

徐玲慧,梁颖兰,栗宏伟,等. 常春藤素皂苷元介导 Axin2/AREG 轴抑制炎症缓解小鼠急性肾损伤 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 157-168.

XU L H, LIANG Y L, SU H W, et al. Hederagenin mediates Axin2/AREG axis to inhibit inflammation and alleviate acute kidney injury in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 157-168.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.001

常春藤素皂苷元介导 Axin2/AREG 轴抑制炎症缓解小鼠急性肾损伤

徐玲慧¹, 梁颖兰², 栗宏伟³, 李健春¹, 李贵平⁴, 王丽^{1*}, 邹远霞^{1,4*}

(1. 西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院肾病科, 四川 泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院泌尿外科, 四川 泸州 646000; 4. 西南医科大学附属中医医院儿童诊疗中心, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨常春藤素皂苷元(hederagenin, HDG)对顺铂(cisplatin, Cis)诱导的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)小鼠的保护作用及潜在机制。**方法** 将 24 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、AKI 模型组、HDG 低剂量组 HDG 高剂量组, 每组各 6 只。通过腹腔注射 Cis 20 mg/kg 建立小鼠 AKI 模型, HDG 低剂量组及 HDG 高剂量组分别给予 20、40 mg/kg 灌胃 HDG, 3 d 后进行取材。收集小鼠肾进行苏木素-伊红(HE)及糖原(periodic acid-schiff, PAS)染色评估肾病理情况, 收集血清检测肌酐、尿素氮的变化, Western Blot 检测 p-P65、P65、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等炎症相关蛋白的表达。体外使用 Cis 200 ng/mL 刺激肾小管上皮细胞(TCMK1)建立炎症细胞模型, 设置空白组、Cis 模型组、HDG 低剂量组、HDG 高剂量组、Axin2 过表达组、HDG + Axin2 过表达组, 收取细胞蛋白后检测 p-P65、P65、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、Axin2、AREG 的表达变化。**结果** 与对照组相比, AKI 模型组小鼠血清肌酐和尿素氮水平明显升高($P < 0.05$), 并伴随肾小管空泡变性、炎细胞浸润及糖原沉积等病理改变, 炎症相关蛋白 p-P65、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 Axin2 表达均显著上调($P < 0.05$)。HDG 干预后, 血清肌酐和尿素氮水平呈剂量依赖性下降(高剂量组降幅>低剂量组降幅, $P < 0.05$), 肾组织病理损伤明显减轻, 上述炎症因子及 Axin2 表达同步降低($P < 0.05$)。体外实验证实 HDG 可剂量依赖性抑制 Cis 诱导的 TCMK1 细胞中 Axin2 及相关炎症因子表达。转录组测序显示 Axin2 过表达显著上调双调蛋白(AREG)表达($P < 0.05$)。机制研究表明, HDG 通过抑制 Axin2/AREG 轴降低 p-P65 磷酸化水平($P < 0.05$), 而 Axin2 过表达可逆转 HDG 对 Cis 诱导肾小管细胞损伤的保护作用。**结论** HDG 通过抑制 Axin2/AREG 轴的激活减轻炎症, 缓解 AKI 小鼠肾损伤。

【关键词】 常春藤素皂苷元; 急性肾损伤; Axin2; AREG; 炎症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0157-12

Hederagenin mediates Axin2/AREG axis to inhibit inflammation and alleviate acute kidney injury in mice

XU Linghui¹, LIANG Yinglan², SU Hongwei³, LI Jianchun¹, LI Guiping⁴, WANG Li^{1*}, ZOU Yuanxia^{1,4*}

【基金项目】 国家自然科学基金(82104665), 四川省科技计划资助(2022YFS0621), 西南医科大学科技项目资助(2023ZYQ01)。Funded by National Natural Science Foundation of China (82104665), Sichuan Science and Technology Program (2022YFS0621), Southwest Medical University Technology Program (2023ZYQ01).

【作者简介】 徐玲慧, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 急性肾损伤及纤维化治疗。Email: 20220399120015@stu.swmu.edu.cn

【通信作者】 邹远霞, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 急性肾损伤及纤维化治疗。Email: zouyxp@swmu.edu.cn;

王丽, 女, 博士, 研究生导师, 研究方向: 急性肾损伤及纤维化治疗。Email: wangli120@swmu.edu.cn。

* 共同通信作者

(1. Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Nephrology, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Department of Urology, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 4. Children's Diagnosis and Treatment Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: ZOU Yuanxia. E-mail: zouyxp@swmu.edu.cn; WANG Li. E-mail: wangli120@swmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of hederagenin (HDG) on cisplatin (Cis)-induced acute kidney injury (AKI) in mice and its potential mechanism. **Methods** 24 male C57BL/6J mice were randomly divided into a control group, AKI model group, HDG low-dose group, and HDG high-dose group, with six mice in each group. AKI model was established by intraperitoneal injection of 20 mg/kg cisplatin (Cis). The HDG low-dose and HDG high-dose groups were given 20, 40 mg/kg HDG by intragastric administration, respectively, and samples were collected 3 days later. The kidneys of the mice were collected for hematoxylin-eosin (HE) and periodic-acid-schiff (PAS) staining to evaluate the kidney pathology, and serum was collected to detect changes in serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN). The expression of p-P65, P65, IL-6, TNF- α , IL-1 β , and other inflammatory-related proteins was detected by Western Blot. A TCMK1 (renal tubular epithelial cell) inflammatory cell model was established by Cis (200 ng/mL) stimulation *in vitro*. Blank group, Cis model group, HDG low-dose group, HDG high-dose group, Axin2 overexpression group, HDG + Axin2 overexpression group were set up. In the Axin2-overexpression group, the expression of p-P65, P65, IL-6, TNF- α , IL-1 β , Axin2, and AREG was detected among total cell proteins. **Results** Compared with the control group, AKI model mice exhibited significantly elevated serum creatinine and blood urea nitrogen levels ($P < 0.05$), accompanied by pathological alterations including vacuolar degeneration of renal tubules, inflammatory cell infiltration, and glycogen deposition, and the expression of inflammation-related proteins (p-P65, TNF- α , IL-6, IL-1 β) and Axin2 was markedly upregulated in AKI mice ($P < 0.05$). HDG treatment induced a dose-dependent reduction in serum creatinine and blood urea nitrogen levels (high-dose > low-dose, $P < 0.05$), alleviated renal histopathological damage, and concurrently suppressed the expression of these inflammatory mediators and Axin2 ($P < 0.05$). HDG was confirmed that dose-dependently inhibited Cis-induced upregulation of Axin2, and inflammatory cytokines *in vitro* experiments. Transcriptome sequencing revealed that Axin2 overexpression significantly increased amphiregulin (AREG) expression ($P < 0.05$). Mechanistically, HDG reduced p-P65 phosphorylation by suppressing the Axin2/AREG axis ($P < 0.05$), while Axin2 overexpression abolished the protective effects of HDG against Cis-induced renal tubular cell injury. **Conclusions** HDG protects against renal injury in AKI mice by reducing inflammation through the inhibition of Axin2/AREG axis activation.

[Keywords] hederagenin; acute kidney injury; Axin2; AREG; inflammation

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

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是由多种病因引起的以短期肾功能急剧下降为主要特点的临床综合征,致死率高,且发病率呈逐渐上升的趋势^[1]。AKI会对肾造成不可逆的损伤,若持续发展,最终会导致慢性肾病(chronic kidney injury, CKD)的发生^[2],所以早期抑制AKI的发生发展尤为重要。目前,针对AKI的治疗十分有限,因此,探索AKI新的治疗途径及其机制非常关键。常春藤皂苷元(hederagenin, HDG)是一种从黄芪、忍冬、威灵仙等中药中提取出来的五

环三萜皂苷^[3]。目前研究发现它对多种疾病均有治疗作用,例如HDG通过抑制NF- κ B信号通路和减少NLRP3炎症小体的释放,来减轻脓毒症大鼠肺组织的炎症水平和糖尿病心肌病小鼠的炎症反应,进而发挥对肺和心脏的保护作用^[4-5]。HDG通过抑制JAK/STAT介导的免疫反应,改善阿霉素诱导的肾小球肾炎^[6]。但是在AKI中的研究较少,本课题组前期研究发现HDG可通过A330074k22Rik/Axin2/ β -catenin改善AKI^[7],但进一步的机制仍不清楚。本研究拟通过构建顺

铂(cisplatin, Cis)诱导的动物和细胞炎症模型,进一步探讨 HDG 改善 AKI 的可能机制,以期为临床治疗 AKI 提供新的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康的 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 24 只,4 ~ 6 周龄,体质量 18 ~ 22 g,购买于西南医科大学实验动物中心【SCXK(川)2023-0017】,本实验中的小鼠饲养及无菌手术操作均在西南医科大学 SPF 实验动物中心完成【SYXK(川)2023-0065】,实验条件适宜,室温保持在 23 ~ 27 ℃,湿度保持在 45% ~ 55%,给予昼夜明暗交替(12 h/12 h)光照,全程自由进食、自由饮水。本实验中涉及动物操作程序得到西南医科大学实验动物伦理学批准(20231219-002)。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》,实验设计和饲养使用过程遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞株

小鼠肾小管上皮细胞株(TCMK1,货号:CL0440,湖南丰晖生物科技有限公司)。

1.1.3 主要试剂与仪器

HDG(纯度 > 98%,批号:SH8030,北京索莱宝有限公司);Cis 注射液(批号:H20040813,江苏豪森药业集团有限公司);p-P65 兔单抗、P65 兔单抗(批号:3033S,82420S,美国 CST 公司);TNF- α 鼠单抗、IL-1 β 鼠单抗、IL-6 鼠单抗(批号:sc-52746,sc-52012,sc-32296,北京 Santa cruz 公司);Axin2 兔单抗(批号:DF6978,江苏 Affinity 公司);AREG 兔单抗(批号:16036-1-AP,武汉 Proteintech 公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号:36313ES60,上海歌凡生物科技有限公司);糖原染色(PAS)试剂盒(批号:BP-DL031,南京森贝伽生物科技有限公司);免疫组化染色试剂盒(货号:PV-9000,北京中杉金桥生物技术有限公司);血清肌酐、尿素氮检测试剂盒(批号:20230202,20230131,南京建成生物工程研究所);转染试剂(批号:L3000150,美国 invitrogen 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, GIBCO, BioTek, 10099-14c);DMEM 培养基(GIBCO, BioTek, C11995500BT);TRIzol 试剂(Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)。自动酶标仪(型号:Synergy H, 美国 BioTek 公司);蛋白电泳仪(型号:Mini-Sub Cell GT, 美国 Bio-Rad 公司);倒置显微镜(型号:Eclipse Ti-s, 日本尼康)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及用药

24 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组、AKI 模型组、HDG 低剂量组、HDG 高剂量组,每组各 6 只。造模前 6 h 分别给予 HDG 低剂量组 20 mg/kg、HDG 高剂量组 40 mg/kg 的 HDG 灌胃(ig),连续 3 d,除对照组之外的所有组均给予 Cis 注射液(20 mg/kg)腹腔注射(ip)^[8],对照组给予等量的生理盐水。3 d 后处死小鼠,心脏取血,剖开腹腔取出双肾,去除包膜后予以 4%多聚甲醛 4 ℃固定 24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋保存,其余组织存于-80 ℃冰箱。

1.2.2 各组小鼠血清肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测

采集各组血清后 4 ℃静置过夜,3000 r/min,离心 15 min 收集上清,按照试剂盒说明书所述方法检测 Scr 及 BUN,记录各组数据并进行统计学分析。

1.2.3 肾组织病理染色

石蜡切片于 65 ℃烘烤 2 h 后,常规脱蜡复水,按照 HE 和 PAS 染色说明书要求操作,在光学显微镜下通过 HE 染色评估肾组织结构改变情况,通过 PAS 染色观察糖原沉积物情况。免疫组化:将小鼠肾包埋后,切 4 μ m 的石蜡片备用,将切片进行常规脱蜡、复水、抗原修复后,加入 Axin2 抗体,以 1 : 100 的浓度稀释,4 ℃孵育过夜,予以 PBS 3 min $\times$ 3 次清洗后,加入二抗孵育 1 h。DAB 显色成功后,苏木素复染 15 s,流水冲洗 10 min,二甲苯透明晾干,中性树脂封片后于光学显微镜下观察 Axin2 的表达情况。

1.2.4 体外炎症细胞模型的构建

TCMK1 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中培养,置于 37 ℃培养箱中孵育,分别设置空白组、Cis 模型组(Cis 200 ng/mL)、HDG 低剂量组(Cis 200 ng/mL + HDG 10 μ g/mL)、HDG 高剂量组(Cis 200 ng/mL + HDG 30 μ g/mL)、Axin2 过表达组(Cis 200 ng/mL + Axin2 overexpression)、HDG + Axin2 过表达组(Cis 200 ng/mL + HDG 30

μg/mL + Axin2 overexpression), 其中 HDG 预处理 2 h, Cis 刺激 24 h 后收集细胞提取蛋白和 RNA。

1.2.5 细胞转染

细胞在不含青霉素或链霉素的培养基中培养至 60%, 将 pcDNA3.1-Axin2 过表达质粒按 Lipofectamine 转染试剂说明书转染进入 TCMK1 细胞并过表达 Axin2。

1.2.6 转录组测序(RNA-seq)

使用 TRIzol 试剂从 TCMK1 对照组和 Axin2 过表达组中提取 RNA, 检测合格后进行 mRNA 富集、片段化及 cDNA 合成, 构建完成 cDNA 文库后, 进行高通量测序, 测序及生物信息分析由百迈客生物完成。

1.2.7 Western Blot 检测炎性蛋白表达

将 0.1 g 肾组织或细胞加入裂解液和蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的混合液中, 研磨后超声, 冰上裂解 15 ~ 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min 收取上清即为蛋白样品。采用考马斯亮蓝测定蛋白浓度, 将每个样品的蛋白浓度调至 10%, 加入相对应的 loading buffer, 100 ℃ 煮 10 min 后进行上样。

在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 100 V 恒压转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 分别加入稀释后的一抗 GAPDH、p-P65、P65、TNF-α、IL-1β、IL-6、Axin2 和 AREG, 于 4 ℃ 摇床过夜后 TBST 5 min × 3 次清洗, 加入 HRP 标记二抗在室温下孵育 1 h, TBST 再次清洗 5 min × 3 次, 加入 ECL 发光液进行显色, 凝胶成像分析仪上曝光成像, 对目的蛋白和内参蛋白的灰度值进行分析。

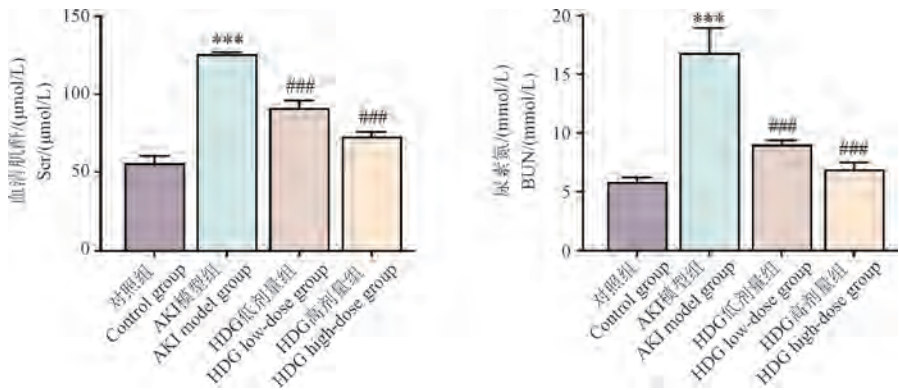
1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 多组间的比较采用单因素方差分析, 两组间的比较采用 *t* 检验, 数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 *P* < 0.05 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 HDG 对 AKI 小鼠 Scr 和 BUN 的影响

与对照组比, 模型组小鼠 Scr、BUN 水平明显升高 (*P* < 0.001); 与 AKI 模型组相比, HDG 低、高剂量组的 Scr、BUN 水平均有不同程度的降低 (*P* < 0.001), 且 HDG 高剂量组下降更为明显。表明 HDG 可有效恢复 AKI 小鼠的肾功能。见图 1。



注: 与对照组相比, *** *P* < 0.001; 与 AKI 模型组相比, ### *P* < 0.001。
图 1 HDG 对 AKI 小鼠 Scr 和 BUN 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with control group, *** *P* < 0.001. Compared with AKI model group, ### *P* < 0.001.

Figure 1 Effects of HDG on Scr and BUN levels in AKI mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2 HDG 对 AKI 小鼠肾病理结构的影响

HE 及 PAS 染色结果显示, 与对照组相比, AKI 模型组小鼠肾组织结构紊乱、肾小管上皮细胞空泡变性, 部分可见坏死, 大量炎性细胞浸润, 糖原沉积物明显增加; 与 AKI 模型组相比, HDG 低、高剂量组小鼠的肾组织水肿和炎性细胞浸润明显减轻, 肾小球及肾小管组织结构较为完整、

清晰, 肾小管空泡变性明显缓解, 表明 HDG 可缓解 AKI 小鼠的肾病理损伤。见图 2。

2.3 HDG 对 AKI 小鼠肾炎症相关蛋白表达的影响

Western Blot 显示, 与对照组相比, AKI 模型组小鼠肾中与炎症相关的蛋白 p-P65、TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达均明显升高 (*P* < 0.01); 与 AKI

模型组相比,上述炎症相关蛋白在 HDG 低、高剂量组的表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 HDG 对 Cis 诱导的 TCMK1 细胞炎症相关蛋白的影响

Western Blot 结果显示,与空白组相比,Cis 模型组中与炎症相关的蛋白 p-P65、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达均明显升高($P < 0.05$);与 Cis 模型组相比,上述炎症相关蛋白在 HDG 低、高剂量组的

表达水平显著降低($P < 0.05$),且降低幅度与 HDG 干预浓度成正相关。见图 4。

2.5 HDG 对各组 Axin2 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示,与对照组相比,AKI 模型组小鼠肾组织中 Axin2 的黄色沉积明显增多($P < 0.01$),且主要表达于肾小管;与 AKI 模型组比较,HDG 低、高剂量组小鼠肾组织内 Axin2 的沉积明显减少($P < 0.05$)。见图 5。在体外实验

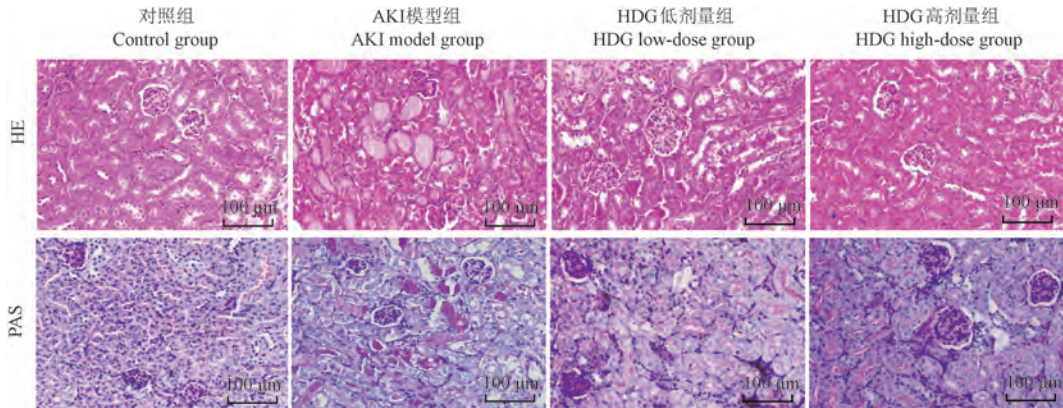
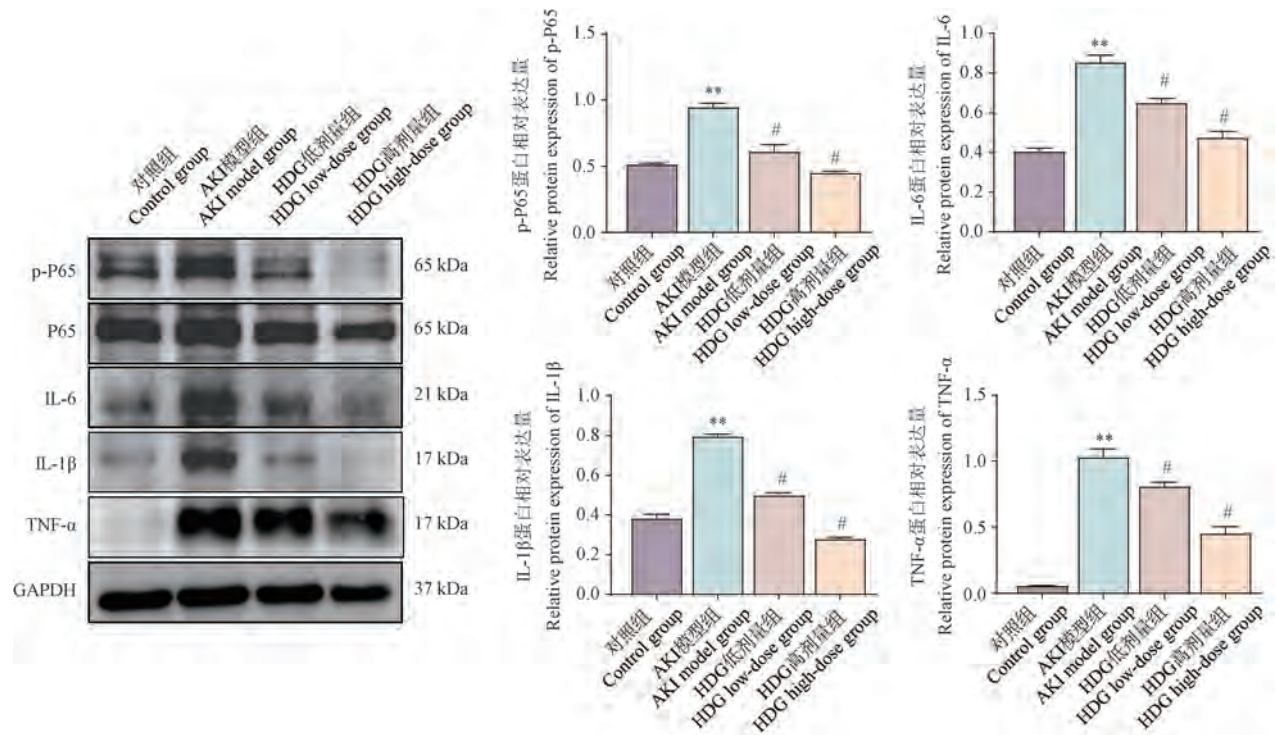


图 2 HDG 对 AKI 小鼠肾组织病理形态的影响($n = 6$)

Figure 2 Effect of HDG on pathological morphology of renal tissue in AKI mice($n = 6$)

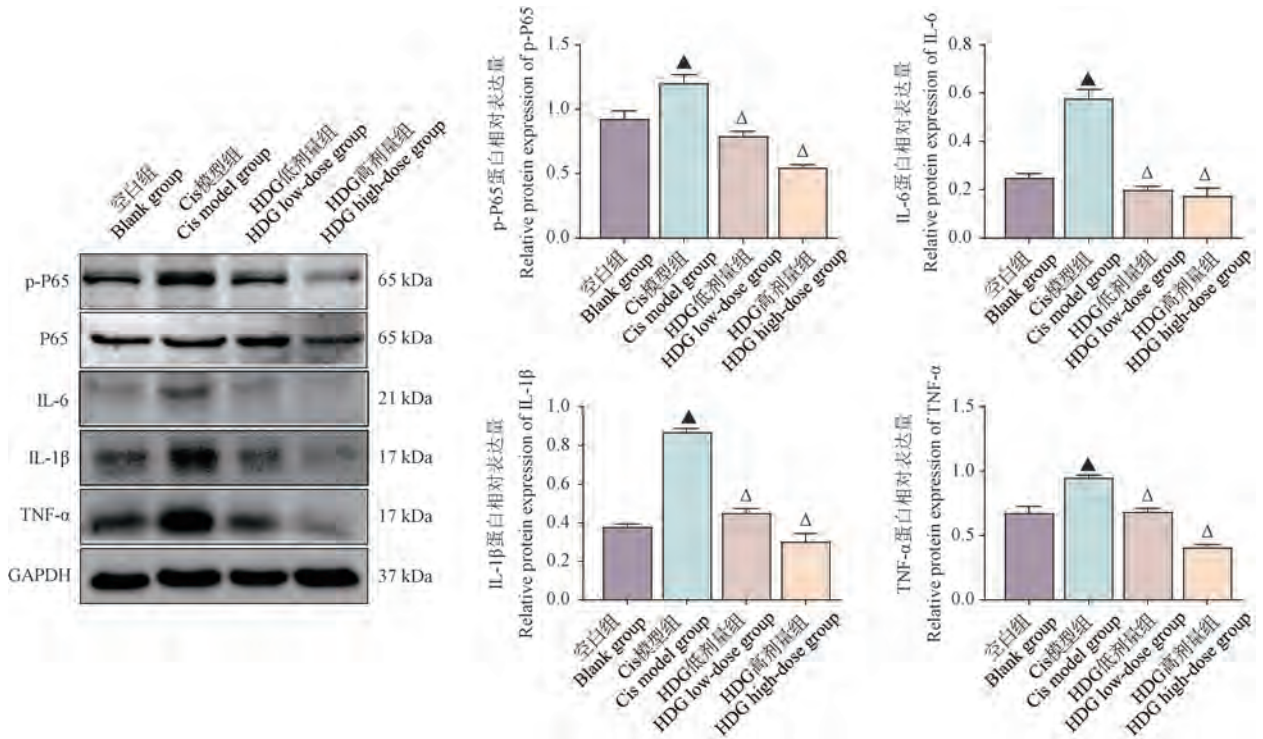


注:与对照组相比,* $P < 0.01$;与 AKI 模型组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图 3 HDG 对 AKI 小鼠肾组织炎症相关蛋白水平的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 3 Changes of inflammation related protein levels in kidney tissue of AKI mice induced by HDG($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注:与空白组相比,▲ $P < 0.05$;与 Cis 模型组相比,Δ $P < 0.05$ 。(下同)

图 4 HDG 对 Cis 诱导的 TCMK1 细胞炎症相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with the blank group, ▲ $P < 0.05$. Compared with Cis model group, Δ $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Effect of HDG on inflammation related proteins in Cis-induced TCMK1($\bar{x} \pm s, n = 3$)

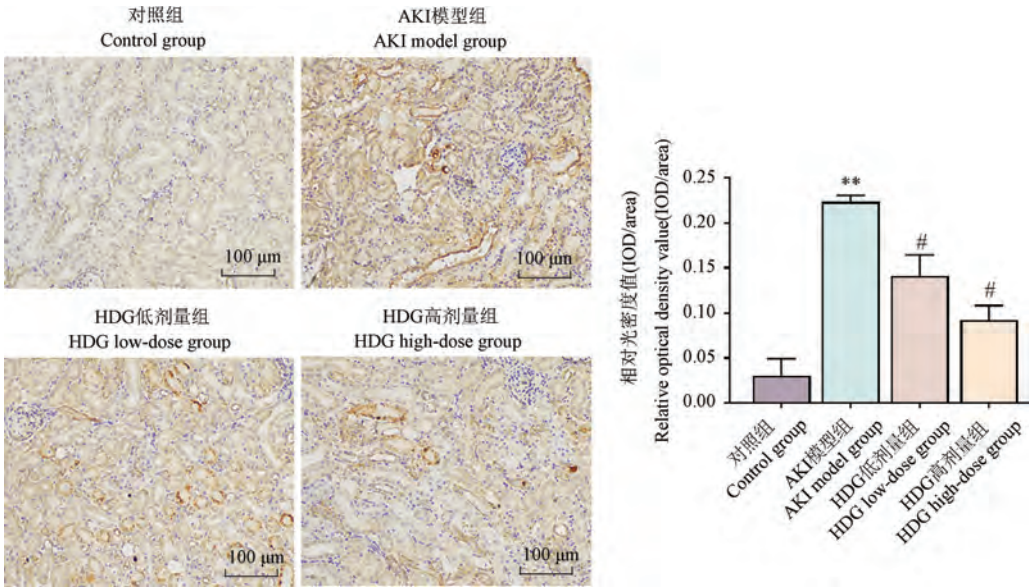


图 5 HDG 对 AKI 小鼠肾组织 Axin2 蛋白表达的影响($n = 6$)

Figure 5 Effect of HDG on Axin2 protein expression in kidney tissue of AKI mice($n = 6$)

中,Western Blot 结果显示,与空白组相比,Cis 模型组 Axin2 的蛋白表达水平明显上升($P < 0.05$);与 Cis 模型组比较,HDG 低、高剂量组 Axin2 的表达显著减少($P < 0.05$)。见图 6。

2.6 TCMK1 对照组与 Axin2 过表达组 RNA-seq 分析的差异基因结果

与 TCMK1 对照组相比,Axin2 过表达组存在 14 768 个差异基因,其中差异倍数最明显的基因

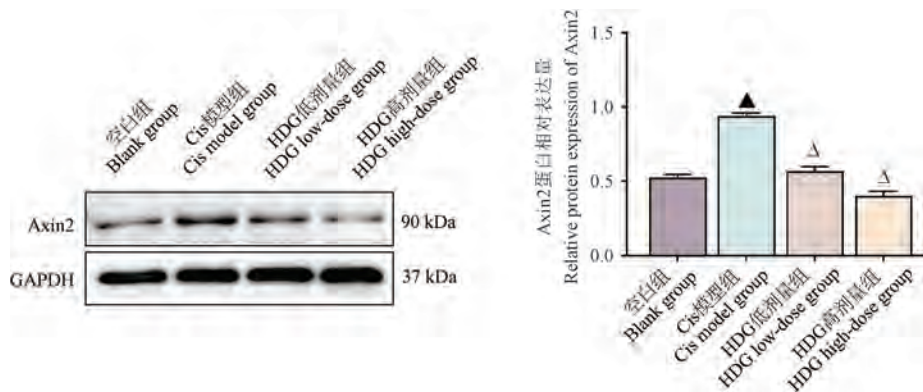
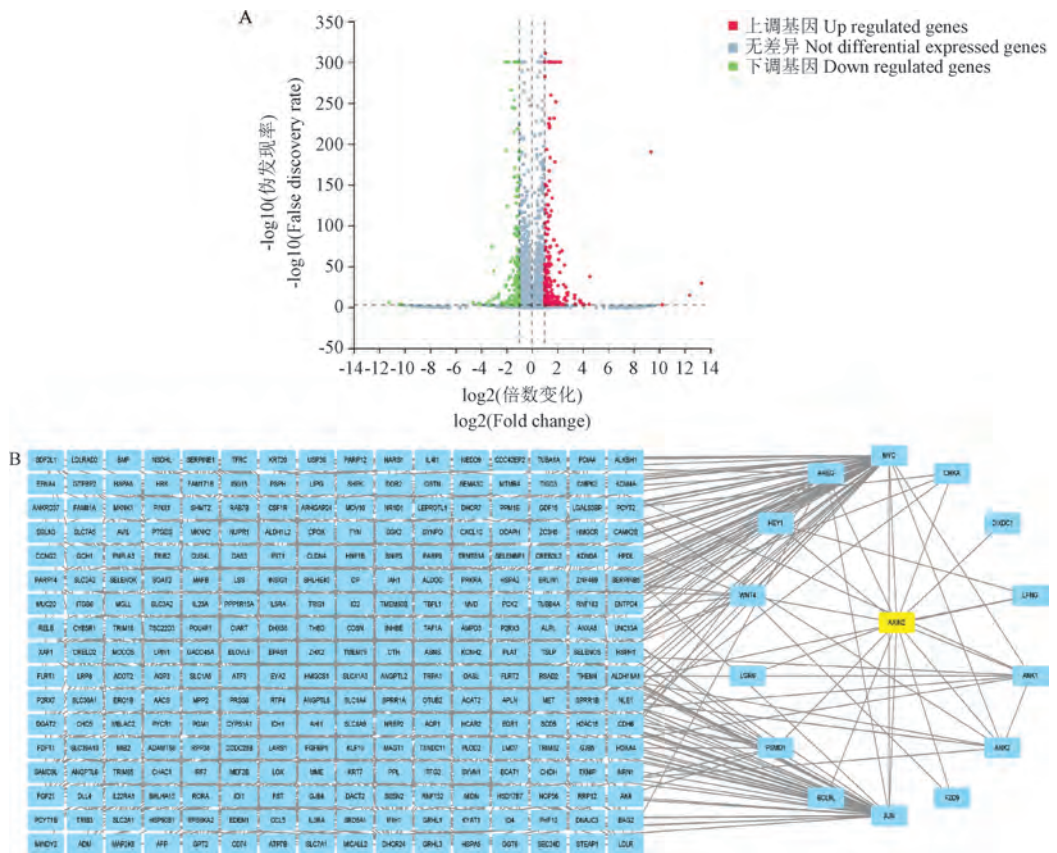


图 6 HDG 对 Cis 诱导的 TCMK1 细胞中各组 Axin2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 6 Effect of HDG on the expression of Axin2 protein in Cis-induced TCMK1($\bar{x} \pm s, n = 3$)

有 420 个,包括 AREG 等 249 个上调基因和 171 个下调基因(图 7A)。将得到的差异基因与 Axin2 进行蛋白互作可视化处理,建立蛋白互作网络图。结果显示双调蛋白(amphiregulin, AREG)、Hes 相关家族 bHLH 转录因子(hes-related family bHLH transcription factor,HEY1)、WNT 家族蛋白 4(WNT family protein 4,WNT4)、富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 6(leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6,LGR6)、26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 6(26 S proteasome



注:A:TCMK1 对照组与 Axin2 过表达组差异基因火山图;B:蛋白互作图。

图 7 TCMK1 对照组与 Axin2 过表达组测序的差异基因结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

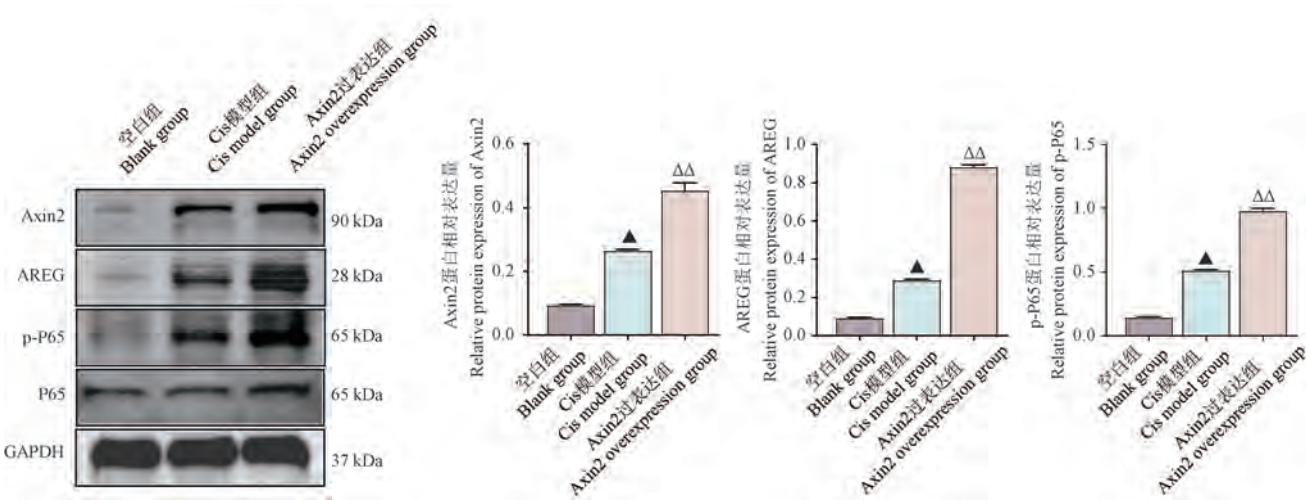
Note. A. Volcano map of differential genes between TCMK1 control group and Axin2 overexpression group. B. Protein interaction map.

Figure 7 Differentially expressed genes in the TCMK1 control group and Axin2 overexpression group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

non-ATPase regulatory subunit 6, PSMD6)、类 B 细胞淋巴瘤 9 类似蛋白 (b-cell lymphoma 9-like protein, BCL9L)、Jun 原癌基因 (Jun proto-oncogene, JUN)、卷曲受体蛋白 9 (frizzled receptor protein 9, FZD9)、锚蛋白 2 (ankyrin 2, ANK2) 锚蛋白 1 (ankyrin 1, ANK1)、0-岩藻糖肽 3-β-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 (lunatic fringe, LFNG)、DIX 结构域蛋白 1 (DIX domain-containing protein 1, DIXDC1)、鸭胆碱激酶 α (choline kinase alpha, CHKA)、髓细胞增生蛋白 (myelocytomatosis oncogene, MYC), 可能是核心靶点 (图 7B)。AREG 在多种炎症反应中发挥重要作用^[9-11]。研究表明, AREG 参与支气管炎和肺部炎症的进程^[12-13]。此外, AREG 被发现可促进肾纤维化的进展^[14], 但在 AKI 中的作用尚未报道。

2.7 过表达 Axin2 后对 p-P65 和 AREG 蛋白的影响

通过 Western Blot 检测了空白组与 Axin2 过表达组靶点的情况, 结果发现与空白组相比, Cis 模型组中 p-P65、Axin2 和 AREG 的蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 Cis 模型组相比, Axin2 过表达组中的 p-P65、Axin2 和 AREG 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 这与测序结果一致 (见图 8)。随后为了明确 HDG 是否通过调控 Axin2/AREG 轴发挥肾保护作用, 进行了 Western Blot 检测, 结果显示, 与 Cis 模型组相比, HDG 高剂量组的 p-P65、Axin2 和 AREG 的蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 HDG 高剂量组相比, HDG + Axin2 过表达组的 p-P65、Axin2 和 AREG 的蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (见图 9)。



注: 与 Cis 模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 8 过表达 Axin2 后对 p-P65 和 AREG 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

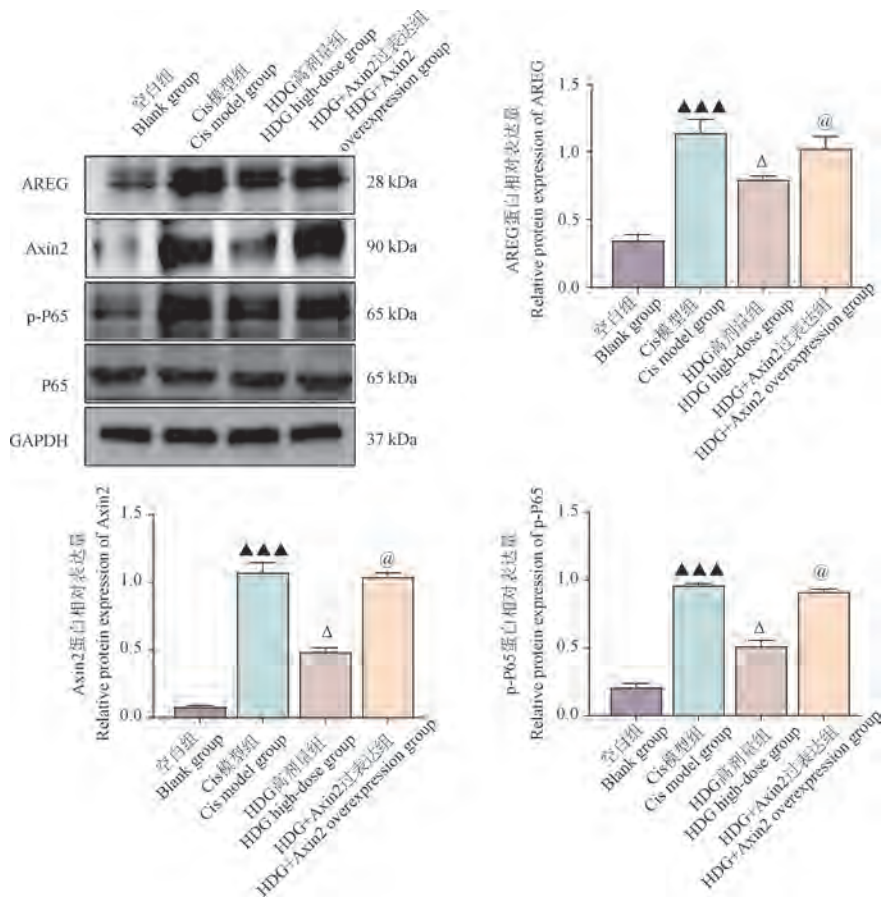
Note. Compared with Cis model group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 8 Effect of Axin2 overexpression on p-P65 and AREG proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

AKI 指的是肾功能的突然丧失, 以 Scr 和 BUN 的上升和排尿减少为主要特征的一种疾病。据报道目前 AKI 导致的全球死亡率已经超过了心力衰竭、糖尿病、乳腺癌等导致的死亡率^[15]。导致 AKI 的风险因素有许多, 例如血容量不足、肾毒性药物、急性感染、败血症、癌症的化疗等。尽管对 AKI 的认识在不断加深, 目前仍未找到有效的治疗方法可以促进肾的恢复^[16]。因此, 寻找

新的更为行之有效的治疗方式十分重要。Cis 作为一线抗癌药物, 广泛应用于临床抗癌治疗^[17], 但因其肾毒性导致临床应用受限。本实验在采用 Cis 诱导的经典 AKI 模型中进行研究^[18]。本研究结果表明在 AKI 小鼠中, Scr 及 BUN 水平明显升高, 肾病理染色可见显著的肾结构破坏, 包括肾小管坏死、空泡变性、肾小管上皮细胞肿胀变性等, 这与 AKI 的临床特征相吻合。体外实验中亦采用 Cis 诱导的 TCMK1 细胞炎症模型模拟 AKI 小鼠的炎症反应, 可见 p-P65、TNF-α、IL-6、



注:与空白组相比,*** $P < 0.001$;与 HDG 高剂量组相比,@ $P < 0.05$ 。

图 9 HDG 通过调控 Axin2/AREG 轴发挥肾保护作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with the blank group, *** $P < 0.001$. Compared with HDG high-dose group, @ $P < 0.05$.

Figure 9 HDG exerts a renal protective effect by regulating the Axin2/AREG axis($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IL-1 β 炎症相关蛋白的显著上升。

中医药在肾损伤的治疗中存在许多优势^[19-20],目前许多中药复方、单体被报道对肾疾病有效,例如槲皮素可能通过抑制铁死亡保护小鼠急性肾损伤^[21];芪苓通络方通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路缓解特发性膜性肾病大鼠的肾损伤^[22];本课题组在之前的研究中还发现了黄芪三七合剂可以通过下调巨噬细胞中的 Mincle 通路来抑制 AKI 中的炎症反应^[23]。HDG 是本课题组从黄芪三七合剂质谱分析中得到的中药单体,其在炎症方面的应用十分广泛,有研究发现其可以通过抑制 NLRP3 炎症小体及 NF- κ B 信号的激活来减轻大鼠的急性肺损伤^[5];还可以通过抑制 JAK2/STAT3/MAPK 信号通路来发挥在骨关节炎中的抗炎作用^[24]。本课题组前期研究还发现 HDG 可通过 A330074k22Rik/Axin2/ β -catenin 改善 AKI^[7],但其潜在的作用机制仍需进

一步探索。本研究的体内外实验结果均表明 HDG 对 Cis 诱导的急性肾损伤小鼠有明确的预防保护作用,能降低炎症相关蛋白的表达,并且可能存在剂量依赖性。

Axin2 是一种编码为 843 个氨基酸长的蛋白质,它位于人类的 17q24 号染色体上,最先被认为是一种肿瘤抑制因子^[25]。随后的研究表明它是 WNT 通路的一个负调节因子,且可以认为是 WNT 信号通路的直接效应基因^[26],并且对肾的发育以及急性肾小管的损伤发挥着重要作用,而 WNT 通路是 AKI 进展中的一个重要通路^[27-28]。本研究中,体内外实验模型组中均检测到 Axin2 的表达水平升高,说明在 AKI 中 Axin2 被激活,与之相反的是经 HDG 干预后的小鼠和细胞中 Axin2 的表达量下调,说明 HDG 可以抑制 Axin2 的表达。为了寻找 Axin2 作用的核心靶点,本研究进行了转录组测序,测序结果和研究结果显示

AREG 可能是 Axin2 的下游靶标。本研究实验结果表明 AKI 模型中, Axin2 的表达增加, 同时伴有 AREG 的表达升高。为了进一步明确 HDG 是否通过调节 Axin2/AREG 轴发挥肾保护作用, 在 TCMK1 细胞中高表达 Axin2, 发现炎症相关蛋白上调, 同时 AREG 的表达水平也增加, 单纯予以 HDG 干预的细胞中 Axin2、AREG 和炎症相关蛋白表达水平平均下调, 而在 Axin2 高表达的细胞中同时予以 HDG 进行干预, 发现 HDG 对肾的保护作用消失, 炎症相关蛋白、Axin2 和 AREG 的表达水平再次上升。这些结果说明 HDG 可能是通过抑制 Axin2/AREG 轴的激活发挥在 AKI 中的保护作用。

AREG 是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的配体, 通过与 EGFR 结合, 在组织修复、炎症和免疫等方面发挥重要作用。既往研究表明 AREG 在皮肤炎症、气道炎症和肾小球肾炎方面发挥促进作用^[29-31], 但在 AKI 中的作用未见报道。此外, AREG 在肾纤维化中的作用已有报道。OSAKABE 等^[32]的研究发现血清可溶性 AREG 水平与 CKD 患者当前及 2 年和 3 年后的 Scr 水平呈正相关, 并且糖尿病肾病和原发性高血压患者的血清可溶性 AREG 水平显著升高。AREG 在晚期 CKD 患者的肾小管细胞中高表达, 而在肾功能保存的患者中仅弱表达。因此血清可溶性 AREG 水平可能作为 CKD 患者肾功能和肾预后的生物标志物。KEFALOYIANNI 等^[33-34]研究证实了 AKI 和肾纤维化患者的可溶性 AREG 在人尿中显著上调, 并通过体外实验验证 AREG 具有独特的促纤维化作用, 这种作用会因 TNF- α 诱导的 proAREG 裂解成 AREG 而增强。SON 等^[35]使用了两种由单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UO) 和高嘌呤饮食 (adenine, AD) 诱导的肾纤维化动物模型, 研究靶向 AREG 的自组装微泡抑制性 RNA (SAMiRNA-AREG) 对肾纤维化的治疗作用, 发现 SAMiRNA-AREG 显著降低了 UO 和 AD 诱导的 AREG mRNA 表达, 有效改善肾组织炎症和肾纤维化, 体外实验证实了 SAMiRNA-AREG 减弱了 TGF- β 1 诱导的细胞外基质产生和肌成纤维细胞分化, 并发现在 UO 或 AD 模型中上调的 AREG 主要定位于远端肾小管。这些结果证实了

AREG 在肾纤维化中的作用, 为肾纤维化的治疗提供了参考。Axin2/AREG 轴在 AKI 中的直接作用目前在 Pubmed 中尚未检索到, 这也是本研究的新颖之处。

综上, 本研究表明 HDG 能够减轻 Cis 诱导的 AKI 小鼠的肾功能受损、组织病理损伤、降低炎症相关蛋白的表达, 抑制 Axin2/AREG 轴的激活, 这可能是其发挥肾保护作用的关键, 这为临床治疗 AKI 提供了可能的方向。然而本研究未能具体阐明 HDG 调控 Axin2/AREG 轴发挥抗炎作用的具体途径, 仍需进一步探索。

参 考 文 献 (References)

- [1] PEERAPORN RATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GÓMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment [J]. *Kidney Int*, 2019, 96(5): 1083-1099.
- [2] MATSUURA R, DOI K, RABB H. Acute kidney injury and distant organ dysfunction-network system analysis [J]. *Kidney Int*, 2023, 103(6): 1041-1055.
- [3] HUANG X, SHEN Q K, GUO H Y, et al. Pharmacological overview of hederagenin and its derivatives [J]. *RSC Med Chem*, 2023, 14(10): 1858-1884.
- [4] LI Y, DONG J, SHANG Y, et al. Anti-inflammatory effects of hederagenin on diabetic cardiomyopathy via inhibiting NF- κ B and smads signaling pathways in a type-2 diabetic mice model [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(45): 26238-26247.
- [5] WANG L, ZHAO M. Suppression of NOD-like receptor protein 3 inflammasome activation and macrophage M1 polarization by hederagenin contributes to attenuation of sepsis-induced acute lung injury in rats [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7262-7276.
- [6] ZHONG X, JIA J, TAN R, et al. Hederagenin improves adriamycin-induced nephropathy by inhibiting the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Integr Med Nephrol Androl*, 2024, 11(2): e22.
- [7] XIE K H, LIU X H, JIA J, et al. Hederagenin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury via inhibiting long non-coding RNA A330074k22Rik/Axin2/ β -catenin signalling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112: 109247.
- [8] MIAO N, YIN F, XIE H, et al. The cleavage of gasdermin D by caspase-11 promotes tubular epithelial cell pyroptosis and urinary IL-18 excretion in acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2019, 96(5): 1105-1120.
- [9] ZAISS D M W, GAUSE W C, OSBORNE L C, et al. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair [J]. *Immunity*, 2015, 42(2): 216-226.

- [10] SINGH S S, CHAUHAN S B, KUMAR A, et al. Amphiregulin in cellular physiology, health, and disease: potential use as a biomarker and therapeutic target [J]. J Cell Physiol, 2022, 237(2): 1143–1156.
- [11] PLATEN C, DRESCHERS S, REISS L K, et al. Amphiregulin regulates phagocytosis-induced cell death in monocytes via EGFR and matrix metalloproteinases [J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 4310419.
- [12] ONES A C, ANDERSON D, GALBRAITH S, et al. Personalized transcriptomics reveals heterogeneous immunophenotypes in children with viral bronchiolitis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 199(12): 1537–1549.
- [13] ZHANG Y, WANG S, XIA H, et al. Identification of monocytes associated with severe COVID-19 in the PBMCs of severely infected patients through single-cell transcriptome sequencing [J]. Engineering, 2022, 17: 161–169.
- [14] WANG Q, WANG F, LI X, et al. Quercetin inhibits the amphiregulin/EGFR signaling-mediated renal tubular epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis in obstructive nephropathy [J]. Phytother Res, 2023, 37(1): 111–123.
- [15] KELLUM J A, ROMAGNANI P, ASHUNTANTANG G, et al. Acute kidney injury [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 52.
- [16] LIU K D, GOLDSTEIN S L, VIJAYAN A, et al. AKI! Now initiative: recommendations for awareness, recognition, and management of AKI [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2020, 15(12): 1838–1847.
- [17] ZHANG J, YE Z W, TEW K D, et al. Cisplatin chemotherapy and renal function [J]. Adv Cancer Res, 2021, 152: 305–327.
- [18] HOLDITCH S J, BROWN C N, LOMBARDI A M, et al. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 3011.
- [19] SHI Y, SHI X, ZHAO M, et al. Pharmacological potential of astragali radix for the treatment of kidney diseases [J]. Phytomedicine, 2024, 123: 155196.
- [20] 陈彦旭, 姜晓雪, 张钦媛, 等. TGF- β /Smad 信号通路在糖尿病肾病中的作用及中药干预的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10): 2630–2638.
- CHEN Y X, JIANG X X, ZHANG Q Y, et al. Role of TGF- β /Smad signaling pathway in diabetic kidney disease and research progress of traditional Chinese medicine intervention [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(10): 2630–2638.
- [21] WANG Y, QUAN F, CAO Q, et al. Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis [J]. J Adv Res, 2021, 28: 231–243.
- [22] 邵建彬, 王霞, 徐华洲, 等. 芪苓通络方抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路改善特发性膜性肾病大鼠肾损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 100–108.
- SHAO J B, WANG X, XU H Z, et al. Qiling Tongluo prescription improves renal injury in rats with idiopathic membranous nephropathy by inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(4): 100–108.
- [23] 雷小琴, 魏何燕, 谭睿陟, 等. 黄芪三七合剂对顺铂诱导小鼠急性肾损伤的影响 [J]. 中成药, 2022, 44(4): 1107–1113.
- LEI X Q, WEI H Y, TAN R Z, et al. Effects of Huangqi Sanqi Mixture on cisplatin-induced acute kidney injury in mice [J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(4): 1107–1113.
- [24] SHEN Y, TENG L, QU Y, et al. Hederagenin suppresses inflammation and cartilage degradation to ameliorate the progression of osteoarthritis: an *in vivo* and *in vitro* study [J]. Inflammation, 2023, 46(2): 655–678.
- [25] MIETE C, SOLIS G P, KOVAL A, et al. Gai2-induced conductin/axin2 condensates inhibit Wnt/ β -catenin signaling and suppress cancer growth [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 674.
- [26] BAHL C, SHARMA S, SINGH N, et al. Association study between genetic variations in Axin2 gene and lung cancer risk in North Indian population: a multiple interaction analysis [J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 1010428317695533.
- [27] XU Z H, WANG C, HE Y X, et al. Hypoxia-inducible factor protects against acute kidney injury via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2022, 322(6): F611–F624.
- [28] MAIESE K, LI F, CHONG Z Z, et al. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? [J]. Pharmacol Ther, 2008, 118(1): 58–81.
- [29] SAKAI H, SATO K, SATO F, et al. Curcumin inhibits epigen and amphiregulin upregulated by 2, 4, 6-trinitrochlorobenzene associated with attenuation of skin swelling [J]. Inflamm Res, 2017, 66(8): 663–678.
- [30] MELDERIS S, HAGENSTEIN J, WARKOTSCH M T, et al. Amphiregulin aggravates glomerulonephritis via recruitment and activation of myeloid cells [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(9): 1996–2012.
- [31] KIM K W, JEE H M, PARK Y H, et al. Relationship between amphiregulin and airway inflammation in children with asthma and eosinophilic bronchitis [J]. Chest, 2009, 136(3): 805–810.
- [32] OSAKABE Y, TANIGUCHI Y, HAMADA ODE K, et al. Clinical significance of amphiregulin in patients with chronic kidney disease [J]. Clin Exp Nephrol, 2024, 28(5): 421–

430.

[33]

KEFALOYIANNI E, MUTHU M L, KAEPLER J, et al. ADAM17 substrate release in proximal tubule drives kidney fibrosis [J]. JCI Insight, 2016, 1(13): e87023.

[34]

KEFALOYIANNI E, KEERTHI RAJA M R, SCHUMACHER J, et al. Proximal tubule-derived amphiregulin amplifies and integrates profibrotic EGF receptor signals in kidney fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(12): 2370–2383.

[35]

SON S S, HWANG S, PARK J H, et al. Author correction: *in vivo* silencing of amphiregulin by a novel effective self-assembled-micelle inhibitory RNA ameliorates renal fibrosis via inhibition of EGFR signals [J]. Sci Rep, 2023, 13: 11745.

[收稿日期] 2024-07-29

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评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。



张日云,吴凤兰,毛德文,等. 三种不同剂量 DEN 诱导大鼠原发性肝癌模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33 (2): 169–179.

ZHANG R Y, WU F L, MAO D W, et al. Comparison of three different doses of DEN induced primary liver cancer models in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 169–179.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.002

三种不同剂量 DEN 诱导大鼠原发性肝癌模型的比较

张日云^{1,2}, 吴凤兰^{1,2,3*}, 毛德文^{2,3}, 王明刚^{2,3*}, 裴浩^{1,2}, 李飞燕^{1,2}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023;
3. 广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 南宁 530023)

【摘要】 目的 使用 3 种不同剂量的二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 建立大鼠原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 模型, 旨在构建一个高效、稳定、经济的 PLC 动物模型。**方法** 将雄性 SD 大鼠 45 只, 随机分为 4 组, 分别为正常组、低剂量组 (50 mg/kg)、中剂量组 (70 mg/kg)、高剂量组 (200 mg/kg)。正常组 6 只, 其余组各 13 只。正常组不做任何处理。低剂量组第 1 ~ 4 周, 每周腹腔注射 2 次, 第 5 ~ 12 周, 每周注射 1 次; 中剂量组每周腹腔注射 1 次, 连续 16 周; 高剂量组仅第 1 周给药 1 次。随后观察各组大鼠至 16 周。通过生存率、病理学检测、生化检测、肝脾指数计算、免疫组化、酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 等检测方法验证模型的建立及优化评价。**结果** 正常组大鼠存活率为 100%, 低剂量组为 46.15%, 中剂量组为 69.23%, 高剂量组为 84.61%。肉眼观察正常组大鼠肝组织未见异常; 低剂量组大鼠肝颜色变深, 表面较粗糙, 可见少量癌结节, 质地稍硬; 中剂量组大鼠肝表面粗糙, 可见多个小的癌结节及散在块状占位性结节, 质地坚硬; 高剂量组大鼠肝颜色变浅, 表面稍粗糙, 未见明显癌结节。苏木素-伊红 (HE) 染色显示低、中剂量组肝组织结构紊乱, 细胞异型性大, 肿瘤细胞形成, 高剂量组肝小叶结构不清晰, 肝细胞呈不同程度的水肿、变性、坏死, 未见明显肿瘤细胞形成。与正常组对比, 低、中、高剂量组血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 均有升高; 低剂量组 ALT、AST 升高显著 ($P < 0.05$), 差异具有显著性, 中剂量组 ALT、AST、TBIL 均显著升高 ($P < 0.05$), 差异具有显著性, 高剂量组的 ALT、AST、TBIL 虽有升高, 但升高不明显, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 与正常组相比, 低剂量组凝血功能国际标准化比值 (international normalized, INR) 明显增高 ($P < 0.05$), 差异具有显著性, 活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 均有升高, 但差异无显著性 ($P > 0.05$); 中剂量组血清 APTT、PT、INR、AFP 水平显著增高 ($P < 0.05$), 差异具有显著性; 高剂量组血清 PT、AFP 水平增高 ($P < 0.05$), 差异具有显著性, 血浆 APTT 水平略有升高 ($P > 0.05$), 差异无显著性; 中剂量组肝、脾指数均升高 ($P < 0.05$), 低剂量组脾指数升高 ($P < 0.05$), 高剂量组肝指数升高 ($P < 0.05$), 差异具有显著性; 低、中、高剂量组肝组织 AFP 光密度值均明显升高 ($P < 0.05$), 差异具有显著性。**结论** 低、中剂量组均可成功诱导 PLC 大鼠模型, 但中剂量组的病理改变和生化检查结果更符合人体肝组织从肝损伤发展至肝纤维化、肝硬化最终为肝癌的发病机理, 且给药次数更少, 大鼠存活率更高, 能建立更经济实惠的优效 PLC 模型。

【基金项目】 国家自然科学基金 (82274434), 广西中青年教師科研基础能力提升项目 (2023KY0313), 广西中医药大学第一附属医院博士基金启动课题 (2020BS003)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82274434), Guangxi Young and Middle-Aged Teachers' Scientific Research Basic Ability Enhancement Project (2023KY0313), the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Doctoral Fund Initiation Project (2020BS003).

【作者简介】 张日云, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肝病。Email: zhangriyun2022@163.com

【通信作者】 吴凤兰, 女, 硕士, 住院医师, 研究方向: 中医药防治肝病的基础与临床。Email: wufenglan8090@163.com;

王明刚, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合防治重症肝病。Email: wmgxyx2012@163.com。

* 共同通信作者

【关键词】 原发性肝癌;二乙基亚硝胺;造模方法;大鼠;模型优化

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2025) 02-0169-11

Comparison of three different doses of DEN induced primary liver cancer models in rats

ZHANG Riyan^{1,2}, WU Fenglan^{1,2,3*}, MAO Dewen^{2,3}, WANG Minggang^{2,3*}, PEI Hao^{1,2}, LI Feiyan^{1,2}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

Corresponding author: WU Fenglan. E-mail: wufenglan8090@163.com; WANG Minggang.

E-mail: wmgx2012@163.com

【Abstract】 Objective Three different doses of diethylnitrosamine (DEN) were used to establish a rat primary liver cancer (PLC) model to establish an efficient, stable, and economical animal model of PLC. **Methods** Forty-five male SD rats were randomly divided into four groups: normal group, DEN 50 mg/kg dose group (low dose group), 70 mg/kg dose group (medium dose group), and 200 mg/kg dose group (high dose group). There were 6 animals in the normal group and 13 animals in each of the other groups. The normal control group received no treatment. The model group and low dose groups were injected intraperitoneally twice a week during weeks 1 ~ 4 and once a week during weeks 5 ~ 12; the medium dose group was injected intraperitoneally once a week for 16 consecutive weeks; and the high dose group was administered only once in the first week. The rats in each group were then followed for 16 weeks. The establishment of the model and optimal evaluation were verified by survival rate, pathological tests, biochemical tests, liver and spleen index calculation, immunohistochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and other assays. **Results** The survival rate was 100% in the normal group, 46.15% in the low dose group, 69.23% in the medium dose group, and 84.61% in the high dose group. The liver tissues of the rats in the normal group showed no abnormality to the naked eye; the liver of the rats in the low dose group became darker in color, rougher in surface, with a small number of cancerous nodules and slightly hard texture; the liver of the rats in the medium dose group was rough in surface, with several small cancerous nodules and scattered massive occupying nodules and hard texture; The liver of rats in the high dose group became lighter in color, slightly rougher in surface, with no obvious cancerous nodules; HE staining showed that the liver tissues of rats in the low and medium dose groups were structurally disorganized, with large cellular heterogeneity and tumor cells. HE staining showed that the liver tissues of rats in the low and medium dose groups were structurally disorganized, with large cellular heterogeneity and tumor cell formation, while the structure of the liver lobules of the high dose group was unclear, with different degrees of edema, degeneration and necrosis of liver cells, and no obvious tumor cell formation was seen. Compared with the normal group, serum liver function alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bilirubin (TBIL) were elevated in the low, medium, and high dose groups; ALT and AST were significantly elevated in the low dose group ($P < 0.05$), the difference was statistically significant, ALT, AST and TBIL were significantly elevated in the medium dose group ($P < 0.05$), the difference was statistically significant, and the difference was statistically significant, although liver function in the high dose group was elevated, the increase was not significant, the difference was not statistically significant ($P > 0.05$); compared with the normal group, the international normalized ratio (INR) of coagulation function was significantly higher in the low dose group, with a statistically significant difference ($P < 0.05$), and the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and alpha-fetoprotein (AFP) levels were increased ($P < 0.05$), and the difference was not statistically significant; serum APTT, PT, INR, and AFP levels were significantly increased in the medium dose group ($P < 0.05$), and the difference was statistically significant; serum PT and AFP levels were increased in the high dose group ($P < 0.05$), the difference was statistically significant, and plasma APTT levels were slightly increased ($P > 0.05$), the difference was not statistically significant; liver and spleen indexes were

increased in the medium dose group ($P < 0.05$), the spleen index increased in the low dose group ($P < 0.05$), and the liver index increased in the high dose group ($P < 0.05$), the difference was statistically significant; the optical density value of liver tissue AFP increased significantly in the low, medium and high dose groups ($P < 0.05$), the difference was statistically significant. **Conclusions** Both the low and medium dose groups could successfully induce the PLC rat model, but the pathological changes and biochemical findings of the medium dose group were more consistent with the pathogenesis of human liver tissue from liver injury to hepatic fibrosis to cirrhosis to hepatocellular carcinoma, and the number of administrations of the drug is less, and the survival rate of the rats is higher so that a more cost-effective and superior PLC model can be established.

[Keywords] primary liver cancer; diethylnitrosamine; modelling methods; rat; model optimization

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

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是一种常见的恶性肿瘤,近年来该病新发病例及死亡人数一直居高不下。据统计 2020 年全球新发肝癌患者约有 90 万人,死亡人数约 83 万人,位列全球癌症死因前五位^[1]。一项对 204 个国家和地区 29 种癌症的全球经济成本估计和预测的研究表明,2020 年至 2050 年肝癌的全球经济成本约为 1.638 万亿元,居于全球癌症经济成本第五位,居于我国肿瘤经济负担第一位^[2]。据 2022 年《中国人群肝癌筛查指南》调查报告显示中国肝癌的早期诊断率只有约 23.2%^[3],国际平均早期肝癌诊断率也只有 30% ~ 55%^[4],部分肝切除术和移植术的根治性治疗是首选方案,5 年内生存率可达 59% ~ 68%^[5-7]。门静脉结扎后进行的肝切除术能快速诱导残肝增生,是肝癌转化治疗的新导向,能为更多中晚期癌症患者营造肝癌根治性手术条件^[6,8-9],但由于 PLC 的发病机制尚未完全清晰,治疗手段有限,仍具有较高的死亡率,因此迫切需要探明其发病机制,以研制有效药物治疗 PLC,降低死亡率,而构建能模拟人 PLC 发病过程的动物模型是深入研究 PLC 发病机制的前提基础。

利用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)腹腔注射诱发小鼠原发性肝癌,是目前应用较多的一种 PLC 模型^[10],但在实验过程中小鼠 PLC 模型在取材时会遇到血液样本量少、肝组织小,无法满足各类检测需要的缺点,只能通过扩大造模数量解决上述问题。大鼠肝再生能力强,与人类的基因相似度高,大鼠的器官、组织和血液等体积的样本量也大于小鼠,便于造模后对实验样本进行研究,是许多实验造模动物的优选^[11-13]。目前国内外报道的 PLC 大鼠模型研究大多使用

低剂量的 DEN 诱导,但此法的腹腔注射较多,如吴元芳等^[14]使用 50 mg/kg 的 DEN 诱导 PLC 大鼠模型,需要每周腹腔注射 3 次,王军等^[15]使用 20 mg/kg DEN 腹腔注射和灌胃合并诱导,也需要腹腔注射每周 3 次,而常彦祥等^[16]使用更低剂量的 10 mg/kg DEN,则需要每周腹腔注射 5 次。GHUFRAN 等^[17]使用 30 mg/kg DEN 腹腔注射诱导 PLC 大鼠模型,在 11 周之前需要每周腹腔注射 2 次,12 ~ 16 周,每周 1 次。SAWONG 等^[18]前期以 50 mg/kg 和后期以 30 mg/kg 的 DEN 腹腔注射 DEN 每周 2 次,共需要 12 周成功建立模型。上述方法虽然都能成功建立 PLC 模型,但腹腔注射操作频次过多,人力、时间成本消耗大,本研究旨在研究相同的时间内减少腹腔注射次数成功建立 PLC 大鼠模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只,4 ~ 5 周龄,体重(160 ± 20)g,购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2022-0011】,饲养于广西中医药大学科学实验中心【SYXK(桂)2019-0001】。饲养环境:室内温度控制在 20 ~ 25 °C,相对湿度控制在 45% ~ 70%,12 h 循环照明,自由进食和饮水。适应性饲养 1 周后进行造模实验。本实验获得广西中医药大学动物伦理委员会批准(DW 20231016-228)。

1.1.2 主要试剂与仪器

N-Nitrosodiethylamine solution(Merck, 40334, 德国)、甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP) Polyclonal antibody(武汉三鹰, 14550-1-AP, 中国)、CUSABIO

Rat AFP 酶联免疫吸附试剂盒 (ELISA Kit) (武汉华美, CSB-E08281r, 中国)、免疫组化通用型试剂盒 (中杉金桥, PV-6000, 中国)、DAB 显色试剂盒 (中杉金桥, ZLI-9018, 中国)。

全自动脱水机 (徕卡, LEICA ASP300S, 德国)、组织包埋机 (赛默飞, Thermo HISTOSTAR, 美国)、切片机 (赛默飞, Thermo Shandon A78100101, 美国)、展烤片机 (爱华, ZKPJ-1A, 日本)、封染一体机 (达科为, DP360 + CS500, 中国)、正置光学显微镜 (奥林巴斯, Olympus BX43, 日本)、酶标仪 (赛默飞, Thermo Multiskan Go, 美国)、全自动生化分析仪 (迈瑞, BS-600, 中国)、全自动凝血分析仪 (赛科希德, SF-880C, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模方法

SD 大鼠 45 只随机分为正常组 6 只, 低、中、高剂量组各 13 只。正常组不予任何处理; 参照国内外较常用的 DEN 造模剂量^[18-20], 选择 50、70 和 200 mg/kg 分别作为低、中、高剂量组给药量: 低剂量组第 1 ~ 4 周, 每周腹腔注射 2 次, 第 5 ~ 16 周, 每周腹腔注射 1 次; 中剂量组每周腹腔注射 1 次, 连续 16 周; 高剂量组仅第 1 周腹腔注射 1 次, 随后观察各组大鼠至 16 周。

1.2.2 大鼠的一般情况观察

造模过程中, 每周记录 1 次大鼠的体质量, 每天观察大鼠的体型、毛发、精神状态、消化道症状等。

1.2.3 标本采集

造模第 16 周后用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 3000 r/min 离心 15 min, 提取血清、血浆置于 -80 °C 冰箱, 以备全自动生化分析仪、ELISA 检测及凝血分析仪检测; 随后剖取肝、脾组织, 进行拍照、称重, 比较各组肝外观颜色及大小, 用游标卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤数目及成瘤率, 肝、脾指数 (肝、脾体质量/体质量 $\times 100\%$); 剪取 3 cm $\times$ 4 cm 肝组织置于 10% 中性甲醛固定 24 h 后, 用于苏木素-伊红 (HE) 病理染色与免疫组化。

1.2.4 全自动生化分析仪、凝血分析仪检测肝功能和凝血功能

将血清、血浆放于冰上溶解后, 置于全自动

生化分析仪和凝血分析仪中检测。

1.2.5 ELISA 法检测 AFP

使用前, 将 ELISA 试剂盒所有试剂样品置于室温平衡 30 min, 血清解冻后再次离心, 配制生物素抗体 (1 $\times$)、HRP-抗生物素蛋白 (1 $\times$)、洗涤缓冲液 (1 $\times$) 及标准品, 设立 7 个标准品浓度; 在 48 孔板设立好分组后, 在相应的分组孔板分别加入标准品和待测血清样本 100 μ L, 37 °C 孵育 2 h; 倒掉孔板中液体, 每孔加入 100 μ L 生物素抗体 (1 $\times$), 37 °C 孵育 1 h, 倒掉孔板液体, 洗涤缓冲液 (1 $\times$) 清洗 3 次, 每次 2 min; 每孔加入 HRP-抗生物素蛋白 (1 $\times$) 100 μ L, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤缓冲液 (1 $\times$) 清洗 5 次, 每次 2 min; 每孔加入 TMB 底物 90 μ L, 37 °C 避光孵育 20 min; 每孔加入终止液 50 μ L, 轻轻晃荡均匀, 5 min 内用酶标仪在 450 nm 处测定每个孔的光密度 (optical density, OD) 值。

1.2.6 肝组织 HE 染色

肝组织经 24 h 固定后, 剪取 1 cm $\times$ 0.2 cm $\times$ 0.2 cm 肝组织置于组织包埋盒中, 流水冲洗 6 h, 以去除组织中的固定液, 将包埋盒放入全自动脱水机进行梯度脱水, 用石蜡包埋成蜡块, 将肝组织蜡块切成 4 μ m 厚切片, 65 °C 烤片机上烤 1 h 后放入封染一体机进行脱蜡、水洗、染色、脱水透明, 中性树胶封片, 采集图像。

1.2.7 免疫组化检测肝组织 AFP 表达

同 HE 染色法得经脱水包埋的 1 cm $\times$ 0.2 cm $\times$ 0.2 cm 肝组织蜡块, 切片后, 用二甲苯、无水乙醇脱水、脱蜡, 柠檬酸钠进行抗原修复, 加入适量内源性过氧化物酶阻断剂, 室温孵育 10 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 min, 滴山羊血清封闭 30 min, 滴加一抗 (1 : 100) 4 °C 孵育过夜, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 min, 二抗 37 °C 孵育 1 h, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 min, DAB 染色后苏木素复染、脱水、封片后光学显微镜下观察拍照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 版软件进行实验数据分析, 计量资料数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 *t* 检验或 Wilcoxon 检验进行分析。组间比较采用单因素方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件半

定量分析 AFP 的表达,指标取 IOD 值的平均值。

2 结果

2.1 大鼠外观一般情况

造模期间,正常组大鼠毛发有光泽,精神状态良好,饮食、饮水及消化道症状均未见异常,体质稳步增长,与正常组比较,低、中剂量组大鼠

自第 6 周开始,逐渐出现体型增长缓慢,食欲减退、毛色晦暗、精神不振、活动减少、弓背行为等表现,自第 10 周开始,出现明显的体型消瘦、静默怠动、眼球变白、尿液变黄、耳朵苍白、尾巴枯槁等表现,高剂量组大鼠体型增长稍缓慢,毛发较正常组光泽稍暗,精神一般,活跃度降低,未见明显弓背行为及尿液改变表现(见图 1)。

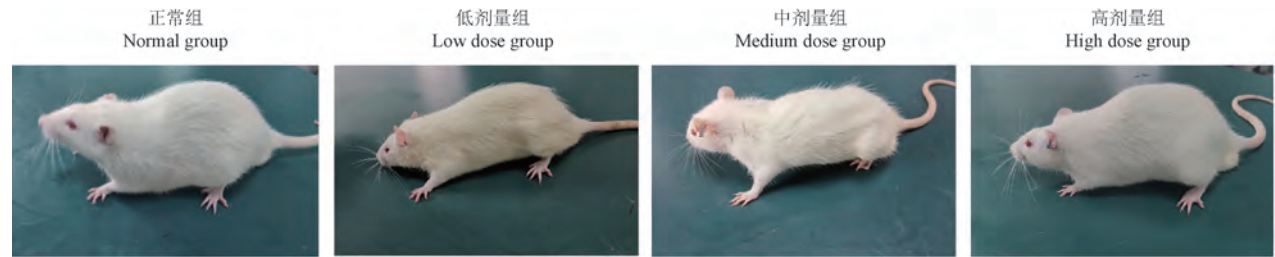


图 1 四组大鼠 16 周时外观表现
Figure 1 Appearance of the four groups of rats at the age of 16 weeks

2.2 存活时间

造模时间共 16 周,正常组存活率为 100%;低剂量组大鼠分别在第 5、6、9 和 16 周出现死亡,共死亡 7 只;中剂量组大鼠分别在第 5、12、15 和 16 周出现死亡,共死亡 4 只;高剂量组大鼠在第 2 周死亡 2 只(见表 1)。使用 GraphPad Prism 5.0 软件的 Log-rank 检验绘制生存曲线,16 周末正常组存活率为 100%,低剂量组存活率为 46.15%,中剂量组存活率为 69.23%,高剂量组存活率为 84.61%(见图 2)。

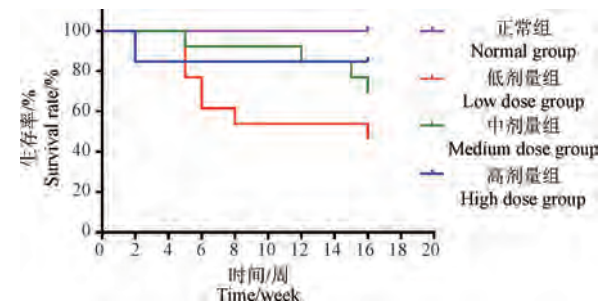


图 2 正常组与模型组大鼠生存曲线
Figure 2 Survival curves of normal and model rats

表 1 四组大鼠不同时间点生存率

Table 1 Survival rates at different time points in four groups of rats				
时间/周 Time/week	正常组/% Normal group/%	低剂量组/% Low dose group/%	中剂量组/% Medium dose group/%	高剂量组/% High dose group/%
2	100.00	100.00	100.00	100.00
4	100.00	100.00	100.00	84.61
6	100.00	76.92	92.30	84.61
8	100.00	61.54	92.30	84.61
10	100.00	53.85	92.30	84.61
12	100.00	53.85	92.30	84.61
14	100.00	53.85	84.61	84.61
16	100.00	46.15	69.23	84.61

注:存活率 = 实验结束时每组大鼠存活只数/该组大鼠总数 × 100%。
Note. Survival rate = Number of rats in each group alive at the end of the test/total number of rats in that group × 100%.

