

杨迪,鹿振辉,蒋雨薇,等. 重症哮喘动物模型构建研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 467-478.

YANG D, LU Z H, JIANG Y W, et al. Construction of a severe asthma animal model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 467-478.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.001

重症哮喘动物模型构建研究

杨迪,鹿振辉,蒋雨薇,李翠,马子凤,王钰,陈林锦,陆天逊,崔洁*

(上海中医药大学附属龙华医院,呼吸疾病研究所,上海 200032)

【摘要】 目的 构建能够重现重症哮喘临床表型的动物模型。**方法** 使用卵清蛋白(ovalbumin,OVA)联合 IL-33 或不同剂量的脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)探索构建重症哮喘小鼠模型。造模后通过肺功能、炎症细胞数量及肺组织病理,评估模型。通过 GEO 数据库筛选重症哮喘患者的关键基因,对构建的模型进行验证。**结果** OVA 叠加 IL-33 或 LPS(5 μ g)相较 OVA 哮喘模型能够显著增加气道阻力,肺泡灌洗液中炎症细胞数量,加重肺组织病理损伤。在构建的重症哮喘模型中重症哮喘的关键基因表达情况与临床重症哮喘患者一致。**结论** OVA 联合 IL-33 或 LPS(5 μ g)可用于构建重症哮喘的实验动物模型。

【关键词】 脂多糖;卵清蛋白;重症哮喘;IL-33;GEO 数据库

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0467-12

Construction of a severe asthma animal model

YANG Di, LU Zhenhui, JIANG Yuwei, LI Cui, MA Zifeng, WANG Yu, CHEN Linjin, LU Tianxun, CUI Jie*

(Institute of Respiratory Diseases, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: CUI Jie. E-mail: cuij1998@163.com

【Abstract】 Objective To develop an animal model that replicates the clinical phenotype of severe asthma. **Methods** Ovalbumin (OVA) combined with IL-33 or varying doses of lipopolysaccharides (LPS) was used to explore the construction of a severe asthma mouse model. Established model animals were assessed for lung function, number of inflammatory cells, and lung tissue pathology were assessed. Expression of key genes associated with severe asthma identified from the GEO database were validated in the new model. **Results** Compared with OVA alone, OVA combined with IL-33 or 5 μ g LPS significantly increased airway resistance and the number of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid, and aggravated the pathological damage to lung tissues. The expression patterns of key genes in the newly constructed severe asthma models were consistent with those observed in clinical patients with severe asthma. **Conclusions** The modeling method of combining OVA with IL-33 or LPS (5 μ g) can be used to construct experimental animal models of severe asthma.

【Keywords】 lipopolysaccharides; ovalbumin; severe asthma; IL-33; GEO database

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

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82205004),上海市卫健委中医药科研项目(2022QN003),浦东新区中医药传承创新发展示范试点项目(YC-2023-0901)。

Funded by National Natural Science Foundation of China Youth Program (82205004), Shanghai Health Commission Traditional Chinese Medicine Research Project (2022QN003), Demonstration Pilot Project of Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Development in Pudong New Area(YC-2023-0901).

[作者简介] 杨迪,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。Email:yang_d0715@126.com

[通信作者] 崔洁,女,博士,住院医师,研究方向:中医药防治哮喘的机制与临床。Email:cuij1998@163.com

哮喘影响着全球超 3 亿人的健康,其特征是以慢性气道炎症为特征的异质性疾病,我国哮喘总患病人数超过四千万^[1-2]。重症哮喘(severe asthma, SA)定义为使用大剂量吸入性糖皮质激素加长效的 β_2 受体激动剂仍不理想或需长期依赖此类治疗以避免病情失控的哮喘类型^[3]。尽管 SA 仅占哮喘患者总数的 5% ~ 10%,却是导致哮喘相关致残和死亡的主要原因之一^[4]。SA 的发病机制和治疗成为目前哮喘研究的热点之一。实验动物模型为哮喘的基础研究提供重要支撑。传统的哮喘动物模型常通过卵清蛋白(ovalbumin, OVA)或使用尘螨(house dust mite, HDM)致敏构建^[5-6],主要模拟嗜酸性粒细胞增多的过敏性哮喘。目前 SA 模型主要通过脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)或病毒如呼吸道合胞病毒、流感病毒等联合 OVA 进行构建^[7-11],但现有的 SA 模型造模方法不统一,不能完全重现 SA 临床表型。因此本研究在 OVA 致敏的基础上叠加白介素(interleukin, IL)-33 和不同剂量的 LPS 旨在模拟不同类型的炎症表型和疾病严重程度,以期建立一种稳定并且能够重现 SA 患者临床表型的实验动物模型,为 SA 的发病机制及防治提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

C57BL/6J 雄性小鼠, SPF 级, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 共 42 只, 每组 6 只, 分为 7 组。购于浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(浙)2024-0001】, 饲养于上海中医药大学附属龙华医院实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】, 饲养条件为昼夜各半循环照明, 相对湿度 40% ~ 50%, 温度控制在 22 ~ 23 °C, 自由进食饮水。实验动物处置严格遵循动物福利原则, 研究方案经上海中医药大学医学实验动物研究所实验动物管理和使用委员会批准(PZSHUTCM211115011)。

1.1.2 主要试剂与仪器

OVA V 级(批号: A5503, 购自: Sigma), OVA II 级(批号: A5253, 购自: Sigma), DNase I 消化酶(批号: 11284932001, 购自: Roche), LPS(批号: L5293, 购自: Sigma), 乙酰甲胆碱(methacholine,

Mch)(批号: A2251, 购自: Sigma), 注射用明胶铝(批号: 21645-51-2, 购自: CRODA), LiberaseTM 消化酶(批号: 05401020001, 购自: Roche), 抗小鼠 CD11b-FITC(批号: 101205, 购自: Biolegend), 抗小鼠 SigleIF-APC(批号: 155507, 购自: Biolegend), Ly6G-eF450(批号: 48-5931-82, 购自: Invitrogen), F480-PE-Cy7(批号: 123113, 购自: Biolegend), 可固定活力染料 eFluor 780(批号: 65-0865-14, 购自: Invitrogen), 抗小鼠 CD45-ef506(50-112-4943, 购自: Invitrogen), IL-33(HY-P73210, 购自: MCE), TRIzol(批号: 99088701, 购自: Invitrogen), 逆转录试剂盒(批号: RR036A, 购自: TaKaRa), SYBR Green PCR Mix 试剂盒(批号: A5503, 购自: Vazyme)。FinePointe 气道阻力和肺顺应性检测系统(美国 DSI 公司); 流式细胞分析仪(美国贝克曼公司); 微量分光光度计(杭州奥盛公司); 实时荧光定量 PCR 仪(德国耶拿分析仪器股份公司)。

1.2 方法

1.2.1 OVA 组模型构建及 OVA 联合 IL-33 滴鼻构建 SA 模型

对照组, 实验第 0、7 天采用 100 μ L 0.9% 的 NaCl 进行腹腔注射致敏; 第 14、16、18、20 和 22 天将小鼠置于密封的箱子中, 用 0.9% 的 NaCl 雾化 30 min/d; 第 24 ~ 26 天麻醉小鼠后给予 50 μ L PBS 滴鼻; 第 14 天开始给予 50 μ L 的 PBS 滴鼻连续 5 d, 每天 1 次, 滴鼻 1 h 后进行当天的雾化操作。

OVA 组, 在实验第 0 和 7 天进行采用 100 μ L (1 mg/mL) 的 OVA 腹腔注射进行致敏; 第 14、16、18、20 和 22 天将小鼠置于密封的箱子中, 用 3% OVA 雾化 30 min/d; 第 24 ~ 26 天麻醉小鼠后给予 50 μ L (1 mg/mL) OVA 滴鼻。

OVA + IL-33 组, 在第 14 天开始激发的同时, 通过给予 50 μ L (2 mg/mL) 的 IL-33 滴鼻连续 5 d (共 500 ng), 每天 1 次。如果滴鼻与 OVA 雾化在同 1 d 进行, 滴鼻 1 h 后再进行雾化。

1.2.2 OVA 联合 LPS 滴鼻构建 SA 模型

OVA + LPS 1 ~ 4 组, 在第 1、2、3 和 14 天麻醉小鼠将 OVA 10 μ g 和 LPS (0.5、1、2.5 和 5 μ g) 混于 50 μ L 的 PBS 中对小鼠进行滴鼻干预, 第 21 ~ 27 天同样将小鼠置于密封箱中, 并使用 3%

OVA 雾化 60 min。所有动物于第 28 天处理。造模流程如图 1。

1.2.3 肺功能检测

在最后一次 OVA 刺激 48 h 后进行评估。小鼠使用 1% 戊巴比妥钠麻醉,颈部气管切开后进行插管后将小鼠放置在 DSI Buxco 呼吸机上进行操作,呼吸频率稳定后依次用雾化 PBS 和 Mch (0.3.125、6.25、12.5 和 25 mg/mL) 对小鼠进行支气管激发实验,记录小鼠的气道阻力增加百分比。

1.2.4 肺泡灌洗液采集及流式检测

小鼠完成肺功能检测后,待小鼠麻醉状态下处死,取仰卧位固定牙齿和四肢,根据无菌操作原则沿着胸骨中线依次剪开腹部、胸壁以及颈部皮肤,以暴露气管、心脏、肺等。通过气管插管注入 1 mL PBS,同时将 80% 以上的 BALF 回收,回收的 BALF 在 2200 r/min、4 °C 条件下离心 10 min,离心后上清保存至 -80 °C。细胞沉淀使用 PBS 重悬,在细胞沉淀中加入含 10% FBS + 0.2%

BD 刺激剂,在 37 °C 下刺激 4 h。刺激完成后,加入表面抗体 CD45、Live、Ly6G、CD11b、CD11c、SigleIF 和 F480 避光 4 °C 孵育 30 min,IC buffer 固定,上机检测。

1.2.5 肺组织病理

完成肺泡灌洗液后将肺取出,小鼠右上肺用 4% 多聚甲醛固定 24 h,经石蜡包埋、切片、脱水透明后,进行苏木素-伊红 (HE)、Masson 以及糖原 (PAS) 染色。

1.2.6 SA 患者差异表达基因分析

从 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中搜索“severe asthma”,获得关于人支气管上皮细胞的基因芯片数据 GSE43696,该数据集包含 20 个对照样本和 38 个重症哮喘样本,根据调整后 P 值 (adjusted P value) < 0.05 和 $|\log FC| \geq 1$ 筛选差异基因。使用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对筛选出的差异基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of

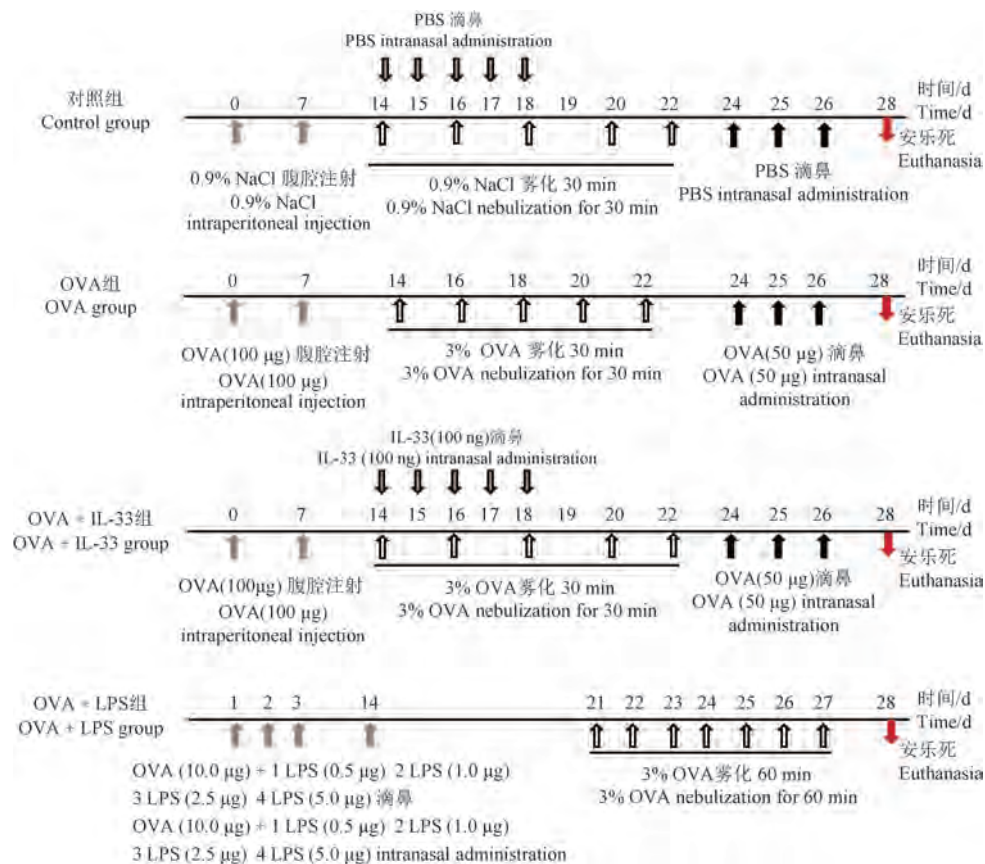


图 1 造模流程

Figure 1 Model establishment

genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。将差异基因导入 String 数据库, 构建蛋白互作网络 (protein-to-protein internet, PPI), 结果导入 Cytoscape (3.9.0), 根据根据度中心性 (degree centrality, DC)、介数中心性 (betweenness centrality, BC) 和紧密中心性 (closeness centrality, CC) 的大小对各个节点进行排序与筛选分析, 通过 CytoHubba 插件筛选 MCC 法中排名前 10 的基因作为枢纽基因。

1.2.7 PCR 检测

使用 TRIzol 试剂提取小鼠肺组织中的总 RNA, 之后使用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。定量 PCR 试剂 SYBR Green 进行 PCR 实验。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法将基因表达水平归一化, 与内参 GAPDH 值对比后, 计算差异值。所有引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>Gapdh</i>	F: AGGTCGGAGTCAACGGATTG R: TGTAAACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>ErbB2</i>	F: GAGACAGAGCTAAGGAAGCTGA R: ACGGGGATTTTCACGTTCTCC
<i>Bdnf</i>	F: TCATACTTCGTTGCATGAAGG R: ACACCTGGGTAGGCCAAGTT
<i>Gdnf</i>	F: GCCGGACGGGACTCTAAGAT R: CGTCATCAAACTGGTCAGGATAA
<i>Kcnc1</i>	F: CCCCTACTCATCCCGCTAC R: TGTTCACGATGGGGTTGAAGC
<i>Syt4</i>	F: GGAGGCCAATTCCCTGAG R: TCATTTTGATGTACGGGTCAAG
<i>Cck</i>	F: AAGAGCGGCGTATGTCTGTG R: CATCCAGCCCATGTAGTCCC
<i>Kcna4</i>	F: CGGGAGAGACTCGCTCACT R: CACGGCTACCTTGAGGATCAT
<i>Kcna1</i>	F: GAGAATGCGGACGAGGCTTC R: CCGGAGATGTTGATTACTACGC
<i>Ntrk2</i>	F: CTGGGGCTTATGCCTGCTG R: AGGCTCAGTACACCAAATCCTA
<i>Il-6</i>	F: CTGCAAGAGACTTCCATCCAG R: AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计分析, 结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 气道炎症评估

采用流式细胞术检测小鼠肺泡灌洗液中的炎症细胞, 相较 OVA 组, OVA + IL-33 组及 OVA + LPS 4 组均都能显著增加肺泡灌洗液炎症细胞总数 ($P < 0.05$), 其中 OVA + LPS 4 组细胞总数增加幅度要高于 OVA + IL-33 组。此外, 相较 OVA 组, OVA + IL-33 组显著增加嗜酸粒细胞水平 ($P < 0.001$) 但对中性粒细胞无明显影响, 而 OVA + LPS 组均可显著增加中性粒细胞水平 ($P < 0.01$), 特别是 OVA + LPS 4 组 (图 2)。

2.2 气道高反应性评价

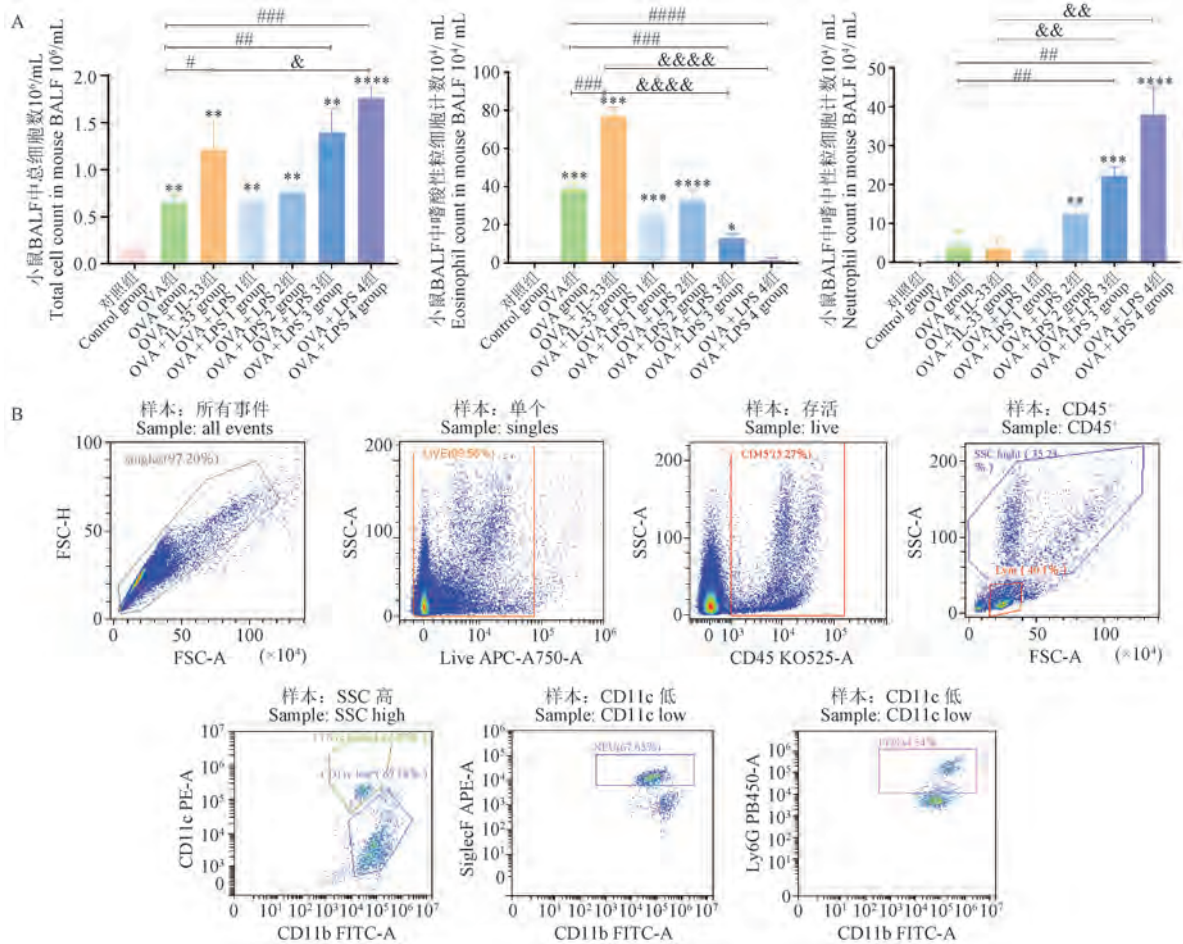
小鼠肺功能检测结果提示: 相较 OVA 组, OVA + IL-33 组及 OVA + LPS 组对低浓度 Mch 浓度敏感性更高 ($P < 0.05$), 当加入 12.5 mg/mL, 及 25 mg/mL 时 Mch 作为激发浓度为时, 相较 OVA 组, OVA + IL-33 组及 OVA + LPS 4 组气道阻力显著升高 ($P < 0.05$), OVA + IL-33 组与 OVA + LPS 4 组相比无显著性差异 (图 3)。

2.3 组织病理学分析

HE 染色观察小鼠肺组织炎症细胞浸润 (图 4)。对照组小鼠支气管和肺泡结构清晰, 模型组小鼠的炎症细胞明显浸润到细支气管周围和血管周围的结缔组织中。相较单纯 OVA 造模组, OVA + IL-33 组及 OVA + LPS 组小鼠炎症细胞浸润更显著 ($P < 0.05$)。且随着 LPS 浓度的升高, 炎症细胞浸润及肺组织弥漫性损伤更明显, 其中 OVA + LPS 4 组炎症细胞浸润最为严重。PAS 染色评估气道黏液分泌情况 (图 5), 相较 OVA 组, OVA + IL-33 组及 OVA + LPS 4 组小鼠气道上皮杯状细胞内黏液分泌更显著 ($P < 0.05$)。Masson 染色检测用于评估胶原沉积, 用来反应气道重塑情况 (图 6), 结果表明相较 OVA 组, OVA + IL-33 组及 OVA + LPS 组气道外周胶原沉积增多 ($P < 0.01$), 且随 LPS 浓度增高, 胶原蛋白沉积占比增多 ($P < 0.01$)。

2.4 SA 患者差异表达基因及差异表达基因的通路富集分析

对 GSE43696 中 20 个正常样本及 38 个 SA 样本进行差异表达基因分析 (differential expression analysis, DEG), 共筛选出 137 个差异基



注:A: BALF 中炎症细胞数量(总细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞); B: 流式检测逻辑图; 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与 OVA 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$; 与 OVA + IL-33 组相比, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.0001$ 。(下图同)

图 2 气道炎症及气道高反应性评估

Note. A. Number of inflammatory cells in BALF (total cells, eosinophils, neutrophils). B. Flow cytometry gating strategy. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with OVA group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$. Compared with OVA + IL-33 group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 2 Assessment of airway inflammation

因,包含 44 个上调基因和 93 个下调基因(见表 2,图 7)。蛋白互作网络包括 56 个节点和 174 条边,根据 Cytohubba 插件分析所得排名前 10 的枢纽基因分别为 IL-6、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、钾电压门控通道亚家族 C 成员(potassium voltage-gated channel subfamily C, KCNC)1、突触结合蛋白 4(synaptotagmin 4, SYT4)、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)、钾电压门控通道家族中钾电压门控通道亚家族 A 成员(potassium voltage-gated channel subfamily A

member, KCNA)4、KCNA1、神经营养受体酪氨酸激酶家族(neurotrophin receptor kinase 2, NTRK2)和酪氨酸激酶受体 2(Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2, ERBB2)。GO 分析提示差异基因在生物学过程中主要涉及钾离子跨膜转运、信号转导、蛋白质同质寡聚化、离子跨膜转运、离子转运调控等;细胞成分层面主要涉及质膜、质膜组成、细胞外区域、轴突、细胞表面等;分子功能方面主要涉及参与调节突触前膜电位的电压门控离子通道活性、延迟整流器钾通道活性、I 受体拮抗剂活性、IgE 结合、钙离子结合等。KEGG 结果显示通路主要聚焦在神经活性配体、受体相互作用果

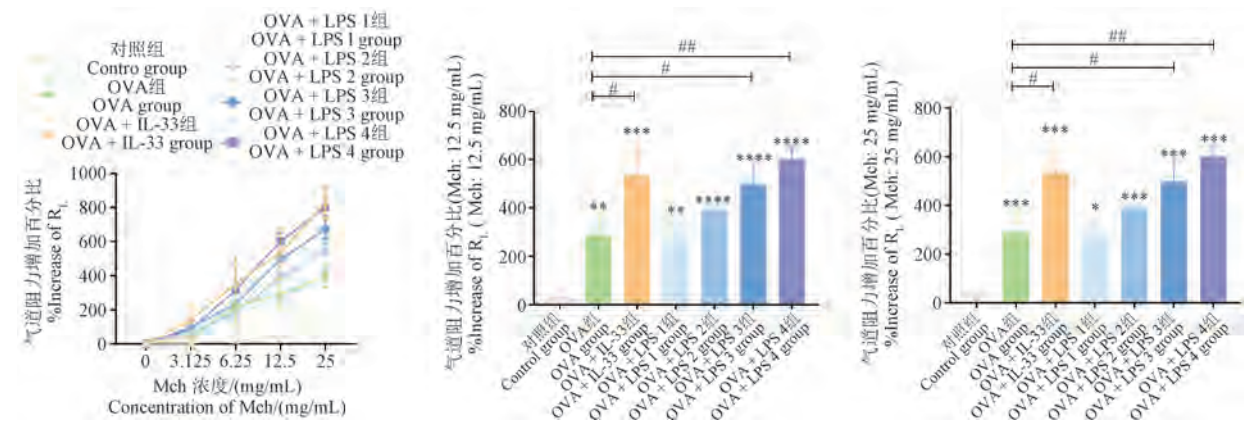


图 3 气道高反应性评估

Figure 3 Airway hyperresponsiveness

表 2 上调与下调基因

Table 2 Up-regulated and down-regulated genes.

差异表达基因分析 DEG	基因名称 Gene name
上调表达 Up-regulated	<i>Cla1</i> , <i>Slco1B3</i> , <i>Phactr3</i> , <i>Ceacam5</i> , <i>Cgrefl</i> , <i>Prr4</i> , <i>Tpo</i> , <i>B3Gnt6</i> , <i>Ntrk2</i> , <i>C1Orf186</i> , <i>Cck</i> , <i>Krt6A</i> , <i>Tcn1</i> , <i>Akr1B10</i> , <i>Adora3</i> , <i>Ms4A2</i> , <i>Fkbp5</i> , <i>Il1R2</i> , <i>Cxcl14</i> , <i>Tprxl</i> , <i>Krt6C</i> , <i>Ptprh</i> , <i>Ca12</i> , <i>Wdr72</i> , <i>Fbp2</i> , <i>Irx4</i> , <i>C1Orf64</i> , <i>Pxdn</i> , <i>Sntg2</i> , <i>Cd109</i> , <i>Cdh15</i> , <i>Bdnf</i> , <i>Cemip</i> , <i>Gdnf</i> , <i>Nmu</i> , <i>Psca</i> , <i>Sp5</i> , <i>Hsd11B2</i> , <i>Lrrc31</i> , <i>Tmem200A</i> , <i>Slc9A3</i> , <i>Upk1B</i> , <i>Hkdc1</i> , <i>Itga10</i>
下调表达 Down-regulated	<i>Shisa2</i> , <i>Ncoa7</i> , <i>Ccdc169</i> , <i>Far2P1</i> , <i>Tll1</i> , <i>Loc100506699</i> , <i>Ccdc68</i> , <i>Vgll2</i> , <i>Cilp</i> , <i>Steap4</i> , <i>Cyp4F30P</i> , <i>Pcdh17</i> , <i>Ccl15</i> , <i>Bod1L1</i> , <i>Fmn2</i> , <i>Nav3</i> , <i>Dnase1L3</i> , <i>Fam155A</i> , <i>Peg10</i> , <i>Nat8B</i> , <i>Lgals2</i> , <i>Nol4</i> , <i>Rnf182</i> , <i>Tox</i> , <i>Sema3E</i> , <i>Atcay</i> , <i>Fcer1A</i> , <i>Foxa2</i> , <i>Scn3A</i> , <i>Slamf7</i> , <i>Crabp2</i> , <i>Siah3</i> , <i>Sv2B</i> , <i>Lrrc63</i> , <i>Gem</i> , <i>Atp6V1B1</i> , <i>Thsd7A</i> , <i>Cdh18</i> , <i>Atp8A2</i> , <i>Il-6</i> , <i>Bex1</i> , <i>Nox1</i> , <i>Egfm1P</i> , <i>Neu4</i> , <i>Prlhr</i> , <i>Theg</i> , <i>Chl1-As1</i> , <i>Kcnc1</i> , <i>Scgn</i> , <i>Hnf1A-As1</i> , <i>Aard</i> , <i>Ltf</i> , <i>Fhod3</i> , <i>Adarb2-As1</i> , <i>ErbB2</i> , <i>Il36Rn</i> , <i>Gabrg1</i> , <i>Gpr156</i> , <i>Sfta1P</i> , <i>Scgb1A1</i> , <i>Epha10</i> , <i>Pdlim3</i> , <i>Pcsk9</i> , <i>Vgll3</i> , <i>Spta3</i> , <i>Dnajc5B</i> , <i>Linc00261</i> , <i>C2Cd4B</i> , <i>Tmem45A</i> , <i>Slc44A5</i> , <i>Scgb3A1</i> , <i>B3Galt5-As1</i> , <i>B3Gat1</i> , <i>Ddc</i> , <i>Hpn</i> , <i>C7Orf26</i> , <i>Tgm7</i> , <i>Kalrn</i> , <i>Kcna4</i> , <i>Wnk4</i> , <i>Sucnr1</i> , <i>Syt13</i> , <i>Plac4</i> , <i>Dppa5</i> , <i>Syt4</i> , <i>Tmem74B</i> , <i>Ptgir</i> , <i>Ano4</i> , <i>Erich1-As1</i> , <i>Loc100132287</i> , <i>Kcna1</i> , <i>Mmp16</i> , <i>Csh1</i>

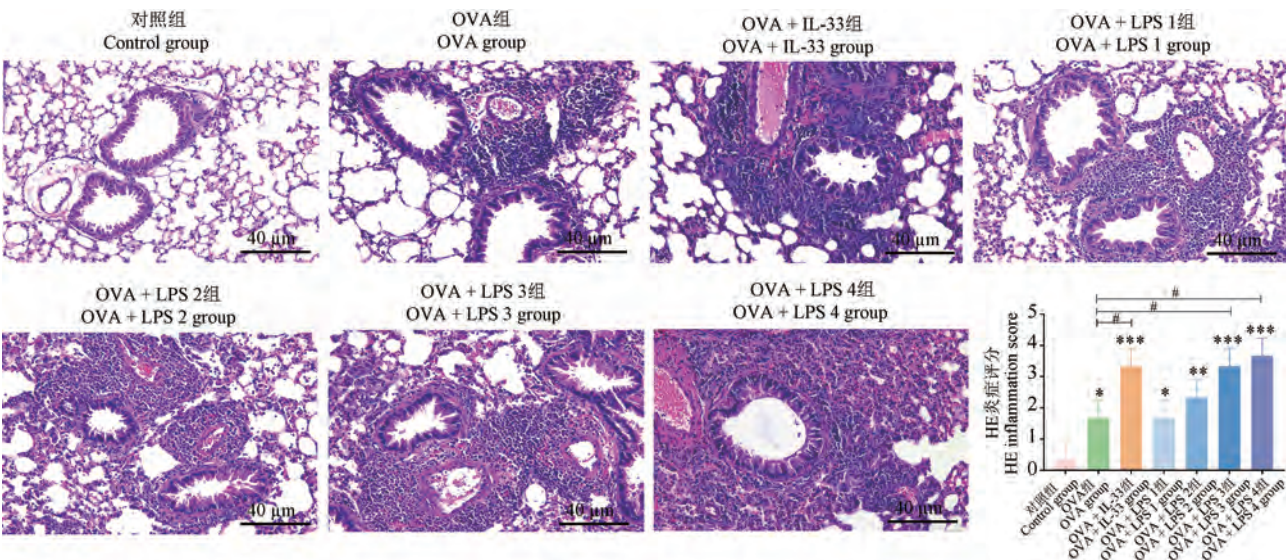


图 4 肺组织 HE 染色

Figure 4 HE staining of lung tissue

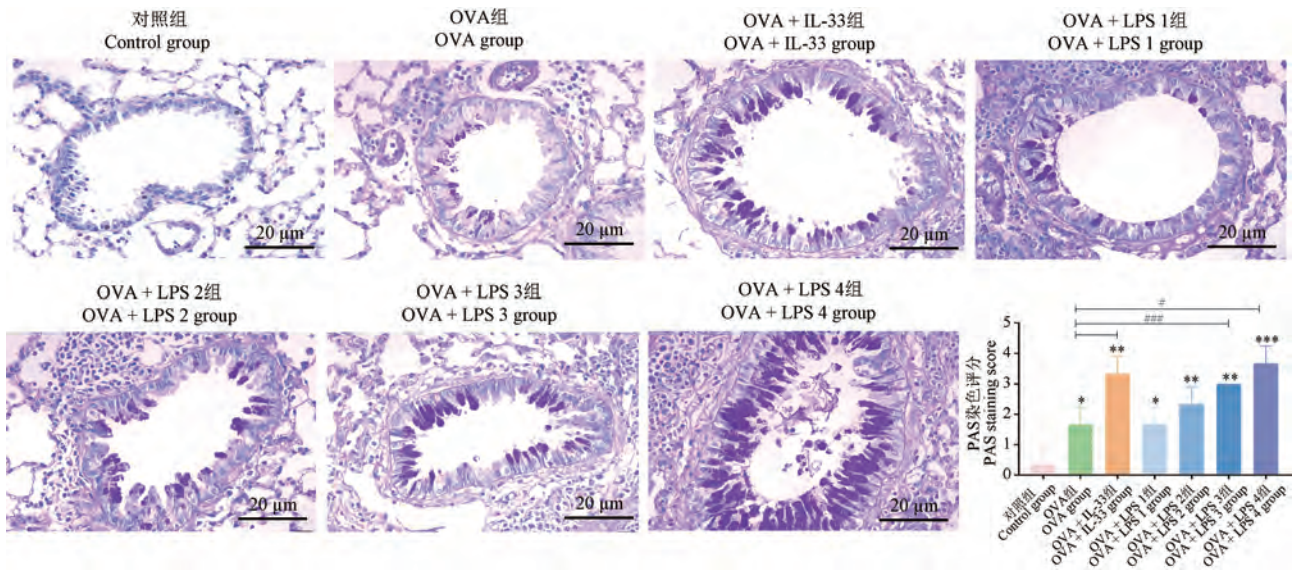


图 5 肺组织 PAS 染色

Figure 5 PAS staining of lung tissue

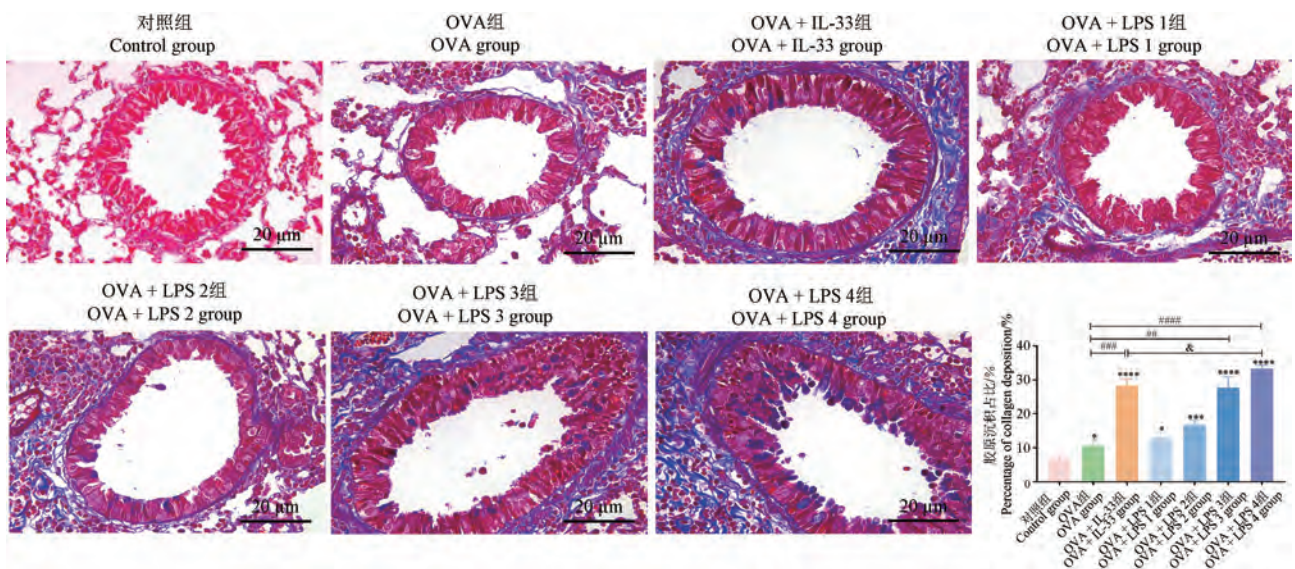


图 6 肺组织 Masson 染色

Figure 6 Masson staining of lung tissue

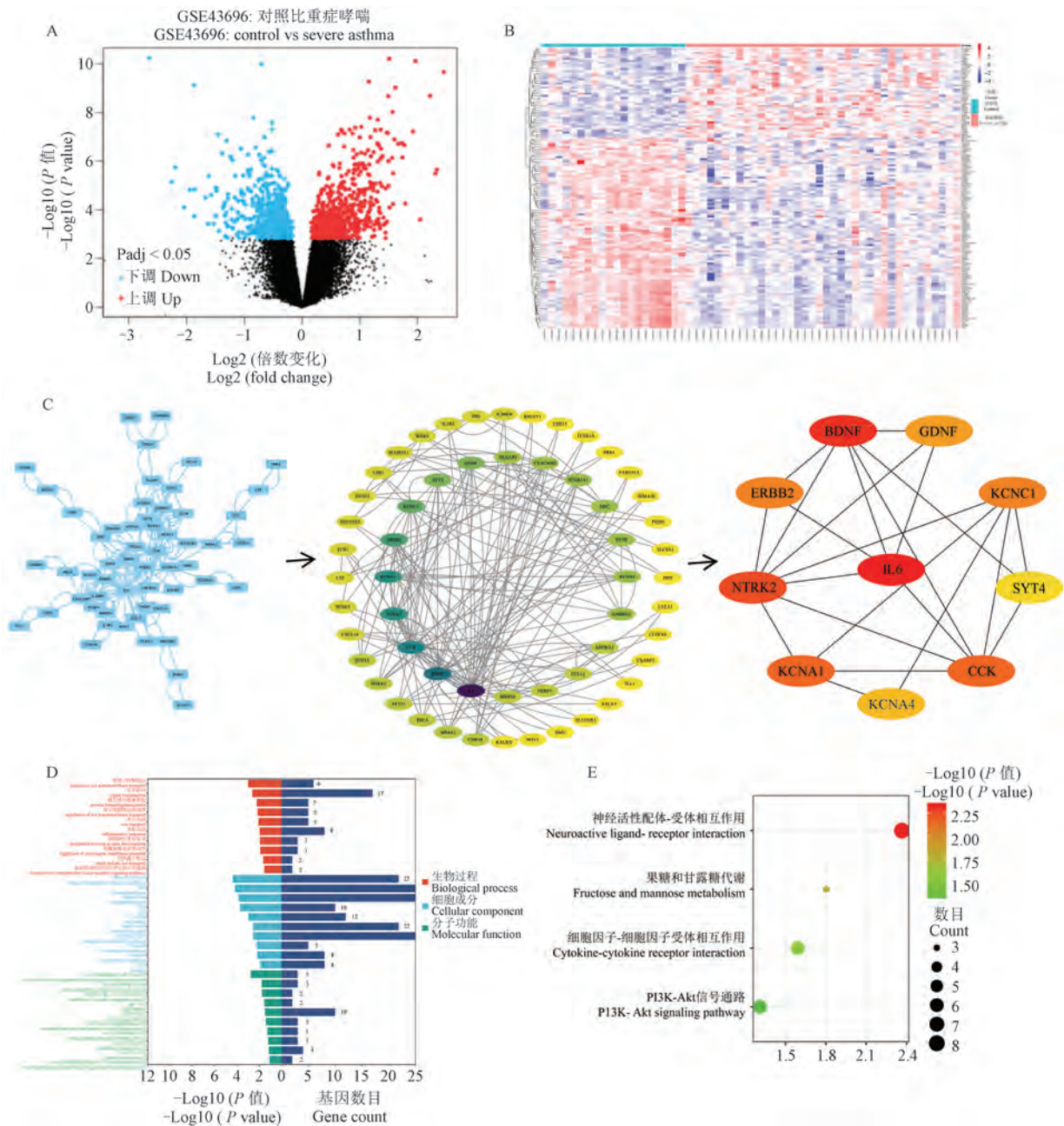
糖和甘露糖代谢细胞因子、细胞因子受体相互作用以及 PI3K-Akt 等信号通路。

2.5 小鼠肺组织中 SA 关键基因表达情况

采用 PCR 技术检测对照组、OVA 组、OVA + IL33 组及 OVA + LPS 组模型小鼠肺组织中 SA 相关的关键基因 *Il-6*、*Kcna1*、*Kcna4*、*Kcnc1*、*Ntrk2*、*ErbB2* 和 *Bdnf* 的 mRNA 表达情况,如图 8 所示相较对照组,*Il-6*、*Gdnf*、*Ntrk2*、*Bdnf* 表达显著上升;*ErbB2* 是显著下降的;*Kcnc1*、*Kcna1*、*Kcna4*、*Syt4*、*Cck* 等未有显著性差异。

3 讨论

SA 作为一种治疗极具挑战性且经济负担沉重的疾病,构成了哮喘致残、致死的主要原因。有研究指出 SA 患者平均治疗的费用可比较度的高出十倍,占哮喘相关医疗保健费用的 60% 以上^[12]。与轻度哮喘患者相比,重症患者诱导痰中嗜酸性粒细胞或嗜中性粒细胞等炎症细胞数量升高更为明显,且气道重塑病理变化更加显著^[13]。当前,临床上对于 SA 患者尚缺乏高效的



注:A:火山图;B:热图;C:差异表达基因的PPI图及关键模块;D:GO分析;E:KEGG分析。

图7 SA患者差异表达基因分析

Note. A. Volcano plot. B. Heatmap. C. PPI network and key modules of differentially expressed genes. D. GO analysis. E. KEGG analysis.

Figure 7 Differentially expressed gene analysis in SA patients

治疗方案,因此,SA的发病机制及其治疗靶点的探索已成为哮喘研究的热点议题。构建一种能够模拟SA临床表型和主要病理特征的实验动物模型,对于深入探究SA的发病机制及开发有效的诊疗手段具有至关重要的意义。

SA按照炎症细胞的类型可以归为T2型和T2型^[13],即以嗜酸性粒细胞占主导的表型以及

非嗜酸性哮喘如中性粒细胞哮喘等^[14]。既往研究认为嗜酸性粒细胞增多聚集与哮喘加重密切相关。IL-33结合其受体ST2后,能够激活Th2型免疫反应,导致促炎细胞因子(如IL-4、IL-5、IL-13)的释放增加。这些细胞因子与SA患者的气道炎症状态、嗜酸性粒细胞增多和气道过度反应存在着紧密的关系^[15]。IL-33不仅具备激活适应

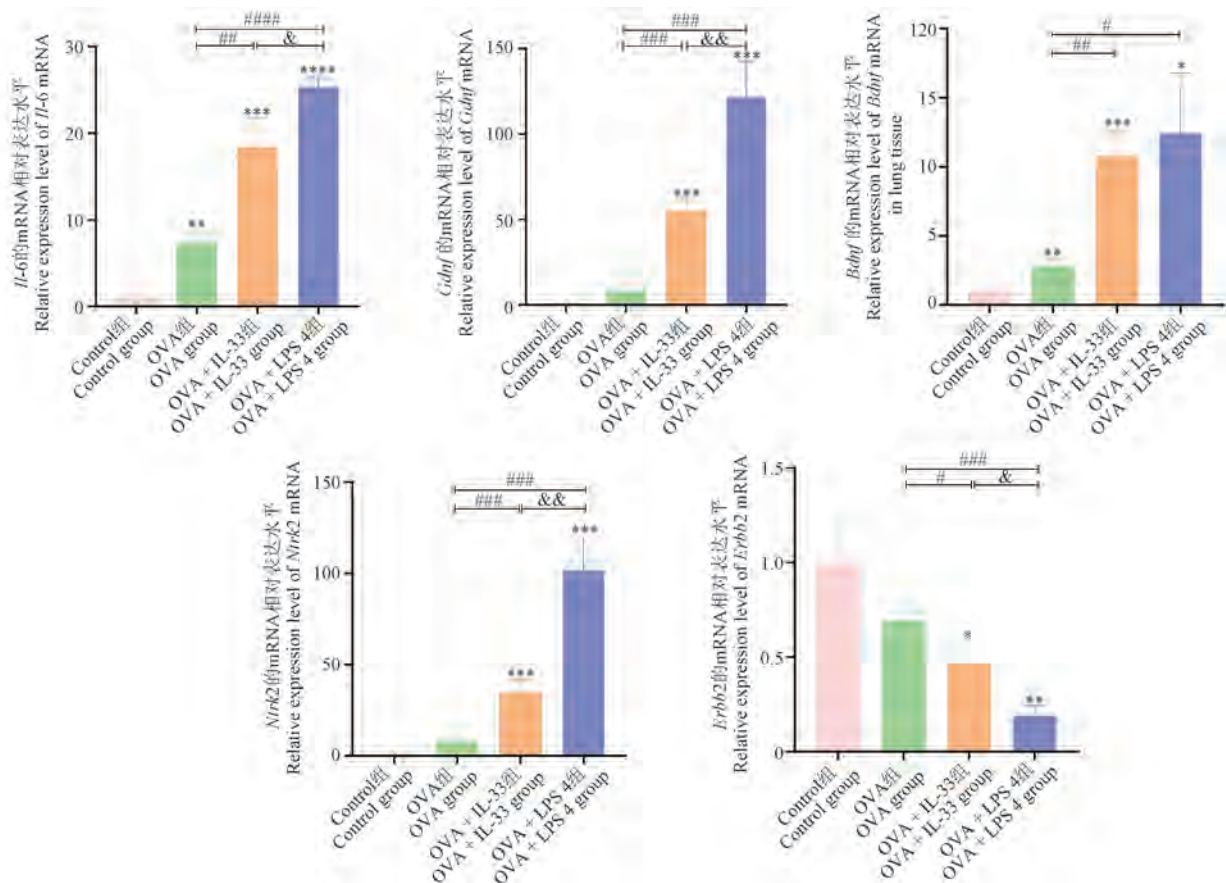


图 8 肺组织中 *Il-6*、*Gdnf*、*Bdnf*、*Ntrk2* 和 *Erbb2* 的 mRNA 相对表水平

Figure 8 Relative expression levels of *Il-6*, *Gdnf*, *Bdnf*, *Ntrk2* and *Erbb2* mRNA in lung tissue

性免疫系统,还能通过影响固有淋巴样细胞 (group 2 innate lymphoid cells, ILC2)、嗜酸性粒细胞等固有免疫细胞,进一步加剧炎症反应。研究表明,SA 患者的血清和气道中 IL-33 的水平显著升高,且其浓度与疾病严重程度、急性发作频率及气道炎症程度相关。通过阻断 IL-33 可以显著提高哮喘控制率,并改善中重度哮喘患者的肺功能^[16]。OVA 是哮喘动物模型最常用的致敏原之一^[17-18],可以稳定的建立过敏性哮喘动物模型。在此基础上,LI 等^[19]采用 OVA 叠加 IL-33 连续滴鼻诱导的哮喘小鼠模型中结果显示其通过直接激活 ILC2 细胞,增强哮喘 Th2 型气道炎症反应。基于团队的前期研究结果^[20],此次研究采用 OVA 叠加 500 ng 的 IL-33,以放大嗜酸性粒细胞聚集反应,从而模拟以嗜酸性粒细胞增多为特征的 SA 模型。对比单纯 OVA 激发的哮喘小鼠模型,发现当 OVA 与 IL-33 联合使用时,可以显著促进肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞数量,气道阻力显著升高,肺组织病理学检测提示杯状细胞增

生黏液分泌增多以及胶原沉积气道重塑明显形成。

近年来随着研究发现 30% ~ 50% 的患者表现为非过敏性、非嗜酸性的。且在非嗜酸性粒细胞哮喘病例研究中发现,中性粒细胞表型往往与更高的疾病严重程度和加重频率呈现出正相关性^[21-22]。此外,SA 患者往往对皮质类固醇治疗表现出抵抗性,而这种抵抗性与中性粒细胞数量的增多也密切相关^[15,23]。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的共同成分,常被用于诱导中性粒细胞增多的炎症反应,且与哮喘严重程度增强相关^[24-25],已有研究采用 OVA 联合 LPS 可成功建立中性粒细胞哮喘小鼠模型^[7-9]。然而中性粒细胞哮喘模型构中使用的 LPS 剂量并不一致。本研究通过 OVA 联合不同剂量 LPS 的探索构建中性粒细胞表型的 SA 模型。结果显示随着 LPS 剂量的增加,气道阻力以及肺组织炎症明显增强。当联合使用的 LPS 剂量为 1 μg 时,相较单纯的 OVA 组,BALF 中嗜酸性粒细胞占比降低,而中性

粒细胞占比增加。而 LPS 剂量进一步增加达到 2.5、5 μg 时,小鼠 BALF 中嗜中性粒细胞占比明显升高,形成了明显的以嗜中性粒细胞为主的炎症细胞表型。当 LPS 剂量达到 5 μg 时中性粒细胞占比达到最高,同时气道的粘液分泌及胶原沉积也显著增加。

在现有的 SA 模型中,嗜酸性粒细胞聚集的 T2 型 SA 目前研究较少,本研究采用了 IL-33 放大 T2 型炎症效应,为该类型 SA 基础研究提供新思路,其次非 T2 型 SA 模型研究中,CAMARGO 等^[26]采用 OVA 以及 OVA 叠加 LPS 分别成功建立了过敏性哮喘和以中性粒细胞为主的 SA 小鼠模型,其 LPS 用量为 2 μg 溶于 20 μL 的 PBS 中,小鼠病理显示肺组织细胞外基质重塑,BALF 中总细胞、中性粒细胞升高,且显著高于对照组以及单纯 OVA 组,嗜酸性粒细胞数量低于 OVA 组,但高于对照组,此次本团队的研究结果与之趋势相符。

在探索 SA 动物模型同时引入 GEO 数据库中芯片集 GSE43696,旨在通过分析对比出正常人与 SA 患者气道上皮细胞差异基因,从而筛选出 10 个最显著的自由度基因 *Il-6*、*Bdnf*、*ErbB2*、*Gdnf*、*Ntrk2*、*Kcnc1*、*Syt4*、*Cck*、*Kcna4*、*Kcna1*。IL-6 是重要的 Th2 型炎症介质,基础研究发现使用 IL-6 单克隆抗体干预小鼠模型可以防止其产生严重的 Th2 型气道炎症^[27],并且临床研究也发现重症哮喘患者疾病严重程度与血清中 IL-6 水平相关^[28]。除此之外,U-BIOPRED 队列研究中患者的痰液转录组学分析显示,IL-6 同时驱动了非 T2 型哮喘患者的气道炎症和上皮功能障碍^[29]。BDNF 是一种重要的神经营养因子,主要参与神经系统发育和可塑性过程。有研究表明,BDNF 在气道神经调节中发挥着重要作用,其上调可导致气道高反应性和气道炎症的发生^[30]。ERBB2 是表皮生长因子受体家族一员,INOUE 等^[31]指出,ERBB2 通路中的原发性缺陷可能限制了哮喘患者的上皮修复过程,因此 ERBB2 的功能稳态可考虑作为哮喘治疗的新靶点。GDNF 可以调节神经元的存活以及功能状态。WANG 等在哮喘大鼠的肺和脑组织中检测出 GDNF 表达增多,他们向大鼠侧脑室注射 GDNF 显著加重了大鼠哮喘症^[32]。同时,DRAKE 等^[33]认为 GDNF 是一种促

进气管收缩和重塑的因子,其可以导致过敏原诱导的气道高反应性哮喘小鼠模型中的气道重塑,且通过阻断 GDNF 信号传导可减弱过敏原诱导的哮喘小鼠气道高反应性和气道重塑。NTRK2,涉及编码神经营养因子受体(tropomyosin receptor kinase B,TRKB),有研究者发现 NTRK2 是上皮间充质信号失调的重要标志物,且随着疾病严重程度的发展而发展^[34]。ZHENG 等^[35]分析铁死亡相关基因在哮喘患者气道上皮细胞中的作用文中提到 SYT4 可能与上皮细胞铁死亡机制有关,虽然 SYT4 在哮喘中的具体作用机制尚不清楚,但本研究的分析结果显示,在重症哮喘患者中,SYT4 基因表达下调。此外,钾电压门控通道家族中 KCNA 以及 KCNC 致病性突变可以引起癫痫以及共济失调^[36-37]。*Kcna1*、*Kcnc1*、*Kcna4*、*Cck* 等基因与哮喘的关系描述并不多,在本次研究中汇聚到 SA 患者 *Kcna1*、*Kcnc1*、*Kcna4*、*Cck* 基因下调,也为 SA 相关研究提供重要线索。为了验证在 SA 动物模型中这些基因的表达变化,本研究采用了 PCR 技术进行检测。这些结果为进一步理解重症哮喘的发病机制提供了重要的实验依据。

综上所述,研究通过使用 OVA、LPS 和 IL-33 单独或联合刺激,构建了小鼠 SA 模型,探究了不同造模方式对哮喘小鼠病理进程的影响。并通过 GEO 数据库芯片 GSE43696 进行了正常人和 SA 患者差异基因表达分析,小鼠 PCR 结果表明本研究的模型符合 SA 的相关基因的表达特点。此外,本研究对差异表达基因进行了通路富集分析,为 SA 的研究提供重要线索。

参 考 文 献(References)

- [1] HUANG K, YANG T, XU J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [2] LIN J T, WANG W Q, ZHOU X, et al. The level of asthma control in China from a national asthma control survey [J]. *CHIN J Tuberc Respir Dis*, 2017, 40(7): 494-498.
- [3] REDDEL H K, BACHARIER L B, BATEMAN E D, et al. Global initiative for asthma strategy 2021: executive summary and rationale for key changes [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(1): 17-35.
- [4] SETTIPANE R A, KREINDLER J L, CHUNG Y, et al. Evaluating direct costs and productivity losses of patients

- with asthma receiving GINA 4/5 therapy in the United States [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2019, 123(6): 564–572. e3.
- [5] CHEN Y J, CHEN C T, SHIMIZU BASSI G, et al. Asthma research in mice; an overview of current models and their methodological variability [J]. *Int Rev Immunol*, 2024, 44(18): 1–14.
- [6] LOURENÇO L O, RIBEIRO A M, LOPES F D T Q D S, et al. Different phenotypes in asthma: clinical findings and experimental animal models [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2022, 62(1): 240–263.
- [7] 敖小冬, 农光民, 刘静, 等. 中性粒细胞性支气管哮喘小鼠模型建立的探索 [J/OL]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2012, 6(2): 100–105.
- AO X D, NONG G M, LIU J, et al. Exploration of a mice model of neutrophilic asthma [J/OL]. *Chin J Asthma (Electron Ed)*, 2012, 6(2): 100–105.
- [8] 刘晓微, 蒋敏, 农光民, 等. 中性粒细胞性支气管哮喘小鼠模型的建立及其气道高反应规律的研究 [J/OL]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2013, 7(3): 1–5.
- LIU X W, JIANG M, NONG G M, et al. To establish a mice model of neutrophilic asthma and research the airway hyperreactivity [J/OL]. *Chin J Asthma (Electron Ed)*, 2013, 7(3): 1–5.
- [9] BOGAERT P, NAESSENS T, DE KOKER S, et al. Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300(5): L679–L690.
- [10] RAVANETTI L, DIJKHUIS A, SABOGAL PINEROS Y S, et al. An early innate response underlies severe influenza-induced exacerbations of asthma in a novel steroid-insensitive and anti-IL-5-responsive mouse model [J]. *Allergy*, 2017, 72(5): 737–753.
- [11] HONG J Y, CHUNG Y, STEENROD J, et al. Macrophage activation state determines the response to rhinovirus infection in a mouse model of allergic asthma [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 63.
- [12] SADATSAFAVI M, LYND L, MARRA C, et al. Direct health care costs associated with asthma in British Columbia [J]. *Can Respir J*, 2010, 17(2): 74–80.
- [13] CHUNG K F, DIXEY P, ABUBAKAR-WAZIRI H, et al. Characteristics, phenotypes, mechanisms and management of severe asthma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(10): 1141–1155.
- [14] WENZEL S E. Severe adult asthmas: integrating clinical features, biology, and therapeutics to improve outcomes [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(7): 809–821.
- [15] VAN DER PLOEG E K, KRABBENDAM L, VROMAN H, et al. Type-2 CD8⁺ T-cell formation relies on interleukin-33 and is linked to asthma exacerbations [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5137.
- [16] WECHSLER M E, RUDDY M K, PAVORD I D, et al. Efficacy and safety of itepekimab in patients with moderate-to-severe asthma [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(18): 1656–1668.
- [17] ZHOU Y, HUANG X, YU H, et al. TMT-based quantitative proteomics revealed protective efficacy of Icariside II against airway inflammation and remodeling via inhibiting LAMP2, CTSD and CTSS expression in OVA-induced chronic asthma mice [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154941.
- [18] ZUO X, GU Y, GUO X, et al. Preparation of budesonide-loaded liposomal nanoparticles for pulmonary delivery and their therapeutic effect in OVA-induced asthma in mice [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 673–688.
- [19] LI Y, CHEN S, CHI Y, et al. Kinetics of the accumulation of group 2 innate lymphoid cells in IL-33-induced and IL-25-induced murine models of asthma: a potential role for the chemokine CXCL16 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(1): 75–86.
- [20] 薛玲娜. 加味玉屏风散对 ILC2 介导过敏性哮喘气道炎症的免疫调控机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学; 2021.
- XUE L N. Study on the immune regulation mechanism of Jia-Wei-Yu-Ping-Feng-San on ILC2-mediate airway inflammation in allergic asthma [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 2021.
- [21] RICCIARDOLO F L M, GUIDA G, BERTOLINI F, et al. Phenotype overlap in the natural history of asthma [J]. *Eur Respir Rev*, 2023, 32(168): 220201.
- [22] MOORE W C, HASTIE A T, LI X, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(6): 1557–1563.
- [23] RAY A, KOLLS J K. Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(12): 942–954.
- [24] MICHEL O. Role of lipopolysaccharide (LPS) in asthma and other pulmonary conditions [J]. *J Endotoxin Res*, 2003, 9(5): 293–300.
- [25] THEOFANI E, SEMITEKOLOU M, SAMITAS K, et al. TFEB signaling attenuates NLRP3-driven inflammatory responses in severe asthma [J]. *Allergy*, 2022, 77(7): 2131–2146.
- [26] CAMARGO L D N, RICHETTI R F, ARISTÓTELES L R C R B, et al. Effects of anti-IL-17 on inflammation, remodeling, and oxidative stress in an experimental model of

- asthma exacerbated by LPS [J]. *Front Immunol*, 2018, 8: 1835.
- [27] CHU D K, AL-GARAWI A, LLOP-GUEVARA A, et al. Therapeutic potential of anti-IL-6 therapies for granulocytic airway inflammation in asthma [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2015, 11(1): 14.
- [28] LI X, HASTIE A T, PETERS M C, et al. Investigation of the relationship between IL-6 and type 2 biomarkers in patients with severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(1): 430–433.
- [29] JEVNIKAR Z, ÖSTLING J, AX E, et al. Epithelial IL-6 trans-signaling defines a new asthma phenotype with increased airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(2): 577–590.
- [30] WATANABE T, FAJT M L, TRUDEAU J B, et al. Brain-derived neurotrophic factor expression in asthma: association with severity and type 2 inflammatory processes [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(6): 844–852.
- [31] INOUE H, HATTORI T, ZHOU X, et al. Dysfunctional ErbB2, an EGF receptor family member, hinders repair of airway epithelial cells from asthmatic patients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(6): 2075–2085.
- [32] WANG X, WANG Y, CHEN X, et al. The central glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) regulates pulmonary function in asthmatic rats [J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11(2): 113.
- [33] DRAKE L Y, WICHER S A, ROOS B B, et al. Functional role of glial-derived neurotrophic factor in a mixed allergen murine model of asthma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2024, 326(1): L19–L28.
- [34] LOFFREDO L F, ABDALA-VALENCIA H, ANEKALLA K R, et al. Beyond epithelial-to-mesenchymal transition: common suppression of differentiation programs underlies epithelial barrier dysfunction in mild, moderate, and severe asthma [J]. *Allergy*, 2017, 72(12): 1988–2004.
- [35] ZHENG Y, FAN J, JIANG X. The role of ferroptosis-related genes in airway epithelial cells of asthmatic patients based on bioinformatics [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(9): e33119.
- [36] ALLEN N M, WECKHUYSEN S, GORMAN K, et al. Genetic potassium channel-associated epilepsies: clinical review of the Kv family [J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2020, 24: 105–116.
- [37] HURLOCK E C, BOSE M, PIERCE G, et al. Rescue of motor coordination by Purkinje cell-targeted restoration of Kv3.3 channels in *Kcnc3*-null mice requires *Kcnc1* [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(50): 15735–15744.

[收稿日期] 2024–10–15

赵志特,何兴林,师长宏,等. 基于双人源化小鼠模型探索靶向间质 MAOA 在前列腺癌免疫微环境中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 479-488.

ZHAO Z T, HE X L, SHI C H, et al. Targeting of stromal MAOA expression in the immune microenvironment of prostate cancer using a dual-humanized mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 479-488.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.002

基于双人源化小鼠模型探索靶向间质 MAOA 在前列腺癌免疫微环境中的作用

赵志特^{1,2}, 何兴林¹, 师长宏^{2*}, 杨力军^{1*}

(1. 空军军医大学西京医院泌尿外科, 西安 710032; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 通过构建免疫-肿瘤双人源化小鼠模型,探索靶向间质单胺氧化酶 A (monoamine oxidase A, MAOA) 在前列腺癌免疫微环境中的作用。**方法** 利用生物信息学分析 MAOA 高表达肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblasts, CAFs) 在前列腺癌中与 T 细胞的关系;利用多重免疫荧光技术分析间质 MAOA 与 CD8⁺ T 细胞的关系;构建免疫-肿瘤双人源化小鼠模型,体内验证靶向间质 MAOA 后 CD8⁺ T 细胞浸润情况。**结果** 间质中 MAOA 的表达与 CD8⁺ T 细胞浸润成反比;体内抑制间质中 MAOA 可以提高 CD8⁺ T 细胞浸润,这可能是通过抑制肿瘤微环境中胶原的累积所实现的。**结论** 间质中 MAOA 在前列腺癌免疫抑制微环境中发挥着重要作用,抑制间质中 MAOA 的表达可以促进免疫细胞的浸润,提示 MAOA 抑制剂可能作为前列腺癌患者免疫联合治疗的潜在治疗药物。

【关键词】 前列腺癌; MAOA; 肿瘤相关成纤维细胞; 肿瘤免疫微环境

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0479-10

Targeting of stromal MAOA expression in the immune microenvironment of prostate cancer using a dual-humanized mouse model

ZHAO Zhite^{1,2}, HE Xinglin¹, SHI Changhong^{2*}, YANG Lijun^{1*}

(1. Department of Urology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;

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

Corresponding author: YANG Lijun. E-mail: fmmuyanglijun@163.com;

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

【Abstract】 Objective Construction of an immune-tumor dual humanized mouse model to explore the role of targeting monoamine oxidase A (MAOA) in the immune microenvironment of prostate cancer. **Methods** Bioinformatics analysis was used to examine the relationship between MAOA^{high} cancer associated fibroblasts (CAFs)

【基金项目】 国家自然科学基金 (32270566), 空军军医大学第一附属医院航空临床医学专项研究项目 (HKLCZX03)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32270566), the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University Aviation Clinical Medicine Special Research Project (HKLCZX03).

【作者简介】 赵志特,男,在读硕士研究生,研究方向:泌尿系肿瘤诊疗。Email: zzt17694881960@163.com

【通信作者】 杨力军,男,博士,博士生导师,研究方向:泌尿系结石的诊断与治疗。Email: fmmuyanglijun@163.com;

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

* 共同通信作者

and T cells in prostate cancer. Multiplex immunofluorescence was employed to analyze the relationship between stromal MAOA expression and CD8⁺ T cells. An immune-tumor dual humanized mouse model was constructed for *in vivo* verification of the infiltration of CD8⁺ T cells in response to the targeting of stromal MAOA. **Results** MAOA expression in the stroma was inversely proportional to the infiltration of CD8⁺ T cells. Inhibiting MAOA expression in the stroma enhanced the infiltration of CD8⁺ T cells *in vivo*, which may reflect suppression of the accumulation of collagen in the tumor microenvironment. **Conclusions** Stromal MAOA plays an important role in the immunosuppressive microenvironment of prostate cancer, and its inhibition may promote the infiltration of immune cells. MAOA inhibitors have therapeutic potential in immune combination therapy for patients with prostate cancer.

[Keywords] prostate cancer; MAOA; cancer associated fibroblasts; tumor immune microenvironment

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

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是全球男性健康的主要威胁之一。根据最新的癌症统计数据,PCa已成为男性最常见的癌症之一,并且是男性癌症死亡的第二大原因^[1]。尽管早期PCa可以通过手术或放疗有效控制,但晚期,特别是转移性去势抵抗性前列腺癌(metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC)的治疗选择有限,预后较差^[2]。免疫疗法,特别是免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)和嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)疗法,在治疗某些恶性肿瘤方面显示出显著潜力^[3-4]。然而,其在PCa中的应用面临肿瘤的免疫逃逸策略和缺乏有效的预测性生物标志物等障碍^[5-6],这可能与PCa抑制性的免疫微环境密切相关。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)在PCa的发展中扮演着至关重要的角色。基质的不适当激活会增强肿瘤细胞的生长和转化^[7-8]。最近对TME的研究揭示了肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)等间质细胞在调节免疫反应和促进肿瘤生长中的作用^[9-10]。CAFs可以通过分泌一系列蛋白质、细胞因子和趋化因子来促进肿瘤免疫逃逸,这些主要与ICIs疗法耐药性相关^[11]。因此,CAFs是免疫学上“冷”肿瘤(抑制性)微环境的关键组成部分,被认为是增强免疫疗法反应的有希望的靶点。

单胺氧化酶A(monoamine oxidase A, MAOA)是一种线粒体酶,它在大脑中降解神经递质并影响情绪和行为。MAOA在肿瘤中的作用正在受到关注,因为它可以促进PCa的生长、转移、干性和治疗抵抗等^[12-13]。此外,MAOA在PCa的肿瘤微环境中也扮演了重要角色,其在间质中的表达

上调,也有助于推动PCa的发展^[14]。相关实验还表明,肿瘤浸润性T细胞的活性与细胞中MAOA的表达有关。MAOA抑制剂可以通过上调这些细胞的血清素5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)自分泌途径激活CD8⁺T细胞,显著抑制肿瘤生长^[15]。这表明抑制MAOA在PCa治疗中具有治疗前景。然而,间质中MAOA与PCa免疫微环境之间的相互作用不明确,需要进一步阐明。因此,本研究拟通过构建免疫-肿瘤双入源化小鼠模型探索靶向间质中MAOA在PCa免疫微环境中的作用,旨在为PCa寻找更有效的免疫治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30只SPF级,体质量为(22±2)g,雌性,5周龄的重度免疫缺陷(NOD/ShiLtJGpt-Prkdc^{em26Cd52}Il2rg^{em26Cd22}/Gpt, NCG)小鼠,购自集萃药康生物科技有限公司(中国成都)【SCXK(川)2020-034】。小鼠饲养于空军军医大学实验动物中心SPF级环境中【SYXK(陕)2024-003】,温度23~25℃,湿度40%~60%,12h昼夜交替,动物所需饲料、饮用水经灭菌处理。实验方案经空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准(20231465)。

1.1.2 实验细胞

从美国典型培养物保藏中心购入人PCa细胞系22RV1(CRL-2505)和人前列腺基质细胞WPMY-1(CRL-2854)。

1.1.3 主要试剂与仪器

新鲜外周血样本来源于本校第一附属医院

的健康献血者,已获得医学伦理委员会的批准(KY20193035)。RPMI-1640 细胞培养基(货号:PMI50110,购自 Pricella 公司);DMEM 细胞培养基(货号:6124515,购自 Gibco 公司);0.05%的胰蛋白酶(批号:25300-054,购自 Gibco 公司);胎牛血清(货号:A5669701,购自 Gibco 公司);青霉素-链霉素(货号:15140122,购自 Gibco 公司);人外周血淋巴细胞分离液(货号:LTS10771,购自灏洋生物科技有限公司);FITC 标记的 CD45 抗体(货号:11-0459-42,购自 Invitrogen 公司);人的 CD8 抗体(货号:GB114123,购自 Servicebio 公司); α -SAM 抗体(货号:ab7817,购自 Abcam 公司);KI-67 抗体(货号:GB121141,购自 Servicebio 公司);MAOA 抗体(货号:ab126751,购自 Abcam 公司);COL1A1 抗体(货号:ab138492,购自 Abcam 公司)。荧光显微镜(货号:BZ-X810,购自 Keyence 公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据集中获取了 PCa 的 RNA 测序数据,并根据 MAOA 和 COL1A1 基因的中位数表达水平将患者分为高表达组和低表达组,比较了两组之间不同免疫细胞的相对比例。进一步使用 CIBERSORT 算法计算每个样本中免疫细胞浸润的相对比例,并进行皮尔顿检验以检查 MAOA 与多种免疫细胞相对比例之间的相关性及 COL1A1 与 T 细胞的相关性。

1.2.2 单细胞测序分析

本研究选取了公共数据库 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 中的 GSE141445 数据集作为研究对象,采用了 R 语言软件(版本 4.4.0)中的 Seurat 软件包来处理单细胞数据。首先,排除了基因表达量超过 4000 或低于 200 的细胞。随后,使用 Seurat 软件包中的 FindVariableFeatures 函数选取了前 2000 个可变基因进行数据归一化处理。对归一化数据使用 ScaleData 和 RunPCA 函数进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。进一步使用 t 分布随机邻域嵌入(t-SNE)方法实现了数据的降维和可视化。根据不同细胞类型的特定标记基因的表达情况,对主要细胞类型或亚型进行

了细胞注释和可视化。本文参照网站(<http://xteam.xbio.top/CellMarker/index.jsp>)的注释信息对该单细胞文件的不同细胞群进行详细注释,本实验中使用成纤维细胞的标记基因“COL1A1”,“DCN”,“ACTA2”和“MYL9”进行细胞亚群注释。本研究于上述单细胞文件中提取出表达矩阵及细胞注释信息,使用 R 语言软件(版本 4.4.0)中的“CellChat”软件包推断和分析了细胞间通讯。

1.2.3 细胞培养与分组

WPMY-1 NC 细胞为通过慢病毒构建的稳定细胞系,WPMY-shMAOA 细胞为通过慢病毒感染敲低 MAOA 表达的稳定细胞系。所有细胞均在含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 及 DMEM 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 培养条件下培养。使用 0.05%胰酶传代培养密度达到 80% ~ 90% 的细胞。

1.2.4 免疫荧光

临床 PCa 患者组织标本经脱蜡、抗原修复后直接用 4% 的通用型中性固定液处理 30 min。然后用 1% 的牛血清白蛋白封闭,随后使用 MAOA、CD8、 α -SAM、KI-67 抗体进行染色。通过荧光显微镜观察荧光强度。

1.2.5 Western Blot 分析

用 RIPA 裂解液从细胞中提取蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。通过 10% SDS-PAGE 凝胶,进行凝胶电泳,并用相应抗体 MAOA 和 COL1A1 进行 Western Blot。

1.2.6 免疫-肿瘤双人源化小鼠模型的构建

将 1×10^7 个的新鲜外周血中提取的单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)通过尾静脉注射的方式注入小鼠体内。2 周后,将处于对数生长期的 WPMY-1 NC 及 WPMY-shMAOA 细胞分别与 22RV1 按照 $6 \times 10^6 : 2 \times 10^6$ (3 : 1) 的比例混合皮下注射接种至小鼠。3 周后,采集小鼠静脉血并分离 PBMCs。用抗人 CD45 抗体标记免疫细胞。通过流式细胞仪检测小鼠外周血免疫细胞阳性比例并用 FlowJo 10 软件分析以评价小鼠免疫重建水平。选择重建成功的 NCG 小鼠(CD45⁺ T > 25%)进一步监测肿瘤体积。计算公式为 $ab^2/2$ (a 为长径, b 为短径),本实验分为两个主要组别:(1)对照组($n = 5$):22RV1 肿瘤细胞与 WPMY-NC 细胞的共移

植;(2) 实验组 ($n = 5$): 22RV1 肿瘤细胞与 WPMY-shMAOA 细胞的共移植。

1.2.7 Masson 染色

组织切片在脱蜡和水化处理后,用 Weigert 氏铁苏木素染液进行染色,用 1% 的盐酸酒精进行分化,自来水冲洗返蓝,然后用丽春红酸性复红液染色,以标记胶原蛋白和肌纤维。使用磷钨酸或磷钨酸溶液对切片进行分化,用苯胺蓝或光绿液对切片进行复染。染色完成后,切片需逐级脱水,并通过二甲苯透明化。最后用中性树胶封片,在显微镜下观察。

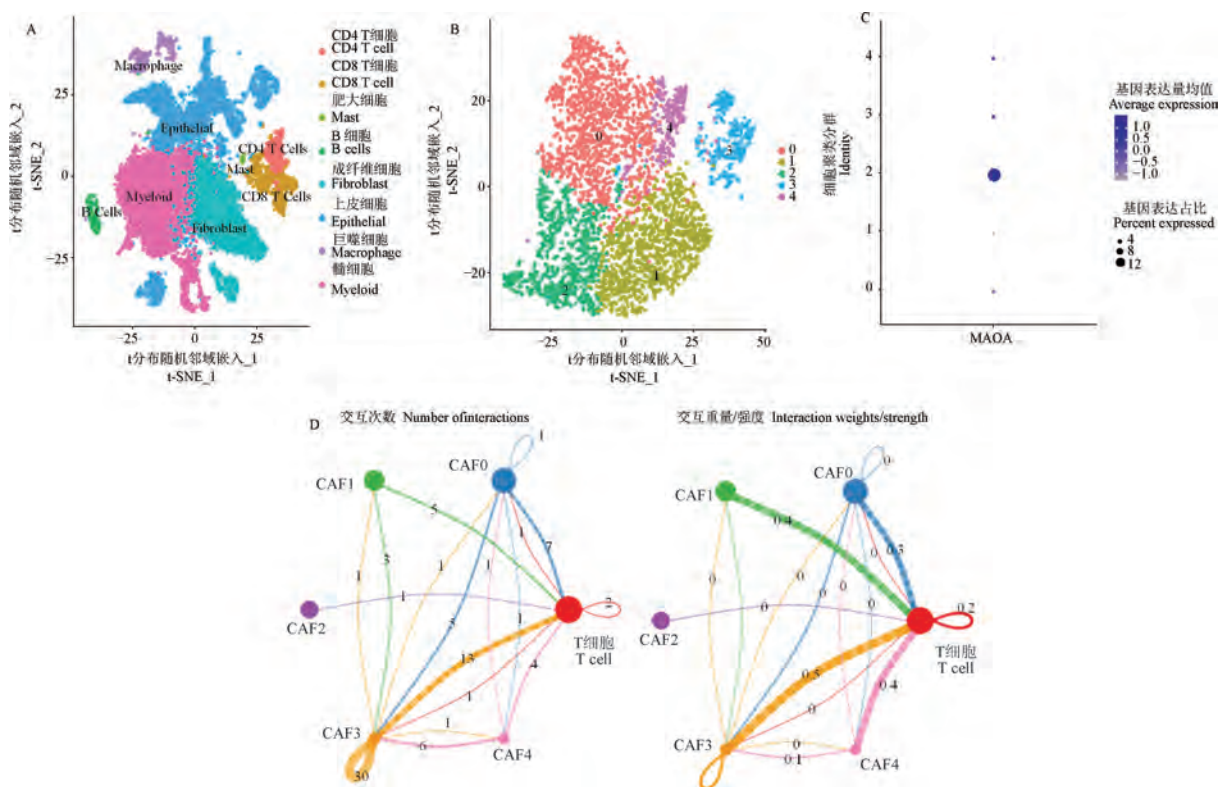
1.3 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,并使用 GraphPad Prism 进行分析。各组间差异采用 t 检验和方差分析 (ANOVA) 进行检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 单细胞测序揭示间质 MAOA 与 T 细胞的关联

为了更加深入探究间质中 MAOA 的功能,本研究重新分析了已公开的 PCa 单细胞数据集 (GSE141445)。针对细胞群的特异性基因表达^[16],识别出 8 个不同的细胞群 (图 1A)。进一步将 8 个细胞群中的间质细胞 (fibroblast) 细分为 5 个亚群 (图 1B),并对其 MAOA 表达水平进行了分析。分析结果表明,亚群 2 的 MAOA 表达水平显著高于其他亚群 (图 1C, $P < 0.05$),且通过细胞间通讯技术分析发现,亚群 2 与 T 细胞的相互作用较其他亚群显著减弱 (图 1D, $P < 0.05$),即间质的 MAOA 的表达与 T 细胞的相互作用可能存在负相关性。



注:A:使用 t-SNE 进行细胞类型注释;B:CAFs 亚群的 t-SNE 图,亚群用不同的颜色编码;C:MAOA 在成纤维细胞 0、1、2、3 和 4 中的表达水平;D:不同亚群的 CAFs 与 T 细胞的细胞通讯。

图 1 单细胞测序揭示间质 MAOA 与 T 细胞的关联

Note. A. Annotate cell types using t-SNE. B. t-SNE plot of subclusters of CAFs, subclusters are coded with different colours. C. Expression levels of MAOA in fibroblast 0, 1, 2, 3, and 4. D. Cell communication between different subpopulations of CAFs and T cell.

