 发病率可达 100%。TNF-Tg3647 和 Tg197

是常见的两个 TNF 转基因小鼠品系, Tg3647 包含一个转基因拷贝, 其关节炎症状较轻, Tg197 则含有 5 个转基因拷贝, 表现为更严重的关节炎^[37]。雌性 Tg3647 小鼠的寿命相较于雄性明显缩短, 可能与早发性心肌炎和心肺病变有关^[38]。TNF-Tg 小鼠模型是一种慢性自发性 RA 模型, 即使施加 CII 和 PG 等诱导剂也无法诱导急性炎症的发生, 这可能与长期 TNF- α 刺激后 T 细胞的免疫耐受有关^[39]。与 AA 等具有自限性的模型相比, TNF-Tg 模型最显著的特征是其慢性和逐渐加重的进行性关节炎病程, 可观察到与人 RA 一致的滑膜增生、炎性细胞浸润、血管翳形成和关节软骨破坏等病理学特征, 是研究 RA 发病机制和 TNF 抑制剂等药物筛选的重要工具^[40]。

1.2.3 SKG 小鼠模型

BALB/c 背景的 SKG 小鼠中编码 T 细胞受体信号分子的 ZAP-70 基因发生点突变, 改变了 T 细胞对自身多肽和 MHC 复合物的耐受性, 导致慢性自身免疫性关节炎的发生^[41], 与人 RA 相似, 雌性小鼠的发病率和严重程度较高^[42]。SKG 小鼠在酵母聚糖或其他微生物刺激后发展为慢性自身免疫性关节炎, BAILLET 等^[43]发现沙眼衣

原可诱导 SKG 小鼠产生 TNF 依赖性关节炎。SKG 小鼠表现出与 RA 相似的小关节对称性炎症、类风湿因子升高和进行性的关节破坏,并存在间质性肺炎、脊柱炎和肠炎等关节外病变,因此也作为间质性肺病研究的动物模型,SKG 小鼠在无病原体环境中不会发展为慢性关节炎,其发

生可能与自身反应性 T 细胞与环境刺激之间的相互作用有关,SKG 模型对于 RA 的关节外组织自身免疫性损伤机制、免疫学和遗传机制研究具有重要意义^[44]。

常用诱导性和基因工程模型与人 RA 的比较见表 2。

表 2 常用诱导性和基因工程模型与人 RA 的比较

Table 2 Comparison of commonly used inducible and genetic engineering models with human RA

模型 Models	主要机制 Primary mechanism	与人 RA 比较的异同点 Similarities and differences compare with human RA
胶原诱导的 关节炎 CIA	C II 的核心抗原肽与 MHC II 分子结合并被 TCR 识别,激活 T、B 细胞 Core antigenic peptide of C II binds to MHC II molecules, recognized by TCR to activate T and B cells	相同点:多关节炎;关节病理学改变相似;细胞免疫和体液免疫改变明显;受 MHC 基因的限制;存在性别差异 不同点:缺少慢性病程,持续时间较短;不存在类风湿因子 Similarities: polyarthritis; joint pathological changes are similar; changes of cellular immunity and humoral immunity were obvious; limited by MHC genes; gender differences Differences: lack of chronic disease course, shorter duration; no rheumatoid factor
佐剂诱导的 关节炎 AA	分枝杆菌中的 65 kDa 热休克蛋白激活 CD4 ⁺ T 细胞 65 kDa heat shock protein in Mycobacterium activates CD4 ⁺ T cells	相同点:多关节炎;关节病理学改变相似;受 MHC 基因的限制;存在关节外病变;存在性别差异 不同点:缺少慢性病程,具有自限性;仅存在细胞免疫功能紊乱;不存在类风湿因子 Similarities: polyarthritis; joint pathological changes are similar; limited by MHC genes; extra-articular lesions; gender differences Difference: lack of chronic disease course, self-limitation; only cellular immune dysfunction existed; no rheumatoid factor
抗原诱导的 关节炎 AIA	m-BSA 与免疫球蛋白 G Fc 段受体结合,激活免疫系统 m-BSA binds to immunoglobulin G Fc segment receptors, activate the immune system	相同点:关节病理学改变相似 不同点:缺少慢性病程,具有自限性;仅影响注射关节;不受 MHC 基因的限制;不存在类风湿因子 Similarities: joint pathological changes are similar Difference: lack of chronic disease course, self-limitation; affects only the injection joint; not restricted by MHC genes; no rheumatoid factor
胶原抗体诱导的 关节炎 CAIA	抗体与 C II 表位结合并形成免疫复合物,激活免疫系统 Antibodies bind to C II epitopes and form immune complexes, activate the immune system	相同点:多关节炎;关节病理学改变相似 不同点:缺少慢性病程,具有自限性;不受 MHC 基因的限制;不通过 T、B 细胞介导;不存在类风湿因子 Similarities: polyarthritis; joint pathological changes are similar Difference: lack of chronic disease course, self-limitation; not restricted by MHC genes; not mediated by T and B cells; no rheumatoid factor
K/BxN 模型 K/BxN model	T 细胞识别 MHC II 类抗原呈递细胞上的 G6PI,激活免疫系统 T cells recognize G6PI on MHC class II antigen-presenting cells, activate the immune system	相同点:慢性自发性多关节炎;关节病理学改变相似;MHC 基因相关 不同点:患者中 G6PI 抗体阳性发生率;无全身表现和类风湿因子的产生 Similarities: chronic spontaneous polyarthritis; joint pathological changes are similar; MHC gene correlation Differences: incidence of G6PI antibody positive in patients was low; no systemic manifestations or rheumatoid factors
TNF 转基因模型 TNF transgenic model	将人 TNF 基因片段整合至小鼠中,导致 TNF 过表达 Integration of a human TNF gene fragment into mice, TNF overexpression	相同点:慢性自发性多关节炎;关节病理学改变相似 不同点:不存在类风湿因子 Similarities: chronic spontaneous polyarthritis; joint pathological changes are similar Difference: no rheumatoid factors
SKG 模型 SKG model	ZAP-70 基因发生点突变,导致免疫耐受失衡 Point mutation of ZAP-70 gene leads to immune tolerance imbalance	相同点:关节病理学改变相似;慢性病程;存在类风湿因子等自身抗体;存在性别差异 不同点:关节外病变不完全相同 Similarities: joint pathological changes are similar; chronic course of disease; there are autoantibodies such as rheumatoid factor; gender differences Difference: extra-articular lesions are not identical

1.3 中医病证结合模型

RA 属于中医“痹证”范畴,中医认为虚、寒、湿、热、瘀是 RA 的重要病因病机。RA 病证结合模型是在 CIA 或 AA 等模型基础上,给予风、寒、湿等环境刺激或合并肾虚等模拟发病条件建立,既有关节炎特征,又体现了一定的中医病因病机和证候表现,对于中医证候研究和中药复方的药效评价具有重要意义。

1.3.1 风寒湿痹病证结合模型

风寒湿痹证是 RA 的临床常见证型之一,主要表现包括关节屈伸不利、冷痛、触之不温,疼痛遇寒加重等^[45]。张逢等^[46]和林也等^[47]的研究发现“风寒湿”通过 JAK/STAT 信号通路激活 Th17 细胞分化,导致 Th17/Treg 细胞失衡以及抑制促红细胞生成素的表达影响 RA 的发生,同时外湿加重了大鼠的线粒体损伤,并导致线粒体自噬水平下降,线粒体降解受阻^[48]。风寒湿痹病证结合模型通常在 CIA 或 AA 造模的基础上,给予风寒湿环境刺激,但刺激时长不一,14 ~ 45 d,每日 4 ~ 8 h 均有报道^[49-52]。基于血清代谢组学的研究发现了风寒湿痹模型大鼠与正常大鼠的 45 种差异代谢物,主要涉及类固醇激素生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢等通路^[53]。朱兴旺等^[54]选择 TNF- α 转基因小鼠建立 RA 寒痹模型,发现其发病可能与滑膜组织缺氧诱导因子 1 α 的上调有关。与 CIA 或 AA 模型相比,风寒湿痹模型动物通常表现出精神萎靡,活动、饮食减少,小便偏多等寒痹证候表现和更严重的关节炎症,同时白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-5 和 IL-17A 等炎症因子和 Beclin1 等滑膜自噬相关蛋白水平显著升高^[55-57]。

1.3.2 风湿热痹病证结合模型

风湿热痹因外感风湿热邪而引起,以游走性关节疼痛,关节灼热红肿,喜冷恶热等为主要表现。风湿热痹病证结合模型由 CII 或 CFA 联合风湿热环境刺激诱导建立,与 CIA 或 AA 模型大鼠相比,风湿热痹模型大鼠毛发干枯发黄、精神萎靡、发病时间提前、关节肿胀加重、关节表面温度和毛细血管通透性升高,血清 TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高,关节表面温度、热痛阈值和毛细血管通透性可能是风湿热痹模型的特征性评价指标^[58-60]。朱兴旺等^[61]的研究认为 CIA 大鼠基础

属性为热,在经风湿热环境刺激后具有显著的热痹证候演变过程,其机制可能与热休克蛋白 70 的上调有关。此外,风湿热痹大鼠的肠道菌群结构发生了显著变化,其厚壁菌门、乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属 9、拟普雷沃氏菌属的相对丰度明显降低,拟杆菌门、拟杆菌属的相对丰度显著升高,这种变化也可能与风湿热痹的发病有关^[62]。

1.3.3 肾虚痹证病证结合模型

中医理论认为肾为“先天之本”,肾精亏虚或先天不足导致痹证发生。肾虚证动物模型的造模方法包括药物造模法和手术造模法^[63],此外,已有通过基因敲除建立肾虚证小鼠模型报道^[64]。基于代谢组学的研究发现了肾虚证动物的多种生物标志物,涉及氨基酸代谢、脂质代谢、核苷酸代谢和肠道微生物代谢等通路^[65-66]。叶亲彬^[67]和陶黎等^[68]通过手术切除雌性大鼠卵巢后皮下注射 CII 诱导建立肾虚痹证病证结合模型,肾虚痹证大鼠关节肿胀严重,关节病理切片可见大量炎性细胞浸润,滑膜增生和软骨侵蚀,股骨骨小梁减少,破骨细胞数量明显高于 CIA 组大鼠,表明肾虚加重了 CIA 大鼠的骨质破坏。

1.3.4 脾虚痹证病证结合模型

中医认为脾胃虚弱可致痰湿内生,湿浊为患,复感外邪而致痹,肠道屏障受损和肠道菌群失调导致的免疫紊乱也可能与脾虚痹证的发生有关^[69],基于 GC-MS 技术的代谢组学研究发现了脾虚证大鼠的多种差异代谢物^[70]。脾虚证动物模型的造模方法包括苦寒泻下法等病因病机造模法和以利血平为代表的药物造模法,及综合多种方法的多因素造模方法^[71]。刘德芳等^[72]选择雄性 Wistar 大鼠,给予高脂饮食和高湿度环境喂养,并通过皮下注射 CFA 建立脾虚痹证大鼠模型,脾虚痹证大鼠与 AA 大鼠相比,精神萎靡、进食减少,脾组织 Na⁺, K⁺-ATPase 活性明显降低。王明珠等^[73]的研究发现冰水潮湿诱发的脾虚证小鼠血清中 α 淀粉酶、胃泌素和胰蛋白酶水平显著下降,通过冰水潮湿和 CII 诱导建立的脾虚痹证模型与 CIA 模型组比,脾虚痹证模型小鼠的血清 IL-6、粒细胞集落刺激因子水平显著升高,表明脾虚证加重了 CII 诱导的关节炎症。

1.3.5 血瘀证病证结合模型

瘀血阻络所致的关节疼痛可见于痹证发展

的各个时期,血瘀证动物模型的造模方法包括冰水刺激、疲劳运动和外伤等病因造模方法、以肾上腺素为代表的药物造模方法和联合多种方法的多因素造模方法^[74]。基于代谢组学和蛋白质组学的研究发现了多种与肾上腺素诱发的血瘀证大鼠发病相关的差异代谢物和差异表达蛋白,涉及葡萄糖代谢、脂肪酸代谢、胆酸代谢等代谢途径和补体与凝血级联反应、血小板活化与聚集等关键通路^[75-76]。陈文佳等^[77]通过皮下注射 C II 和盐酸肾上腺素,并联合冰水刺激的方法建立 RA 血瘀证模型,与 CIA 模型相比,血瘀证病证结合模型大鼠的血浆黏度、红细胞压积、血小板计数和纤维蛋白原显著升高,表明血瘀证加剧了 CIA 模型的血液流变性、凝血功能、血小板功能和内皮功能的异常变化,大鼠可能处于“血瘀”状态,接近临床血瘀证的证候特点。

2 体外模型

得益于生物工程技术的进步,从组织外植体到 3D 共培养系统的研究取得了显著的进展,构建一种与 RA 病理生理接近的体外模型对于药物的早期筛选,发病机制、药理与毒理研究和减少实验动物的使用意义重大。

2.1 组织外植体

来自 RA 患者的组织外植体具有与 RA 最接近的生理相似性,是研究细胞反应、细胞外基质重塑过程和软骨的有力工具,但其容易受到个体健康状况、药物、样品制备和供应血管中断的影响,从外植体边缘开始的细胞死亡限制了模型的使用时长,SPINNEN 等^[78]开发了一种从人软骨组织中大批量制备软骨切片培养物的方法,单个组织样本即可获得多达 100 个外植体培养物,组织细胞活力能够在 3 周内保持稳定。基于来自 RA 患者的滑膜外植体,DORST 等^[79]证明了抗成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)靶向光动力疗法以光剂量依赖性方式诱导原代 RA FLS 死亡,用于 RA 靶向局部治疗的潜力。

2.2 体外 2D 模型

2D 单层细胞培养简单,成本较低,用于确定化合物最佳浓度、分析基因表达谱和高通量筛选。CHWASTEK 等^[80]建立了一个包含神经上皮

干细胞和 FLS 的 2D 共培养模型,首次将含有 FLS 的半透膜插件引入神经细胞培养物中,研究神经元细胞对 FLS 分泌的促炎因子的反应。2D 共培养系统在研究细胞-细胞、细胞-微环境或细胞-体液相互作用方面具有一定的优势,CHIU 等^[81]通过人间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)和 FLS 的共培养系统,发现 IL-1 β 刺激的 MSC 通过淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1)与胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)相互作用粘附在 FLS 上,然后分泌肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)诱导 FLS 凋亡,证明 MSCs 在 RA 治疗中的潜力。但过于简化的 2D 模型在研究细胞形态、多样性、周期进程和分化能力方面存在一定的局限性^[82]。