2.3 各组大鼠体质量和肝、脾指数

实验期间,每周定时测量 1 次大鼠体质量,造模前 3 周,4 组大鼠的体质量未见明显差距,自第 4 周起,随着模型构建时间的持续延长,低、中、高剂量组大鼠体质量逐渐出现增长缓慢表现,自第 7 周起,低、中剂量组大鼠体质量出现明显下降($P < 0.05$)。(见表 2)。从体质量动态变化图来看,中、低剂量组大鼠随着造模时间的延长,体质量增长速度明显减慢,以中剂量组显著(见图 3)。

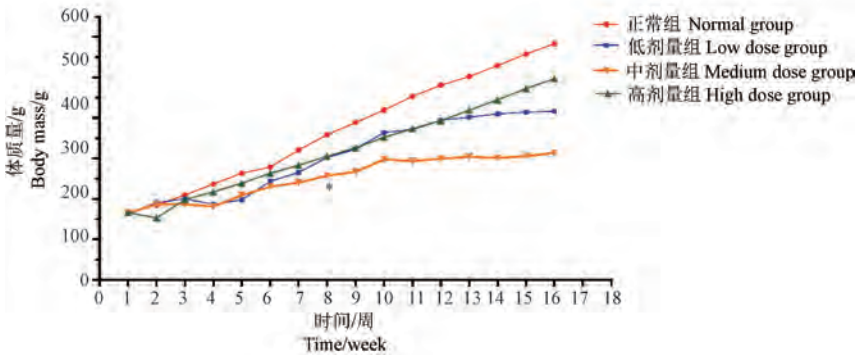
16 周末取材,对每组大鼠肝、脾进行称重并记录,与正常组比较,中剂量组肝指数、脾指数显著升高($P < 0.05$),低剂量组脾指数明显上升($P < 0.05$),高剂量组肝、脾指数未见明显升高($P > 0.05$)(见表 3、图 4)。

表 2 不同周期四组大鼠体质量变化情况($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes in body mass of four groups of rats in different cycles ($\bar{x} \pm s$)

时间/周 Time/week	正常组/g Normal group/g	低剂量组/g Low dose group/g	中剂量组/g Medium dose group/g	高剂量组/g High dose group/g	F 值 F value	P 值 P value
1	166.83 ± 4.79	163.92 ± 4.89	165.08 ± 5.40	166.23 ± 5.01	0.656	0.584
2	184.33 ± 7.55	190.69 ± 11.10	186.69 ± 11.19	177.84 ± 40.06	2.615	0.064
3	209.83 ± 16.98	200.23 ± 12.72	187.08 ± 17.94 [△]	198.36 ± 12.75	3.550	0.023
4	237.00 ± 21.93	186.92 ± 13.52	181.08 ± 21.08 [△]	217.55 ± 21.64	16.430	0.000
5	263.50 ± 21.89	197.83 ± 32.79 [△]	209.25 ± 34.52 [△]	238.73 ± 21.90	8.582	0.000
6	279.00 ± 13.35	243.50 ± 52.47	230.42 ± 40.88 [△]	263.55 ± 18.80 [△]	3.128	0.039
7	320.50 ± 24.52	265.38 ± 70.29 [△]	240.17 ± 52.32 [△]	283.18 ± 15.59	4.389	0.010
8	358.83 ± 23.72	302.71 ± 75.68 [△]	257.25 ± 49.00 [△]	305.55 ± 17.51 [△]	6.866	0.001
9	388.67 ± 24.64	322.86 ± 83.20 [△]	266.83 ± 48.40 [△]	326.64 ± 20.51 [△]	8.909	0.000
10	419.83 ± 26.15	364.14 ± 97.63	298.00 ± 54.96 [△]	351.91 ± 21.69 [△]	6.813	0.001
11	453.50 ± 28.58	371.43 ± 103.42 [△]	293.42 ± 56.33 [△]	373.64 ± 22.06 [△]	10.722	0.000
12	481.00 ± 31.29	394.71 ± 108.89 [△]	299.45 ± 55.68 [△]	393.55 ± 22.46 [△]	12.544	0.000
13	502.67 ± 29.58	402.00 ± 109.51 [△]	304.00 ± 64.80 [△]	419.18 ± 24.79 [△]	13.895	0.000
14	529.83 ± 24.94	410.14 ± 115.10 [△]	301.45 ± 60.53 [△]	444.91 ± 25.74 [△]	18.797	0.000
15	558.50 ± 20.48	414.29 ± 115.80 [△]	305.50 ± 68.66 [△]	473.09 ± 22.31 [△]	21.229	0.000
16	583.67 ± 15.04	416.29 ± 127.26 [△]	314.11 ± 67.62 [△]	496.91 ± 20.56 [△]	21.192	0.000

注:与正常组相比,[△] $P < 0.05$ 。(下图/表同)
Note. Compared with normal group, [△] $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)



注:与低剂量组对比,* $P < 0.05$ 。
图 3 四组大鼠不同时间点体质量动态变化情况

Note. Compared with low dose group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Dynamic changes in body mass at different times in four groups of rats

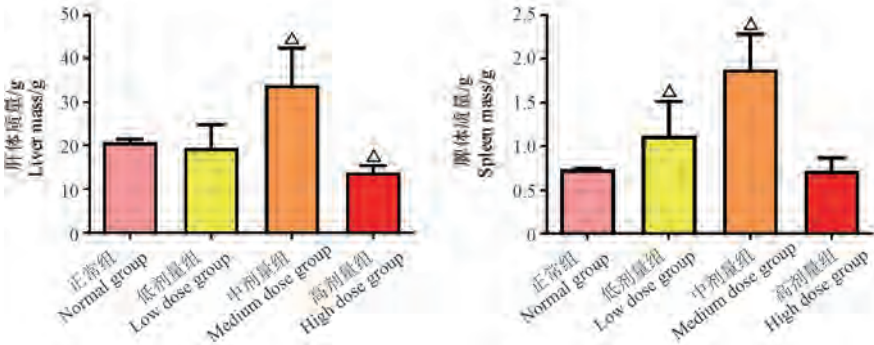


图 4 肝体质量和脾体质量比较

Figure 4 Liver body mass compared to spleen body mass

表 3 四组大鼠肝指数和脾指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of liver index and splenic index in four groups of rats($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	每组数量 <i>n</i>	肝指数/% Liver index/%	脾指数/% Splenic index/%
正常组 Normal group	6	3.56 ± 0.03	0.13 ± 0.00
低剂量组 Low dose group	6	5.24 ± 1.43 [△]	0.31 ± 0.16 [△]
中剂量组 Medium dose group	9	10.82 ± 1.49 [△]	0.61 ± 0.16 [△]
高剂量组 High dose group	11	2.78 ± 0.31	0.14 ± 0.03

2.4 各组大鼠的癌结节数目及肿瘤发生率

正常组大鼠肝正常,未见肿瘤生长,肿瘤发生率为0%;肉眼可见低剂量组大鼠肝肿瘤数目为1~3个不等,肿瘤发生率为100%;中剂量组大鼠肝肿瘤数目为5~8个不等,肝癌发生率为100%;高剂量组大鼠肝外观无肿瘤生长,肿瘤发生率为0%。

表 4 四组大鼠血清 AST、ALT 和 TBIL 比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of sera AST、ALT and TBIL in four groups of rats($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	谷丙转氨酶/(U/L) ALT/(U/L)	谷草转氨酶/(U/L) AST/(U/L)	总胆红素/(U/L) TBIL/(U/L)
正常组 Normal group	36.65 ± 3.17	89.95 ± 5.36	0.88 ± 0.20
低剂量组 Low dose group	100.77 ± 19.80 [△]	250.43 ± 68.58 [△]	6.84 ± 8.26
中剂量组 Medium dose group	106.39 ± 21.16 [△]	345.89 ± 23.93 [△]	51.35 ± 10.86 [△]
高剂量组 High dose group	38.45 ± 3.62	88.10 ± 14.32	1.49 ± 0.50

表 5 四组大鼠血清 APTT、PT、INR 和 AFP 变化情况($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Changes in APTT, PT, INR and AFP in four groups of rats($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	活化部分凝血活酶时间/s APTT/s	凝血酶原时间/s PT/s	国际标准化比值 INR	甲胎蛋白/(pg/mL) AFP/(pg/mL)
正常组 Normal group	16.80 ± 1.70	16.30 ± 1.49	1.32 ± 0.13	64.78 ± 4.30
低剂量组 Low dose group	19.02 ± 3.14	18.10 ± 1.92	1.52 ± 0.16 [△]	187.00 ± 93.08
中剂量组 Medium dose group	21.71 ± 2.70 [△]	20.50 ± 2.26 [△]	1.66 ± 0.08 [△]	828.47 ± 51.02 [△]
高剂量组 High dose group	17.19 ± 1.22	17.12 ± 3.06 [△]	1.29 ± 0.12	380.77 ± 51.02 [△]

2.7 大鼠肝外观、病理学观察

正常组大鼠肝呈鲜红色,表面光滑,质地柔

2.5 血清 ALT、AST 和 TBIL 浓度的比较

与正常组大鼠相比,低剂量组 ALT、AST 显著升高($P < 0.05$),中剂量组 ALT、AST、TBIL 均显著升高($P < 0.05$),高剂量组 ALT、TBIL 虽有升高,但差异无显著性($P > 0.05$)(见表4)。

2.6 凝血功能活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、国际标准化比值(international normalized ratio, INR)及血清 AFP 水平

与正常组相比,低剂量组血浆 INR 水平明显增高($P < 0.05$),血浆 APTT、PT 及血清 AFP 均有升高($P > 0.05$);中剂量组血浆 APTT、PT、INR 及血清 AFP 水平显著增高($P < 0.05$);高剂量组血浆 PT、血清 AFP 水平增高($P < 0.05$),血浆 APTT 水平略有升高($P > 0.05$)。值得关注的是,中剂量组对比其他3组 APTT、PT、INR、AFP 均显著升高,特别是 AFP 水平升高明显(见表5、图5)。

软,肉眼观察未见异常病变。低剂量组大鼠肝颜色变深,表面较粗糙,肉眼可见少量的癌结节,结

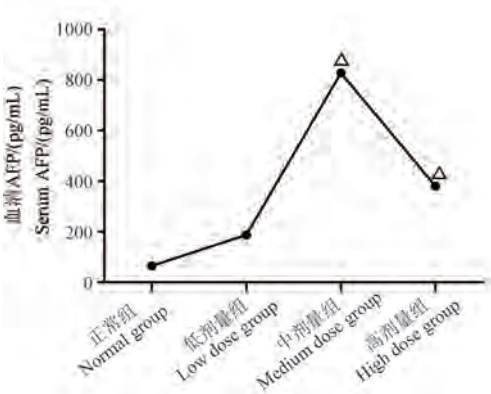


图 5 四组大鼠血清 AFP 阳性水平比较
Figure 5 Comparison of serum AFP positive levels in four groups of rats

节质地坚硬。中剂量组大鼠肝表面呈黄褐色,凹凸不平,肉眼可见数个小的癌结节及个别巨大占位性结节,质地坚硬,较低剂量组大鼠相比,肝癌结节数量多且大,肝体表面积大于其他 3 组大鼠,解剖时可见肝与周围器官粘连。高剂量组大鼠肝颜色变浅,表面稍粗糙,肉眼观察未见明显结节(见图 6)。

HE 染色显示(见图 7):正常组大鼠肝组织结构清晰,肝小叶结构完整,肝细胞大小均匀且排列整齐紧密,以中央静脉为中心向四周呈放射状排布。低剂量组大鼠肝组织结构被破坏,出现大小不一,形状不规则的假小叶,肝细胞变性坏死,异型性大,核分裂或变大,排列紊乱,局部区域癌

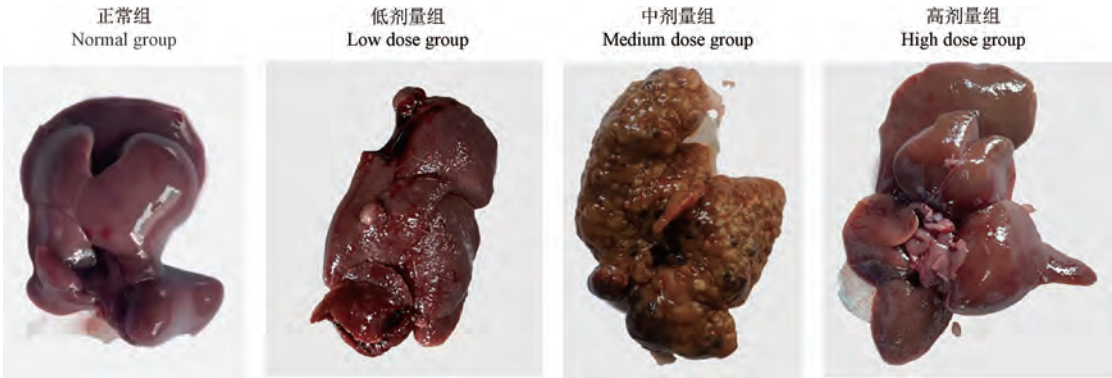


图 6 四组大鼠肝外观一般情况
Figure 6 General liver appearance in four groups of rats

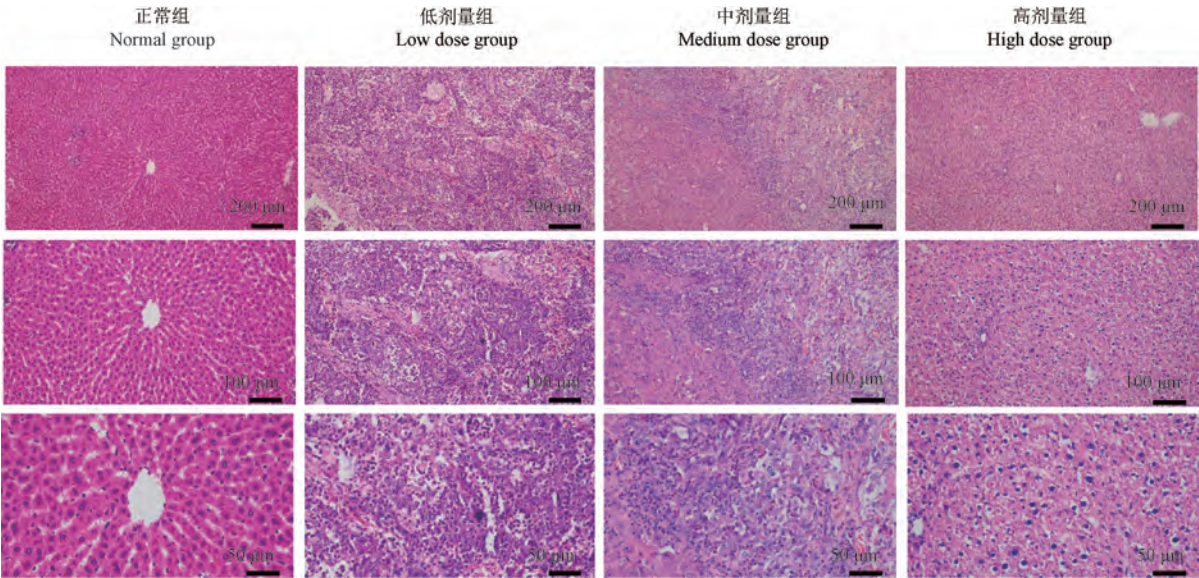


图 7 造模 16 周各组大鼠肝组织 HE 染色病理表现
Figure 7 Pathology of HE staining of rats liver tissue in each groups after 16 weeks of modeling

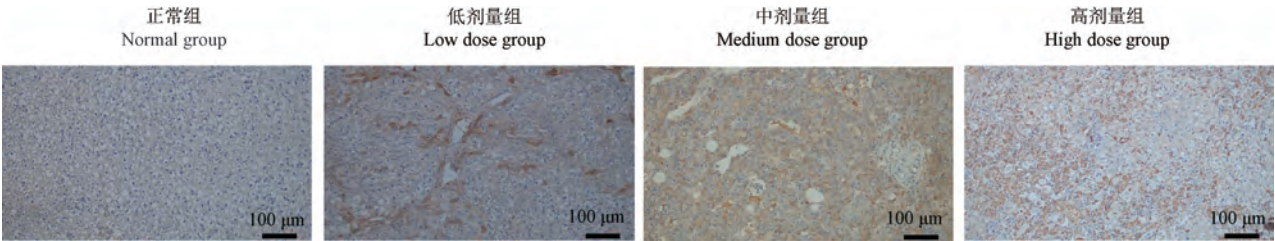


图 8 四组大鼠肝组织 AFP 免疫组化图像

Figure 8 Immunohistochemical images of AFP in the liver tissue of four groups of rats

结节形成,异型细胞增生多且异型性大,分化程度低,癌细胞间纤维组织增生,小血管增生且充血明显,癌结节内部细胞呈片状坏死。中剂量组大鼠肝组织结构紊乱,肝小叶结被广泛的癌结节替代,癌组织内血管增生密集、扩张、充血,纤维组织广泛增生,癌细胞分化程度高,细胞呈巢状或梁状排列,异型性显著,见大小不等的核分裂象、细胞核增大的实性细胞团。高剂量组大鼠肝小叶结构不清晰,肝细胞排列较正常组相比稍紊乱,肝细胞广泛水肿、变性。

2.8 肝组织 AFP 蛋白表达

免疫组化结果:正常组肝细胞细胞核呈蓝色,细胞质未见明显棕色黄染,AFP 呈阴性表达。与正常组相比,低、中、高剂量各组肝细胞胞质均出现不同程度的棕色黄染,AFP 呈阳性表达(见图 8)。利用 Image Pro Plus 6.0 软件对各组肝组织 AFP 光密度值进行测量统计,4 组图片拍照参数相同。与正常组相比,低、中、高剂量组 AFP 均明显升高($P < 0.05$),值得注意的是中剂量组 AFP 阳性表达最为显著(见图 9)。

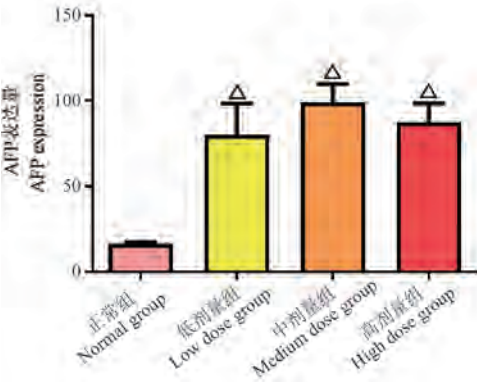


图 9 各组大鼠肝组织 AFP 阳性表达水平

Figure 9 Degrees of AFP positive expression in rat liver tissue in each group

3 讨论

目前,PLC 的发病机制尚未完全阐明,涉及多因素、多进程,长期暴露于杀菌剂(三氯生)、杀虫剂如卡贝嗪、二氯二苯基二氯乙烯(carbon tetrachloride, DDE)、β-六氯己烷或五氯苯酚、DEN、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)等化学污染物、膳食污染物,如黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等均可诱发 PLC。此外,嗜肝病毒感染也是 PLC 的主要发病机制之一^[21-23]。鉴于肝癌的高发病率和死亡率,对其发病机理的深入研究有利于突破肝癌的治疗瓶颈,建立高效、经济的动物模型是研究 PLC 的必要条件之一。

DEN 与 CCl₄ 诱导的肝癌病变过程与人体 PLC 发病进程相似^[17,24-25],是目前应用较多的化学诱导法,符合人体从肝炎症进展到肝癌的病变过程,现阶段应用较多的小鼠 PLC 模型,多为 2 周龄小鼠,研究表明幼鼠的肝组织更易发生癌变^[26],但小鼠给药周期长,大多为 24 ~ 48 周成模^[27],时间成本较大,且样本组织较少,难以满足科研需要。大鼠与小鼠相类似,肝和血液样本较多,能极大提高科研工作效率,因此筛选出高效、经济实惠的动物模型十分重要,建立大鼠 PLC 模型更有利于 PLC 的深入研究。

肝酶学中 ALT 主要分布于肝细胞的周边和胆管细胞,肝细胞损伤致细胞内膜通透性增加,胞浆内的 ALT 被释放而引起血清中 ALT 升高;AST 主要分布于线粒体,肝损伤严重时,血清 AST 升高明显,是肝功能检测的重要指标;总胆红素作为揭示肝稳态的生物标志物,与癌死亡率增加相关,是评估癌症恶病质预后的关键指标^[28],AFP 是早期诊断肝癌特异性较高的重要指标^[6]。PLC 患者的肿瘤发展过程为长期嗜肝病毒、酒

精、致癌物质等导致肝炎症,长期进展会导致肝出现发育异常的结节,进而出现肝硬化和早期肝癌,终末期会形成巨块型肝癌^[29]。临床的检查结果表现为肝功能指数升高,凝血功能障碍,AFP 升高等,患者会出现消瘦、腹部肿块、黄疸等临床症状。在本实验中,经过 16 周的 DEN 腹腔注射,病理结果显示低、中剂量组均能成功构建 PLC 大鼠模型,与低剂量组相比,中剂量组大鼠肝功能 AST、ALT、TBIL,凝血功能 APTT、INR、PT、肝脾指数均显著升高,肝组织及血清 AFP 表达显著升高。从外观上看,中剂量组的大鼠也出现了消瘦的表现。综合分析,中剂量组的 PLC 大鼠更符合人体 PLC 发病的病理过程。

近年来 PLC 大鼠模型研究较少,一方面有部分文章造模具体方法、剂量、造模试剂公司等信息描述不清楚^[30],无法给相关科研工作者提供参考,另一方面国内外 PLC 大鼠模型造模方法各异,时间、频次、剂量等各不相同,从中筛选出一种简单、高效的 PLC 模型造模方法有利于促进实验研究的发展。在本研究中,参照国内外研究及小鼠 PLC 模型的制备经验,使用 4 ~ 5 周龄的大鼠,尝试了 3 种不同剂量的 DEN 制备 PLC 大鼠模型,发现中剂量的 DEN 每周 1 次腹腔注射,连续 16 周,能成功诱导 PLC 大鼠模型,与现有的造模方法相比,该方法在减少造模次数的同时具有较高的成模率和存活率,是一种较为理想的造模方法,值得推广应用。

然而本实验也存在一定的局限性,造模方式和传统方式一样都为腹腔注射,造模时间也未缩短,连续 16 周的腹腔注射意味着实验操作者需要与致癌物质 DEN 接触的时间较长,风险较大,这要求实验工作者操作标准,做好防护措施。下一步本研究团队将继续探索更优化的 PLC 大鼠模型,例如通过改变造模方式,减少实验操作者对致癌物质的接触等,以期为研究 PLC 的发病机制、预防疫苗和治疗药物研发及筛选提供高效、安全、便捷的实验动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] CHEN S, CAO Z, PRETTNER K, et al. Estimates and projections of the global economic cost of 29 cancers in 204 countries and territories from 2020 to 2050 [J]. *JAMA Oncol*, 2023, 9(4): 465-472.
- [3] 赫捷, 陈万青, 沈洪兵, 等. 中国人群肝癌筛查指南(2022, 北京) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(8): 1739-1758.
HE J, CHEN W Q, SHEN H B, et al. China guideline for liver cancer screening (2022, Beijing) [J]. *J Clin Hepatol*, 2022, 38(8): 1739-1758.
- [4] KUDO M. Management of hepatocellular carcinoma in Japan as a world-leading model [J]. *Liver Cancer*, 2018, 7(2): 134-147.
- [5] NJEI B, ROTMAN Y, DITAH I, et al. Emerging trends in hepatocellular carcinoma incidence and mortality [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1): 191-199.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版) [J]. *中国实用外科杂志*, 2022, 42(3): 241-273.
Bureau of Medical Administration, National Health Commission of the People's Republic of China. Standardization for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (2022 edition) [J]. *Chin J Pract Sugg*, 2022, 42(3): 241-273.
- [7] UTSUNOMIYA T, SHIMADA M, KUDO M, et al. A comparison of the surgical outcomes among patients with HBV-positive, HCV-positive, and non-B non-C hepatocellular carcinoma: a nationwide study of 11, 950 patients [J]. *Ann Surg*, 2015, 261(3): 513-520.
- [8] LI P P, HUANG G, JIA N Y, et al. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy versus sequential transarterial chemoembolization and portal vein embolization in staged hepatectomy for HBV-related hepatocellular carcinoma: a randomized comparative study [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2022, 11(1): 38-51.
- [9] 袁响林. 中晚期原发性肝癌的降期转化治疗 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(2): 267-271.
YUAN X L. Downstaging conversion therapy for advanced primary liver cancer [J]. *J Clin Hepatol*, 2020, 36(2): 267-271.
- [10] 方权, 郑晓光, 孙越, 等. 可实时监测的小鼠原发性肝癌模型建立及应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 346-354.
FANG Q, ZHENG X G, SUN Y, et al. Establishment and application of a mouse model of HCC in real-time [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 346-354.
- [11] ZHANG B, MENG F, LIU Y, et al. Inhibition of TGFβ1 accelerates regeneration of fibrotic rat liver elicited by a novel two-staged hepatectomy [J]. *Theranostics*, 2021, 11

- (10): 4743–4758.
- [12] TOCHII K, IWATA H, SUGIMOTO T, et al. Two-stage portal vein ligation facilitates liver regeneration safely in rats with liver cirrhosis [J]. J Invest Surg, 2022, 35(3): 549–559.
- [13] LIN R, XIE S, XU F, et al. Improvement of rat hepatocellular carcinoma model induced by diethylnitrosamine [J]. Tissue Cell, 2024, 86: 102261.
- [14] 吴元芳, 张陈丽, 张芹. 白花蛇舌草乙醇提取物调控 DDR1 对大鼠肝癌细胞增殖的影响 [J]. 山东医药, 2022, 62(4): 51–54.
- WU Y F, ZHANG C L, ZHANG Q. Effects of ethanol extracts of Hedyotis diffusa on proliferation of rat hepatocarcinoma cells by regulating DDR1 [J]. Shandong Med J, 2022, 62(4): 51–54.
- [15] 王军, 徐建良, 杜燕红. 扶正祛邪汤对肝癌模型大鼠肠道菌群微生态环境的作用研究 [J]. 陕西中医, 2021, 42(2): 143–147.
- WANG J, XU J L, DU Y H. Effect of Fuzheng Quxie decoction on intestinal microflora microecological environment of liver cancer model rats [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2021, 42(2): 143–147.
- [16] 常彦祥, 孙利平. 柴胡皂苷 D 对肝癌大鼠肿瘤生长和免疫功能的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(14): 2059–2062.
- CHANG Y X, SUN L P. Effects of Saikosaponin-D on tumor growth and immune function in liver cancer rats [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2020, 36(14): 2059–2062.
- [17] GHUFRAN H, AZAM M, MEHMOOD A, et al. Standardization of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma rat model with time based molecular assessment [J]. Exp Mol Pathol, 2021, 123: 104715.
- [18] SAWONG S, PEKTHONG D, SUKNOPPAKIT P, et al. Calotropis gigantea stem bark extracts inhibit liver cancer induced by diethylnitrosamine [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 12151.
- [19] SINGH D, SINGH M, YADAV E, et al. Amelioration of diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatocellular carcinogenesis in animal models via knockdown oxidative stress and proinflammatory markers by Madhuca longifolia embedded silver nanoparticles [J]. RSC Adv, 2018, 8(13): 6940–6953.
- [20] 音金萍. 基于网络药理学和 IL-6/STAT3/Vimentin 信号通路研究健脾益气方治疗 DEN 肝癌大鼠的作用机制 [D]. 南宁: 广西中医药大学; 2021.
- YIN J P. Study on the mechanism of Jianpi Yiqi Recipe in treating diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma based on network pharmacology and IL-6/STAT3/Vimentin signaling pathway [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine; 2021.
- [21] BAROUKI R, SAMSON M, BLANC E B, et al. The exposome and liver disease-how environmental factors affect liver health [J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 492–505.
- [22] 孙振宇, 武鸿彪, 刘宁, 等. 小鼠原发性肝癌模型的建立与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 22–27.
- SUN Z Y, WU H B, LIU N, et al. Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 22–27.
- [23] ERKEKOGLU P, ORAL D, CHAO M W, et al. Hepatocellular carcinoma and possible chemical and biological causes: a review [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2017, 36(2): 171–190.
- [24] SHARMA R, ALI T, NEGI I, et al. Dietary modulations of folic acid affect the development of diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in a rat model [J]. J Mol Histol, 2021, 52(2): 335–350.
- [25] SHIN S, WANGENSTEEN K J, TETA-BISSETT M, et al. Genetic lineage tracing analysis of the cell of origin of hepatotoxin-induced liver tumors in mice [J]. Hepatology, 2016, 64(4): 1163–1177.
- [26] 何晓东, 邹一贺, 黎冰林, 等. 不同配方饲料对 DEN 诱导小鼠肝癌模型建立的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 306–310.
- HE X D, GUI Y H, LI B L, et al. Effect of different formula diets on mouse model with DEN-induced hepatocellular carcinoma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(3): 306–310.
- [27] WU C, CHEN W, FANG M, et al. Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits hepatocellular carcinoma progression via miR-145/miR-21 mediated Smad3 phosphorylation [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 98–112.
- [28] LI X R, ZHANG Q, ZHANG K P, et al. Association of serum total bilirubin with survival outcomes in patients with cancer Cachexia: a prospective, multicenter cohort study [J]. Nutrition, 2022, 102: 111711.
- [29] CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(3): 139–152.
- [30] 朱晓燃, 杨振寰, 索菲娅, 等. 清肝化痰颗粒对二乙基亚硝胺所致原发性肝癌大鼠的治疗作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(3): 161–165.
- ZHU X R, YANG Z H, SUO F Y, et al. Therapeutic effect of Qinggan Huayu granule on diethylnitrosamine-induced primary liver cancer rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2021, 29(3): 161–165.

薛茜尹,吴淑雅,许婧余,等. 慢性心理应激模型小鼠中医证型变化规律研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 180-189.

XUE Q Y, WU S Y, XU J Y, et al. Study on patterns of traditional Chinese medicine syndrome changes in mouse models of chronic psychological stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 180-189.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.003

慢性心理应激模型小鼠中医证型变化规律研究

薛茜尹¹, 吴淑雅¹, 许婧余¹, 张怡¹, 张铭珈², 敖海清^{1*}

(1. 广州中医药大学 公共卫生与管理学院, 广州 510006; 2. 浙江中医药大学 基础医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 研究慢性心理应激模型小鼠在造模过程中的证型变化规律及其可能的物质基础。**方法** 采用慢性温和不可预知应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)方法制备慢性心理应激小鼠模型,造模2周后在造模同时使用逍遥散(XYS组)和四逆散(SNS组)治疗,比较造模小鼠(M4组和M6组)和给药2周(S4组和X4组)、4周(S6组和X6组)后慢性心理应激小鼠的一般情况、行为学和生化指标。**结果** 与M4组小鼠比较,S4组和X4组小鼠体质量、旷场实验总路程和中央路程、血清去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)浓度、胃部 Ghrelin 表达均升高;S4组小鼠糖水偏好率、血清 D-木糖浓度均升高;与X4组比较,S4组小鼠旷场实验总路程、血清 D-木糖浓度均升高;与M6组小鼠比较,S6组和X6组小鼠体质量、血清 NE 浓度、血清 D-木糖浓度、胃部 Ghrelin 表达均升高;X6组小鼠糖水偏好率、旷场实验总路程、穿梭箱实验主动逃避次数均升高,血清皮质酮(cortisol, CORT)浓度降低;与S6组相比,X6组小鼠体质量、旷场实验总路程、血清 D-木糖浓度、胃部 Ghrelin 表达均升高。**结论** 慢性心理应激小鼠造模过程中中医证型由肝郁气滞证演变为肝郁脾虚证,其证候变化生物学基础可能是血清 CORT 和 NE 浓度组合变化及胃中 Ghrelin 水平下降。

【关键词】 慢性心理应激;情志致病;中医证型;辨证论治

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0180-10

Study on patterns of traditional Chinese medicine syndrome changes in mouse models of chronic psychological stress

XUE Qianyin¹, WU Shuya¹, XU Jingyu¹, ZHANG Yi¹, ZHANG Mingjia², AO Haiqing^{1*}

(1. School of Public Health and Management, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. School of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: AO Haiqing. E-mail: aohaiqing@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the patterns of syndrome changes and their possible material basis in mouse models of chronic psychological stress during the modeling process. **Methods** A chronic unpredictable mild stress (CUMS) method was employed to prepare a model of chronic psychological stress in mice. After 2 weeks of modeling, Xiaoyao powder (XYS group) and Sini powder (SNS group) were administered concurrently with the modeling process. General conditions, behavioral, and biochemical indicators were compared between the modeling mice (M4 and M6 group) and the mice treated for 2 weeks (S4 and X4 group) and 4 weeks (S6 and X6 group) after

【基金项目】 国家自然科学基金(81673838), 国家自然科学基金青年项目(82205229), 广东省区域联合基金-青年基金项目(2021A1515110798)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81673838), Youth Project of the National Natural Science Foundation of China (82205229), Guangdong Regional Joint Fund-Youth Fund Project (2021A1515110798).

【作者简介】 薛茜尹,女,在读博士研究生,研究方向:中医药抗应激损伤及心身医学。Email:xqy777777@163.com

【通信作者】 敖海清,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:肝藏象理论及中医药抗应激损伤。Email:aohaiqing@gzucm.edu.cn

chronic psychological stress. **Results** Compared with M4 group mice, body mass, total distance and central distance in the open field test, serum NE concentration, and gastric Ghrelin expression were increased in S4 group and X4 group mice, and sugar water preference rate and serum D-xylose concentration were increased in S4 group mice. Compared with X4 group mice, total distance in the open field test and serum D-xylose concentration were increased in the S4 group mice. Compared with M6 group mice, body mass, serum NE concentration, serum D-xylose concentration, and gastric Ghrelin expression were increased in group S6 and X6 group mice; sugar water preference rate, total distance in the open field test, and active avoidance counts in the shuttle box test were increased in X6 group mice, while their serum CORT concentration was decreased. Compared with S6 group mice, body mass, total distance in the open field test, serum D-xylose concentration, and gastric Ghrelin expression in X6 group mice were increased. **Conclusions** During the process of modeling chronic psychological stress in mice, the traditional Chinese medicine syndrome evolved from liver qi stagnation to liver qi stagnation with spleen deficiency. The biological bases of the syndrome changes may be the combined changes in serum CORT and NE concentrations and the decrease in gastric Ghrelin levels.

[Keywords] chronic psychological stress; emotional disorders; traditional Chinese medicine syndromes; syndrome differentiation and treatment

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

应激(stress)是指在受到各种内外界环境因素刺激时,机体所出现全身范围的非特异性反应^[1],慢性心理应激是指作用于精神心理的应激源长时间作用而导致的应激反应,长期处于高压应激状态会增加焦虑、抑郁以及其他心理障碍的风险^[2-3],也会增加肿瘤等多种疾病的发生风险^[4]。

慢性心理应激可以归类于中医情志致病范畴。情志是中医对情绪和情感的特有称谓,情志也影响着人体脏腑气血。现有单纯使用慢性心理应激造模的小鼠研究多聚焦于抑郁症,因为造模具体方法和时间不同,结果可见肝郁气滞型^[5-6]、肝郁脾虚型^[7]及肝郁阳虚型^[8]等多种证型表现。中医对疾病的认识是动态变化的,《素问·玉机真藏论》中云:“五脏相通,移皆有次”^[9],情志致病聚焦于肝但仍伴有其他脏腑病变,在慢性心理应激造模过程中中医证型的变化规律仍待探索。

本研究通过以方测证结合生化指标变化,以探寻慢性心理应激造模过程中的证型变化规律及其可能的物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠共 80 只,6 ~ 7 周

龄,体质量(20 ± 2)g,购于广州锐格生物科技有限公司【SCXK(粤)2021-0059】。动物饲养于广州中医药大学动物实验中心【SYXK(粤)2023-0342】,温度 23 ~ 25 ℃,湿度 50% ~ 70%,昼夜照明为 12 h/12 h 模拟自然环境,本实验经由广州中医药大学动物中心动物实验伦理委员会审核批准(20240306013)。

1.1.2 药物

逍遥散组方药材颗粒剂(柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、生姜、薄荷、炙甘草)、四逆散组方药材颗粒剂(柴胡、枳实、白芍、炙甘草)均购自广东一方制药有限公司。将各药物颗粒剂溶于水后加热煮沸浓缩,根据《药理实验方法学(第 4 版)》^[10]分别配置成 3.3 g/mL 逍遥散溶液和 2.5 g/mL 四逆散溶液。

1.1.3 主要试剂与仪器

小鼠皮质酮(cortisol, CORT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、D-木糖 ELISA 试剂盒(酶免公司,货号:MM-0061M1、MM-0627M1、MM-46426M1,中国);DAB 显色试剂盒(中杉金桥公司,货号:ZLI-9017,中国);苏木素染色液(碧云天公司,货号:C0107,中国);Ghrelin 抗体(Proteintech 公司,货号:13309-1-AP,中国)。Ep 束缚管、束缚铁笼均为自制;LED 频闪灯;摄像头、行为学分析软件(上海吉量软件科技有限公司,中国)。

后出现电击时逃向另一侧为被动逃避反应阳性,记录小鼠从暗箱逃出的时间;开灯、电击时均不逃跑为主动、被动逃避反应阴性。每只小鼠测试后,用 75%乙醇擦拭去除箱子中的气味后再进行下一只小鼠操作。最后用每只小鼠在结束训练后进行的 30 个回合中主动回避次数和平均被动逃避时间来评价小鼠的学习记忆能力。

1.2.3 指标检测

(1)一般情况:每日观察小鼠的一般情况,包括精神状态、饮水、摄食、皮毛色泽、自主活动及粪便等,并观察小鼠对抓取刺激的反应,每周定时测量各组小鼠体质量。

(2)ELISA 检测血清 CORT、NE 浓度:用 2%戊巴比妥钠麻醉小鼠后,取血,室温静置 1 h 后,4 ℃ 下、3000 r/min 离心 20 min,收集血清并保存于-80 ℃冰箱中待用。小鼠血清 CORT 和 NE 浓度严格按照试剂盒说明书进行操作。

(3)血清 D-木糖检测:小鼠行为学测试后,禁食不禁水 24 h,按 10 mL/kg 灌胃 5% D-木糖溶液,1 h 后用 2%戊巴比妥钠麻醉小鼠,取血,室温静置 1 h 后,4 ℃、3000 r/min 离心 20 min,收集血清保存于-80 ℃冰箱中待用。小鼠血清 D-木糖检测严格按照试剂盒说明书进行操作。

(4)胃部苏木素-伊红(HE)染色观察形态:胃底部黏膜以 4%多聚甲醛固定液 4 ℃固定 24 h,常规石蜡包埋后,横切切片、脱蜡,常规 HE 染色,脱水后用中性树胶封片,晾干后观察。

(5)免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测胃黏膜 Ghrelin 阳性细胞表达:胃底部黏膜以 4%多聚甲醛固定液 4 ℃固定 24 h,常规石蜡包埋后,横切切片、脱蜡,配制柠檬酸钠抗原修复液,用高压锅进行抗原修复,煮沸后开盖自然冷却至室温。用阻断剂室温孵育 20 min,添加 Ghrelin 一抗(1:200)4 ℃孵育 2 d;用增强液室温孵育 1 h,使用增强酶标室温孵育 1 h,DAB 染色后使用苏木素染色,脱水后用中性树胶封片,晾干后观察。使用阳性染色面积占比进行统计学分析。

1.3 统计学分析

统计分析采用 SPSS 21.0 软件完成。计量资料采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;符合正态分布与方差齐性的计量资料,多组间比较采用单因

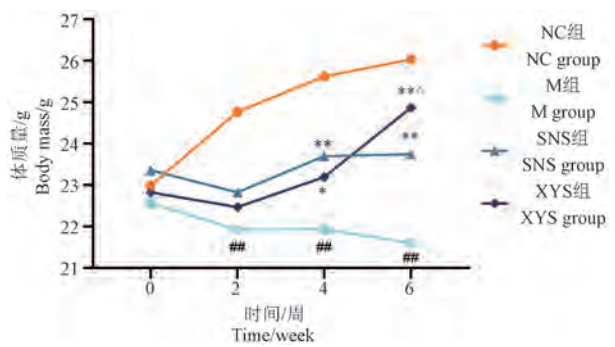
素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;符合正态分布但方差不齐的计量资料,使用 Dunnett's T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

2.1.1 体质量变化

与 NC 组比较,M2 组、M4 组、M6 组小鼠体质量显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,X4 组小鼠体质量升高($P < 0.05$),S4 组小鼠体质量显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,S6、X6 组小鼠体质量显著升高($P < 0.01$);与 S6 组比较,X6 组小鼠体质量升高($P < 0.05$)。见图 2。



注:与 NC 组相比,## $P < 0.01$;与 M 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SNS 组相比,^ $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 2 小鼠体质量变化($n = 10$)

Note. Compared with NC group, ## $P < 0.01$. Compared with M group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SNS group, ^ $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Changes in mice body mass($n = 10$)

2.1.2 中医证候外观表征概述

NC 组小鼠毛色黑灰柔顺、体型正常,日常活动敏捷,抓取时抗争激烈,伴大小便失禁。造模 2 周后,小鼠动作机警、毛发凌乱、警惕性强,抓取时抗争激烈,偶见大小便失禁。造模 4 周后,M4 组小鼠活动减少、抓取时偶有挣扎,少见大小便失禁;S4 组和 X4 组小鼠较 M4 组小鼠活动增多,S4 组小鼠比 X4 组小鼠抓取时抗争更加激烈。造模 6 周后,M6 组小鼠毛发凌乱、形体消瘦,日常活动减少,喜在角落抱团,抓取时几乎无反抗,偶有大便失禁且稀软;S6 组和 X6 组小鼠较 M6 组小鼠更加活跃,S6 组较 X6 组小鼠大便偶见稀软,X6 组小鼠毛色较 S6 组和 M6 组小鼠更加柔顺有光泽。

2.2 行为学实验

2.2.1 糖水偏好实验

与 NC 组比,M4 组和 M6 组小鼠糖水偏好率显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比,S4 组小鼠糖水偏好率显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,X6 组小鼠糖水偏好率显著升高($P < 0.01$)。见表 1。

2.2.2 旷场实验

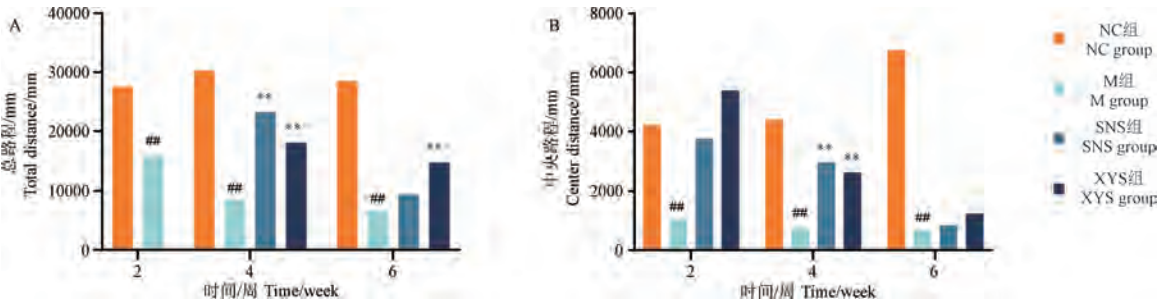
与 NC 组比较,M2 组、M4 组和 M6 组小鼠总路程显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组和

X4 组小鼠总路程显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,X6 组小鼠总路程显著升高($P < 0.01$);与 X4 组比较,S4 组小鼠总路程升高($P < 0.05$);与 S6 组比较,X6 组小鼠总路程显著升高($P < 0.01$),见图 3A。与 NC 组比较,M2 组、M4 组和 M6 组小鼠中央路程显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组和 X4 组小鼠中央路程显著升高($P < 0.01$);其余组之间中央路程无统计学意义,见图 3B。小鼠旷场实验路线见图 4。

表 1 小鼠糖水偏好率变化($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

Table 1 Changes in mice sucrose preference rate($\bar{x} \pm s, n = 10, \%$)

时间 Times	NC 组 NC group	M 组 M group	SNS 组 SNS group	XYX 组 XYX group
第 2 周 Second week	90.90 ± 4.70	82.60 ± 4.00	80.72 ± 7.61	81.56 ± 4.17
第 4 周 Forth week	88.42 ± 3.15	71.76 ± 9.54 [#]	87.47 ± 4.34 ^{**}	82.09 ± 4.24
第 6 周 Sixth week	88.17 ± 3.07	69.17 ± 7.67 [#]	75.31 ± 4.57	85.45 ± 4.02 ^{**}



注:A:总路程结果;B:中央路程结果。

图 3 小鼠旷场实验结果($n = 10$)

Note. A. Results of total distance. B. Results of center distance.

Figure 3 Results of mice open field text($n = 10$)

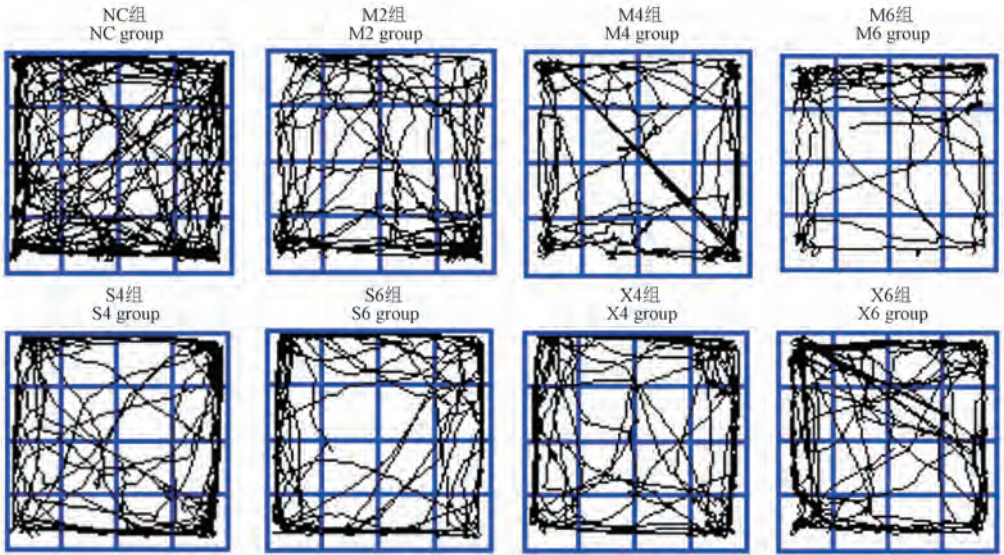


图 4 小鼠旷场轨迹图

Figure 4 Track map of mice in open field test

2.2.3 穿梭箱实验

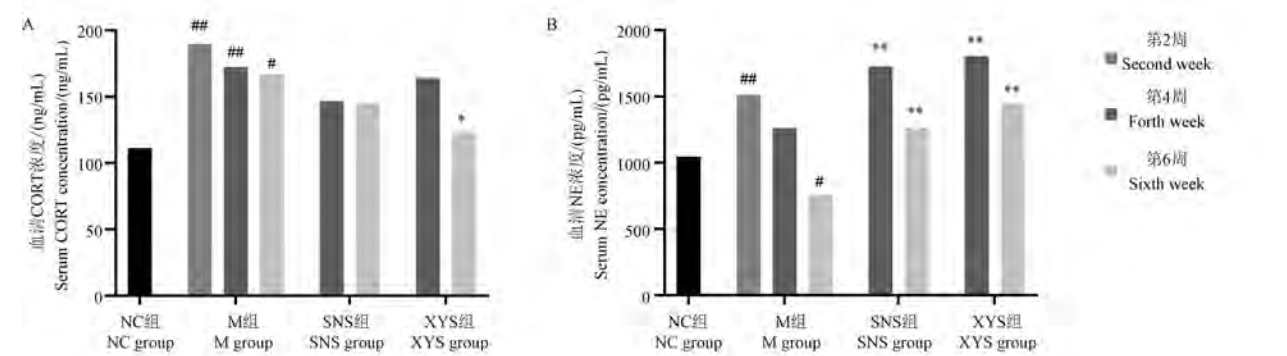
与 NC 组比较,M4 组和 M6 组小鼠主动逃避次数显著降低($P < 0.01$);与 M6 组比较,X6 组小鼠主动逃避次数升高($P < 0.05$)。第一次被动逃避时间各组间无统计学意义,见表 2。

2.3 指标检测

2.3.1 血清 CORT、NE 浓度

与 NC 组比较,M2 组和 M4 组 CORT 的浓度

显著升高($P < 0.01$),M6 组 CORT 浓度升高($P < 0.05$);与 M6 组比较,X6 组 CORT 浓度下降($P < 0.05$),见图 5A。与 NC 组比较,M2 组 NE 浓度显著升高($P < 0.01$),M6 组 NE 浓度降低($P < 0.05$);与 M4 组比较,S4 组和 X4 组 NE 浓度显著升高($P < 0.01$);与 M6 组比较,S6 组和 X6 组 NE 浓度显著升高($P < 0.01$),见图 5B。



注:A:血清 CORT 浓度;B:血清 NE 浓度;与 NC 组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图 5 小鼠血清应激相关指标浓度($n = 5$)

Note. A. Concentration in serum CORT. B. Concentration in serum NE. Compared with NC group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 5 Concentration of stress-related indicators in mouse serum($n = 5$)

表 2 小鼠穿梭箱实验结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Results of mice shuttle box experiment($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Groups	时间 Times	主动逃避次数 Active evasion frequency	第一次被动逃避时间/s First passive evasion time/s
NC 组 NC group	第 2 周 Second week	1.20 ± 0.79	1.07 ± 0.32
	第 4 周 Forth week	2.30 ± 0.95	0.91 ± 0.15
	第 6 周 Sixth week	2.20 ± 1.14	0.86 ± 0.20
M 组 M group	第 2 周 Second week	0.70 ± 1.25	0.91 ± 0.15
	第 4 周 Forth week	0.20 ± 0.63##	1.00 ± 0.20
	第 6 周 Sixth week	0.30 ± 0.48##	1.08 ± 0.30
SNS 组 SNS group	第 2 周 Second week	-	-
	第 4 周 Forth week	1.50 ± 0.71	0.85 ± 0.10
	第 6 周 Sixth week	1.40 ± 1.35	0.79 ± 0.12
YYS 组 YYS group	第 2 周 Second week	-	-
	第 4 周 Forth week	1.20 ± 0.92	1.01 ± 0.11
	第 6 周 Sixth week	2.00 ± 1.41*	0.80 ± 0.14

2.3.2 血清 D-木糖检测

与 NC 组比较,M2 组 D-木糖浓度降低($P < 0.05$),M4 组和 M6 组 D-木糖浓度显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组 D-木糖浓度升高($P < 0.05$);与 M6 组比较,S6 组和 X6 组 D-木糖水平

均显著升高($P < 0.01$);S4 组 D-木糖浓度高于 X4 组($P < 0.05$);X6 组 D-木糖水平高于 S6 组 D-木糖水平($P < 0.05$)。见图 6。

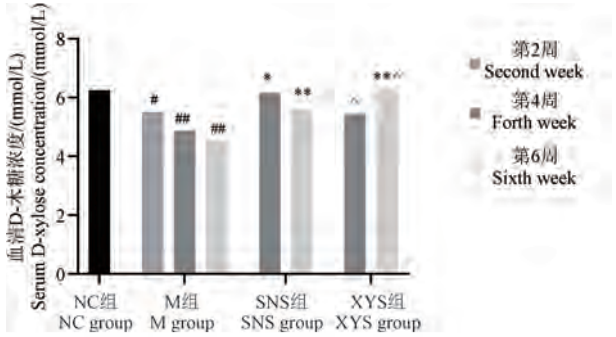


图 6 小鼠血清 D-木糖浓度变化($n = 5$)

Figure 6 Changes in serum D-xylose in mice($n = 5$)

2.3.3 胃部 HE 染色观察

NC 组小鼠呈正常胃黏膜表现,腺体排列整齐、呈高柱状、形态规则;M2 组小鼠腺体排列相对整齐,腺体底部略见腺腔扩张;M4 组小鼠周围腺体减少,腺体排列相对紊乱;M6 组小鼠胃部腺体显著减少,腺体排列紊乱、显著萎缩;S4 组小鼠

胃部腺体底部略见腺腔扩张;S6 组小鼠胃小凹处略见排列紊乱;X4 组小鼠胃黏膜腺体排列相对整齐;X6 组小鼠腺体底部略见萎缩,胃黏膜较为完整。见图 7。

2.3.4 胃黏膜 Ghrelin 阳性细胞表达

与 NC 组相比,M2 组、M4 组、M6 组 Ghrelin

表达水平均显著降低($P < 0.01$);与 M4 组比较,S4 组和 X4 组 Ghrelin 表达水平均升高($P < 0.05$);与 M6 组比较,S6 组 Ghrelin 表达水平升高($P < 0.05$),X6 组 Ghrelin 表达水平显著升高($P < 0.01$),且 X6 组比 S6 组显著升高($P < 0.01$)。见图 8。

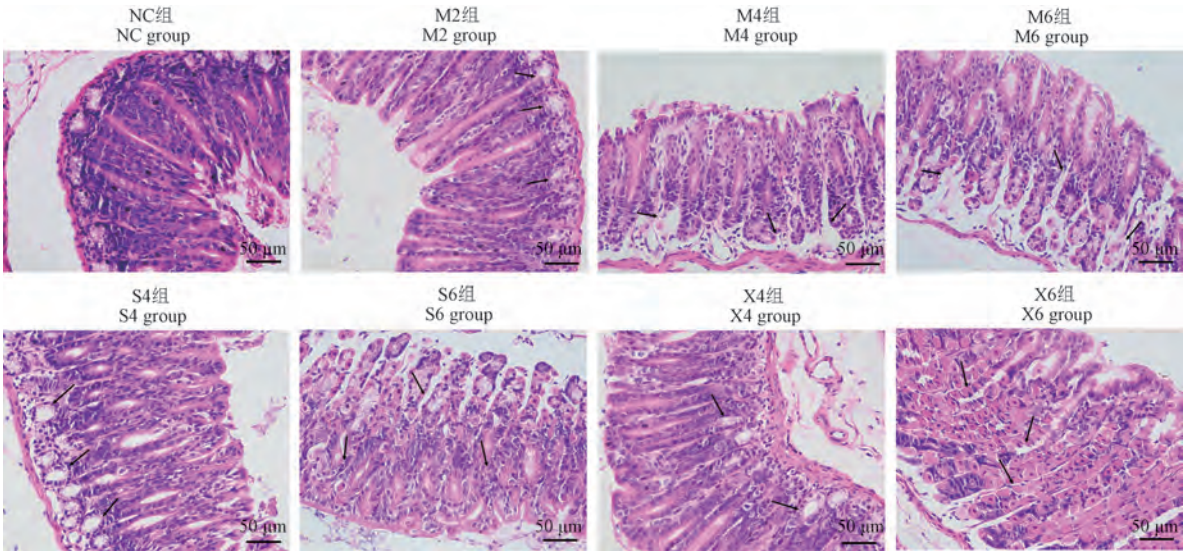
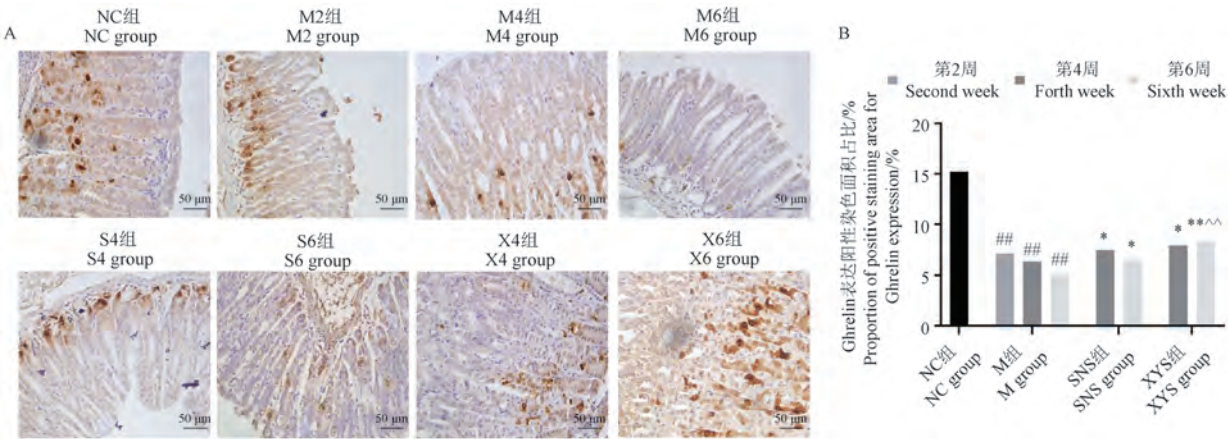


图 7 小鼠胃部 HE 染色结果
Figure 7 HE staining results of mice stomach



注:A:小鼠胃部 Ghrelin 表达 IHC 结果;B:小鼠胃部 Ghrelin 表达阳性染色面积占比。

图 8 小鼠胃部 Ghrelin 表达 IHC 结果($n = 5$)

Note. A. IHC results of Ghrelin expression in mice stomach. B. Proportion of positive staining area for Ghrelin expression in mice stomach.

Figure 8 IHC results of Ghrelin expression in mice stomach($n = 5$)

3 讨论

慢性心理应激是因为在较长时间内受到持续压力而在生理、心理上体现出的累积性反应,

是许多心身疾病形成的重要病因之一。本研究通过慢性不可预知温和应激模拟真实世界中引起怒、惊、恐等情绪的应激事件。在实验初期,小鼠被抓取灌胃时常伴有大小便失禁,本团队认为

这可能是“恐伤肾”的表现。在实验进展 1 周后,小鼠已适应抓取灌胃因此不再伴有大小便失禁的现象,但因为实验周期中,每日仍有灌胃和两种不可预知的应激刺激且小鼠无法逃离该环境,所以小鼠的情绪体验由“惊恐”逐渐转变为“郁怒”。《柳州医话》指出“七情之病,必由肝引起”^[17],《傅青主女科》言“肝气不舒,久郁伤脾”^[18],肝脾在生理上相互依赖,在病理上相互影响。逍遥散和四逆散分别是疏肝健脾和疏肝解郁的代表方剂,课题组前期研究发现逍遥散颗粒剂对 CMUS 造模小鼠的行为学指标改善效果明显^[19]。本研究采用“以方测证”的研究方法,通过对小鼠服用逍遥散或四逆散后行为变化的观察,结合中医理论,本团队认为慢性心理应激的病程主要涉及肝脾两脏。

糖水消耗实验和旷场实验是 CUMS 模型常用的评价指标,分别可以反应小鼠的快感缺乏程度和兴奋紧张程度,在本次实验中主要用于疗效评价。从实验结果分析发现疏肝理气的四逆散对造模 4 周的小鼠疗效优于疏肝健脾的逍遥散,而逍遥散对造模 6 周的小鼠疗效优于四逆散,从方证对应的角度来分析推测,本研究认为:小鼠造模的过程中经历了肝郁气滞向肝郁脾虚的证候转化过程。

血清 CORT 和 NE 分别由肾上腺皮质和髓质分泌,可以反映机体应激水平。本研究观察到在应激初期,血清 CORT 和 NE 浓度快速上升,当小鼠处于较长期的应激后,血清 CORT 和 NE 浓度逐渐呈下降趋势。詹雯洁等^[20]研究了青少年抑郁障碍患者血浆皮质醇与中医证型的相关性,发现多数抑郁障碍患者血浆皮质醇水平升高,且肝郁气滞证抑郁患者皮质醇升高更为明显。胡随瑜等^[21]对 1977 例抑郁症患者的中医证型研究,发现肝郁气滞型多出现在轻度抑郁症患者或抑郁症发病早期,而肝郁脾虚型多为长病程抑郁症或反复性抑郁症患者。袁洋等^[22]对 112 例非酒精性脂肪肝患者证候研究发现,肝郁脾虚型患者的病程(21.52 ± 32.05)个月远超过肝郁气滞型患者的病程(9.18 ± 10.72)个月。结合实验观察与理论研究,本团队推测不同浓度的 CORT 和 NE 可能是肝郁气滞证和肝郁脾虚证的部分物质基础。

D-木糖在小肠中的吸收方式是被动扩散,且在体内不被肝代谢,其吸收水平能够反映小肠的表面积及小肠吸收功能水平,在许多现代研究中,血清 D-木糖水平是脾虚证的相关指标^[23-25]。Ghrelin 为生长激素释放激素,又称胃饥饿素,主要由存在于胃底黏膜层的 X/A 泌酸细胞合成,主要生理功能是促进生长激素释放与促进进食,也有研究发现 Ghrelin 在学习、记忆和神经保护方面具有调节功能,并且能够缓解焦虑、抑郁等情志改变及睡眠障碍^[26]。MINGARDI 等^[27]发现, Ghrelin 对情绪的调控作用可能来自于其抗炎、抗氧化和神经营养作用。FAHED 等^[28]对抑郁症患者进行了夜间禁食后测定其血液 Ghrelin 浓度及情绪变化,发现 Ghrelin 升高的患者抑郁症状缓解更加明显,且食欲得到改善。姚玉璞等^[29]曾对肝郁气结型和肝郁脾虚型抑郁患者进行抑郁症消化道症状的证候特点研究,结果发现压力越大消化道症状积分越高,病程越长脾虚分值越高。本研究发现,在应激 4 周时,使用逍遥散与四逆散对小鼠消化系统改善作用相似,但在应激 6 周时,逍遥散对慢性心理应激导致的血清 D-木糖水平下降和胃中 Ghrelin 表达下降的改善优于四逆散,侧面印证慢性心理应激证候特征为肝郁脾虚证,且胃部 Ghrelin 表达下降可能是慢性心理应激肝郁气滞证转向肝郁脾虚证的物质基础。

中医理论强调辨证论治,证候的变化可以反映病势发展和转归、预测疾病走向,及时进行针对性治疗,可以达到控制病情、防止疾病恶化的目的。如果慢性心理应激是引起“证”的主要因素,那么将与中医理论中“异病同治”思想不谋而合——因为是相同的证(即由慢性心理应激造成的病理改变),所以可以采用同样的治法(即治疗慢性心理应激引起的生理改变)。在强调辨证的同时并不是要忽视辨病。证候代表的并非一个疾病单元,而是某种疾病发展变化的外在表现。与应激相关的疾病有常见证候,如腹泻型肠易激综合征以大肠湿热证和肝郁脾虚证多见^[30]、抑郁症以肝郁气滞证和肝郁脾虚证多见^[31]、失眠以肝郁化火证和阴虚火旺证多见^[32]等,在辨病的基础上考虑证候,有助于选择更加准确的治疗方案。本研究并未聚焦于某一特定疾病,而是探讨情志变化作为病因时对疾病证型的影响。探究慢性

心理应激证候演变规律有利于提高辨证论治的主动性、预见性和针对性,即当面对慢性心理应激作为主要病因的疾病时,提供辨证论治的思路作为参考,确定先后主次、轻重缓急,有助于提高辨证准确度、把握疾病发展过程中证候演变规律、提高医者对疾病转归的预见性。其次,将慢性心理应激作为中医病因加以研究,结合现代检验手段,有助于理解中医证候的生理学基础,探寻证候的物质基础和特异性指标。

本研究选用疏肝方四逆散和疏肝解郁方逍遥散,通过实验验证结合方药反证,证实慢性心理应激的致病特点由开始的肝郁气滞证逐渐转变为肝郁脾虚证,其物质基础可能是 CORT 和 NE 以不同浓度进行组合以及 Ghrelin 水平的下降。

参 考 文 献(References)

- [1] SAPOLSKY R M. Stress and the brain; individual variability and the inverted-U [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(10): 1344–1346.
- [2] RAY A, GULATI K, RAI N. Stress, anxiety, and immunomodulation; a pharmacological analysis [J]. *Vitam Horm*, 2017, 103: 1–25.
- [3] YANG L, ZHAO Y, WANG Y, et al. The effects of psychological stress on depression [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2015, 13(4): 494–504.
- [4] CUI B, PENG F, LU J, et al. Cancer and stress; nextgen strategies [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 93: 368–383.
- [5] 于琦, 金光亮. 三种复方对慢性应激模型大鼠海马 CREB、BDNF 基因表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(3): 591–594.
- YU Q, JIN G L. The effects of three complex prescriptions on BDNF and CREB expression of liver depression model by chronic unpredictable mild stress in rats [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2009, 25(3): 591–594.
- [6] 于琦, 金光亮. 三种复方对慢性应激肝郁模型大鼠海马 5-HT_{1A} 受体基因表达的影响 [J]. *北京中医药*, 2008, 27(1): 57–59.
- YU Q, JIN G L. Effects of three kinds of compound prescriptions on gene expression of 5-HT_{1A} receptor in hippocampus of rats with chronic stress and liver depression [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2008, 27(1): 57–59.
- [7] 刘玥莹, 郭晓玲, 赵宏波, 等. 逍遥散提取物对肝郁脾虚证模型大鼠药效的行为学评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(7): 2138–2141.
- LIU Y Y, GUO X L, ZHAO H B, et al. Behavior evaluation of rat model with stagnation of liver Qi and spleen deficiency syndrome regulating by Xiaoyao San extract [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2013, 28(7): 2138–2141.
- [8] 余楷杰, 高静静, 巩子汉, 等. 母婴分离/束缚应激模型小鼠海马小胶质细胞变化及温阳解郁方的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(18): 49–57.
- SHE K J, GAO J J, GONG Z H, et al. Changes of microglia in hippocampus of mice induced by maternal separation with restraint stress and regulatory effect of Wenyang Jieyu prescription [J]. *Chin J Experim Tradit Med Formul*, 2021, 27(18): 49–57.
- [9] 傅景华. 黄帝内经素问 [M]. 北京: 中医古籍出版社; 1997.
- FU J H. *Suwen of Huangdi Neijing* [M]. Beijing: Publishing House of Ancient Chinese Medical Books; 1997.
- [10] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2010.
- WEI W, WU X M, LI Y J. *Experimental methodology of pharmacology* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2010.
- [11] KATZ R J, ROTH K A, CARROLL B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247–251.
- [12] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358–364.
- [13] 张怡, 张铭阳, 冯庭宇, 等. 肝郁气滞、肝郁脾虚证慢性应激模型大鼠外周血 Th17/Treg 平衡偏移的比较 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(2): 229–233.
- ZHANG Y, ZHANG M J, FENG T Y, et al. Comparison of Th17/treg balance deviation in peripheral blood of chronic stress model rats with liver stagnation and qi stagnation and liver stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(2): 229–233.
- [14] 朱艳芳, 徐志伟, 敖海清, 等. 加减小逍遥散对慢性心理应激 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(6): 555–557, 592.
- ZHU Y F, XU Z W, AO H Q, et al. Effect of modified Xiaoyao San on insulin resistance in type 2 diabetes mellitus mice with chronic psychological stress [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2013, 24(6): 555–557, 592.
- [15] PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1/2/3): 3–33.
- [16] FERNÁNDEZ-TERUEL A, TOBEÑA A. Revisiting the role of anxiety in the initial acquisition of two-way active avoidance: pharmacological, behavioural and neuroanatomical convergence [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 118: 739–758.

- [17] 盛燮荪, 张明权, 吴静芝, 等. 王孟英医著精华 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社; 1992.
SHENG B S, ZHANG M Q, WU J Z, et al. The essence of Wang Mengying's medical works [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Press; 1992.
- [18] 傅山. 傅青主女科 [M]. 上海: 上海人民出版社; 1978.
FU S. Fu Qingzhu's obstetrics and gynecology [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House; 1978.
- [19] ZHANG Y, LI X J, WANG X R, et al. Integrating metabolomics and network pharmacology to explore the mechanism of Xiao-Yao-San in the treatment of inflammatory response in CUMS mice [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16 (11): 1607.
- [20] 詹雯洁, 骆利元, 汪琦, 等. 青少年抑郁障碍患者皮质醇水平与中医证候相关性研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25(4): 1475-1480.
ZHAN W J, LUO L Y, WANG Q, et al. A study on the correlation between cortisol levels and tcm syndrome distribution in adolescents with depressive disorder [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2023, 25(4): 1475-1480.
- [21] 胡随瑜, 张宏耕, 郑林, 等. 1977 例抑郁症患者中医不同证候构成比分析 [J]. *中国医师杂志*, 2003, 5(10): 1312-1314.
HU S Y, ZHANG H G, ZHENG L, et al. Analysis of TCM different syndromes composition ratio in 1977 patients with depression [J]. *J Chin Physician*, 2003, 5(10): 1312-1314.
- [22] 袁洋, 卜平, 孔桂美, 等. 112 例非酒精性脂肪肝证候病机的研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2007, 17(1): 40-42.
YUAN Y, BU P, KONG G M, et al. Study on syndrome pathogenesis of 112 cases of nonalcoholic fatty liver [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2007, 17(1): 40-42.
- [23] 薛晓倩, 黄学宽, 高宁, 等. 化湿液对湿阻证大鼠血清 D-木糖及 Ghrelin 含量的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12): 206-209.
XUE X Q, HUANG X K, GAO N, et al. Effects of Huashi liquid on content of D-xylose and ghrelin in serum of rats with dampness retention syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2011, 17(12): 206-209.
- [24] 张广梅, 李杰, 吴萍, 等. 血清 D-木糖与太阴病(脾阳虚证)“欲解时”及理中汤干预的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(10): 4685-4688.
ZHANG G M, LI J, WU P, et al. Study on serum D-xylose changes in the recovery of Taiyin disease (syndrome of spleen Yang deficiency) and after the intervention of Lizhong Decoction [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33 (10): 4685-4688.
- [25] 李篮, 何群, 王欢欢, 等. 不同治疗方法对脾气虚证模型兔血清 D-木糖含量的影响 [J]. *中成药*, 2010, 32(12): 2165-2167.
LI L, HE Q, WANG H H, et al. Effects of different treatment methods on serum D-xylose content in rabbits with spleen-qi deficiency syndrome [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2010, 32(12): 2165-2167.
- [26] SANGER G J, BROAD J, CALLAGHAN B, et al. Ghrelin and motilin control systems in GI physiology and therapeutics [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 239: 379-416.
- [27] MINGARDI J, MEANTI R, PAOLI C, et al. Ghrelin, neuroinflammation, oxidative stress, and mood disorders: what are the connections? [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2024, 22: 1.
- [28] FAHED R, SCHULZ C, KLAUS J, et al. Ghrelin is associated with an elevated mood after an overnight fast in depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2024, 175: 271-279.
- [29] 姚玉璞, 张立平, 郭蓉娟, 等. 从抑郁症的主要证型探讨“见肝之病, 知肝传脾” [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28 (4): 1081-1083.
YAO Y P, ZHANG L P, GUO R J, et al. Based on the main pattern of depression to explore the meaning of 'When the liver is affected, a prescription is chosen to replenish the spleen' [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2013, 28 (4): 1081-1083.
- [30] 熊钦, 李奕霖, 姚承佼, 等. 腹泻型肠易激综合征常见证型粪便肠道菌群宏基因组学横断面研究 [J]. *中医杂志*, 2024, 65(5): 503-511.
XIONG Q, LI Y L, YAO C J, et al. Metagenomics of fecal gut microbiota in common traditional Chinese medicine syndrome types of irritable bowel syndrome with diarrhea: a cross-sectional study [J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 65 (5): 503-511.
- [31] 张佳怡, 张顺玲, 钟琳炜, 等. 基于文献分析抑郁证的证型分布及用药规律 [J]. *中医临床研究*, 2024, 16(6): 33-38.
ZHANG J Y, ZHANG S L, ZHONG L W, et al. Analysis of depression syndrome distribution and medication rules based on the literature [J]. *Clin J Chin Med*, 2024, 16(6): 33-38.
- [32] 袁拯忠, 戴春秀, 叶人, 等. 913 例失眠患者中医证型分布的影响因素分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26 (7): 1587-1590.
YUAN Z Z, DAI C X, YE R, et al. Analysis on relative factors of TCM pattern identification of 913 insomnia cases [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2011, 26(7): 1587-1590.

赵亚,吕冲昊,罗世帆,等. *Padi2* 敲除加重社会隔离下小鼠的抑郁样行为[J]. 中国实验动物学报,2025,33(2):190-203.

ZHAO Y, LYU C H, LUO S F, et al. *Padi2* knockout exacerbates depressive-like behaviors in socially isolated mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 190-203.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.004

Padi2 敲除加重社会隔离下小鼠的抑郁样行为

赵亚¹, 吕冲昊^{1,2}, 罗世帆¹, 刘可^{1,2}, 郑泽民^{1,2}, 白冰¹, 师长宏^{1*}

(1. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 2. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨肽基精氨酸脱亚胺酶 2 (*Padi2*) 敲除对社会隔离下小鼠抑郁样行为的影响。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术, 建立 C57BL/6J 背景的 *Padi2* 敲除 (*Padi2*^{-/-}) 小鼠模型, 通过基因型鉴定和 RT-qPCR 检测 *Padi2* 的敲除效果; 选取 6 周龄的雄性 *Padi2*^{-/-} 小鼠和野生型 C57BL/6J 小鼠分别设置正常饲养组和社会隔离组, 每组 15 只, 正常饲养组 5 只/笼饲养, 社会隔离组 1 只/笼饲养, 每周称重一次, 4 周后进行强迫游泳以及旷场实验; 行为学实验结束后, 取各组小鼠脑组织, 通过免疫荧光检测小鼠脑内小胶质细胞变化情况。**结果** 成功建立 *Padi2*^{-/-} 小鼠, 正常饲养组中 *Padi2*^{-/-} 小鼠和 C57BL/6J 小鼠行为学无差异; 社会隔离后, 与 C57BL/6J 小鼠相比, *Padi2*^{-/-} 小鼠抑郁症状显著升高, 体质量增长明显, 脑组织中小胶质细胞数目显著增多。**结论** *Padi2* 敲除加重社会隔离下小鼠的抑郁样行为以及肥胖, 提示 *Padi2* 参与抑郁症进展, 可能是抑郁症预防和治疗的有效靶点。

【关键词】 抑郁样行为; 肽基精氨酸脱亚胺酶 2; 社会隔离; 基因敲除; 小胶质细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025) 02-0190-14

Padi2 knockout exacerbates depressive-like behaviors in socially isolated mice

ZHAO Ya¹, LYU Chonghao^{1,2}, LUO Shifan¹, LIU Ke^{1,2}, ZHENG Zemin^{1,2}, BAI Bing¹, SHI Changhong^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China;
2. the First Clinical Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

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

【Abstract】 Objective To explore the impact of peptidylarginine deiminase 2 (*Padi2*)-knockout on depressive-like behaviors in socially isolated mice. **Methods** Using CRISPR/Cas9 technology, a *Padi2*-knockout (*Padi2*^{-/-}) mouse model with a C57BL/6J background was established, and the effect of *Padi2* knockout was identified by genotyping and RT-qPCR detection. Six-week-old male *Padi2*^{-/-} mice and wild-type C57BL/6J mice were selected and divided into normal rearing and social isolation groups, with 15 mice per group. The normal rearing group mice were housed with 5 mice per cage, and the social isolation group was housed with 1 mouse per cage, and weighed once a week. After 4 weeks, forced swimming and open field tests were conducted. After the behavioral experiments, brain tissues were taken from mice in each group, and changes in microglia in the brains were detected by immunofluorescence. **Results** We successfully established *Padi2*^{-/-} mice. There was no difference in behavior

[基金项目] 陕西省创新能力的支持计划(2022PT-36, 2022PT-42), 军队实验动物专项课题(SYDW2020-20), 国家自然科学基金(32300428)。

Funded by Shaanxi Province Innovation Capacity Support Plan(2022PT-36, 2022PT-42), Special Topic of Military Experimental Animals (SYDW2020-20), National Natural Science Foundation of China (NSFC) Young Scientists Fund Project(32300428).

[作者简介] 赵亚, 女, 硕士, 助教, 研究方向: 疾病动物模型制备与评价。Email: 15702954323@163.com

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

between *Padi2*^{-/-} mice and C57BL/6J mice in the normal rearing group. After social isolation, compared with C57BL/6J mice, *Padi2*^{-/-} mice showed a significant increase in depressive symptoms, obvious weight gain, and a significant increase in the number of microglia in brain tissue. **Conclusions** *Padi2* knockout exacerbated depressive-like behaviors and obesity in socially isolated mice, indicating that *Padi2* is involved in the progression of depression and may be an effective target for the prevention and treatment of depression.

【Keywords】 depressive-like behavior; peptidylarginine deiminase 2; social isolation; gene knockout; microglia

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

抑郁症 (depression) 是以情绪低落、兴趣减退、认知功能受损和植物症状 (如睡眠或食欲障碍) 为特征的神经衰弱疾病^[1-2], 也是发病率最高的精神疾病。抑郁症状下, 神经胶质的突触功能障碍, 少突胶质细胞减少, 星形胶质细胞密度降低及功能减退、小胶质细胞活力增加^[3], 导致分子水平、脑网络水平及行为水平的一系列表型变化^[4-6]。抑郁症是环境和基因共同作用的结果^[7-9], 施加单一因素很难促发抑郁, 将两种因素结合研究可以更好地模拟抑郁症的发生发展。社会隔离, 特别是早期长时间社会隔离对哺乳动物的心理健康与神经系统发育具有破坏性影响, 在认知、情绪及行为多方面产生明显的障碍, 是诱导动物抑郁样模型的有效环境因素^[10-11]。肽基精氨酸脱亚胺酶 (peptidylarginine deiminase, *Padi*) 2 是一种受高浓度 Ca^{2+} 调控可催化精氨酸残基转换为瓜氨酸残基的水解酶, 是哺乳动物神经系统中主要表达的 PADI, 在整个神经系统中都有表达, 在神经发育过程中具有重要作用^[12-15]。*Padi2* 在巨噬细胞因子分泌、凋亡和细胞粘附等功能发挥重要功能, 已明确抑郁症是一种小胶质细胞相关疾病, 而小胶质细胞作为脑内的巨噬细胞, 在中枢神经系统中充当免疫细胞^[16]。但 *Padi2* 是否影响抑郁症的进程尚未有报道。因此, 本研究构建 *Padi2* 敲除 (*Padi2*^{-/-}) 小鼠, 并对其进行 4 周社会隔离以构建抑郁样小鼠模型, 分析该小鼠行为学、脑组织形态病理学变化, 探究 *Padi2* 在抑郁症进程中的作用, 期望为抑郁症的预防和治疗提供新的有效靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

购自空军军医大学实验动物中心【SCXK

(陕)2024-002】的 6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠以及 *Padi2*^{-/-} 小鼠各 30 只, 体质量均在 18 ~ 22 g, 以上动物均饲养于空军军医大学实验动物中心屏障设施【SYXK (陕) 2024-003】, 室温控制在 24 ~ 26 °C, 湿度控制在 50% ~ 60%, 动物饲养间温湿度检测系统每 30 min 检测一次数据, 12 h/12 h 明暗交替, 自由进食, 隔日更换垫料。本研究涉及的动物使用及实验操作程序均通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准 (IACUC-20241399)。

1.1.2 主要试剂与仪器

抗离子钙结合衔接分子 1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, IBA-1) 抗体 (Ab178846) 购自英国 Abcam 公司; DyLight 59 荧光标记二抗购自美国 Genetex 公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 10 µg/mL) 购自北京雷根 (Leagene) 公司。

PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司 (型号: Mastercycler X50s); 台式高速冷冻型微量离心机购自德国 eppendorf 公司 (型号: 5425); 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied biosystems 公司 (型号: StepOnePlus™); 激光共聚焦显微镜购自德国 Zeiss AG 公司 (型号: LSM800); 冰冻切片机购自德国 Leica 公司 (型号: CM3050S); 旷场箱 (型号: 63008)、高架十字迷宫 (型号: 63010)、强迫游泳筒 (型号: 63022) 均购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 行为学视频追踪系统购自西班牙 Panlab 公司 (型号: Smart3.0)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

具体分组和每组只数为: 正常饲养组野生型 C57BL/6J 小鼠 (对照-野生型, Con-WT) 和正常饲养组 *Padi2*^{-/-} 小鼠 (对照-敲除型, Con-KO) 各 15 只, 以及社会隔离组野生型 C57BL/6J 小鼠 (实

验-野生型, EX-WT) 和社会隔离组 *Padi2*^{-/-} 小鼠 (实验-敲除型, EX-KO) 各 15 只。

1.2.2 *Padi2*^{-/-} 小鼠构建

利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Padi2*^{-/-} 小鼠模型。小鼠 *Padi2* 基因位于第四号染色体, 针对 *Padi2* 基因设计两条 sgRNA, 分别为: mouse-*Padi2*-gRNAFP: 5'-GGCCAGATGGTCCCCACTCTG-3' 和 mouse-*Padi2*-gRNARP: 5'-CCCCTGACTCACTGCTATAGA-3'。将两条 sgRNA 加入带有 T7 启动子序列上游引物 (T7-sgRNA-FP) 后, 与下游引物序列 (sgRNA-RP) 一起交予北京华大公司合成带有 sgRNA 序列的上下游引物对; 以标准 gRNA 骨架为模板, 使用 sgRNA 序列的上下游引物对扩增标准 gRNA 模板进行 PCR 扩增, 将 sgRNA 转入标准 gRNA 骨架, 使用 PCR 产物回收试剂盒过柱回收 PCR 产物。PCR 产物转录得到 gRNA, 使用 RNA 回收试剂盒纯化 gRNA, 将纯化 gRNA、spCas9 蛋白及 DNA 混合进行酶切反应后, 琼脂糖凝胶电泳检测酶切活性, 酶切效率 ≥ 70% 方可用于后续显微注射。注射完成 30 min 后, 挑选存活胚胎进行移植, 待 F0 代仔鼠出生后, 剪尾鉴定, 鉴定得到的阳性小鼠用于后续繁育。具体构建方案见图 1。

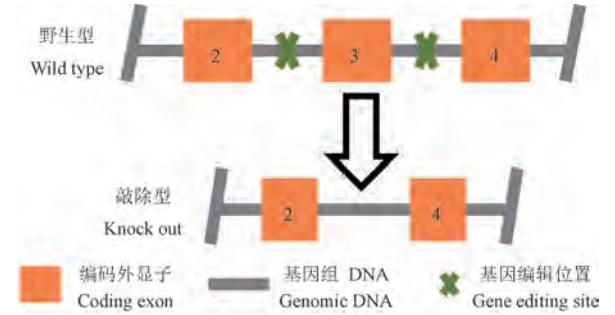


图 1 *Padi2* 敲除小鼠构建方案
Figure 1 Establishment scheme for *Padi2* knockout mice

1.2.3 基因型鉴定

小鼠出生后剪取脚趾编号并提取脚趾 DNA 进行基因型鉴定。在小鼠出生 2 周左右, 剪取脚趾编号, 并将剪取的脚趾放在 1.5 mL 离心管内, 每管加入 500 μL 的组织裂解液 (组织裂解液配方见表 1) 和 2 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K, 在加热模块上震荡孵育 2 ~ 3 h 使小鼠脚趾组织充分裂解后, 向该离心管内加入 500 μL 的氯仿溶液, 漩涡振荡器上充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 轻

柔的吸取上清, 置于新标记好的 1.5 mL 离心管内, 加入 500 μL 异丙醇溶液, 漩涡振荡器上充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃除上清, 可以观察到 1.5 mL 离心管底部有少量的白色沉淀物, 即为 DNA, 加入提前 4 ℃ 预冷的 75% 乙醇溶液 1 mL, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 室温下离心管轻柔倒置, 干燥 10 min, 加入 200 μL 的双蒸水溶解 DNA。将提取的小鼠鼠尾 DNA 利用 TaKaRa 公司的 PremixTaq™ 混合物进行扩增。*Padi2* 基因敲除检测引物为: mouse-*Padi2*-KO-F: 5'-GAGTACCAGACTAACCCGAGCTAT-3', mouse-*Padi2*-KO-R: 5'-GTGACAGCACTCAGGACACTAGG-3', mouse-*Padi2*-WT-F: 5'-CCTGTCTGGTTGGA TTATCTGGGAAAA-3', mouse-*Padi2*-WT-R: 5'-CACCCCTGAAACCTGCCCTGAGTT-3'。扩增条件为: 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 30 s, 61 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 3 min, 从变性到延伸重复 35 个循环, 68 ℃ 延伸 10 min。DNA 扩增产物首先是使用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 重复 3 次, 确认条带大小无误后, 将剩余 DNA 扩增产物送至北京华大生物科技有限公司测序, 得到测序结果后, 将测序结果通过 NCBI-BLAST 线上分析, 确认敲除片段具体碱基序列并确认 *Padi2*^{-/-} 小鼠基因型。

表 1 组织裂解液配方

Table 1 Tissue lysis buffer recipe		
试剂 Reagent	浓度/(mol/L) Concentration/(mol/L)	剂量/μL Dose/μL
Tris (pH = 8.0)	1.000	50.0
NaCl	5.000	40.0
EDTA (pH = 8.0)	0.500	5.0
SDS	0.346	4.5
ddH ₂ O	55.560	400.5

1.2.4 小鼠体质量测量

小鼠 6 周龄时开始称重, 每周测量 1 次, 测量时轻柔的抓取小鼠, 确定编号, 将小鼠放入特定的测量盒称重。

1.2.5 旷场实验 (open field test, OFT)

4 周社会隔离后, 将小鼠放置在旷场箱 (50 cm × 50 cm × 40 cm) 中央格, 同时进行摄像和计时, 5 min 后自动停止摄像。Smart 3.0 行为学视频追踪系统分别记录 5 min 内运动总距离、平均速度、中央格停留时间等指标。OFT 可用来评估实验动物的自主运动能力和探究行为。每

只动物实验结束后,清除实验箱内动物的大小便,用 75%乙醇擦洗箱底和四壁,以清除气味。

1.2.6 高架十字迷宫

将小鼠置于高架十字迷宫装置(臂宽 5 cm,臂长 35 cm,闭臂高 15 cm,迷宫离地高度 55 cm)的中心,由 Smart 3.0 行为学视频追踪系统分别记录 5 min 内小鼠在开放臂的探索时间及频次,以评估小鼠的焦虑情况及探索行为。每只动物实验结束后,清除实验设备内动物的大小便,用 75%乙醇擦洗箱底和四壁,以清除气味。

1.2.7 强迫游泳实验

将小鼠置于水面高度 25 cm、水温 20 ~ 24 ℃的透明玻璃圆筒(高度 30 cm,直径 10 cm),将小鼠放入圆筒中开始计时,共 6 min,Smart 3.0 行为学视频追踪系统记录后 4 min 小鼠的不动时间。

1.2.8 脑损伤观察及脑组织取材

行为学实验结束后,采用心脏灌注法进行脑组织取材,该方法可快速冲净血液并在动物死亡前进行组织固定,避免组织自溶现象。心脏灌注法脑组织取材时,小鼠经麻醉后开胸,剪开心包膜,暴露心脏,剪开右心耳,同时与心尖呈 30° ~ 45°夹角进行左心室插管,固定针头,先快速灌注生理盐水(即 0.9% NaCl 溶液)10 mL 冲洗血液,然后换用 4%多聚甲醛溶液灌注 25 mL,小鼠后肢绷直、尾部竖起成一条直线、肝发白、内脏鼓起即灌注完成。取完整脑组织置于 4%多聚甲醛溶液中,于 4 ℃下保存至少 24 h。然后分别用 25%、30%蔗糖梯度溶液进行脱水。在冰冻切片机上行冠状连续切片,切片厚度为 20 μm,用于免疫荧光染色。在脑组织取材需要注意:(1)暴露心脏时,在膈肌与胸骨柄相连处剪一个小口,造成人工气胸,使肺萎缩、胸腔里的空间增大,可有效避免肺、肝及心脏损伤,且减少出血;(2)进行左心室插管时,灌注针从左心室插入主动脉,确保达到体循环灌注冲洗血液的效果;(3)灌注时,排空输液器内气泡避免出现血栓,影响后续实验。

1.2.9 小鼠石蜡包埋组织切片的制备

在处死小鼠分离各组织后,取 0.5 cm × 0.5 cm 的组织置于 4 mL 装有 4%多聚甲醛的离心管内,固定 48 h 以上,固定好的组织经由低到高的乙醇浓度脱水,二甲苯中透明,置换出组织块中的乙醇,浸入石蜡包埋,包埋好的组织置于

切片机上固定组织,切片(切片厚度为 3 ~ 4 μm),切下来的组织切片放入 40 ~ 45 ℃的热水中进行展片,取结晶的载玻片,标记好信息,将切片贴于载玻片上。

1.2.10 小鼠组织苏木精-伊红(HE)染色

将用于实验的石蜡切片置于切片架上,将切片及切片架染缸置于预先设置好温度的恒温摊片烤片机内 2 h,迅速将放有切片的切片架依次转移至二甲苯 I 和 II 中各 5 min,然后在梯度乙醇中依次转移,乙醇梯度及时间如下:100%的乙醇中浸泡 2 min,95%的乙醇中浸泡 2 min,90%的乙醇中浸泡 1 min,85%的乙醇中浸泡 1 min,75%的乙醇中浸泡 1 min。水中净放 2 min,苏木精染色 5 min,自来水清洗苏木精 5 次(直至自来水不变色),1%盐酸乙醇迅速分化 3 s,自来水中返蓝 2 min 后,伊红染液染色 3 min,自来水进行清洗 5 遍,继续梯度乙醇中过缸,95%乙醇中 10 s,95%乙醇中 2 min,100%乙醇 I 中 2 min,100%乙醇 II 中 2 min,二甲苯 I 中 5 min,二甲苯 II 中 5 min,用中性树胶封片。(注意:(1)自来水冲洗时尽量轻柔,避免造成脱片;(2)苏木精染色时间需根据室温调节,夏天染色 3 ~ 5 min,冬天可能染色需要 20 ~ 30 min;(3)封片时,将未封片的切片连同切片架暂时放置于二甲苯 II 中。)

1.2.11 免疫荧光染色及激光共聚焦观察

将切片在 PBS(pH = 7.4)中洗涤 5 min,用 0.2% Triton 20 通透 10 min,然后进行免疫荧光标记处理。切片在 2% BSA 中孵育 1 h 后,加入一抗 4 ℃孵育过夜(Iba-1 抗体的工作液稀释比例为 1 : 500)。第 2 天在 PBS 中洗涤 3 次,将切片与相应的二抗(Dylight 594 荧光标记的二抗工作液稀释比例为 1 : 500)在室温下避光孵育 2 h。切片在 PBS 中洗涤 3 次,每次 5 min,避光。细胞核用 DAPI 溶液(10 μg/mL)染色 8 min,然后用抗荧光淬灭封片剂封片。使用激光共聚焦显微镜拍摄照片,共聚焦使用时,室温控制在 22 ℃,湿度控制在 40% ~ 60%,并使用 Image J V1.8.0.112 软件分析免疫荧光染色的荧光强度, $P < 0.05$ 为差异具有显著性差异。

1.2.12 实时定量 PCR 检测 (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)

按照 RNA 提取试剂盒步骤提取总 RNA,计

算出样品的 RNA 浓度,用反转录试剂盒进行反转录,以总 RNA 1 μg 为模版,上机检测,每个样本设 3 个复孔,每个模板的 Ct 值使用 Applied Biosystems Step One 加 RT-qPCR 系统测定。计算 ΔCt 和 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值,分析目标基因的相对表达量。选择查找用于小鼠的 RT-qPCR 反应引物包括以下分子的上下游引物:*IL-1 β* 以及 *TNF- α* 基因的表达,分别进行 PCR 反应。RT-qPCR 所用引物序列分别为:Mouse- *β -actin*-F:5'-AGCCATGTACGTAGC CATCCA-3',Mouse- *β -actin*-R:5'-TCTCCGGAGTC CATCACAATG-3',Mouse-*TNF- α* -F:5'-CACAGAA AGCATGATCCGCG-3',Mouse-*TNF- α* -R:5'-CAGA TTGACCTCAGCGCTGA-3',Mouse-*IL-1 β* -F:5'-ATG GATGCTACCAAAGTGGAT-3',Mouse-*IL-1 β* -R:5'-TCACACACCAGCAGGTTATCATC-3'。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.4.0 软件进行数据统计学分析,结果均以平均值 $\pm$ 标准

差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较应用单因素方差分析,组内比较应用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

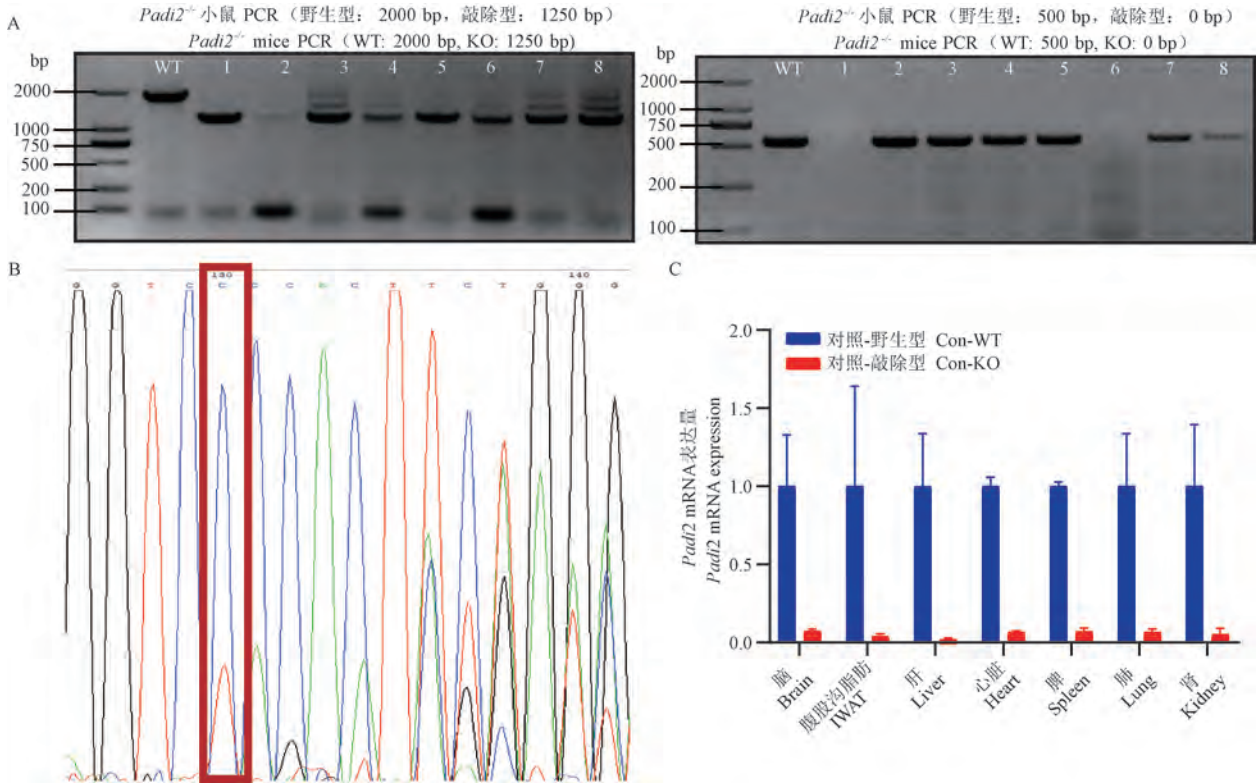
2 结果

2.1 *Padi2*^{-/-}小鼠的建立

小鼠出生 2 周左右,剪取脚趾编号并提取脚趾 DNA 进行基因型鉴定,经 PCR 鉴定野生条带为 2000 bp 及 500 bp,敲除条带为 1250 bp,杂合小鼠同时在 2000、1250 和 500 bp 处有条带(图 2A);通过杂合子小鼠测序确认 *Padi2* 基因第三外显子成功敲除(图 2B),可稳定传代。用 qPCR 检测 8 周龄 *Padi2*^{-/-} 小鼠主要脏器 *Padi2* mRNA 表达情况(图 2C),结果表明,在 *Padi2*^{-/-} 小鼠的主要脏器中,*Padi2* mRNA 表达水平显著低于野生型小鼠,表明 *Padi2*^{-/-} 小鼠模型构建成功。

2.2 *Padi2*^{-/-}对小鼠生长繁殖及表型的影响

饲养过程中发现,*Padi2* 敲除不影响正常饲



注:A:PCR 鉴定 *Padi2*^{-/-} 小鼠基因型;B:测序鉴定 *Padi2*^{-/-} 小鼠基因型;C:RT-qPCR 鉴定主要脏器 *Padi2* mRNA 表达。

图 2 *Padi2*^{-/-} 小鼠构建及鉴定

Note. A. PCR identification of *Padi2*^{-/-} mouse genotype. B. Sequencing identification of *Padi2*^{-/-} mouse genotype. C. RT-qPCR identification of *Padi2* mRNA expression in major organs.