Figure 1 Single-cell sequencing reveals the association between stromal MAOA and T cell

2.2 临床患者间质 MAOA 的表达与 CD8⁺ T 细胞的关系

为验证单细胞测序的结果,进一步通过临床患者的组织切片进行多重免疫荧光分析(图 2),筛选 α -SMA 阳性区域(间质标志物),并根据 MAOA 表达将间质细胞分为高表达组和低表达组。结果显示,高表达 MAOA 的间质细胞中 CD8⁺ T 细胞表达降低,而低表达 MAOA 的间质细胞中 CD8⁺ T 细胞表达较高。这些发现进一步证实了肿瘤中的间质 MAOA 的表达与 CD8⁺ T 细胞浸润之间的负相关性,提示 MAOA 可能作为免疫抑制基因发挥作用。

2.3 免疫人源化小鼠模型的构建

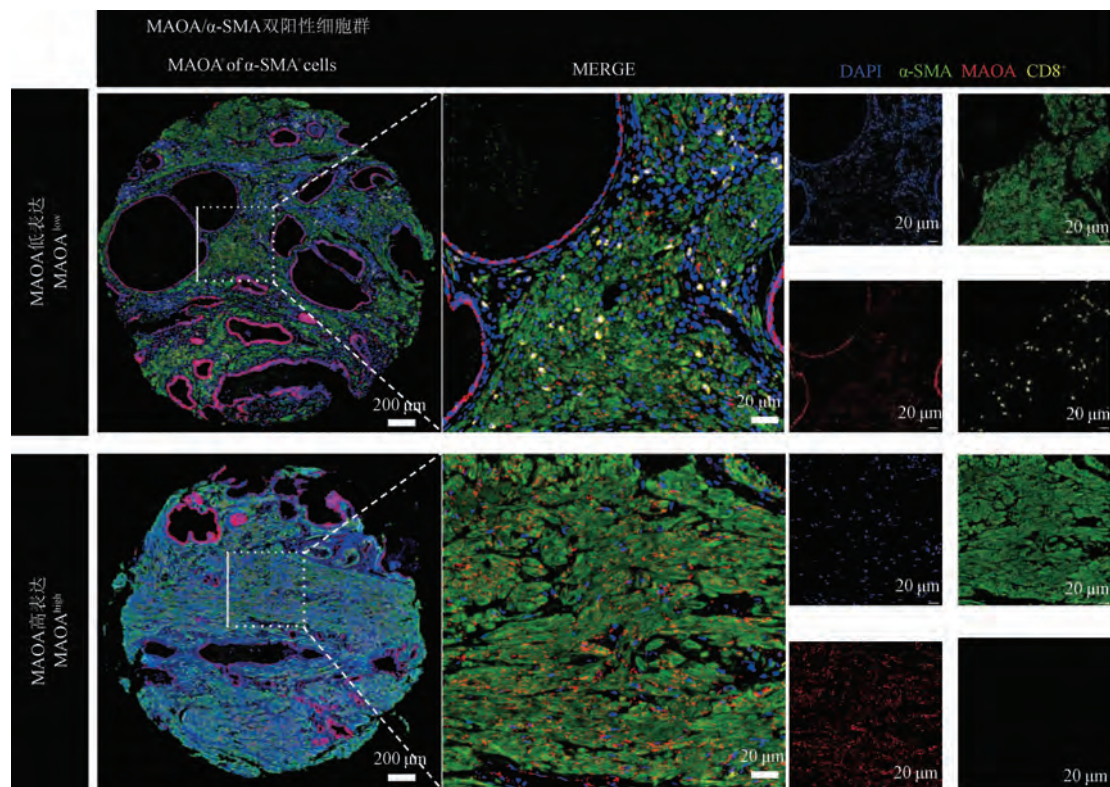
如图 3 所示,为了模拟人类免疫系统,将健康献血者的新鲜血液中的 PBMCs 通过尾静脉植入重度免疫缺陷的小鼠体内。3 周后,通过流式细胞术检测小鼠外周血中人的 CD45⁺ T 细胞含量。当 CD45⁺ T 细胞的比例超过 25% 时,表明成功构建了人源化免疫系统的小鼠模型^[17]。

2.4 体内抑制间质中 MAOA 的表达促进 CD8⁺ T 细胞的浸润

为验证靶向间质 MAOA 对 PCa 免疫浸润的影响,本研究在免疫人源化小鼠模型的基础上进一步将人前列腺基质细胞 WPMY-1-NC 和 WPMY-shMAOA 与 PCa 细胞系 22RV1 按 3:1 的比例植入小鼠腹部皮下,构建了免疫-肿瘤双人源化小鼠模型(图 4A,图 4B)。实验结果显示,与对照组相比,实验组的肿瘤生长速度显著减缓(图 4C,图 4D, $P < 0.001$)。此外,免疫荧光分析表明,在对照组的肿瘤中, KI-67 的表达降低,同时 CD8⁺ T 细胞的浸润有所增加(图 5)。这些发现表明,靶向间质中 MAOA 可能通过改变肿瘤微环境中的免疫细胞浸润特性,对 PCa 的免疫反应产生影响。

2.5 间质中 MAOA 通过促进胶原的累积抑制 CD8⁺ T 细胞的浸润

胶原基质,作为肿瘤间质中的关键非细胞成分,主要是由肿瘤相关的成纤维细胞所分泌,先

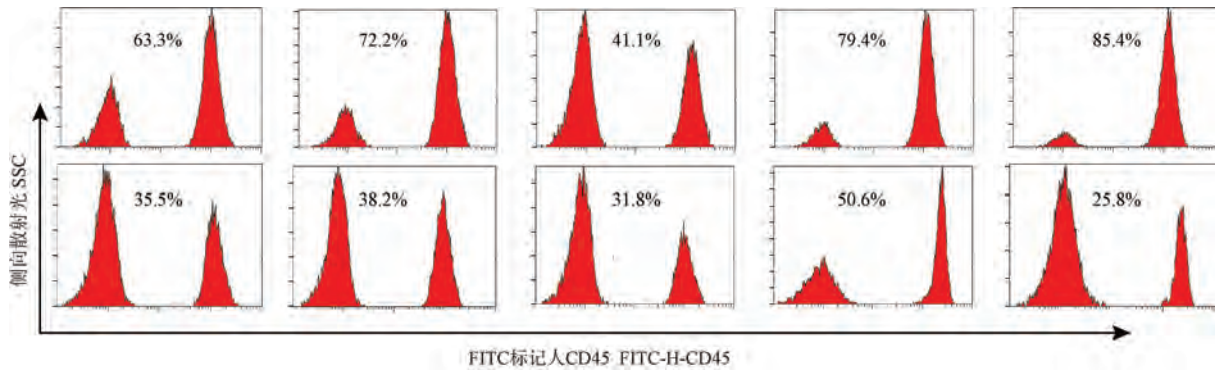


注:PCa 样本中 α -SMA 阳性 CAFs 中 MAOA、CD8 表达的代表性图像。

图 2 临床患者中间质 MAOA 与 CD8⁺ T 的表达情况

Note. Representative images of MAOA and CD8 expression in α -SMA-positive CAFs in prostate cancer samples.

Figure 2 Expression of MAOA and CD8⁺ T cells in the tumor interstitial tissue of clinical patients

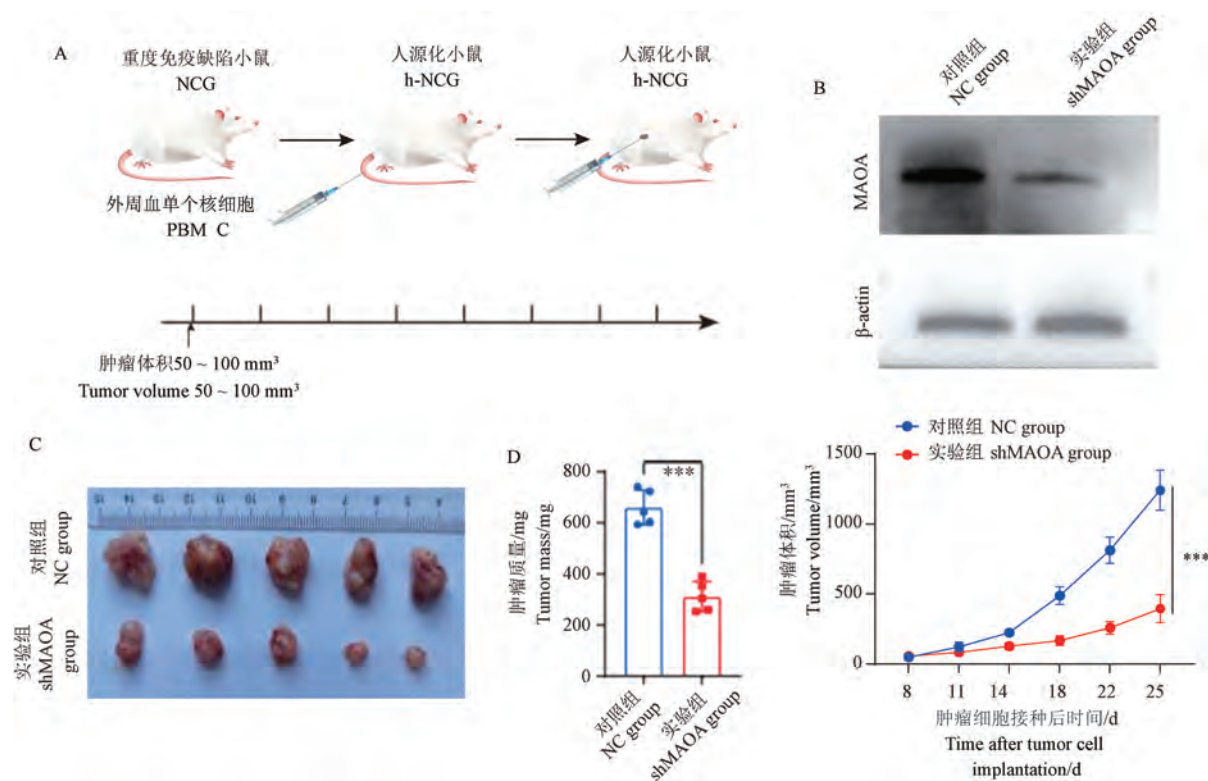


注:流式细胞术检测不同小鼠外周血中 $CD45^+$ T 细胞重建水平。

图 3 免疫人源化小鼠模型重建水平的评估

Note. Flow cytometry is used to detect the reconstitution level of $CD45^+$ T cells in the peripheral blood of different mice.

Figure 3 Assessment of immune system reconstitution in humanized mice



注:A:双人源化小鼠模型构建示意图;B:Western Blot 分析 MAOA 的表达情况;C:不同处理组肿瘤大小实拍图;D:不同处理组肿瘤质量和肿瘤体积量化结果;与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

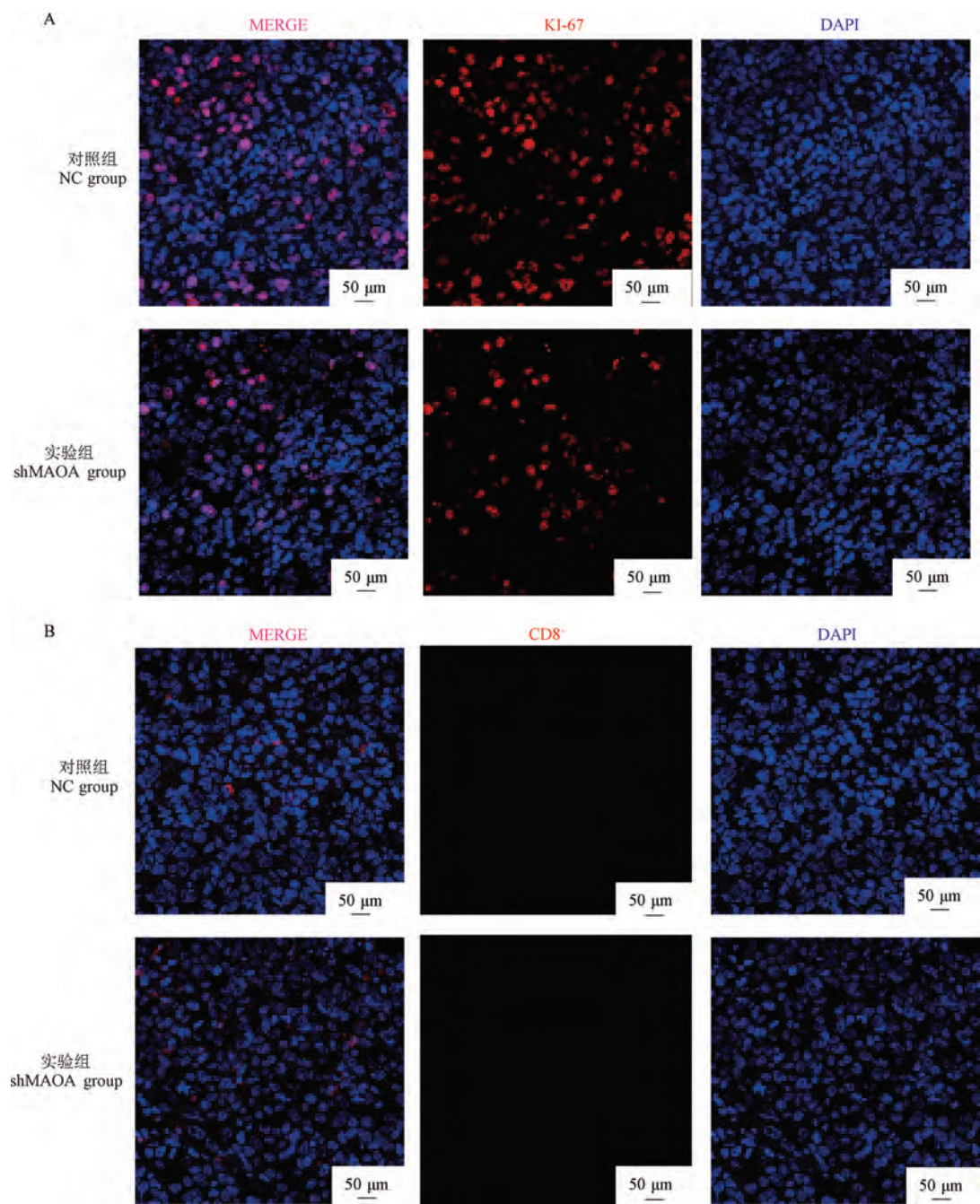
图 4 间质 MAOA 的表达调控 $CD8^+$ T 细胞浸润的体内研究

Note. A. Schematic diagram of the construction of a double humanized mouse model. B. Western Blot analysis of MAOA expression. C. Actual photos of tumor size in different treatment groups. D. Tumor mass and quantified results of tumor volume in different treatment groups. Compared with NC group, *** $P < 0.001$.

Figure 4 *In vivo* study on the regulation of $CD8^+$ T cell infiltration by interstitial MAOA expression

前有研究报道 COL1A1 的沉积和交联可阻碍肿瘤浸润性淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) 的移动,高密度的胶原蛋白能抑制 TILs 的

增殖、调节其细胞毒性并促进癌细胞的免疫逃逸^[18]。如图 6A 所示,生物信息学分析显示在 PCa 中 COL1A1 与 $CD8^+$ T 细胞成反比,Western



注:A:不同处理组 KI-67 免疫荧光代表性图片;B:不同处理组 CD8⁺ T 细胞免疫荧光的代表性图片。

图 5 免疫荧光结果

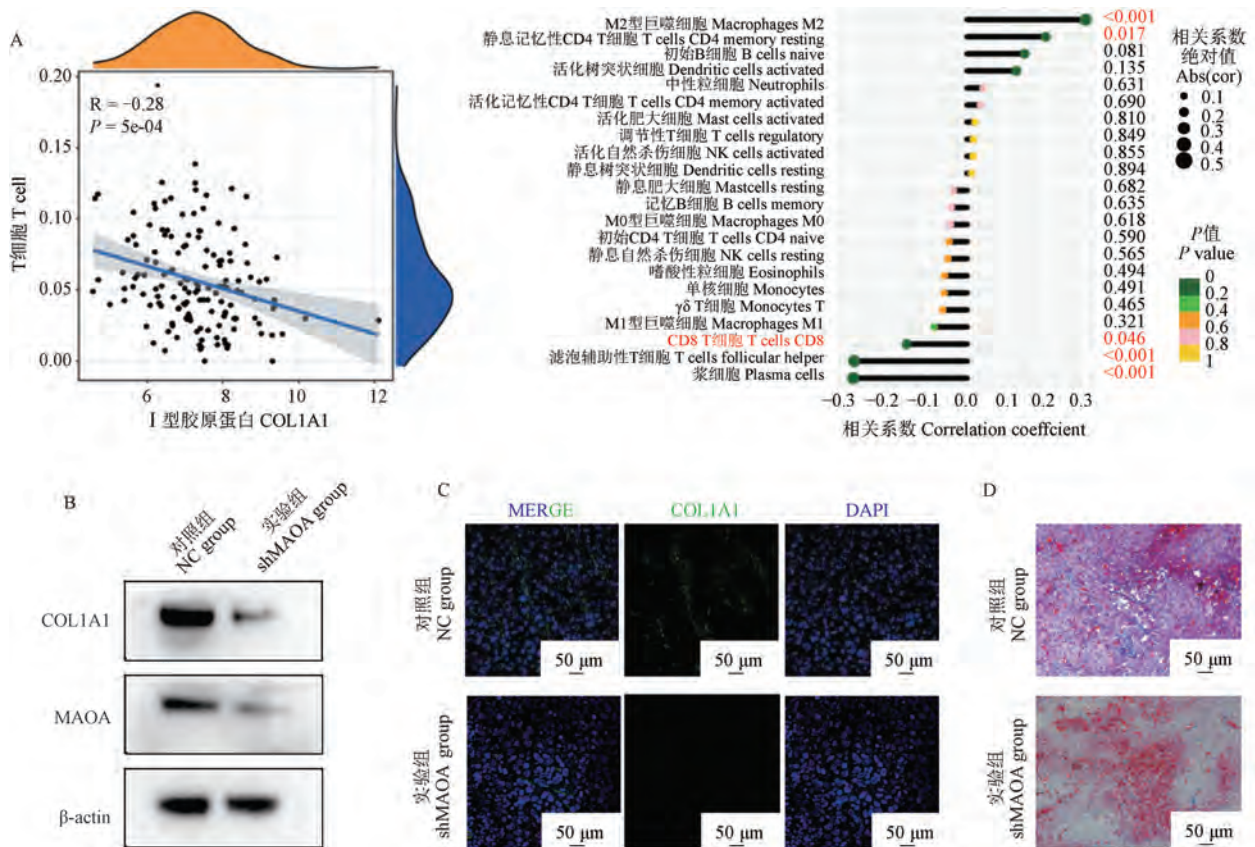
Note. A. Representative immunofluorescence images of KI-67 in different treatment groups. B. Representative immunofluorescence images of CD8⁺ T cell in different treatment groups.

Figure 5 Immunofluorescence result

Blot 检测发现,与对照组相比,实验组细胞中 COL1A1 蛋白表达显著降低(图 6B),进一步通过免疫组化和 Masson 染色也证实了实验组组中胶原含量降低(图 6C,图 6D)。以上结果提示,间质中 MAOA 可以通过影响肿瘤中的胶原沉积进一步阻碍 CD8⁺ T 细胞的浸润。

3 讨论

近期的研究,包括本课题组的实验,均已证实肿瘤中的 MAOA 在调节 PCa 发展和转移中发挥重要作用^[19]。单胺氧化酶抑制剂(monoamine oxidase inhibitors, MAOIs)在治疗复发性 PCa 的 II



注: A: COL1A1 的表达与 T 细胞的相关性分析 (左), COL1A1 与不同类型的免疫细胞的相关性分析 (右); B: Western Blot 分析 MAOA 敲低后 COL1A1 的表达情况; C: COL1A1 代表性免疫荧光图; D: 代表性 Masson 染色图。

图 6 间质中 MAOA 通过促进胶原的累积抑制 CD8⁺ T 细胞的浸润

Note. A. Correlation analysis of COL1A1 expression with T cells (left), correlation analysis of COL1A1 with different types of immune cells (right). B. Western Blot analysis of COL1A1 expression following MAOA knockdown. C. Representative immunofluorescence images of COL1A1. D. Representative images of Masson staining.

Figure 6 Stromal MAOA inhibits the infiltration of CD8⁺ T cell by promoting collagen accumulation

期临床试验中显示出积极结果,显著降低了前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 水平^[20],为使用 MAOIs 治疗 PCa 的潜在策略提供了有力证据。最重要的是,MAOA 介导的肿瘤成纤维细胞重编程促进了前列腺肿瘤的发生和癌症干细胞特性,为靶向间质 MAOA 治疗 PCa 提供了理论依据^[14]。然而,MAOA 在 PCa 间质细胞中的作用并不是十分清楚。

在肿瘤免疫微环境中,CAFs 扮演着关键角色,它们是增强免疫治疗反应的潜在靶点^[21-22]。尽管如此,当前针对 CAFs 的治疗策略尚未展现出足够的效力^[23]。越来越多的研究证据揭示了 CAFs 与免疫细胞之间的相互作用在 PCa 的发展中发挥着至关重要的作用。特定的 CAF 亚型能够促进 PCa 的免疫抑制环境,这表明通过调节

CAFs 的表型和功能,靶向 CAFs 可能增强肿瘤对免疫治疗的敏感性。本研究通过构建免疫-肿瘤双入源化小鼠模型,模拟人 PCa 免疫微环境,特别是通过混合瘤接种,观察间质中 MAOA 的表达对 CD8⁺ T 细胞浸润的影响。结果显示间质中 MAOA 的高表达与 CD8⁺ T 细胞浸润的减少呈正相关,暗示间质中 MAOA 的表达可能对 CD8⁺ T 细胞的肿瘤浸润具有负向调控作用。

肿瘤间质中的胶原基质是肿瘤发生、发展、转移和耐药性的主要活性成分,影响 TILs 的增殖、浸润和生物活性,从而在癌细胞的恶性行为中扮演直接或间接的角色^[18]。本研究在混合瘤模型中观察到间质 MAOA 通过促进胶原的积累,抑制 CD8⁺ T 细胞的浸润,进而促进 PCa 的免疫抑制微环境。已知活性氧是 MAOA 的下游靶

点^[24]。有研究表明,活性氧的增加可能会激活 JAK-STAT6 信号通路,影响胶原的交联和稳定性^[25]。因此,MAOA 同样可能通过活性氧调控胶原的累积影响 CD8⁺ T 细胞的浸润。

MAOA 不仅在调节 CD8⁺ T 细胞方面发挥作用,还能重编程肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs)。研究表明,MAOA 通过增强氧化应激反应,促进了小鼠 TAMs 向免疫抑制状态的极化,并削弱了它们的抗肿瘤能力^[26]。苯乙肼等药物能够诱导 TAMs 的重编程,进而抑制肿瘤的生长^[26]。此外,MAOA 的表达也被发现于巨噬细胞、树突状细胞和调节性 T 细胞等多种免疫细胞类型中^[27]。有证据显示,氯吉林 (clorgyline) 通过增加巨噬细胞在肿瘤中的浸润来延缓胶质瘤的进展^[28]。在 clorgyline 处理的动物模型中,与未处理的对照组相比,肿瘤内巨噬细胞和 TNF- α 阳性细胞的数量显著增加,这表明 clorgyline 能够增强促炎反应并减缓肿瘤的进展^[28]。树突状细胞作为高效的抗原呈递细胞,其特征在于能够激活并促进初始 T 细胞的增殖^[29-30]。在树突状细胞中也观察到了 MAOA 的表达^[27],这提示了在这些细胞中靶向 MAOA 进行免疫或代谢调节可能为肿瘤免疫治疗开辟新的方向。在实体瘤中,除了 TAMs 外,调节性 T 细胞 (Treg) 也在免疫抑制的肿瘤微环境中被检测到^[27],MAOA 可能成为一个潜在的新靶点,有助于改善 Treg 的免疫抑制特性和功能不全。

综上所述,本研究构建了免疫-肿瘤双人源化小鼠模型,这一模型具备人免疫系统的特征,不仅能模拟肿瘤微环境,还能够评估人类特异性免疫疗法的效果。本实验在 PCa 研究领域,证实了间质 MAOA 在 PCa 的进展中发挥着重要作用,并且通过靶向间质 MAOA 抑制肿瘤间质中胶原的累积,可以促进免疫细胞的浸润。将靶向间质 MAOA 的治疗与免疫治疗相结合,可能为 PCa 患者提供一种新的治疗策略。

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] REBELLO R J, OING C, KNUDSEN K E, et al. Prostate cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 9.
- [3] MORGAN R A, DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. Science, 2006, 314(5796): 126-129.
- [4] STEPHEN HODI F, O' DAY S J, MCDERMOTT D F, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma [J]. N Engl J Med, 2010, 363(8): 711-723.
- [5] BEER T M, KWON E D, DRAKE C G, et al. Randomized, double-blind, phase III trial of ipilimumab versus placebo in asymptomatic or minimally symptomatic patients with metastatic chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(1): 40-47.
- [6] TOPALIAN S L, STEPHEN HODI F, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2443-2454.
- [7] FIORI M E, DI FRANCO S, VILLANOVA L, et al. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 70.
- [8] JOSHI R S, KANUGULA S S, SUDHIR S, et al. The role of cancer-associated fibroblasts in tumor progression [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(6): 1399.
- [9] KOBAYASHI H, ENOMOTO A, WOODS S L, et al. Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(5): 282-295.
- [10] FARHOOD B, NAJAFI M, MORTEZAEE K. Cancer-associated fibroblasts: secretions, interactions, and therapy [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 2791-2800.
- [11] MAO X, XU J, WANG W, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives [J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 131.
- [12] WEI J, YIN L, LI J, et al. Bidirectional cross-talk between MAOA and AR promotes hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer [J]. Cancer Res, 2021, 81(16): 4275-4289.
- [13] WU J B, YIN L, SHI C, et al. MAOA-dependent activation of shh-IL6-RANKL signaling network promotes prostate cancer metastasis by engaging tumor-stromal cell interactions [J]. Cancer Cell, 2017, 31(3): 368-382.
- [14] LI J, PU T, YIN L, et al. MAOA-mediated reprogramming of stromal fibroblasts promotes prostate tumorigenesis and cancer stemness [J]. Oncogene, 2020, 39(16): 3305-3321.

- [15] WANG X, LI B, KIM Y J, et al. Targeting monoamine oxidase A for T cell-based cancer immunotherapy [J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(59): eabh2383.
- [16] ZHANG Y, FAN A, LI Y, et al. Single-cell RNA sequencing reveals that HSD17B2 in cancer-associated fibroblasts promotes the development and progression of castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Lett*, 2023, 566: 216244.
- [17] GUO W, QIAO T, LI H, et al. Peripheral CD8⁺ PD-1⁺ T cells as novel biomarker for neoadjuvant chemoimmunotherapy in humanized mice of non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2024, 597: 217073.
- [18] NIA H T, MUNN L L, JAIN R K. Physical traits of cancer [J]. *Science*, 2020, 370(6516): eaaz0868.
- [19] SHUI X, REN X, XU R, et al. Monoamine oxidase A drives neuroendocrine differentiation in prostate cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 606: 135–141.
- [20] GROSS M E, AGUS D B, DORFF T B, et al. Phase 2 trial of monoamine oxidase inhibitor phenelzine in biochemical recurrent prostate cancer [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2021, 24(1): 61–68.
- [21] HARPER J, SAINSON R C A. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 25: 69–77.
- [22] ZIANI L, CHOUAIB S, THIERY J. Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 414.
- [23] CHEN Y, MCANDREWS K M, KALLURI R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(12): 792–804.
- [24] HAN H, LI H, MA Y, et al. Monoamine oxidase A (MAOA): a promising target for prostate cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2023, 563: 216188.
- [25] SEIF F, KHOSHMIRSAFA M, AAZAMI H, et al. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2017, 15(1): 23.
- [26] WANG Y C, WANG X, YU J, et al. Targeting monoamine oxidase A-regulated tumor-associated macrophage polarization for cancer immunotherapy [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3530.
- [27] WANG X, LI B, KIM Y J, et al. Targeting monoamine oxidase A for T cell-based cancer immunotherapy [J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(59): eabh2383.
- [28] KUSHAL S, WANG W, VAIKARI V P, et al. Monoamine oxidase A (MAO A) inhibitors decrease glioma progression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 13842–13853.
- [29] WAISMAN A, LUKAS D, CLAUSEN B E, et al. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(2): 153–163.
- [30] MEENU M, VERMA V K, SETH A, et al. Association of monoamine oxidase A with tumor burden and castration resistance in prostate cancer [J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2020, 93: 100610.

[收稿日期] 2024-10-09

柳慧敏,何茜,贾瑞莲,等. 干扰素- γ 基因敲除小鼠饲养繁殖方法的优化 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 489-500.

LIU H M, HE X, JIA R L, et al. Optimization of feeding and breeding methods for interferon- γ knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 489-500.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.003

干扰素- γ 基因敲除小鼠饲养繁殖方法的优化

柳慧敏,何茜,贾瑞莲,李娜,许瑞,冯耀宇,肖立华,郭亚琼*

(华南农业大学,动物疫病防控全国重点实验室,广州 510642)

【摘要】 目的 繁育获得干扰素- γ 基因敲除纯合子 (IFN- $\gamma^{-/-}$) 小鼠,并改善繁育策略,建立稳定的干扰素- γ 基因敲除纯合子 (IFN- $\gamma^{-/-}$) 小鼠繁育体系,为相关研究提供理想的动物模型。**方法** 首先以 C57BL/6J 为背景的 IFN- γ 基因敲除杂合子 (IFN- $\gamma^{+/-}$) 小鼠作为亲本进行繁育。之后,基于获得的子代小鼠,采用 3 种配种方式进行繁育:(1) 雌性杂合子与雄性杂合子;(2) 雄性纯合子与雌性杂合子;(3) 雌性纯合子与雄性纯合子。并比较子代中 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的数量和存活情况,筛选最优繁育策略。在最优繁育策略下,评估雌鼠配种周龄和饲料种类对 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠繁殖性能的影响,共统计 60 只 IFN- $\gamma^{-/-}$ 雌鼠的前 3 胎窝产仔数、离乳存活数和离乳存活率,同时记录和分析了孕鼠营养补充、放置遮蔽物等环境优化措施对繁育效果的影响。**结果** 在通过添加蛋黄以及瓜子充分保障孕鼠营养的条件下,雌性和雄性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠配种,单胎新生 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠存活数为 5 ~ 8 只,繁育获得的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的效率优于其他配种模式。此外,饲料种类和配种周龄对雌鼠繁殖性能影响显著,7 ~ 9 周龄的雌性与雄性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠合笼配种并且饲喂繁殖饲料时,雌鼠的窝产仔数 (6.9 ± 1.7)、离乳存活数 ($6.5\% \pm 2.0\%$) 和离乳存活率 ($93.2\% \pm 17.8\%$) 均高于其他繁育条件。另外,通过放置遮蔽物预防种鼠打架有助于提高繁殖效果。**结论** 采用优化的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠配种策略,结合高蛋白饲料饲喂、营养补充及规范化配种周龄管理,可显著提高 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的繁育效率和稳定性,为相关研究提供可靠的动物模型支持。

【关键词】 干扰素- γ ; 基因敲除小鼠; 饲养; 繁殖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0489-12

Optimization of feeding and breeding methods for interferon- γ knockout mice

LIU Huimin, HE Xi, JIA Ruilian, LI Na, XU Rui, FENG Yaoyu, XIAO Lihua, GUO Yaqiong*

(State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Corresponding author: GUO Yaqiong. E-mail: guoyq@scau.edu.cn

【Abstract】 Objective The purpose of the study is to breed homozygous interferon- γ knockout (IFN- $\gamma^{-/-}$) mice and optimize the breeding strategies to achieve continuous and stable reproduction of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice, which could be used as an ideal animal model for fundamental research. **Methods** Initially, heterozygous IFN- γ knockout (IFN- $\gamma^{+/-}$) C57BL/6J mice were used as the parental generation for breeding. Subsequently, 3 breeding strategies were

【基金项目】 国家自然科学基金 (32273032), 广东省基础与应用基础研究基金 (2024B1515020116)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32273032), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2024B1515020116).

【作者简介】 柳慧敏,女,在读硕士研究生,研究方向:兽医寄生虫学。Email:huiminliu4512@126.com

【通信作者】 郭亚琼,女,博士,副教授,研究方向:兽医寄生虫学。Email:guoyq@scau.edu.cn

employed using the offspring: (1) female heterozygotes mated with male heterozygotes; (2) male homozygotes mated with female heterozygotes; (3) female homozygotes mated with male homozygotes. The number and survival rate of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice were compared across the three breeding strategies to determine the optimal breeding strategy. Under the optimal strategy, the effects of female mating age and diet type on the reproductive performance of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice were further evaluated. Data from the first three litters of 60 IFN- $\gamma^{-/-}$ female mice, including litter size, number of weaning survivors, and weaning survival rate, were recorded and analyzed. In addition, the effects of dietary supplementation of pregnant mice and environmental optimization measures, such as the provision of shelters, were evaluated. **Results** Under conditions where the nutritional needs of pregnant mice were adequately met by supplementation with egg yolk and sunflower seeds, mating of female and male IFN- $\gamma^{-/-}$ mice resulted in a litter size of five to eight IFN- $\gamma^{-/-}$ mice, demonstrating higher efficiency compared to other breeding strategies. In addition, diet type and mating age significantly influenced female reproductive performance. When 7 ~ 9 weeks old female IFN- $\gamma^{-/-}$ mice were mated to male IFN- $\gamma^{-/-}$ mice and fed a high-protein breeding diet, litter size (6.9 ± 1.7), weaning survival number ($6.5\% \pm 2.0\%$) and weaning survival rate ($93.2\% \pm 17.8\%$) were higher than those under other conditions. In addition, providing shelters to prevent fighting between breeding pairs further improved reproductive outcomes. **Conclusions** By adopting an optimized breeding strategy, combined with a high-protein diet, nutritional supplementation, and standardized mating age management, the breeding efficiency and stability of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice can be significantly improved. This provides a reliable animal model for related research.

【Keywords】 interferon- γ ; gene knockout mouse; feeding; reproduction

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

干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 是一种在动物机体固有免疫和适应性免疫中发挥重要作用的细胞因子,由活化的 T 细胞和 NK 细胞分泌,具有抗病毒、抗寄生虫、抗肿瘤、抑制细胞增殖及调节机体免疫等作用^[1]。1993 年,有研究对 C57BL/6J 小鼠基因组的 IFN- γ 基因进行破坏后得到了免疫缺陷小鼠品系 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠^[2]。目前,以 C57BL/6J 为背景的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠在国内外研究中广泛使用,常应用于寄生虫感染^[3-5]、病毒感染^[6-7]、免疫调控^[8-9]、肿瘤及心血管疾病^[10-11] 等方面。

目前 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的获得方式通常是购买 IFN- $\gamma^{+/-}$ 种鼠,使用传统的育种方式即雌性杂合子与雄性杂合子交配来获得 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠。然而在繁育过程中发现,杂杂配种获得的子代中纯合子的占比极低;对小鼠繁育后代的生存能力有一定消极影响^[12];花费较高,对于高校科研课题组来说不是最佳选择。另外,在包括 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠在内的基因敲除纯合子小鼠繁育过程中,也常面临雌鼠体质较弱、流产,新生小鼠离乳存活率低等问题,无法实现纯合子小鼠的稳定遗传^[13]。所以建立稳定高效的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠模型具有重要的意义。

为了低成本且高效地稳定获得 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠,本研究于 2018 年 6 月从中国医学科学院医学实验动物研究所引进 IFN- $\gamma^{+/-}$ 种鼠,在华南农业大学实验动物中心内进行饲养繁殖。对子代的基因型进行鉴定及筛选后,成功获得健康的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠后代,并进一步对亲本小鼠的配种方法和饲养繁殖措施进行探讨和优化,为 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的稳定遗传和可持续繁育提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠(遗传背景:C57BL/6J,品系名:B6.129S7-Ifng^{tm1Ts}/J)于 2006 年从美国杰克逊实验室(Jackson laboratory)引入我国,对应鼠种编号为 002287。4 只 SPF 级 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠,其中雄性 2 只,雌性 2 只,7 ~ 8 周龄,体质量为 16 ~ 20 g,购自中国医学科学院医学实验动物研究所【SCXK(京)2024-0009】,饲养于华南农业大学实验动物中心【SYXK(粤)2024-0136】。饲养环境:环境温度为 18 ~ 22 ℃,相对湿度为 50% ~ 60%,光照明暗控制各为 12 h,小鼠自由饮食。本研究通过华南农业大学实验动物伦理委员会审查批准

(2022F093,2023F201)。

1. 1. 2 主要试剂与仪器

EasyPure® Genomic DNA Kit(北京全式金生物科技股份有限公司,中国,货号:EE101-01)、TaKaRa LA Taq® Hot Start Version(宝生物工程(大连)有限公司,日本,货号:RR042)和 TaKaRa LA Taq® with GC Buffer(宝生物工程(大连)有限公司,日本,货号:RR02AG)、6 × DNA 上样缓冲液(广州东盛生物科技有限公司,中国,货号:M9041)、100 bp DNA Ladder(广州东盛生物科技有限公司,中国,货号:M1062)、琼脂糖(安徽白鲨生物科技有限公司,中国,货号:BS081-100g)、大小鼠维持饲料(北京市科澳协力饲料有限公司,中国,货号:1016706714625204224)和实验鼠生长繁殖饲料(江苏省协同医药生物工程有限责任公司,中国,货号:XTI01FZ-003)(如表 1 所示)。独立通风笼具(individually ventilated cages, IVC)(苏州市君圣实验动物设备有限公司,中国);恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司,中国);Veriti® 96-well Thermal Cycler PCR 仪(ABI,MA,美国);琼脂糖凝胶电泳系统(Bio-Rad,美国);多功能凝胶成像仪(Analytik Jena,德国)。

表 1 本研究所采用的两种商品化饲料的主要营养成分

Table 1 Main nutrients of two commercial feed used in this study

养分 Nutrients	维持饲料 Maintenance feed	生长和繁殖饲料 Growth and breeding diet
水分 Moisture	≤ 10%	≤ 10%
粗蛋白 Crude protein	≥ 18%	≥ 20%
粗脂肪 Crude fat	≥ 4%	≥ 4%
粗纤维 Crude fiber	≤ 5%	≤ 5%
粗灰分 Crude ash	≤ 8%	≤ 8%
钙 Calcium	1.0% ~ 1.8%	1.0% ~ 1.8%
总磷 Total phosphorus	0.6% ~ 1.2%	0.6% ~ 1.2%

1. 2 方法

1. 2. 1 小鼠的信息记录

每周定期更换垫料、食物和饮用水,对配种

小鼠定期给予营养。在配种过程中,每天进入动物房 1 次,观察配种小鼠的饲养情况,并做详细记录,包括是否怀孕、产仔数量、子代和雌鼠健康状况。

1. 2. 2 小鼠的基因型鉴定方法

将引进的 IFN-γ^{+/-} 种鼠进行配种,根据孟德尔定律,其子代可能为杂合子(IFN-γ^{+/-})、纯合子(IFN-γ^{-/-})和野生型(IFN-γ^{+/+})。为获得 IFN-γ^{-/-} 小鼠,需要对子代小鼠的 IFN-γ 基因位点的基因型进行鉴定,具体方法如下:

(1)小鼠趾尖基因组 DNA 提取:剪取 10 ~ 14 d 的子代小鼠趾尖组织,置于无菌的 1.5 mL 离心管中,用 EasyPure® Genomic DNA Kit 对小鼠组织进行基因组 DNA 提取,将提取好的 DNA 置于-20 ℃ 的冰箱中备用。

(2)PCR 反应体系:对提取的小鼠基因组 DNA 进行巢式 PCR 鉴定,引物序列由 Jackson Laboratory 官网(<https://www.jax.org/strain/002287>)提供,oIMR8285: 5'-AGGGAACTGGGA GAGGAGAAATAT-3';oIMR8284: 5'-AGAAGTAA GTGGAAGGGCCCAGAAG-3';oIMR6218: 5'-CCT TCTATCGCCTTCTTGACG-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成,为干粉状。根据基因型鉴定试剂盒的使用说明配制 21 μL PCR 反应体系进行扩增反应。在 1.5 mL 离心管中分别加入 2 × GC Buffer I 10 μL、dNTP Mixture 1.6 μL、oIMR6218 (10 pmol/μL) 1 μL、oIMR8284 (10 pmol/μL) 1 μL、oIMR8285 (10 pmol/μL) 1 μL、LA Taq HS (5 U/μL) 0.1 μL、ddH₂O 5.3 μL 和 DNA 模板 1 μL。

(3)PCR 反应条件:使用 PCR 仪进行扩增,PCR 反应循环体系设定为:①预变性 94 ℃ 15 min;②变性 94 ℃ 20 s,退火 65 ℃ 15 s,延伸 68 ℃ 10 s,循环 10 次,且每个循环退火温度下降 0.5℃;③变性 94 ℃ 15 s,退火 60 ℃ 15 s,延伸 72 ℃ 10 s,循环 28 次;④72 ℃ 2 min,终止反应。

(4)琼脂糖凝胶电泳:向 2%琼脂糖凝胶孔中加入 10 μL 混合了 DNA 上样缓冲液的 PCR 产物,随后调节电泳槽电压为 110 V 和工作时间为 42 min 进行电泳,电泳结束后在凝胶成像仪中对 PCR 产物进行观察分析。

(5)基因型结果判定:根据 PCR 产物条带位

置判断小鼠的基因型情况 (<https://www.jax.org/strain/002287>)。引物 oIMR8285 和 oIMR6218 扩增产物片段长度为 500 bp, 若 PCR 产物为该长度, 则 PCR 产物对应小鼠为 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠; oIMR8285 和 oIMR8284 引物扩增长度为 210 bp, 则 PCR 产物对应小鼠为野生型小鼠; 若 PCR 产物中同时存在 500 bp 和 210 bp 条带, 则对应小鼠为 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠。

1.2.3 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的获得

首先将购买的 4 只 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠进行适应性饲养, 达到 8 周龄性成熟和体成熟后, 通过传统的杂合子和杂合子交配的配种方式以雌雄 1:1 的比例进行合笼配种。繁育获得第一胎子代后, 对 10 ~ 14 日龄的子代进行基因型鉴定, 在小鼠 3 周龄时, 根据基因型鉴定结果和性别分笼饲养。为了进一步扩大种群, 将 6 ~ 8 周龄雌性和雄性 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠以 2:1 的比例进行多次配种, 确保能够稳定持续地生产子代。

进一步, 为了能高效获得更多的纯合子小鼠, 将配种方式优化为纯合子和杂合子交配的配种方式。考虑到雌性纯合子体质较弱, 所以选雌性杂合子与雄性纯合子交配。观察子代情况, 确保每窝产仔数目稳定后, 再对配种方式进行调整。最后, 将获得的纯合子子代相互交配, 根据雌鼠在繁殖过程中出现的问题进行相应的调整, 确保雌鼠能够稳定生产。在繁育过程中, 种鼠均采用雌雄长期同居法 (雌雄比例为 2:1), 所生产的乳鼠均在 3 周左右分笼。比较 3 种配种方式的优缺点, 并且在每种配种方式的雌鼠能稳定生产后, 统计 10 只雌鼠在 3 个月内的受孕胎数、子代各基因型数量和子代总数, 并且对获得的纯合子小鼠数目进行统计学分析。

1.2.4 小鼠饲养条件及繁育措施的优化

在确定纯合子和纯合子配种可稳定产生子代后, 为了能进一步确定不同配种周龄以及饲料种类对小鼠繁育情况的影响, 以优化繁育条件, 本研究随机选取了 60 只不同周龄配种以及饲喂不同种类商品化饲料的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 雌鼠, 统计其前 3 胎的窝产仔数、离乳存活数、离乳存活率。相关繁殖种鼠采取雌雄长期同居法进行配种, 每笼种鼠中雌雄配比为 2:1, 不同周龄的雌鼠 (5 ~ 7 周龄和 7 ~ 9 周龄) 分别与 6 ~ 7 周龄的雄鼠合

笼繁殖, 饲喂饲料分别为维持饲料和生长繁殖饲料, 具体 4 个分组为: (1) 饲喂维持饲料, 5 ~ 7 周龄的雌鼠与 6 ~ 7 周龄的雄鼠合笼繁殖 ($n = 15$); (2) 饲喂维持饲料, 7 ~ 9 周龄的雌鼠与 6 ~ 7 周龄的雄鼠合笼繁殖 ($n = 15$); (3) 饲喂生长繁殖饲料, 5 ~ 7 周龄的雌鼠与 6 ~ 7 周龄的雄鼠合笼繁殖 ($n = 15$); (4) 饲喂生长繁殖饲料, 7 ~ 9 周龄的雌鼠与 6 ~ 7 周龄的雄鼠合笼繁殖 ($n = 15$)。分别记录各组雌鼠生产的前 3 胎窝产仔数和离乳存活数, 并计算前 3 胎的子鼠离乳存活率 (离乳存活率 = 离乳存活数/窝产仔数 $\times$ 100%)。并且对繁殖过程中出现的雌鼠食仔、小鼠打斗、小鼠脱毛等问题进行总结与分析, 观察雌鼠配种周龄和两种不同商品化饲料以及其他因素对 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的繁殖性能的影响。

1.3 统计学分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 来探究不同配种周龄和不同饲料种类对雌鼠繁殖性能的影响, 并且分析了雌鼠配种周龄和饲料种类之间的交互作用, 以评估两种因素对雌鼠繁殖性能的综合影响。统计分析均在 SPSS 26.0 中完成, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的获得及鉴定

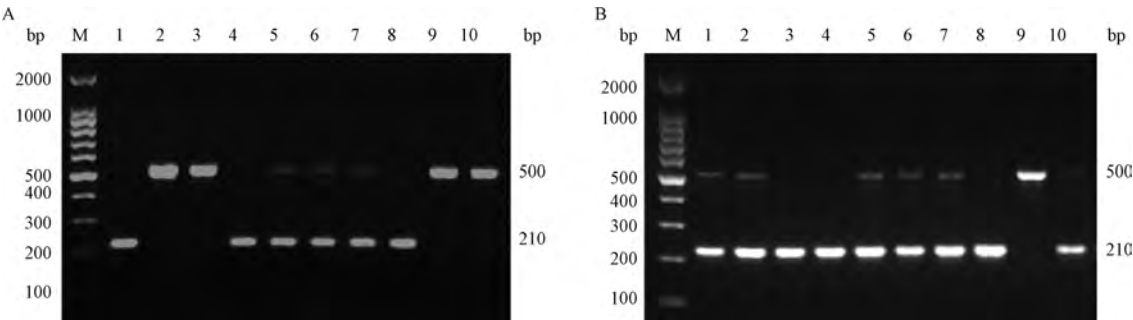
2.1.1 部分小鼠基因型鉴定结果

杂合子与杂合子交配获得的两窝子代小鼠趾尖基因组 DNA 扩增产物的凝胶电泳结果如图 1 所示。按照条带大小不同来区分小鼠的基因型, 在 500 bp 和 210 bp 处均观察到条带, 为 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠; 仅在 210 bp 处见单条带, 为野生型小鼠; 仅在 500 bp 处见单条带, 为 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠。

2.1.2 不同配种繁殖方法的比较选择

雌性 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠与雄性 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠交配、雌性 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠与雄性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠交配、雌性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠与雄性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠交配, 三种不同配种繁殖方式均可获得 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠, 然而不同的配种方法各有利弊。

(1) 杂合子小鼠与杂合子小鼠交配 (IFN- $\gamma^{+/-}$ $\text{♀} \times$ IFN- $\gamma^{+/-}$ ♂): 将引进的 2 对 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠进



注:M;DNA 标记;A: 2、3、9、10;IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠样品;1、4、8:野生型小鼠样品;5、6、7:IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠样品;B: 1、2、5、6、7、10;IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠样品;3、4:野生型小鼠样品;9:IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠样品。

图 1 部分子代小鼠基因型 PCR 鉴定结果

Note. M. DNA Marker. A. 2, 3, 9, 10. IFN- $\gamma^{-/-}$ mice sample. 1, 4, 8. Wild-type mice sample. 5, 6, 7. IFN- $\gamma^{+/-}$ mice sample. B. 1, 2, 5, 6, 7, 10. IFN- $\gamma^{+/-}$ mice sample. 3, 4. Wild-type mice sample. 9. IFN- $\gamma^{-/-}$ mouse sample.

Figure 1 Identification of genotypes of some offspring mice by PCR

行合笼配种,生产第一胎子代后发现小鼠存活数目为 4 ~ 6 只。待小鼠能稳定生产后,对小鼠进行了为期 3 个月的持续观察,10 只雌鼠共生产 13 胎小鼠。平均每胎新生小鼠离乳存活数为 6.8 只,离乳存活率为 92.7%,每胎可供纯合子小鼠数目为 2.2 只(见表 2)。此方式产生的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠体型较为健壮,但是数量较少,需要消耗大量基因型鉴定试剂盒以及人力。

(2) 杂合子小鼠与纯合子小鼠交配 (IFN- $\gamma^{+/-}$ ♀ × IFN- $\gamma^{-/-}$ ♂): 进一步将雌性 IFN- $\gamma^{+/-}$ 小鼠与雄性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠交配,待小鼠生产稳定后,在 3 个月的持续观察中,10 只雌鼠共生产 12 胎小鼠。平均每胎新生小鼠离乳存活数为 6.6 只,离乳存活率为 96.8%,单胎可获得 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠为 2.6 只(见表 2)。此交配方式生产的子代 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠较少,仍旧需要消耗大量基因型鉴定试剂盒以及人力。

(3) 纯合子小鼠与纯合子小鼠交配 (IFN- $\gamma^{-/-}$

♀ × IFN- $\gamma^{-/-}$ ♂): 进一步将雌性和雄性 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠进行交配,发现雌鼠繁殖能力较差。部分种鼠配种后无法怀孕或者受孕后流产,存活的子代大多生长滞后,且存活时间不超过 3 周。在怀孕雌鼠笼内加入富含维生素 E 的灭菌瓜子以加强孕期营养后,雌鼠生育能力提高并且流产情况减少,受孕成功的雌鼠每胎新生小鼠全部为 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠。通过提高雌鼠营养,保障雌鼠能够稳定生产后,统计了 10 只雌鼠的繁殖情况,结果显示 10 只雌鼠共生产 17 胎小鼠。平均每胎可获得 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠为 6.7 只,显著高于杂合子互交和纯合子与杂合子交配的方式 ($P < 0.001$),新生小鼠的离乳存活率为 97.8%(见表 2)。因此,通过加强怀孕 IFN- $\gamma^{-/-}$ 雌鼠的营养供给,可以提高雌鼠繁育性能,产生大量的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠。相比杂合子与杂合子交配、纯合子与杂合子交配,纯合子与纯合子交配的方式生产效率更高,且节省了子代基因型鉴定的试剂和人力成本。

表 2 不同配种方式下 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的繁育情况 ($n = 10$)

Table 2 Breeding performance of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice using different mating methods ($n = 10$)

配种方法 Methods ♀ × ♂	受孕胎数/ n Number of pregnancies/ n	子代各基因型数量/ n Each genotypes count in offspring/ n			子代总数/ n Total number of offspring/ n	纯合率/% Homozygosity rate/%	离乳存活率/% Weaned survival rate/%
		+/+	+/-	-/-			
IFN- $\gamma^{+/-}$ × IFN- $\gamma^{+/-}$	13	2.1 ± 1.2	3.0 ± 1.1	2.2 ± 1.7***	6.8 ± 2.6	31.5	92.7
IFN- $\gamma^{+/-}$ × IFN- $\gamma^{-/-}$	12	0	4.0 ± 2.0	2.6 ± 2.2***	6.6 ± 2.3	39.2	96.8
IFN- $\gamma^{-/-}$ × IFN- $\gamma^{-/-}$	17	0	0	6.7 ± 1.7	6.7 ± 1.7	100.0	97.8

注:与 IFN- $\gamma^{+/-}$ × IFN- $\gamma^{-/-}$ 相比, *** $P < 0.001$ 。
Note. Compared with IFN- $\gamma^{+/-}$ × IFN- $\gamma^{-/-}$, *** $P < 0.001$.

2. 1. 3 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠外形特征

在纯合子和纯合子配种方式下生产的新生纯合子小鼠,在外观形态上与野生型小鼠未见明显差异(图 2)。1 日龄新生 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠两眼紧闭、四肢蜷缩、皮肤无毛呈肉红色、两耳紧贴在皮肤上、活动能力有限,与野生型幼鼠无明显差异。21 日龄成年 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠眼睛完全睁开、毛发发育完全、被毛为黑色、行动自如,与野生型 C57BL/6J 小鼠基本相同。

2. 2 不同配种周龄、不同商品化饲料对 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠繁育性能的影响

如表 3,通过对 60 只雌鼠的前 3 胎窝产仔数、离乳存活数、离乳存活率进行统计,观察不同配种周龄和饲喂不同商品化饲料对雌鼠的繁育

性能的影响。结果显示,雌鼠在 7 ~ 9 周龄配种的窝产仔数(6.2 ± 1.9)高于 5 ~ 7 周龄配种的窝产仔数($5.5 \pm 2.3, P = 0.05$);雌鼠在 7 ~ 9 周龄配种的离乳存活数(5.7 ± 2.1)显著高于在 5 ~ 7 周龄配种的离乳存活数($4.6 \pm 2.5, P = 0.002$);雌鼠在 7 ~ 9 周龄配种的离乳存活率(92.0 ± 19.7)显著高于在 5 ~ 7 周龄配种的离乳存活率($81.6 \pm 33.0, P = 0.011$);饲喂生长繁殖饲料雌鼠的离乳存活数(5.6 ± 2.4)显著高于饲喂维持饲料雌鼠的离乳存活数($4.7 \pm 2.3, P = 0.008$),饲喂生长繁殖饲料雌鼠的窝产仔数(6.1 ± 2.2)和离乳存活率($90.3\% \pm 23.6\%$)高于饲喂维持饲料雌鼠的窝产仔数(5.6 ± 2.1)和离乳存活率($83.3\% \pm 30.8\%$),但是差异无显著性($P > 0.05$)。



图 2 不同日龄的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠与 C57BL/6J 小鼠的外形特征

Figure 2 Appearance characteristics of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice and C57BL/6J mice at different ages

表 3 饲养条件对雌鼠繁殖性能的影响($n = 90$)

Table 3 Effects of rearing conditions on the reproductive performance of female mice($n = 90$)

饲养条件 Rearing conditions	配种周龄 Mating age in weeks		饲料种类 Type of feed	
	5 ~ 7 周龄 5 ~ 7 weeks	7 ~ 9 周龄 7 ~ 9 weeks	维持饲料 Maintenance feed	生长繁殖饲料 Breeding diet
窝产仔数/ n Litter size/ n	5.5 ± 2.3	6.2 ± 1.9	5.6 ± 2.1	6.1 ± 2.2
离乳存活数/ n Weaned survival number/ n	4.6 ± 2.5	$5.7 \pm 2.1^{**}$	4.7 ± 2.3	$5.6 \pm 2.4^{\wedge\wedge}$
离乳存活率/% Weaned survival rate/%	81.6 ± 33.0	$92.0 \pm 19.7^{+}$	83.3 ± 30.8	90.3 ± 23.6

注:与 5 ~ 7 周龄相比, $^{+}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$;与饲喂维持饲料相比, $^{\wedge\wedge}P < 0.01$ 。
Note. Compared with 5 ~ 7 weeks, $^{+}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Compared with maintenance feed, $^{\wedge\wedge}P < 0.01$.

不同配种周龄(5 ~ 7 周龄和 7 ~ 9 周龄)、不同种类饲料(维持饲料和生长繁殖饲料)对 60 只雌鼠前 3 胎窝产仔数、离乳存活数、离乳存活率影响的双因素方差分析结果如表 4 所示。雌鼠配种周龄对雌鼠的窝产仔数($P = 0.044$)、离乳存活

数($P = 0.001$)、离乳存活率($P = 0.01$)均有显著性影响;饲料种类对离乳存活数有显著性影响($P = 0.006$),对窝产仔数和离乳存活率的影响未达到统计学显著性($P = 0.148, P = 0.081$);配种周龄和饲料种类对窝产仔数存在显著的互

表 4 不同饲养条件对雌鼠繁殖性能的双因素方差分析

Table 4 Two-way ANOVA of the reproductive performance of female mice under different rearing conditions

指标 Index	F 检验 P 值 F test P value		
	配种周龄 Mating age in weeks	饲料种类 Type of feed	配种周龄 × 饲料种类 Mating age in weeks × type of feed
窝产仔数/ <i>n</i> Litter size/ <i>n</i>	0.044	0.148	0.002
离乳存活数/ <i>n</i> Weaned survival number/ <i>n</i>	0.001	0.006	0.110
离乳存活率/% Weaned survival rate/%	0.010	0.081	0.249

作效应($P = 0.002$),对离乳存活数和离乳存活率没有显著的互作效应($P = 0.11, P = 0.249$)。

如表 5,进一步将不同配种周龄和不同种类饲料分组进行比较可知,雌鼠在 7 ~ 9 周龄配种并且饲喂生长繁殖饲料的窝产仔数(6.9 ± 1.7)显著高于在 5 ~ 7 周龄配种并且饲喂维持饲料的窝产仔数($5.8 \pm 2.3, P = 0.014$)、在 5 ~ 7 周龄配种并且饲喂生长繁殖饲料的窝产仔数($5.3 \pm 2.3, P < 0.001$)和在 7 ~ 9 周龄配种并且饲喂维持饲料的窝产仔数($5.4 \pm 1.9, P < 0.001$)。雌鼠在 7 ~ 9 周龄配种并且饲喂生长繁殖饲料的离乳存活数(6.5 ± 2.0)显著高于在 5 ~ 7 周龄配种并且饲喂维持饲料的离乳存活数($4.4 \pm 2.6, P < 0.001$)、在 5 ~ 7 周龄配种并且饲喂生长繁殖饲料的离乳存活数($4.8 \pm 2.4, P = 0.001$)和在 7 ~ 9 周龄配种并且饲喂维持饲料的离乳存活数($5.0 \pm 2.0, P = 0.001$)。雌鼠在 7 ~ 9 周龄配种并且饲喂生长繁殖饲料的离乳存活率($93.2\% \pm$

17.8%)显著高于在 5 ~ 7 周龄配种并且饲喂维持饲料的离乳存活率($75.7\% \pm 36.6\%, P = 0.005$),与在 5 ~ 7 周龄配种并且饲喂生长繁殖饲料($87.5\% \pm 28.1\%, P = 0.246$)和在 7 ~ 9 周龄配种并且饲喂维持饲料的离乳存活率($90.8\% \pm 21.6\%, P = 0.565$)差异不显著。综上,在 7 ~ 9 周龄与雄鼠合笼配种并且饲喂生长繁殖饲料的雌鼠繁殖性能更好。

2.3 其他因素对 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠繁育性能的影响

因 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠在繁育过程中会出现多种情况,从而影响小鼠繁殖性能,难以实现扩繁。下面针对 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠繁殖问题进行了介绍以及调整。

2.3.1 雌鼠食仔

据观察,雌鼠生产第一胎后会出现拒绝哺乳新生小鼠甚至食仔的情况(图 3A)。随后采取措施来预防雌鼠食仔,包括在笼内放置脱脂棉球供小鼠筑窝,在生产前 1 周向笼内投放灭菌瓜子和

表 5 不同饲养条件对雌鼠繁殖性能的综合影响($n = 45$)

Table 5 Combined effects of different rearing conditions on the reproductive performance of female mice($n = 45$)

饲养条件 Rearing conditions	窝产仔数/ <i>n</i> Litter size/ <i>n</i>	离乳存活数/ <i>n</i> Weaned survival number/ <i>n</i>	离乳存活率/% Weaned survival rate/%
5 ~ 7 周龄 × 维持饲料 5 ~ 7 weeks × maintenance feed	5.8 ± 2.3^a	4.4 ± 2.6^{aaa}	75.7 ± 36.6^{aa}
5 ~ 7 周龄 × 生长繁殖饲料 5 ~ 7 weeks × breeding diet	5.3 ± 2.3^{aaa}	4.8 ± 2.4^{aa}	87.5 ± 28.1
7 ~ 9 周龄 × 维持饲料 7 ~ 9 weeks × maintenance feed	5.4 ± 1.9^{aaa}	5.0 ± 2.0^{aa}	90.8 ± 21.6
7 ~ 9 周龄 × 生长繁殖饲料 7 ~ 9 weeks × breeding diet	6.9 ± 1.7	6.5 ± 2.0	93.2 ± 17.8

注:与 7 ~ 9 周龄 × 生长繁殖饲料相比, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$ 。
Note. Compared with 7 ~ 9 weeks × breeding diet, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$.

熟鸡蛋黄为雌鼠补充营养(图 3B)。在产前 3 d 尽可能地避免惊扰雌鼠,在生产后减少对新生小鼠的检查以防特殊气味混入鼠笼内,若发现有啃食新生小鼠的情况,需将手套沾染种鼠粪便气味并快速取出小鼠尸体,避免血腥味刺激雌鼠吃更多的小鼠。

经过改善发现小鼠食仔的情况减少,母性行为较好的雌鼠会通过撕咬棉球筑出一个相对完整洁净的窝以供小鼠保暖(图 3C)。同时在食仔情况严重的雌鼠笼内观察到,放置的棉球呈现散乱并且沾有粪便食物残渣的状态(图 3D)。

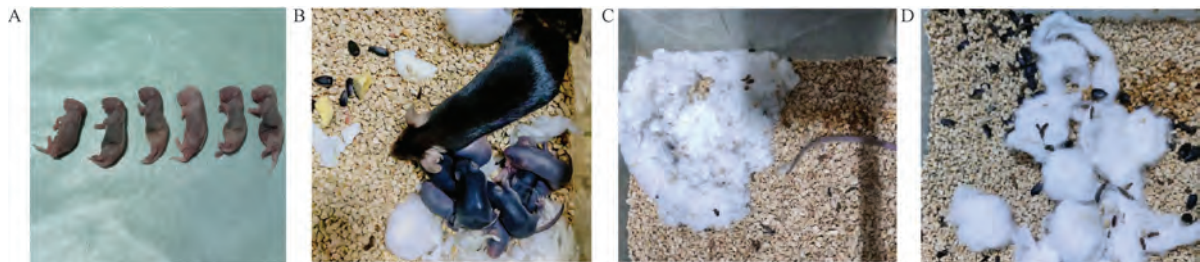
2.3.2 小鼠打架

在小鼠的饲养过程中,由于争夺配偶及食物资源、抢夺领地等原因,会出现互相撕咬导致小鼠背部撕裂、尾部断裂甚至死亡的情况(图 4A、图

4B),影响小鼠生长发育和扩大繁殖规模进度。一方面,在日常检查中发现攻击性强的小鼠及时作出分笼处理。另一方面,在饲养过程中发现种鼠合笼配种时放置沾有原先小鼠气味的脱脂棉球和提供遮蔽物来丰富笼内环境能够预防小鼠打架行为的出现(图 4C)。

2.3.3 小鼠脱毛

在繁育过程中,发现在同一窝子代中,有个别子代小鼠出现整个背部脱毛的现象(图 5A)。据观察,小鼠脱毛现象一方面是因雌鼠压力大、季节变换、饮食变化而为小鼠舔背梳毛过度,对于这种情况会在小鼠分笼后自行恢复(图 5B);另一方面是本品系在特定饲养条件下无法适应环境压力并且缺乏生理活动的体现,具有良性、可以缓解的特点。

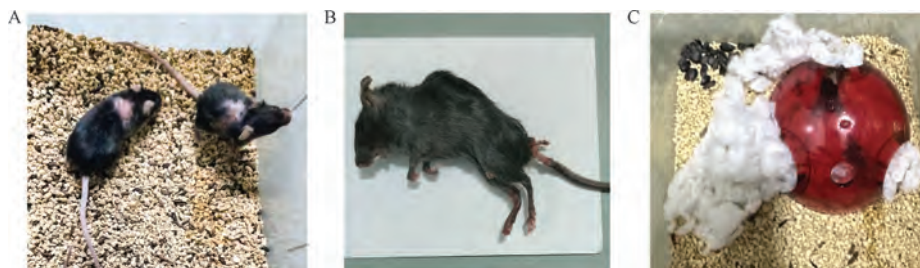


注:A:雌鼠生产第一胎小鼠后母性较弱,拒绝哺乳导致小鼠全部死亡;B:在笼内放置脱脂棉球、瓜子和鸡蛋黄,以辅助雌鼠哺育小鼠;C:母性行为较强的小鼠撕咬棉球筑成的一个较整齐干净的窝;D:母性行为较差的雌鼠撕咬棉球筑成的一个无规则、沾染粪便食物残渣的窝。

图 3 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的母性行为表现及改善措施

Note. A. Female mouse produced her first litter of mice but refused to nurse, resulting in the death of all the mice. B. Degreased cotton balls, melon seeds and egg yolk were placed in the cage to assist female mice nursing. C. Mice with strong maternal behavior tore cotton balls to make a neat and clean nest. D. Mice with poor maternal behavior tore at an irregular, fecal-stained cotton ball nest.

Figure 3 Maternal behavioral performance in IFN- $\gamma^{-/-}$ mice and interventions

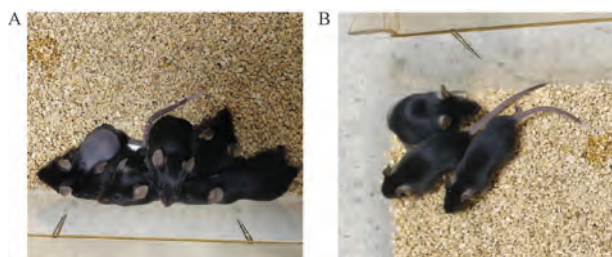


注:A:2只小鼠打架致背部皮肤撕裂;B:小鼠打架导致尾部受伤;C:通过放置遮蔽物和棉花来预防小鼠打架。

图 4 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠打架导致受伤或死亡及相应预防措施

Note. A. Two mice fight resulting in a skin tear on the back. B. Mouse with a broken tail due to a fight. C. Mice were prevented from fighting by placing shelter and cotton.

Figure 4 Fight-related injury or death in IFN- $\gamma^{-/-}$ mice and preventive measures



注:A:同一窝小鼠中有个别小鼠背部脱毛;B:分笼后,小鼠背部重新长出毛发。

图5 个别 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠脱毛及恢复情况

Note. A. Some mice in the same litter showed hair loss on their entire backs. B. Mice regrowing hair on their backs after separation of cages.