2.3 体外 3D 模型

与 2D 模型相比,3D 模型在研究细胞与基质相互作用、增殖、分化和迁移,以及模拟关节的结构特征方面具有显著优势^[83]。关节炎症的标志是 FLS 过度增殖和免疫细胞浸润,基于 FLS、血管内皮细胞(endothelial cells, EC)和 3D 支架构建的滑膜模型为研究 RA 滑膜组织微环境提供了一种重要工具^[84]。通过在 3D 支架上培养患者来源的滑膜细胞以模拟 RA 的炎性微环境和细胞-基质相互作用,在 RA 发病机制研究、药物筛选和开发个性化治疗方案中拥有巨大潜力, BONELLI 等^[85]使用由 FLS 组成的 3D 模型发现干扰素调节因子 1(interferon regulatory factor 1, IRF1)是干扰素介导的炎症级联反应的关键调节因子。关节软骨由软骨细胞和胶原蛋白组成,对于吸收机械负荷和保护软骨下骨起着重要作用,3D 软骨模型通常基于 C II、天然凝胶、海藻酸微球、透明质酸或壳聚糖制成的多孔支架构建^[86], DAMERAU 等^[87]开发了一种由 MSC 衍生的 3D 软骨模型,通过在 3D 无支架软骨组件和磷酸三钙中共培养间充 MSC 衍生的骨骼和软骨成分以建立 3D 骨软骨组织模型,使用 TNF- α 等促炎因子诱导软骨退化和骨破坏,以研究骨软骨降解过程中细胞因子驱动的细胞和基质相关变化,并验证了其作为临床前药物筛选工具的潜力。骨质流失和骨侵蚀是 RA 的重要特征之一,骨骼是一种动态的、高度血

管化的结缔组织,钙化和矿化在骨组织的形成过程中至关重要,THRIVIKRAMAN 等^[88]建立了一种由 MSC、EC 和神经母细胞瘤细胞组成,基于钙和磷酸盐介质及非胶原蛋白类似物的仿生骨组织模型,成功模拟了骨骼的纳米级钙化和细胞与矿物质的相互作用。3D 滑膜模型和 3D 骨软骨模型相结合的多组分体外 3D 共培养模型对于研究 RA 发病过程中的滑膜炎症、软骨和骨损伤至关重要,但目前还没有合适的多组分体外模型能够模拟健康或炎症关节的生理病理特征。

2.4 微流控芯片

微流控技术通过在区室化的 3D 微环境中构建精细的生理模型,模拟人体组织和器官的微观结构、化学梯度和生物力,进而实现对组织形态、生理功能和代谢产物的动态监测与分析,在 RA 相关机制研究、药物评估、毒性测试和个性化医疗中潜力巨大^[89]。THOMPSON 等^[90]基于市售器官芯片系统开发了一种由 FLS 和 EC 组成,具有生物力和炎症因子刺激的血管化滑膜芯片,以模拟 RA 滑膜炎症的生理病理特征,用于研究关节炎炎症机制和创新疗法测试,可通过在滑膜芯片中嵌入光电探测器阵列,以监测 3D 模型中的细胞增殖、侵袭和基质凝聚过程^[91]。PETTA 等^[92]使用 3D 打印的微流控装置建立了一个包含滑膜和软骨的关节芯片,其组成包括 FLS、软骨细胞和由胶原蛋白、蛋白聚糖和透明质酸组成的软骨基质,软骨-滑膜双类器官模型为研究组织水平的串扰提供了一个有力工具^[93],以提高我们对 RA 复杂病理生理机制的理解,并开发和验证新的治疗方法,此外,微流控芯片也有望作为诊断工具对疾病进行早期诊断^[94]。

3 总结与展望

自 20 世纪 50 年代 AA 模型建立以来,各种诱导性模型和自发性基因修饰模型不断涌现,逐渐从啮齿类发展至非人灵长类动物,造模和评价方法不断完善,动物模型的发病机制也基本清晰,得益于此,RA 发病机制与治疗药物的研究取得了显著进展。尽管大多数动物模型都表现出与人 RA 类似关节病理特征,如炎性细胞浸润、滑膜增生、血管翳形成、软骨破坏和骨侵蚀,但由于诱导方法和种属差异的限制,以及 RA 复杂的发

病机制,目前尚无一种动物模型能够全面反映 RA 的临床特点,包括诱导性模型的自限性,较少的关节外并发症及无内源性免疫耐受失衡过程等,因此,探寻一种能科学全面反映 RA 特点的动物模型对于 RA 发病机制研究和药物筛选评价都具有重要意义。

中医药在 RA 的治疗中发挥着不可替代的作用,目前基于中医理论并结合 RA 病因病机建立的中医病证结合动物模型已经取得了一定进展,模型制备方法日趋成熟,并能体现部分中医证候特点,但仍存在许多不足之处,包括造模方法简单、标准不一,与临床病证并不完全吻合,且缺乏量化的评价标准。如何实现动物模型评价指标的客观标准化,并将其应用于中医证候研究仍需更进一步的研究,建立体现中医辨证论治与现代医学疾病理论的病证结合动物模型,对于阐明中药复方的作用特点和中医药现代化意义重大。

生物技术和生物材料的创新促进了 RA 3D 体外模型的发展,为高通量筛选技术和药理毒理研究提供了一个新平台,加速了新药开发进程。但目前的 3D 共培养系统仍不能完全复制关节中复杂的细胞组成,同时标准化评价方法的缺乏也限制了 3D 体外模型的应用。因此,开发包含多种细胞类型的标准化培养系统,将不同的 3D 培养模型相结合,对于 RA 的发病机制研究和药物开发都至关重要。

近年来,免疫细胞和炎症因子抑制剂及干细胞疗法已成为新的研究热点,基于现有实验模型的深入研究、改良和新模型的开发有望大大加速创新疗法的研究进程。

参 考 文 献 (References)

- [1] TIAN X, LI M, ZENG X. The current status and challenges in the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis in China; an annual report of 2019 [J]. *Rheumatol Immunol Res*, 2021, 2(1): 49-56.
- [2] ŠTEIGEROVÁ M, ŠÍMA M, SLANAŘ O. Pathogenesis of collagen-induced arthritis: role of immune cells with associated cytokines and antibodies, comparison with rheumatoid arthritis [J]. *Folia Biol*, 2023, 69(2): 41-49.
- [3] ROSLONIEC E F, WHITTINGTON K, PROSLOVSKY A, et al. Collagen-induced arthritis mouse model [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(12): e313.
- [4] 孙文婷, 万盈盈, 杨家熙, 等. 性别差异对牛 II 型胶原诱

- 导的类风湿关节炎模型的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 25-34.
- SUN W T, WAN Y Y, YANG J X, et al. Effect of gender difference on the model of rheumatoid arthritis induced by bovine type II collagen [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 25-34.
- [5] DE S, KUNDU S, CHATTERJEE M. Generation of a robust model for inducing autoimmune arthritis in Sprague Dawley rats [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2020, 102: 106659.
- [6] 刘家望, 王宏伟, 许江城, 等. 改进型胶原诱导的小鼠关节炎动物模型的建立[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(2): 98-108.
- LIU J W, WANG H W, XU J C, et al. Establishment of an improved mouse model of collagen-induced arthritis [J]. Chin J Vet Med, 2020, 56(2): 98-108.
- [7] NA H S, LEE S Y, MIN H K, et al. The establishment of a rheumatoid arthritis primate model in macaca fascicularis [J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 264.
- [8] WONG H, LIU L, OUYANG W, et al. Exposure-effect relationships in established rat adjuvant-induced and collagen-induced arthritis; a translational pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 369(3): 406-418.
- [9] SO I S, KANG J H, HONG J W, et al. A novel apoptosis probe, cyclic ApoPep-1, for *in vivo* imaging with multimodal applications in chronic inflammatory arthritis [J]. Apoptosis, 2021, 26(3/4): 209-218.
- [10] LORD A E, ZHANG L, ERICKSON J E, et al. Quantitative *in vivo* micro-computed tomography for monitoring disease activity and treatment response in a collagen-induced arthritis mouse model [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 2863.
- [11] NOSRATI Z, BERGAMO M, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C, et al. Refinement and validation of infrared thermal imaging (IRT); a non-invasive technique to measure disease activity in a mouse model of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2020, 22(1): 281.
- [12] WANG Z, TONG Z, CHEN H, et al. Photoacoustic/ultrasonic dual-mode imaging for monitoring angiogenesis and synovial erosion in rheumatoid arthritis [J]. Photoacoustics, 2023, 29: 100458.
- [13] WANG S, ZHOU Y, HUANG J, et al. Advances in experimental models of rheumatoid arthritis [J]. Eur J Immunol, 2023, 53(1): e2249962.
- [14] 李日许, 叶晓彤, 陈健钊, 等. 风湿性关节炎胶原诱导型与佐剂诱导型大鼠模型的建立与对比分析 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(2): 49-60.
- LI R X, YE X T, CHEN J Z, et al. Establishment and comparative analysis of collagen-induced arthritis(CIA) and adjuvant-induced arthritis (AA) rat models of rheumatoid arthritis [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(2): 49-60.
- [15] NOH A S M, CHUAN T D, KHIR N A M, et al. Effects of different doses of complete Freund's adjuvant on nociceptive behaviour and inflammatory parameters in polyarthritic rat model mimicking rheumatoid arthritis [J]. PLoS One, 2021, 16(12): e0260423.
- [16] INGRAM S, CHISHOLM K I, WANG F, et al. Assessing spontaneous sensory neuron activity using *in vivo* calcium imaging [J]. Pain, 2024, 165(5): 1131-1141.
- [17] LIU Y, XIE W, TANG Z, et al. A reconfigurable integrated smart device for real-time monitoring and synergistic treatment of rheumatoid arthritis [J]. Sci Adv, 2024, 10(18): eadj0604.
- [18] KESSLER J, TOTOSON P, DEVAUX S, et al. Animal models to study pathogenesis and treatments of cardiac disorders in rheumatoid arthritis: advances and challenges for clinical translation [J]. Pharmacol Res, 2021, 170: 105494.
- [19] BORDY R, MORETTO J, DEVAUX S, et al. Adjuvant-induced arthritis is a relevant model to mimic coronary and myocardial impairments in rheumatoid arthritis [J]. Joint Bone Spine, 2021, 88(1): 105069.
- [20] CHANG M H, LEVESCOT A, NELSON-MANEY N, et al. Arthritis flares mediated by tissue-resident memory T cells in the joint [J]. Cell Rep, 2021, 37(4): 109902.
- [21] DI CEGLE I, ASCONE G, CREMERS N A J, et al. Fcγ receptor-mediated influx of S100A8/A9-producing neutrophils as inducer of bone erosion during antigen-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 80.
- [22] TOPPING L M, ROMERO-CASTILLO L, URBONAVICIUTE V, et al. Standardization of antigen-emulsion preparations for the induction of autoimmune disease models [J]. Front Immunol, 2022, 13: 892251.
- [23] MARÍN-PRIDA J, RODRÍGUEZ-ULLOA A, BESADA V, et al. The effects of phycocyanobilin on experimental arthritis involve the reduction in nociception and synovial neutrophil infiltration, inhibition of cytokine production, and modulation of the neuronal proteome [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1227268.
- [24] FREY O, HÜCKEL M, GAJDA M, et al. Induction of chronic destructive arthritis in SCID mice by arthritogenic fibroblast-like synoviocytes derived from mice with antigen-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 261.
- [25] 范凯健, 吴菁, 王婷玉. 胶原诱导与抗原诱导 C57BL/6 小鼠类风湿关节炎造模的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 31-35.
- FAN K J, WU J, WANG T Y. Comparison of collagen-

- induced and antigen-induced C57BL/6 mouse models of rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28 (11): 31–35.
- [26] WILLIAMS B, LEES F, TSANGARI H, et al. Effects of mild and moderate monoclonal antibody dose on inflammation, bone loss, and activation of the central nervous system in a female collagen antibody-induced arthritis mouse model [J]. *J Histochem Cytochem*, 2021, 69(8): 511–522.
- [27] BERSELLINI FARINOTTI A, WIGERBLAD G, NASCIMENTO D, et al. Cartilage-binding antibodies induce pain through immune complex-mediated activation of neurons [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(8): 1904–1924.
- [28] KURTOVIĆ Z, SANDOR K, TER HEEGDE F, et al. circRNA landscape in dorsal root Ganglia from mice with collagen antibody-induced arthritis [J]. *Neurobiol Pain*, 2023, 14: 100142.
- [29] SU J, KROCK E, BARDE S, et al. Pain-like behavior in the collagen antibody-induced arthritis model is regulated by lysophosphatidic acid and activation of satellite Glia cells [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 101: 214–230.
- [30] WALTHER A R, STEPULA E, DITZEL N, et al. *In vivo* longitudinal monitoring of disease progression in inflammatory arthritis animal models using raman spectroscopy [J]. *Anal Chem*, 2023, 95(7): 3720–3728.
- [31] MALEITZKE T, WEBER J, HILDEBRANDT A, et al. Standardized protocol and outcome measurements for the collagen antibody-induced arthritis mouse model [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(4): 101718.
- [32] LECETA J, GARIN M I, CONDE C. Mechanism of immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in the K/BxN mice model of autoimmune arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 701862.
- [33] MATSUMOTO I, KURATA I, OHYAMA A, et al. Revisit of autoimmunity to glucose-6-phosphate isomerase in experimental and rheumatoid arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2020, 30(2): 232–238.
- [34] LOPEZ-SANTALLA M, CONDE C, RODRIGUEZ-TRILLO A, et al. Assessment of mesenchymal stem/stromal cell-based therapy in K/BxN serum transfer-induced arthritis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 943293.
- [35] CHRISTENSEN A D, HAASE C, COOK A D, et al. K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 213.
- [36] KONDO N, KURODA T, KOBAYASHI D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 10922.
- [37] LI P, SCHWARZ E M. The TNF- α transgenic mouse model of inflammatory arthritis [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2003, 25(1): 19–33.
- [38] BELL R D, WU E K, RUDMANN C A, et al. Selective sexual dimorphisms in musculoskeletal and cardiopulmonary pathologic manifestations and mortality incidence in the tumor necrosis factor-transgenic mouse model of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(9): 1512–1523.
- [39] 赵文婷. 类风湿关节炎中医寒痹证候模型向热痹证候模型转化的实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2021.
- ZHAO W T. Experimental study on transformation of the animal model of cold Bi syndrome to heat bi syndrome in rheumatoid arthritis [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2021.
- [40] ISHIWATARI-OGATA C, KYUUMA M, OGATA H, et al. Ozoralizumab, a humanized anti-TNF α NANOBODY[®] compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNF α IgG [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 853008.
- [41] TAKEUCHI Y, HIROTA K, SAKAGUCHI S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2020, 294(1): 164–176.
- [42] GUERARD S, BOIERI M, HULTQVIST M, et al. The SKG mutation in ZAP-70 also confers arthritis susceptibility in C57 black mouse strains [J]. *Scand J Immunol*, 2016, 84(1): 3–11.
- [43] BAILLET A C, REHAUME L M, BENHAM H, et al. High chlamydia burden promotes tumor necrosis factor-dependent reactive arthritis in SKG mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(6): 1535–1547.
- [44] SENDO S, SAEGUSA J, YAMADA H, et al. Tofacitinib facilitates the expansion of myeloid-derived suppressor cells and ameliorates interstitial lung disease in SKG mice [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 184.
- [45] 刘蔚翔, 巩勋, 姜泉, 等. 类风湿关节炎湿热与寒湿证候的病机特点分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1088–1091.
- LIU W X, GONG X, JIANG Q, et al. Analysis of the disease characteristics of rheumatoid arthritis syndrome of dampness-heat and cold-dampness [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(2): 1088–1091.
- [46] 张逢, 戴宗顺, 林也, 等. “风寒湿”外邪影响 Th17/Treg 失衡促进类风湿关节炎病证发生的分子机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(11): 1657–1662.
- ZHANG F, DAI Z S, LIN Y, et al. Mechanistic studies of Th17/treg imbalance influenced by exogenous wind-cold-damp pathogens on the development of rheumatoid arthritis [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2021, 41(11): 1657