Figure 2 Construction and identification of *Padi2*^{-/-} mice

养状态下小鼠生长和发育。小鼠 6 周龄开始每周称重,持续 4 周发现,Con-KO 小鼠和 Con-WT 小鼠体质量增长无显著性差异(图 3A ~ 3B)。对 Con-KO 小鼠的主要脏器 HE 染色结果分析,主要脏器病理检查未发现明显异常(图 3C)。

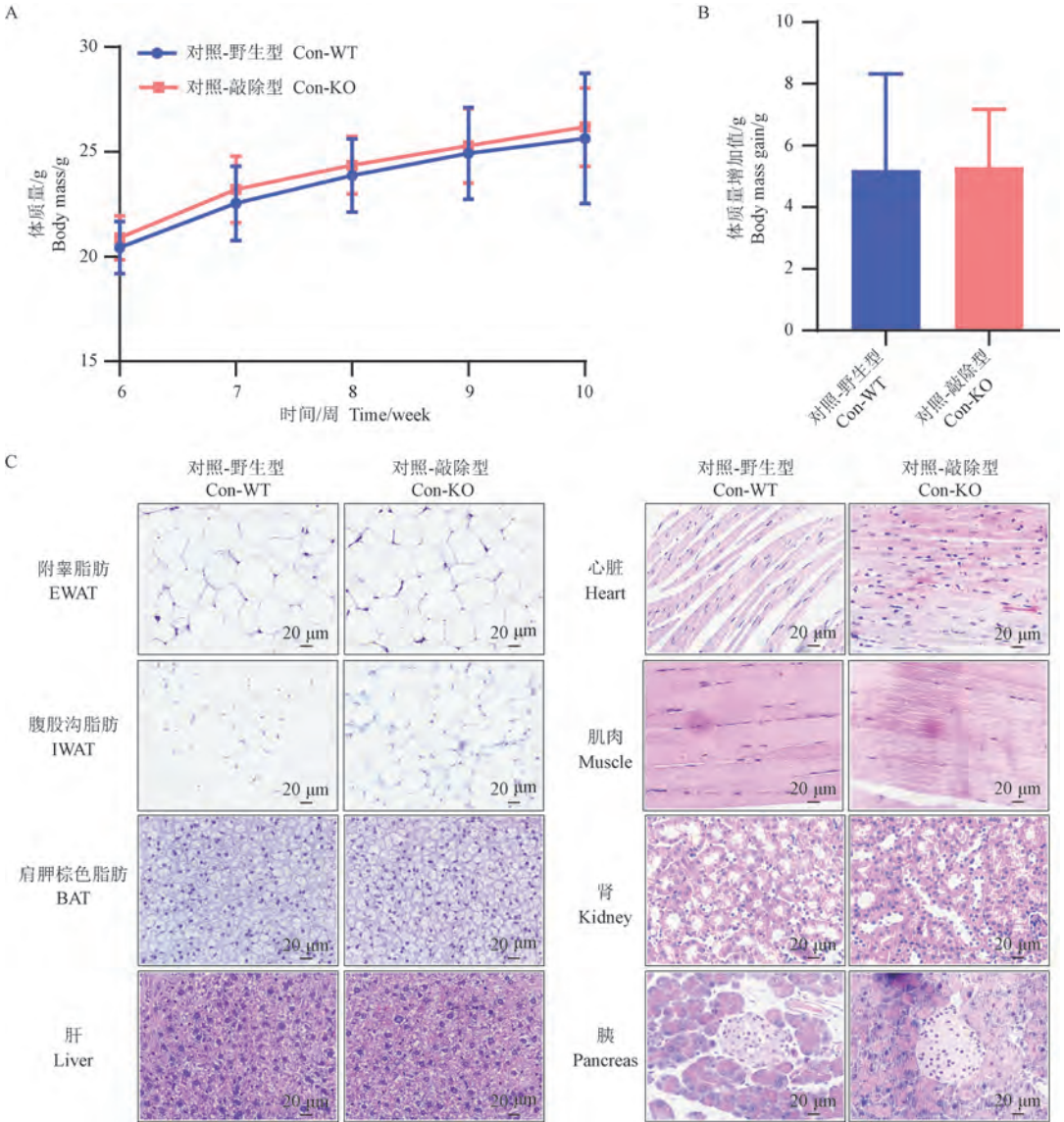
2.3 *Padi2* 敲除对社会隔离小鼠自主运动能力和探究行为的影响

OFT 结果表明,4 周社会隔离后,小鼠的总运动距离、进入中央区域的次数均增加。正常饲养

组中,Con-WT 小鼠和 Con-KO 小鼠运动总距离、进入中央区域的次数无差异,两者典型运动轨迹图相似;社会隔离后,与 EX-WT 小鼠相比,EX-KO 小鼠总运动距离、进入中央区域的次数显著增加,*Padi2*^{-/-} 小鼠的典型运动轨迹图与野生型 C57BL/6J 相比更复杂(图 4A ~ 4C)。

2.4 *Padi2* 敲除对社会隔离小鼠抑郁症状的影响

强迫游泳结果显示,社会隔离后,小鼠不动时间增长,与 EX-WT 小鼠相比,EX-KO 小鼠的不



注:A:正常饲养的 *Padi2*^{-/-} 小鼠生长曲线;B:正常饲养的 *Padi2*^{-/-} 小鼠饲养 4 周体质量增加值;C:*Padi2*^{-/-} 小鼠主要脏器 HE 染色。

图 3 *Padi2*^{-/-} 小鼠与野生型小鼠体质量以及各组织 HE 染色($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Note. A. Growth curve of normally raised *Padi2*^{-/-} mice. B. Body mass gain of normally raised *Padi2*^{-/-} mice over 4 weeks. C. HE staining of major organs in *Padi2*^{-/-} mice.

Figure 3 Body mass and HE staining of major tissues in *Padi2*^{-/-} mice compared to WT mice ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

动时间显著增加,提示 EX-KO 小鼠的行为绝望较 EX-WT 小鼠显著增加。对照组中 Con-WT 小鼠与 Con-KO 小鼠在强迫游泳实验中的不动时间相近。4 周的社会隔离后,与对照组相比,实验组小鼠不动时间均增加;实验组中,EX-KO 小鼠的不动时间较 EX-WT 小鼠显著增加(图 5A)。

2.5 *Padi2* 敲除对社会隔离小鼠焦虑症状的影响

高架十字迷宫结果显示,社会隔离后,小鼠进入开放臂的频次和时间减少。4 周的社会隔离后,与 EX-WT 小鼠相比,EX-KO 小鼠进入开放臂的频次显著减少,提示 EX-KO 小鼠的焦虑情绪较 EX-WT 小鼠显著增加。对照组中 Con-WT 小鼠与 Con-KO 小鼠进入开放臂的频次和时间无显著差异(图 5B)。

2.6 社会隔离的 *Padi2*^{-/-} 小鼠体质量变化

体质量结果显示,EX-KO 小鼠体质量增加较快,并且与 EX-WT 小鼠相比,具有显著性差异

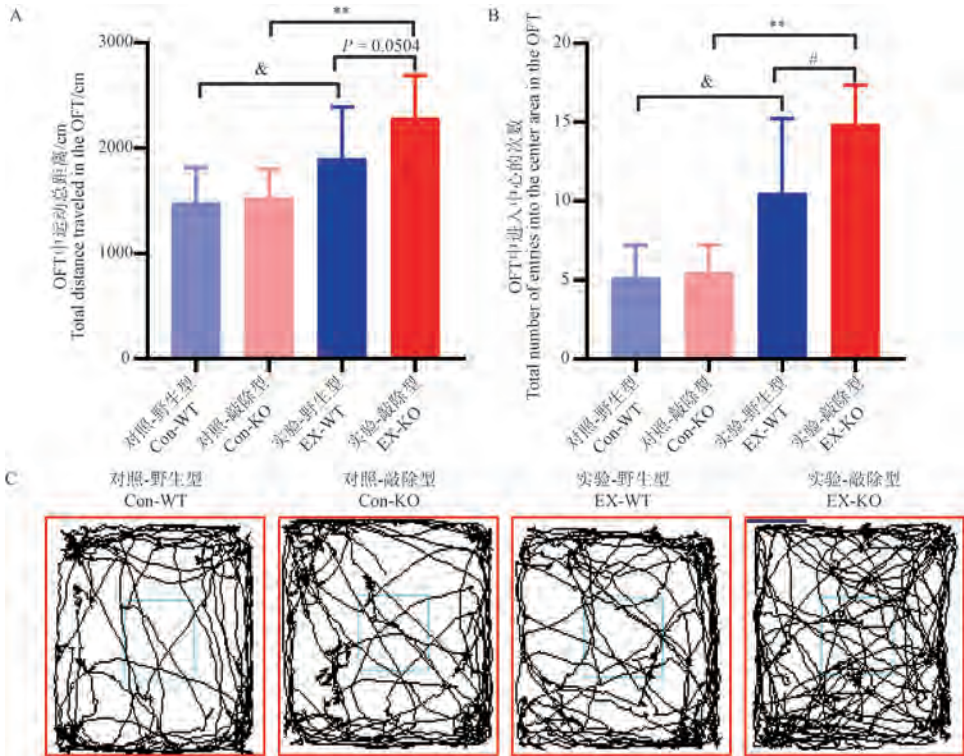
(图 5C)。每周记录社会隔离的小鼠体质量变化,发现社会隔离 1 周,EX-KO 小鼠与 EX-WT 小鼠具有显著性差异,并且这种差异持续存在,两组间的体质量增长值也存在显著性差异(图 5D)。

2.7 社会隔离的 *Padi2*^{-/-} 小鼠脑内小胶质细胞的数目

脑组织免疫荧光染色结果表明,4 周社会隔离后,*Padi2*^{-/-} 小鼠脑内小胶质细胞的数目显著增多。对照组中,Con-WT 小鼠与 Con-KO 小鼠脑内各位置小胶质细胞数目无差异;社会隔离组脑内小胶质细胞显著增加,并且与 EX-WT 小鼠相比,EX-KO 小鼠海马 CA1 区以及 CA3 区小胶质细胞海马区域显著增加(图 6)。

2.8 社会隔离的 *Padi2*^{-/-} 小鼠脑内的神经炎症因子变化情况

脑组织 RT-qPCR 实验表明,4 周社会隔离后,*Padi2*^{-/-} 小鼠脑内神经炎症因子 IL-1 β 以及

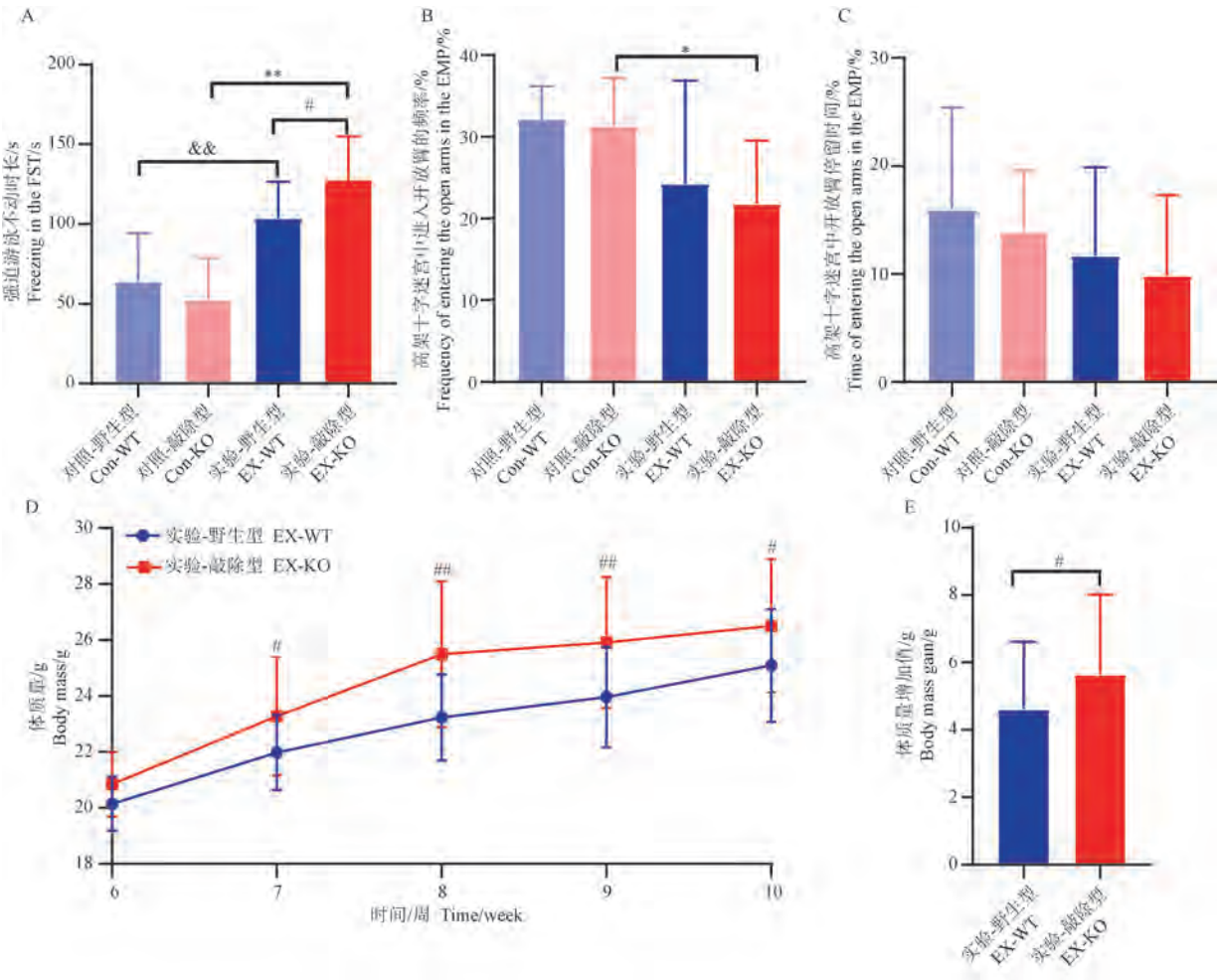


注:A:OFT 总路程;B:OFT 进入中间区域次数;C:OFT 典型运动轨迹;与 EX-WT 小鼠组相比,* $P < 0.05$;与 Con-WT 小鼠相比,& $P < 0.05$;与 Con-KO 小鼠相比,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 4 OFT 结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Total distance traveled of OFT. B. Total number of entries into the central area in the OFT. C. Typical movement trajectory of OFT. Compared with EX-WT mice group, * $P < 0.05$. Compared with Con-WT mice group, & $P < 0.05$. Compared with Con-KO mice group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 4 Results of the open field test($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注:A:强迫游泳不动时间;B:高架十字迷宫小鼠进入开放臂的频率;C:高架十字迷宫小鼠在开放臂停留时间;D:社会隔离的 *Padi2*^{-/-} 小鼠生长曲线;E: *Padi2*^{-/-} 小鼠社会隔离 4 周体质量增加值;与 EX-WT 小鼠相比,## *P* < 0.01;与 Con-WT 小鼠相比, && *P* < 0.01;与 Con-KO 小鼠相比, * *P* < 0.05。(下同)

图 5 社会隔离后 *Padi2*^{-/-} 小鼠强迫游泳、高架十字迷宫以及体质量变化($\bar{x} \pm s, n \geq 6$)

Note. A. Freezing time in the FST. B. Frequency of mice entering the open arms in the EMP. C. Duration of time mice spend in the open arms in the EMP. D. Growth curve of *Padi2*^{-/-} mice with social isolation. E. Body mass gain of *Padi2*^{-/-} mice after 4 weeks of social isolation. Compared with EX-WT mice group, ## *P* < 0.01. Compared with Con-WT mice group, && *P* < 0.01. Compared with Con-KO mice group, * *P* < 0.05. (The same in the following figures)

Figure 5 Forced swimming, elevated plus maze and body mass change in *Padi2*^{-/-} mice with social isolation($\bar{x} \pm s, n \geq 6$)

TNF-α 的表达升高。对照组中,Con-WT 小鼠与 Con-KO 小鼠脑组织中神经炎症因子表达无差异;与对照组相比,社会隔离组脑组织中神经炎症因子 IL-1β 以及 TNF-α 的表达均显著升高,并且与 EX-WT 小鼠相比,EX-KO 小鼠脑组织中神经炎症因子 TNF-α 的表达显著升(图 7)。

3 讨论

Padi2 是哺乳动物神经系统中主要表达的

Padi,可修饰精氨酸以产生结构和功能改变的瓜氨酸化蛋白质参与在小鼠神经发育过程中^[12-13,15]。*Padi2* 失调和异常蛋白瓜氨酸化可加剧神经炎症,促进神经退行性病变^[17-18]。神经炎症通过多种神经生物学机制参与抑郁症进展^[19-20],但尚未有研究报道 *Padi2* 是否通过影响神经炎症,参与抑郁症进程。在诸多导致抑郁症的环境因素中,社会隔离对各生命阶段人群的心理健康均有巨大影响,是抑郁症的重要危险因

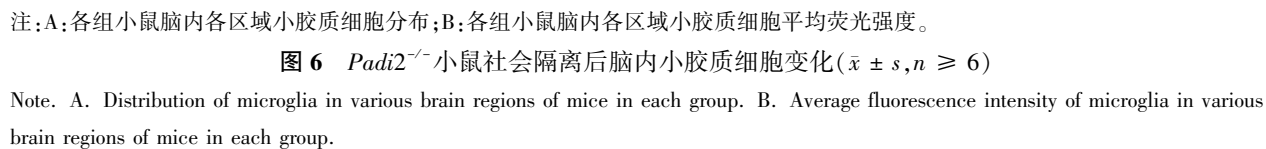
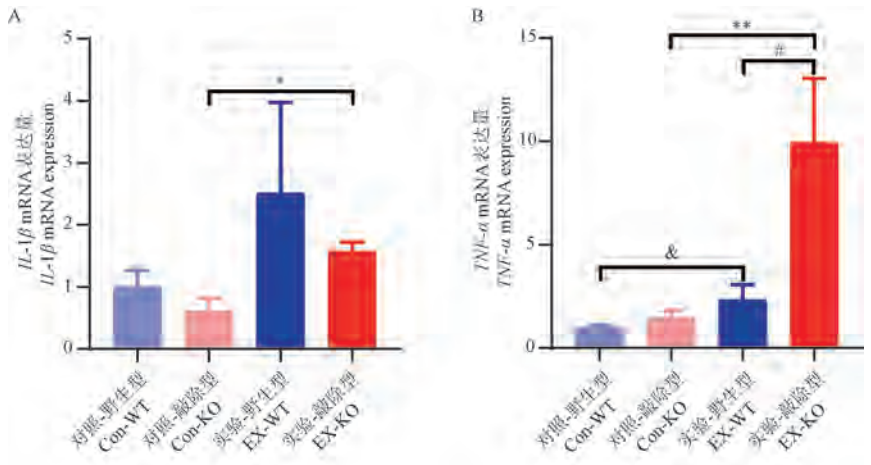


Figure 6 Changes in microglia in the brains of *Padi2*^{-/-} mice after social isolation ($\bar{x} \pm s, n \geq 6$)



注:A:各组小鼠脑内 IL-1β 表达情况;B:各组小鼠脑内 TNF-α 表达情况。

图 7 *Padi2*^{-/-}小鼠社会隔离后脑内炎症因子变化($\bar{x} \pm s, n \geq 6$)

Note. A. *IL-1β* expression in the brains of mice in each group. B. *TNF-α* expression in the brains of mice in each group.

Figure 7 Changes in inflammatory factors in the brains of *Padi2*^{-/-} mice after social isolation($\bar{x} \pm s, n \geq 6$)

素,可能严重影响死亡率和发病率^[21]。

因此,本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Padi2*^{-/-}小鼠,并对其进行 4 周社会隔离,探究 *Padi2* 敲除对抑郁症进程的影响。结果显示,正常饲养条件下,敲除 *Padi2* 并不影响小鼠的体质量、组织形态、行为学以及脑内各区域小胶质细胞数量。社会隔离后,与正常饲养相比,无论野生型小鼠还是 *Padi2*^{-/-}小鼠均出现明显的抑郁相关表型,并且与社会隔离的野生型小鼠相比,社会隔离的 *Padi2*^{-/-}小鼠抑郁样症状加剧。在症候群及症状学方面焦虑和抑郁两病症都有着重叠部分,临床中经常有着焦虑和抑郁两种疾病共存的状况^[22]。高架十字迷宫实验能有效反映临床患者的焦虑状态,可有效评估抗焦虑药物的药理效应^[23]。因此,研究人员使用高架十字迷宫实验探究社会隔离的 *Padi2* 敲除小鼠是否出现焦虑情绪,结果发现社会隔离的 *Padi2*^{-/-}小鼠焦虑情绪也加剧。肥胖与抑郁症有关,肥胖增加患抑郁症的可能且抑郁症状显著升高^[24-25],因此,研究人员测量社会隔离前后小鼠的体质量增长情况,发现社会隔离后,*Padi2*^{-/-}小鼠的体质量显著高于对照组小鼠。以上结果提示,*Padi2* 敲除加剧社会隔离后的抑郁样症状,并且伴随着抑郁样症状的加剧,*Padi2* 敲除小鼠的肥胖表型也加剧。然而,*Padi2* 敲除加剧社会隔离后的抑郁样症状的原因尚不清楚。

Padi2 对于巨噬细胞的细胞因子分泌、凋亡和细胞粘附等功能均具有重要作用^[26-27]。在巨噬细胞中 *Padi2* 过表达,可通过瓜氨酸化 IκB 激酶 (IκB kinase, IKK),抑制核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB) p65 转录因子表达^[28],进而抑制巨噬细胞分泌 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 等细胞因子表达,抑制 *Padi* 活性可阻断活化的巨噬细胞中 IL-1β 释放^[29]。*Padi2* 还可通过 caspase-3、caspase-2 和 caspase-9 激活促进巨噬细胞凋亡,并通过 FAK、桩蛋白和 PAK1 增强细胞粘附^[26]。小胶质细胞作为脑内的巨噬细胞,在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中充当免疫细胞,在监测微环境中可能有有害的刺激或损伤方面发挥主导作用^[30]。抑郁症被认为是一种小胶质细胞相关疾病 (小胶质细胞病)^[31],在抑郁症的早期阶段,促炎细胞因子持续升高,小胶质细胞迅速被激活,随后分泌出多种有害因子,最终导致神经元损伤、海马神经发生减少和抑郁症加剧^[32-34]。自杀抑郁症患者的尸检研究也表明活化的小胶质细胞增加^[35-36],以及抑郁症患者血清和脑脊液中促炎细胞因子也增加^[37]。但目前 *Padi2* 影响小胶质细胞的研究较少^[10,38-39],尚未有研究探索 *Padi2* 是否可以通过调节小胶质细胞功能,影响抑郁症的进程。因此,研究人员进一步探索 *Padi2* 敲除加剧社会隔离后的抑郁样症状是否与小胶质细胞的激活和增殖的加剧有关。

首先,脑切片免疫荧光染色发现,4 周社会隔离的 *Padi2*^{-/-} 小鼠脑内小胶质细胞数量显著增多,其中海马体区域的小胶质细胞数量显著增多。这可能由于抑郁症诱导促炎小胶质细胞表型,分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子,导致小胶质细胞与神经元之间的串扰减少,海马体中的炎症和突触功能障碍,加剧神经元损伤,导致抑郁症样行为^[16,40-42]。抑郁症患者血清中 IL-1 β 以及 TNF- α 浓度显著升高^[36,43-45],抗抑郁治疗降低 IL-1 β 以及 TNF- α 水平^[46-47],且 IL-1 β 受体拮抗剂以及 TNF- α 拮抗剂可显著降低小鼠的抑郁行为^[48-50]。*Padi2* 可调节巨噬细胞中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等炎症因子表达,因此,本文进一步探究 *Padi2* 是否调节小胶质细胞中 IL-1 β 以及 TNF- α 表达。本研究使用 RT-qPCR 检测 4 周社会隔离的 *Padi2*^{-/-} 小鼠脑内 IL-1 β 以及 TNF- α 表达情况,结果显示,4 周社会隔离后 *Padi2*^{-/-} 小鼠脑内 IL-1 β 及 TNF- α 表达增多。

综上所述,本研究表明 *Padi2* 敲除可以促进小胶质细胞激活和增殖加剧,诱导其向促炎表型分化并分泌 IL-1 β 以及 TNF- α 等炎症因子,进而增加神经炎症,加剧社会隔离后小鼠抑郁样症状。但本研究仅探讨 *Padi2* 敲除对 4 周社会隔离状态下,小鼠行为学、脑内小胶质细胞数目以及炎症因子的变化,未利用 *Padi2* 胶质细胞条件性敲除 (*Padi2* CKO) 小鼠深入探究 *Padi2* 影响小胶质细胞增殖和活化的具体机制,也未深入研究其他环境因素或遗传因素与 *Padi2* 的相互作用。未来的研究中,需构建 *Padi2* CKO 小鼠探索 *Padi2* 敲除影响小胶质细胞的功能、导致神经炎症的发生和抑郁症发展的具体机制,并且进一步研究 *Padi2* 敲除是否导致海马新生神经元发生减少以及神经损伤。例如,抑郁症中小胶质细胞 NOD 样受体热蛋白结构域-3 (NOD-like receptor pyrin domain-containing-3, NLRP3) 炎性小体激活,其是调节促炎细胞因子释放的重要分子,可激活刺激趋化因子并促进分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子以及其他炎症介质^[51-52],并且小胶质细胞 NLRP3 炎性小体通过激活神经炎症 caspase-1 通路响应慢性压力诱导神经毒性星形胶质细胞的产生,加剧抑郁症状状态下的神经元功能障碍^[53],其是否参与 *Padi2* 敲除加剧小鼠抑郁样行为为本研

究尚未探讨。因此,后续研究中,研究人员拟结合单细胞测序技术,分析社会隔离后小鼠脑内不同细胞群间的基因组、转录组及表观基因组变化,寻找 *Padi2* 敲除影响抑郁症进展的关键分子,确认其是否通过激活 NLRP3 炎性小体释放 IL-1 β 和 TNF- α 等促炎因子,促进神经毒性星形胶质细胞的产生,加剧抑郁症状状态下的神经元功能障碍。其次,已有广谱的 *Padi* 家族抑制剂以及特异性的 *Padi2* 抑制剂用于 *Padi2* 功能的研究,研究人员将会使用已有的 *Padi2* 抑制剂以及激动剂^[53-56],在体内外正向和反向的探讨 *Padi2* 调节小胶质细胞促炎激活的具体机制和通路,验证 NLRP3 炎性小体是否参与其中。并且,设计相应的过表达载体,在体内外过表达 *Padi2*,探究过表达 *Padi2* 是否会减少神经毒性星形胶质细胞的产生并缓解抑郁症状,以期发现针对 *Padi2* 的抑郁症治疗药物或干预措施,为抑郁症的研究提供新的视角和证据。

参 考 文 献 (References)

- [1] OTTE C, GOLD S M, PENNINX B W, et al. Major depressive disorder [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16065.
- [2] 陈亚婷, 雷梦珠, 张波, 等. 慢性应激诱导动物抑郁样行为机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (6): 811-819.
CHEN Y T, LEI M Z, ZHANG B, et al. Research progress on mechanisms underlying chronic-stress-induced depressive-like behavior in animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31 (6): 811-819.
- [3] BANDOLI G, CAMPBELL-SILLS L, KESSLER R C, et al. Childhood adversity, adult stress, and the risk of major depression or generalized anxiety disorder in US soldiers: a test of the stress sensitization hypothesis [J]. Psychol Med, 2017, 47 (13): 2379-2392.
- [4] FINNEGAN A, FINNEGAN S, MCGEE P, et al. Predisposing factors leading to depression in the British Army [J]. Br J Nurs, 2010, 19 (21): 1355-1362.
- [5] RIAL D, LEMOS C, PINHEIRO H, et al. Depression as a glial-based synaptic dysfunction [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 521.
- [6] 李梦瑶, 高枫, 郑帆帆, 等. 应用基因修饰动物模型研究抑郁症进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (12): 1610-1616.
LI M Y, GAO F, ZHENG F F, et al. Progress in depression research using genetically modified animal models [J]. Acta

- Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1610–1616.
- [7] LESCH K P. Gene-environment interaction and the genetics of depression [J]. J Psychiatry Neurosci, 2004, 29(3): 174–184.
- [8] KEERS R, UHER R. Gene-environment interaction in major depression and antidepressant treatment response [J]. Curr Psychiatry Rep, 2012, 14(2): 129–137.
- [9] 薛涛, 邹丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 321–326.
- XUE T, WU L S, LIU X M, et al. Research progress on animal models of depression and their evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(3): 321–326.
- [10] SHIMADA N, HANDA S, UCHIDA Y, et al. Developmental and age-related changes of peptidylarginine deiminase 2 in the mouse brain [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(4): 798–806.
- [11] 齐天, 胡婷, 王伟. 青春社会隔离致实验动物抑郁行为的脑机制研究进展 [J]. 海军军医大学学报, 2023, 44(10): 1219–1227.
- QI T, HU T, WANG W. Brain mechanism of depressive behavior induced by social isolation in experimental animals during adolescence: research progress [J]. Acad J Nav Med Univ, 2023, 44(10): 1219–1227.
- [12] LANGE S, GALLAGHER M, KHOLIA S, et al. Peptidylarginine deiminases-roles in cancer and neurodegeneration and possible avenues for therapeutic intervention via modulation of exosome and microvesicle (EMV) release? [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6): 1196.
- [13] FALCÃO A M, MEIJER M, SCAGLIONE A, et al. PAD2-mediated citrullination contributes to efficient oligodendrocyte differentiation and myelination [J]. Cell Rep, 2019, 27(4): 1090–1102.
- [14] YUSUF I O, PARSI S, OSTROW L W, et al. PAD2 dysregulation and aberrant protein citrullination feature prominently in reactive astrogliosis and myelin protein aggregation in sporadic ALS [J]. Neurobiol Dis, 2024, 192: 106414.
- [15] WOOD D D, ACKERLEY C A, BRAND B V, et al. Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities [J]. Lab Invest, 2008, 88(4): 354–364.
- [16] WANG H, HE Y, SUN Z, et al. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 132.
- [17] YUSUF I O, QIAO T, PARSI S, et al. Protein citrullination marks myelin protein aggregation and disease progression in mouse ALS models [J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1): 135.
- [18] JANG B, ISHIGAMI A, MARUYAMA N, et al. Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases: strong evidence of neurodegeneration [J]. Prion, 2013, 7(1): 42–46.
- [19] WU A, ZHANG J. Neuroinflammation, memory, and depression: new approaches to hippocampal neurogenesis [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 283.
- [20] TROUBAT R, BARONE P, LEMAN S, et al. Neuroinflammation and depression: a review [J]. Eur J Neurosci, 2021, 53(1): 151–171.
- [21] PREEZ A D, ONORATO D, EIBEN I, et al. Chronic stress followed by social isolation promotes depressive-like behaviour, alters microglial and astrocyte biology and reduces hippocampal neurogenesis in male mice [J]. Brain Behav Immun, 2021, 91: 24–47.
- [22] 李文科, 钟世洪. 艾司西酞普兰治疗伴焦虑症状的抑郁症的研究 [J]. 中国社区医师, 2018, 34(2): 11, 13.
- LI W K, ZHONG S H. Study on escitalopram in the treatment of depression associated with anxiety symptoms [J]. Chin Commun Doct, 2018, 34(2): 11, 13.
- [23] 罗丹妮, 李瑛, 周思远. 高架十字迷宫在焦虑大鼠模型判定中的应用 [J]. 福建医科大学学报, 2019, 53(2): 132–136.
- LUO D N, LI Y, ZHOU S Y. Elevated plus maze is applied to audit rat models of anxiety [J]. J Fujian Med Univ, 2019, 53(2): 132–136.
- [24] PAULITSCH R G, DEMENECH L M, DUMITH S C. Association of depression and obesity is mediated by weight perception [J]. J Health Psychol, 2021, 26(11): 2020–2030.
- [25] VITTENGL J R. Which body shape dimensions and sizes predict depression? [J]. J Affect Disord, 2019, 250: 193–198.
- [26] YU H C, TUNG C H, HUANG K Y, et al. The essential role of peptidylarginine deiminases 2 for cytokines secretion, apoptosis, and cell adhesion in macrophage [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 5720.
- [27] LAI N S, YU H C, TUNG C H, et al. Increased peptidylarginine deiminases expression during the macrophage differentiation and participated inflammatory responses [J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1): 108.
- [28] LEE H J, JOO M, ABDOLRASULNIA R, et al. Peptidylarginine deiminase 2 suppresses inhibitory- κ B kinase activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. J Biol Chem, 2010, 285(51): 39655–39662.
- [29] MISHRA N, SCHWERDTNER L, SAMS K, et al. Cutting edge: protein arginine deiminase 2 and 4 regulate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β maturation and ASC speck

- formation in macrophages [J]. *J Immunol*, 2019, 203(4): 795–800.
- [30] FANG S, WU Z, GUO Y, et al. Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1193053.
- [31] YIRMIYA R, RIMMERMAN N, RESHEF R. Depression as a microglial disease [J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(10): 637–658.
- [32] ZHENG L S, KANEKO N, SAWAMOTO K. Minocycline treatment ameliorates interferon- α -induced neurogenic defects and depression-like behaviors in mice [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 5.
- [33] DANTZER R, O'CONNOR J C, FREUND G G, et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 46–56.
- [34] TONG L, GONG Y, WANG P, et al. Microglia loss contributes to the development of major depression induced by different types of chronic stresses [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(10): 2698–2711.
- [35] BLANK T, PRINZ M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders [J]. *Glia*, 2013, 61(1): 62–70.
- [36] FRICK L R, WILLIAMS K, PITTINGER C. Microglial dysregulation in psychiatric disease [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 608654.
- [37] DOWLATI Y, HERRMANN N, SWARDFAGER W, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(5): 446–457.
- [38] ARIF M, KATO T. Increased expression of PAD2 after repeated intracerebroventricular infusions of soluble A β (25–35) in the Alzheimer's disease model rat brain: effect of memantine [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2009, 14(4): 703–714.
- [39] ASAGA H, ISHIGAMI A. Microglial expression of peptidylarginine deiminase 2 in the prenatal rat brain [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2007, 12(4): 536–544.
- [40] XIAN X, CAI L L, LI Y, et al. Neuron secrete exosomes containing miR-9-5p to promote polarization of M1 microglia in depression [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 122.
- [41] ELLUL P, BOYER L, GROG L, et al. Interleukin-1 β -targeted treatment strategies in inflammatory depression: toward personalized care [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2016, 134(6): 469–484.
- [42] YRONDI A, AOUIZERATE B, EL-HAGE W, et al. Assessment of translocator protein density, as marker of neuroinflammation, in major depressive disorder: a pilot, multicenter, comparative, controlled, brain PET study (INFLADEP study) [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9: 326.
- [43] LIU Y, HO R C M, MAK A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor α (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression [J]. *J Affect Disord*, 2012, 139(3): 230–239.
- [44] FAN N, LUO Y, OU Y, et al. Altered serum levels of TNF- α , IL-6, and IL-18 in depressive disorder patients [J]. *Hum Psychopharmacol*, 2017, 32(4). DOI: 10.1002/hup.2588.
- [45] DAS R, EMON M P Z, SHAHRIAR M, et al. Higher levels of serum IL-1 β and TNF- α are associated with an increased probability of major depressive disorder [J]. *Psychiatry Res*, 2021, 295: 113568.
- [46] MAES M, SONG C, YIRMIYA R. Targeting IL-1 in depression [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(11): 1097–1112.
- [47] EL-HAGGAR S M, EISSA M A, MOSTAFA T M, et al. The phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline as a novel adjunct to antidepressants in major depressive disorder patients: a proof-of-concept, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Psychother Psychosom*, 2018, 87(6): 331–339.
- [48] MAZARATI A M, PINEDA E, SHIN D, et al. Comorbidity between epilepsy and depression: role of hippocampal interleukin-1 β [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(2): 461–467.
- [49] GAO M, SONG Y, LIU Y, et al. TNF- α /TNFR1 activated astrocytes exacerbate depression-like behavior in CUMS mice [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 220.
- [50] MAJIDI J, KOSARI-NASAB M, SALARI A A. Developmental minocycline treatment reverses the effects of neonatal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors, hippocampal inflammation, and HPA axis activity in adult mice [J]. *Brain Res Bull*, 2016, 120: 1–13.
- [51] LI M X, ZHENG H L, LUO Y, et al. Gene deficiency and pharmacological inhibition of caspase-1 confers resilience to chronic social defeat stress via regulating the stability of surface AMPARs [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(3): 556–568.
- [52] LIVELY S, SCHLICHTER L C. Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ + TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10) [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 215.
- [53] LI S, FANG Y, ZHANG Y, et al. Microglial NLRP3 inflammasome activates neurotoxic astrocytes in depression-like mice [J]. *Cell Rep*, 2022, 41(4): 111532.
- [54] LU Y, LI J, CHENG J, et al. Messenger RNA profile analysis deciphers new Esrrb responsive genes in prostate

cancer cells [J]. BMC Mol Biol, 2015, 16: 21.

[55] HUNG S K, YU C C, LIN H Y, et al. Targeting PADI2 as a potential therapeutic strategy against metastasis in oral cancer via suppressing EMT-mediated migration and invasion and CCL3/5-induced angiogenesis [J]. Clin Exp Metastasis, 2024, 41(6) : 925–935.

[56] WANG L, SONG G, ZHANG X, et al. PADI2-mediated citrullination promotes prostate cancer progression [J]. Cancer Res, 2017, 77(21) : 5755–5768.

[收稿日期] 2024-08-23

缺氧条件下,神经干细胞衍生的外泌体通过 miR-9/Hes1 轴调节脑微血管内皮细胞的细胞增殖、迁移和细胞死亡

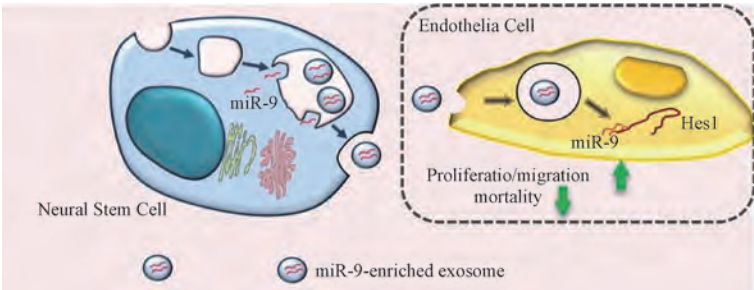
研究背景:先前的研究发现,小鼠胚胎神经干细胞(NSC)衍生的外泌体(EXOs)通过 miR-9/Hes1 轴调控 NSC 分化。然而,EXOs 通过 miR-9/Hes1 轴对脑微血管内皮细胞(BMEC)功能障碍的影响仍然未知。因此,本研究旨在确定 EXOs 通过 miR-9/Hes1 轴对 BMEC 增殖、迁移和死亡的影响。

研究方法:采用免疫荧光、定量实时聚合酶链反应、细胞计数试剂盒检测、伤口愈合检测、钙素-乙酰氧甲基/碘化丙啶染色、苏木精-伊红染色等方法确定 EXOs 对 BMEC 的作用和机制。

研究结果:在缺氧条件下,EXOs 能促进 BMEC 的增殖和迁移,减少细胞死亡。在缺氧条件下,过表达 miR-9 可促进 BMEC 的增殖和迁移,减少细胞死亡。此外,下调 miR-9 可抑制 BMEC 的增殖和迁移,并促进细胞死亡。沉默 Hes1 可改善 amtagomiR-9 对 BMEC 增殖、迁移和细胞死亡的影响。缺氧诱导的小鼠海马和皮层区域观察到亢进结构。同时,EXO 治疗改善了脑血管的改变。

结论:在缺氧条件下,NSC 衍生的 EXO 可通过 miR-9/Hes1 轴促进 BMEC 的增殖和迁移,并减少细胞死亡。因此,EXO 治疗策略可用于缺氧诱导的血管损伤。

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(1) : 24-35. doi: 10. 1002/ame2. 12394)。



阮天音,王四园,李旭涛,等. Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤小鼠模型的转录组学分析 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33 (2): 204-215.

RUAN T Y, WANG S Y, LI X T, et al. Transcriptomics of the Lieber-DeCarli mouse model of alcoholic liver injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 204-215.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.005

Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤小鼠模型 的转录组学分析

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

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

【摘要】 目的 分析 Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤小鼠模型的转录组学特点。方法 雄性 C57BL/6J 小鼠 18 只, 随机分成酒精饲料组 10 只和对照组 8 只。酒精饲料组喂养 Lieber-DeCarli 酒精饲料, 先以 10 ~ 57.3 mL/L 递增量的 95% 酒精饲料适应性喂养 1 周, 再以 57.3 mL/L 95% 酒精饲料喂养 2 周, 共 3 周; 对照组同时喂养对照饲料。处死小鼠留取血清和肝组织, 试剂盒检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 与肝组织总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、丙二醛 (MDA) 含量; ELISA 法测定小鼠肝组织炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 水平, 并用 qRT-PCR 验证 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1 基因表达。苏木素-伊红 (HE)、油红 O 染色观察肝组织病理变化; 通过免疫组织化学染色法, 使用 F4/80 抗体检测巨噬细胞的表达变化。RNA-seq 分析两组肝组织差异基因并进行 GO 和 KEGG 分析, 再以 qRT-PCR 验证差异基因表达。结果 与对照组比较, 酒精饲料组小鼠体重显著下降 ($P < 0.01$); 血清 ALT、AST 水平显著升高 ($P < 0.01$), 肝组织 TC、TG、MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$), GSH、T-SOD 含量显著下降 ($P < 0.05$); 组织中炎症因子 IL-6、TNF- α 与 TGF- β 1 水平上升, 以 qRT-PCR 验证结果相一致 ($P < 0.05$)。肝小叶结构破坏, 呈现大泡脂肪变性、微泡性脂肪变性及气球样变性; 肝组织中脂滴显著增多, 巨噬细胞表达增加。以 $|\log_2 FC| > 1$ 且 $q < 0.05$ 为筛选条件, 获得 2063 个差异基因, 其中 1236 个基因上调, 827 个基因下调。主要在细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、趋化因子信号通路、类固醇激素生物合成、谷胱甘肽代谢、视黄醇代谢等通路富集 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 验证其中显著上调 (*Mmp12*、*Gstm3*、*Cyp2a22* 等) 与下调 (*Serpina1e*、*Acmsd*、*Mup3d* 等) 的差异基因各 10 个, 与转录组测序结果一致。结论 酒精性肝损伤主要病理机制涉及细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、趋化因子信号通路、谷胱甘肽代谢、视黄醇代谢等通路。

【关键词】 酒精性肝损伤; Lieber-DeCarli 模型; 基因表达; 转录组学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0204-12

Transcriptomics of the Lieber-DeCarli mouse model of alcoholic liver injury

RUAN Tianyin¹, WANG Siyuan¹, LI Xutao¹, ZHANG Hao^{2,3}, PENG Yuan¹,
LIU Chenghai^{1,4}, TAO Yanyan^{1*}

【基金项目】 上海市科委创新项目 (19401901500)。

Funded by Shanghai Science and Technology Commission Innovation Project (19401901500)。

【作者简介】 阮天音, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治急性慢性肝病。Email: rty1216@126.com

【通信作者】 陶艳艳, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 中西医结合防治急性慢性肝病。Email: taoyanyan@shutcm.edu.cn

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

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

[Abstract] Objective To investigate the characteristics of liver injury in the Lieber-DeCarli alcoholic liver disease (ALD) mouse model and to analyze its transcriptomic profile. **Methods** Eighteen male C57BL/6J mice were randomly divided into an alcohol-fed group ($n = 10$) and a control group ($n = 8$). The alcohol-fed group received a Lieber-DeCarli ethanol diet, starting with an adaptive one-week phase using incremental concentrations of ethanol (10 ~ 57.3 mL/L), followed by 2 weeks of a 57.3 mL/L concentration of 95% ethanol, for a total of 3 weeks. The control group was provided with an isocaloric control diet for 3 weeks. At the end of the study, mice were sacrificed, and serum and liver tissue samples were collected. Serum liver function markers (ALT, AST), hepatic lipids (TC, TG), reduced glutathione (GSH), total superoxide dismutase (T-SOD), and malondialdehyde (MDA) were measured using biochemical assays. The levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β 1) in liver tissue were assessed by ELISA. Histopathological changes in liver tissue were examined using hematoxylin-eosin (HE) and Oil Red O staining. Immunohistochemical staining using the F4/80 antibody was employed to assess changes in macrophage expression. RNA-seq analysis was conducted to identify differentially expressed genes between the two groups of liver tissues, followed by GO and KEGG pathway enrichment analysis. qRT-PCR was used to validate the expression of these differentially expressed genes. **Results** Compared with the control group, the alcohol-fed mice exhibited a significant decrease in body weight ($P < 0.01$). Serum ALT and AST levels were significantly elevated ($P < 0.01$), while liver tissue levels of TC, TG, and MDA were significantly increased ($P < 0.05$). Conversely, GSH and T-SOD levels were significantly reduced ($P < 0.05$). The levels of inflammatory factors IL-6, TNF- α , and TGF- β 1 were increased, which was consistent with the qRT-PCR validation results ($P < 0.05$). Histological examination revealed disrupted hepatic lobular structure, with macrovesicular steatosis, microvesicular steatosis, and ballooning degeneration. Additionally, fat droplets in liver tissue were significantly increased, and macrophage expression was upregulated. Differential gene expression analysis, using a threshold of $|\log_2 FC| > 1$ and $q < 0.05$, identified 2063 differentially expressed genes, of which 1236 were upregulated and 827 downregulated. Enriched pathways included xenobiotic metabolism via cytochrome P450, cytokine-cytokine receptor interaction, chemokine signaling, steroid hormone biosynthesis, glutathione metabolism, and retinol metabolism. ($P < 0.05$). qRT-PCR validation confirmed the significant upregulation (e.g., *Mmp12*, *Gstm3*, *Cyp2a22*) and downregulation (e.g., *Serpina1e*, *Acmsd*, *Mup3d*) of 10 genes from each category, consistent with the transcriptome sequencing results. **Conclusions** The primary pathological mechanisms underlying alcoholic liver injury involve pathways related to xenobiotic metabolism and act via cytochrome P450, cytokine-cytokine receptor interaction, chemokine signaling, glutathione metabolism, and retinol metabolism.

[Keywords] alcoholic liver injury; Lieber-DeCarli model; gene expression; transcriptomics
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

酒精性肝损伤是由长期大量饮酒引起的一系列肝疾病,高达 90% 的患者肝组织发生脂肪变性,若伴随气球样病变、肝细胞坏死和中性粒细胞浸润病变,则进一步发展为酒精性肝炎、肝纤维化、甚至是肝硬化和/或肝癌。酒精相关肝硬化的年龄标准化患病率和年龄标准化死亡率分别为 122.71/10 万和 1.98/10 万,酒精导致的原

发性肝癌年龄标准化患病率较 2018 年增长 0.53%^[1-3]。目前每年约有 300 万人死于饮酒引发的肝病及其并发症,《2023 年世界卫生统计》将其列入导致非传染性疾病高发的四大主要因素之一^[4]。

Lieber-DeCarli 酒精液体饲料造模法是目前广泛应用于研究酒精性肝损伤的经典模型^[5],小

鼠和人类基因组具有高度相似性,采用转录组分析其差异基因表达,有助于明确酒精性肝损伤的病理机制或发现新的治疗靶点^[6]。本研究构建 Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤小鼠模型,分析其转录组学特点,以期为临床药物研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 7 周龄、SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,质量为 (20 ± 1) g,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司【SCXK(沪)2022-0009】。环境温度 22 ~ 23 °C、相对湿度 50% ~ 60%,12 h 昼夜循环交替,饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】。本实验已通过上海中医药大学实验动物伦理委员会的审批(PZSHUTCM2311100003)。

1.1.2 主要试剂与仪器

Lieber-DeCarli 酒精饲料、对照饲料购自小泰有泰(北京)生物科技有限公司(酒精饲料主要由糊精和麦芽糖混合物、酪蛋白、橄榄油、玉米油、脂溶性维生素(A、D、E、K)和水溶性维生素B₁₂、矿物质和纤维、乙醇组成;对照饲料中无乙醇,其余配方相同);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT), (No. C009-1)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST), (No. C010-1)、甘油三酯(triglyceride, TG), (No. F001-1)、总胆固醇(total cholesterol, TC), (No. F002-1-1)、Bradford (No. W042-1-1)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH), (No. A006-2)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD), (No. A001-3)、油红 O 染液(No. D027-1-2)均购自南京建成生物工程研究所;脂质氧化(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(No. S0131S)购自碧云天生物技术;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和转化生长因子- β 1(transforming growth factor beta 1, TGF- β 1) ELISA 试剂盒(No. 88706488、88732488、88835088)均购于赛默飞世尔科技有限公司;F4/80 抗体(Cat# 70076T)购自 Cell Signaling Technology;即用型 SABC-POD(兔 IgG)试剂盒(NO. 19D11B29)购自

博士德生物;TRIzol Reagent (No. F919KB3054)、总 RNA 提取试剂盒(No. B518811)购自上海生工生物工程股份有限公司;反转录试剂盒(No. AJ92014A)、扩增试剂盒(No. AJF0343A),均购自日本 TaKaRa 公司。石蜡包埋机(LEICAEG1160)、自动脱水机(LEICA ASP300)、转轮切片机(RM2035)、数字扫描系统(SCN400)及烤片机(HI1220)均购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 酒精性肝损伤模型建立及分组

18 只小鼠按随机数字法分为酒精饲料组(10 只)和对照组(8 只)。酒精饲料配制:第 1 ~ 3 天按照 132.18 g 酒精饲料加入 10 mL 95%乙醇,以双蒸水定容到 1 L,30 s 内充分混匀,分装至饲养瓶;第 4 ~ 6 天增加至 30 mL/L,第 7 天开始添加至 57.3 mL/L,小鼠适应性喂养 1 周;随后 2 周以 57.3 mL/L 95%乙醇配制酒精饲料喂养。对照饲料配制:称量 221.78 g 对照组饲料,以常温双蒸水定容到 1 L,30 s 内充分混合后分装至饲养瓶,小鼠喂养 3 周^[7]。

1.2.2 取材

小鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠(2 mL/kg)进行麻醉后,通过下腔静脉采血。血液静置于室温 2 h,随后在 4 °C,3000 r/min 离心 15 min,收集血清并储存于-80 °C 冰箱中。接着迅速剪断下腔静脉,摘取肝、脾并称重记录。两份约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 的肝右叶组织分别用于 10%甲醛溶液固定和光学切片冷冻介质包埋,剩余部分保存于-80 °C 冰箱。

1.2.3 血清及肝组织生化指标检测

根据试剂盒说明书操作:分别取血清 10 μ L,微板法检测 ALT 和 AST 活性;肝组织 20 mg 按照重量(mg):体积(mL) = 1:9 的比例加入 9 倍体积无水乙醇,匀浆,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清测定 TG 和 TC 水平;肝组织 100 mg,以生理盐水为介质按相同方法匀浆,取上清测定 GSH、T-SOD 和 MDA 水平。

1.2.4 ELISA 检测炎症因子水平

取 40 μ L 上述生理盐水为介质的肝组织匀浆,加入 19 倍体积生理盐水 760 μ L 稀释,分别取 100 μ L 用于 ELISA 检测 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 含量。

1.2.5 肝组织苏木素-伊红 (HE) 染色与油红 O 染色

HE 和油红 O 染色参照试剂盒说明书操作。HE 染色后观察肝组织病理变化,由两位病理专家按照酒精性肝病的 SALVE 分级分期系统^[8]盲法阅片并计算评分。油红 O 染色后运用 Image J 1.8.0 软件处理图像,分析脂滴面积占比。

1.2.6 免疫组织化学染色

组织切片脱蜡水化,抗原修复先用高火煮沸 (7 ~ 8 min),再低火维持 15 min,自然冷却至室温,1 × TBST 洗 3 次每次 5 min,3%过氧化氢-甲醇孵育 10 min,TBST 洗 3 次,每次 5 min,滴加 5% BSA 封闭液,室温下孵育 30 min,滴加 30 μL 一抗,4 ℃ 过夜;TBST 洗 3 次,每次 5 min,滴加二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗 3 次,每次 5 min,滴加试剂 SABC,室温孵育 20 min,TBST 洗 3 次,每次 5 min,DAB 显色,苏木素染核,完成后,依次进行脱水、透明化处理,并封片固定。用 Image J 1.8.0 软件进行肝组织免疫组化阳性表达面积半定量分析。

1.2.7 提取 RNA、构建文库及测序

TRIzol 试剂提取两组小鼠总 RNA,评估纯度、定量和完整性后,进行转录组文库构建并使

用 Illumina Novaseq 6000 平台进行高通量测序,产生 150 bp 双末端读数。原始数据经 Fastp^[9] 处理,清理低质量序列以供进一步分析。

1.2.8 差异基因筛选

通过 R4.3.2 软件的“DESeq2 包”分析差异基因表达,筛选出 $|\log_2 FC| > 1$ 且 $q < 0.05$ 的上调和下调基因;使用“微生信平台”可视化差异分析结果,包括热图和火山图等^[10]。

1.2.9 蛋白质-蛋白质互作 (protein-protein interaction networks, PPI) 分析

使用 STRING 12.0 数据库进行分析,通过名称/标识符检索小鼠蛋白,设置交互分数阈值为 0.9,获取并展示 PPI 网络图,排除孤立蛋白^[11]。

1.2.10 GO 和 KEGG 富集分析

通过超几何分析算法对差异基因表达进行 GO 和 KEGG 的富集分析,获得显著性富集基因条目,并绘制 GO 和 KEGG 通路气泡图^[12]。

1.2.11 RT-qPCR 验证关键基因

总 RNA 提取后,mRNA 逆转录为 cDNA 并进行 PCR 扩增。采用 2^{-ΔΔCt} 法,以 GAPDH 为内参计算 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司与上海冠泰生物科技有限公司提供,序列见表 1。

表 1 引物 qRT-PCR 序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	上游(5'→3') Forward(5'→3')	下游(5'→3') Reverse(5'→3')
<i>Mmp12</i>	GGCAACTGGACAACTCAACTCTG	CGCTTCATCCATCTTGACCTCTG
<i>Gstm3</i>	ACTCCATCCGCTTGCTCCTG	CTGGCTTCGGTCAAAGTTGGG
<i>Cyp2a22</i>	GGATGACAAGGACAGTTGAAGAAG	GATGCTGCTGAAGAACAGGAACAG
<i>Lcn2</i>	GCTACAATGTCACCTCCATCCTG	ATACCTGTGCATATTTCCACAGATG
<i>Plin4</i>	AGGCAGTATCTGGAGGTGTGATG	TGTGCTAACTGTGCTCTTCGTATTG
<i>Cyp2a4</i>	CGAATGCTGGAGGAGAAGAAGAAC	TGCTGCTGACGGTCTCTGTG
<i>Acof2</i>	TGCTCTCTTGGATGTCGTGGAAG	AGGAACAGGAAGGTCGTCTCAG
<i>Tubb2a</i>	CAAGATCAGAGAGGAGTACCCAGAC	TCCACCACAGTATCAGAGACCTTG
<i>Mgst3</i>	TGCCCTCTTTGCCCTGATGG	CCGTAGCCTAAGCCTGGTCTG
<i>CCL6</i>	CTGCTGCTTCTCTTATGCCACAC	CCCTCCTGCTGATAAAGATGATGC
<i>Serpina1e</i>	GAGATTGCTACAAACCTGGGAGAC	AGAAGATGTTGGAAGTGTGGACTG
<i>Acmsd</i>	GGAGATGGAGCGTTGTGTTAAGG	GCCGCAGCATAGATTGGGAAG
<i>Mup3</i>	CGAGAACCAGATTGTAGTTTAGACATC	CGAGGCAGCGATTGACATTGG
<i>Cyp7a1</i>	AGGTCTCTGAAGTATCCGTCTAC	CGTCTTAGCCTTCTCCATGTCATC
<i>Ces3b</i>	CTGTGTCACTATCTTCGGTAACTCTG	TCTGGGATATGGCTCTGTGGAAG
<i>Serpina3k</i>	TGTCCTGCTGTCTATGCTTCC	TGTCATCTTGTGTCCCATTTGTCTTG
<i>C8b</i>	ACGGAGTGTGGCGGAAGC	CGGAGCAAGTAAGTATGTCTGTACC
<i>Mup8</i>	GAGTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTG	GAGGCAGCGATTGGCATTGG
<i>Mup2</i>	GAGTTCAGACATCAAGGAAAGGTTTG	GGAGGCAGCGATTGGCATTG
<i>C8a</i>	TGGCATTGGCATAGGAATTAAGGATAG	TATGTCACCGTCACCATTCCAG
<i>IL-6</i>	GCTACCAAACTGGATATAATCAGG	GGACTGTGGCTTTGTCTTTCTT
<i>TNF-α</i>	TGCTCCTCTTTTGTCTTATGTT	AGGTTCACTGATGTAGCCACAG
<i>TGF-β1</i>	AACCAAGGAGACGGAATACA	CGTGGAGTTTGTATCTTTTGC
<i>GAPDH</i>	TCACCATCTTCCAGGAGCGAGAC	TGAGCCCTTCCACAATGCCAAAG

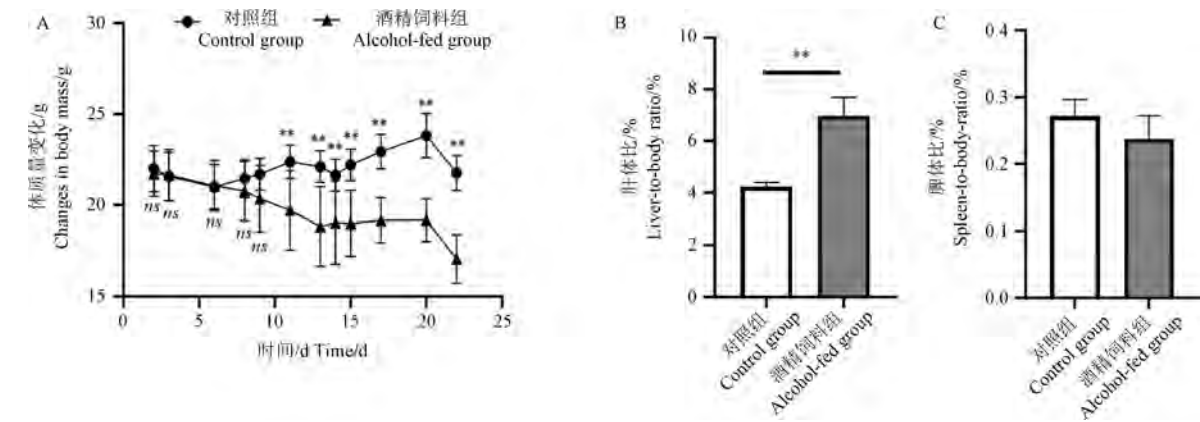
1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 10.0.2 和 SPSS 27.0 软件进行数据分析与作图。计量数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,经条件检验后,使用 *T* 检验或 Wilcoxon 秩和检验比较两独立样本组。有序分类数据进行 Ridit 分析。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠一般情况变化

两组小鼠均活动良好、毛色光泽;与对照组相比,酒精饲料组摄食量逐渐增加、酒精饲料组小鼠体质量明显下降($P < 0.01$)、肝体比升高($P < 0.01$);脾体比两组间无统计学意义(图 1)。



注:A:两组小鼠体质量变化;B:两组小鼠肝体比;C:两组小鼠脾体比;与对照组相比,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 两组小鼠体质量与肝体比和脾体比变化

Note. A. Changes in body mass of the two mice groups. B. Liver-to-body ratio of the two mice groups. C. Spleen-to-body ratio of the two mice groups. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Changes in body mass, liver-to-body ratio, and spleen-to-body ratio in two mice groups

2.2 两组小鼠肝功能、脂质代谢及氧化应激指标变化

酒精饲料组小鼠血清肝功能指标 ALT、AST 水平较对照组显著上升($P < 0.01$),组织上清中脂质代谢相关指标 TC($P < 0.01$)、TG($P < 0.05$)水平显著上升,MDA 水平显著升高($P < 0.01$);GSH、T-SOD 水平显著下降($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 两组小鼠肝组织炎症因子水平

与对照组小鼠相比,酒精饲料组小鼠组织上清中 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 水平显著升高($P < 0.05$)。通过 qRT-PCR 验证发现 IL-6、TNF- α 和 TGF- β 1 基因上调($P < 0.05$)。IL-6 和 TNF- α 作为典型的促炎因子,其表达上调表明酒精对肝组织的促炎性作用;TGF- β 1 是一种双重功能的因子,与肝纤维化密切相关,其上调预示着组织修复和纤维化的可能性(图 3)。

2.4 两组小鼠肝组织病理变化

肝组织 HE 染色,以酒精性肝病的 SALVE 分级分期系统对脂肪变性、小叶中性粒细胞浸润和

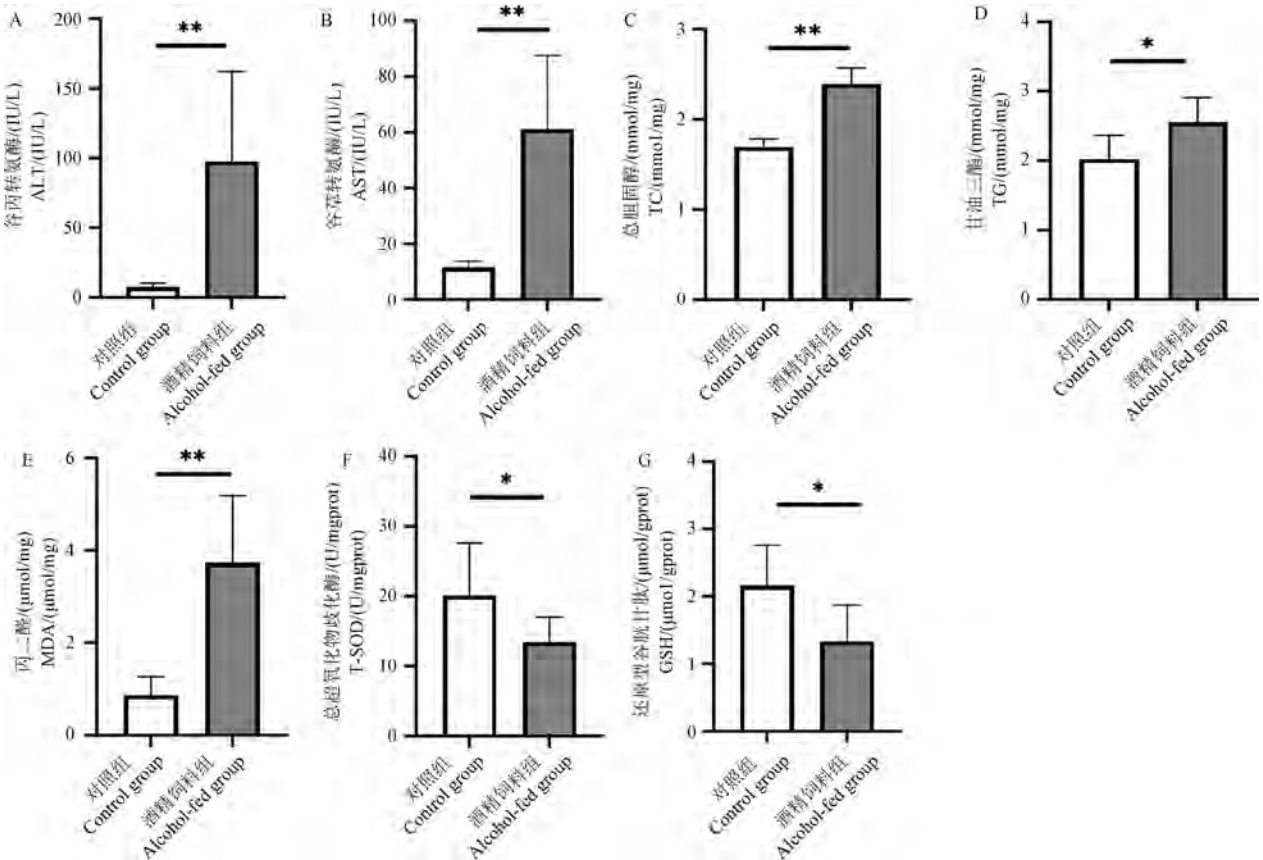
气球样变进行评分(见表 2 ~ 4)提示:酒精饲料组小鼠肝细胞出现大泡性脂肪变性、微泡性脂肪变性、气球样变性、中性粒细胞浸润;油红 O 染色显示酒精饲料组小鼠肝组织脂滴着色明显($P < 0.01$);F4/80 免疫组化结果显示酒精饲料组巨噬细胞阳染明显增加($P < 0.01$)(图 4)。

2.5 两组小鼠差异基因表达分析

通过热图和火山图分析,揭示了对照组与酒精饲料组小鼠肝组织中差异表达基因的分布情况。总共检测到 2063 个差异基因($|\log_2 FC| > 1, q < 0.05$),其中 1236 个基因表达上调,827

表 2 肝细胞脂肪变性分级

Table 2 Grading of hepatocellular steatosis					
组别 Groups	脂肪变性分级 Grading of fat degeneration				Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级 G0	1 级 G1	2 级 G2	3 级 G3	<i>R</i> 值 <i>R</i> value
对照组 Control group	8	0	0	0	0.22
酒精饲料组 Alcohol-fed group	0	1	3	6	0.72**



注:A:小鼠血清 ALT 含量;B:小鼠血清 AST 含量;C:小鼠组织 TC 含量;D:小鼠组织 TG 含量;E:小鼠组织 MDA 含量;F:小鼠组织 T-SOD 含量;G:小鼠组织 GSH 含量;与对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 2 两组小鼠 ALT、AST、TC、TG、MDA、T-SOD 和 GSH 变化

Note. A. Serum ALT concentration in mice. B. Serum AST concentration in mice. C. TC content in mice tissues. D. TG content in mice tissues. E. MDA content mice in tissues. F. T-SOD content mice in tissues. G. GSH content in mice tissues. Compared with the control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Changes in ALT, AST, TC, TG, MDA, T-SOD and GSH indicators in two mice groups

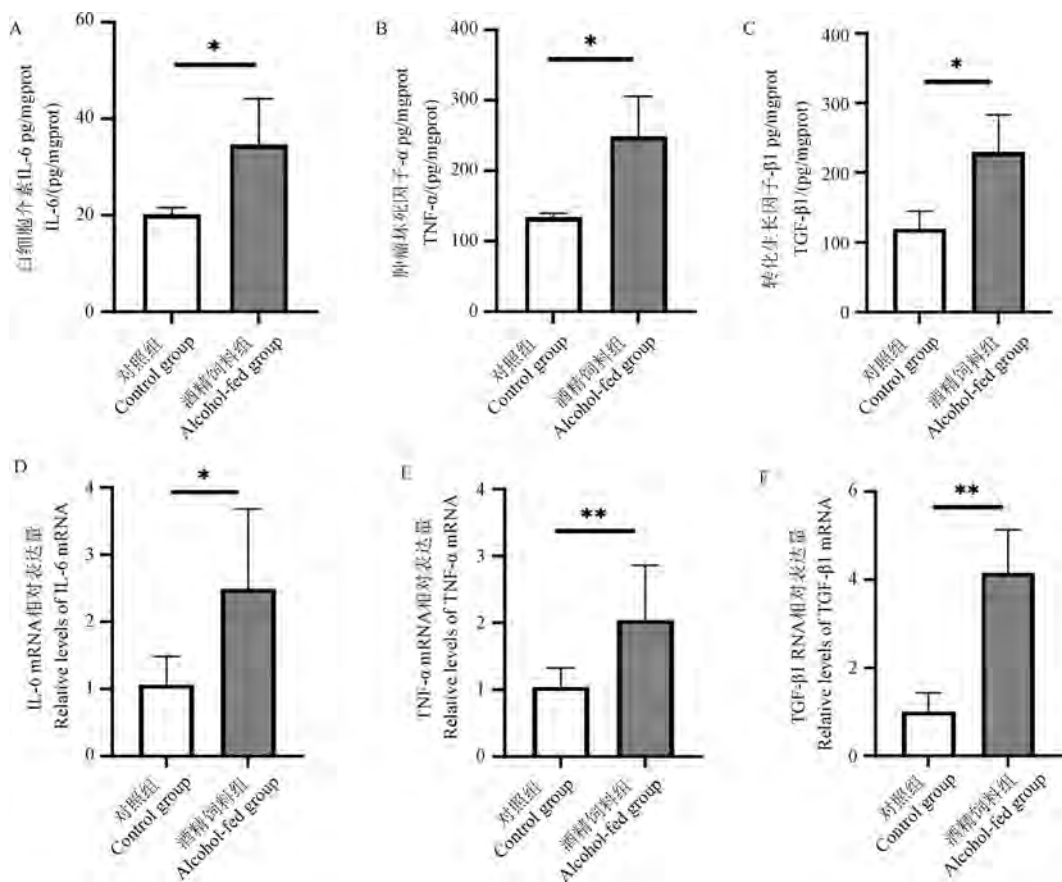
Table 3 Grading of neutrophil infiltration severity in liver lobules				
组别 Groups	小叶中性粒细胞分级 Lobular neutrophil grading			Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级 G0	1 级 G1	2 级 G2	R 值 R value
对照组 Control group	8	0	0	0.22
酒精饲料组 Alcohol-fed group	0	4	6	0.72**

个基因表达下调。相比对照组小鼠,酒精饲料组小鼠肝中 *Mmp12*、*Gstm3*、*Cyp2a22* 等基因的表达显著上调,而 *Serpina1e*、*Acmsd*、*Mup3* 等基因的表达则显著下调(图 5)。

Table 4 Grading of hepatocellular ballooning				
组别 Groups	气球样变分级 Balloon-like change grading			Ridit 分析 Ridit analysis
	0 级 G0	1 级 G1	2 级 G2	R 值 R value
对照组 Control group	8	0	0	0.22
酒精饲料组 Alcohol-fed group	0	2	8	0.72**

2.6 两组小鼠肝组织差异表达基因的 PPI 分析

通过 String 数据库构建 PPI 图,组成互作网络的基因主要与 CD44、CYP2E1、SYK、PIK3CD、CD4、CDK1、CXCL10、RAC2、CCNA2、ICAM1 等蛋白相关(图 6)。



注:A:小鼠肝组织 IL-6 蛋白水平;B:小鼠肝组织 TNF-α 蛋白水平;C:小鼠肝组织 TGF-β1 蛋白水平;D:小鼠肝组织 IL-6 mRNA 水平;E:小鼠肝组织 TNF-α mRNA 水平;F:小鼠肝组织 TGF-β1 mRNA 水平。

图3 两组小鼠组织 IL-6、TNF-α 和 TGF-β1 水平

Note. A. IL-6 protein level in mouse liver tissue. B. TNF-α protein level in mouse liver tissue. C. TGF-β1 protein level in mouse liver tissue. D. IL-6 mRNA level in mouse liver tissue. E. TNF-α mRNA level in mouse liver tissue. F. TGF-β1 mRNA level in mouse liver tissue.

Figure 3 Levels of IL-6, TNF-α and TGF-β1 in tissues of two mice groups

2.7 两组小鼠肝组织差异表达基因的 GO 分析

两组小鼠肝组织差异表达基因涉及 3870 个生物过程 (biological process, BP)、578 个细胞组分 (cell component, CC) 和 1103 个分子功能 (molecular function, MF)。BP 包括炎症反应、脂质代谢过程、中性粒细胞趋化性、IL-6 产生的正向调节、超氧阴离子生成的正向调控、类固醇代谢过程、IL-1β 生成的正向调节;CC 包括 NADPH 氧化酶复合物、过氧化物酶体、肥大细胞颗粒等组分;MF 包括氧化还原酶活性、花生四烯酸环氧化酶活性、细胞因子受体活性、趋化因子活性、转氨酶活性、CXCR 趋化因子受体结合、谷胱甘肽转移酶活性等功能(图 7)。

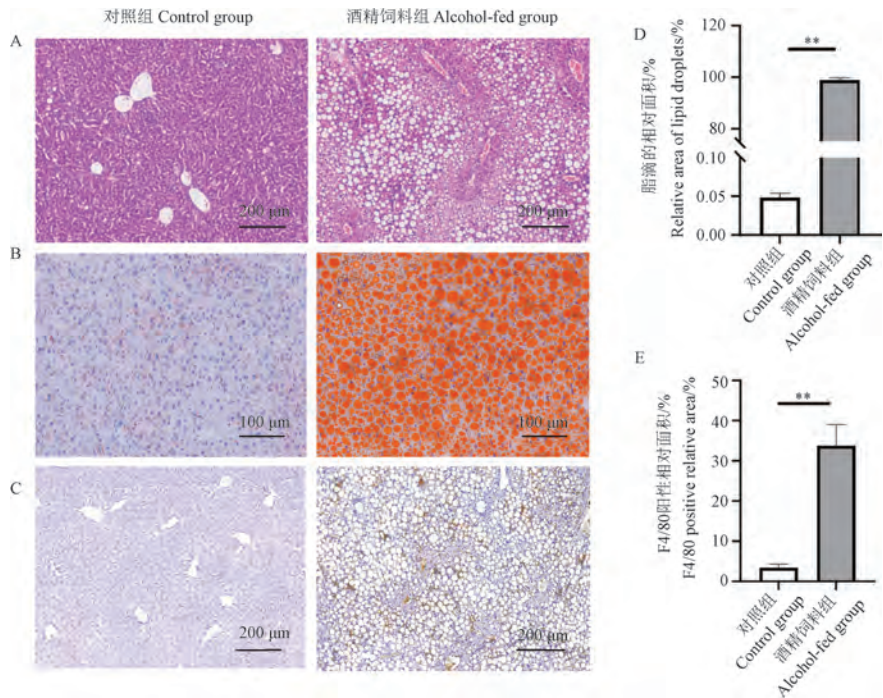
2.8 两组小鼠差异表达基因的 KEGG 分析

KEGG 分析显示,与对照组小鼠比较,酒精液

体饲料喂养组小鼠的差异表达基因共有 66 条信号通路被激活。与酒精性肝损伤紧密相关的前 20 条通路包括:细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、趋化因子信号通路、类固醇激素生物合成、谷胱甘肽代谢、视黄醇代谢、药物代谢-细胞色素 P450、胆汁分泌、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、半乳糖代谢、花生四烯酸代谢、NF-κB 信号通路、氨基酸糖和核苷酸糖代谢、细胞周期、果糖和甘露糖代谢、蛋白质的消化和吸收、p53 信号通路、PPAR 信号通路、NOD 样受体信号通路、炎症介质对 TRP 通道的调控等通路(图 8)。

2.9 两组小鼠肝组织差异表达基因的 qRT-PCR 验证

采用 qRT-PCR 对两组小鼠肝差异基因进行

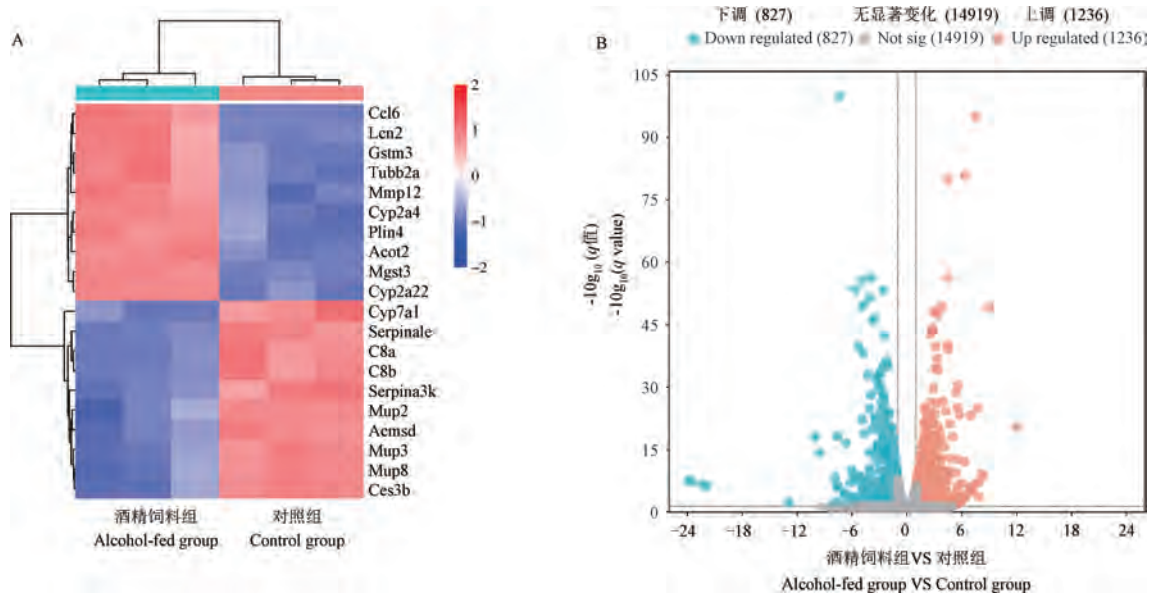


注:A:肝组织 HE 染色;B:肝组织油红 O 染色;C:肝组织 F4/80 免疫组化;D:肝组织油红半定量脂滴的相对面积;E:肝组织 F4/80 阳性相对面积。

图 4 两组小鼠肝组织 HE、油红 O 及 F4/80 免疫组化染色

Note. A. HE staining of liver tissues. B. Oil Red O staining of liver tissue. C. F4/80 immunohistochemistry of liver tissues. D. Relative area of oil red semi quantitative lipid droplets in liver tissues. E. Relative area of F4/80 positivity in liver tissues.

Figure 4 HE, Oil Red O staining and F4/80 immunohistochemistry of liver tissues in two mice groups

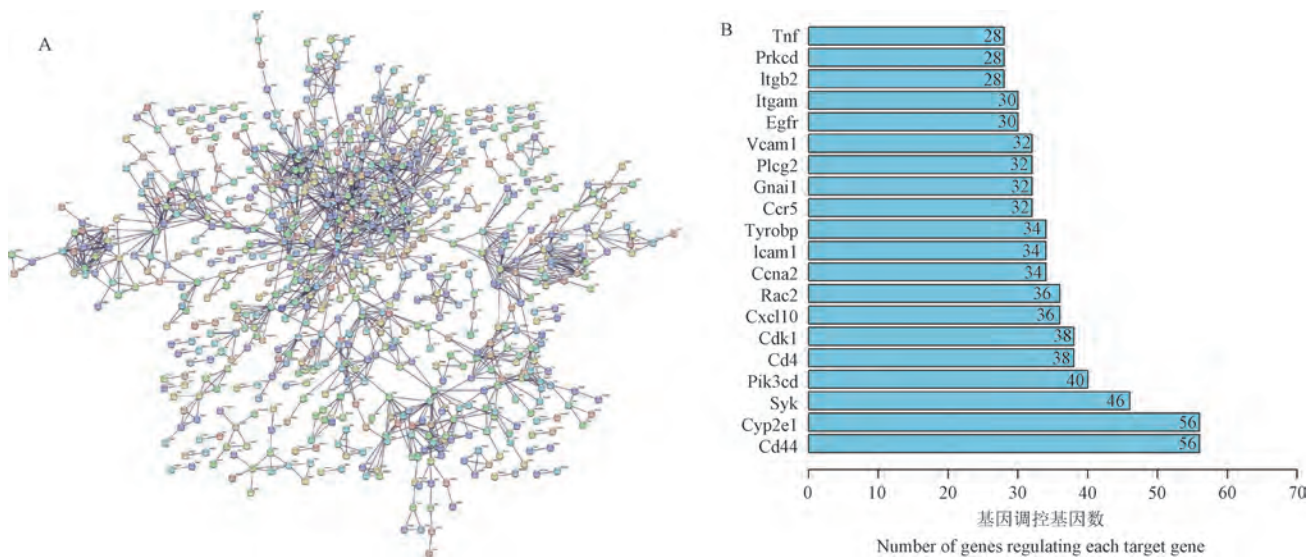


注:A:酒精饲料组和对照组肝组织差异基因热图;B:酒精饲料组和对照组肝组织差异基因火山图;红色:上调基因;蓝色:下调基因;灰色:无显著差异基因。

图 5 肝组织的差异表达基因

Note. A. Heat map of differential genes in alcohol-fed group and control group. B. Volcano map of differential genes in alcohol-fed group and control group. Red. Up-regulated genes. Blue. Down-regulated genes. Grey. Non-significantly different genes.

Figure 5 Differentially expressed genes in liver tissue



注:A:蛋白与蛋白相互作用图;B:基因调控基因数图。

图 6 肝组织差异基因的 PPI 网络图

Note. A. Protein-protein interaction diagram. B. Number of genes regulating each target gene.