Figure 5 Hair loss and recovery in some IFN- $\gamma^{-/-}$ mice

3 讨论

IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的繁育较为困难,主要体现在 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠相比正常雌鼠体质较弱、单胎产仔数量少、新生小鼠存活率低和发育缓慢等方面。这主要是由于 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠为重症免疫缺陷小鼠,对饲养繁育环境要求较高,小鼠的生长发育和健康状况与饲养环境、饲喂方法、小鼠饮水习惯等密切相关。由于不同实验室饲养环境并不完全一致,因此同一种品系在不同实验室中的繁育情况也会存在差异^[14]。因此,深入了解小鼠繁育性能,根据实际情况制定恰当的繁育措施,能够更有针对性地提升小鼠的繁殖能力。

在优化繁育条件的情况下,采用雌雄 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠进行配种可持续稳定地获得优质纯合子子代。在本研究中,通过优化小鼠配种方式(由起初的杂合子互交-杂合子和纯合子交配-纯合子互交)、选择 7 ~ 9 周龄的雌鼠用于配种繁育、更换实验鼠生长繁殖饲料、增加灭菌瓜子、放置遮蔽物等措施改善饲养条件^[15],提高了纯合子繁育雌鼠的体质,成功实现了 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的扩繁,获得的纯合子小鼠与直接购买的纯合子小鼠同样健康,并可减少小鼠在长途运输过程中的应激反应。

相比雌性杂合子与雄性杂合子小鼠交配、雌性杂合子与雄性纯合子交配,本研究所采用的雌性纯合子与雄性纯合子交配的方法,雌鼠生产效率更高。在雌性杂合子与雄性杂合子以及雌性杂合子与雄性纯合子交配过程中,选择剪取 10 ~

14 d 的子代小鼠趾尖组织进行基因型鉴定,原因是子代小鼠年龄过小易导致小鼠死亡,年龄过大时易导致出血过多且小鼠不易控制。同时,根据鉴定结果及时淘汰杂合小鼠和野生型小鼠,有助于给纯合子小鼠提供更多的生存空间并且降低饲养繁殖成本。此外,体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)-胚胎移植(*embryo transfer*, ET)技术也可以实现 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠快速扩繁的目的^[16],相比传统的配种方式具有以下优势:节约饲养周期、可以实现快速扩繁、可以在同一时间获得实验需求的纯合子小鼠以便实验分组、可严格控制后代动物质量^[17]。但是存在技术复杂度高、实验成本较高、对操作人员要求较高等问题^[18]。

小鼠性成熟的时间通常为 6 ~ 8 周,雌鼠性成熟时间较早。为了实现快速扩繁,可采用 5 ~ 6 周龄的雌鼠进行配种^[13]。本研究使用 5 ~ 7 周龄的雌鼠配种和 7 ~ 9 周龄的雌鼠配种,配种结果发现选择 7 ~ 9 周龄的雌鼠配种获得子代的效率更高,观察发现子代小鼠体质更加健康。饲料对小鼠的生长、繁殖产生直接的影响^[19-20]。不同种类的商品化饲料在营养成分上存在差异,其中蛋白质作为动物生长发育不可或缺的关键营养成分,广泛参与并调节动物体内的多种生命活动过程。研究表明,蛋白质摄入量不足会显著影响小鼠的免疫功能,导致其免疫力下降^[21-22]。本研究使用的生长繁殖饲料和维持饲料的主要营养成分差别在于蛋白质的含量不同,生长繁殖饲料的蛋白质含量高于维持饲料(20% > 18%)。实验结果表明,实验鼠维持饲料和生长繁殖饲料都可以满足小鼠的日常生产,但是繁殖饲料能明显的改善雌鼠的繁殖性能。并且在 7 ~ 9 周龄与雄鼠合笼配种并且饲喂生长繁殖饲料的雌鼠生产繁殖性能更好。

雌鼠食仔是基因工程小鼠繁育过程中常遇到的问题,主要原因有雌鼠缺乏营养、饲养环境改变(温度过低、噪音过大)、生产过程中受到人为干扰等。可通过在妊娠雌鼠生产前补充营养、减少光照和噪音的干扰、在生产后及时取出死亡的新生小鼠来减少雌鼠食仔行为,以及根据使用脱脂棉球建造和维护巢穴的行为来选择雌性行为较强的雌鼠^[23-25],本研究发现通过以上措施显

著提升了雌鼠带仔能力。在小鼠的饲养过程中,由于争夺配偶及食物资源、抢夺领地、饲养环境噪音大、C57BL/6J 小鼠品系好斗等原因,会出现小鼠打斗的情况,影响小鼠生长发育和扩大繁殖规模进度。减少小鼠打斗的方法有:固定同一笼内的雄雌比例(雄:雌=1:2)避免多只雄鼠与雌鼠合笼配种,多只雌鼠也会对彼此出生乳鼠进行交叉哺乳,提高存活率^[26];合笼时,先放雌鼠再放雄鼠,否则雌鼠会攻击雄鼠;发现打斗时需及时对攻击性强的小鼠做出分笼处理;在日常换垫料时放置沾有原先小鼠气味的棉花,并且提供遮蔽物来丰富笼内环境。这些措施能够有效降低小鼠打架伤亡的情况,进一步提升 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠整体的繁育性能。小鼠脱毛主要分为病理性脱毛和非病理性脱毛,IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠脱毛主要是由于非病理性脱毛。通常由于雌鼠压力大、季节变换、饮食变化而为子代小鼠过度理毛会导致小鼠脱毛,对于这种情况会在子代小鼠成年分笼后自行恢复。此外,由于 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠是以 C57BL/6J 为遗传背景的 IFN- γ 基因敲除小鼠,研究表明 C57BL/6J 近交系脱毛小鼠与正常小鼠皮肤毛囊形态学存在差异,有一定概率会自发脱毛。通过增加与雄鼠的同居、妊娠、生产及正常哺乳等生理活动、降低饲养密度、放置棉花以供撕咬等措施可以显著减少小鼠过度理毛和自然脱毛情况的发生^[27-28]。

IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠已用于寄生虫学机制研究。本研究饲养繁育的 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠已用于微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)的动物感染模型建立,解决了以往动物模型中隐孢子虫感染时间短、排泄量低的问题,可用于该病原的生物学研究及药物的开发与评价^[29-30]。此外,调查发现,IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠模型在弓形虫(*Toxoplasma gondii*)^[31-32]、卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)^[33]、多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*)^[34]等寄生虫机制研究中也多次使用。

综上所述,针对重症免疫缺陷小鼠 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠,通过提高繁育小鼠的营养、规范配种时间和改善繁育环境等措施,可实现通过纯合子配种高效稳定地纯合子后代,这为后续使用实验动物模型开展研究奠定了基础,同时也为其他免疫缺陷小鼠的繁育提供了参考。

参 考 文 献(References)

- [1] SCHRODER K, HERTZOG P J, RAVASI T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions [J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 163-189.
- [2] DALTON D K, PITTS-MEEK S, KESHAV S, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes [J]. Science, 1993, 259(5102): 1739-1742.
- [3] RANA V S, KITSOU C, DUTTA S, et al. Dome1-JAK-STAT signaling between parasite and host integrates vector immunity and development [J]. Science, 2023, 379(6628): eabl3837.
- [4] XU R, BEATTY W L, GREIGERT V, et al. Multiple pathways for glucose phosphate transport and utilization support growth of *Cryptosporidium parvum* [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 380.
- [5] 董辉, 苏瑞景, 杨卫华, 等. BALB/c 和 IFN- $\gamma^{-/-}$ 小鼠感染虎源弓形虫急性期组织损伤和抗原分布 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(6): 1153-1157.
DONG H, SU R J, YANG W H, et al. Tissue lesions and antigen distribution of BALB/c mice and IFN- $\gamma^{-/-}$ mice infected with *Toxoplasma gondii* isolated from tigers [J]. Chin J Vet Sci, 2020, 40(6): 1153-1157.
- [6] SCOTT DEVERA T, JOSHI S K, AYE L M, et al. Regulation of Anthrax toxin-specific antibody titers by natural killer T cell-derived IL-4 and IFN γ [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23817.
- [7] SUN J, ZHUANG Z, ZHENG J, et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment [J]. Cell, 2020, 182(3): 734-743. e5.
- [8] 黎峰铭, 唐雪梅. 全身型幼年特发性关节炎与巨噬细胞活化综合征的动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1225-1233.
LI F M, TANG X M. Progress on animal models of systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1225-1233.
- [9] GUO K, YOMBO D J K, WANG Z, et al. The chemokine receptor CXCR3 promotes CD8⁺ T cell-dependent lung pathology during influenza pathogenesis [J]. Sci Adv, 2024, 10(1): eadj1120.
- [10] VICTÓRIO S C S, CARTAROZZI L P, HELL R C R, et al. Decreased MHC I expression in IFN γ mutant mice alters synaptic elimination in the spinal cord after peripheral injury [J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 88.
- [11] FERRARI D P, BORTOLANZA M, DEL BEL E A. Interferon- γ involvement in the neuroinflammation associated with Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia

- [J]. Neurotox Res, 2021, 39(3): 705–719.
- [12] 苏瑞景, 董辉, 朱瑶, 等. IFN- γ 基因敲除小鼠的繁育及其对 TgCatChn4 弓形虫的感染研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(3): 250–253.
SU R J, DONG H, ZHU Y, et al. Reproduction of IFN- γ knockout mice and infection of TgCatChn4 strain of *Toxoplasma gondii* [J]. Chin J Zoonoses, 2019, 35(3): 250–253.
- [13] 彭旭, 尹海林. 基因工程小鼠繁育策略 [J]. 实验科学与技术, 2021, 19(5): 31–37.
PENG X, YIN H L. Breeding strategies for genetically modified mice [J]. Exp Sci Technol, 2021, 19(5): 31–37.
- [14] 田枫, 任波, 张云凤, 等. 基因修饰小鼠饲养管理及使用过程中问题探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 72–74.
TIAN F, REN B, ZHANG Y F, et al. Discussion on the management and usage of genetically modified mice [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(7): 72–74.
- [15] 曾昭智, 张锦红, 揭光敏, 等. 葵花籽对昆明小鼠生长繁殖性能的影响 [J]. 贵州农业科学, 2013, 41(6): 138–139.
ZENG Z Z, ZHANG J H, JIE G M, et al. Effects of sunflower seed on growth and reproduction performances of Kunming mice [J]. Guizhou Agric Sci, 2013, 41(6): 138–139.
- [16] 李斯特, 唐玉玲, 崔晶, 等. 小鼠生物净化中体外受精试剂对其受精率和产仔率的影响 [J]. 实验动物科学, 2024, 41(4): 56–60.
LI S T, TANG Y L, CUI J, et al. Effect of *in vitro* fertilization reagent on fertilization rate and birth rate of mice in biological purification [J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(4): 56–60.
- [17] 张静, 刘苗苗, 唐倩倩, 等. 实验动物质量保障体系和服务体系建设 [J]. 实验动物科学, 2023, 40(4): 62–68.
ZHANG J, LIU M M, TANG Q Q, et al. Construction of laboratory animal quality assurance and service system [J]. Lab Anim Sci, 2023, 40(4): 62–68.
- [18] 吴晗. 体外受精子代小鼠 T 淋巴细胞亚群失衡及表观遗传机制初探 [D]. 济南: 山东大学; 2023.
WU H. Preliminary study on the imbalance of T lymphocyte subsets and epigenetic mechanism *in vitro* sperm generation mice [D]. Jinan: Shandong University; 2023.
- [19] WEICHBROD R H, THOMPSON G A, NORTON J N. Management of animal care and use programs in research, education, and testing [M]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018.
- [20] PELLIZZON M A, RICCI M R. Effects of rodent diet choice and fiber type on data interpretation of gut microbiome and metabolic disease research [J]. Curr Protoc Toxicol, 2018, 77(1): e55.
- [21] 董巧燕, 张文盛, 尚艳姣, 等. 不同厂家实验动物饲料质量调查分析 [J]. 实验动物科学, 2024, 41(4): 68–74.
DONG Q Y, ZHANG W S, SHANG Y J, et al. Investigation and analysis of experimental animal feeds quality of different manufacturers [J]. Lab Anim Sci, 2024, 41(4): 68–74.
- [22] 韩帅, 朱晓伟, 包思成, 等. 实验动物饲料质量检测体系建设初探 [J]. 中国饲料, 2019, 9: 10–14.
HAN S, ZHU X W, BAO S C, et al. Study on the quality testing system of experiment animal feed [J]. Chin Feed, 2019, 9: 10–14.
- [23] 傅军. 两种基因敲除小鼠的生长与繁殖性能测定 [J]. 浙江畜牧兽医, 2019, 44(2): 2–4.
FU J. The performance test on growth and reproduction traits for two kinds of gene knockout mice [J]. Zhejiang J Anim Sci Vet Med, 2019, 44(2): 2–4.
- [24] 高艳华, 王显钢, 贾秀月, 等. 母性行为的激素机制 [J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(11): 1051–1052.
GAO Y H, WANG X G, JIA X Y, et al. Hormonal mechanism of maternal behavior [J]. Chin J Behav Med Sci, 2005, 14(11): 1051–1052.
- [25] 曾敏娟, 鲍波, 李晓玲, 等. KM 小鼠吃仔原因及其预防措施 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2016, 24(1): 32–35.
ZENG M J, BAO B, LI X L, et al. Causes and preventive measures of KM mice eating young [J]. Heilongjiang J Anim Reprod, 2016, 24(1): 32–35.
- [26] 张弓长, 邓一平, 董碧蓉. 基因工程小鼠饲养繁育及鉴定策略 [J]. 现代临床医学, 2023, 49(4): 295–298.
ZHANG G C, DENG Y P, DONG B R. Breeding and identification strategy of genetically engineered mice [J]. J Mod Clin Med, 2023, 49(4): 295–298.
- [27] 王丽, 王海涛, 李树伟. C57BL/6J 近交系脱毛小鼠与正常小鼠毛囊形态学观察及 AP-1 表达的差异 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(21): 16–18, 288.
WANG L, WANG H T, LI S W. Morphological observation of hair follicle and difference of AP-1 expression in C57BL/6J hair removal and normal mouse [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2017(21): 16–18, 288.
- [28] 黄月玲, 戴丽军, 谭小军, 等. 近交系 C57BL/6J 小鼠的脱毛特征 [J]. 解剖学研究, 2012, 34(4): 267–271.
HUANG Y L, DAI L J, TAN X J, et al. The features of hair loss in the inbred strain of C57BL/6J [J]. Anat Res, 2012, 34(4): 267–271.
- [29] HUANG J, CHEN M, HE Y, et al. *Cryptosporidium equi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): biological and genetic characterisations [J]. Int J Parasitol, 2023, 53(10): 545–554.
- [30] JIA R, HUANG W, HUANG N, et al. High infectivity and

unique genomic sequence characteristics of *Cryptosporidium parvum* in China [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16 (8): e0010714.

[31] 苏瑞景. IFN- γ 和肠道菌群在弓形虫病中的作用研究 [D]. 郑州: 河南农业大学; 2020.

SU R J. The role of IFN- γ and gut commensal bacteria in toxoplasmosis [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University; 2020.

[32] DUBEY J P, FERREIRA L R, MARTINS J, et al. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality [J]. *Parasitology*, 2012, 139(1): 1–13.

[33] YANG Y, YING Y, VERMA S K, et al. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China [J]. *Vet Parasitol*, 2015, 211(3/4): 283–288.

[34] 章宁. γ -干扰素在泡球蚴感染小鼠中的作用研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学; 2020.

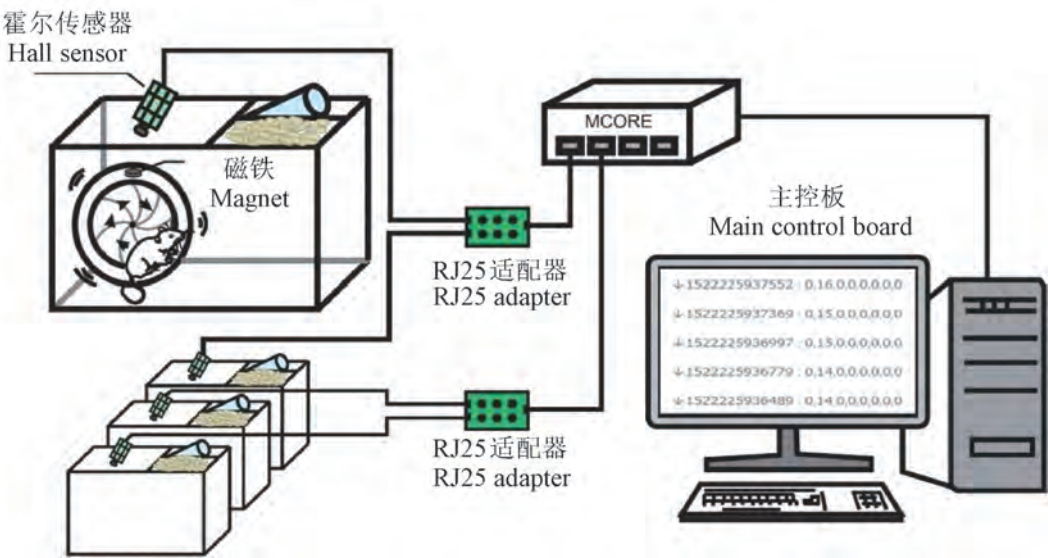
ZHANG N. Study on the effect of interferon- γ in mice with *Echinococcus multilocularis* infection [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University; 2020.

[收稿日期] 2024-10-16

用于生物钟研究的新型小动物运动活动记录装置

啮齿动物跑轮记录仪是研究昼夜节律的可靠方法。本研究展示了如何构建一个简单而智能的跑轮记录系统。跑轮安装在笼子的底座上,霍尔传感器则安装在笼子的盖子上。然后,RJ25 适配器将运行信号传输到主控板。最后,主控制板通过 USB 接口连接到计算机的 USB 端口。数据收集使用的是可在线访问的自创软件 Magturning。通过 Magturning,生成的数据被实时保存和导出。随后,通过收集小鼠在不同光照条件下的运动活动数据,对该装置进行了验证。总之,这个新装置可以记录啮齿动物的昼夜节律活动。我们的设备适用于与生物钟研究相关的跨学科调查。

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):71–76. doi: 10.1002/ame2.12381)。



倪玉芳,张璐娜,晏姝涵,等. 肾纤康调控 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路改善肾纤维化的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 501-511.

NI Y F, ZHANG L N, YAN S H, et al. ShenXiankang formula modulates the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway to ameliorate renal fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 501-511.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.004

肾纤康调控 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路 改善肾纤维化的研究

倪玉芳¹, 张璐娜¹, 晏姝涵², 李倩倩¹, 栗宏伟³, 胡琼丹⁴,
张琼⁴, 王丽¹, 李健春^{1*}

(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
中西医结合学院, 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肾病科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 评估中药复方肾纤康对肾损伤和纤维化的保护作用,并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)建立慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)小鼠模型,并随机分为假手术组、模型组及肾纤康低、高剂量组(1500、4500 mg/(kg·d)),每组 8 只。肾纤康各组每天灌胃不同剂量的肾纤康,其余小鼠灌胃等量的生理盐水,持续 7 d。实验结束后,收集肾组织,通过苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色评估肾损伤和纤维化。用 Real-time PCR、免疫组化和 Western Blot 检测纤维化标志物、上皮膜蛋白 3(epithelial membrane protein 3, Emp3)及 Tgf- β /Smad 信号通路相关蛋白的表达。细胞实验中,通过 Emp3 回复实验和 Co-IP 分析肾纤康对 Emp3/Tgf- β /Smad3 通路及其与转化生长因子 β 受体 2(TGF- β receptor R2, Tgf β 2)相互作用的影响。**结果** 肾纤康干预显著改善了 UUO 模型组中的免疫细胞浸润和肾小管萎缩,降低了肾损伤分子 1(kidney injury molecule 1, Kim1)和脂质运载蛋白 2(lipocalin 2, Lcn2)的表达,验证了其在减轻肾损伤方面的效果。Masson 染色及纤维化标志物纤连蛋白(fibronectin, Fn)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的检测结果显示,肾纤康能有效抑制 UUO 诱导的纤维化进程。机制研究发现,肾纤康通过特异性下调 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路的异常活化发挥作用,细胞实验进一步证实了肾纤康通过调节 Emp3 来影响 Tgf- β /Smad3 信号传导。Co-IP 实验结果显示,肾纤康通过调控 Emp3 与 Tgf β 2 的相互作用来发挥作用。**结论** 肾纤康对慢性肾病小鼠模型表现出显著的保护作用,能够有效减轻肾损伤和纤维化。其机制可能与下调 Emp3/Tgf- β /Smad3 信号通路的活化有关,提示肾纤康在肾保护方面具有潜在的治疗价值。

【关键词】 肾纤康;慢性肾病;肾纤维化;Emp3;Tgf- β /Smad3

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0501-11

ShenXiankang formula modulates the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway to ameliorate renal fibrosis

NI Yufang¹, ZHANG Luna¹, YAN Shuhan², LI Qianqian¹, SU Hongwei³,
HU Qiongdan⁴, ZHANG Qiong⁴, WANG Li¹, LI Jianchun^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金(82104665, 82205002), 四川省科技厅项目(2023NSFSC1763, 2022YFS0621)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82104665, 82205002), Sichuan Science and Technology Program (2023NSFSC1763, 2022YFS0621).

【作者简介】 倪玉芳,女,硕士,主管技师,研究方向:中西医结合防治器官纤维化。Email:niyufang@swmu.edu.cn

【通信作者】 李健春,男,博士,高级实验师,研究方向:中西医防治器官纤维化。Email:lijianchun@swmu.edu.cn

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

Corresponding author: LI Jianchun. E-mail: lijianchunchina@swmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the protective effects of the traditional Chinese medicine formula Shenxiankang on renal injury and fibrosis, and to explore its potential mechanisms of action. **Methods** Chronic kidney disease (CKD) model was established in mice using unilateral ureteral obstruction (UUO). The mice were randomly divided into four groups: sham, UUO, and Shenxiankang (SXX) Low/High dose groups (1500, 4500 mg/(kg·d)), each comprising eight mice. The each SXX groups received daily oral administration of Shenxiankang, and the remaining mice were gavaged equivalent volumes of saline for 7 d. After the experiment, renal tissues were collected for assessment of renal injury and fibrosis using HE and Masson staining. The expression levels of fibrosis markers and proteins involved in the epithelial membrane protein 3 (Emp3) and Tgf- β /Smad3 signaling pathway were determined by Real-time PCR, immunohistochemistry, and Western Blot. In cell-based experiments, the effects of Shenxiankang on the Emp3/Tgf- β /Smad3 pathway and its interaction with TGF-beta receptor R2 (Tgf β 2) were further analyzed using an Emp3 knockdown and Co-IP assays. **Results** Shenxiankang significantly reduced immune cell infiltration and tubular atrophy in the UUO model group and decreased the expression of kidney injury markers kidney injury molecule 1 (Kim1) and Lipocalin 2 (Lcn2), confirming its efficacy in alleviating renal injury. Masson staining and analysis of fibrosis markers Fibronectin (Fn) and α -smooth muscle actin (α -SMA) indicated that Shenxiankang effectively suppressed fibrosis induced by UUO. Mechanistic studies revealed that Shenxiankang exerted its effects by selectively downregulating the abnormal activation of the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway, a finding further supported by cellular experiments showing that Shenxiankang modulates Tgf- β /Smad3 signaling through Emp3 regulation. Moreover, the Co-IP experiment result indicate that Shenxiankang exerts its effects by regulating the interaction between Emp3 and Tgf β 2. **Conclusions** Shenxiankang exhibits significant protective effects in a mouse model of chronic kidney disease, effectively reducing renal injury and fibrosis. These effects are likely mediated through the downregulation of the Emp3/Tgf- β /Smad3 signaling pathway, suggesting Shenxiankang's potential therapeutic value in renal protection.

【Keywords】 ShenXiankang; chronic kidney disease; renal fibrosis; Emp3; Tgf- β /Smad3

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

慢性肾疾病 (chronic kidney disease, CKD) 是由多种因素引起的肾结构和功能损伤的非传染性疾病,其发病率和死亡率正在稳步上升^[1]。据 2019 年一项调查显示,中国 CKD 的总体患病率已高达 15.9% ~ 16.8%^[2]。肾纤维化 (renal fibrosis, RF) 是 CKD 发展过程中的关键病理特征,其主要表现为结缔组织在肾结构中的异常增生和沉积^[3]。在 CKD 患者中,肾纤维化是导致肾功能丧失的主要原因,并被视为终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 的重要病理特征^[4]。

大量研究表明,中医药在 CKD 的治疗中具有独特的优势,能够通过调整阴阳平衡、改善气血

循环及提供针对性治疗,有效延缓肾间质纤维化的进展^[5]。肾纤康是一种基于“肾内微癥积”理论的中药复方,已在临床上被证实对延缓肾纤维化具有显著效果,其作用机制可能与 TGF- β /Smad 信号通路密切相关^[6]。转化生长因子 β 受体 2 (TGF-beta receptor R2, Tgf β 2) 是 TGF- β /Smad 信号通路中启动信号传导的关键因子^[7],在肾纤维化过程中通过调控细胞转化、基质合成和纤维细胞的增生,发挥重要作用。当 TGF- β 与细胞表面的 Tgf β 2 结合后, Tgf β 2 会招募并激活 TGF- β 受体 1 (TGF-beta receptor R1, Tgf β 1),后者进一步磷酸化下游的 Smad3 蛋白。磷酸化的 Smad3 与

Smad4 结合形成复合物,随后转运至细胞核中,调控与纤维化、细胞生长及分化相关的基因表达,从而促进纤维化的发展^[8-9]。此前有研究表明,在肺癌细胞中上皮膜蛋白 3 (epithelial membrane protein 3, Emp3) 通过与 Tgf β 2 相互作用调节 Tgf β /Smad 信号通路活化,影响上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[10]。

基于此发现,本课题假设肾纤康改善 CKD 的潜在机制可能涉及通过调控 Tgf β 2 和 Emp3 相互作用,从而调控 Tgf β /Smad 信号通路的激活有关。为验证此假设,本研究建立了单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 模型,并检测了肾组织中的病理损伤、纤维化及 Tgf β /Smad 信号通路相关蛋白的变化。此外,本实验利用蛋白质免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 技术检测肾纤康对 Emp3 与 Tgf β 2 相互作用的影响,旨在明确肾纤康改善肾损伤的作用机制,为进一步的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 32 只,体重质量约为 25 g,由成都药康生物科技有限公司提供【SCXK(川)2022-034】,小鼠饲养于西南医科大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(川)2023-0065】。饲养条件为:温度(25 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C、湿度 50% ~ 60%、每天光照 12 h、给予充足的水和饲料。本实验严格遵循西南医科大学动物伦理委员会的指导方针并通过伦理审批(2022-1001-005),确保实验的伦理合规性。

1.1.2 细胞

小鼠肾小管上皮细胞 (transformed C3H mouse kidney-1, TCMK1, Cat#CL0440) 购于丰晖生物,人胚肾细胞 (293FT, Cat#BNCC342056) 购于北纳生物。

1.1.3 主要试剂与仪器

肾纤康购于西南医科大学附属中医医院制剂室(生大黄 9 g,水蛭 3 g,白花蛇舌草 12 g,淫羊藿 15 g,黄芪 30 g,当归 12 g,莪术 12 g);苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (C0105s)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012) 与 RIPA 裂解液 (P0013C) 购

于 Beyotime; Masson 三色染色液 (BA-4079B) 购于珠海贝索;免疫组化所用通用二步法试剂盒、DAB 显色液 (PV-9000、ZLI-9019) 购于中杉金桥;GFP 磁珠 (KTSM1334) 购于康体生命;Emp3 (Sc-518092) 购于 Santa Cruz; phospho-Smad3 (p-Smad3)、Smad3、phospho-Smad2 (p-Smad2)、Smad2 (AF1759、AF1501、AF2545、AF1300) 均购于 Beyotime; Gapdh (AB0037) 购于 Abways; Fn (T59537) 购于 abmart; α -SMA (23081-1-AP) 购于 proteintech。

实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher 公司);蛋白质电泳转印系统 (Bio-Rad); e-BLOT 化学发光成像系统 (易亨特生命科学); Nikon 正置光学显微镜 (日本尼康);石蜡组织切片机 (德国莱卡);全波长酶标仪 (杭州奥盛);超微量紫外分光光度计 (美国 Therm)。

1.2 方法

1.2.1 肾功能检测

收集 2024 年西南医科大学附属中医医院肾病科确诊 CKD 患者 20 例,在一个周期治疗阶段随机给予 10 例肾纤康干预作为肾纤康组,另外 10 例给予安慰剂 (原方稀释 15 倍的相同性状,气味的药品) 作为对照组。治疗前后收集患者空腹静脉血 5 mL,分离血清后检测肾功能指标 (血清肌酐、尿素氮、肾小球滤过率)。本研究通过西南医科大学附属中医医院伦理委员会批准 (KY2023020-FS01)。

1.2.2 动物造模及给药

小鼠经适应性喂养 1 周后随机分为 4 组:假手术 (Sham) 组、模型 (UUO) 组、肾纤康低、高剂量 (SXK-Low/High dose, 1500/4500 mg/(kg $\cdot$ d)) 组。除假手术组外,其余小鼠按照文献所述造单侧输尿管梗阻建立 CKD 模型^[11-12]。具体操作如下:根据小鼠体质量腹腔注射适量 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,备皮后切开背部皮肤,暴露左侧肾及输尿管,并用手术线将输尿管两端结扎,随后剪断输尿管中段。假手术组不进行输尿管结扎及剪断,其他操作与模型组一致。造模后,肾纤康低/高剂量组每天灌胃相应剂量的药物,连续 7 d。其余小鼠则灌胃等体积的生理盐水。实验结束后,麻醉并处死小鼠,收集肾组织的 1/4 进行石蜡包埋,而剩下的肾组织经液氮速冻后提取蛋

白和 RNA 进行后续实验分析。

1.2.3 病理染色与免疫组化

组织切片经脱蜡复水后进行病理染色和免疫组化。HE 染色按照试剂盒所述步骤进行,具体染色步骤:将组织浸于苏木素染料中 5 min,经 75%乙醇分色后马上用伊红染料染色 45 s,最后封片并在显微镜下观察肾小管损伤情况并采集具有代表性的图片。Masson 染色主要步骤:铁苏木素浸染 5 min、丽春红 10 min、磷钼酸分色 1 ~ 5 min、然后用甲苯胺蓝染色 1 ~ 5 min,最后用 1%冰醋酸清洗至没有蓝色染料流出为止。待切片风干后封片并在显微镜下观察胶原纤维染色情况,拍摄具有代表性的染色图片并使用 Image J 1.51 软件计算胶原纤维蓝染面积占总面积的百分比。免疫组化首先是将脱蜡复水后的切片放置在加热沸腾后的 pH = 6.0 柠檬酸三钠缓冲液中,并持续加热 10 min 进行抗原修复,冷却后滴加过氧化物酶孵育 20 min 阻断非特异性染色,然后用 5% BSA 封闭 30 min,滴加待测抗体 4 ℃孵育过夜。第 2 天根据 DAB 显色试剂盒进行抗体显色,然后经苏木素复染 20 s 后封片。最后在显微镜下观察并拍摄抗体表达位置(200 倍放大倍数),并用 Image J 1.51 软件计算抗体表达面积占总面积的百分比。

1.2.4 Real-time PCR 检测纤维化标志物、Emp3 及 Tgf-β/Smad 信号通路相关 mRNA 的表达

收集约 25 mg 肾组织,提取总 RNA,然后用紫外超微量分光光度计测定 RNA 浓度和质量。取 1 μg RNA,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,结合 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 和相应基因引物,配置 Real-time PCR 反应体系,PCR 设置条件为:95 ℃ 30 s 变性,然后设置(95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s)运行 40 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。以 *Gapdh* 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算靶基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.5 Western Blot 检测纤维化标志物、Emp3 及 Tgf-β/Smad 信号通路相关蛋白的表达

切取适当肾组织提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量蛋白浓度。SDS-PAGE 胶中每孔上样 30 μg 进行蛋白分离,通过湿转的方式将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上,然后用 5% BSA

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>Fn</i>	<i>Fn</i> -F	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT
	<i>Fn</i> -R	GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG
<i>α-SMA</i>	<i>α-SMA</i> -F	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA
	<i>α-SMA</i> -R	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
<i>Gapdh</i>	<i>Gapdh</i> -F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	<i>Gapdh</i> -R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

室温封闭 1 h,随后加入特异性一抗 4 ℃孵育过夜。按一抗抗体来源加入抗鼠/兔辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 5000),室温孵育 1 h。最后,使用 e-BLOT 化学发光成像分析系统对结果进行扫描分析,然后用 Image J 1.51 软件读取各条带灰度值,并以假手术组数值化为一做统计学分析。

1.2.6 TCMK1 培养与干预处理

取对数生长期的 TCMK1 细胞(10% FBS 的 DMEM 高糖培养基),经过计数稀释,使 100 μL 培养基中包含 8000 个细胞,每孔接种 100 μL 于 96 孔培养板中,分别加入 25 ~ 400 μg/mL 肾纤康药物处理,24 h 后检测细胞活力。每孔加入总培养基 1/10 体积的 CCK-8 试剂,37 ℃孵育 1 ~ 4 h 后,在 450 nm 波长检测 OD 值。此外,将 TCMK1 细胞接种于 6 孔板,并分为 4 组:对照(NC)、过表达(OE-*Emp3*)组、过表达 *Emp3* + 低浓度肾纤康(50(μg/mL))组和高浓度肾纤康(100(μg/mL))组。使用聚乙烯亚胺将 *mCherry-Emp3* 质粒转染至细胞中,转染 6 h 后分别加入不同浓度的肾纤康处理细胞。处理 42 h 后,收集细胞样品,并通过 Western Blot 分析蛋白表达水平,以验证药物干预的效果。

1.2.7 Co-IP 分析肾纤康对 Emp3/Tgf-β/Smad3 通路及其与 Tgfβ2 相互作用的影响

293FT 细胞(10% FBS 的 DMEM 高糖培养基)培养至 6 cm 细胞皿中,当细胞密度达到 60% ~ 70% 时,按照 PEI 转染试剂所述步骤将 *mCherry-Emp3* 和 *GFP-Tgfβ2* 共转染 6 h 后加入不同剂量肾纤康处理 42 h 收样。使用 1 mL Co-IP 裂解液(50 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,1% Triton,1 mmol/L EDTA,pH = 7.5)于冰上裂解

30 min。离心取上清与 GFP 磁珠在 4 ℃ 下旋转孵育 2 h,用裂解液洗涤 5 次。然后加入 50 μL 蛋白上样缓冲液重悬磁珠,95 ℃ 金属浴 10 min,离心取上清进行免疫印迹分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析,计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异性的比较,服从正态分布且方差齐则采用非配对 *t* 检验,多组数据采用单因素方差分析方法。各组资料不符合正态分布或方差不齐,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,若提示组间存在差异,进一步采用独立样本的非参数检验 (Mann-Whitney *U*) 进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 肾纤康对临床 CKD 患者肾功能和小鼠肾病理变化的影响

收集整理本研究纳入病例治疗前后血清肌酐、尿素氮和肾小球滤过率数据发现,肾纤康治疗后患者血清肌酐明显降低,并且其肾小球滤过率也得到明显改善 ($P < 0.001$),见图 1。根据 HE 染色结果显示,假手术组肾小球形态正常,肾小管管腔完整,而模型组肾小管明显扩张且上皮细胞脱落、肾小球皱缩或扩张使形态大小不一 ($P < 0.01$),这些变化符合 CKD 相关的病理特征。经肾纤康治疗后肾小管管腔扩张得到明显改善,且肾小球的形态也较模型均一,该变化具有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据免疫组化结果显示,与假手术组相比,模型组肾损伤标志物肾损伤分子-1 (kidney injury molecule-1, Kim1) 和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (lipocalin-2, Lcn2) 的表达显著上升 ($P < 0.001$),且主要表达于扩张的肾小管腔上;肾纤康治疗后,这些标志物的表达明显降低。Western Blot 结果进一步验证了免疫组化的发现。这些结果表明,肾纤康能够有效改善 CKD 小鼠的肾病理损伤,具有潜在的保护作用。

2.2 肾纤康对小鼠肾纤维化程度的影响

假手术组 Masson 染色组织结构清晰,少许蓝色胶原纤维沉积(图 2)。模型组肾间质中胶原纤维沉积显著增加,而肾纤康治疗后,蓝色的胶原纤维面积和强度均显著降低 ($P < 0.001$)。进一步的免疫组化分析显示,治疗组的纤维化标志物

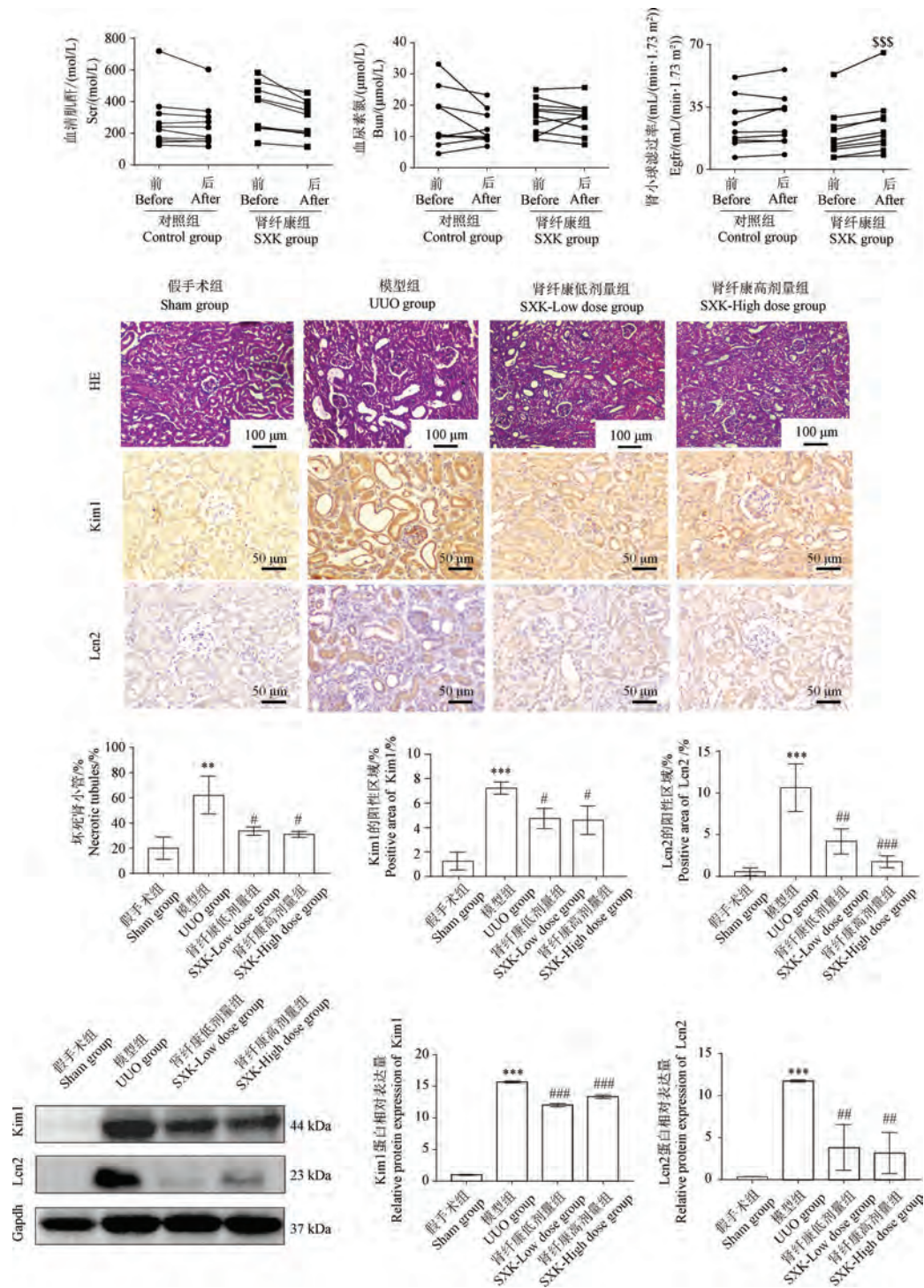
Fn 和 α-SMA 的表达水平也显著低于模型组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。同时, Real-time PCR 和 Western Blot 结果显示,在 RNA 和蛋白水平上,模型组 Fn 和 α-SMA 均明显高于假手术组,治疗后两个指标明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果表明,肾纤康处理能够有效减轻 CKD 小鼠的肾间质纤维化程度。

2.3 肾纤康对 CKD 小鼠肾 Emp3/Tgf-β/Smad3 信号通路的影响

Western Blot 结果显示(图 3),模型组 Tgf-β/Smad3 信号通路蛋白中的 Tgfβ2、Smad3 及 Smad2 磷酸化 (p-Tgfβ2、p-Smad3 及 p-Smad2) 水平明显增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。肾纤康干预呈现剂量依赖性降低 p-Tgfβ2 和 p-Smad3 水平的效果,而对 p-Smad2 水平没有显著影响。同时, Real-time PCR 和 Western Blot 结果显示,模型组 Emp3 的 RNA 和蛋白表达量显著高于正常组织,而肾纤康治疗后 Emp3 表达在 RNA 和蛋白水平上显著降低 ($P < 0.001$),在免疫组化水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。免疫组化结果进一步验证了这一发现,并显示 Emp3 主要表达于扩张的肾小管上皮细胞。以上结果表明,肾纤康能够选择性抑制 Tgf-β/Smad3 信号通路的异常激活,并减少 Emp3 的异常表达。

2.4 Emp3 过表达拮抗肾纤康对 Tgf-β/Smad3 信号通路及纤维化的调控作用

为进一步探讨肾纤康延缓 CKD 纤维化的机制是否与 Emp3/Tgf-β/Smad3 信号通路有关,作者在 TCMK1 细胞中过表达 Emp3,并检测肾纤康在 Emp3 过表达情况下的抗纤维化效果。首先,通过 CCK-8 实验确定了适当的药物处理浓度,结果显示肾纤康在 400 μg/mL 的浓度下未引起明显的细胞毒性(图 4)。在此基础上,作者在 TCMK1 细胞中过表达了 Emp3, Real-time PCR 和 Western Blot 结果发现 Emp3 过表达能促进纤维化标志物 Fn 的蛋白水平升高;在 Emp3 过表达的情况下,50、100 μg/mL 的肾纤康药物干预废除了其原有的抗纤维化效果。进一步检测 Emp3 对 Tgf-β/Smad3 信号通路的影响, Western Blot 结果进一步表明, Emp3 过表达显著增强了 p-Tgfβ2 和 p-Smad3 的水平。在 Emp3 过表达的情况下,50、100 μg/mL 的肾纤康干预不能减弱 Emp3 对 p-



注:与肾纤康治疗前相比, $^{***}P < 0.001$;与假手术组相比, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$;与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ 。(下图同)

图 1 肾纤康对临床 CKD 患者肾功能和小鼠肾病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. Compared with before SXX group, $^{***}P < 0.001$. Compared with Sham group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Compared with UUO group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of SXX on renal function in clinical CKD patients and renal pathological changes in CKD mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tgfβ2 和 p-Smad3 水平的抑制作用。综上所述, 肾纤康通过调控 Emp3, 抑制异常激活的 Tgfβ2/

Smad3 信号通路, 进而延缓了 TCMK1 细胞的纤维化进程。

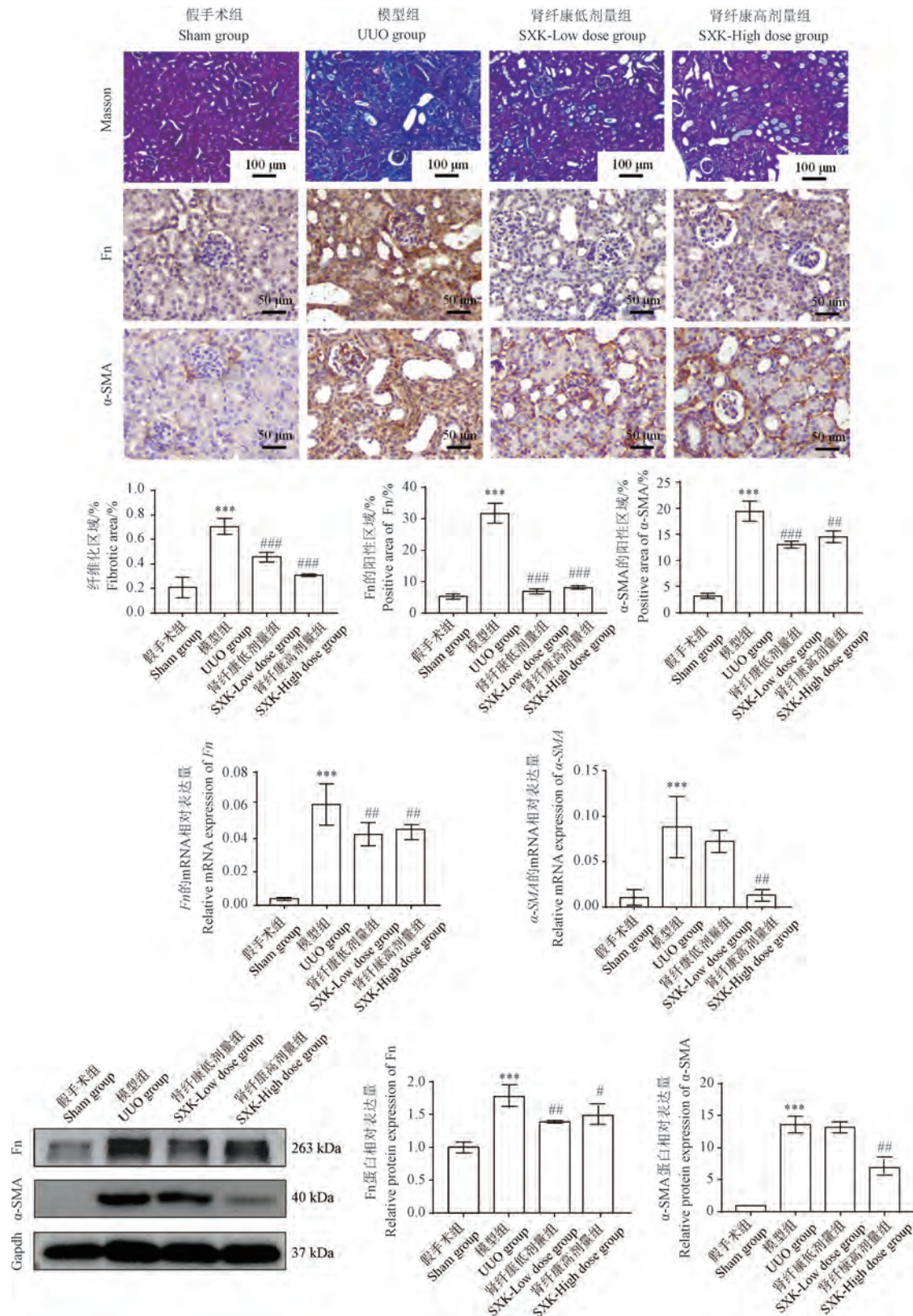


图 2 肾纤康延缓 CKD 小鼠肾纤维化的进程($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Figure 2 SXK delayed the progression of renal fibrosis in CKD mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.5 肾纤康干预调节 Emp3 与 Tgfβ2 相互作用

有研究表明, Emp3 在肺癌细胞中通过与

Tgfβ2 的相互作用调控 Tgf-β/Smad 信号通路的活化,进而影响上皮-间质转化^[10]。基于此,本课题

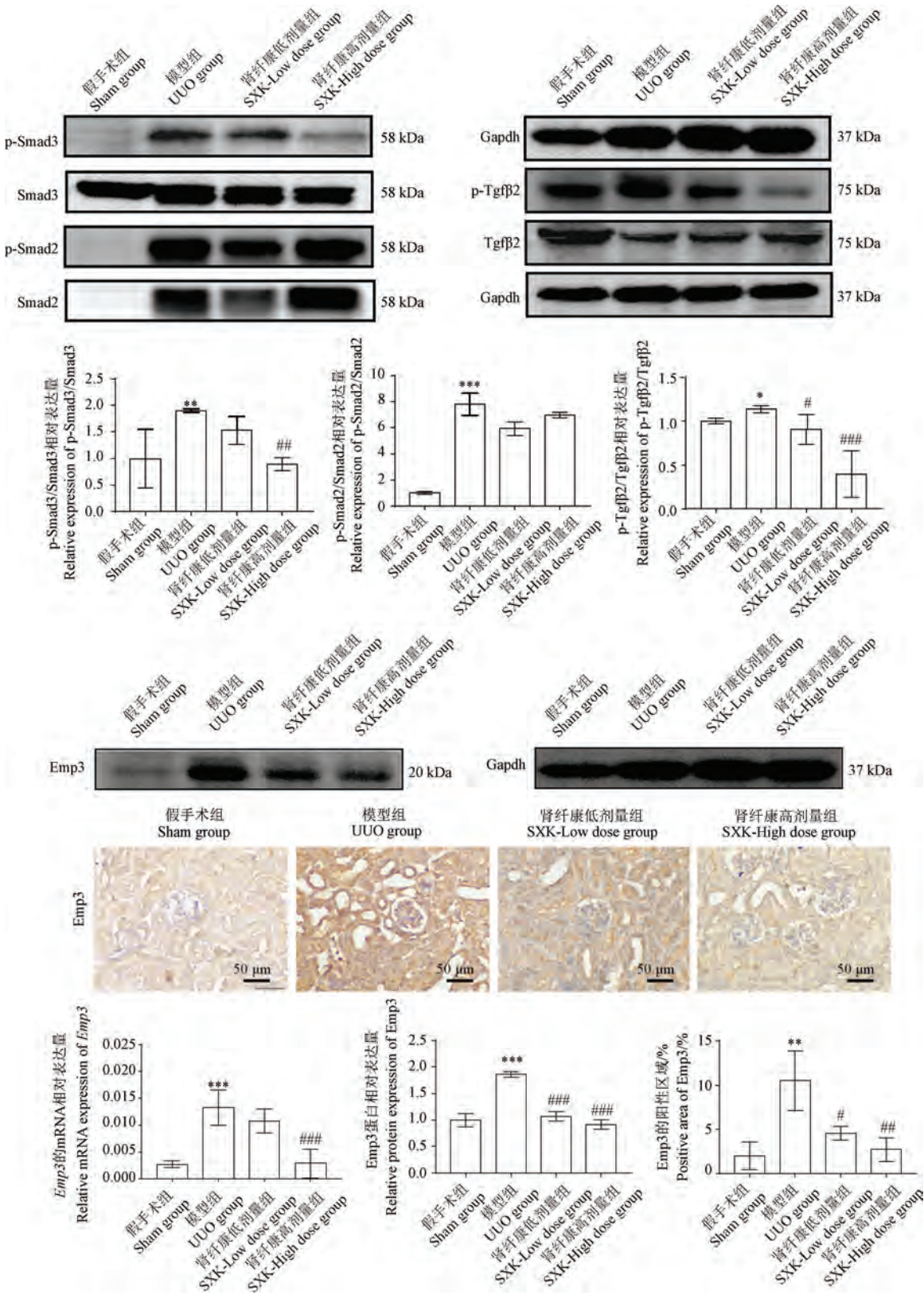
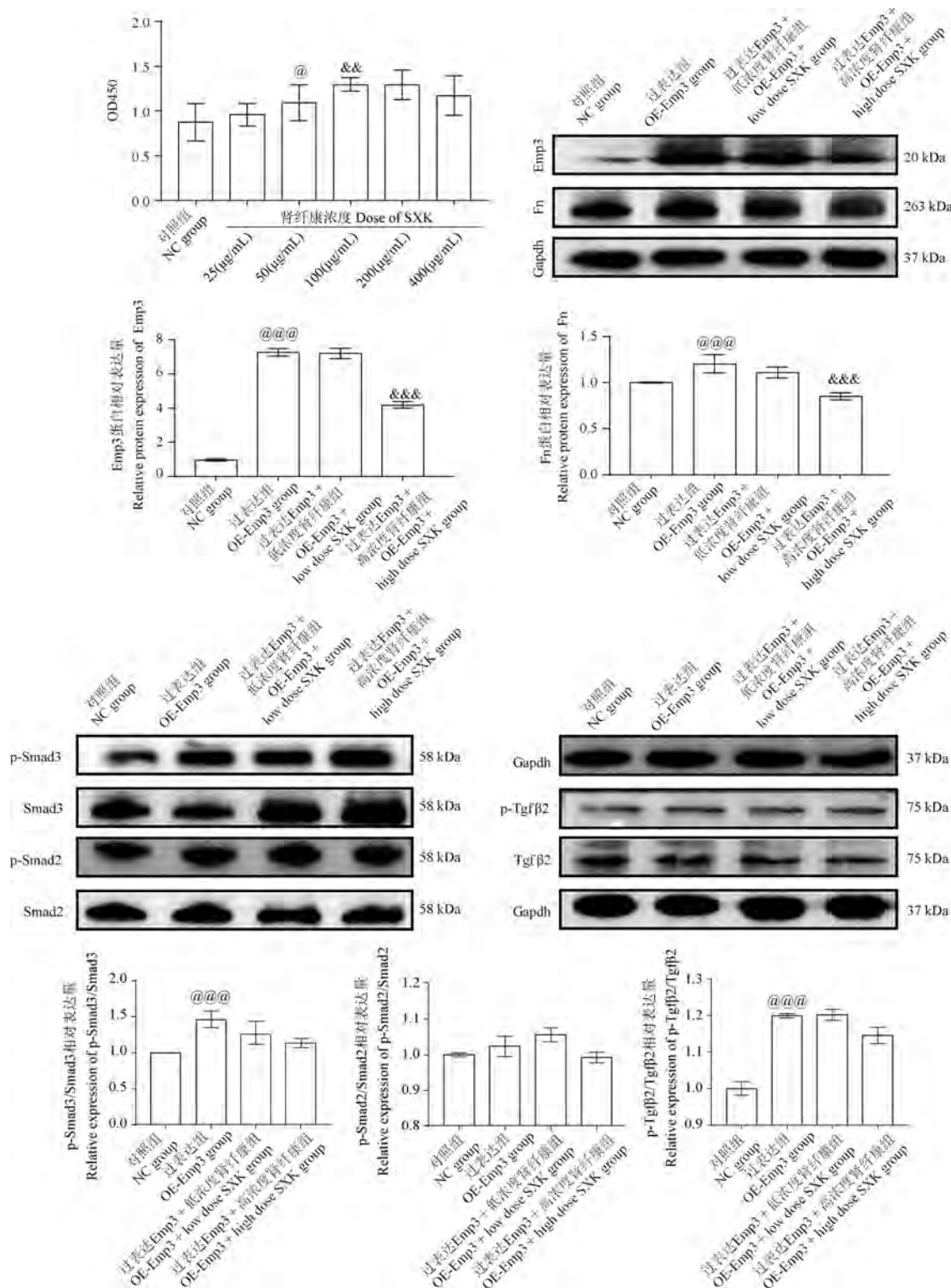


图 3 肾纤康抑制 CKD 小鼠肾 Emp3/Tgf-β/Smad3 通路蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Figure 3 SXK inhibited the protein expression of Emp3/Tgf-β/Smad3 pathway in kidney of CKD mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)



注:与 NC 组相比, $^* P < 0.05$, $^{***} P < 0.001$;与过表达组相比, $^{\&\&} P < 0.01$, $^{\&\&\&} P < 0.001$ 。(下同)

图 4 肾纤维康通过抑制 Emp3/Tgf-β/Smad3 信号激活来抑制细胞纤维化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with NC group, $^* P < 0.05$, $^{***} P < 0.001$. Compared with OE-Emp3 group, $^{\&\&} P < 0.01$, $^{\&\&\&} P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 SXX inhibited fibrosis by inhibiting Emp3/Tgf-β/Smad3 signaling activation($\bar{x} \pm s, n = 3$)

通过 Co-IP 实验进一步探讨了肾纤康在调控 Emp3 与 Tgf β 2 相互作用中的作用。实验结果揭示,Emp3 与 Tgf β 2 之间存在显著的相互作用,且

在肾纤康处理后,这种相互作用被显著抑制(图 5)。无论是高剂量还是低剂量的肾纤康,均表现出相似的抑制效果,表明该作用并未呈现出明显

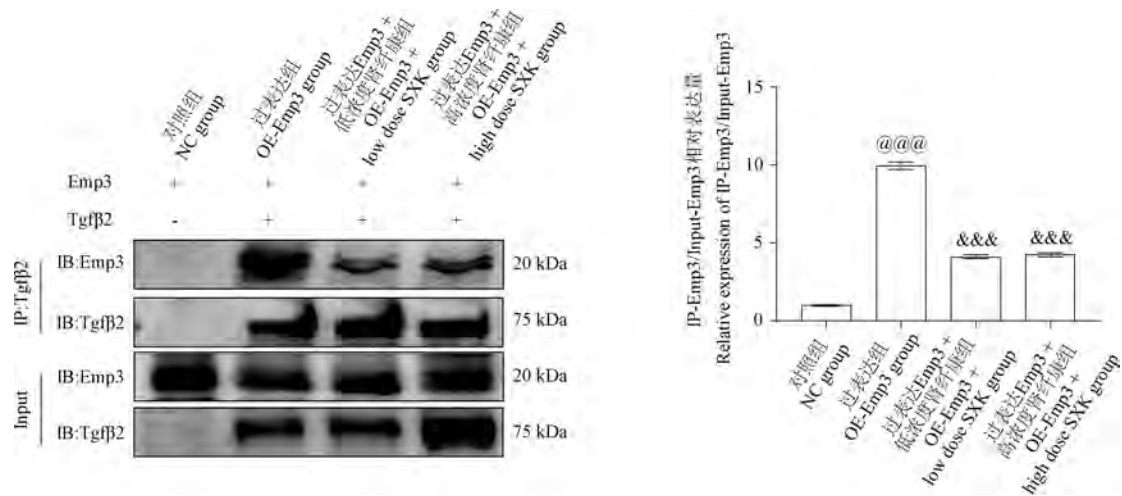


图 5 肾纤康抑制 Emp3 和 Tgf β 2 的相互作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 5 SXK inhibits the interaction between Emp3 and Tgf β 2($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的剂量依赖性。这一结果暗示,肾纤康在达到有效浓度后即可阻断 Emp3 与 Tgf β 2 的相互作用,且进一步增加药物剂量不会显著增强抑制。

3 讨论

CKD 已成为全球健康的重大负担,其发病率随着全球人口老龄化及慢性疾病增加而持续上升^[13]。RF 是导致肾功能逐步丧失的关键病理进程,当肾疾病进展至末期时可能需通过透析或肾移植来维持生命^[14]。因此,发展能够有效延缓或逆转 RF 的治疗策略对于改善 CKD 患者的生存质量和预后具有至关重要的意义。在此背景下,由于传统中药的独特治疗优势和较低副作用,其在 CKD 的治疗中日益受到关注^[15]。特别是肾纤康这一基于中药的复方制剂,在作者前期的研究中显示了显著的抗纤维化效果。

Tgf- β /Smad 信号通路在胚胎发育、免疫调节和组织修复中起关键作用,但其异常激活与癌症、纤维化等多种疾病密切相关^[16-17]。Tgf- β 与 Tgf β 2 结合后,激活 Tgf β r1,进而磷酸化 Smad 蛋白,形成 R-Smad/Co-Smad 复合物,进入细胞核调控基因转录。因此,Tgf β 2 的活化在这一信号通路的启动过程中至关重要。针对 Tgf β 2 的异常活化,调控其信号传递可能是抑制纤维化进程的关键

靶点之一。已有研究表明,Emp3 通过与 Tgf β 2 的相互作用,促进了 Tgf- β 信号的激活^[18]。在本研究中,课题组发现 Emp3 在 UUO 诱导的 CKD 模型中显著上调,而肾纤康干预能够显著调节 Emp3 的表达。这一发现提示肾纤康可能通过调控 Emp3/Tgf- β /Smad 信号通路发挥其抗纤维化作用。进一步通过 Real-time PCR、免疫组化和 Western Blot 实验,证实肾纤康在 UUO 模型中显著降低了 Emp3、p-Tgf β 2 和 p-Smad3 的表达,表明肾纤康有效抑制了异常激活的 Emp3/Tgf- β /Smad 信号通路。为了进一步验证这一机制,作者在 TCMK1 肾小管上皮细胞中过表达了 Emp3。结果显示,Emp3 过表达显著增加了纤维化标志物的表达,并上调了 p-Tgf β 2 和 p-Smad3 的水平。然而,在 Emp3 过表达的 TCMK1 细胞中,肾纤康的抗纤维化效果被废除。此外,通过 Co-IP 实验进一步确认,肾纤康不仅降低了 Emp3 和 Tgf β 2 的蛋白表达水平,还显著减弱了它们之间的相互作用,提示肾纤康在一定程度上通过调控 Emp3 与 Tgf β 2 的相互作用来发挥其抗纤维化作用。

总的来说,本课题的研究表明,肾纤康通过抑制 Emp3/Tgf β 2 相互作用及 Tgf- β /Smad 信号通路的异常激活,能够有效减缓肾纤维化。这一发现为肾纤康作为 CKD 治疗的潜在药物提供了新

的机制依据。然而,肾纤康作为一种复方制剂,含有多种生物活性成分,但其中具体作用于 Emp3 调控的机制仍有待进一步阐明。尽管本研究显示肾纤康能够显著降低 Emp3 的表达,并通过调控 Tgf- β /Smad 信号通路抑制肾纤维化,但这些生物活性成分如何具体作用于 Emp3 及其下游信号尚不明确。因此,未来的研究应进一步聚焦于肾纤康的关键成分,探讨它们在调控 Emp3 表达及信号传导中的作用机制,这将为更精准的药物开发提供依据。

参 考 文 献(References)

- [1] KOVESDY C P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022 [J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2022, 12(1): 7–11.
- [2] DUAN J, WANG C, LIU D, et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 10408.
- [3] HUANG R, FU P, MA L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 129.
- [4] ZHANG Y, JIN D, KANG X, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 696542.
- [5] WAN Y, FENG Y, LI M, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of chronic kidney diseases: theories, applications, and mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 917975.
- [6] 倪玉芳, 张璐娜, 张琼, 等. 肾纤康通过调节 Smad3 介导的铁死亡缓解 CKD 小鼠肾纤维化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(6): 1097–1104.
- NI Y F, ZHANG L N, ZHANG Q, et al. Shen-Xiankang formula alleviates renal fibrosis in chronic kidney disease mice by regulating Smad3-mediated ferroptosis [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2024, 40(6): 1097–1104.
- [7] ZHOU X, LI X, WANG R, et al. Recruitment of LEF1 by Pontin chromatin modifier amplifies TGF β 2 transcription and activates TGF β /SMAD signalling during gliomagenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 818.
- [8] MASSAGUÉ J, SHEPPARD D. TGF- β signaling in health and disease [J]. *Cell*, 2023, 186(19): 4007–4037.
- [9] FAROOQI A A, PINHEIRO M, GRANJA A, et al. EGCG mediated targeting of deregulated signaling pathways and non-coding RNAs in different cancers: focus on JAK/STAT, Wnt/ β -catenin, TGF/SMAD, NOTCH, SHH/GLI, and TRAIL mediated signaling pathways [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 951.
- [10] KAHM Y J, KIM R K, JUNG U, et al. Epithelial membrane protein 3 regulates lung cancer stem cells via the TGF- β signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2021, 59(4): 80.
- [11] LI J, WANG L, TAN R, et al. Nodakenin alleviated obstructive nephropathy through blunting Snail1 induced fibrosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9752–9763.
- [12] 庄子锐, 王明亮, 张婷, 等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 845–852.
- ZHUANG Z R, WANG M L, ZHANG T, et al. Research progress and evaluation of animal models of hepatorenal fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(6): 845–852.
- [13] HU J, KE R, TEIXEIRA W, et al. Global, regional, and national burden of CKD due to glomerulonephritis from 1990 to 2019: a systematic analysis from the global burden of disease study 2019 [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2023, 18(1): 60–71.
- [14] SHAO G, ZHU S, YANG B. Applications of herbal medicine to treat autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 629848.
- [15] 段艳华, 陈云祥, 郑高利, 等. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提取物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 10–19.
- DUAN Y H, CHEN Y X, ZHENG G L, et al. Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine-induced renal injury through inhibiting TGF- β 1/Smad signaling [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 10–19.
- [16] YANG J, WANG M, ZHU F, et al. Putative endothelial progenitor cells do not promote vascular repair but attenuate pericyte-myofibroblast transition in UUO-induced renal fibrosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 104.
- [17] SHU G, DAI C, YUSUF A, et al. Limonin relieves TGF- β -induced hepatocyte EMT and hepatic stellate cell activation *in vitro* and CCl₄-induced liver fibrosis in mice via upregulating Smad7 and subsequent suppression of TGF- β /Smad cascade [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 107: 109039.
- [18] JUN F, HONG J, LIU Q, et al. Epithelial membrane protein 3 regulates TGF- β signaling activation in CD44-high glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 14343–14358.

[收稿日期] 2024-09-20

陈宇,施佳君,富丹婷,等. 抑肝扶脾汤调控 PKA/PKC-CREB 通路修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 512-521.

CHEN Y, SHI J J, FU D T, et al. Mechanistic study of Yigan Fupi decoction-mediated repair of the intestinal barrier and reduction of IBS sensitivity through regulation of the PKA/PKC-CREB pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 512-521.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.005

抑肝扶脾汤调控 PKA/PKC-CREB 通路修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的机制研究

陈宇¹, 施佳君¹, 富丹婷¹, 杨钦钦¹, 傅睿¹, 朱佳杰^{1,2}, 朱明锦^{1,2},
刘忻颖^{1,2}, 陈明显^{1,2*}

(1. 浙江省中医药研究院, 杭州 310007; 2. 浙江中医药大学附属省立同德医院, 杭州 310007)

【摘要】 目的 研究抑肝扶脾汤 (Yigan Fupi decoction, YGFP) 对肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 的改善作用, 并从 PKA/PKC-CREB 通路深入研究其修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的作用机制。**方法** 将母婴分离后的大鼠随机分为模型对照 (M) 组、抑肝扶脾汤 (YGFP) 组和未母婴分离的大鼠作为正常对照 (N) 组, YGFP 组予 YGFP 连续 4 周。腹壁撤退反射 (abdominal withdraw reflex, AWR) 评估肠道敏感性, LC-MS/MS 法检测胆汁酸代谢物浓度, ELISA 法检测 IL-6 和 CXCL1 的血清水平, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察结肠病理学变化, Western Blot 和免疫组化检测 PKA、PKC、CREB、5HT2AR、5-HT7R、ZO-1、Claudin 1 的蛋白相对表达。**结果** 与 N 组比, M 组的内脏疼痛阈值降低, 总胆汁酸代谢物、IL-6 和 CXCL1 含量明显升高, PKA、PKC、CREB、5HT2AR、5-HT7R 蛋白相对表达显著升高, ZO-1、Claudin 1 的蛋白相对表达明显下降。与 M 组相比, 抑肝扶脾汤可显著增加 IBS 大鼠的内脏疼痛阈值, 显著降低总胆汁酸代谢物、IL-6 和 CXCL1 含量, 使 PKA、PKC、CREB、5HT2AR、5-HT7R 蛋白相对表达明显降低, ZO-1、Claudin 1 的蛋白相对表达升高。**结论** 抑肝扶脾汤可有效改善 IBS, 其机制可能是通过调控 PKA/PKC-CREB 通路修复肠道屏障降低其敏感性实现的。

【关键词】 抑肝扶脾汤; 肠道屏障; IBS 敏感性; PKA/PKC; CREB

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0512-10

Mechanistic study of Yigan Fupi decoction-mediated repair of the intestinal barrier and reduction of IBS sensitivity through regulation of the PKA/PKC-CREB pathway

CHEN Yu¹, SHI Jiajun¹, FU Danting¹, YANG Qinqin¹, FU Rui¹, ZHU Jiajie^{1,2},
ZHU Mingjin^{1,2}, LIU Xinying^{1,2}, CHEN Mingxian^{1,2*}

(1. Zhejiang Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2. Provincial Tongde Hospital Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

Corresponding author: CHEN Mingxian. E-mail: chenmingxian2005@163.com

【Abstract】 Objective To study the therapeutic effects of Yigan Fupi decoction (YGFP) on irritable bowel syndrome (IBS) and its mechanism of action in repairing the intestinal barrier and reducing IBS sensitivity through the

【基金项目】 浙江省科技厅 2024 年院所专项 (YSZX2401), 浙江省自然科学基金 (LY21H270003, ZCLMS25H2701)。

Funded by Zhejiang Provincial Department of Science and Technology Research Institute Support Program 2024 (YSZX2401), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY21H270003, ZCLMS25H2701)。

【作者简介】 陈宇, 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 动物医学。Email: blow2000@163.com

【通信作者】 陈明显, 男, 博士, 主任中医师, 研究方向: 中医脾胃病。Email: chenmingxian2005@163.com

PKA/PKC-CREB pathway. **Methods** Baby rats separated from their mother were randomly divided into a model control (M) and a YGFP group, while baby rats without maternal separation were used as a normal control (N) group. The YGFP group was given YGFP for 4 weeks. Abdominal withdrawal reflex was used to evaluate intestinal sensitivity. Liquid chromatography tandem mass spectrometry and ELISA were used to detect bile acid metabolite concentrations and serum levels of interleukin (IL)-6 and CXCL1, respectively. HE staining was used to observe pathological changes in the colon, and Western Blot and immunohistochemistry were used to analyze the relative protein expression levels of PKA, PKC, CREB, 5HT2AR, 5-HT7R, ZO-1, and Claudin 1. **Results** Compared with the normal control group, the M group showed a significantly decreased visceral pain threshold, significantly increased levels of total bile acid metabolites, IL-6, and CXCL1, significantly increased relative expression of PKA, PKC, CREB, 5HT2AR, and 5-HT7R, and significantly decreased relative expression of ZO-1 and Claudin 1. Compared with the M group, the YGFP group showed a significantly increased visceral pain threshold, significantly reduced levels of total bile acid metabolites, IL-6, and CXCL1, significantly reduced relative expression of PKA, PKC, CREB, 5HT2AR, and 5-HT7R, and increased relative expression of ZO-1 and Claudin 1. **Conclusions** YGFP effectively improved IBS through a mechanism that may involve repair of the intestinal barrier and reduced sensitivity through the PKA/PKC-CREB pathway.

【Keywords】 Yigan Fupi decoction; intestinal barrier; IBS sensitivity; PKA/PKC; CREB

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

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是在没有明显器质性病变的情况下,伴排便习惯或大便形态改变的慢性复发性腹部不适甚至腹痛^[1],对患者的生活质量有重大影响,影响全球 5% ~ 10% 的普通人群^[2]。其发病机制尚不十分清楚,目前的研究认为其与肠道动力异常、肠道菌群紊乱、脑肠轴异常、肠道轻度炎症、内脏高敏感和精神心理等极为相关^[3]。临床上西医治疗 IBS 主要为对症治疗,疗效不甚满意,中医药对其治疗具有一定的优势。其中抑肝扶脾汤(Yigan Fupi decoction, YGFP)是陆拯教授治疗腹泻型 IBS 的验方,临床使用已达 30 余年^[4]。前期的临床观察研究表明,YGFP 能有效缓解肠道症状,改善大便秘结和频率,改善肝气乘脾证候^[5]。在良好的临床疗效的基础上,本研究通过母婴分离建立 IBS 大鼠模型,以蛋白激酶(protein kinase, PK)A/PKC-环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)通路为切入点,进一步研究 YGFP 修复肠道屏障降低 IBS 敏感性的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雌性 SPF 级 12 周龄 SD 孕鼠 13 只,孕 17 ~

18 d, 体质量 230 ~ 250 g, 从杭州医学院购买【SCXK(浙)2024-0002】,于浙江省中医药研究院 SPF 级屏障实验室饲养【SYXK(浙)2024-0010】,环境温度:22 ~ 26 °C,湿度:40% ~ 70%,光照:12 h 明暗交替(7:00 ~ 19:00),并在实验中按实验动物“3R”原则给予人道关怀,动物伦理经浙江省中医药研究院实验动物伦理委员会审查通过(浙中研动物伦理审字第[2021]016号)。

1.1.2 实验药物

抑肝扶脾汤:按《天癸病论与临床》,由炒白芍、炒白术、炒黄连、吴茱萸、升麻炭、合欢皮组成^[6],每剂含生药 60 g,原料药主要来源于桐君堂药业有限公司、华东医药股份有限公司、英特药业有限责任公司,由中药房余平主任中药师鉴定质控,汤剂由本院制剂室通过煎煮法制备,水提 2 次,过滤,浓缩至含生药 1 g/mL,分装灭菌,冷藏备用。以芍药苷、小檗碱作为质控标准,通过薄层色谱检测含量,按《中国药典》2020 年版合剂项下相对密度、微生物、pH 值等检测保证汤剂质量^[7]。

1.1.3 主要试剂与仪器

PKA 一抗(4782)购于 CST 公司;PKC 一抗(ab181558)、CREB 一抗(ab32515)均购于 abcam 公司;5-羟色胺 2A 受体(5-hydroxytryptamine report 2A, 5-HT2AR)(PA5-95288)、5-HT7R

(MA5-37958)、闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) (40-2200)、闭合蛋白 1 (senescence-associated epithelial membrane protein 1, Claudin 1) (37-4900) 均购于赛默飞公司; GAPDH (60009-1-AP) 购于 proteintech 公司; 二抗购于中杉金桥公司; HPLC 级乙腈 (A998-4)、HPLC 级甲醇 (A452-4)、LCMS 级纯净水 (W6-4) 均购于 fisher 公司; 大鼠白介素 (interleukins, IL)-6 酶联免疫吸附测定试剂盒 (E-EL-R0016c)、大鼠趋化因子 (CXC 基序) 配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1 gene, CXCL1) (IL-8 类似物) 酶联免疫吸附试剂盒 (E-EL-R0003c) 均购于 Elabscience 公司。电泳仪 (BIO-RAD 公司), 电转仪 (大连竞迈科技有限公司), 酶标仪 (芬兰雷勃), 成像系统 (Tanon 公司), 液相质谱联用仪 (AB SCIEX 公司), 冷冻研磨仪 (上海万柏生物), 切片机 (徕克公司), 摊片机 (徕克公司), 正置显微镜 (NIKON 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

新生 SD 乳鼠, 出生第 2 天起进行母婴分离 3 h, 每天 9:00 ~ 12:00, 连续 2 周, 第 21 天断奶 (与母鼠分笼), 筛选出雄性 SD 大鼠, 随机分为模型对照组 (M 组) 和抑肝扶脾汤组 (YGFP 组), 未母婴分离的雄性 SD 大鼠作为正常对照组 (N 组), 每组 6 只。饲养至 6 周后 YGFP 组予抑肝扶脾汤 18 g/(kg·d) (相当于成人剂量的 18 倍), 连续 4 周, M 组和 N 组予等量纯水。

1.2.2 肠道敏感性评估

于造模后和治疗结束后分别评价一次肠道敏感性。参考文献^[3]采用直肠刺激法引起腹壁撤退反射 (abdominal withdraw reflux, AWR) 进行敏感性评估。在实验前及干预后以自制结直肠测压计对各组大鼠分别进行内脏敏感性评价。测定前大鼠禁食不禁水 18 h, 并轻触其肛门部, 使其排尽大便后, 将球囊涂抹石蜡油润滑后塞入肛门约 7 cm, 在肛门外 1 cm 处用医用胶带将其固定在大鼠尾根部, 然后将大鼠置于 18 cm × 8 cm × 6 cm 的特制小笼中, 使其不得转头; 待其完全平静后慢慢向气囊内充气, 观察大鼠腹壁对肠腔球囊扩张刺激的反应。分别记录引起大鼠腹部抬起时的压力值, 每次扩张持续 20 s, 连续测 3 次取平均值, 每次间隔至少 4 min。

1.2.3 血清学检测

ELISA 检测 IL-6 和 CXCL1 的血清学水平。

1.2.4 胆汁酸检测

将肠道内容物经专业处理后制得肠内容物样品, 采用 UPLC-QTOF-MS/MS 对样品中的目标物进行定性定量检测, 具体参数如下: 色谱条件: ExionLC AD system, Waters BEHC18 (150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 液相色谱柱, 柱温 40 °C, 进样量为 5 μL。流动相 A (0.1% 甲酸-水溶液), 流动相 B (0.1% 甲酸-乙腈)。质谱条件: AB SCIEX QTRAP 6500+, 采用负模式检测, Curtain Gas (CUR) 为 35, Collision Gas (CAD) 为 Medium, IonSpray Voltage (IS) 为 -4500, Temperature (TEM) 为 500, Ion Source Gas1 (GS1) 为 40, Ion Source Gas2 (GS2) 为 50。在 AB Sciex 定量软件 OS 中采用默认参数对各离子碎片进行自动识别和积分, 并辅助人工检查。以分析物的质谱峰面积与内标峰面积比值为纵坐标 (y), 以分析物的浓度为横坐标 (x) 绘制线性回归标准曲线, 所有指标的线性 R^2 大于 0.99。各胆汁酸的线性方程如下: 甘氨酸胆酸, $y = 0.057\,03x - 9.017\,54e^{-4}$; 甘氨酸鹅脱氧胆酸, $y = 0.055\,23x + 0.127\,75$; 牛磺胆酸, $y = 0.070\,78x + 0.096\,51$; 牛磺鹅脱氧胆酸, $y = 0.080\,42x + 0.113\,08$; 甘氨酸熊脱氧胆酸, $y = 0.060\,40x + 0.006\,73$; 别胆酸, $y = 0.009\,43x - 9.041\,40e^{-4}$; 熊脱氧胆酸, $y = 0.021\,27x + 0.002\,34$; 脱氧胆酸, $y = 0.020\,12x + 5.268\,93e^{-4}$; 牛磺熊脱氧胆酸, $y = 0.109\,43x - 8.540\,28e^{-4}$; 猪脱氧胆酸, $y = 0.018\,80x + 0.001\,35$; 原胆酸, $y = 0.017\,60x - 0.002\,33$; 甘氨酸脱氧胆酸, $y = 0.058\,79x + 0.004\,11$; 甘氨酸石胆酸, $y = 0.076\,78x - 0.001\,43$; α -鼠胆酸, $y = 0.005\,83x - 0.001\,52$; β -鼠胆酸, $y = 0.001\,57x + 2.923\,87e^{-4}$; 7-酮基石胆酸, $y = 0.028\,50x + 5.045\,40e^{-4}$; 牛磺- α -鼠胆酸, $y = 0.059\,58x + 0.005\,76$; 牛磺- β -鼠胆酸, $y = 0.177\,11x - 4.024\,60e^{-4}$; ω -鼠胆酸, $y = 0.003\,54x + 2.240\,29e^{-4}$; 鼠脱氧胆酸, $y = 0.016\,96x + 0.004\,54$; 牛磺猪脱氧胆酸, $y = 0.157\,85x + 0.008\,09$; 牛磺猪胆酸, $y = 0.083\,80x + 0.007\,69$; 牛磺石胆酸, $y = 0.136\,39x + 6.640\,92e^{-4}$; 牛磺脱氧胆酸, $y = 0.113\,95x + 0.013\,35$; 石胆酸, $y = 0.071\,65x - 8.515\,17e^{-5}$; 胆酸, $y = 0.020\,24x$

+ 0.002 37; 鹅脱氧胆酸, $y = 0.031\ 60x + 0.005\ 21$; 猪胆酸, $y = 0.007\ 25x + 0.002\ 48$; 23-脱甲胆酸, $y = 0.017\ 42x - 5.336\ 26e^{-4}$; 甘氨酸猪胆酸, $y = 0.037\ 13x - 0.002\ 17$; 23-脱甲脱氧胆酸, $y = 0.014\ 46x - 0.001\ 64$; 异石胆酸, $y = 0.023\ 88x + 0.001\ 63$; 12-酮基石胆酸, $y = 0.025\ 57x + 0.001\ 64$; 脱氢石胆酸, $y = 2.001\ 28x + 0.117\ 12$; 石胆酸-3-硫酸, $y = 0.116\ 72x - 0.004\ 69$; 鹅去氧胆酸-3 β -葡萄糖醛酸, $y = 0.023\ 97x - 0.001\ 72$; 3 β -熊脱氧胆酸, $y = 0.019\ 67x - 0.002\ 09$; 3-脱氢胆酸, $y = 0.036\ 45x + 0.001\ 83$; 鹅去氧胆酸-24-酰基- β -D-葡萄糖醛酸, $y = 0.018\ 37x + 0.002\ 69$; 12-氧代鹅去氧胆酸, $y = 0.003\ 60x - 1.291\ 66e^{-4}$; 7,12-二酮基石胆酸, $y = 0.001\ 76x + 2.154\ 05e^{-4}$; 脱氢胆酸, $y = 0.013\ 90x + 8.738\ 55e^{-4}$; 熊果胆酸, $y = 0.012\ 08x + 3.284\ 91e^{-4}$; 7-酮基脱氧胆酸, $y = 0.018\ 40x + 4.446\ 72e^{-4}$; 异脱氧胆酸, $y = 0.016\ 09x + 0.010\ 10$; 3 β -胆酸, $y = 0.016\ 16x + 0.004\ 54$; 牛磺- ω -鼠胆酸, $y = 0.070\ 89x + 0.004\ 13$ 。样本浓度计算:将样品分析物的质谱峰面积与内标峰面积比值,代入线性方程中,计算浓度结果。

1.2.5 大鼠结肠病理学观察

取大鼠结肠部分置于 10% 中性甲醛溶液中固定后,经脱水、透明、浸蜡、包埋后制成蜡块后,用切片机切成 4 μm 薄片,行苏木素-伊红(HE)染色,观察结肠组织的病理改变。

1.2.6 大鼠回肠、结肠的蛋白定量检测

提取回肠、结肠总蛋白并蛋白定量,于制备好的 PAGE 胶上每孔上样约 20 μg 蛋白,经电泳、转膜、染色、封闭、抗体孵育、显色后将其放入成像系统中进行扫描分析。

1.2.7 大鼠回肠、结肠的免疫组化染色

切片经烤片、脱蜡、水化、抗原修复、阻断、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、苏木素染色、透明和封片,采集样本相关部位,计算阳性面积比例。

1.3 统计学分析

所有数据用平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,使用 SPSS 22.0、Image-Pro Plus 6.0 对数据和图片统计分析,运用 ANOVA 单因素方差分析以及多组间数据比较,组间比较采用 LSD 分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 肠道敏感性评价