- 1662.
- [47] 林也, 廖菁, 戴宗顺, 等. 风寒湿外邪作用于 EPO 影响痹证(类风湿关节炎)的发生 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(3): 345-349.
LIN Y, LIAO J, DAI Z S, et al. Exogenous wind-cold-damp on EPO affects the occurrence of Bi syndrome (rheumatoid arthritis) [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(3): 345-349.
- [48] 宋雨萱, 王佳丽, 郑智礼, 等. 模拟外湿环境探讨外湿对正常及类风湿关节炎大鼠线粒体自噬的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(3): 417-422, 493.
SONG Y X, WANG J L, ZHENG Z L, et al. The effect of external humidity on mitochondrial autophagy in normal and rheumatoid arthritis rats-discussed by simulating the external wet environment [J]. Prog Mod Biomed, 2023, 23(3): 417-422, 493.
- [49] 靳荃, 青千裕, 郜宪明, 等. 甘草附子汤对小鼠疼痛模型及寒湿证疼痛模型止痛作用比较研究 [J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(5): 338-341.
JIN Q, QING Q Y, GAO X M, et al. Analgesic effect of Gancao Fuzi Decoction on the pain mice model with cold-damp syndrome and pain mice model [J]. J Shanxi Univ Chin Med, 2020, 21(5): 338-341.
- [50] 林也, 戴宗顺, 张婷, 等. 基于“以方测证”的类风湿关节炎风寒湿痹证动物模型的构建研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 668-672.
LIN Y, DAI Z S, ZHANG T, et al. Construction of animal model of rheumatoid arthritis with wind cold dampness arthralgia syndrome based on the theory of “testing syndrome by formula” [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(5): 668-672.
- [51] 欧阳丹, 李鑫, 湛港香, 等. 乌头汤通过下调 HIF-1 α /VEGFA/Ang 信号通路抑制 AIA 风寒湿痹证大鼠血管翳形成 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(9): 10-18.
OUYANG D, LI X, ZHAN G X, et al. Inhibition of pannus formation by Wutoutang in AIA rats with wind-cold-dampness Bi syndrome via down-regulating HIF-1 α /VEGFA/Ang signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(9): 10-18.
- [52] 周文涛, 马薇娜, 豆江移, 等. 寒湿痹证小鼠模型的制备及寒湿淫致痹机制初探 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20(12): 141-144.
ZHOU W T, MA W N, DOU J Y, et al. Construction of the mouse model of cold-dampness arthromyodynia and research on the mechanism of arthromyodynia induced by cold and dampness [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2022, 20(12): 141-144.
- [53] 何东初, 李蒋风. 基于代谢组学探讨痹症宁方治疗风寒湿痹型类风湿关节炎的作用机制 [J]. 中国医药导报, 2023, 20(34): 21-25, 35.
HE D C, LI J F. Explore the action mechanism of Bizhengning Decoction in the treatment of wind-cold-dampness bi type rheumatoid arthritis based on metabonomics [J]. Chin Med Her, 2023, 20(34): 21-25, 35.
- [54] 朱兴旺, 赵文婷, 赵晓峰, 等. 基于人 TNF- α 转基因关节炎小鼠建立寒痹模型及评价 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(4): 448-452, 461.
ZHU X W, ZHAO W T, ZHAO X F, et al. Establishment and evaluation of cold arthralgia model based on human TNF- α transgenic arthritis mice [J]. Chin J Immunol, 2022, 38(4): 448-452, 461.
- [55] 刘涛, 王永辉, 江晓智, 等. 不同类风湿关节炎模型制备方法对大鼠血清炎症因子和滑膜自噬蛋白表达的影响 [J]. 中国药物与临床, 2021, 21(13): 2249-2251.
LIU T, WANG Y H, JIANG X Z, et al. Impacts of model preparation methods on the expression of serum inflammatory factors and synovial autophagy protein in rats with rheumatoid arthritis [J]. Chin Remedies Clin, 2021, 21(13): 2249-2251.
- [56] 尚玉巧. TRPV1 致敏和脱敏建立类风湿关节炎热痹与寒痹证候模型的实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2023.
SHANG Y Q. Experimental study on establishment of heat bi and cold bi syndrome model in rheumatoid arthritis by sensitization and desensitization of TRPV1 [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2023.
- [57] 张婷. 基于炎症细胞因子表达谱的类风湿关节炎不同辨证分型临床与基础研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2021.
ZHANG T. Clinical and basic research on different syndrome differentiation types of rheumatoid arthritis based on inflammatory cytokine expression profile [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine; 2021.
- [58] 富丽萍, 李佳钰, 陆麒麟, 等. 从炎症、凋亡与自噬评价 Mtb 诱导类风湿关节炎风湿热痹动物模型 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(23): 44-52.
FU L P, LI J Y, LU Q J, et al. Evaluation of animal model of rheumatoid arthritis induced by mycobacterium tuberculosis from inflammation, apoptosis and autophagy [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(23): 44-52.
- [59] 韦乃球, 周玲梅, 成观凤, 等. 祛风湿中药威灵仙、豨莶草对痹证大鼠作用的性-效关系研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(13): 1520-1529
WEI N Q, ZHOU L M, CHENG G F, et al. Study on the property-efficacy relationship of antirheumatic traditional chinese medicine Clematidis Radix et Rhizoma and

- Siegesbeckiae Herba on arthralgia syndrome rats [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2024, 44(13): 1520-1529
- [60] 杨东宇, 赵中亭, 陈家涟, 等. 类风湿性关节炎热痹证大鼠模型的复制与评价 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(8): 2042-2045.
- YANG D Y, ZHAO Z T, CHEN J L, et al. Replication and evaluation of rat model of rheumatoid arthritis with heat arthralgia syndrome [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2021, 32(8): 2042-2045.
- [61] 朱兴旺, 赵文婷, 宣亚男, 等. 风寒湿热环境对胶原诱导性关节炎大鼠模型中医证型的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(12): 1476-1482.
- ZHU X W, ZHAO W T, XUAN Y N, et al. Effects of wind cold dampness heat environment on traditional Chinese medicine syndrome types in collagen induced arthritis model rats [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2021, 41(12): 1476-1482.
- [62] 梁露莹, 林鸿鑫, 蔡义思, 等. 基于 16S rDNA 测序研究当归拈痛汤对风湿热痹佐剂性关节炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(9): 18-27.
- LIANG L Y, LIN H X, CAI Y S, et al. Effect of Danggui Niantongtang on intestinal flora in adjuvant-induced arthritis rats of wind-dampness-heat arthralgia: based on 16S rDNA sequencing [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2023, 29(9): 18-27.
- [63] 崔玮, 孙理军. 基于中医理论探讨肾虚动物模型的造模方式 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(11): 2737-2739.
- CUI W, SUN L J. Study on the modeling method of animal model of kidney deficiency based on TCM theory [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2021, 32(11): 2737-2739.
- [64] 王玲, 陈佳, 陈客宏, 等. 一种 Parkin 基因敲除小鼠肾虚证动物模型的建立 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2021, 22(8): 669-672, 754.
- WANG L, CHEN J, CHEN K H, et al. Establishment of an animal model of parkin gene knockout mice with kidney deficiency syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2021, 22(8): 669-672, 754.
- [65] LU Q, ZHANG J, XIN L, et al. Integrated gas chromatography-mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry renal metabolomics and lipidomics deciphered the metabolic regulation mechanism of Gushudan on kidney-Yang-deficiency-syndrome rats [J]. *J Sep Sci*, 2023, 46(13): e2300124.
- [66] XIN L, REN M, LOU Y, et al. Integrated UHPLC-MS untargeted metabolomics and gut microbe metabolism pathway-targeted metabolomics to reveal the prevention mechanism of Gushudan on kidney-Yang-deficiency-syndrome rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 242: 116062.
- [67] 叶亲彬. 二至丸联合甲氨蝶呤对肾虚痹证大鼠骨稳态失衡的作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2022.
- YE Q B. Effect and mechanism of Erzhi pills combined with Methotrexate on bone homeostasis imbalance in rats with Bi syndrome of kidney deficiency [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2022.
- [68] 陶黎, 刘梅洁, 薛欣, 等. 益肾蠲痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(5): 420-426.
- TAO L, LIU M J, XUE X, et al. Impact of Yishen Juanbi Wan on ankle bone destruction of kidney deficiency collagen-induced arthritis rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 59(5): 420-426.
- [69] 官美惠, 黄艺晨, 韩婷芬, 等. 基于肠屏障损害探讨类风湿关节炎脾虚湿蕴毒蕴结病机的生物学基础 [J]. *新中医*, 2023, 55(1): 13-17.
- GUAN M H, HUANG Y C, HAN T F, et al. Study on biological basis of pathogenesis of rheumatoid arthritis with accumulation of spleen deficiency and dampness toxin based on intestinal barrier dysfunction [J]. *New Chin Med*, 2023, 55(1): 13-17.
- [70] 刘明. 基于肠道菌群和 GC-MS 技术的脾气虚动物模型的生物学机制分析 [D]. 长春: 长春中医药大学; 2022.
- LIU M. Biological mechanism analysis of spleen-qi deficiency animal model based on intestinal flora and GC-MS technology [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine; 2022.
- [71] 张永龙, 马唯刚, 钱星羽, 等. 脾虚证实验动物模型构建及评价方法的研究述评 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(3): 385-396.
- ZHANG Y L, MA W G, QIAN X Y, et al. Construction of experimental animal models and evaluation of spleen deficiency syndrome; a review [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(3): 385-396.
- [72] 刘德芳, 张耀雷, 刘碧莹, 等. 基于脾虚湿阻研究佐剂性关节炎大鼠模型炎症因子、钠钾 ATP 酶及病理组织学变化 [J]. *风湿病与关节炎*, 2023, 12(1): 1-5.
- LIU D F, ZHANG Y L, LIU B Y, et al. Study on inflammatory factors, Na⁺, K⁺-ATPase and histopathological changes of adjuvant arthritis rat model based on spleen deficiency and dampness obstruction [J]. *Rheum Arthr*, 2023, 12(1): 1-5.
- [73] 王明珠, 黄琳, 李海昌, 等. 冰水潮湿诱发的脾虚对 DBA/1 小鼠胶原诱导型关节炎的影响及参苓白术散的“以方测证” [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(11): 6781-6784.

- WANG M Z, HUANG L, LI H C, et al. Effects of drinking ice water and high humidity induced spleen deficiency on CIA disease in DBA/1 mice and the 'counter evidence' of Shenling Baizhu Powder [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(11): 6781-6784.
- [74] 于嘉莹, 张会永, 王凤, 等. 九种血瘀证动物模型造模方法研究进展与评述 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(12): 4855-4864.
- YU J Y, ZHANG H Y, WANG F, et al. Research progress and review of nine animal models of blood stasis syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(12): 4855-4864.
- [75] 胡广, 李瑛, 杨会珍, 等. 基于蛋白质组学探讨慢性血瘀证大鼠的发病机理 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(11): 1796-1801.
- HU G, LI Y, YANG H Z, et al. Study on the pathogenesis of chronic blood stasis syndrome in rats based on proteomics [J]. J Basic Chin Med, 2022, 28(11): 1796-1801.
- [76] 胡广, 杨会珍, 张国瑗, 等. 基于代谢组学技术研究不同剂量肾上腺素血瘀证模型的作用机制 [J]. 世界中医药, 2023, 18(12): 1672-1678, 1683.
- HU G, YANG H Z, ZHANG G Y, et al. Mechanism of blood stasis syndrome model induced by different doses of epinephrine based on metabolomics technology [J]. World Chin Med, 2023, 18(12): 1672-1678, 1683.
- [77] 陈文佳, 李涛, 胥明珠, 等. 基于症状映射的类风湿关节炎瘀血阻络证生物内涵研究及其病证结合动物模型建立和评价 [J]. 药学报, 2023, 58(8): 2434-2441.
- CHEN W J, LI T, XU M Z, et al. Exploring biological connotation of blood stasis syndrome of rheumatoid arthritis and establishment of improved animal models based on syndrome-symptom mapping [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(8): 2434-2441.
- [78] SPINNEN J, SHOPPERLY L K, RENDENBACH C, et al. A novel method facilitating the simple and low-cost preparation of human osteochondral slice explants for large-scale native tissue analysis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6394.
- [79] DORST D N, RIJPKEMA M, BUITINGA M, et al. Targeting of fibroblast activation protein in rheumatoid arthritis patients: imaging and *ex vivo* photodynamic therapy [J]. Rheumatology, 2022, 61(7): 2999-3009.
- [80] CHWASTEK J, KĘDZIORA M, BORCZYK M, et al. Mimicking the human articular joint with *in vitro* model of neurons-synoviocytes co-culture [J]. Int J Stem Cells, 2024, 17(1): 91-98.
- [81] CHIU Y H, LIANG Y H, HWANG J J, et al. IL-1 β stimulated human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate rheumatoid arthritis via inducing apoptosis of fibroblast-like synoviocytes [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 15344.
- [82] DAMERAU A, GABER T. Modeling rheumatoid arthritis *in vitro*: from experimental feasibility to physiological proximity [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 7916.
- [83] YUN C, KIM S H, KIM K M, et al. Advantages of using 3D spheroid culture systems in toxicological and pharmacological assessment for osteogenesis research [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(5): 2512.
- [84] KIM D, HEO J, SONG B, et al. 3D *in vitro* synovial hyperplasia model on polycaprolactone-micropatterned nanofibrous microwells for screening disease-modifying anti-rheumatic drugs [J]. Mater Today Bio, 2024, 26: 101061.
- [85] BONELLI M, DALWICK K, PLATZER A, et al. IRF1 is critical for the TNF-driven interferon response in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes: JAKinibs suppress the interferon response in RA-FLS [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(7): 1-11.
- [86] XIE R, PAL V, YU Y, et al. A comprehensive review on 3D tissue models: Biofabrication technologies and preclinical applications [J]. Biomaterials, 2024, 304: 122408.
- [87] DAMERAU A, PFEIFFENBERGER M, WEBER M C, et al. A human osteochondral tissue model mimicking cytokine-induced key features of arthritis *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): 128.
- [88] THRIVIKRAMAN G, ATHIRASALA A, GORDON R, et al. Rapid fabrication of vascularized and innervated cell-laden bone models with biomimetic intrafibrillar collagen mineralization [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3520.
- [89] LI Z A, SANT S, CHO S K, et al. Synovial joint-on-a-chip for modeling arthritis: progress, pitfalls, and potential [J]. Trends Biotechnol, 2023, 41(4): 511-527.
- [90] THOMPSON C L, HOPKINS T, BEVAN G, et al. Human vascularised synovium-on-a-chip: a mechanically stimulated, microfluidic model to investigate synovial inflammation and monocyte recruitment [EB/OL]. [2023-10-10]. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acf976>.
- [91] ROTHBAUER M, HÖLL G, EILENBERGER C, et al. Monitoring tissue-level remodelling during inflammatory arthritis using a three-dimensional synovium-on-a-chip with non-invasive light scattering biosensing [J]. Lab Chip, 2020, 20(8): 1461-1471.
- [92] PETTA D, D'ARRIGO D, SALEHI S, et al. A personalized osteoarthritic joint-on-a-chip as a screening platform for biological treatments [J]. Mater Today Bio, 2024, 26: 101072.
- [93] ROTHBAUER M, BYRNE R A, SCHOBESBERGER S, et al. Establishment of a human three-dimensional chip-based chondro-synovial coculture joint model for reciprocal cross

talk studies in arthritis research [J]. Lab Chip, 2021, 21
(21): 4128-4143.