Figure 6 PPI network diagram of differentially expressed genes in liver tissue

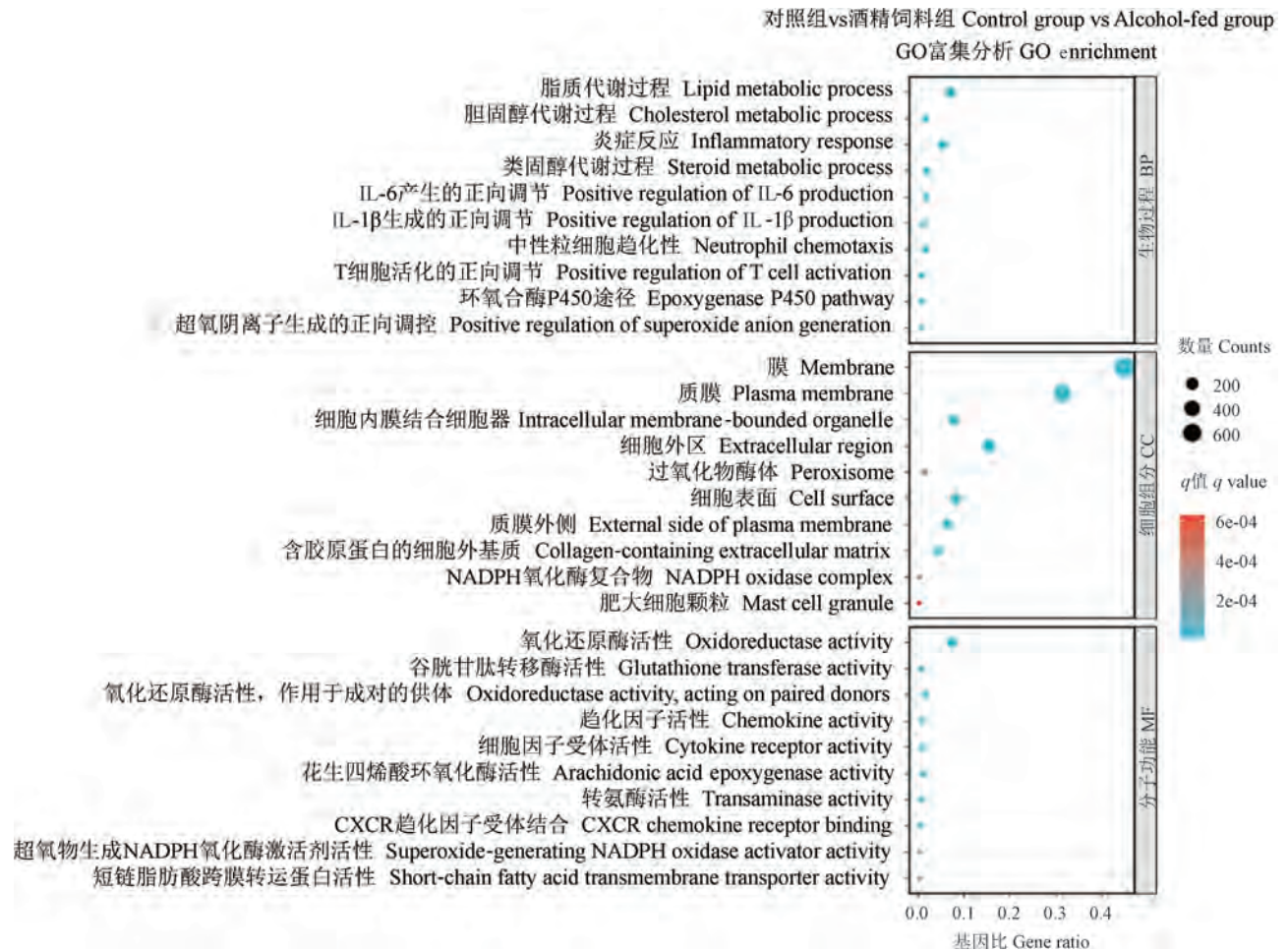


图 7 差异表达基因 GO 富集分析

Figure 7 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

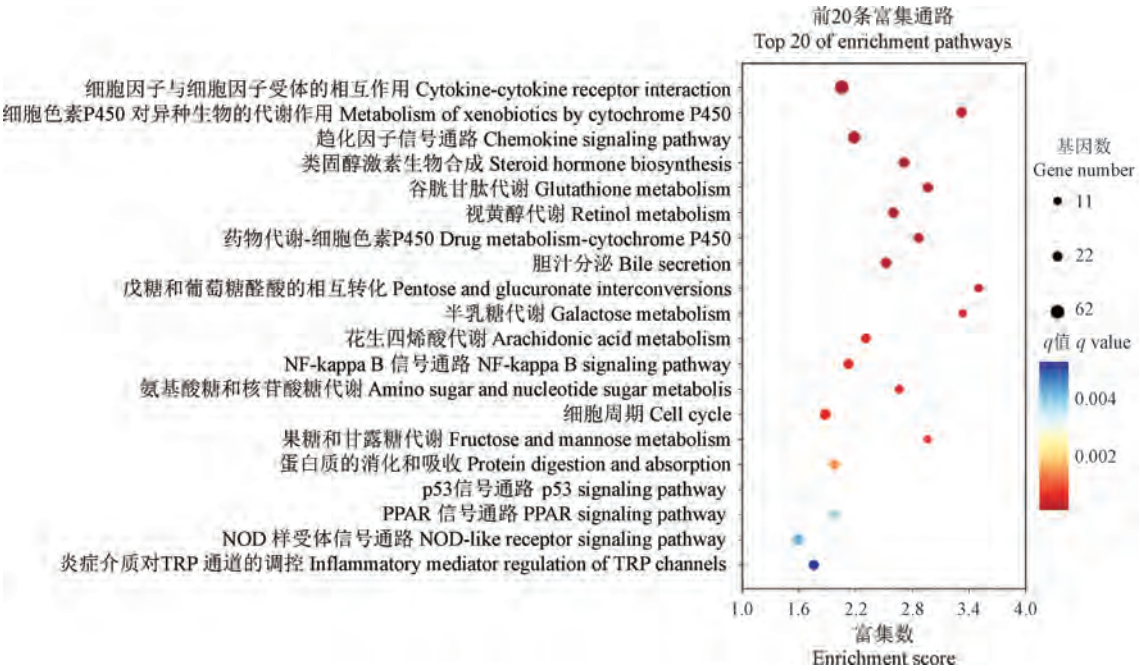


图 8 差异表达基因的 KEGG 分析

Figure 8 KEGG enrichment bubble map of differentially expressed genes

了验证,结果提示:表达上调最显著的 10 个基因包括: *Mmp12*、*Gstm3*、*Cyp2a22*、*Lcn2*、*Plin4*、*Cyp2a4*、*Acot2*、*Tubb2a*、*Mgst3*、*Ccl6*; 表达下调最显著的 10 个基因分别是 *Serpina1e*、*Acmsd*、*Mup3*、*Cyp7a1*、*Ces3b*、*Serpina3k*、*C8b*、*Mup8*、*Mup2*、*C8a*。经验证以上基因的 mRNA 表达变化均与转录组测序结果一致(图 9)。

3 讨论

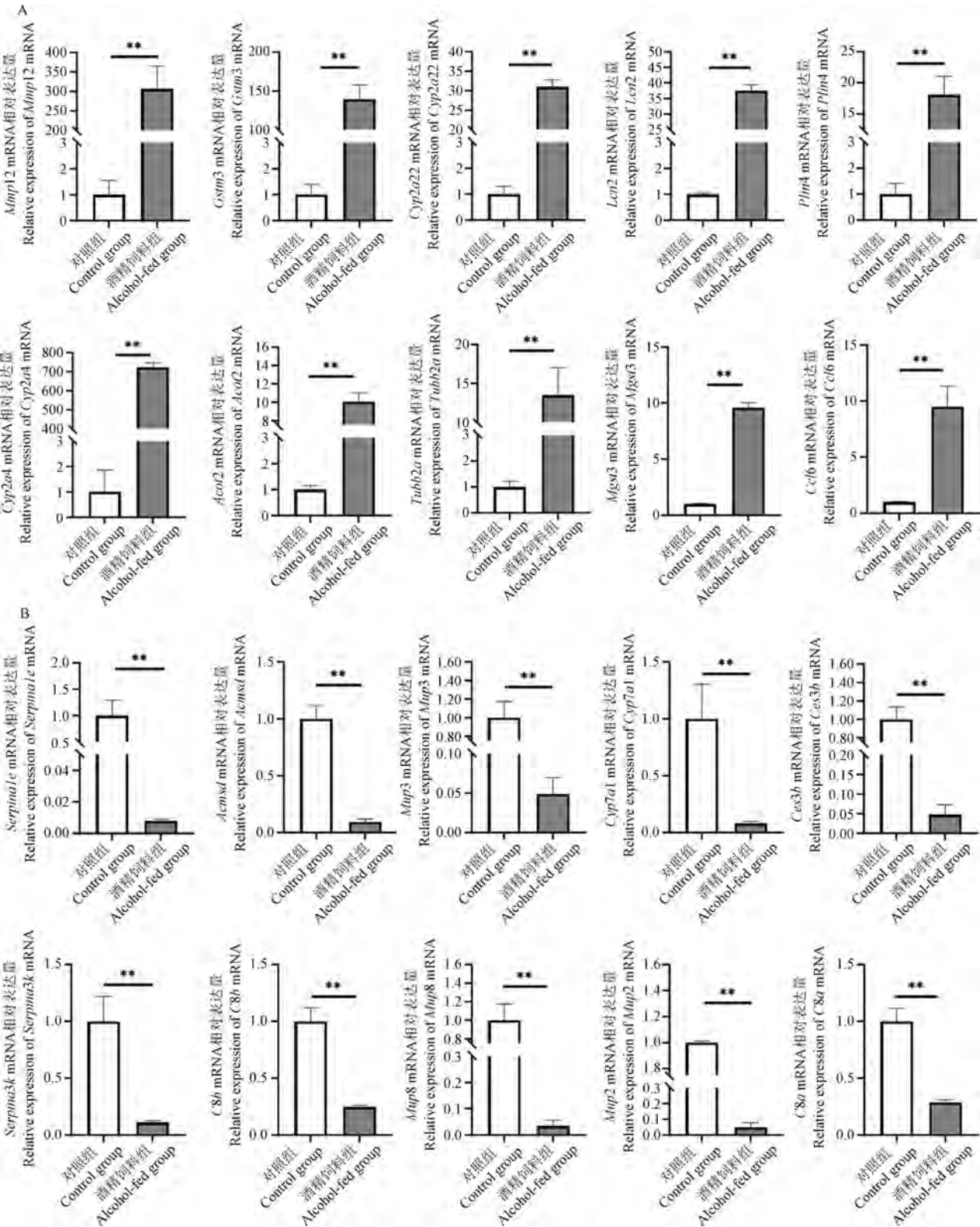
目前常用酒精性肝损伤模型有酒精灌胃、单瓶强制饮酒和双瓶自由选择等。C57BL/6J 小鼠有酒精偏嗜性,是首选的酒精性肝损伤模型小鼠^[13];本研究选择 C57BL/6J 小鼠,以酒精液体饲料自由采食,模型小鼠 ALT、AST、TC、TG、MDA 及炎症相关细胞因子均显著升高,GSH、SOD 均显著下降,病理上表现为大泡性脂肪变性、微泡性脂肪变性、气球样变性和中性粒细胞的浸润,其生化、病理等符合酒精性肝损伤特点^[5]。

两组差异基因中,酒精饲料组显著上调的基因可分为 3 类:炎症、脂质代谢和抗氧化相关基因。炎症相关基因如 *Lcn2* 与酒精性肝炎严重程度相关^[14],C-C 基序趋化因子配体(C-C motif chemokine ligand,CCL)6 虽未直接与酒精性肝损伤关联,但与趋化因子 CCL2 和 CCL5 相似^[15],可

能在酒精性肝损伤中发挥作用。上调的脂质代谢基因 *Plin4* 与脂质积累相关,*Plin2* 在酒精性脂肪肝中过度表达^[16],*Plin4* 可能也有类似作用。抗氧化相关基因(如 *Gstm3*、*Mgst3*)与谷胱甘肽代谢通路相关,*Cyp2a22*、*Cyp2a4* 同属于细胞色素 P450 家族,可能参与酒精代谢,生成活性氧(reactive oxygen species,ROS),加剧氧化应激、脂质过氧化及肝细胞凋亡等反应^[17]。相关通路在 KEGG 分析中显示富集。

下调的基因与解毒、细胞保护和修复能力相关。下调的解毒相关基因(如 *Mup2*、*Mup3*、*Mup8*)与药物代谢-细胞色素 P450 通路的减少相一致,表明肝对外源性物质的代谢能力下降,可能导致毒素积累。对于细胞保护相关基因(如 *Serpina1e*、*Serpina3k*)与细胞周期、蛋白质消化和吸收通路的减少相关,这可能影响了肝细胞的再生和修复能力。

综上,本研究发现的显著变化的差异基因以及 GO、KEGG 的通路,主要体现在细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、趋化因子信号通路、细胞因子与细胞因子受体的相互作用、GSH 代谢、视黄醇代谢、NF-κB 信号通路等通路。上述发现对于酒精性肝损伤的潜在治疗靶点研究具有一定的借鉴意义。



注:A:上调最显著的 10 个基因;B:下调最显著的 10 个基因。

图 9 qRT-PCR 分析两组小鼠肝组织差异表达基因

Note. A. Upregulation of the 10 most significant genes. B. Downregulate the 10 most significant genes.

Figure 9 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes in two groups of mice

本研究存在一定局限性:(1)主要在基因水平上探讨了酒精性肝损伤的分子机制,可能无法全面揭示酒精性肝损伤的复杂过程;(2)本研究未对差异基因进行功能验证,后续研究可通过基因敲除或过表达等方法进一步验证这些基因在酒精性肝损伤中的作用,以期在酒精性肝损伤靶向治疗提供理论依据。

参 考 文 献(References)

[1] THURSZ M, LINGFORD-HUGHES A. Advances in the understanding and management of alcohol-related liver disease [J]. BMJ, 2023, 383: e077090.

[2] DANPANICHKUL P, CHEN V L, CHAIYAKUNAPRUK N, et al. Socio-economic association of alcohol use disorder and cardiovascular and alcohol-associated liver disease from 2010 to 2019 [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2024, 60(3): 340–349.

[3] DANPANICHKUL P, NG C H, TAN D J H, et al. The global burden of alcohol-associated cirrhosis and cancer in young and middle-aged adults [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2024, 22(9): 1947–1949.

[4] World Health Organization. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals [EB/OL]. [2023–05–19]. <https://iris.who.int/handle/10665/367912>.

[5] LAMAS-PAZ A, HAO F, NELSON L J, et al. Alcoholic liver disease: utility of animal models [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(45): 5063–5075.

[6] SAVIANO A, HENDERSON N C, BAUMERT T F. Single-cell genomics and spatial transcriptomics: discovery of novel cell states and cellular interactions in liver physiology and disease biology [J]. J Hepatol, 2020, 73(5): 1219–1230.

[7] LIEBER C S, DECARLI L M, SORRELL M F. Experimental methods of ethanol administration [J]. Hepatology, 1989, 10(4): 501–510.

[8] LACKNER C, STAUBER R E, DAVIES S, et al. Development and prognostic relevance of a histologic grading and staging system for alcohol-related liver disease [J]. J Hepatol, 2021, 75(4): 810–819.

[9] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast

all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.

[10] 闫阮玉, 吴洪雨, 黄恺, 等. 两种肝毒性化学物诱导的肝纤维化小鼠模型转录组学的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 32–45.

YAN R Y, WU H Y, HUANG K, et al. Comparative study of transcriptomics in two murine liver fibrosis models induced by hepatotoxic chemicals [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(5): 32–45.

[11] 李容容, 孙鑫, 黄恺, 等. C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 乙型肝炎转基因小鼠的转录组学分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1519–1529.

LI R R, SUN X, HUANG K, et al. Transcriptomic analysis of C57BL/6N-Tg(1.28HBV)/Vst hepatitis B virus transgenic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1519–1529.

[12] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. Cluster profiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284–287.

[13] 杜冯, 梁李铖, 邹坤, 等. 两种 C57BL/6J 小鼠酒精性脂肪肝模型建立方法及比较 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 557–566.

DU F, LIANG L C, ZOU K, et al. Establishment and comparison of two alcoholic fatty liver models in C57BL/6J mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 557–566.

[14] OSNA N A, RASINENI K, GANESAN M, et al. Pathogenesis of alcohol-associated liver disease [J]. J Clin Exp Hepatol, 2022, 12(6): 1492–1513.

[15] AMBADE A, LOWE P, KODYS K, et al. Pharmacological inhibition of CCR2/5 signaling prevents and reverses alcohol-induced liver damage, steatosis, and inflammation in mice [J]. Hepatology, 2019, 69(3): 1105–1121.

[16] CARR R M, AHIMA R S. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases [J]. Exp Cell Res, 2016, 340(2): 187–192.

[17] WU X, FAN X, MIYATA T, et al. Recent advances in understanding of pathogenesis of alcohol-associated liver disease [J]. Annu Rev Pathol, 2023, 18: 411–438.

[收稿日期] 2024-09-22

牛晓涛,左佳倩,黄玉洁,等. 2,4-二硝基氯苯诱导 BALB/c 荷瘤小鼠特异性皮炎模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 216-224.

NIU X T, ZUO J Q, HUANG Y J, et al. Establishment of an atopic dermatitis model in tumor-bearing BALB/c mice induced by 2,4-dinitrochlorobenzene [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 216-224.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.006

2,4-二硝基氯苯诱导 BALB/c 荷瘤小鼠特异性皮炎模型的建立

牛晓涛^{1,2}, 左佳倩^{1,2}, 黄玉洁^{1,2}, 任雯沁^{1,2}, 束昕妍^{1,2}, 舒鹏^{1,2*}

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学, 南京 210029)

【摘要】 目的 本研究使用 2,4-二硝基氯苯 (2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB) 诱导 BALB/c 荷瘤小鼠建立特异性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 模型, 模拟临床恶性肿瘤患者皮肤炎症并发症的情况。**方法** 将 BALB/c 小鼠分为不同组别: 空白对照组 (NC group), 模型组 (MODEL group), 特异性皮炎组 (AD group), 地塞米松组 (DEX group)。将模型组和地塞米松组的小鼠进行 S-180 肿瘤细胞腋下接种后, 利用 DNCB 刺激模型组、特异性皮炎组、地塞米松组小鼠的背部皮肤和耳部, 建立荷瘤小鼠特异性皮炎动物模型。观察和记录小鼠体质量的变化, 在末次给药后评估小鼠背部皮肤状况, 取脾计算脾系数, 测定小鼠耳片质量差以计算耳廓肿胀度和肿胀抑制率, 并对背部皮肤组织进行组织病理学检测, 使用 ELISA 法检测血清中 IgE、TNF- α 、IL-4 及 IL-17 水平。**结果** 与空白对照组相比, 模型组、特异性皮炎组、地塞米松组小鼠的皮肤出现了红斑、丘疹、鳞屑和苔藓样改变, 同时伴有体质量下降, 脾系数和耳廓肿胀度明显增加。病理结果表明, 皮肤结构不完整, 皮肤厚度显著增加, 有大量炎性细胞浸润, 肥大细胞数量增加。血清中 IgE、TNF- α 、IL-4 和 IL-17 水平均有所上升。与模型组相比, 地塞米松组在各项检测指标上均有改善。**结论** DNCB 激发可成功建立荷瘤小鼠特异性皮炎动物模型, 该模型具有药物可控性, 这为进行恶性肿瘤与皮肤炎症的相关科学研究提供了有益的科研工具。

【关键词】 动物模型; 特异性皮炎; 恶性肿瘤; BALB/c 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0216-09

Establishment of an atopic dermatitis model in tumor-bearing BALB/c mice induced by 2,4-dinitrochlorobenzene

NIU Xiaotao^{1,2}, ZUO Jiaqian^{1,2}, HUANG Yujie^{1,2}, REN Wenqin^{1,2}, SHU Xinyan^{1,2}, SHU Peng^{1,2*}

(1. the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Corresponding author: SHU Peng. E-mail: shupengsp@njucm.edu.cn

【Abstract】 Objective In this study, 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) was used to induce the establishment of an atopic dermatitis (AD) model in BALB/c homozygous mice to simulate the skin inflammatory complications in patients with clinical malignancies. **Methods** BALB/c mice were divided into different groups: negative control group (NC group), model group (MODEL group), atopic dermatitis group (AD group), and

【基金项目】江苏省中医药科技发展计划重点项目 (ZD202214), 国家自然科学基金 (82374539), 江苏省研究生实践创新计划 (KYCX24_2230)。

Funded by the Jiangsu Province Chinese Medicine Science and Technology Development Program Key Project (ZD202214), National Natural Science Foundation of China (82374539), Jiangsu Province Graduate Student Practice and Innovation Program (KYCX24_2230).

【作者简介】牛晓涛, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医内科学 (肿瘤临床)。Email: 473521649@qq.com

【通信作者】舒鹏, 女, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肿瘤临床。Email: shupengsp@njucm.edu.cn

dexamethasone group (DEX group). After the mice in MODEL group and DEX group were inoculated with S-180 tumor cells in the axilla, MODEL group, AD group and DEX group were stimulated with DNCB on the dorsal skin and the ear to establish an animal model of atopic dermatitis in tumor-bearing mice. Changes in body weight were observed and recorded, the dorsal skin condition of mice was assessed after the last administration of the drug, the spleen was taken to calculate the spleen coefficient, the difference in the mass of mouse ear slices was determined to calculate the degree of auricular swelling and the rate of inhibition of swelling, and histopathological tests were performed on the dorsal skin tissues to detect the levels of IgE, TNF- α , IL-4, and IL-17 in the serum using an ELISA assay. **Results** Compared with the NC group, the skin of mice in the MODEL and AD groups showed erythematous, papular, scaly and mossy changes, accompanied by weight loss, and a significant increase in splenic coefficient and auricular swelling. Pathologic findings showed an incomplete skin structure, a significant increase in skin thickness, a large infiltration of inflammatory cells, and an increase in the number of mast cells. Serum levels of IgE, TNF- α , IL-4 and IL-17 were increased. Compared with the MODEL group, the DEX group showed an improvement in all the assays. **Conclusions** DNCB excitation can successfully establish an animal model of AD in hormonal mice, which is drug-controllable, which provides a useful scientific tool for conducting scientific research related to malignant tumors and skin inflammation.

【Keywords】 animal model; atopic dermatitis; malignant tumor; BALB/c mice

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

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是常见的皮肤病,其临床表现主要是反复发作的湿疹样皮损、瘙痒、皮肤干燥、糠状脱屑等^[1]。AD的发病涉及以下3种机制:免疫失衡、皮肤屏障功能障碍以及皮肤微生物失衡之间的相互作用^[2-3]。目前,临床上轻中度AD常采用局部糖皮质激素和局部钙调神经磷酸酶抑制剂等药物治疗,而重度AD可考虑使用系统性免疫抑制剂、生物制剂以及光疗进行治疗^[4-5]。

AD与恶性肿瘤关系密切,其具体机制尚不明确。学术界常认为AD患者皮肤的免疫失衡可能改变机体与肿瘤的免疫应答^[6]。AD与非黑色素瘤皮肤癌之间存在显著相关性,AD患者患基底细胞癌的风险明显增加^[7]。内脏肿瘤与AD也有相关性,如胰腺癌、脑瘤、子宫颈癌、肾癌等^[8]。这些研究结果为进一步探讨AD与恶性肿瘤之间的关联提供了重要线索。

近年来,临床实践观察到恶性肿瘤患者出现皮肤并发症的案例在逐渐增多,这对患者的生存质量产生了明显的负面影响。因此,从现代生物学的视角深入研究恶性肿瘤与皮肤炎症的发生、发展以及复发过程中的相互关系和科学机制显得尤为紧迫。目前研究主要集中在恶性肿瘤放化疗后出现皮肤炎症的动物模型,尚未建立恶性肿瘤合并皮肤炎症的动物模型。

本研究旨在建立一种模拟恶性肿瘤患者合并皮肤炎症的动物模型,在借鉴现有的AD模型后^[9-15],通过使用BALB/c小鼠来模拟肿瘤并发皮肤病变的临床现象,同时还设置给药组,以评估该模型是否具有药物可控性,为后续恶性肿瘤患者合并皮肤炎症的治疗策略研究提供初步实验数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级BALB/c小鼠(6~8周龄),18~22 g,雄性16只,由斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)-2019-0010】提供,饲养于江苏省中医院(江苏省中医临床研究院)动物实验中心【SYXK(苏)2022-0070】。饲养温度为(23±2)℃、相对湿度为(55±5)%、光照环境为12 h昼夜循环,分笼饲养,给予自由饮食和饮水。造模及给药期间所有小鼠均饮用纯净水和普通小鼠维持饲料,本实验所有涉及研究动物操作均获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(2024DW-034-01)。

1.1.2 细胞株

S-180细胞(武汉尚恩生物技术有限公司, SNL-433)。

1. 1. 3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司, KGL1201-500), 2, 4-二硝基氯苯(2, 4-dinitrochlorobenzene, DNCB)(西格玛-奥德里奇公司, 美国, 237329-10G), 苏木素-伊红(HE)染液试剂盒(珠海贝索生物科技有限公司, BA4099), 甲苯胺蓝染液(武汉塞维尔生物科技有限公司, G1032-100ML), 小鼠 IgE ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司, JL12885), 小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司, JL10484), 小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司, JL20266), 小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司, JL20250)。

酶标仪(Bio Tek, 美国), YD-12P2 脱水机(金华市益迪医疗设备有限公司, 中国), YD-6L 包埋机(金华市益迪医疗设备有限公司, 中国), RM125 RTS 病理切片机(徕卡, 德国), PH60 病理组织漂烘仪(常州派斯杰医疗设备有限公司, 中国), 10127105p-G/188105 病理级显微镜载玻片(江苏示泰实验器材有限公司, 中国), 10212450C 标准级显微镜盖玻片(江苏示泰实验器材有限公司, 中国), BX51 正置显微镜(OLYMPUS, 日本), VS200 扫描仪(OLYMPUS, 日本)。

1. 2 方法

1. 2. 1 动物分组及模型建立

将 BALB/c 雄性小鼠随机分为空白对照组(NC group, $n = 4$), 模型组(MODEL group, $n = 4$), 特应性皮炎组(AD group, $n = 4$), 地塞米松组(DEX group, $n = 4$)。实验开始前 1 d, 将各组小鼠使用异氟烷(4%, 300 ~ 500 mL/min)吸入麻醉后, 均用实验专用剃毛仪初步剔除背部较长毛发, 再用薇婷温和脱毛膏脱除绒毛, 面积为 2 cm $\times$

3 cm; 模型建立的过程如图 1 所示, 实验第 1 天, 取模型组、地塞米松组 8 只小鼠进行 S-180 实体瘤造模。使用磷酸缓冲盐溶液将 S-180 肉瘤细胞悬液浓度调节至每毫升 1×10^6 个, 每只小鼠左前肢腋窝下接种 0.2 mL。实验开始后的前 3 d, 将实验组小鼠背部皮肤和右耳每天分别用 100 μ L 的 2.0% DNCB(基质液丙酮: 橄榄油 = 3: 1)溶液和 10 μ L 的 1.0% DNCB 溶液致敏, 空白对照组小鼠涂抹相同剂量的基质溶液; 4 d 后, 除空白对照组外, 其余各组小鼠背部皮肤和右耳每 2 d 用 100 μ L 的 1.0% DNCB 溶液和 10 μ L 的 0.5% DNCB 溶液致敏, 共 21 d, 至小鼠皮肤出现出血、红斑、水肿、丘疹、表皮剥脱、鳞屑, 耳朵出现肿胀时, 即造模成功^[16]。于第 22 天开始至第 35 天, 地塞米松组治疗时给予复方醋酸地塞米松乳膏 200 mg/d 于背部脱毛区均匀涂抹, 每天 1 次, 空白对照组、模型组、特应性皮炎组涂抹相同容量的生理盐水。

1. 2. 2 小鼠体质量变化

于实验第 0、7、14、21、28 和 35 天分别称取各组小鼠体质量。

1. 2. 3 各组小鼠皮肤症状及皮损状态评分

从实验第 1 天开始, 使用手机每天拍摄记录小鼠背部皮损的变化。根据临床 EASI 评分方法, 在实验开始后的第 1、7、14、21、28 和 35 天, 对背部皮损的严重程度进行评分^[17]。评分包括四种症状, 分别评定为 0 分(无)、1 分(轻度)、2 分(中度)、3 分(重度)。具体评分标准见表 1。

1. 2. 4 各组小鼠脾系数比较

造模后第 36 天, 实验结束时, 将各组小鼠经异氟烷(4%, 300 ~ 500 mL/min)吸入麻醉后处死, 立即摘取小鼠脾, 随后称取小鼠脾质量,

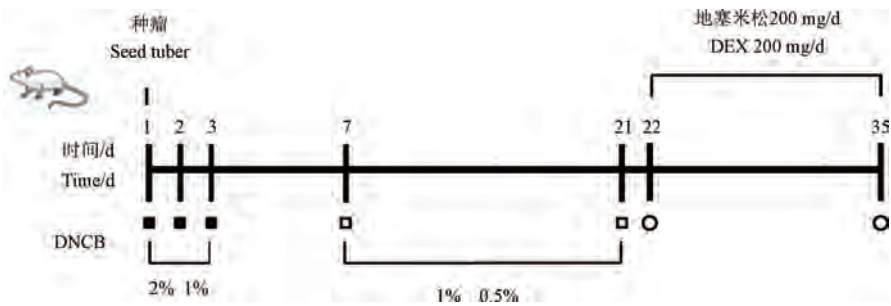


图 1 实验中使用的肿瘤、DNCB 处理和地塞米松给药时间

Figure 1 Seeded tumors, DNCB treatment and DEX administration used in the experiment

表 1 皮损严重程度评分表
Table 1 Scale of severity of skin lesions

程度 Degree	红斑(出血) Erythema (bleeding)	水肿(丘疹) Edema (pimples)	表皮剥脱(抓痕) Epidermal peeling (scratches)	鳞屑(干燥) Scaly (dry)
无(0分) None (0 points)	无 None	无 None	无 None	无 None
轻度(1分) Mild (1 point)	微弱可见,呈浅粉色 Faintly visible, light pink	几乎无法观察到凸起于皮肤表面 Almost unobservable bumps on the skin surface	略微浅层表皮脱落 Slightly superficial epidermal loss	呈糠状脱屑 Furfuraceous
中度(2分) Moderate (2 points)	明显可见,呈深红色 Visible, deep red	明显可见皮肤高出,但不明显 Visible skin elevation, but not obvious	许多轻微的表皮脱落/抓痕或少量较之前的表皮脱落/抓痕 Many minor epidermal peels/scratches or a few more previous epidermal peels/scratches	片状鳞屑覆盖较少 Less flaky scaly coverage
重度(3分) Severe (3 points)	深红或绯红色 Dark red or scarlet	明显凸起于皮肤表面 Clearly raised on the skin surface	大范围的浅层表皮剥脱/抓痕,以及/或许多较深的表皮剥脱 Extensive superficial epidermal peeling/scratching, and/or many deeper epidermal peels	厚厚的鳞屑覆盖 Thick scales cover

参考文献方法计算脏器指数^[18]。

1.2.5 各组小鼠耳廓肿胀度及耳肿胀抑制率

末次给药后,使用直径为 6 mm 的穿孔器分别在小鼠左右耳相同区域的耳片上打孔,然后立即在分析天平上称重^[19]。以小鼠左右耳片的重量差值作为耳廓肿胀程度,计算肿胀抑制率^[20]。

1.2.6 各组小鼠皮肤病理学改变

将小鼠使用异氟烷(4%,300 ~ 500 mL/min)吸入麻醉处死后,收集的皮损组织位于脱毛后的 2 cm × 3 cm 皮肤区域内,放置在 4%多聚甲醛中固定,经过洗涤、脱水、透明处理、石蜡包埋固定,切片,再使用 HE 和甲苯胺蓝染色后,在荧光正置显微镜下观察背部皮肤的病理变化。

1.2.7 ELISA 法检测小鼠血清的 IgE、TNF-α、IL-4 和 IL-17 表达水平

造模后第 36 天,实验结束,将各组小鼠使用异氟烷(4%,300 ~ 500 mL/min)吸入麻醉后处死后,小鼠眼眶取血,制备血清,液氮速冻后放置于-80 ℃冰箱中冻存。按照相应试剂盒说明书操作,检测血清中相关免疫因子 IgE、TNF-α、IL-4 和 IL-17 的含量。

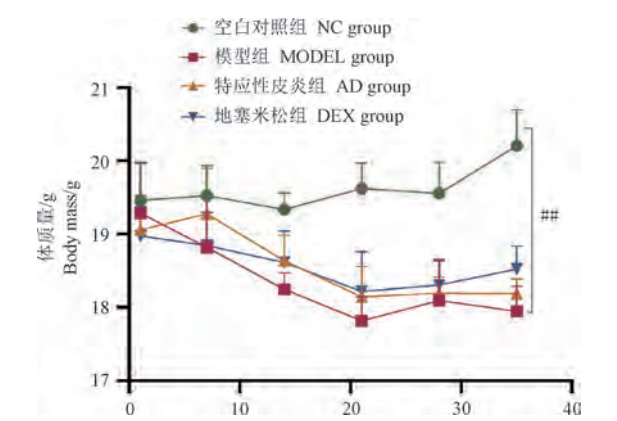
1.3 统计学分析

利用 Graphpad Prism 9.0 软件对数据进行处理,数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式呈现。进行多组间比较时,使用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的体质量变化情况

在造模第 0、7、14、21 和 35 天时,与空白对照组比较,各组间体质量均呈下降趋势。在 21、35 天时,地塞米松组小鼠较模型组体质量升高,呈上升趋势(图 2)。



注:与空白对照组相比,## $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 2 各组小鼠体质量变化

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

Figure 2 Changes in body mass of mice in each group

2.2 各组小鼠皮肤症状

在造模和给药期间的第 7、14、21、28 和 35 天,对各组小鼠背部受试区的皮肤状态进行拍照和评分。空白对照组小鼠状态较其他组良好,皮

肤粉嫩光滑。与空白对照组相比,模型组和特应性皮炎组小鼠于用药第 7、14、21、28 和 35 天背部皮肤损伤逐渐加重,至最后取材阶段,模型组和特应性皮炎组小鼠出现明显的皮肤红斑、水肿、鳞屑以及糜烂和表皮脱落等炎症表现,小鼠皮损

评分显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,用药后第 7 天,地塞米松组上述症状均显著改善,红斑结痂面积明显缩小,用药后第 14 天,地塞米松组小鼠皮肤恢复明显,小鼠皮损评分显著降低($P < 0.01$)。见图 3、表 2。

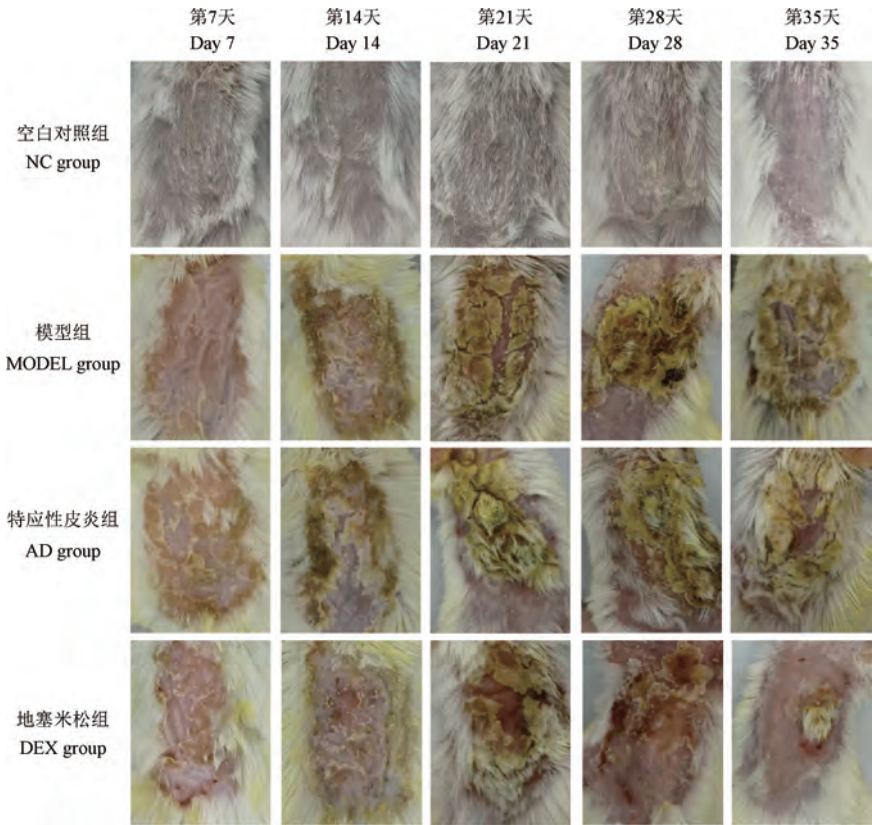


图 3 各组小鼠背部皮肤
Figure 3 Dorsal skin of mice in each group

表 2 各组小鼠背部皮损评分情况($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Dorsal skin lesion scores of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28	第 35 天 Day 35
空白对照组 NC group	0	0	0	0	0	0
模型组 MODEL group	0	3.25 ± 0.50 ^{##}	6.50 ± 1.29 ^{##}	10.25 ± 0.50 ^{##}	10.25 ± 0.96 ^{##}	10.50 ± 0.58 ^{##}
特应性皮炎组 AD group	0	2.75 ± 0.50 ^{##}	6.50 ± 1.29 ^{##}	10.75 ± 0.96 ^{##}	10.25 ± 0.96 ^{##}	10.75 ± 0.96 ^{##}
地塞米松组 DEX group	0	3.50 ± 0.58 ^{**}	6.00 ± 0.82 ^{**}	10.00 ± 0.82 ^{**}	8.00 ± 0.82 ^{**}	3.00 ± 0.82 ^{**}

注:与模型组相比, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with MODEL group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.3 各组小鼠脾指数比较

与空白对照组相比,模型组和特应性皮炎组小鼠的脾质量增大,脾指数显著增加($P < 0.01$);与模型组相比,地塞米松组小鼠的脾质量减小,

脾指数显著降低($P < 0.01$)。见图 4。
2.4 各组小鼠耳廓肿胀度及耳肿胀抑制率比较
经 DNCB 持续刺激后,模型组和特应性皮炎组小鼠耳肿胀度与右耳耳片质量明显增加,和空

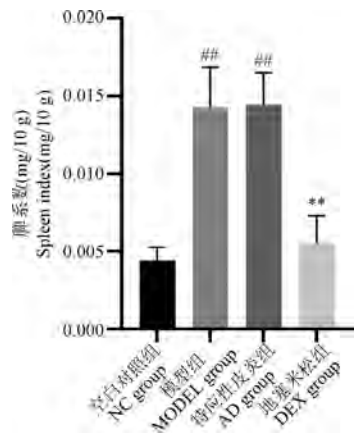


图 4 各组小鼠脾指数

Figure 4 Splenic index of mice in each group

白组相比具有显著差异 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 地塞米松组小鼠的耳肿胀度右耳耳片质量明显降低, 耳肿胀抑制率较高, 具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5、表 3。

2.5 各组小鼠皮肤病理学改变

镜下可见, 空白对照组小鼠皮肤组织表皮和真皮层皮肤厚度薄, 毛囊、皮脂腺等外观正常, 无炎症浸润。与空白组相比, 模型组和特应性皮炎

组小鼠可见表皮、真皮层厚度明显增加, 皮肤角化异常, 显著的炎性细胞浸润。与模型组相比, 地塞米松组小鼠表皮、真皮厚度明显减少, 炎性细胞浸润减轻。采用甲苯胺蓝染色计数真皮层肥大细胞浸润。空白对照组小鼠仅见少量的肥大细胞浸润, 与空白对照组比较, 模型组和特应性皮炎组小鼠的皮肤可见明显的肥大细胞数量增多, 与模型组比较, 地塞米松组小鼠肥大细胞数量减少明显。见图 6。

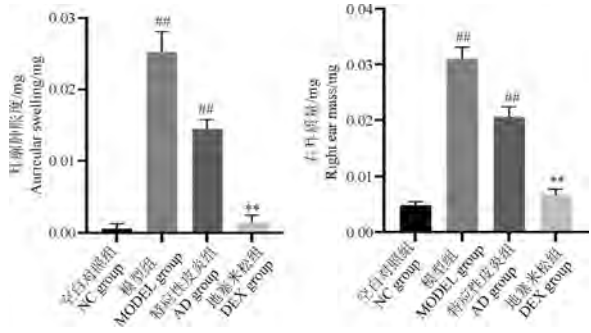
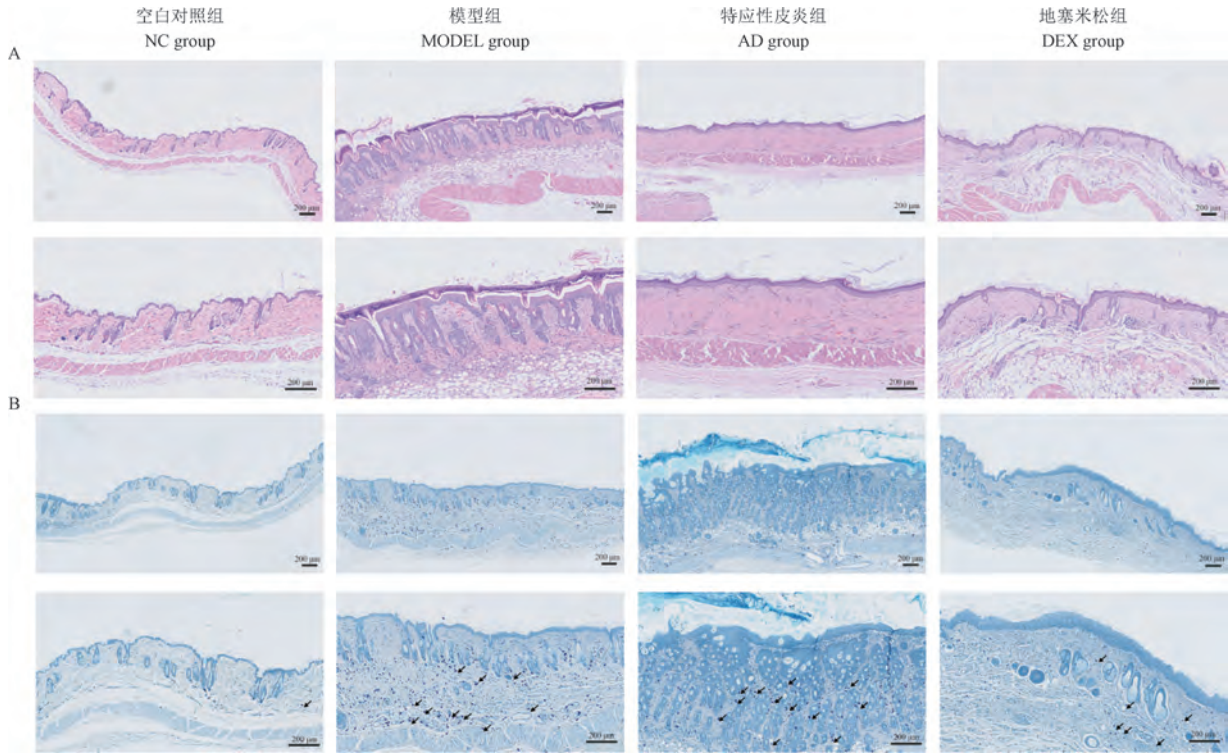


图 5 各组小鼠耳廓肿胀度和右耳质量

Figure 5 Auricular swelling and right ear mass of mice in each group



注: A: 各组小鼠皮肤组织病理学改变; B: 各组小鼠肥大细胞浸润情况。

图 6 各组小鼠皮肤组织病理切片染色

Note. A. Histopathological changes of skin lesions in mice in each group. B. Mast cell infiltration in mice in each group.

Figure 6 Staining of histopathological sections of skin lesions of mice in each group

2.6 各组小鼠血清 IgE、TNF-α、IL-4 和 IL-17 含量的变化

与空白对照组相比,模型组和特应性皮炎组的血清中 IgE、TNF-α、IL-4 和 IL-17 的含量均呈显

著增高($P < 0.01$);而地塞米松组的血清中 IgE、TNF-α、IL-4 和 IL-17 的含量则显示出不同程度的下降,与模型组相比,具有明显差异($P < 0.01$),见图 7。

表 3 各组小鼠耳廓肿胀度及肿胀抑制率

Table 3 Auricular swelling and swelling inhibition rate of mice in each group

组别 Groups	左耳质量/mg Left ear mass/mg	右耳质量/mg Right ear mass/mg	耳肿胀度/mg Swelling degree/mg	肿胀抑制率/% Swelling inhibition rate/%
空白对照组 NC group	4.25 ± 0.50	4.85 ± 0.60	0.60 ± 0.71	-
模型组 MODEL group	5.75 ± 0.96	31.00 ± 2.16 ^{##}	25.25 ± 2.87 ^{##}	-
特应性皮炎组 AD group	6.05 ± 0.82	20.57 ± 1.85 ^{##}	14.52 ± 1.26 ^{##}	-
地塞米松组 DEX group	5.25 ± 0.50	6.75 ± 0.96 ^{**}	1.50 ± 1.00 ^{**}	94.06%

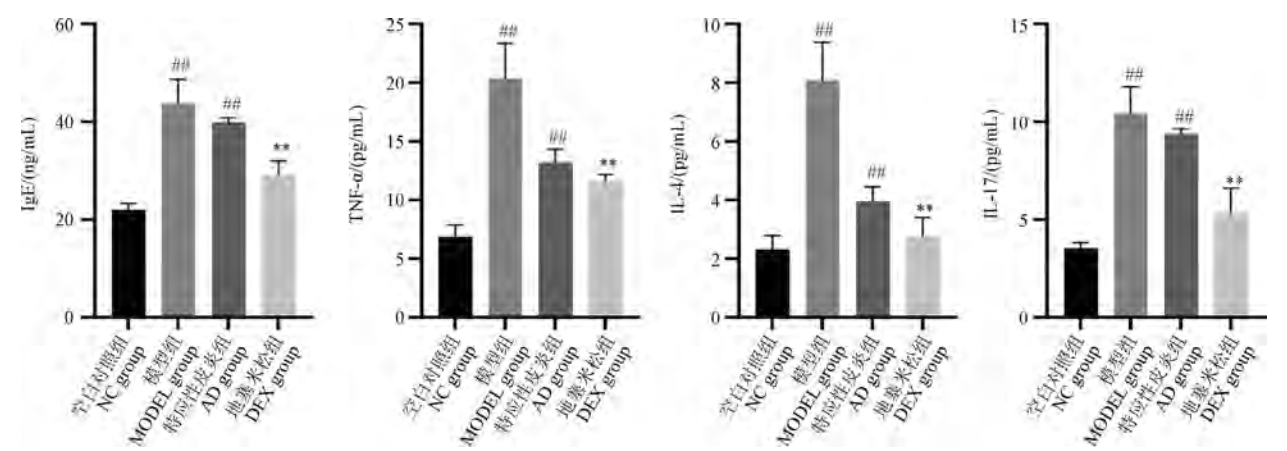


图 7 各组小鼠血清 IgE、TNF-α、IL-4 和 IL-17 细胞因子的表达水平

Figure 7 Expression levels of serum IgE, TNF-α, IL-4 and IL-17 cytokines of mice in each group

3 讨论

AD 常与遗传和过敏相关,主要表现为反复发作的皮肤干燥、剧烈瘙痒、糠筛状脱屑等。尽管 AD 的发病机制尚未完全阐明,但 Th1/Th2 细胞失衡被学界普遍认为是 AD 形成的重要原因之一^[21]。在 AD 发病过程中,外在因素或内在改变导致炎症细胞数量明显增加,致使 Th2 相关细胞因子促使 B 细胞激活,从而导致 IgE 和 IL-4 水平显著上升,Th2 相关细胞因子还可刺激 Th2 细胞活化,抑制 Th1 细胞功能^[22]。公认的细胞促炎症因子之一是 Th1 分泌的 TNF-α,被认为是 AD 的诱因之一^[23]。IL-17 是一种重要的促炎细胞因子,主要由 CD4⁺ Th17 细胞和先天性淋巴样细胞亚群分泌,可促进炎症反应的发生,在自身免疫

性疾病、炎症、肿瘤以及移植排斥反应中起关键作用^[24]。在恶性肿瘤的发生和发展中,肿瘤免疫微环境(tumor microenvironment, TME)扮演着关键角色。肿瘤中的 Th 细胞受到抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)的激活后,具备增殖分化的能力,会形成 Th1、Th17、Th22 以及 Tfh 等亚群,进而促进肿瘤的发展^[25-27]。本研究中模型组相较于特应性皮炎组显示出较高的趋势,验证了肿瘤与皮肤炎症之间可能存在的密切关联。

为了深入研究 AD 的发病机制,国内外学者常常使用卵清蛋白^[28]、DNCB^[29]、尘螨^[30]等物质进行诱导。在本次实验中使用的 DNCB 是一种半抗原的化学物质,具有与上皮蛋白的可溶部分结合形成全抗原的特性,因此会引发过敏反应^[31]。因此本实验中使用 DNCB 激发小鼠背部和耳部,

通过不同的给药天数观察小鼠背部受试区皮肤状态并进行皮损评分,以确定最佳的方法来诱导荷瘤小鼠特异性皮炎。

在末次激发给药后,小鼠的背部受试区可能出现不同程度的皮疹、红斑、溃烂、糠状脱屑、结痂的表现。与空白对照组相比,模型组和特异性皮炎组均有明显的造模效果。病理学检测结果显示两者的特异性皮炎结果接近。在 AD 的发病过程中,Th1/Th2 失衡,Th2 型细胞能够产生大量 IgE 的炎症细胞因子。因此,血清的 IgE 浓度通常是 AD 模型的重要指标之一。本研究采用 ELISA 法测定血清样本,结果显示模型组和特异性皮炎组的 IgE 水平较空白对照组显著升高,而特异性皮炎组略低于模型组。此外,细胞因子 TNF- α 、IL-17 和 IL-4 也被认为能够反映 AD 模型疾病严重程度。本研究的测定结果显示,模型组和特异性皮炎组的这些细胞因子水平均显著高于空白对照组,而特异性皮炎组的水平则低于模型组。此外,与模型组相比,地塞米松组显示出明显的改善趋势,说明本研究建立的动物模型具有对药物治疗的可控性。

综上,本研究旨在探索小鼠作为对肿瘤本身引起皮炎并发症的动物模型。然而,在皮炎诱导方式、小鼠品种、肿瘤类型等方面仍存在一些局限性,需要在未来展开进一步探讨。通过使用 DNCB 诱导,本研究成功建立了 BALB/c 荷瘤小鼠 AD 模型,这种方法具有操作简便、成本低廉的优势,可作为一种具有推广应用前景的肿瘤合并皮肤炎症动物模型。这为深入研究其发病机制和药物开发提供了有益的研究工具。

参 考 文 献(References)

- [1] 张玉,崔晶,刘海玉,等. 蜂毒治疗特异性皮炎的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2023, 37(12): 1423-1427, 1435.
ZHANG Y, CUI J, LIU H Y, et al. Bee venom in atopic dermatitis treatment [J]. Chin J Dermatovenereol, 2023, 37(12): 1423-1427, 1435.
- [2] LANGAN S M, IRVINE A D, WEIDINGER S. Atopic dermatitis [J]. Lancet, 2020, 396(10247): 345-360.
- [3] NARLA S, SILVERBERG J I. The role of environmental exposures in atopic dermatitis [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2020, 20(12): 74.
- [4] SCHULER C F 4th, BILLI A C, MAVERAKIS E, et al. Novel insights into atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 151(5): 1145-1154.
- [5] SIDBURY R, ALIKHAN A, BERCOVITCH L, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis in adults with topical therapies [J]. J Am Acad Dermatol, 2023, 89(1): e1-e20.
- [6] 马梦茜,王清滢,李亚琴,等. 特异性皮炎共病研究进展[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2023, 22(3): 291-295.
MA M X, WANG Q Y, LI Y Q, et al. Progress of atopic dermatitis comorbidities [J]. Chin J Dermatovenereology Integr Tradit West Med, 2023, 22(3): 291-295.
- [7] GANDINI S, STANGANELLI I, PALLI D, et al. Atopic dermatitis, naevi count and skin cancer risk: a meta-analysis [J]. J Dermatol Sci, 2016, 84(2): 137-143.
- [8] HWANG C Y, CHEN Y J, LIN M W, et al. Cancer risk in patients with allergic rhinitis, asthma and atopic dermatitis: a nationwide cohort study in Taiwan [J]. Int J Cancer, 2012, 130(5): 1160-1167.
- [9] WANG Y, ZHANG P, ZHANG J, et al. Inhibitory effect of bisdemethoxycurcumin on DNCB-induced atopic dermatitis in mice [J]. Molecules, 2022, 28(1): 293.
- [10] LEE Y, CHOI H K, N'DEH K P U, et al. Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice [J]. Nutrients, 2020, 12(2): 411.
- [11] GUNASEKARAN P, FAN M, KIM E Y, et al. Amphiphilic triazine polymer derivatives as antibacterial and anti-atopic agents in mice model [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15161.
- [12] BAI X Y, LIU P, CHAI Y W, et al. Artesunate attenuates 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis by down-regulating Th17 cell responses in BALB/c mice [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 874: 173020.
- [13] LEE J H, LIM J Y, JO E H, et al. Chijabyukpi-Tang inhibits pro-inflammatory cytokines and chemokines via the Nrf2/HO-1 signaling pathway in TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells and ameliorates 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1018.
- [14] YANG C C, HUNG Y L, KO W C, et al. Effect of neferine on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8237.
- [15] HAN X, CHEN Z, YUAN J, et al. *Artemisia annua* water extract attenuates DNCB-induced atopic dermatitis by restraining Th2 cell mediated inflammatory responses in BALB/c mice [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 291: 115160.
- [16] KIM H I, HONG S H, LEE S Y, et al. *Gardenia jasminoides* ameliorates antibiotic-associated aggravation of

- DNCB-induced atopic dermatitis by restoring the intestinal microbiome profile [J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1349.
- [17] 高娟, 陈桂芳, 谭伟, 等. 过敏煎对特异性皮炎小鼠的干预作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(8): 1806-1810.
- GAO J, CHEN G F, TAN W, et al. Study on the intervention effect of allergy decoction on atopic dermatitis in mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(8): 1806-1810.
- [18] 马天怡, 毛敏, 吴秋月, 等. 蒲公英甾醇对 2, 4-二硝基氯苯诱导的特异性皮炎小鼠模型的改善作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(10): 2160-2165.
- MA T Y, MAO M, WU Q Y, et al. Ameliorative effect of taraxasterol on 2, 4-dinitrochlorobenzene induced atopic dermatitis in mice [J]. *Chin J Immunol*, 2023, 39(10): 2160-2165.
- [19] 杨凡, 谭正怀, 石锦萍, 等. 蛇黄乳膏止痒功效相关机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(18): 210-213.
- YANG F, TAN Z H, SHI J P, et al. Antipruritic mechanism of shehuang cream in animal [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2012, 18(18): 210-213.
- [20] 余志杰, 邓婷, 李劲松, 等. 蛇黄软膏对湿疹的抗过敏、止痒及抗炎作用研究 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(16): 1868-1876.
- YU Z J, DENG T, LI J S, et al. Research on anti-allergic, antipruritic and anti-inflammatory effects of Shehuang ointment on eczema [J]. *Chin J New Drugs*, 2020, 29(16): 1868-1876.
- [21] NOVAK N. New insights into the mechanism and management of allergic diseases: atopic dermatitis [J]. *Allergy*, 2009, 64(2): 265-275.
- [22] 宋艳丽, 刘青云, 陈少君, 等. 龙牡汤对特异性皮炎小鼠树突状细胞 IgE 高亲和力受体 γ 亚基启动子甲基化水平及 Th 分化的影响 [J]. *北京中医药*, 2022, 41(4): 379-384.
- SONG Y L, LIU Q Y, CHEN S J, et al. Effects of Longmu decoction on methylation level of high-affinity IgE receptor γ subunit promoter and Th differentiation in dendritic cells of mice with atopic dermatitis [J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2022, 41(4): 379-384.
- [23] CAMPIONE E, LANNA C, DILUVIO L, et al. Skin immunity and its dysregulation in atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(3): 257-267.
- [24] 邹瑞, 李娟, 李劲松. 特异性皮炎治疗药物的研究进展 [J]. *药物流行病学杂志*, 2024, 33(4): 449-460.
- ZOU R, LI J, LI J S. Research progress of drugs for the treatment of atopic dermatitis [J]. *Chin J Pharmacoepidemiol*, 2024, 33(4): 449-460.
- [25] KUANG D M, PENG C, ZHAO Q, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells [J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 154-164.
- [26] KUANG D M, XIAO X, ZHAO Q, et al. B7-H1-expressing antigen-presenting cells mediate polarization of protumorigenic Th22 subsets [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4657-4667.
- [27] CHEN M M, XIAO X, LAO X M, et al. Polarization of tissue-resident TFH-like cells in human hepatoma bridges innate monocyte inflammation and M2b macrophage polarization [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(10): 1182-1195.
- [28] DIDOVIC S, OPITZ F V, HOLZMANN B, et al. Requirement of MyD88 signaling in keratinocytes for Langerhans cell migration and initiation of atopic dermatitis-like symptoms in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(4): 981-992.
- [29] INAGAKI N, NAGAI H. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(3): 251-259.
- [30] KAWAKAMI Y, YUMOTO K, KAWAKAMI T. An improved mouse model of atopic dermatitis and suppression of skin lesions by an inhibitor of Tec family kinases [J]. *Allergol Int*, 2007, 56(4): 403-409.
- [31] 莫俊奎, 周继昌, 刘小立, 等. DNCB 致敏诱导 BALB/c 小鼠特异性皮炎模型的建立 [J]. *中国热带医学*, 2013, 13(12): 1439-1442.
- MO J L, ZHOU J C, LIU X L, et al. Establishment of atopic dermatitis model with BALB/c mice induced by DNCB [J]. *Chin Trop Med*, 2013, 13(12): 1439-1442.

[收稿日期] 2024-07-16

田佳灵,赵弼洲. 骨缺损范围可控颌骨放射性骨坏死动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 225-231.
TIAN J L, ZHAO B Z. Establishment of an animal model with controllable osteoradionecrosis of the jaws with bone defect range [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 225-231.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.007

骨缺损范围可控颌骨放射性骨坏死动物模型的建立

田佳灵,赵弼洲*

(甘肃省中医院口腔颌面外科,兰州 730050)

【摘要】 目的 建立一种可控骨缺损范围的,具有早期、轻型颌骨放射性骨坏死(osteoradionecrosis of jaws, ORNJ)特征的动物模型。**方法** 应用电子直线加速器单次高剂量照射的方法,据照射剂量不同,分为 a 组(对照组)、b 组(12 Gy 组)、c 组(14 Gy 组),每组随机分配 6 只兔。b 组、c 组两组右侧下颌骨部位进行放疗照射。1 周后所有动物于右侧下颌角处制备标准一致的骨缺损。4 周后处死,进行大体观察;下颌骨标本锥形束 CT(cone-beam CT, CBCT)扫描及 HU 值对比;苏木素-伊红(HE)染色组织学观察;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, Trap)染色组织学观察及破骨细胞计数对比,进行统计学分析。**结果** 4 周后 b 组、c 组术区软组织轻度肿胀,皮肤发紫,口腔粘膜可观察到糜烂破溃, c 组更为显著;CBCT 检查提示 b 组、c 组两组照射部位骨皮质毛糙, c 组骨皮质连续性欠佳,骨缺损范围各组均未观察到明显变化。HU 值对比提示 b 组、c 组两组较 a 组显著减小;HE 染色组织学观察提示 b 组、c 组两组骨连续性变差,可见大量纤维组织增生,无细胞空白骨陷窝增多,并能观察到炎细胞浸润;Trap 染色破骨细胞计数提示 c 组破骨细胞较 a 组显著增多。**结论** 应用电子直线加速器,对兔下颌角部位进行 14 Gy 单次照射,并制造骨缺损创伤,4 周后可以建立符合 ORNJ 早期诊断标准,并且骨缺损范围可控的动物模型。

【关键词】 颌骨放射性骨坏死;骨缺损;可控;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0225-07

Establishment of an animal model with controllable osteoradionecrosis of the jaws with bone defect range

TIAN Jialing, ZHAO Bizhou*

(Department of Stomatology in Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: ZHAO Bizhou. E-mail: zhaobizhou@126.com

【Abstract】 Objective To establish, based on new diagnostic criteria for osteoradionecrosis of the jaws (ORNJ), an animal model with a controllable bone defect range and early and mild ORNJ characteristics. **Methods** A method involving single high-dose irradiation with an electron linear accelerator was applied. According to the irradiation dose, the animals were divided into a group (control group); b group (12 Gy group); and c group (14 Gy group). Six rabbits were randomly assigned to each group, b and c groups were uniformly selected for further radiotherapy of the right mandibular area. After 1 week, all animals were prepared with a standard bone defect at the right mandibular angle. After 4 weeks, the animals were euthanized, and general observations were conducted. CBCT scans and HU values of mandibular specimens, HE staining histological observations, Trap staining histology, and osteoclast counts were compared. And the statistical analysis were carried out. **Results** 4 weeks after the bone defect was created, the soft tissue in the surgical area of b and c groups showed mild swelling, purple skin, and erosion and

[基金项目] 甘肃省科技计划(23JRRA1232)。
Funded by Science and Technology Project of Gansu Province (23JRRA1232).
[作者简介] 田佳灵,女,硕士,主治医师,研究方向:口腔临床常见疾病的防治。Email: tianjialing2009@163.com
[通信作者] 赵弼洲,男,硕士,主治医师,研究方向:颌面部外伤的治疗及缺损修复。Email: zhaobizhou@126.com

ulceration of the oral mucosa, with c group showing the most significant changes. CBCT examination showed that the cortical bone of the irradiated areas in b and c groups was rough, while that of c group had poor continuity. No significant changes were observed in the extent of the bone defect in any group, b and c groups had significantly decreased HU values compared with a group. HE staining and histological observation suggested that the bone continuity of b and c groups had deteriorated; there was a large amount of fibrotic tissue proliferation, an increase in blank bone pits without cells, and an infiltration of inflammatory cells. Trap staining revealed a significant increase in osteoclasts in c group compared with a group. **Conclusion** By using an electron linear accelerator, a single dose of 14 Gy irradiation was applied to the mandibular angle area to create bone defects with consistent specifications in rabbits. After 4 weeks, an animal model that met the early diagnostic criteria of ORNJ and had controllable consistency in the range and degree of bone defects was established.

【Keywords】 osteoradionecrosis of jaws (ORNJ); bone defect; controllable; animal model

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

放疗是头颈颌面部肿瘤的重要综合治疗手段之一,但在临床中发现有可能因放疗发生严重并发症——颌骨放射性骨坏死(osteoradionecrosis of jaws, ORNJ),另外放疗常常在手术切除肿瘤前、后进行,手术又是发生 ORNJ 的重要危险因素^[1]。一旦发生 ORNJ,进一步发展为骨缺损,或者因发生 ORNJ,使手术造成的颌骨骨缺损范围扩大,可能导致功能缺失,容貌改变等问题。因此 ORNJ 伴发颌骨缺损治疗修复时机的选择、修复方案的制订、修复效果的评估,需要一个相对标准化的、骨缺损情况一定范围内相似的动物模型来进行大量相关研究。目前已有众多学者成功建立大鼠^[2]、兔^[3]、山羊^[4]、小型猪^[5]等的 ORNJ 模型,但这些模型表现出的骨缺损位置、范围、严重程度等缺乏一致性,进行相关研究时,基线水平难以控制。本研究拟通过选择新西兰大白兔,以 ORNJ 新的诊断标准为依据,建立一种可控骨缺损范围的,具有早期、轻型 ORNJ 特征的动物模型,为相关 ORNJ 骨缺损治疗、修复及病因病理研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择健康雄性普通级新西兰大白兔 24 只,购自湖南太平洋生物科技有限公司【SCXK(湘)2023-0011】,6 月龄,体质量(3.2 ± 0.2) kg。饲养及实验地点为江西中洪博元生物技术实验室【SYXK(赣)2020-0001】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度 50%,温度控制在 23 ~ 25 ℃。本研

究经甘肃省中医院伦理委员会审查批准,符合实验动物伦理学要求(2024-087-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

二甲苯(33535,西陇科学股份有限公司)、无水乙醇(32061,西陇科学股份有限公司)、95%乙醇(32061,西陇科学股份有限公司)、苏木素染液(ZLI-9610,中杉金桥)、苏木素返蓝液(G1040, Servicebio)、伊红染色液(G1100, Solarbio)、抗酒石酸酸性磷酸酶染色液(G1050, Servicebio)。

微型手持式颅钻(7001 型,瑞沃德生命科技有限公司)、电子直线加速器(Vital Beam,瓦里安)、CBCT(3D eXam I, Kavo)、显微镜(BX43, OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及放疗照射方案

兔分笼单独适应性饲养 1 周,随机分为 a 组、b 组、c 组、d 组共 4 组,每组 6 只,其中 a 组为对照组, b 组、c 组、d 组为射线照射组。麻醉选择 3% 戊巴比妥钠,按 25 mg/kg 计算用量,行注射麻醉,麻醉成功后,选择仰卧位放置于照射平台,绷带自胸腹部、下肢段绑缚固定体位。

照射剂量根据生物学等效公式计算, $BED = nd [1 + d/(\alpha/\beta)]$, 其中 n 为照射次数,本研究选取单次照射($n = 1$)。d 为照射剂量,分别选择 12、14、16 Gy,对应 b 组、c 组、d 组, α/β 值选取头颈部鳞状细胞癌放疗常数 3。计算得出 b 组等效剂量为 60 Gy, c 组等效剂量为 79 Gy, d 组等效剂量为 101 Gy。a 组不进行照射。兔头偏向左侧,暴露右侧下颌骨体,记号笔标记拟照射部位,用铅板遮挡其余部位(图 1)。电子直线加速器照

射,视野为 5 cm × 3 cm,照射范围为右侧下颌骨体近下颌角处。剂量率为 0.8 Gy/min。照射射线后,d 组 6 只兔陆续出现狂躁、流涎,停止进食进水,1 周内该组实验动物全部死亡,考虑照射剂量过大,已不适合选取 16 Gy 剂量进行下一步研究,故后续研究排除该组所有样本。

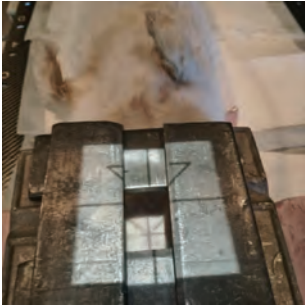


图 1 新西兰大白兔固定照射

Figure 1 New Zealand white rabbit fixed and irradiated

1.2.2 制造标准化骨缺损

照射后饲养 1 周,a 组、b 组和 c 组 3 组兔麻醉,无菌条件下,沿右侧下颌骨近下颌角处切开皮肤、咬肌及骨膜,分离暴露右侧下颌角,选取骨量最丰满处,用已消毒的慢速马达,安装直径 5 mm,厚度 1 mm 磨头,配合冷生理盐水冷却,制造直径 5 mm,深 1 mm 的标准圆形骨缺损(图 2),无菌盐水反复冲洗后分层缝合伤口。

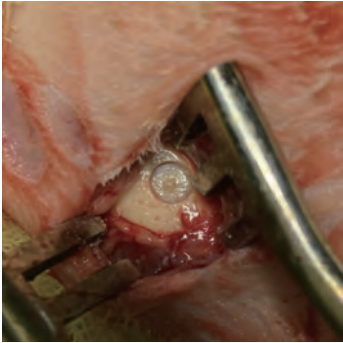


图 2 右侧下颌角处标准尺寸骨缺损

Figure 2 Standard size bone defect at right mandibular angle

1.2.3 大体观察

制造骨缺损后,每周观察兔术区局部及全身情况。4 周后处死,解剖观察皮肤、粘膜等表现。

1.2.4 锥形束 CT(cone-beam, CBCT)扫描及 HU 值对比分析

动物处死后,取材右侧下颌骨标本,CBCT 扫描后观察骨缺损区骨质变化情况,并于人造骨缺

损区上、下边缘及底部正中部位应用 ExamVision 1.9.3 软件分别测量 HU 值,求平均值后,作为骨密度评价指标,进行 b 组和 c 组与 a 组对比分析。

1.2.5 组织学对比

将下颌骨骨缺损标本脱钙、蜡块包埋、切片,行苏木素-伊红(HE)染色,在正置白光拍照显微镜下观察各组标本骨缺损区组织学表现。

1.2.6 破骨细胞计数

标本石蜡切片行免疫组化 Trap 染色,在 20 倍镜下,每个样本 Trap 染色切片选择 3 张镜下照片,由 2 名观察人员计数破骨细胞数目,评估缺损区骨吸收破坏情况。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行数据统计学分析。计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 大体表现

造骨缺损 4 周后,a 组、b 组和 c 组实验动物全部存活。a 组术区皮肤黏膜红润,伤口愈合良好;b 组可见术区皮肤颜色发紫,软组织轻度肿胀,伤口愈合尚可;c 组可见术区皮肤颜色发紫,软组织明显肿胀,伤口愈合稍欠佳,有极少量脓性分泌物形成。口腔黏膜情况观察亦有不同,a 组口腔黏膜色质红润,无明显改变;b 组右侧磨牙后区近照射部位有局限溃疡病变;c 组右侧牙龈黏膜、舌背黏膜见多发糜烂面,表面黄白色假膜覆盖,舌体及上腭黏膜颜色发白发紫,黏膜有缺血表现(图 3)。

2.2 CBCT 影像表现及 HU 值比较

CBCT 影像学表现方面,a 组骨缺损区周围骨皮质连续光滑,未见明显异常;b 组骨缺损区骨皮质变毛糙,连续性变差;c 组可见骨缺损区骨皮质毛糙,局部有极少量骨破坏,连续性中断(图 4)。但骨缺损范围各组均未见明显改变。ExamVision 1.9.3 软件测量各组骨缺损区周围骨皮质 HU 值,统计对比后发现,b 组、c 组 4 周时,HU 值均较 a 组减小,具有统计学意义(图 5)。

2.3 HE 染色组织学表现

a 组可见骨连续性正常,缺损区可见纤维增

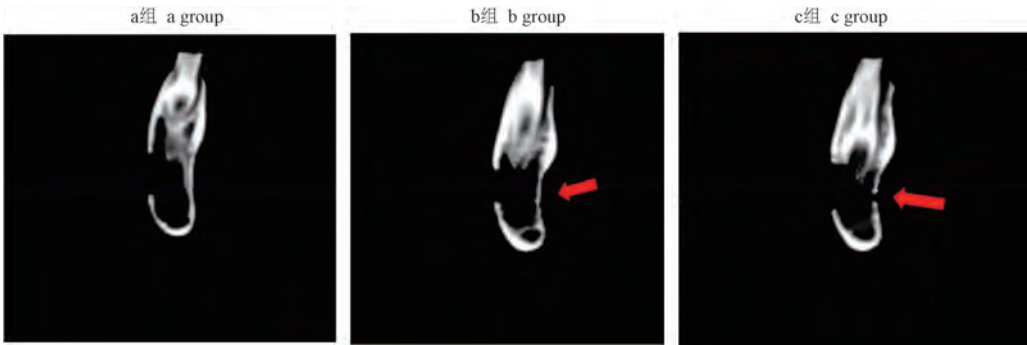


注:A:不同放疗剂量照射后兔术区局部皮肤表现;B:不同放疗剂量照射后兔口腔黏膜局部表现。

图3 各组射线照射后大体表现

Note. A. Local skin appearance of rabbits after different doses of radiotherapy. B. Local manifestations of oral mucosa in rabbits after irradiation with different doses of radiotherapy.

Figure 3 General manifestations of each group after radiation exposure



注:a组:骨皮质未见明显异常;b组:可见骨缺损区皮质毛糙(红色箭头处);c组:可见骨缺损区骨皮质连续性欠佳,骨皮质毛糙(红色箭头处)。

图4 不同放疗剂量照射后兔下颌骨 CBCT 影像表现

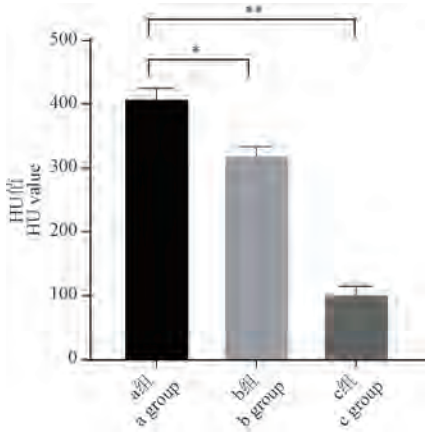
Note. a group. There was no obvious abnormality in the cortex of bone. b group. Cortex of bone defect was coarse (red arrow). c group. Continuity of the cortex of bone defect was poor and the cortex of bone defect was coarse (red arrow).

Figure 4 CBCT imaging of mandible in rabbits after different doses of radiotherapy

生(黑色箭头),并可见到有少量新骨基质生成(红色箭头);b组骨连续性尚可,但较a组稍差,缺损区纤维增生明显(黑色箭头),范围扩大,同时可观察到无细胞空白骨陷窝(蓝色箭头),未见明显新骨形成;c组部分区域可见到大量集中的空白骨陷窝(蓝色箭头),数目明显多于a组、b组两组,且骨连续性差,纤维增生范围广泛,纤维细胞中可见淋巴细胞浸润(图6)。

2.4 Trap 染色及破骨细胞计数

a组镜下很难见到特异性红染破骨细胞,骨连续性好;b组可见少量红染破骨细胞;c组绝大多数镜下照片可见较多典型红染破骨细胞,并可见较多无细胞空虚骨陷窝。b组和c组髓腔内可见纤维增生性改变。镜下破骨细胞计数b组和c组均大于a组,其中b组较a组差异无显著性($P > 0.05$),c组较a组具有统计学意义($P < 0.05$)(图7)。



注:与 a 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 5 不同照射剂量骨缺损周围 HU 值

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

Figure 5 HU value around the bone defect of different irradiation doses

3 讨论

在发表的专家共识中,对 ORNJ 的诊断标准归纳为 5 点:(1)有明确放疗史;(2)临床可观察到骨外露,同时伴有粘膜、皮肤的损伤;(3)在无骨外露的情况下可以观察到影像学上明确存在的骨质改变、破坏;(4)无复发肿瘤存在;(5)组织病理学检查能够观察到骨结构的破坏,骨细胞的消失,死骨形成^[1]。LYONS 等^[6]通过对 ORNJ 的深入研究,于 2008 年对 ORNJ 病因机理做出解释,认为 ORNJ 是放疗过程中,骨组织产生急性炎症反应,同时因各组细胞因子、自由基作用,导致放疗区域组织萎缩并纤维化的病理过程,并进一步于 2014 年通过对 85 名不同病程 ORNJ 患者的深入分类研究,提出了新的 ORNJ 诊断标准及分型^[7], I 型可以无明显症状及临床表现,但影像

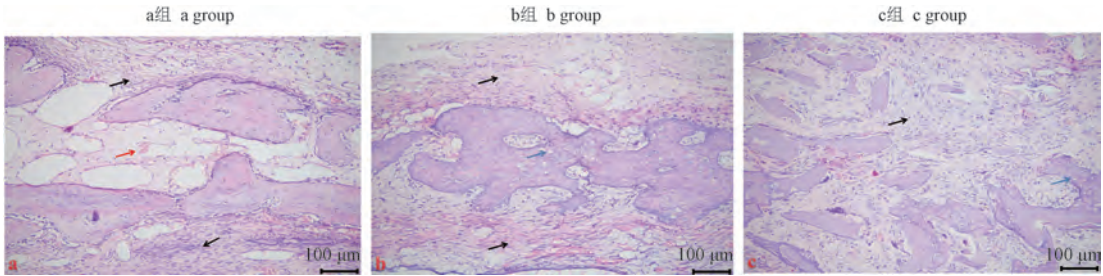
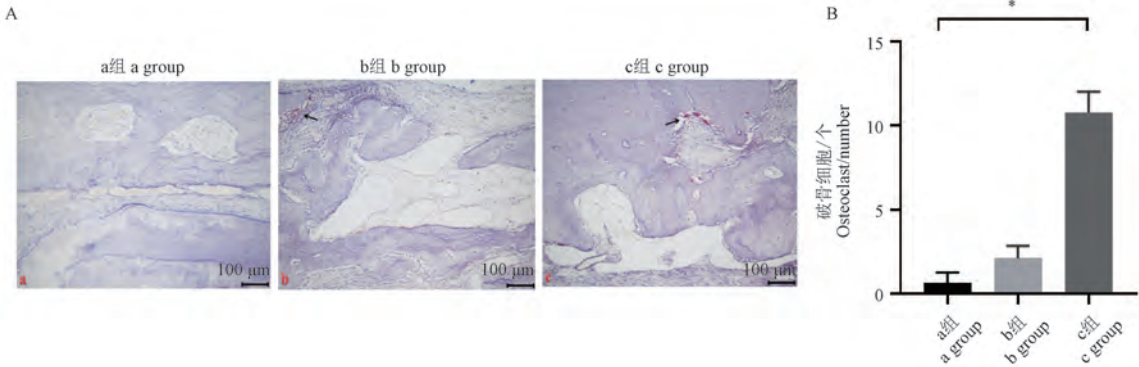


图 6 兔下颌骨缺损区 HE 染色组织学表现

Figure 6 HE staining of mandibular defect in rabbits



注:A:兔下颌骨缺损区 Trap 染色;B:不同照射剂量 Trap 染色破骨细胞计数。

图 7 Trap 染色及破骨细胞计数

Note. A. Trap staining of mandibular defects in rabbits. B. Trap stained osteoclasts at different irradiation doses.

Figure 7 Trap staining and osteoclast counting

学上可以观察到 $< 2.5\text{ cm}$ 的骨破坏; II 型可具有轻度临床症状,或者有可见死骨暴露,骨质破坏范围 $> 2.5\text{ cm}$; III 型在 II 型的基础上,临床症状加重,除骨组织破坏更加显著外,还伴有软组织的损伤与感染; IV 型则在 III 型的基础上,进一步出现病理性骨折,软组织瘘口等。头颈部恶性肿

瘤患者经放射治疗后,如能及时发现、诊断 ORNJ,在类似 I ~ II 型分类阶段就能进行相关骨质破坏的预防与治疗,能有效阻止病情的发展。

颌骨恶性肿瘤患者本身就因手术切除部分骨组织造成颌骨缺损,作为高危致病因素的颌骨手术创伤,术前、术后如需配合放疗,更应以 ORNJ I 期病理特征及临床表现为参考,进行密切观察监测,一旦发生 ORNJ,早期就进行治疗或者颌骨缺损的修复,更是能极大改善 ORNJ 患者的生活质量^[8]。如何做好相关研究,动物模型是非常重要的实验平台。目前成功建立的各种 ORNJ 的动物模型^[2-5],多是通过放疗照射后,利用拔牙作为高危致病因素,这些动物模型具有一些共同的特点:(1)建立的动物模型基本上都位于 ORNJ 分类 III ~ IV 型,不能满足早期 ORNJ 的相关研究;(2)拔牙作为高风险因素,创面暴露于口腔,细菌、食物残渣等干扰因素不能排除;(3)骨缺损范围一致性差,进行相关研究时基线水平存在差异性。因此期望建立一种可操作性强、成功率高;利用人造骨缺损手术创伤为高危因素,细菌、感染等干扰因素小的;具有 I ~ II 型早期病理特征和临床表现;骨缺损范围及基线水平一定程度可控的动物模型。

兔作为一种常用实验动物,较之犬类性情温顺,较之猪、羊等动物价格低廉,较之大鼠等小型动物可操作性更强^[9]。在实验中发现,兔下颌骨前端大部分骨质菲薄,但下颌角处骨质丰满,适合选择为造缺损手术部位,且该部位术中容易暴露,术式难度小。术后分层严密缝合,伤口不暴露,避免其他细菌及感染因素影响。

研究证实,放射剂量大于 60 Gy,会显著提高 ORNJ 发病率,且发病概率及病变严重程度与剂量增大呈正相关^[10-11]。本研究中,选择的放疗照射剂量为 12 和 14 Gy,为避免反复麻醉可能造成的不良意外情况,选择了高剂量单次照射。通过生物等效公式换算,分别约等于 60 和 79 Gy。与临床研究中提到的 ORNJ 发生阈值剂量 > 60 Gy 的结论一致^[12]。

YFANTI 等^[13]研究证实,CBCT 可以观察到 ORNJ 的细微病变表现。实验中 CBCT 影像检查可见,b 组缺损区骨皮质毛糙,c 组更是可以观察到微小骨皮质连续性中断,较 a 组有明显区别,但

细微骨皮质改变未改变缺损区范围,一致性得到保证。HU 值即 CT 值,可用来反应检查部位的密度区别^[14-15],进一步测量各组 HU 值,统计学分析后发现 b 组和 c 组骨密度均较 a 组减小,且具有统计学意义,能够说明照射组均出现一定程度的骨质破坏与吸收,符合早期 ORNJ 影像学表现与特征。

放射性照射引起急性炎症,使细胞损伤,在自由基、微血管血栓以及各种生长因子的作用下,促进了肌成纤维细胞的生长,放疗部位堆积大量成纤维细胞的细胞外基质,导致组织萎缩并纤维化^[16],并且进一步研究证实,萎缩纤维化早于骨质破坏^[17]。实验中 HE 染色结果提示随着射线剂量的提高,骨组织纤维化程度加重,无细胞骨陷窝结构越来越多,淋巴细胞浸润于骨组织。a 组可以观察到自身修复的新骨基质形成,但 b 组和 c 组均难以观察到骨修复迹象。

Trap 是破骨细胞特异性标志酶,很多实验研究应用 Trap 染色来反应破骨细胞的活性、分化程度等^[18-20],破骨细胞的活性又一定程度反应了骨吸收的活跃性。本研究应用 Trap 染色发现,a 组切片镜下只能观察到极个别红染的破骨细胞,随着放射剂量增加,破骨细胞数目增多,提示单次高剂量照射,可能能够建立 ORNJ 动物模型。但因干预条件的不同,破骨细胞活性可能在各组实验样本中的活跃时期不一致,一旦破骨细胞凋亡,并不能被观察到,因此不同干预条件下的样本,在同一时间节点观察到的破骨细胞活跃程度,并不能完全反应其骨吸收程度,可能需要更深入的讨论与研究,才能获得更严谨的结论。

综上所述,对兔下颌角部位进行 14 Gy 单次照射,照射部位制造规格较一致的骨缺损,4 周后可以建立符合 ORNJ 早期影像学诊断标准、组织病理学特征,并且骨缺损范围可控的动物模型。该动物模型有望在颌骨恶性肿瘤切除术后伴发 ORNJ 患者的早期治疗、修复相关研究,以及在 ORNJ 早期病因、病理、预防方面的研究中发挥重要作用。但该动物模型仍然存在一定不足,为了使骨缺损范围可控,最大程度减少 ORNJ 骨坏死对骨缺损一致性的影响,本实验只能摸索选择临界照射剂量,将 ORNJ 影像、组织病理等特征控制在早期阶段,与临床中大部分 III ~ IV 期 ORNJ 患

者死骨外露、软组织严重感染伴缺损等病变特征具有很大区别,反应出该动物模型一定的局限性。如何研究建立一种更加贴近临床,且研究基线水平更加一致的 ORNJ 动物模型,仍然需要进一步的探索。

参 考 文 献(References)

- [1] HE Y, MA C, HOU J, et al. Chinese expert group consensus on diagnosis and clinical management of osteoradionecrosis of the mandible [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2020, 49(3): 411–419.
- [2] YAMASAKI M C, ROQUE-TORRES G D, PERONI L V, et al. A modified protocol of mandibular osteoradionecrosis induction in rats with external beam radiation therapy [J]. *Clin Oral Investig*, 2020, 24(4): 1561–1567.
- [3] BODARD A G, DEBBACHE S, LANGONNET S, et al. A model of mandibular irradiation in the rabbit: preliminary results [J]. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*, 2013, 52(1): e17–e22.
- [4] 贺捷,何悦,邱蔚六,等. 下颌骨放射性骨坏死山羊动物模型的建立 [J]. *口腔医学*, 2009, 29(9): 453–456, 493.
HE J, HE Y, QIU W L, et al. Establishment of goat osteoradionecrosis animal model [J]. *Stomatology*, 2009, 29(9): 453–456, 493.
- [5] POORT L J, LUDLAGE J H B, LIE N, et al. The histological and histomorphometric changes in the mandible after radiotherapy: an animal model [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2017, 45(5): 716–721.
- [6] LYONS A, GHAZALI N. Osteoradionecrosis of the jaws: current understanding of its pathophysiology and treatment [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 46(8): 653–660.
- [7] LYONS A, OSHER J, WARNER E, et al. Osteoradionecrosis—a review of current concepts in defining the extent of the disease and a new classification proposal [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 52(5): 392–395.
- [8] BUTZIN S. Osteoradionecrosis of the jaw: a window of opportunity [J]. *Br Dent J*, 2022, 232(9): 628.
- [9] 宗春琳,郭宇轩,窦庚,等. 兔下颌骨放射性骨坏死模型的建立及评估 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2014, 12(6): 481–486.
ZONG C L, GUO Y X, DOU G, et al. Establishment of a rabbit model for mandibular osteoradionecrosis [J]. *Chin J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 12(6): 481–486.
- [10] LANG K, HELD T, MEIXNER E, et al. Frequency of osteoradionecrosis of the lower jaw after radiotherapy of oral cancer patients correlated with dosimetric parameters and other risk factors [J]. *Head Face Med*, 2022, 18(1): 7.
- [11] KUBOTA H, MIYAWAKI D, MUKUMOTO N, et al. Risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Radiat Oncol*, 2021, 16(1): 1.
- [12] DE ALMEIDA-SILVA L A, LUPP J D S, SOBRAL-SILVA L A, et al. The incidence of osteoradionecrosis of the jaws in oral cavity cancer patients treated with intensity-modulated radiotherapy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2024, 138(1): 66–78.
- [13] YFANTI Z, TETRADIS S, NIKITAKIS N G, et al. Radiologic findings of osteonecrosis, osteoradionecrosis, osteomyelitis and jaw metastatic disease with cone beam CT [J]. *Eur J Radiol*, 2023, 165: 110916.
- [14] 徐业豪,任碧晖,戴婕婷,等. 皮质骨厚度及颌骨骨密度对种植术中疼痛的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2024, 33(2): 211–218.
XU Y H, REN B H, DAI J T, et al. Effects of cortical bone thickness and jaw bone density on pain during implant surgery [J]. *Shanghai J Stomatol*, 2024, 33(2): 211–218.
- [15] 毛丽莎,袁鼎翔,邹婷婷,等. 基于 3D-Slicer 上颌骨自体骨移植供骨量及其相关因素分析 [J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2024, 25(4): 259–263, 304.
MAO L S, YUAN D X, ZOU T T, et al. A study on the potential donor sites and related factors of maxilla for autogenous bone grafting based on 3D-Slicer [J]. *Chin J Prosthodont*, 2024, 25(4): 259–263, 304.
- [16] FRANKART A J, FRANKART M J, CERVENKA B, et al. Osteoradionecrosis: exposing the evidence not the bone [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2021, 109(5): 1206–1218.
- [17] SØNSTEVOLD T, JOHANNESSEN A C, STUHR L. A rat model of radiation injury in the mandibular area [J]. *Radiat Oncol*, 2015, 10: 129.
- [18] 陈静,姚薇,韩克光,等. 羊骨髓肽-钙螯合物对诱导分化的破骨细胞形成和吸收的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 574–579.
CHEN J, YAO W, HAN K G, et al. Effects of sheep bone marrow peptides with and without calcium chelation on RANKL-induced osteoclast formation and activity [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(5): 574–579.
- [19] KADEH H, SARAVANI S, JAMSHIDI A. A comparative immunohistochemical expression of TRAP in odontogenic cysts [J]. *Iran J Otorhinolaryngol*, 2023, 35(131): 295–301.
- [20] 李龙鹤,白殿卿,王岩,等. 去卵巢大鼠模型成骨细胞破骨细胞平衡的实验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2005, 15(4): 213–217.
LI L H, BAI D Q, WANG Y, et al. Assessment on the balance between osteoblasts and osteoclasts in ovariectomized rat models [J]. *Chin J Comp Med*, 2005, 15(4): 213–217.

李晓菲,江科,董梦婷,等. 乳腺癌荷瘤小鼠模型抑郁表型比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 232-240.
LI X F, JIANG K, DONG M T, et al. A comparative study of depression phenotype in a tumor-bearing mouse model of breast cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 232-240.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.008

乳腺癌荷瘤小鼠模型抑郁表型比较研究

李晓菲,江科,董梦婷,王月莲,刘嘉琦,李欣,盛佳钰*

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院乳腺病科,上海 200437)

【摘要】 目的 比较两种不同方法构建的乳腺癌荷瘤小鼠抑郁表型,优选更符合临床表现并适合基础研究的乳腺癌抑郁小鼠模型。**方法** 构建单纯接种 4T1 乳腺癌细胞的肿瘤模型(4T1 组)和联合慢性温和不可预知刺激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)的肿瘤抑郁复合模型(4T1 + CUMS 组)。实验周期共 42 d,全程监测小鼠体质量、肿瘤体积、生存时长,于第 15 和 29 天分别进行两次抑郁行为学检测(包括糖水偏好实验、旷场实验、悬尾实验、高架十字迷宫实验)。苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织切片中海马神经元病理改变。**结果** (1)体质量:4T1 组与 4T1 + CUMS 组自 29 d 起体质量开始逐渐减轻,实验结束时 4T1 + CUMS 组体质量显著低于 4T1 组及 Control 组($P < 0.001$);(2)肿瘤体积:实验全程两模型组肿瘤体积增长速度均一无明显差异($P > 0.05$);(3)生存时长:4T1 组及 4T1 + CUMS 组存活率分别为 100% 及 60%,4T1 + CUMS 组小鼠初次出现死亡时间为第 36 天;(4)抑郁行为学检测:第 1 次行为学检测 3 组之间无明显差异($P > 0.05$),第 2 次行为学检测两组模型均表现出明显的抑郁表型。两模型组糖水偏好指数、中心区域活动距离均显著降低($P < 0.001$),不动时间显著上升($P < 0.001$);(5)脑组织病理切片:4T1 组与 4T1 + CUMS 组海马区神经元细胞数量减少,形态不规则,细胞之间排列紊乱且间隙不清,部分核仁模糊。**结论** 虽然单纯肿瘤和肿瘤复合应激刺激方法均能制备乳腺癌抑郁模型,但单纯肿瘤模型造模方式简单,造模成功后低死亡率、长时间窗便于后续给药和检测,且其抑郁表型产生原因更符合临床成因和表现,可为日后乳腺癌肿瘤相关抑郁的动物实验提供模型参考。

【关键词】 乳腺癌;肿瘤;抑郁;动物模型;行为学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2025) 02-0232-09

A comparative study of depression phenotype in a tumor-bearing mouse model of breast cancer

LI Xiaofei, JIANG Ke, DONG Mengting, WANG Yuelian, LIU Jiaqi, LI Xin, SHENG Jiayu*

(Department of Breast Diseases, Yueyang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

Corresponding author: SHENG Jiayu. E-mail: sjy1983sh@126.com

【Abstract】 Objective Compare the depression phenotypes of a breast cancer tumor-bearing mouse model constructed using two different method and a mouse model of breast cancer depression with clinical manifestations, as well as assess their suitability for basic research. **Methods** We constructed a tumor model with 4T1 breast cancer cells alone (4T1 group) and a tumor-depression composite model given chronic unpredictable mild (CUMS) (4T1 +

【基金项目】上海市科委医学创新研究专项(21Y11923600, 23Y11921600),上海市卫健委卫生行业临床研究专项(202140172),国家自然科学基金青年项目(82104952)。

Funded by the Shanghai Science and Technology Commission Medical Innovation Research Special Fund(21Y11923600, 23Y11921600), Health Industry Clinical Research Project of Shanghai Municipal Health Commission(202140172), National Natural Science Foundation of China Youth Project(82104952)。

【作者简介】李晓菲,女,硕士,研究方向:中西医结合防治乳腺疾病。Email: littlefairy5588@163.com

【通信作者】盛佳钰,女,博士,主任医师,研究方向:中医药防治乳腺癌。Email: sjy1983@shutcm.edu.cn

CUMS group). The experimental period was 42 d, and the body mass, tumor volume, and survival time of the mice were monitored throughout the whole process. Two depressive behavioral tests (of sucrose preference test, open field test, tail suspension test, and elevated plus maze) were performed on the 15th and 29th days, respectively. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of hippocampal neurons in brain tissue sections. **Results** (1) Body mass: The body mass of the 4T1 group and 4T1 + CUMS group began to decrease from 29 d, and the body mass of the 4T1 + CUMS group was significantly lower than that of the 4T1 group and Control group at the end of the experiment ($P < 0.001$). (2) Tumor volume: There was no significant difference in the growth rate of tumors between the two model groups throughout the experiment ($P > 0.05$). (3) Survival time: The survival rates of the 4T1 group and 4T1 + CUMS group were 100% and 60%, and the first death of mice in the 4T1 + CUMS group was on the 36th day. (4) Behavior test of depression: There was no significant difference between the three groups in the first depressive behavior tests ($P > 0.05$), and the two groups showed obvious depressive phenotypes in the second behavioral tests. The sucrose preference index and activity distance in the central area were significantly decreased in the two model groups ($P < 0.001$), and the immobility time was significantly increased ($P < 0.001$). (5) Pathological section of brain tissue: On pathological examination of brain tissue, we observed a reduced number of neuronal cells in the hippocampus of the 4T1 group and 4T1 + CUMS group, their morphology was irregular, the arrangement between the cells was disordered and the gap was unclear, and some nucleoli were blurred. **Conclusions** Although the tumor-only method and the tumor with compound stress stimulation method can both be used to prepare breast cancer depression models, the tumor-only modeling method is simpler and the mortality rate after successful modeling is higher. The long window of time is convenient for subsequent drug administration and detection, and the causes of the depression phenotype are more in line with the clinical causes and manifestations. Therefore, the 4T1 model can provide a reference model for future animal experiments on breast cancer tumor-related depression.