与 N 组相比, M 组内脏疼痛阈值均显著降低 ($P < 0.01$), 予抑肝扶脾汤后, 大鼠的内脏疼痛阈值较 M 组明显升高 ($P < 0.05$), 提示抑肝扶脾汤给药后可显著降低大鼠的内脏敏感性(见表 1)。

表 1 各组大鼠造模后 AWR 阈值 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$, mmHg)

组别 Groups	内脏疼痛阈值 Visceral pain threshold prior to dosing	给药后内脏疼痛阈值 Visceral pain threshold after dosing
N 组 N group	75.33 $\pm$ 3.15	76.33 $\pm$ 2.69
M 组 M group	60.17 $\pm$ 2.23 **	60.33 $\pm$ 2.97 **
YGFP 组 YGFP group	60.33 $\pm$ 2.13 **	70.00 $\pm$ 2.36 #

注:与 N 组相比, ** $P < 0.01$; 与 M 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

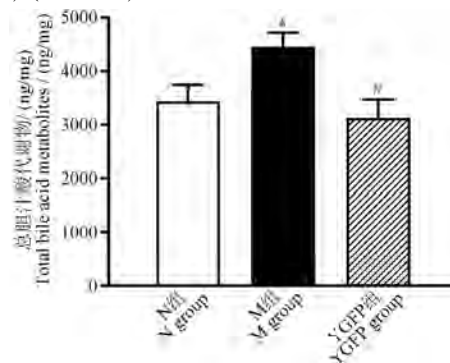
Note. Compared with N group, ** $P < 0.01$. Compared with M group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

2.2 胆汁酸检测

如图 1, M 组的总胆汁酸代谢物浓度较 N 组明显增加 ($P < 0.05$), YGFP 组较 M 组显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 血清中 IL-6 和 CXCL1 含量变化

与 N 组相比, M 组的 IL-6 和 CXCL1 含量显著升高 ($P < 0.01$), YGFP 组较 M 组显著降低 ($P < 0.01$) (见图 2)。



注:与 N 组相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 总胆汁酸代谢物浓度 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

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

Figure 1 Total bile acid metabolite concentration ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

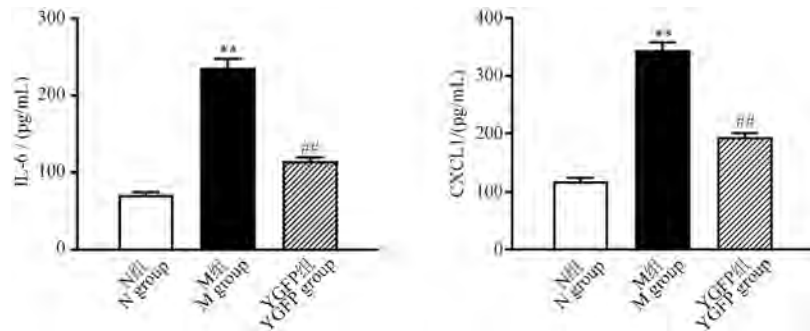


图 2 血清中 IL-6 和 CXCL1 含量($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)
Figure 2 Serum levels of IL-6 and CXCL1($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

2.4 大鼠结肠病理学观察

HE 染色显示, M 组大鼠结肠黏膜组织少量炎症细胞浸润, 未见结构损伤; YGFP 组炎症细胞浸润较 M 组明显降低, 未见形态损伤(见图 3)。

2.5 大鼠回肠、结肠 PKA 和 PKC 的蛋白表达

与 N 组相比, M 组大鼠结肠的 PKA 蛋白表达明显增加($P < 0.05$), 回肠的 PKA 蛋白表达有

增加趋势($P > 0.05$), 回肠和结肠的 PKC 蛋白表达均显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$), 予 YGFP 后大鼠结肠和回肠的 PKA 及结肠的 PKC 蛋白表达均有降低趋势($P > 0.05$), 回肠的 PKC 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)(见图 4)。

通过对回肠、结肠的免疫组化图分析可知, M 组较 N 组回肠、结肠的 PKA、PKC 的表达明显升

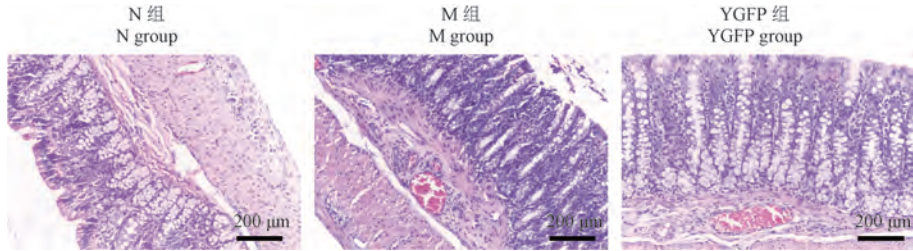


图 3 结肠 HE 染色
Figure 3 HE staining of colon

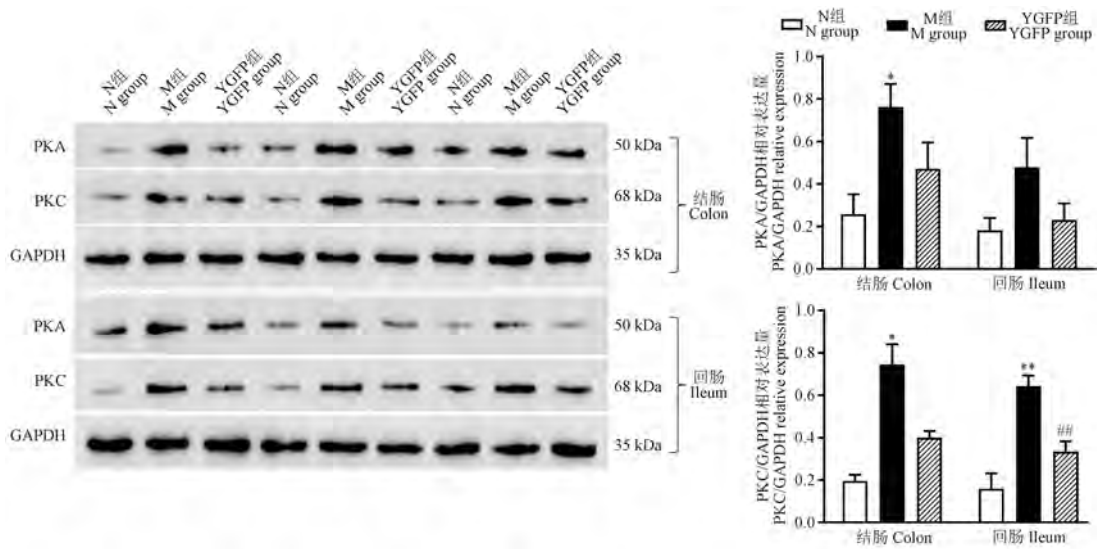


图 4 回肠、结肠 PKA 和 PKC 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)
Figure 4 Relative protein expression of PKA and PKC in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

高($P < 0.01$), 予 YGFP 后表达明显降低($P < 0.01, P < 0.05$), (见图 5)。

2.6 大鼠回肠、结肠 CREB 的蛋白表达

如 Western Blot 结果所示, 与 N 组相比, M 组大鼠回肠、结肠的 CREB 蛋白表达明显增加($P < 0.05$), YGFP 组大鼠回肠的 CREB 蛋白表达显著降低($P < 0.05$) (图 6)。

如免疫组化分析所示, 与 N 组相比, M 组大鼠回肠、结肠的 CREB 蛋白表达明显增加($P < 0.01$), YGFP 组大鼠结肠的 CREB 蛋白表达显著

降低($P < 0.05, P < 0.01$) (图 7)。

2.7 大鼠回肠、结肠 5HT_{2A}R 和 5-HT₇R 的蛋白表达

与 N 组相比, M 组大鼠回肠、结肠的 5-HT_{2A}R 和 5-HT₇R 蛋白表达明显增加($P < 0.01$), 予 YGFP 后大鼠结肠和回肠的 5-HT_{2A}R 和 5-HT₇R 蛋白表达显著降低($P < 0.01, P < 0.05$) (见图 8)。

如图 9 通过对回肠、结肠的免疫组化图分析可知, M 组较 N 组回肠、结肠的 5-HT_{2A}R、5-HT₇R

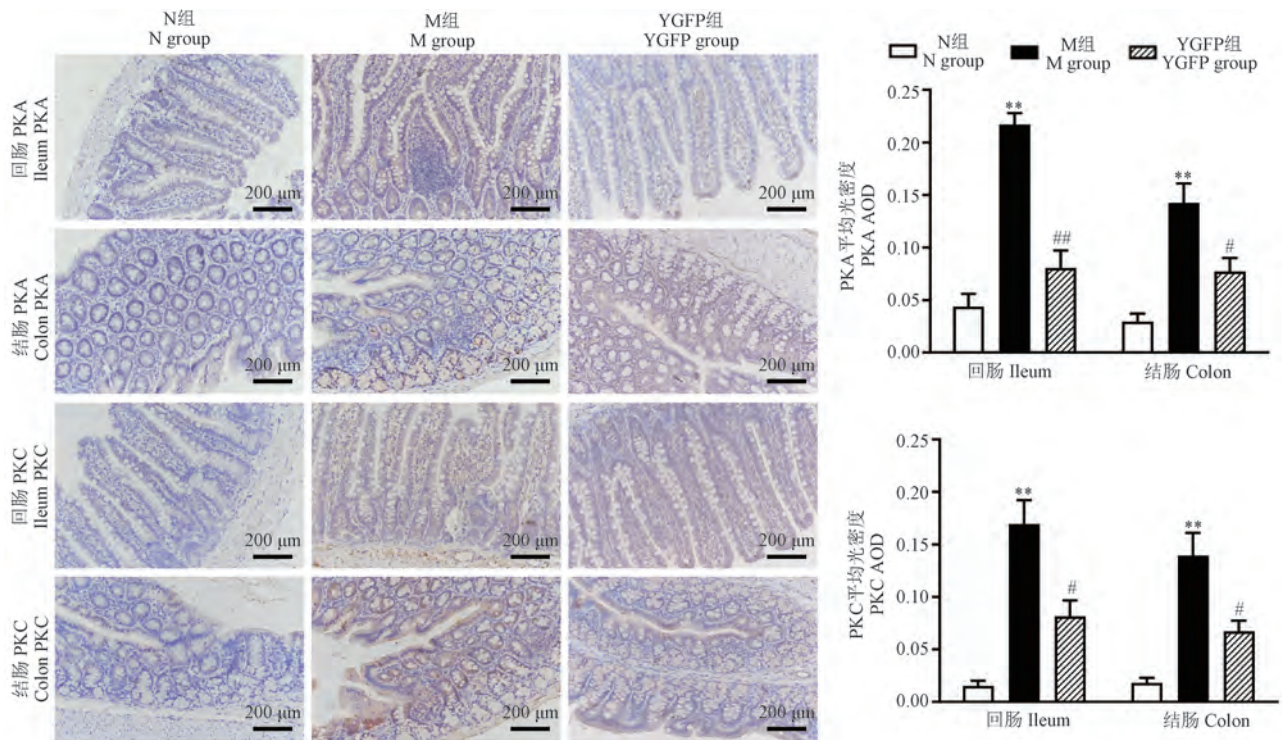


图 5 回肠、结肠 PKA 和 PKC 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 6$)

Figure 5 Immunohistochemical staining and analysis of PKA and PKC in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 6$)

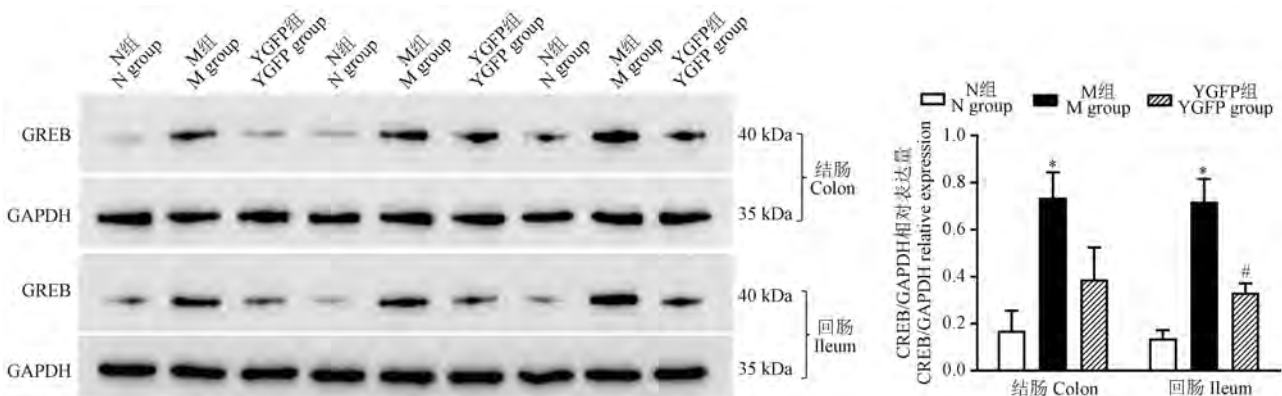


图 6 回肠、结肠 CREB 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 3$)

Figure 6 Relative protein expression of CREB in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 3$)

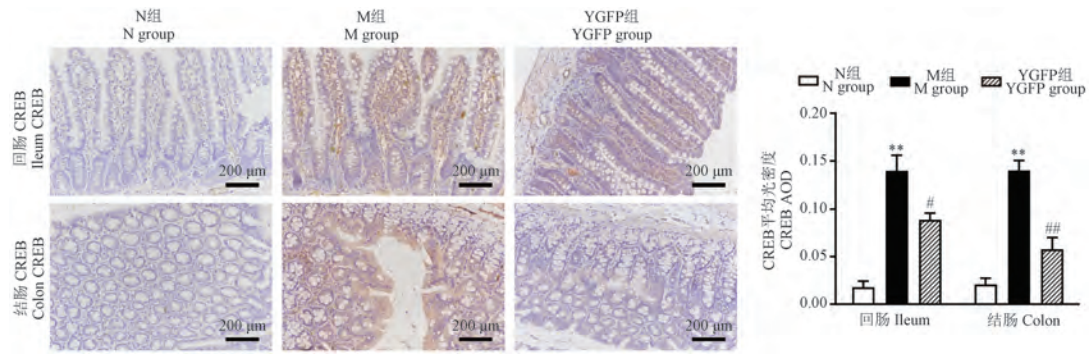


图 7 回肠、结肠 CREB 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 7 Immunohistochemical staining and analysis of CREB in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

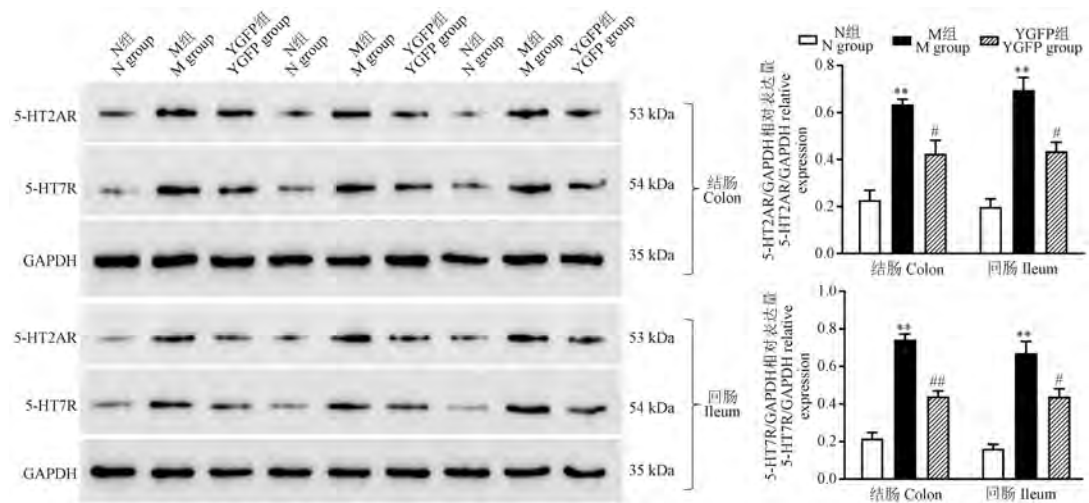


图 8 回肠、结肠 5-HT2AR 和 5-HT7R 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Figure 8 Relative protein expression of 5-HT2AR and 5-HT7R in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

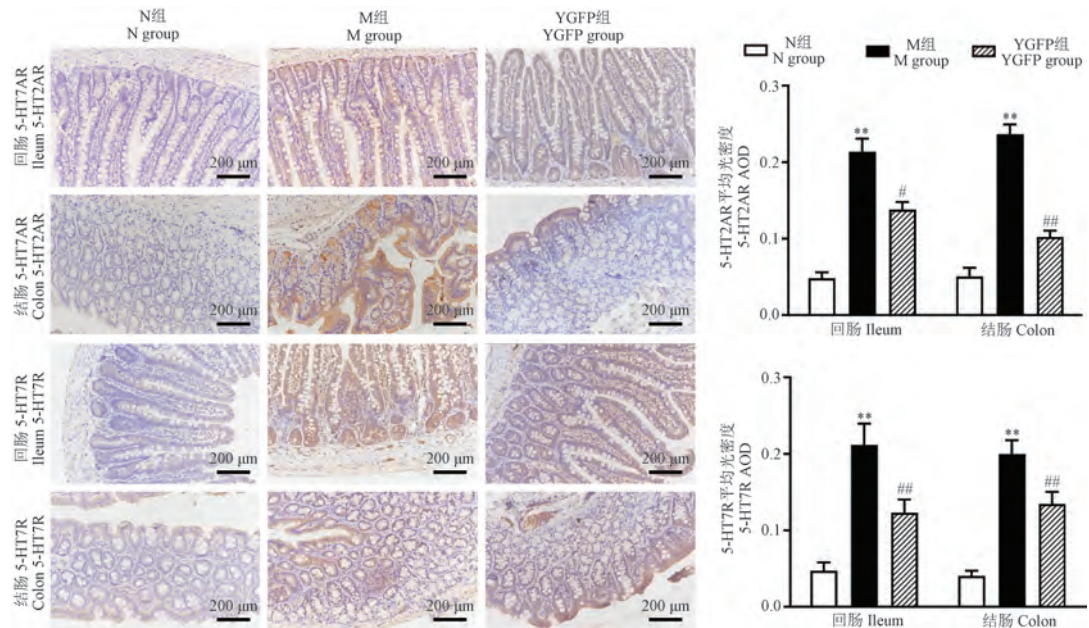


图 9 回肠、结肠 5-HT2AR 和 5-HT7R 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 9 Immunohistochemical staining and analysis of 5-HT2AR and 5-HT7R in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

的表达明显升高($P < 0.01$), 给与 YGFP 后表达显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。

2.8 大鼠回肠、结肠 ZO-1 和 Claudin 1 的蛋白表达

与 N 相比, M 组大鼠回肠、结肠的 ZO-1 及回肠 Claudin 1 的蛋白表达明显降低($P < 0.01, P <$

0.05), 予 YGFP 后大鼠结肠和回肠的 ZO-1 和 Claudin 1 蛋白表达均有升高趋势($P > 0.05$) (见图 10)。通过对回肠、结肠的免疫组化图分析知, M 组较 N 组回肠、结肠的 ZO-1、Claudin 1 的表达明显降低($P < 0.01$), 给与 YGFP 后表达显著升高($P < 0.01, P < 0.05$) (见图 11)。

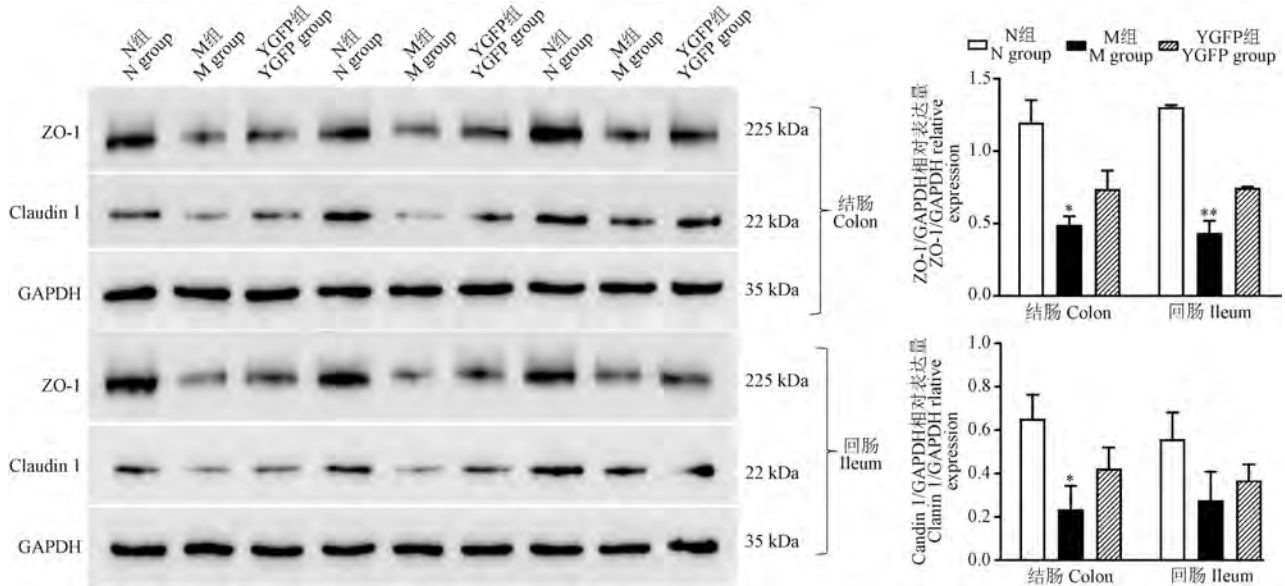


图 10 回肠、结肠 ZO-1 和 Claudin 1 的蛋白相对表达($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

Figure 10 Relative protein expression of ZO-1 and Claudin 1 in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 3$)

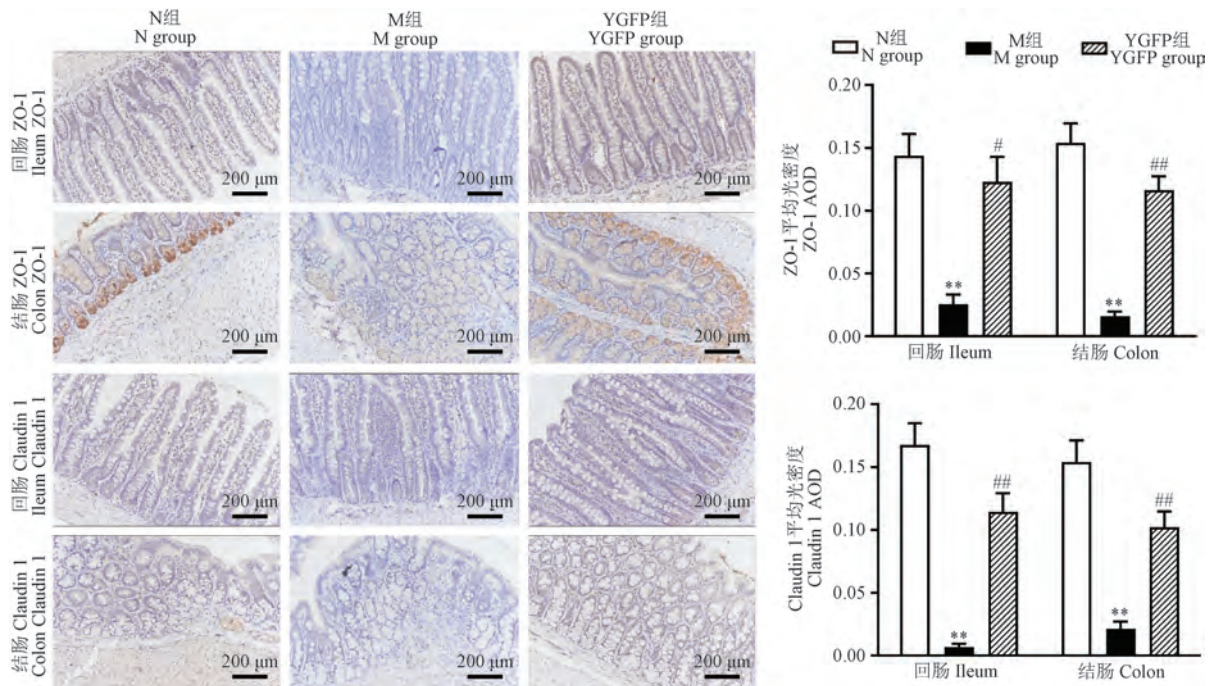


图 11 回肠、结肠 ZO-1 和 Claudin 1 的免疫组化染色及分析($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

Figure 11 Immunohistochemical staining and analysis of ZO-1 and Claudin 1 in the ileum and colon($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 6$)

3 讨论

中医学多从肝脾失调来探讨内脏高敏感性在 IBS 发病中的机制,IBS 内脏痛觉敏感的症状与中医之“痛泻”极为相似,历代医家多认为是土虚木乘,肝脾不和,脾受肝制,运化失常所致,总结出“木旺克土”是其发病基础,从肝脾论治是治疗本病的主要方法。抑肝扶脾汤,应用抑肝扶脾、肝脾并重之法配伍而成。本方以白芍缓急止痛,白术健脾燥湿,黄连清胃理肠,吴茱萸温肝开郁,升麻升发清阳,合欢皮调气和血。六药共奏抑肝扶脾、缓急止痛、祛湿止泻之功效,可使肝脾健,气行湿祛,肝脾和调。本研究采用新生大鼠母婴分离进行造模后^[8],模型大鼠的内脏敏感性较正常组明显升高,抑肝扶脾汤干预后,大鼠的内脏疼痛阈值明显升高,敏感性降低。

胆汁酸具有调节肠蠕动的的作用,且影响肠道敏感性^[9-10]。胆汁酸代谢改变和 IBS 生态失调之间存在相关性^[11]。本研究 M 组的总胆汁酸代谢物浓度高于 N 组,抑肝扶脾汤干预后总胆汁酸代谢物较 M 组显著下降,表明抑肝扶脾汤可能通过调节 IBS 肠道微生态来降低胆汁酸的分泌。

有研究表明,PKA、PI3K/Akt 和 PKC 级联反应能促进下游促炎因子转录,诱发内脏高敏感性而导致 IBS 的发生^[12]。本研究 IBS 模型大鼠较 N 组回肠、结肠的 PKA、PKC 的表达明显升高,PKA、PKC 的表达减少。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号传导的改变与胃肠道功能障碍有关^[13],这已被认为是治疗 IBS 样症状的潜在目标。cAMP 诱导 cAMP 依赖性 PKA 的敏化,进而触发下游 cAMP 信号传导,如 CREB。本研究通过对回肠、结肠的蛋白相对表达分析发现,M 组较 N 组回肠、结肠的 CREB 的表达显著升高,YGFP 组的 CREB 的表达显著降低。

另有研究发现,IBS 与炎症和疼痛敏化密切相关^[14]。有研究发现,腹泻型 IBS 小鼠血清中 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和 CXCR3 等炎症相关因子浓度升高^[15]。IL-6 和 IL-8 是 IBS 主要的炎症因子,是炎性反应的促发剂,

加剧炎症反应。CXCL1 与 IL-8 具有潜在相似的作用,CXCL1 在炎症反应期间会有较高的表达,从而促进炎症过程。本实验结果显示,IBS 模型大鼠的炎症相关因子 IL-6 和 CXCL1 含量显著升高,抑肝扶脾汤灌胃后又明显下降,表明抑肝扶脾汤可降低 IBS 大鼠的炎症反应。5-HT_{2A}R 是神经源性疼痛相关的 5-HT 受体亚型,5-HT_{2A}R 激动剂介导着人体的结肠黏膜分泌反应,5-HT_{2A}R 激动剂应增加 IBS 等胃肠易激障碍患者的转运^[16]。5-HT₇R 是 G 蛋白偶联受体家族中研究最多的成员之一,其在调节平滑肌松弛和内脏感觉方面起重要作用,与 IBS 等疾病有关^[17]。抑制 5-HT₇R 导致压力阈值升高,从而阻断刺激肠蠕动,降低肠顺应性^[18]。本研究结果显示 M 组大鼠回肠、结肠的 5HT_{2A}R 和 5-HT₇R 蛋白相对表达较 N 组明显增加,加用抑肝扶脾汤之后大鼠结肠和回肠的 5HT_{2A}R 和 5-HT₇R 蛋白相对表达显著降低,抑肝扶脾汤可调节 5-HT 受体亚型的表达。这些结果均提示抑肝扶脾汤可降低肠道炎症和疼痛敏感性。

此外,IBS 中内脏过敏的起源和严重程度与肠屏障功能障碍有关^[19]。肠道屏障由上皮细胞和紧密连接蛋白(tight junction proteins, TJ)组成,可调节细胞旁通透性,以防止管腔内的有害物质通过肠黏膜进入其他组织^[20]。ZO-1、Claudin 1 和 occludin 是最重要的 TJ 成分,在维持肠道屏障功能发挥重要作用^[21]。Western Blot 和免疫组化结果均显示 IBS 模型大鼠的回肠、结肠的 ZO-1 及回肠 Claudin 1 的蛋白相对表达较 N 组明显降低,抑肝扶脾汤干预后大鼠结肠和回肠的 ZO-1 和 Claudin 1 蛋白表达均有所增加,表明 IBS 大鼠存在肠道屏障功能障碍,抑肝扶脾汤对其有修复作用。

因此,抑肝扶脾汤可能通过调控 PKA/PKC-CREB 通路,抑制促炎因子,促进肠道紧密连接蛋白,修复 IBS 大鼠的肠道屏障功能,从而降低内脏高敏感性而改善 IBS 症状。

参 考 文 献(References)

- [1] BERTIN L, ZANCONATO M, CREPALDI M, et al. The role of the FODMAP diet in IBS [J]. *Nutrients*, 2024, 16 (3): 370.
- [2] MAYER E A, RYU H J, BHATT R R. The neurobiology of

- irritable bowel syndrome [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28 (4): 1451–1465.
- [3] 张佳河, 祝旺, 沈丹婷, 等. 腹泻型肠易激综合征动物模型评价的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32 (2): 238–247.
- ZHANG J H, ZHU W, SHEN D T, et al. Research progress on animal models for the evaluation of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(2): 238–247.
- [4] 傅睿, 陈明显, 李亚平, 等. 抑肝扶脾汤治疗腹泻型肠易激综合征的临床应用 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42(6): 426–431.
- FU R, CHEN M X, LI Y P, et al. Clinical application of Yigan fupi decoction for treating irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2018, 42 (6): 426–431.
- [5] 陈明显, 陈军贤, 夏亮, 等. 抑肝扶脾汤治疗腹泻型肠易激综合征的随机对照临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(6): 656–660.
- CHEN M X, CHEN J X, XIA L, et al. Treating irritable bowel syndrome with diarrhea patients by Yigan fupi decoction: a randomized controlled trial [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2014, 34(6): 656–660.
- [6] 陆拯. 天癸病论与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2011.
- LU Z. Theory and clinical practice of Tianqi disease [M]. Beijing: People's Medical Publishing House Co., Ltd; 2011.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; 2020 edition volume I [S]. Beijing: China Medical Science Press; 2020.
- [8] COUTINHO S V, PLOTSKY P M, SABLAD M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282 (2): G307–G316.
- [9] ZHAO J, TIAN L, XIA B, et al. Cholecystectomy is associated with a higher risk of irritable bowel syndrome in the UK Biobank: a prospective cohort study [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1244563.
- [10] MIN Y W, REZAIE A, PIMENTEL M. Bile acid and gut microbiota in irritable bowel syndrome [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2022, 28(4): 549–561.
- [11] DENG X, XIAO L, LUO M, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota in irritable bowel syndrome [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2023, 38 (7): 1072–1082.
- [12] GUO Y, LU Q, YANG X J, et al. Efficacy of Shu-Yi-Ning-Chang decoction on IBS-D: modulating Nr4a3 pathway to reduce visceral hypersensitivity [J]. *PLoS One*, 2024, 19 (4): e0299376.
- [13] ZHANG Y, LI X, LU S, et al. Stress triggers gut dysbiosis via CRH-CRHR1-mitochondria pathway [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2024, 10(1): 93.
- [14] YUAN Y, WANG X, HUANG S, et al. Low-level inflammation, immunity, and brain-gut axis in IBS: unraveling the complex relationships [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2): 2263209.
- [15] JANG J H, JANG S Y, AHN S, et al. Chronic gut inflammation and dysbiosis in IBS: unraveling their contribution to atopic dermatitis progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2753.
- [16] HOLDCROFT A, SAPSED-BYRNE S, MA D, et al. Sex and oestrous cycle differences in visceromotor responses and vasopressin release in response to colonic distension in male and female rats anaesthetized with halothane [J]. *Br J Anaesth*, 2000, 85(6): 907–910.
- [17] ZHANG S, TIAN D, XIA Z, et al. Chang-Kang-Fang alleviates diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) through inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118236.
- [18] WU Y, LI S, LV L, et al. Protective effect of *Pediococcus pentosaceus* Li05 on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats [J]. *Food Funct*, 2024, 15 (7): 3692–3708.
- [19] NOZU T, MIYAGISHI S, NOZU R, et al. Losartan improves visceral sensation and gut barrier in a rat model of irritable bowel syndrome [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(6): e13819.
- [20] VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(9): 821–834.
- [21] WEI Y, FAN Y, HUANG S, et al. Baizhu Shaoyao decoction restores the intestinal barrier and brain-gut axis balance to alleviate diarrhea-predominant irritable bowel syndrome via FoxO1/FoxO3a [J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155163.

[收稿日期] 2024–09–30

龙亚丽,刘雅莉,杨明轩,等. 黄芩通过 JAK2/STAT3 信号通路联合 5-Fu 发挥抗 C57BL/6J 小鼠肺癌的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 522-529.

LONG Y L, LIU Y L, YANG M X, et al. Scutellaria baicalensis exerts its anti C57BL/6J mouse lung cancer effect through the JAK2/STAT3 signaling pathway combined with 5-Fu [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 522-529.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.006

黄芩通过 JAK2/STAT3 信号通路联合 5-Fu 发挥抗 C57BL/6J 小鼠肺癌的作用

龙亚丽¹, 刘雅莉¹, 杨明轩¹, 田启会², 张勇^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 甘肃畜牧工程职业技术学院, 武威 733006)

【摘要】目的 基于 JAK2/STAT3 信号通路研究黄芩联合 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)对 Lewis 荷瘤模型小鼠肺癌的抑制作用。**方法** 检测黄芩(20 mg/kg)联合 5-Fu 干预 Lewis 荷瘤小鼠后的体质量、进食量和瘤体积变化,通过苏木素-伊红(HE)染色观察瘤组织病理变化,通过免疫组织化学染色观察增殖相关蛋白 Ki67 表达水平变化,通过 TUNEL 染色观察瘤组织中细胞凋亡水平变化,通过免疫组织化学染色观察瘤组织中对 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达水平的变化。**结果** 与模型组相比,联合干预后小鼠瘤体积明显变小,具有统计学意义($P < 0.01$),体质量升高($P < 0.05$),进食未发生明显变化。瘤组织中增殖相关蛋白 Ki67 表达明显降低,TUNEL 标记的凋亡细胞明显增多;p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达升高。**结论** 黄芩水煎液可抑制 JAK2/STAT3 信号通路,并增加 5-Fu 对小鼠肺癌的抑制作用。

【关键词】 肺癌荷瘤小鼠;黄芩;JAK2/STAT3 信号通路;5-Fu

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0522-08

Scutellaria baicalensis exerts its anti C57BL/6J mouse lung cancer effect through the JAK2/STAT3 signaling pathway combined with 5-Fu

LONG Yali¹, LIU Yali¹, YANG Mingxuan¹, TIAN Qihui², ZHANG Yong^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Gansu Polytechnic College of Animal Husbandry & Engineering, Wuwei 733006, China)

Corresponding author: ZHANG Yong. E-mail: 541409422@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the inhibitory effect of Scutellaria baicalensis combined with 5-Fu on Lewis tumor bearing mouse lung cancer based on the JAK2/STAT3 signaling pathway. **Methods** To detect the changes in body mass, food intake and tumor volume of Lewis tumor-bearing mice after intervention of Scutellaria baicalensis (20 mg/kg) combined with 5-Fu. Pathological changes in tumor tissue were observed by HE staining, expression levels of proliferation related protein Ki67 were observed by immunohistochemical staining, changes in cell

[基金项目]武威市自然科学基金(WW23A03RPZ007),2024 年甘肃省高校教师创新基金项目(2024A303),武威市科技计划 B 类项目(WW23B02NY119)。

Funded by National Natural Science Foundation of Wuwei(WW23A03RPZ007), 2024 Gansu Province University Teacher Innovation Fund Project (2024A303), Wuwei City Science and Technology Plan Class B Project (WW23B02NY119).

[作者简介]龙亚丽,女,博士,研究方向:动物生殖生理。Email:1220602702@qq.com

[通信作者]张勇,男,博士,教授,研究方向:动物生殖生理,动物医学工程,动物发育生物学等。Email:541409422@qq.com

apoptosis levels in tumor tissue were observed by TUNEL staining, and changes in expression levels of JAK2, p-JAK2, STAT3, and p-STAT3 proteins in tumor tissue were observed by immunohistochemical staining. **Results** Compared with the model group, the tumor volume of mice after combined intervention significantly decreased ($P < 0.01$) and body mass increased ($P < 0.05$), but there was no significant change food intake. The expression of proliferation related protein Ki67 in tumor tissue was significantly reduced, and the number of apoptotic cells labeled with TUNEL was significantly increased; The expression of p-JAK2 and p-STAT3 proteins is elevated. **Conclusions** Scutellaria baicalensis decoction can inhibit the JAK2/STAT3 signaling pathway and increase the inhibitory effect of 5-Fu on mouse lung cancer.

【Keywords】 lung cancer bearing tumor mice; Scutellaria baicalensis; JAK2/STAT3 signaling pathway; 5-Fu
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺癌在全球或在我国均是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1-2]。其中,男性肺癌的发病率和死亡率占有所有恶性肿瘤的第一位^[3]。肺癌的主要诱因与长期大量吸烟密切相关^[4]。在所有肺癌中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)所占的比例是最高的,而在 NSCLC 所有的亚型中腺癌是最常见的,同时也是最常见的原发肺肿瘤^[5-6]。目前猫狗等宠物的肺癌患病率也逐渐增多^[7-8],但是相关的研究和治疗策略仍然较少。

目前针对肿瘤的治疗手段以手术、放、化疗或靶向分子治疗为主,其中,化疗在 NSCLC 治疗中应用最为广泛^[9],但化疗药物具有明显的毒副作用,对患者生存质量存在隐患^[10]。5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是肿瘤治疗常用的化疗药之一,对多数的肿瘤有明显抑制作用,但是对肺癌不仅缺乏敏感性,且存在的一定耐药的影响。因此,寻求一种针对 5-FU 增效的方法对其临床应用至关重要。中医药在肿瘤治疗过程中显示出较好的作用,在与放化疗联合治疗肿瘤方面均取得了很好的效果。黄芩味苦,性平,主要归经为心脏、肺、胆、大肠,其功效为清热燥湿、泻火解毒,主治诸热、黄疸,去水肿、恶疮、火疡等疾病。周季青等^[11]研究发现中药黄芩主要成分黄芩苷抑制了 PI3K/AKT/FoxO3a 信号通路,进而诱导 HepG2 肝癌细胞铁死亡;彭虹瑶等^[12]也证实黄芩苷可以抑制核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路,并抑制了卵巢癌细胞的增殖、迁移;郑宁泽等^[13]发现黄芩主要成分黄芩素增强细胞缝隙链接的功能进而增加卵巢癌耐药细胞对顺铂的敏感性。但是,其是否对 5-Fu 具有增效作用仍然需要进一步探索。此外, JAK2/STAT3 信号通路参

与了肿瘤细胞增殖、分化和死亡等多个生命过程^[14],密切参与到肺癌化疗耐药过程^[15],而黄芩的调控作用是否与 JAK2/STAT3 信号通路相关也尚不明确。因此,本研究拟通过 C57BL/6J 小鼠探究黄芩联合 5-Fu 对肺癌的治疗作用及初步分析其潜在机制,为动物肺癌的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄 C57BL/6J 小鼠 24 只(雄性),SPF 级,体质量(18 ± 5) g,由扬州大学动物实验中心提供【SCXK(苏)2022-0009】,小鼠饲养于扬州大学医学院【SYXK(苏)2022-0044】。饲养环境:温度维持在 $20 \sim 24^{\circ}\text{C}$,湿度为 $40\% \sim 70\%$,12 h 循环照明,小鼠自由饮水饮食。本实验所有操作已通过扬州大学伦理委员审批(yxyl-2024-177)。

1.1.2 细胞

Lewis 小鼠非小细胞肺癌细胞(批号:CL-0140,购自武汉普诺赛)。

1.1.3 主要试剂与仪器

黄芩购自扬州市中医院;肿瘤增殖抗原(proliferation related Ki-67 antigen, Ki67)多克隆抗体(批号:ET1609-34,购自杭州 HuaBiol 公司)、信号转导因子和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)多克隆抗体(批号:ET1603-40,购自杭州 HuaBiol 公司)、磷酸化信号转导因子和转录激活因子 3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription, 3 p-STAT3)多克隆抗体(批号:ET1603-40,购自杭州 HuaBiol 公司)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体(批号: ET1601-4, 购自杭州 HuaBiol 公司), 蛋白酪氨酸激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 多克隆抗体(批号: GR320396-3, 购自英国 Abcam 公司)、磷酸化蛋白酪氨酸激酶 2 (phosphorylated janus kinase 2, p-JAK2) 多克隆抗体(批号: GR3184958-7, 购自英国 Abcam 公司), 山羊抗兔二抗(批号: RS0002, 购自美国 Immunoway 公司), DMEM 培养基(批号: MA0212-1, 购自大连美伦公司), 胎牛血清(批号: 164210, 购自武汉普诺赛公司), TUNEL 凋亡染色试剂盒(批号: GDP1043, 购自武汉塞维尔公司), DAB 显色试剂盒(批号: G1212, 购自武汉塞维尔公司)。二氧化碳细胞培养箱(日本 Panasonic 公司, MCO-5AC), 正置光学显微镜(日本 Olympus 公司, BX53), 激光共聚焦正置显微镜(日本 Olympus 公司, IX81)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立与分组

Lewis 小鼠非小细胞肺癌细胞在 T25 细胞培养瓶中培养, 细胞完全培养基(含有 10 % 胎牛血清和 1 % 青霉素 + 链霉素的 DMEM 培养基), 在 37 ℃ 和 5% CO₂ 条件下于细胞培养箱进行常规培养。将细胞传代到 P4 时, 使用对数生长期细胞进行实验。

体外培养 Lewis 小鼠非小细胞肺癌细胞, 消化后用 PBS 将细胞数量调整为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 在 C57BL/6J 小鼠右前肢腋下进行皮下注射, 注射量为每只 0.1 mL, 建立肺癌皮下荷瘤模型。当右前肢腋下可触及 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm 左右大小瘤体的时候, 即为建模成功。使用游标卡尺测量瘤体长短径, 并随机将小鼠分为模型(Model)组、黄芩(Huangqin)组、5-Fu(5-Fu)组以及黄芩 + 5-Fu(Huangqin + 5-Fu)组。每组 6 只。根据人与动物间药物剂量的换算方法^[12], 根据前期预实验结果, 将黄芩水煎液灌胃量设定为 10 g/kg。模型组: 腹腔注射生理盐水, 0.1 mL/d; 同时灌胃生理盐水, 0.1 mL/d, 每天 1 次, 连续 14 d; 黄芩组: 灌胃黄芩水煎液, 0.1 mL/d, 每天 1 次, 连续 14 d; 5-Fu 组: 每天腹腔注射 0.1 mL 5-Fu(10 mg/kg), 每天 1 次, 连续 14 d; 黄芩 + 5-Fu 组: 每天腹腔注射 0.1 mL 5-Fu(10 mg/kg) 和灌胃黄芩水煎液, 每天 1 次, 连续 14 d。

1.2.2 一般情况观察

观察小鼠生命活动状态, 记录小鼠的进食量和体质量, 计算体质量变化百分比, 测量瘤体长径和短径进行瘤体体积计算。体质量变化百分比计算公式 = 第 n 天体质量(g)/第 1 天体质量(g) × 100 %; 瘤体体积计算公式 = $0.5 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 。

1.2.3 黄芩水煎液制备

将 100 g 黄芩用 0.5 L 蒸馏水煮沸 1 h, 提取水煎液, 然后用滤纸过滤, 放 4 ℃ 备用。以成人 20 g 的服药剂量换算, 调整每只小鼠每日灌胃剂量为 0.57 g/kg。

1.2.4 瘤组织的病理形态观察

处死小鼠后, 完全剥离 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织, 用 4% 多聚甲醛溶液固定组织。脱水并使用石蜡对组织进行包埋, 然后对蜡块进行切片, 制备厚度为 4 μm 的组织切片。石蜡切片依次经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、洗片, 使用蛋白酶 K 在 37 ℃ 条件下孵育后, 用 PBS 冲洗。使用苏木素-伊红(HE)染色法进行染色, 使用中性树脂封片。通过光学显微镜, 观察肿瘤组织的病理形态变化。

1.2.5 瘤组织免疫组织化学染色

小鼠肿瘤组织切片常规脱蜡至水后, 进行抗原修复、封闭, 4 ℃ 下孵育抗体 Ki67(1 : 200), JAK2(1 : 400), p-JAK2(1 : 300), STAT3(1 : 200), p-STAT3(1 : 200), 孵育二抗(1 : 1000), SP 显色、苏木素进行核复染、脱水封片, 于光学显微镜下观察、拍照。

1.2.6 瘤组织 TUNEL 染色

前处理同 1.2.4, 切片脱蜡后, 加入 TUNEL 染色液, 37 ℃ 条件下孵育 60 min, 使用 PBS 清洗, 使用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂进行封片。在激光共聚焦显微镜下观察小鼠肿瘤组织中细胞凋亡情况。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。结果采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间均数的比较采用 One-way ANOVA, 两两比较采用最小显著法(LSD)检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 黄芩联合 5-Fu 对 Lewis 荷瘤小鼠生命状态和进食的影响

各组小鼠精神状态良好,活动度均较好;与模型组比较,黄芩组的进食量水平未见明显差异($P > 0.05$),5-Fu 组小鼠精神状态一般,较多处于静卧状态,黄芩组和黄芩 + 5-Fu 组小鼠进食量水平未见明显差异($P > 0.05$);与 5-Fu 组比较,黄芩 + 5-Fu 组小鼠活动增加明显,进食量水平也无明显差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠的进食量($\bar{x} \pm s, n = 6, g$)

时间/d Time/d	0	2	4	6	8	10	12	14
模型组 Model group	18.13	16.66	19.20	17.37	15.56	17.92	16.55	16.37
黄芩组 Huangqin group	16.22	17.35	19.33	16.68	14.89	18.44	16.31	16.19
5-Fu 组 5-Fu group	17.32	16.32	18.58	16.25	14.20	16.22	15.37	15.17
黄芩 + 5-Fu 组 Huangqin + 5-Fu group	17.02	17.24	19.11	16.79	14.73	17.64	15.86	15.82

表 2 小鼠体质量变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

时间/d Time/d	0	2	4	6	8	10	12	14
模型组 Model group	100.0 $\pm$ 3.4	102.5 $\pm$ 2.7	109.4 $\pm$ 4.3	112.3 $\pm$ 6.8	119.3 $\pm$ 7.5	127.8 $\pm$ 7.7	129.6 $\pm$ 6.5	133.2 $\pm$ 9.5
黄芩组 Huangqin group	100.0 $\pm$ 2.7	101.4 $\pm$ 4.3	107.2 $\pm$ 5.5	110.1 $\pm$ 7.4	114.6 $\pm$ 8.2	118.2 $\pm$ 7.5	124.6 $\pm$ 8.8	127.1 $\pm$ 8.9
5-Fu 组 5-Fu group	100.0 $\pm$ 4.7	101.2 $\pm$ 3.5	105.4 $\pm$ 3.7	107.6 $\pm$ 5.4	108.5 $\pm$ 6.5	110.3 $\pm$ 8.5*	113.6 $\pm$ 9.5*	110.4 $\pm$ 7.4*
黄芩 + 5-Fu 组 Huangqin + 5-Fu group	100.0 $\pm$ 5.7	102.5 $\pm$ 4.3	106.3 $\pm$ 4.2	109.2 $\pm$ 5.7	112.5 $\pm$ 6.7	117.4 $\pm$ 7.2	120.5 $\pm$ 8.2	123.2 $\pm$ 7.2#

注:与模型组相比,* $P < 0.05$;与 5-Fu 组相比,# $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with model group, * $P < 0.05$. Compared with the 5-Fu group, # $P < 0.05$. (The same in the following tables)

开始,瘤体积下降程度具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.05$)。与 5-Fu 组相比,黄芩 + 5-Fu 组小鼠瘤体积从第 10 天开始减小,具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 3。

2.4 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织病理形态的影响

HE 染色结果如图 1,苏木素标记细胞核显示

2.2 黄芩联合 5-Fu 对 Lewis 荷瘤小鼠体质量的影响

如表 2,相较于模型组,黄芩组体质量未见明显差异($P > 0.05$),提示黄芩对荷瘤小鼠体质量无影响;从第 10 天开始,5-Fu 组在的体质量下降程度出现差异,具有统计学意义($P < 0.05$)。相较于 5-Fu 组,黄芩 + 5-Fu 组小鼠体质量变化平稳,在第 14 天体质量提升($P < 0.05$)。

2.3 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤体积变化的影响

与模型组相比,黄芩组瘤体积变化无明显差异($P > 0.05$),5-Fu 组和黄芩 + 5-Fu 组从第 6 天

为紫色,伊红标记细胞质显示为粉红色。模型组瘤组织中瘤细胞排列紧密,与模型组相比,5-Fu 组肿瘤细胞明显疏松,排列紊乱,部分细胞出现核皱缩凋亡形态;黄芩 + 5-Fu 组肿瘤组织中瘤细胞有明显空泡,排列疏松,细胞核肿胀且出现空腔。以上结果提示,黄芩联合 5-Fu 能够明显改变肺癌组织肿瘤细胞排列与病理形态。

表 3 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤体积的影响($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{cm}^3$)

Table 3 Effect of scutellaria baicalensis combined with 5-Fu on tumor volume($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{cm}^3$)

时间/d Time/d	模型组 Model group	黄芩组 Huangqin group	5-Fu 组 5-Fu group	黄芩 + 5-Fu 组 Huangqin+5-Fu group
0	0.088 ± 0.012	0.093 ± 0.023	0.101 ± 0.015	0.112 ± 0.053
2	0.102 ± 0.035	0.144 ± 0.078	0.137 ± 0.033	0.126 ± 0.079
4	0.175 ± 0.088	0.197 ± 0.072	0.188 ± 0.079	0.178 ± 0.088
6	0.268 ± 0.058	0.245 ± 0.068	0.193 ± 0.087 *	0.207 ± 0.072 *
8	0.597 ± 0.092	0.526 ± 0.102	0.296 ± 0.103 *	0.225 ± 0.069 **
10	0.828 ± 0.210	0.785 ± 0.265	0.374 ± 0.125 **	0.278 ± 0.074 ** #
12	1.277 ± 0.289	1.104 ± 0.375	0.525 ± 0.188 **	0.256 ± 0.092 ** ##
14	1.752 ± 0.421	1.620 ± 0.533	0.837 ± 0.209 **	0.307 ± 0.054 ** ##

注:与模型组相比, ** $P < 0.01$; 与 5-Fu 组相比, ## $P < 0.01$ 。
Note. Compared with model group, ** $P < 0.01$. Compared with the 5-Fu group, ## $P < 0.01$.

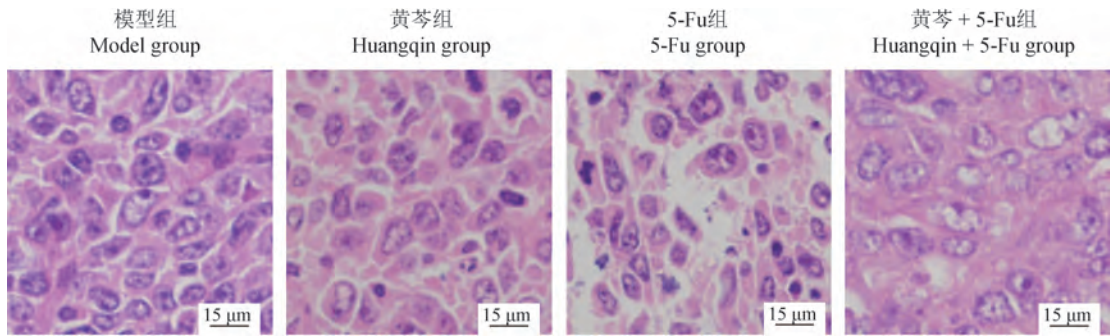


图 1 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织病理形态的影响

Figure 1 Effect of scutellaria baicalensis combined with 5-Fu on the pathological morphology of mouse tumor tissue

2.5 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织 Ki67 蛋白表达的影响

免疫组织化学染色结果如图 2 所示,蛋白表达以棕褐色标示,棕褐色标记细胞越多或者棕褐色颜色越深提示蛋白表达水平越高。与模型组

相比,5-Fu 组瘤组织中瘤细胞的 Ki67 的表达明显降低;黄芩 + 5-Fu 组肿瘤组织中瘤细胞表达 Ki67 的数量及水平均低于模型和 5-Fu 组。以上结果提示,黄芩联合 5-Fu 能够明显抑制肺癌细胞的增殖。

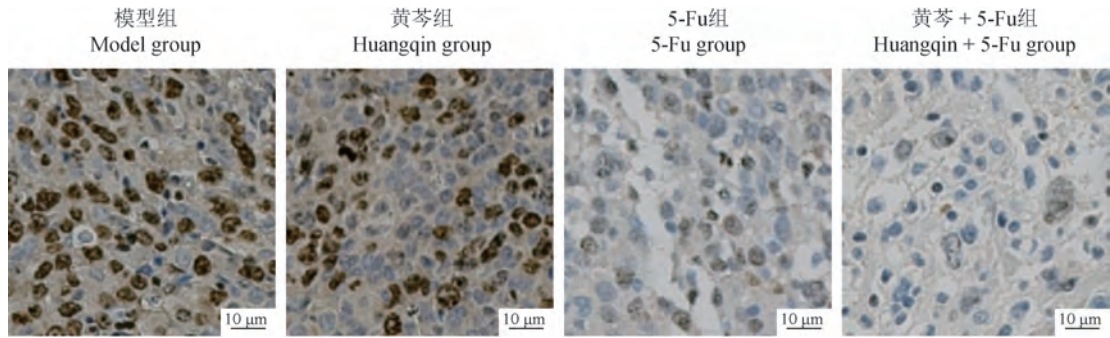


图 2 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织 Ki67 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of scutellaria baicalensis combined with 5-Fu on the expression of Ki67 protein in mouse tumor tissue

2.6 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果如图 3,细胞核用蓝色 DAPI 标记($OD = 405 \text{ nm}$);凋亡细胞用 TUNEL 标记($OD = 488 \text{ nm}$)。与模型组相比,5-Fu 组和黄芩

+ 5-Fu 组瘤组织中凋亡细胞明显增多;与 5-Fu 组相比,黄芩 + 5-Fu 组肿瘤组织中凋亡的瘤细胞增多。以上结果提示,黄芩联合 5-Fu 能够明显促进肺癌细胞的凋亡。

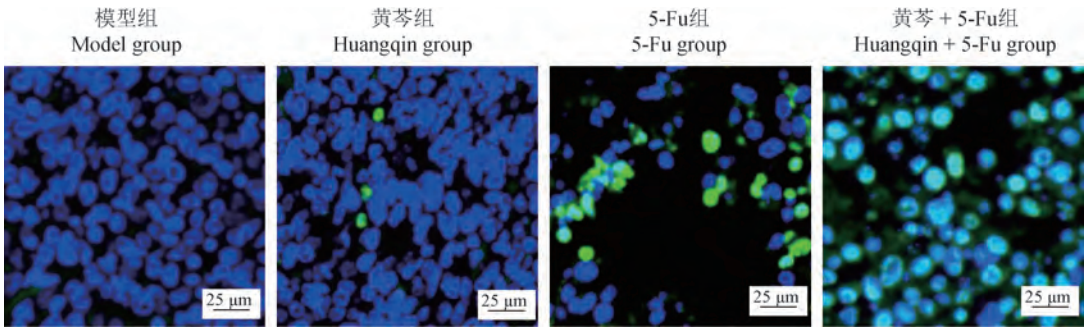


图 3 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织 TUNEL 染色的影响

Figure 3 Effect of scutellaria baicalensis combined with 5-Fu on TUNEL staining of mouse tumor tissue

2.7 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

为了证实黄芩对 5-Fu 的增效作用是否与 JAK2/STAT3 信号通路相关,本研究进一步通过

免疫组化检测了通路中关键蛋白 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 的表达情况。如图 4 所示与模型组相比,各组瘤组织对 JAK2 和 STAT3 蛋白的表达均无明显变化;与模型组相比,黄芩组和黄

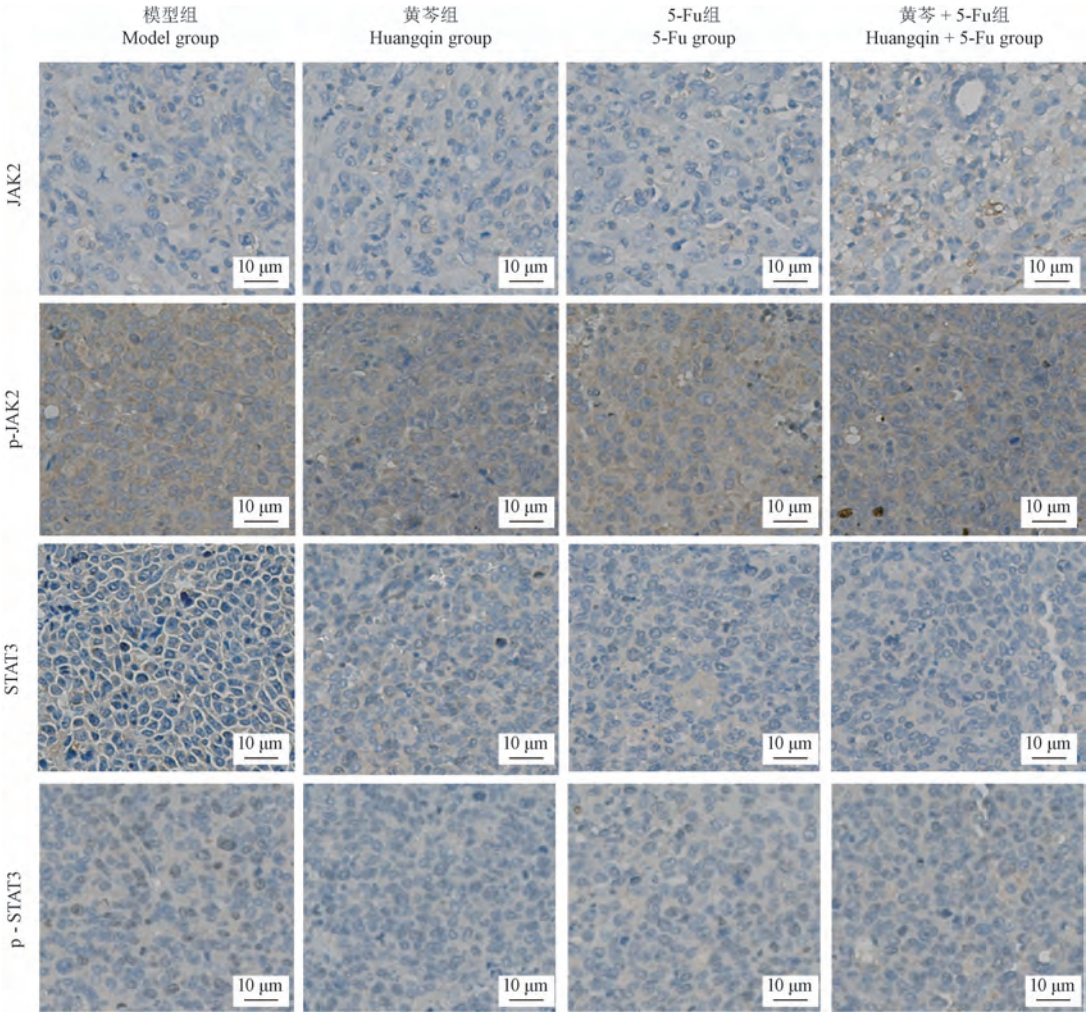


图 4 黄芩联合 5-Fu 对小鼠瘤组织中 JAK2、STAT3、p-JAK2 和 p-STAT3 表达的影响

Figure 4 Effect of scutellaria baicalensis combined with 5-Fu on the expression of JAK2, STAT3, p-JAK2 and p-STAT3 in mouse tumor tissue

芩 + 5-Fu 组瘤组织对 p-JAK2 蛋白的表达降低,但 5-Fu 组未见明显改变;此外,与模型组相比,黄芩 + 5-Fu 组瘤组织细胞核内 p-STAT3 表达减少。

3 讨论

肺癌临床治疗主要以手术治疗联合放化疗为主,但同时也存在耐药性高、毒副作用大等问题,严重制约了其对肺癌患者的疗效。尽管动物肺癌的治疗可能存在一定差异,但仍然值得借鉴和参考。中医理论分析认为,肺癌的发病主要为浊毒、痰饮、瘀血病理产物的积聚^[16-17]。随疾病治疗手段或复发转移的病程变化,其外在表现常为多证相兼。治疗以益气扶正、标本兼顾为要点,以清热解毒、软坚散结为基础,以化痰通络、活血行瘀为主。中药黄芩具有清热燥湿、泻火解毒的功效,主治诸热、黄疸,去水肿、恶疮、火疡等疾病,符合肺癌的治疗标准^[18]。本研究发现,在进食和体质量方面,5-Fu 或黄芩并没有影响,但是黄芩明显促进了 5-Fu 对瘤体积的抑制作用;此外,通过病理形态分析和对增殖和凋亡相关指标的检测发现黄芩对肺癌细胞的抑制作用并不明显,但能够显著的加强 5-Fu 对肺癌细胞增殖的抑制作用和促凋亡作用。因此,本研究认为黄芩对 5-Fu 具有增效的作用。

JAK2/STAT3 信号通路是经典的炎症信号通路,在调控肿瘤细胞增殖和凋亡方面发挥着重要作用^[13]。多种炎性细胞因子与其受体结合后促进 JAK2 磷酸化并进一步催化 STAT3 蛋白发生磷酸化,磷酸化的 STAT3 转移到细胞核发挥促肿瘤作用^[19-20]。本研究发现,黄芩能够明显抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平及 p-STAT3 的入核,因此黄芩可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路。

本研究基于以上实验证实了黄芩可抑制 JAK2/STAT3 信号通路,同时能够促进 5-Fu 对肺癌的抑制作用,但是黄芩对 5-Fu 的增效作用是否是因为其抑制 JAK2/STAT3 信号通路直接导致的,仍然需要进一步论证。然而尽管黄芩对 JAK2/STAT3 有抑制作用,但是对肺癌的抑制作用并没有统计学意义。因此,本研究认为黄芩对 JAK2/STAT3 的抑制程度并不足以发挥抗肺癌作用,却可以促进 5-Fu 发挥抗肺癌作用。本研究为

后继续探讨黄芩辅助 5-Fu 抗肺癌作用机制提供了参考,也为黄芩联合 5-Fu 治疗小动物肺癌提供了实验依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] WU F, WANG L, ZHOU C. Lung cancer in China: current and prospect [J]. *Curr Opin Oncol*, 2021, 33(1): 40-46.
- [2] BRODY H. Lung cancer [J]. *Nature*, 2020, 587(7834): S7.
- [3] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer [J]. *Lancet*, 2021, 398(10299): 535-554.
- [4] NOORELDEEN R, BACH H. Current and future development in lung cancer diagnosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8661.
- [5] ABU ROUS F, SINGHI E K, SRIDHAR A, et al. Lung cancer treatment advances in 2022 [J]. *Cancer Invest*, 2023, 41(1): 12-24.
- [6] ALEXANDER M, KIM S Y, CHENG H. Update 2020: management of non-small cell lung cancer [J]. *Lung*, 2020, 198(6): 897-907.
- [7] 贾珊珊, 于爽, 马德滨, 等. 犬猫肺乳头状腺癌的病理学诊断 [J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(4): 493-499.
JIA S S, YU S, MA D B, et al. Pathological diagnosis of canine and cat lung papillary adenocarcinoma [J]. *Chin Vet Sci*, 2018, 48(4): 493-499.
- [8] 贡桔, 张丽云, 陈志瑾, 等. 建立犬肺癌模型及制作方法的比较研究 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2015, 12(9): 569-572.
GONG J, ZHANG L Y, CHEN Z J, et al. Establishment of lung cancer model in canine and comparison of methodology [J]. *Chin J Interv Imag Ther*, 2015, 12(9): 569-572.
- [9] SALEHI-RAD R, LI R, PAUL M K, et al. The biology of lung cancer: development of more effective methods for prevention, diagnosis, and treatment [J]. *Clin Chest Med*, 2020, 41(1): 25-38.
- [10] RUIZ-CORDERO R, DEVINE W P. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy in lung cancer [J]. *Surg Pathol Clin*, 2020, 13(1): 17-33.
- [11] 周季青, 黎华建, 曾煜豪, 等. 黄芩苷通过抑制 ROS 介导的 PI3K/Akt/FoxO3a 信号通路诱导 HepG2 细胞铁死亡 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(5): 1327-1334.
ZHOU J Q, LI H J, ZENG Y H, et al. Baicalin induces ferroptosis in HepG2 cells by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2024, 49(5): 1327-1334.
- [12] 彭虹瑶, 宋林江, 凡艺月, 等. 黄芩苷通过调控 NF- κ B 信号通路抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移 [J]. *中药材*, 2023, 46(9): 2319-2323.
PENG H Y, SONG L J, FAN Y Y, et al. Baicalin inhibits

- the proliferation and migration of ovarian cancer cells by regulating the NF- κ B signaling pathway [J]. *J Chin Med Mater*, 2023, 46(9): 2319–2323.
- [13] 郑宁泽, 彭富华, 樊迪, 等. 黄芩素增强细胞缝隙链接的功能进而增加卵巢癌耐药细胞对顺铂的敏感性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(10): 905–906.
- ZHENG N Z, PENG F H, FAN D, et al. Baicalein enhances the function of gap junctions and then increases the sensitivity of drug-resistant ovarian cancer cells to cisplatin [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2019, 33(10): 905–906.
- [14] PARK S Y, LEE C J, CHOI J H, et al. The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal cancer stem cell persistence and radioresistance [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 399.
- [15] WANG L N, ZHANG Z T, WANG L, et al. TGF- β 1/SH2B3 axis regulates anoikis resistance and EMT of lung cancer cells by modulating JAK2/STAT3 and SHP2/Grb2 signaling pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 472.
- [16] 张尤, 陈炜. 名中医韩明向基于“一本四证”论治肺癌经验 [J]. *陕西中医*, 2023, 44(12): 1788–1791.
- ZHANG Y, CHEN W. Han Ming's experience in treating lung cancer based on “one book and four syndromes” [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2023, 44(12): 1788–1791.
- [17] 黎雪, 刘硕, 王学谦, 等. 中医药防治肺结节的优势及思考 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(11): 1814–1817.
- LI X, LIU S, WANG X Q, et al. Advantages and considerations of traditional Chinese medicine in preventing and treating pulmonary nodules [J]. *J Basic Chin Med*, 2023, 29(11): 1814–1817.
- [18] 刘晓龙, 李春燕, 陈奇剑, 等. 黄芩主要活性成分和药理作用研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2023, 40(10): 979–985, 990.
- LIU X L, LI C Y, CHEN Q J, et al. Research progress on the main active ingredients and pharmacological effects of *Scutellariae Radix* [J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2023, 40(10): 979–985, 990.
- [19] 李智鹏, 林鑫, 李良庆, 等. AG490 抑制 M2 样巨噬细胞 JAK2/STAT3 通路影响胃癌细胞增殖和凋亡 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2023, 44(5): 709–716.
- LI Z P, LIN X, LI L Q, et al. AG490 regulates JAK2/STAT3 pathway in M2-like macrophages via promoting the proliferation of gastric cancer cells and inhibiting apoptosis [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2023, 44(5): 709–716.
- [20] LIANG L, HUI K, HU C, et al. Autophagy inhibition potentiates the anti-angiogenic property of multikinase inhibitor anlotinib through JAK2/STAT3/VEGFA signaling in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 71.

[收稿日期] 2024-09-18

黄逸伦,徐芝炫,郭红刚,等. 唾液乳杆菌 Li01 对幽门螺杆菌合并苯并芘致长爪沙鼠 DNA 损伤的改善作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 530–539.

HUANG Y L, XU Z X, GUO H G, et al. Therapeutic effects of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 on DNA damage induced by the combination of *Helicobacter pylori* and Benzo(a)pyrene in Mongolian gerbils [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 530–539.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.007

唾液乳杆菌 Li01 对幽门螺杆菌合并苯并芘致长爪沙鼠 DNA 损伤的改善作用研究

黄逸伦¹, 徐芝炫², 郭红刚³, 张扬帆², 刘慧敏², 谢文迪²,
陈永平⁴, 褚晓峰^{5*}

(1. 温州医科大学阿尔伯特学院, 浙江 温州 325035; 2. 杭州医学院检验医学院、生物工程学院, 杭州 310053; 3. 杭州医学院实验动物中心, 杭州 310053; 4. 温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325035; 5. 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014)

【摘要】 目的 探讨唾液乳杆菌 Li01 (*Ligilactobacillus salivarius* Li01, *L. salivarius* Li01) 对幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)、苯并芘 (Benzo(a)pyrene, BaP)、Hp + BaP 共同作用引起的 DNA 损伤的保护作用, 评价 *L. salivarius* Li01 的相关益生特性。**方法** 雄性 SPF 级长爪沙鼠适应性饲养 1 周后, 随机分组进行 Hp、BaP、Hp + BaP 灌胃造模。第 32 周, 确定造模成功后使用 *L. salivarius* Li01 灌胃修复。第 36 周, 取长爪沙鼠眼球血做彗星实验并取肝组织检测细胞色素氧化酶 P4501A1 (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1, CYP1A1) 基因表达水平。**结果** 与对照组相比, Hp、BaP、Hp + BaP 组的彗星尾长、尾部 DNA 含量和肝 *Cyp1a1* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.0001$), 其中 Hp + BaP 组的彗星尾长、Olive 尾距、彗星尾部 DNA 含量和肝 *Cyp1a1* 基因表达水平显著高于 Hp 及 BaP 组 ($P < 0.05$)。 *L. salivarius* Li01 干预后, 各组彗星尾长、Olive 尾距、彗星尾部 DNA 含量及肝 *Cyp1a1* 基因表达水平显著减小 ($P < 0.001$)。**结论** Hp、BaP、Hp + BaP 均能引起长爪沙鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤, 且 Hp 和 BaP 具有协同致损伤作用, 而 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 造成的 DNA 损伤具有保护作用。

【关键词】 唾液乳杆菌; 幽门螺杆菌; 苯并芘; 长爪沙鼠模型; DNA 损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0530-10

Therapeutic effects of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 on DNA damage induced by the combination of *Helicobacter pylori* and Benzo(a)pyrene in Mongolian gerbils

HUANG Yilun¹, XU Zhixuan², GUO Honggang³, ZHANG Yangfan², LIU Huimin², XIE Wendi²,
CHEN Yongping⁴, CHU Xiaofeng^{5*}

[基金项目] 2024 年温州医科大学本专科学子科研立项资助课题 (wyx2024101143), 浙江省基础公益项目 (LGD22C040024)。

Funded by 2024 Wenzhou Medical University Undergraduate and Junior College Student Research Funding Projects (wyx2024101143), the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LGD22C040024)。

[作者简介] 黄逸伦, 男, 在读本科生, 研究方向: 微生物及病原微生物。Email: yilun13@ualberta.ca

[通信作者] 褚晓峰, 男, 学士, 研究员, 研究方向: 实验动物模型开发与比较医学。Email: cxf1001@hmc.edu.cn

(1. Alberta Institute, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 2. School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 3. Center of Laboratory Animal, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 4. the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 5. Affiliated People's Hospital, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

Corresponding author: CHU Xiaofeng. E-mail: cxf1001@hmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 (*L. salivarius* Li01) against DNA damage induced by *Helicobacter pylori* (Hp), Benzo(a)pyrene (BaP), and Hp + BaP, and to evaluate the probiotic properties of *L. salivarius* Li01. **Methods** After 1 week of adaptive feeding, specific pathogen-free male Mongolian gerbils were randomly assigned to groups and subjected to intragastric administration of Hp, BaP, and Hp + BaP for model induction. At week 32 post model establishment, therapeutic *L. salivarius* Li01 was administered intragastrically. At week 36, peripheral blood samples were collected from each group for the comet assay, while liver tissues were collected and tested for *Cyp1a1* gene expression levels. **Results** Compared with those in the control group, the comet tail length, %tail DNA, and hepatic *Cyp1a1* expression levels were significantly increased in the Hp, BaP, and Hp + BaP groups ($P < 0.0001$). Among these, the comet tail length, olive tail moment, %tail DNA, and hepatic *Cyp1a1* expression levels were significantly higher in the Hp + BaP group than in the Hp and BaP groups ($P < 0.05$). Following intervention with *L. salivarius* Li01, the comet tail length, olive tail moment, %tail DNA, and hepatic *Cyp1a1* expression levels were significantly reduced in each group ($P < 0.001$). **Conclusions** Hp infection, BaP exposure, and the Hp + BaP combination induced DNA damage in the peripheral lymphocytes of Mongolian gerbils, with the Hp + BaP combination showing synergistic damage. *L. salivarius* Li01 had a protective effect against DNA damage caused by Hp, BaP, and Hp + BaP.