2024, 556: 117841

[94] KUMAR A S, VENKATESALU S, DILLIYAPPAN S, et al.
Microfluidics as diagnostic tools [J]. Clin Chim Acta,

[收稿日期] 2024-06-28

一种全新的糖尿病自发性高甘油三酯血症仓鼠模型

张灵芝, 王雨辰

(中国医学科学院药物研究所药理室)

长期以来,金黄地鼠(又名仓鼠)因其血脂代谢模式与人类相似,常常被作为研究人类代谢性疾病的动物模型。日前,北京大学医学部刘国庆课题组在 *Animal Models and Experimental Medicine*, AMEM 上发表一篇 SHORT COMMUNICATION, 揭示一种全新的糖尿病自发性高甘油三酯血症仓鼠模型。

糖尿病常常伴随着高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia, HTG)并发症,HTG 被认为是糖尿病血管并发症的风险因素之一。在建立动物模型过程中,诱导糖尿病高甘油三酯血症通常需要高脂肪饮食。本文利用新开发的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体基因敲除仓鼠模型,以期探究该动物模型是否会在糖尿病病发过程中,不进行饮食控制的情况下发生 HTG。

以野生型仓鼠和 LDL 受体基因缺陷的杂合子仓鼠为研究对象,通过腹腔注射链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱发糖尿病,监测 60 d 内的血糖、甘油三酯和胆固醇变化。通过强饲法给予橄榄油,测定血浆中甘油三酯清除率。于诱发糖尿病后第 60 天,评估胰岛素对糖尿病 HTG 的影响。注射 STZ 后第 7 天,与对照组相比,野生型仓鼠和杂合子仓鼠的血糖增加了 3 倍多,而血浆胰岛素降至对照组的 30%,并在 60 d 内保持稳定。注射 STZ 后第 7 天,野生型仓鼠的血浆 TG 保持不变,但随后略有增加。相反,杂合子仓鼠在第 7 天时,表现出严重的 HTG,直至研究结束。橄榄油强饲法显示,尽管杂合子仓鼠注射肝素后,血浆中的脂蛋白脂肪酶活性显著降低,但与野生型动物相比,杂合子仓鼠的血浆甘油三酯清除速度要慢得多。腹腔注射胰岛素后,杂合子仓鼠的高血糖和 HTG 可逆转至糖尿病前水平。

综上所述,患有糖尿病的 LDL 受体基因缺陷的杂合子仓鼠会自发形成严重的 HTG,并且对胰岛素有依赖性。这种仓鼠模型在遗传和冠状动脉粥样硬化病变的发展方面与人类家族性高胆固醇血症(FH)患者非常相似,有望有效应用于研究与人类糖尿病及 HTG 相关的并发症。

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*, 2024, 7(6): 955-960. doi: 10.1002/ame2.12490)。

董娟聪,王婧洁,于金环,等. 模式生物斑马鱼在放射医学研究中的应用现状[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 141-148.

DONG J C, WANG J J, YU J H, et al. Application status of the model organism zebrafish in radiation medicine research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 141-148.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.014

模式生物斑马鱼在放射医学研究中的应用现状

董娟聪^{1*}, 王婧洁¹, 于金环², 程娇¹, 党旭红¹, 杨国栋³

(1. 中国辐射防护研究院, 太原 030006; 2. 中韩(长春)国际合作示范区疾病预防控制中心, 长春 130051; 3. 中核四〇四有限公司, 甘肃 嘉峪关 735100)

【摘要】 斑马鱼作为一种介于细胞与传统哺乳动物之间的模式生物, 凭借其独特的优势在放射医学研究中展现出广阔的应用前景。其与人类基因有 87% 的同源性、高繁殖力、胚胎期短、透明易观察的胚胎等特点, 使其成为放射医学研究的重要工具。近期, 斑马鱼在低剂量辐射生物效应、放射治疗及辐射损伤防治等放射医学关键领域的应用取得了显著进展。本文综述了这些应用状况, 旨在挖掘斑马鱼在放射医学研究中的潜在价值, 为相关领域的实验研究提供借鉴与参考。

【关键词】 斑马鱼; 胚胎; 放射医学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0141-08

Application status of the model organism zebrafish in radiation medicine research

DONG Juancong^{1*}, WANG Jingjie¹, YU Jinhuan², CHENG Jiao¹, DANG Xuhong¹, YANG Guodong³

(1. China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China; 2. China-Korea (Changchun) International Cooperation Demonstration Zone Center for Disease Control and Prevention, Changchun 130051, China; 3. the 404 Company Limited, China National Nuclear Corporation, Jiayuguan 735100, China)

Corresponding author: DONG Juancong. E-mail: 15698331657@163.com

【Abstract】 As a model organism that bridges the gap between cells and traditional mammals, the zebrafish has broad application prospects in radiation medicine research. Among its unique advantages are its characteristics of a high homology with human genes, high fertility, short embryonic period, and transparent and easy to observe embryos, making it an important tool in radiation medicine research. Recently, remarkable progress has been made in the application of zebrafish to investigate low-dose radiation biological effects, radiation therapy, and radiation damage prevention and treatment, key areas of radiation medicine. In this paper, these applications are reviewed; we explore the value of zebrafish in radiation medicine research and provide a reference for experimental research in related fields.

【Keywords】 zebrafish; embryo; radiation medicine

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

核与辐射技术是一把“双刃剑”, 在为人类社会带来巨大福祉和便利的同时, 也潜藏着对人民生命健康和安全构成威胁的风险。电离辐射生

物效应及机制的阐明, 是核与辐射技术推广应用的重要基础。在进行电离辐射影响机体健康的相关实验研究中, 使用优质的研究对象非常重

[基金项目] 山西省基础研究计划青年科学研究项目(202103021223454)。

Funded by Youth Scientific Research Project of Shanxi Basic Research Program (202103021223454).

[作者简介] 董娟聪, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 放射医学。Email: 15698331657@163.com

要,当前运用最为广泛的实验动物是啮齿类,虽然便捷,但存在实验周期长,临床运用欠佳等不足。而斑马鱼,又称“水中小白鼠”,为一种介于细胞和传统哺乳动物的模式生物,其体外受精、强大的繁殖能力以及胚胎和幼体的透明性使得观察和研究变得极为便利。因此,借助斑马鱼胚胎作为实验研究对象,更能在放射医学研究领域开展更为深入和准确的研究。本文旨在探析斑马鱼在低剂量辐射生物效应、肿瘤放射治疗及辐射损伤防治研究中的应用,以期在斑马鱼在放射医学实验研究中的应用提供新的思路和方法。

1 斑马鱼简介

斑马鱼是起源于东南亚的热带淡水鱼,是一种进行脊椎动物研究的理想模式生物。它与人类基因有 87% 的同源性,使得在斑马鱼模型系统中获得的研究结果能够有效地应用于人类^[1]。相较于传统实验动物如小鼠、大鼠等,斑马鱼在经济方面更易于被接受,并具有以下的优势。

实验便利:(1)斑马鱼在胚胎、幼鱼及成鱼等不同发育阶段均适合进行实验研究。在胚胎发育的早期阶段,斑马鱼对电离辐射表现出高度的敏感性,使其成为研究辐射基因毒性和发育的理想模型^[2]。通过观察斑马鱼胚胎的形态和行为变化,易发现辐射导致的生长迟缓和各种畸形,可为研究辐射对胎儿发育的影响提供参考;(2)斑马鱼透明的胚胎和体外受精,有助于直接观察发育过程中的各种细节,而且无需牺牲亲代,为实验研究提供了极大的便利;(3)斑马鱼是体内成像的理想模式生物之一^[3]。随着荧光蛋白特异性标记的转基因斑马鱼品系构建技术的成熟,使研究者能够方便地观察特定细胞的行为,如血管生成、淋巴细胞管形成、造血干细胞迁移等,实现实时成像,进一步凸显了斑马鱼作为模式生物的优势;(4)成年斑马鱼眼睛位于身体两侧,便于解剖与观察,晶状体的结构和组分与人类极为相似,是研究辐射致眼晶状体损伤研究的理想模型;(5)斑马鱼的开放数据库资源,如斑马鱼信息网络(ZFIN) <http://zfin.org>、Ensembl 数据库 <https://asia.ensembl.org/index.html>、FishTaco 数据库 <https://borenstein-lab.github.io>、FishMapDB 数据库 <http://fishdb.ihb.ac.cn>、国家斑马鱼资源

中心 <http://159.226.163.90/>等,使得各种数据能够方便地获取,这为进一步利用斑马鱼作为研究对象提供了重要的支持。

实验周期短:斑马鱼胚胎发育迅速,受精后 48 h 即可清晰地识别出大脑、眼睛、心脏和肝等主要器官^[4]。在受精后 72 h,幼鱼孵化出,而主要器官开始发挥功能则在受精后 5 ~ 6 d。斑马鱼在 4 ~ 6 个月内即可性成熟。因此,利用斑马鱼进行辐射生物效应实验,可以在较短时间内获得电离辐射作用后机体整个生命过程的研究结果。

适宜用于大规模筛选:斑马鱼具有体外受精和产卵量大的特点,一条雌鱼和一条雄鱼一次产卵量为 50 ~ 300 个^[5]。这种特性使得斑马鱼成为适合进行大规模药物筛选的优质模型,因为它可以在孔板中同时测试多种药物,弥补了小鼠等模式动物产量少的不足。此外,斑马鱼还广泛应用于大规模遗传筛查研究中。

实验条件要求低:作为小型脊椎动物模型,斑马鱼具有饲养经济、对环境适应能力强的特点,可以在非动物实验室条件下进行研究。由于成年斑马鱼的体积非常小,空间占用少,且其受精和发育过程均在水中进行,因此非常适合进行太空搭载实验,用于空间辐射生物效应的研究。

结果客观准确:斑马鱼在水中完成整个受精和生长发育的过程,这使得辐照剂量的分布更加均匀。此外,斑马鱼的高生育率、短传代时间和大量的后代数量,减少了实验重复的时间,增强了统计效力,使实验结果更加可靠。

由于斑马鱼具有高繁殖力、短胚胎期、视觉上透明以及适合高通量筛选等诸多优势,美国国立卫生研究院已将其视为继小鼠和大鼠之后研究人类疾病的第 3 种脊椎动物模型^[6]。

2 斑马鱼在低剂量辐射生物效应研究中的应用

低剂量辐射是指剂量 < 100 mGy 或者剂量率 < 5 mGy/h 的电离辐射^[7]。目前关于低剂量辐射的生物学效应仍存在争议。对低剂量辐射健康影响的评估主要基于高剂量辐射生物效应的结果进行外推,因此对于长期暴露于低剂量辐射环境下的人员健康评估存在较大的不确定性。研

究人员在低剂量辐射作用后斑马鱼的孵化率、死亡率、畸变率、昼夜节律、运动功能、神经系统损伤及其机制等方面进行了大量研究,这些研究结果为低剂量辐射生物效应的研究提供了重要的参考。

2.1 孵化率、存活率及畸形率

孵化率、存活率及畸形率是斑马鱼受电离辐射作用后最直观的生物学指标。多项研究表明,低剂量辐照对斑马鱼胚胎的孵化率和存活率无明显影响。当斑马鱼胚胎接受剂量率为 0.033、0.130 和 1.20 mGy/h 的 γ 射线照射 10 d 后(累积剂量分别为 0.33、1.30 及 12.0 mGy),其孵化率和存活率均未受到显著影响^[8]。另有研究发现斑马鱼胚胎在受照累积剂量为 1、2.0、2.5、15.0 mGy 的 γ 射线作用后,各组的孵化率和存活率也无明显变化^[9]。ZHAO 等^[10]也得出了一致的结果。HUREM 等^[11]的研究发现,在 0.4、3.9 和 15.0 mGy/h 的 γ 射线照射下,斑马鱼的孵化率和存活率也未出现显著变化,但在 38 mGy/h 的照射后二者则显著下降。此外,有报道 1 Gy 电离辐射可降低受精后 72 h 时斑马鱼胚胎的孵化率,延迟胚胎孵化^[12]。可见低剂量电离辐射一般不会引起斑马鱼孵化率及存活率的改变。而低剂量辐射作用后,则会引起斑马鱼胚胎发生畸形。徐超等^[9]研究发现,累积剂量为 2.5 mGy 和 15.0 mGy 的 γ 射线照射后,畸变率显著增加,分别增加了 10 倍和 12.6 倍,而 2 mGy 的 γ 射线作用后则未出现显著变化。研究者通过模拟牙科 X 射线照射的两种模式,发现在标准全景组(平均剂量为 7.83 mSv)和牙髓全景组(平均剂量 5.83 mSv)的作用后,两组均观察到斑马鱼胚胎畸形发生,表现为卵黄囊水肿和脊柱弯曲^[13]。以上结果表明在 < 0.1 Gy 和 5.0 mGy/h 的低剂量率条件下,斑马鱼的孵化率和死亡率不会受到显著影响,而可能会引起斑马鱼胚胎发生畸形。

2.2 神经系统发育

大脑对射线十分敏感,广岛和长崎幸存者所生儿童的流行病学研究表明,低至 0.31 Gy 的电离辐射会导致大脑发育缺陷和认知能力下降^[14]。长期暴露于低剂量电离辐射下的放射工作人员可出现头痛、头晕、记忆力减退、睡眠功能障碍等神经系统症状。在斑马鱼胚胎发育的早期阶段,

辐射暴露对神经行为功能的影响尤为显著,因此斑马鱼成为研究辐射神经毒性的优质活体模型。KOLLAYAN 等^[15]使用牙科 X 射线装置照射斑马鱼胚胎,剂量分别为 7.17、23.17 和 63.83 mSv,结果发现 72 hpf 时,3 组均出现心包水肿;此外,23.17 和 63.83 mSv 组在 48 hpf 时出现心包水肿。63.83 mSv 组在 72 hpf 时出现卵黄囊水肿和脊柱侧凸,表明牙科 X 射线对神经发育产生剂量相关的有害影响,提示虽然牙科的辐射水平低于医疗辐射水平,但辐射暴露的固有风险不容忽视。何楚琦^[16]将斑马鱼胚胎置于不同剂量剂率 0.1、0.2、0.4 mGy/h γ 射线下,观察 72、96 及 120 hpf 的脑损伤现象,发现与对照组相比,0.1 mGy/h 的剂量组并未发生明显变化,甚至细胞数量比对照组还要多。然而,经过 0.2 和 0.4 mGy/h 的辐照后,斑马鱼脑组织神经元细胞出现了排列紊乱、胞质浓缩、细胞间间隙增大并出现空洞的情况。另一项实验中设置了相似的剂量组 0.250、0.313、0.417 mGy/h 的 ¹³⁷Cs γ 射线,研究结果发现各组脑部组织均出现了空泡,部分脑部细胞变形,脑部细胞之间的界限变得模糊^[17],与何楚琦^[16]的研究结果基本一致。此外,ZHAO 等^[18]研究发现 15 mGy γ 射线辐射可引起脑部损伤效应的发生,表现为斑马鱼脑细胞凋亡增加。这些结果表明,低剂量辐射确实可以导致斑马鱼大脑发育障碍。然而,需要注意的是,这些结果主要集中在斑马鱼这一模式生物上,至于低剂量长期辐射对人类脑部发育的具体影响还需要更多的人类数据来证实。