[Keywords] breast cancer; tumor; depression; animal model; behavior

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

肿瘤相关抑郁 (cancer-related depressed, CRD) 是乳腺癌患者在诊断和治疗过程中常出现病理性抑郁状态或综合征, 临床多表现为情绪低落、兴趣丧失、精力匮乏、体力下降、悲观消极、自责感强烈以及潜在的自杀意念^[1]。与精神病性抑郁不同, 该疾病由恶性肿瘤诊断与治疗过程中产生, 对肿瘤患者的生存及预后产生不良影响^[2]。近年来 CRD 逐渐引起重视, 但其早期诊断与治疗率较低^[3], 发生机制和预防治疗是当前研究热点, 而研究过程中尚缺乏代表性动物模型, 因此亟待探索与构建。

目前构建单纯抑郁动物模型方式多为应激刺激, 如慢性温和不可预知刺激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS)、慢性约束刺激 (chronic restraint stress, CRS) 和皮质酮 (corticosterone, CORT) 注射等, 其中 CUMS 是较常用且较可靠的抑郁症啮齿类动物模型^[4]。虽然目前尚无适用于 CRD 的权威动物模型, 但较多研究者采用以单纯抑郁模型为基础的肿瘤-抑郁复合模型, 如通过皮下接种 4T1 细胞构建乳腺癌

荷瘤小鼠模型后再联合 CUMS^[5]、CRS^[6]、CORT^[7] 等抑郁造模方式共同构建乳腺癌抑郁模型, 其中 4T1 细胞接种联合 CUMS 的复合模型报道最多, 但 CUMS 应激刺激导致的抑郁与 CRD 的临床成因仍有偏颇。课题组在前期预实验与文献检索中发现肿瘤生长本身是一种慢性应激刺激, 单纯荷瘤小鼠也具有一定的抑郁表型, 本研究将单纯荷瘤小鼠与荷瘤抑郁复合模型小鼠进行多方面比较, 探索更适合用于临床乳腺癌 CRD 研究的动物模型, 为后续乳腺癌 CRD 相关基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2023-0009】, 饲养于上海市中医药大学附属岳阳中西医结合医院屏障环境中【SYXK(沪)2023-0050】, 环境: 恒温恒湿, 温度维

持在 24 ~ 26 ℃, 湿度 40% ~ 70%, 昼夜各半循环照明。实验过程中小鼠的饲养及其他操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》, 本实验实施过程符合动物伦理要求, 获上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院伦理委员会审批 (YYLAC-2024-235-1)。

1.1.2 细胞株

4T1 细胞 (中科院上海细胞库, SCSP-5056)。

1.1.3 主要试剂与仪器

苏木素-伊红 (HE) 高清恒染试剂盒 (Servicebio, G1076), RPMI Medium1640 培养液 (Solarbio, 规格: 500 mL, 批号: 20221230), 胎牛血清 (美国 Hyclone, 规格: 500 mL, 批号: RK09403)。冰冻切片机 (赛默飞世尔科技有限公司, CRYOSTAR NX50, 美国), 正置光学显微镜 (尼康, NIKON ECLIPSE E100, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验模型制备

将 30 只小鼠随机分为 3 组: 对照组 (Control 组), 单纯肿瘤模型组 (4T1 组), 肿瘤-抑郁复合模型组 (4T1 + CUMS 组), 每组 10 只。

(1) 单纯肿瘤模型建立: 将 4T1 细胞传代培养, 获得细胞密度为 $9 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液 10 mL。小鼠适应性喂养 1 周后, 4T1 组和 4T1 + CUMS 组每只小鼠接种 4T1 细胞 0.1 mL 于第 2 对乳房垫, 持续观察 28 d。4T1 细胞注射到 BALB/c 小鼠中时, 4T1 自发产生高转移肿瘤, 可转移到肺、肝、淋巴结和大脑, 同时在注射部位形成始发灶, 且 4T1 细胞在 BALB/c 小鼠中的生长与转移特性与人体中的乳腺癌十分相近^[8]。

(2) 肿瘤-抑郁复合模型建立: 4T1 + CUMS 组小鼠第 2 对乳房垫接种 4T1 细胞当日起, 每日给予一种温和刺激, 相邻的 2 d 不重复, 持续 28 d^[9]。刺激方式: 禁食 (24 h)、禁水 (24 h)、昼夜颠倒 (24 h)、足底电击 (20 s)、鼠笼倾斜 45° (7 h)、束缚 (2 h)、潮湿垫料 (24 h)、夹尾 (1 min)。

1.2.2 动物一般情况观察

本次实验周期为 42 d, 实验期间对所有小鼠体质量、肿瘤体积和生存情况进行监测。

体质量: 每 7 d 对小鼠进行体质量测量与记录, 并计算各组平均体质量。

肿瘤体积: 每 7 d 使用游标卡尺对小鼠进行

肿瘤大小测量, 并通过公式计算肿瘤体积, 肿瘤体积 (mm^3) = $1/2ab^2$ (a: 肿瘤长径; b: 肿瘤短径; 单位: mm), 并计算各组平均肿瘤体积。

生存情况监测: 记录每只小鼠死亡时间, 实验结束时统计各组小鼠存活数量。

1.2.3 行为学检测

(1) 糖水偏好实验 (sucrose preference test, SPT): 小鼠单笼饲养, 进行 48 h 蔗糖饮水训练, 全程给予 1% 蔗糖水和纯水 (24 h 交换两个水瓶位置)。训练期结束后, 禁水 (不禁食) 24 h 后给予 1% 蔗糖水和纯水并测定 24 h 内小鼠对两瓶水的饮用量 (g)。

(2) 旷场实验 (open field test, OFT): 将小鼠放入自主活动箱, 适应 3 min 后开始测试, 用录像设备进行实验过程录制, 使用诺达思 Noldus EthoVision XT 10.1 动物运动轨迹跟踪系统分析视频中各组小鼠 15 min 内在中央格静止时间、穿格运动的总路程以及平均速度, 2 次实验之间用低浓度乙醇溶液喷洒、清洁场箱内壁及底面。测试时保持周围环境安静。

(3) 高架十字迷宫 (elevated plus maze, EPM): 测试前小鼠先放在空旷地自由活动 5 min, 适应后将小鼠头朝开臂方向放入中央区域, 记录 5 min 内小鼠进入开放臂次数、停留时间, 闭合臂进入次数、停留时间, 并计算开放臂停留时间比例, 开放臂进入次数比例。

(4) 悬尾实验 (tail suspension test, TST): 将小鼠距尾尖 1 cm 处用胶布固定并将小鼠倒挂在挂钩上, 使其呈倒悬状态, 用录像设备进行实验过程录制, 使用诺达思 Noldus EthoVision XT 10.1 动物运动轨迹跟踪系统分析视频中小鼠的绝望状态与挣扎行为, 自动记录小鼠在 6 min 内的累积不动时间和运动时间, 统计后 4 min 悬尾不动时间和运动时间^[10]。

1.2.4 HE 染色观察海马组织病理改变

实验结束时将所有小鼠处死, 每组取 3 只小鼠新鲜脑组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 脱水后包埋切片 (厚度 20 μm), 将冰冻切片从 -20 ℃ 冰箱取出恢复至室温, 用组织固定液固定 15 min 后流水冲洗。切片使用高清恒染预处理液处理 1 min 后使用 HE 染色, 脱水封片采用光学显微镜观察图像。

1. 2. 5 实验流程

第 1 天起通过接种 4T1 细胞将小鼠分为 3 组,第 15 ~ 21 天进行第 1 次行为学检测,第 29 ~

35 天进行第 2 次行为学检测,第 42 天进行取材,实验全程每 7 d 进行体质量和肿瘤体积测量,见图 1。

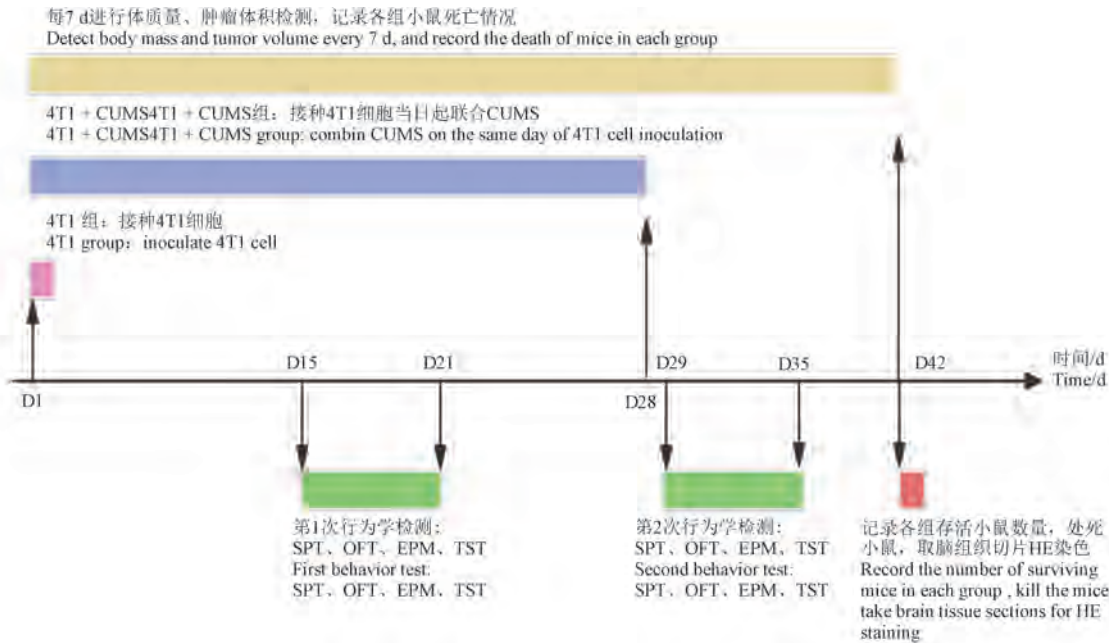


图 1 实验流程

Figure 1 Experimental flow

1. 3 统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行处理和分析,计量资料结果采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较方差齐且符合正态分布,采用单因素方差分析,结果以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

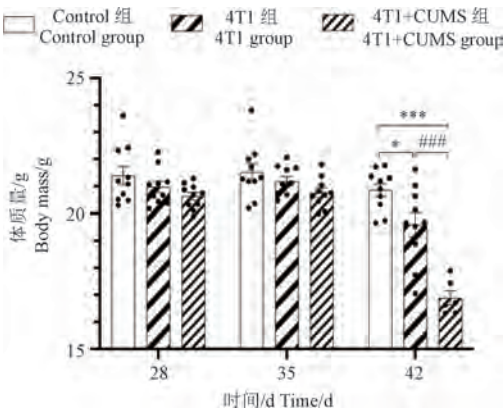
2. 1 小鼠体质量、肿瘤体积及生存情况比较

2. 1. 1 体质量变化

每 7 d 对小鼠体质量进行测量,第 1 ~ 28 天,3 组间均无显著性差异。第 28 天起(造模结束后)两模型组体质量出现下降趋势,第 42 天时 4T1 组和 4T1 + CUMS 组均出现明显体质量降低,且 4T1 + CUMS 组与 Control 组和 4T1 组相比均差异具有显著性($P < 0.001$),见图 2。

2. 1. 2 肿瘤体积变化

接种 4T1 细胞 7 d 后肉眼可见皮下结节,实验期间 4T1 组和 4T1 + CUMS 组肿瘤呈进行性增大趋势,但两组间无显著性差异($P > 0.05$),见图 3。第 28 天(造模结束时)4T1 组和 4T1 + CUMS



注:与 Control 组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与 4T1 组相比,### $P < 0.001$ 。(下图同)

图 2 各组小鼠体质量变化

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with 4T1 group, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes in body mass of mice in each group

组肿瘤大小分别为(1018 ± 102.2) mm^3 、(1034 ± 106.3) mm^3 ,第 42 天(实验结束时)4T1 组和 4T1 + CUMS 组肿瘤大小分别为(1332 ± 84.47) mm^3 、(1382 ± 67.69) mm^3 。

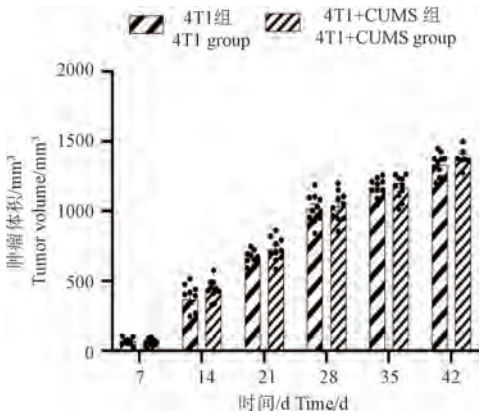


图3 各组小鼠肿瘤体积变化

Figure 3 Changes in tumor volume in mice in each group

2. 1. 3 生存情况

第 36 天 4T1 + CUMS 组小鼠开始出现死亡, 第 42 天(实验结束时)4T1 + CUMS 组共 4 只小鼠死亡,存活率 60%,而 4T1 组未见小鼠死亡。3 组小鼠存活率之间具有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。

2. 2 焦虑抑郁行为学检测结果

第 15 和 29 天分别对 3 组小鼠进行第 1 次和第 2 次行为学检测,结果如下:快感缺失变化如图 5A 中 SPT 所示,第 1 次行为学结果显示,与 Control 组相比,两模型组小鼠蔗糖偏好指数均无明显差异($P > 0.05$)。第 2 次行为学结果显示,4T1 组、4T1 + CUMS 组蔗糖偏好指数分别为 (68.80 ± 5.94)%、(68.00 ± 8.69)%,与 Control 组 (82.40 ± 6.45)% 相比,均显著下降 ($P < 0.001$)。

绝望行为变化如图 5B 中 TST 所示,第 1 次

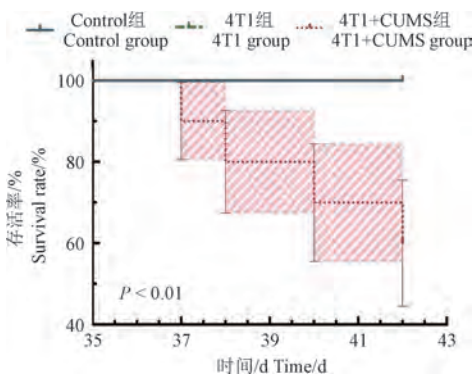


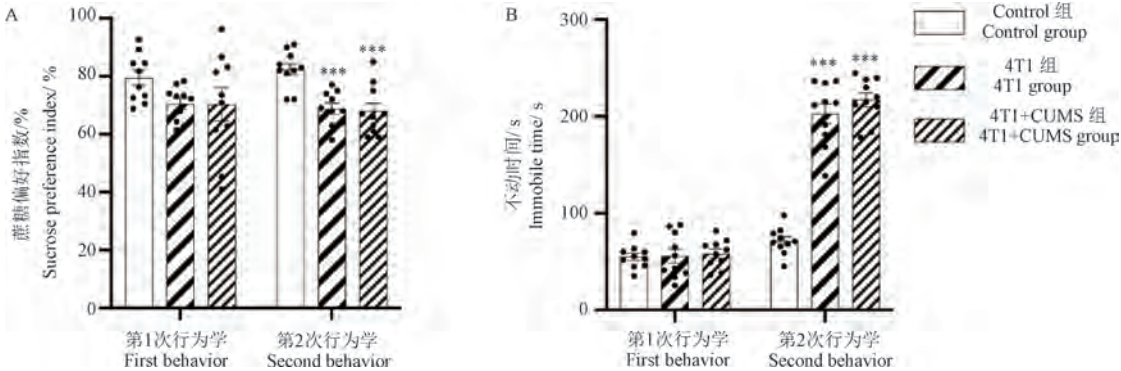
图4 各组小鼠生存曲线

Figure 4 Survival curves of mice in each group

行为学结果显示,与 Control 组相比,两模型组小鼠不动时间均无明显差异($P > 0.05$)。第 2 次行为学结果显示,4T1 组、4T1 + CUMS 组不动时间分别为 (202.70 ± 32.49)s、(217.10 ± 22.46)s,与 Control 组 (71.16 ± 13.98)s 相比,均显著增加 ($P < 0.001$)。

两次 SPT 和 TST 中两模型组之间均无统计学意义($P > 0.05$),可见抑郁程度相当。

自主活动变化如图 6 所示。第 1 次行为学结果显示,与 Control 组相比,两模型组小鼠中心运动总里程数均无明显差异($P > 0.05$)。第 2 次行为学结果显示,4T1 组、4T1 + CUMS 组中心运动总里程数分别为 (2437.00 ± 642.70)cm、(2348.00 ± 483.40)cm,与 Control 组 (4099.00 ± 1147.00)cm 相比均显著降低($P < 0.001$)。两次 OFT 中模型组之间无统计学意义($P > 0.05$),可见两种造模方式对活动能力影响差异不显著。



注:A:SPT 中蔗糖偏好指数;B:TST 中不动时间。

图5 SPT 与 TST 检测抑郁样行为

Note. A. Sucrose preference index in SPT. B. Immobility time in TST.

Figure 5 Depression-like behavior detected by SPT and TST

焦虑行为变化如图 7 所示。第 1 次行为学结果显示,与 Control 组相比,4T1 组和 4T1+CUMS 组小鼠开放臂停留时间百分比均无明显差异($P > 0.05$)。第 2 次行为学结果显示,与 Control 组相比,4T1 组和 4T1 + CUMS 组开放臂停留时间百

分比均有所降低,分别为 $(11.12 \pm 4.37)\%$ 、 $(9.04 \pm 4.39)\%$,4T1 + CUMS 组降低显著($P < 0.01$)。两次 EPM 中模型组之间无统计学意义($P > 0.05$),可见两种造模方式对焦虑程度影响无明显差异。

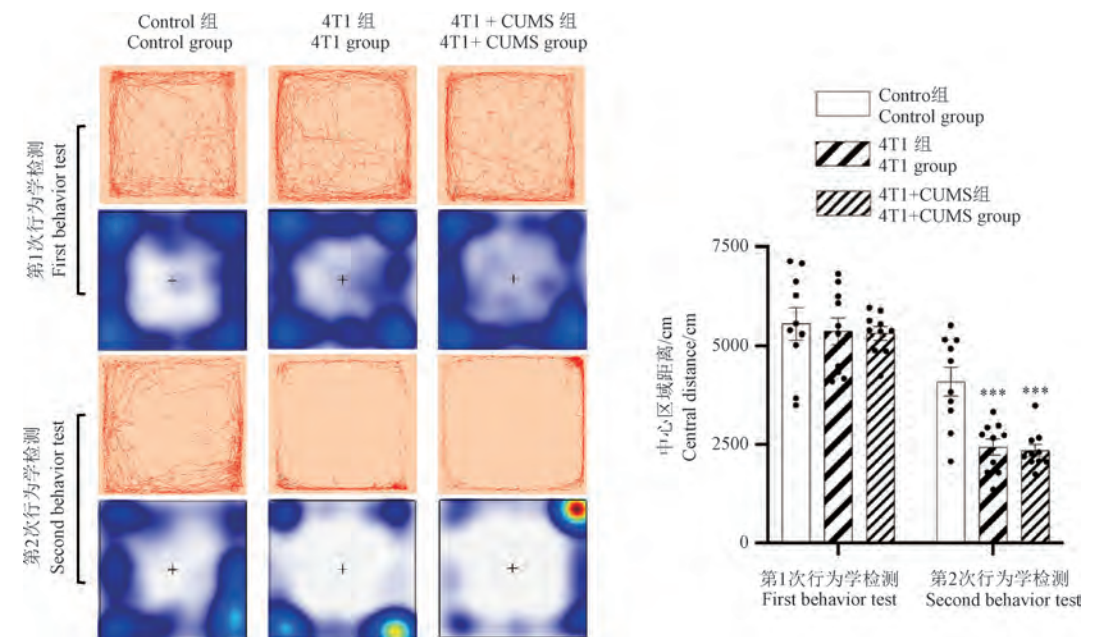
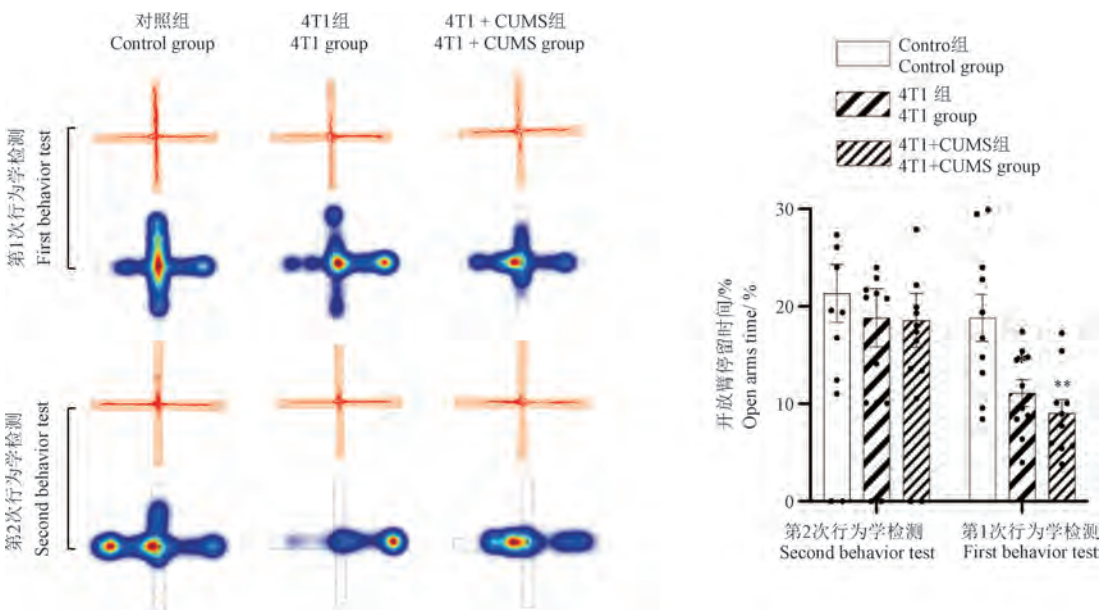


图 6 OFT 中水平运动总距离、运动轨迹
Figure 6 The total distance and trajectory of horizontal motion in the OFT

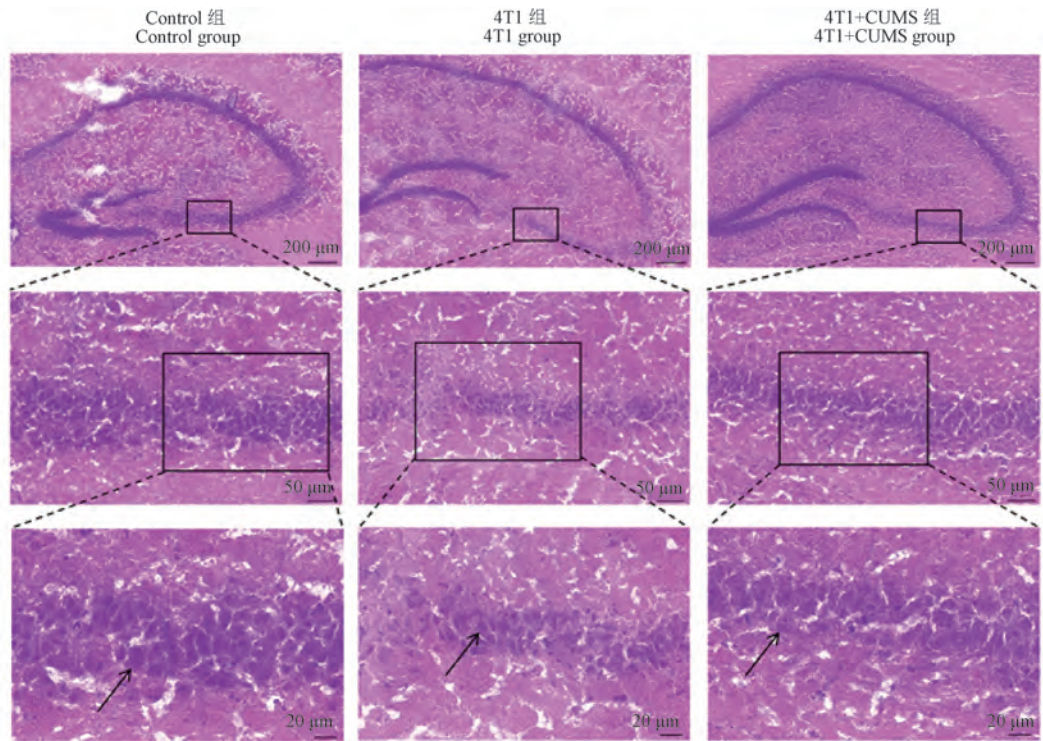


注:与 Control 组相比, ** $P < 0.01$ 。
图 7 EPM 中开放臂停留时间比例和运动轨迹
Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$.
Figure 7 Proportion of the dwell time and the trajectory of the open arm in the EPM

2.3 HE 染色观察各组小鼠海马组织病理形态改变

Control 组海马区神经元形态规则,大小正常,核仁清晰,排列整齐紧密;4T1 组与 4T1 +

CUMS 组均表现出海马区神经元细胞数量减少,形态不规则,细胞之间排列紊乱且间隙不清,部分核仁模糊,而两模型组之间细胞形态与数量差异无显著性,见图 8。



注:黑色箭头:神经元细胞;紫色核团:细胞核。
图 8 各组小鼠脑组织病理改变($n = 3$)

Note. Black arrows. Neuronal cells. Purple-stained nuclei. Cell nucleus.

Figure 8 Brain histopathological changes in mice in each group($n = 3$)

3 讨论

当前 CRD 的动物实验多采用肿瘤-抑郁复合模型,如 4T1 细胞接种联合 CRS、CORT、CUMS 等。其中 CRS 操作简单但刺激方式单一,小鼠对反复出现的同种刺激易产生适应性,具有不稳定性;CORT 造模周期短,方法简便,但直接影响激素水平,存在代谢紊乱等副作用;CUMS 虽造模周期较长,操作繁琐,但与人类抑郁症拟合度较高,模型稳定性强,是经典的抑郁动物模型^[11]。既往文献报道中,构建乳腺癌相关抑郁动物模型时较多联合 CUMS^[12-13],因此本实验也选择与联合 CUMS 的肿瘤-抑郁复合模型进行比较。临床上 CRD 出现在恶性肿瘤的诊断与治疗过程中,形成原因与机制均与单纯抑郁症存在差异,可能为肿瘤生长造成的脑功能改变,并非单纯外界应激刺

激或药物造成。现代研究表明,中枢系统外的肿瘤能够与中枢神经系统相互作用,通过神经信号的传递调节神经免疫网络^[14],改变肿瘤微环境及神经重塑^[15];抑郁可激活 IDO 信号通路从而促进肿瘤生长^[16];肠道菌群紊乱能引发炎症反应,促进乳腺癌细胞生长,又可通过脑肠轴到达中枢神经系统影响大脑功能,从而产生抑郁^[17-19],可见乳腺癌和抑郁之间存在相关性。虽然目前部分研究采用荷瘤模型联合 CUMS 构建肿瘤-抑郁复合模型,但无论先进行 CUMS 造模再接种细胞^[20],还是接种细胞后进行 CUMS 造模^[21],均不能很好的与临床乳腺癌相关抑郁的成因及表现相契合。

基于课题组前期研究结果发现,单纯接种 4T1 细胞的小鼠模型也能检测出抑郁表型,本研究拟进一步通过实验比较单纯接种 4T1 细胞和接

种 4T1 细胞联合 CUMS 两种乳腺癌抑郁模型的差异,探索出更适合乳腺癌 CRD 基础实验的动物模型。

本研究中模型组肿瘤体积在第 2 次行为学检测时为 1000 mm^3 左右,与 XIONG 等^[22]通过接种 4T1 细胞构建乳腺癌焦虑小鼠的造模时间和肿瘤负荷一致,排除因肿瘤过大导致小鼠活动能力受限引起的行为学误差。刘燕等^[23]通过接种 4T1 细胞联合 CRS 构建了乳腺癌合并抑郁小鼠模型,结果显示叠加 CRS 后小鼠肿瘤体积较单纯荷瘤组变大,且抑郁状态显著加重,而本研究中 4T1 + CUMS 组的肿瘤体积并未比 4T1 组大,两组在抑郁程度也并无差异,对此研究人员考虑可能由接种细胞数量不同所致肿瘤负荷差异引起,当肿瘤负荷过大时,小鼠肢体活动能力受到限制,从而影响行为学实验结果。

CRD 模型需满足临床中该类共病患者的症状表现,如食欲减弱、体质量减轻、快感缺失、行为绝望、活动减少、探索欲下降等。本实验通过 TST、SPT、OFT 和 EPM 观察小鼠行为学变化,发现 4T1 组具有抑郁表型,且抑郁程度与 4T1 + CUMS 组无明显差异。同时海马组织切片 HE 染色结果显示,4T1 组与 4T1 + CUMS 组小鼠均出现海马区神经元细胞数量减少、细胞排列疏松紊乱、核内空泡样改变明显、部分核仁模糊、细胞间隙增大等病理学改变,这与 YANG 等^[24]发现单独外周肿瘤细胞可以诱发海马功能障碍结果一致,可见肿瘤能通过影响大脑海马神经元从而产生抑郁,且这种影响并非在接种肿瘤细胞后即刻产生。本研究中第一次行为学检测时两模型组均未发现抑郁表型,第二次行为学检测时,4T1 组和 4T1 + CUMS 组小鼠肿瘤体积均在 1000 mm^3 左右,并伴随显著的快感缺失、行为绝望、自主活动减少和探索欲望降低等表现,即证明此时两模型组小鼠均可产生较稳定的抑郁表型。由于 4T1 组未接受外界应激刺激,其抑郁更多源于肿瘤对大脑的影响,与临床乳腺癌患者 CRD 病因相符合,而得到稳定的单纯荷瘤抑郁模型需满足以下条件:(1)接种细胞密度达到 $9 \times 10^6/\text{mL}$,接种剂量为 0.1 mL ;(2)肿瘤体积接近 1000 mm^3 ,造模持续 28 d。

此外,本次实验中 4T1 + CUMS 组出现了死

亡事件,与 4T1 组相比具有较高死亡率。由于该复合模型造模周期长,从第 28 天造模结束至初次发生死亡事件仅相差 8 d,对于一个研究模型而言,此治疗时间窗显然太短。本研究认为小鼠死亡的原因为 CUMS 的强烈刺激性,小鼠经过禁食、电击、束缚等刺激后会表现为食欲下降、精力减退,此时若叠加肿瘤因素会引起过度消耗甚至死亡。结合研究期间小鼠体质量变化和生存概率可见,模型组小鼠在实验后期出现明显体质量下降,而 4T1 组小鼠在 42 d 实验中保持了 0% 死亡率,为后续研究留下足够的时间窗。

综上所述,与较为常见 4T1 + CUMS 复合模型相比,单纯接种乳腺癌细胞的 4T1 模型具有以下优势:(1)从经济效益来看,与复合模型相比,单纯荷瘤操作简便,无需额外实验仪器与场地,成本投入较低,具有更高的性价比;(2)从实验效率来看,单纯荷瘤具有更低的死亡率,提高造模成功率;(3)从时间成本来看,单纯荷瘤造模成功后具有更久的“治疗窗”,为后续实验提供足够时间支持。相比之下,4T1 模型更加符合临床乳腺癌患者的 CRD 成因,有望为日后乳腺癌相关抑郁发病机制及药物研究提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] 中华中医药学会血液病分会,中国民族医药学会血液病分会,中国中西医结合肿瘤专业委员会,等. 肿瘤相关抑郁中医诊疗专家共识 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(1): 12-17.
China Association of Chinese Medicine Blood Disease Branch, Hematology Branch of Chinese Ethnic Medicine Association, Chinese Cancer Committee of Integrated Traditional and Western Medicine, et al. Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of cancer-related depression based on traditional Chinese medicine [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(1): 12-17.
- [2] MARINOVIC D A, HUNTER R L. Examining the interrelationships between mindfulness-based interventions, depression, inflammation, and cancer survival [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(5): 490-502.
- [3] 董青,李潇,吕丽媛,等. 恶性肿瘤中医维持治疗专家共识 [J/OL]. [2023-12-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3574.r.20231222.1459.009.html>.
DONG Q, LI X, LYU L Y, et al. Expert consensus on maintenance treatment of malignant tumors in traditional Chinese medicine [J/OL]. [2023-12-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3574.r.20231222.1459.009>.

- html.
- [4] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101–116.
- [5] CHEN J, LI J, QIAO H, et al. Disruption of IDO signaling pathway alleviates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behaviors and tumor progression in mice with breast cancer [J]. *Cytokine*, 2023, 162: 156115.
- [6] BAI Y, NIU L, SONG L, et al. Uncovering the effect and mechanism of Jiawei Xiaoyao Wan in treating breast cancer complicated with depression based on network pharmacology and experimental analysis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155427.
- [7] ZHU Q, HAN Y, HE Y, et al. Kaempferol improves breast cancer-related depression through the COX-2/PGE2 pathway [J]. *Front Biosci*, 2023, 28(11): 311.
- [8] HEPPNER G H, MILLER F R, SHEKHAR P M. Nontransgenic models of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2000, 2(5): 331–334.
- [9] LI H, XIANG Y, ZHU Z, et al. Rifaximin-mediated gut microbiota regulation modulates the function of microglia and protects against CUMS-induced depression-like behaviors in adolescent rat [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 254.
- [10] 李炳. 电针及药物抗抑郁的行为学及表观遗传学机制研究 [D]. 上海: 复旦大学; 2011.
- LI B. Changes of behavior and epigenetic modification during treatment of electro-acupuncture and antidepressant drugs [D]. Shanghai: Fudan University; 2011.
- [11] 吕金芝, 向玉仙, 王丹, 等. 抑郁症啮齿动物模型的建立及评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(5): 93–103.
- LYU J Z, XIANG Y X, WANG D, et al. Establishment and evaluation of rodent models of depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(5): 93–103.
- [12] HE B, GUO W, SHI R, et al. Ruyong formula improves thymus function of CUMS-stimulated breast cancer mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(1): 117164.
- [13] CHEN J, LI J, QIAO H, et al. Disruption of IDO signaling pathway alleviates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behaviors and tumor progression in mice with breast cancer [J]. *Cytokine*, 2023, 162: 156115.
- [14] 郭炳涛, 陈湘, 吴川清. 肿瘤微环境中神经免疫网络的研究进展 [J/OL]. [2023–10–26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20231025.1649.008.html>.
- GUO B T, CHEN X, WU C Q. Research progress of neuroimmune network in tumor microenvironment [J/OL]. [2023–10–26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20231025.1649.008.html>.
- [15] HANAHAN D, MONJE M. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 573–580.
- [16] YU S, LI W, TANG L, et al. Depression in breast cancer patients: immunopathogenesis and immunotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2022, 536: 215648.
- [17] SIDEBOTTOM A M, RODRIGUEZ T G, KARPIN J E, et al. Clinical and translational considerations for understanding depression and anxiety in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2021, 2021: 6689443.
- [18] SINAGRA E, UTZERI E, MORREALE G C, et al. Microbiota-gut-brain axis and its affect inflammatory bowel disease: pathophysiological concepts and insights for clinicians [J]. *World J Clin Cases*, 2020, 8(6): 1013–1025.
- [19] MOULTON C D, PAVLIDIS P, NORTON C, et al. Depressive symptoms in inflammatory bowel disease: an extraintestinal manifestation of inflammation? [J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 197(3): 308–318.
- [20] HE B, GUO W, SHI R, et al. Ruyong formula improves thymus function of CUMS-stimulated breast cancer mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(1): 117164.
- [21] 郭文琴, 许颢, 刘曦, 等. 慢性不可预知温和应激通过抑制 JAK2-PI3K 通路影响乳腺癌小鼠胸腺功能的实验研究 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2022, 46(4): 376–387.
- GUO W Q, XU X, LIU X, et al. Chronic unpredictable mild stress suppresses thymus function in breast cancer mice by inhibiting JAK2-PI3K pathway [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2022, 46(4): 376–387.
- [22] XIONG S Y, WEN H Z, DAI L M, et al. A brain-tumor neural circuit controls breast cancer progression in mice [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(24): e167725.
- [23] 刘燕, 彭梦薇, 刘高源, 等. 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(3): 36–44, 50.
- LIU Y, PENG M W, LIU G Y, et al. Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using 4T1 breast cancer cell inoculation combined with chronic restraint stress [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(3): 36–44, 50.
- [24] YANG M, KIM J, KIM J S, et al. Hippocampal dysfunctions in tumor-bearing mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 36: 147–155.

江民健,池恒愉,康玉蓉,等. 电针对糖尿病神经痛大鼠背根神经节 TRPV4 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 241-248.

JIANG M J, CHI H Y, KANG Y R, et al. Effect of electroacupuncture on the expression of TRPV4 in the dorsal root ganglion of diabetic neuropathic pain model rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 241-248.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.009

电针对糖尿病神经痛大鼠背根神经节 TRPV4 表达的影响

江民健¹, 池恒愉¹, 康玉蓉¹, 蒋永亮^{1,2,3}, 郑峻沐¹, 李斯苒¹, 周姝婷^{1,2,3},
刘伯宇^{1,2,3}, 邵晓梅^{1,2,3}, 方剑乔^{1,2,3*}, 何晓芬^{1,2,3*}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053; 2. 浙江省针灸神经病学研究重点实验室, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学针灸研究院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察电针(electroacupuncture, EA)对糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)大鼠体质量、空腹血糖、热痛阈、背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)瞬时受体电位香草蛋白 4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)的影响。**方法** 采用向腹腔注入链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)构建 DNP 大鼠模型。第 15 ~ 21 天, 在大鼠双侧足三里(ST36)和昆仑(BL60)穴予以每日一次 30 min 的 2 Hz EA 治疗。检测各组大鼠体质量、空腹血糖和热痛阈。采用免疫荧光检测大鼠 L4 ~ L6 DRG 中 TRPV4 和神经元(neuron, NeuN)共标的表达。检测 TRPV4 激动剂 GSK1016790A 对 EA 干预 DNP 大鼠体质量、空腹血糖、热痛阈的影响。**结果** 第 7 天后, 与正常组相比, 模型组体质量明显下降($P < 0.01$), 空腹血糖明显上升($P < 0.01$); 第 21 天, 与模型组相比, 模型 + 电针组热痛阈明显提高($P < 0.01$); 大鼠 L4 ~ L6 DRG 上的 TRPV4 和 NeuN 共标免疫荧光结果显示: 模型组的阳性细胞表达较正常组均显著升高($P < 0.01$), 模型 + 电针组大鼠 L4 ~ L6 DRG TRPV4 和 NeuN 共标的阳性细胞表达较模型组均显著下降($P < 0.01$); TRPV4 激动剂 GSK1016790A 可翻转 EA 对 DNP 大鼠热痛阈下调作用($P < 0.01$)。**结论** EA 能减轻链脲佐菌素诱导的 DNP, 其作用机制可能与其抑制 DRG 中 TRPV4 的表达有关。

【关键词】 糖尿病神经痛; 电针; 背根神经节; 瞬时受体电位香草蛋白 4

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0241-08

Effect of electroacupuncture on the expression of TRPV4 in the dorsal root ganglion of diabetic neuropathic pain model rats

JIANG Minjian¹, CHI Hengyu¹, KANG Yurong¹, JIANG Yongliang^{1,2,3}, ZHENG Yinmu¹, LI Siyi¹,
ZHOU Shuting^{1,2,3}, LIU Boyu^{1,2,3}, SHAO Xiaomei^{1,2,3}, FANG Jianqiao^{1,2,3*}, HE Xiaofen^{1,2,3*}

【基金项目】 浙江省自然科学基金项目 (ZCLY24H2701, LY22H270006), 国家中医药管理局科技司-浙江省共建项目重点项目 (GZY-ZJ-KJ-24073), 浙江中医药大学附属医院专项 (2022FSYYZZ09, 2024FSYYZY05)。

Funded by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (ZCLY24H2701, LY22H270006), Key Projects of Science and Technology Department of State Administration of Traditional Chinese Medicine-Zhejiang Province Co-Construction Project (GZY-ZJ-KJ-24073), Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine Special (2022FSYYZZ09, 2024FSYYZY05).

【作者简介】 江民健, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 针刺镇痛与免疫调节。Email: 20221111211255@zcmu.edu.cn

【通信作者】 何晓芬, 女, 博士, 高级实验员, 研究方向: 针刺镇痛与免疫调节。Email: zjhxfl986@163.com;

方剑乔, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针刺镇痛效应基础。Email: fangjianqiao7532@163.com。

* 共同通信作者

(1. Third Clinical Medical College, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Acupuncture Neurology, Hangzhou 310053, China; 3. Institute of Acupuncture and Moxibustion, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: HE Xiaofen. E-mail: zjhx1986@163.com; FANG Jianqiao. E-mail: fangjianqiao7532@163.com

[Abstract] Objective To explore the function of electroacupuncture (EA) on body mass, fasting blood glucose, heat pain threshold, and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in the dorsal root ganglia (DRG) of rats with diabetic neuropathic pain (DNP). **Methods** A DNP rat model was formed by intraperitoneally injecting the animals with STZ. From days 15 to 21, bilateral Zusanli and Kunlun points of the DNP rat model were treated with electroacupuncture once daily for 30 min. We then measured their body mass, fasting blood glucose, and heat pain threshold. The co-expression of TRPV4 and NeuN in the rat L4 ~ L6 DRG was detected by immunofluorescence. The effects of the TRPV4 agonist GSK1016790A on body mass, fasting blood glucose, and the heat pain threshold of DNP rats treated with electroacupuncture were detected. **Results** After the 7th day, body mass was significantly decreased ($P < 0.01$) and fasting glucose was significantly increased ($P < 0.01$) in the model group compared with the normal group. After the 21st day, compared with the model group, heat pain threshold of the model + electroacupuncture group was significantly higher ($P < 0.01$); the results of co-expression of TRPV4 and NeuN immunofluorescence on rat L4 ~ L6 DRG showed that: the expression of positive cells in the model group was significantly higher ($P < 0.01$) than that in the normal group, the co-expression of TRPV4 and NeuN positive cells in L4 ~ L6 DRG of rats in the model + electroacupuncture group was significantly lower ($P < 0.01$) than that in the model group. The TRPV4 agonist GSK1016790A can reverse the downregulation of thermal pain threshold induced by electroacupuncture in DNP rats ($P < 0.01$). **Conclusion** Electroacupuncture alleviated the DNP induced by STZ, and its mechanism may involve the inhibition of TRPV4 protein expression in the DRG.

[Keywords] diabetic neuropathic pain; electroacupuncture; dorsal root ganglia; transient receptor potential vanilloid 4

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

糖尿病神经痛 (diabetic neuropathic pain, DNP) 患者临床上症状常表现为烧灼样、电击样或针刺样等,对 DNP 患者的生活产生了负面的影响^[1]。DNP 目前尚缺乏有效有针对性的治疗方法。电针 (electroacupuncture, EA) 是一种结合中国传统医学中的针灸和现代电疗的治疗方式,在国际上也越来越受认可并被广泛使用。临床上,EA 治疗是一种绿色且有效缓解疼痛的手段,但其应用于临床 DNP 的治疗有待进一步拓展,因而需要进一步明确 EA 治疗 DNP 的作用机制^[2]。课题组前期研究表明低频 EA 可有效缓解 DNP 大鼠神经痛^[3],EA 可能通过抑制 DNP 大鼠脊髓背角小胶质细胞和星形胶质细胞活化缓解 DNP^[4-5],但 EA 对 DNP 的镇痛机制仍有待进一步探究与阐述。瞬时受体电位香草蛋白 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 是 TRP 家族中的一员^[6],先前的研究表明,TRPV4

的表达和功能可能与背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 慢性压迫、眶下神经慢性收缩损伤、紫杉醇和长春新碱治疗等引起的神经性疼痛有关^[7-12],也有研究初步表明其在 DRG 上的神经感觉神经元中表达变化参与 DNP 的调控^[13]。但目前尚未有相关研究探究 EA 缓解 DNP 是否与调控 DRG 的 TRPV4 表达有关。

故本研究观察 EA 对 DNP 大鼠的镇痛效应,同时观察 EA 对 DNP 大鼠 L4 ~ L6 DRG 中 TRPV4 阳性细胞表达的影响,并使用 TRPV4 激动剂进行进一步验证,旨在阐释 EA 治疗 DNP 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

从中国科学院上海实验动物中心【SCXK

【(沪)2022-0004】购入 6 ~ 8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量 (200 ± 10) g, 饲养于浙江中医药大学实验动物中心【SYXK (浙) 2021-0012】。饲养环境: 温度 $22 \sim 26$ °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 充足摄食和饮水, 12 h/12 h 昼夜交替光照, 适应性饲养 7 d 后开始实验。本实验所有方案经浙江中医药大学实验动物伦理委员会审批 (IACUC-20220425-06)。

1.1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (sigma, 货号: S0130); 兔抗 TRPV4 抗体 (GT, 货号: GTX54764); 小鼠抗 NeuN (Abcam, 货号: ab104224); 驴抗兔 488 二抗 (Jackson, 货号: 711-545-152); 驴抗小鼠 647 二抗 (Jackson, 货号: 715-605-150); GSK1016790A (sigma, 货号: G0798-10MG)。罗氏卓越型血糖仪 (德国 Roche Diagnostics GmbH, 产品编号: 04680464003); NX50 型冰冻切片机 (美国 Thermo, 序列号: S16111988); 35100 型冷热板痛觉测试仪 (意大利 Ugo Basile, 序列号: 0193U1211297); 蔡司 Axio Imager M2 研究级显微镜 (德国 Zeiss, 序列号: 3525002874); HANS-200E 型韩氏穴位神经刺激仪 (中国北京华卫产业开发公司, 序号: 200110513697)。

1.2 方法

1.2.1 造模方法及模型评价

造模方法参照本课题组已成功建立 DNP 的方法^[14], 即禁食 16 h, 以 65 mg/kg 的剂量腹腔注射 STZ, 柠檬酸缓冲液作为溶剂对照腹腔注射正常组。DNP 模型造模成功的标准为: 大鼠足底热痛阈下降 15% 以及尾静脉取血测量空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L^[15]。

1.2.2 分组

本实验分为两部分, 第一部分实验从 20 只健康雄性 SD 大鼠中随机选取 6 只作为正常组 (Control, $n = 6$), 剩余 14 只予以 STZ 注射造模, 造模成功的 12 只大鼠随机分为模型组 (DNP, $n = 6$), 模型 + 电针组 (DNP + EA, $n = 6$); 第二部分实验对 12 只健康雄性 SD 大鼠予以 STZ 注射造模, 造模成功的 10 只大鼠随机分为模型 + 电针 + 生理盐水组 (DNP + EA + NS, $n = 5$)、模型 + 电针 + GSK1016790A 组 (DNP + EA +

GSK1016790A, $n = 5$)。

1.2.3 空腹血糖和体质量测定

大鼠空腹血糖测量于造模前, 造模第 7、14、21 天禁食不禁水 8 h 后, 并用电子体重秤称量大鼠体质量。

1.2.4 EA 干预

第 15 天进行 EA 治疗。选用毫针 (0.25 mm $\times$ 13 mm), 以频率为 2 Hz, 强度 1 ~ 2 mA (前 15 min 用 1 mA, 后 15 min 用 2 mA) EA 干预双侧足三里穴和昆仑穴 (具体选穴参照《实验针灸学》)^[4], 每天每次 30 min, 连续 7 d。正常组和模型组大鼠仅予以相同固定。

1.2.5 TRPV4 激动剂 GSK1016790A 腹腔注射

第 15 天进行 GSK1016790A 腹腔注射。固定大鼠使其腹部朝上, 使用棉签蘸取 70% 乙醇擦拭腹部区域局部消毒, 选择下腹部两侧并避开膀胱位置, 在腹中线旁 0.5 cm 处以 45° 角刺入腹腔, 回抽针栓查看是否有血液或腹腔液, 确认未误入血管或其他器官后再缓慢注射 GSK1016790A (10 μ g/kg), 注射完毕后迅速拔出针头并用棉球轻压注射部位以防渗漏, 连续 7 d 注射。

1.2.6 热痛阈测定

大鼠热痛阈于造模前、造模第 7、14 和 21 天进行测定。参照相关同类研究方法测量热痛阈^[16]。将每只大鼠单独置于热板上 (52 ± 0.5) °C, 记录大鼠出现舔后足反应时所需时间, 即热缩足潜伏期。每间隔 30 min 测量, 重复 3 次, 统计平均热痛阈。单次热痛阈测量时长不超过 30 s, 以防止大鼠后足受伤。

1.2.7 免疫荧光检测大鼠 DRG TRPV4 和 NeuN 共标阳性细胞表达

造模后 21 d EA 后取大鼠 L4 ~ L6 DRG, 将组织切成厚度为 10 μ m 的冰冻切片, 切片用 5% 驴血清封闭 1 h, 加入兔抗 TRPV4 (1 : 100) 和小鼠抗 NeuN (1 : 600) 4 °C 下孵育过夜, 次日加入驴抗兔 488 二抗 (1 : 400) 和驴抗小鼠 647 二抗 (1 : 400) 孵育 1 h (避光), 用抗荧光淬灭剂 (含 DAPI) 进行封片, 用显微镜成像后再用 Image J 1.53U 图像分析统计。

1.3 统计学分析

数据处理和分析软件: GraphPad Prism 8.0。实验数据采用平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。

免疫荧光统计使用单因素方差分析;组间采用 Dunnett's 多重比较检验;体质量、空腹血糖和热痛阈使用双因素方差分析;组间采用 Tukey's 多重比较检验;以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

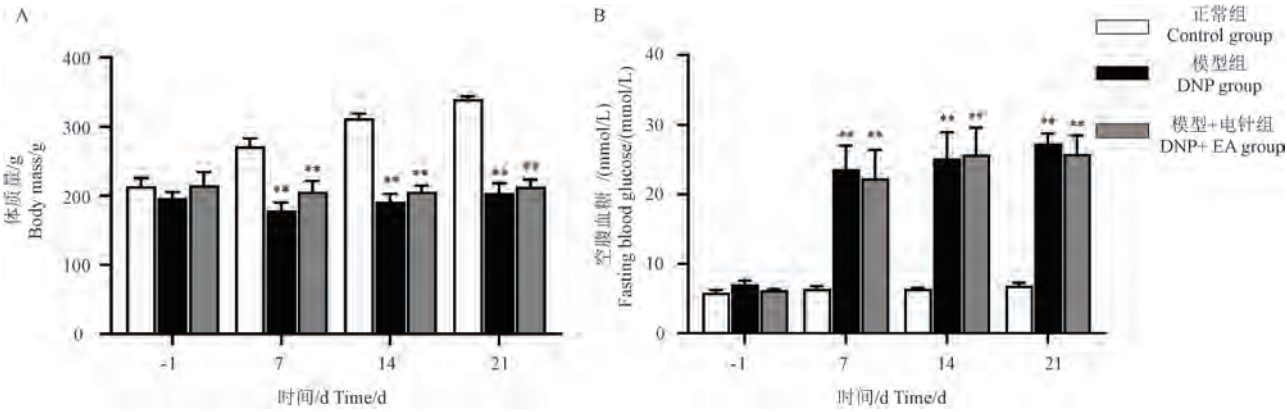
2.1 体质量、空腹血糖变化

腹腔注射 STZ 前,不同组大鼠体质量和空腹血糖无显著性差异。腹腔注射 STZ 后第 7 天,模型组及模型 + 电针组大鼠体质量相较于正常组

显著下降($P < 0.01$),模型组及模型 + 电针组大鼠空腹血糖较正常组显著升高($P < 0.01$)。见图 1。

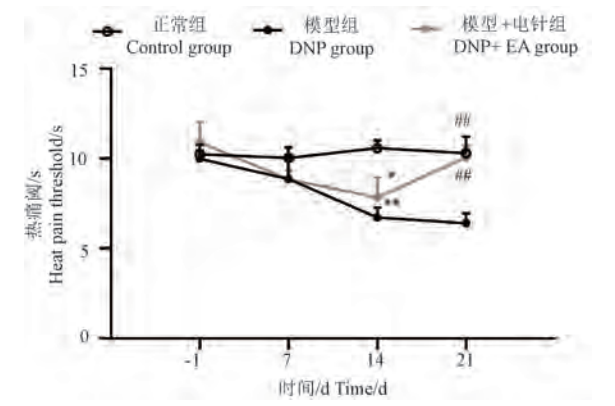
2.2 热痛阈变化

腹腔注射 STZ 前至腹腔注射 STZ 后第 7 天,不同组大鼠足底热痛阈值差异无显著性。腹腔注射 STZ 后第 14 天,模型组及模型 + 电针组大鼠热痛阈相较于同期正常组明显下降($P < 0.05$);腹腔注射 STZ 后第 21 天,模型 + 电针组大鼠热痛阈相较于同期模型组上升($P < 0.01$)。见图 2。



注:A:体质量;B:空腹血糖;与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)
Figure 1 体质量和血糖变化($n = 6$)
Note. A. Body mass. B. Fasting blood glucose. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Changes of body mass and fasting blood glucose($n = 6$)



注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。(下同)
Figure 2 热痛阈变化($n = 6$)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes of heat pain threshold($n = 6$)

2.3 大鼠 L4 ~ L6 DRG TRPV4 和 NeuN 共标阳性细胞表达

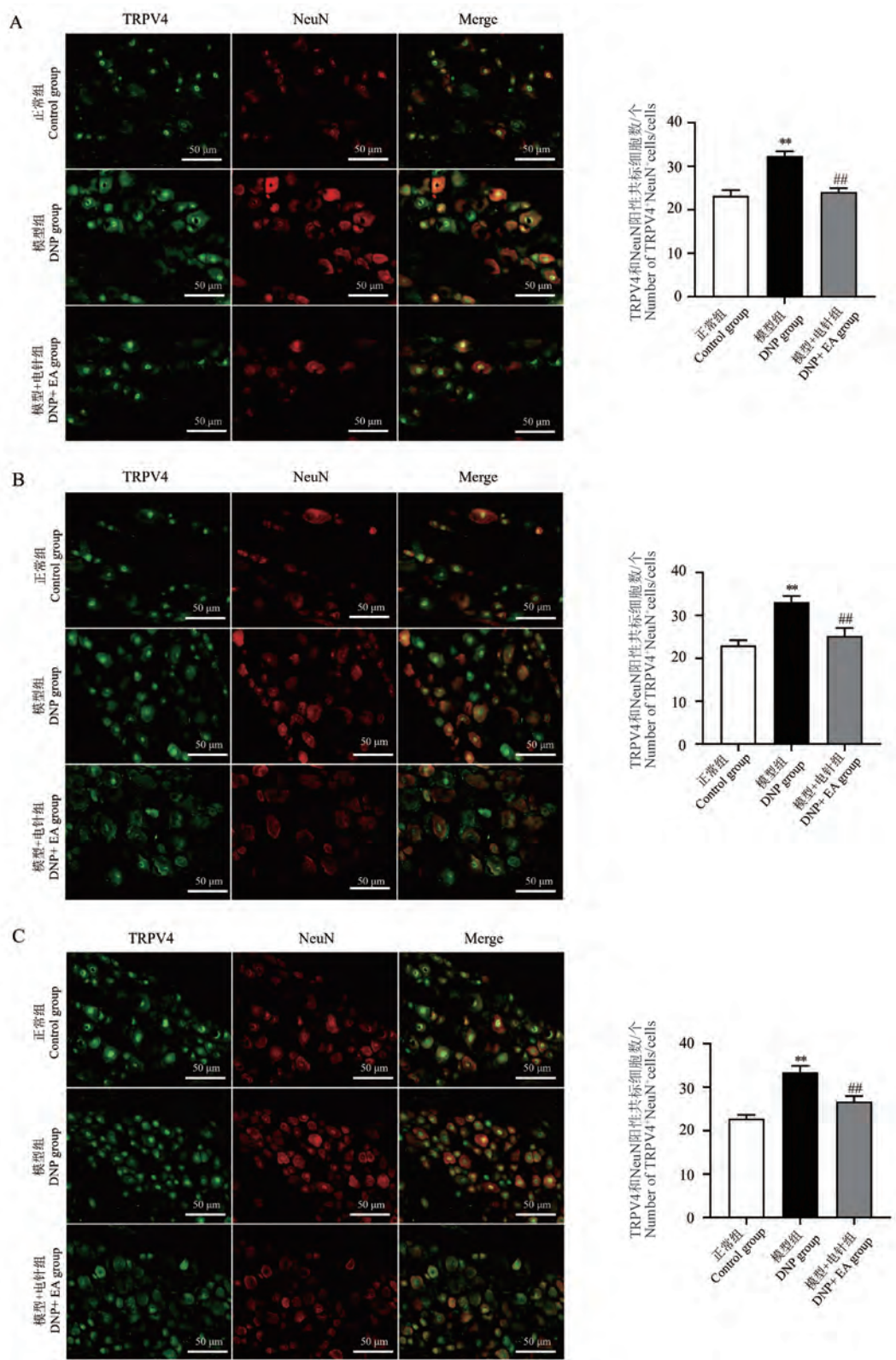
模型组大鼠 L4 ~ L6 DRG 组织中 TRPV4 和 NeuN 共标阳性细胞数相较于正常组显著升高($P < 0.01$);模型 + 电针组大鼠 L4 ~ L6 DRG 中 TRPV4 和 NeuN 共标阳性细胞数相较于模型组显著降低($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 TRPV4 激动剂对 EA 干预 DNP 大鼠体质量、空腹血糖变化的影响

各时间点各组大鼠体质量、空腹血糖差异无显著性,表明 TRPV4 激动剂 GSK1016790A 对 EA 干预 DNP 大鼠体质量、空腹血糖变化的无影响。见图 4。

2.5 TRPV4 激动剂对 EA 干预 DNP 大鼠热痛阈变化的影响

腹腔注射 STZ 前到注射后第 14 天时,同时期



注:A;L4 DRG 免疫荧光代表图和统计图;B:L5 DRG 免疫荧光代表图和统计图;C:L6 DRG 免疫荧光代表图和统计图。

图 3 大鼠 L4 ~ L6 DRG 中 TRPV4 和 NeuN 免疫荧光结果($n = 3$)

Note. A. L4 DRG immunofluorescence representative figure and statistical figure. B. L5 DRG immunofluorescence representative figure and statistical figure. C. L46 DRG immunofluorescence representative figure and statistical figure.

Figure 3 Immunofluorescence results of TRPV4 and NeuN in rat L4 ~ L6 DRG($n = 3$)

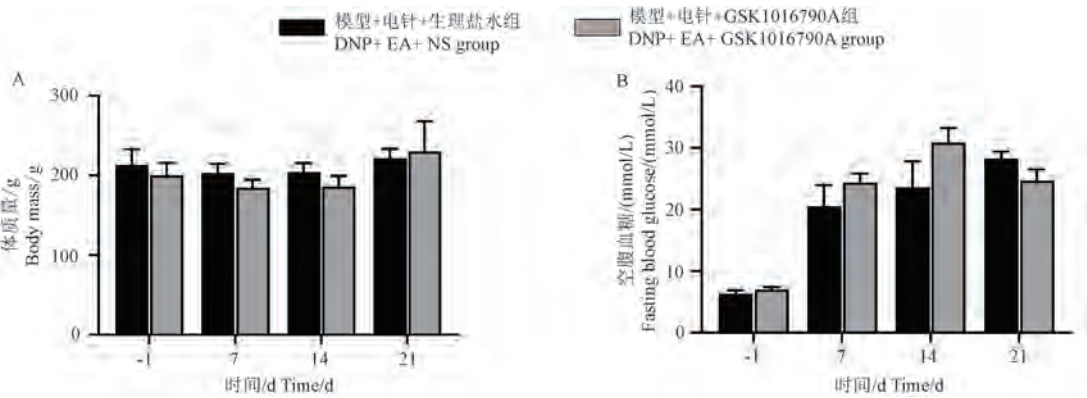
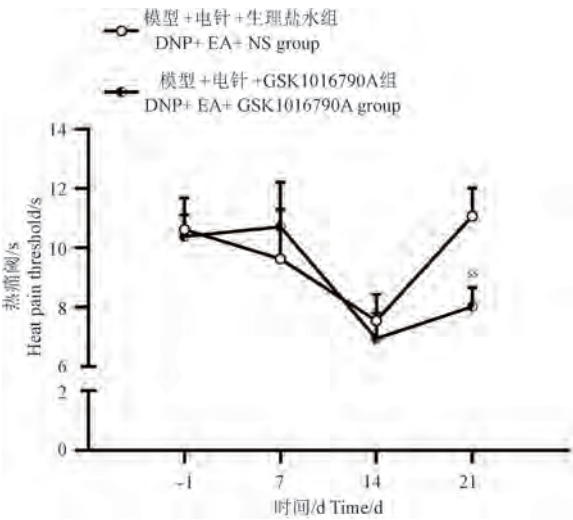


图 4 体质量和血糖变化($n = 5$)

Figure 4 Changes of body mass and fasting blood glucose of the rats($n = 5$)

各组大鼠热痛阈差异无显著性。第 21 天时,模型 + 电针 + GSK1016790A 组大鼠热痛阈相较于模型 + 电针 + 生理盐水组明显下降($P < 0.01$)。见图 5。



注:与模型 + 电针 + 生理盐水组相比, ^{ss} $P < 0.01$ 。

图 5 热痛阈比较($n = 5$)

Note. Compared with DNP + EA + NS group, ^{ss} $P < 0.01$.

Figure 5 Comparison of heat pain threshold($n = 5$)

3 讨论

DNP 属糖尿病常见并发症之一,临床上患者可出现四肢痛觉过敏、麻木等症状。目前尚无针对 DNP 的特异性缓解药物,且目前的治疗方法常伴有严重的副作用^[17-18]。EA 可有效缓解多种慢性疼痛^[19-21],相较于传统镇痛药物,副作用更小。本课题组前期已经成功建立了 DNP 大鼠模型^[22],为探究 EA 治疗 DNP 的机制提供了保障。已有研究证明 EA 刺激足三里、昆仑穴对 DNP 大

鼠有良好的镇痛效果^[23-24],且 2 Hz EA 的治疗作用优于 100 Hz EA^[3]。故本研究采用 2 Hz EA 干预探究 EA 治疗 DNP 的外周镇痛机制。研究结果表明 EA 对体质量和空腹血糖无影响,EA 能显著提高大鼠的热痛阈,即可缓解大鼠 DNP。

DRG 是感觉传导和调节的关键结构,更是疼痛传递的重要结构^[25]。在机体受到伤害性刺激时,DRG 中感觉神经元会发生超敏反应和过度兴奋,这种外周敏化现象对慢性疼痛的发生和维持至关重要。DRG 作为处理疼痛信息的“起搏点”,DRG 神经元上受体表达变化、离子通道变化均参与神经痛过程^[26]。以往研究已经发现了 DRG 神经元中参与疼痛产生和转导的一系列离子通道,其中与温度感觉最相关的是温度敏感瞬时受体电位通道 (thermosensitive transient receptor potential channels, thermoTRPs); thermoTRPs 中 TRPV1 ~ TRPV4 是与热伤害刺激相关的,TRPA1 和 TRPV8 是对冷伤害刺激敏感的^[27-28]。本课题组前期研究已经阐述了 EA 能通过下调 DNP 大鼠 DRG 和脊髓背角中 TRPV1 来提高 DNP 大鼠的热痛阈进而缓解 DNP^[29],为了进一步探究 thermoTRPs,通过查阅文献发现 TRPV4 在热疼痛超敏反应的产生和维持中起着重要作用,神经性疼痛发生时 DRG 神经元中 TRPV4 的表达增多^[6]。本研究结果显示,STZ 注射可诱导 DNP 大鼠 DRG 中 TRPV4 的阳性细胞表达增多,与以往的结果相一致^[30],EA 干预在缓解 DNP 大鼠疼痛的同时也下调了 DNP 大鼠 DRG 中 TRPV4 的表达。药理学结果显示激动剂 GSK1016790A 可选择性激活 TRPV4 通道^[31]。故第二部分结合

TRPV4 激动剂 GSK1016790A 来验证 EA 是否通过下调 TRPV4 表达缓解 DNP, 研究结果表明注射 TRPV4 激动剂 GSK1016790A 可部分逆转 EA 对 DNP 大鼠的镇痛作用, 但不影响其体质量和空腹血糖。

综上所述, 本研究成功建立了大鼠 DNP 模型, 初步探究了 EA 在 DNP 大鼠模型中镇痛的效果及其机制, 证明了 EA 可能是通过下调 DNP 大鼠 DRG 中 TRPV4 的表达以改善 STZ 诱导的大鼠 DNP。本研究初步阐明了 EA 治疗 DNP 的部分机制, 有助于推动 EA 在 DNP 临床治疗中的应用。

参 考 文 献 (References)

- [1] VAN ACKER K, BOUHASSIRA D, DE BACQUER D, et al. Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics [J]. *Diabetes Metab*, 2009, 35(3): 206–213.
- [2] AHN A C, BENNANI T, FREEMAN R, et al. Two styles of acupuncture for treating painful diabetic neuropathy—a pilot randomised control trial [J]. *Acupunct Med*, 2007, 25(1/2): 11–17.
- [3] HE X F, WEI J J, SHOU S Y, et al. Effects of electroacupuncture at 2 and 100 Hz on rat type 2 diabetic neuropathic pain and hyperalgesia-related protein expression in the dorsal root ganglion [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017, 18(3): 239–248.
- [4] 陈芷羽, 胡群祺, 马益琪, 等. 电针对 STZ 诱导的糖尿病神经痛大鼠脊髓小胶质细胞和 P2X4 的干预作用 [J]. *上海针灸杂志*, 2022, 41(6): 604–609.
CHEN Z Y, HU Q Q, MA Y Q, et al. Intervening effect of electroacupuncture on microglia and P2X4 in the spinal cord of rats with STZ-induced diabetic neuropathy [J]. *Shanghai J Acupunct Moxibustion*, 2022, 41(6): 604–609.
- [5] 王涵芝, 瞿思颖, 邵昭霞, 等. 电针对糖尿病神经痛大鼠脊髓星形胶质细胞活化的影响 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(6): 540–545.
WANG H Z, QU S Y, TAI Z X, et al. Effects of electroacupuncture on activation of astrocyte in spinal cord in rats with diabetic neuropathic pain [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2019, 43(6): 540–545.
- [6] FAN X, WANG C, HAN J, et al. Role of TRPV4-P2X7 pathway in neuropathic pain in rats with chronic compression of the dorsal root ganglion [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(8): 2143–2153.
- [7] ALESSANDRI-HABER N, DINA O A, JOSEPH E K, et al. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(5): 1046–1057.
- [8] BOEHMERLE W, HUEHNCHEN P, LEE S L L, et al. TRPV4 inhibition prevents paclitaxel-induced neurotoxicity in preclinical models [J]. *Exp Neurol*, 2018, 306: 64–75.
- [9] COSTA R, BICCA M A, MANJAVACHI M N, et al. Kinin receptors sensitize TRPV4 channel and induce mechanical hyperalgesia: relevance to paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2150–2161.
- [10] MOORE C, GUPTA R, JORDT S E, et al. Regulation of pain and itch by TRP channels [J]. *Neurosci Bull*, 2018, 34(1): 120–142.
- [11] QU Y J, ZHANG X, FAN Z Z, et al. Effect of TRPV4-p38 MAPK pathway on neuropathic pain in rats with chronic compression of the dorsal root ganglion [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 6978923.
- [12] ZHANG Y, SU Q, LIAN Y, et al. Botulinum toxin type A reduces the expression of transient receptor potential melastatin 3 and transient receptor potential vanilloid type 4 in the trigeminal subnucleus caudalis of a rat model of trigeminal neuralgia [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(10): 735–740.
- [13] DIAS F C, ALVES V S, MATIAS D O, et al. The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates mechanical allodynia in diabetic mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 856: 172408.
- [14] 胡群祺, 马益琪, 费雪瑜, 等. 电针与预电针对糖尿病神经痛大鼠痛觉敏化及脊髓背角 P2X7R 表达的影响 [J]. *中国针灸*, 2022, 42(2): 173–178.
HU Q Q, MA Y Q, FEI X Y, et al. Effect of electroacupuncture and pretreatment of electroacupuncture on pain sensitization and expression of P2X7R in spinal dorsal horn in rats with diabetic neuropathic pain [J]. *Chin Acupunct Moxibustion*, 2022, 42(2): 173–178.
- [15] 郭欣, 赖薇, 李艳华, 等. 磷脂酶 Cε1 在 1 型糖尿病大鼠病理性神经痛中的作用初探 [J]. *昆明医科大学学报*, 2021, 42(2): 23–28.
GUO X, LAI W, LI Y H, et al. Role of phospholipase C epsilon 1 in neuropathic pain of rats with type 1 diabetes [J]. *J Kunming Med Univ*, 2021, 42(2): 23–28.
- [16] INALTEKIN A, KIVRAK Y. Evaluation of the effect of vortioxetine on pain threshold by hot-plate test in mice [J]. *Noro Psikiyatr Ars*, 2021, 58(4): 274–277.
- [17] SCHREIBER A K, NONES C F, REIS R C, et al. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment [J]. *World J Diabetes*, 2015, 6(3): 432–444.
- [18] CALLAGHAN B C, CHENG H T, STABLES C L, et al.

- Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments [J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(6): 521-534.
- [19] HE Y, GUO X, MAY B H, et al. Clinical evidence for association of acupuncture and acupressure with improved cancer pain: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(2): 271-278.
- [20] GAO F, XIANG H C, LI H P, et al. Electroacupuncture inhibits NLRP3 inflammasome activation through CB2 receptors in inflammatory pain [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 67: 91-100.
- [21] 李晓洁, 尹诚语, 郑小莉, 等. 电针对复杂性区域疼痛综合征 I 型大鼠模型局部组织氧化应激反应的干预作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 593-601.
- LI X J, YIN C Y, ZHENG X L, et al. Intervention of electroacupuncture on oxidative stress response from local tissues of a CRPS-I rat model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(5): 593-601.
- [22] 瞿思颖, 王涵芝, 胡群祺, 等. 电针对糖尿病神经痛模型大鼠痛觉敏化及脊髓小胶质细胞 BDNF 表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 307-313.
- QU S Y, WANG H Z, HU Q Q, et al. Effects of electroacupuncture on pain sensitization and BDNF expression in spinal microglia in rats with diabetic neuropathic pain [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 307-313.
- [23] 鲁义, 甘英, 刘栋, 等. 电针足三里穴治疗糖尿病周围神经痛的作用机制探索 [J]. *中医临床研究*, 2023, 15(35): 79-83.
- LU Y, GAN Y, LIU D, et al. The action mechanism of electroacupuncture at the Zusanli point on treating diabetic peripheral neuralgia [J]. *Clin J Chin Med*, 2023, 15(35): 79-83.
- [24] 邵昭霞, 费雪瑜, 瞿思颖, 等. 电针对糖尿病神经痛大鼠脊髓背角 NF- κ B p65 蛋白的干预作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(1): 43-48.
- TAI Z X, FEI X Y, QU S Y, et al. Intervention effect of electroacupuncture on NF- κ B p65 at spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathic pain rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(1): 43-48.
- [25] HOGAN Q H. Labat lecture: the primary sensory neuron: where it is, what it does, and why it matters [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2010, 35(3): 306-311.
- [26] KRAMES E S. The dorsal root ganglion in chronic pain and as a target for neuromodulation: a review [J]. *Neuromodulation*, 2015, 18(1): 24-32.
- [27] CORTRIGHT D N, SZALLASI A. TRP channels and pain [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(15): 1736-1749.
- [28] TOMINAGA M, CATERINA M J. Thermosensation and pain [J]. *J Neurobiol*, 2004, 61(1): 3-12.
- [29] MA Y Q, HU Q Q, KANG Y R, et al. Electroacupuncture alleviates diabetic neuropathic pain and downregulates p-PKC and TRPV1 in dorsal root ganglions and spinal cord dorsal horn [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 3333563.
- [30] CUI Y Y, LI M Y, LI Y T, et al. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid 4 in the dorsal root ganglion and spinal cord of diabetic rats with mechanical allodynia [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 162: 30-39.
- [31] JIN M, WU Z, CHEN L, et al. Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16713.

[收稿日期] 2024-08-10

刘子轩,霍清,孙雅煊,等. 抑郁症动物模型的建立及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 249-258.

LIU Z X, HUO Q, SUN Y X, et al. Development of an animal model of depression and evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 249-258.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.010

抑郁症动物模型的建立及评价方法研究进展

刘子轩,霍清,孙雅煊,戴雪伶,李昕*

(北京联合大学生物化学工程学院,北京 100191)

【摘要】 抑郁症是一种常见的慢性精神疾病,抑郁症动物模型被广泛应用于抑郁症发病机制的研究和抗抑郁新药的研发,其模拟人类抑郁症状的同一性和可靠性会直接影响研究结果。然而,目前还尚未发现与人类抑郁症发病完全契合的动物模型,阻碍了对抑郁症的深入研究。然而通过采用科学、合理的造模和评价方法,能够在较大程度上模拟抑郁症的病理状态,为深入理解抑郁症的发病机制和进一步研发有效的抗抑郁药物提供基础。本文旨在通过综述几种常用的动物抑郁模型及行为测试方法,为研究者提供参考。

【关键词】 抑郁症;动物模型;发病机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0249-10

Development of an animal model of depression and evaluation methods

LIU Zixuan, HUO Qing, SUN Yaxuan, DAI Xueling, LI Xin*

(College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Corresponding author: LI Xin. E-mail: lixinenglish@126.com

【Abstract】 Depression is a common chronic mental illness. Animal models of depression are widely used to study the pathogenesis of depression as well as in the development of new antidepressant drugs. The consistency and reliability of animal models of depression to simulate human depressive symptoms directly affect the study result. However, at present, no animal models have been found that are completely consistent with the onset of human depression, which hinders the in-depth study of depression. By using scientific and reasonable modeling and evaluation method, the pathological state of depression can still be simulated to a large extent, providing a basis for further in-depth research of the pathogenesis of depression and the development of effective antidepressant drugs. This paper aims to provide a reference for researchers by reviewing several commonly used animal models and behavioral tests of depression.

【Keywords】 depression; animal model; molecular mechanism

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

抑郁症又称抑郁障碍,是一种情感性精神障碍,其核心特征表现为显著而持久的情绪低

落^[1]。患者常伴随兴趣丧失、思维迟缓、自我评价降低、食欲改变和睡眠障碍等多种症状^[2]。随

【基金项目】 国家自然科学基金 (11975048), 北京联合大学校级科研项目 (ZK10202204), 北京联合大学校级教改项目 (JY2023Y008)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (11975048), the Academic Research Projects of Beijing Union University (ZK10202204), Education Reform Project of Beijing Union University (JY2023Y008).