【Keywords】 *Ligilactobacillus salivarius*; *Helicobacter pylori*; Benzo(a)pyrene; Mongolian gerbil model; DNA damage

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

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种革兰阴性微需氧螺旋菌, 通常定植于胃黏膜, 并能通过感染破坏胃肠道菌群和胃上皮细胞结构, 使 DNA 发生损伤, 增加细胞恶变概率^[1-2]。苯并芘 (Benzo(a)pyrene, BaP) 是一组含有五个苯环的多环芳烃^[3], 人类通过接触受污染的食物和空气摄入^[4-5], 其不与人体 DNA 直接反应, 而是通过二醇-环氧途径、邻醌途径和自由基阳离子途径被代谢活化后才与 DNA 形成加合物, 对 DNA 造成损伤, 损伤严重则会导致基因突变甚至诱发癌症^[6]。感染了 Hp 并同时接触到 BaP 是人类活动中较为普遍的现象, 但至今鲜见这两者共同作用于实验动物模型报道。根据文献^[7-8], 相比小鼠, 长爪沙鼠更易感染 Hp, 并在感染 Hp 后会出现与人类相似的疾病过程, 且饲养条件不高、饲养成本较低、易于管理, 寿命较小鼠长, 适合长期观察^[8], 是研究 Hp 感染较为理想的动物模型。而一般 DNA 水平体外实验采用的细菌 (原核) 或细胞 (真核) 培养条件苛刻, 需要特殊的仪器设

备, 对硬件环境要求极高。此外, 部分益生乳杆菌具有潜在的抗 DNA 损伤和抗基因突变活性, 如关于嗜酸乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌等的抗 DNA 损伤作用已有诸多报道^[9-10], 本课题组前期研究发现唾液乳杆菌 Li01 (*Ligilactobacillus salivarius* Li01, *L. salivarius* Li01) 具有优秀的抗炎、减轻组织异常、防止腹泻和体质量减轻等益生功能^[11-12], 但其是否具有抗 DNA 损伤的益生特性尚未见报导。因此, 本研究采用长爪沙鼠动物模型, 观察 *L. salivarius* Li01 在 Hp、BaP、Hp + BaP 引起的 DNA 损伤中的改善和缓解作用, 评价 *L. salivarius* Li01 的相关益生特性, 以期为益生菌资源开发提供候选菌株和实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性长爪沙鼠 72 只, 体质量 (50 ± 10) g, 2 月龄, 购于杭州医学院动物中心

【SCXK(浙)2019-0002】,并于杭州医学院动物中心【SYXK(浙)2019-0011】进行常规饲养(恒温 22 ~ 25 ℃,恒湿 40% ~ 60%,昼夜各半照明),饲料由杭州医学院动物中心提供,实验方案通过杭州医学院实验动物福利伦理委员会批准(2021-115),整个实验操作过程遵守实验动物标准操作规范。

1.1.2 菌种

Hp 国际标准菌株(Sydney strain 1, SS1),购买于杭州致远医学检验所,批号:20220817。*L. salivarius* Li01(1×10^{11} CFU/g),由绍兴同创生物科技有限公司馈赠,批号:20230418。

1.1.3 主要试剂与仪器

BaP(S30595,上海易博远生物科技有限公司);彗星电泳法检测细胞损伤试剂盒(KGA240-50,江苏凯基生物有限公司);小鼠淋巴细胞分离液(GS3702-100 mL,广州顺豪生物科技有限公司);Tris-HCL 缓冲液(3042538,上海尚宝生物科技有限公司);碱性琼脂糖凝胶电泳缓冲液 10 × (ST466-500 mL,上海碧云天生物技术有限公司);PBS 缓冲液 1 × (KGB5001,江苏凯基生物技术有限公司);PBS 缓冲液 10 × (P160220611,深圳逗点生物技术有限公司);总 RNA 提取剂(HKR022,杭州浩克生物技术有限公司);三氯甲烷(20230214,国药集团化学试剂有限公司);异丙醇(20221104,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(20221214,国药集团化学试剂有限公司);快速总 RNA 提取试剂盒(HKR06,杭州浩克生物技术有限公司);All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(AE341, Trans);2 × SYBR Green qPCR Master Mix(K1070, APEX BIO)。

电子天平(BSA223S,赛多利斯科学仪器有限公司,中国);移液器(G33552D,艾本德股份公司,德国);干式恒温器(GY-2102,精骐有限公司,美国);高速台式离心机(Centrifuge5702,艾本德股份公司,德国);海尔医用冷藏冷冻箱(HYCD-205,海尔生物医疗股份有限公司,中国);玻璃点样毛细管(南通医太玻璃仪器,中国);羽帆牌载玻片(盐城市羽帆实验器材有限公司,中国);微量离心管(上海市求精生化试剂仪器有限公司,中国);水平电泳槽(Mini-sub Cell GT, Bio-Rad, 美国);电泳仪(PowerPac HC, Bio-

Rad, 美国);多管架自动平衡离心机(TDZ5-WS, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, 中国);荧光显微镜(80i, 尼康, 日本);匀浆仪(KZ-II, Servicebio, 中国);荧光定量 PCR 仪(IQ5, Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型建立

SPF 级雄性长爪沙鼠,起初随机分为 4 组:正常对照(CG)组, Hp 组、BaP 组和 Hp + BaP 组,每组 18 只。Hp 组、Hp + BaP 组分别胃灌注 Hp 混悬液,浓度为 1×10^9 CFU/mL,每只每次 0.5 mL,每周 1 次,连续 5 周^[13]。同时 BaP 组进行 BaP 灌胃,将 BaP 溶于色拉油中,浓度为 5 mg/mL,每只每次 0.5 mL,连续灌胃 4 周,每周 2 次^[14]。Hp + BaP 组在 Hp 灌胃结束后,继续灌胃 BaP,浓度、剂量和频次同 BaP 组。模型建成后,第 32 周进行 *L. salivarius* Li01 灌胃修复:随机选择正常对照组, Hp 组, BaP 组, Hp + BaP 组各 9 例长爪沙鼠,分别组成正常对照组($n = 9$), Hp + Li01 组($n = 9$), BaP + Li01 组($n = 9$)和 Hp + BaP + Li01 组($n = 9$),每次每只长爪沙鼠用 *L. salivarius* Li01(浓度: 5×10^{10} CFU/mL)灌胃 1 mL,连续 4 周,每周 5 次^[12],对照组用 0.9% 的生理盐水代替。第 36 周时长爪沙鼠取血做 DNA 损伤实验及取肝组织检测细胞色素氧化酶 P4501A1(cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1, CYP1A1)基因表达水平。

1.2.2 长爪沙鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤检测(彗星实验)

取各组长爪沙鼠新鲜血液,提取所需淋巴细胞;在细胞计数板上进行计数,用 PBS 重悬使细胞密度为每毫升 10^6 个;载玻片预热,铺胶,总计铺三层,淋巴细胞位于第二层胶;使用配置好的 Lysis Buffer 于 4 ℃ 裂解 1.5 h;然后 DNA 碱解旋 30 min;调整电压 25 V,电泳 25 min;用 PI 染液进行中和染色;镜检拍照;最后各组随机挑选 100 个图片中细胞,通过 CASP 软件分析测量,得出尾长(tail length),Olive 尾距(Olive tail moment),彗星尾部 DNA 含量%(% tail DNA)。根据彗星尾部 DNA 含量%,可将损伤分为 5 个等级^[15],如表 1 所示。

表 1 DNA 损伤分级评定表
Table 1 DNA damage grading scale

等级 Grade	彗星尾部 DNA 含量 %tail DNA	损伤程度 Damage level
0 级 Grade 0	[0% , 5%)	无损伤 No damage
1 级 Grade 1	[5% , 20%)	轻度损伤 Mild damage
2 级 Grade 2	[20% , 40%)	中度损伤 Moderate damage
3 级 Grade 3	[40% , 95%)	高度损伤 High level damage
4 级 Grade 4	[95% , 100%]	重度损伤 Severe damage

1.2.3 长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因表达水平检测
取各组长爪沙鼠的肝组织样本,按照杭州浩克生物技术有限公司的快速总 RNA 提取试剂盒操作步骤提取 RNA,进行反转录。qPCR 条件为 94 ℃、10 min 预变性,40 个循环,具体为 94 ℃、15 s、60 ℃、30 s。采用 *Gapdh* 作为内参。PCR 引

物序列如表 2 所示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 27.0.1 进行统计学分析,GraphPad Prism 10.1.2 进行绘图,实验数据结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,多组间比较应用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 长爪沙鼠外周血淋巴细胞彗星实验形态学观察

2.1.1 Hp、BaP、Hp + BaP 对长爪沙鼠淋巴细胞 DNA 损伤形态学影响

当细胞 DNA 受损伤时,释放出断裂的 DNA 片段,电泳时,形成“彗星”状影像,DNA 损伤越多,进入细胞尾部的 DNA 碎片越多,由此来评价细胞 DNA 损伤情况。图 1 分别为各组外周血淋巴细胞在荧光显微镜下观察到的形态,正常对照组细胞呈圆形,细胞核边缘清楚、整齐,无拖尾现象。Hp + BaP 组,损伤的 DNA 片段从核中移出,

表 2 *Cyp1a1* 基因的引物序列
Table 2 Primer sequences for the *Cyp1a1* gene

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')	扩增片段长度/bp Amplified fragment length/bp
<i>Mou-Gapdh</i>	AACAGCAACTCCCACTCTTCC	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	164
<i>Cyp1a1</i>	GCCAATGTCATCTGTGCCATAT	CAGGTAACGGAGGACAGGAAT	147

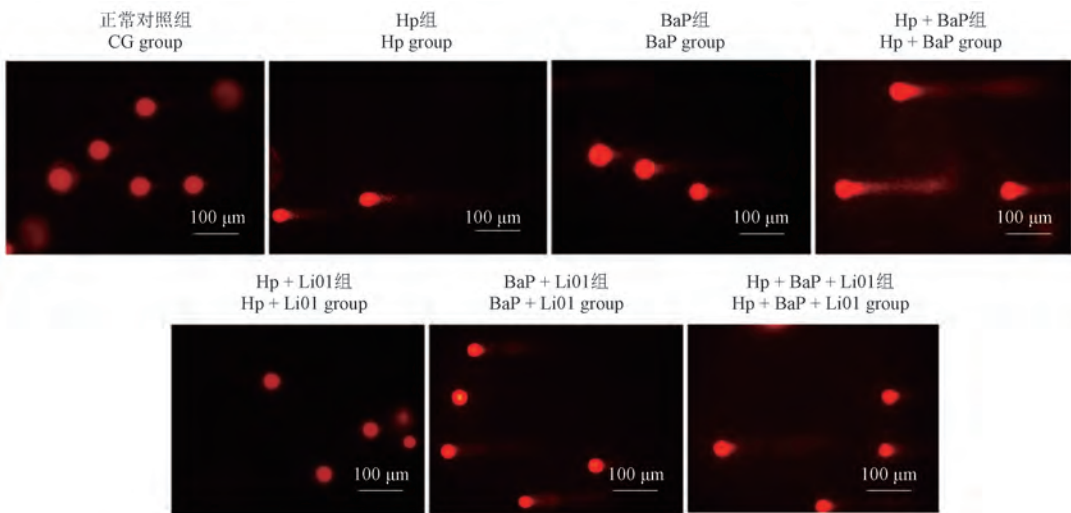


图 1 长爪沙鼠外周血淋巴细胞的 DNA 损伤形态学观察
Figure 1 Morphological observation of DNA damage in peripheral lymphocytes of Mongolian gerbils

呈现尾形分布,出现明显拖尾现象,形似“彗星”。Hp 组和 BaP 组也有拖尾现象。

2.1.2 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠淋巴细胞 DNA 损伤形态学方面的影响

如图 1 所示,经 *L. salivarius* Li01 修复后,与 Hp 组相比,Hp + Li01 组细胞核拖尾现象有明显改善,甚至部分逆转为正常;与 BaP 组相比,BaP + Li01 组细胞核拖尾现象有明显减轻;与 Hp + BaP 组相比,Hp + BaP + Li01 组的细胞损伤同样得到显著改善和修复。

2.2 各组长爪沙鼠外周血淋巴细胞彗星实验结果

2.2.1 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤结果

依据随机原则,对正常对照组、Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组分别计数外周血淋巴细胞约 100 个,对每个细胞分别进行彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量的测量。从图 2 可以看出,Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组的彗星尾长和尾部 DNA 含量均大于正常对照组,具有极显著差异性 ($P < 0.0001$);Hp + BaP 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均大于 Hp 或者 BaP 组,具有显著性差异性 ($P < 0.05$, $P < 0.0001$),根据

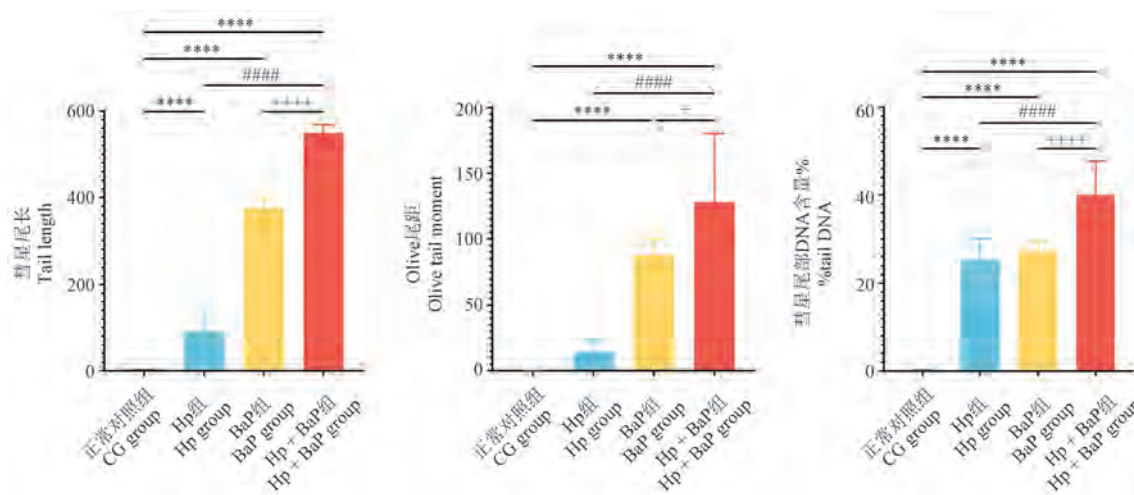
表 3,正常对照组无损伤,Hp、BaP 组均为中度损伤,Hp + BaP 组则为高度损伤。

2.2.2 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤的改善和修复作用结果

依据随机原则,对各实验组分别计数约 100 个外周血淋巴细胞,对每个细胞分别进行彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量的测量。从图 3 及表 3 可以看出,Hp + Li01 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均小于 Hp 组,具有极显著性差异性 ($P < 0.001$);BaP + Li01 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均小于 BaP 组,具有极显著差异性 ($P < 0.0001$);Hp + BaP + Li01 组的彗星尾长、Olive 尾距和彗星尾部 DNA 含量均小于 Hp + BaP 组,具有极显著差异性 ($P < 0.0001$)。根据表 3,正常对照组无损伤,Hp 组为中度损伤,Hp + Li01 组逆转为无损伤;BaP 组为中度损伤,BaP + Li01 组改善和减轻为轻度损伤;Hp + BaP 组为高度损伤;Hp + BaP + Li01 组修复为轻度损伤。

2.3 长爪沙鼠肝 *cyp1a1* 基因表达水平

如图 4 所示,与正常对照组相比,Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量均升高,且具有极显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P <$

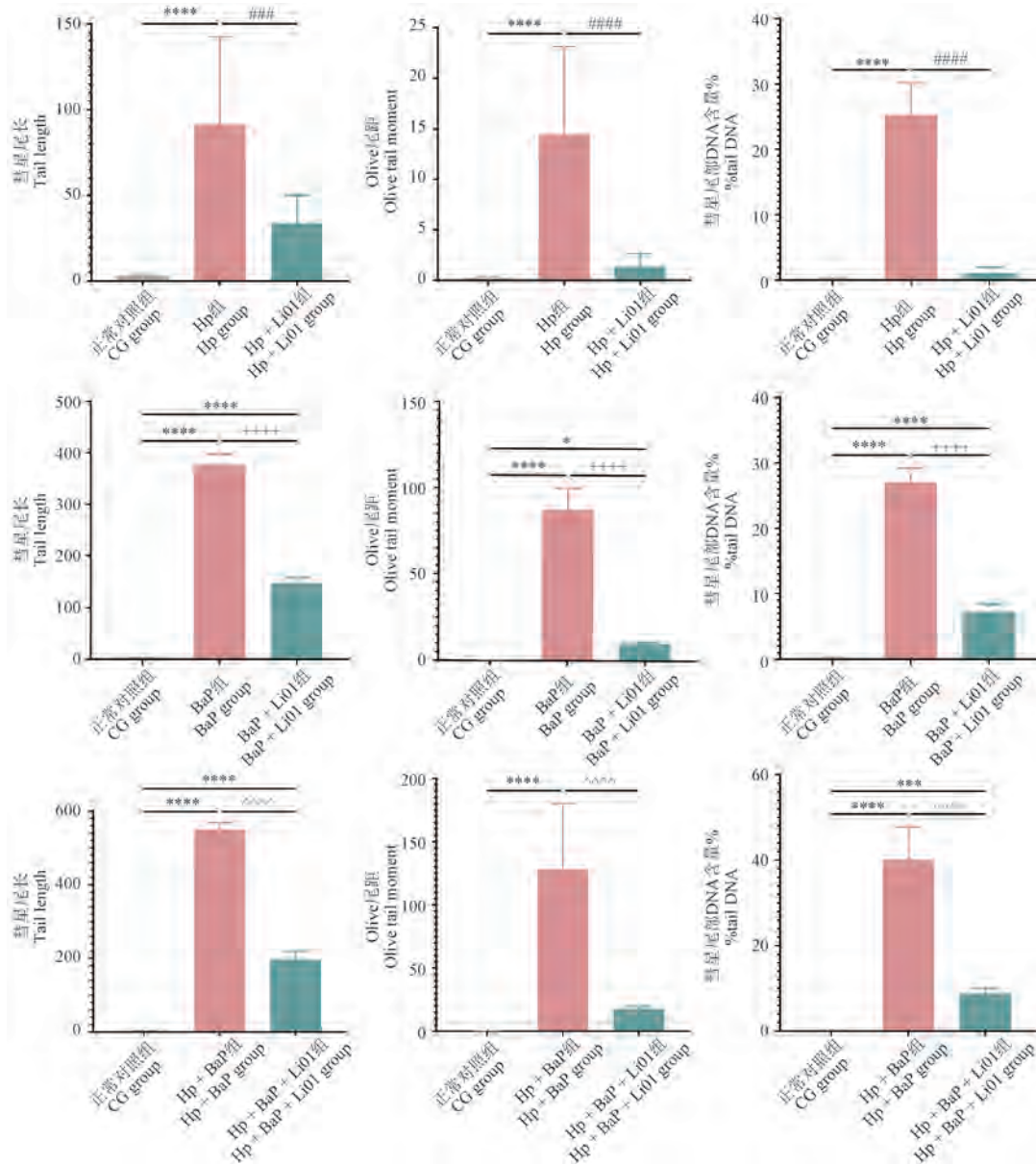


注:与正常对照组相比,**** $P < 0.0001$;与 Hp 组相比,**** $P < 0.0001$;与 BaP 组相比, + $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 2 Hp、BaP、Hp + BaP 致长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤结果 ($n = 9$)

Note. Compared with CG group, **** $P < 0.0001$. Compared with Hp group, **** $P < 0.0001$. Compared with BaP group, + $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 DNA damage caused by Hp, BaP and Hp + BaP in peripheral lymphocytes of Mongolian gerbils ($n = 9$)



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与 Hp 组相比,### $P < 0.001$;与 Hp + BaP 组相比,#### $P < 0.0001$ 。(下图/表同)

图 3 *L. salivarius* LiO1 对 Hp、BaP、Hp + BaP 致爪沙鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤的作用结果($n = 9$)

Note. Compared with CG group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with Hp group, ### $P < 0.001$. Compared with Hp + BaP group, #### $P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 3 Effects of *L. salivarius* LiO1 on peripheral blood lymphocyte DNA damage in Mongolian gerbils induced by Hp, BaP, and Hp + BaP ($n = 9$)

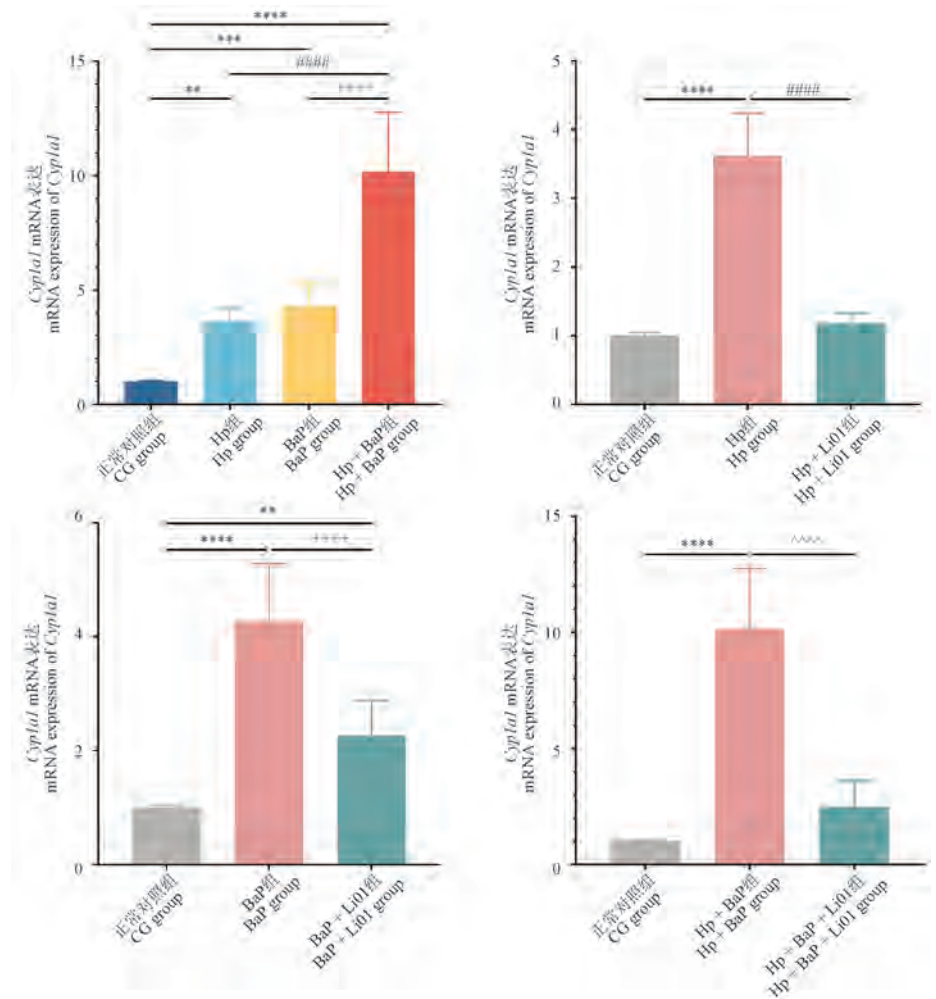
0.0001);与 Hp 组或者 BaP 组相比,Hp + BaP 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著升高 ($P < 0.0001$);与 Hp 组相比,Hp + LiO1 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著下降 ($P < 0.0001$);与 BaP 组相比,BaP + LiO1 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著下降 ($P < 0.0001$);与 Hp + BaP 组相比,Hp + BaP + LiO1 组的 *Cyp1a1* mRNA 表达量极显著

下降 ($P < 0.0001$)。 *Cyp1a1* mRNA 检测结果分析说明 Hp、BaP、Hp + BaP 均能使长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因表达水平升高,且与 Hp 或 BaP 单因素相比,Hp + BaP 能更显著地提高长爪沙鼠肝组织中 *Cyp1a1* 基因的表达量,而 *L. salivarius* LiO1 干预后,Hp 组、BaP 组、Hp + BaP 组的 *Cyp1a1* 基因的表达量均明显下降。

表 3 L. salivarius Li01 干预前后,各实验组长爪沙鼠细胞 DNA 损伤情况($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 DNA damage status of Mongolian gerbil cells in each group before and after intervention with L. salivarius Li01 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别 Groups	彗星尾长 Tail length	Olive 尾距 Olive tail moment	彗星尾部 DNA 含量% %tail DNA	损伤级别 Damage level
正常对照组 CG group	3.20 ± 0.42	0.26 ± 0.12	0.16 ± 0.16	无损伤 No damage
Hp 组 Hp group	91.40 ± 48.55****	14.43 ± 8.26****	25.30 ± 4.85****	中度损伤 Moderate damage
Hp + Li01 组 Hp + Li01 group	33.70 ± 16.56###	1.37 ± 1.30####	1.04 ± 0.96####	无损伤 No damage
BaP 组 BaP group	376.20 ± 21.77****	87.37 ± 12.59****	27.05 ± 2.15****	中度损伤 Moderate damage
BaP + Li01 组 BaP + Li01 group	170.73 ± 10.55****	10.15 ± 0.80****	7.24 ± 1.22****	轻度损伤 Mild damage
Hp + BaP 组 Hp + BaP group	549.50 ± 19.23**** #### +	128.06 ± 52.29**** #### +	40.08 ± 7.30**** #### +	高度损伤 High level damage
Hp + BaP + Li01 组 Hp + BaP + Li01 group	197.00 ± 22.57***	17.80 ± 1.91***	8.83 ± 1.23***	轻度损伤 Mild damage



注:与正常对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 4 各组长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因表达水平($n = 9$)

Note. Compared with CG group, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Expression levels of the *Cyp1a1* gene in the liver tissues of Mongolian gerbils in each group($n = 9$)

3 讨论

L. salivarius Li01 作为一种潜在的益生菌,其益生特性已有少量相关报导。根据文献,使用 *L. salivarius* Li01 和白藜芦醇能治疗葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎,并且两者具有良好的协同作用^[16]。此外,有研究表明 *L. salivarius* Li01 具有通过调节 5-羟色胺信号通路来改善和治疗小鼠便秘的作用^[17],并可能通过抑制细菌易位、重塑肠道微生物群和降低促炎细胞因子水平等机制改善小鼠急性肝损伤等^[11]。

本研究彗星实验结果显示,单一因素 Hp、BaP 均能致长爪沙鼠细胞 DNA 损伤,而 Hp、BaP 联合使用引起的损伤更加严重。根据相关文献,这是因为 Hp 感染导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和引起细胞氧化应激,细胞氧化应激导致 DNA 链断裂,进而引起氧化性 DNA 损伤^[18-19],DNA 损伤在 Hp 感染后胃组织从胃炎向胃癌演变过程中发挥了重要的作用^[20]。另有研究表明,BaP 也可以通过影响 ROS 的形成来诱导氧化应激^[21],并导致细胞 DNA 发生损伤。此外,BaP 进入机体后,在 CYP450 酶系的作用下,经过一系列代谢活化反应生成终致癌物 BPDE,直接作用于 DNA,导致 DNA 受损伤,释放出断裂的 DNA 片段^[22]。因本研究在灌胃之前,长爪沙鼠免疫力强,Hp、BaP 暴露的量较低,所以单一作用组属于中度损伤,而同样的暴露量,Hp 和 BaP 协同作用组达到高度损伤,从分子水平说明,Hp 和 BaP 两者具有协同作用。*L. salivarius* Li01 干预后,各模型组细胞 DNA 损伤减轻、甚至有的逆转至基本恢复正常。以上结果说明 *L. salivarius* Li01 可能具有修复某些因素引起的 DNA 损伤的益生特性。这与 LIU 等^[23]的研究结果一致,益生乳杆菌能使 BaP 诱导的小鼠 DNA 损伤大大减轻。ZHANG 等^[24]的研究结果同样发现,用 Li 及其分泌物饲灌胃多环芳烃类化合物造模的舌癌大鼠,发现其改善了大鼠 DNA 损伤及抑制了肿瘤的产生。一般认为益生菌对致癌物的脱基因毒性功能主要通过两种途径实现,一种是通过菌体对有毒物质的吸附来实现,另一种是通过菌体及其分泌物将有毒物质转化为无毒物质的代谢、降解过程来实现^[25-26]。本研究推测是以上两种情

况都有:(1)已有文献报导,膳食中的致癌物 BaP、黄曲霉素 B₁ 等益生乳杆菌抑制的机理是细菌的吸附作用^[27-28];(2)葛绍阳等^[29]已明确 *L. salivarius* 菌体分泌物中存在的 H₂O₂ 在分解多环芳烃类化合物的过程中起关键性作用。关于 *L. salivarius* Li01 具有脱基因毒性的机理研究正在进行中。

Cyp1a1 基因是 CYP1 家族的一部分,主要在肝、肺和肠中表达^[30]。根据文献,*Cyp1a1* 在 BaP 的代谢、解毒中起着不可或缺的作用^[31]。经口暴露的 BaP 通过消化道在肠壁被吸收入血,再进入肝,最终参与全身血液循环^[32]。在肝,BaP 可与芳烃受体结合,导致芳烃受体转移至细胞核,诱发 *Cyp1a1* 的转录和表达,促使与突变密切相关的二氢二羟环氧苯并(a)芘(Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, BPDE)-DNA 加合物的形成,BPDE-DNA 导致基因 DNA 序列中 G 到 T 的碱基突变^[33],使 DNA 在细胞分裂过程中不能正常复制,基因无法正确的翻译成蛋白质,促使细胞突变和 DNA 损伤,导致炎性细胞因子的表达增加,进而引发炎症,甚至癌变^[34-35]。本研究中 Hp 感染合并 BaP 摄入(Hp + BaP 组)能诱导长爪沙鼠肝 *Cyp1a1* 基因的表达量显著高于单纯 Hp 感染组或者单纯 BaP 诱导组。同时,*L. salivarius* Li01 能显著降低各模型组 *Cyp1a1* 基因表达量,这一结论在一定程度上揭示了 Hp 和 BaP 协同导致长爪沙鼠更严重的 DNA 损伤,以及 *L. salivarius* Li01 对 Hp、BaP、Hp + BaP 引起的 DNA 损伤具有保护作用的可能机制。然而,关于 Hp 单独感染与合并 BaP 摄入上调 *Cyp1a1* 基因表达的机制还有待进一步的研究。

综上所述,Hp、BaP、Hp + BaP 均能引起长爪沙鼠血细胞 DNA 损伤,其中 Hp 和 BaP 具有协同作用,而 *L. salivarius* Li01 在 Hp、BaP、Hp + BaP 引起的 DNA 损伤中具有良好的改善、修复、甚至逆转的益生作用,是益生菌资源开发优秀的候选菌株。

参 考 文 献 (References)

- [1] WU L, JIANG F, SHEN X. Helicobacter pylori CagA protein regulating the biological characteristics of gastric cancer through the miR-155-5p/SMAD2/SP1 axis [J]. Pathogens, 2022, 11(8): 846.

- [2] 董海滨. 幽门螺杆菌 *cagA* 和 *vacA* 基因型对胃上皮细胞 DNA 损伤修复的影响 [D]. 郑州: 郑州大学; 2018.
DONG H B. Effect of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genotypes on DNA damage repairing gastric epithelial cells. [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2018.
- [3] BUKOWSKA B, MOKRA K, MICHAŁOWICZ J. Benzo [a] pyrene-environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (11): 6348.
- [4] 管融资, 吴航利, 王佳, 等. 苯并[a]芘污染现状及其生物毒性效应 [J]. *延安大学学报(自然科学版)*, 2019, 38 (3): 49-54.
GUAN R Z, WU H L, WANG J, et al. Status of benzo[pyrene] pollution and its biotoxic effects [J]. *J Yanan Univ Nat (Sci Ed)*, 2019, 38(3): 49-54.
- [5] BUKOWSKA B, SICIŃSKA P. Influence of benzo (a) pyrene on different epigenetic processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13453.
- [6] 王珠琳, 袁莉, 张萌. 苯并[a]芘及其代谢产物与 DNA 加合物检测方法的研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(14): 287-293.
WANG Z L, YUAN L, ZHANG M. Research progress on the detection methods of benzo [a] pyrene and its metabolites and DNA adducts [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(14): 287-293.
- [7] MISHRA K K, SRIVASTAVA S, AAYYAGARI A, et al. Development of an animal model of *Helicobacter pylori* (Indian strain) infection [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2019, 38(2): 167-172.
- [8] NOTO J M, ROMERO-GALLO J, BLANCA PIAZUELO M, et al. The Mongolian gerbil: a robust model of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 263-280.
- [9] 汪雪, 陈颖, 崔省委, 等. 乳杆菌属益生菌在家畜疾病防治中的应用 [J]. *甘肃畜牧兽医*, 2022, 52(6): 17-20, 29.
WANG X, CHEN Y, CUI S W, et al. Application of *Lactobacillus* probiotics in prevention and treatment of livestock diseases [J]. *Gansu Anim Husb Vet Med*, 2022, 52(6): 17-20, 29.
- [10] 李海龙, 丁小玲, 李吕木. 唾液乳杆菌的研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2015, 35(5): 94-97.
LI H L, DING X L, LI L L. Advances in saliva *Lactobacillus* (*Lactobacillus salivarius*) [J]. *J Microbiol*, 2015, 35(5): 94-97.
- [11] YANG L, BIAN X, WU W, et al. Protective effect of *Lactobacillus salivarius* Li01 on thioacetamide-induced acute liver injury and hyperammonaemia [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(6): 1860-1876.
- [12] YAO M, LU Y, ZHANG T, et al. Improved functionality of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 in alleviating colonic inflammation by layer-by-layer microencapsulation [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2021, 7(1): 58.
- [13] CRAFA P, RUSSO M, MIRAGLIA C, et al. From sidney to OLGA: an overview of atrophic gastritis [J]. *Acta Biomed*, 2018, 89(8-S): 93-99.
- [14] 党海珍, 魏品康, 张霄峰. 冰盐水对苯并(a)芘诱发小鼠前胃组织癌变过程的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(11): 1266-1267.
DANG H Z, WEI P K, ZHANG X F. Influence of ice brine on the process of B (a) P inducing anterior stomach neoplasms in mice [J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2006, 27(11): 1266-1267.
- [15] 朱燕萍, 金念祖, 周建伟, 等. 槲皮素在苯并芘致小鼠 DNA 损伤中的作用 [J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(11): 1333-1335.
ZHU Y P, JIN N Z, ZHOU J W, et al. Effect of quercetin on benzo [a] pyrene-induced DNA damage in mice [J]. *China Public Health*, 2004, 20(11): 1333-1335.
- [16] FEI Y, ZHANG S, HAN S, et al. The role of dihydroresveratrol in enhancing the synergistic effect of *Ligilactobacillus salivarius* Li01 and resveratrol in ameliorating colitis in mice [J]. *Research (Wash D C)*, 2022, 2022: 9863845.
- [17] QIU B, ZHU L, ZHANG S, et al. Prevention of loperamide-induced constipation in mice and alteration of 5-hydroxytryptamine signaling by *Ligilactobacillus salivarius* Li01 [J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 4083.
- [18] GOBERT A P, WILSON K T. Polyamine- and NADPH-dependent generation of ROS during *Helicobacter pylori* infection: a blessing in disguise [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 105: 16-27.
- [19] SALVATORI S, MARAFINI I, LAUDISI F, et al. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: pathogenetic mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2895.
- [20] KALISPERATI P, SPANOU E, PATERAS I S, et al. Inflammation, DNA damage, *Helicobacter pylori* and gastric tumorigenesis [J]. *Front Genet*, 2017, 8: 20.
- [21] GAO M, ZHENG A, CHEN L, et al. Benzo (a) pyrene affects proliferation with reference to metabolic genes and ROS/HIF-1 α /HO-1 signaling in A549 and MCF-7 cancer cells [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(2): 741-749.
- [22] REED L, MRIZOVA I, BARTA F, et al. Cytochrome b5 impacts on cytochrome P450-mediated metabolism of benzo [a] pyrene and its DNA adduct formation: studies in hepatic cytochrome b5/P450 reductase null (HBRN) mice [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(4): 1625-1638.
- [23] LIU J, HE H, XU M, et al. Detoxification of oral exposure

- to benzo(a)pyrene by *Lactobacillus plantarum* CICC 23121 in mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65(12): e2001149.
- [24] ZHANG M, WANG F, JIANG L, et al. *Lactobacillus salivarius* REN inhibits rat oral cancer induced by 4-nitroquinoline 1-oxide [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(7): 686–694.
- [25] 张明, 孙二娜. 脱基因毒性乳酸菌的筛选 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(13): 123–125.
ZHANG M, SUN E N. Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by HPLC [J]. Food Res Dev, 2014, 35(13): 123–125.
- [26] 王晓. 利用乳杆菌脱除伏马毒素的研究 [D]. 北京: 北京林业大学; 2015.
WANG X. Study on the removal of fumonisin toxins using *Lactobacillus* [D]. Beijing: Beijing Forestry University; 2015.
- [27] 李扬扬, 张晓瑞, 郭玉蓉, 等. 乳酸菌对棒曲霉素的脱除作用 [J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 40–44.
LI Y Y, ZHANG X R, GUO Y R, et al. Removal of patulin by lactic acid bacteria [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(10): 40–44.
- [28] 张珺雯. 双歧杆菌缓解苯并芘 (BaP) 基因毒性研究 [D]. 北京: 北京林业大学; 2017.
ZHANG J W. Study on the amelioration of Bifidobacteria on Benzo(a)pyrene (BaP) genotoxicity [D]. Beijing: Beijing Forestry University; 2017.
- [29] 葛绍阳, 张明, 侯彩云, 等. 唾液乳杆菌分泌物脱基因毒性活性物质分析 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 48–53.
GE S Y, ZHANG M, HOU C Y, et al. Analysis of antigenotoxicity substance of the secretion of *Lactobacillus salivarius* Ren [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(1): 48–53.
- [30] KLOMP F, WENZEL C, DROZDZIK M, et al. Drug-drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(12): 1201.
- [31] XIA G, ZHOU G, JIANG W, et al. Attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced carcinogenesis and tumorigenesis by omega-3 fatty acids in mice in vivo [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(7): 3781.
- [32] WANG L, XU W, MA L, et al. Detoxification of benzo[a]Pyrene primarily depends on cytochrome P450, while bioactivation involves additional oxidoreductases including 5-lipoxygenase, cyclooxygenase, and aldo-keto reductase in the liver [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017, 31(7): e21902.
- [33] MESCHER M, HAARMANN-STEMMANN T. Modulation of CYP1A1 metabolism: from adverse health effects to chemoprevention and therapeutic options [J]. Pharmacol Ther, 2018, 187: 71–87.
- [34] WILLIS A J, INDRA R, WOHAK L E, et al. The impact of chemotherapeutic drugs on the CYP1A1-catalysed metabolism of the environmental carcinogen benzo[a]Pyrene: Effects in human colorectal HCT116 TP53(+/+), TP53(+/-) and TP53(-/-) cells [J]. Toxicology, 2018, 398/399: 1–12.
- [35] LI W, HU J, ADEBALI O, et al. Human genome-wide repair map of DNA damage caused by the cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(26): 6752–6757.

[收稿日期] 2024-09-23

章俐俐,曹淑琼,徐梦婷,等. 茶花蜜对高脂饮食果蝇模型生物学特征的影响[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 540-548.

ZHANG L L, CAO S Q, XU T M, et al. Impact of camellia honey on high-fat diet-induced intestinal inflammation and injury in *Drosophila* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 540-548.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.008

茶花蜜对高脂饮食果蝇模型 生物学特征的影响

章俐俐^{1,2#}, 曹淑琼^{1#}, 徐梦婷¹, 洪滔³, 张美芳¹, 刘丹¹,
罗涛^{4*}, 刘志勇^{1,5*}

(1. 江西中医药大学实验动物科技中心, 南昌 330004; 2. 江西省儿童医院, 南昌 330006;
3. 江西中医药大学临床医学院, 南昌 330004; 4. 南昌大学第一附属医院血液净化中心,
南昌 330006; 5. 南昌市实验动物病理重点实验室, 南昌 330004)

【摘要】 目的 探索茶花蜜对高脂饮食诱导的果蝇模型生物学特征、肠道炎症和损伤的影响。**方法** 以标准培养基中加入 30% 猪油为果蝇高脂模型组, 采用含有不同浓度的茶花蜜的高脂培养基作为各茶花蜜组, 分别对果蝇的成虫体质量、羽化率、成虫爬行能力、脂滴的大小及肠道活性氧自由基(ROS)水平进行检测比较。**结果** 与模型组比较, 各茶花蜜组有明显的改善效果, 茶花蜜可以改善果蝇由于高脂饮食诱导的羽化率下降、果蝇蛹体积变大、成虫平均体质量增大、成虫爬行能力下降、脂滴面积增大、肠道损伤及活性氧自由基水平升高。**结论** 茶花蜜可以改善高脂饮食诱导的果蝇生长发育及肠道炎症和损伤。

【关键词】 茶花蜜; 肠道; 高脂饮食; 果蝇; 生物表型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0540-09

Impact of camellia honey on high-fat diet-induced intestinal inflammation and injury in *Drosophila*

ZHANG Lili^{1,2#}, CAO Shuqiong^{1#}, XU Mengting¹, HONG Tao³, ZHANG Meifang¹, LIU Dan¹,
LUO Tao^{4*}, LIU Zhiyong^{1,5*}

(1. Experimental Animal Technology Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China; 3. Clinical Medical College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 4. Hemodialysis Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;
5. Key Laboratory of Experimental Animal Pathology of Nanchang, Nanchang 330004, China)

Corresponding author: LUO Tao. E-mail: 568017151@qq.com; LIU Zhiyong. E-mail: liuzhiyong0791@163.com

【基金项目】 江西中医药大学大学生创新创业项目(2024125), 校级科技创新团队发展计划(CXTD-22004)。

Funded by Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Project (2024125), University-Level Scientific and Technological Innovation Team Development Program (CXTD-22004).

【作者简介】 章俐俐, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药理与毒理。Email: 395831576@qq.com;

曹淑琼, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药食两用中药药理。Email: 2822420543@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 罗涛, 男, 学士, 主管护师, 研究方向: 药效研究。Email: 568017151@qq.com;

刘志勇, 男, 博士, 博士生导师, 教授, 研究方向: 药食两用中药药理与毒理。Email: liuzhiyong0791@163.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To explore the effects of camellia honey on intestinal inflammation and injury induced by a high-fat diet (HFD) in *Drosophila*. **Methods** A HFD model group of fruit flies was created by feeding with standard culture medium containing 30% lard. Each camellia honey groups were fed the same high-fat medium containing different concentrations of camellia honey. The body mass, eclosion rate, climbing ability, size of lipid droplets, and levels of intestinal reactive oxygen species in adult flies were measured and analyzed. **Results** Compared with the model group, each camellia honey groups showed significant improvements. Specifically, camellia honey ameliorated the following HFD-induced alterations: decline in eclosion rate, increase in pupal volume, increase in adult average body mass, decrease in adult climbing ability, enlargement of the lipid droplet area, elevation in intestinal ROS levels, and intestinal damage. **Conclusions** Camellia honey improved the growth and development, intestinal inflammation, and injury induced by a HFD in *Drosophila*.

【Keywords】 camellia honey; intestine; high-fat diet; *Drosophila*; bio-phenotype

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

随着生活水平的不断提高,居民膳食中脂质摄入量日益增加,脂肪堆积和超重等代谢疾病增多,特别是高脂饮食可能导致肠道损伤^[1-3],饮食方式西化或高脂饮食还会破坏肠道黏膜屏障,造成肠道微生态失调,导致肠道细菌的多样性降低,功能改变,出现慢性炎症,使体内脂肪体脂滴增多,活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)水平显著上升等,导致肠道出现炎症表现^[4-6]。

我国是茶树的发源地,茶树是一种蜜、粉含量很高的植物,但是茶花蜜(camellia honey)由于寡糖含量高,对人工养殖蜜蜂子代有一定的毒性^[7-8],自然条件下人工养殖的蜜蜂并不爱采集茶花蜜^[9],但是有研究发现,如在人工干预下,蜜蜂可以采集茶花蜜,所得到的茶花蜜含有棉籽糖和水苏糖^[10],这两个糖被归类为棉籽糖家族低聚糖(raffinose family oligosaccharides, RFOs),是一类具有调节肠道菌群、预防克罗恩病、保护肝、降低血糖、血脂等生物学功能的益生元^[11-14],有很高的药用价值,有研究发现茶花蜜有利于控制和缓解肠道疾病,而茶花蜜是否可以对高脂饮食导致的肠道炎症和损伤有治疗或预防作用有待研究。

果蝇生命周期短,基因组序列已完成,且部分基因与人类的基因序列保持较高的同源性,已被证明是一种评估多种抗氧化剂特性的检测平台^[15]。果蝇肠道结构简单,且功能与人类相似,当果蝇受到外来有害物质的损害时,其肠黏膜上皮屏障被破坏,肠道内稳态被打破,从而影响果蝇的正常生长和发育^[16],本实验以野生型黑腹果

蝇(*Drosophila melanogaster*)为实验对象,通过高脂饮食建立高脂果蝇模型,模拟现代人高脂饮食导致的肠道炎症和损伤,然后观察茶花蜜对高脂饮食诱导的果蝇肠道炎症和损伤的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

羽化 12 h 内的新生野生型黑腹果蝇 w118,由江西中医药大学动物科技实验中心提供。实验期间动物饲养于江西中医药大学实验动物科技中心【SYXK(赣)2022-0002】,所有果蝇均饲养于同一环境下,将果蝇培养于恒温培养箱中,培养条件为温度 25 ℃,相对湿度 60%,光照时间 12 h,本实验通过江西中医药大学实验动物科技中心伦理审批(JZLLSC20240812)。

1.1.2 主要仪器与试剂

茶花蜜(批号:20221121,由江西农业大学李震博士提供);二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)(批号:GC30025,购自 GLPBIO 公司);氟硼二吡咯(Boron-dipyrromethe, BODIPY)(批号:GC42959,购自 GLPBIO 公司);鬼笔环肽(Phalloidin)(批号:GC15692,购自 GLPBIO 公司);亮蓝溶液(批号:C14869772,购自麦克林公司);4%多聚甲醛通用型组织固定液(批号:24312112,购自 biosharp 公司);PBS(批号:G4202,购自 Servicebio 公司);曲拉通 X-100(批号 T8200,购自 Solarbio 公司);猪油(批号:20240311,购自 sam 超市)。恒温培养箱(宁波赛福实验仪器有限公司),果蝇

CO₂ 麻醉装置(南昌江竹实业有限公司);分析天平(Sartorius 公司);电子分析天平(METTLER TOLEDO 公司);Axioskop 2 plus 型荧光显微镜(徕卡公司);普通显微镜(CNOPtec 公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备

基础培养基:玉米粉 26.25 g,白糖 18.75 g,琼脂 1.875 g,酵母粉 10 g,丙酸 1.25 mL,尼泊金 3 mL,水 250 mL。在培养基未凝固前分装到果蝇管中,高压灭菌,冷却凝固后放入恒温培养箱中 4℃ 储藏,用时提前拿出待回室温后方可用于果蝇喂养。

高脂培养基:在基础培养基的基础上添加 30% 猪油制成高脂培养基。

茶花蜜培养基:在高脂培养基的基础上添加不同浓度的茶花蜜,配成 0.25%,0.5%,1% 的茶花蜜培养基。

1.2.2 实验造模和处理

实验果蝇分为空白对照组,模型组,茶花蜜组(0.25%,0.5%,1%)。每组 30 只(雌 20 只,雄 10 只)。空白对照组接种到基础培养基中进行喂养;模型组接种到高脂培养基进行喂养,模拟现代人的高脂饮食导致肠道炎症和损伤;含药组分别接种至 0.25%,0.5%,1% 茶花蜜培养基中进行喂养^[17-18]。

1.2.3 观察和检测指标

(1) 蛹体积测定、成虫体质量的测定及攀爬能力的测定:收集在不同培养基中的蛹,将蛹放置在显微镜下以相同倍数进行拍摄,图片使用 Image J 1.8.0 软件测量出蛹的长度和宽度,以空白对照组体积为标准,利用公式(1): $V = 4 \times (L/2) \times (W/2)^2$ 。式中: V 为蛹体积; L 为蛹长度; W 为蛹宽度。

将羽化不超过 8 h 的成年果蝇收集在新鲜培养基中放置 24 h,然后雌雄分开放入试管中,每组至少 30 只,采用分析天平称重后根据公式:平均体质量 = 总质量/称量个数计算得到成虫平均体质量。在温度为 25℃、湿度为 60% 的环境光下进行实验。收集 10 只新羽化(3 日龄)的雄果蝇,将果蝇放置至空管底部,并同时开始计时,11 s 时,用相机照下图片。实验重复 3 次,根据公式:爬行能力 = 爬行超过 8 cm(包括 8 cm)的果蝇个

数/10 × 100%,计算爬行能力。

(2) 成虫羽化率的测定:羽化率公式为:羽化率 = 羽化后蛹壳个数/结蛹总数 × 100%,计算成虫羽化率

(3) 幼虫脂肪体细胞和脂滴染色:收集不同培养基中的三龄幼虫,准备 4% 多聚甲醛、PBS、荧光染料(BODIPY、DAPI)、封片剂和显微镜。在冰 PBS 中利用显微镜对果蝇三龄幼虫进行解剖,提取脂肪体组织置于载玻片上。所有材料取完后,用移液管去除 PBS,再用 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 min。去除 4% 多聚甲醛,滴入 PBST 清洗除去残余的 4% 多聚甲醛,洗涤 3 次,分别为 5、5 和 15 min。去除载玻片上的 PBST,将荧光染料用铝箔纸对试管包裹,染色全程避光处理,防止荧光淬灭。将 BODIPY 荧光染料滴入载玻片上,将组织包围,染色 30 min。去除 BODIPY 染料,每个载玻片上加入 PBST,清洗 3 次,共 15 min。去除载玻片上的 PBST,用 DAPI 染色 10 min。去除 DAPI 染料,加入 PBST 洗涤二次,共 10 min。在载玻片上滴封片剂甘油,盖上盖玻片进行封片处理。封片之后可以置于片盒中 4℃ 保存或立即进行 Axioskop 2 plus 型荧光显微镜拍摄^[19]。结果用 Image J 1.8.0 分析计算单位面积内脂滴个数和细胞核个数,以空白对照组为标准,分别计算模型组、茶花蜜组的相对脂滴面积。

(4) 肠道 ROS 水平的测定:在常温的 PBS 缓冲液中,利用显微镜提取雌果蝇成虫肠道;加 DHE(用 PBS 缓冲液稀释)避光染色 30 min;PBS 缓冲液清洗肠道 3 次,每次清洗 5 min;在黑暗条件下将肠道用 4% 多聚甲醛固定 30 min,然后用 PBS 再次清洗 3 次,每次 5 min。将肠道与 DAPI 避光结合 5 min,加入 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。用 70% 甘油封片,用荧光显微镜观察并拍照。使用 Image J 1.8.0 软件,通过 DHE 的荧光强度指示 ROS 水平。

(5) 蓝精灵实验:30 只新羽化的(3 日龄)果蝇按照上述分组培养 72 h 后,饥饿处理 1 h。将各组果蝇分别放入含浸透 2.4% 亮蓝溶液(含有 5% 蔗糖)的滤纸片的培养管,培养 12 h^[21]。在冰 PBS 溶液中解剖并提取果蝇中肠。肠道用 4% 多聚甲醛固定 20 min,然后用 PBS 清洗 3 次^[21]。滴入 70% 甘油后,将肠道置于电子显微镜下进行观

察和拍照,以评估肠道泄漏,并根据蓝色果蝇数量占果蝇总数的百分比计算泄漏率。

1.3 统计学分析

实验数据用 IBM SPSS 26.0 统计软件进行统计分析,各项指标采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较使用单因素方差分析,组间多重比较使用 LSD 检验,本实验所用图谱均采用 Graph prism 9.3.1 软件作图,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 茶花蜜对高脂饮食果蝇体质量和蛹体积的影响

与空白对照组相比,高脂饮食导致模型组相对蛹体积上升,同时,当添加 0.25%、0.5%、1% 茶花蜜后,蛹的大小和体积得到显著的改善(图 1A),0.5%、1% 茶花蜜组接近正常。模型组的成虫平均质量相较于空白对照组更大($P < 0.05$),喂食茶花蜜后成虫平均体质量与模型组比较显著下降,差异显著($P < 0.05$,图 1B)。

2.2 茶花蜜对高脂饮食果蝇的羽化率的影响

图 2 结果显示,模型组与空白对照组相比,羽化率显著下降($P < 0.01$),说明高脂饮食能使果蝇的羽化率显著下降。茶花蜜各组与模型组相

比,茶花蜜组的羽化率得到了明显提升($P < 0.05$, $P < 0.001$)。上述结果表明,茶花蜜对高脂饮食诱导的果蝇羽化率下降有良好的改善作用。

2.3 茶花蜜对高脂饮食果蝇攀爬能力的影响

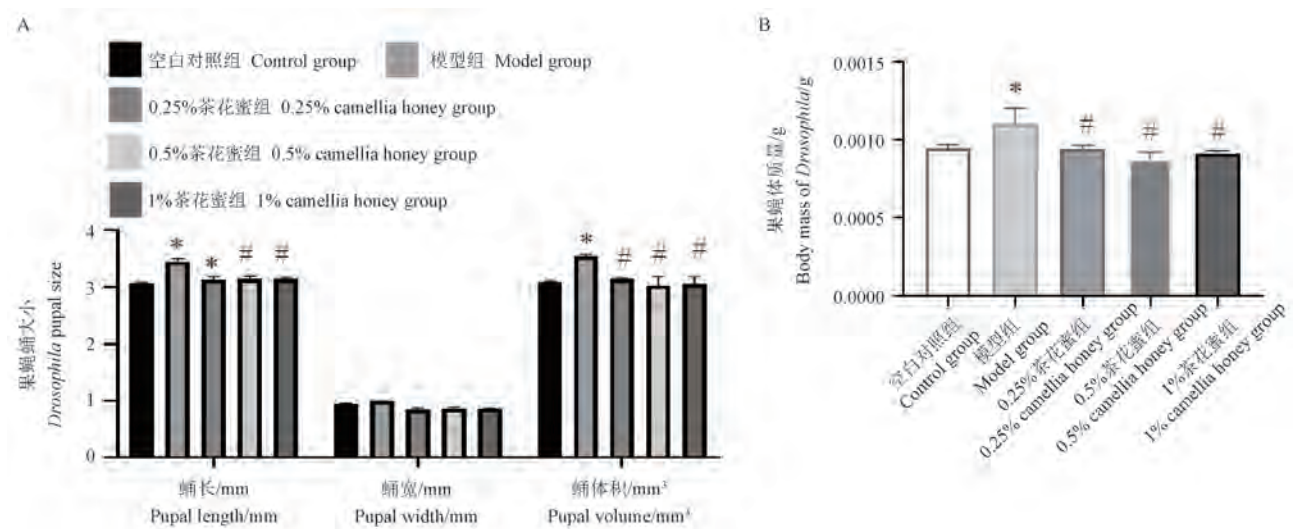
高脂喂食的模型组的攀爬能力较空白对照组和茶花蜜组差(图 3),差异具有显著性($P < 0.01$)。喂食茶花蜜可以显著增加攀爬能力,其中 0.25% 的添加可以显著增加攀爬能力($P < 0.05$),添加量达到 0.5% 和 1% 时,攀爬能力较模型组显著改善,差异达到显著水平($P < 0.01$)。

2.4 茶花蜜对高脂饮食果蝇幼虫脂肪体细胞和脂滴染色的影响

脂滴染色结果,与空白对照组相比,喂食高脂饮食后脂肪体内脂滴数量显著增加,而加入茶花蜜后脂肪体内脂滴数量比喂食高脂饮食时显著减少(图 4,图 5),实验结果说明茶花蜜能够减少喂食高脂饮食果蝇脂肪体内脂肪积累,经 Image J 1.8.0 软件分析计算单位面积内脂滴个数,差异具有显著性($P < 0.05$)。

2.5 茶花蜜对高脂饮食果蝇肠道 ROS 水平的影响

与空白对照组相比,喂食高脂饮食后肠道内 ROS 水平显著增加(图 6),而加入茶花蜜后肠道内 ROS 水平比喂食高脂饮食时显著减少,实验结

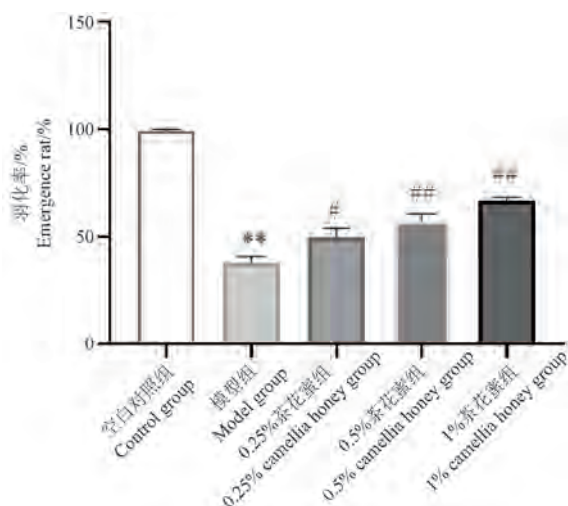


注:A:果蝇蛹的大小;B:果蝇体质量;与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 茶花蜜对高脂饮食果蝇质量和蛹体积的影响

Note. A. Size of the *Drosophila* pupae. B. Body mass of the *Drosophila*. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of camellia honey on the mass and pupal volume of *Drosophila* fed a high-fat diet



注:与空白对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图2 茶花蜜对高脂饮食果蝇羽化率的影响

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

Figure 2 Impact of camellia honey on the eclosion rate of *Drosophila* fed a high-fat diet

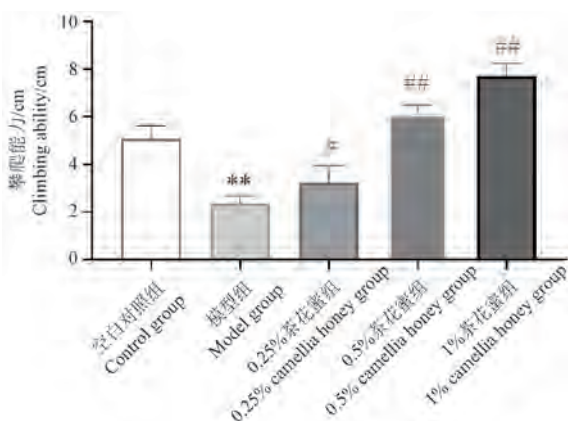


图3 茶花蜜对高脂饮食果蝇攀爬能力的影响

Figure 3 Effect of camellia honey on the climbing ability of *Drosophila* fed a high-fat diet

果说明茶花蜜能够减少喂食高脂饮食果蝇肠道内 ROS 产生,减少肠道炎症,通过 DHE 的荧光强度,显示喂食茶花蜜后肠道 ROS 荧光强度下降。

2.6 茶花蜜对高脂饮食果蝇肠道损伤的影响

图7结果表明泄露率模型组高于空白对照组,而各茶花蜜组低于模型组。这表明茶花蜜可以缓解由高脂饮食导致的肠道损伤情况。

3 讨论

我们国家茶树的种植时间最久、产量最高,

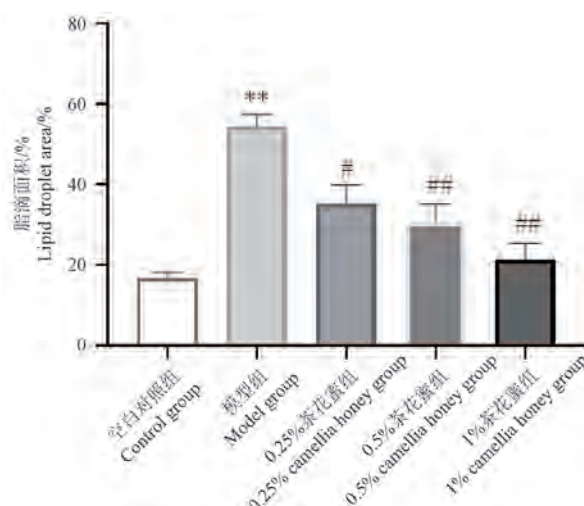


图4 茶花蜜对高脂饮食果蝇幼虫脂滴染色面积的比较

Figure 4 Comparison of lipid droplet staining area in larval *Drosophila* fed a high-fat diet treated with camellia honey

目前来说已经有 10 多个品种分布于南方至,海南岛,北部至亚热带纬度南部的大部分省份,在四季都是常青,秋天开花,产出大量茶花蜜和花粉。山茶花蜜是一种天然的甜味物质,是由蜜蜂收集植物的花蜜、分泌物或蜜液等混合在一起,经过发酵制成的一种天然甜味物质^[12]。广西昭平利用中蜂生产茶花蜜属于天然营养物质,呈淡金黄色泽、入口甜润、有淡茶香味、易结晶,具有原生态长寿产品特质,符合“饮昭平茶,喝茶花蜜,做长寿人”的完整生态养生理念^[22]。但由于茶花蜜中含有多糖,人工饲养的蜜蜂幼虫不能消化吸收,且无法排泄,引起生理性烂子^[8],影响茶花蜜的生产,也是造成茶花“千花一果”现象,由于授粉靠天然油茶地蜂,传粉蜂种的限制和技术的不足,导致油茶在实际大生产中普遍存在坐果率低、产量低的症结,这已成为长期严重制约我国油茶产业健康发展壮大的瓶颈^[23-24]。

我国很早就应用蜂蜜入药,现代研究发现蜂蜜具有广谱的抑菌作用^[25-27],同时体外模拟消化与发酵过程后对肠道微生物的影响的实验发现中国常见意蜂蜜(洋槐蜜、枣花蜜、荆条蜜、荔枝蜜)以及特色中蜂蜜(枇杷蜜、桉木蜜、苦丁茶蜜)可产生大量短链脂肪酸,并降低氨态氮含量,使肠道 pH 保持在中性偏酸性环境,有利于改善肠道内环境,保持肠道健康^[28]。还有研究通过对山

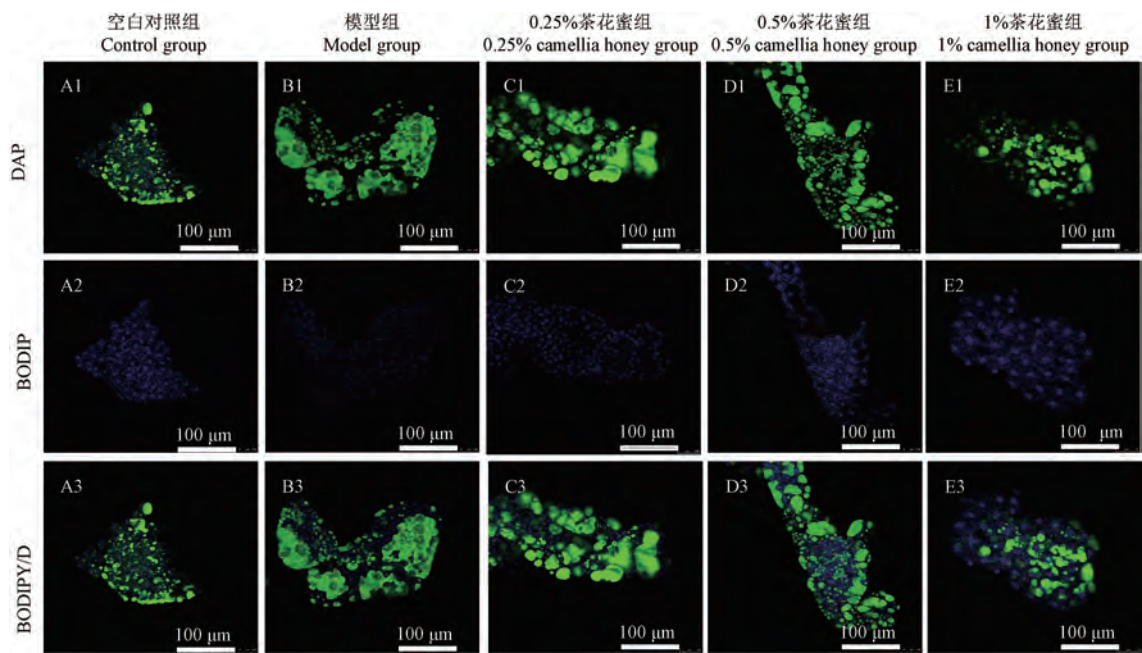


图 5 茶花蜜对高脂饮食果蝇幼虫脂肪体细胞和脂滴染色的影响

Figure 5 Impact of camellia honey on the fat body cells and lipid droplet staining of larval fat in *Drosophila* fed a high-fat diet

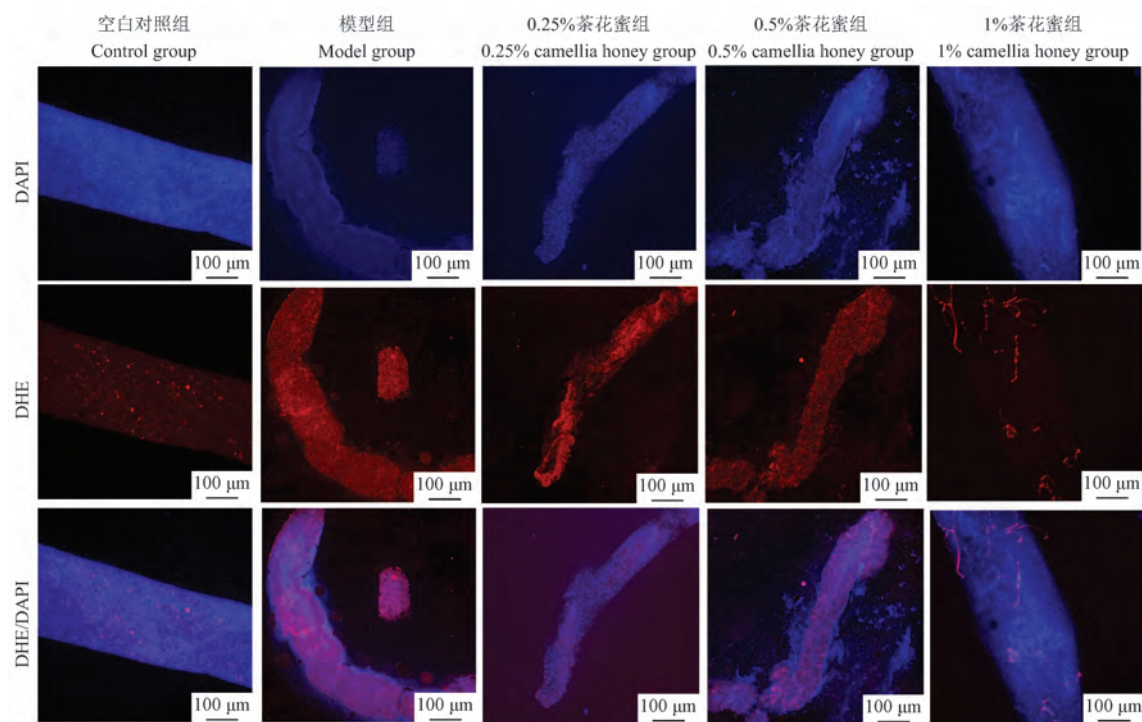


图 6 高脂饮食对肠道 ROS 的产生的影响

Figure 6 Effect of induction of intestinal ROS production by a high-fat diet

茶花蜜多糖的理化性质及薄层色谱分析,探讨山茶花蜜多糖对慢传输便秘大鼠的干预效果,揭示山茶花蜜的品质特性,为进一步完善山茶花蜜品质评价体系奠定了基础^[29]。本实验研究发现,高脂饮食导致了果蝇模型组严重的临床表现,成蛹率、孵化率等显著下降,攀爬能力下降,肠道炎症

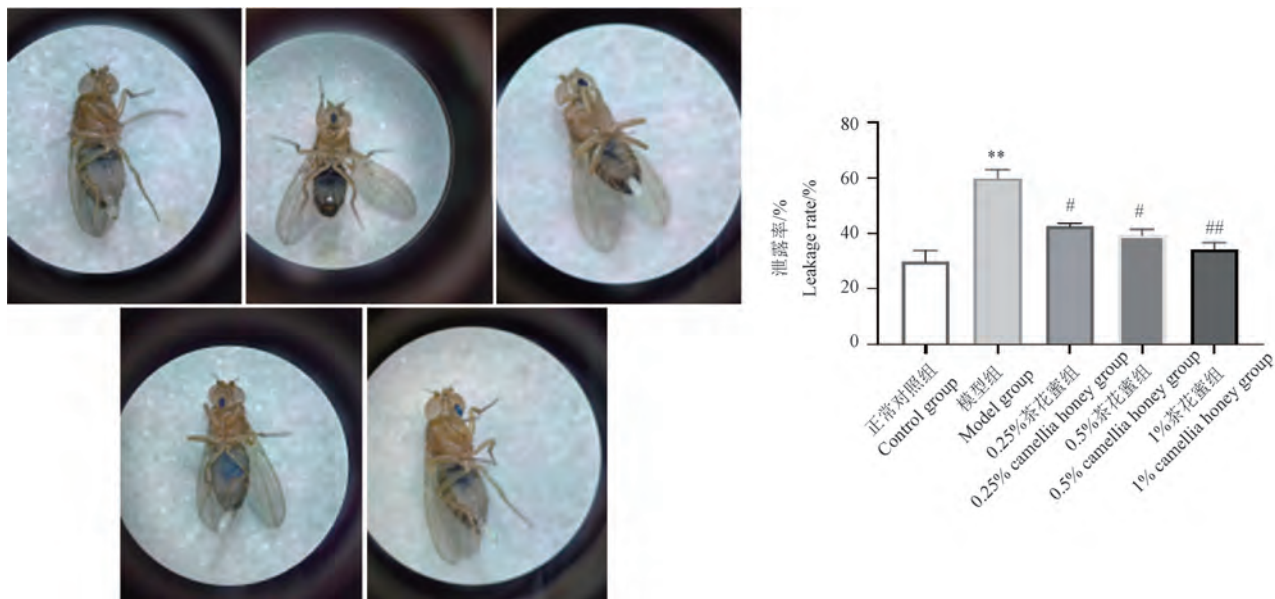


图 7 茶花蜜对高脂饮食诱导的果蝇肠道损伤(泄露率)的影响

Figure 7 Effect of camellia honey on intestinal damage (leakage rate) induced by a high-fat diet in *Drosophila*

表现和泄露增加,而喂食茶花蜜后各项指标有显著改善,表明茶花蜜对高脂饮食导致的肠道炎症和损伤的影响和改善作用。

果蝇作为模型生物在研究肥胖和代谢疾病方面具有独特的优势。果蝇的遗传简单性和快速生命周期使其成为研究能量平衡、脂质代谢和糖代谢的理想选择^[30-31],果蝇的脂质代谢机制与哺乳动物高度保守,和哺乳动物一样都以三酰甘油的形式储存脂质,并且在类似脂肪体中积累,然而,果蝇模型与哺乳动物模型在某些方面存在差异,果蝇的消化系统和代谢途径虽然与哺乳动物有相似之处,但在复杂性上仍有所不同。果蝇的营养信号通路如胰岛素受体-雷帕霉素靶蛋白信号通路在调节高脂肪饮食下的脂肪积累方面具有独特的作用,而这些通路在哺乳动物中的复杂性和相互关系更为复杂,果蝇的脂肪体相当于哺乳动物的白色脂肪组织,但其功能和调控机制可能有所不同^[32-33]。

在比较医学意义上,果蝇模型提供了一种经济且高效的工具,用于探索肥胖和代谢疾病的分子基础。通过果蝇模型,科学家可以识别与能量稳态相关的基因和信号通路,并开发潜在的治疗策略。尽管果蝇模型在某些生理过程上与哺乳动物存在差异,但其保守的代谢功能和遗传特性

使其成为理解人类肥胖和代谢疾病的重要桥梁。果蝇模型在高脂饮食代谢研究中为科学家提供了一个低成本、快速且有效的平台,有助于揭示肥胖和代谢疾病的分子机制,并为开发新的治疗方法提供理论基础和实验支持。

本研究只是茶花蜜药用价值研究探索中的一小部分内容,在研究中尽管选择了一些方法,但与全面发掘出茶花蜜对高脂饮食诱导的肠道炎症和损伤的改善作用可能还有一段距离,有关茶花蜜对肠道炎症和损伤的改善功能的研究还有待进一步探讨。

参 考 文 献 (References)

- [1] 白野,李坤,邵佳瑶,等. 高脂饮食对果蝇生长发育和氧化应激的影响 [J]. 粮食与油脂, 2019, 32(9): 40-44.
BAI Y, LI K, SHAO J Y, et al. Effects of high fat diet on the growth and development and oxidative stress of *Drosophila melanogaster* [J]. Cereals Oils, 2019, 32(9): 40-44.
- [2] 左占广,朱彩霞,鲁东立,等. 红景天提高黑腹果蝇肠道免疫功能研究 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 691-694.
ZUO Z G, ZHU C X, LU D L, et al. Improvement of *Rhodiola rosea* on intestinal immune function of *Drosophila melanogaster* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(5): 691-694.
- [3] 陈轶楠,刘维新,邓秋萍,等. 高脂饮食对炎症性肠病影响研究进展 [J]. 临床军医杂志, 2020, 48(7): 868

- 870.
CHEN Y N, LIU W X, DENG Q P, et al. Research progress on the effect of high-fat diet on inflammatory bowel disease [J]. Clin J Med Off, 2020, 48(7): 868-870.
- [4] ZHANG X, JIN Q, JIN L H. High sugar diet disrupts gut homeostasis though JNK and STAT pathways in *Drosophila* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 487(4): 910-916.
- [5] 陈羽臣, 柳宗琳, 张宏, 等. 工布乌头提取物提高果蝇肠道免疫功能的实验研究 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 949-954.
CHEN Y C, LIU Z L, ZHANG H, et al. Improvement effect of extracts from *Aconitum kongboense* on intestinal immune function of *Drosophila melanogaster* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(6): 949-954.
- [6] WU S C, LIAO C W, PAN R L, et al. Infection-induced intestinal oxidative stress triggers organ-to-organ immunological communication in *Drosophila* [J]. Cell Host Microbe, 2012, 11(4): 410-417.
- [7] SHARMA O P, RAJ D, GARG R. Toxicity of nectar of tea (*Camellia Thea* L.) to honeybees [J]. J Apic Res, 1986, 25(2): 106-108.
- [8] WANG Y, LIU X, WANG Y, et al. Molecular mechanism of poisoning to honeybees (*Apis mellifera* L.) after ingestion of *Camellia oleifera* nectar [J]. J Asia Pac Entomol, 2024, 27(1): 102206.
- [9] 李震. 蜜蜂采集油茶蜜粉中毒机理解析 [D]. 南昌: 江西农业大学; 2023.
LI Z. Analysis of the mechanism of poisoning in honeybees collecting *camellia oleifera* pollen [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University; 2023.
- [10] PETANIDOU T. Sugars in mediterranean floral nectars; an ecological and evolutionary approach [J]. J Chem Ecol, 2005, 31(5): 1065-1088.
- [11] HE Q, HE L, ZHANG F, et al. Stachyose modulates gut microbiota and alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis in mice [J]. Saudi J Gastroenterol, 2020, 26(3): 153.
- [12] LIU G, BEI J, LIANG L, et al. Stachyose improves inflammation through modulating gut microbiota of high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(6): e1700954.
- [13] XI M, ZHAO S, GE W, et al. Effects of stachyose on the intestinal microbiota and barrier in antibiotic-treated mice [J]. J Funct Foods, 2021, 83: 104493.
- [14] ZHANG R, ZHAO Y, SUN Y, et al. Isolation, characterization, and hepatoprotective effects of the raffinose family oligosaccharides from *rehmannia glutinosa libosch* [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(32): 7786-7793.
- [15] 万永奇, 谢维. 生命科学与人类疾病研究的重要模型——果蝇 [J]. 生命科学, 2006, 18(5): 425-429.
WAN Y Q, XIE W. *Drosophila*: an important model organism for understanding basic biological and human disease mechanisms [J]. Chin Bull Life Sci, 2006, 18(5): 425-429.
- [16] STORELLI G, DEFAYE A, ERKOSAR B, et al. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing [J]. Cell Metab, 2011, 14(3): 403-414.
- [17] 李文佳, 刘强, 金丽华. 刺五加提取物对果蝇免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1997-2001.
LI W J, LIU Q, JIN L H. Effect of extract from roots and rhizomes of *Acanthopanax senticosus* on immune function of *Drosophila melanogaster* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43(10): 1997-2001.
- [18] 朱彩霞, 王超, 金丽华. 西藏绵头雪兔子提取物对果蝇肠道免疫的影响 [J]. 中成药, 2014, 36(4): 689-693.
ZHU C X, WANG C, JIN L H. Effect of *Saussurea laniceps* extracts on gut immunity of *Drosophila melanogaster* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(4): 689-693.
- [19] 陈麒名, 印涵, 王思宏, 等. 钝叶瓦松对 SDS 诱导的果蝇肠道损伤修复作用 [J]. 林业科技通讯, 2021, 64(3): 39-42.
CHEN Q M, YIN H, WANG S H, et al. Repair effect of extract of *Orostachys malacophylla* (pall.) fisch. on intestinal injury by in *Dosophila* induced by SDS [J]. For Sci Technol, 2021, 64(3): 39-42.
- [20] 吴磊, 李广莹, 闫永平, 等. 百里酊对化学诱导的溃疡性结肠炎的保护作用 [J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2023, 46(6): 849-852.
WU L, LI G Y, YAN Y P, et al. Protective effect of thymoquinone on chemically induced ulcerative colitis [J]. J Hefei Univ Technol Nat Sci, 2023, 46(6): 849-852.
- [21] 周洋, 柳宗琳, 陈羽臣, 等. 瓜蒌、红花、川芎和菊花提取物对氧化应激诱导的果蝇肠道免疫的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2194-2200.
ZHOU Y, LIU Z L, CHEN Y C, et al. Effect of extract from *Trichosathis Fructus*, *Carthami Flos*, *Chuanxiong Rhizoma*, and *Chrysanthemi Flos* on oxidative stress-induced gut immunity in *Drosophila melanogaster* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(15): 2194-2200.
- [22] 谭荣德, 李宏芳, 陆超丽, 等. 中华蜜蜂对茶花蜜源的利用研究 [J]. 中国蜂业, 2013, 64(16): 33-35.
TAN R D, LI H F, LU C L, et al. Study on the utilization of *camellia* nectar source by Chinese bees [J]. Apic Chin, 2013, 64(16): 33-35.
- [23] 胡景华, 刘锋, 秦加敏. 油茶有效传粉蜂种研究进展 [J]. 蜜蜂杂志, 2019, 39(3): 27-30.