2.3 行为运动能力

电离辐射也会引起斑马鱼行为运动发生改变。MURAT 等^[14]将斑马鱼胚胎置于 0.5 mGy/h 的 γ 射线的环境中培育,发现斑马鱼幼鱼会在光暗运动实验中的行为与对照组相比发生显著改变。有研究报道 0.1 Gy 的 γ 射线可通过增加斑马鱼褪黑素的分泌,导致其行为节律紊乱^[12]。另有研究发现,暴露在 5.0 mGy/h γ 射线下的斑马鱼幼鱼,其肌纤维断裂和神经肌肉连接发生改变,提示长期暴露于低剂量电离辐射可通过影响神经元和肌肉祖细胞,引起幼鱼自由游动缺陷。

2.4 低剂量辐射生物效应机制的探索

分子水平的研究能深入揭示辐射效应的产

生机制,可为辐射损伤预警及早干预手段的建立提供理论参考。目前利用斑马鱼为研究对象开展低剂量辐射生物效应机制的相关研究,主要集中于辐射诱导的 DNA 损伤、氧化应激、凋亡途径、炎症反应及个体发育等方面。

DNA 是电离辐射作用的靶点,电离辐射可通过损伤 DNA 诱发机体基因突变和染色体改变,进而引起细胞损伤,最终引起机体功能或结构的改变。为了深入探究这一过程,研究者将斑马鱼胚胎暴露于 32.7 mGy 的 γ 射线后,发现染色质中 H3K4me3 组蛋白在 *hnf4a*、*gmnn* 和 *vegfab* 基因上出现超富集现象^[19]。另有研究报道,在 0.005、0.05、0.5、5 及 50 mGy/h 的 γ 射线作用下,斑马鱼胚胎的 H3K27me3 和 H3Kme4 组蛋白基因启动子 DNA 出现了低甲基化现象^[20]。这些结果表明,低剂量电离辐射可能通过影响组蛋白的翻译后修饰来调控染色质结构,进而影响与表型相关的基因表达。另外,研究发现 7.83 和 5.83 mGy 的 X 射线作用后,斑马鱼胚胎的炎症和凋亡相关基因表达增加,氧化抗氧化平衡恶化,免疫反应受到抑制^[13]。而持续接受 0.013 和 0.12 mGy/h 的 γ 射线照射,斑马鱼胚胎发育至 4 d 时活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的表达会显著升高。而在持续接受 0.003 mGy/h 的长期作用后,斑马鱼胚胎发育至 7 d 时 ROS 表达也会显著升高^[8],表明在足够长的作用时间下,即使是更低剂量的辐射也可能通过改变氧化应激反应来影响斑马鱼胚胎的健康。由于斑马鱼具有发育迅速、胚胎期短等优势,它被视为研究辐射对发育障碍影响机制的优质动物模型。MURAT 等^[20]发现斑马鱼胚胎受到 0.005、0.05、0.5、5 及 50 mGy/h 的 γ 射线作用后,与外胚层和中胚层形态发育相关的基因表达均发生变化,在 0.5 ~ 50 mGy/h 作用下变化尤为显著。这些差异基因主要参与如 Notch、视黄酸、BMP 和 Wnt 等与发育相关的信号通路。表明调节原肠胚形态发生的转录程序在 ≥ 0.5 mGy/h 的剂量率下被扰动,这可能与发育后期神经和肌肉的功能缺陷有关。此外,长期暴露于 5 mGy/h 的 γ 射线下的斑马鱼幼鱼,其神经、肌肉发育和视黄酸信号传导都受到干扰。其中视黄酸信号的破坏可能是导致体细胞和神经发育障碍的关键途径,进而可能对认知

和行为产生不良影响^[14]。ZHAO 等^[18]研究发现,受精后 2 h 的斑马鱼胚胎在 15 mGy 的 ¹³⁷Cs γ 射线照射后,参与 Wnt 信号通路的基因 *axin2* 在脑组织中的表达显著增加,提示低剂量辐射可能通过抑制 Wnt 信号通路影响斑马鱼胚胎脑细胞的凋亡和发育。而对于成年斑马鱼,当在 0.05、0.5 和 5 mGy/h 的辐射下连续暴露 36 d 后,端脑差异表达的基因数量随着剂量增加而增加,分别为 27、200 和 530 个。这些基因主要参与神经传递、神经激素及下丘脑-垂体-肾间轴的功能^[21]。以上研究结果为深入理解低剂量辐射生物效应发生的机理提供支持。

3 斑马鱼在肿瘤放射治疗研究中的应用

随着核能与核技术的迅猛发展,质子、重离子、超高剂量率以及放射性靶向药物等放疗技术在肿瘤治疗领域的应用日益广泛。为了在确保肿瘤治疗效果的同时减少正常组织的不良反应,迫切需要深入了解这些新技术的生物效应。不仅有助于提高肿瘤治疗的成功率,还能为患者带来更好的生活质量。与小鼠模型相比,斑马鱼在胚胎阶段的透明色素沉积而易于检测肿瘤转移情况^[22]。斑马鱼胚胎未成熟的免疫系统可以接受人类癌细胞的移植和存活,无需免疫抑制^[23],为肿瘤模式动物的建立提供极大的便利。此外,斑马鱼模型在药物筛选研究和个体化医疗研究中也得到了证实^[24-25]。目前已开发了许多方法来复制和研究人类癌症疾病,如通过将肿瘤细胞局部显微注射到斑马鱼中,以及随后旨在通过化学筛选和体内成像评估可能的治疗方案^[26]。因此斑马鱼可作为很好的模式生物用于肿瘤放疗领域的相关研究中。

3.1 超高剂量率放射治疗 (ultra high dose rate radiotherapy, UHDR-RT)

UHDR-RT 即 FLASH 技术,是当前放疗领域研究的热点,但该技术的广泛应用需要明确其最佳的照射参数。HORST 等^[27]利用斑马鱼胚胎,在超高剂量率 (ultra high dose rate, UHDR) 和参考剂量率下,比较质子入口平台、质子布拉格峰及 30 MeV 电子束下的不同的生物学终点 (心包

水肿、脊柱弯曲、胚胎长度和眼直径), 结果表明斑马鱼胚胎模型是一种适用于 FLASH 放疗放射生物学研究的临床前高通量模型, 其结果与啮齿动物模型相当。此外, SAADE 等^[28] 通过比较 68 MeV 质子束的 UHDR 辐照 (8 ~ 9 kGy/s) 与常规放射剂量率 (0.2 Gy/s) 对斑马鱼胚胎的影响, 发现在接受 30 和 40 Gy 的 UHDR-RT 后, 斑马鱼胚胎的体长分别增加了 180 和 90 mm, 对照组未见明显变化。与常规放疗相比, UHDR 组仅在 30 Gy 剂量下, 心包水肿发生率减少。在存活率和脊柱弯曲度方面, 两种放疗方式没有显著差异。罗辉等^[29] 研究发现电子束 FLASH 照射较常规照射对斑马鱼胚胎损伤更小, 并证明其诱发较低的氧化应激有关。以上这些研究表明 UHDR-RT 对正常组织具有一定的保护作用, 研究结果可为 UHDR-RT 的进一步研究提供参考, 有助于推动其在肿瘤治疗领域的应用。

3.2 相对生物学效应 (relative biological effectiveness, RBE)

RBE 是评估不同类型射线所产生生物学效应的重要参数, 在肿瘤放疗方案的制定中起着非常重要的作用。随着高传能线密度 (linear energy transfer, LET) 射线放疗技术的迅速发展, 通过确定不同 LET 射线的 RBE 值, 能够更好地预测治疗效果和潜在的不良反应。LI 等^[30] 以斑马鱼睾丸生精细胞凋亡为生物终点, 获得了碳离子的 RBE 为 (1.48 ± 0.04)。此外, 研究发现在利用小动物 (小鼠、大鼠) 为研究对象开展质子 RBE 体内实验研究时, 很难沿着质子深度剂量分布精确和重复地定位实验动物和靶区域, 而利用斑马鱼胚胎进行研究可实现对质子深度剂量分布的每毫米进行采样, 特别是在布拉格峰的远端边缘^[31]。SZABÓ 等^[31] 使用德累斯顿大学质子治疗的 150 MeV 质子束, 在两个不同的深度位置, 即入口平台和布拉格峰展宽中部照射斑马鱼胚胎。观察胚胎存活情况, 发现在 20 Gy 平台和布拉格峰展宽中部质子相对于 6 MV 光子束照射, 质子 RBE 值分别为 (1.13 ± 0.08) 和 (1.20 ± 0.04)。可见, 实现较小的质子范围不确定性, 可利用比啮齿类动物小得多且解剖均匀的斑马鱼胚胎进行相关研究。因此, 利用斑马鱼胚胎作为质子 RBE 的研究, 是向详细的毫米级方向迈出的第一步,

此研究也为高 LET 射线, 如重离子、中子等的生物效应的研究提供了借鉴。

3.3 肿瘤辐射敏感性预测

在对肿瘤患者进行放疗方案的制定时, 确定患者的辐射敏感性非常重要。对于辐射敏感的患者, 会降低其放疗剂量, 而对于辐射耐受的患者, 则会增加其放疗剂量或改变治疗方案, 以提高肿瘤的治疗增益比。COSTA 等^[32] 利用结直肠癌患者活检组织制备了斑马鱼异种移植物, 给予放射治疗, 检测分析了细胞增殖、凋亡、肿瘤大小和 DNA 损伤等指标的变化, 来评估患者肿瘤的放射敏感性。值得注意的是, 利用斑马鱼建立肿瘤模型, 可实现在 4 d 内区分放射敏感肿瘤和放射耐受肿瘤, 这一工作开启了利用斑马鱼模型预测肿瘤对放疗反应的可能性。

3.4 辐射增敏

在临床肿瘤治疗过程中, 经常会发现, 随着治疗周期的增加, 有的肿瘤患者会发生辐射耐受现象, 因此提高患者肿瘤的辐射敏感性是提高放疗疗效的手段之一。研究者利用斑马鱼胚胎中共同培养基质细胞和头颈部鳞状细胞癌细胞, 首次模拟了斑马鱼胚胎中真实的头颈部鳞状细胞肿瘤和微环境, 发现与基质细胞共培养的肿瘤细胞对辐射的敏感性降低, 这一研究为利用斑马鱼异种移植模型靶向基质细胞或调节其活性以增强辐射敏感性的研究策略奠定了基础^[33]。COSTA 等^[34] 利用肠癌手术标本和诊断活检技术, 比较了两种放射增敏剂在斑马鱼异种移植模型中的作用, 发现二甲双胍具有强大的体内放射增敏作用, 类似于 5-氟尿嘧啶, 提示其可用于优化肿瘤放疗方案。在另一项研究中, 利用斑马鱼模型, 研究发现亲脂性他汀类药物氟伐他汀是一种潜在的放射增敏剂^[35]。可见斑马鱼模型在放射增敏药物的研究中的重要应用价值。通过使用这一模型, 可以快速筛选出具有潜在增敏作用的物质, 为肿瘤放射治疗提供新的策略和药物候选物质。

4 斑马鱼在辐射防护剂研究中的应用

随着核能与核技术利用的快速发展、世界环

境的复杂性及国际形势的日益紧张(如俄乌冲突、朝核问题、阿以冲突、伊朗问题不断反复),核事故、局部核战争、核恐怖袭击发生的可能性增加,放疗技术的快速发展,均可能会造成人员的辐射损伤,因此研发辐射防护剂对辐射损伤救治具有重要的意义。

为了验证辐射防护剂的有效性,需要一个适合高通量药物筛选的研究模型。与小鼠、2D 和 3D 细胞培养系统相比,斑马鱼具有独特的优势。首先,斑马鱼能大量产卵,这为药物筛选提供了丰富的样本来源。其次,斑马鱼的胚胎可以直接从培养液中吸收药物,操作简便,大大提高了筛选效率。因此,利用斑马鱼作为研究对象能够满足药物筛选快速、高通量的需求。利用斑马鱼模型作为研究对象,在进行辐射防护剂研究中开展了广泛的研究。纳米颗粒 DF1、氨磷汀(WR-2721)、DNA 修复蛋白 KU80 和共济失调毛细血管扩张突变基因(ATM)以及移植的造血干细胞的辐射保护作用已被报道^[36]。Kelulut 蜂蜜通过 Hantzsch 反应生成的聚合物能够有效抑制由电离辐射诱导的 DNA 损伤及细胞凋亡过程,从而起到防护作用^[37]。据研究报道,临床上常用的降糖药、降糖药物已证实对辐射诱导的斑马鱼胚胎损伤具有防护效果。采用降压药托屈嗪进行预处理,可使电离辐射引起的 ROS 表达水平,由 1.85 倍降低至 1.56 倍^[38],显著减轻了斑马鱼的辐射损伤。此外,降糖药苯乙双胍通过减轻电离辐射作用后斑马鱼胚胎中 ROS 介导的 DNA 损伤和脂质过氧化,从而抑制了细胞凋亡、突变和随后的发育中断和停滞^[39]。另一项研究指出,二甲双胍同样具有改善辐射诱导的斑马鱼幼形态异常和畸形的作用,并能减轻辐射诱导的细胞凋亡率和氧化应激反应,进而起到对斑马鱼辐射损伤的防护作用^[40]。DIMRI 等^[41]发现,在辐照前 3 min 使用麻醉剂盐酸丙洛卡因进行预处理,可使辐照引起的不良反应减少 85%,死亡率降低 60%。辐照前用低聚岩藻糖预处理斑马鱼肝癌模型,能够减少纤维化和细胞周期/增殖标志物的表达,从而对辐射诱导的纤维化和二次癌症具有预防作用^[42]。此外,利用斑马鱼模型证实了槲寄生提取物,及腺苷均有辐射防护的潜力^[43-44]。除此之外,对于研究辐射防护剂在大脑等封闭器官中的

功效具有很大的挑战性,SUN 等^[45]构建了凋亡报告基因的斑马鱼模型,可以直观地展示辐射或药物作用后斑马鱼复杂大脑结构的变化,为研究提供了极大的便利。因此,斑马鱼在辐射防护剂研究方面具有非常好的应用前景。