【作者简介】 刘子轩,男,硕士,研究方向:生物活性物质的发掘及作用机理。Email:1638187678@qq.com

【通信作者】 李昕,女,硕士,讲师,研究方向:活性物质功效。Email: lixinenglish@126.com

着现代生活节奏的加快以及近年来新冠肺炎疫情的来袭,人们在自身健康、生活以及学习等方面的压力增加,患抑郁症的风险也在逐年升高,已成为世界第四大疾病^[3]。抑郁症动物模型与抑郁症患者需要具有相同的发病机制,目前被广泛认可的抑郁症发病机制有如下四种:(1)下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)轴假说:外界应激导致 HPA 轴过度兴奋并引起大脑前额叶皮质和海马区域的神经细胞发生萎缩或凋亡,促使糖皮质激素释放过度,糖皮质激素受体表达降低,不能正常进行其负反馈调节,从而导致学习、记忆和情绪发生改变^[4];(2)单胺类神经递质假说:脑内 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)等神经递质含量不足或功能缺陷可导致抑郁^[5];(3)脑源性营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)假说:BDNF 参与神经元的生长增殖以及神经传递等生命活动,在多数抑郁症患者的大脑中,BDNF 的含量均低于正常水平^[6];(4)炎症因子假说:抑郁症的神经发生减少和神经变性是由炎症、细胞介导的免疫激活及其长期后遗症引起的,应激导致中枢神经系统中促炎因子表达量增加以及炎症相关通路激活水平增加^[7]。

尽管目前尚不清楚研究人员是否能够根据在动物身上观察到的表现来确定抑郁症的生物学机制,但通过利用适当的标准和方法,抑郁症模型仍然可以在很大程度上描述类似的分子变化和发病机制^[8]。

1 改变生物学因素所致模型

1.1 利血平诱导抑郁模型

利血平是一种吲哚生物碱,能够溶于脂肪和有机溶剂,因此利血平可以穿过血脑屏障并减慢神经系统的活动,导致心率下降、心输出量减少、外周阻力降低和血压降低,影响心血管系统、中枢神经系统和胃肠道^[9]。利血平抑郁模型代表了抑郁症的第一个神经学模型,应用于许多与抑郁症相关的研究^[10]。研究表明,利血平能够与儿茶酚胺储存囊泡结合,并通过抑制囊泡单胺转运蛋白-2 阻断肾上腺素能的神经传递,从而阻断了神经递质的储存过程,触发了神经递质的氧化代

谢,产生自由基,引起海马区兴奋性和血液皮质醇水平的增加^[9,11]。上睑下垂、僵住症和体温过低是用于表征利血平诱导啮齿类动物抑郁症的指标,并且可以较为容易地进行观测^[12]。还有研究基于斑马鱼建立利血平抑郁模型,采用三维视频跟踪系统检测斑马鱼在新型水箱中的游泳行为状态,发现利血平给药后的斑马鱼表现出长期抑郁症状,包括全身皮质醇升高、社交退缩和运动迟缓^[13]。

利血平抑郁模型可分为急性模型和慢性模型。冯飞等^[14]通过腹腔注射大鼠 2、4、6 mg/kg 利血平建立急性抑郁模型,于注射后 1 ~ 2 h 通过旷场实验评价不同剂量对大鼠自发探索能力的影响,结果表明 4 mg/kg 为利血平建立急性抑郁模型的最佳剂量。ANTKIEWICZ-MICHALUK 等^[15]通过每天 1 次腹腔注射给予实验大鼠 0.2 mg/kg 利血平,持续 14 d,于第 14 天注射后 2 h 进行强迫游泳实验(forced swimming test, FST),其不动时间相较于空白对照组显著提升,一定程度上表明慢性抑郁模型建立成功。

该模型中的抑郁情况可以通过预先服用抗抑郁药物而发生逆转,是一种能够评估抗抑郁药物效果的潜在抑郁造模方法^[15]。近年来,许多报道研究了不同抗抑郁药物对利血平诱导的抑郁模型的影响:利血平模型小鼠服用芦丁 14 d,每天 1 次,表现出抗抑郁作用,这种作用是通过增加大脑皮质和海马区的 5-HT、NE 和 DA 水平来实现的,芦丁的抗氧化和血管扩张特性也可能有助于其抗抑郁特性^[16]。此外,舍曲林也能够降低利血平诱导斑马鱼皮质醇的水平,抑制 5-HT 的再摄取,行为学上表现为抑郁斑马鱼颜色偏好和运动探索能力的恢复^[17]。

利血平诱导模型能够区分普通抗抑郁药和其他精神活性药物的药理作用且模型建立耗时较少^[18]。但该模型与个体抑郁的发病过程并不一致,可能会降低后续实验结果的准确性。一般来说,人类抑郁症状的发生与长期压力或精神负担有关^[19]。此外,利血平作用的针对性较差,易产生假阳性反应,如 DA、苯丙胺具有拮抗利血平的作用。为此,有研究采用利血平和氢化可的松药物联用降低假阳性干扰,提高模型可靠性,这为药物诱导抑郁模型提供了新的思路^[20]。

1.2 皮质酮 (corticosterone, CORT) 诱导抑郁模型

CORT 是啮齿类动物中一种重要的糖皮质激素。当机体受到刺激时,HPA 轴高度兴奋,分泌大量糖皮质激素。研究表明,高浓度的 CORT 能够与海马糖皮质激素受体结合从而刺激细胞电压门控 Ca^{2+} 通道和 N-甲基天冬氨酸受体,损害海马神经元,引起细胞凋亡,从而导致焦虑、抑郁等情绪疾病发生^[21]。长期暴露于外源性 CORT 会损害与应激相关的特定大脑区域,如海马体和前额叶皮层,导致神经发生和树突分支减少。成体海马神经发生 (adult hippocampal neurogenesis, AHN) 能够将神经干细胞转化为海马齿状回 (dentate gyrus, DG) 的成熟神经元,与抑郁行为密切相关,而 CORT 能够显著降低 AHN 水平^[22]。慢性 CORT 能够诱导 DG 中过度活跃的神经元自噬,可能是通过增加自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, ATG5) 的表达并导致神经元中 BDNF 的降解^[23]。房鑫鑫等^[24]使用 RNA 干扰敲除神经元中的 ATG5 来抑制 CORT 诱导小鼠 DG 中过度活跃的神经元自噬,结果表明,敲除 ATG5 可以逆转 BDNF 和 AHN 表达的降低,发挥抗抑郁作用。

该模型通常采用 20 mg/kg 的 CORT 给予小鼠,给药方式为皮下注射,每天 1 次,持续 3 ~ 4 周。也有研究使用不同浓度的 CORT 溶液替代饮水,例如 25 mg/L 的皮质酮半琥珀酸酯水溶液,持续喂养 21 d 来制备抑郁模型^[24]。

磷酸肌醇三激酶 (human phosphoinositide-3 kinase, PI3K) 与突触可塑性、学习和记忆以及抑郁程度有关,其活化可介导苏氨酸蛋白激酶 (protein kinase B, Akt) 磷酸化触发糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β) 活性,从而调节 β -连环蛋白 (β -catenin) 的表达。活化的 Akt 可以诱导促凋亡蛋白的泛素化和水解,从而抑制细胞凋亡。此外,活化的 Akt 还可以促进核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-related factor 2, Nrf2) 的核转录,核内 Nrf2 可以与抗氧化反应元件结合,随后产生一系列抗氧化酶,这些抗氧化酶可以进一步清除活性氧,以保护细胞免受活性氧诱导的凋亡^[25-27]。PI3K/Akt 是多种细胞增殖、存活和分化的重要信号通路,

在调节细胞凋亡中也起着至关重要的作用。赵凡等^[28]发现,黄芩苷能够显著改善 CORT 小鼠的抑郁样行为,促进 DG 发育,从而逆转了神经毒性引起的海马神经元抑郁样病理变化,其机制可能与激活 PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin 通路相关。SUN 等^[29]发现芍药根精油可以上调 CORT 诱导的小鼠海马神经元中 PI3K 和 Akt 的磷酸化,通过 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路对海马神经元发挥抗凋亡作用,缓解 CORT 小鼠的抑郁症状。

该模型具有简单易行、周期短等优点。但长期注射外源性 CORT 可能会对实验动物的身体健康产生一定的副作用,如体质量减轻和免疫力下降等,造模时需要注意实验动物的健康状况。此外,CORT 可能会诱发或加重感染,导致消化系统及神经系统失调,其结果可能会对强迫游泳和旷场实验造成一定干扰,也可通过 CORT 与其他药物联用降低副作用,其联用作用机制则需要进一步研究。

1.3 嗅球 (olfactory bulb, OB) 切除术诱导抑郁模型

OB 作为嗅觉处理的初级中枢,参与嗅觉的处理过程。OB 的体积会影响嗅觉功能,OB 将气味信号同时扩散至除嗅觉处理中枢外的其他脑区,参与抑郁等情感变化。嗅球切除术 (olfactory bulbectomy, OBX) 是一种经过验证的抑郁症造模方法,可导致与人类状况相似的行为和神经缺陷^[30]。线粒体细胞异常是重度抑郁症的一个特征,而 OBX 模型的作用机制包括线粒体代谢的改变,OBX 能够显著影响海马突触前部线粒体,而对来自海马突触后部和额叶大脑区域的线粒体不会造成影响,这表明 OBX 对突触前部的影响具有显著的特异性^[31]。OBX 还会提升与血清中脂质代谢物上调相关的磷脂酰胆碱、L- α -谷氨酰-L-赖氨酸和粪卟啉原 III 水平,这些物质会参与抗炎脂质的代谢^[32]。

OBX 操作方法是将大鼠在麻醉 (100 mg/kg 氯胺酮) 下切除双侧 OB,OB 通过在脑脊液前 7 mm 和距中线 2 mm 的坐标处钻孔吸出,用止血海绵止血并缝合皮肤。大鼠在术后 1 h 和 2 d 分别用 0.05 mg/kg 的美洛昔康治疗疼痛和炎症^[33]。

OBX 导致的抑郁样行为可以通过阿米替林、

西酞普兰和氟西汀等抗抑郁药物的长期治疗来逆转,急性抗抑郁药治疗(<2周)对OBX模型则没有改善^[34]。研究表明,解郁除烦胶囊可以保护大鼠的神经元并减轻抑郁样行为,这是由于其显著调节HPA轴、突触可塑性和恢复神经发生的能力。OBX大鼠成纤维细胞生长因子2及其受体2和受体3的表达水平降低,而解郁除烦胶囊处理则会逆转这种下降^[35]。

OBX模型稳定性好,但缺点在于这种造模方式是由嗅球皮层损伤产生的,造模时动物死亡率较高。该模型对于手术操作和实验条件的要求也较高,需要专业的手术技术和设备支持,否则可能会影响模型的可靠性。

2 改变心理社会因素所致模型

2.1 习得性无助(learned helplessness, LH)抑郁模型

LH是一种常见的抑郁症动物模型。当实验动物反复受到无法控制的负面刺激而无法逃脱时,它们会变得焦虑,即使面对可控的刺激,这些动物也持续表现出较少的逃避行为^[36]。食欲素-A(orexin-A, OX-A)和食欲素-B(orexin-B, OX-B)是在下丘脑中产生的神经肽。临床研究表明,抑郁和焦虑与OX系统有关^[37]。LH大鼠与正常大鼠的比较表明,LH大鼠脑中的OX-A水平明显降低,OX-A和OX-B激活下降,导致大鼠更容易受到压力刺激^[38]。

建立LH模型最常用的方法是足部电击,其装置由一个亚克力盒子中两个大小相等的隔室所组成,由一面中央开口的墙隔开,动物可以通过这面墙从一个隔室进入另一个隔室,其中一侧隔室的地板上配有脚部电击装置^[36]。LH包括两个阶段,训练阶段和测试阶段。训练阶段时,将小鼠放在穿梭盒子的一侧,并允许探索穿梭盒子5 min。在适应期结束后,给予小鼠30次不可预测但可逃避的脚电刺激,强度为0.3 mA,持续时间最长为24 s,不可预测的电击间隔为30~60 s^[39]。测试阶段时,每只小鼠进行30次穿梭逃避实验,持续时间为3 s,间隔为30~60 s。在电击开始时,隔墙打开,当小鼠进入非电击室时,实验终止,逃生延迟和逃生失败次数由软件自动记录^[39]。

近年来,也有研究表明抗抑郁药物可以缓解LH模型的抑郁水平。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是细胞生长和增殖的重要调节因子,YANG等^[36]发现LH模型下调了海马体中BDNF的表达和Akt-mTOR信号通路的激活,而姜黄苷可以通过促进BDNF表达和激活海马中的Akt-mTOR信号通路来加速小鼠的恐惧记忆消除并改善抑郁样行为。

LH模型与人类抑郁形成机制类似,抗抑郁药物可在3~5 d内逆转该模型的抑郁症状^[40]。其缺点是抑郁持续时间长,不同种类的模型动物会表现出不同的刺激反应^[41]。此外,蒲俊材^[42]通过比较LH组与空白对照组大鼠前额皮质代谢分子的表达水平发现LH诱导与氨基酸代谢紊乱有关。因此,LH模型可用于快速抗抑郁药物的筛选以及抑郁症机制的研究。LH模型要求具有较强的应激源,仅对急性治疗敏感,不适于筛选周期较长的抗抑郁药物。

2.2 慢性不可预知应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)模型

CUMS模型不仅会导致类似抑郁症的行为,还会改变肠道微生物的组成^[43-44]。从CUMS模型的大脑蛋白质组分析中鉴定了来自3个家族的91个上调和142个下调的独特蛋白质,这233种差异表达跨膜蛋白富含13条通路,包括突触囊泡循环、尼古丁成瘾、氧化磷酸化、钙信号和腺苷3',5'-单磷酸信号,富含已知参与帕金森病和阿尔茨海默病发展的分子,这可能表明神经退行性疾病和抑郁症之间存在共同的分子机制^[45]。CUMS模型的刺激方法一般包括一系列实验,见表1。这些方法在实验中需要无规律随机排列以避免动物产生耐受^[46]。缺乏快感是CUMS小鼠的主要特征,表现为行为测试的缺陷,包括糖水偏爱率下降、FST期间不动时间增加、旷场实验(open field test, OFT)期间表现出自由探索能力的下降并且在高架十字迷宫测试期间张开双臂的时间减少^[47]。CUMS模型成立后,抑郁状态将会持续3个月左右。

CUMS能够增加肝白细胞介素-6的水平,并引起Janus激酶2和信号转导转录激活因子3的激活^[48]。研究表明,芍药多糖可降低CUMS小鼠白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α

表 1 CUMS 模型刺激方法
Table 1 Stimulation methods of CUMS model

刺激方法 Stimulus method	时间 Time
束缚 Bind	4 ~ 6 h
昼夜颠倒 Day and night reversal	24 h
禁食 Fasting	24 h
禁水 Water prohibition	24 h
悬尾 Tail suspension	5 min
刺激性气味 Pungent smell	12 h
强迫游泳 Forced swimming	5 min
电击足底 Electric shock on the sole	10 s
垫料潮湿 Wet bedding	12 h
噪音 Noise	1 h

水平,提高 5-HT 水平,还可以调控 CUMS 小鼠肠道菌群,增加其物种丰富度。芍药多糖还能够显著抑制 CUMS 小鼠结肠组织中 NLRP3/ASC/Caspase-1 信号通路的激活,改善结肠粘膜和神经元损伤^[49]。此外,线粒体自噬是近年来神经退行性疾病研究的一大热点。YANG 等^[48]发现巴戟天寡糖可通过提升线粒体动力学相关蛋白 Mfn2 的表达从而调节 PI3K-Akt-mTOR 通路的激活,促进受损线粒体自噬,降低促炎因子的释放水平,抑制神经元细胞的凋亡,最终缓解 CUMS 大鼠的抑郁症状。

CUMS 能够模拟大多数人类抑郁症的症状,而且和治疗方法之间存在密切联系,实验结果可靠性强^[50]。但 CUMS 的刺激方法需要操作者耗费巨大精力,刺激不当也会引起实验动物死亡,导致造模效率相对较低。

3 基因突变形成的抑郁模型

3.1 Fawn-Hooded (FH) 大鼠

FH 大鼠的隐性红眼稀释基因中具有基因突变,该基因导致血小板中功能失调的 5-HT 释放。与正常大鼠相比,FH 大鼠应激后血浆中 CORT 含量增加。另一方面,在 FH 大鼠中,神经免疫反应

较为迟钝,这可能与 FH 大鼠血浆 CORT 对内毒素的迟钝反应有关^[51]。

粪便微生物群移植 (fecal microbiota transplant, FMT) 已被提出作为抑郁症的潜在治疗方案。在 FMT 之前,与 SD 大鼠相比,FH 大鼠的抑郁样行为以及神经递质和细胞因子水平显著升高。FMT 后,接受 FH 粪便菌群的 FH 大鼠表现出加重的抑郁样行为,而接受 SD 微生物群的 FH 大鼠的抑郁症状明显缓解,海马神经递质显著增加,部分海马细胞因子明显减少。分析表明,SD-FMT 通过肠道微生物物种的显著减少来阻止受者的抑郁发展,从而导致受者通过肠神经系统、肠道屏障和血脑屏障在血清和海马体中进行代谢调节^[52]。

3.2 Flinder Sensitive Line (FSL) 大鼠

FSL 大鼠是抑郁症遗传易感性的模型,表现出自发和应激敏感的抑郁样表型,包括减少睡眠潜伏期,这为抑郁症中的睡眠相关症状提出了一个合适的模型^[53]。

FSL 大鼠中出现了无序的 NO/cGMP/PKG 信号级联反应,这是一种广泛描述和验证的重度抑郁症遗传动物模型^[54]。FSL 大鼠抑郁症模型中,内侧前额叶皮层急性切片前边缘区域的可塑性降低,强直性 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 抑制增加。强直抑制可以通过阻断星形胶质细胞内 Ca^{2+} 来减少信号传导或通过用司来吉兰抑制合成酶毛-B 来减少星形胶质细胞 GABA。阻断 GABA 合成还可以恢复 FSL 前额叶皮层中受损的突触可塑性,突触可塑性的降低和兴奋抑制平衡的改变被认为是重度抑郁症的机制^[55]。

4 抑郁症动物模型总结

综上总结的抑郁症动物模型优势、局限性及改进建议如表 2 所示。

5 抑郁症动物模型的评价

5.1 基于情绪行为的评价

5.1.1 糖水偏好实验 (sucrose preference test, SPT)

SPT 的原理依靠啮齿类动物对甜食偏爱的天性。当给它们同时提供普通水和蔗糖溶液时,它

表 2 抑郁症动物模型

Table 2 List of animal models of depression

建模手段 Modeling means	模型名称 Model name	优势 Advantage	局限性 Limitation	改进建议 Improvement suggestion
改变生物学因素 Altered biology	利血平诱导抑郁模型 Reserpine induced depression model	耗时较少、有利于抗抑郁药物初筛 It takes less time and is conducive to the preliminary screening of antidepressant drugs	与个体发病机制不吻合、易产生假阳性反应 It is inconsistent with the individual pathogenesis and easy to produce false positive reaction	在具体实验操作中,单一模型易产生假阳性结论,建议根据不同研究方向与研究角度使用两种及以上模型来提高实验结果的可靠性。如药物诱导抑郁模型可适当采用两者及两者以上联合用药提高抑郁模型可靠性 In specific experimental operation, a single model is easy to produce false positive conclusions. It is recommended to use two or more models according to different research directions and perspectives to improve the reliability of experimental results. For example, the drug induced depression model can be appropriately used to improve the reliability of the depression model
	CORT 诱导抑郁模型 CORT induced depression model	耗时较少、周期短 Less time and short cycle	存在一定副作用、易产生假阳性反应 Some side effects, easy to produce false positive reaction	
	OBX 诱导抑郁模型 OBX induced depression model	稳定性好 Good stability	死亡率高、操作难度大 High mortality, difficult operation	
改变心理社会因素 Change psychosocial factors	LH 诱导抑郁模型 LH induced depression model	与个体发病机制类似、对急性治疗敏感 Similar to individual pathogenesis, sensitive to acute treatment	抑郁持续时间短、不适合慢性药物治疗 Depression has a short duration, is not suitable for chronic drug treatment	
	CUMS 诱导抑郁模型 CUMS induced depression model	与个体发病机制类似、可靠性强 Similar to the individual pathogenesis, the reliability is strong	建模效率较低、对实验动物伤害较强 Modeling efficiency is low and the damage to test animals is strong	
	FH 大鼠抑郁模型 FH rat depression model	稳定性好 Good stability	研究成本较高 Higher research cost	
基因突变 Gene mutation	FSL 大鼠抑郁模型 FSL rat depression model	稳定性好 Good stability	研究成本较高 Higher research cost	

们会有选择性地饮用蔗糖溶液。但当抑郁模型建成后,模型动物对蔗糖溶液的偏爱程度会有所降低^[56]。

在 SPT 开始前,所有小鼠禁食禁水 24 h^[57]。然后,给予小鼠两个标准饮料瓶,一个含有 1% ~ 2% 蔗糖溶液,另一个为自来水,持续 24 h。每 6 h 将两个饮料瓶调换位置,以避免侧偏。在 SPT 结束时测量蔗糖和水的摄入量,蔗糖偏爱率表示为蔗糖摄入量/蔗糖摄入量加水摄入量的百分比^[58]。

5.1.2 悬尾实验(tail suspension test, TST)

TST 将动物的尾部固定,使其头部向下悬挂。正常动物在此环境中会表现出挣扎行为,企图摆

脱困境。而抑郁模型动物则会出现间断性不动,表现出行为绝望状态。因此通过检测动物在 TST 中的不动时间即可快速评价抑郁模型建立或抗抑郁药物的效果。

固定胶带应缠在接近小鼠尾巴尖端的位置,地面到小鼠头部的距离控制在 50 cm 左右,实验时应将各小鼠中间放置挡板,以免相互影响。悬挂后适应 1 min,然后计时 5 min,记录 5 min 内的小鼠不动时间^[59]。

5.1.3 FST

与 TST 的原理类似,同样将动物置于一个局限的环境中,基于动物的绝望状态评估研究效果。将 25 ℃ 的自来水倒入直径为 25 cm 的透明

圆柱桶中,然后将每只小鼠单独放入其中自由游泳。不动时间定义为四肢不动仅依靠浮力漂浮在水面的时间。让每只小鼠适应条件 1 min,然后记录接下来 5 min 内的总不动时间^[59]。

5.2 基于自发活动能力的评价

5.2.1 OFT

OFT 通过检测实验动物的自发活动行为和探索能力评价焦虑样行为^[58]。动物对新的开阔环境具有天然恐惧。因此它们主要在旷场的周边区域活动,而在中央区域较少^[60]。

旷场装置底面(96 cm × 96 cm × 50 cm)分成 9 个面积相等的正方形区域,将每只小鼠从旷场的一角放入,使其自由活动适应 1 min。然后记录在 5 min 内的中心区域停留时间、穿过中心次数以及总移动距离。在每次测试之后,用 75% 乙醇彻底清洁旷场的内壁和底板,以避免残留气味对实验结果的影响^[60]。

5.2.2 明暗箱实验(light dark box test, LDBT)

啮齿类动物为夜行性动物,喜欢黑暗而回避光照。LDBT 基于此特征评价实验动物在两种环境下的自发探索行为。

明暗箱是一个木制的矩形盒子,分为两个区域。较小的区域为黑匣子(18 cm × 27 cm × 27 cm),内壁为黑色,顶盖不发光,较大的区域是亮箱(45 cm × 27 cm × 27 cm),内壁为白色,顶盖设有 LED 灯提供光源。测试开始时,将小鼠放置在暗箱的中间,然后自由移动 5 min。测试选取亮盒的保留时间作为评价小鼠是否具有焦虑行为的指标^[59]。

5.2.3 社交互动实验(social interaction test, SIT)

SIT 主要通过检测小鼠对社交的兴趣和社交认知能力评价焦虑样行为,也是自闭症等相关疾病研究的常见评估方法。

测试装置由一个长方形的透明或半透明塑料箱组成,箱子分为 3 个大小相等的隔室。两个外侧隔室各放置一个圆柱形的透明或半透明笼子,用于放置陌生动物。将实验动物放入中间隔室,让其自由活动 10 ~ 15 min,使其熟悉环境。之后将陌生动物放入一个外侧隔室的圆柱笼中,另一个外侧隔室放一个空笼子。然后,打开中间隔室与两个外侧隔室之间的通道,让实验动物自由探索。记录实验动物在陌生动物所在隔室和

空笼子所在隔室的停留时间,持续 10 ~ 15 min。通常情况下,如果实验动物在陌生动物所在的隔室停留时间明显长于空笼子所在的隔室,说明动物具有社交倾向^[59]。

6 讨论与展望

综上所述,通过改变动物的生物学因素、心理社会因素以及基因突变都可诱导与人类相似的神经生物学变化而模拟临床抑郁症状。然而,由于抑郁症的形成是由多条神经通路所组成的复杂网络共同作用的结果,基于单一回路对特定脑区调控的动物模型并不能全面阐释抑郁症的病理机制。因此,传统的抑郁动物模型阻碍了新型治疗手段的进一步深入。在未来的研究中,除了关注抑郁症状的表型,还应当深入探索临床症状背后的生物学原理和发病机制。鉴于动物模型与人类之间的差异性,还应致力于开发不同病理机制的更为可靠精确的动物模型,这将有助于今后抗抑郁药物的进一步研发。

参 考 文 献(References)

- [1] LIU L, WANG H, CHEN X, et al. Gut microbiota and its metabolites in depression: from pathogenesis to treatment [J]. *EBioMedicine*, 2023, 90: 104527.
- [2] IDUNKOVA A, LACINOVA L, DUBIEL-HOPANOVA L. Stress, depression, and hippocampus: from biochemistry to electrophysiology [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2023, 42(2): 107-122.
- [3] RIKHANI K, VAS C, JHA M K. Approach to diagnosis and management of treatment-resistant depression [J]. *Psychiatr Clin North Am*, 2023, 46(2): 247-259.
- [4] PARIANTE C M, LIGHTMAN S L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments [J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(9): 464-468.
- [5] HOLMES A, HEILIG M, RUPNIAK N M, et al. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(11): 580-588.
- [6] RANA T, BEHL T, SEHGAL A, et al. Unfolding the role of BDNF as a biomarker for treatment of depression [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(10): 2008-2021.
- [7] XU Y Q, GOU Y, YUAN J J, et al. Peripheral blood inflammatory cytokine factors expressions are associated with response to acupuncture therapy in postpartum depression patients [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 5189-5203.
- [8] HAO Y, GE H, SUN M, et al. Selecting an appropriate

- animal model of depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (19): 4827.
- [9] ZHU G H, SUN X P, LI J, et al. No association between low-dose reserpine use and depression in older hypertensive patient: result of a multicenter, cross-sectional study [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2019, 16(8): 608–613.
- [10] PARK B K, KIM N S, KIM Y R, et al. Antidepressant and anti-neuroinflammatory effects of bangpungtongsung-san [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 958.
- [11] KHURANA K, BANSAL N. Lacidipine attenuates reserpine-induced depression-like behavior and oxido-nitrosative stress in mice [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2019, 392(10): 1265–1275.
- [12] IKRAM H, HALEEM D J. Repeated treatment with reserpine as a progressive animal model of depression [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2017, 30(3): 897–902.
- [13] NGUYEN M, STEWART A M, KALUEFF A V. Aquatic blues: modeling depression and antidepressant action in zebrafish [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 55: 26–39.
- [14] 冯飞, 许崇涛. 利血平抑郁模型的剂量探讨 [J]. 汕头大学医学院学报, 2007, 20(4): 223–225.
FENG F, XU C T. Suitable dosage of reserpine for animal model of depression [J]. *J Shantou Univ Med Coll*, 2007, 20(4): 223–225.
- [15] ANTKEWICZ-MICHALUK L, WĄSIK A, MOŹDŹEŃ E, et al. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat [J]. *Neurotox Res*, 2014, 26(1): 85–98.
- [16] FOUDAH A I, ALQARNI M H, ALAM A, et al. Rutin improves anxiety and reserpine-induced depression in rats [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7313.
- [17] ZHANG S, LIU X, SUN M, et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and traditional Chinese medicine (TCM) [J]. *Behav Brain Funct*, 2018, 14(1): 13.
- [18] LEITH N J, BARRETT R J. Effects of chronic amphetamine or reserpine on self-stimulation responding: animal model of depression? [J]. *Psychopharmacology*, 1980, 72(1): 9–15.
- [19] WILLNER P. The validity of animal models of depression [J]. *Psychopharmacology*, 1984, 83(1): 1–16.
- [20] 包祖晓, 赵国平, 何贵平, 等. 肝肾阳虚型抑郁症大鼠模型的建立与评价 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 42–45.
BAO Z X, ZHAO G P, HE G P, et al. The establishment and evaluation of depression rat model with liver-kidney yang deficiency [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2015, 33(1): 42–45.
- [21] MO F, TANG Y, DU P, et al. GPR39 protects against corticosterone-induced neuronal injury in hippocampal cells through the CREB-BDNF signaling pathway [J]. *J Affect Disord*, 2020, 272: 474–484.
- [22] LIN L, HERSELMAN M F, ZHOU X F, et al. Effects of corticosterone on BDNF expression and mood behaviours in mice [J]. *Physiol Behav*, 2022, 247: 113721.
- [23] ZHANG K, WANG F, ZHAI M, et al. Hyperactive neuronal autophagy depletes BDNF and impairs adult hippocampal neurogenesis in a corticosterone-induced mouse model of depression [J]. *Theranostics*, 2023, 13(3): 1059–1075.
- [24] 房鑫鑫, 麻慧, 鲍金豪, 等. 用皮质酮替代饮水小鼠模型评价盐酸羟哌吡酮的抗抑郁效应及机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36(5): 329–337.
FANG X X, MA H, BAO J H, et al. Antidepressant effect and possible mechanisms of hypidone hydrochloride in corticosterone replacement drinking water model in mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2022, 36(5): 329–337.
- [25] ZHANG Q, LI R L, TAO T, et al. Antiepileptic effects of cicadae periostracum on mice and its antiapoptotic effects in H₂O₂-stimulated PC12 cells via regulation of PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5598818.
- [26] ZHANG Q, DUAN H X, LI R L, et al. Inducing apoptosis and suppressing inflammatory reactions in synovial fibroblasts are two important ways for Guizhi-Shaoyao-Zhimu Decoction against rheumatoid arthritis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 217–236.
- [27] WANG Z, CHENG Y T, LU Y, et al. Baicalin ameliorates corticosterone-induced depression by promoting neurodevelopment of hippocampal via mTOR/GSK3 β pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(5): 405–412.
- [28] 赵凡, 张卫华, 孙若岚, 等. 黄芩基于 PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin 通路对慢性皮质酮诱导的抑郁小鼠神经发生的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2): 609–614.
ZHAO F, ZHANG W F, SUN R L, et al. Effects of Radix Scutellariae on neurogenesis in chronic corticosterone-induced depression mouse based on PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway [J]. *J Chin Med*, 2023, 38(2): 609–614.
- [29] SUN J Y, LIU Y T, JIANG S N, et al. Essential oil from the roots of paeonia lactiflora pall. has protective effect against corticosterone-induced depression in mice via modulation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 999712.

- [30] GALINDO-PAREDES G, FLORES G, MORALES-MEDINA J C. Olfactory bulbectomy induces nociceptive alterations associated with gliosis in male rats [J]. *IBRO Neurosci Rep*, 2023, 14: 494–506.
- [31] ALMEIDA R F, GANZELLA M, MACHADO D G, et al. Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 76: 1–11.
- [32] YAN L, GU M Q, YANG Z Y, et al. Endogenous n-3 PUFAs attenuated olfactory bulbectomy-induced behavioral and metabolomic abnormalities in Fat-1 mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 96: 143–153.
- [33] RAFAŁO-ULIŃSKA A, POCHWAT B, MISZTAK P, et al. Zinc deficiency blunts the effectiveness of antidepressants in the olfactory bulbectomy model of depression in rats [J]. *Nutrients*, 2022, 14(13): 2746.
- [34] JIANG Y, PUN R Y, PEARISO K, et al. Olfactory bulbectomy leads to the development of epilepsy in mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138178.
- [35] ZHAO C, WANG M, LI T, et al. Antidepressant-like effects of Jieyu Chufan capsules in the olfactory bulbectomy rat model [J]. *Brain Res*, 2024, 1824: 148676.
- [36] YANG S J, SONG Z J, WANG X C, et al. Curculigoides facilitates fear extinction and prevents depression-like behaviors in a mouse learned helplessness model through increasing hippocampal BDNF [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(10): 1269–1278.
- [37] ZOU Z, HUANG J, YANG Q, et al. Repeated Yueju, but not fluoxetine, induced sustained antidepressant activity in a mouse model of chronic learned helplessness: involvement of CaMKII signaling in the hippocampus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1442578.
- [38] HIROSE Y, ODA Y, YOSHINO K, et al. Reduction of claudin-5 and aquaporin-4 in the rat hippocampal CA-1 and CA-3 regions of a learned helplessness model of depression [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2024, 234: 173676.
- [39] MADESHIYA A K, WHITEHEAD C, TRIPATHI A, et al. C1q deletion exacerbates stress-induced learned helplessness behavior and induces neuroinflammation in mice [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 50.
- [40] YEUNG Y T, AZIZ F, GUERRERO-CASTILLA A, et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(14): 1449–1484.
- [41] HENN F A, VOLLMAYR B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4/5): 799–804.
- [42] 蒲俊材. 习得性无助模型大鼠前额叶皮质的代谢组学研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学; 2017.
- PU J C. Metabonomic research of the prefrontal cortex of the learned helplessness rats model [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2017.
- [43] LI H, XIANG Y, ZHU Z, et al. Rifaximin-mediated gut microbiota regulation modulates the function of microglia and protects against CUMS-induced depression-like behaviors in adolescent rat [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 254.
- [44] LI S, LUO H, LOU R, et al. Multiregional profiling of the brain transmembrane proteome uncovers novel regulators of depression [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(30): eabf0634.
- [45] 朱传安, 陈进东, 杨海永, 等. CUMS 对焦虑小鼠海马与前额叶皮层锥体神经元兴奋/抑制平衡的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2022, 38(6): 814–819.
- ZHU C A, CHEN J D, YANG H Y, et al. Effects of CUMS on excitatory/inhibitory balance of hippocampal and prefrontal cortex pyramidal neurons in anxiety-like mice [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2022, 38(6): 814–819.
- [46] WANG Y L, WU H R, ZHANG S S, et al. Catalpol ameliorates depressive-like behaviors in CUMS mice via oxidative stress-mediated NLRP3 inflammasome and neuroinflammation [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 353.
- [47] ZHANG M, WU W, HUANG C, et al. Shuxie-1 decoction alleviated CUMS-induced liver injury via IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 848355.
- [48] YANG L, AO Y, LI Y, et al. Morinda officinalis oligosaccharides mitigate depression-like behaviors in hypertension rats by regulating Mfn2-mediated mitophagy [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 31.
- [49] WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation [J]. *Psychopharmacology*, 1997, 134(4): 319–329.
- [50] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology*, 1987, 93(3): 358–364.
- [51] KNAPP D J, HARPER K M, MELTON J, et al. Comparative effects of stressors on behavioral and neuroimmune responses of fawn-hooded (FH/Wjd) and Wistar rats: Implications for models of depression [J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 322: 74–80.
- [52] HU B, DAS P, LV X, et al. Effects of ‘healthy’ fecal microbiota transplantation against the deterioration of depression in fawn-hooded rats [J]. *mSystems*, 2022, 7(3): e0021822.
- [53] GARDNER W, FUCHS F, DURIEUX L, et al. Slow wave

sleep deficits in the flinders sensitive line rodent model of depression; effects of medial forebrain bundle deep-brain stimulation [J]. Neuroscience, 2022, 498: 31-49.

[54] SAAYMAN J L B, STEYN S F, BRINK C B. The long-term bio-behavioural effects of juvenile sildenafil treatment in Sprague-Dawley versus flinders sensitive line rats [J]. Acta Neuropsychiatr, 2021, 33(4): 200-205.

[55] SRIVASTAVA I, VAZQUEZ-JUAREZ E, HENNING L, et al. Blocking astrocytic GABA restores synaptic plasticity in prefrontal cortex of rat model of depression [J]. Cells, 2020, 9(7): 1705.

[56] ZHOU Q G, HU Y, WU D L, et al. Hippocampal telomerase is involved in the modulation of depressive behaviors [J]. J Neurosci, 2011, 31(34): 12258-12269.

[57] HUANG H J, ZHU X C, HAN Q Q, et al. Ghrelin alleviates anxiety- and depression-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress in rodents [J]. Behav Brain Res, 2017, 326: 33-43.

[58] GUAN W, WU X Y, JIN X, et al. MiR-204-5p plays a critical role in the pathogenesis of depression and anti-depression action of venlafaxine in the hippocampus of mice [J]. Curr Med Chem, 2024, 31(22): 3412-3425.

[59] 卢宇佳, 张珊, 赵谦, 等. 啮齿类动物抑郁相关行为学评价 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(6): 87-93.

LU Y J, ZHANG S, ZHAO Q, et al. A review of behavioral evaluation of depression in rodents [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(6): 87-93.

[60] GAO M, WU Y, YANG L, et al. Anti-depressant-like effect of fermented *Gastrodia elata* Bl. by regulating monoamine levels and BDNF/NMDAR pathways in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115832.

[收稿日期] 2024-05-22

《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!

师雨琛, 李小强. TRPV1 通道在小鼠组织纤维化中的作用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 259–266.
SHI Y C, LI X Q. Progress in study of the function of transient receptor potential vanillin subfamily 1 channel in tissue fibrosis of mouse models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 259–266.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.011

TRPV1 通道在小鼠组织纤维化中的作用研究进展

师雨琛^{1,2}, 李小强^{1*}

(1. 空军军医大学药理学系中药与天然药物学教研室, 西安 710032;
2. 空军军医大学基础医学院, 西安 710032)

【摘要】 纤维化的主要病理特征为纤维结缔组织增多、实质细胞减少, 如持续进展可致器官结构破坏和功能减退。近年来研究发现, 非选择性阳离子通道-瞬时感受器电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid subfamily 1, TRPV1) 通道与纤维化密切相关。该通道被激活后可使胞内阳离子浓度升高, 引起相应的生理和病理变化, 特别是在调控组织纤维化过程中发挥关键作用。为了深入研究 TRPV1 通道参与组织纤维化的发生机制, 动物模型已成为了该类研究的重要工具。本文将综述 TRPV1 通道在小鼠心脏、肾、胰腺等脏器纤维化中的作用, 对 TRPV1 通道参与调控纤维化的相关信号通路进行总结, 以期对纤维化发病机制研究和药物研发提供新的思路。

【关键词】 纤维化; 瞬时感受器电位香草酸亚型 1 通道; 小鼠模型; 信号通路; 药物靶点

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0259-08

Progress in study of the function of transient receptor potential vanillin subfamily 1 channel in tissue fibrosis of mouse models

SHI Yuchen^{1,2}, LI Xiaoqiang^{1*}

(1. Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. College of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)
Corresponding author: LI Xiaoqiang. E-mail: xxqqli@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Fibrosis is a pathological process characterized by an increase in connective tissue and a decrease in parenchymal cells within organ tissues. During its progression, fibrosis can lead to structural damage and functional decline of the affected organ. In recent years, it has found that non-selective cation channel transient receptor potential vanilloid subfamily 1 (TRPV1) channel is closely related to fibrosis. When this channel is activated, it can increase the intracellular cation concentration and cause corresponding physiological and pathological changes, playing a particularly crucial role in regulating tissue fibrosis. Animal models have become important tools in studies into the mechanism by which the TRPV1 channel induces organ fibrosis. This article reviews the role of TRPV1 channels in the fibrosis of organs such as the heart, kidney, and pancreas in mice. The relevant signaling pathways in which TRPV1 channels participate to regulate fibrosis are summarized to provide new ideas for studying the pathogenesis of fibrosis and the development of targeted drugs.

【基金项目】 国家自然科学基金(82270357), 空军军医大学“青苗”基金(2024QMJJ013)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82270357), Sapling Fund Foundation of Air Force Medical University (2024QMJJ013).

【作者简介】 师雨琛, 女, 在读本科生, 研究方向: 药物的筛选与评价。E-mail: 2494741746@qq.com

【通信作者】 李小强, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 离子通道调控疾病的分子基础与应用。Email: xxqqli@fmmu.edu.cn

【 Keywords 】 fibrosis; transient receptor potential vanilloid subfamily 1 channel; mouse model; signaling pathway; drug target

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

瞬时感受器电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid subfamily 1, TRPV1) 通道是一种非选择性阳离子通道,广泛分布于神经、心血管等多个系统中^[1]。TRPV1 通道被激活时,能引起 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 和 Na^{+} 等阳离子内流,其对 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 有相对选择特异性,为其他阳离子的 5 ~ 10 倍,可引起相应的生理和病理变化^[2]。在生理条件下,TRPV1 通道参与疼痛感知、炎症反应和细胞信号传导等过程^[1]。在纤维化进程中,TRPV1 的表达异常,参与调节心脏、肾、胰腺、肺、肝等多组织的纤维化。鉴于纤维化疾病的共性特征,本文将结合小鼠模型,总结 TRPV1 通道与组织纤维化之间的关系,阐明 TRPV1 通道在调节纤维化过程中发挥的作用,分析 TRPV1 通道参与调控纤维化的相关信号通路,以及 TRPV1 通道作为纤维化疾病治疗靶点的潜力,为纤维化的研究提供新的思路。

1 基于小鼠模型探讨 TRPV1 通道在各脏器纤维化过程中的作用机制

TRPV1 通道在不同器官中均有表达,其主要生理功能是感受热、痛等伤害性刺激,且与炎症、损伤等多种病理过程密切相关^[1]。在纤维化疾病中,主要是通过调节细胞内 Ca^{2+} 浓度影响纤维化细胞的激活和分化^[2]。TRPV1 通道还参与多条纤维化信号通路的调控,如转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 信号通路、核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 等^[3]。在这些信号通路中,TRPV1 通过调控细胞因子、炎症介质和生长因子的生成与释放,影响纤维化的发展。TRPV1 通道在各个脏器纤维化中的作用是多方面的,其激活或抑制可能对纤维化进程产生不同的影响。因此,深入理解 TRPV1 在纤维化中的作用机制对于开发针对性的治疗策略具有重要意义。

1.1 TRPV1 通道在调控心肌纤维化信号通路中的作用

在心肌纤维化研究中,通过异丙肾上腺素、

高盐饮食、左冠状动脉前降支结扎等方法构建的小鼠模型显示,TRPV1 对心肌纤维化具有保护作用,可以抑制纤维细胞的增殖和分化^[4-6]。然而,在主动脉弓缩窄 (transverse aortic constriction, TAC) 所引起的压力超负荷状态的小鼠模型中,TRPV1 的保护作用并不显著,甚至可能产生相反的效果。一项研究指出 TRPV1 能抑制促炎细胞因子的分泌以及巨噬细胞的浸润而对心肌肥大发挥保护作用^[7]。而另一项研究发现与野生型小鼠相比,TRPV1 基因敲除小鼠的心脏功能得到改善,心肌肥大、纤维化和组织重塑减少^[8]。有研究者分析原因可能在于不同的实验条件,例如心脏超声心动图前后不同的测试时间点、用于开发 TAC 的针头大小的差异以及使用不同剂量的拮抗剂等^[9]。提示,对于 TRPV1 相关功能研究,需要改进动物模型制备和应用体系来规避实验条件对 TRPV1 功能的评价。

进一步探究心肌纤维化的分子机制,发现 TRPV1 通道对 TGF- β 信号通路、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 等关键介质的调控起着核心作用^[10-12]。研究表明,TRPV1 激活剂辣椒素可以抑制野生型小鼠压力超负荷引起的 TGF- β 、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的上调和 SMAD2/3 蛋白 (SMAD family member 2/3, SMAD2/3) 的磷酸化,但对 TRPV1 基因敲除小鼠没有影响^[13]。长期食用富含辣椒素的饮食能够缓解高盐饮食所引发的心脏肥大和纤维化。这一保护效果是由于 TRPV1 通道的激活,进而促进了过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (peroxisome proliferator-activated receptor-delta, PPAR- δ) 的表达增加所致^[14]。此外, MARSHALL 等^[15] 在高脂饮食喂养的野生型小鼠血浆中检测到较多的白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10),但在 TRPV1 基因敲除小鼠中未观察到明显变化。TAC 是一种通过手术模拟心脏后

负荷增加,进而引发心力衰竭的小鼠模型,其病理过程与高血压或主动脉瓣狭窄引起的心力衰竭相似。有研究表明,TAC 能够增加肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平,激活 TRPV1,减少炎症介质的产生,并促进降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 的释放;相比之下,TRPV1 基因敲除的小鼠并未表现出这种反应,表明 TRPV1 的激活对于抑制炎症反应具有重要作用^[7]。

鉴于动物模型在 TRPV1 研究中的重要意义,在选择动物模型时,需要考虑每种模型的特点,例如,异丙肾上腺素诱导的模型能够快速模拟心肌纤维化,适合研究急性效应,但可能无法完全模拟人类心肌纤维化的慢性过程。高盐饮食模型则更贴近人类饮食习惯引起的病理变化,但可能需要较长时间来观察效果^[16]。左冠状动脉前降支结扎模型则能够模拟心肌缺血后的纤维化,但其手术操作复杂,对技术要求较高。横主动脉缩窄模型则能够模拟长期压力超负荷下的心肌纤维化,但其对心脏的负荷是逐渐增加的,可能更适合研究慢性纤维化过程^[17-18]。

1.2 TRPV1 通道在调控肾纤维化信号通路中的作用

目前肾纤维化研究的关键问题是:炎症反应如何形成、如何调控胞外基质。TRPV1 是高血压引起的肾纤维化的重要通道蛋白,可与炎症相关的 TGF- β 及 NF- κ B 信号串扰抑制纤维化。据报道,激活 TRPV1 通道可降低脱氧皮质酮醋酸酯盐 (deoxycorticosterone acetate, DOCA) 诱导的高血压小鼠的肾损伤,抑制纤连蛋白的上调、I 型和 III 型胶原蛋白的表达,从而延缓肾间质纤维化的进展^[19]。单侧输尿管梗阻引起肾纤维化的小鼠模型中,辣椒素可抑制 TGF- β 1/SMAD2/3 信号传导来延缓肌成纤维细胞的活化,从而显著改善肾纤维化^[20]。因此,激活 TRPV1 通道,抑制 TGF- β 1 的产生可能有助于减少细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积累并延缓肾间质纤维化的进展。再者,NF- κ B 以及多种炎症相关基因的异常激活会加剧肾损伤。TRPV1 的缺失会产生大量有害的促炎细胞因子,增加肾小管间质损伤。DOCA 处理的野生型小鼠与 TRPV1 基因敲除小鼠相比,TRPV1 基因敲除小鼠中 NF- κ B 活性显著增

加^[21]。这些数据表明 NF- κ B 在 TRPV1 介导的抗炎中发挥着核心调节作用。

在动物模型的选择上,单侧输尿管梗阻模型因其较好的重复性和快速的肾间质纤维化发生,是研究肾间质纤维化的常用动物模型^[22]。然而,每种模型都有其特定的应用场景和局限性。例如,DOCA 诱导的高血压模型适合研究长期高血压对肾的影响,而单侧输尿管梗阻模型则更适用于研究急性肾损伤后的纤维化过程。需要选择不同的模型评估 TRPV1 激活在不同病理状态下对肾纤维化的潜在治疗价值。

1.3 TRPV1 通道在调控胰腺纤维化信号通路中的作用

在胰腺中,TRPV1 多在感觉神经元和脊髓神经元中表达,所以其介导的机制多与神经肽 P 物质 (substance P, SP) 相关。有研究表明,TRPV1 通道的激活可释放 SP 并与内皮细胞上的神经激肽-1 受体 (neurokinin-1 receptor, NK1R) 结合,导致间质水肿和中性粒细胞浸润^[23]。在雨蛙素诱导的胰腺炎小鼠模型中,使用 TRPV1 拮抗剂辣椒西平可抑制初级感觉神经元并减少组织炎症,从而抑制 SP 的释放和 NK1R 激活,最终减轻胰腺纤维化的严重程度^[24]。雨蛙素诱导的胰腺炎模型因其能够模拟人类胰腺炎的关键病理特征,包括胰腺组织的炎症细胞浸润、纤维化及胰腺功能的损伤,已成为研究胰腺纤维化的重要工具。此模型不仅有助于理解疾病的发展机制,还对评估潜在治疗干预策略具有重要价值。尽管如此,针对 TRPV1 治疗策略的有效性和安全性仍需在更广泛的临床前模型和临床研究中进行系统验证。

1.4 TRPV1 通道在调控肺纤维化信号通路中的作用

研究人员在肺纤维化的过程中观察到 TRPV1 激活与肺泡上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和肌成纤维细胞的分布和数量变化有关。特别是早期阶段,成纤维细胞和促炎巨噬细胞显著增加,这表明 TRPV1 可能在急性炎症反应中发挥作用^[25-27]。此外,特定蛋白如 MMP12、骨膜蛋白 (periostin, POSTN) 和 I 型胶原蛋白 α 1 链 (collagen type I alpha 1 chain, COL1A1) 在肺纤维化过程中的表达变化也与 TRPV1 通道的激活状态有关^[28]。

在特发性肺纤维化临床患者的研究中,发现内质网与线粒体之间的相互作用减弱,这一现象与磷酸簇分类蛋白 2(phosphofurin acidic cluster sorting protein-2, PACS-2)的表达降低有关。研究还揭示了 TRPV1 通道与 PACS-2 之间的相互作用,并且通过使用辣椒素可恢复 PACS-2 的水平,减少肺泡上皮细胞的凋亡。这些发现提示,调节 PACS-2/TRPV1 轴可能是特发性肺纤维化患者治疗的潜在新策略^[29]。在肺纤维化诱导的咳嗽模型中,TRPV1 和瞬时受体电位 A1(transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1)通道在肺部的表达均增加。与对照组相比,模型组肺组织中这两种通道蛋白的表达显著上调,并且这种上调与 Ashcroft 纤维化评分呈负相关^[30]。最后,研究还发现小剂量辣椒素通过激活 TRPV1、促进 CGRP 的释放,抑制细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK)的磷酸化并下调真核翻译起始因子 3A(eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A, EIF3A)的表达,从而逆转肺泡上皮细胞的上皮间质转化^[31]。上述研究结果表明,TRPV1 通道在肺纤维化的发展中起着多方面的作用,包括内质网-线粒体联系、影响固有免疫细胞的反应,以及参与咳嗽敏感性的调节。这些发现为肺纤维化的治疗提供了新的潜在靶点。

1.5 TRPV1 通道在调控肝纤维化信号通路中的作用

在肝纤维化过程中,TRPV1 通道的作用机制同样受到关注。研究表明,TRPV1 通过与无菌 α 及 Toll/白细胞介素受体含基序蛋白 1(sterile alpha and toll/interleukin receptor motif-containing protein 1, SARM1)的相互作用,维持肝星状细胞的静止状态,从而在肝纤维化过程中起到保护作用。在肝纤维化患者和小鼠模型中,TRPV1 表达水平显著下调。此外,TRPV1 的遗传和药理抑制导致 NF- κ B 激活和促炎细胞因子的产生,这表明 TRPV1 可能通过抑制炎症反应来减缓肝纤维化的进程^[32]。

四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的小鼠模型也被用来研究 TRPV1 在肝纤维化中的作用。随着 CCl_4 浓度的增加,小鼠肝逐渐出现纤维化,血清中丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨

基转移酶含量逐渐升高,而白蛋白含量降低。此外,IL-6 和 TGF- β 1 等炎症因子的表达也随之增加,这可能与 TRPV1 通道的激活状态有关^[33]。

1.6 TRPV1 通道在调控其他脏器纤维化信号通路中的作用

TRPV1 同样调控角膜、口腔粘膜、皮肤等组织的纤维化,这些组织含有丰富的神经末梢,多参与温度感知、痛觉传递等功能^[34-36]。在小鼠角膜碱烧伤模型的研究中发现,TRPV1 的缺失显著降低了眼成纤维细胞中 TGF- β 1 及其他促炎因子的表达水平,有效抑制了小鼠角膜愈合过程中的炎症反应和疤痕形成^[34]。在口腔粘膜方面,热、辣和酸性食物引起的灼痛感加剧了口腔粘膜的纤维化,这与 TRPV1 的激活密切相关^[35]。尽管如此,目前对于 TRPV1 在口腔粘膜纤维化中的具体作用机制的研究还相对有限,需通过进一步的实验来阐明。在皮肤系统性硬化症的研究中,使用 TRPV1 受体和 CGRP 基因敲除小鼠的研究表明,TRPV1 受体的激活可能通过诱导 SP 的释放来调节炎症过程,这可能会对纤维化过程具有保护作用^[36]。总的来说,TRPV1 在角膜、口腔粘膜和皮肤等组织中的表达和激活状态可能通过多种机制影响纤维化的发展。这些机制包括对炎症反应的调节、成纤维细胞的活化和细胞外基质的重塑等。

2 TRPV1 通道在各脏器纤维化治疗中的应用

鉴于 TRPV1 在纤维化中的重要作用,靶向 TRPV1 可能成为纤维化治疗的新策略。研究发现,部分天然化合物和药物可通过调控 TRPV1 通道活性,减轻纤维化程度。例如姜黄素等天然化合物以及部分钙通道拮抗剂,均可调控 TRPV1 通道活性,从而达到抗纤维化的效果。

为了评价 TRPV1 激动剂及拮抗剂的治疗效果,研究者根据脏器纤维化诱因的不同开发了多种动物模型模拟患者的病理性损伤。心肌纤维化模型主要是由压力超负荷、免疫损伤、缺血、高糖等因素诱导建立。在压力超负荷诱导的小鼠模型中,TRPV1 激动剂辣椒素改善了心脏肥大和纤维化^[13]。但辣椒素对于异丙肾上腺素诱导的

心肌纤维化并没有保护作用^[4]。在 TAC 诱导的心脏肥大模型中,两项研究比较了 TRPV1 基因敲除和 TRPV1 拮抗剂辣椒西平减轻心肌纤维化的效果。发现在 TRPV1 基因敲除鼠中,可出现代偿性纤维化进展^[37]。然而,TRPV1 通道拮抗剂的使用,与基因敲除技术明显不同,拮抗剂以急性方式阻断 TRPV1,抑制纤维化,并不产生代偿反应^[38]。同时,在高盐、高糖诱导的心脏肥大动物模型中,可能会诱发慢性发作,从而与 TAC 模型的快速刺激形成对比。在两种模型中 TRPV1 选择性受体激动剂香草酸类激动剂树脂毒素可产生类似的治疗效果^[39]。总之,TRPV1 不同的干预方法在不同的小鼠模型中可能产生类似或不同的效果。

在肾纤维化中,仅有一项研究提出,在缺血/再灌注小鼠模型中使用辣椒素和树脂毒素进行体内研究,发现两种激动剂均能预防缺血/再灌注引起的肾功能障碍,并保护肾免受损伤和纤维化^[19]。在胰腺纤维化中,TRPV1 通道的激活促进胰腺纤维化进展,故多使用 TRPV1 的拮抗剂进行干预。例如,TRPV1 拮抗剂辣椒西平可减轻胰腺纤维化程度^[24]。全身使用 TRPV1 拮抗剂 SB-366791 可显著逆转胰腺炎症并缓解纤维化程度^[38]。研究表明,TRPV1 拮抗剂 PAC-14028 乳膏是一种非甾体类化合物,通过阻断 TRPV1 通道,减少 SP 的释放,从而减轻瘙痒和皮肤炎症。临床试验表明,PAC-14028 乳膏在改善特应性皮炎症状和体征方面表现出良好的疗效和安全性^[40]。上述结论均采用小鼠纤维化模型,评价了 TRPV1 通道激动剂或拮抗剂对脏器纤维化的影响。机制层面发现 TGF- β 的激活是促进纤维化进展的主要原因。那么该信号通路的拮抗剂曲尼斯特、吡菲尼酮与 TRPV1 拮抗剂的联合应用可能达到更好的治疗效果。另外,TRPV1 激动剂或拮抗剂的使用能否增强常用一线治疗药物的敏感性等治疗策略仍需要深入研究。

3 总结与展望

纤维化动物模型在纤维化发病机制研究、药物研发等方面具有重要价值。TRPV1 通道在纤维化过程中具有重要的作用,通过建立合适的动物模型开展研究,有助于揭示纤维化疾病的病理

生理特征,为预防组织纤维化发生提供理论依据,为临床治疗纤维化疾病提供新的思路。然而,TRPV1 在纤维化中的作用机制尚不完全明确,有待进一步研究。未来研究需要关注以下 4 个方面。

3.1 关注不同类型的纤维化动物模型

在研究 TRPV1 在脏器纤维化中的作用时,除了小鼠模型,还有其他动物模型被用于此类研究。例如,在骨癌痛模型中,大鼠胫骨内注射肺癌细胞后,研究者观察到 TRPV1 通道的激活与疼痛行为有关^[41]。此外,大鼠模型也被用于研究肝纤维化,其中 TRPV1 的表达和功能下降与肝星状细胞的激活有关^[32]。还有使用仓鼠模型来研究代谢功能障碍相关脂肪性肝炎,这是一种与肝纤维化相关的疾病。在这些研究中,通过使用基于全反式视黄酸的脂质纳米粒和融合蛋白策略,成功实现了药物在纤维化肝中的高效递送和治疗^[42]。这些不同的动物模型为研究 TRPV1 在脏器纤维化中的作用提供了多样化的方法和视角,有助于深入理解其在疾病发展中的作用机制,并为开发新的治疗方法提供了实验基础。

3.2 深入探讨 TRPV1 在纤维化信号通路中的作用及调控机制

纤维化多与急性或慢性炎症相关,但关于免疫细胞在纤维化中的作用研究甚少。事实上,在脏器损伤过程中会有大量免疫细胞聚集到损伤部位。比如辅助性 T 细胞(helper T cells, Th),包括 Th1、Th2 和 Th17 在纤维化中的作用备受关注,其中 Th1 主要分泌干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和 TNF- β 参与细胞免疫。而 IFN- γ 具有强大的抗纤维化活性,主要在纤维化的初始阶段发挥作用。Th2 主要分泌白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-5(interleukin-5, IL-5)、白细胞介素-13(interleukin-13, IL-13),其中 IL-4 具有强大的促纤维化活性,在纤维化后期起作用。Th17 产生白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17),其最经典的靶细胞是成纤维细胞,可以促进胶原和 MMPs 的产生,促进纤维化^[43-45]。在缺血再灌注引起的急性肾损伤模型中,MEHROTRA 等^[46]发现瞬时受体电位阳离子通道亚家族 C 成员 3(transient receptor potential cation channel, subfamily C member 3, TRPC3)通道的突

变会导致 Th17 细胞损伤,抑制肾纤维化进展。除 Th 淋巴细胞外,TRPV 通道可以调控巨噬细胞极化,影响脏器纤维化^[47-48]。因此,TRPV1 通道激活介导的免疫反应可能是治疗脏器纤维化的有效策略。但该现象是与免疫细胞分泌的炎性介质相关还是与免疫细胞本身的活化和迁移能力相关,机制尚不明确,需要进一步探索验证。

3.3 探讨 TRPV1 在不同器官纤维化中的表达差异及作用特点

TRPV1 在多种脏器纤维化疾病中发挥作用,包括心肌、肾、胰腺、肺和角膜纤维化等。TRPV1 的激活有利于肾、肺纤维化,而 TRPV1 的抑制有利于胰腺纤维化和角膜纤维化。然而,TRPV1 在心肌纤维化中的矛盾作用使得在治疗器官损伤引起的炎症和纤维化时很难决定是激活还是抑制 TRPV1。因此,进一步研究 TRPV1 在纤维化中的作用对于未来探究针对纤维化疾病的有效治疗干预策略至关重要。

3.4 发现新型 TRPV1 激活剂或抑制剂,为纤维化治疗新药的研发奠定基础

针对不同器官中 TRPV1 表达的差异性,临床上使用的 TRPV1 激动剂或抑制剂显示出较好的抑制纤维化的效果,但部分患者会出现血管痉挛和梗死。TRPV1 通道的结构极其复杂,不仅有相互作用的配体,还有多个蛋白激酶磷酸化位点,例如 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶 II^[49-50]。TRPV1 的配体及多个磷酸化位点的存在意味着这些蛋白和激酶可能具有调节作用。靶向 TRPV1 的磷酸化位点也可能是重要的研究方向,发现新型 TRPV1 激活剂或抑制剂,可能为纤维化治疗新药的研发奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] ESANCY K, DHAKA A. Turning down the body heat: a novel mechanism for TRPV1 antagonist-induced hyperthermia [J]. *Neuron*, 2024, 112(11): 1727-1729.
- [2] OH S J, LIM J Y, SON M K, et al. TRPV1 inhibition overcomes cisplatin resistance by blocking autophagy-mediated hyperactivation of EGFR signaling pathway [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2691.
- [3] DIETRICH A, STEINRITZ D, GUDERMANN T. Transient receptor potential (TRP) channels as molecular targets in lung toxicology and associated diseases [J]. *Cell Calcium*, 2017, 67: 123-137.
- [4] WANG Q, ZHANG Y, LI D, et al. Transgenic overexpression of transient receptor potential vanilloid subtype 1 attenuates isoproterenol-induced myocardial fibrosis in mice [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 601-609.
- [5] LANG H, LI Q, YU H, et al. Activation of TRPV1 attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy through improvement of mitochondrial function [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23): 5548-5558.
- [6] HUANG W, RUBINSTEIN J, PRIETO A R, et al. Enhanced postmyocardial infarction fibrosis via stimulation of the transforming growth factor-beta-smad2 signaling pathway: role of transient receptor potential vanilloid type 1 channels [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(2): 367-376.
- [7] ZHONG B, RUBINSTEIN J, MA S, et al. Genetic ablation of TRPV1 exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 261-270.
- [8] BUCKLEY C L, STOKES A J. Mice lacking functional TRPV1 are protected from pressure overload cardiac hypertrophy [J]. *Channels*, 2011, 5(4): 367-374.
- [9] PENG G, TANG X, GUI Y, et al. Transient receptor potential vanilloid subtype 1: a potential therapeutic target for fibrotic diseases [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 951980.
- [10] KELLER M, MERGLER S, LI A, et al. Thermosensitive TRP channels are functionally expressed and influence the lipogenesis in human meibomian gland cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 4043.
- [11] INOUE R, KURAHARA L H, HIRAISHI K. TRP channels in cardiac and intestinal fibrosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 40-49.
- [12] XING C, BAO L, LI W, et al. Progress on role of ion channels of cardiac fibroblasts in fibrosis [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1138306.
- [13] WANG Q, MA S, LI D, et al. Dietary capsaicin ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through the transient receptor potential vanilloid type 1 [J]. *Am J Hypertens*, 2014, 27(12): 1521-1529.
- [14] GAO F, LIANG Y, WANG X, et al. TRPV1 activation attenuates high-salt diet-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through PPAR- δ upregulation [J]. *PPAR Res*, 2014, 2014: 491963.
- [15] MARSHALL N J, LIANG L, BODKIN J, et al. A role for TRPV1 in influencing the onset of cardiovascular disease in obesity [J]. *Hypertension*, 2013, 61(1): 246-252.
- [16] BACMEISTER L, SCHWARZL M, WARNKE S, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 19.
- [17] HIROSE M, TAKANO H, HASEGAWA H, et al. The

- effects of dipeptidyl peptidase-4 on cardiac fibrosis in pressure overload-induced heart failure [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 135(4): 164–173.
- [18] BARRICK C J, DONG A, WAIKEL R, et al. Parent-of-origin effects on cardiac response to pressure overload in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(3): H1003-H1009.
- [19] WANG Y, WANG D H. Protective effect of TRPV1 against renal fibrosis via inhibition of TGF- β /Smad signaling in DOCA-salt hypertension [J]. *Mol Med*, 2011, 17(11/12): 1204–1212.
- [20] LIU Z, WANG W, LI X, et al. Capsaicin ameliorates renal fibrosis by inhibiting TGF- β 1-Smad2/3 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154067.
- [21] WANG Y, CUI L, XU H, et al. TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of ENOS/NO pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 260: 13–19.
- [22] SUZUKI T, KIMURA M, ASANO M, et al. Role of atrophic tubules in development of interstitial fibrosis in microembolism-induced renal failure in rat [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(1): 75–85.
- [23] LI B, HAN X, YE X, et al. Substance P-regulated leukotriene B4 production promotes acute pancreatitis-associated lung injury through neutrophil reverse migration [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 57: 147–156.
- [24] NATHAN J D, PATEL A A, MCVEY D C, et al. Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(5): G1322-G1328.
- [25] SZALLASI A, CORTRIGHT D N, BLUM C A, et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(5): 357–372.
- [26] MCGARVEY L P, BUTLER C A, STOKESBERRY S, et al. Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(3): 704–712.
- [27] BAXTER M, ELTOM S, DEKKAK B, et al. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung [J]. *Thorax*, 2014, 69(12): 1080–1089.
- [28] SCHERAGA R G, OLMAN M A. TRP channels in pulmonary fibrosis: variety is a spice of life [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 68(3): 241–242.
- [29] KNOELL J, CHILLAPPAGARI S, KNUDSEN L, et al. PACS₂-TRPV1 axis is required for ER-mitochondrial tethering during ER stress and lung fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(3): 151.
- [30] GUO Y, YING S, ZHAO X, et al. Increased expression of lung TRPV1/TRPA1 in a cough model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in guinea pigs [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 27.
- [31] 卢林明, 俞婷婷, 何晓伟, 等. 小剂量辣椒素抗小鼠肺纤维化的作用及其机制 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(3): 216–222.
- LU L M, YU T T, HE X W, et al. Effect of small dose capsaicin for treatment of pulmonary fibrosis in mice and its mechanism [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2020, 36(3): 216–222.
- [32] TAO L, YANG G, SUN T, et al. Capsaicin receptor TRPV1 maintains quiescence of hepatic stellate cells in the liver via recruitment of SARM1 [J]. *J Hepatol*, 2023, 78(4): 805–819.
- [33] QIAN K, LEI X, LIU G, et al. Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) alleviates hepatic fibrosis via TGF- β signaling [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 3100943.
- [34] OKADA Y, REINACH P S, SHIRAI K, et al. TRPV1 involvement in inflammatory tissue fibrosis in mice [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(6): 2654–2664.
- [35] HUANG Z, SHARMA M, DAVE A, et al. The antifibrotic and the anticarcinogenic activity of capsaicin in hot chili pepper in relation to oral submucous fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 888280.
- [36] SZABÓ A, CZIRJÁK L, SÁNDOR Z, et al. Investigation of sensory neurogenic components in a bleomycin-induced scleroderma model using transient receptor potential vanilloid 1 receptor- and calcitonin gene-related peptide-knockout mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(1): 292–301.
- [37] WANG L, WANG D H. TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice [J]. *Circulation*, 2005, 112(23): 3617–3623.
- [38] ZAHNER M R, LI D P, CHEN S R, et al. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats [J]. *J Physiol*, 2003, 551(2): 515–523.
- [39] HORTON J S, SHIRAIISHI T, ALFULAIJ N, et al. TRPV1 is a component of the atrial natriuretic signaling complex, and using orally delivered antagonists, presents a valid therapeutic target in the longitudinal reversal and treatment of cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Channels*, 2019, 13(1): 1–16.
- [40] PARK C W, KIM B J, LEE Y W, et al. Asivatrep, a TRPV1 antagonist, for the topical treatment of atopic dermatitis: phase 3, randomized, vehicle-controlled study (CAPTAIN-AD) [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2022, 149(4): 1340–1347.
- [41] SHAN X, ZHAO Z, LAI P, et al. RNA nanotherapeutics

with fibrosis overexpression and retention for MASH treatment [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 7263.

[42] ZAI K, ISHIHARA N, OGUCHI H, et al. Regulation of inflammatory response of macrophages and induction of regulatory T cells by using retinoic acid-loaded nanostructured lipid carrier [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2019, 30(1): 1–11.

[43] YANG B, ZHANG G, ELIAS M, et al. The role of cytokine and immune responses in intestinal fibrosis [J]. J Dig Dis, 2020, 21(6): 308–314.

[44] FROIDURE A, CRESTANI B. Regulation of immune cells in lung fibrosis: the reign of regnase-1? [J]. Eur Respir J, 2021, 57(3): 2004029.

[45] SPAGNOLO P, TONELLI R, SAMARELLI A V, et al. The role of immune response in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: far beyond the Th1/Th2 imbalance [J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26(7): 617–631.

[46] MEHROTRA P, STUREK M, NEYRA J A, et al. Calcium channel orai1 promotes lymphocyte IL-17 expression and progressive kidney injury [J]. J Clin Invest, 2019, 129(11): 4951–4961.

[47] USUI-KUSUMOTO K, IWANISHI H, ICHIKAWA K, et al. Suppression of neovascularization in corneal stroma in a TRPA1-null mouse [J]. Exp Eye Res, 2019, 181: 90–97.

[48] SCHWARTZ E S, LA J H, SCHEFF N N, et al. TRPV1 and TRPA1 antagonists prevent the transition of acute to chronic inflammation and pain in chronic pancreatitis [J]. J Neurosci, 2013, 33(13): 5603–5611.

[49] CHEN Y S, LU M J, HUANG H S, et al. Mechanosensitive transient receptor potential vanilloid type 1 channels contribute to vascular remodeling of rat fistula veins [J]. J Vasc Surg, 2010, 52(5): 1310–1320.

[50] BONNINGTON J K, MCNAUGHTON P A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor [J]. J Physiol, 2003, 551(2): 433–446.

[收稿日期] 2024-05-22

《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。

刘京霞,陈新旺,郭娅静,等. cAMP 信号通路在抑郁症发病机制及干预策略中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 267-274.

LIU J X, CHEN X W, GUO Y J, et al. Research progress on cAMP signaling pathway in the pathogenesis and intervention strategies of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 267-274.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.012

cAMP 信号通路在抑郁症发病机制及干预策略中的研究进展

刘京霞¹, 陈新旺¹, 郭娅静¹, 董永书^{2*}, 郭昱辰¹

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南省中西医结合医院, 郑州 450004)

【摘要】 抑郁症是目前普遍存在的一种精神类疾病, 给患者生活质量带来负面影响的同时, 也给社会带来严重的经济负担。近年来, 基于信号传导通路来干预抑郁症的策略引起社会广泛关注, 其中 cAMP 通路作为一个重要的细胞信号通路, 在抑郁症的发病机制和干预过程中起着关键作用。因此, 就近年来有关基于 cAMP 通路干预抑郁症的研究进行综述, 为调控 cAMP 通路及其级联影响抑郁症的作用机制提供理论依据。

【关键词】 抑郁症; cAMP 通路; PKA; CREB; BDNF; 信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0267-08

Research progress on cAMP signaling pathway in the pathogenesis and intervention strategies of depression

LIU Jingxia¹, CHEN Xinwang¹, GUO Yajing¹, DONG Yongshu^{2*}, GUO Yuchen¹

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Province Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Zhengzhou 450004, China)

Corresponding author: DONG Yongshu. E-mail: 5959230@qq.com

【Abstract】 Depression is a common mental illness that has a negative impact on patient quality of life, as well as representing a serious economic burden to society. The strategy of interfering with depression based on signaling pathways has recently attracted widespread attention. The cAMP pathway is an important cellular signaling pathway that plays a key role in the pathogenesis of and interventions for depression. In this review, we addresses recent studies on cAMP pathway-based interventions in depression, to provide a theoretical basis for regulating the cAMP pathway and its cascade mechanism in depression.

【Keywords】 depression; cAMP pathway; PKA; CREB; BDNF; signaling pathway

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

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目 (81704183), 2023 年河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项 (HSRP-DFCTCM-2023-7-11), 河南省中医药拔尖人才培养项目资助 (豫卫中医函[2023]2 号)。

Funded by Youth Fund Program of the National Natural Foundation of China (81704183), 2023 Henan Province “Double First-Class” Initiative Traditional Chinese Medicine Scientific Research Special Project (HSRP-DFCTCM-2023-7-11), Henan Province Chinese Medicine Top Talent Cultivation Program Funding (Yu Wei Chinese Medicine Letter [2023] NO. 2)。

【作者简介】 刘京霞, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸 (脑病)。Email: 1924581296@qq.com

【通信作者】 董永书, 男, 主任医师, 研究方向: 针灸治疗神经系统疾病的临床。Email: 5959230@qq.com

抑郁症是一种以持续情绪低落、兴趣减退、认知障碍和生理功能紊乱等为特征的精神障碍疾病^[1],也是最常见的精神健康障碍疾病,相关研究表明,全球焦虑和抑郁的患病率正在逐渐增加^[2-3]。抑郁是明显和持续的抑郁情绪^[4],一项衡量 2002 ~ 2030 年全球疾病负担和流行病学转变的研究表明,到 2030 年,抑郁症也许会成为全球疾病负担的第二大原因^[5]。虽然抑郁症的病因机制尚不清楚,但已经提出了几种假说解释其潜在的发病机制,包括单胺递质缺乏、HPA 轴过度活化、神经炎症和肠脑轴 (gut-brain axis, GBA) 功能障碍等。

目前干预抑郁症药物的作用机制,常常涉及多种信号通路的传导过程,包括环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、钙调蛋白激酶 (CaM-dependent protein kinase, CaMK) 信号通路、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 信号通路、Notch 信号通路、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 信号通路、雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路等。药物通过激活以上信号通路,刺激其级联来放大作用,然后刺激下游靶点,从而产生神经生物学效应,促进神经元突触可塑性、抑制炎症反应、减轻神经元的损伤以及神经毒性、调节神经元的生长再生等,进而发挥抗抑郁的作用。现在基于 cAMP 信号通路干预抑郁症状的研究越来越多,但是相关总结性的文章较少,故本文主要对 cAMP 信号通路在抑郁症中的作用机制进行具体综述。

1 cAMP 信号通路

cAMP 信号通路是细胞内一个重要的信号传导通路,现在基于其研究较多的有 cAMP/PKA、cAMP/PKA/CREB 和 cAMP/PKA/CREB/BDNF 级联信号通路。cAMP 通路可参与调节多种细胞的增殖过程、分化过程以及凋亡过程^[6],通过调节神经元的生长发育、神经发生、突触可塑性和记忆巩固,在中枢神经系统 (central nervous

system, CNS) 中发挥独特的作用。cAMP 信号通路参与调节的具体机制为膜上的 G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 与胞外受体等配体结合并活化, G 蛋白与 GPCR 结合→激活腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC)→AC 催化 ATP 水解形成 cAMP→cAMP 激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)→激活后的 PKA 将 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 磷酸化→磷酸化的 CREB 与细胞核内的 cAMP 反应元件 (cAMP response element, CRE) 特异性结合,促使脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的转录与表达→产生信号通路生物学效应来应对外界的刺激^[7-9]。

作为细胞内第二信使的 cAMP 广泛分布于神经系统中, cAMP 能够积极促进与长期记忆有关基因的激活,并且可直接调节细胞的生长代谢、基因表达、分化和凋亡等各种生物学行为和过程^[10]。也有研究表示,神经元细胞内的 cAMP 水平可能在神经突的生长中起决定性的作用^[11]。PKA 是一种嗜碱性丝氨酸/苏氨酸激酶,在细胞信号传导中起着关键作用, PKA 在 CNS 中广泛表达,对神经元的分化和存活机制有显著影响^[12-13], PKA 的异常可导致神经发育生长出现障碍,影响疼痛感应、社会行为、学习记忆和运动能力的功能^[14]。PKA 下游底物之一的 CREB 被称为“记忆开关”,是一种与许多基因的启动子区域结合的转录因子^[15],可以影响神经元突触可塑性和长期记忆形成, CREB 的激活可以发挥一系列的生物学效应,包括改善神经元凋亡^[16-17]。BDNF 是 CREB 下游重要的靶基因,磷酸化的 CREB 与 CRE 结合后促使 BDNF 表达^[18], BDNF 是神经系统疾病中重要的神经营养因子,滋养多种类型的神经元,促进神经元的分化、增殖、再生、成熟以及神经递质的合成^[19-20], BDNF 也可以通过增强树突的复杂程度和树突棘密度协助促进突触可塑性^[21]。

2 cAMP 信号通路和抑郁的关系

目前大量动物实验表明, cAMP 信号通路在抑郁症的发病机制和干预机制中起着关键作用,抑郁和慢性应激常常伴随着 cAMP 信号通路的异

常,破坏了 cAMP/PKA、cAMP/PKA/CREB 和 cAMP/PKA/CREB/BDNF 级联信号通路正常传导,引起抑郁症患者一些神经病理反应,包括神经炎症、神经元细胞凋亡、突触功能的异常和神经发生受损等^[22]。cAMP 通路在调节抑郁症患者情绪以及行为方面发挥重要作用,其信号通路相关蛋白表达下调可能诱发抑郁症^[23]。有研究表明,慢性不可预测应激降低了模型大鼠海马中 cAMP、PKA 和 CREB 的表达^[24],导致神经发生受损,从而出现抑郁样的行为^[25]。KIM 等^[26]也表明,慢性、反复性应激导致小鼠模型海马体中 5HT1A 受体介导的 cAMP/PKA/CREB 级联反应的缺失,由此使小鼠产生抑郁和焦虑症状。近年来越来越多的研究表明,上调 cAMP 信号通路相关蛋白,可以改善抑郁状态。余汇等^[27]研究表明,沃替西汀干预抑郁症状可能通过激活 cAMP/CREB/BDNF 信号传导通路,提高小鼠海马 cAMP 的含量、促进 p-CREB 和 BDNF 的表达来改善小鼠的抑郁样症状。以上均表明 cAMP 信号通路在抑郁发病机制和干预机制中都发挥着重要作用。

2.1 cAMP 信号通路通过调节神经元影响抑郁

cAMP 信号通路中的 CREB 可直接调控 BDNF 的合成及转录,BDNF 是一种神经营养因子,是调节神经元活动最重要的基因之一^[28],cAMP 通路的激活可以促进 BDNF 的合成和释放,从而促进神经元的生长。在抑郁症患者中,神经元的生长和再生发生受损,因此通过增强 cAMP/PKA/CREB/BDNF 通路的活性,可以促进 BDNF 的表达,恢复这些异常,改善抑郁患者的症状。有研究证明,成年哺乳动物海马区神经元的减少是抑郁症发生的关键因素,而增多是恢复的关键因素^[29-30]。

LI 等^[31]研究表明豆腐果苷可能通过刺激 cAMP/PKA/CREB 通路,上调慢性不可预测轻度应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 模型大鼠海马磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白 (phosphorylated cAMP response element binding protein, pCREB) 水平,增强海马区神经保护作用,促进神经元细胞生长,从而改善抑郁样行为。赵迪克等^[32]采用柴胡加龙骨牡蛎汤去干预 CUMS 抑郁模型大鼠,研究结果显示,柴胡加龙骨牡蛎汤缓解了大鼠焦虑、抑郁样情绪,其作用机制可

能是通过激活 cAMP/PKA/CREB/BDNF 信号通路,增强 BDNF 表达,使海马神经元的结构和功能得到保护,神经元的生长被促进实现的。张付民等^[33]发现柴胡疏肝散可能通过激活 cAMP/CREB/BDNF 通路,促使大鼠海马区中 cAMP、CREB、BDNF 的基因和蛋白表达升高,进而保护神经发挥抗抑郁作用。LIU 等^[34]研究表明,磷酸二酯酶 4D (phosphodiesterase 4D, PDE4D) 抑制剂 GEBR-7b 重复给药显著逆转了慢性不可预测压力 (chronic unpredictable stress, CUS) 诱导的抑郁样行为,其干预机制至少部分是通过调节大鼠海马中 cAMP、蛋白激酶 A 催化亚基 α (protein kinase A catalytic subunit α , PKA α)、pCREB 和 GLT1 水平介导的,激发其对 CUS 诱导的行为和生化功能障碍的神经保护潜力。

综上所述, cAMP 通路中的 PKA、CREB、BDNF 基因和蛋白具有保护神经元、促进海马神经元生长与再生的功能,从而发挥抗抑郁的作用,因此海马神经元生长和再生是抑郁症好转的一个重要靶标。

2.2 cAMP 信号通路通过促进神经可塑性影响抑郁

神经可塑性是指大脑通过不断形成新的神经连接来改变和适应外在或内在刺激的能力^[35]。神经可塑性主要包括两种类型:功能神经可塑性和结构神经可塑性^[36-37]。功能性神经可塑性是指改变了神经递质和受体的工作形式,使大脑能够在不改变其结构的情况下进行适应;结构神经可塑性包括神经发生、树突棘突形成以及轴突生长和修复机制的改变^[38]。cAMP 通路对神经可塑性至关重要, cAMP 信号已被证明与突触可塑性降低的机制有关^[39-40]。在抑郁症患者中,神经可塑性可能受损,而通过增强 cAMP 通路的活性,可以促进神经可塑性的恢复,从而有助于改善患者的情绪和认知功能。有研究表明抗抑郁药物的作用可能是通过刺激抑郁症患者 CREB 的表达来介导的,长期抗抑郁药给药后 CREB 的激活是神经可塑性的标志^[41-42]。

HUANG 等^[43]研究表明,腺相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV)-miR-139-5p 抑制 CUMS 诱导的抑郁小鼠模型海马细胞中的 PDE4D,刺激 cAMP/PKA/CREB/BDNF 通路的激活,增强

cAMP、p-CREB 和 BDNF 的表达水平,促使小鼠海马神经发生形成新的神经元,从而改善小鼠抑郁样症状。王叶倩等^[44]研究表明,复方柴金解郁方能够有效激活 CREB,使其 CREB 含量显著升高,影响到神经元组织的再生能力及神经可塑性,从而发挥干预抑郁症的作用。ZHANG 等^[45]研究发现,CUMS 诱导的抑郁模型大鼠海马区 cAMP-PKA 通路异常,CREB 磷酸化水平、BDNF 合成降低,黄芪通过激活 cAMP/PKA/CREB/BDNF 信号通路,增强 p-CREB 和 BDNF 表达,可明显提高抑郁大鼠海马齿状回成熟和突触可塑性,进而改善 CUMS 大鼠模型的抑郁样行为。CHONG 等^[46]研究发现,4 周的猴头菌 (*hericium erinaceus*, HE) 治疗改善了 2 周抑制应激小鼠的抑郁样行为,其干预作用是通过促进海马中 CREB 的磷酸化,从而增强抑郁小鼠的海马神经发生来实现的。LI 等^[47]研究表明,柴胡皂苷 D 通过激活 cAMP/PKA/CREB 信号通路,增强 p-CREB S133、BDNF 蛋白表达和调节神经递质,从而改善大鼠海马神经发生来影响抑郁症的有效药物。

综上所述,通过激活 cAMP 信号通路及其相关级联,刺激 p-CREB 和 BDNF 表达,可促进神经可塑性,从而改善患者的抑郁样症状,因此,可将促进神经可塑性作为干预抑郁症状的一个重要靶点。

2.3 cAMP 信号通路通过抑制神经炎症影响抑郁

cAMP 信号通路及其级联在神经系统疾病中发挥着重要的抗炎作用,例如 cAMP-PKA/CREB 通路可通过减轻神经炎症来发挥神经保护作用^[48],黄芩素可通过调节 cAMP-PKA/CREB 通路逆转神经炎症的发生,从而改善阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的症状^[49]。现在越来越多的证据表明炎症细胞因子水平的升高与人类抑郁样症状和心理障碍相关^[50];TAN 等^[51]的研究也表明通过脂多糖诱导促炎细胞因子的激活,促进神经炎症,可能导致抑郁症状的发生,而且以往研究发现,肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 的水平与抑郁症状呈正相关^[52-53],所以炎症可能是抑郁症发病和病程中的一个重要因素。cAMP 通路中的 cAMP、PKA 和 CREB 与神

经炎症密切相关,cAMP 水平的降低负反馈调节 NF- κ B 信号通路并增加炎症因子的产生,炎症因子的过度产生可能导致神经炎症^[54-56]。

TANG 等^[57]研究表明,交泰丸通过激活 cAMP/PKA/CREB 信号通路,改善海马的损伤和中枢神经系统的炎症反应,从而缓解了糖尿病合并抑郁症患者的抑郁样症状。陈宁等^[58]研究表明艾氯胺酮干预抑郁模型可刺激 cAMP-PKA-CREB 信号通路,促使 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白及 mRNA 表达升高,降低血清 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子水平,从而改善抑郁症状。周振伟等^[59]研究表明,柴胡加龙骨牡蛎汤可显著改善肿瘤后抑郁模型大鼠的抑郁样行为,其机制可能与上调 BDNF/TrkB/CREB 信号通路,刺激 BDNF 蛋白表达和 p-CREB/CREB 升高,从而抑制大鼠海马神经炎症反应有关。CHANG 等^[60]研究表明,柴胡通过上调 cAMP/PKA/CREB 通路中 PKA 和 CREB 的蛋白表达水平,血液中 IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平降低,从而改善 CUMS 诱导的大鼠抑郁样症状。WANG 等^[61]发现,积雪草总苷可通过激活 cAMP-PKA 通路,抑制 CUMS 小鼠模型 NF- κ B 和 NLRP3 相关炎症表达,降低 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 炎症因子水平,从而改善抑郁模型小鼠抑郁样症状。TYNAN 等^[62]通过研究发现 SSRIs 有效抑制小胶质细胞 TNF- α 的产生,发挥抗炎作用,而这种作用是通过激活 cAMP-PKA 通路实现的。DARWISH 等^[63]表示,杜拉鲁肽通过激活 cAMP/PKA 通路,抑制慢性社会挫败应激 (chronic social defeat stress, CSDS) 雄性 C57BL/6 小鼠模型海马区 IL-1 β 、IL-18、IL-6 和 TNF- α 炎症标志物水平,从而改善小鼠的抑郁样症状。何佩宜等^[64]研究表明,逍遥散通过影响 cAMP 信号通路,上调慢性束缚应激 (chronic immobilization stress, CIS) 诱导抑郁大鼠模型大脑皮层中 cAMP、CREB1 mRNA 表达,降低血清炎症因子前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、P 物质 (substances P, SP) 含量,从而改善大鼠的抑郁状态。

综上所述,通过增强 cAMP 通路的活性,促进 cAMP 通路中的 cAMP、PKA、CREB、p-CREB 蛋白及 mRNA 表达升高,降低血液中的炎症因子水平,可能有助于减轻抑郁症患者的炎症反应,从而改善他们的抑郁状态。

2.4 cAMP 信号通路通过抑制细胞凋亡影响抑郁

cAMP-PKA/CREB 还可调节细胞凋亡,当 CAMP/PKA/CREB/BDNF 通路被激活时,会促进 CREB 和 BDNF 的表达,进而调节细胞内的生存信号通路。CREB 与神经元凋亡密切相关,而凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 是 CREB 的重要靶点之一^[65]。BDNF 也可以通过多种方式抑制细胞凋亡,例如抑制凋亡相关蛋白的表达、促进抗氧化剂的生成、维持线粒体功能等。

CAI 等^[66]研究表明,蒙药槟榔十三味丸通过激活 cAMP/CREB/BDNF 信号通路,升高 BDNF mRNA 和 CREB mRNA 的表达水平,促进 CUMS 诱导的抑郁大鼠海马神经元增殖,并且抑制海马神经细胞凋亡,发挥明显的抗抑郁作用。SOARES 等^[67]研究表明,在双侧颈总动脉闭塞 (bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO) 小鼠模型中, Bay60-7550 的抗焦虑作用伴随着神经元凋亡减少,同时伴随着 cAMP-CREB-BDNF 信号通路的激活。TANG 等^[57]研究表明,交泰丸通过激活 cAMP/PKA/CREB 信号通路,提高了 cAMP 的含量以及 PKA 和 CREB 的 mRNA 表达和磷酸化水平,抑制小胶质细胞的活化,改善海马神经元的凋亡,从而改善抑郁症患者的抑郁样症状。ZHANG 等^[68]表明,胸痞方 (Xiong-Pi-Fang, XPF) 可治疗冠心病伴抑郁,改善患者抑郁样症状,这种作用可能是由于 cAMP 信号通路的激活,上调心肌和海马中 PKA、CREB 和 BDNF 的表达水平,从而抑制细胞凋亡有关。CONG 等^[69]研究证明, PDE4 抑制剂罗利普兰可能通过抑制细胞凋亡来减轻认知缺陷和抑郁样行为,其作用可能是通过刺激 cAMP 信号通路介导的。WANG 等^[70]研究表明,柴胡皂苷 A 可以改善脑缺血后患者的抑郁样行为,其作用机制可能是 BDNF、p-CREB 以及 Bcl-2 的表达增加, Bax、Caspase-3 的水平降低,使海马神经元凋亡得到抑制实现的。

综上所述, cAMP 通路可以在一定程度上抑制细胞凋亡,有助于维持细胞的存活和功能,在治疗抑郁症中发挥着重要作用。

3 小结与展望

抑郁症是一种持续的、严重的精神类疾病,

可能对患者的感觉、情绪、行为以及身体健康^[71]产生不利影响。cAMP 通路作为一个重要的信号传导通路,在神经系统疾病的发病机制和治疗过程中发挥着重要的作用,通过激活 cAMP 通路,促进 PKA、CREB 和 BDNF 的表达,可以影响神经元的功能和结构,促进神经元生长和再生、增强神经可塑性、减轻神经炎症并抑制细胞凋亡,从而改善抑郁症患者的症状。尽管 cAMP 通路在抑郁症的治疗中具有很大的潜力,但目前仍存在一些挑战和未解决的问题,现在大多数关于 cAMP 通路及其级联干预抑郁症的研究局限于抑郁症的动物模型,而临床研究较少,所以需要进一步的临床研究来评估激活 cAMP 通路及其级联干预抑郁症的安全性、有效性和可行性。因此,需要更全面的动物实验进行更深入的探索,以促进动物实验向临床应用的过渡。

参 考 文 献 (References)

- [1] FREEMAN M. The world mental health report: transforming mental health for all [J]. World Psychiatry, 2022, 21(3): 391-392.
- [2] LIU Q, HE H, YANG J, et al. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: findings from the global burden of disease study [J]. J Psychiatr Res, 2020, 126: 134-140.
- [3] YANG X, FANG Y, CHEN H, et al. Global, regional and national burden of anxiety disorders from 1990 to 2019: results from the global burden of disease study 2019 [J]. Epidemiol Psychiatr Sci, 2021, 30: e36.
- [4] WITTENBORN A K, RAHMADAD H, RICK J, et al. Depression as a systemic syndrome: mapping the feedback loops of major depressive disorder [J]. Psychol Med, 2016, 46(3): 551-562.
- [5] LOPEZ A D, MATHERS C D. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030 [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2006, 100(5/6): 481-499.
- [6] HOU T, QIN Y, ZHANG Y, et al. Teriparatide regulates osteoblast differentiation in high-glucose microenvironment through the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. J South Med Univ, 2023, 43(1): 39-45.
- [7] WALTEREIT R, WELLER M. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity [J]. Mol Neurobiol, 2003, 27(1): 99-106.
- [8] CHO Y S, LEE Y N, CHO-CHUNG Y S. Biochemical characterization of extracellular cAMP-dependent protein kinase as a tumor marker [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(3): 679-684.