- HU J H, LIU F, QIN J M. The recent advances in research on effective pollinators of *Camellia oleifera* [J]. J Bee, 2019, 39(3): 27-30.
- [24] 高超. 油茶后期自交不亲和性的细胞学研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学; 2017.
- GAO C. The cytological study on late-acting self-incompatibility in *Camellia oleifera* [D]. Central South University of Forestry and Technology; 2017.
- [25] GRABEK-LEJKO D, WOREK M. Honeydew honey as a reservoir of bacteria with antibacterial and probiotic properties [J]. Antibiotics (Basel), 2024, 13(9): 855.
- [26] KASSYM L, KUSSAINOVA A, SEMENOVA Y, et al. Antimicrobial effect of honey phenolic compounds against *E. coli*-an *in vitro* study [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2024, 17(5): 560.
- [27] NAZZARO F, OMBRA M N, COPPOLA F, et al. Antibacterial activity and prebiotic properties of six types of Lamiaceae honey [J]. Antibiotics, 2024, 13(9): 868.
- [28] 赵圆, 陈思淮, 孙玉敬, 等. 中国特色蜂蜜调节肠道菌群的研究 [J]. 中国食品学报, 2024, 24(12): 78-93.
- ZHAO Y, CHEN S H, SUN Y J, et al. Studies on China's characteristic honey regulated gut microbiota [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2024, 24(12): 78-93.
- [29] 姜婷婷. 可溶性膳食纤维果胶对饮食诱导肥胖大鼠代谢与肠屏障的保护作用及机制研究 [D]. 南京: 南京大学; 2016.
- JIANG T T. Research on the protective effects and mechanisms of soluble dietary fiber pectin on metabolism and intestinal barrier in diet-induced obese rats [D]. Nanjing: Nanjing University; 2016.
- [30] LAKHOTIA S C, RANGANATH H A. Experiments with *Drosophila* for biology courses [M]. Bengaluru: Indian Academy of Sciences; 2023.
- [31] CHATTERJEE N, PERRIMON N. What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes [J]. Sci Adv, 2021, 7(24): eabg4336.
- [32] TONK-RÜGEN M, VILCINSKAS A, WAGNER A E. Insect models in nutrition research [J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1668.
- [33] BIRSE R T, CHOI J, REARDON K, et al. High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila* [J]. Cell Metab, 2010, 12(5): 533-544.

[收稿日期] 2024-10-10

《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。



曾茵,李琳琳,马祥铭,等. 基于数据挖掘的肺纤维化动物模型特点分析 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 549–560.

ZENG Y, LI L L, MA X M, et al. Data mining analysis of animal models of pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 549–560.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.009

基于数据挖掘的肺纤维化动物模型特点分析

曾茵,李琳琳,马祥铭,肖雨锋,胡珏*

(湖南中医药大学医学院,长沙 410208)

【摘要】 目的 研究肺纤维化的动物模型特点,为肺纤维化动物模型的标准化及肺纤维化的发病机制及诊疗研究提供参考。**方法** 在中国知网、万方、维普、中国生物医学文献和 PubMed 数据库中检索近 10 年有关肺纤维化动物实验文献,归纳实验动物种类、性别、造模方式、检测指标等要素,用 Excel 进行数据分析。**结果** 共纳入符合条件文献 292 篇。肺纤维化动物模型的动物种类主要是 SD 大鼠、Wistar 大鼠、C57BL/6 小鼠,动物性别多为雄性,造模药物主要是博来霉素、百草枯、二氧化硅悬液,造模方式主要是气管内注入,造模周期多为 28 d,检测指标主要从肺组织病理观察、蛋白表达、细胞因子、生化指标等多个方面展开。**结论** SD 大鼠、C57BL/6 小鼠是肺纤维化动物模型最常用的实验动物,气管内注入博来霉素(5 mg/kg)是使用最频繁的造模方式,此方法可以简便有效地复制出与人类肺纤维化相似的病理特点,可为肺纤维化动物实验研究提供参考。

【关键词】 肺纤维化;动物模型;数据挖掘;发病机制;基础研究

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0549-12

Data mining analysis of animal models of pulmonary fibrosis

ZENG Yin, LI Linlin, MA Xiangming, XIAO Yufeng, HU Jue*

(Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Corresponding author: HU Jue. E-mail: cynthia910830@126.com

【Abstract】 Objective To study the characteristics of animal models of pulmonary fibrosis so as to provide a reference for the standardization of such models, and to guide research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of pulmonary fibrosis. **Methods** Studies using experimental pulmonary fibrosis in animals published in the past 10 years were retrieved from the CNKI, Wanfang, VIP, SinoMed, and PubMed databases. Factors including animal species, sex, modeling method, and detection index were summarized, and the data were analyzed using Excel. **Results** A total of 292 eligible studies were included. The animals mainly included SD rats, Wistar rats, and

[基金项目] 2021 年度湖南省教育厅科学研究项目(21B0360), 湖南中医药大学 2021 年度科研基金项目(2021XJJ019), 湖南中医药大学 2020 年度中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXYJH13), 湖南中医药大学 2023 年本科生科研创新基金项目(57), 湖南中医药大学 2024 年大学生创新训练项目(233)。

Funded by the 2021 Scientific Research Project of the Hunan Provincial Education Department (21B0360), the 2021 Scientific Research Fund Project of Hunan University of Chinese Medicine (2021XJJ019), the 2020 Open Fund Project for First-Class Discipline of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Hunan University of Chinese Medicine (2020ZXYJH13), the 2023 College Student Scientific Research and Innovation Fund Project of Hunan University of Chinese Medicine (57), the 2024 College Student Innovation Training Project of Hunan University of Chinese Medicine (233).

[作者简介] 曾茵,女,在读本科生,研究方向:中医药防治感染性疾病。Email:2954738474@qq.com

[通信作者] 胡珏,女,硕士,讲师,研究方向:中医药防治感染性疾病。Email:cynthia910830@126.com

C57BL/6 mice, and most were male. The most common modeling drugs were bleomycin, paraquat, and silica suspension, mainly administered by intratracheal injection, with a typical modeling cycle of 28 d. The detection indexes mainly comprised lung tissue pathology and measurements of protein expression, cytokine levels, and biochemical indexes. **Conclusions** SD rats and C57BL/6 mice were the most commonly used animals for experimental pulmonary fibrosis, and intratracheal injection of bleomycin (5 mg/kg) was the most frequently used modeling method. This approach allows for the straightforward and effective replication of pathological features resembling human pulmonary fibrosis, and may serve as a reference for future experimental studies using animal models of pulmonary fibrosis.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; animal model; data mining; pathogenesis; basic research

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

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是肺组织异常修复造成不可逆损伤的一类疾病,以炎症和细胞外基质沉积为特征,呈进展性和致死性的弥漫性肺间质疾病。其中,特发性肺间质纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 发病率最高^[1-2]。目前认为在肺纤维化的发展过程中,环境刺激、遗传基因背景以及免疫系统异常都是不可忽略因素^[3]。在这些因素的作用下,成纤维细胞会异常增殖和活化,导致大量的胶原蛋白等细胞外基质物质产生,并在肺组织中不断聚集形成纤维结构^[4]。患者常常会出现干咳、进行性呼吸困难等症状,严重影响呼吸功能^[5]。在传统中医中,根据肺纤维化的症状和病因将其归类为“咳嗽”“哮喘”“肺痿”等疾病范畴^[6],肺纤维化患者常常表现出咳嗽、气喘、胸闷等症状,有些患者还可能出现痰多、舌质紫黯、脉细涩等表现^[7]。中医认为,肺纤维化的发生与人体正气不足、外邪入侵、痰瘀互结等因素密切相关^[8]。近年来肺纤维化的发病率逐渐上升^[9-10],现代研究表明这可能与环境污染、诊断水平提高以及人口老龄化有关^[11]。

鉴于肺纤维化预后极差且死亡率较高^[12-15],大量研究者广泛而深入地投入到该疾病的研究。在研究过程中,构建合适可靠的动物模型对于揭示肺纤维化发病机制和寻找相对应治疗手段必不可少。因此,近年来研究人员使用不同种类的动物,如小鼠、大鼠、兔等;通过不同的实验方法,如气管内注入博来霉素、腹腔注入百草枯等,成功构建了多种肺纤维化动物模型^[16]。这些模型在研究肺纤维化的发病机制及探索新的治疗方法方面发挥了重要作用。本文通过检索 2013 年 1 月 1 日—2024 年 8 月 25 日关于肺纤维化动物

实验方面的文献资料,并分析其中涉及到的造模动物种类、性别、造模方式以及检测指标等要素的数据,探索肺纤维化动物模型的研究现状及不足,为未来规范建立肺纤维化动物模型和深入探索肺纤维化作用机制提供可靠的参考依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源

在中国知网 (CNKI)、万方数据知识服务平台 (Wanfang Data)、维普中文期刊服务平台 (VIP)、中国生物医学文献数据库 (CBM) 中以“肺纤维化”and“动物模型”为主题词检索;在 PubMed 数据库中 with “pulmonary fibrosis”AND“animal model”为主题词检索,检索时间为 2013 年 1 月 1 日—2024 年 8 月 25 日。

1.2 文献筛选标准

纳入标准:明确为肺纤维化动物实验且造模成功,数据详细的文献。排除标准:(1) 动物模型不明、合并其他疾病并发症、数据错误或不全的文献;(2) 综述、学位论文、理论研究、会议类文献。

1.3 统计学分析

应用 Excel 统计软件,将纳入的 292 篇有关肺纤维化动物实验的文献中动物实验的造模动物种类、动物性别、造模方式、造模周期和检测指标等数据进行整理分析,建立肺纤维化动物模型数据库。

2 结果

2.1 文献筛选结果

根据上述策略检索,共检索到相关文献 2651 篇,排除重复文献 711 篇,筛选排除不符合标准的

文献,最终筛选出符合纳入标准的文献 292 篇。本文对这纳入的 292 篇文献进行统计分析(见图 1)。

2.2 造模动物种类

将纳入的 292 篇文献中的动物实验种类进行统计分析发现,造模动物种类主要是 SD 大鼠 (109 次, 37.33%)、C57BL/6 小鼠 (91 次, 31.16%) 和 Wister 大鼠 (51 次, 17.47%)。其中较为常见的还有 KM 小鼠、ICR 小鼠、美利奴羊、BALB/c 小鼠,具体数据见表 1。其次,对 292 篇文献中实验动物性别分布分析,其中有 38 篇表述不清不纳入分析,大部分选择为雄性 (210 次, 82.68%),具体数据见表 2。

2.3 造模诱导因素

将文献中的造模诱导因素进行统计分析。主要用博来霉素 (238 次, 81.50%), 常用的还有二氧化硅悬液 (20 次, 6.84%)、百草枯 (14 次, 4.79%), 胺碘酮、PM2.5、油酸、辐射束照射、脂多糖、甲氨蝶呤、石棉、高氧等也可用于诱导纤维化,具体数据见表 3。

2.4 造模方式

将文献中的动物实验造模方式进行统计分析。最常用的为博来霉素气管内注入造模 (204 次), 其次是二氧化硅气管内注入造模 (19 次), 造模方式具体数据见表 4。由于研究多用博来霉素造模,所以对博来霉素使用频繁的造模方式的造模剂量进行分析(频数 ≥ 2),见表 5。

表 1 肺纤维化动物模型选择动物种类的频数与占比

Table 1 Frequency and proportion of pulmonary fibrosis models

动物种类 Animal species	频数/次 Frequency/times	占比/% Percentage/%
SD 大鼠 SD rat	109	37.33
C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	91	31.16
Wistar 大鼠 Wistar rats	51	17.47
KM 小鼠 KM mice	18	6.16
ICR 小鼠 ICR mice	6	2.05
BALB/c 小鼠 BALB/c mice	5	1.71
美利奴羊 Merino sheep	4	1.37
白化大鼠 Albino rat	2	0.68
D1CC × D1BC 小鼠 D1CC × D1BC mice	1	0.34
Fischer 大鼠 Fischer rat	1	0.34
树鼩 Tree shrew	1	0.34
白色家兔 White rabbit	1	0.34
野生型小鼠 Wild type mice	1	0.34
CD-1 小鼠 CD-1 mice	1	0.34

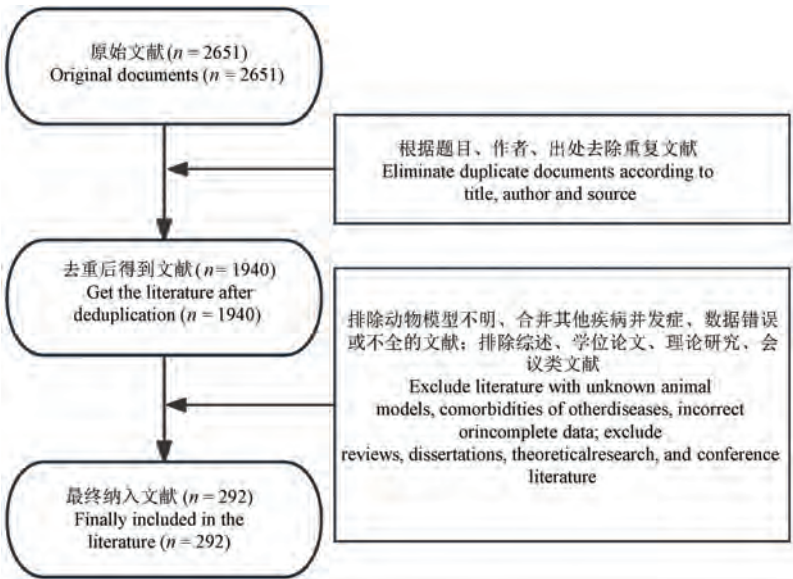


图 1 文献筛选流程

Figure 1 Screening process diagram

表 2 肺纤维化动物模型选择动物性别频数与占比

Table 2 Gender frequency and proportion of selected animal models with pulmonary fibrosis

动物性别 Gender of animal	频数/次 Frequency/times	占比/% Percentage/%
雄性 Male	210	82.68
雌雄各半 Female and male	19	7.48
雌性 Female	25	9.84

表 3 肺纤维化模型诱导因素频数及占比

Table 3 Frequency and proportion of inducible factors in pulmonary fibrosis model

造模诱导因素 Modeling inducible factor	频数/次 Frequency/times	占比/% Percentage/%
博来霉素 Bleomycin	238	81.50
二氧化硅 Silicon dioxide	20	6.84
百草枯 Paraquat	14	4.79
胺碘酮 Amiodarone	4	1.37
PM2.5	4	1.37
辐射束照射胸部 Radiation beam struck the chest	3	1.03
油酸 Oleic acid	2	0.68
脂多糖 Lipopolysaccharide	2	0.68
甲氨蝶呤 Methotrexate	1	0.34
石棉 Asbestos	1	0.34
高氧 Hyperoxia	1	0.34
香烟 Cigarettes	1	0.34
硫磺 Sulfur	1	0.34

表 4 不同诱导因素的造模方式频数

Table 4 Frequency of modeling methods for different induction factors

造模诱导因素 Modeling inducible factor	造模方式 Modeling method	频数/次 Frequency/times
博来霉素 Bleomycin	气管内注入 Intratracheal instillation	204
	腹腔注入 Intraperitoneal injection	10
	口咽注入 Oropharyngeal inhalation	7
	其他 Other	17
二氧化硅 Silicon dioxide	气管内注入 Intratracheal instillation	19
	口咽注入 Oropharyngeal inhalation	1
	腹腔注入 Intraperitoneal injection	7
	灌胃 Intragastric administration	7
百草枯 Paraquat	气管滴注 Intratracheal instillation	2
	口服 Take orally	1
	胃管溶解注入 Gastric tube dissolution injection	1
	暴露于高浓度 PM _{2.5} 的空气中 Exposure to high concentrations of PM _{2.5} in the air	2
PM2.5	气管滴注 Intratracheal instillation	2
	照射胸部 Irradiation of the chest	3
	尾静脉注射 Tail vein injection	2
	气管内注入 Intratracheal instillation	1
辐射束 Beam of radiation	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1
	于氧体积分数为 95% 的动物氧仓中 Place in an animal oxygen chamber with a volume fraction of oxygen of 95%	1
油酸 Oleic acid	烟熏 Smoke out	1
	烟熏 Smoke out	1
脂多糖 Lipopolysaccharide	气管内注入 Intratracheal instillation	1
	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1
甲氨蝶呤 Methotrexate	气管内注入 Intratracheal instillation	1
	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1
石棉 Asbestos	气管内注入 Intratracheal instillation	1
	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1
高氧 Hyperoxia	气管内注入 Intratracheal instillation	1
	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1
香烟 Cigarettes	气管内注入 Intratracheal instillation	1
	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1
硫磺 Sulfur	气管内注入 Intratracheal instillation	1
	雾化吸入 Inhalation	1
	口服 Take orally	1
	口腔插管滴注 Oral intubation drip	1

表 5 博来霉素不同造模方式的造模剂量频数
(频数 ≥ 2)

Table 5 Molding dose frequency of bleomycin in different molding methods (frequency ≥ 2)

造模方式 Modeling method	造模剂量/(mg/kg) Dose/(mg/kg)	频数/次 Frequency/times
气管内注入 Intratracheal instillation	5	126
	3	12
	2	8
	10	8
	2.5	9
	4	6
	1.25	3
	6	3
	0.5	2
	1	2
	16.7	2
腹腔注入 Intraperitoneal injection	7.5	2
	15	5
	35	3
口咽吸入法 Oropharyngeal inhalation	2.5	2

2.5 造模周期

造模诱导因素不同,诱导肺纤维化的进程不同,故造模周期有差异。根据不同造模诱导因素整理造模周期,统计展示每种造模方式频数前三,具体分布见表6。肺纤维化动物模型造模方

表 6 不同诱导因素造模周期频数(频数前三)

Table 6 Frequency of modeling cycle for different induction factors (top 3 frequency)

造模诱导因素 Modeling inducible factors	药物造模周期/d Modeling cycle/d	频数/次 Frequency/times
博来霉 Bleomycin	28	96
	21	29
	14	19
百草枯 Paraquat	28	4
	7	4
	21	2
二氧化硅 Silicon dioxide	28	8
	30	2
	56	2

式多样,故可以根据实验目的和实际情况选择更合适的造模方式。

2.6 检测指标

如表 7 对纳入文献所使用的检测指标进行统计分析。结果表明使用的检测指标主要是肺组织病理、蛋白表达、细胞因子、肺组织羟脯氨酸含量、基因表达、生化指标、一般情况、肺功能、肺系数(肺指数)、细胞计数等,使用频数前五的是肺组织病理(269 次)、蛋白质表达(222 次)、细胞因子(186 次)、羟脯氨酸含量(176 次)、基因表达(104 次)、氧化应激参数(96 次),具体检测指标频数。

表 7 肺纤维化模型检测指标频数

Table 7 Frequency of pulmonary fibrosis model detection indicators

检测指标 Specifie indicators	具体指标 Specific indicators	频数/次 Frequency/times
肺组织病理观察 Pathological observation of lung tissue	HE 染色、Tunel 染色、Masson 染色、免疫荧光染色等观察肺组织的结构变化和肺组织损伤程度;使用透射电镜观察肺组织的微结构 HE staining, Tunel staining, Masson staining and immunofluorescence staining were used to observe the structural changes of lung tissue and the degree of lung tissue injury. Microstructure of lung tissue was observed using transmission electron microscopy	269
蛋白表达 Protein expression	Western Blot 检测蛋白在肺组织表达情况,免疫组织化学、免疫荧光观察蛋白表达位置 Protein expression in lung tissue was detected by Western Blot, and the protein expression location was observed by immunohistochemistry and immunofluorescence	222
细胞因子 Cytokines	ELISA 等方法检测血清、肺组织匀浆、肺泡灌洗液中细胞因子(IL-1β、TNF-α、IL-17、IL-6、CTGF、PDGF、VEGF 等)的表达 ELISA and other methods were used to detect the expression of cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-17, IL-6, CTGF, PDGF, VEGF, etc.) in serum, lung tissue homogenate and alveolar lavage fluid	186
羟脯氨酸含量 Hydroxyproline content	ELISA 试剂盒等方法检测血清、肺组织匀浆中羟脯氨酸水平 Levels of hydroxyproline in serum and lung tissue homogenates were detected by ELISA kit	176

续表 7

检测指标 Specifie indicators	具体指标 Specific indicators	频数/次 Frequency/times
基因表达 Gene expression	荧光定量 PCR、普通 PCR 等方法检测肺组织的基因表达 Gene expression in lung tissue was detected by real-time PCR and general PCR	104
氧化应激参数 Oxidative stress parameter	抗氧化能力、氧化应激分析(血清/血浆、肺泡灌洗液、肺组织匀浆中活性氧、丙二醛、髓过氧化物酶、超氧化物歧化酶氧化应激因子水平检测) Antioxidant capacity, oxidative stress analysis (reactive oxygen species, malondialdehyde, myeloperoxidase and superoxide dismutase levels in serum/plasma, alveolar lavage fluid and lung tissue homogenates)	96
肺系数(肺指数) Lung coefficient (lung index)	肺系数 = 肺湿重(g)/体质量(kg) Lung coefficient = lung wet mass (g)/body mass (kg)	63
一般情况观察 General situation observation	体重变化;咳嗽状态;异常行为(动物挠头、躁动不安);毛发状态(松散无光泽);精神状态(萎靡不振);呼吸状况(困难、急促,偶有喘鸣声) Weight change; cough state; abnormal behavior (animals scratching their heads, fidgeting) hair condition (loose and dull); mental state (lethargy); breathing condition (difficult, rapid, occasional wheeze)	47
肺功能 Pulmonary function	清醒/麻醉状态下节段性/侵袭性肺功能测定(肺总量、潮气容量、肺泡通气量、支气管收缩程度、最大呼气量、肺活量、最大呼气中段量、频率、每分钟通气量) Segmental/invasive pulmonary function measurement (total lung volume, tidal volume, alveolar ventilation, bronchoconstriction, maximal expiratory volume, vital capacity, maximal midexpiratory volume, frequency, ventilation per minute) during awake/anesthesia	43
存活情况 Condition of survival	存活天数、存活情况、存活率 Survival days, survival condition, survival rate	32
细胞计数 Cell count	外周血、肺实质、肺泡灌洗液总细胞计数及分类计数;支气管灌洗液细胞计数、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)分析、肺泡巨噬细胞(AM)检测 Total cell count and differential cell count of peripheral blood, lung parenchyma and bronchoalveolar lavage fluid; bronchoalveolar lavage fluid cell counting, cell counting kit-8 (CCK-8) analysis and alveolar macrophage (AM) detection were performed	30
肺泡灌洗液 Bronchoalveolar lavage fluid	ELISA、比色法等方法检测肺泡灌洗液中蛋白含量;肺泡液体清除率 Protein content of alveolar lavage fluid was detected by ELISA and colorimetry; alveolar fluid clearance etc.	27
胶原表达情况 Expression of collagen	Western Blot 等方法测量肺组织胶原含量 Collagen content in lung tissue was measured by Western Blot	16
肺湿/干质量测定 Lung wet/dry mass was determined	肺湿/干质量测定、肺组织干湿质量比 Lung wet/dry mass was measured and lung tissue dry to wet mass ratio was determined	7
血气分析 Blood gas analysis	测定血液的酸碱度、二氧化碳分压、氧分压、氧饱和度等 pH, PCO ₂ , PO ₂ and SO ₂ of blood were measured	6
肺的大体观 Gross view of the lung	动物取材及解剖情况、动物取材及解剖情况 Animal sampling and dissection, animal sampling and dissection	4
氧合指数 Index of oxygenation	PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 300 mmHg	1

3 讨论

由于环境污染、感染性疾病以及代谢免疫性疾病的高发和抗生素的过度使用,肺纤维化的临

床发病率呈上升趋势,严重危害人类的健康和生命。目前,中医通过辨证施治和调理脏腑功能在治疗肺纤维化中取得了显著疗效^[17-18]。例如,中药复方制剂百合固金汤^[19]、补肺汤^[20]等在改善

患者的症状和延缓病情进展方面可以发挥很好的效果;针灸治疗可以通过调节机体的免疫功能来改善肺功能;推拿可以有效缓解患者的呼吸困难等症状。近年来中医药防治肺纤维化的实验研究也取得了一定的进展^[21]。研究发现,中药复方中的有效成分具有抗炎、抗纤维化和调节免疫功能等作用,如抗纤汤具有抑制肺部炎症、抗纤维化、改善肺组织微循环和改善临床症状的作用^[22]。同时,一些中药提取物及其活性成分在细胞和动物实验中显示出良好的抗纤维化作用,如黄芪的提取物及其活性成分黄芪多糖和黄芪总苷可以抑制造血干细胞的增殖和胶原蛋白的产生,从而达到抗纤维化的作用^[23]。但肺纤维化的发病机制目前还尚未完全明确,并且在西医临床的治疗中依旧缺乏有效治疗肺纤维化的药物,因此需要进一步的动物实验研究,为肺纤维化的临床治疗与药物研究提供新思路及科学依据。

3.1 动物种类分析

据文献筛选数据显示,肺纤维化造模动物最常用的动物为鼠。大鼠具有较强的抗感染能力和生命力且养育成本低。SD 大鼠和 Wister 大鼠都是闭群大鼠,在 5 年以上的时间中不会从外面引进新的品种,一直保持在固定场所繁殖,所以遗传背景相对稳定^[24]。其中 SD 大鼠对呼吸系统的疾病有很强的抵抗力,SD 大鼠的肺纤维化进程与人类的肺纤维化病变过程相似^[25],故大多数实验都选择了 SD 大鼠进行肺纤维化造模。小鼠的基因与人类基因组高度同源^[26],且繁殖周期短,操作简单、价格便宜。其中最常用于构建肺纤维化模型的小鼠是 C57BL/6 小鼠,C57BL/6 小鼠具有寿命较长、肿瘤发生率低、个体差异性小,可重复性比较高的优点^[27-29]。在其他造模动物中,羊作为肺纤维化动物模型,有较大的肺容积和肺表面积,有利于研究气体交换和药物分布^[30],但饲养成本较高;树鼩能够较好地模拟人类的呼吸系统生理特征^[31-33],但繁殖能力较低且价格昂贵;兔则容易饲养、繁殖力强,但模型制作方法较为复杂。此外,因为雌性动物在生殖周期中会经历不同的激素水平变化^[34-35],可能会对实验结果产生干扰,所以在性别选择上,实验动物多选用雄性,使得实验结果更加一致。

3.2 诱导因素分析

肺纤维化的病因十分复杂,通常是由于呼吸道长时间暴露于刺激物、可吸入大气颗粒物、微生物、污染物、病原体和过敏原等有害因素下而引起肺部炎症,从而使肺泡上皮细胞被破坏并且释放许多能引起肺纤维化的炎症因子。在这种情况下,机体会启动复杂的防御和修复机制以应对炎症和组织损伤,但此过程的持续进行会使成纤维细胞增殖异常及胶原沉积过多,最终形成肺纤维化^[36]。通过分析 292 篇文献造模数据,发现博来霉素、二氧化硅悬液、百草枯、辐射束照射、油酸和高氧都可用于诱导肺纤维化。

博来霉素是一种由轮枝链霉菌分泌分泌的糖肽类抗生素,用于治疗鳞状细胞癌、生殖细胞肿瘤和淋巴瘤等。但博来霉素也能诱导 DNA 断裂并产生自由基诱导氧化应激反应的发生^[37],从而引起细胞凋亡或坏死,最终导致炎症反应和纤维化^[38]。若长期处于二氧化硅粉尘的环境下容易引发以肺部组织弥漫性纤维化为特征的全身性疾病。二氧化硅粉尘被巨噬细胞摄取至肺组织后会损伤细胞膜,释放出的粉尘还会被其他肺泡巨噬细胞再次吞噬,形成恶性循环^[36]。此过程中,多种炎性及致纤维化因子被激活,促进肺组织炎症反应、成纤维细胞增殖及胶原沉积,最终导致肺纤维化^[39]。百草枯的毒性作用于肺部可促使中性粒细胞与纤维母细胞数量增加,引发炎症反应,导致肺局部纤维组织过度增生。同时,百草枯还能抑制超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性,使得自由基积累,进一步加剧肺组织损伤。此外,百草枯还能干扰线粒体功能,加速细胞凋亡过程,共同作用于肺纤维化的形成^[40]。辐射束的照射能直接损伤内皮细胞与肺上皮细胞,诱导炎症因子的释放。受损的区域聚集大量淋巴细胞与巨噬细胞,不仅加剧肺部炎症,还可能促使肺泡上皮细胞向间质细胞转化,这一系列病理变化最终引起肺纤维化^[41]。

博来霉素诱导的肺纤维化动物模型不能模拟肺纤维化的全部特征,没有复制出临床特发性肺纤维化进展慢、不可逆的特点,但是其组织病理变化与人类肺纤维化最为接近^[42],且价格低廉,容易获取,重现性好,故博来霉素是肺纤维化动物模型造模使用最频繁的诱导因素^[43]。选用

二氧化硅诱导肺纤维化模型操作简便且成功率高,但其存在着纤维化无纤维细胞灶、无上皮细胞增生、时间异质性不明显、应用范围有限等缺点;百草枯诱导的肺纤维化模型可模拟不可逆性肺纤维化,病理特征明显,表现为肺组织内间质增厚、纤维增生、慢性炎症等且复制时间短^[44],但过高的死亡率和较大的毒性使实验操作较为困难;辐射诱导的肺纤维化模型可用于观察不同品系小鼠对放射线敏感程度和损伤严重度的差异,但其模型的制备时间过长。

3.3 造模方法分析

用博来霉素诱导的肺纤维化动物模型的造模方式有气管内注入、腹腔注入、气管内雾化、尾静脉注射和经鼻吸入等^[45],绝大多数是气管内注入。气管内注入诱导的动物肺纤维化与人类肺纤维化的病理变化相似^[41],且给药剂量小、建模时间短,但肺部纤维化分布不均匀且操作难度大;腹腔注入诱导的肺纤维化模型实验动物死亡率较低且病灶分布均匀、操作简单且肺损伤程度低,不过其给药剂量大、建模时间长。博来霉素气管内给药一般是 5 mg/kg,而腹腔给药一般是 15 mg/kg。用二氧化硅诱导的肺纤维化动物模型常用的造模方式有气管内注入和口咽注入。通过气管内注入可以观察到早期炎性反应、炎症细胞浸润情况和细胞因子的表达;口咽注入则更贴近人类矽肺病的发病过程,但操作复杂且耗时较长^[46]。用百草枯诱导的肺纤维化动物模型常用的造模方式有腹腔注入和灌胃。腹腔注入给药,百草枯迅速被吸收进入血液循环,进而作用于肺组织,导致肺纤维化;灌胃给药则可能使药物在胃肠道中停留时间较长,会影响药物的吸收速度和程度。不同的给药方式各有优缺点,研究者可以根据实验目的和条件选择合适的给药方式。

3.4 检测指标分析

3.4.1 肺组织病理观察

通过观察肺组织的病理改变,如肺泡结构破坏、炎症细胞浸润和纤维组织增生的程度,可对模型进行评价^[44]。观察肺组织病理最常用的染色方法是苏木素-伊红(HE)染色和 Masson 染色;HE 染色和 Masson 染色可以帮助研究人员在光学显微镜下观察肺组织的纤维化程度和炎症反应;

Masson 染色后肺组织中的胶原蛋白呈蓝色,可直接观察肺组织胶原蛋白的沉积情况^[47-48]。

3.4.2 生化指标

通过数据分析,肺纤维化动物模型最常检测的生化指标有血清、肺组织匀浆、肺泡灌洗液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等细胞因子和 ROS、MDA、SOD 等氧化应激因子的水平;还有通过实时荧光定量 PCR 检测法和 Western Blot 检测法检测的肺组织中 TGF- β 1、Smad2/3、NF- κ B、 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达水平。

IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 是重要的促炎细胞因子,检测其含量可以反映机体的炎症程度^[49]。VEGF 可与纤维化因子协同,促进 II 型肺泡上皮细胞发生间充质转化,并加速肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的转变^[50];PDGF 可直接刺激肺成纤维细胞的有丝分裂^[51];CTGF 兼具趋化及促进成纤维细胞有丝分裂的双重效应^[52]。ROS、MDA 及 SOD 等参数反映了生物体内氧化应激的水平,其中 ROS 是氧单电子还原的关键产物,MDA 为脂质过氧化副产物,而 SOD 则是关键的抗氧化防御酶^[53]。根据研究需求选择这些生化指标,对于揭示肺纤维化的发病机制具有重大意义。

TGF- β 是转化生长因子超家族的一员,包括 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 三种亚型,是维持肺部正常生理功能不可或缺的多功能细胞因子,而异常的 TGF- β 信号是肺纤维化进程的核心驱动因素^[54]。其中 TGF- β 1 在气道上皮和成纤维细胞中的高表达会触发成纤维细胞的异常分化与损伤反应,加速纤维化的发展^[55]。而 Smad 家族蛋白在 TGF- β 信号转导中起关键性作用,其中 Smad2 和 Smad3 作为 TGF- β 1 的下游效应分子被激活,而 Smad7 则作为负调控因子参与这一过程^[56]。因此,在肺纤维化病理状态下,Smad2 与 Smad3 的表达显著上调,而 Smad7 的表达受到抑制^[57]。此外, α -SMA 作为活化成纤维细胞的标志性蛋白,在肺纤维化过程中的细胞增殖与分化中发挥着至关重要的作用。通过监测这些蛋白在肺纤维化动物模型中的表达变化,我们能够更深

入地理解纤维化发病机制中涉及的能量代谢失衡、细胞增殖异常及细胞凋亡等关键环节。

在肺纤维化的研究中,对这些关键因子的深入研究不仅有助于阐明肺纤维化的复杂机制,还为开发新的治疗靶点与策略提供了坚实的科学依据,与肺纤维化动物模型的研究结果相互印证,进一步推动了临床治疗的进步。

4 肺纤维化动物模型的发展与挑战

目前研究人员选择最多的实验动物是鼠,尤其是 SD 大鼠和 C57BL/6 小鼠,性别多选用雄性;造模方法使用最多的是博来霉素气管给药;检测指标大多包含了肺组织病理观察、蛋白质的表达和细胞因子。但当前肺纤维化动物模型仍面临许多挑战:(1)动物模型的肺纤维化病变程度和病程进展与人类存在较大差异,无法完全模拟人类肺纤维化的发病机制和病理过程^[58-59];(2)在肺纤维化动物模型的制备过程中,经常用到的造模方法有气管内注入、腹腔注入、雾化吸入、经鼻给药、静脉注入,这些方法可能会对动物的呼吸系统造成一定程度的损伤,从而影响模型的有效性和可靠性;(3)肺纤维化动物模型选用的动物种类也会影响模型的有效性和可靠性,如鼠类虽然是常用的肺纤维化动物模型,但其体型较小,在放射影像学的研究方面并不适用;大型动物虽然体型大、肺部组织结构与人相似,可以通过影像学方法观察动物造模的动态情况,但价格昂贵且操作复杂^[60]。要建立更完善的肺纤维化动物模型还需要研究人员不断地探索。

建立高质量的肺纤维化动物模型在肺纤维化疾病的研究和临床实践中具有非常重要的意义。本文通过数据挖掘的方式对肺纤维化动物模型的构建进行分析和总结,希望可以为相关研究人员提供帮助。同时希望随着对肺纤维化发病机制的深入研究和技术的不断进步,未来能够构建更为精准和实用的肺纤维化动物模型,为肺纤维化的预防和治疗提供有力支持。

参 考 文 献(References)

- [1] MOLINA-MOLINA M, PEREDA J, XAUBET A. Experimental models for the study of pulmonary fibrosis; current usefulness and future promise [J]. Arch Bronconeumol, 2007, 43(9): 501-507.
- [2] COLLARD H R, RYERSON C J, CORTE T J, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. an international working group report [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 194(3): 265-275.
- [3] DU BOIS R M. An earlier and more confident diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir Rev, 2012, 21(124): 141-146.
- [4] CHANDA D, OTOUPALOVA E, SMITH S R, et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis [J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 56-69.
- [5] MOORE B B, LAWSON W E, OURY T D, et al. Animal models of fibrotic lung disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(2): 167-179.
- [6] 杨慧聪, 王克婧, 张飞宇, 等. 基于肺纤维化模型的五味参苓汤配比筛选及提取工艺研究 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(10): 15-22.
YANG H C, WANG K J, ZHANG F Y, et al. Formulation optimization and extraction technology of Wuwei Shenqin decoction based on pulmonary fibrosis model [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(10): 15-22.
- [7] 秦晓娟, 奚娜. 活血通络汤治疗类风湿关节炎致肺间质纤维化的疗效观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(5): 115-118.
QIN X J, XI N. Effect of Huoxue Tongluo decoction on pulmonary interstitial fibrosis caused by rheumatoid arthritis [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2024, 51(5): 115-118.
- [8] 蔡松, 张立山, 孙放, 等. 基于气热血火理论从三焦论治肺纤维化 [J]. 世界中医药, 2024, 19(6): 822-825.
CAI S, ZHANG L S, SUN F, et al. Discussion on the treatment of pulmonary fibrosis from the perspective of Sanjiao based on the theory of "qi, blood, water, fire" [J]. World Chin Med, 2024, 19(6): 822-825.
- [9] MAHER T M, BENDSTRUP E, DRON L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 197.
- [10] MEI Q, LIU Z, ZUO H, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update on pathogenesis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 797292.
- [11] ISHIDA Y, KUNINAKA Y, MUKAIDA N, et al. Immune mechanisms of pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3149.
- [12] LEY B, COLLARD H R, KING T E Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(4): 431-440.
- [13] KANG Y P, LEE S B, LEE J M, et al. Metabolic profiling regarding pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Proteome Res, 2016, 15(5): 1717-1724.
- [14] ZHAO Y D, YIN L, ARCHER S, et al. Metabolic heterogeneity of idiopathic pulmonary fibrosis: a metabolomic

- study [J]. *BMJ Open Respir Res*, 2017, 4(1): e000183.
- [15] MCGRATH E E, MILLAR A B. Hot off the breath: triple therapy for idiopathic pulmonary fibrosis-hear the PANTHER roar [J]. *Thorax*, 2012, 67(2): 97-98.
- [16] 张丹参, 马佳呈. 诱发肺纤维化动物模型方法及评价 [J]. *神经药理学报*, 2019, 9(6): 15-20.
- ZHANG D S, MA J C. Methods and evaluation of animal models of induced pulmonary fibrosis [J]. *Acta Neuropharmacol*, 2019, 9(6): 15-20.
- [17] 王琦, 赵亚茜, 谌晓莉, 等. 中医治疗肺纤维化的研究进展 [J]. *河北医学*, 2021, 27(10): 1751-1753.
- WANG Q, ZHAO Y Q, CHEN X L, et al. Research progress of treating pulmonary fibrosis with traditional Chinese medicine [J]. *Hebei Med*, 2021, 27(10): 1751-1753.
- [18] 李尚点, 李友林, 张慧婷, 等. 基于数据挖掘探讨中药专利复方治疗肺纤维化用药规律 [J]. *中医学报*, 2025, 40(1): 50-56.
- LI S D, LI Y L, ZHANG H T, et al. Medication rule of TCM patent compound formula in treatment of pulmonary fibrosis based on data mining [J]. *Acta Chin Med*, 2025, 40(1): 50-56.
- [19] 肖雪童. 基于数据挖掘的中药复方治疗特发性肺纤维化用药规律的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学; 2023.
- XIAO X T. Study on the law of traditional Chinese medicine compound in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis based on data mining [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [20] 何家琛, 李佳玮, 刘志东. 中药复方对特发性肺纤维化干预机制的实验研究进展 [J]. *天津中医药大学学报*, 2024, 43(5): 450-456.
- HE J C, LI J W, LIU Z D. Experimental research progress of traditional Chinese medicine compound on the intervention mechanism of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2024, 43(5): 450-456.
- [21] 马林纳, 王瑞, 苗明三. 基于数据挖掘的治疗肺纤维化中药用药规律分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(6): 1406-1411.
- MA L N, WANG R, MIAO M S. Medication rule of Chinese materia Medica in treatment of pulmonary fibrosis based on data mining [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(6): 1406-1411.
- [22] 吴艳旭, 郭勃, 蒙巍, 等. 特发性肺纤维化的中医治疗概述 [J]. *中外医学研究*, 2021, 19(6): 194-196.
- WU Y X, GUO B, MENG W, et al. Overview on traditional Chinese medicine treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin Foreign Med Res*, 2021, 19(6): 194-196.
- [23] 赵梦雅, 姜梦笔, 杨欣, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨黄芪治疗特发性肺纤维化的分子机制 [J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(9): 1582-1592.
- ZHAO M Y, JIANG M B, YANG X, et al. Study on the molecular mechanism of Astragali Radix in treating idiopathic pulmonary fibrosis based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2021, 33(9): 1582-1592.
- [24] 袁佳, 庞立健, 郑玮东, 等. IPF 动物造模及造模方法研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(7): 89-91.
- YUAN Q, PANG L J, ZHENG W D, et al. Study of induction of pulmonary fibrosis and methods of induced pulmonary fibrosis [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2014, 16(7): 89-91.
- [25] 张东伟, 王继峰, 牛建昭, 等. 盐酸博莱霉素致大鼠肺纤维化动物模型 HRCT 的评价 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29(6): 507-509.
- ZHANG D W, WANG J F, NIU J Z, et al. Evaluation the diagnostic value of HRCT in a rat model of pulmonary fibrosis induced with bleomycin A5 [J]. *Med J Chin People's Liberation Army*, 2004, 29(6): 507-509.
- [26] 陈力, 王静, 吴平先, 等. 单碱基编辑技术在动物中的应用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(23): 21-25, 31, 130-132.
- CHEN L, WANG J, WU P X, et al. Application of single base gene editing technology in animals [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2023(23): 21-25, 31, 130-132.
- [27] 郭琦琦, 李毅, 翁桓泽, 等. 生物及非生物因素诱导肺纤维化动物模型研究的特点 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(14): 2273-2278.
- GUO Q Q, LI Y, WENG H Z, et al. Advances in animal models of pulmonary fibrosis induced by biotic and abiotic factors [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(14): 2273-2278.
- [28] 刘蓉, 赵瑾, 李洪涛, 等. 两个品系小鼠肺纤维化模型的比较观察 [J]. *实验动物与比较医学*, 2011, 31(5): 376-380.
- LIU R, ZHAO J, LI H T, et al. Comparative observation on pulmonary fibrosis models between two strains of mice [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2011, 31(5): 376-380.
- [29] 宋桂芹, 徐志伟, 李泽, 等. 不同品系小鼠肺纤维化模型的比较研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(4): 13-16.
- SONG G Q, XU Z W, LI Z, et al. Comparative study on pulmonary fibrosis model induced by Bleomycin in three strains of mice [J]. *Chin J Mod Med*, 2017, 27(4): 13-16.
- [30] ORGAN L, BACCI B, KOUMOUNDOUROS E, et al. Structural and functional correlations in a large animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *BMC Pulm Med*, 2015, 15: 81.

- [31] 陈玥, 苏丹, 贵文娟, 等. 树鼯呼吸系统主要组织器官组织学研究 [J]. 遵义医科大学学报, 2023, 46(12): 1148–1152.
- CHEN Y, SU D, GUI W J, et al. Investigation of respiratory system organs in tree shrew [J]. J Zunyi Med Univ, 2023, 46(12): 1148–1152.
- [32] CHE P, WANG M, LARSON-CASEY J L, et al. A novel tree shrew model of pulmonary fibrosis [J]. Lab Invest, 2021, 101(1): 116–124.
- [33] ZHAO Y, WANG J, KUANG D, et al. Susceptibility of tree shrew to SARS-CoV-2 infection [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16007.
- [34] VOLTZ J W, CARD J W, CAREY M A, et al. Male sex hormones exacerbate lung function impairment after bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39(1): 45–52.
- [35] GHARAEI-KERMANI M, HATANO K, NOZAKI Y, et al. Gender-based differences in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Am J Pathol, 2005, 166(6): 1593–1606.
- [36] 刘静, 肖元元, 曾明. 自噬在不同病因所致肺纤维化中的作用及机制 [J]. 卫生研究, 2021, 50(3): 515–520, 532.
- LIU J, XIAO Y Y, ZENG M. The role of autophagy in pulmonary fibrosis caused by different etiology and mechanism [J]. J Hyg Res, 2021, 50(3): 515–520, 532.
- [37] 陈孟毅, 孟爱民. 肺纤维化动物模型及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 88–93.
- CHEN M Y, MENG A M. Introduction and research progress of animal models of pulmonary fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(6): 88–93.
- [38] DELLA LATTI V, CECCHETTINI A, DEL RY S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions [J]. Pharmacol Res, 2015, 97: 122–130.
- [39] 邓雅茹, 陈同生. 中药单体抗肺纤维化研究进展 [J/OL]. [2024-09-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20240729.1640.056.html>.
- DENG Y R, CHEN T S. Research progress on anti-pulmonary fibrosis effects of traditional Chinese medicine monomers [J/OL]. [2024-09-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20240729.1640.056.html>.
- [40] HE Y, THUMMURI D, ZHENG G, et al. Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. Transl Res, 2019, 209: 14–21.
- [41] HUANG C, QIAN S L, SUN L Y, et al. Light-emitting diode irradiation (640 nm) regulates keratinocyte migration and cytoskeletal reorganization via hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Photomed Laser Surg, 2016, 34(8): 313–320.
- [42] 李丽娜, 王华, 周蕾, 等. 博来霉素诱导小鼠肺间质纤维化造模方式的选择 [J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(3): 254–257.
- LI L N, WANG H, ZHOU L, et al. Comparison of mouse lung fibrosis induced by intraperitoneal injection and intratracheal instillation of bleomycin [J]. Chin J Immunol, 2010, 26(3): 254–257.
- [43] 张亮, 席瑞, 臧凝子. 熊去氧胆酸通过调控 TGF- β 1/Smads 信号通路对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(2): 271–276.
- ZHANG L, XI R, ZANG N Z. Ursodeoxycholic acid regulates TGF- β 1/smads signaling pathway to treat bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. World J Integr Tradit West Med, 2023, 18(2): 271–276.
- [44] 李莎, 刘文. 百草枯致肺纤维化动物模型、发病机制及抗纤维化治疗进展 [J]. 药学服务与研究, 2018, 18(4): 241–246.
- LI S, LIU W. Advances in animal model, pathogenesis and anti-fibrosis treatment of pulmonary fibrosis induced by paraquat [J]. Pharm Care Res, 2018, 18(4): 241–246.
- [45] 王搏, 宋庆华, 唐会猛, 等. 博来霉素诱导的肺纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1617–1628.
- WANG B, SONG Q H, TANG H M, et al. Progress in animal models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1617–1628.
- [46] 李丹丹, 王瑞, 张海东. 矽肺动物模型的研究进展 [J]. 中国工业医学杂志, 2019, 32(2): 109–112.
- LI D D, WANG R, ZHANG H D. Progress in experimental animal models of silicosis [J]. Chin J Ind Med, 2019, 32(2): 109–112.
- [47] 陈雪芬, 姬文婕, 胡道川, 等. 阿托伐他汀对实验性肺纤维化的干预作用及机制 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2015, 14(3): 236–241.
- CHEN X F, JI W J, HU D C, et al. The effects and mechanism of atorvastatin in experimental pulmonary fibrosis [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2015, 14(3): 236–241.
- [48] BISCHOF R J, SNIBSON K, SHAW R, et al. Induction of allergic inflammation in the lungs of sensitized sheep after local challenge with house dust mite [J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33(3): 367–375.
- [49] 韩晓静, 韩齐齐, 钱峰. 特发性肺纤维化的炎症机制与潜在药物靶标 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(5): 828–832.
- HAN X J, HAN Q Q, QIAN F. Inflammatory mechanisms and potential drug targets in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(5): 828–832.
- [50] BARRATT S L, FLOWER V A, PAULING J D, et al. VEGF (vascular endothelial growth factor) and fibrotic lung

- disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1269.
- [51] 汪君, 陈晔, 林佳玉, 等. 肺纤维化治疗相关靶点研究进展 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2024, 34(5): 486-490.
WANG J, CHEN Y, LIN J Y, et al. Research progress of therapeutic targets for pulmonary fibrosis [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*, 2024, 34(5): 486-490.
- [52] 陈琳, 宋远圆, 马华. 人脐带间充质干细胞对大鼠肺成纤维细胞分泌 Smad2 蛋白、结缔组织生长因子的影响 [J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2024, 8(12): 18-22.
CHEN L, SONG Y Y, MA H. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on secretion of Smad2 protein and connective tissue growth factor in rat lung fibroblasts [J]. *Mod Med Health Res Electron J*, 2024, 8(12): 18-22.
- [53] 王春玲, 任春贞, 王旭勇, 等. 当归黄芪超滤物通过调控 Nrf2/xCT/GPX4 信号通路抑制铁死亡改善放射性大鼠肺纤维化 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(16): 4338-4346.
WANG C L, REN C Z, WANG X Y, et al. Ultrafiltration of *Angelicae Sinensis Radix* and *Astragali Radix* inhibits ferroptosis and improves pulmonary fibrosis in rats by regulating Nrf2/xCT/GPX4 signaling pathway [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2024, 49(16): 4338-4346.
- [54] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(5): a021873.
- [55] KANG H. Role of microRNAs in TGF- β signaling pathway-mediated pulmonary fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2527.
- [56] ZHU L, FU X, CHEN X, et al. M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(9): 960-968.
- [57] WALTON K L, JOHNSON K E, HARRISON C A. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 461.
- [58] MILGER K, KNEIDINGER N, NEUROHR C, et al. Switching to nintedanib after discontinuation of pirfenidone due to adverse events in IPF [J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(4): 1217-1221.
- [59] PEI Z, QIN Y, FU X, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102509.
- [60] 肖懿瑶. 张纾难教授治疗肺间质纤维化用药规律及肺痿冲剂药效机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2022.
XIAO S Y. Professor Zhang Shu-nan's drug administration in the treatment of pulmonary interstitial fibrosis and the pharmacodynamic mechanism of Feiwei granules [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2022.

[收稿日期] 2024-09-18

李璘, 邱蓉丽, 魏凯峰, 等. 斑马鱼在抗肿瘤药物和临床研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 561–566.

LI L, QIU R L, WEI K F, et al. Zebrafish applications in anti-tumor drug research and clinical studies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 561–566.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.010

斑马鱼在抗肿瘤药物和临床研究中的应用

李璘¹, 邱蓉丽², 魏凯峰¹, 程海波³, 孙东东^{3*}

(1. 南京中医药大学中医学院, 南京 210023; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023;
3. 南京中医药大学江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023)

【摘要】 斑马鱼作为独具特点的新兴实验动物, 广泛应用于人类多种疾病的研究。斑马鱼具有发育迅速、基因组与哺乳类动物高度同源、基因编辑操作简便和成本低廉等优势, 目前已成为肿瘤研究不可或缺的模式动物之一。本文对斑马鱼抗肿瘤药物和临床治疗肿瘤研究的应用特点进行概述, 以期对斑马鱼在抗肿瘤药物筛选、药物效应、毒副作用、作用机制及临床研究等方面的进一步应用提供有益参考。

【关键词】 斑马鱼; 抗肿瘤; 药物; 筛选; 耐药性; 临床治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0561-06

Zebrafish applications in anti-tumor drug research and clinical studies

LI Lin¹, QIU Rongli², WEI Kaifeng¹, CHENG Haibo³, SUN Dongdong^{3*}

(1. School of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Collaborative Innovation Center of Jiangsu Province Chinese Medicine in Cancer Prevention and Treatment, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Corresponding author: SUN Dongdong. E-mail: sundd@njucm.edu.cn

【Abstract】 Zebrafish is a relatively new experimental animal model with unique characteristics that enable its wide use in research on many human diseases. The exploration of anti-tumor drugs and other clinical treatments remain the focus of current research on cancer. Zebrafish characteristics, including rapid development, ease of observation, high genetic homology, and low-cost gene editing, make them highly useful for tumor research. By covering the applications of zebrafish in anti-tumor drug research and clinical studies, this review aims to provide valuable insights for the further utilization of zebrafish in cancer drug screening, assessment of drug activity and toxicity, and clinical research.

【Keywords】 zebrafish; anti-tumor; drug; screening; drug resistance; clinic therapy

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

斑马鱼肿瘤与人类肿瘤的发生高度保守, 许多斑马鱼肿瘤研究结果常常可以外推人类, 因此 斑马鱼在肿瘤相关研究中应用广泛, 其独有的特性引起了学者的注意。尽管斑马鱼作为研究人

【基金项目】 国家自然科学基金(82361168663), 江苏省中医药科技发展计划重点项目(ZD202201)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82361168663), Key Project of Jiangsu Provincial Development Plan for Traditional Chinese Medicine Science and Technology (ZD202201).

【作者简介】 李璘, 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 抗肿瘤中药分子机制。Email: lilinabc@njucm.edu.cn

【通信作者】 孙东东, 男, 博士, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤发病与药物干预机制。Email: sundd@njucm.edu.cn

类肿瘤的一种良好工具,但存在局限性。伴随生物分子发光、转基因和 CRISPR 等技术发展,以及斑马鱼基因操作的便捷性,扩大了斑马鱼在肿瘤研究中的应用。本综述探讨斑马鱼作为肿瘤研究对象的适用性,总结斑马鱼在抗肿瘤药物研发和临床研究中的应用前景。

1 斑马鱼用于研究抗肿瘤药物的优势

1.1 与人类肿瘤高度相似性

斑马鱼与人类有相似的组织发育特点、屏障和组织特异性转运系统,是介于细胞与动物之间的非哺乳脊椎动物,会发生人类类似的肿瘤。尽管与人类生活环境不同,但斑马鱼肿瘤的细胞生长、基因转录及表达与人类依然保持高度保守状态。斑马鱼 *rag2* 启动子控制斑马鱼 *kr⁺* 基因形成横纹肌肉瘤,*myc* 基因产生急性 T 细胞白血病,诱导 *krasg12v* 基因形成原位胰腺癌,均发生与人类肿瘤相似的分子结构和表型等生物学改变^[1-2]。斑马鱼原位或异位植入高转移性肿瘤呈现与人类相似的侵袭和转移。高转移乳腺癌细胞植入斑马鱼尾部造血组织发生骨转移,或尾部造血组织出现微转移;同样原位高转移性肿瘤,如视网膜母细胞瘤或小儿脑瘤分别接种于斑马鱼眼部或脑腔形成原位瘤^[3]。斑马鱼肠道组织杯状细胞和肠分泌细胞分泌粘蛋白,类似人类的 M 细胞参与斑马鱼肠道抗原递呈,和哺乳类动物一样不断更新,同样发生肠腺癌和肝癌。因此,斑马鱼成为研究人类肿瘤的重要工具,适合研究肿瘤发生发展过程及与天然免疫和获得性免疫间的作用。

1.2 体现药物作用的综合效应

斑马鱼疾病相关蛋白及疾病过程与人类高度相似,意味着对斑马鱼起作用的药物与人类有类似的作用靶点^[4]。用斑马鱼研究抗肿瘤药物时,可以获得药物对肿瘤的直接作用,还可以观察药物影响微环境对肿瘤的间接作用,如观测斑马鱼肿瘤区及其周围中性粒细胞及巨噬细胞,判定肿瘤细胞与免疫系统及药物的作用^[5]。用启动子 *her4.1* 使转基因斑马鱼 *tp53^{-/-}* 的神经祖细胞和放射状胶质细胞过表达 *egfr^{full}* 和 *pi13kca^{H1047R}*,发现

胶质母细胞瘤早期阶段的炎性细胞(小胶质细胞或巨噬细胞)呈现抑制肿瘤生长的作用,肿瘤后期炎症转录因子 *irf7* 或 *irf8* 抑制细胞的吞噬功能而促进肿瘤细胞的增殖,呈现出肿瘤与免疫细胞相互作用的变化过程^[6]。药物研究早期阶段,斑马鱼不仅提供药物的基本效应,还提供相关代谢及毒副作用等信息。对于新化合物,斑马鱼肿瘤模型可以在不了解药物作用机制的条件下发现或筛选药物的抗肿瘤作用。抗肿瘤前体药物本身活性较弱,在斑马鱼体内经酶或非酶转化释放活性物质而发挥药效,或代谢产物存在活性,只有整体动物模型才能发现药物特殊作用靶点或相关作用。同时可以进行构效关系研究,甚至改变药物靶向分布,优化药物效价。

斑马鱼模型可以同时提供药物作用的综合信息,斑马鱼作为系统性生物体,与分子生物学或细胞生物学等研究方法比较,体现肿瘤细胞与非肿瘤细胞间、肿瘤细胞与基质间及肿瘤细胞与机体组织器官间的相互作用;与啮齿类动物的研究方法比较,斑马鱼实验时间及成本消耗小,转化效率高,尤其适用于珍贵的小量药物。

1.3 斑马鱼发育迅速,可以提高研究效率

斑马鱼一次性产生大量后代且受光照调节,受精 8 h 内胚层细胞极化,肠道发育,22 h 背主动脉和后主静脉形成,约 30 h 形成小动脉。受精 48 h 斑马鱼产生红细胞、血小板及淋巴细胞,54 h 淋巴细胞到达胸腺开始发育,5 d 完成发育^[7]。斑马鱼造血干细胞受精 36 h 出现,小鼠是 10.5 d,人类需要 28 d。斑马鱼生长迅速,生命周期较短,尤其适用于肿瘤发生过程的研究。早期斑马鱼机体透明,通过报告基因实时观察肿瘤细胞生长,转移等过程。斑马鱼移植肿瘤技术非常成熟,包括前列腺癌、乳腺癌、肠癌,黑色素瘤、肉瘤及白血病,操作简单,每天可以注射几百条,仅用 16 周便筛选 16 320 种化合物^[8]。斑马鱼是体外受精,适合肿瘤相关基因的实验性研究,具有非常好的操作性,现已有终身保持透明的转基因成年斑马鱼,用立体显微镜或共聚焦显微镜定位研究肿瘤细胞。斑马鱼是理想的高通量筛选抗肿瘤药物的模式动物,饲养维护及管理成本不高,可以大批量实验。

2 斑马鱼在抗肿瘤药物临床前研究中的应用

2.1 抗肿瘤药物筛选

候选药确定是抗肿瘤药物研究的关键步骤,斑马鱼常用于 T 急性淋巴细胞白血病 (T cell acute lymphoblastic leukaemia, T-ALL) 药物筛选,荧光标记 T 淋巴细胞 *myc*⁺ 诱导斑马鱼 T-ALL 模型,从 4880 个药物中发现抗精神病先导化合物吩噻嗪明显杀死癌细胞,因其抑制多巴胺受体 D₂ 导致锥体外系运动障碍,已有学者修饰分子结构降低副作用,保留抗癌效应^[1]。T-ALL 斑马鱼模型筛选 26 400 种化合物,确定化合物 Lenalidekar 使 PI3 激酶/AKT/mTOR 通路蛋白去磷酸化,延迟有丝分裂晚期的敏感细胞,抑制难治性 B 淋巴细胞性和慢性髓性等其它白血病^[9]。

黑色素瘤是高度恶性肿瘤植入斑马鱼后,从 FDA 和 EMA 获批的 1280 种治疗其它疾病的药物中,筛选 55 种药物抑制黑色素瘤细胞 (60% 以上),其中抗真菌药克霉唑效果最佳^[10]。克霉唑合用法尼基蛋白转移酶抑制剂洛那法尼或 MEK 抑制剂曲美替尼,增强抑制黑色素瘤细胞^[10]。转基因斑马鱼 *v12ras*⁺ 形成黑色素瘤不仅呈现水平生长,还侵袭性垂直生长,表现为 ERK-MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR 双通路激活。用该模型从 640 种药物中筛选 MEK 抑制剂 PD184352 和 PI3K/mTOR 抑制剂 NVPBEZ235,两者合用双硫仑、雷帕霉素或丹参酮协同抑制黑色素瘤^[11]。另外,斑马鱼在其它抗肿瘤药物筛选也广泛应用。将神经嵴干细胞植入斑马鱼,发现来氟米特抑制神经母细胞瘤,进一步研究表明来氟米特抑制二氢乳清酸脱氢酶抗肿瘤细胞增殖,并且有较强免疫抑制作用^[12]。用斑马鱼模型从 3840 个小分子化合物中筛选治疗腺样囊性癌 (*myb*⁺) 的成分全反式维甲酸,目前已用于二期临床试验^[1]。

斑马鱼用于抗肿瘤药物筛选优势明显,一般肿瘤细胞植入斑马鱼 1 d 后给药,48 h 便可检测药物的效应。伴随着多种荧光技术的发展,结合宽场或共聚焦等显微技术,利用高内涵成像以及自动识别等检测方法,斑马鱼抗肿瘤药物筛选的自动化程度越来越高,有进一步加快的趋势。同

时,斑马鱼可以在未知化合物作用情况下进行规模性快速筛选。

2.2 抗肿瘤药物靶点及机制研究

斑马鱼不仅用于抗肿瘤药物筛选,还广泛用于抗肿瘤药物作用靶点研究。目前血管生成是抗肿瘤靶点研究的一个重要方向,旨在通过抑制肿瘤血管限制肿瘤细胞代谢。从 2000 多种化合物中用斑马鱼筛选发现 7 种化合物影响血管生成,其中瑞舒伐他汀抑制血管生成效果最佳^[13]。但在 *vegfr2/grcjp*⁺ 转基因斑马鱼研究中发现抑制 VEGF 信号可以抑制原位肿瘤增殖,却促进微肿瘤形成,发现 VEGF 信号通路与髓源性细胞作用促进肿瘤转移^[14]。因此有学者用斑马鱼发现化合物 PF-502 诱导内皮细胞,激活 Notch1 信号通路,形成流线型血管结构,提高血管稳定性和改善血液动力学,从而促进肿瘤内血管正常化,提高药物向肿瘤内递送^[15]。

斑马鱼也用于抗肿瘤药物新靶点发现或新作用机制研究。斑马鱼脑移植瘤模型显示 HSP90 抑制剂 onalespib 和替莫唑胺抑制神经胶质瘤生长,发现抑制精氨酸甲基转移酶-5 可作为治疗神经胶质瘤的靶点^[16]。肺癌细胞发生 *egfr*⁺ 和 *t790m*⁺ 双变异产生吉非替尼耐药,用斑马鱼肺癌模型发现奥希替尼抑制 *egfr*⁺ 和 *t790m*⁺ 变异的肺癌细胞,认为 *t790m* 可以作为抗肿瘤药物的新靶点^[17]。K-975 抑制斑马鱼骨肉瘤 (5 μmol/L) 1.1 倍,是转录增强相关结构域 (transcriptional enhanced associate domain, TEAD) 抑制剂,研究发现 K-975 通过丙烯酰胺结构与位于 TEAD 棕榈酸酯结合口袋中的 Cys359 共价结合,抑制 YAP1/TAZ 和 TEAD 之间的蛋白质-蛋白质相互作用^[12]。从 773 种药物中发现埃罗替尼阻止斑马鱼白血病发生,高效阻止肿瘤细胞 Wnt/β-catenin 的下游信号通路,因此认为抑制 Wnt/β-catenin 下游信号通路可以降低毒副作用的产生^[18]。另外,斑马鱼也用于优化药物及其衍生物的抗肿瘤作用。从 24300 种化合物中选出组蛋白乙酰转移酶抑制作用的化合物 WM-8014 (IC₅₀, 8 nM), *krasg12v*⁺ 诱导斑马鱼肝肿瘤,化合物 WM-8014 具有明显抑制作用,从其系列衍生物中筛选具有更好生物利用度化合物^[19]。

肿瘤细胞信号通路复杂多变,靶点多种多

样,抗肿瘤药物作用并非集中在一个靶点上,常常需要快速识别作用靶点或机制。在整体动物疾病状态下,斑马鱼不仅用于研究抗肿瘤药物作用的强度,也用于抗肿瘤药物新靶点及机制研究,以及优化药物及量效或毒性及代谢研究。

2.3 抗肿瘤药毒副作用研究

抗肿瘤药物毒副作用是影响其应用的重要因素,有些抗肿瘤化合物效价较高,但常掩盖其生物发育及胚胎早期毒副作用。药物或化合物加入水中,观察斑马鱼死亡或表型异常变化,容易发现发育毒性及行为异常,快速评价抗肿瘤药物系统性毒副作用。如抗肿瘤作用的野茉莉皂甙元 A 和 B 破坏细胞膜完整性,损伤早期斑马鱼的胚胎发育;恩杂鲁胺抑制雄激素受体治疗前列腺癌,斑马鱼前列腺癌模型发现它诱发心动过缓导致斑马鱼死亡^[20]。抗肿瘤药物常抑制骨髓造血功能及肝毒性,用红细胞荧光报告基因发现抗肿瘤药物对骨髓细胞功能及血液毒性的影响。化疗药阿霉素和表阿霉素在斑马鱼肝及胆汁中大量分布,显示表阿霉素与肝有更强亲和力,同样发现表阿霉素对斑马鱼心毒性较阿霉素强^[21]。斑马鱼也用于筛选改善抗肿瘤药物毒副作用的成分或药物。顺铂治疗肿瘤常出现耳毒性和肾毒性,用斑马鱼从 1280 种化合物中筛选 22 种对耳和肾有保护作用的药物,其中多巴胺和含羞草素可以保护听泡中毛细胞和维持肾小球滤过功能,不降低顺铂类药物的治疗作用^[22]。斑马鱼用于抗肿瘤药物毒副作用研究可以在抗肿瘤效应研究时进行,同时观察药物分布及代谢过程,预测其作用或机制,预防其毒副作用或筛选对抗性成分。

3 斑马鱼在临床抗肿瘤研究中的应用

3.1 临床抗肿瘤药物治疗方案的筛选

肿瘤治疗,如生物靶点治疗、免疫治疗及化疗药物等有效性接近或低于 50%。药物精准治疗提高肿瘤治疗的有效性,但精准治疗取决于肿瘤基因变异及分子生物学特点和分子标志物。斑马鱼肿瘤模型在初步确定甚至不确定肿瘤信息的前提下,快速规模性筛选有效的临床治疗方

案。将患者临床肿瘤样本 Dil 标记植入受精 48 h 的斑马鱼,4 d 肿瘤种植成功率可达 89%,即可快速筛选确定高效治疗方案,病理组织学分析发现肿瘤组织保持原有特点^[23]。24 例患者肿瘤组织(12 例胰腺癌、肠癌 8 例、胃癌 4 例)植入斑马鱼卵黄囊,观察 10 个不同化疗药物配伍方案对肿瘤的抑制率,相应药物治疗方案应用于临床,治疗效果与斑马鱼模型药物作用的结果呈现正相关^[23]。5-氟尿嘧啶、奥沙利铂和叶酸组成的复方用于 5 例不同患者肿瘤斑马鱼移植模型,给药 3 d 后其中 2 例有效,临床手术用药治疗 6 个月后没有复发,3 例无效患者,手术治疗 3 个月后肿瘤复发。同样,将患者肠癌细胞植入斑马鱼,评估临床两个治疗方案的优劣,方案 1(5-氟尿嘧啶、伊立替康及甲酰四氢叶酸)和方案 2(5-氟尿嘧啶、奥沙利铂及甲酰四氢叶酸),方案 1 明显优于方案 2^[24]。

肿瘤移植斑马鱼模型用于药物敏感性的筛选,为临床个体化治疗提供精准信息,将适合个体的治疗方案快速转化为临床应用。一般精准治疗的信息如基因测试、数据分析一般需要 1 ~ 4 周,而斑马鱼明显的特点是速度快、范围广,斑马鱼肿瘤模型非常成熟,同时可以自动化检测。

3.2 临床肿瘤药物耐药性研究

肿瘤耐药是当前临床治疗肿瘤的难点和障碍,包括肿瘤固有耐药和治疗后获得性耐药。许多患者肿瘤植入斑马鱼形成移植模型,如腺样囊性癌、神经内分泌瘤、乳腺癌、头颈癌、胰腺癌及黑色素瘤等,保留原有的临床杂合性、固有耐药和获得性耐药的特性。治疗过程中肿瘤细胞产生基因变异导致药物耐药,或不易治疗,或产生肿瘤复发。如 *kras*^{G13D} 变异的肠癌细胞对西妥昔单抗耐药,其植入斑马鱼产生同样结果^[24]。患者黑色素瘤植入斑马鱼,发现瘤组织中部分无关 MITF (melanocyte inducing transcription factor) 肿瘤细胞变为 *mitf*⁺ 型细胞而复发,与临床结果一致^[25]。同样用斑马鱼模型发现抑制基因 *spred1* 负调控 MARK 信号通路,其缺失促进黏膜黑色素瘤细胞增殖,提高对化疗药物的耐药性^[26]。临床选用贝伐珠单抗治疗方案治疗肠腺癌腹膜转移的患者,手术后无效死亡,将患者肿瘤组织植入斑马鱼,发现肿瘤细胞对贝伐珠单抗明显耐药,不能

诱导肿瘤细胞凋亡($P = 0.47$)和抑制肿瘤细胞转移($P = 0.73$)^[27]。

治疗过程中,肿瘤容易产生耐药而导致治疗失败。在保持原有临床肿瘤特点的条件下,将肿瘤组织植入斑马鱼,评判肿瘤是否产生抗药性。同时,短时间内同时筛选多种药物或组方,快速筛选有效治疗方案,为临床治疗提供依据。

4 结语

斑马鱼近年用于抗肿瘤药物筛选,斑马鱼有完整的组织系统,与体外细胞培养比较,容易捕捉到药物非目标细胞的系统性作用。有以下特点表明斑马鱼表型筛选优于体外靶标筛选:(1)非靶标效应,斑马鱼用于研究抗肿瘤药物直接作用的同时,也可同时观察到抗肿瘤作用的间接作用,如促进免疫细胞杀伤、抑制肿瘤血管生成等作用;(2)系统性效应,斑马鱼用于研究抗肿瘤药物作用的同时,还可以观察其对心血管、神经等许多系统的影响,也能对抗肿瘤药物的代谢及作用时间进行初步观测。

斑马鱼适用于抗肿瘤药物研究的全过程,包括先导物筛选及靶点确定、药物临床前效应和临床研究,但需要注意影响药物作用的其它因素:(1)肿瘤细胞植入不同位置的差异。肿瘤一般植入位置为卵黄囊内和卵周间隙(居维叶氏管,PVS)周围,植入PVS的肿瘤细胞较植入卵黄囊内更容易观测,因为其位置较浅,实体瘤容易成团^[28]。但神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤及髓母细胞瘤植入PVS生长速度慢,需原位植入。胶质母细胞瘤植入脑组织中肿瘤细胞发生侵袭并黏附于血管壁上,种植于卵黄囊中极少发生侵袭,因为它不存在髓鞘神经元;(2)斑马鱼对药物吸收方式有一定特殊性。在胚胎期,药物可以通过斑马鱼绒毛膜吸收,或通过表层细胞,或消化系统,幼鱼表皮比胚胎期表皮吸收弱,成年斑马鱼还通过鳃吸收。经过消化系统吸收的药物常因首过效应而发生变化,但经皮或静脉给药发生变化较少。侵入性的给药方式有腹腔注射和球后注射,也可以麻醉后灌胃给药,但这些方式不适合长期给药;(3)斑马鱼给药方式通常将药物溶于水,吸收溶于水中的药物,受精后3 d(3 days post fertilization,3 dpf)可以通过皮肤和吞食用药。人

因间断性给药形成峰值,斑马鱼给药时出现持续暴露,药物排泄物也留在水中;(4)斑马鱼药物吸收较人更容易吸收脂溶强的药物。如脂溶性 $clogP \leq 5.3$,分子量在200 ~ 500 kDa 间,平均分子量为350 kDa^[29]。对于水不溶性药物,可用助溶剂,如二甲基亚砜(一般不超过1%);(5)屏障系统的差异。斑马鱼3 d形成血脑屏障,2.5 d可阻止分子量4 kDa 的化合物,3 d阻止400 kDa 的化合物^[30]。

人类肿瘤种类繁多,复杂多变,当前没有任何一种模型代表肿瘤的全部特点。尽管斑马鱼用于抗肿瘤药物研究有不足之处,但不可否认,斑马鱼作为模式实验动物,其肿瘤模型在抗肿瘤药物筛选、预测毒副作用以及肿瘤个体化治疗方案等方面的应用依然能提供重要的研究价值。

参 考 文 献(References)

- [1] ROY D, SUBRAMANIAM B, CHONG W C, et al. Zebrafish-a suitable model for rapid translation of effective therapies for pediatric cancers [J]. *Cancers*, 2024, 16(7): 1361–1376.
- [2] LIN Q Z, JIN L, PENG R Y. New progress in zebrafish liver tumor models: techniques and applications in hepatocellular carcinoma research [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(2): 780–804.
- [3] CHEN X, WANG J, CAO Z, et al. Invasiveness and metastasis of retinoblastoma in an orthotopic zebrafish tumor model [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10351.
- [4] MARTINEZ-LOPEZ M F, LOPEZ-GIL J F. Small fish, big answers: zebrafish and the molecular drivers of metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 871–900.
- [5] WEISS A, AMATA C D, PEARSON B J, et al. A syngeneic spontaneous zebrafish model of tp53-deficient, EGFRvIII, and PI3KCAH1047R-driven glioblastoma reveals inhibitory roles for inflammation during tumor initiation and relapse in vivo [J]. *eLife*, 2024, 13: RP93077.
- [6] ALBERTI G, AMICO M D, BAYVISOTTO C C, et al. Speeding up glioblastoma cancer research: highlighting the zebrafish xenograft model [J]. *Int J Mol Sc*, 2024, 25(10): 5394–5405.
- [7] ALVERS A L, RYAN S, SCHERZ P J, et al. Single continuous lumen formation in the zebrafish gut is mediated by smoothened-dependent tissue remodeling [J]. *Development*, 2014, 141(5): 1110–1119.
- [8] SHEPARD J L, AMATRUDA J F, STERN H M, et al. A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility [J]. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A, 2005, 102(37): 13194–13199.
- [9] RIDGES S, HEATON W L, JOSHI D, et al. Zebrafish screen identifies novel compound with selective toxicity against leukemia [J]. Blood, 2012, 119 (24): 5621–5631.
- [10] PRECAZZINI F, PANCHER M, GATTO P, et al. Automated *in vivo* screen in zebrafish identifies Clotrimazole as targeting a metabolic vulnerability in a melanoma model [J]. Dev Biol, 2020, 457(2): 215–225.
- [11] FERNANDEZ DEL AMA L, JONES M, WALKER P, et al. Reprofiting using a zebrafish melanoma model reveals drugs cooperating with targeted therapeutics [J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 40348–40361.
- [12] STURTZEL C, GRISSNERBERGER S, BOZATZI P, et al. Refined high-content imaging-based phenotypic drug screening in zebrafish xenografts [J]. NPJ Precis Oncol, 2023, 7(1): 44.
- [13] WANG C, TAO W, WANG Y, et al. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer [J]. Eur Urol, 2010, 58(3): 418–426.
- [14] HE S, LAMERS G E, BEENAKKER J M, et al. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model [J]. J Pathol, 2012, 227(4): 431–445.
- [15] ZHONG J, XIAO C, CHEN Q, et al. Zebrafish functional xenograft vasculature platform identifies PF-502 as a durable vasculature normalization drug [J]. iScience, 2023, 26 (9): 107734.
- [16] UFFENORDE J, HARIRI M, PAPALANIS E, et al. Enhancing glioblastoma therapy: unveiling synergistic anticancer effects of onalespib-radiotherapy combination therapy [J]. Front Oncol, 2025, 15: 1451156.
- [17] LI X Y, HUANG L T, WU J Q, et al. Zebrafish xenograft model of human lung cancer for evaluating osimertinib resistance [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3129748.
- [18] AL-HAMALY M A, COX A H, HANEY M G, et al. Zebrafish drug screening identifies Erlotinib as an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling and self-renewal in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 170: 116013.
- [19] PRIEBBENOW D L, LEAVER D J, NGUYEN N, et al. Discovery of acylsulfonohydrazide-derived inhibitors of the lysine acetyltransferase, KAT6A, as potent senescence-inducing anti-cancer agents [J]. J Med Chem, 2020, 63 (9): 4655–4684.
- [20] NISHIMURA M, FUCHINO H, TAKAYANAGI K, et al. Toxicity of jegosaponins A and B from *Styrax japonica* siebold et al. zuccarini in prostate cancer cells and zebrafish embryos resulting from increased membrane permeability [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6354.
- [21] YAO Y, SUN S, FEI F, et al. Screening in larval zebrafish reveals tissue-specific distribution of fifteen fluorescent compounds [J]. Dis Model Mech, 2017, 10(9): 1155–1164.
- [22] WERTMAN J N, MELONG N, STOYEK M R, et al. The identification of dual protective agents against cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity using the zebrafish model [J]. eLife, 2020, 9: e56235.
- [23] USAI A, DI FRANCO G, COLUCCI P, et al. A model of a zebrafish avatar for co-clinical trials [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(3): E677.
- [24] FIOR R, PÓVOA V, MENDES R V, et al. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(39): E8234–E8243.
- [25] TRAVNICKOVA J, MUISE S, WOJCIECHOWSKA S, et al. Fate mapping melanoma persister cells through regression and into recurrent disease in adult zebrafish [J]. Dis Model Mech, 2022, 15(9): dmm049566.
- [26] ABLAIN J, XU M, ROTHSCCHILD H, et al. Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma [J]. Science, 2018, 362 (6418): 1055–1060.
- [27] REBELO DE ALMEIDA C, MENDES R V, PEZZAROSSA A, et al. Zebrafish xenografts as a fast screening platform for bevacizumab cancer therapy [J]. Commun Biol, 2020, 3 (1): 299.
- [28] 李璘, 邱蓉丽, 魏凯峰, 等. 斑马鱼肿瘤模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(2): 165–168.
- LI L, QIU R L, WEI K F, et al. Advances in zebrafish models of tumor [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(2): 165–168.
- [29] DASH S N, PATNAIK L. Flight for fish in drug discovery: a review of zebrafish-based screening of molecules [J]. Biol Lett, 2023, 19(8): 20220541.
- [30] XIE J, FARAGE E, SUGIMOTO M, et al. A novel transgenic zebrafish model for blood-brain and blood-retinal barrier development [J]. BMC Dev Biol, 2010, 10: 76.