5 结语

在开展放射医学研究的探索中,面临着一个严峻的挑战:如何在遵守严格的动物保护和伦理法规的前提下,有效地进行科学实验。传统的啮齿类动物实验往往受限于动物数量的限制,这使得研究的深度和广度受到一定制约。尽管细胞培养等体外实验方法可以实现高通量的研究,但它们无法完全模拟生物体内部的复杂环境,从而难以精确阐明体内的实际效应。然而,斑马鱼胚胎作为一种理想的实验模型,为放射医学研究带来了独特的机遇。特别是在以下 4 个方面:(1)适用于高通量的放射生物学研究,尤其适用于开展电离辐射对神经系统发育的影响研究,通过大规模的实验,可以迅速筛选和评估不同辐射剂量对斑马鱼胚胎的影响,为理解电离辐射对机体的损伤及作用机制提供有力支持;(2)为新兴的肿瘤放疗技术推广应用研究提供有效和可靠的工具,例如加深对观察到的剂量率依赖性的理解或进一步探索射线物理参数的空间分布;(3)在放疗之前对患者进行辐射敏感性的检测分析,助推个体化精准放疗的发展;(4)在辐射防护及辐射增敏剂的筛选研究中也发挥着重要作用。此外,放射性核素内照射对人类健康的潜在威胁已成为当前研究的焦点。斑马鱼作为模式生物,无疑为这一关键领域的研究提供了强有力的实验平台与工具。如研究氚对斑马鱼健康影响^[46]、铀的跨代毒性研究^[47]。因此,利用斑马鱼模式动物作为研究对象是对传统放射医学领域中实验研究的极大补充。随着斑马鱼模式动物在放射医学领域的深入应用,相信将会解锁更多新的应用价值,为放射生物学、精准放疗、辐射防护技术的发展提供坚实的支撑,推动放射医学的不断进步。

参 考 文 献(References)

- [1] 翟开革. 低剂量 γ 辐照通过 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路诱导斑马鱼细胞凋亡的机理研究[D]. 衡阳: 南华大学; 2022. ZHAI K G. Mechanism of apoptosis induced by low dose γ

- irradiation through WNT/Ca²⁺ signaling pathway in zebrafish cells [D]. Hengyang: University of South China; 2022.
- [2] SHANG Y, ZHANG S, CHENG Y, et al. Tetrabromobisphenol a exacerbates the overall radioactive hazard to zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environ Pollut, 2023, 316(2): 120424.
- [3] LIU J, LI W, JIN X, et al. Optimal tagging strategies for illuminating expression profiles of genes with different abundance in zebrafish [J]. Commun Biol, 2023, 6(1): 1300.
- [4] CHOI V W Y, YU K N. Embryos of the zebrafish *Danio rerio* in studies of non-targeted effects of ionizing radiation [J]. Cancer Lett, 2015, 356(1): 91-104.
- [5] WEINTRAUB A. All eyes on zebrafish [J]. Lab Anim, 2017, 46(8): 323-326.
- [6] RASOOLY R S, HENKEN D, FREEMAN N, et al. Genetic and genomic tools for zebrafish research: the NIH zebrafish initiative [J]. Dev Dyn, 2003, 228(3): 490-496.
- [7] MAHESH M, FRUSH D P, GROS S, et al. Proposed priorities for low-dose radiation research and their relevance to the practice of radiology [J]. Radiology, 2023, 309(2): e222590.
- [8] GAGNAIRE B, ARCANJO C, CAVALIÉ I, et al. Effects of gamma ionizing radiation exposure on *Danio rerio* embryonal stages-comparison with tritium exposure [J]. J Hazard Mater, 2021, 408: 124866.
- [9] 徐超, 李天阳, 胡晨剑, 等. 低剂量⁶⁰Co- γ 射线对斑马鱼胚胎发育及行为的影响 [J]. 浙江工业大学学报, 2021, 20(1): 106-110.
- XU C, LI T Y, HU C J, et al. Effects of low-dose ⁶⁰Co- γ rays on embryonic development and behavior of zebrafish [J]. J Zhejiang Univ Technol, 2021, 20(1): 106-110.
- [10] ZHAO W, HU N, DING D, et al. Developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos induced by low-dose γ -ray irradiation [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(4): 3869-3881.
- [11] HUREM S, MARTÍN L M, BREDE D A, et al. Dose-dependent effects of gamma radiation on the early zebrafish development and gene expression [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179259.
- [12] ZHAO W, MAO L, HE C, et al. Effects of low dose radiation on behavior rhythm of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 255: 114779.
- [13] KARAGÖZ A, BELER M, ALTUN B D, et al. Panoramic dental X-ray exposure leads to oxidative stress, inflammation and apoptosis-mediated developmental defects in zebrafish embryos [J]. J Stomatol Oral Maxillofac Surg, 2023, 124(6S): 101661.
- [14] MURAT EL HOUDIGUI S, ADAM-GUILLERMIN C, LORO G, et al. A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 20241.
- [15] KOLLAYAN B Y, CANSIZ D, BELER M, et al. Effects of low-dose ionizing radiation on the molecular pathways linking neurogenesis and autism spectrum disorders in zebrafish embryos [J]. Drug Chem Toxicol, 2024, 47(6): 960-973.
- [16] 何楚琦. miRNA 在低剂量 γ 辐射影响斑马鱼胚胎神经发育中的作用及机制 [D]. 衡阳: 南华大学; 2021.
- HE C Q. The effects and mechanism of low-dose radiation on miRNA-mediated neurodevelopment of zebrafish [D]. Hengyang: University of South China; 2021.
- [17] 苑朋辉, 赵维超, 胡南, 等. 低剂量率 γ 射线辐照对斑马鱼胚胎脑部发育形态学的影响 [J]. 南华大学学报(自然科学版), 2019, 33(3): 28-32.
- YUAN P H, ZHAO W C, HU N, et al. Effects of low dose rate γ -ray irradiation on the developmental morphology of brain in zebrafish embryo [J]. J Univ South China (Sci Technol), 2019, 33(3): 28-32.
- [18] ZHAO W, YUAN P, HU N, et al. Effects of low-dose gamma-ray radiation on apoptosis and development of zebrafish embryo brain [J]. Radiat Res, 2020, 194(1): 61-70.
- [19] LINDEMAN L C, KAMSTRA J H, BALLANGBY J, et al. Gamma radiation induces locus specific changes to histone modification enrichment in zebrafish and Atlantic salmon [J]. PLoS One, 2019, 14(2): e0212123.
- [20] MURAT EL HOUDIGUI S, ADAM-GUILLERMIN C, ARMANT O. Ionising radiation induces promoter DNA hypomethylation and perturbs transcriptional activity of genes involved in morphogenesis during gastrulation in zebrafish [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4014.
- [21] CANTABELLA E, CAMILLERI V, CAVALIE I, et al. Revealing the increased stress response behavior through transcriptomic analysis of adult zebrafish brain after chronic low to moderate dose rates of ionizing radiation [J]. Cancers, 2022, 14(15): 3793.
- [22] HASON M, BARTŮŇEK P. Zebrafish models of cancer-new insights on modeling human cancer in a non-mammalian vertebrate [J]. Genes, 2019, 10(11): 935.
- [23] TREDE N S, LANGENAU D M, TRAVER D, et al. The use of zebrafish to understand immunity [J]. Immunity, 2004, 20(4): 367-379.
- [24] NAKAYAMA J, MAKINOSHIMA H. Zebrafish-based screening models for the identification of anti-metastatic drugs [J]. Molecules, 2020, 25(10): 2407.
- [25] WAHBI W, KORELIN K, SIEVILÄINEN M, et al. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* personalized cancer

- treatment assays for oral squamous cell carcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2023, 33: 101677.
- [26] LAM P Y, PETERSON R T. Developing zebrafish disease models for *in vivo* small molecule screens [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 50: 37–44.
- [27] HORST F, BODENSTEIN E, BRAND M, et al. Dose and dose rate dependence of the tissue sparing effect at ultra-high dose rate studied for proton and electron beams using the zebrafish embryo model [J]. *Radiother Oncol*, 2024, 194: 110197.
- [28] SAADE G, BOGAERTS E, CHIAVASSA S, et al. Ultrahigh-dose-rate proton irradiation elicits reduced toxicity in zebrafish embryos [J]. *Adv Radiat Oncol*, 2023, 8(2): 101124.
- [29] 罗辉, 马蕾杰, 毛荣虎, 等. 超高剂量率照射减轻斑马鱼胚胎放射损伤的作用及机制研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2024, 44(3): 174–180.
- LUO H, MA L J, MAO R H, et al. Effects and mechanism of ultra-high dose rate irradiation in reducing radiation damage to zebrafish embryos[J]. *Chin J Radiol Med Prot*, 2024, 44(3): 174–180.
- [30] LI H, ZHANG W, ZHANG H, et al. Mitochondrial proteomics reveals the mechanism of spermatogenic cells apoptosis induced by carbon ion radiation in zebrafish [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22439–22449.
- [31] SZABÓ E R, BRAND M, HANS S, et al. Radiobiological effects and proton RBE determined by wildtype zebrafish embryos [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0206879.
- [32] COSTA B, FERREIRA S, PÓVOA V, et al. Developments in zebrafish avatars as radiotherapy sensitivity reporters-towards personalized medicine [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102578.
- [33] WAHBI W, AWAD S, SALO T, et al. Stroma modulation of radiation response in head and neck squamous cell carcinoma: Insights from zebrafish larvae xenografts [J]. *Exp Cell Res*, 2024, 435(1): 113911.
- [34] COSTA B, FERNANDEZ L M, PARÉS O, et al. Zebrafish Avatars of rectal cancer patients validate the radiosensitive effect of metformin [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 862889.
- [35] MOHAPATRA D, DAS B, SURESH V, et al. Fluvastatin sensitizes pancreatic cancer cells toward radiation therapy and suppresses radiation- and/or TGF- β -induced tumor-associated fibrosis [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(3): 298–311.
- [36] MOHAPATRA A P, PARIDA D, MOHAPATRA D, et al. Zebrafish larvae as a model to evaluate potential radiosensitizers or protectors [J]. *J Vis Exp*, 2022, 186: 1–10.
- [37] ADENAN M N H, YAZAN L S, CHRISTIANUS A, et al. Radioprotective effects of kelulut honey in zebrafish model [J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1557.
- [38] DIMRI M, JOSHI J, CHAKRABARTI R, et al. Todralazine protects zebrafish from lethal effects of ionizing radiation: role of hematopoietic cell expansion [J]. *Zebrafish*, 2015, 12(1): 33–47.
- [39] GAN L, GUO M, SI J, et al. Protective effects of phenformin on zebrafish embryonic neurodevelopmental toxicity induced by X-ray radiation [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 4202–4210.
- [40] WANG B, DONG J, XIAO H, et al. Metformin fights against radiation-induced early developmental toxicity [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 732: 139274.
- [41] DIMRI M, JOSHI J, SHRIVASTAVA N, et al. Prilocaine hydrochloride protects zebrafish from lethal effects of ionizing radiation: role of hematopoietic cell expansion [J]. *Tokai J Exp Clin Med*, 2015, 40(1): 8–15.
- [42] WU S Y, YANG W Y, CHENG C C, et al. Low molecular weight fucoidan prevents radiation-induced fibrosis and secondary tumors in a zebrafish model [J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1608.
- [43] RIM C H, KOUN S, PARK H-C, et al. Radioprotective effects of mistletoe extract in Zebrafish embryos *in vivo* [J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(8): 1150–1159.
- [44] CRUZ F F, PEREIRA T C B, COSTA K M, et al. Effect of adenosine treatment on ionizing radiation toxicity in zebrafish early life stages [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2024, 397(1): 521–534.
- [45] SUN L W H, ASANA MARICAN H T, BEH L K, et al. Imaging the radioprotective effect of amifostine in the developing brain using an apoptosis-reporting transgenic zebrafish [J]. *Int J Radiat Biol*, 2024, 100(3): 433–444.
- [46] SCHIANO DI LOMBO M, CAVALIÉ I, CAMILLERI V, et al. Tritiated thymidine induces developmental delay, oxidative stress and gene overexpression in developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2023, 265: 106766.
- [47] XU C, GONG H, NIU L, et al. Maternal exposure to dietary uranium causes oxidative stress and thyroid disruption in zebrafish offspring [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 265: 115501.

杨光,高阳,崔忆馨,等. 医疗器械大动物实验研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(1): 149-156.

YANG G, GAO Y, CUI Y X, et al. Research progress in large-scale animal experimental research on medical devices [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(1): 149-156.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.01.015

医疗器械大动物实验研究进展

杨光¹, 高阳², 崔忆馨², 朱怀利¹, 胡佳伟², 杨倩², 崔超越², 魏旭峰^{2*}

(1. 无锡明慈心血管病医院, 江苏 无锡 214000; 2. 江苏美凤力医疗科技有限公司, 江苏 泰州 225316)

【摘要】 随着我国成为全球医疗器械的第二大市场, 国产医疗器械行业也随之不断发展。大动物研究作为医疗器械临床前评价的重要环节, 直接影响着医疗器械的研究和应用。大动物因其体型、解剖结构、生理功能等方面与人类更加接近, 被广泛用于医疗器械安全性和可行性评估。在大动物实验研究中, 选择适合的实验动物和建立合适的动物疾病模型是保证实验顺利进行的基础。本文对医疗器械大动物实验研究中实验动物的选择和疾病模型的建立进行了系统梳理, 指出了现有问题和不足, 为医疗器械大动物实验研究提供了参考。

【关键词】 医疗器械; 大动物实验; 实验动物选择; 疾病模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 01-0149-08

Research progress in large-scale animal experimental research on medical devices

YANG Guang¹, GAO Yang², CUI Yixin², ZHU Huaili¹, HU Jiawei²,
YANG Qian², CUI Chaoyue², WEI Xufeng^{2*}

(1. Wuxi Mingci Cardiovascular Hospital, Wuxi 214000, China; 2. Jiangsu Medphoenix Medical Technology Co., Ltd, Taizhou 225316, China)

Corresponding author: WEI Xufeng. E-mail: 493451257@qq.com

【Abstract】 As China has become the second largest market for medical devices in the world, the domestic medical device industry has been growing. As an important part of preclinical evaluation of medical devices, large animal research directly affects the research and application of medical devices. Large animals are widely used in the evaluation of safety and feasibility of medical devices because they are closer to humans in terms of body size, anatomical structure and physiological functions. In large animal experimental research, the selection of suitable experimental animals and the establishment of suitable animal disease models are the basis for ensuring the smooth progress of experiments. In this paper, the selection of experimental animals and the establishment of disease models in medical device large animal experimental research are systematically sorted out, and the existing problems and deficiencies are pointed out.

【Keywords】 medical devices; large animal experiments; selection of laboratory animals; disease models

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

【基金项目】 泰州市科技支撑计划(社会发展)项目(TS202205)。

Funded by Taizhou Science and Technology Support Program (Social Development) Project(TS202205).