- [9] SHARMA N, LOPEZ D I, NYBORG J K. DNA binding and phosphorylation induce conformational alterations in the kinase-inducible domain of CREB. Implications for the mechanism of transcription function [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(27): 19872–19883.
- [10] 甄磊, 张懿兰, 王晓娜, 等. 舒芬太尼调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路对卵巢癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响 [J]. *中国细胞生物学报*, 2024, 46(3): 445–455.
- ZHEN L, ZHANG Y L, WANG X N, et al. Effects of sufentanil on proliferation, apoptosis, and invasion of ovarian cancer cells by regulating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Chin J Cell Biology*, 2024, 46(3): 445–445.
- [11] BATTY N J, TORRES-ESPÍN A, VAVREK R, et al. Single-session cortical electrical stimulation enhances the efficacy of rehabilitative motor training after spinal cord injury in rats [J]. *Exp Neurol*, 2020, 324: 113136.
- [12] CICEK C, EREN-KOÇAK E, TELKOPARAN-AKILLILAR P, et al. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus of rats subjected to chemically-induced phenylketonuria [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(2): 545–557.
- [13] JAHAN S, SINGH S, SRIVASTAVA A, et al. PKA-GSK3 β and β -catenin signaling play a critical role in trans-resveratrol mediated neuronal differentiation in human cord blood stem cells [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(4): 2828–2839.
- [14] GLEBOV-MCCLLOUD A G P, SAIDE W S, GAINE M E, et al. Protein kinase A in neurological disorders [J]. *J Neurodev Disord*, 2024, 16(1): 9.
- [15] ZHONG Y, ZHU Y, HE T, et al. Rolipram-induced improvement of cognitive function correlates with changes in hippocampal CREB phosphorylation, BDNF and Arc protein levels [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 610: 171–176.
- [16] WANG X, WANG K, WU X, et al. Role of the cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in abnormal behaviours of serotonin transporter knockout mice [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 419: 113681.
- [17] WU T, LI X, LI T, et al. Apocynum venetum leaf extract exerts antidepressant-like effects and inhibits hippocampal and cortical apoptosis of rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 5916451.
- [18] GE L, LIU L, LIU H, et al. Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 768: 49–57.
- [19] WANG J Q, MAO L. The ERK pathway: molecular mechanisms and treatment of depression [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(9): 6197–6205.
- [20] ANGELUCCI F, BRENNÈ S, MATHÉ A A. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models [J]. *Mol Psychiatry*, 2005, 10(4): 345–352.
- [21] RIBEIRO F F, XAPELLI S. Intervention of brain-derived neurotrophic factor and other neurotrophins in adult neurogenesis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1331: 95–115.
- [22] RENDEN R B, BROADIE K. Mutation and activation of Galpha s similarly alters pre- and postsynaptic mechanisms modulating neurotransmission [J]. *J Neurophysiol*, 2003, 89(5): 2620–2638.
- [23] 王金梦, 杨玉, 刘星玥, 等. 基于信号通路的中药抗抑郁症作用机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(1): 115–118.
- WANG J M, YANG Y, LIU X Y, et al. Research progress on mechanism and signaling pathway regulation of Chinese materia Medica on depression [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(1): 115–118.
- [24] WANG C, GUO J, GUO R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 73.
- [25] THOME J, HENN F A, DUMAN R S. Cyclic AMP response element-binding protein and depression [J]. *Expert Rev Neurother*, 2002, 2(3): 347–354.
- [26] KIM M H, LEEM Y H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2014, 18(1): 97–104.
- [27] 余汇, 陈佳佳, 曾冰清, 等. cAMP/CREB/BDNF 信号通路在沃替西汀抗小鼠抑郁样行为中的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(1): 107–112.
- YU H, CHEN J J, ZENG B Q, et al. Role of cAMP/CREB/BDNF signaling pathway in anti-depressive effect of vortioxetine in mice [J]. *J South Med Univ*, 2017, 37(1): 107–112.
- [28] ERNFORS P, BENZON J, KOKAIA Z, et al. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis [J]. *Neuron*, 1991, 7(1): 165–176.
- [29] DECAROLIS N A, EISCH A J. Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: a critical evaluation [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(6): 884–893.
- [30] AIMONE J B, DENG W, GAGE F H. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions [J]. *Trends Cogn Sci*, 2010, 14(7): 325–337.
- [31] LI X Y, QI W W, ZHANG Y X, et al. Helicid ameliorates learning and cognitive ability and activities cAMP/PKA/

- CREB signaling in chronic unpredictable mild stress rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(7): 1146–1154.
- [32] 赵迪克, 牛君, 杜志欣, 等. 基于 cAMP/PKA/CREB/BDNF 信号通路探讨柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(3): 17–25.
- ZHAO D K, NIU J, DU Z X, et al. Exploration of antidepressant mechanism of chaihu and longgu mulitang Based on cAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway [J]. *Chin J Experim Tradit Med Form*, 2023, 29(3): 17–25.
- [33] 张付民, 刘俊. 柴胡疏肝散调节大鼠额叶环磷酸腺苷/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白/脑源性神经营养因子信号通路发挥抗抑郁作用研究 [J]. *安徽医药*, 2020, 24(4): 646–650.
- ZHANG F M, LIU J. Chaihu Shugan San exerts antidepressant effect by regulating the cAMP/CREB/BDNF signaling pathway in the prefrontal cortex of rats with chronic unpredictable mild stress [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2020, 24(4): 646–650.
- [34] LIU X, GUO H, SAYED M D, et al. cAMP/PKA/CREB/GLT1 signaling involved in the antidepressant-like effects of phosphodiesterase 4D inhibitor (GEBR-7b) in rats [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016, 12: 219–227.
- [35] PRICE R B, DUMAN R. Neuroplasticity in cognitive and psychological mechanisms of depression: an integrative model [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(3): 530–543.
- [36] LUCIANA M, COLLINS P F. Neuroplasticity, the prefrontal cortex, and psychopathology-related deviations in cognitive control [J]. *Annu Rev Clin Psychol*, 2022, 18: 443–469.
- [37] MAGEE J C, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2020, 43: 95–117.
- [38] CHEN S, WANG K, WANG H, et al. The therapeutic effects of saikosaponins on depression through the modulation of neuroplasticity: From molecular mechanisms to potential clinical applications [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 201: 107090.
- [39] WANG Z Z, ZHANG Y, LIU Y Q, et al. RNA interference-mediated phosphodiesterase 4D splice variants knock-down in the prefrontal cortex produces antidepressant-like and cognition-enhancing effects [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(4): 1001–1014.
- [40] MANJI H K, DUMAN R S. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics [J]. *Psychopharmacol Bull*, 2001, 35(2): 5–49.
- [41] TSUCHIMINE S, SUGAWARA N, YASUI-FURUKORI N. Increased levels of CREB in major depressive patients with antidepressant treatment [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 263: 296–297.
- [42] NIBUYA M, NESTLER E J, DUMAN R S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(7): 2365–2372.
- [43] HUANG P, WEI S, LUO M, et al. MiR-139-5p has an antidepressant-like effect by targeting phosphodiesterase 4D to activate the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(20): 1594.
- [44] 王叶情, 王宇红, 黄会珍, 等. 复方柴金解郁方对抑郁症失眠大鼠海马、下丘脑 CaMK II 和 CREB 表达影响及药效研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(5): 444–453.
- WANG Y Q, WANG Y H, HUANG H Z, et al. Effects and efficacy of Compound Chaijin Jieyu Formula on the expression of CaMK II and CREB in hypothalamus and hippocampus of rats with depression and insomnia [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 44(5): 444–453.
- [45] ZHANG R, GUO L, JI Z, et al. Radix scutellariae attenuates CUMS-induced depressive-like behavior by promoting neurogenesis via cAMP/PKA pathway [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(11): 2111–2120.
- [46] CHONG P S, POON C H, ROY J, et al. Neurogenesis-dependent antidepressant-like activity of hericium erinaceus in an animal model of depression [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 132.
- [47] LI H Y, ZHAO Y H, ZENG M J, et al. Saikosaponin D relieves unpredictable chronic mild stress induced depressive-like behavior in rats; involvement of HPA axis and hippocampal neurogenesis [J]. *Psychopharmacology*, 2017, 234(22): 3385–3394.
- [48] JIN P, DENG S, TIAN M, et al. INT-777 prevents cognitive impairment by activating takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5) and attenuating neuroinflammation via cAMP/PKA/CREB signaling axis in a rat model of sepsis [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113504.
- [49] ZHANG S, WEI D, LV S, et al. Scutellarin modulates the microbiota-gut-brain axis and improves cognitive impairment in APP/PS1 mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 89(3): 955–975.
- [50] KROGH J, BENROS M E, JØRGENSEN M B, et al. The association between depressive symptoms, cognitive function, and inflammation in major depression [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 35: 70–76.
- [51] TAN Y, XU M, LIN D. Review of research progress on intestinal microbiota based on metabolism and inflammation for depression [J]. *Arch Microbiol*, 2024, 206(4): 146.
- [52] HANNESTAD J, DELLAGIOIA N, BLOCH M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36(12): 2452–2459.
- [53] JANSSEN D G, CANIATO R N, VERSTER J C, et al. A

- psychoneuroimmunological review on cytokines involved in antidepressant treatment response [J]. Hum Psychopharmacol, 2010, 25(3): 201–215.
- [54] NETTIS M A, PARIANTE C M. Is there neuroinflammation in depression? Understanding the link between the brain and the peripheral immune system in depression [J]. Int Rev Neurobiol, 2020, 152: 23–40.
- [55] TROUBAT R, BARONE P, LEMAN S, et al. Neuroinflammation and depression: a review [J]. Eur J Neurosci, 2021, 53(1): 151–171.
- [56] WANG C, YANG X M, ZHUO Y Y, et al. The phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram reverses A β -induced cognitive impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses in rats [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2012, 15(6): 749–766.
- [57] TANG Y, GAO Y, NIE K, et al. Jiao-Tai-Wan and its effective component-berberine improve diabetes and depressive disorder through the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117829.
- [58] 陈宁, 黄燕. 艾氯胺酮对抑郁大鼠的作用效果及对 cAMP-PKA-CREB 信号通路的影响 [J]. 四川医学, 2019, 40(8): 785–789.
- CHEN N, HUANG Y. Effect of esketamine on depressed rats and its effect on cAMP-PKA-CREB signaling pathway [J]. Sichuan Med J, 2019, 40(8): 785–789.
- [59] 周振伟, 董燕玲, 杨文轩, 等. 柴胡加龙骨牡蛎汤对肿瘤后抑郁模型大鼠海马 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的影响 [J]. 中国药业, 2023, 32(17): 29–34.
- ZHOU Z W, DONG Y L, YANG W X, et al. Effect of chaihujialonggumuli decoction on BDNF/TrkB/CREB signaling pathway in hippocampus of model rats with post-tumor depression [J]. Chin Pharm, 2023, 32(17): 29–34.
- [60] CHANG B, LIU Y, HU J, et al. Bupleurum chinense DC improves CUMS-induced depressive symptoms in rats through upregulation of the cAMP/PKA/CREB signalling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115034.
- [61] WANG L, GUO T, GUO Y, et al. Asiaticoside produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice, involving reversion of inflammation and the PKA/pCREB/BDNF signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 2364–2372.
- [62] TYNAN R J, WEIDENHOFER J, HINWOOD M, et al. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia [J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(3): 469–479.
- [63] DARWISH A B, EL SAYED N S, SALAMA A A A, et al. Dulaglutide impedes depressive-like behavior persuaded by chronic social defeat stress model in male C57BL/6 mice: implications on GLP-1R and cAMP/PKA signaling pathway in the hippocampus [J]. Life Sci, 2023, 320: 121546.
- [64] 何佩宜, 陈聪, 侯雅静, 等. 逍遥散对抑郁大鼠大脑皮层 cAMP 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(12): 6008–6012.
- HE P Y, CHEN C, HOU Y J, et al. Effects of Xiaoyaosan on cAMP signaling pathway in cerebral cortex of depressed rats [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(12): 6008–6012.
- [65] CAI X, FU H, WANG Y, et al. Depletion of GPSM1 enhances ovarian granulosa cell apoptosis via cAMP-PKA-CREB pathway *in vitro* [J]. J Ovarian Res, 2020, 13(1): 136.
- [66] CAI M Y, YANG Z, HUANG X J, et al. Mongolian medicine areca thirteen pill (GY-13) improved depressive syndrome via upregulating cAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 293: 115310.
- [67] SOARES L M, MEYER E, MILANI H, et al. The phosphodiesterase type 2 inhibitor BAY 60-7550 reverses functional impairments induced by brain ischemia by decreasing hippocampal neurodegeneration and enhancing hippocampal neuronal plasticity [J]. Eur J Neurosci, 2017, 45(4): 510–520.
- [68] ZHANG L, ZHANG Y, ZHU M, et al. An integrative pharmacology-based strategy to uncover the mechanism of Xiong-pi-Fang in treating coronary heart disease with depression [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 590602.
- [69] CONG Y F, LIU F W, XU L, et al. Rolipram ameliorates memory deficits and depression-like behavior in APP/PS1/tau triple transgenic mice: involvement of neuroinflammation and apoptosis via cAMP signaling [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2023, 26(9): 585–598.
- [70] WANG A R, MI L F, ZHANG Z L, et al. Saikosaponin A improved depression-like behavior and inhibited hippocampal neuronal apoptosis after cerebral ischemia through p-CREB/BDNF pathway [J]. Behav Brain Res, 2021, 403: 113138.
- [71] FEKADU N, SHIBESHI W, ENGIDAWORK E. Major depressive disorder: pathophysiology and clinical management [J]. J Depress Anxiety, 2017, 6: 1–7.

郭碧玉,杨惠栾,陈依凡,等. 模式生物斑马鱼作为抑郁模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 275-287.

GUO B Y, YANG H L, CHEN Y F, et al. Progress of research into the zebrafish (*Danio rerio*) depression model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 275-287.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.013

模式生物斑马鱼作为抑郁模型的研究进展

郭碧玉¹, 杨惠栾¹, 陈依凡¹, 杨晓密¹, 姚政^{1,2*}, 毛羽^{1,2*}

(1. 云南中医药大学基础医学院, 昆明 650500;
2. 云南省中西医结合慢病防治重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 斑马鱼具有繁殖周期短、发育早期(胚)体呈透明、与人类遗传和生理高度同源性及养殖成本低等优点,对哺乳动物抑郁症模型的局限性具有一定的弥补作用,目前已成为研究精神类疾病的一种最有潜力的模式生物。由于斑马鱼独特的生物学特性和模型建立方法的多样性,利用斑马鱼建立抑郁症模型开展的研究正处于快速发展阶段。本文旨在从斑马鱼抑郁模型的造模方法、评价指标、优势与局限性等方面进行全面综述。

【关键词】 斑马鱼; 抑郁症; 疾病动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0275-13

Progress of research into the zebrafish (*Danio rerio*) depression model

GUO Biyu¹, YANG Huiluan¹, CHEN Yifan¹, YANG Xiaomi¹, YAO Zheng^{1,2*}, MAO Yu^{1,2*}

(1. Basic Medicine College, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. Yunnan Key Laboratory of Chronic Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Kunming 650500, China)

Corresponding author: MAO Yu. E-mail:47228684@qq.com; YAO Zheng. E-mail:yaozhmail@126.com

【Abstract】 The zebrafish is characterized by its rapid reproductive cycle, transparent embryonic body in the early developmental stages, high genetic and physiological homology with humans, and low breeding costs. These advantages make it a valuable tool that complements mammalian models of depression. The zebrafish has emerged as a promising model organism for studying mental illnesses owing to its unique biological characteristics and the diverse method available for establishing depression models using this species. This article aims to provide a comprehensive review of zebrafish depression model establishment method, evaluation criteria, advantages, and limitations.

【Keywords】 zebrafish; depression; animal model of disease

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

抑郁症是一种涉及遗传、心理、生物化学和社会环境等因素的精神疾病,具有高患病率、高疾病负担和高致残率等特点^[1]。其临床特征包

括情绪低落、兴趣减退、食欲紊乱、社交恐惧和认知能力低下等^[2]。据统计,全球患抑郁症人口约有 3.5 亿,发病率约为 11%。世界卫生组织预测,

【基金项目】 云南省科技厅中医基础研究联合专项(202001AZ0001-040)。

Funded by Department of Science and Technology of Yunnan Province Joint Project of Basic Research of Traditional Chinese Medicine (202001AZ0001-040).

【作者简介】 郭碧玉,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治疾病机制。Email:913193302@qq.com

【通信作者】 毛羽,女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:神经精神疾病的发病机制与治疗。Email:47228684@qq.com;

姚政,女,硕士,教授,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治疾病机制。Email:yaozhmail@126.com

* 共同通信作者

到 2030 年抑郁症将成为全球疾病负担第一位的疾病^[3]。

抑郁症的发病机制复杂,发病假说众多,如:下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA)功能失调假说、单胺假说、神经炎症假说、线粒体功能障碍假说等^[4],但其确切病因和发病机制尚未完全阐明。目前临床上治疗抑郁症的手段和方法主要有药物治疗、心理治疗和电休克治疗(electroconvulsive therapy,ECT)^[5]。在临床前研究中,实验动物模型一直是研究抑郁症发病机制的重要工具和手段。尽管,哺乳类动物(如大、小鼠和猕猴)是研究抑郁症的经典动物模型,但它们在用于药物的高通量筛选时存在着经济成本高、饲养实验周期长和样本量小等局限性。斑马鱼作为一种新兴的模式生物,弥补了上述局限性。与哺乳类动物比较,斑马鱼具有表型稳定、成本低廉、繁殖周期短和可进行高通量药物筛选等优点,是研究抑郁症的理想模式生物。本文就斑马鱼作为抑郁症动物模型的研究进展进行综述。

1 斑马鱼作为抑郁症动物模型的优势

1.1 斑马鱼与哺乳类动物的精神疾病动物模型比较

1.1.1 非人灵长类动物

非人灵长类动物的基因序列和亲缘关系与人类最为近似,与其他动物相比,非人灵长类动物具有更发达的中枢神经系统结构和更为高级的脑功能。因此,它们可以通过不断学习来提升认知能力和表达能力,逐渐实现社会化。在抑郁症行为和神经系统研究方面,有较为突出的优势,被视为理想的抑郁症模型动物^[6]。但非人灵长类动物获取成本高昂、生长和造模周期较长、喂养繁琐、死亡率高及配套系统要求苛刻等缺点限制了该动物模型的广泛应用。

1.1.2 啮齿类动物

啮齿类动物是精神疾病和药理学模型的主要模式动物,它们具有与人类高度相似的诊断参数,并且在研究疾病的发展、诊断和治疗方案方面已建立了标准化体系。然而,啮齿类动物与人类在饮食需求、生活方式以及行为复杂性等方面存在显著性差异,这使得研究人类精神疾病的发

病机制、大脑皮层的结构和功能变得更加复杂^[7]。因此也不能完全模拟抑郁症的发病机制和过程。

1.1.3 斑马鱼

斑马鱼是一种生活在热带地区的淡水鱼,体呈纺锤形,体长 3 ~ 5 cm,体型较小。因其获得成本低、样本量大、繁殖力快而被广泛应用于精神疾病、心血管疾病、肿瘤疾病、毒理学分析等领域^[8-10]。雌性斑马鱼单次产卵可达 200 ~ 300 枚,这些卵在体外孵化和生长发育,易于进行实验操作。在胚胎和幼鱼时期,其独特的透明特征,为通过荧光标记和钙成像等技术实现可视化和神经元活动跟踪,实时观察体内器官和大脑特定神经元的发育,同时为了解整个胚胎发育过程中大脑动力学、疾病进展和药物反应提供了巨大的优势。这一优势特点解决了哺乳动物模型中体内和体外研究之间差异的问题^[11]。在神经科学领域,幼鱼主要应用于识别新开发的中枢神经系统有效药物和具有中枢神经系统作用的药物再利用,且大多集中在焦虑和压力相关药物以及睡眠障碍药物^[12]。与幼鱼相比,成年斑马鱼主要应用在实验模型上。成鱼的大脑皮层与哺乳动物类似,由 4 个部分组成:内侧皮层和哺乳动物的海马回同源,背侧皮层同源哺乳动物的同型皮质,腹侧和外侧皮层则分别同源哺乳动物的杏仁核和梨状皮层^[13-17],这些结构都与抑郁症密切相关。发育成熟的斑马鱼具有更为复杂的行为模式、更发达的感觉、视觉和内分泌系统;对环境影响有着更高的敏感性和更复杂的神经行为表型^[18]。其次,作为日行性动物,成鱼对视觉刺激的反应方式和行为模式比啮齿类动物更接近于人类^[19]。因此,成鱼在研究一些精神疾病的特定表型时,更具有一定的可靠性和稳定性(图 1)。

1.2 斑马鱼与人类之间生物学特征的相似性

斑马鱼在遗传、结构、生理和行为等方面与人类存在较高的相似性,这使其成为研究人类疾病的理想模型。

在遗传方面,斑马鱼与人类基因序列具有高度同源性,超过 80% 的人类疾病相关基因存在于斑马鱼中^[20]。这意味着用斑马鱼所做的药物实验结果在多数情况下同样也适用于人类。斑马鱼有两个人类 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的

直系同源物,即 Abcb4 和 Abcb5。Abcb4 蛋白在斑马鱼的血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)和肠组织中均有分布,而 Abcb5 蛋白仅在鳃、皮肤和卵巢等组织中表达,但在对人的 P-gp 底物高通量筛选的结果表明,斑马鱼的 Abcb4 蛋白在功能上与人的 P-gp 更为相似,而 P-gp 与药物的吸收、分布和排泄密切相关,可直接影响药物的生物利用度和药效。基于上述 Abcb4 蛋白的定位和特异性,斑马鱼可能是研究化合物的口服生物利用度和药物进入大脑吸收度最有价值的模型^[21]。此外, HuC 蛋白是最早发现的斑马鱼神经元前体细胞标记物之一,它与人类 HuC 蛋白同源度达 89%。HuC 蛋白是一种在神经系统中表达的 RNA 结合蛋白,参与了神经元细胞命运决定的基本机制,对神经元的发育和维持都具有重要作用,这表明该蛋白在斑马鱼神经系统中也具有相似的作用^[22-23](图 2)。

在神经系统结构和生理方面,斑马鱼和人类大脑在进化上具有高度的保守性。斑马鱼的神经系统在解剖学和生物化学通路上与人高度相似^[24-26],如斑马鱼的下丘脑-垂体-肾间轴(hypothalamic-pituitary-renal axis, HPI)功能与人的 HPA 轴功能类似,而在临床上 HPA 轴的过度活跃是与重度抑郁症最一致的内分泌参数。其次,斑马鱼和人类主要的糖皮质激素都是皮质醇(cortisol, CORT),且 CORT 水平不仅会随着压力的增加而升高,还会表现出昼夜节律,与人类一样在白天达到峰值^[27]。除体内的 CORT 外,斑马鱼脑内所含有的兴奋性神经递质谷氨酸(glutamic acid, Glu)和抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)以及胆碱能受体(acetylcholine receptor, AChR)、血清素(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)等神经递质及其受体都与人类相似^[28-30](图 2)。

在行为表现方面,斑马鱼可模拟人类表现出应激反应、学习记忆以及情感(焦虑、恐惧、痛苦、无助、求爱和社会互动)等相关行为表现^[31-36]。例如,当斑马鱼感到恐惧时,会表现出逃避、颤抖和呼吸加快等行为;感到痛苦时,会表现出游动减缓、食欲下降等症状。在研究这些行为时,研

究者还发现斑马鱼和人的下视丘分泌素/食欲素(hypothalamic hypocretin/orexin, Hcrt)神经元的表达模式和轴突投射之间存在很高的相似性^[37-38],而 Hcrt 神经元的作用主要是调节进食、压力、奖励、记忆和成瘾等行为。这为利用斑马鱼模型研究人类复杂的心理和行为提供了理论基础(图 2)。

除上述之外,成年斑马鱼的脊髓神经元形态、神经分化和脊髓网络发育也与高等脊椎动物相似^[15,39]。其体内的星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、小脑浦肯野细胞、髓鞘和运动神经元等不同神经细胞类型均与人类相似^[40-41]。此外,斑马鱼大脑还拥有再生能力^[42],通过对斑马鱼神经系统的定向表达研究,可以了解新基因在神经元发育中的功能作用及神经自主修复过程,为斑马鱼在研究神经科学和疾病模型方面提供独特的优势。

1.3 斑马鱼作为抑郁模型存在的局限性和注意事项

尽管斑马鱼作为抑郁模型具有诸多优势,但抑郁症的临床症状较为复杂使得斑马鱼并不能完全模拟人类复杂的情绪和认知过程。如抑郁患者通常会出现内疚或自杀的念头,这些情绪是无法在斑马鱼身上评估到的。在目前的研究中,斑马鱼对压力应激源的行为反应也有些模糊,无法更精确地区分抑郁状态与焦虑、躁狂和精神分裂症之间的行为表现差异。其次,斑马鱼的行为学评价标准尚未完全统一,不同实验室之间的测试方法和结果可能存在差异,这对结果的解释和比较造成一定的困难^[43]。

除此之外,不同的品系和不同性别之间的斑马鱼也存在行为表现上的差异。如豹纹斑马品系、白化品系、WIK 品系与野生 AB 品系相比,更容易出现焦虑行为^[44]。在性别方面,雌鱼前脑的 DA 水平比雄鱼高,而 5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA)与 5-HT 的比例较低。与其他物种情况一致,在面对压力应激源时,雌鱼的 CORT 水平比雄鱼更高,这也表明雌鱼更易受压力源的影响^[45]。最后,与许多非灵长类动物模型一样,斑马鱼缺乏典型的海马体或大脑皮质^[14]。因此,在使用斑马鱼模型研究脑部疾病时,必须考虑其发育和形态以及遗传背景与人类的差异性。

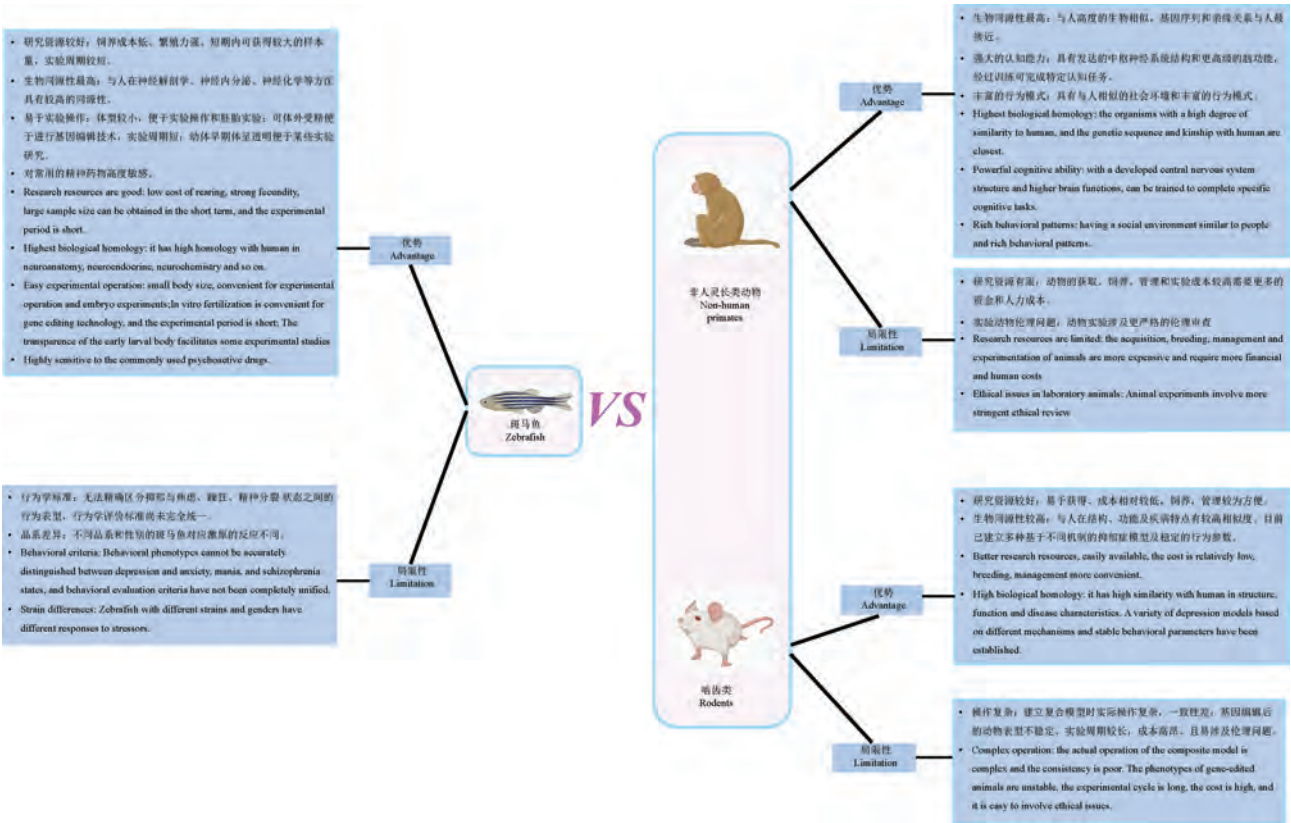


图 1 斑马鱼与哺乳类动物的精神疾病动物模型比较

Figure 1 Comparison of zebrafish and mammalian animal models for psychiatric disorders

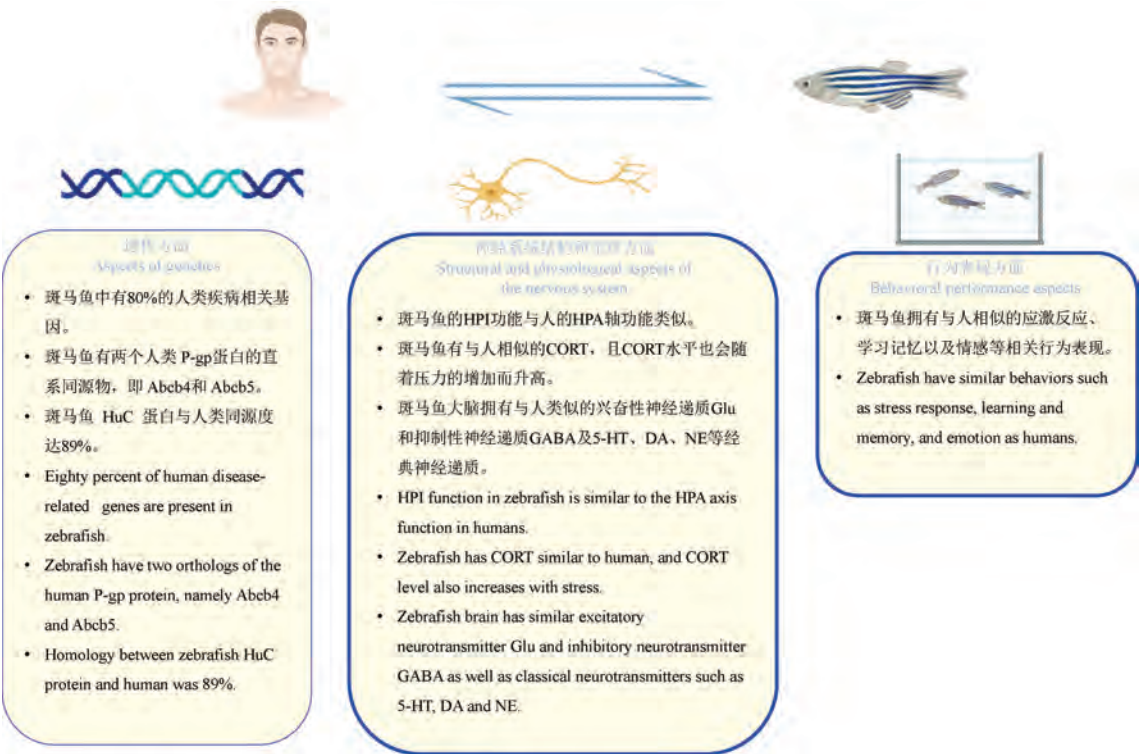


图 2 斑马鱼与人之间生物学特征的相似性

Figure 2 Biological similarities between zebrafish and humans

2 斑马鱼抑郁模型的评价指标

2.1 行为测试

2.1.1 新型水箱测试(novel tank test,NTT)

NTT 是评估斑马鱼焦虑和抑郁行为最常用的测试之一。该测试是将成年斑马鱼放置于一个 3 L 的水箱中,水箱被分成上、下两个相等的水平部分。当斑马鱼进入一个新环境时,最初的大部分时间都会停留在“安全区域”(即水箱的下部)。经环境适应后,斑马鱼开始表现出探索行为,即探索水箱上部。记录并分析 5 min 内斑马鱼游到水箱上部的潜伏期(s)、在水箱上部游动的总时间(s)、在水箱上部游动的总距离(m)、进入水箱上部的次数、游动的总距离(m)、冻结僵化持续时间(s)、冻结僵化次数、不规则游动的次数、游动速度(m/s)等^[46-47](图 3,表 1)。

使用 NTT 的优势之一是可以从三维角度分析动物的行为,即可通过自动化追踪分析斑马鱼三维角度的游泳速度(m/s)、转向角度(°)、距离(m)等,并且可通过其颜色变化反应速度快慢,从而提供更多相关数据丰富斑马鱼情感行为表型^[48-49]。

2.1.2 明/暗箱测试(light/dark box test,LDT)

LDT 是根据野生成年斑马鱼在黑暗区域躲避捕食者攻击的自然行为设计。与啮齿类动物相似,成年斑马鱼更倾向于避开光照区,而停留在黑暗区域。因此,当斑马鱼越焦虑时,躲在暗箱的时间就越长。

在 LDT 中,分析 5 min 内斑马鱼在明/暗箱的停留时间(s)、进入明箱的潜伏期(s)、穿梭次数和风险评估事件次数^[50](图 3,表 1)。

LDT 存在一定的局限性。斑马鱼对黑暗环境的偏好具有年龄依赖性^[51],这可能是黑色素细

胞成熟所致^[52]。在黑色素细胞没有发育成熟的幼鱼中,并不能观察到幼鱼对光照环境的偏好^[53]。因此该测试只适用于观察成年斑马鱼对黑暗环境的偏好^[54-55]。然而 LDT 设计的初衷并不是为了评估斑马鱼的抑郁行为,而是用于评估焦虑行为,常用于检测潜在抗焦虑或致焦虑药物的有效成分。该测试与斑马鱼的抑郁模型测试相配合,有助于检测具有抗抑郁潜力的药物是否含有其他抗焦虑或致焦虑的副作用以及区分焦虑与抑郁行为表现。

2.1.3 浅滩测试(shoaling test,ST)

在这些行为测试中要准确地区分斑马鱼的焦虑和抑郁行为是比较有限的,但 ST 弥补这一缺点。斑马鱼是一种群居鱼类,它们倾向于形成紧密的鱼群^[56]。ST 则是用于评估一群斑马鱼的整体社会行为。当斑马鱼焦虑时,鱼群之间的距离就会缩短,显现出更强的凝聚力。反之,斑马鱼抑郁时,鱼群之间的平均距离则会增加,这种“社交退缩”表型,也是抑郁症的常见临床症状。在该测试中,斑马鱼的群体行为用视频记录 5 min 后,约每 15 s 获取一张视频截图,共截取约 20 张图片。将每个图片校准到与实际水箱的大小一致,然后测量该组中每条鱼之间的距离(m),取平均值进行分析^[57-58](表 1)。

2.1.4 社会偏好测试(social preference test,SPT)

社会偏好是指个体对生活在同类附近的偏好^[59]。斑马鱼在 2 周龄时,开始逐渐靠近彼此,形成社会群体^[60-61]。当其感受到威胁或者出于社会原因而聚集在一起时,它们会表现出以身体对齐、协调游动速度为特征的集体行为或模式。从进化角度分析,这种行为能更有效地躲避捕食者和提高游泳效率^[62]。斑马鱼这种社会行为是通过观察个体对社会刺激所作出的反应来评估的。

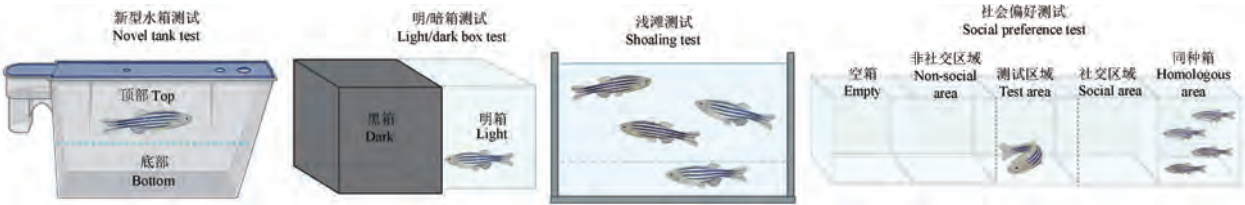


图 3 斑马鱼抑郁模型的行为学测试示意图
Figure 3 Behavioral test diagram of zebrafish depression model

在 SPT 中,水箱被分为 3 部分,左侧为空箱(不放任何动物),中间为测试箱(放入实验鱼),右侧为同种箱(放入同种鱼)。把实验鱼放入测试水箱中,会表现出对同种箱侧鱼的强烈趋向,

且更喜欢与同种鱼进行视觉互动。SPT 主要测量实验鱼在靠近社交区域即同种箱区域的停留时间(s)、社交区域的游动总距离(m)和首次进入社交区域的潜伏期(s)^[63](图 3,表 1)。

表 1 斑马鱼抑郁模型的行为学测试

Table 1 Behavioral tests for depression models in zebrafish

行为学测试 Behavioral test	程序 Procedure	观察指标 Observational index	参考文献 References
新型水箱测试 NTT	a、摄像机置于箱体(长 24 cm × 宽 8 cm × 高 20 cm)正前方;多个水箱测试时,每个水箱用不透明隔板隔开,保持背景和光源一致。 b、用渔网轻柔的捞起斑马鱼(每网一尾鱼),然后将其放入新水箱中,记录其 5 min 内的行为。 a、Camera is placed in front of the box (length 24 cm × width 8 cm × height 20 cm). For multiple tank testing, each tank was separated by an opaque partition to keep the background and light source consistent. b、Zebrafish were gently picked up with a net (one fish per net), then placed in a new tank and their behaviour was recorded for 5 min.	①游到水箱上部的潜伏期/s ②在水箱上部游动的总时间/s ③在水箱上部游动的总距离/m ④进入水箱上部的次数 ⑤游动的总距离/m ⑥冻结僵化持续时间/s ⑦冻结僵化次数 ⑧不规则游动的次数 ⑨游动速度/(m/s) 注:冻结僵化:除了鳃和眼以外,在 2 s 或更长时间内无运动。 不规则游动:游动方向或速度的急剧变化以及重复的快速冲刺行为。 ①Latency to enter the top part/s ②Total time spent swimming in the upper part of the tank/s ③Total swimming distance above the tank/m ④Number of entries to the top area ⑤Total swimming distance/m ⑥Duration of freezing/s ⑦Time of freezing ⑧Number of erratic movements ⑨Speed of swimming/(m/s) Note. Freezing;there was no movement for 2 s or more, except for gills and eyes. Erratic movements; sharp changes in the direction or speed of swimming and repeated rapid sprinting behavior.	[46-47]
明/暗箱测试 LDT	a、箱体(长 25 cm × 宽 15 cm × 高 15 cm)被一块黑色隔板划分为明箱和暗箱,隔板底部留有 2 cm 高的缝隙,便于斑马鱼在两箱之间自由游动;多个水箱测试时,保持明箱底部背景和顶部光源一致。 b、摄像机置于明箱上方,记录其 5 min 内的行为。 a、Chamber (length 25 cm × width 15 cm × height 15 cm) was divided into a light chamber and a dark chamber by a black partition. A gap of 2 cm high was left at the bottom of the partition, so that the zebrafish could swim freely between the two chambers. When testing multiple tanks, keep the bottom background and top light source consistent. b、A camera was placed above the light box to record its behavior for 5 min.	①明/暗箱的停留总时间/s ②进入明箱的潜伏期/s ③穿梭次数 ④风险评估事件次数 注:穿梭次数:明/暗两箱之间的总穿梭次数。 风险评估事件次数:从暗箱进入明箱后再次快速返回暗箱(鱼体部或部分进入均可)。 ①Total time spent in the light/dark box/s ②Incubation period for entry into the light box/s ③Number of shuttles ④Number of risk assessment events Note. Shuttling times;total shuttling times between the light/dark bins. Number of risk assessment events;from the dark box into the open box and then quickly return to the dark box again (fish body or part of the entry can be).	[50]
浅滩测试 ST	a、该箱体与 NTT 箱体相同。 b、单缸需同时放入 4 尾鱼进行录像。记录该鱼群 5 min 内的行为。 a、This box is the same as the NTT box. b、Single cylinder should be up to 4 fish tail into the video at the same time. Behavior of the shoal was recorded for 5 min.	约每 15 s 获取一张视频截图(确保鱼之间不会出现重叠为有效截图)共约 20 张,测量每张截图中每条鱼之间的距离/m。 Take a video screenshot about every 15 s (ensure that there is no overlap between the fish is effective screenshot), a total of about 20, and measure the distance between each fish in each screenshot/m.	[57-58]

续表 1

行为学测试 Behavioral test	程序 Procedure	观察指标 Observational index	参考文献 References
社会偏好 测试 SPT	a、箱体(长 50 cm × 宽 15 cm × 高 15 cm)用隔板划分为左室(空箱)、中室(测试箱)、右室(同种箱)3 个箱室,左、右室各占总箱体的 1/5,中室占 3/5。如图虚线所示,将中室再划分为社交区域、测试区域和非社交区域共 3 个区域。 b、同种箱室放入相同品种斑马鱼,测试箱放入待测试的鱼。摄像机置于水箱正前方,记录其 5 min 的内行为。		
	a、Box body (length 50 cm × width 15 cm × height 15 cm) is divided into three chambers with partitions: the left chamber (empty chamber), the middle chamber (test chamber) and the right chamber (homologous chamber). The left and right chambers each account for 1/5 of the total box body, and the middle chamber accounts for 3/5. As shown by the dotted line in the figure, the middle chamber was subdivided into three areas: social area, test area and non-social area. b、Zebrafish were placed in the homologous chamber, while the fish to be tested were placed in the experimental chamber. The camera, positioned directly in front of the tank recorded their internal behavior for 5 min.	①首次进入社交区域的潜伏期/s ②社交区域/非社交区域的停留总时间/s ③社交区域/非社交区域的游动总距离/m ①Latency to first social zone entry/s ②Total time spent in the social/non-social area/s ③Total swimming distance in social/non-social areas/m	[63]

2.2 生化指标检测

生化指标的检测也是验证动物模型是否成功的一个重要因素。由于斑马鱼的 HPI 轴与人类的 HPA 轴在结构和功能上具有相似性,因此 CORT 通常是检测人和斑马鱼的压力水平指标。研究表明,当斑马鱼暴露于攻击性鱼类、报警信息素、咖啡因等刺激因子时,斑马鱼体内的 CORT、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、促阿片-黑素细胞皮质素原(proopiomelanocortin, POMC)水平显著升高并伴随抑郁行为的出现^[64-65]。与哺乳动物一样,单胺类神经递质在调节斑马鱼的情感行为方面也发挥着重要作用。高水平的单胺类神经递质多与焦虑症和躁动症相关,而低水平的单胺类神经递质则与抑郁症相关。在慢性不可预知性轻度应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)构建的斑马鱼模型中 5-HT、DA 和 NE 等神经递质水平显著下降^[30,66]。另外,有研究表明,在给予斑马鱼慢性应激后其脑内抗增殖蛋白 2(prohibitin 2, PHB2)、溶质载体家族 25 α 成员 5 蛋白(solute carrier family 25 alpha member 5 protein, SLC25α5)、电压依赖性阴离子通道 3(voltage-dependent anion channel 3, VDAC3)、异柠檬酸脱氢酶 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)等 4 种线

粒体蛋白水平均显著升高,这提示线粒体功能障碍可能是斑马鱼抑郁和相关情绪障碍表型的基础^[67-68]。脑内脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)水平的下降也与其抑郁行为相关,BDNF 对脑回路中涉及情绪和认知功能神经元的生长、存活、可塑性以及调控信息传递的突触发育至关重要^[69-70]。近年来,炎性因子如 IL-1β、IL-6、TNF-α 的水平变化与抑郁症的症状相关^[71]。PETRY 等^[72]通过氟西汀和姜黄素预处理后发现,氟西汀和姜黄素可以改善接种嗜水气单胞菌疫苗的斑马鱼抑郁行为表现和 IL-1β 和 IL-6 表达水平的增加(表 2)。

3 斑马鱼不同抑郁模型的建立方法

3.1 CUMS 模型

应激是建立抑郁模型的重要方法之一,采用 CUMS 建立的抑郁模型国际认可度较高。大量研究采用啮齿类动物建立 CUMS 模型,其可模拟现实生活中未知的、慢性的、轻度应激压力源。该模型操作简单、成功率高、能很好地模拟临床抑郁症状,现已广泛用于抗抑郁药物药效评估^[73]。

斑马鱼的 CUMS 模型近年来也被开发建立,其造模方法是对斑马鱼进行 3 ~ 5 周的慢性应激程序。慢性应激程序的应激源包括捕食者暴露、

表 2 斑马鱼抑郁生化指标的变化

Table 2 Zebrafish depression biochemical indicators of change

生化指标 Biochemical indicators	变化 Change	参考文献 Reference
皮质醇 CORT	↑	
促肾上腺皮质激素 ACTH	↑	[64-65]
促阿片-黑素细胞皮质素原 POMC	↑	
血清素 5HT	↓	
多巴胺 DA	↓	[30, 66]
去甲肾上腺素 NE	↓	
抗增殖蛋白 2 PHB2	↑	
溶质载体家族 25 α 成员 5 蛋白 SLC25α5	↑	[67-68]
电压依赖性阴离子通道 3 VDAC3	↑	
异柠檬酸脱氢酶 2 IDH2	↑	
脑源性神经营养因子 BDNF	↓	[69-70]
白细胞介素 1β IL-1β	↑	
白细胞介素 6 IL-6	↑	[71-72]
肿瘤坏死因子 α TNF-α	↑	

渔网追赶、拥挤束缚、黑暗环境、强光刺激、冷热温度变换、禁食、报警信息素刺激、空气暴露、社交隔离、浅水应激等,每种应激因子每日随机出现一种或一种以上^[74]。

通过观察 CUMS 后斑马鱼运动活动(运动迟缓、冻结僵化)、社会偏好(社会快感缺乏、攻击性降低、群体凝聚力降低)、对新物体的探索(减少探索新异事物的行为)行为表现以及检测斑马鱼脑内 5-HT、DA 和 BDNF 等生化指标的变化来判断模型是否成功^[75]。胡国俊^[76]对斑马鱼采用 CUMS 持续 5 周后,发现其探索行为和鱼群凝聚力减少,冻结僵化行为时间和趋暗性增加;体内促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、ACTH 及 CORT 水平显著升高,脑内 5-HT 和 NE 含量显著降低。

MARCON 等^[77]通过 CUMS 持续 7 ~ 14 d 后发现斑马鱼冻结僵化行为的时间和次数增加、鱼群凝聚力下降、认知功能受损及神经递质水平明显下降,这些指标变化与抑郁症患者相关指标变化具有一致性。此外,应激后进行抗抑郁药(氟西汀、去甲替林)治疗,鱼的抑郁行为得以改善;同时,脑内炎症标志物及体内 CORT 水平均显著下降。郑淑怡等^[44]利用中药海马干预 CUMS 建立的抑郁模型,发现海马可有效降低斑马鱼的焦虑程度及抑郁行为表现,并降低 CORT、IL-6 和 IFN-γ 水平,增加单胺类神经递质水平及逆转 5-HT 能系统失调。MOCELIN 等^[78]采用 CUMS 持续应激 14 d,并于第 7 天进行 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)干预处理,在行为学检测中发现 NAC 可提高斑马鱼在顶部区域的进入次数和停留时间,并逆转了活性氧(reactive oxygen species, ROS)、非蛋白硫醇(non-protein thiols, NPSH)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性水平降低。总之,CUMS 处理和药物干预作用从斑马鱼的探索行为、冻结僵化行为、鱼群凝聚力以及 CORT、5-HT、DA、NE 等生化指标变化方面,评估抑郁模型建立的有效性。

CUMS 模型的优势在于其能够克服单一重复的应激源引发的动物适应性反应,且这种模型可长期有效的刺激使动物产生抑郁样情绪。该模型的优势:(1)强度温和,不足以对动物造成持久的伤害;(2)缓慢发作,且应激源会持续数周,反复刺激;(3)不可预知,每个应激源所持续时间、方式均不同。而该模型所诱发的抑郁行为会持续 2 ~ 3 个月,且抗抑郁药物治疗可以逆转该行为。然而,CUMS 模型的局限性:(1)该模型造模时间长、工作量较大,且因其模拟的是慢性应激状态,并不能完全反映抑郁症的所有复杂特征;(2)各实验室在 CUMS 模型应激源的选择和应用上存在主观性,易造成实验结果的不一致性;(3)动物模型与人类在生物学和行为学上始终存在着差异,模型中观察到的结果并不完全适用于人类。

3.2 药物诱导模型

利血平是临床上应用最早的一种治疗精神疾病的药物,从 1950 年开始被应用于高血压的治疗,但长期使用会导致抑郁症状^[79]。因此,该药是较早开发用于诱导动物抑郁的工具药。利血

平主要通过耗竭单胺类神经递质导致抑郁,目前该方法已广泛用于诱导斑马鱼抑郁模型的建立。利血平诱导后的斑马鱼表现出运动迟缓、社交降低、全身 CORT 基线升高和 DA 水平下降等抑郁表型^[80-81]。然而药物诱导又可分为急性诱导和慢性诱导,急性诱导的成鱼抑郁模型,通常是在单次给药后的第 7 天出现抑郁表型。TANG 等^[82]研究发现文法辛拉联合褪黑素可以明显的改善利血平急性诱导的斑马鱼抑郁表型,增加其脑内 5-HT、NA、DA 等神经递质水平;ZHANG 等^[83]通过利血平急性诱导后,发现鱼的运动能力显著下降、认知功能受损、颜色偏好发生改变,表现出明显的抑郁行为;同时伴随 CORT 水平升高、单胺类神经递质水平下降,而这些变化在给予舍曲林和加味逍遥散治疗后得以改善。相对于急性诱导而言,慢性诱导则需要小剂量连续给药 7 d 后方可出现抑郁表型。LIU 等^[84]使用安神补心六片对慢性诱导的模型进行治疗后,发现其有效成分木香炔内酯(costunolide, COS)通过抑制利血平诱导的 5-HT 转运体和 NE 转运体的高表达,显著改善了斑马鱼的抑郁行为、神经损伤和 5-HT 和 NE 水平。除上述对成鱼诱导外,有研究还将斑马鱼胚胎(受精 6 h 后)与利血平进行共培养,行为学检测发现幼鱼运动速度降低、运动总量减少、对外界反应能力降低,体内的 5-HT 也显著降低,而上述表现均与临床抑郁症状一致^[85]。时瑞碟^[86]利用幼鱼建模后连续 7 d 给予天南星醇提取物治疗能改善斑马鱼的运动感知能力和学习记忆能力,同时减少脑内凋亡细胞数量和体内炎症细胞数量。郑涵文等^[87]也发现黄花菜醇对幼鱼抑郁模型指标具有明显的改善作用。

药物诱导模型的优势在于操作简单、周期较短、动物痛苦较轻,且结果可重复性强,实验条件相对可控,如药物种类、剂量、给药方式等均可标准化,这有助于减少实验误差并提高结果的可靠性。但药物诱导模型易忽略抑郁症发病的多因素和复杂性,可信度较低、动物死亡率高、模型病理过程与人类抑郁症的发病机制有显著性差异,因此无法广泛应用,只能用作抗抑郁药物药效成分的初步筛选测定。

3.3 基因突变模型

斑马鱼的基因突变模型也常被应用于抑郁

症的临床前研究中。ZIV 等^[88]在成年斑马鱼中发现了一种斑马鱼突变体,它是由于糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的转录活性消失,导致应激反应的负反馈被破坏,即突变的 Grs357 斑马鱼的 GR 调节功能失调,并伴随体内 CORT 水平显著升高,从而表现出焦虑样和抑郁样行为。经氟西汀治疗后,其行为表现恢复正常,同时 CORT 水平也降低。Grs357 突变体是 HPI 轴功能失调的代表模型,模型中 HPI 衍生因子 CORT、ACTH 和 CRH 均异常升高,而这也是人类重度抑郁症的常见表型。随后 GRIFFITHS 等^[89]也发现突变的 Grs357 幼鱼自发性游动减少;经氟西汀治疗 24 h 后,抑郁行为得到显著改善。光感知在神经系统内分泌中发挥着重要的调节作用,它涉及对压力、睡眠和免疫等多种生理反应的调控。在斑马鱼中,GR 主要表达于视网膜的细胞中,广泛调控视网膜的靶基因,然而在光感知过程中神经递质 DA 起着重要作用。因此,糖皮质激素也参与调控 DA 信号传导基因。MUTO 等^[90]利用 Grs357 突变模型探讨 GR 活性如何参与斑马鱼视网膜的光适应时,发现 Grs357 突变体的 DA 受体的信号传导显著降低;通过调节外在的光感知环境,可以刺激其体内多巴胺和其他神经调节剂的分泌。

目前,基因突变模型已相对成熟,该模型的优点在于可以直接针对抑郁症的遗传机制进行研究,通过基因突变模拟人类抑郁症的遗传特征。基因突变模型通过转基因技术或敲除特定基因来改变神经递质、受体或转运蛋白来构建抑郁模型,该模型已被证明具有较好的有效性。然而,抑郁症是一种受多基因影响的疾病,基因与环境因素相互作用,故单一基因突变的抑郁症模型并不能完全阐释抑郁症的复杂病理机制,此外,该模型价格昂贵,建立时还可能存在基因功能冗余、基因编辑引起的非特异性效应,因此临床应用受限。

4 总结与展望

近些年,中国科学院证实了人类可能是由鱼类进化而来的^[91],提示在未来,鱼类作为人类疾病模式动物可信度会更高、疾病治疗的贡献度会更大。然而,就目前研究所示,任何疾病动物模

型均不能完全复制人的疾病^[92]。不同类型斑马鱼抑郁模型各具优势的同时也不可避免地存在各自的局限。如:CUMS 模型在应激刺激的选择和应用上存在主观性,易造成实验结果的不一致性;药物诱导模型易忽略抑郁症发病的多因素和复杂性;基因突变模型成本较高,建立模型时可能存在基因功能冗余、基因编辑引起的非特异性效应。

综上,未来在抑郁等精神疾病的研究中应尽可能利用好斑马鱼模型优势(如:与人类遗传、结构和生理功能的高相似性、成本低、繁殖快和高通量等)结合最新研究成果不断改进、完善现有模型评价方法,使其更具可靠性、可重复性、稳定性、标准化和产业化。其次,利用斑马鱼胚胎期或幼鱼优势挖掘潜在新型抑郁评价手段或完善现有的模型方法,使其特色优势得以实现。最后,发挥好斑马鱼抑郁模型工具优势,为当前亟待解决的抑郁症相关问题如明确发病机理,完善疾病的预防、诊断和治疗方法、新药的评价和筛选等提供有价值的解决思路和策略。

参 考 文 献(References)

[1] GURURAJAN A, REIF A, CRYAN J F, et al. The future of rodent models in depression research [J]. Nat Rev Neurosci, 2019, 20(11): 686–701.

[2] 李媛媛, 张碧涛, 范培健, 等. 类风湿关节炎伴发抑郁症模型大鼠制备与评价探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1105–1113.

LI Y Y, ZHANG B T, FAN P J, et al. Establishment and evaluation of a rat model of rheumatoid arthritis with depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1105–1113.

[3] COVID-19 Mental Disorders Collaborators. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic [J]. Lancet, 2021, 398(10312): 1700–1712.

[4] FRIES G R, SALDANA V A, FINNSTEIN J, et al. Molecular pathways of major depressive disorder converge on the synapse [J]. Mol Psychiatry, 2023, 28(1): 284–297.

[5] ZAKARIA F, AKHTAR M T, NORHAMIDAH W I W, et al. *Centella asiatica* (L.) Urb. Extract ameliorates branched-chain amino acid (BCAA) metabolism in acute reserpine-induced stress zebrafish model via ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based metabolomics approach [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2023, 264: 109501.

[6] 王文聪, 赵雅蔚, 何侃. 抑郁动物模型研究进展 [J]. 中

国比较医学杂志, 2019, 29(7): 125–130.

WANG W C, ZHAO Y W, HE K. Recent progress in research on animal models of depression [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 125–130.

[7] 韩晓蕾, 胡风云, 田峰, 等. 抑郁动物模型的研究进展及评价 [J]. 临床医药实践, 2015, 24(7): 533–536.

HAN X L, HU F Y, TIAN F, et al. Research progress and evaluation of animal models of depression [J]. Proceed Clin Med, 2015, 24(7): 533–536.

[8] TAL T, YAGHOUBI B, LEIN P J. Translational toxicology in zebrafish [J]. Curr Opin Toxicol, 2020, 23/24: 56–66.

[9] JI C, TAO Y, LI X, et al. AHR-mediated m⁶A RNA methylation contributes to PM_{2.5}-induced cardiac malformations in zebrafish larvae [J]. J Hazard Mater, 2023, 457: 131749.

[10] 黄孔丽, 苏世杰, 王玉婷, 等. 模式生物斑马鱼在神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 121–131.

HUANG K L, SU S J, WANG Y T, et al. Research progress on the model organism zebrafish in neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 121–131.

[11] D'AMORA M, GIORDANI S. The utility of zebrafish as a model for screening developmental neurotoxicity [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 976.

[12] DASGUPTA S, SIMONICH M T, TANGUAY R L. Zebrafish behavioral assays in toxicology [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2474: 109–122.

[13] AMO R, AIZAWA H, TAKAHOKO M, et al. Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula [J]. J Neurosci, 2010, 30(4): 1566–1574.

[14] CHENG R K, JESUTHASAN S J, PENNEY T B. Zebrafish forebrain and temporal conditioning [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014, 369(1637): 20120462.

[15] JURISCH-YAKSI N, YAKSI E, KIZIL C. Radial glia in the zebrafish brain: functional, structural, and physiological comparison with the mammalian glia [J]. Glia, 2020, 68(12): 2451–2470.

[16] LIU W, GE T, LENG Y, et al. The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex [J]. Neural Plast, 2017, 2017: 6871089.

[17] ASIM M, WANG H, WARIS A. Altered neurotransmission in stress-induced depressive disorders: the underlying role of the amygdala in depression [J]. Neuropeptides, 2023, 98: 102322.

[18] GENG Y, ZOU H, GUO Y, et al. Chronic exposure to cortisone induces thyroid endocrine disruption and retinal dysfunction in adult female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Sci Total Environ, 2023, 905: 167022.

[19] MESSINA A, POTRICH D, SCHIONA I, et al. Response to change in the number of visual stimuli in zebrafish: a

- behavioural and molecular study [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5769.
- [20] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498–503.
- [21] ROBEY R W, ROBINSON A N, ALI-RAHMANI F, et al. Characterization and tissue localization of zebrafish homologs of the human ABCB1 multidrug transporter [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 24150.
- [22] KIM C H, UESHIMA E, MURAOKA O, et al. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker [J]. Neurosci Lett, 1996, 216(2): 109–112.
- [23] ITOH M, KIM C H, PALARDY G, et al. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta [J]. Dev Cell, 2003, 4(1): 67–82.
- [24] MUELLER T, WULLIMANN M F. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy [J]. Brain Behav Evol, 2009, 74(1): 30–42.
- [25] LÉGARÉ A, LEMIEUX M, DESROSIERS P, et al. Zebrafish brain atlases: a collective effort for a tiny vertebrate brain [J]. Neurophotonics, 2023, 10(4): 044409.
- [26] RINK E, WULLIMANN M F. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Brain Res, 2004, 1011(2): 206–220.
- [27] LIGHTMAN S L, WILES C C, ATKINSON H C, et al. The significance of glucocorticoid pulsatility [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 583(2/3): 255–262.
- [28] WINTER M J, PINION J, TOCHWIN A, et al. Functional brain imaging in larval zebrafish for characterising the effects of seizurogenic compounds acting via a range of pharmacological mechanisms [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(13): 2671–2689.
- [29] VERMA R, RAJ CHOUDHARY P, KUMAR NIRMAL N, et al. Neurotransmitter systems in zebrafish model as a target for neurobehavioural studies [J]. Mater Today Proc, 2022, 69: 1565–1580.
- [30] EVSIUKOVA V S, BAZOVKINA D, BAZHENOVA E, et al. Tryptophan hydroxylase 2 deficiency modifies the effects of fluoxetine and pargyline on the behavior, 5-HT- and BDNF-systems in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12851.
- [31] PINHO J S, CASTILHO M, SOLLARI J S, et al. Innate chemical, but not visual, threat cues have been co-opted as unconditioned stimulus for social fear learning in zebrafish [J]. Genes Brain Behav, 2020, 19(8): e12688.
- [32] SALAHINEJAD A, ATTARAN A, NADERI M, et al. Chronic exposure to bisphenol S induces oxidative stress, abnormal anxiety, and fear responses in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Sci Total Environ, 2021, 750: 141633.
- [33] SIVALINGAM M, OGAWA S, PARHAR I S. Habenula kisspeptin retrieves morphine impaired fear memory in zebrafish [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 19569.
- [34] BÜHLER A, CARL M. Zebrafish tools for deciphering habenular network-linked mental disorders [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 324.
- [35] NAGPAL J, CRYAN J F. Microbiota-brain interactions: moving toward mechanisms in model organisms [J]. Neuron, 2021, 109(24): 3930–3953.
- [36] SANTACÀ M, DADDA M, DALLA VALLE L, et al. Learning and visual discrimination in newly hatched zebrafish [J]. iScience, 2022, 25(5): 104283.
- [37] ELBAZ I, LEVITAS-DJERBI T, APPELBAUM L. The hypocretin/orexin neuronal networks in zebrafish [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2017, 33: 75–92.
- [38] KUKKONEN J P. Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012 [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(1): C2–C32.
- [39] CHANG W, PEDRONI A, BERTUZZI M, et al. Locomotion dependent neuron-glia interactions control neurogenesis and regeneration in the adult zebrafish spinal cord [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4857.
- [40] ZABEGALOV K N, WANG D, YANG L, et al. Decoding the role of zebrafish neuroglia in CNS disease modeling [J]. Brain Res Bull, 2021, 166: 44–53.
- [41] MAGNUS G, XING J, ZHANG Y, et al. Diversity of cellular physiology and morphology of purkinje cells in the adult zebrafish cerebellum [J]. J Comp Neurol, 2023, 531(3): 461–485.
- [42] SCHUSTER C J, KAO R M. Glial cell ecology in zebrafish development and regeneration [J]. Heliyon, 2020, 6(2): e03507.
- [43] SIREGAR P, JUNIARDI S, AUDIRA G, et al. Method standardization for conducting innate color preference studies in different zebrafish strains [J]. Biomedicines, 2020, 8(8): 271.
- [44] 邓淑怡, 王佳佳, 张永平, 等. 海马改善斑马鱼慢性应激所致抑郁样行为和病理变化的机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(3): 520–525.
- DENG S Y, WANG J J, ZHANG Y P, et al. Mechanism of seahorse ameliorating depression-like behavioral and pathological changes caused by chronic stress in zebrafish [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(3): 520–525.
- [45] AUDIRA G, SIREGAR P, STRUNGARU S A, et al. Which zebrafish strains are more suitable to perform behavioral studies? a comprehensive comparison by phenomic approach [J]. Biology, 2020, 9(8): 200.
- [46] MESHALKINA D A, KYSIL E V, WARNICK J E, et al. Adult zebrafish in CNS disease modeling: a tank that's half-full, not half-empty, and still filling [J]. Lab Anim (NY), 2017, 46(10): 378–387.
- [47] ARTHI B, CHELLATHAI D. Effects of vasicine in

- neuroinflammatory zebrafish model [J]. *Bioinformation*, 2023, 19(5): 595–604.
- [48] MACRÌ S, NERI D, RUBERTO T, et al. Three-dimensional scoring of zebrafish behavior unveils biological phenomena hidden by two-dimensional analyses [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1962.
- [49] CACHAT J, STEWART A, UTTERBACK E, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17597.
- [50] MAXIMINO C, ARAUJO J, LEÃO L K, et al. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2011, 33(6): 727–734.
- [51] MIKLÓSI A, ANDREW R J. The zebrafish as a model for behavioral studies [J]. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 227–234.
- [52] MCCLURE M. Development and evolution of melanophore patterns in fishes of the genus *Danio* (Teleostei: Cyprinidae) [J]. *J Morphol*, 1999, 241(1): 83–105.
- [53] WATKINS J, MIKLÓSI A, ANDREW R J. Early asymmetries in the behaviour of zebrafish larvae [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 151(1/2): 177–183.
- [54] SERRA E L, MEDALHA C C, MATTIOLI R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(12): 1551–1553.
- [55] FACCIOL A, TRAN S, GERLAI R. Re-examining the factors affecting choice in the light-dark preference test in zebrafish [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 327: 21–28.
- [56] MILLER N, GERLAI R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Behav Brain Res*, 2007, 184(2): 157–166.
- [57] GREEN J, COLLINS C, KYZAR E J, et al. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior [J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 210(2): 266–271.
- [58] GROSSMAN L, UTTERBACK E, STEWART A, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 214(2): 277–284.
- [59] LIU X, ZHANG Y, LIN J, et al. Social preference deficits in juvenile zebrafish induced by early chronic exposure to sodium valproate [J]. *Front Behav Neurosci*, 2016, 10: 201.
- [60] SCERBINA T, CHATTERJEE D, GERLAI R. Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: a strain comparison study [J]. *Amino Acids*, 2012, 43(5): 2059–2072.
- [61] NORTON W H J, MANCEAU L, REICHMANN F. The visually mediated social preference test: a novel technique to measure social behavior and behavioral disturbances in zebrafish [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2011: 121–132.
- [62] ABAID N, PORFIRI M. Fish in a ring: spatio-temporal pattern formation in one-dimensional animal groups [J]. *J R Soc Interface*, 2010, 7(51): 1441–1453.
- [63] SAVERINO C, GERLAI R. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish [J]. *Behav Brain Res*, 2008, 191(1): 77–87.
- [64] 陈贝贝, 彭志兰, 章超桦, 等. 牡蛎酶解物对慢性不可预知温和应激斑马鱼抑郁行为改善作用研究 [J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(4): 55–63.
- CHEN B B, PENG Z L, ZHANG C H, et al. Study on improving effect of oyster hydrolysate on depressive behavior of zebrafish under chronic unpredictable mild stress [J]. *J Food Sci Technol*, 2021, 39(4): 55–63.
- [65] XIN N, JIANG Y, LIU S, et al. Effects of prednisolone on behavior and hypothalamic-pituitary-interrenal axis activity in zebrafish [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2020, 75: 103325.
- [66] 龙妍, 石炎夏, 丘岳, 等. 褐藻寡糖对慢性不可预知温和应激诱导的斑马鱼抑郁样行为及肠道菌群的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(7): 1025–1034.
- LONG Y, SHI Y X, QIU Y, et al. Effects of alginate oligosaccharides on depression-like behavior and gut microbiota in zebrafish induced by chronic unpredictable mild stress [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2024, 41(7): 1025–1034.
- [67] CHAKRAVARTY S, REDDY B R, SUDHAKAR S R, et al. Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63302.
- [68] OTSUKA T, MATSUI H. Fish models for exploring mitochondrial dysfunction affecting neurodegenerative disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7079.
- [69] RANA T, BEHL T, SEHGAL A, et al. Unfolding the role of BDNF as a biomarker for treatment of depression [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(10): 2008–2021.
- [70] LUCON-XICCATO T, TOMAIN M, D'ANIELLO S, et al. Bdnf loss affects activity, sociability, and anxiety-like behaviour in zebrafish [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 436: 114115.
- [71] KIRSTEN K, POMPERMAIER A, KOAKOSKI G, et al. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain [J]. *Stress*, 2021, 24(1): 107–112.
- [72] PETRY F, OLTRAMARI A R, KUHN K Z, et al. Fluoxetine and curcumin prevent the alterations in locomotor and exploratory activities and social interaction elicited by immunoinflammatory activation in zebrafish: involvement of BDNF and proinflammatory cytokines [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(3): 389–399.
- [73] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in

- rodents: meta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101–116.
- [74] SONG C, LIU B P, ZHANG Y P, et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: complex effects on behavior and physiology [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 81: 384–394.
- [75] MANUEL R, GORISSEN M, ZETHOF J, et al. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: stronger effects in the resting phase than in the active phase [J]. *J Exp Biol*, 2014, 217(21): 3919–3928.
- [76] 胡国俊. 丙戊酸钠对慢性不可预知应激诱导斑马鱼抑郁模型的改善作用及机制研究 [D]. 重庆: 西南大学; 2022.
- HU G J. The improvement effect and mechanism of valproate sodium on chronic unpredictable stress-induced zebrafish depression model [D]. Chongqing: Southwest University; 2022.
- [77] MARCON M, HERRMANN A P, MOCELIN R, et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline [J]. *Psychopharmacology*, 2016, 233 (21/22): 3815–3824.
- [78] MOCELIN R, MARCON M, D'AMBROS S, et al. N-acetylcysteine reverses anxiety and oxidative damage induced by unpredictable chronic stress in zebrafish [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(2): 1188–1195.
- [79] LEITH N J, BARRETT R J. Effects of chronic amphetamine or reserpine on self-stimulation responding: animal model of depression? [J]. *Psychopharmacology*, 1980, 72(1): 9–15.
- [80] KYZAR E, STEWART A M, LANDSMAN S, et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish [J]. *Brain Res*, 2013, 1527: 108–116.
- [81] ZANG L, MADDISON L A, CHEN W. Zebrafish as a model for obesity and diabetes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 91.
- [82] TANG Y Q, LI Z R, ZHANG S Z, et al. Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2019, 76: 106835.
- [83] ZHANG S, LIU X, SUN M, et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and traditional Chinese medicine (TCM) [J]. *Behav Brain Funct*, 2018, 14(1): 13.
- [84] LIU J, SHANG Y, XIAO J, et al. Phenotype-based HPLC-Q-TOF-MS/MS coupled with zebrafish behavior trajectory analysis system for the identification of the antidepressant components in methanol extract of Anshen Buxin six pills [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 764388.
- [85] 关开宇. 利血平诱导的斑马鱼抑郁症模型构建 [A]. 2019 第四届之江精神医学交流会、浙江省医学会精神病学学术大会、浙江省医师协会精神科医师分会第十二届年会论文汇编 [C]; 2019.
- GUAN K Y. Construction of a zebrafish depression model induced by reserpine [A]. 2019 4th Zhijiang Psychiatric Exchange Conference, Zhejiang Medical Association Psychiatry Academic Conference, 12th Annual Meeting of Zhejiang Physicians Association Psychiatry Physicians Branch Proceedings [C]; 2019.
- [86] 时瑞碟. 天南星改善抑郁症的认知与行为障碍效果及机制研究 [D]. 唐山: 华北理工大学; 2023.
- SHI R D. Effectiveness and mechanism of improving cognitive and behavioral impairments in depression by rhizoma arisaematis [D]. Tangshan: North China University of Science and Technology; 2023.
- [87] 郑涵文, 王梓航, 刘昕玥, 等. 黄花菜醇提物对斑马鱼抑郁样行为的改善作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(4): 20–27.
- ZHENG H W, WANG Z H, LIU X Y, et al. Improvement of depressive-like behavior in *Hemerocallis citrina* Baroni using a zebrafish model [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(4): 20–27.
- [88] ZIV L, MUTO A, SCHOONHEIM P J, et al. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor [J]. *Mol Psychiatry*, 2013, 18(6): 681–691.
- [89] GRIFFITHS B B, SCHOONHEIM P J, ZIV L, et al. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response [J]. *Front Behav Neurosci*, 2012, 6: 68.
- [90] MUTO A, TAYLOR M R, SUZAWA M, et al. Glucocorticoid receptor activity regulates light adaptation in the zebrafish retina [J]. *Front Neural Circuits*, 2013, 7: 145.
- [91] ZHU Y A, LI Q, LU J, et al. The oldest complete jawed vertebrates from the early Silurian of China [J]. *Nature*, 2022, 609(7929): 954–958.
- [92] 王文聪, 赵雅蔚, 何侃. 抑郁动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(7): 125–130.
- WANG W C, ZHAO Y W, HE K. Recent progress in research on animal models of depression [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(7): 125–130.

周轶凡,张彩勤,李秉润,等. 日本脑炎病毒逃逸 I 型干扰素机制在小鼠感染模型创制中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 288-295.

ZHOU Y F, ZHANG C Q, LI B R, et al. Japanese encephalitis virus escape type I interferon mechanism in the creation of a mouse infection model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 288-295.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.014

日本脑炎病毒逃逸 I 型干扰素机制在小鼠感染模型创制中的应用进展

周轶凡^{1,2}, 张彩勤², 李秉润³, 包娇娇⁴, 张延英¹, 师长宏^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032;
3. 空军军医大学基础医学院一大队三队, 西安 710032; 4. 空军军医大学基础
医学院五大队二十队, 西安 710032)

【摘要】 日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)感染人体后首先会逃避先天免疫的 I 型干扰素(I -interferon, I -IFN)的抑制作用,进而感染其他细胞和组织,引起痉挛、神经退行性病变和神经性炎症等系列严重症状甚至死亡。JEV 主要通过抑制 IFN- α/β 产生和干扰素的 Janus 激酶(Janus kinase, Jak)-信号转导和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号通路来逃避先天免疫,基于 JEV 的免疫逃逸机制构建了多种小鼠感染模型,用于研究 JEV 感染的致病机制和治疗方案。本文在阐述 JEV 的干扰素(interferon, IFN)免疫逃逸机制的基础上,系统介绍了相应的小鼠感染模型,分析该类小鼠模型的特点、人类症状的模拟程度等,基于此可能发现新的研究靶点,进而开发新的 JEV 感染小鼠模型,为 JEV 研究提供理想的动物模型。

【关键词】 日本脑炎病毒; I 型干扰素; 免疫逃逸; 小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0288-08

Japanese encephalitis virus escape type I interferon mechanism in the creation of a mouse infection model

ZHOU Yifan^{1,2}, ZHANG Caiqin², LI Bingrun³, BAO Jiaojiao⁴, ZHANG Yanying¹, SHI Changhong^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. No. 1 Brigade No. 3 Team, Air Force Medical University Basic Medical College, Xi'an 710032, China; 4. No. 5 Brigade No. 20 Team, Air Force Medical University Basic Medical College, Xi'an 710032, China)

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

【Abstract】 Japanese encephalitis virus (JEV) usually evades the inhibitory effect of the innate immunity factor type I interferon (I -IFN) when it infects human cells and tissues. The virus then causes a series of serious symptoms, such as spasticity, neurodegenerative lesions, neuroinflammation, and even death. Generally, JEV

[基金项目] 军队实验动物专项课题(SYDW_KY(2021)-14, SYDW_KY(2021)-16, SYDW[2018]08 号), 陕西省创新能力支撑计划(2023-CX-PT-04, 2022PT-36)。

Funded by Special Topic of Military Experimental Animals (SYDW_KY(2021)-14, SYDW_KY(2021)-16, SYDW[2018]08), Shaanxi Innovation Capability Support Plan (2023-CX-PT-04, 2022PT-36).

[作者简介] 周轶凡, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 日本脑炎病毒感染模型的制备。Email: 2056419660@qq.com

[通信作者] 师长宏, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人源化动物模型的创制与应用。Email: changhong@fmmu.edu.cn

escapes innate immunity by inhibiting IFN- α/β production and the interferon Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway. Because of this special immune escape mechanism, various mouse infection models have been constructed for the study of the pathogenesis of and therapeutic regimens for JEV infections. In this review, based on an exposition of the IFN immune escape mechanism of JEV, we systematically introduce the concept of JEV-infected mouse models and analyze the characteristics of these models and the degree to which they simulate human symptoms. The intention is to develop various new JEV-infected mouse models based on potential new research targets and provide novel ideas for animal models for JEV research.

[Keywords] Japanese encephalitis virus; type I interferon; immune escape; mouse model

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

日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 是黄病毒科黄病毒属的病毒^[1]。JEV 的基因组 RNA 大小约为 11 kb, 在 5' 端具有甲基化的帽状结构, 在 3' 端没有 poly (a) 尾巴。在 5'-和 3'-未翻译区 (untranslated regions, UTRs) 之间发现单个开放阅读框 (open-reading-frame, ORF), 它编码衣壳 (capsid, C)、前体膜 (precursor films, PrM) 和包膜 (capsule) 这 3 种结构蛋白和非结构蛋白 (non-structural protein, NS) 1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5 这 7 种非结构蛋白。JEV 感染会引起许多临床症状, 从无症状或自限性发热疾病到以意识改变、脑神经麻痹、异常运动和癫痫发作等为特征的危及生命的神经系统并发症^[2], 对人类健康产生严重危害, 其感染与发病的高危人群为儿童^[3]。JEV 每年报告约 68 000 例感染病例, 如若发展为日本脑炎 (Japanese encephalitis, JE)^[4], 病死率高达 20% ~ 30%^[4-5], 约 30% ~ 50% 的患者会出现永久性神经或精神性后遗症^[3]。人体在受到 JEV 感染后, 机体免疫系统会释放一系列细胞因子抵御病毒入侵, 其中最有效的就是 I 型干扰素 (I-interferon, I-IFN)。IFN- α 和 IFN- β 是两种典型的 I-IFN。I-IFN 作为最重要的宿主防御分子之一, 在抵抗 JEV 感染中起着至关重要的作用。同时, JEV 在与宿主的相互作用中也进化出不同的逃逸方式来对抗 I-IFN。JEV 可通过 NS'、NS4B 和 NS5 等非结构蛋白与干扰素免疫抑制相关通路中的不同蛋白分子产生作用, 靶向抑制干扰素的产生及其信号通路产生的抗病毒作用, 达到免疫逃逸的目的^[6-8], 促进病毒在人体细胞内的复制, 进而引起人体发生痉挛、瘫痪和脑水肿等症状, 对机体造成严重程度不同的损伤。

目前对于 JEV 免疫逃逸机制的认识尚不全

面, 主要受限于缺乏合适的动物模型。现有在 JEV 感染研究中被广泛应用的主要是基于干扰素信号通路分子敲除的小鼠模型, 此模型的特点是 JEV 在体内的复制能力增强, 导致高发病率和早期死亡, 但与人体感染后的免疫反应和症状表现有显著性差异, 这限制了对治疗药物和靶点更深入的研究。尤其是使用最广泛的干扰素受体缺失小鼠模型, 感染 JEV 后死亡速度快, 病程急骤, 观察症状的窗口期较短。这主要是因为此类小鼠缺乏与人类高度相似的免疫系统, 没有完整的免疫反应机制, 在模拟 JEV 感染后的体内免疫应答过程中存在不足。本文综述了 JEV 干扰素免疫逃逸机制的研究进展, 绘制了主要的作用机制图 (图 1), 并重点介绍了基于免疫逃逸机制制备的 JEV 感染小鼠模型的特点。通过对比分析这些模型与人类临床症状和疾病进程的相似度, 本文提出了构建 JEV 感染小鼠模型的新方向。期望这些新策略能够为 JEV 研究提供更理想的小鼠实验模型, 从而推动相关治疗药物和靶点的研究。

1 JEV 通过抑制干扰素的产生来逃避免疫

宿主细胞内的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 能够识别病原体的特定成分^[9], 这一识别过程触发了免疫细胞中 I-IFN 的产生^[10]。当前研究揭示了多种诱导 I-IFN 产生的途径, 其中包括: 线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS) 通过激活干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 的途径^[11]; Toll 样受体 (toll-like receptors, TLR) 3 和 TLR4 通过激活适配蛋白 β 干

扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β , TRIF) 的途径;TLR7/TLR8 和 TLR9 通过激活 IRF7 的途径,此外还存在多条旁通路^[12]。I-IFN 型干扰素产生后,与干

扰素受体结合,引发一系列抗病毒反应^[13]。研究表明 JEV 能够针对性地干预 I-IFN 的产生途径,降低 IFN- α/β 的生成,从而增强 JEV 在宿主体内的复制和致病力,实现免疫逃逸(图 1)。

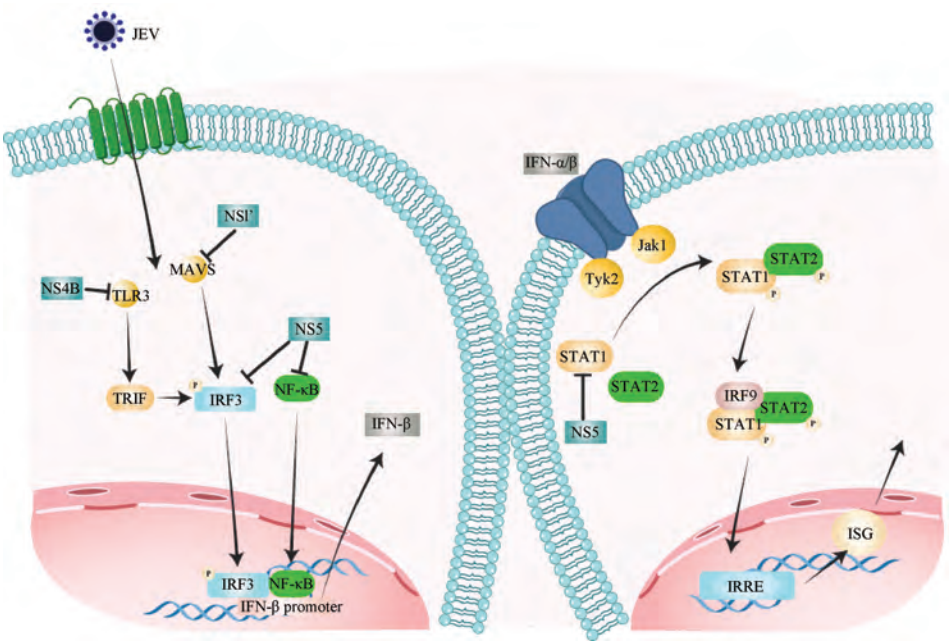


图 1 JEV 逃逸干扰素抗病毒作用的主要机制

Figure 1 Main mechanism of JEV escape interferon antiviral effect

1.1 NS1' 抑制 MAVS 介导 I-IFN 启动子的失活负向调控 IFN-β 的产生

NS1' 在 C 端包含了整个 NS1 和 NS1' 独特的 52aa 附加序列,由程序性核糖体移码而产生^[14]。既往研究表明,NS1' 对于 JEV 的毒力有着显著影响^[15],如在乙脑病毒中去除 NS1' 会减弱病毒对小鼠神经的侵袭性^[16]。而缺乏 NS1' 的 JEV 减毒活疫苗 SA14-14-2 株毒力随着 NS1' 的恢复而增强。有研究表明 NS1' 增加 JEV 毒性的效果与减少 I-IFN 的产生有关^[17]。NS1' 主要通过增强核因子 c-Rel 和环磷酸腺苷反应成分结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate reactive component binding protein, CREB) 与微小 RNA22 (microRNA-22, miR-22) 启动子的结合上调了 miR-22 的表达,从而抑制 MAVS 的表达^[6]。MAVS 是 I-IFN 信号通路中干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 的上游,抑制 MAVS 的表达后会降低 STING 的作用,STING 有着调控 IRF3 从而调控 IFN-β 生成的重要作用^[18],抑制 STING 会阻断 IRF3 激活并合成 IFN-

β 的作用,从而减少了干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 的产生,促进 JEV 在体内的复制,达到免疫逃逸的效果。实验人员已在 *Mavs* 基因敲除小鼠模型上验证了此免疫逃逸机制^[6]。

1.2 NS4B 抑制 TLR3 阻碍 IRF3 的激活负向调控 IFN-β 的产生

NS4B 作为 JEV 中的关键非结构蛋白,在病毒的免疫逃逸机制中发挥着至关重要的作用。现有研究表明 NS4B 能够有效抑制 TLR3 及其下游信号因子 IRF3 的激活^[7]。为了验证这一点,研究人员在 *Tlr3* 基因敲除小鼠模型上进行了 JEV 感染实验,并观察到 *Tlr3* 基因的敲除显著抑制了 IFN-β 的产生^[19]。进一步的实验表明,NS4B 的作用是通过直接与 TLR3 及下游信号因子 TRIF 相互作用,抑制了 IRF3 的激活和磷酸化。IRF3 在先天免疫系统中对 IFN-β 的产生至关重要,其激活被抑制后会显著减少 IFN-β 的产生,进而减弱先天免疫系统的抗病毒能力,这为 JEV 在宿主体内更有效的复制和发挥其致病作用提供了条件^[7]。

1.3 NS5 阻断 IRF3 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的核易位负向调控 IFN- β 的产生

研究揭示了 JEV 的 NS5 能够有效抑制 I-IFN 的产生。这种抑制作用主要通过干扰关键转录因子 IRF3 和 NF- κ B 的活性来实现^[20]。IRF3 和 NF- κ B 作为细胞质中的信号蛋白,在病毒感染时能迁移到细胞核,并与 IFN- β 启动子结合,激活 IFN- β 的转录,发挥抗病毒作用。进一步的研究发现,JEV 的 NS5 蛋白并不阻断双链核糖核酸 (double-stranded RNA, dsRNA) 信号通路的上游环节,而是直接作用于 IRF3 和 NF- κ B 本身。具体来说,JEV 的 NS5 蛋白与核蛋白相互作用蛋白抗体 (nuclear protein interaction protein antibody, KPNA) 2、KPNA3 和 KPNA4 相互作用,通过竞争性地阻断 KPNA3 和 KPNA4 与其下游 IRF3 和 p65 (NF- κ B 的一个亚基) 的结合,抑制 IRF3 和 NF- κ B 向细胞核的转移^[20]。这种作用导致细胞质中的 IRF3 和 NF- κ B 水平升高,而细胞核中的水平降低。由于 IRF3 和 NF- κ B 无法转移到细胞核内负向调控 IFN- β 的产生,削弱了细胞的抗病毒反应,提高 JEV 的复制和传播,从而实现免疫逃逸^[20]。

2 JEV 通过抑制 IFN- α/β 的 JAK-STAT 信号通路来逃避免疫

IFN- α/β 与其受体结合后,通过酪氨酸磷酸化作用,激活了 Janus 蛋白酪氨酸激酶 (Janus proteintyrosine kinase, JAK) 1 和酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, Tyk2),这一过程是干扰素信号传导的关键步骤。信号转导和转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 1 和 STAT2 被磷酸化,进而发生二聚化。这些二聚体与 IRF9 结合,形成干扰素刺激基因因子 3 (interferon-stimulated gene factor 3, ISGF3) 复合体。ISGF3 复合物进一步与细胞核内 ISGs 的干扰素刺激反应元件 (interferon stimulated responsive element, ISRE) 结合,从而激活这些基因的转录^[21-22]。这一转录过程产生了一系列具有抗病毒功能的干扰素刺激基因产物^[23],它们在抵御 JEV 感染中发挥着重要作用 (图 1)。通过

JAK-STAT 这一精细调控的信号传导途径,细胞能够有效地响应病毒感染,激活抗病毒状态,增强宿主的免疫防御能力。

有研究者将 STAT1 蛋白与红色荧光蛋白 DsRed 融合,成功构建了一种名为 STAT1-DsRed 的融合蛋白,使得 STAT1 的细胞内移动得以可视化^[24]。在 BHK-21 细胞中,经过 IFN- α 处理后,这种融合蛋白能够进入细胞核并发挥其作用,随后停留在细胞核内。然而,在经过 NS5 蛋白感染的 BHK-21 细胞中,IFN- α 处理后的 STAT1-DsRed 融合蛋白却大量滞留在细胞质中,表明 NS5 蛋白能够阻止 STAT1 的核定位,从而抑制 IFN- α 的信号传导。为了深入探究 NS5 蛋白对 STAT1 的影响,研究人员构建了一种能够过表达 NS5 蛋白的重组 SIN 病毒,并用其感染所有细胞。研究发现,NS5 蛋白通过抑制干扰素受体相关激酶 Tyk2 的酪氨酸磷酸化,阻止了其激活,进而阻断了 STAT1 的磷酸化和激活过程。这种机制导致 STAT1 无法发生核移位,从而阻断了细胞在接收到 IFN- α 信号后的 JAK-STAT 信号通路^[24]。这一阻断作用进一步抑制了 ISG 的激活以及其抗病毒功能产物的产生,使得 JEV 能够实现免疫逃逸,增强了其在宿主体内的复制能力^[8]。

目前的研究对于 JEV 如何逃避 IFN 介导的 JAK-STAT 信号通路的机制仍然不够深入。特别是 JEV 感染后对 JAK-STAT 通路中关键分子如 STAT2 的影响,以及其他可能的致病机制,都需要进一步的探索和研究。为了深入理解这些复杂的生物过程,开发合适的小鼠感染模型是至关重要的。这些模型不仅能够提供必要的实验基础,帮助科学家们观察和分析 JEV 与宿主免疫系统之间的相互作用,而且对于揭示 JEV 的致病机制和开发新的治疗策略也具有重要意义。

3 基于 IFN 信号通路的 JEV 感染小鼠模型

研究人员针对干扰素信号通路以及 JEV 感染后的免疫逃逸机制,成功构建了特异性敲除干扰素靶点和缺乏干扰素受体的 JEV 感染小鼠模型。这些模型在临床表现和发病特征上与传统的 C57BL/6 小鼠相比更接近人类感染后的情况。

即使是较低剂量的 JEV 感染,也能在这些模型中引起疾病症状并导致死亡。这些基于免疫逃逸机制的模型不仅对深入研究 JEV 感染机制具有重要价值,同时也为开发针对性的治疗药物和确定治疗靶点提供了宝贵的实验基础。

3.1 基于抑制 I-IFN 产生机制构建的 JEV 感染小鼠模型

3.1.1 *Mavs* 基因敲除小鼠

Mavs 基因敲除小鼠模型是在 C57BL/6 小鼠的基础上,利用基因编辑技术特异性地敲除 *Mavs* 基因而构建的。在实验中,这些小鼠通过腹腔注射 1×10^4 个空斑形成单位(plaque forming units, PFU)的 JEV 后,与注射相同剂量的野生型小鼠相比,表现出了显著更早的死亡时间(感染后 5 d),以及更快速的全体死亡(感染后 8 d)。此外,这些小鼠还出现了严重的感染症状,包括明显的瘫痪和后肢无力,这些症状与人类感染 JEV 后的重症表现相似^[6]。这种 *Mavs* 基因敲除小鼠模型的优势在于能够模拟 JEV 感染后的重症症状,为研究病毒的致病机制提供了有力的实验依据。然而,该模型也有其局限性,它不能完全模拟 JEV 感染后在人类中出现的外周器官症状。因此,在研究 JEV 的治疗方案,尤其是针对外周器官损伤的治疗策略时,这种模型可能存在一定的局限性。