[收稿日期] 2024–12–03

孙宁,张琰,谢留威,等. 犬面部表情应用于评估情绪的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 567-580.

SUN N, ZHANG Y, XIE L W, et al. Research progress on facial expressions for assessing emotions in dogs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 567-580.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.011

犬面部表情应用于评估情绪的研究进展

孙宁¹, 张琰^{1,2}, 谢留威¹, 徐澍¹, 黄和³, 许现新^{1,4},
孙祎凡¹, 陶施帆^{3*}

(1. 中国刑事警察学院, 沈阳 110048; 2. 河南省郑州市公安局, 郑州 450000;
3. 沈阳医学院, 沈阳 110034; 4. 海南省临高县公安局, 海南 三沙 571800)

【摘要】 情绪状态是评估动物福利的核心要素。面部表情作为一种非侵入性方法, 越来越多地被用于评估动物情绪状态。犬 (*Canis familiaris*) 与人类关系密切, 面部表情对于种间交流和情感表达至关重要。本综述通过对犬面部表情的神经生物学机制、犬面部肌肉解剖结构以及演变历程、犬与人类面部表情的类比以及不同情绪下犬面部各部位的表情进行阐述, 表明犬面部表情是一种有潜力的动物福利指标, 犬可作为研究种间面部情绪交流的模型动物。犬面部表情应用于情绪的评估对神经科学、精神药理学、动物行为学和动物福利科学等多学科领域的研究具有重要价值。

【关键词】 面部表情; 犬; 情绪; 评估

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0567-14

Research progress on facial expressions for assessing emotions in dogs

SUN Ning¹, ZHANG Yan^{1,2}, XIE Liuwei¹, XU Shu¹, HUANG He³,
XU Xianxin^{1,4}, SUN Yifan¹, TAO Shifan^{3*}

(1. Criminal Investigation Police University of China, Shenyang 110048, China; 2. Zhengzhou Municipal Public Security Bureau of Henan Province, Zhengzhou 450000, China; 3. Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China; 4. Lingao County Public Security Bureau of Hainan Province, Sansha 571800, China)

Corresponding author: TAO Shifan. E-mail: syxyzqw@163.com

【Abstract】 Emotions are an integral part of animal welfare. Facial expressions are increasingly used as a non-invasive method for assessing the emotional state of animals. Dogs (*Canis familiaris*) are closely related to humans, and facial expressions are crucial for interspecies communication and emotional expression. This paper reviews the neurobiological mechanisms of facial expressions and the anatomical structure of the facial muscles and their evolution in dogs, the analogy between dog and human facial expressions, and the expression of various parts of the dog's face under different emotions. These studies demonstrate that dog's facial expressions can be used as a potential indicator

【基金项目】 中央高校基本科研业务费项目 (D2024005), 中国刑事警察学院研究生教学案例库建设项目 (YALK202407)。

Funded by Fundamental Research Funds for the Central Universities (D2024005), Criminal Investigation Police University of China Graduate Student Teaching Case Bank Construction Project (YALK202407).

【作者简介】 孙宁, 女, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 警犬技术及动物行为。Email: 1336794661@qq.com

【通信作者】 陶施帆, 女, 硕士, 助教, 研究方向: 计算机视觉技术。Email: syxyzqw@163.com

of animal welfare, and that dogs can be used as a model animal for studying interspecies facial emotional communication. The use of dog's facial expressions to assess emotions will aid multidisciplinary research, including in the fields of neuroscience, psychopharmacology, animal behavior, and animal welfare.

【Keywords】 facial expressions; dogs; emotions; assessment

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

准确识别动物福利状态在生物科学领域至关重要。国际公认的动物福利包括五个领域:营养、环境、健康、行为和情绪状态^[1]。其中,情绪状态是评估动物福利的核心要素^[2],与生理福利共同构成动物福利的两大维度。生理福利易于量化,而情绪福利则较难衡量^[3]。人类可以通过语言表达情绪^[4],但动物依靠行为与生理变化间接表达情绪状态^[5-6],行为(如活动、注意力、姿势和叫声)因其即时性和非侵入性,常被用作情绪标记^[5],但其单一指标难以全面反映动物的情绪状态^[7],且测量方法的可靠性仍有争议^[8]。由于动物情绪无法像人类语言那样直接评估,研究人员需要确定更可靠、有效的测量工具来推断动物的情绪状态。

面部表情可作为量化情绪状态的方法^[9]。在人类中,面部表情被广泛研究^[10],是情绪识别的可靠指标^[11]。人类面部表情和情绪状态之间的关联早已通过心理学的系统研究建立起来。心理学家 NELSON 等^[12]认为,人类的日常交流有 55% 的信息通过面部表情传递。研究表明,哺乳动物同样具有丰富的面部表情,如马(17 种)^[13],猫(15 种)^[14],犬(20 种)^[15-16],人类(21 种)^[17]。犬和马的面部活动区域相同(耳、鼻、眼睛和嘴唇),但犬的面部表情变化更广^[13,15-16]。面部表情作为动物的非语言手段,可以反映意图^[18]、社交信号^[19-20]及情绪状态^[21]。1872 年, DARWIN^[22]在他的开创性著作《人与动物的情绪表达》中,认为面部表情伴随着人类和非人类动物的情绪状态。自 DARWIN^[22]提出动物情绪表达理论以来,一些研究进一步证实犬的面部表情与特定情绪状态(如期待奖励、社交孤立或与主人团聚)有关^[23-26],并可根据人类的基本情绪分类法进行分类^[24]。WALLER 等^[26]研究犬对不同情绪刺激的面部表情,使用了诱发快乐(与主人一起玩耍)、积极预期(与食物、户外游戏相关)、沮丧(无法获得玩具、食物)和恐惧(经历雷暴)的

情绪刺激,研究发现犬对各种情绪刺激表现出特定的面部表情^[16]。神经科学研究进一步支持这一关联: KARL 等^[27]使用功能磁共振成像评估了 12 头犬对积极社交和非社交的中性刺激的反应,结果表明,犬在积极社交时,情感相关脑区(如左侧杏仁核、下丘脑和岛叶皮层等边缘区域)被激活,且与面部表情变化一致。情绪状态及其面部表情涉及外周神经、自主神经、内分泌和肌肉系统的协同作用,并依赖于杏仁核、下丘脑和脑干等核心脑区的调控^[28]。作为情绪的外在表征,面部表情整合了行为、声音等多重生理反应及其神经通路^[29],因而可作为评估犬情绪状态的一种简单、无创的指标。

迄今为止,犬面部表情与情绪状态的定量研究仍有限。识别犬的面部情绪指标是一项重大挑战,系统性分析在非灵长类动物中尤为缺乏。犬作为高度社会化的物种,与人类关系密切,其情绪理解对改善动物福利至关重要^[30]。基于犬和人类的特殊互动关系,有必要深入研究犬的面部表情在跨物种交流中的作用,以开发可靠的动物福利监测工具。

1 犬面部表情的神经生物学机制

由于动物无法通过语言表达情绪,因此了解情绪感知的神经机制尤为重要。面部表情的产生始于外界刺激激活中枢神经系统,主要涉及边缘系统(包括扣带回的腹侧和背侧区域、前额皮质、腹侧纹状体、丘脑背内侧核和杏仁核)的调控^[31]。杏仁核作为核心结构,不仅负责情绪处理和面部表情生成,还参与整合情绪记忆及多种感觉信息^[32]。边缘系统通过多种神经递质、神经肽和激素介导内部通讯,包括儿茶酚胺、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)、催产素(oxytocin, OXT)、5-羟色胺(serotonin, SE)和肾上腺素(adrenaline, A)等,这些神经化学物质既调控恐惧、焦虑和快乐等情

绪^[33],又直接支配面部肌肉的相应运动。

DA 系统与情绪调节密切相关。DA 信号主要通过大脑皮质结构(包括内侧前额叶皮质、前扣带回和嗅觉皮质)以及皮质下结构(如纹状体、杏仁核和海马)的相互作用,参与处理积极情绪和奖赏相关刺激。这些信号最终被整合到腹侧被盖区和伏隔核等关键脑区^[34],因此,DA 浓度的降低与慢性焦虑等消极情绪有关,而其升高则与引发积极情绪的事件(如运动和抚摸等能减轻犬压力的活动)有关^[35]。NA 和 SE 在情绪调节中也扮演重要角色。血浆中的 NA 和 SE 水平与放松状态有关,其中 SE 特别参与调节攻击性行为 and 面部表情的表达。研究发现,具有攻击倾向的动物前额叶皮层中的 SE 水平较低。OXT 则通过增强杏仁核与其他脑区(包括眶额皮层、扣带回和颞沟)的功能联系,抑制杏仁核对恐惧、愤怒等消极情绪及相应面部表情的激活^[36]。在不同物种中,基础 OXT 水平低下通常与消极情绪相关。

在积极情绪状态下,如当犬接触熟悉的人类或同伴时,杏仁核神经机制会促使 OXT、DA 和 SE 的水平升高,此时犬表现出典型的愉悦表情,包括张嘴、下巴放松和唇角上扬等类似微笑的动作。当面临威胁或消极刺激(如争夺领地)时,杏仁核神经机制会促使儿茶酚胺(包括 A 和 NA)的分泌,这些神经递质通过激活运动皮层及其传出纤维来改变面部表情,此时犬表现出耳朵外耷、内眉提升以扩大视野等恐惧表情。当感知到不利的外部刺激(如陌生人或动物)时,犬体内儿茶酚胺水平升高,同时 OXT、DA 和 SE 水平下降,这些神经递质触发杏仁核与运动皮层及面部神经的协同作用,此时犬表现为一系列的恐惧表情:耳朵压平、皱鼻、上唇提升、白色巩膜外露以及发声行为,以此作为威胁的信号。

以上面部表情的神经生物学机制表明,面部表情的产生主要是由于中枢神经系统通过边缘系统之间的联系对外界刺激进行调节,通过释放神经递质介导面部肌肉的运动变化。尽管以上的研究已表明激素等化学物质可介导面部肌肉的运动变化,但犬的面部表情究竟是反映真实情绪,还是对人类手势的社会交流策略,目前尚存争议。

2 犬的面部表情肌肉

面部表情是面部肌肉的运动,犬的面部解剖结构具有一系列肌肉,主要肌肉包括:颊肌(buccinator),犬齿肌(caninus),额肌(frontalis),眼内侧提肌(levator anguli oculi medialis, LAOM),上唇提肌(levator labii maxillaris, LLM),鼻唇提肌(levator nasolabialis, LN),颏肌(mentalis),眼轮匝肌(orbicularis oculi, OOc),口轮匝肌(orbicularis oris, OOr),颈阔肌(platysma),眼外侧牵拉肌(retractor anguli oculi lateralis, RAOL),颧肌(zygomaticus)等。

犬的面部肌肉可以产生特定运动,比如,额肌、眼外侧牵拉肌、眼内侧提肌和眼轮匝肌可实现提眉和闭眼等动作^[37];二腹肌后腹、颊肌、口轮匝肌、颧肌、颏肌、犬齿肌、上唇提肌和鼻唇提肌可将下巴提升、张开犬嘴、加深鼻唇沟或嘴部伸展^[38]。当情绪状态变化时,引发面部的相应系列肌肉运动,比如,当疼痛或恐惧等消极刺激时,由鼻唇提肌、上唇提肌和犬齿肌收缩引发上唇抬起而产生皱鼻,或是由下耳内收肌、额锯肌和眼外侧牵开肌引发耳朵变平^[38]。

3 犬面部肌肉解剖结构的演变

犬在 33 000 多年前被驯化^[39],在驯化过程中,选择性压力通常会经由环境因素或人为选择对物种的遗传特征施加压力,致使驯化物种的形态、行为、生理等性状出现显著性差异^[16]。选择性压力塑造了犬的解剖结构和行为,使其成为人类最好的朋友。研究证明,与狼相比,犬已经进化出特殊的面部肌肉,能够通过面部表情表达情绪与情感^[26,40]。

KAMINSKI 等^[40]比较了犬与其现存近亲灰狼(*Canis lupus*)的面部解剖结构,发现两者仅在眼部周围的肌肉组织存在差异。其中,犬的 LAOM 特别发达,该肌肉收缩时能够显著提升内眉。相比之下,灰狼的 LAOM 仅含有少量肌肉纤维且被大量结缔组织包围,导致其提升内眉能力受限。这种解剖学差异带来了行为表现的不同:犬提升内眉的动作幅度较大,这一动作会增加眼眶的高度,使眼睛显得更大、更可爱,类似于人类悲伤时的面部表情,更易引发人类的关爱^[26]。

KAMINSKI 等^[40]站在犬舍前,观察了犬和灰狼的内眉上提动作,与狼相比,犬的内眉上提更频繁、幅度更大,做这种提眉动作较多的犬很快被人领养,表明内眉上扬的特征给犬带来选择性优势。这一研究结果表明,犬发达的 LAOM 是犬为适应与人类交流而进化的结果。

狼和犬面部肌肉还有一个差异是 RAOL。RAOL 的功能是将眼睑外侧角拉向耳朵,狼的 RAOL 比犬更为纤细,由稀疏的肌纤维束组成。所有品种的犬都有 RAOL,西伯利亚哈士奇犬(Siberian Husky)除外,哈士奇属于古老的犬种,与狼的亲缘关系比其他犬种更为密切^[41],哈士奇的眼部几乎没有表情。

LAOM 和 RAOL 这两块肌肉与人犬的跨物种交流有关。犬与人的相互凝视是犬在驯化而得,对于人犬互动至关重要^[42]。犬(而不是狼)在无法独立解决问题时会与人类目光接触^[43]。因此,相互凝视是人类文明进程中人与犬独特关系的标志,这种人与犬的交流特征,导致犬和狼之间眼部肌肉的解剖学差异,这种差异是驯化选择还是数百年来人类后天训练的结果,仍待研究。

4 犬与人类面部表情的类比

自 DARWIN^[22]研究以来,人们一直在研究跨物种面部情绪表达的共性,其中大部分研究主要集中在与人类关系密切的灵长类物种上。目前还不清楚在系统发育上相距甚远却与人类情感交流密切的物种(如犬)是否具有类似的面部表情。犬与人类共同生活了 15 000 ~ 30 000 年,人类环境可被视为该物种的自然生态位^[44]。鉴于犬和人类独特的种间关系,犬为面部情绪表达的研究提供了一个独特的非灵长类动物模型。

人类面部表情的主要作用是传达复杂的情绪信息。POWELL 等^[45]的研究指出,人类面部表情的丰富性与头颈部肌肉数量的增加有关,这种进化特征支持了人类在思维活动、情感表达和语言交流等方面的特殊能力。然而 POWELL 等^[45]也强调,人类在整体形态上并不比其他灵长类动物更复杂,事实上大多数哺乳动物都具有与人类相似的面部肌肉组织^[46]。这种跨物种在情绪表达形式和功能上的相似性,表明了它们可能拥有共同的进化根源^[46]。WALLER 等^[46]揭示了不同

物种之间存在的系统发育相似性。研究显示,包括黑猩猩、长臂猿、马、犬和猫在内的多个物种,其面部肌肉中至少有 47% 具有共同的肌肉基础。这一发现表明,尽管犬和人类在系统发育上属于远缘类群,但二者具有同源的面部解剖结构。另外,犬在驯化过程将自己融入了人类的生活方式,产生了行为和解剖学上的适应性改变(如进化出类似孩童的面部表情^[26]),实现了与人类的面部交流,体现出趋同进化。鉴于哺乳动物面部肌肉组织的共同起源、相似的情绪反应机制以及长期密切联系,犬与人类具有共同的面部表情相关性(即相同的情绪与相同的核心面部肌肉运动密切相关),因此,可以参照人类的面部表情来解析犬的面部表情含义。

CAEIRO 等^[16]比较了人类和犬对不同情绪刺激的面部表情。研究发现,虽然人类和犬在基础面部肌肉构成上高度相似,但其具体面部运动并不完全对应。CAEIRO 等^[16]发现人类与犬的面部同源性可能仅存在于肌肉组织结构层面,而在功能表达上存在显著区别。灵长类动物之间(包括人类)的面部表情有更大的相似性^[47],它们不仅在肌肉层面,而且在表情表达上都表现出连续性。相比之下,犬的面部表情则展现出独特的物种特异性,犬和人类面部肌肉组织表达情感方式显然不同。这种差异可能源于多方面因素:首先,犬的面部特征(如缺乏局部脂肪沉积)限制了其肌肉运动方式;其次,犬缺失人类特有的面部肌肉,使其无法完成特定表情动作。例如,人类的杜兴式微笑(Duchenne smile)需要眼轮匝肌产生面颊上提^[48],这一动作在犬身上从未观察到。同样,人类恐惧表情的关键特征——上眼睑提升和嘴唇拉伸动作(即眼睛睁大,嘴唇向侧下方伸展),犬缺乏产生上眼睑提升动作的上睑提肌或产生嘴唇拉伸的笑肌,于是不能产生同样的面部表情。在表达悲伤情绪时,人类依靠颧小肌产生鼻唇沟加深的表情,而犬缺乏颧小肌,通过产生喘气、舔鼻唇等替代性动作来表达类似情绪。相较于人类将多个面部动作整合为完整的表情模式,犬对特定情绪刺激往往表现出更为单一和特异的反应动作。表 1 汇总了人类和犬在面部表情动作及相关肌肉的异同,为理解两者面部表情的共性和差异提供了重要参考。

表 1 人类和犬的面部表情动作和面部肌肉的比较

Table 1 Comparison of action units and the facial muscles in humans and dogs

面部动作 Facial action		面部肌肉 Facial musculature	
人类 Humans	犬 Dogs	人类 Humans	犬 Dogs
内眉提升 Inner brow raise	内眉提升 Inner brow raise	额肌(内侧) Frontalis (medial)	额肌存在但无法提升眉毛区域。眼 内侧提肌可提升眉毛内侧区域 Frontalis is present but it does not seem to raise the brow region. LAOM raises the inner brow region
外眉提升 Outer brow raise	未观察到 Not observed	额肌(外侧) Frontalis (lateral)	
眉毛降低 Brow lowere	未观察到 Not observed	降眉肌、皱眉肌、降眉肌 Procerus, corrugator supercilii, depressor supercilii	不存在 Not present
上眼睑提升 Upper lid raise	未观察到 Not observed	上睑提肌 Levator palpebrae superioris	未描述 Not described
面颊提升 Cheek raise	仅观察到闭眼眨眼 Observed only with eye closure and blink	眼轮匝肌 Orbicularis oculi	存在 Present
眼睑收紧 Lid tighten	未观察到 Not observed		
闭眼 Eye closure	闭眼 Eye closure	上睑提肌松弛 Relaxation of levator palpebraesuperioris	眼轮匝肌 Orbicularis oculi
眨眼 Blink	眨眼 Blink		
鼻部隆起(皱鼻) Nose wrinkle (nasal scrunch)	鼻部隆起和上唇提 升共同作用-鼻部隆 起不单独出现	鼻唇提肌 Levator labii superioris	鼻唇提肌、犬齿肌、上唇提肌 Levator nasolabialis, caninus, levator labii maxillaris
上唇提升 Upperlip raise	Nose wrinkle and upperlip raise-nose wrinkler hard to code independently	上唇提肌 Levator labii superioris	
鼻唇沟加深 Nasiolabial furrow deepen	未观察到 Not observed	颧小肌 Zygomaticus minor	不存在 Not present
唇角上扬(微笑) Lip corner pull (smiles)	唇角上扬 Lip corner pull	颧大肌 Zygomaticus major	颧肌 Zygomaticus
唇尖牵拉 Sharp lip pull	未观察到 Not observed	犬齿肌 Caninus	-
薄唇 Dimple	未观察到 Not observed	颊肌 Buccinator	-
唇角压低 Lip corner depress	未观察到 Not observed	降口角肌 Depressor anguli oris	不存在 Not present
下唇压低 Lower lip depress	下唇压低 Lower lip depress	下唇降肌 Depressor labii inferioris	颈阔肌 Platysma
下巴提升 Chin raise	未观察到 Not observed	颏肌 Mentalis	-
噘嘴 Lip pucker up	噘嘴 Lip pucker up	上、下唇裂肌和口轮匝肌 Incisivii labii (superioris andinferioris), orbicularis oris	仅存在口轮匝肌 Only orbicularis oris present
嘴唇拉伸 Lip stretch	未观察到 Not observed	笑肌 Risorius	不存在 Not present
嘴唇漏斗(将嘴唇向 外推,像说“吹”) Lip funnel(Push your lips outward, like saying “blow”)	未观察到 Not observed	口轮匝肌 Orbicularis oris	-

续表 1

面部动作 Facial action		面部肌肉 Facial musculature	
人类 Humans	犬 Dogs	人类 Humans	犬 Dogs
嘴唇收紧 Lip tighten	未观察到 Not observed	颈阔肌 Platysma	—
嘴唇加压 Lip press	未观察到 Not observed	口轮匝肌 Orbicularis oris	—
张嘴 Lips part	张嘴 Lips part	口轮匝肌、下唇降肌、 上唇提肌 Orbicularis oris, depressor labiiinferioris, levator labii superioris	口轮匝肌、犬齿肌、上唇 提肌、鼻唇提肌、颈阔肌 Orbicularis oris, caninus, levator labii maxillaris, levator nasolabialis, platysma
下巴下垂 Jaw drop	下巴下垂 Jaw drop	非表情肌;咬肌、颞肌、翼状肌和二腹肌 Non-mimetic muscles: masseter, temporalis, pterygoid and digastricus	
嘴部伸展 Mouth stretch	嘴部伸展 Mouth stretch		
抿嘴 Lips towards each other	未观察到 Not observed	口轮匝肌 Orbicularis oris	—
颈部收紧 Neck tighten	未观察到 Not observed	颈阔肌 Platysma	—
鼻孔扩张 Nostrils dilate	嗅闻期间观察到 Observed during sniff	鼻肌 Nasalis	上唇提肌 Levator labii maxillaris
鼻孔收缩 Nostril compress			

5 不同情绪下犬面部各部位的表情

按照面部从上至下顺序,从眉部、眼部、鼻部、颊部、口、下颌部以及耳部依次阐述犬不同情绪下的面部表情。由于耳朵的位置变化同样是由面部肌肉控制,因此耳朵的运动也被归类为面部表情。

5.1 眉部

5.1.1 内眉上提(inner brow raise)

人类在惊讶和恐惧等消极情绪状态下会出现眉毛上提的现象^[49]。在灵长类动物、马和犬等物种也有类似表现^[13,26,50]。尽管犬并不具备眉毛(眉毛是人类独有的解剖特征),但其眼睛上方有一条独特的脊状结构,内眼角上方有一个柔软的突起(由真皮层增厚形成),这一区域具有活动性,且在不同品种中呈现不同颜色。从解剖学角度看,“提眉”动作主要指内侧眉毛的上提。犬的这一动作由 LAOM 完成,而人类则由额肌控制,部分灵长类动物(如黑猩猩^[51])也类似。犬的内眉上提动作比较频繁和夸张^[40],人类可以直接观察到这一行为。

当犬内眉上提时,眼内侧提肌收缩会将内眼角上方的突起向背侧牵拉,表现为眼部上方的突起向中线倾斜移动,同时扩大眼眶区域。这种现象具有重要的进化意义;较大的眼睛比例是许多哺乳动物幼崽的特征,而眉毛上提常被视为悲伤的表达^[52],这些特征能引发人类的关爱反应^[53]。然而,关于这一行为的功能存在不同观点。BREMHORST 等^[54]研究发现,犬的内眉上提可能并非情绪表达,而是一种交流行为。他们的实验显示,人类是否存在(分别为社交和非社交环境)显著影响犬的内眉上提频率,在非社交情境下该行为出现更频率($P < 0.000\ 01$, $F = 24.62$),表明犬的面部表情受到人类关注度的影响。但更多研究表明,犬的内眉上提确实与特定情绪有关。BLOOM 等^[24]观察到,犬在惊讶时会轻微提眉并倾斜头部。特别是在疼痛状态下,犬会持续上扬内眉^[55],这与人类疼痛时眉毛下垂的典型表现形成鲜明对比^[56]。目前,包括动态交互式视觉模拟量表在内的多个犬疼痛评估系统(如墨尔本大学和科罗拉多大学开发的疼痛评估量表)都将内眉上提与耳朵、眼睛的动作共同作为重要指

标,用于评估从 0 级(无痛)到 4 级(剧痛)的疼痛程度^[57]。

综合来看,犬在面对威胁、消极刺激、兴奋以及疼痛时,都会出现不同程度的内眉上提动作。因此,内眉位置的变化成为评估犬面部表情的关键指标^[55]。

5.2 眼部

5.2.1 眼睛睁大

犬的内眉上提会增大眼眶区域,但并不会增加眼睑开度(即不会使眼睛睁大)^[21]。眼睑开度的调节是情绪表达的重要部分,在人类和其他动物中,眼睛睁大和白色巩膜外露通常与消极情绪相关^[58]。在大多数哺乳动物中,眼睑开度主要由上睑提肌控制。人类在恐惧、愤怒和惊讶时,眼睑开度会增大^[58],这有助于扩大视野范围,提高警惕性^[59]。然而,根据 EVANS 等^[60]的《Miller's Anatomy of the Dog》,犬并不具备上睑提肌。因此,当犬因恐惧或压力而睁大眼睛时,实际是由于内侧提眉肌收缩及眼球运动,导致白色巩膜外露,使眼睛看起来更大^[26,38]。

5.2.2 白色巩膜外露

白色巩膜外露是由眼球在眼窝内的运动引起的(犬的眼内侧提肌嵌入眼球突出部,可控制眼球运动),而非眼睑开度的变化^[13]。犬的巩膜虽为白色,但通常不可见,只有在特定情况下(如恐惧时)才会显露。由于这一体征非常明显, BURZA 等^[61]认为恐惧是犬最易识别的情绪,仅通过眼部表现即可判断。白色巩膜外露有时也被称为“鲸鱼眼”(whale eye)^[21]。这一术语源于鲸鱼通过转动眼球(而非移动头部)观察人类习性。类似地,英语中的“side-eye”描述人类从眼角斜视而不转动头部的行为,此时白色巩膜暴露更多,通常暗示恐惧或不信任^[62]。神经影像学研究表明,人脑的杏仁核会对白色巩膜外露的表情产生反应^[63],且这种恐惧信号可在种内和种间传递^[64]。从进化角度看,人类识别犬的恐惧情绪是一种有利的社会学习策略^[59],有助于警惕潜在威胁。此外,白色巩膜外露常伴随眉毛运动,当犬向上看时,内眉会上提,呈现出“萌态”表情。

5.2.3 眯眼

与眼睛睁大相反,眯眼(缩小眼睑开度)在某些情况下与消极情绪有关。例如,小鼠(*Mus*

musculus) 在激烈的社交环境中会眯眼,以保护脸部敏感部位免受攻击^[65]。这一现象在入侵小鼠和常驻小鼠的对抗中得到验证:常驻小鼠的面部被咬伤,而入侵小鼠(不表现眯眼)则更多遭受背部攻击^[66]。在人类中,眯眼通常与愤怒有关,表示一种威胁信号^[21]。然而,犬科动物和灵长类动物的威胁信号更多表现为直勾勾地凝视^[67]。有趣的是,眯眼也与积极情绪有关,例如人类、猫和犬在玩耍或放松时也会眯眼^[67-68]。人类在积极和消极情绪下的眯眼存在差异^[69],积极情绪(如快乐)时,眼眶下区域抬高,眼睑自然松弛或收缩;消极情绪(如愤怒)时,眉毛下垂,眼睑紧绷。目前,这种差异是否适用于非人类动物仍有待研究。

5.2.4 闭眼和眨眼

在灵长类动物中,闭眼和眨眼由上睑提肌松弛引发^[21]。然而,犬类的眼部结构和运动机制与灵长类存在显著差异。犬具有 3 个眼睑:上眼睑、下眼睑以及位于内眼角的第三眼睑;犬的上眼睑缺乏灵长类动物特有的睫状弓(superciliary arch)和上睑褶(epicanthal fold);资料证实犬并不具备上睑提肌^[60]。这些解剖学上的差异导致犬的闭眼和眨眼动作依赖眼轮匝肌及上、下眼睑的协同运动来完成。研究发现,犬的眨眼频率与情绪状态密切相关。消极状态下(如恐惧、压力)眨眼频率增加^[15,70-72]。MILLS^[71]观察到犬在焰火之夜表现出更高的眨眼率(尽管未达显著性差异),这可能与惊吓反射有关^[73],类似地,人类在压力或焦虑时也会增加眨眼^[74]。此外, BREMHORST 等^[15]发现,挫折情境同样会提高犬的眨眼频率,表明眨眼次数可能反映犬广义的压力反映,而非特定情绪。然而, PEDRETTI 等^[75]的研究显示,实验人员的注视(即使非威胁性)也会导致犬眨眼次数增多,犬可能将这种注视视为轻微威胁,从而表现出减少目光接触、增加闭眼和眨眼的行为。除情绪表达外,眨眼在犬类行为中还可能具有其他功能。有观点认为眨眼可能是犬在冲突情境下表现出的安抚姿态^[76],但目前尚缺乏充分的实证证据支持这一假设。同时需要强调的是,作为哺乳动物的正常生理行为,眨眼在维持眼部湿润方面具有重要作用^[71],因此在情绪判断时需要将其与情绪性眨眼加以区分。

综上所述,犬眼部区域的动作较为丰富,眼睛睁大、白色巩膜外露、闭眼和眨眼通常与犬的消极情绪相关,而眯眼可能反映犬的积极情绪。由于眼部区域动作具有较高的可观测性和反应灵敏度,使其成为评估犬类情绪状态的可靠指标。

5.3 鼻部

5.3.1 皱鼻

人类皱鼻常用于表达厌恶情绪^[21],由鼻唇提肌收缩引发,导致鼻背侧形成皱纹。该动作可与上唇提肌引发的上唇抬高独立发生,这一特征在黑猩猩等灵长类动物中同样存在。犬的皱鼻行为多表达愤怒或威胁等消极情绪,常见于咆哮时,伴随龇牙动作,表现为鼻部和上唇同时向背侧移动,与猕猴的表现相似^[49]。犬的皱鼻和上唇抬高通常协同发生,由鼻唇提肌、犬齿肌、上唇提肌共同完成。其中鼻唇提肌和深层的犬齿肌负责上唇抬高,前者还能将上唇和鼻子向更眉间斜向牵拉。犬齿肌和上唇提肌沿口角水平分布,紧密相连附着于鼻唇部,收缩时共同将鼻部和上唇内侧向背尾侧牵拉。另外,上唇提肌在犬嗅闻时也会激活,通过抬高上唇增强鼻部运动幅度。

5.4 颊部

人类颧小肌收缩会加深鼻唇沟,表达悲伤情绪^[21],但犬缺乏该肌肉。在积极情绪表达上,人类特有的杜兴式微笑(发自内心的微笑)由眼轮匝肌收缩引发脸颊上扬,区别于非杜兴式微笑(应酬式的微笑)^[49]。目前尚未在犬等动物中发现类似的表情机制。

5.5 口、下颌部

犬在表达情感状态、进行社会交流以及移位行为时,经常会有口腔和下颌运动。常见行为包括:

5.5.1 移位行为

许多动物(包括人类)的移位行为表现为口腔动作^[77]。移位行为是动物在冲突或受挫时表现出的与当前动机无关的行为模式,作为一种应对应激源的平衡策略^[77]。

犬常见的移位行包括舔唇鼻、打哈欠、抓挠、伸展、自我梳理、嗅闻环境和视线转移^[78]。这些明显的行为表现被认为具有交流功能,在犬种内以及人犬互动中起到安抚信号的作用,能有效降低犬攻击行为发生率^[79-80]。然而,这些行为究竟

是由于社交伙伴(犬或人)的存在引发,还是由于实验情境导致,仍需要进一步确定。

5.5.2 唇角上扬

灵长类动物具有颧大肌和颧小肌,其中颧大肌通过将唇角斜向颊骨方向牵拉产生微笑表情。犬仅具有 1 块颧肌,其收缩会使唇角向耳部方向后拉,类似微笑。

在情绪表达上,人类通过颧大肌引发的唇角上扬动作来表现快乐情绪,包括放松的面部表情、大笑和微笑^[81],类似的表情也出现在黑猩猩等灵长类中,可分为两类:不露上牙的唇角上扬游戏表情,以及露出上牙的呲牙表情^[82]。值得注意的是,这种游戏表情在犬科动物如金豺(*Canis aureus*)和灰狼中也有发现,其特征表现为唇角上扬、下巴放松和不同程度的上牙暴露^[22,67]。而呲牙表情通常发生在犬攻击时,并伴随皱鼻、身体紧张等肢体信号,综合考虑就能将两种表情区分开来^[21]。BREMHORST 等^[70]的研究揭示了犬嘴唇上扬表情的特殊性。在消极条件下,犬对玩具奖励的期待会引发比食物奖励更频繁的上扬嘴唇动作,表明这一表情具有特定的情境相关性,可能反映与玩具相关的特定动机。值得注意的是,在研究的各种面部表情中(包括耳朵内收、耳朵变平、耳朵向下、眨眼、嘴唇分开、下巴下垂、露出舌头、舔鼻子和拉嘴角等),只有嘴唇上扬表现出与奖励类型的相关性。这一发现提示,嘴唇上扬可能反映特定动机而非普遍情绪状态,因此,不适合作为评估犬情绪状态的可靠指标。

5.5.3 下巴下垂

下巴下垂是指下颌放松导致嘴巴微微张开的动作。该动作主要由咬肌、颞肌、翼状肌和二腹肌等非表情肌控制,常发生于犬喘气时。对于沙皮犬(Shar-Pei)等具有下垂嘴唇和皮肤皱褶的品种,这一动作很难辨别^[26]。研究表明,犬的喘气行为与恐惧反应存在关联。GÄHWILER 等^[72]发现,犬对烟花的恐惧会显著增加喘气行为,而烟花噪音正是犬最常见的恐惧源^[83]。虽然喘气的主要功能是调节体温,但也被认为是短期压力、恐惧或焦虑的指标^[84]。这种关联可能源于应激反应导致核心体温升高^[85],类似现象在小鼠等其他哺乳动物也有报道^[86]。尽管恐惧刺激通常会增加喘气频率^[84],但也有研究发现 6 个月以下

的幼犬在恐惧刺激下喘气减少,而与主人分离的犬在团聚时则表现出喘气增加^[87]。这表明喘气可能反映积极或消极情绪,需结合具体情境和其他行为指标进行综合判断。

5.5.4 嘴部伸展

嘴部伸展表现为下颌主动向下运动,暴露出下牙、舌头及口腔。与下巴下垂相比,其张口幅度更大且下颌活动更明显。该动作同样由咬肌、颞肌、翼状肌和二腹肌等非表情肌控制,常见于犬打哈欠(Yawning)时。在灵长类动物中,哈欠常出现在焦虑或冲突情境中,例如,黑冠猴(*Macaca nigra*)、猕猴(*Macaca mulatta*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)。这一现象也见于其他物种,包括非哺乳动物,如鸵鸟(*Struthio camelus*)^[21]。JOLY-MASCHERONI 等^[88]提出,犬的哈欠可能是由压力反应的表现,轻度压力环境可能诱发“紧张性哈欠”。虽然这种哈欠与困倦性哈欠相似,但常伴随其他应激行为,如喘气、颤抖、身体抖动、舔嘴唇或呜咽^[89],可作为鉴别依据。

5.5.5 舔鼻子和舔嘴唇

犬常表现出用舌头快速擦拭鼻子或嘴唇的行为,这一现象在灵长类动物中尚未发现。具体而言,舔唇是指舌头沿上唇外侧从中线向嘴角移动的动作,而舔鼻则是舌头伸出擦拭鼻子的行为,这些行为通常被视为犬的安抚信号^[78],用来表达和平意图。在犬种内交流、狼群社交互动以及人类互动中都能观察到这种行为^[21,30,79],它们往往传递着友好或顺从的信号^[30]。早期研究认为舔唇/舔鼻与犬的急性应激反应相关^[90],但后续研究提出不同见解。GÄHWILER 等^[72]研究发现,即使是烟花这类强恐惧刺激也不会增加犬舔嘴唇或打哈欠的频率。同样,FRANZINI 等^[91]也观察到雷雨声并不会导致犬舔嘴唇和打哈欠行为增多。可见,社交性刺激情境下,舔嘴唇和打哈欠并不能有效评估犬的恐惧程度,它们可能更多地在社交交流中发挥作用。

先前研究已提出,犬舔唇/舔鼻频率的增加可以反映社会环境中的急性压力^[90]。压力和情绪经常单独提及^[92],但也密切相关。LAZARUS^[92]提出有压力就有情绪,压力被定义为情绪状态的子集^[92],通常在面对厌恶性情境时产生消极情绪状态^[93]。所以,舔唇/舔鼻被视为

是压力指标之一^[90]。研究发现,在挫折情境(如无法获得食物奖励)下,犬舔唇/舔鼻的频率增加^[15,78]。FIRNKES 等^[30]进一步发现,轻微社会威胁会增加舔嘴唇行为,而严重威胁时这种行为反而减少,犬会转而表现出屈服或逃跑行为。这表明,舔唇行为在犬类社交交流中具有重要作用。此外,住院犬的舔鼻行为与唾液皮质醇水平呈正相关^[94],但与尿皮质醇/肌酐比率呈负相关。而 PEDRETTI 等^[75]的研究则未发现皮质醇浓度与舔鼻行为的关联,提示社交伙伴的存在可能是引发该行为的关键因素。

另一方面,部分研究显示舔唇/舔鼻可能与积极情绪相关。犬在与主人互动或重逢时会出现这种行为^[87]。CAEIRO 等^[16]发现积极情绪下,犬会表现出舔唇/舔鼻并伴随“耳朵内收”,而 BREMHORST 等^[15]的研究显示舔鼻在消极条件下更常见。这种差异可能源于研究背景的不同。ALBUQUERQUE 等^[95]的研究特别指出,与积极视觉刺激(人类和犬的快乐表情)相比,犬在面对消极视觉刺激(人类和犬的愤怒表情)时舔唇频率更高,且对人类愤怒表情的反应比对同类愤怒表情更强烈,这表明犬可能具备识别人类愤怒表情的能力。

5.6 耳部

犬具有丰富的表型多样性,不同品种的耳朵形态差异明显。野生犬科动物及部分品种的成年犬保持立耳(erect ears)特征,这种耳朵活动性强,能传递丰富的交流信息。而垂耳(floppy ears)则是驯化物种(包括犬、牛、山羊和兔子等)的典型特征^[96]。立耳的位置变化比垂耳更易观察,但某些品种的长毛覆盖或传统剪耳习俗会增加耳朵动作识别的难度,例如杜伯文犬(Dobermann)。

5.6.1 犬耳朵的动作状态

灵长类动物(猕猴除外)的耳部肌肉不发达,但犬拥有发达的耳部肌肉,其解剖结构复杂,在有限空间内分布多组肌肉,使得精确识别每个动作的肌肉来源具有难度。犬的耳朵活动极为频繁和多样,主要包括:

(1)耳朵向前:表现为耳廓转向正前方。立耳犬的耳廓呈现为坚挺、紧张,半折耳犬的耳廓可见明显前转和上翘,而垂耳犬的这一动作较难识别。

(2) 耳朵内收: 表现为耳朵向头部中线靠拢, 耳根间距缩小。

(3) 耳朵压平: 表现为耳朵向尾部方向拉伸并紧贴头部。立耳犬的耳廓塌陷成扁平状, 半折耳犬的耳廓被拉向尾部, 从犬的正面观察时耳朵会从视线中消失。

(4) 耳朵旋转: 表现为耳廓向外侧旋转, 这一现象仅见于直立耳犬种^[26], 垂耳犬(如拉布拉多犬)未观察到。

(5) 耳朵外耷: 表现为耳朵向腹侧和外侧下垂, 而不是尾侧。HANDELMAN^[97]描述其为“飞机耳”状态。这是耳朵内收的反向动作, 耳根间距增大。立耳犬的耳廓通常转向腹侧, 从犬正面观察时耳朵仍可见。

5.6.2 不同情绪下犬耳朵的动作状态

与其他耳朵灵活的动物(如小鼠、猫、牛)类似, 犬的耳朵位置是其社会交流和情绪状态的重要指标^[21]。研究表明, 犬和狐狸(*Vulpes vulpes*)等犬科动物在焦虑或恐惧时会降低耳朵位置^[90]。“耳朵压平”被广泛认为与多种动物的消极情绪有关(如小鼠、绵羊、山羊、猪、马、猫)^[21, 98], 在郊狼、狐狸和狼等犬科动物中也常见于受惊情境^[67]。虽然传统上将其解释为屈服、顺从^[72]或恐惧的表现^[21], 但科学验证这一关联的研究仍显不足。BEERDA 等^[90]的经典实验证实, 在威胁性刺激下, “耳朵压平”伴随姿势蹲伏和尾巴下垂构成犬的恐惧表现。BREMHORST 等^[15]进一步发现, 该动作不仅反映恐惧, 也出现在挫折情境, 且出现频率更高, 提示“耳朵压平”可能是广泛的消极情绪指标, 而不仅仅是反映某一种具体的离散情绪(即恐惧或沮丧)。未来研究需要针对不同消极情境, 从持续时间、频率、动作转换等维度深入分析“耳朵压平”的具体特征, 以区分其反映的特定消极状态。

在积极情绪方面, BREMHORST 等^[15]和 CAEIRO 等^[16]的研究一致表明“耳朵内收”是可靠的积极情绪指标, 这一现象在放松状态下的猫身上也有所体现^[99]。PEDRETTI 等^[75]则发现“耳朵向前”与积极情绪相关, 反映犬对任务的专注程度。早期研究认为这一动作与注意力、警觉性和自信心有关^[22, 97], 而注意力增强正是积极预期的主要特征^[100]。PEDRETTI 等^[75]还发现“耳

朵向前”与唾液皮质醇浓度呈负相关, 进一步支持其作为积极情绪指标的有效性。不过需注意, 高度警惕的犬在潜在恐惧情境下也可能会“耳朵向前”, GÄHWILER 等^[72]提出此时可通过观察耳根是否后转来辅助判断犬的情绪状态。为了更好地了解犬耳的表情功能, 仍需对耳朵位置、动作细节及相关情境开展更深入的研究。

6 局限性与展望

本研究通过系统分析犬面部表情的神经生物学机制、犬面部肌肉解剖结构以及演化历程, 探讨了犬与人类面部表情的相似性, 并详细阐述了不同情绪下犬面部各部位的表情特征。研究表明犬的面部表情确实能够反映其情绪状态, 且与情绪密切相关, 这使犬成为研究种间面部情绪交流的理想模型动物。虽然面部表情具有作为动物福利评估指标的潜力, 但由于驯化过程的影响、人与犬的密切关系以及犬表型的高度多样性, 对犬面部表情进行客观评估仍面临诸多挑战。

6.1 解剖学差异

犬不同品种之间的解剖学差异(如头部形态、毛色、耳朵形状等)是面部表情识别面临的首要挑战。全世界 400 多个犬品种^[101]在头部和面部特征上表现出极大的形态差异^[102]。从头部长度来看, 不同品种的犬, 其头部长度范围为 7 ~ 28 cm^[103], 其中短头型(brachycephalic)和中头型(mesocephalic)的头部明显短于长头型(dolichocephalic)^[60]品种, 这种解剖差异直接影响面部肌肉的发育空间; 短头和中头犬种的口鼻部、嘴唇和鼻部肌肉因空间受限, 导致其面部结构较为紧凑^[104], 限制了面部表情的表达能力。皮毛的颜色也影响面部表情的评估^[105], 黑色皮毛会干扰对某些肌肉群收缩的观察, 如眶上(supraorbital)和眶下(infraorbital)。而沙皮犬等面部皱褶明显的品种也难以准确识别面部肌肉运动。一些古老犬种, 如哈士奇犬、阿拉斯加雪橇犬(Alaskan Malamute)中, 某些特定面部肌肉的缺失可能导致对恐惧、痛苦等消极情绪的误判^[14]。现有研究多采用拉布拉多犬(Labrador Retriever)等形态中等的犬种作为研究对象, 其研究结论的普适性有待验证, 未来需纳入更多不同形态特征的犬种进行研究。

6.2 情绪表达的多模态特征

犬情绪识别的复杂性还源于其情绪表达的多模态特征。犬具有丰富的行为表现(例如,发声、身体姿势和嗅觉行为等),而且相似的行为可能出现在不同情境中,且个体对情绪刺激的反应存在差异。这种复杂性提示,未来的研究在比较不同品种和形态的犬时,需要整合发声特征、肢体行为、嗅觉信号等多种行为指标,并结合心率、皮质醇等生理参数,以建立更准确的面部表情情绪识别系统。

综上所述,虽然面部表情作为动物福利评估指标具有重要潜力,但要将现有研究成果推广到所有犬种和其他情绪环境仍需更多证据支持。开发基于计算机视觉技术的犬面部表情深度学习工具,将成为评估犬面部表情与情绪、福祉关系的有效途径,也为临床应用提供了新的技术手段。

参 考 文 献(References)

- [1] LECORPS B, WEARY D. Animal affect, welfare and the Bayesian brain [J]. Anim Welf, 2024, 33: e39.
- [2] BROOKS H, DAVIDSON M, MENDL M, et al. Examining personality dimensions in rats using a caregiver questionnaire [J]. Appl Anim Behav Sci, 2024, 271: 106170.
- [3] FRAGOSO A A H, CAPILÉ K, TACONELI C A, et al. Animal welfare science: why and for whom? [J]. Animals (Basel), 2023, 13(11): 1833.
- [4] CÁCERES-MATOS R, CASTILLO-GARCÍA M, MAGNI E, et al. Effectiveness of virtual reality for managing pain, fear, and anxiety in children and adolescents undergoing needle-related procedures: systematic review with meta-analysis [J]. Nurs Rep, 2024, 14(3): 2456–2484.
- [5] SCHILLER D, YU A N C, ALIA-KLEIN N, et al. The human affectome [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2024, 158: 105450.
- [6] HALL C, KAY R. Living the good life? A systematic review of behavioural signs of affective state in the domestic horse (*Equus caballus*) and factors relating to quality of life. Part 2: Horse-human interactions [J]. Anim Welf, 2024, 33: e41.
- [7] WAGNER B, TORO J M, MAYAYO F, et al. Do rats (*Rattus norvegicus*) perceive octave equivalence, a critical human cross-cultural aspect of pitch perception? [J]. R Soc Open Sci, 2024, 11(5): 221181.
- [8] WALLACE V C J, NORBURY T A, RICE A S C. Ultrasound vocalisation by rodents does not correlate with behavioural measures of persistent pain [J]. Eur J Pain, 2005, 9(4): 445–452.
- [9] ZYCH A D, GOGOLLA N. Expressions of emotions across species [J]. Curr Opin Neurobiol, 2021, 68: 57–66.
- [10] EGGLESTON A, TSANTANI M, OVER H, et al. Preferential looking studies of trustworthiness detection confound structural and expressive cues to facial trustworthiness [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 17709.
- [11] CHWE J A H, VARTIAINEN H I, FREEMAN J B. A multidimensional neural representation of face impressions [J]. J Neurosci, 2024, 44(39): e0542242024.
- [12] NELSON N L, RUSSELL J A. Dynamic facial expressions allow differentiation of displays intended to convey positive and hubristic pride [J]. Emotion, 2014, 14(5): 857–864.
- [13] WATHAN J, BURROWS A M, WALLER B M, et al. EquiFACS: the equine facial action coding system [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0131738.
- [14] CAEIRO C C, BURROWS A M, WALLER B M. Development and application of CatFACS: are human cat adopters influenced by cat facial expressions? [J]. Appl Anim Behav Sci, 2017, 189: 66–78.
- [15] BREMHORST A, SUTTER N A, WÜRBEL H, et al. Differences in facial expressions during positive anticipation and frustration in dogs awaiting a reward [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 19312.
- [16] CAEIRO C, GUO K, MILLS D. Dogs and humans respond to emotionally competent stimuli by producing different facial actions [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15525.
- [17] BURROWS A M, KAMINSKI J, WALLER B M, et al. Dog faces exhibit anatomical differences in comparison to other domestic animals [J]. Anat Rec (Hoboken), 2021, 304(1): 231–241.
- [18] WALLER B M, WHITEHOUSE J, MICHELETTA J. Rethinking primate facial expression: a predictive framework [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 82: 13–21.
- [19] CRIVELLI C, FRIDLUND A J. Inside-out: from basic emotions theory to the behavioral ecology view [J]. J Nonverbal Behav, 2019, 43(2): 161–194.
- [20] CRIVELLI C, FRIDLUND A J. Facial displays are tools for social influence [J]. Trends Cogn Sci, 2018, 22(5): 388–399.
- [21] DESCOVICH K A, WATHAN J, LEACH M C, et al. Facial expression: an under-utilised tool for the assessment of welfare in mammals [J]. ALTEX, 2017, 34(3): 409–429.
- [22] DARWIN C. The expressions of the emotions in man and animals [M]. London: William Clowes and Sons; 1872.
- [23] SCHIRMER A, SEOW C S, PENNEY T B. Humans process dog and human facial affect in similar ways [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74591.

- [24] BLOOM T, FRIEDMAN H. Classifying dogs' (*Canis familiaris*) facial expressions from photographs [J]. Behav Processes, 2013, 96: 1–10.
- [25] NAGASAWA M, KAWAI E, MOGI K, et al. Dogs show left facial lateralization upon reunion with their owners [J]. Behav Processes, 2013, 98: 112–116.
- [26] WALLER B M, PEIRCE K, CAEIRO C C, et al. Paedomorphic facial expressions give dogs a selective advantage [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82686.
- [27] KARL S, SLADKY R, LAMM C, et al. Neural responses of pet dogs witnessing their caregiver's positive interactions with a conspecific: an fMRI study [J]. Cereb Cortex Comm, 2021, 2(3): tgab047.
- [28] KONOK V, NAGY K, MIKLÓSI Á. How do humans represent the emotions of dogs? The resemblance between the human representation of the canine and the human affective space [J]. Appl Anim Behav Sci, 2015, 162: 37–46.
- [29] PANKSEPP J. The basic emotional circuits of mammalian brains: do animals have affective lives? [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2011, 35(9): 1791–1804.
- [30] FIRNKES A, BARTELS A, BIDOLI E, et al. Appeasement signals used by dogs during dog-human communication [J]. J Vet Behav, 2017, 19: 35–44.
- [31] NELSON X J, TAYLOR A H, CARTMILL E A, et al. Joyful by nature: approaches to investigate the evolution and function of joy in non-human animals [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2023, 98(5): 1548–1563.
- [32] KLEPZIG K, DOMIN M, WENDT J, et al. Structural integrity of the insula and emotional facial recognition performance following stroke [J]. Brain Commun, 2023, 5(3): fcad144.
- [33] HERNÁNDEZ-AVALOS I, MOTA-ROJAS D, MENDOZA-FLORES J E, et al. Nociceptive pain and anxiety in equines: physiological and behavioral alterations [J]. Vet World, 2021, 14(11): 2984–2995.
- [34] ALEXANDER R, ARACÓN O R, BOOKWALA J, et al. The neuroscience of positive emotions and affect: implications for cultivating happiness and wellbeing [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2021, 121: 220–249.
- [35] BERTESELLI G. Evaluation of immunological, stress and behavioural parameters in dogs (*canis familiaris*) with anxiety-related disorders [A]. Proceedings of the 5th international veterinary behavioural meeting [C]. West Lafayette, US: Purdue University Press; 2005.
- [36] ZHANG H, CHEN K, BAO J, et al. Oxytocin enhances the triangular association among behavior, resting-state, and task-state functional connectivity [J]. Hum Brain Mapp, 2023, 44(17): 6074–6089.
- [37] HARE B, TOMASELLO M. Human-like social skills in dogs? [J]. Trends Cogn Sci, 2005, 9(9): 439–444.
- [38] WALLER B M, CAEIRO C C, PEIRCE K, et al. DogFACS: the dog facial action coding system manual [M]. Cambridge: University of Portsmouth; 2013.
- [39] BOUGIOURI K, ANINTA S G, CHARLTON S, et al. Imputation of ancient canid genomes reveals inbreeding history over the past 10, 000 years [J]. bioRxiv, 2024, 3: 585179.
- [40] KAMINSKI J, WALLER B M, DIOGO R, et al. Evolution of facial muscle anatomy in dogs [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(29): 14677–14681.
- [41] PARKER H G, KIM L V, SUTTER N B, et al. Genetic structure of the purebred domestic dog [J]. Science, 2004, 304(5674): 1160–1164.
- [42] NAGASAWA M, MITSUI S, EN S, et al. Social evolution. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds [J]. Science, 2015, 348(6232): 333–336.
- [43] MARSHALL-PESCINI S, RAO A, VIRÁNYI Z, et al. The role of domestication and experience in 'looking back' towards humans in an unsolvable task [J]. Sci Rep, 2017, 7: 46636.
- [44] ALOMONS H, SMITH K C M, CALLAHAN-BECKEL M, et al. Cooperative communication with humans evolved to emerge early in domestic dogs [J]. Curr Biol, 2021, 31(14): 3137–3144.
- [45] POWELL V, ESTEVE-ALTAVA B, MOLNAR J, et al. Primate modularity and evolution: first anatomical network analysis of primate head and neck musculoskeletal system [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2341.
- [46] WALLER B M, MICHELETTA J. Facial expression in nonhuman animals [J]. Emot Rev, 2013, 5(1): 54–59.
- [47] PARR L A, WALLER B M. Understanding chimpanzee facial expression: insights into the evolution of communication [J]. Soc Cogn Affect Neurosci, 2006, 1(3): 221–228.
- [48] CAI C Q, LAVAN N, CHEN S H Y, et al. Mapping the differential impact of spontaneous and conversational laughter on brain and mind: an fMRI study in autism [J]. Cereb Cortex, 2024, 34(5): bhae199.
- [49] CORREIA-CAEIRO C, HOLMES K, MIYABE-NISHIWAKI T. Extending the MaqFACS to measure facial movement in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) reveals a wide repertoire potential [J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0245117.
- [50] CAEIRO C C, WALLER B M, ZIMMERMANN E, et al. OrangFACS: a muscle-based facial movement coding system for orangutans (*Pongo spp.*) [J]. Int J Primatol, 2013, 34(1): 115–129.

- [51] VAN BERLO E, ROTH T S, KIM Y, et al. Selective and prolonged attention to emotional scenes in humans and bonobos [J]. *Proc Biol Sci*, 2024, 291(2028): 20240433.
- [52] PAUL E S, COOMBE E, MCGREEVY P D, et al. Are brachycephalic dogs really cute? Evidence from online descriptions [J]. *Anthrozoös*, 2023, 36(4): 533–553.
- [53] GLOCKER M L, LANGLEBEN D D, RUPAREL K, et al. Baby schema in infant faces induces cuteness perception and motivation for caretaking in adults [J]. *Ethology*, 2009, 115(3): 257–263.
- [54] BREMHORST A, MILLS D S, STOLZLECHNER L, et al. ‘puppy dog eyes’ are associated with eye movements, not communication [J]. *Front Psychol*, 2021, 12: 568935.
- [55] MOTA-ROJAS D, MARCET-RIUS M, OGI A, et al. Current advances in assessment of dog’s emotions, facial expressions, and their use for clinical recognition of pain [J]. *Animals (Basel)*, 2021, 11(11): 3334.
- [56] PRKACHIN K M. Assessing pain by facial expression: facial expression as nexus [J]. *Pain Res Manag*, 2009, 14(1): 53–58.
- [57] TESSIER M H, MAZET J P, GAGNER E, et al. Facial representations of complex affective states combining pain and a negative emotion [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 11686.
- [58] VEMULA S, MUVAVARIRWA T, DOORNBOS F, et al. Neuromuscular junction development differs between extraocular and skeletal muscles and between different extraocular muscles [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2024, 65(5): 28.
- [59] SUSSKIND J M, ANDERSON A K. Facial expression form and function [J]. *Commun Integr Biol*, 2008, 1(2): 148–149.
- [60] EVANS H E, DE LAHUNTA A. Miller’s anatomy of the dog, 4th edition [M]. Missouri: Elsevier; 2013.
- [61] BURZA L B, BLOOM T, TRINDADE P H E, et al. Reading emotions in dogs’ eyes and dogs’ faces [J]. *Behav Processes*, 2022, 202: 104752.
- [62] CARNEY D R. Ten things every manager should know about nonverbal behavior [J]. *Calif Manag Rev*, 2021, 63(2): 5–22.
- [63] WHALEN P J, KAGAN J, COOK R G, et al. Human amygdala responsivity to masked fearful eye whites [J]. *Science*, 2004, 306(5704): 2061.
- [64] TSUJI Y, KANAZAWA S, YAMAGUCHI M K. The other-race effect of pupil contagion in infancy [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 9418.
- [65] SWAN J, BOYER S, WESTLUND K, et al. Decreased levels of discomfort in repeatedly handled mice during experimental procedures, assessed by facial expressions [J]. *Front Behav Neurosci*, 2023, 17: 1109886.
- [66] 许佳玲, 刘坤, 邢影, 等. 啮齿类动物实验性经前烦躁症模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(9): 90–98.
- XU J L, LIU K, XING Y, et al. Research progress of experimental premenstrual dysphoria models in rodents [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(9): 90–98.
- [67] FOX M W. A comparative study of the development of facial expressions in canids; wolf, coyote and foxes [J]. *Behaviour*, 1970, 36(1/2): 49–73.
- [68] EKMAN P, DAVIDSON R J, FRIESEN W V. The Duchenne smile: emotional expression and brain physiology. II [J]. *J Pers Soc Psychol*, 1990, 58(2): 342–353.
- [69] HUANG K, TIAN Z, ZHANG Q, et al. Reduced eye gaze fixation during emotion recognition among patients with temporal lobe epilepsy [J]. *J Neurol*, 2024, 271(5): 2560–2572.
- [70] BREMHORST A, MILLS D S, WÜRBEL H, et al. Evaluating the accuracy of facial expressions as emotion indicators across contexts in dogs [J]. *Anim Cogn*, 2022, 25(1): 121–136.
- [71] MILLS D. Management of noise fears and phobias in pets [J]. *Pract*, 2005, 27(5): 248–255.
- [72] GÄHWILER S, BREMHORST A, TÓTH K, et al. Fear expressions of dogs during new year fireworks: a video analysis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16035.
- [73] RYLANDER R. Physiological aspects of noise-induced stress and annoyance [J]. *J Sound Vib*, 2004, 277(3): 471–478.
- [74] GIANNAKAKIS G, PEDIADITIS M, MANOUSOS D, et al. Stress and anxiety detection using facial cues from videos [J]. *Biomed Signal Process Contr*, 2017, 31: 89–101.
- [75] PEDRETTI G, CANORI C, MARSHALL-PESCINI S, et al. Audience effect on domestic dogs’ behavioural displays and facial expressions [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 9747.
- [76] SINISCALCHI M, D’INGEO S, MINUNNO M, et al. Communication in dogs [J]. *Animals (Basel)*, 2018, 8(8): E131.
- [77] PEDRETTI G, CANORI C, BIFFI E, et al. Appeasement function of displacement behaviours? Dogs’ behavioural displays exhibited towards threatening and neutral humans [J]. *Anim Cogn*, 2023, 26(3): 943–952.
- [78] KUHNE F, HÖBLER J C, STRUWE R. Emotions in dogs being petted by a familiar or unfamiliar person: Validating behavioural indicators of emotional states using heart rate variability [J]. *Appl Anim Behav Sci*, 2014, 161: 113–120.
- [79] MARITI C, FALASCHI C, ZILOCCHI M, et al. Analysis of calming signals in domestic dogs: are they signals and are

- they calming? [J]. J Vet Behav, 2014, 9(6): e1-e2.
- [80] COOLS A K A, VAN HOUT A J M, NELISSEN M H J. Canine reconciliation and third-party-initiated postconflict affiliation: do peacemaking social mechanisms in dogs rival those of higher primates? [J]. Ethology, 2008, 114(1): 53-63.
- [81] WALLER B M, PARR L A, GOTHARD K M, et al. Mapping the contribution of single muscles to facial movements in the *Rhesus* macaque [J]. Physiol Behav, 2008, 95(1/2): 93-100.
- [82] DE WAAL F B M. Darwin's legacy and the study of primate visual communication [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1000: 7-31.
- [83] SALONEN M, SULKAMA S, MIKKOLA S, et al. Prevalence, comorbidity, and breed differences in canine anxiety in 13 700 finnish pet dogs [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2962.
- [84] DRESCHER N A, GRANGER D A. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers [J]. Appl Anim Behav Sci, 2005, 95(3/4): 153-168.
- [85] TRAVAIN T, COLOMBO E S, HEINZL E, et al. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*)—a pilot study [J]. J Vet Behav, 2015, 10(1): 17-23.
- [86] ADRIAAN BOUWKNECHT J, OLIVIER B, PAYLOR R E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2007, 31(1): 41-59.
- [87] FLINT H E, COE J B, SERPELL J A, et al. Identification of fear behaviors shown by puppies in response to nonsocial stimuli [J]. J Vet Behav, 2018, 28: 17-24.
- [88] JOLY-MASCHERONI R M, SENJU A, SHEPHERD A J. Dogs catch human yawns [J]. Biol Lett, 2008, 4(5): 446-448.
- [89] MADSEN E A, PERSSON T. Contagious yawning in domestic dog puppies (*Canis lupus familiaris*): the effect of ontogeny and emotional closeness on low-level imitation in dogs [J]. Anim Cogn, 2013, 16(2): 233-240.
- [90] BEERDA B, SCHILDER M B H, VAN HOOFF J A R A M, et al. Manifestations of chronic and acute stress in dogs [J]. Appl Anim Behav Sci, 1997, 52(3/4): 307-319.
- [91] FRANZINI DE SOUZA C C, DIAS D P M, DE SOUZA R N, et al. Use of behavioural and physiological responses for scoring sound sensitivity in dogs [J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0200618.
- [92] LAZARUS R S. Stress and emotion: a new synthesis: risk management [M]. New York, US: Springer Publishing Co; 1999.
- [93] GUEVARA R D, LÓPEZ-VERGÉ S, PASTOR J J, et al. When the neighbors are noisy: effect of social challenge in collateral pens of stressed animals [J]. Front Vet Sci, 2024, 11: 1433628.
- [94] HEKMAN J P, KARAS A Z, DRESCHER N A. Salivary Cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures [J]. Appl Anim Behav Sci, 2012, 141(3/4): 149-157.
- [95] ALBUQUERQUE N, GUO K, WILKINSON A, et al. Mouth-licking by dogs as a response to emotional stimuli [J]. Behav Processes, 2018, 146: 42-45.
- [96] BOYKO A R, QUIGNON P, LI L, et al. A simple genetic architecture underlies morphological variation in dogs [J]. PLoS Biol, 2010, 8(8): e1000451.
- [97] HANDELMAN B. Canine behavior a photo illustrated handbook [M]. Wenatchee: Dogwise; 2008.
- [98] DEFENSOR E B, CORLEY M J, BLANCHARD R J, et al. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts [J]. Physiol Behav, 2012, 107(5): 680-685.
- [99] BENNETT V, GOURKOW N, MILLS D S. Facial correlates of emotional behaviour in the domestic cat (*Felis catus*) [J]. Behav Processes, 2017, 141(Pt 3): 342-350.
- [100] FORGET B, GARCIA E M, GODINO A, et al. Cell-type- and region-specific modulation of cocaine seeking by micro-RNA-1 in striatal projection neurons [J]. Mol Psychiatry, 2022, 27(2): 918-928.
- [101] FOGLE B. The encyclopedia of the dog [M]. London: Dorling Kindersley; 1996.
- [102] MASON M J, LEWIS M A. Structure and scaling of the middle ear in domestic dog breeds [J]. J Anat, 2024, 245(2): 324-338.
- [103] PAUL E S, PACKER R M, MCGREEVY P D, et al. That brachycephalic look: Infant-like facial appearance in short-muzzled dog breeds [J]. Anim Welf, 2023, 32: e5.
- [104] LILJA-MAULA L I O, MÄKI K H, AROMAA M K, et al. Evaluation of brachycephalic obstructive airway syndrome breeding test results in Finland from 2017 to 2022 [J]. Acta Vet Scand, 2024, 66(1): 35.
- [105] BLOOM T, TREVATHAN-MINNIS M, ATLAS N, et al. Identifying facial expressions in dogs: a replication and extension study [J]. Behav Processes, 2021, 186: 104371.

陈瑾玲,陈钰涵,李欣,等. 特应性皮炎的中西医病证动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 581-592.

CHEN J L, CHEN Y H, LI X, et al. Progress in animal models of atopic dermatitis in relation to Chinese and western medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 581-592.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.012

特应性皮炎的中西医病证动物模型研究进展

陈瑾玲¹, 陈钰涵¹, 李欣^{2,3}, 区燕华^{2,3}, 袁迪芬¹, 白琨然¹, 袁嘉丽¹,
段媛媛^{2,3}, 羊忠山¹, 牛海涛^{1,2,3*}

(1. 云南中医药大学基础医学院, 昆明 650500; 2. 病毒致病及防控教育部重点实验室, 基础医学与公共卫生学院, 暨南大学, 广州 510632; 3. 广州市无菌动物与微生态转化重点实验室, 暨南大学实验动物管理中心, 广州 510632)

【摘要】 近年来随着对中医药在治疗免疫系统疾病的研究不断深入,越来越多的中医药显示出对免疫系统疾病有良好的治疗作用。而特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种以2型免疫为特征的炎症性疾病,对其发病机制和针对其治疗的免疫药物研究也不断增加,从而产生了多种不同类型的动物模型。本文旨在对现有的AD动物模型及其免疫相关特点进行综述,希望为未来AD的相关研究模型的选择提供相应的参考。

【关键词】 特应性皮炎; 动物模型; 中医病证; 免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0581-12

Progress in animal models of atopic dermatitis in relation to Chinese and western medicine

CHEN Jinling¹, CHEN Yuhan¹, LI Xin^{2,3}, OU Yanhua^{2,3}, YUAN Difen¹, BAI Kunran¹,
YUAN Jiali¹, DUAN Yuanyuan^{2,3}, YANG Zhongshan¹, NIU Haitao^{1,2,3*}

(1. School of Basic Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;
2. Key Laboratory of Viral Pathogenesis & Infection Prevention and Control, Ministry of Education, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Guangzhou Key Laboratory of Germ-Free Animals and Microbiota Application, Institute for laboratory Animal Sciences, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Corresponding author: NIU Haitao. E-mail: htniu@jnu.edu.cn

【Abstract】 Recent research progress into the use of Chinese medicine has demonstrated good therapeutic effects for increasing numbers of Chinese medicines for immune system diseases. Atopic dermatitis (AD) is an inflammatory disease characterized by type 2 immunity, and research into its pathogenesis and therapeutic

【基金项目】 科技部重点研发专项(2022YFF0710701, 2022YFF0710702), 广州市重点研发计划项目(202206010157), 广州市市校联合资助重点实验室项目(202201020381)。

Funded by the National Key R&D Programs of China(2022YFF0710701, 2022YFF0710702), Guangzhou Key Research and Development Program(202206010157), Guangzhou Joint Fund for Key Laboratory(202201020381)。

【作者简介】 陈瑾玲, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合肠道微生态与机体免疫系统交互、微生态应用转化。

Email: 3223545187@qq.com

【通信作者】 牛海涛, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肠道微生态与机体免疫系统交互。Email: htniu@jnu.edu.cn

immunopharmaceuticals has resulted in various different types of animal models. This review summarizes the existing animal models of AD and their immune-related characteristics, with the aim of providing appropriate references for the selection of future research models related to AD.