【作者简介】 杨光,男,博士,教授,研究方向:心脏和大血管外科工作以及相关医疗器械的设计研发。Email:1298014629@qq.com

【通信作者】 魏旭峰,男,博士,副教授,研究方向:人工心脏、瓣膜等医疗器械的临床前评价和临床。Email:493451257@qq.com

医疗器械的研发和应用是保障人类健康的重要环节。然而,由于起步晚、技术落后等原因,我国的医疗器械产业长期以来处在发展缓慢、创新能力不足的阶段,尤其是在高端医疗器械领域的占有率较低。随着“十二五”以来国家出台了一系列政策^[1]以及“中国制造 2025”^[2]、“健康中国 2030 战略”^[3]等国家战略规划后,中国的医疗器械行业整体保持了稳步的发展态势,市场规模从 2001 年的 179 亿元快速增长到了 2019 年的 5800 亿元^[4],为国产创新医疗器械的发展提供了更为广阔的平台。伴随着心血管支架、医疗手术机器人、人工心脏瓣膜等国产 III 类医疗器械的相继上市,我国高端医疗器械严重依赖进口的现象也得到了一定改善。

在医疗器械产品从实验室研究向临床应用转化的过程中,动物实验是不可或缺的环节之一。大动物因其与人类更加接近的体型和生理结构而被广泛应用于医疗器械的研究和评估。目前,关于医疗器械大动物实验研究的报道日渐增多,应用范围涵盖了实验动物的选择、疾病模型的建立、医疗器械手术评估等方面。这些研究为医疗器械的研发和临床应用提供了重要的支持。本文将对用于医疗器械研究的大动物实验进行综述。

1 医疗器械实验中大动物的选择

选择合适的实验动物是决定医疗器械实验价值的基础,直接影响着实验结果的可靠性和可信度^[5]。实验动物选择一般遵照以下 3 个原则:(1)实验动物是否符合产品的实验目的;(2)优先选用与人体相似的实验动物,如解剖结构、血流动力学、电生理学等;(3)尽量避免选用伦理争议较大的实验动物。

目前用于医疗器械研究的实验动物可分为小型动物和大型动物。常见的小型动物包括小鼠、大鼠和兔子,此类动物饲养成本低且手术难度较小,通常应用于医疗器械早期可行性评估,然而,小型动物与人类在神经系统、免疫系统和新陈代谢系统等方面存在较大差异,限制了其在医疗器械研究中的应用^[6]。相比之下,大型动物如猪、犬、绵羊、非人灵长类等更接近人类,在评估医疗器械的安全性和可行性方面具有优势:首

先,大型动物的解剖结构和生理功能与人类更为相近,更适合进行外科手术操作和长期监测,更适合模拟人体的生理环境和疾病状态;其次,大型动物相较于小型动物更加长寿,在安全性和可行性的评估中,大型动物能提供的可观察的时间窗口更长,有利于测试医疗器械是否存在潜在的副作用;最后,大型动物的体型和力学特征使其更适合评估和测试需要机械适应性的医疗器械,如人工心脏、骨支架等。尽管大动物模型在医疗器械中具有优势,但仍然面临着成本高、实验伦理等问题,因此需要综合考虑研究目的、实验经费等因素。

1.1 实验猪

猪的基因组序列与人类同源性极高,基因相似度高达 95%^[7],且具有与人类相似的心血管、代谢、呼吸和消化系统,因此被广泛应用于心血管疾病、异种移植、口腔医学、胃肠疾病研究相关的医疗器械研究开发中^[8]。

巴马小型猪的心血管尺寸与人体十分相近,常被选作植入性心血管材料的评价动物,如 MIYAGI 等^[9]在猪体内进行实验,评估了左心房辅助装置(left atrial assist device, LAAD)的安全性。猪也被广泛用于心脏瓣膜类产品的评价,通过在猪体内植入人造瓣膜,对其生物相容性、免疫反应、耐久性以及其他病理特征进行长期观察评估^[10]。由于与人的心脏相似度很高,猪心异种移植一直是研究的热点。2023 年马里兰大学医学院完成了首例动物心脏移植手术,在心脏病患者体内移植了一颗经过基因编辑后的猪心脏^[11],虽然患者在 2 个月后死亡,但这也成为器官移植发展道路上新的里程碑。

猪也是口腔医学类医疗器械经常选择的实验动物。早在 1976 年, BIVIN 等^[12]就发现小型猪的食性、牙齿排列和替换模式上都与人类具有较高的相似性。SONOYAMA 等^[13]将小型猪自体根尖牙干细胞(stem cells from the apical papilla, SCAPs)和牙周膜干细胞(periodontal stem cells, PDLSCs)与生物支架复合,实现了生物牙根再生,并用异体牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)实现了冠修复。

此外,猪同样可以作为手术模型动物来评估新型的手术方法及策略。例如,王洋等^[14]使用达

芬奇手术机器人分别在巴马小型猪的心脏、肺、肝和胃中进行了微创手术,成功评估了达芬奇手术机器人手术期间的麻醉管理策略。

1.2 实验犬

犬类是目前基础医学研究和教学中最常用大型动物之一。根据实验需求可以选择不同年龄、性别和体重的实验用犬,相较于其他大型实验动物,犬类价格低廉易得、便于饲养和管理。在所有实验用犬中,比格犬因其具有遗传信息清晰、实验均一性好、环境适应性强、性格温顺等优点而成为国际上公认的实验用犬,国家新药评价规定,国家二类以上药物必须用实验比格犬进行实验研究^[15]。

除了可用于药物评价,犬类也经常作为外科手术的模式动物,医生可以在犬类中模拟真实临床情况下的手术操作过程,以熟悉新型医疗方法和医疗器械,积累实际临床操作经验。同时,这种模拟手术也可以发现新型医疗方法和医疗器械的不足之处并加以改进。例如, BUOTE 等^[16]使用手术机器人在犬类尸体中评估了腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)和机器人胆囊切除术(robotic cholecystectomy, RC)之间的差异,发现手术机器人提供的关节自由度能够进行更加精确的解剖和缝合,但是也具有机器人手臂与端口对接困难、手术过程中机械手臂偶尔发生碰撞等缺点,这些发现为手术机器人的改进提供了方向。

犬类在医疗器械的开发过程中同样发挥重要的作用,在左心耳封堵器 Amplatzer Cardiac Plug 的研发过程中, MUÑOZ 等^[17]使用犬类作为实验动物完成了安全性和可行性的评估,为进一步进行人体实验奠定了基础; KAR 等^[18]在犬类中比较了两款左心耳封堵器 Watchman 和 Amplatzer Cardiac Plug 在犬左心耳模型中的愈合反应,发现 Watchman 不会影响左心耳临近结构,表面组织恢复良好,而 Amplatzer Cardiac Plug 可能危及左心耳临近结构从而导致愈合时间延长。由于传统的金属介入性封堵器会导致心脏穿孔、房室传导阻滞等疾病,因此可降解封堵器的研发迫在眉睫, GUO 等^[19]研发了一种可降解的室间隔缺损(vaccine safety datalink, VSD)封堵器,在犬类中植入后进行了评估实验,在 24 个月的随访期

间显示出了良好的闭塞性,并且没有出现相应的并发症。急性缺血性卒中(acute ischemic stroke, AIS)是最常见的脑卒中,使用取栓支架进行治疗相比于传统的静脉溶栓治疗具有压倒性的优势, ZHOU 等^[20]比较了 Tonbridge 与 Solitaire 取栓支架在 AIS 犬模型中的有效性和安全性,结果表明两组产品在各方面表现均无差异,可以用于进一步的临床检测。

1.3 实验羊

羊有着与人类近似的血流动力学特征和实验室指标,在常见的哺乳动物中羊的药理反应最接近人类。绵羊性格温顺、易于管理、术后不易感染、手术耐受性好,因此常被用于长期的植入型医疗器械的评估。

成年羊的体型、心率、心输出量和心内压力等指标与健康的年轻人相似,心脏的大小及结构也几乎相同,在评估心血管植入装置方面具有天然的优势,用于评估的材料及器械无需进行尺寸改造便可直接适配^[21]。CARNEY 等^[22]在绵羊主动脉处植入狭窄环构建了主动脉狭窄模型,随后将其用于主动脉瓣置换术(transcatheter aortic valve replacement, TAVR)装置的在体长期评估,评价了 TAVR 装置的安全性和有效性。

羊的后置骨骼结构和骨密度与人类下肢的变化趋势有诸多相似性。在羊所有的承重关节中,股骨、膝关节以及下肢运动节段的与人类最为相似,因此常被用于骨科植入物的评价。例如, WILLIAMSON 等^[23]在绵羊中评估了用于骨肿瘤切除的机器人系统,证明该系统可以重复且精确地切除骨肿瘤,并且可以实现高精度地植入物放置,植入物与骨骼之间的间隙极小。KAISER 等^[24]在绵羊的体内比较了 3 种骨水泥的使用效果,结果表明新型纽贝利水泥在凝结时间以及降解性上具有明显优势。

1.4 非人灵长类动物

非人灵长类动物(non human primates, NHPs)与人类具有 98% 以上的同源^[25],在遗传、行为、认知、解剖结构等方面都与人类极为相似,因此被视为最理想的实验动物,研究结果往往容易推广到实际临床应用中^[26]。非人灵长类动物具有高级的脑功能结构,其高度发达的前额叶皮质控制着其他实验动物所不具备的高级认知功能^[27],是

精神类疾病研究首选的实验动物。

目前在医学研究中广泛应用的非人类灵长类动物主要有恒河猴 (*Macaca mulatta*) 和食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 两种。作为人源化程度最高的动物,非人类灵长类动物在医疗器械的开发过程中扮演着重要角色,被广泛应用于呼吸系统^[28]、影像学系统^[29]和神经植入装置^[30]等各个方面的研究。虽然非人灵长类动物在医疗器械研究领域具有先天的优势,但是其成本高昂且数量有限,因此一般被用于临床前研究的最后阶段,美国的食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和中国的食品药品监督管理局 (State Food and Drug Administration, SFDA) 都已明确要求二类以上的新药在进入临床实验前,必须取得非人灵长类动物实验^[31]的可靠数据。

2 大动物疾病模型的建立

对于大部分医疗器械,由于疾病的复杂性,仅在健康的动物体内实验不足以评价产品的特性,因此需要根据医疗器械针对的疾病建立相应的疾病模型。建立动物模型需要遵守以下 5 个原则:(1) 相似性:基于人类疾病复制的动物疾病模型,目的是从中推广应用于人体的有关规律;(2) 可重复性:理想的动物模型应该是可重复的,甚至是可标准化的;(3) 可靠性:建立的动物模型应该力求可靠地反映人类疾病,即可特异地反映某种疾病或某种机能、代谢以及结构变化,应具备该种疾病地主要症状和体征;(4) 适用性和可控性:供医学研究用的动物模型,在建立时应考虑到今后临床应用和便于控制该疾病的发展;(5) 易行性和经济性:建立动物模型的方法应尽量做到容易执行和合乎经济原则。根据建立模型的方法可以将动物疾病模型分为以下 3 类:自发性模型动物、转基因模型动物以及诱发性模型动物。

2.1 自发性模型动物

自发性模型动物是指在自然条件下受到先天性或遗传性因素而发生疾病的动物。自发性模型动物疾病发生和发展的过程与人类疾病相似,可以观察到遗传因素以及环境因素对疾病发生造成的影响。但自发性模型动物同样具有缺点:造模周期过长、实验动物数量需求较大,因此这类模型动物往往价格高昂,且自发性模型动物

大都具有异质性,存在较大的个体差异,难以获得大量性状均匀的疾病模型,在国内的实际应用较少。

目前国内自发性模型动物的研究主要集中在鼠、兔等小型动物,主要是由于大型动物模型的成本高昂且难以获取,限制了其广泛应用。关于自发性模型动物获取主要有 2 种方法:(1) 从自然繁殖的动物中挑选出与人类疾病症状近似的动物疾病模型,例如,新生猪中大约有 1% 会出现先天的异常或者缺陷,包括主动脉瓣下狭窄 (subaortic stenosis, SS)、三尖瓣发育不良 (dysplasia of the tricuspid valve, DPTV)、房室隔缺损 (atrioventricular septal defect, AVSD)、右心室畸形 (malformation of the moderator band, MFMB)、肺动脉瓣狭窄 (pulmonary stenosis, PS) 等^[32-33];(2) 则是利用筛选出的自发性疾病动物进行育种,从后代中持续获得稳定的疾病模型。这种方法通常只适用于受遗传因素影响的疾病建模,如自发性 II 型糖尿病动物模型^[34]。但这种方法同样存在缺点,频繁的同系繁殖会导致后代的疾病发生^[35]。

2.2 转基因模型动物

转基因模型动物是指通过实验方法敲除内源基因或者转入外源基因的动物,通过这种方式构建的疾病模型可以为疾病的基因治疗提供理论基础,但是不能完全真实地反映临床患者的病因以及病理情况。

随着 CRISPR-Cas9 等基因编辑技术的发展,转基因模型动物的研究越来越普遍,多见于啮齿类动物,在猪、猴等动物中也有报道。JIANG 等^[36]通过敲除小鼠心肌细胞中的 *Rhau* 基因成功建立了小鼠心衰模型。LIU 等^[37]和 QIU 等^[38]在食蟹猴中敲除了 *BMAL1* 基因从而构建了生物节律紊乱模型,建模后的动物表现出昼夜活动异常、环境探索行为减少以及面对新事物出现负面反应,与抑郁症患者症极为相似。日本学者 UMEYAMA 等^[39]通过体细胞核移植的方式制造了携带 *HNF1 α* 基因的转基因猪,成功获得了糖尿病猪模型,出现高血糖、低胰岛素分泌等糖尿病的病理特征。

2.3 诱发性模型动物

诱发性模型动物是指通过使用不同的致病

因素(物理、化学、生物等)作用于动物,从而得到特定疾病动物模型的动物,即通过手术、药物或饮食等诱导方式建立动物疾病模型。诱发性模型动物造模成本较低、耗时较短、造模难度更低、造模具有均一性且更容易控制,是国内外使用最多的模型动物。

手术造模是医疗器械开发过程中使用较多的动物模型。与药物研究不同,许多医疗器械受限于尺寸大小,无法在小鼠等小型动物中进行评价。猪、羊等大型动物在器官尺寸上更贴近人类,因此,这些大型动物被广泛应用于医疗器械评价。LOUKANOV 等^[40]通过心肺分流术和结扎左肺动脉成功在猪体内建立了肺动脉高血压,并伴随肺循环血管阻力。LI 等^[41]则对猪进行外科开胸手术,通过断裂腱索的方式成功建立了猪二尖瓣反流模型,与假手术组相比,实验组的左心房扩大,心肌纤维化明显增加,左心房收缩功能明显下降,超声结果显示出现了重度二尖瓣反流。这些建模成功的动物后续可以用于新型人造瓣膜的在体植入评价^[42]。绵羊也是心血管类医疗器械广泛使用的实验动物,BUSZMAN 等^[43]首先建立了 21 只主动脉狭窄羊模型,随后对其进行经导管主动脉植入术,用以评价新型球囊扩张导管。类似的评价方法也适用于其他方面的医疗器械研究。VARGA 等^[44]通过手术在绵羊体内制造髌骨软骨缺损,用于评价新型骨水泥的治疗效果。结果显示新型骨水泥与关节软骨具有高度的生物相容性,能够用于软骨缺损的治疗。通过手术建立的疾病模型症状相对均一,造模方法成熟可控,因此实际应用比例较高。

药物诱导同样应用广泛,通过选择适合的化学药物诱导剂对动物进行处理,从而得到特定的疾病模型。由于成本等因素的限制,药物诱导模型多见于小型动物中。ZAMBRASKI 等^[45]使用醋酸脱氧皮质酮(deoxycorticosterone acetate, DOCA)或者高盐处理 21 d,建立了稳定的小型猪高血压(hypertension)模型,平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)增加了大约 32%,肾皮质内血流量明显增高。使用糖皮质激素可以成功建立小鼠骨质疏松模型,使其形成骨受损并且骨折风险以剂量依赖性的方式增加^[46]。TALAVERA 等^[47]发现每隔 7 d 对兔进行静脉注射柔红霉素 4 mg/kg,