3.1.2 *Tlr3* 基因敲除小鼠

Tlr3 基因敲除小鼠是通过在 BALB/c 小鼠上进行基因编辑,特异性地敲除 *Tlr3* 基因而得到的。这些小鼠在腹腔注射 1.4×10^7 PFU 的 JEV 后,与注射相同剂量的 BALB/c 小鼠相比,表现出更为严重的中枢神经系统症状。这种症状的加剧与 *Tlr3* 基因敲除后血脑屏障的通透性显著增加有关^[19]。然而,与其他基因敲除小鼠模型相比,*Tlr3* 基因敲除小鼠在 JEV 感染实验中需要更高的病毒剂量才能显现出明显的病理症状。这一点与人类感染重症日本脑炎时所需的病毒剂量存在显著性差异。因此,尽管 *Tlr3* 基因敲除小鼠在研究 JEV 引起的中枢神经系统病理变化方面具有一定的优势,但在模拟人类感染 JEV 的病理过程时,它们并不是最理想的模型选择。

3.1.3 *Tlr7* 基因敲除小鼠

全身性 *Tlr7* 基因敲除小鼠是通过在 BALB/c 小鼠模型上应用吗啉代(morpholino)技术制备而

成。已有的实验表明,全身性敲除 *Tlr7* 基因小鼠可有效降低 NF- κ B 和 IRF7 的磷酸化,负向调控 IFN- α 的产生^[25],与野生型小鼠相比,在皮下感染 3×10^5 PFU 剂量 JEV 后,这种敲除小鼠模型展现出了更早的死亡时间。此外,这些小鼠在外周和脑内的病毒载量以及趋化因子水平都有显著增加,而 IFN- α 和抗病毒蛋白的表达则显著降低。这些特征与人感染 JEV 时的病理症状更为接近,使得这种小鼠模型成为研究人体实际感染 JEV 的有力工具。这种 *Tlr7* 基因敲除小鼠已被应用于 JEV 药物的治疗实验,并在其中发挥了重要作用^[26]。然而,该模型在 1×10^5 PFU 的较低剂量 JEV 感染后,死亡时间和发病情况与普通小鼠感染后无区别,这是因为此小鼠模型的 *Tlr7* 敲除会受到 TLR8 补偿影响降低对 IFN- α 产生的下降作用^[27],模拟干扰素通路方面存在不完全性,这限制了此模型的使用。

3.2 基于抑制 I-IFN 的 JAK-STAT 作用机制构建的 JEV 感染小鼠模型

3.2.1 *Stat1* 基因敲除小鼠

在 C57BL/6 小鼠的基础上通过基因敲除技术制备的 *Stat1*^{-/-}小鼠,已成为当前研究免疫逃逸机制的关键模型。这种模型对多种病毒表现出极高的易感性。在感染 10 PFU 的 JEV 后,大多数 *Stat1*^{-/-}小鼠在感染后 5 d 死亡,而所有小鼠在感染后 9 d 死亡。该模型的一个显著优点是即使在较低剂量的病毒感染后,也能迅速导致死亡。此外,感染后血脑屏障的破坏使得病毒能够侵入中枢神经系统,引发中枢神经系统疾病^[28],这对于研究 JEV 感染的重症病理具有重要价值。然而,该模型也存在一定的局限性,由于小鼠死亡速度较快,它们通常在 JEV 感染的早期阶段就死亡,这限制了研究治疗窗口期的长度。

3.2.2 IFN 受体缺失小鼠

现在常用的干扰素受体缺失小鼠是通过使缺乏 I 型 IFN 受体(interferon-alpha receptor, IFNAR)的小鼠即 A129 小鼠与缺乏 II 型 IFN 受体(interferon-gamma receptor, IFNGR)的小鼠即 G129 小鼠杂交获得的 AG129 小鼠即同时缺乏 I 型和 II 型 IFN 受体的小鼠模型^[29]。在一项研究中,6 ~ 8 周龄 AG129 小鼠感染低剂量(10 PFU/0.1 mL)JEV SA14-14-2 株后有 100% 的发病率,

且死亡时间很短为感染后 4 d^[30]。但 AG129 小鼠的缺点为缺乏有效的 IFN 反应,AG129 小鼠由于干扰素免疫系统缺失的缘故,往往起病急骤且死亡迅速,导致对于 JEV 感染后的症状观察窗口期很短,不利于 JEV 感染后的症状研究。

也有实验使用的干扰素受体缺失小鼠为 C57BL/6 背景下的 IFNAR 敲除小鼠^[31]。由于其 IFN 受体缺失,阻断了 IFN 信号通路的传导,可以产生更好的感染效果,因此被广泛用于 JEV 致病机制以及疫苗和抗病毒药物的评估研究。IFNAR^{-/-}小鼠相较于野生型的小鼠,在同样注射了致病量的 SA14-14-2 株的 JEV 后,在大部分外周脏器与血清中都能够检测到病毒载量的显著升高,炎症因子也有明显的增加,肝与脾的病理病变明显,但是这个动物模型的中枢神经系统的病变不明显,在脑部的病毒载量和炎症因子没有明显增加^[31]。所以此模型可以较好地模拟 JEV 感染后外周炎症的症状,但对于中枢神经系统疾病并没有很好的模拟效果。在研究 JEV 感染小鼠的外周症状时可以使用此模型,但研究中枢神经系统症状时不建议使用。

以上 IFN 免疫信号通路中的分子敲除小鼠模型,均由于缺失而阻碍 IFN 发挥正常的抗病毒免疫反应,从而促使 JEV 的复制和感染而引起疾病症状,但是该类小鼠模型毕竟不具备完整的 IFN 免疫,不能完全模拟人类感染 JEV 后的 IFN 免疫过程,大多表现出急性感染、病程较短、模拟的临床症状较少等局限性,需考虑开发新的 JEV 感染小鼠模型。

4 总结与展望

JEV 感染人体后,主要通过靶向抑制干扰素信号通路中的关键分子来逃避宿主的干扰素免疫应答。目前,用于 JEV 感染研究的小鼠模型主要是通过定向敲除干扰素免疫逃逸位点构建的。这些模型能够在一定程度上模拟特定免疫位点缺失后的感染状态,但它们的免疫系统与人类存在显著性差异,缺乏完整的 IFN 免疫系统,导致模拟出的 JEV 感染症状、免疫应答过程及其疾病进程与人类实际情况存在一定差距。因此需要开发新的小鼠模型,以更真实地反映人体的免疫应答过程和疾病症状。新的小鼠模型的创制方向

将主要集中在人源化方面,即通过技术手段使小鼠的免疫系统尽可能地接近人类,从而更准确地模拟 JEV 感染后的一系列临床症状。

4.1 通过 IFN- I 信号通路中关键分子的基因人源化以模拟人类干扰素免疫反应

STAT2 是干扰素作用通路 JAK-STAT 中的关键分子,对 IFN 的作用至关重要。在登革病毒(dengue virus, DENV)的相关研究中,已经观察到 DENV 的非结构蛋白 NS5 在小鼠细胞中无法有效降解 STAT2 与抑制 IFN 免疫反应。这主要是因为小鼠的 *Stat2* 基因序列与人类的 *STAT2* 存在显著性差异,这种差异影响了 DENV 在小鼠细胞中的增殖情况^[32]。鉴于人类中 *STAT2* 基因的特异性,已有研究在 C57BL/6 小鼠中实现了人源化 *STAT2* 的插入,并将其应用于同为黄病毒的寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)的感染研究^[33]。研究发现,ZIKV 在这种人源化小鼠模型中的病毒动力学变化以及在睾丸组织中的休眠状态与人类感染 ZIKV 后的临床表现更为相似^[34]。这表明小鼠基因的人源化改造是提高黄病毒感染小鼠模型模拟人类感染真实情况的有效策略。

另外,STING 分子是刺激干扰素产生的主要影响因素。研究表明,JEV 感染后 STING 的表达水平会显著升高,进而激活 IRF3 并促进 I-IFN 的产生,这对于限制 JEV 在人体内的复制和表达至关重要^[18]。此外,研究发现人类的 *STING* 可被 DENV 蛋白酶有效切割,阻断下游的 IRF3 激活,从而抑制干扰素的产生,促进 DENV 的增殖^[35]。而小鼠的 *Sting* 基因则不易被 DENV 蛋白酶切割^[36],这表明 DENV 在人类 *STING* 环境中的复制能力优于在小鼠 *Sting* 基因环境中的复制能力。基于这些发现,构建含有人源化 *STING* 的小鼠模型可能有助于更准确地模拟 JEV 的感染过程。

因此,在保留完整的 IFN 信号通路基础上,构建 *STAT2* 和 *STING* 基因人源化小鼠模型,并将其应用于 JEV 感染实验,将有助于更真实地模拟人体细胞中 IFN 反应,从而可能模拟临床 JEV 感染患者的多种症状。此策略有望为 JEV 感染的机制研究和治疗策略的开发提供更有力的实验支持。

4.2 通过基因人源化和免疫系统双人源化以更接近人类感染 JEV 情况

已有研究表明,JEV 在人体中的发病和预后

与 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞密切相关^[37], 然而具体的作用机制尚不完全清楚, 需要通过合适的小鼠模型来进一步研究。此外, 已有证据显示, 小鼠的获得性免疫反应与人类存在差异, 这限制了小鼠模型在完全模拟 JEV 感染人类后的免疫反应方面的应用。因此, 构建免疫人源化的小鼠模型可能是一个有效的研究方向。免疫人源化的小鼠模型是通过将人类细胞或组织移植到免疫缺陷小鼠体内, 从而在小鼠体内模拟完整的人类免疫应答。这种模型对于病毒感染机制的研究具有重要价值^[38]。例如, 通过 CD34⁺ 造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSC) 重建技术构建的免疫人源化小鼠模型已在艾滋病病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV) 等病毒感染实验中得到广泛应用^[39], 并在 DENV 感染实验中也已有使用^[40-43], 显示出与人类相似的特异性 T 细胞反应频率^[44] 和类似人类的发热症状进展^[25]。考虑到单一的基因人源化或免疫系统人源化可能无法全面反映 JEV 感染后的临床症状和免疫应答, 将这两种方法结合起来可能是构建更理想模型的关键。具体来说, 在重度免疫缺陷的小鼠中, 首先进行关键分子的基因人源化编辑, 然后通过人源 CD34⁺ HSC 进行免疫重建, 从而构建出基因和免疫双人源化的小鼠模型。利用这种模型进行 JEV 感染研究, 可以从先天性免疫和获得性免疫两个方面更真实地模拟人类对病毒感染的免疫应答和疾病进展过程。通过这种方法可以为 JEV 感染提供一种更接近于人体的动物模型, 这将有助于深入理解 JEV 的致病机制, 并为开发有效的预防和治疗策略提供重要的实验动物模型基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] ZHANG Y G, ZHANG H X, CHEN H W, et al. Type I / type I IFN and related factors regulate JEV infection and BBB endothelial integrity [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 216.
- [2] YADAV P, CHAKRABORTY P, JHA N K, et al. Molecular mechanism and role of Japanese encephalitis virus infection in central nervous system-mediated diseases [J]. *Viruses*, 2022, 14(12): 2686.
- [3] ZHU Y, CHEN S, LURONG Q, et al. Recent advances in antivirals for Japanese encephalitis virus [J]. *Viruses*, 2023, 15(5): 1033.
- [4] MOHSIN F, SULEMAN S, ANZAR N, et al. A review on Japanese encephalitis virus emergence, pathogenesis and detection: from conventional diagnostics to emerging rapid detection techniques [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 217: 435-448.
- [5] ZHU Y, HE Z, QI Z. Virus-host interactions in early Japanese encephalitis virus infection [J]. *Virus Res*, 2023, 331: 199120.
- [6] ZHOU D, LI Q, JIA F, et al. The Japanese encephalitis virus NS1' protein inhibits type I IFN production by targeting MAVS [J]. *J Immunol*, 2020, 204(5): 1287-1298.
- [7] ZENG Q, LIU J, LI Z, et al. Japanese encephalitis virus NS4B inhibits interferon beta production by targeting TLR3 and TRIF [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 284: 109849.
- [8] LIN R J, CHANG B L, YU H P, et al. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism [J]. *J Virol*, 2006, 80(12): 5908-5918.
- [9] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 805-820.
- [10] JENSEN S, THOMSEN A R. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion [J]. *J Virol*, 2012, 86(6): 2900-2910.
- [11] SUI L, ZHAO Y, WANG W, et al. Flavivirus prM interacts with MDA5 and MAVS to inhibit RLR antiviral signaling [J]. *Cell Biosci*, 2023, 13(1): 9.
- [12] ROJAS J M, ALEJO A, MARTÍN V, et al. Viral pathogen-induced mechanisms to antagonize mammalian interferon (IFN) signaling pathway [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1423-1444.
- [13] MERTOWSKA P, SMOLAK K, MERTOWSKI S, et al. Immunomodulatory role of interferons in viral and bacterial infections [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10115.
- [14] ZHANG L, NAN X, ZHOU D, et al. Japanese encephalitis virus NS1 and NS1' protein disrupts the blood-brain barrier through macrophage migration inhibitory factor-mediated autophagy [J]. *J Virol*, 2024, 98(5): e0011624.
- [15] MELIAN E B, HINZMAN E, NAGASAKI T, et al. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness [J]. *J Virol*, 2010, 84(3): 1641-1647.
- [16] YE Q, LI X F, ZHAO H, et al. A single nucleotide mutation in NS2A of Japanese encephalitis-live vaccine virus (SA14-14-2) ablates NS1' formation and contributes to attenuation [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(9): 1959-1964.
- [17] WANG J, LI X, GU J, et al. The A66G back mutation in NS2A of JEV SA14-14-2 strain contributes to production of NS1' protein and the secreted NS1' can be used for diagnostic biomarker for virulent virus infection [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 36: 116-125.
- [18] NAZMI A, MUKHOPADHYAY R, DUTTA K, et al. STING mediates neuronal innate immune response following

- Japanese encephalitis virus infection [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 347.
- [19] HAN Y W, CHOI J Y, UYANGAA E, et al. Distinct dictation of Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality via triggering TLR3 and TLR4 signal pathways [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10 (9): e1004319.
- [20] YE J, CHEN Z, LI Y, et al. Japanese encephalitis virus NS5 inhibits type I interferon (IFN) production by blocking the nuclear translocation of IFN regulatory factor 3 and NF- κ B [J]. *J Virol*, 2017, 91(8): e00039-e00117.
- [21] PLATANIAS L C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(5): 375-386.
- [22] IVASHKIV L B, DONLIN L T. Regulation of type I interferon responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1): 36-49.
- [23] LIAO Y, GORAYA M U, YUAN X, et al. Functional involvement of interferon-inducible transmembrane proteins in antiviral immunity [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1097.
- [24] ROBY J A, ESSER-NOBIS K, DEWEY-VERSTELLE E C, et al. Flavivirus nonstructural protein NS5 dysregulates HSP90 to broadly inhibit JAK/STAT signaling [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 899.
- [25] NAZMI A, MUKHERJEE S, KUNDU K, et al. TLR7 is a key regulator of innate immunity against Japanese encephalitis virus infection [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 69: 235-247.
- [26] AWAIS M, WANG K, LIN X, et al. TLR7 deficiency leads to TLR8 compensative regulation of immune response against JEV in mice [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 160.
- [27] CHEN S T, LIU R S, WU M F, et al. CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(4): e1002655.
- [28] VAN DEN BROEK M F, MÜLLER U, HUANG S, et al. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors [J]. *Immunol Rev*, 1995, 148: 5-18.
- [29] CALVERT A E, DIXON K L, DELOREY M J, et al. Development of a small animal peripheral challenge model of Japanese encephalitis virus using interferon deficient AG129 mice and the SA14-14-2 vaccine virus strain [J]. *Vaccine*, 2014, 32(2): 258-264.
- [30] LIU J, JING W, FANG Y, et al. The infection of the Japanese encephalitis virus SA14-14-2 strain induces lethal peripheral inflammatory responses in IFNAR deficiency mice [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 823825.
- [31] ASHOUR J, MORRISON J, LAURENT-ROLLE M, et al. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(5): 410-421.
- [32] KIM I J, TICHE M P, LANTHIER P A, et al. Zika purified inactivated virus (ZPIV) vaccine reduced vertical transmission in pregnant immunocompetent mice [J]. *NPJ Vaccines*, 2024, 9(1): 32.
- [33] YANG W, ZHANG C, LIU L B, et al. Immunocompetent mouse models revealed that S100A4⁺ monocytes/macrophages facilitate long-term Zika virus infection in the testes [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2024, 13 (1): 2300466.
- [34] ZHU T, WEBB L G, VELOZ J, et al. Generation and characterization of human-mouse STING chimeras that allow DENV replication in mouse cells [J]. *mSphere*, 2022, 7 (3): e0091421.
- [35] AGUIRRE S, MAESTRE A M, PAGNI S, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8 (10): e1002934.
- [36] TURTLE L, BALI T, BUXTON G, et al. Human T cell responses to Japanese encephalitis virus in health and disease [J]. 2016, 213(7): 1331-1352.
- [37] CORONEL-RUIZ C, GUTIÉRREZ-BARBOSA H, MEDINA-MORENO S, et al. Humanized mice in dengue research: a comparison with other mouse models [J]. *Vaccines*, 2020, 8(1): 39.
- [38] LEUNG C, CHIJOKE O, GUJER C, et al. Infectious diseases in humanized mice [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43 (9): 2246-2254.
- [39] ZOMPI S, HARRIS E. Animal models of dengue virus infection [J]. *Viruses*, 2012, 4(1): 62-82.
- [40] MOTA J, RICO-HESSE R. Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20762.
- [41] BYRNE A B, GARCÍA C C, DAMONTE E B, et al. Murine models of dengue virus infection for novel drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2022, 17(4): 397-412.
- [42] KAYESH M E H, TSUKIYAMA-KOHARA K. Mammalian animal models for dengue virus infection: a recent overview [J]. *Arch Virol*, 2022, 167(1): 31-44.
- [43] JAISWAL S, PAZOLES P, WODA M, et al. Enhanced humoral and HLA-A2-restricted dengue virus-specific T-cell responses in humanized BLT NSG mice [J]. *Immunology*, 2012, 136(3): 334-343.
- [44] FRIAS-STACHELI N, DORNER M, MARUKIAN S, et al. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing [J]. *J Virol*, 2014, 88 (4): 2205-2218.

李丽,严兴科,魏玉婷,等. 阿尔茨海默病病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 296-310.

LI L, YAN X K, WEI Y T, et al. Research progress of Alzheimer's disease syndromes combined with animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(2): 296-310.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.02.015

阿尔茨海默病病证结合动物模型的研究进展

李丽¹, 严兴科^{1,2*}, 魏玉婷¹, 窦婷婷¹

(1. 甘肃中医药大学针灸推拿学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医药研究中心, 兰州 730000)

【摘要】 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病, 中医药治疗 AD 效果良好, 病证结合动物模型是开展相关研究的基础。本文整理和归纳常用非转基因型 AD 动物模型及 AD 病证结合动物模型的研究资料, 发现当前常见的非转基因型 AD 动物模型包括老化型 (自然老化型、快速老化型和诱导老化型) 和注入诱导损伤型 (A β 注射动物模型、Tau 蛋白损伤型、胆碱能系统损伤模型、神经炎症模型和铝中毒诱导模型) 共八种, AD 病证结合动物模型有肾虚/肾虚精亏/肾虚髓空、痰浊阻窍、瘀血阻络、痰瘀互结、肝郁和痰饮郁热证六种。本文通过综述各模型复制方法的优势及不足, 以期为今后 AD 病证结合动物模型的研究提供参考。

【关键词】 阿尔茨海默病; 动物模型; 病证结合; 研究进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 02-0296-15

Research progress of Alzheimer's disease syndromes combined with animal models

LI Li¹, YAN Xingke^{1,2*}, WEI Yuting¹, DOU Tingting¹

(1. College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Research Center of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: YAN Xingke. E-mail: yanxingke@126.com

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is a common neurodegenerative disease. Traditional Chinese medicine is effective in treating AD. The combination of disease and syndrome with animal model is the basis and premise of related research. In this paper, studies on non-transgenic AD animal models and AD disease and syndrome combined animal models are summarized. It was found that, there are eight common non-transgenic AD animal models, including aging type (natural aging type, rapid aging type and induced aging type) and injection-induced injury type (A β injection animal model, Tau damage type, damage model of cholinergic system, neuroinflammatory model and aluminum poisoning induction model). AD disease and syndrome combined with animal models include kidney deficiency/kidney deficiency and essence deficiency/kidney deficiency and pulp emptying, phlegm turbidity blocking orifice, blood stasis blocking collaterals, phlegm stasis interlocking, liver depression and phlegm fluid stagnation heat. In this paper, the advantages and disadvantages of each model replication method are reviewed, in order to provide reference and support for the future study of AD disease and syndrome combined with animal models.

【基金项目】 甘肃省中医药研究中心 2024 年度专项开放课题 (zyzx-2024-zx03), 2023 年甘肃省省级重点人才项目 (甘组通字 [2023] 20 号), 2024 年高校教师创新基金项目 (2024A-082)。

Funded by Gansu Research Center of Traditional Chinese Medicine 2024 Special Open Project (zyzx-2024-zx03), 2023 Provincial Key Talent Project of Gansu Province (Gan Zu Tong Zi [2023] No. 20), 2024 College Teacher Innovation Fund Project (2024A-082).

【作者简介】 李丽, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 针灸调节效应的脑功能机制。Email: 1637758247@qq.com

【通信作者】 严兴科, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针灸调节效应的脑功能机制。Email: yanxingke@126.com

[Keywords] Alzheimer’s disease; animal model; combination of disease and syndrome; research progress

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 是一种与衰老密切相关的神经退行性疾病,主要表现为进行性认知功能和记忆障碍^[1]。AD 的发病率随着年龄的增长逐渐升高,AD 是痴呆症最常见的病因,占痴呆病例的 60% ~ 70%^[2],我国痴呆的患者近 1507 万,其中 AD 患者约 983 万^[3]。该病发病隐匿、病情呈持续性进展,严重影响患者的生活质量,给患者家庭及社会带来了极大的经济负担^[4]。动物实验不仅是推动医学发展的重要动力,而且是连接基础与临床的桥梁,建立正确的动物模型是开展动物实验不可或缺的实验基础与前提。目前常用的 AD 动物模型大致分为老化型、注入诱导型、转基因型、复合型 4 种^[5]。病证结合动物模型是在中医辨证的思想与

现代医学理论相结合指导下发展形成的衍生产物。模型特点是在动物身上复制与人体疾病、证候相同或相近的因素,同时模拟“病”与“证”相关的信息,较单纯“病”或单纯“证”的动物模型更具说服力^[6]。为进一步探索中医药治疗 AD 的作用机制、评价中医药的疗效,建立标准化的病证结合动物模型是推进中医药现代化的重要手段,并且具有重大意义^[7]。因此,本文系统梳理常见非转基因 AD 动物模型的制备方法及其各自优缺点,在此基础上,总结归纳当前已有的 AD 病证结合动物模型,对其构建方法、评价模式等进行梳理总结,以期为病证结合动物模型的研究提供参考,为今后 AD 的中医药研究提供动物模型基础 (图 1)。

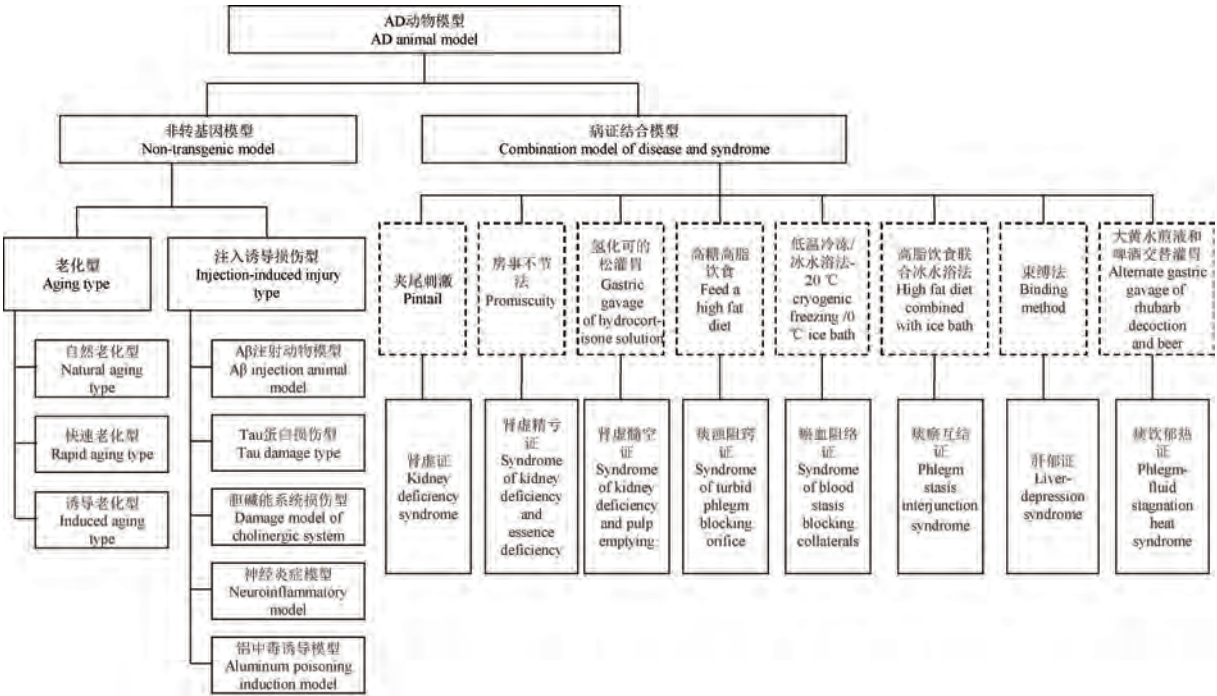


图 1 AD 非转基因动物模型及病证结合动物模型概括

Figure 1 General of AD non-transgenic animal model and disease-syndrome combined animal model

1 常见非转基因 AD 动物模型的制备

国内外常见 AD 动物模型分为转基因和非转基因两类,转基因动物模型具有复杂的生化、病

理和认知行为学特征,采用理化手段制备的非转基因动物模型在进行单一致病因素导致的认知行为障碍相关研究上更具优势,且更具经济性^[8]。常见非转基因 AD 动物模型包括老化型和注入诱导损伤型。见表 1。

表 1 非转基因型 AD 动物模型特点总结

Table 1 Summary of characteristics of non-transgenic AD animal models

模型 Model	造模方法 Molding method	优点 Advantage	局限性 Limitations
老化型 Aging type	自然老化型 Natural aging type	实验周期更短,相对经济且省时省力 Experiment cycle is shorter, relatively economical and saves time and effort	不能模拟 AD 的全部病理表现,实验过程中容易死亡 It can not simulate all the pathological manifestations of AD, and it is easy to die during the experiment
	快速老化型 Rapid aging type	AKR/J 系小鼠近交繁殖而成 ^[11] AKR/J inbred mice ^[11]	寿命短,实验周期短,节省人力物力 Life cycle is short, the price is high, the mechanism involved is complex
	诱导老化型 Induced aging type	皮下 ^[12] 或腹腔注射 D-gal D-gal is injected subcutaneously ^[12] or intraperitoneally	造模周期较长,造模同时动物极易出现其他疾病或者死亡,且脑组织内无 A β 沉积相关病理特征 Modeling cycle was long, and the animals were prone to other diseases or death at the same time, and there were no pathological features related to A β deposition in the brain tissue
	A β 注射动物模型 A β injection animal model	脑内注射 A β 片段 ^[13] Intracerebral injection of A β fragment ^[13]	需反复注射达到稳定,且极易因注射不当导致 A β 积聚在注射部位,使局部浓度过高,造成局部损伤 Repeated injection is required to achieve stability, and it is easy to accumulate A β at the injection site due to improper injection, so that the local concentration is too high, causing local damage
			需反复注射达到稳定,且极易因注射不当导致 Tau 蛋白积聚在注射部位,使局部浓度过高,造成局部损伤;缺乏 A β 淀粉样病变 It requires repeated injection to achieve stability, and it is easy to accumulate Tau protein at the injection site due to improper injection, so that the local concentration is too high, resulting in local damage. Lack of A-beta amyloid disease
注入诱导 损伤型 Injection-induced injury type	Tau 蛋白损伤型 Tau protein damage type	脑内注射 Tau 蛋白/脑内注射冈田酸 ^[14] Intracerebral injection of Tau protein/intracerebral injection of okada acid ^[14]	能快速产生 AD 病理模型;操作简单、成本低、造模周期短 Pathological model of AD can be quickly generated. Simple operation, low cost, short molding cycle
	胆碱能系统损伤模型 Damage model of cholinergic system	脑内注射秋水仙碱 ^[15-16] /东莨菪碱 ^[17] Intracranial colchicine ^[15-16] /scopolamine ^[17]	AD 病理特征较单一,难以形成 A β 沉积和神经纤维缠结 Pathological features of AD are simple, and it is difficult to form A β deposition and NFTs
	神经炎症模型 Neuroinflammatory model	腹腔注射脂多糖 ^[18] /脑内注射链脉佐菌素 ^[19] Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide ^[18] /intracerebral injection of streptozotocin ^[19]	经脑室注射给药,操作不当易致脑组织局部损伤 Intraventricular injection may cause local injury of brain tissue due to improper operation

续表 1

模型 Model	造模方法 Molding method	优点 Advantage	局限性 Limitations
铝中毒诱导模型 Aluminum poisoning induction model	颅内/皮下注射 AlCl ₃ /AlCl ₃ 灌胃 ^[20] Intracranial/subcutaneous injection of AlCl ₃ /AlCl ₃ by gavage ^[20]	制作简单、成本低、成功率较高、死亡率较低 Simple production, low cost, high success rate, low mortality	AD 病理特征较单一 Pathological features of AD are simple

1.1 老化型 AD 动物模型

AD 是一种与衰老密切相关的神经退行性疾病,构建与衰老相似、符合老年患者临床表现的动物模型以进一步研究衰老意义重大。当前常见的老化型 AD 动物模型包括自然老化型、快速老化型和诱导老化型 3 种。

1.1.1 自然老化型

AD 常见于 65 岁以上老年人^[21]。自然衰老模型一般选用小鼠和大鼠,老年小鼠的年龄为 12 ~ 20 月龄,衰老早期大鼠的年龄为 21 ~ 26 月龄^[22],衰老晚期大鼠的年龄为 30 ~ 32 月龄^[23]。自然老化模型表现出学习和记忆能力的减退,并伴有脑神经元的萎缩,符合老年患者的临床表现^[5]。相较于非人灵长类动物,啮齿类动物实验周期更短,相对经济且省时省力^[8]。缺点是自然老化的动物模型不能模拟 AD 的全部表现,且在实验过程中容易死亡。如卢峡等^[9]在 24 月龄以上老年大鼠的灰质、白质以及脊索中均发现了高分子量的 Tau 蛋白,同时观察发现该老年大鼠的灰质和白质中的中分子量 Tau 含量比成年组显著增高,这可能是老化过程的一种代偿反应。高林等^[10]研究发现,老年大鼠(12 月龄以上)记忆能力减退,海马部位出现大量的 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)₁₋₄₂ 沉积,并伴有神经元的皱缩或丢失以及胶质细胞的浸润。

1.1.2 快速老化型

快速老化型小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)是由 AKR/J 系小鼠近交繁殖而成,分 9 个亚系。其中 SAMP8 是一种被广泛认可的衰老模型,其脑组织内含有大量沉积的 A β ,表明 SAMP8 模型具有与 AD 主要病理变化相似的特征,因此是研究 AD 较成熟的模型^[24],常用于学习记忆缺陷及衰老相关机制的研究^[25-26]。SAMP8 小鼠 4 月龄即出现毛发脱落等衰老特征,5 月龄时观察到小鼠神经元数量减少、神经递质

代谢异常、神经细胞萎缩等,同时出现学习和记忆能力下降,认知功能减退等改变,8 月龄出现树突、突触和神经元的改变,符合 AD 患者临床特征及神经病理改变,但其生命周期短、价格偏高、涉及机制复杂,不适合长期研究和单一机制的研究^[27-28]。咎树杰等^[11]研究发现,SAMP8 小鼠在 4 月龄时出现了空间学习能力和短期记忆力减退的表现,且海马 A β ₁₋₄₂ 表达明显增多。段力琦等^[29]建立快速老化型小鼠 SAMP8 模型,给予洗心汤可以改善其空间学习记忆能力,减轻海马、结肠组织中 A β ₁₋₄₂ 的生成与沉积。

1.1.3 诱导老化型

诱导老化型是一种通过皮下或腹腔注射 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)引起代谢紊乱诱发衰老的 AD 动物模型。此造模方法具有实验成本低、实验结果稳定、造模方法简便、成模时间短、可重复性较高等优点,已被国内外学者广泛使用^[30]。如 YU 等^[31]采用 D-gal 诱导衰老大鼠模型,经 Morris 水迷宫测试,发现模型大鼠逃避潜伏期延长、目标象限停留时间减少。利用 D-gal 构建老化型 AD 模型除以上优点,仍然存在造模周期较长、造模的同时动物极易出现其他疾病或死亡的现象,且脑组织内无 A β 沉积等 AD 相关的特征病理出现^[32],故多用于建立复合模型,与其他诱导方式共同构建 AD 动物模型。如瞿艳等^[12]以 D-gal 皮下注射联合海马脑区注射 A β ₁₋₄₂ 寡聚体建立 AD 模型,结果发现,模型小鼠出现焦虑样行为及空间学习记忆和情景记忆损伤。此外,也有 D-gal 联合 A β 类寡聚体、D-gal 联合三氯化铝(AlCl₃)和 D-gal 联合亚硝酸钠等复合造模方法^[33],可以解决单一模型无法模拟 AD 的全部病理表现等局限性。

1.2 注入诱导损伤 AD 动物模型

AD 的病因、发病机制相对复杂,根据不同的发病机制,提出了 A β 假说、Tau 蛋白异常磷酸化

假说、胆碱能假说、炎症损伤假说和铝中毒假说等^[34]。在充分认识 AD 病因与发病的基础上,建立与疾病假说密切相关的 AD 动物模型,对 AD 的治疗评价、前沿研究具有重要意义。

1.2.1 A β 注射动物模型

AD 发病机制复杂,涉及多个致病因素,其中 A β 假说在当前各假说中占据主导地位^[35]。A β 的沉积能触发级联反应,促进神经网络的结构退化,诱导突触损伤和神经元丢失,产生大脑不可逆的神经萎缩及神经退行性病变,是造成 AD 的关键因素^[36]。A β 诱导 AD 动物模型主要是在动物的特异性脑区注射 A β 片段以诱发 A β 的沉积,常注射的脑区有海马和侧脑室等。如张婧凡等^[13]复制 AD 大鼠模型的方法是在大鼠双侧海马注射 A β_{1-42} 溶液 5 μ L,含量 10 μ g,复制完成后,经 Morris 水迷宫实验结果显示,模型大鼠逃避潜伏期较空白组显著延长,穿越平台次数和平台象限停留的时间显著减少;同时,利用苏木素-伊红(HE)染色发现,复制的模型大鼠神经元数量减少,部分出现细胞核皱缩;海马 CA1 区可见大量 A β 阳性细胞。以上研究结果提示,注射 A β_{1-42} 能引起 A β 沉积、海马区神经元受损以及大鼠学习、记忆能力受损的现象。A β 诱导模型属于一种急性损伤,能快速产生 AD 病理模型,需反复注射达到稳定,且极易因注射不当导致 A β 积聚在注射部位,使局部浓度过高,造成局部损伤。

1.2.2 Tau 蛋白损伤型

AD 神经细胞凋亡中有一种过磷酸化的微管蛋白,即 Tau 蛋白发挥着重要作用。Tau 蛋白异常磷酸化假说认为过度磷酸化的 Tau 蛋白失去了与微管蛋白相结合的能力而丧失其原有的功能,过度磷酸化的 Tau 蛋白以双螺旋细丝、直丝以及缠结的骨架等形式在细胞内聚集形成细胞内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),最终导致神经元变性与死亡,从而形成 AD^[37]。脑内注射 Tau 蛋白可产生 NFTs 样结构,加快 AD 模型小鼠相关病理特征的形成^[38-39]。注射 Tau 蛋白复制 AD 模型的优缺点同注射 A β 。此外,目前使用较多的还有脑内注射冈田酸等磷脂酸酶抑制剂,也可导致 Tau 蛋白过度磷酸化,过度磷酸化的 Tau 蛋白存在于神经元内的 NFTs 中,这是 AD 的一个重要病理学特征^[40]。这种造模方法具有操

作简单、成本低、造模周期短等特点^[41],但该模型缺乏 A β 淀粉样病变。如 ÇAKIR 等^[14]于大鼠双侧脑室注射冈田酸复制 AD 模型,结果发现,模型大鼠大脑皮层和海马 CA3 区域的半胱氨酸天冬氨酸 3(caspase-3)、磷酸化-tau-(ser396)、A β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的水平均有所增加, Morris 水迷宫实验提示注射冈田酸会破坏大鼠的空间记忆能力。

1.2.3 胆碱能系统损伤模型

胆碱能系统负责调控机体的学习及记忆能力,AD 的发生发展与该系统出现异常也密切相关。常用损伤胆碱能系统的化学制剂有秋水仙碱、东莨菪碱等,该模型缺乏 AD 典型的病理学特征表现,且损伤胆碱能系统的部分化学制剂药效可逆,这与 AD 不可逆的神经损害不相拟合^[42]。秋水仙碱是一种生物碱,来源于秋水仙属植物的种子,脑室内注射秋水仙碱可导致大鼠进行性记忆障碍和神经退行性变,其特征为 AD 的散发模型^[43]。RAO 等^[15]利用秋水仙碱诱导 AD 大鼠模型,评估白藜芦醇以及白藜芦醇联合多奈哌齐对模型大鼠额叶和海马小胶质细胞和星形胶质细胞数值表达的影响,结果发现 AD 模型大鼠小胶质细胞数量显著增加。SIL 等^[16]研究发现,脑内注射秋水仙碱可引起大鼠海马神经元变性和神经炎症反应,且神经元变性的增加与该部位神经炎症反应的增加相一致,提示此模型大鼠可能作为 AD 的散发模型。

胆碱能假说认为胆碱能细胞丢失及乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)减少造成胆碱能缺失是早期 AD 的重要诱因^[44-45]。东莨菪碱是一种 M 胆碱受体拮抗药,可以穿过血脑屏障到达神经中枢,并与中枢神经内的 M 受体相结合,进而阻断受体和 Ach 相结合,抑制中枢神经系统功能,引起胆碱能失调,最终导致学习记忆功能障碍等表现^[46-47]。东莨菪碱作为广泛的 AD 模型建立方法之一,能够起到短时抑制学习记忆的作用,但其作用是非选择性的,故不能准确辨别具体脑区的受体类型,同时也缺乏 AD 特征病理改变,如缺乏 Tau 蛋白过度磷酸化和 A β 沉积等^[48]。YERRAGURAVAGARI 等^[17]以东莨菪碱复制学习记忆障碍 AD 大鼠模型,观察发现复制的模型

大鼠学习和记忆能力显著下降,胆碱酯酶水平显著升高,神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)下降。除上述两种损伤胆碱能系统的化学制剂之外,还有少数研究者采用免疫毒素 192-IgG-saporin 建立胆碱能系统损伤 AD 模型^[49]。

1.2.4 神经炎症模型

当前越来越多的研究表明,神经炎症在 AD 等其他退行性疾病的发生发展过程中也发挥着至关重要的作用^[2,50]。AD 的神经炎症模型主要建立在细胞模型之上,小胶质细胞和星形胶质细胞是神经炎症重要的介导者,此两种细胞的活化和增生出现在 A β 和 NFTs 形成之前^[51]。诱导 AD 神经炎症模型主要使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和链脲佐菌素(streptozocin, STZ)。LPS 是一种经典的致炎剂,是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分^[52-53],若 LPS 进入人体或大脑,会引起炎症并充当内毒素,从而促进淀粉样蛋白病理、Tau 病理和小胶质细胞激活,从而导致 AD 的神经变性^[54]。XIE 等^[18]利用腹腔注射 LPS 建立神经炎症模型,结果发现模型大鼠脑组织中的小胶质细胞被激活,脑组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平升高,提示神经炎症模型复制成功,自发活动、新物体识别和 Morris 水迷宫实验提示模型大鼠出现学习和记忆能力受损的情况。

STZ 是一种亚硝基脲衍生物,低剂量注射 STZ 能引起脑内胰岛素信号稳态破坏,进而出现能量代谢障碍,大脑产生 A β 沉积、Tau 过度磷酸化^[55],以及出现神经炎症^[56]等与散发型 AD 类似的病理变化,同时也能出现学习、记忆能力的受损和认知障碍等表现^[57]。STZ 侧脑室注射的 AD 模型已被证明脑内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子升高^[58]及核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的上调^[59]。但此造模方法也存在造模成功率不稳定且造模时死亡率偏高等不足^[60]。GÁLL 等^[19]在雄性成年 Wistar 大鼠脑室内注射 STZ 诱发 AD 样症状,旷场、新物体识别和径向臂迷宫实验结果发现,模型大鼠出现认知行为衰退,海马区星形胶质细胞水平显著增高等现象。

1.2.5 铝中毒诱导模型

“铝中毒假说”认为铝具有神经毒性,入脑后

可损伤神经元,同时降低胆碱能神经系统的功能以及学习记忆能力等^[61]。此外,铝元素在脑内可与 A β 发生聚合作用,进而产生大量氧自由基,促进脂质过氧化反应,导致海马神经细胞发生膜性损伤,进而引发认知功能障碍^[62]。通常于大鼠颅内或者皮下注射 AlCl₃ 构建铝中毒模型,也有少量研究通过 AlCl₃ 灌胃模拟铝中毒模型。该模型制作简单、成本低、成功率较高、死亡率较低,并且在识别 AD 早期诊断标志物,进一步制定防治 AD 策略方面具有较大的价值,但铝中毒模型同样只能表现单一的 AD 病理特征,通常需与其他造模方法结合以加快 AD 病理形成。如程厚之等^[20]以 AlCl₃ 连续喂养大鼠 3 个月, Morris 水迷宫定位航行实验结果显示,模型大鼠运动轨迹趋向性较差,偏离平台,表明慢性铝中毒动物模型对机体有毒性作用,可引起学习记忆功能减退、认知功能障碍等症状。

2 AD 不同证型动物模型的制备

中医学无 AD 的病名,根据其症状及表现可将 AD 归属于“痴呆”“健忘”等范畴,病位在脑,与脾、肾、心脏、肝的功能失调密切相关,病理因素主要为痰、瘀、火。“十四五”规划教材《中医内科学》将痴呆分为:髓海不足、脾肾亏虚、气血不足、痰浊蒙窍、瘀阻脑络、心肝火旺和热毒内盛七型^[63]。建立合适的病证结合动物模型是推进中医药现代化的重要手段,总结当前已有的 AD 病证结合动物模型有:肾虚/肾虚精亏/肾虚髓空、痰浊阻窍、瘀血阻络、痰瘀互结、肝郁和痰饮郁热证 6 种。见表 2。

2.1 肾虚/肾虚精亏/肾虚髓空证模型

2.1.1 肾虚证模型

AD 是衰老进程中与肾虚密切相关的疾病,“肾为先天之本”,与记忆、认知功能紧密关联。张学凯等^[72]提出,肾虚是 AD 的启动因子,肾虚易及脾、肝,进而生痰、瘀、火等病理产物。张玉莲等^[73]对 660 例老年性痴呆患者进行中医证候学研究,发现肾虚型患者占比最多,约为 86.36%。黄正团等^[64]通过 D-gal 联合 AlCl₃ 制备 AD 大鼠模型,后基于中医恐伤肾的中医理论给予大鼠夹尾恐惧诱导肾虚证候,证候评价指标用证候评分、金匱肾气丸以方测证以及肾虚相关实验室指

表 2 AD 病证结合动物模型总结

Table 2 Summary of AD disease and syndrome combined with animal model

证候 Syndrome	种属 Species	造模方法 Molding method		证候评价 Syndrome evaluation	造模周期 Molding cycle	造模顺序 Molding sequence
		致病因素 Pathogenic factor	证候因素 Syndrome factor			
肾虚证 Kidney deficiency syndrome	SD 大鼠 SD rat	腹腔注射 D-gal 联合 AlCl ₃ 灌胃 Intraperitoneal injection of D-gal combined with AlCl ₃ intragastric administration	夹尾 ^[64] Pintail ^[64]	证候评分,金匮肾气丸以方测证,肾虚相关实验室指标 Syndrome score, Jinkui Shenqi pills to measure the syndrome, kidney deficiency related laboratory indicators	8 周 8 weeks	病证同时造模 Simultaneous modeling of disease and syndrome
肾虚精亏证 Syndrome of kidney deficiency and essence deficiency	SD 大鼠 SD rat	侧脑室注射 Aβ ₁₋₄₂ Aβ ₁₋₄₂ was injected into the lateral ventricle	房事不节法 ^[65] Promiscuity ^[65]	糖代谢、氨基酸代谢和脂质代谢指标 Carbohydrate metabolism, amino acid metabolism and lipid metabolism indexes	8 周 8 weeks	先证后病 Syndrome before disease
肾虚髓空证 Syndrome of kidney deficiency and pulp emptying	Wistar 大鼠 Wistar rat	海马 CA1 区注射 Aβ ₂₅₋₃₅ 多肽片段 Aβ ₂₅₋₃₅ polypeptide fragment was injected into hippocampal CA1 region	氢化可的松溶液灌胃 ^[66] Gastric gavage of hydrocortisone solution ^[66]	HPA 轴功能虚性亢进、泛素-蛋白酶体系统衰退、脑组织抗氧化水平降低 HPA axis function deficiency hyperactivity, ubiquitin-proteasome system decline, brain tissue antioxidant level decreased	6 周 6 weeks	病证同时造模 Simultaneous modeling of disease and syndrome
痰浊阻窍证 Syndrome of turbid phlegm blocking orifice	SD 大鼠 SD rat	腹腔注射 D-gal Intraperitoneal injection of D-gal	喂养高脂饲料 ^[67] Feed a high fat diet ^[67]	血胆固醇、甘油三酯含量显著增高 Blood cholesterol and triglyceride content increased significantly	48 d	病证同时造模 Simultaneous modeling of disease and syndrome
瘀血阻络证 Syndrome of blood stasis blocking collaterals	SD 大鼠 SD rat	腹腔注射 D-gal 联合脑内注射 Aβ Intraperitoneal injection of D-gal combined with intracerebral injection of Aβ	-20 ℃ 低温冷冻 ^[67] /0 ℃ 冰水浴 ^[68] -20 ℃ cryogenic freezing ^[67] /0 ℃ ice bath ^[68]	血浆粘度、红细胞压积、纤维蛋白原含量均显著增多,全血低切还原粘度显著降低 Plasma viscosity, hematocrit and fibrinogen content increased significantly, and the whole blood hyposhear reduction viscosity decreased significantly	48 d	病证同时造模 Simultaneous modeling of disease and syndrome
痰瘀互结证 Phlegm stasis interjunction syndrome	APP/PS1 双转基因小鼠 APP/PS1 double transgenic mice	-	高脂饮食饲喂联合冰水浴 ^[69] High fat diet combined with ice bath ^[69]	舌色偏暗红,血液流变指标及血脂指标均升高 Tongue color was dark red, blood rheology index and lipid index were increased	2 周 2 weeks	-
肝郁证 Liver-depression syndrome	SD 大鼠 SD rat	海马内注射 Aβ ₁₋₄₀ Aβ ₁₋₄₀ was injected into the hippocampus	束缚法 ^[70] Binding method ^[70]	糖水偏好实验,柴胡疏肝散以方测证 Sugar water preference experiment, buplehu Shugan powder to measure the syndrome	3 周 3 weeks	先证后病 Syndrome before disease
痰饮郁热证 Phlegm-fluid stagnation heat syndrome	KM 小鼠 KM mouse	腹腔注射 D-gal Intraperitoneal injection of D-gal	大黄水煎液和啤酒交替灌胃 ^[71] Alternate gastric gavage of rhubarb decoction and beer ^[71]	测脑组织中丙二醛含量和谷胱甘肽过氧化物酶活性,茵陈五苓散以方测证 Content of malondialdehyde and the activity of glutathione peroxidase in brain were measured	40 d	病证同时造模 Simultaneous modeling of disease and syndrome

标,结果模型大鼠出现了明显的精神萎靡、自主活动减少、脱毛等符合临床肾虚证的表现,且证候评分明显高于对照组。有研究者先腹腔注射 D-gal 复制亚急性衰老模型以模拟中医肾虚证,后通过大鼠双侧海马注射 $A\beta_{25-35}$ 复制 AD 疾病模型,采用抗氧化能力和下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)检验肾虚证模型,用地黄饮子以方测证反向验证证候结合动物模型,结果造模后大鼠抗氧化能力下降,HPA 轴功能虚性亢进,提示肾虚证模型复制成功^[74]。

上述两种方法构建的肾虚证 AD 动物模型仍需细化证候评价指标以进一步验证何种模型动物更符合临床肾虚型 AD 患者的临床表现。从中医理论层面分析,前者基于恐伤肾理论选用夹尾恐惧诱导肾虚证候更为贴切,证候评价方面可补充、借鉴后者的评价方法及指标,以增加实验设计的完整性。

2.1.2 肾虚精亏证模型

肾精亏虚证是 AD 各阶段最主要的证候。“肾为先天之本”,肾藏精,肾精是人体生命活动的物质基础。当机体年老体竭之时,肾气衰、肾精竭,即肾气亏虚则髓海不足,真阴真阳难以上充脑府,脑络失于濡养,则神明失用,发为痴呆。帅月圆等^[65]采用先证后病的顺序复制肾虚精亏证 AD 大鼠模型,证候复制方法为房事不节法联合腹腔注射 D-gal,疾病复制方法为侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$,发现肾虚精亏证 AD 大鼠存在诸多能量代谢紊乱表现,如糖代谢、氨基酸代谢和脂质代谢的紊乱。此种造模方法缺少对证候的直观评价,仅从能量代谢角度间接表明复制的模型符合肾虚精亏证。另有研究同样采用先证后病的顺序复制肾虚精亏证 AD 大鼠模型,与上述方法不同的是证候复制方法采用腹腔持续注射 D-gal 48 d,疾病构建方法有侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ ^[67]、双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{25-35}$ ^[68],两人均通过检测大鼠抗氧化能力相关指标来验证肾虚精亏证候模型,观察发现注射 D-gal 后,大鼠抗氧化能力降低,模型复制成功。

对比之前提到的复制肾虚证 AD 动物模型,发现通过先腹腔注射 D-gal 复制证候模型,后利用 $A\beta$ 诱导 AD 疾病模型,不仅可以复制肾虚证 AD 模型,也可复制肾虚精亏证 AD 模型,造模区

别仅在于造模时间不等,由此是否可以推测,通过施加中医证候干预因素的造模方法复制的病证结合动物模型可能更接近临床。故以上造模方法仍需进一步对比验证,是否可以采取多因素叠加的造模方式,以更好地模拟临床中体质、外邪、情志等多种致病因素,同时严格把控多因素造模的施加时间,探索出最佳的病证结合造模方式,以期更好地促进中医药现代化的机制研究。

2.1.3 肾虚髓空证模型

痴呆的基本病机是髓减脑消,神机失用。《灵枢·经脉》记载:“脑为髓之海,人始生,先成精,精成而脑髓生”;《医林改错·脑髓篇》记载:“高年无记性者,脑髓渐空”^[75]。随着机体年龄的增长,肾精逐渐亏损,脑髓失于充养,进一步导致脑窍失养、智力减退,临床多表现为健忘、痴呆等。杨少敏等^[76]运用数据挖掘技术分析 AD 的病因病机,研究发现该病的中医证型以肾虚髓减证为主。陈秀艳^[66]选用氢化可的松溶液进行灌胃以复制肾虚髓空证模型,并于海马 CA1 区注射 $A\beta_{25-35}$ 多肽片段以复制 AD 疾病模型。当观察到大鼠学习记忆能力及空间探索能力严重受损时,则表明疾病模型制备成功;当出现 HPA 轴功能虚性亢进、泛素-蛋白酶体系统衰退、脑组织抗氧化水平降低则表明肾虚髓空证候模型复制成功。此类造模方法同样局限于西医病理特点的检测,缺少对中医证候宏观及微观维度的评价指标。

2.2 痰浊阻窍证模型

痰浊与健忘、痴呆的发生也存在着密切联系。《丹溪心法》记载到:“健忘,精神短少者多,亦有痰者”;《石室秘录》记载到:“痰气最盛,呆气最深”。痴呆的病性为“本虚标实”^[77]。痰浊属实邪之标的范畴,病理性的痰浊也会加剧五脏六腑的衰竭,从而形成虚实相致的恶性循环。郭少珍^[67]首先选用腹腔注射 D-gal 以构建衰老期肾精亏虚证大鼠模型,同时联合喂养高脂饲料以模拟人类嗜食肥甘厚味之候,并于实验的第 34 天在大鼠侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 毒性片段 5 μL 。证候验证方法为检测血脂水平的变化,结果发现模型大鼠学习、记忆能力较前明显下降,海马区部分神经元凋亡,大鼠血胆固醇、甘油三酯含量显著增高,表明痰浊阻窍证 AD 大鼠模型复制成功。侯江淇等^[78]采用同样的证候造模方法,而疾病造模采用

的是双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{25-35}$, 得出结果与郭少珍^[67] 基本一致。而李斌等^[79] 直接选用高糖高脂饮食联合 $A\beta$ 海马注射复制痰浊阻窍证 AD 模型, 实验中选用 Morris 水迷宫实验验证疾病造模成功, 但缺少对证候的评价与验证, 难以验证证候模型复制成功与否。

故综合以上 3 种造模方法, 为进一步评估何种方法是痰浊阻窍证模型的最优造模方法, 构建痰浊阻窍证模型之前是否需要先复制衰老期肾精亏虚证模型, 仍需进一步优化实验设计方案深入研究得出。

2.3 瘀血阻络证模型

《血证论》记载到:“血在上, 则浊蔽而不明矣”;《医林改错》中也有“凡有瘀血也令人善忘”的记载^[80]。机体进入老龄之后, 脏腑精气虚衰, 尤以肾气亏虚, 导致气血津液运行失常, 从而引发瘀血内生, 影响脑髓的正常功能, 进而导致痴呆、健忘等症状的出现。抑或随着机体年龄渐长, 肾阳逐渐虚衰, 导致虚寒内生, 血液遇寒凝涩而成瘀, 瘀血阻于脑络则发为本病。由此可知, 痴呆的发生与瘀血之间同样存在着密切的联系。郭少珍^[67] 先给予大鼠腹腔注射 D-gal 构建衰老期肾精亏虚的大鼠模型, 并于第 22 天开始对大鼠进行 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻, 于该实验的第 34 天在大鼠侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 复制瘀血阻络证 AD 模型, 通过检测血液流变学的变化以验证证候的复制, 结果发现模型大鼠的血浆粘度、红细胞压积、纤维蛋白原含量均显著增多, 全血低切还原粘度显著降低, 表明瘀血阻络证模型复制成功。侯江洪^[68] 同样先腹腔注射 D-gal 以构建衰老期肾精亏虚证模型, 然后将大鼠置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰水中进行冰水浴 28 d, 最后分别于大鼠双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{25-35}$, 最终成功复制出本虚标实的 AD 瘀血阻络证大鼠模型。疾病和证候模型的验证同郭少珍^[67], 得出结果基本一致。

综上可知, 通过低温冷冻或冰水浴均可模拟 AD 瘀血阻络证候, 但这两种方法均是构建在衰老期肾精亏虚大鼠模型基础之上, 当前暂无直接给予证候干预因素结合疾病造模方法构建瘀血阻络证病证结合的 AD 模型。

2.4 痰瘀互结证模型

痰、瘀是 AD 的主要致病因素, 也是 AD 缠绵

难愈、反复发作的主要因素。痰浊、瘀血相互搏结, 导致经脉不畅, 气血精微不能上达脑窍, 脑失于所养, 故发为痴呆^[81]。“痰为瘀之渐, 瘀为痰之变”, 痰瘀一旦形成, 二者在体内相互转化、相互搏结。谭爱华等^[69] 以 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型动物, 以冰水浴模拟“瘀”的病理状态, 给予高脂饮食饲喂模拟“痰”的病理状态, 二者结合以模拟“痰瘀互结”的病理状态, 通过观察小鼠舌色、血液流变学、血脂的变化以评价证候复制情况, 结果发现模型小鼠舌色偏暗红, 血液流变指标及血脂指标均升高, 表明模型复制成功。此法同时构建了痰瘀互结证动物模型, 具有建模成型率高、与临床症状相贴合、评价方法较为全面等特点, 可为后续研究痰、瘀病理因素相关证候的造模研究提供参考与依据。

2.5 肝郁证模型

肝的疏泄功能与神志活动密切相关, 情志失调是导致痴呆的重要原因之一。《景岳全书》记载到:“痴呆症, 凡平素无痰, 或以郁结, 或以不遂, 或以思虑, 或以惊恐而渐至痴呆”^[82]。研究发现, 抑郁症是与认知缺陷同时存在的最普遍的非认知症状, 与神经变性疾病和认知能力下降有关^[83], 抑郁状态是 AD 早期常见的精神异常表现, 抑郁症与 AD 的认知障碍两者间存在着紧密的联系^[84-85]。禰璇等^[70] 采用先证后病的顺序构建肝郁证 AD 大鼠模型, 肝郁证复制方法为连续束缚 3 周, 疾病的复制方法为海马内注射 $A\beta_{1-40}$, 利用糖水偏好实验评价肝郁证模型大鼠抑郁样行为, 水迷宫实验评价 AD 模型大鼠学习记忆行为, 并利用柴胡疏肝散以方测证反向验证病证结合动物模型。课题组前期研究肝郁型失眠, 采取慢性夹尾刺激法模拟肝郁证候表现, 模型复制成功率较高、操作简便, 证候评价方法选用了旷场实验和高架十字迷宫实验, 从焦虑和抑郁两个角度评价肝郁证候的复制, 对于肝郁型 AD 证候的评价同样有借鉴意义^[86]。

2.6 痰饮郁热证模型

痰饮郁热证 AD 动物模型研究较少, 主要针对茵陈五苓散的作用效应研究提出。如张静等^[71] 采取 D-gal 腹腔注射复制 AD 疾病模型, 用大黄水煎液和啤酒交替灌胃复制痰饮郁热证候模型。其中, 大黄苦寒攻下极易伤脾, 脾虚则运

化水湿失常,易生痰生饮,啤酒性属湿热,二者结合复制痰饮郁热证 AD 模型。结果发现茵陈五苓散可以显著提高病证结合组 AD 小鼠的学习成绩,显著改善其大脑代谢。此造模方法尚未考虑对证候的评价与验证,但对于痰饮郁热证的造模方法尚有借鉴与参考之处。

3 小结与展望

动物模型是深入开展 AD 病因病机、药物防治等相关研究不可或缺的基础与工具。老化型和注入诱导损伤型是当前常见的两类非转基因 AD 动物模型,其中老化型又包括自然老化型、快速老化型和诱导老化型 3 种,注入诱导损伤型主要包括 A β 注射动物模型、Tau 蛋白损伤型、胆碱能系统损伤模型、神经炎症模型和铝中毒诱导模型 5 种,以上 8 种非转基因 AD 动物模型各有其优势与不足,单一方法多用于研究散发型 AD 病理机制,为较全面研究 AD 的病理机制常需多种模型复制方法组合使用。

病证结合动物模型是连接临床和基础研究的桥梁和纽带,构建以中医辨证论治理论为基础的中医特色的病证结合动物模型,使动物模型既符合西医疾病特征又具备中医证候的特点,有助于揭示疾病的发病机理和治疗方法,对推动中医药现代化进程具有重要意义。总结当前已有的 AD 病证结合动物模型包括:肾虚/肾虚精亏/肾虚髓空、痰浊阻窍、瘀血阻络、痰瘀互结、肝郁和痰饮郁热证 6 种,造模顺序多为先证后病,也有先病后证和病证同时造模。疾病复制方法多选择上述 8 种方法之中的一种或是组合两种及以上的方法进行造模。证候造模主要在中医理论指导下进行,如肾虚证采用夹尾刺激法、肾虚精亏证采用房事不节法、肾虚髓空证采用氢化可的松溶液灌胃的方法、痰浊阻窍证采用高糖高脂饮食法、瘀血阻络证采用低温冷冻或冰水浴的方法、痰瘀互结证采用高脂饮食联合冰水浴法、肝郁证采用束缚法、痰饮郁热证采用大黄水煎液和啤酒交替灌胃的方法。

目前 AD 病证结合动物模型的研究虽取得了部分成果,但仍存在一些问题需要关注和解决:(1)证候复制方法混杂多样,缺少中医理论的指导。本论文总结的部分中医证候模型的建立无

直接的中医理论依据,例如采用氢化可的松溶液灌胃诱导肾虚髓空证模型;不同证候模型采用相同的造模方法,如肾虚证和肾虚精亏证均是腹腔注射 D-gal 复制证候模型,后利用 A β 诱导 AD 疾病模型。因此在证候造模时需要加强与中医基础理论的运用与结合,采取符合中医病因病机的造模方式,尽可能统一模型制备中的干预措施、时间、强度等,使模型动物更贴近中医临床实际情况;(2)病证间的因果关系与时序问题缺乏统一。“证”是“病”某一阶段的概括,存在持续进展与不断变化等过程和特点。当前 AD 病证结合动物模型大多为疾病、证候的叠加模型,无法很好地反映病证间的因果关系,先证后病或病证同时造模的方法再叠加疾病的造模因素后,难以保证“证”是否变化;先病后证的造模方法又无法准确识别疾病主证类型。因此,未来研究要参考当前研究者提出的“三维病证结合动物模型”的构建方法^[87],筛选出最优的病证结合动物模型制备方法,可进一步提高造模成功率;(3)评价标准体系不完善。中医学强调辨证论治,“病”与“证”紧密相连,但现有的病证结合模型缺乏较为合理的评价标准体系,疾病评价多为临床症状或病理机制的评价,证候评价大多基于致病因素、症状体征、以方测证反证和少量客观指标佐证的方式。因此,在未来研究中,应引入更多检测手段,宏观与微观、生理与病理相结合,以期更丰富、更全面地评价病证结合动物模型的构建。

参 考 文 献(References)

- [1] KNOPMAN D S, AMIEVA H, PETERSEN R C, et al. Alzheimer disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 33.
- [2] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. Nat Rev Neurol, 2021, 17(3): 157-172.
- [3] JIA L, DU Y, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. Lancet Public Health, 2020, 5(12): e661-e671.
- [4] OSSENKOPPELE R, VAN DER KANT R, HANSSON O. Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials [J]. Lancet Neurol, 2022, 21(8): 726-734.
- [5] 陈思儒,李盛楠,高仙维,等.阿尔茨海默病及轻度认知

- 障碍常用动物模型的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(12): 3054-3058.
- CHEN S R, LI S N, GAO X W, et al. Research progress of commonly used animal models of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(12): 3054-3058.
- [6] 陈燕清, 杨晶晶, 曹卓青, 等. 病证结合动物模型的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 628-629, 705.
- CHEN Y Q, YANG J J, CAO Z Q, et al. Thinking about animal model of disease and syndrome combination [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2017, 23(5): 628-629, 705.
- [7] 甘佳乐, 徐武清, 刘敬霞. 病证结合脑梗死动物模型探讨 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(9): 101-104.
- GAN J L, XU W Q, LIU J X. Discussion on animal models of cerebral infarction integrated disease with syndrome [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2016, 18(9): 101-104.
- [8] 谢晓露, 陈秀, 寇利秋, 等. AD 动物模型及其相关指标评价方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 145-154.
- XIE X L, CHEN X, KOU L Q, et al. Research progress on animal models and evaluation methods of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 145-154.
- [9] 卢峡, 李娜, 江宇, 等. 不同年龄大鼠神经系统 tau 蛋白的表达特性 [J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(3): 193-196.
- LU X, LI N, JIANG Y, et al. Developmentally regulated expression of tau protein in normal rat neural system [J]. Acta Univ Medicinae Tangji, 2001, 30(3): 193-196.
- [10] 高林, 陈烈冉, 贾延劼, 等. 海马区注射 $A\beta_{1-42}$ 对不同年龄大鼠记忆能力和脑内 $A\beta_{1-42}$ 沉积的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(2): 311-313.
- GAO L, CHEN L R, JIA Y J, et al. Effect of injecting $A\beta_{1-42}$ in hippocampal region on the memory ability of rat [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 2006, 41(2): 311-313.
- [11] 咎树杰, 王凯, 徐家淳, 等. 益肾化浊方早期干预对快速衰老 SAMP8 小鼠学习记忆的影响及其机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(8): 91-99.
- ZAN S J, WANG K, XU J C, et al. Effect of early intervention of Yishen Huazhuo prescription on learning and memory of accelerated aging SAMP8 mice and its mechanism [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(8): 91-99.
- [12] 瞿艳, 吴欢, 朱国旗, 等. 安神定志方对 D-半乳糖协同 $A\beta$ 诱导的小鼠阿尔茨海默病样行为的改善作用及机制研究 [J]. 药学报, 2024, 59(1): 119-134.
- QU Y, WU H, ZHU G Q, et al. The improving effect and mechanisms of Anshen Dingzhi Prescription on Alzheimer's disease-like behavior induced by D-galactose combined with $A\beta$ in mice [J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(1): 119-134.
- [13] 张婧凡, 龙清华, 曾楚华, 等. 基于 LKB1/AMPK/mTOR 通路调节自噬探讨固本健脑液对阿尔茨海默病的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(2): 293-300.
- ZHANG J F, LONG Q H, ZENG C H, et al. Mechanism of Guben Jiannao liquid on Alzheimer's disease by regulating autophagy based on LKB1/AMPK/mTOR pathway [J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, 50(2): 293-300.
- [14] ÇAKIR M, YÜKSEL F, ÖZKUT M M, et al. Neuroprotective effect of transient receptor potential vanilloid 1 agonist capsaicin in Alzheimer's disease model induced with okadaic acid [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 109925.
- [15] RAO Y L, GANARAJA B, SURESH P K, et al. Effect of resveratrol and combination of resveratrol and donepezil on the expression of microglial cells and astrocytes in Wistar albino rats of colchicine-induced Alzheimer's disease [J]. 3 Biotech, 2023, 13(9): 319.
- [16] SIL S, GHOSH R, SANYAL M, et al. A comparison of neurodegeneration linked with neuroinflammation in different brain areas of rats after intracerebroventricular colchicine injection [J]. J Immunotoxicol, 2016, 13(2): 181-190.
- [17] YERRAGURAVAGARI B, PENCHIKALA N P, KOLUSU A S, et al. Montelukast ameliorates scopolamine-induced Alzheimer's disease; role on cholinergic neurotransmission, antioxidant defence system, neuroinflammation and expression of BDNF [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2024, 23(8): 1040-1055.
- [18] XIE Y, FANG C, LU L, et al. Extract of *Tinospora sinensis* alleviates LPS-induced neuroinflammation in mice by regulating TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337(1): 118807.
- [19] GÁLL Z, BOROS B, KELEMEN K, et al. Melatonin improves cognitive dysfunction and decreases gliosis in the streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1447757.
- [20] 程厚之, 张丽凤, 梁祚仁, 等. 五味子乙素对铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达影响的研究 [J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(6): 714-718.
- CHENG H Z, ZHANG L F, LIANG Z R, et al. Effects of Schisandrin B on the learning and memory and the expression of synapse-related proteins in rats with aluminum intoxication [J]. J Youjiang Med Univ Natl, 2021, 43(6): 714-718.
- [21] 罗媛, 肖川, 林伟杰. STAT3 通路调控阿尔兹海默症大脑脂质代谢及星形胶质细胞活化的机制研究 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2022, 27(3): 208-211, 218.

- LUO Y, XIAO C, LIN W J. STAT3 pathway regulates abnormal lipid metabolism and astrocyte activation in the brain of Alzheimer's disease [J]. Lingnan J Emerg Med, 2022, 27(3): 208–211, 218.
- [22] 孙琳林. 左归丸对 D-半乳糖致亚急性衰老大鼠抗氧化能力影响的实验研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学; 2009.
- SUN L L. Experimental study about the effect of zuogui pill on anti-oxidant capacity of subacute aging rats induced by D-galactose [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine; 2009.
- [23] 谭淑瑜. 老龄小鼠肠道衰老的代谢组学表征及 FTZ 干预作用 [D]. 广州: 广东药科大学; 2017.
- TAN S Y. Metabolomic characterization of intestinal aging inaging mice and effect of FTZ intervention [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University; 2017.
- [24] 温若兰, 郭婉清, 董卫国, 等. 电针对快速老化模型小鼠骨骼肌线粒体动力学的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(2): 104–109.
- WEN R L, GUO W Q, DONG W G, et al. Effects of electroacupuncture on skeletal muscle mitochondrial dynamics in SAMP8 mice [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2024, 31(2): 104–109.
- [25] LIU B, LIU J, SHI J S. SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2020, 75(2): 385–395.
- [26] 陈丽敏, 郭婉清, 温若兰, 等. 电针对小鼠海马 C3/C3aR/STAT3 信号通路的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(4): 71–76.
- CHEN L M, GUO W Q, WEN R L, et al. Effects of electroacupuncture on hippocampal C3/C3aR/STAT3 signaling pathway in mice [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2023, 30(4): 71–76.
- [27] 赵波, 张新宇, 付学锋. 阿尔兹海默病动物模型的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2012, 28(1): 102–104.
- ZHAO B, ZHANG X Y, FU X F. Research progress of animal models of Alzheimer's disease [J]. Chin J Neuroanat, 2012, 28(1): 102–104.
- [28] 武凤娟. 海参脑苷脂和海参磷脂对阿尔兹海默病的改善作用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学; 2014.
- WU F J. Studys on the improvement effect of sea cucumber cerebroside and sea cucumber phospholipid on Alzheimer's disease [D]. Qingdao: Ocean University of China; 2014.
- [29] 段力琦, 第五永长, 韩欣悦, 等. 洗心汤对快速老化模型小鼠肠道菌群多样性及脑肠组织 $A\beta_{1-42}$ 、LPS、SAA、ACH 水平的影响 [J]. 中医杂志, 2023, 64(24): 2561–2569.
- DUAN L Q, DIWU Y C, HAN X Y, et al. Effects of Xixin decoction on the diversity of intestinal flora and levels of $A\beta_{1-42}$, LPS, SAA, and ACH in brain and intestinal tissues of rapidly aging model mice [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(24): 2561–2569.
- [30] 郭佳晨, 袁青青, 丁永芳, 等. 腊梅叶醇提取物二氯甲烷部位对阿尔茨海默病小鼠的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(2): 230–233.
- GUO J C, YUAN Q Q, DING Y F, et al. Effects of the dichloromethane fraction in the phytol extract of Chimonanthus praecox on Alzheimer's disease mice [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(2): 230–233.
- [31] YU C C, WANG J, YE S S, et al. Preventive electroacupuncture ameliorates D-galactose-induced Alzheimer's disease-like pathology and memory deficits probably via inhibition of GSK3 β /mTOR signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 1428752.
- [32] 吕淑婕, 郭雯, 方亮, 等. 阿尔茨海默病发病机制及体内外模型研究进展 [J]. 实验动物科学, 2024, 41(3): 79–84.
- LYU S J, GUO W, FANG L, et al. Research progress in pathogenesis and *in vitro-in vivo* model of Alzheimer's disease [J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(3): 79–84.
- [33] 魏玉婷, 朱田田, 苏明莉, 等. D-半乳糖法制备 AD 动物模型的分类总结与初步评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 846–856.
- WEI Y T, ZHU T T, SU M L, et al. Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 846–856.
- [34] 张佳焱, 孙璐瑶, 曹津萌, 等. 阿尔茨海默病的发病机制及治疗新进展 [J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2024, 48(4): 401–413.
- ZHANG J Y, SUN L Y, CAO J M, et al. Recent advances in pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease [J]. J Hebei Norm Univ (Nat Sci), 2024, 48(4): 401–413.
- [35] 祝雨辰, 邝柏宇, 梁金萍, 等. 人参、石菖蒲及其药对防治阿尔茨海默症的药理作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(5): 817–822.
- ZHU Y C, KUANG B Y, LIANG J P, et al. Advances in pharmacological effects of ginseng, Acorus calamus and its couplet medicine on Alzheimer's disease [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(5): 817–822.
- [36] CHI H, CHANG H Y, SANG T K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3082.
- [37] 朱振霞, 于浩, 谢文丽. 阿尔茨海默症发病机制及治疗药物研究进展 [J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2021, 30(5): 146–149.
- ZHU Z X, YU H, XIE W L. Research progress in the

- pathogenesis and drug therapy of Alzheimer's disease [J]. J Logist Univ PAP (Med Sci), 2021, 30(5): 146-149.
- [38] MIAO J, SHI R, LI L, et al. Pathological tau from Alzheimer's brain induces site-specific hyperphosphorylation and SDS- and reducing agent-resistant aggregation of tau *in vivo* [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 34.
- [39] HOUBEN S, DE FISENNE M A, ANDO K, et al. Intravenous injection of PHF-tau proteins from Alzheimer brain exacerbates neuroinflammation, amyloid beta, and tau pathologies in 5XFAD transgenic mice [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 106.
- [40] KAUSHAL A, WANI W Y, BAL A, et al. Okadaic acid and hypoxia induced dementia model of Alzheimer's type in rats [J]. Neurotox Res, 2019, 35(3): 621-634.
- [41] 张鑫, 王军燕, 魏玉婷, 等. 冈田酸诱导阿尔兹海默病动物模型的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(19): 129-134.
- ZHANG X, WANG J Y, WEI Y T, et al. Research progress of okadaic acid induced Alzheimer's disease animal model [J]. J Clin Med Pract, 2022, 26(19): 129-134.
- [42] RODRIGUES L, DUTRA M F, ILHA J, et al. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin [J]. J Neural Transm, 2010, 117(11): 1295-1305.
- [43] SIL S, GHOSH T. Role of cox-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of Alzheimer's Disease [J]. J Neuroimmunol, 2016, 291: 115-124.
- [44] LEE J H, JEONG S K, KIM B C, et al. Donepezil across the spectrum of Alzheimer's disease: dose optimization and clinical relevance [J]. Acta Neurol Scand, 2015, 131(5): 259-267.
- [45] BABIC T. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999, 67(4): 558.
- [46] JAIN N K, PATIL C S, KULKARNI S K, et al. Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging- and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice [J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 369-376.
- [47] PEZZE M A, MARSHALL H J, CASSADAY H J. Scopolamine impairs appetitive but not aversive trace conditioning: role of the medial prefrontal cortex [J]. J Neurosci, 2017, 37(26): 6289-6298.
- [48] 刘淑青, 顾丰华. 东莨菪碱长期给药致小鼠学习记忆障碍模型及机制研究 [J]. 医学食疗与健康, 2021, 19(2): 1-6.
- LIU S Q, GU F H. Model and mechanism of scopolamine induced learning and memory impairment in mice [J]. Med Diet Health, 2021, 19(2): 1-6.
- [49] 潘学兵, 龙大宏, 罗秀梅, 等. 神经干细胞移植对 192-IgG-saporin 阿尔茨海默病模型鼠基底前脑神经元 p75^{NGFR} 阳性神经元和行为学的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45): 8426-8430.
- PAN X B, LONG D H, LUO X M, et al. Influence of neural stem cell transplantation on the number of p75^{NGFR} positive neurons of the basal forebrain and the ethology of an animal model of Alzheimer's disease with 192-IgG-saporin [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2010, 14(45): 8426-8430.
- [50] HUANG Y, MUCKE L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies [J]. Cell, 2012, 148(6): 1204-1222.
- [51] HANSLIK K L, ULLAND T K. The role of microglia and the Nlrp3 inflammasome in Alzheimer's disease [J]. Front Neurol, 2020, 11: 570711.
- [52] ZHANG T, WANG S. Esculin inhibits the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice via regulation of TLR/NF- κ B pathways [J]. Inflammation, 2015, 38(4): 1529-1536.
- [53] BROWN G C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 180.
- [54] BROWN G C, HENEKA M T. The endotoxin hypothesis of Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2024, 19(1): 30.
- [55] KAMAT P K, KALANI A, RAI S, et al. Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: a therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(7): 4548-4562.
- [56] AKHTAR A, DHALIWAL J, SAROJ P, et al. Chromium picolinate attenuates cognitive deficit in ICV-STZ rat paradigm of sporadic Alzheimer's-like dementia via targeting neuroinflammatory and IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3 β pathway [J]. Inflammopharmacology, 2020, 28(2): 385-400.
- [57] PARK J, WON J, SEO J, et al. Streptozotocin induces Alzheimer's disease-like pathology in hippocampal neuronal cells via CDK5/Drp1-mediated mitochondrial fragmentation [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 235.
- [58] ALAVI M S, FANOUDI S, HOSSEINI M, et al. Beneficial effects of levetiracetam in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(3): 689-700.
- [59] SIRWI A, EL SAYED N S, ABDALLAH H M, et al. Umuhengerin neuroprotective effects in streptozotocin-induced Alzheimer's disease mouse model via targeting Nrf2 and NF- κ B signaling cascades [J]. Antioxidants, 2021, 10

- (12): 2011.
- [60] SALKOVIC-PETRISIC M, OSMANOVIC-BARILAR J, BRÜCKNER M K, et al. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study [J]. J Neural Transm, 2011, 118 (5): 765-772.
- [61] 张健. 亚慢性铝中毒影响大鼠海马铁稳态的机制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学; 2020.
- ZHANG J. The mechanism of subchronic aluminum poisoning impact on iron homeostasis in rats hippocampus [D]. Harbin: Northeast Agricultural University; 2020.
- [62] LYKETSOS C G, CARRILLO M C, MICHAEL RYAN J, et al. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Dement, 2011, 7(5): 532-539.
- [63] 吴勉华, 石岩. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2021.
- WU M, SHI Y. Internal medicine of Chinese medicine [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press; 2021.
- [64] 黄正团, 曹颖颖. 基于恐伤肾的阿尔茨海默病肾虚证大鼠模型的建立与评价 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(21): 2286-2291, 2296.
- HUANG Z T, CAO Y Y. Establishment and evaluation of a rat model of kidney deficiency syndrome combined with Alzheimer's disease based on fear of kidney injury [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 28(21): 2286-2291, 2296.
- [65] 帅月圆, 韩诚, 曹建华, 等. 基于¹H-NMR 血清代谢组学的阿尔茨海默病肾虚精亏证生物学机制及地黄饮子的干预作用研究 [J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(4): 252-257, 263.
- SHUAI Y Y, HAN C, CAO J H, et al. ¹H-NMR-based serum metabolomics research of the biological mechanism of kidney essence deficiency syndrome in Alzheimer's disease and intervention of Dihuangyinzi decoction [J]. J Shanxi Univ Chin Med, 2021, 22(4): 252-257, 263.
- [66] 陈秀艳. 基于“肾虚髓空”证候要素的地黄饮子干预阿尔茨海默病和帕金森病的方证效应机制研究 [D]. 太原: 山西中医药大学; 2018.
- CHEN X Y. It is treatment effect mechanism research that based on the “kidney marrow empty” syndrome factors of Dihuangyinzi intervention in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [D]. Taiyuan: Shanxi University of Traditional Chinese Medicine; 2018.
- [67] 郭少珍. 基于 PI3K/AKT/GSK3 β 信号通路阿尔茨海默病同病异证机制研究 [D]. 太原: 山西中医药大学; 2019.
- GUO S Z. Study on the mechanism of Alzheimer's disease in different syndrome types based on PI3K/AKT/GSK3 β signal transduction pathway [D]. Taiyuan: Shanxi University of Traditional Chinese Medicine; 2019.
- [68] 侯江洪. 阿尔茨海默病同病异证 tau 蛋白异常磷酸化机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学; 2017.
- HOU J Q. Study of the special tau protein hyperphosphorylated sites in different syndromes types of Alzheimer's disease [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 2017.
- [69] 谭爱华, 冉思邈, 石和元, 等. 阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 39-46.
- TAN A H, RAN S M, SHI H Y, et al. Establishment of Alzheimer's disease with intermingled phlegm and blood stasis in a transgenic mice model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 39-46.
- [70] 禚璇, 戎志斌, 刘纯, 等. 柴胡疏肝散对肝郁型老年性痴呆大鼠模型行为学及海马单胺神经递质的影响 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2013, 23(3): 129-134.
- XUAN X, RONG Z B, LIU C, et al. Effects of CHSGS on behavior and hippocampal monoamine neurotransmitter in Alzheimer's disease rats with liver-qi [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2013, 23(3): 129-134.
- [71] 张静, 史宏, 刘美莲, 等. 茵陈五苓散对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆及脑组织抗氧化能力的影响 [J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(2): 31-33.
- ZHANG J, SHI H, LIU M L, et al. Effects of Yinchén Wuling powder on learning memory and brain antioxidant capacity of Alzheimer's disease model mice [J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med, 2009, 31(2): 31-33.
- [72] 张学凯, 时晶, 倪敬年, 等. 阿尔茨海默病证候级联假说探讨 [J]. 中医杂志, 2019, 60(9): 741-744.
- ZHANG X K, SHI J, NI J N, et al. Discussion on the pattern cascade hypothesis of Alzheimer's diseases [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 60(9): 741-744.
- [73] 张玉莲, 张连城, 李强, 等. 660 例老年性痴呆患者中医证候学研究 [J]. 中医杂志, 2015, 56(3): 235-239.
- ZHANG Y L, ZHANG L C, LI Q, et al. Study on traditional Chinese medicine syndrome of 660 cases of senile dementia [J]. J Tradit Chin Med, 2015, 56(3): 235-239.
- [74] 成金枝, 张俊龙, 郭蕾, 等. 阿尔茨海默病肾虚证病证结合动物模型的制备及验证 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1063-1066.
- CHENG J Z, ZHANG J L, GUO L, et al. Preparation and validation of Alzheimer's disease with kidney deficiency syndrome animal model [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(3): 1063-1066.
- [75] 张梦雪, 丁敏芮, 张彤, 等. 安红梅运用膏方治疗认知障碍经验 [J]. 山东中医杂志, 2024, 43(10): 1145-1149.
- ZHANG M X, DING M R, ZHANG T, et al. AN Hongmei's experience in treating cognitive impairment with

- paste formula [J]. *Shandong J Tradit Chin Med*, 2024, 43 (10): 1145-1149.
- [76] 杨少敏, 黄俊燕, 李金全, 等. 基于数据挖掘的阿尔茨海默病病因病机研究 [J]. *贵州中医药大学学报*, 2024, 46 (4): 52-57.
- YANG S M, HUANG J Y, LI J Q, et al. Study on etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease based on data mining [J]. *J Guizhou Univ Tradit Chin Med*, 2024, 46 (4): 52-57.
- [77] 叶梦怡, 牛阳. 从湿痰论治老年性认知障碍 [J]. *新中医*, 2017, 49(3): 151-153.
- YE M Y, NIU Y. Treating senile cognitive impairment from the perspectives of dampness and phlegm [J]. *J New Chin Med*, 2017, 49(3): 151-153.
- [78] 侯江洪, 张欣, 龙倩, 等. 阿尔茨海默病痰浊阻窍证大鼠 tau 蛋白 Thr181 位点特异性磷酸化改变研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 2154-2158.
- HOU J Q, ZHANG X, LONG Q, et al. Study on the specific change of tau protein phosphorylation in Thr181 site of Alzheimer's disease with phlegm obstructing orifices pattern in rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(5): 2154-2158.
- [79] 李斌, 郭静, 王智超, 等. 痰浊阻窍 AD 大鼠“痰-火-虚”证候演变实验研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20 (8): 36-39.
- LI B, GUO J, WANG Z C, et al. Experimental study on the syndrome evolution in senile dementia (phlegm blockage syndrome) rat model [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2018, 20(8): 36-39.
- [80] 窦金金, 罗泓楠, 李红颖, 等. 地黄饮子防治老年痴呆疾病研究进展 [J]. *现代中药研究与实践*, 2023, 37(1): 92-98.
- DOU J J, LUO H N, LI H Y, et al. Research progress on prevention and treatment of senile dementia with Dihuang Yinzi [J]. *Res Pract Chin Med*, 2023, 37(1): 92-98.
- [81] 谭爱华, 宋子瑜, 胡玉萍, 等. 补肾化痰复方对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力及 SorLA 蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(10): 4961-4964.
- TAN A H, SONG Z Y, HU Y P, et al. Effects of Bushen Huatan Compound on learning and memory ability and SorLA protein expression in APP/PS1 double transgenic mice [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35 (10): 4961-4964.
- [82] 张介宾. 景岳全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- ZHANG J B. *Jingyue quanshu* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 1991.
- [83] KATISKO K, CAJANUS A, KORHONEN T, et al. Prodromal and early bvFTD: evaluating clinical features and current biomarkers [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 658.
- [84] CHANDRA S, SISODIA S S, VASSAR R J. The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored [J]. *Mol Neurodegener*, 2023, 18 (1): 9.
- [85] SUBHRAMANYAM C S, WANG C, HU Q, et al. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 94: 112-120.
- [86] LI L, DONG L L, LI X R, et al. Effects of acupuncture on behaviors and expression levels of 5-HT1AR and 5-HT2AR in the hippocampus of insomnia rats due to liver Qi stagnation [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2023, 21(5): 337-345.
- [87] 李莹, 王磊沙, 刘建勋, 等. 脑梗死气虚血瘀证大鼠模型表征及病理生理变化研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (4): 786-793.
- LI Y, WANG L S, LIU J X, et al. Characterization and pathophysiological changes of cerebral infarction rat model with qi-deficiency and blood-stasis syndrome [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2018, 43(4): 786-793.

[收稿日期] 2024-10-08