持续 6 周后可以提高扩张性心肌病的发生概率。

饮食诱导造模适用于建立肥胖症、动脉粥样硬化、高血脂、糖尿病等疾病模型。这种建模方式能够在病因和病理上最大程度地还原人体疾病模型,被广泛应用于疾病发病机制和医疗器械治疗的研究中^[48]。HOLVOET 等^[49]通过对小型猪进行持续的高脂饮食喂养,发现高脂饮食组的高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)都显著上升,喂养 4 个月后变化趋于稳定,形成了高胆固醇症。饮食诱导建模的时间相对较长,但是成功构建的动物模型更接近临床患者的疾病特征。例如,GUERRATY 等^[50]对通过为期 6 个月的高胆固醇饮食(12%脂肪、1.5%胆固醇)饲养成功建立了主动脉钙化猪模型,解剖结果显示猪的主动脉瓣局部增厚且不透明,组织学切片可见瓣膜组织中存在脂质沉淀以及钙结节,为研究猪瓣膜作为生物工程瓣膜材料来源的可行性提供了理论基础。

3 不足与展望

随着动物实验的迅速增加,实验动物的质量控制和实验管理成为急需解决的问题。从实验动物的质量控制到实验操作过程中的操作规范,都需要更加严格地控制把关,以避免动物遗传背景不统一或人为实验操作不规范对动物实验结果和医疗器械评价的可靠性产生影响。

相较于使用健康的实验动物,更多的医疗器械实验更倾向于选择疾病动物模型作为实验动物,但大动物疾病模型的研究报道相对较少,并且疾病种类的多样性以及实验需求的差异性导致了难以制定统一的造模方法。例如,在建立二尖瓣关闭不全的疾病模型时,虽然都是通过手术建模,但是从具体的方法又可以分为破坏二尖瓣腱索^[51]、损伤二尖瓣瓣叶^[52]、扩大二尖瓣瓣环^[53]、冠状动脉结扎^[54]等方式,这些手术方法的不同直接导致疾病模型的效果具有差异。此外,模型建立完成后的评价也存在问题。由于动物的疾病耐受性与人类有所差异,人为诱导下产生的疾病与自然发病也有不同,因此大动物疾病模型建立之后的评价标准是否应该沿用人类疾病

的评判标准尚无定论。以二尖瓣反流程度判定为例,不同研究中的评价标准有所区别。LI 等^[41]建立的二尖瓣关闭不全模型以反流面积与左心房面积(regurgitant area/left atrial area, RA/LAA)的比率作为评价轻重程度标准,与临床中常用的反流分数(regurgitant fraction, RF)有所不同;而有些研究仅通过比较术前术后超声指标的变化来判断,却没有具体的评价标准^[55]。这些问题都在一定程度上影响了疾病模型的发展。只有建立起标准化的造模方法和统一的疾病模型评价标准,才能进一步推动疾病模型在医疗器械研究中的应用。

随着国产医疗器械的发展,需要对用于临床前评估的大动物研究进行优化。在疾病模型的建立过程中,应确保建模方法标准统一,以保证入组模型的均一性和稳定性。解决了以上问题,医疗器械大动物研究将迈向新的高度,也会进一步促进医疗器械研发和临床应用的发展,提升我国医疗器械产业的创新能力和国际竞争力。

参 考 文 献(References)

[1] 蔡天智. 我国医疗器械产业发展前景 [J]. 中国医疗器械信息, 2012, 18(12): 19-22, 26.
CAI T Z. The trade development prospects of China's medical device industry [J]. Chin Med Device Inf, 2012, 18(12): 19-22, 26.

[2] 中华人民共和国国务院. 中国制造 2025 [EB/OL]. (2015-05-19) [2024-12-17]. https://www.gov.cn/zhengce/content/2015-05/19/content_9784.htm.
State Council of the People's Republic of China. Made in China 2025 [EB/OL]. (2015-05-19) [2024-12-17]. https://www.gov.cn/zhengce/content/2015-05/19/content_9784.htm.

[3] 中华人民共和国国务院. “健康中国 2030”规划纲要 [EB/OL]. (2016-10-25) [2024-12-17]. https://www.gov.cn/zhengce/2016-10/25/content_5124174.htm.
State Council of the People's Republic of China. Outline of the “Healthy China 2030” plan [EB/OL]. (2016-10-25) [2024-12-17]. https://www.gov.cn/zhengce/2016-10/25/content_5124174.htm.

[4] 史新立, 田佳鑫, 骆庆峰, 等. 如何积极推进高端创新医疗器械发展 [J]. 中国医疗器械信息, 2020, 26(21): 15-18.
SHI X L, TIAN J X, LUO Q F, et al. How to actively promote the development of high-end innovative medical devices [J]. Chin Med Device Inf, 2020, 26(21): 15-18.

[5] 秦川, 魏泓. 实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2015.
QIN C, WEI H. Laboratory animal science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2015.

[6] MCGONIGLE P, RUGGERI B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(1): 162-171.

[7] 吴丰春, 魏泓, 甘世祥, 等. 巴马小型猪与贵州小型香猪遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 实验生物学报, 2001, 34(2): 115-119.
WU F C, WEI H, GAN S X, et al. Analysis on genetic diversity to Bama miniature pigs and Guizhou miniature pigs by rapid [J]. Acta Biol Exp Sin, 2001, 34(2): 115-119.

[8] 王芳, 牛冬, 余旭平, 等. 猪生物医学模型研究进展 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(4): 99-102.
WANG F, NIU D, YU X P, et al. Progress on swine biomedical model [J]. Prog Vet Med, 2009, 30(4): 99-102.

[9] MIYAGI C, FUKAMACHI K, MIYAMOTO T, et al. Characterization of left atrial assist device implantation: Early results of *ex vivo* anatomical assessment [J]. Artif Organs, 2023, 47(1): 129-137.

[10] ZHANG B L, BIANCO R W, SCHOEN F J. Preclinical assessment of cardiac valve substitutes: current status and considerations for engineered tissue heart valves [J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 72.

[11] MOHIUDDIN M M, SINGH A K, SCOBIE L, et al. Graft dysfunction in compassionate use of genetically engineered pig-to-human cardiac xenotransplantation: a case report [J]. Lancet, 2023, 402(10399): 397-410.

[12] BIVIN W S, MCCLURE R C. Deciduous tooth chronology in the mandible of the domestic pig [J]. J Dent Res, 1976, 55(4): 591-597.

[13] SONOYAMA W, LIU Y, FANG D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine [J]. PLoS One, 2006, 1(1): e79.

[14] 王洋, 陈克研, 张贺, 等. 巴马小型猪在达芬奇机器人手术系统中的麻醉管理 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 227-230.
WANG Y, CHEN K Y, ZHANG H, et al. Anesthetic management in Bama minipigs with da vinci robotic operating system [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2012, 39(6): 227-230.

[15] LIM S, OH Y I, JEONG J W, et al. Pharmacokinetics of intravenous administered two different high doses of ascorbic acid in healthy beagle dogs [J]. J Adv Vet Anim Res, 2019, 6(4): 481-485.

[16] BUOTE N, CHALON A, MAIRE J, et al. Preliminary experience with robotic cholecystectomy illustrates feasibility

- in a canine cadaver model [J]. *Am J Vet Res*, 2023, 84(10): 1-8.
- [17] MUÑOZ F, LÓPEZ-PEÑA M, MIÑO N, et al. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2012, 14(2): 226-235.
- [18] KAR S, HOU D, JONES R, et al. Impact of Watchman and Amplatzer devices on left atrial appendage adjacent structures and healing response in a canine model [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2014, 7(7): 801-809.
- [19] GUO G, HU J, WANG F, et al. A fully degradable transcatheter ventricular septal defect occluder: Towards rapid occlusion and post-regeneration absorption [J]. *Biomaterials*, 2022, 291: 121909.
- [20] ZHOU G, LI M H, LU H T, et al. No inferiority of Tonbridge thrombectomy device for acute thrombus retrieval compared with Solitaire device: an experimental evaluation with a canine distal external carotid-maxillary artery occlusion model [J]. *J Neurointerv Surg*, 2018, 10(11): 1085-1091.
- [21] WAKSMAN R, PICHARD A D. Will TAVR become the default treatment for patients with severe aortic stenosis? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(2): 122-124.
- [22] CARNEY J P, SCHAPPA FAUSTICH J, LAHTI M T, et al. New model for the assessment of transcatheter aortic valve replacement devices in sheep [J]. *J Invest Surg*, 2022, 35(2): 371-377.
- [23] WILLIAMSON T, RYAN S, BUEHNER U, et al. Robot-assisted implantation of additively manufactured patient-specific orthopaedic implants: evaluation in a sheep model [J]. *Int J Comput Assist Radiol Surg*, 2023, 18(10): 1783-1793.
- [24] KAISER F, SCHRÖTER L, WOHLFAHRT P, et al. Exploring the potential of magnesium oxychloride, an amorphous magnesium phosphate, and newberyite as possible bone cement candidates [J]. *J Biomater Appl*, 2023, 38(3): 438-454.
- [25] OKANO H, KISHI N. Investigation of brain science and neurological/psychiatric disorders using genetically modified non-human primates [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 50: 1-6.
- [26] CHAN A W. Progress and prospects for genetic modification of nonhuman primate models in biomedical research [J]. *ILAR J*, 2013, 54(2): 211-223.
- [27] 李乙江, 肖文娟, 赵玲, 等. 灵长类动物在人类神经系统疾病动物模型中的应用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(5): 849-857.
- LI Y J, XIAO W X, ZHAO L, et al. Application of Primates in human nervous system diseases animal models research [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2022, 49(5): 849-857.
- [28] CABRERA M, PENNEC D L, GUELLEC S L, et al. Influence of mesh nebulizer characteristics on aerosol delivery in non-human Primates [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 191: 106606.
- [29] CHU W T, CASTRO M A, REZA S, et al. Novel machine-learning analysis of SARS-CoV-2 infection in a subclinical nonhuman primate model using radiomics and blood biomarkers [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 19607.
- [30] 张少辉, 米莉莉. 论中美两国在药品监督管理方面的差异性 [J]. *中国药房*, 2003, 14(7): 423-425.
- ZHANG S H, MI L L. Discussion on the difference between FDA and SDA in drug administration [J]. *Chin Pharm*, 2003, 14(7): 423-425.
- [31] PRINS N W, MYLAVARAPU R, SHOUP A M, et al. Spinal cord neural interfacing in common marmosets (*Callithrix jacchus*) [J]. *J Neural Eng*, 2020, 17(1): 016031.
- [32] SWINDLE M M, THOMPSON R P, CARABELLO B A, et al. Congenital cardiovascular disease. in biomedical research [M]. Ames IA: Iowa State University Press, 1992, 176-1841.
- [33] MITCHELL S E, ANDERSON J H, SWINDLE M M, et al. Atrial septostomy: stationary angioplasty balloon technique-experimental work and preliminary clinical applications [J]. *Pediatr Cardiol*, 1994, 15(1): 1-7.
- [34] ASRAFUZZAMAN M, CAO Y, AFROZ R, et al. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1242-1251.
- [35] SRINIVASAN K, RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview [J]. *Indian J Med Res*, 2007, 125(3): 451-472.
- [36] JIANG M, HU H, ZHAO K, et al. The G4 resolvase RHAU modulates mRNA translation and stability to sustain postnatal heart function and regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100080.
- [37] LIU Z, CAI Y, LIAO Z, et al. Cloning of a gene-edited macaque monkey by somatic cell nuclear transfer [J]. *Natl Sci Rev*, 2019, 6(1): 101-108.
- [38] QIU P, JIANG J, LIU Z, et al. BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders [J]. *Natl Sci Rev*, 2019, 6(1): 87-100.
- [39] UMEYAMA K, WATANABE M, SAITO H, et al. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 697-706.
- [40] LOUKANOV T, GEIGER R, AGRAWAL R. Animal models

- related to congenital heart disease and clinical research in pulmonary hypertension [J]. *Cardiology*, 2010, 116(1): 18–25.
- [41] LI B, CUI Y, ZHANG D, et al. The characteristics of a porcine mitral regurgitation model [J]. *Exp Anim*, 2018, 67(4): 463–477.
- [42] SAZZAD F, KOLLENGODE R, BEVERLY C L X, et al. Preclinical large animal *in vivo* experiments for surgically implanted atrioventricular valve: reappraisal and systematic review [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2023, 19(1): e170622206130.
- [43] BUSZMAN P P, KACHEL M, MILEWSKI K P, et al. Long-term bio-functional performance of a novel, self-positioning balloon expandable transcatheter biological aortic valve system in the ovine aortic banding model [J]. *Cardiol J*, 2024, 31(1): 124–132.
- [44] VARGA M, KRESAKOVA L, DANKO J, et al. Tetracalcium phosphate bio cement hardened with a mixture of phytic acid-phytase in the healing process of osteochondral defects in sheep [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21): 15690.
- [45] ZAMBRASKI E J, CICCONE C D. Effects of aortic constriction and renal denervation in DOCA-hypertensive swine [J]. *Am J Physiol*, 1987, 253(6): F1223-F1231.
- [46] COMPSTON J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update [J]. *Endocrine*, 2018, 61(1): 7–16.
- [47] TALAVERA J, GIRALDO A, FERNÁNDEZ-DEL-PALACIO M J, et al. An upgrade on the rabbit model of anthracycline-induced cardiomyopathy: shorter protocol, reduced mortality, and higher incidence of overt dilated cardiomyopathy [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 465342.
- [48] YIN W, LIAO D, XI S, et al. NO-1886 (ibrolipim) decreases ectopic lipids deposition, protects pancreatic β cell in high fat, high sucrose diet-fed mini-pig [J]. *J Endocrinol*, 2004, 180: 399–408.
- [49] HOLVOET P, THEILMEIER G, SHIVALKAR B, et al. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(3): 415–422.
- [50] GUERRATY M A, GRANT G R, KARANIAN J W, et al. Hypercholesterolemia induces side-specific phenotypic changes and peroxisome proliferator-activated receptor- γ pathway activation in swine aortic valve endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(2): 225–231.
- [51] KUNZELMAN K S, LINKER D T, SAI S, et al. Acute mitral valve regurgitation created in sheep using echocardiographic guidance [J]. *J Heart Valve Dis*, 1999, 8(6): 637–643.
- [52] CIRERA S, MOESGAARD S G, ZOIS N E, et al. Plasma proANP and SDMA and microRNAs are associated with chronic mitral regurgitation in a pig model [J]. *Endocr Connect*, 2013, 2(3): 161–171.
- [53] YAMAUCHI H, FEINS E N, VASILYEV N V, et al. Creation of nonischemic functional mitral regurgitation by annular dilatation and nonplanar modification in a chronic *in vivo* swine model [J]. *Circulation*, 2013, 128(11): S263-S270.
- [54] SCHMITTO J D, COSKUN K O, COSKUN S T, et al. Hemodynamic changes in a model of chronic heart failure induced by multiple sequential coronary microembolization in sheep [J]. *Artif Organs*, 2009, 33(11): 947–952.
- [55] 钟丽珊, 杨燕晨, 黄燕莹, 等. 采用经心尖人工腱索植入装置建立二尖瓣反流动物模型 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2023, 31(4): 570–575.
- ZHONG L S, YANG Y C, HUANG Y Y, et al. Establishment of mitral regurgitation model by a transapical artificial chordae tendineae implantation device in swines [J]. *Chin J Clin Thorac Cardiovasc Surg*, 2023, 31(4): 570–575.

[收稿日期] 2024-01-23