【Keywords】 atopic dermatitis; animal models; traditional Chinese medicine(TCM) syndrome types; immunity
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种以皮肤瘙痒为特征的慢性非感染性皮肤病,其发病高峰期常见于婴幼儿时期^[1],尽管成人期和老年期也存在一定的发病比率,但大多数 AD 会随着年龄的增长发病率逐渐下降。其发病率在地区和种族上存在差异,考虑近年来一些非洲地区出现 AD 发病率增长情况^[2],现对 AD 的研究开始逐步增加。同时 AD 所伴随出现的瘙痒、皮肤疼痛和睡眠问题等症状,会导致患者生活质量受损^[3],尽管成人 AD 与儿童 AD 会存在表型分型不同的情况^[4],但 AD 所伴随的合并症在两者中都存在。结合对临床病例统计分析,AD 患者中,鼻炎、哮喘的总体患病率可分别达 40.5%、25.7%;并且儿童的患病率总体较成人患病率高^[5-6]。除此之外,AD 患者还会出现过敏性结膜炎、白癜风、过敏性接触性皮炎、焦虑抑郁等合并症,更甚者其骨质疏松、心血管风险、皮肤癌症风险可成倍数增加^[7],危害人们的健康生活。

由于不同人群在 AD 临床表现、免疫发病机制和基因相关遗传易感性上存在差异^[8],因此,在临床上所采取的治疗方式会有所差异,但皆不外乎于局部皮质类固醇、光疗、免疫抑制剂、JAK 抑制剂或靶向生物制剂^[9],但以上治疗皆有相应副作用,而近年随着我国中医药事业的不断创新,中医药对于 AD 在临床上的疗效也得到不断重视,由此不同类型的 AD 动物模型在针对研究 AD 的病理机制及后续中西医相关治疗策略创新或新型药物开发上扮演着关键角色,基于此现象本文将综述近年 AD 模型在中西医研究的类型及其特点,为后续研究者能供应参考便利。

1 AD 研究概况

AD 皮肤免疫失衡和屏障功能障碍的病理生理特征,是遗传和环境因素共同作用的结果^[10-11],随着近年对菌群研究的不断深入,有研究发现皮肤微生物组的异常可以影响 AD 病程的

发展^[12-13],皮肤微生物如金黄色葡萄球菌^[14-15]和外源定植于皮肤的酵母马拉色菌^[16]会刺激皮肤免疫并促进 AD 的发展^[17]。

1.1 AD 免疫研究

AD 通常主要以 2 型免疫反应为主^[17],与多种特应性过敏症及其并发症相关,包括食物过敏、过敏性鼻炎和哮喘^[18]。在遗传、环境和微生物等因素影响下,表皮主要结构蛋白——丝聚蛋白(filaggrin, Flg)缺乏,造成皮肤屏障受损。皮肤驻留真皮树突状细胞、朗格汉斯细胞被激活,产生呈递抗原,角质形成细胞释放促炎因子和趋化因子^[19],引起 CD4 表达为主要特征的 T 细胞浸润^[20-22]。以 Th2 轴(IL-4、IL-13、IL-31)为核心,对不同人群及其表型会产生不同程度的其他 T 细胞轴(Th1/IFN- γ 、Th17/IL-22 和 IL-23、Th22)刺激^[23-24],产生复杂多样的炎症类型。被激活的 Th2 细胞释放 IL-4、IL-5、IL-13,促进嗜酸性粒细胞增多和 B 细胞中的 IgE 类别转换产生抗原特异性 IgE^[25],介导局部皮肤及其自身机体的免疫炎症发生。

1.2 AD 中医症候研究

传统中医典籍并未有“特异性皮炎”病名的记载,而“乳癣”“奶癣”“胎敛疮”“四弯风”等病名在古籍中所描述症状的与现在 AD 的临床症状多为相似。《诸病源候论》便初记载有“小儿面上癣,皮如甲错起,干燥,谓之乳癣”;《医宗金鉴》所载“胎敛疮,此证生婴儿头顶,或生眉端,又名奶癣”,上述古籍所记载的描述症状与现代临床儿童 AD 相吻合^[26]。而《医宗金鉴·外科心法要诀》中则记载:“四弯风,生于两腿弯、脚弯,每月一发……其痒无度,搔破津水,形如湿癣”,其描述症状又与现代临床对 AD 最为贴近^[27]。

随着现代中医对 AD 的不断探索,各个医家对其有不同的见解。AD 病机多样,为禀赋不耐、胎毒遗热以致胎儿心脾受损所致^[28];或脾虚水湿运化失健,泛溢肌肤;或心火致郁热,疮生痒

甚^[29];或热气怫郁、玄府闭塞^[30],或肝郁肾虚,气血失合,外加感湿热邪气,搏与肌肤发为本病^[31]。

2 AD 西医动物模型

2.1 AD 临床诊断标准

现临床对 AD 的诊断多是根据国际广泛采用

的 Hanifin 和 Rajka (H&R) 标准^[32-33]、Williams 标准和由其衍生并得到验证的英国工作组 (United Kingdom Working Party, UKWP) 标准来进行诊断^[34-35],同时结合我国 AD 临床诊疗指南^[36-38],现临床诊断标准概括为湿疹性病变、剧烈瘙痒和慢性或复发性病程 (见表 1)。

表 1 AD 临床诊断标准
Table 1 AD clinical diagnostic criteria

国际标准 (在瘙痒为主要标准的基础上符合下边 3 个及以上) International criteria (Compliance on the basis of the major standard about pruritus plus three or more)	国内标准 (以 Williams 标准为基础) Domestic criteria (Based on the Williams criteria)
(1) 2 岁以下发病并孩子在过去 12 个月内必须患有皮肤瘙痒症 (2) 皮肤皱褶受累史,过去 1 年内皮肤普遍干燥 (3) 影响成人屈曲表面和婴儿面部及伸肌的皮炎 (肘窝、腘窝、踝前、颈部,10 岁以下儿童包括颊部皮疹) (4) 慢性或复发性皮炎,有屈侧湿疹 (4 岁以下儿童面颊部/前额和四肢伸侧湿疹) (5) 个人或家族有皮肤或呼吸道特异性病史 (年龄较大的直系亲属有过敏性疾病病史或哮喘或花粉症的个人病史) (1) Children under 2 years of age with onset of pruritus must have had pruritus in the past 12 months (2) History of skin fold involvement and generally dry skin in past year (3) Visible flexural dermatitis in adults and facial, extensor muscles dermatitis in infants (elbow socket, rouge socket, anterior ankle, neck, including children under 10 years of age with cheek rash) (4) Chronic or relapsing dermatitis, with flexural eczema (children under 4 years of age with eczema in facial, forehead and extended extremities) (5) Personal or family history of cutaneous or respiratory atopy (history of atopic disease in 1st degree relative if aged or personal history of asthma or hay fever).	(1) 婴儿期 AD: 婴儿湿疹,多分布于两面颊、额部和头皮,皮疹可干燥或渗出 (2) 儿童 AD: 肘窝、腘窝和小腿伸侧,以亚急性和慢性皮炎为主要表现,皮疹往往干燥肥厚,有明显苔藓样变 (3) 青少年或成人 AD: 皮损与儿童期相似,病程超过 6 个月的对称性湿疹 + 特异性个人史和/或家族史 (包括湿疹、过敏性鼻炎、哮喘、过敏性结膜炎等)/血清总 IgE 升高和 (或) 外周血嗜酸性粒细胞升 (或) 和或过敏原特异性 IgE 阳性 (过敏原特异性 IgE 检测 2 级或 2 级以上阳性) (4) 老年期 AD: 皮疹通常泛发,躯干和四肢伸侧为主。且老年期首次发病,有儿童 AD 病史或老年期复发;青少年期和 (或) 成人期首发 AD 或慢性复发病程直至老年期 ^[38] (1) Infancy AD: infantile eczema, mostly on cheeks, forehead and scalp, the rash may be dry or oozing (2) Child AD: elbow sockets, rouge sockets and calf extensors, subacute and chronic dermatitis as the main symptom, rash tends to be dry, hypertrophic, and distinctly mossy (3) Teen or adults AD: symmetrical eczema with lesions similar to those of childhood and with a duration of more than 6 months + personal or family history of atopic (including eczema, allergic rhinitis, asthma, allergic conjunctivitis, etc)/raised serum IgE, and (or) raised peripheral blood eosinophils and (or) allergen-specific IgE positivity (Positive allergen-specific IgE test grade 2 or higher) (4) Gerontic AD: rash is usually generalized, with a predominance on the trunk and extensor sides of the extremities. The rash is usually present for the first time in gerontic, with a history of child AD or relapse in older age, first AD in teenager and adult or chronic relapsing course into gerontic ^[38]

根据以上国内外的临床表征,现开发了不同类型的动物模型以用于对 AD 发病机制,临床治疗及新药开发上的研究,以下将总结归纳现有的 AD 动物模型。

2.2 AD 西医模型

AD 模型可以根据发病特点分为自发性模型和诱导性模型,自发性模型包括基因工程型和近交系小鼠,近交系多用于研究某种药物对整个疾病的病程进展过程,基因工程型小鼠多为单个特

定基因敲除系,旨在重点研究单个基因对此疾病的影响,侧重点不同,所采用的动物模型也有差别,其中有鳞状尾鼠、NC/Nga 鼠、*Flg*^{-/-} 鼠等。

鳞状尾小鼠 (Flaky tail mice, FT) 是近交系小鼠,特征在于其 *Flg* 表达异常,其病变皮肤可出现 AD 样皮疹及大量 Th2 细胞因子,与人体 AD 发病过程接近。不同的 FT 小鼠其 AD 的发病程度各异,研究中可根据其表型选择不一样的 FT 小鼠 AD 模型^[39]。近交双突变品系 (DM) *ma/ma*

Flg^{fl/fl} 小鼠研究发现在其 *Flg* 基因突变的背景下, 有隐性突变 matted (ma) 的 12 ~ 15 只存在突变, 并且与 *Tmem79* 基因相关, 由此可以在 SPF 条件下自发产生 AD 症状, 因此 DM 品系 *ma/ma Flg*^{fl/fl} 小鼠近年来被常用于皮肤屏障缺陷型 AD 的研究^[40-41]。与上述不同的是, 作为基因工程型的 *Flg*^{-/-} 小鼠特征为 *Flg* 基因的缺乏, 在无致敏原情况下皮肤不会出现过敏症状^[42]; NC/Nga (NC) 小鼠作为另一种近交系 AD 模型, 在非 SPF 级条件下饲养它们才会表现出 AD 症状, 然而这些 AD

症状在 SPF 条件下不会出现^[43], 因此在实验研究中需要外来刺激来诱发疾病。
而外源诱导模型包括半抗原诱导小鼠模型: 二硝基氯苯 (1-chloro-2, 4-dinitrochlorobenzene, DNCB)、二硝基氯苯 (2, 4-dinitrofluorobenzene, DNFB)、恶唑酮 (oxazolone, OX); 过敏原诱导小鼠模型卵清蛋白 (ovalbumin, OVA)、卡泊三醇 (calcipotriol, MC903) 诱导小鼠模型等, 这些模型具有操作性强、时间可控、应用范围广等优点^[44], 以上总结详见表 2。

表 2 基于西医理论 AD 不同动物模型分析
Table 2 Analysis of different animal models of atopic dermatitis based on western medical theories

模型 Model	特点 Characteristic	皮肤炎症特征 Skin inflammation characteristic	皮损表征 Skin lesion characterization	生化特征 Biochemical characteristic
<i>Flg</i> 单缺陷小鼠 纯合 BALB/c 品系 <i>Flg</i> -deficient mice pure BALB/c background	<i>Flg</i> ^{-/-}	T 细胞区室(γδT)略有增加, 其他免疫细胞群没有变化 ^[42] Skin shows slight increase in T-cell compartment(γδT), but otherwise unchanged immune cell populations ^[42]	(1) 新生小鼠(3 周前)皮肤干燥、鳞状、角化异常; 尾部皮肤过度线性和环状收缩、随后皮肤逐步恢复 ^[42, 45] (2) 新生和成年 <i>Flg</i> ^{-/-} 小鼠的经皮水分散失(trans epidermal water loss, TEWL)未见变化 ^[46] (3) 老年期(16 周后)出现皮肤干燥、表皮增厚、TEWL ↑ ^[42, 46] (1) Pups(befor 3 weeks) showed dry and scaly skin, hyperlinearity, and annular constrictions of tail skin phenotype ameliorated after few weeks ^[42, 45] (2) Level of TEWL in neonatal and adult <i>Flg</i> ^{-/-} mice unchanged ^[44] (3) Dry skin and epidermal thickening in old age(after 16 weeks)、TEWL ↑ ^[42, 46]	(1) 角蛋白透明颗粒 ↓ (2) 血清 IgE 无变化 ^[42] (1) Keratohyalin granules ↓ (2) Levels of serum IgE unchanged ^[42]
丝聚蛋白突变小鼠 (<i>Flg</i> ^{fl/fl}) C57BL/6J 品系 Filaggrin mutated mice (<i>Flg</i> ^{fl/fl}) C57BL/6J background	<i>fl</i> 突变 <i>fl</i> mutated	-	(1) SPF 条件下不会出现自发性 AD 症状 ^[41] (2) TEWL 没有变化 (3) 轻度弥漫性角化症和真皮细胞浸润增加 ^[41] (1) No spontaneous AD symptoms in SPF conditions ^[41] (2) TEWL unchanged (3) Mild diffuse keratosis and increased dermal cell infiltration ^[41]	血清 IgE ↑ Serum IgE ↑

续表 2

模型 Model	特点 Characteristic	皮肤炎症特征 Skin inflammation characteristic	皮损表征 Skin lesion characterization	生化特征 Biochemical characteristic
丝聚蛋白突变小鼠 (<i>Flg^{fl/fl}</i>) 亲过敏 BALB/c 品系 Filaggrin mutated mice (<i>Flg^{fl/fl}</i>) Sensitive BALB/c background	<i>fl</i> 突变 <i>fl</i> mutated	(1) 真皮层嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、ILC2、肥大细胞、嗜碱性粒细胞 $\uparrow$ ^[47] (2) Th2、Th17 细胞 $\uparrow$ 、Th1 细胞因子 $\uparrow$ ^[48-49] (1) Dermal eosinophils, neutrophils, ILC2, mast cells, basophils ^[47] (2) Th2、Th17 cell $\uparrow$ 、Th1 cytokine $\uparrow$ ^[48-49]	(1) 水肿、红斑、脱屑、苔藓化、表皮增厚 (2) 搔抓、眼睑炎 (3) TEWL $\uparrow$ ^[47] (1) Edema, erythema, desquamation, lichenification, epidermal thickening (2) Scratching, blepharitis (3) TEWL $\uparrow$ ^[47]	(1) 血清 IgE $\uparrow$ (2) Flg $\downarrow$ (1) Serum IgE $\uparrow$ (2) Flg $\downarrow$
鳞片状尾小鼠 (<i>ma/ma Flg^{fl/fl}</i>) Flaky tail mice (<i>ma/ma Flg^{fl/fl}</i>)	(1) <i>fl</i> 突变 (2) <i>Matt</i> 突变 (3) <i>TMEM79</i> 突变 (1) <i>fl</i> mutated (2) <i>Matt</i> mutated (3) <i>TMEM79</i> mutated	(1) 表皮和外周免疫器官 Th17、 $\gamma\delta$ T17 $\uparrow$ ^[50] (2) 病变真皮中嗜酸性粒细胞、中性粒细胞 $\uparrow$ 、IL-17a、IL-23a $\uparrow$ 、FoxP3 ⁺ Treg $\uparrow$ ^[51] (1) Epidermal and peripheral immune organs Th17、 $\gamma\delta$ T17 $\uparrow$ ^[50] (2) Eosinophils, neutrophils in lesion dermis $\uparrow$ 、IL-17a、IL-23a $\uparrow$ 、FoxP3 ⁺ Treg $\uparrow$ ^[51]	(1) 自发性皮肤炎症, 搔抓、红斑、皮肤干燥、过敏反应 ^[41, 51] (2) 毛发脆弱, 纵向分裂断裂、角质缺陷、毛发形成团块、毛囊形态扭曲 (3) TEWL $\uparrow$ ^[40-41] (1) Spontaneous skin inflammation, scratching, erythema, dry skin, allergic reactions ^[41, 51] (2) Hair fragility, longitudinal splitting and breaking, keratin defects, clumping of hair formation, distorted follicle morphology (3) TEWL $\uparrow$ ^[40-41]	血清 IgE $\uparrow$ Serum IgE $\uparrow$
NC/Nga(NC) 小鼠 NC/Nga(NC) mice	(1) <i>TCR Vβ8⁻</i> (2) iNKT 细胞系统性缺陷 ^[52] (1) <i>TCR Vβ8⁻</i> (2) iNKT cell systemic flaw ^[52]	常规条件(非 SPF 级或粉尘螨刺激) 13 周后 CD3 ⁺ $\uparrow$ 、肥大细胞和 T 细胞的浸润 Infiltration of CD3 ⁺ $\uparrow$, mast cells and T cells after 13 week in conventional conditions (non-SPF grade or dust mite stimulation)	(1) SPF 级条件下不会出现 AD 症状 (2) 常规条件下 13 周后可出现搔抓、表皮明显增生、增厚、TEWL $\uparrow$ ^[53] (1) No spontaneous AD symptoms in SPF conditions (2) Scratching, marked epidermal hyperplasia and thickening can occur after 13 week in conventional conditions ^[53]	(1) 常规下或粉尘螨刺激下: 血清 IgE、IgG1、IgG2a $\uparrow$ (2) 皮损表皮胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP) $\uparrow$ ^[54] (1) Under routine or dust mite irritation: serum IgE、IgG1、IgG2a $\uparrow$ (2) TSLP $\uparrow$ ^[54]

续表 2

模型 Model	特点 Characteristic	皮肤炎症特征 Skin inflammation characteristic	皮损表征 Skin lesion characterization	生化特征 Biochemical characteristic
hlAD 模型 hlAD model	半抗原诱导 DNCB Semi-antigenic induction DNCB	(1)肥大细胞 ↑ ^[55] (2)IL-4 ↑ ^[56] (1)Mast cell ↑ ^[55] (2)IL-4 ↑ ^[56]	(1)红斑、干燥、皮肤干裂、搔抓、 TEWL ↑ ^[56] (2)表皮增厚(增生)、角化过 度、海绵状水肿 ^[57] (1)Erythema, dryness, chapped skin, scratching, TEWL ↑ ^[56] (2)Epidermal thickening (hyperplasia), hyperkeratosis, spongy edema ^[57]	(1)血清 IgG、 IgE ↑ ^[57-58] (2)组胺 ↑ (3)TSLP ↑ (4)细胞角蛋白 10 (KRT10) ↑ (5)S100A8 ↑ ^[57] (1)Serum IgG、 IgE ↑ ^[57-58] (2)Histamine ↑ (3)TSLP ↑ (4)Cytokeratin 10 (KRT10) ↑ (5)S100A8 ↑ ^[57]
OX-AD 模型 OX-AD model	半抗原诱导 OX Semi-antigenic induction OX	(1)Th2 型炎症,嗜酸性 粒细胞、肥大细胞 ↑ (2)IL-4、IL-13 ↑ ^[59] (1)Th2 type inflammation, eosinophils, mast cells ↑ (2)IL-4、IL-13 ↑ ^[59]	(1)红斑、干燥、脱屑 ^[60] (2)表皮增生、角化不全、真皮水 肿、TEWL ↑ ^[59, 61] (1)Erythema, dryness, flaking ^[60] (2)Epidermal hyperplasia, hyperkeratosis, dermal edema, TEWL ↑ ^[59, 61]	(1)血清 IgE ↑ ^[61] (2)Flg ↓、细胞角 蛋白 1 和细胞角蛋 白 10 ↑ ^[59] (1)Serum IgE ↑ ^[61] (2)Flg ↓、 cytokeratin 1 and cytokeratin 10 ↑ ^[59]
OVA-AD 模型 OVA-AD model	过敏原诱导 OVA Allergen induction OVA	(1)皮损组织嗜酸性粒细 胞、肥大细胞、CD4 ⁺ 和 CD8 ⁺ T 细胞 ↑ ^[62] (2)IL-4、IL-13、 IFN-γ ↑ ^[63] (1)Eosinophils, mast cells、CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cell in skin lesion tissue ↑ ^[62] (2)IL-4、IL-13、 IFN-γ ↑ ^[63]	(1)搔抓、红斑、干燥 (2)表皮增生增厚、脱落 ^[64] (1)Scratching, erythema, dryness (2)Epidermal hyperplasia thickening and peeling ^[64]	(1)血清 IgG1、 IgG2a、IgE ↑ ^[62] (2)TSLP ↑ ^[65] (1)Serum IgG1、 IgG2a、IgE ↑ ^[62] (2)TSLP ↑ ^[65]

续表 2

模型 Model	特点 Characteristic	皮肤炎症特征 Skin inflammation characteristic	皮损表征 Skin lesion characterization	生化特征 Biochemical characteristic
MC903-AD 模型 MC903-AD model	MC903 诱导 MC903 induced	(1)Th2 型炎症、嗜酸性 粒细胞、嗜碱性粒细胞、 肥大细胞、巨噬细胞 ↑ (2)IL-33、IL-4、IL-13、 IL-31 ↑ ^[66-69] (1)Th2 type inflammation, eosinophils, basophils, mast cells, macrophages ↑ (2)IL-33、IL-4、IL-13、 IL-31 ↑ ^[66-69]	(1)红斑、皮肤干燥、抓痕 ^[70] (2)海绵状水肿、真皮增厚、 角化不全、TEWL ↑ ^[67] (1)Erythema, dry skin, and excoriation ^[70] (2)Spongy edema, dermal thickening and hyperkeratosis, TEWL ↑ ^[67]	(1)血清 IgE ↑ (2)TSLP ↑ ^[69] (3)骨膜蛋白 ↑ ^[66] (4)Claudin-1、 Flg ↓ ^[67] (5)肥大细胞蛋白 酶-1 ^[71] (1)Serum IgE ↑ (2)TSLP ↑ ^[69] (3)Membrane covering bone ↑ ^[66] (4)Claudin-1、 Flg ↓ ^[67] (5)Mast cell protease-1 ^[71]

3 AD 中医证型动物模型

根据中医临床证候分型,AD 主要有心脾积热证、心火脾虚证、脾虚湿蕴证、风湿热蕴证、脾肾阳虚证^[72]。因此基于不同中医证型在临床上存在不同的临床表现,由此也产生了不同种类的证候动物模型,归纳见表 3。

4 AD 模型评价标准

通过对现有模型的总结,AD 模型的评价标准主要基于以下 4 个方面:(1)皮肤皮炎严重程度评分——一般根据与临床患者症状表现相似程度:特应性皮炎评分指数 (scoring atopic dermatitis index, SCORAD)——(清洁:0;几乎清洁:0.1 ~ 1.0;轻度:1.1 ~ 7;中度:7.1 ~ 21;重度:21.1 ~ 50;非常严重:50.1 ~ 72)。和湿疹面积与严重程度指数 (eczema and severity index, EASI)——(清洁:0 ~ 9.9;轻度:10 ~ 28.9;中度:29 ~ 48.9;重度:49.0 ~ 103)。出现不同程度的红斑、脱屑、干燥、丘疹、水疱、水肿、苔藓样变等^[77];(2)皮损组织病理学改变:淋巴细胞海绵状水肿,伴有表皮增生和过度增殖;皮损皮肤免疫细胞浸润明显,包括活化的 T 细胞(偏向性 Th2 炎症反应)、肥大细胞和嗜酸性粒细胞^[78];(3)大

部分伴随血清 IgE 水平升高;(4)分子水平检测:TSLP、骨膜蛋白、Flg、角蛋白、嗜酸细胞活化趋化因子和或特定趋化因子如趋化因子 CCL17、特定抗菌肽——如 S100A7/S100A8/S100A9^[78-79]的表达增加,紧密连接蛋白-1 (Claudin-1) 表达降低。Claudin-1 在细胞紧密连接中发挥着骨架蛋白的作用,是维持上皮细胞屏障功能完整重要的蛋白,缺乏 Claudin-1 蛋白会因皮肤屏障缺陷使得 TEWL 增加^[80]。

5 总结与展望

目前 AD 模型的构建方法已经相对成熟,但是每种模型仍存在一定的局限性,尽管提出有 AD 人源化小鼠模型,其表现会更接近与临床病人的症状表现^[81],但由于其技术和使用成本问题无法得到推广,但在未来有可能会成为在针对 AD 临床药物研究的一个新的模型方向。现阶段中医证候模型现研究相对较少,并且大多研究在国内,国外并未有相关研究。尽管中医药在临床治疗和实验研究上显示 AD 有良好的治疗效果^[82-84],但由于中医证候模型缺乏明确的标准评价体系,因此限制了中医证候模型的发展,这可能与国内中医药在科研研究阶段处于探索阶段有关。现有的中医证候模型模式研究更多为“特

表 3 基于中医理论 AD 不同动物模型分析

Table 3 Analysis of different animal models of atopic dermatitis based on traditional Chinese medicine theories

中医证型 Traditional Chinese medicine syndrome types	造模方式 Modeling method	皮损炎症特征 Skin inflammation characteristic	症状 Symptomatic	生化指标 Biochemical characteristic
脾虚证 Spleen deficiency syndrome	(1) 2% 苦基氯 (2,4,6-trinitrochlorobenzene, PCI) 涂擦在 BALB/c 小鼠腹部皮肤表面。4 d 后用 0.8% PCI 每 2 d 涂擦 1 次, 同时每日 25 mL/kg 药量给予 1 g/mL 大黄水灌胃, 共 14 d^[73] (2) FT 小鼠 20 周后用 108 mg/mL 大黄煎煮液 0.3 mL 灌胃给药 1 周^[74] (1) PCI was rubbed on the skin surface of the abdomen of BALB/c mice. 4 days later, 0.8% PCI was rubbed every 2 d, and 1 g/mL of rhubarb water was given by gavage at a dose of 25 mL/kg per day for 14 d (2) FT mice were administered 108 mg/mL rhubarb decoction 0.3 mL by gavage for 1 week after 20 weeks^[74]	IL-4、IL-17、IL-22 ↑ ^[74]	(1) 皮肤明显增厚、红斑、渗出、糜烂、浆痂^[73] (2) 毛发枯槁、疏散、便溏, 体质量、体力和食量下降、畏寒^[73] (3) 红斑、表皮增生增厚、干燥、棘层肥厚、损伤水肿^[74] (1) Marked thickening of the skin, erythema, oozing, vesicles, crusting^[73] (2) Withered and sparse hair, loose stools, loss of body mass, stamina and food intake, cold feeling^[73] (3) Erythema, epidermal hyperplasia and thickening, dryness, hypertrophy of the stratum spinosum, damage edema^[74]	(1) 血清 IgE ↑ (2) TSLP ↑ (3) 血清 IL-4、IL-17、IL-22 ↑^[73-74] (1) Serum IgE ↑ (2) TSLP ↑ (3) Serum IL-4、IL-17、IL-22 ↑^[73-74]
寒湿证病证 Cold dampness syndrome	在比例为 3:1 的丙酮和橄榄油基质溶液中加入 DNCB 配成浓度为 1% (6 d) 或 0.5% (12 d) 的 DNCB 溶液; 小鼠皮肤滴加 200 μL DNCB 溶液, 在人工气候箱中温度 4 ~ 6℃、相对湿度 90% ~ 95%, 6 h/d (10:00 ~ 16:00), 共 18 d 模拟寒湿环境, 用高脂饲料喂养模拟内湿因素^[75] DNCB was added to a 3:1 ratio of acetone and olive oil substrate solution to formulate a 1% (6 d) or 0.5% (12 d) DNCB solution. Mice were dermally dosed with 200 μL of DNCB solution, and fed with high-fat chow to simulate endohydric factors in an artificial climatic chamber at a temperature of 4 ~ 6℃ and a relative humidity of 90% ~ 95% for 6h per day (10:00 ~ 16:00) for 18 d to simulate cold and humid environments^[75]	真皮浅层大量淋巴细胞浸润 ^[75] Massive lymphocytic infiltration of the superficial dermis ^[75]	(1) 搔抓, 表皮增厚, 角化不全、角化过度 (2) 小便颜色清亮透明色。精神萎靡, 反应迟钝, 蜷缩不喜动, 步态不稳 (3) 皮毛污秽, 肛门污秽, 大便软湿甚至便溏^[75] (1) Scratching, epidermal thickening, hyperkeratosis, hyperkeratosis (2) Urine is clear and transparent in color. depressed, unresponsive, hunched over and uninhibited, unsteady gait (3) Soiling of the skin and fur, soiling of the anus, soft and wet stools or even loose stools^[75]	(1) TSLP ↑ (2) Claudin-1、TRPV3 ↓、TRPV4 ↑^[75]
脾虚湿蕴证 Spleen deficiency and dampness stagnation syndrome	在温度 23℃、湿度 95% 的气候箱内进行 10 h/d 的饲养, 单数日喂养高脂饲料; 双数日禁食, 喂高脂饲料的同时以 1 g/mL 番泻叶冷浸液给小鼠灌胃, 每只 10 mL/kg 诱导持续至动物取材^[76] Mice were housed for 10 h/d in a climatic chamber at a temperature of 23℃ and 95% humidity, fed high-fat chow on odd-numbered days; fasted on even-numbered days, and fed high-fat chow while being gavaged with a cold infusion of 1 g/mL senna at 10 mL/kg each. Induction was continued until the animals were retrieved^[76]	—	(1) 皮肤出现严重水肿、红斑、粗糙、溃烂及结痂、TEWL ↑ (2) 精神萎靡、蜷缩聚堆、毛发污秽油腻、腹泻、大便质软或溏薄、肛周清洁度差^[76] (1) Severe edema, erythema, roughness, ulceration and crusting of the skin, TEWL ↑ (2) Depressed, curled up in piles, dirty and greasy fur, diarrhea, soft or loose stools, poor perianal cleanliness^[76]	

应性模型特征 + 中医证型临床表现”,其效果仍与临床病人有较大出入,所产生的模型症状未必会与病人临床表现相似^[85],未来仍需要研究人员深入去研究更适应的中医证候模型。

现阶段成熟的每种 AD 小鼠模型都具有其独特的特性和优势,例如:半抗原诱导模型具有较低成本,适合深入探究 AD 的分子机制和途径,但诱导剂存在安全隐患,且诱导耗时较长;而过敏原诱导模型应用范围广泛,但操作相对复杂;如:MC903 诱导模型建立迅速,然而不适合探究人类 AD 的病理机制;总体而言,没有哪种模型是完美的,即使是自发型模型小鼠,如 NC 小鼠, *Flg*^{-/-} 小鼠,丝聚蛋白-角蛋白 (*FlgHmr*^{-/-}) 双缺陷小鼠^[86]、C57BL/6J 品系 *Flg*^{fl/fl} 小鼠仍需要半抗原或过敏原刺激下才会出现 AD 样反应,然而这些模型对 AD 发病基因相关机制仍然是不错的选择。

无论是关于中医还是西医对 AD 病证的研究,动物模型选择的目的是最大程度适配研究目的及研究内容,针对临床研究其动物模型尽可能选择与临床症状或病理相近的模型;而针对机制研究则更多选择机制贴近的基因工程模型,只有根据特点去适配不同的动物模型才能达到最好的研究效果。

参 考 文 献 (References)

- [1] RODUIT C, FREI R, DEPNER M, et al. Phenotypes of atopic dermatitis depending on the timing of onset and progression in childhood [J]. JAMA Pediatr, 2017, 171 (7): 655-662.
- [2] HADI H A, TARMIZI A I, KHALID K A, et al. The epidemiology and global burden of atopic dermatitis: a narrative review [J]. Life (Basel), 2021, 11(9): 936.
- [3] SILVERBERG J I, MOHAWK J A, CIRULLI J, et al. Burden of disease and unmet needs in atopic dermatitis: results from a patient survey [J]. Dermatitis, 2023, 34 (2): 135-144.
- [4] FACHERIS P, DA ROSA J C, PAGAN A D, et al. Age of onset defines two distinct profiles of atopic dermatitis in adults [J]. Allergy, 2023, 78(8): 2202-2214.
- [5] RAVNBORG N, AMBIKAIBALAN D, AGNIHOTRI G, et al. Prevalence of asthma in patients with atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis [J]. J Am Acad Dermatol, 2021, 84(2): 471-478.
- [6] KNUDGAARD M H, ANDREASEN T H, RAVNBORG N, et al. Rhinitis prevalence and association with atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2021, 127(1): 49-56.
- [7] THYSSEN J P, HALLING A S, SCHMID-GRENDELMEIER P, et al. Comorbidities of atopic dermatitis-what does the evidence say? [J]. J Allergy Clin Immunol, 2023, 151 (5): 1155-1162.
- [8] CHIRICOZZI A, MAURELLI M, CALABRESE L, et al. Overview of atopic dermatitis in different ethnic groups [J]. J Clin Med, 2023, 12(7): 2701.
- [9] NAPOLITANO M, ESPOSITO M, FARGNOLI M C, et al. Infections in patients with atopic dermatitis and the influence of treatment [J]. Am J Clin Dermatol, 2025, 26(2): 183-197.
- [10] SROKA-TOMASZEWSKA J, TRZECIAK M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4130.
- [11] ZELDIN J, RATLEY G, SHOBNAM N, et al. The clinical, mechanistic, and social impacts of air pollution on atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2024, 154(4): 861-873.
- [12] FANG Z, PAN T, LI L, et al. *Bifidobacterium longum* mediated tryptophan metabolism to improve atopic dermatitis via the gut-skin axis [J]. Gut Microbes, 2022, 14 (1): 2044723.
- [13] SCHNEIDER E, AMAR Y, BUTTER K, et al. Pinewood VOC emissions protect from oxazolone-induced inflammation and dysbiosis in a mouse model of atopic dermatitis [J]. Environ Int, 2024, 192: 109035.
- [14] IWAMOTO K, MORIWAKI M, MIYAKE R, et al. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: strain-specific cell wall proteins and skin immunity [J]. Allergol Int, 2019, 68(3): 309-315.
- [15] VAHER H, KINGO K, KOLBERG P, et al. Skin colonization with *S. aureus* can lead to increased NLRP1 inflammasome activation in patients with atopic dermatitis [J]. J Invest Dermatol, 2023, 143(7): 1268-1278.
- [16] BALAJI H, HERATIZADEH A, WICHMANN K, et al. *Malassezia sympodialis* thioredoxin-specific T cells are highly cross-reactive to human thioredoxin in atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 128(1): 92-99.
- [17] ROTHE M J, GRANT-KELS J M. Diagnostic criteria for atopic dermatitis [J]. Lancet, 1996, 348 (9030): 769-770.
- [18] AFSHARI M, KOLACKOVA M, ROSECKA M, et al. Unraveling the skin; a comprehensive review of atopic dermatitis, current understanding, and approaches [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1361005.
- [19] TSAKOK T, WOOLF R, SMITH C H, et al. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond [J]. Br J Dermatol, 2019, 180(3): 464-474.
- [20] ACEVEDO N, BENFEITAS R, KATAYAMA S, et al. Epigenetic alterations in skin homing CD4⁺ CLA⁺ T cells of atopic dermatitis patients [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 18020.

- [21] LANGAN S M, IRVINE A D, WEIDINGER S. Atopic dermatitis [J]. *Lancet*, 2020, 396(10247): 345–360.
- [22] NAKAZAWA M, SUGI N, KAWAGUCHI H, et al. Predominance of type 2 cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ cells in patients with atopic dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99(5): 673–682.
- [23] BRUNNER P M, LEUNG D Y M, GUTTMAN-YASSKY E. Immunologic, microbial, and epithelial interactions in atopic dermatitis [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2018, 120(1): 34–41.
- [24] CZARNOWICKI T, HE H, KRUEGER J G, et al. Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(1): 1–11.
- [25] LI H, ZHANG Z, ZHANG H, et al. Update on the pathogenesis and therapy of atopic dermatitis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2021, 61(3): 324–338.
- [26] 吴偲, 王彬, 陈秀华. 特应性皮炎病名古今研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(12): 1605–1606.
WU C, WANG B, CHEN X H. Ancient and modern Name studies on atopic dermatitis [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2016, 22(12): 1605–1606.
- [27] 林欢儿, 李孜怡, 彭静, 等. 中医药治疗特应性皮炎研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(11): 29–32.
LIN H E, LI Z Y, PENG J, et al. New progress in the treatment of atopic dermatitis with traditional Chinese medicine [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2019, 21(11): 29–32.
- [28] 陈达灿, 刘焜. 特应性皮炎的禀赋发病因素和心脾病机的理论与实践 [J]. *新中医*, 2009, 41(8): 7–8.
CHEN D C, LIU C. Theory and practice of endowment pathogenesis and heart-spleen pathogenesis of atopic dermatitis [J]. *J New Chin Med*, 2009, 41(8): 7–8.
- [29] 黄楚君, 朱梓波, 薛素琴, 等. 特应性皮炎心脾相关病因病机理论的古文献探析 [J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2018, 17(5): 466–468.
HUANG C J, ZHU Z B, XUE S Q, et al. Analysis of ancient literature on the theory of heart and spleen related etiology and pathogenesis of atopic dermatitis [J]. *Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med*, 2018, 17(5): 466–468.
- [30] 谢晓婷, 胡文梅, 王凯歌, 等. 基于玄府理论论治特应性皮炎 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(1): 138–141.
XIE X T, HU W M, WANG K G, et al. Treatment of atopic dermatitis based on Xuanfu theory [J]. *J Basic Chin Med*, 2024, 30(1): 138–141.
- [31] 孙坤坤, 韩学超, 孙孝凤, 等. 中医药防治特应性皮炎研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 266–273.
SUN K K, HAN X C, SUN X F, et al. Prevention and treatment of atopic dermatitis with traditional Chinese medicine: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(5): 266–273.
- [32] RAJKA G, LANGE LAND T. Grading of the severity of atopic dermatitis [J]. *Acta Derm Venereol*, 1989, 144: 13–4.
- [33] HANIFIN J M. Atopic dermatitis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1982, 6(1): 1–13.
- [34] WILLIAMS H C. Diagnostic criteria for atopic dermatitis [J]. *Lancet*, 1996, 348(9038): 1391–1392.
- [35] WILLIAMS H C, JBURNEY P G, PEMBROKE A C, et al. The U. K. working party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. III. independent hospital validation [J]. *Br J Dermatol*, 1994, 131(3): 406–416.
- [36] 中华医学会皮肤性病学分会免疫学组、特应性皮炎协作研究中心. 中国特应性皮炎诊疗指南(2014 版) [J]. *全科医学临床与教育*, 2014, 12(6): 603–606, 615.
Collaborative Research Center for Atopic Dermatitis, Immunology Group of the Dermatology and Venereology Branch of the Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of atopic dermatitis in China (2014 edition) [J]. *Clin Educ Gen Pract*, 2014, 12(6): 603–606, 615.
- [37] 莫秀梅, 刘俊峰, 林颖, 等. 特应性皮炎中西医结合临床实践指南(草案) [J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2024, 23(3): 249–258.
MO X M, LIU J F, LIN Y, et al. Clinical practice guide of integrated traditional Chinese and western medicine for atopic dermatitis (draft) [J]. *Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med*, 2024, 23(3): 249–258.
- [38] 王建琴. 中国特应性皮炎诊疗指南(2020 版)解读 [J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2020, 27(5): 359–361.
WANG J Q. Interpretation of Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of atopic dermatitis (2020) [J]. *J Diagn Ther Derm Venereol*, 2020, 27(5): 359–361.
- [39] EWALD D A, NODA S, OLIVA M, et al. Major differences between human atopic dermatitis and murine models, as determined by using global transcriptomic profiling [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(2): 562–571.
- [40] SASAKI T, SHIOHAMA A, KUBO A, et al. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(5): 1111–1120.
- [41] SAUNDERS S P, GOH C S M, BROWN S J, et al. Tmem79/Matt is the matted mouse gene and is a predisposing gene for atopic dermatitis in human subjects [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(5): 1121–1129.
- [42] MUHANDES L, CHAPSA M, PIPPEL M, et al. Low threshold for cutaneous allergen sensitization but No spontaneous dermatitis or atopy in FLG-deficient mice [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(11): 2611–2619.
- [43] SUTO H, MATSUDA H, MITSUISHI K, et al. NC/Nga

- mice; a mouse model for atopic dermatitis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 120(1): 70–75.
- [44] ZHENG R, REN Y, LIU X, et al. Exogenous drug-induced mouse models of atopic dermatitis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2024, 77: 104–116.
- [45] PRESLAND R B, BOGGESE D, LEWIS S P, et al. Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice; an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(6): 1072–1081.
- [46] KAWASAKI H, NAGAO K, KUBO A, et al. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(6): 1538–1546.
- [47] SAUNDERS S P, MORAN T, FLOUDAS A, et al. Spontaneous atopic dermatitis is mediated by innate immunity, with the secondary lung inflammation of the atopic March requiring adaptive immunity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(2): 482–491.
- [48] ARCHER N K, JO J H, LEE S K, et al. Injury, dysbiosis, and filaggrin deficiency drive skin inflammation through keratinocyte IL-1 α release [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 143(4): 1426–1443.
- [49] SCHWARTZ C, MORAN T, SAUNDERS S P, et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice with a defective skin barrier is independent of ILC2 and mediated by IL-1 β [J]. *Allergy*, 2019, 74(10): 1920–1933.
- [50] JEE M H, JOHANSEN J D, BUUS T B, et al. Increased production of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells in the Thymus of filaggrin-deficient mice [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 988.
- [51] HOFF S, OYOSHI M K, HORNICK J L, et al. MyD88 signaling in T regulatory cells by endogenous ligands dampens skin inflammation in filaggrin deficient mice [J]. *Clin Immunol*, 2018, 195: 88–92.
- [52] PARK H J, LEE S W, PARK S H, et al. Selective expansion of double-negative iNKT cells inhibits the development of atopic dermatitis in V α 14 TCR transgenic NC/nga mice by increasing memory-type CD8 $^{+}$ T and regulatory CD4 $^{+}$ T cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(6): 1512–1521.
- [53] HASHIMOTO Y, TAKAOKA A, SUGIMOTO M, et al. Itch-associated scratching contributes to the development of dermatitis and hyperimmunoglobulinemia E in NC/Nga mice [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(10): 820–825.
- [54] KIM H M, KANG Y M, LEE M, et al. Papain suppresses atopic skin inflammation through anti-inflammatory activities using *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(8): 928.
- [55] RIEDL R, KÜHN A, HUPFER Y, et al. Characterization of different inflammatory skin conditions in a mouse model of DNCB-induced atopic dermatitis [J]. *Inflammation*, 2024, 47(2): 771–788.
- [56] 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.
- [57] RIEDL R, KÜHN A, RIETZ D, et al. Establishment and characterization of mild atopic dermatitis in the DNCB-induced mouse model [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12325.
- [58] KIM H H, JEONG S H, PARK M Y, et al. The skin histopathology of pro- and parabiotics in a mouse model of atopic dermatitis [J]. *Nutrients*, 2024, 16(17): 2903.
- [59] LEE J H, CHOI C S, BAE I H, et al. A novel, topical, nonsteroidal, TRPV1 antagonist, PAC-14028 cream improves skin barrier function and exerts anti-inflammatory action through modulating epidermal differentiation markers and suppressing Th2 cytokines in atopic dermatitis [J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 30: S0923.
- [60] YUN J W, SEO J A, JEONG Y S, et al. TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery [J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 62(1): 8–15.
- [61] LEE S, PARK N J, BONG S K, et al. Ameliorative effects of *Juniperus rigida* fruit on oxazolone- and 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 214: 160–167.
- [62] YANABA K, KAMATA M, ASANO Y, et al. CD19 expression in B cells regulates atopic dermatitis in a mouse model [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(6): 2214–2222.
- [63] WANG G, SAVINKO T, WOLFF H, et al. Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice [J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(1): 151–161.
- [64] YATSUZUKA R, INOUE T, JIANG S, et al. Development of new atopic dermatitis models characterized by not only itching but also inflammatory skin in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 565(1/2/3): 225–231.
- [65] SHARMA S, SETHI G S, NAURA A S. Curcumin ameliorates ovalbumin-induced atopic dermatitis and blocks the progression of atopic march in mice [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 358–369.
- [66] HASHIMOTO T, YOKOZEKI H, KARASUYAMA H, et al. IL-31-generating network in atopic dermatitis comprising macrophages, basophils, thymic stromal lymphopoietin, and periostin [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2023, 151(3): 737–746.
- [67] NAIDOO K, JAGOT F, VAN DEN ELSEN L, et al. Eosinophils determine dermal thickening and water loss in an MC903 model of atopic dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(12): 2606–2616.
- [68] ZHANG S, FANG X, XU B, et al. Comprehensive analysis of phenotypes and transcriptome characteristics reveal the best atopic dermatitis mouse model induced by MC903 [J]. *J Dermatol Sci*, 2024, 114(3): 104–114.

- [69] ZHENG J, YAO L, ZHOU Y, et al. A novel function of NLRP3 independent of inflammasome as a key transcription factor of IL-33 in epithelial cells of atopic dermatitis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 871.
- [70] GAO J, LI D, FENG Z, et al. Diterpenoid DGT alleviates atopic dermatitis-like responses *in vitro* and *in vivo* via targeting IL-4R α [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 179: 117321.
- [71] KIM A R, JEON S G, KIM H R, et al. Preventive and therapeutic effects of *Lactiplantibacillus plantarum* HD02 and MD159 through mast cell degranulation inhibition in mouse models of atopic dermatitis [J]. Nutrients, 2024, 16(17): 3021.
- [72] 世界医学会皮肤病专业委员会. 国际中医临床实践指南 特应性皮炎 [J]. 世界中医药, 2021, 16(16): 2367–2370.
- Specialty Committee of Dermatology of WFCMS. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of atopic dermatitis in Chinese medicine [J]. World Chin Med, 2021, 16(16): 2367–2370.
- [73] 钱佳丽, 刘久利, 何静岩, 等. 健脾益肠方对脾虚型特应性皮炎小鼠模型的免疫调节作用及其机制研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(2): 211–214, 226.
- QIAN J L, LIU J L, HE J Y, et al. Immune regulations and mechanism of Jianpi Yichang formula in model mice with atopic dermatitis of spleen deficiency type in TCM [J]. World J Integr Tradit West Med, 2019, 14(2): 211–214, 226.
- [74] 段昱竹, 朱慧婷, 曲剑华. 健脾润肤汤对特应性皮炎脾虚证小鼠皮损及细胞炎症因子的影响 [J]. 北京中医药, 2023, 42(11): 1219–1224.
- DUAN Y Z, ZHU H T, QU J H. Effect of Jianpi Runfu Decoction on skin lesions and cytoinflammatory factors in mice with atopic dermatitis of spleen deficiency syndrome [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2023, 42(11): 1219–1224.
- [75] 吴汶丰, 余彦栩, 吴清, 等. 特应性皮炎寒湿证病证结合小鼠模型的构建研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(9): 1500–1507.
- WU W F, YU Y X, WU Q, et al. Construction research of A disease syndrome combination mouse model of cold dampness syndrome with atopic dermatitis [J]. J Basic Chin Med, 2024, 30(9): 1500–1507.
- [76] 钟婷靖, 刘秦, 黎雄, 等. 特应性皮炎脾虚湿蕴病证结合动物模型的构建与评价 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(6): 862–869.
- ZHONG T J, LIU Q, LI X, et al. Construction and evaluation of animal model with spleen deficiency and dampness stagnation syndrome combining atopic dermatitis [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(6): 862–869.
- [77] FISHBEIN A B, SILVERBERG J I, WILSON E J, et al. Update on atopic dermatitis: diagnosis, severity assessment, and treatment selection [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2020, 8(1): 91–101.
- [78] GILHAR A, REICH K, KEREN A, et al. Mouse models of atopic dermatitis: a critical reappraisal [J]. Exp Dermatol, 2021, 30(3): 319–336.
- [79] GITTLER J K, SHEMER A, SUÁREZ-FARIÑAS M, et al. Progressive activation of T(H)₂/T(H)₂₂ cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 130(6): 1344–1354.
- [80] BERGMANN S, VON BUENAU B, VIDAL-Y-SY S, et al. Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2024.
- [81] KEREN A, REICH K, BERTOLINI M, et al. Autologous Th2-polarized lymphocytes induce atopic dermatitis lesions in non-atopic human skin xenotransplants [J]. Allergy, 2023, 78(6): 1538–1553.
- [82] ZENG B, LIU X, ZHOU Y, et al. Effect of a topical traditional Chinese herbal medicine on skin microbiota in mouse model of atopic dermatitis [J]. Heliyon, 2024, 10(13): e33240.
- [83] LI H, LIANG J, LI P, et al. *Schizonepeta tenuifolia* Briq-*Saposhnikovia divaricata* decoction alleviates atopic dermatitis via downregulating macrophage TRPV1 [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1413513.
- [84] 罗瑞静, 李淑, 刘杰, 等. 健脾祛风汤对特应性皮炎患儿肠道菌群生物多样性的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2023, 18(5): 944–947, 953.
- LUO R J, LI S, LIU J, et al. Effect of Jianpi Qufeng decoction on intestinal flora biodiversity in patients with atopic dermatitis [J]. World J Integr Tradit West Med, 2023, 18(5): 944–947, 953.
- [85] 赵琳, 平瑞月, 刘俊峰, 等. 特应性皮炎脾虚湿蕴证患者的皮损表现特征分析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(2): 275–280.
- ZHAO L, PING R Y, LIU J F, et al. Analysis of the characteristics of skin lesions in patients with atopic dermatitis with spleen deficiency and dampness accumulation syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2024, 30(2): 275–280.
- [86] RAHRIG S, DETTMANN J M, BRAUNS B, et al. Transient epidermal barrier deficiency and lowered allergic threshold in filaggrin-homerin (FlgHmr^{-/-}) double-deficient mice [J]. Allergy, 2019, 74(7): 1327–1339.

安丽娟,周静晖,祁羽菲,等. 铁过载小鼠模型构建的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 593–606.

AN L J, ZHOU J H, QI Y F, et al. Research progress on the construction of mouse models of iron overload [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 593–606.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.013

铁过载小鼠模型构建的研究进展

安丽娟¹, 周静晖¹, 祁羽菲¹, 曾丽蓉^{2*}, 郝征²

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津 301617; 2. 天津中医药大学中医学院, 天津 301617)

【摘要】 铁过载是指体内铁含量超过生理需求, 导致铁在器官中沉积的病理状态。铁过载小鼠模型是研究铁代谢紊乱和相关疾病的重要工具。本文综述了目前铁过载小鼠模型构建中较为常用的造模方法, 主要分为两类: (1) 通过肠外补铁 (注射铁剂) 或肠内补铁 (口服铁剂) 构建外源性铁过载小鼠模型; (2) 通过筛选特定小鼠品系或铁代谢相关基因修饰构建自发性铁过载模型。肠外补铁周期短、成功率高, 适用于单一和复合铁过载模型。但高吸收率可能引起毒性反应, 需预实验确定最佳剂量。肠内补铁操作简单、安全, 但吸收率低, 造模周期长。自发性铁过载模型主要用于特定的基因研究, 操作复杂、成本高。不同的造模方法基本能够对应临床中原发性及继发性铁过载相关疾病, 有助于深入理解铁过载的病理机制, 并为开发新的治疗方法提供实验基础。

【关键词】 铁过载; 小鼠模型构建; 评价指标

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0593-14

Research progress on the construction of mouse models of iron overload

AN Lijuan¹, ZHOU Jinghui¹, QI Yufei¹, ZENG Lirong^{2*}, HAO Zheng²

(1. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Corresponding author: ZENG Lirong. E-mail: zlr87108@126.com

【Abstract】 Iron overload refers to the pathological state in which the iron content in the body exceeds physiological requirements, resulting in the deposition of iron in the organs. Iron overload mouse models are an important tool for the study of iron metabolism disorders and related diseases. This paper summarizes the commonly used modeling method used in the construction of iron overload mouse models, which mainly comprise two categories. (1) exogenous iron overload mouse models, constructed through supplementation with extraenteral iron (injected iron) or intrainestinal iron (oral iron); (2) spontaneous iron overload models, constructed by screening for specific mouse lines or modifying iron metabolism-related genes. The method involving extraenteral iron supplementation has a short modeling duration and a high success rate, making it suitable for single and composite iron overload models. However, the high iron absorption rate may cause toxic reactions; thus, the optimal dose needs to be determined in advance. By contrast, intrainestinal iron supplementation is simple and safe, but has a low iron absorption rate and a long modeling duration. The spontaneous iron overload model is mainly used for specific genetic research studies,

【基金项目】 天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研课题 (2023082)。

Funded by Tianjin Municipal Health Commission's Traditional Chinese Medicine and Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Scientific Research Project (2023082).

【作者简介】 安丽娟, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医临床基础。Email: 1341990249@qq.com

【通信作者】 曾丽蓉, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中西医结合治疗血液病机制。Email: zlr87108@126.com

which are complex and involve high costs. The various modeling method offer diverse research pathways, spanning from molecular to systemic levels. This diversity is conducive to gaining an in-depth understanding of the pathological mechanisms underlying iron overload and provides an experimental basis for the development of new treatments.

【Keywords】 iron overload; mouse model construction; evaluation indicators

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

铁过载是指由于体内铁的供给超过铁的需求、铁利用障碍、相关基因突变等原因导致铁广泛沉积于人体器官和组织的实质细胞,常伴有纤维组织显著增生,导致多脏器的结构损害和功能障碍^[1]。铁过载显著增加各类疾病的发病风险,包括肝疾病、糖尿病、心血管疾病、神经退行性疾病、癌症、肾疾病、骨骼疾病和感染性疾病等^[2-3]。

随着对铁过载发病机制的认识和新药开发的研究增多,建立稳定可靠的与人体铁过载发病相近或相似的动物模型显得极为重要。因小鼠的生理特征与人类相似,且具备遗传背景清晰、实验操作成熟、检测手段丰富等特征,在铁过载相关的实验研究中,多将小鼠作为实验对象,其品种包括 C57BL/6、BALB/c、ICR 等。目前关于铁过载小鼠模型的造模方式种类繁多,各有优势与不足。本文就近年来铁过载经典小鼠模型的造模机制和方法等相关研究进行梳理,旨在对铁过载小鼠模型的合理构建提供方法与思路。

1 铁过载概述

铁是一种基本的无机营养素,参与体内多种生化反应,如能量获取或氧气运输等均需要足量的铁供应^[4]。成年人体内约含 3.5 ~ 4.5 g 铁,其主要来源为衰老的红细胞和膳食中的铁摄入^[5]。一般情况下,铁是高度保守的,不易从体内流失。人体没有明确的铁排泄机制,但正常生理情况下,机体通过细胞脱落、汗液、尿液、粪便以及月经等方式排出微量的铁。每天损失的铁含量为 1 ~ 2 mg^[6]。无论铁的生理浓度如何,系统性铁排泄都以几乎稳定的基础速率排出^[7]。一般情况下,若机体出现血清铁含量升高、血清铁蛋白水平增加及转铁蛋白饱和度增加等情况,则提示发生铁过载。过量的铁以未结合的形式存在,易在二价和三价形式之间变化,因此常作为电子载体,催化各类生化反应。如过量的铁通过芬顿(Fenton)反应产生大量的活性氧(reactive oxygen

species, ROS),导致严重的氧化应激,并进一步破坏脂质、DNA、蛋白质等生物分子,引起细胞毒性。分子和细胞水平的损伤最终会导致器官功能障碍^[8]。因此,铁过载具有毒性作用。

铁过载一般分为原发性铁过载(先天性铁代谢障碍)与继发性铁过载(长期输血治疗等)^[9](见表 1)。铁在生理情况下受到细胞及全身水平的严格调控。铁的全身调节主要通过铁转运蛋白(ferroportin, FPN)和铁调素(hepcidin, HEPC)之间的相互作用来完成^[10]。FPN 主要在十二指肠黏膜细胞、肝细胞和巨噬细胞中表达。它介导膳食铁的吸收、肝铁释放和巨噬细胞中铁再循环的调节。HEPC 是一种在肝中产生的肽激素,是铁稳态的关键调控因子^[11]。它在血浆中循环并与 FPN 结合,诱导其降解。当体内有足量铁时,肝产生 HEPC,阻止铁从食物中继续被吸收。当铁储备不足时,HEPC 的产生被抑制,FPN 介导的铁从十二指肠黏膜细胞输出和铁向转铁蛋白的转移得以顺利进行^[12]。因此,HEPC/FPN 调节系统的紊乱、HEPC 低表达、铁转运障碍、肠道铁吸收增加等均可引起机体铁过载。此外,长期输血治疗作为铁过载的另一大诱因:一方面,输入的红细胞浓缩物富含铁质,其含量超出了机体自身的铁代谢能力范围,导致多余的铁元素在体内组织长期累积,影响组织器官功能;另一方面,长期输血抑制患者自身造血功能,减少机体对铁の利用,进一步加重铁在体内的蓄积。研究表明,长期输血患者每年的铁负荷量与输血量及平均红细胞比容成正比^[13]。

越来越多的证据表明,铁过载参与了多种疾病的进展,但是铁过载在其中所扮演的角色和确切机制尚不清楚。在关于铁过载的研究中,建立合适的动物模型来模拟铁过载造成疾病的相关机制和新药的研发成为了广泛关注的热点^[14-16]。目前,铁过载小鼠模型的构建方法主要分为两类:(1)通过摄入外源性铁剂,增加机体铁负

表 1 常见发生铁过载的疾病及机制

Table 1 Common diseases associated with iron overload and the mechanisms		
常见发生铁过载的疾病分类 Classification of diseases with iron overload		铁过载发生机制 Mechanisms of iron overload
原发性铁过载 Primary iron overload	基因突变 Gene mutation	各种类型的遗传性血色沉着症 Various types of hereditary hemochromatosis (HH)
	遗传性贫血伴无效红细胞生成 Hereditary anemia with ineffective erythropoiesis	先天性铁粒幼细胞性贫血 Congenital sideroblastic anemia
		先天性红细胞生成障碍性贫血 Congenital dyserythropoietic anemia
继发性铁过载 Secondary iron overload	无效性红细胞生成 Ineffective erythropoiesis	非输血依赖性地中海贫血 Non-transfusion-dependent thalassemia (NTDT)
		骨髓增生异常综合征 Myelodysplastic syndrome (MDS)
	慢性输血治疗 Chronic transfusion therapy	再生障碍性贫血 Aplastic anemia
		原发性骨髓纤维化 Primary myelofibrosis
		铁调素/铁转运蛋白系统紊乱 Disordered HEPC/FPN system
		铁转运障碍 Disordered iron transport
		肠道铁吸收增加 Increased intestinal iron absorption
		肠道铁吸收增加 Increased intestinal iron absorption
		红细胞浓缩物提供高铁 High iron supply from red cell concentrates

荷,构建继发性铁过载模型;(2)通过筛选特定小鼠品系,或经铁代谢调控基因修饰,破坏 HEPC/FPN 调节系统,导致铁代谢紊乱,进而构建自发性铁过载模型。

这两类模型构建方法引起的铁代谢失衡病理过程如下:一方面,过量的铁进入血液循环,血清铁水平升高;另一方面,铁积累导致氧化应激,损伤细胞和组织,进而引发诸多病理表现。体内铁储存在网状内皮系统中,故过量铁首先沉积于肝、脾。当铁在体内过度蓄积,将导致转铁蛋白饱和度升高,非转铁蛋白结合铁形成,对铁敏感的靶器官如心脏、内分泌腺具有不同于网状内皮系统可控的铁摄取、清除机制,直接摄取循环中的非转铁蛋白结合铁,导致铁过度沉积。因此,铁过载常累及肝、脾、心脏和内分泌腺,并依据铁的沉积速度及程度的差异,对其产生不同程度的功能性和结构性的影响,进而在整体上改变机体的生理状态并引发一系列与铁过载相关的疾病表现。衡量铁过载模型的成功与否及稳定性,通常取决于组织器官层面过量铁所致的病理表现。

2 外源性铁过载小鼠模型的构建方法

根据铁剂的吸收途径,可将外源性铁过载模型的构建方法分为肠外补铁和肠内补铁两种类型。肠外补铁通过注射等方式直接将铁剂输送至血液循环,而肠内补铁则通过口服铁剂使铁经

胃肠道吸收进入体内。不同的给药方式直接影响铁过载模型的建立和实验结果的解读。

2.1 注射外源性铁剂(肠外补铁)

2.1.1 注射性铁剂的选择

自 1927 年起,人们就开始对在动物体内引入不同形式的过量铁的后果进行了反复研究,如离子铁胶体氢氧化铁或糖化氧化铁的化合物等^[17-18]。目前在铁过载模型构建中常用的注射铁剂有:右旋糖酐铁(iron dextran, FeDx)、蔗糖铁(iron sucrose)、铁糊精(iron dextrin)和枸橼酸铁铵(ferric ammonium citrate, FAC)等。

将氢氧化铁与低分子量的右旋糖酐结合制成的 FeDx^[19]具有吸收良好、pH 稳定、低毒性等特性,且价格便宜,给药方便,可经腹腔、皮下、肌肉等多途径给药,故被广泛应用于实验研究中。但 FeDx 释放铁离子的速度较快,或对部分组织造成一定的毒性作用或不良反应。与 FeDx 相比,蔗糖铁^[20]生物利用度更高,安全性更高,总体不良反应率明显降低。但是,从铁-碳水化合物复合物的稳健性来看,蔗糖铁的稳健性较差,容易释放更多不稳定的铁,铁过载程度较难控制。铁糊精^[21]在小鼠体内的分布较为均匀,毒性小,作用持久,有较好的稳定性。但是,铁糊精在小鼠体内释放铁离子的速度相对较慢,给药剂量较难控制,且价格较高。FAC^[22]多应用于体外研究中,在小鼠铁过载模型中应用较少。因为 FAC 铁离子的释放和吸收相对复杂,小鼠体内的消化系

统会对 FAC 进行一系列的处理,使得铁离子的释放和吸收难以精确控制。综合来看,在铁过载小鼠模型的构建中,FeDx 是注射性外源性铁剂的最佳选择,在实验研究中应用最为普遍。

另外,肠外补铁剂多以肌肉注射或静脉注射的方式应用于临床^[23-24],但在广泛性的铁过载小鼠模型中常采取腹腔注射的给药方式来进行模型的建立(见表 2、表 3)。原因在于,肌肉注射、皮下注射或尾静脉注射的方式容易引起注射部位痉挛或坏死。腹腔注射能降低这些风险,且经腹腔注射的铁制剂吸收水平较高,所需造模周期较短。通过腹腔注射来建立的小鼠模型大多 4 ~ 8 周即可达到较高水平的铁过载。

2.1.2 小鼠品系的选择

在铁过载模型构建中,C57BL/6、BALB/c 与 ICR 小鼠为常用品系,三者因自身特性差异而在应用中有所不同。C57BL/6 小鼠因具备稳定的遗传背景和良好的繁殖性能而被广泛应用于实验研究中,是铁过载模型构建时的首选小鼠品系。该品系起源于 Abby Lathrop 的近亲繁育,衍生出 C57BL/6N、C57BL/6J 等多个亚系。不同亚系的小鼠在遗传、生理和行为上存在显著差异^[25]。例如,C57BL/6J 小鼠对高脂饮食敏感,适用于代谢综合症的研究与造模,陈洁等^[26]在探究铁过载对不同高脂膳食所致肝损伤影响时采用其构建铁过载合并非酒精性肝病复合模型。此外,C57BL/6 是首个完成基因组测序的小鼠品系,其在基因操作中具有卓越的稳定性和可预测性,C57BL/6N 亚系被国际敲除小鼠联盟选为标准背景品系,使其成为转基因和基因敲除模型的首选。

BALB/c 小鼠起源于 DBA 和 Bagg 白化病衍生形成的近交系小鼠,与 C57BL/6 小鼠均具有近交系遗传背景一致的优势。但 BALB/c 小鼠在细胞因子合成和免疫反应方面具有独特性,故被广泛应用于免疫学相关的实验研究中^[25]。在再生障碍性贫血合并铁过载的实验研究中,需经免疫介导构建再障模型,常优先选择 BALB/c 小鼠^[27-28]。

ICR 小鼠起源于 Swiss 小鼠群,属于远交群小鼠。与近交系的 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠相比,ICR 小鼠在与高级神经系统相关的行为学表现中,展现出更强的探索能力和记忆力^[29]。在特定

研究领域,如探索铁过载对脑铁分布与脑功能影响的机制研究中,ICR 小鼠因其独特的生物学特性而被选用^[30]。然而,ICR 小鼠在构建铁过载模型中的使用相对较少,这可能与遗传背景的多样性有关。不同国家引进的 ICR 小鼠群体间存在遗传差异,这可能影响实验结果的一致性和重复性。相比之下,C57BL/6 和 BALB/c 小鼠因其遗传背景的均一性,更能确保实验结果的稳定性和可靠性。在构建铁过载模型时,应综合考虑研究对象、实验目的和疾病种类,谨慎选择适宜的小鼠品系。

在建立单一铁过载模型时,不同造模方案中的给药剂量、给药时间、注射频率与方式等存在明显差异(见表 2)。若注射过于频繁、剂量过大易引起小鼠死亡,而剂量过小、间隔时间长则造模周期延长。以 FeDx 为例,近年来的相关实验研究表明,其注射总量低至 0.72 g/kg^[38],高至 8 g/kg 均能成功诱导铁过载。单次注射量一般在 100 ~ 200 mg/kg,注射次数为 8 ~ 14 次,造模周期在 4 ~ 8 周。造模结束后,铁过载小鼠模型评价多依靠血液学指标和组织学检查结果。血液学指标以血清铁为主,组织学检查方法多采用原子吸收分光光度法检测组织铁沉积水平或组织切片镜下观察铁含量等。一般多选择铁过载最常影响的肝、脾、心脏、胰腺等组织进行铁含量测定,以核验铁过载模型的成功建立。

大多数研究指出,小鼠模型的铁过载程度随注射铁剂剂量增加而加重,然而部分研究得出了相反的结论。如 MUSUMECI 等^[32]使用 C57BL/6 和 B6D2F1 两种品系小鼠行腹腔注射 FeDx 造模时发现肝铁含量随时间推移明显降低,且大量铁通过消化道排泄,而 C57BL/6 小鼠这种改变更为明显;GOLBERG 等^[40]和 CHAPPELLE 等^[41]观察到肌肉注射 FeDx 构建的铁过载模型大量铁从尿液中排出,这种铁的排出可能与肾损伤有关。上述现象提示啮齿类动物可能存在不同于人类的铁排泄机制,对维持小鼠组织细胞恒定高铁浓度有不利影响。由于样本数量较少,还需扩大样本数量以得出更为可靠的结论。

目前,关于铁过载合并其他疾病的复合小鼠模型的实验研究中,所涉及的病种包括血液系统疾病、肾疾病、骨骼疾病等(见表 3)。

表 2 肠外补铁构建单一铁过载小鼠模型的造模方案

Table 2 Modelling schemes for constructing a single iron overload mouse model by intestinal iron supplementation

小鼠品种 Mouse species	造模方法 Modelling method	给药方案 Dosing regimen	给药总剂量 Total dose	造模时长 Duration	评价指标 Evaluation indicators
C57BL/6 ^[31]		每次 12.5、25、50 mg/mL, 0.2 mL, 每日 3 次, 共 14 次 12.5, 25, 50 mg/mL, 0.2 mL each time, 3 times a day, for a total of 14 times	35、70、140 mg	6 周 6 weeks	小鼠状态, 肝、脾和骨髓的铁沉积 General condition of the mice, iron deposition in the liver, spleen and bone marrow
C57BL/6, B6D2F1 ^[32]		1 g/kg, 每次 1 周, 共 8 次 1g/kg, once a week, for a total of 8 times	8 g/kg	8 周 8 weeks	尿与粪便中的铁排泄, 肝、心脏组织的铁沉积 Iron excretion in urine and feces, iron deposition in liver and heart tissues
C57BL/6 ^[33-34]		每次 10 mg, 每周 2 次, 共 8 次 10 mg each time, twice a week, for a total of 8 times	80 mg	4 周 4 weeks	血常规, 血清铁, 肝、脾、心脏、股骨铁沉积, 血清铁调素水平 Blood cell count, serum iron level, iron deposition in the liver, spleen, heart and femur, serum hepcidin level
C57BL/6J ^[35]	腹腔注射 FeDx Intraperitoneal injection of FeDx	每次 0.25、0.5、1.0 g/kg, 0.2 mL, 2 次/周, 共 8 次 0.25, 0.5, 1.0 g/kg, 0.2 mL each time, twice a week, for a total of 8 times	2、4、8 g/kg	4 周 4 weeks	体质量, 肝、脾、股骨病理改变, 血清铁蛋白水平 Body mass of mice, pathological changes in the liver, spleen and femur, and the level of serum ferritin
C57BL/6 ^[36-38]		0.1、0.5、1.0 g/kg, 1 次/周, 共 8 次 0.1, 0.5, 1.0 g/kg, once a week, for a total of 8 times	0.8、4、8 g/kg	8 周 8 weeks	血清和脑、心脏、肺、肝、脾、肾、子宫、卵巢及其周围脂肪组织中的铁含量及铁蛋白水平 Iron content and ferritin levels in serum, brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, uterus, ovary and the surrounding adipose tissue
ICR ^[30]		每周 0.1 g 或 1 g, 共 8 次 0.1g or 1g per week, for a total of 8 times	0.8、8 g/kg	8 周 8 weeks	椎间盘组织病理改变, 松质骨和终板组织的铁沉积 Pathological changes of intervertebral disc tissue, iron deposition in cancellous bone and endplate tissue
		200 mg/kg (用 0.9% NaCl 稀释), 每日 2 次, 共 14 次 200mg/kg (diluted with 0.9% NaCl), twice a day, for a total of 14 times	2.8 g/kg	4 周 4 weeks	血清和脑脊液中的铁含量, 肝、脾、海马、纹状体、黑质和嗅球铁沉积和溶酶体功能 Iron content in serum and cerebrospinal fluid, iron deposition in the liver, spleen, hippocampus, striatum, substantia nigra and olfactory bulb, and the function of lysosomes
		120 mg/kg, 每周 2 次, 共 6 次 120 mg/kg, twice a week, for a total of 6 times	0.72 g/kg	12 周 12 weeks	血清铁及总铁结合力水平, 胰腺组织铁沉积 Levels of serum iron and total iron binding capacity, iron deposition in pancreatic tissue
		每次 10 mg, 每日 2 次, 共 14 次 10mg each time, twice a day, for a total of 14 times	140 mg	28 d	小鼠形态变化, 肝、脑组织的铁沉积 Morphological changes of mice, iron deposition in the liver and brain tissues
C57BL/6 ^[39]	腹腔注射蔗糖铁 Intraperitoneal injection of iron sucrose	200 mg/kg, 每日 2 次, 共 14 次 200 mg/kg, twice a day, for a total of 14 times	2.8 g/kg	4 周 4 weeks	心脏、肝组织铁浓度 Iron concentration in the heart and liver tissues

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 是一组异质性克隆性骨髓疾病,其特征是无效造血和外周血细胞减少。无效造血使得红细胞破坏过多,刺激肠道铁吸收增加^[49]。再生障碍性贫血是一种骨髓造血功能衰竭综合征,约 20% 患者在发病初期由于自身铁代谢机制紊乱,出现铁过载^[50]。此外,输血治疗作为 MDS、再生障碍性贫血等血液系统疾病重要的支持治疗手段,不可避免地引起继发性铁过载。

终末期肾病患者由于存在肾性贫血,使用促红细胞生成素治疗后往往伴随着“功能性铁缺乏”,因此需要静脉补铁治疗。与此同时,慢性肾病患者体内 HEPC 的清除减少和慢性炎症状态的存在使得血清 HEPC 水平升高,从而抑制铁の利用,进一步导致铁过载^[51-52]。

在骨骼疾病合并铁过载的情况下,骨代谢相关疾病常作为铁过载相关疾病的重要并发症出现^[53]。如 HH 患者多伴有不同程度的骨质疏松现象。铁过载可以通过抑制成骨细胞分化、增殖和刺激破骨细胞生成来破坏骨稳态^[54],从而对关节稳态和关节功能产生不利影响。

经综述可知,构建复合铁过载模型时,研究者多选择先构建铁过载、后构建其他疾病模型。其优势有二:其一,在技术操作方面,相比构建其它疾病模型时可能需要更复杂的技术操作如基因工程、手术干预等,铁过载模型方法较为成熟,更容易控制,因此可以在相对简单的实验条件下先构建铁过载模型,为后续复杂的疾病模型构建打下基础;其二,在铁过载模型稳定建立后逐步引入其他疾病的诱导因素,可以更好地控制实验进度,避免多个复杂因素同时进行导致实验结果的不确定性增加。不足之处在于,注射外源性铁剂意在增加机体铁负荷,多用于模拟长期输血治疗等引发的继发性铁过载,无法模拟体内 HEPC 水平变化、自身铁代谢机制紊乱或慢性炎症状态下引发的铁过载。

注射外源性铁剂是目前铁过载动物模型中应用最多的造模方法,有复制周期短、成功率高等优势。故此方法不仅应用于建立单一铁过载动物模型,还广泛应用于构建铁过载合并其他疾病的复合模型中。一般情况下,构建单一铁过载模型所输入的铁剂总量平均水平为 4 ~ 8 g/kg。

而构建复合铁过载模型时,考虑小鼠受到其他疾病和铁过载的双重影响,故输入的铁剂总量较低,平均为 2 ~ 4 g/kg。模型评价均以血清铁含量和肝、脾、心脏、胰腺等组织的铁含量测定结果为主。

2.2 口服外源性铁剂(肠内补铁)

直接口服铁剂存在严重的胃肠副作用,易引发便秘、腹泻、胃痉挛等。一些具有缓释特性的铁制剂的出现,在一定程度上规避了这些问题^[55]。其中,羰基铁和柠檬酸铁(ferric citrate, FC)常作为食源性铁制剂应用于铁过载模型的构建中。

2.2.1 羰基铁

羰基铁是一种高度纯净的零价铁制剂,具有良好的生物利用度和较高的安全性,常被添加到小鼠饲料中制成高铁饲料,参与铁过载小鼠模型的构建过程。羰基铁在胃酸的作用下,缓慢释放出铁离子,主要在十二指肠和空肠上段被吸收。过量的铁最终在肝细胞内质网系统沉积,形成主要的肝细胞铁沉积。PIGEON 等^[56]发现 BALB/cJ 小鼠摄入不同浓度羰基铁后,肝铁浓度随剂量和时间增加,并在 3% 羰基铁剂量下出现肝细胞异常有丝分裂和肝纤维化的现象。AREZZINI 等^[57]比较了 3% 羰基铁饲料喂养 8 周小鼠与正常饮食小鼠,发现肝铁浓度等指标存在明显差异。WANG 等^[58]通过给野生型小鼠断奶后喂食富含羰基铁 8.3 g/kg 的高铁饮食促进体内铁过载。总的来说,研究者多选择 3% 羰基铁剂量用于构建慢性食源性铁过载模型^[59],但亦可根据实验需要对羰基铁含量和喂养时间进行调整,以达到预期的铁过载程度。

2.2.2 FC

FC 是一种有机铁复合物,主要以三价铁(Fe^{3+})的形式存在,通过与转铁蛋白受体结合,以转铁蛋白-FC 复合物的形式被细胞摄取。柠檬酸根离子可以帮助 Fe^{3+} 保持溶解状态,有利于其与受体的结合和转运。持续给予 FC 会导致体内铁储存蛋白饱和,多余的铁以含铁血黄素的形式在细胞内外沉积,从而成功构建铁过载模型。马文静^[60]对 C57BL/6 小鼠分别灌胃 1.25%、5% FC 溶液(0.2 mL/d,连续 16 周),结果显示模型组小鼠血清、肝及脾铁含量较对照组均明显升高。李

表 3 肠外补铁构建复合铁过载小鼠模型的造模方案

Table 3 Modelling schemes for constructing composite mouse models of iron overload combined with other diseases by intestinal iron supplementation

分类 Classify	小鼠品种 Mouse species	造模方法 Modelling method	给药方案 Dosing regimen	给药总剂量 Total dose	造模时长 Duration	铁过载评价指标 Evaluation indicators of iron overload
卵巢切除合并铁过载 ^[42] Ovariectomy combined with iron overload ^[42]	ICR	先:腹腔注射 FAC 引发铁过载;后:卵巢切除 First: intraperitoneal injection of fac to induce iron overload; then: ovariectomy	0.05 g/kg,每周 2 次,共 16 次 0.05 g/kg, twice a week, for a total of 16 times	0.8 g/kg	8 周 8 weeks	小鼠体质量;血清铁蛋白 Body mass of mice, serum ferritin levels
MDS 合并铁过载 ^[43] MDS combined with iron overload ^[43]	C57BL/6	先:转入致病基因 (RUNX1-S291fs)并射线照射建立 MDS;后:腹腔注射 FeDx 引发铁过载 First: transfer the pathogenic gene (RUNX1-S291fs) and radiation exposure to establish MDS; then: intraperitoneal injection of FeDx to induce iron overload	25 mg/mL,每次 0.2 mL,每日 2 次,共 8 次 25 mg/mL, 0.2 mL each time, once every two days, for a total of 8 times	40 mg	16 d	血清铁蛋白,肝、脾、骨髓组织病理变化及铁沉积情况 Serum ferritin level, pathological changes and iron deposition in the tissues of the liver, spleen and bone marrow
再生障碍性贫血合并铁过载 ^[27-28] Aplastic anemia combined with iron overload ^[27-28]	BALB/c	先:皮下注射 FeDx 引发铁过载;后:免疫介导建立再生障碍性贫血模型 First: subcutaneous injection of FeDx to induce iron overload; then: establish an aplastic anemia model through immune mediation	200 mg/kg,每周 2 次,共 10 次 200 mg/kg, twice a week, for a total of 10 times	2 g/kg	5 周 5 weeks	血清铁及血清铁蛋白,肝体重比,肝、骨髓病理变化及铁沉积 Serum iron and serum ferritin levels, the ratio of liver weight to body mass, pathological changes and iron deposition in the liver and bone marrow
再生障碍性贫血合并铁过载 ^[27-28] Aplastic anemia combined with iron overload ^[27-28]	BALB/c	先:腹腔注射 FeDx 引发铁过载;后:免疫介导建立再生障碍性贫血模型 First: intraperitoneal injection of FeDx to induce iron overload; then: establish an aplastic anemia model through immune mediation	200 mg/kg,每周 1 次,共 10 次 200mg/kg, once a week, for a total of 10 times	2 g/kg	10 周 10 weeks	血清铁及铁蛋白,肝、股骨组织病理及铁沉积,肝铁代谢调控蛋白表达 Serum iron and ferritin levels, histopathology and iron deposition in the liver and femur tissues, and the expression of iron metabolism regulatory proteins in the liver
结核病合并铁过载 ^[44] Tuberculosis combined with iron overload ^[44]	C57BL/6N	先:腹腔注射 FeDx 引发铁过载;后:经尾静脉注射结核分枝杆菌 First: intraperitoneal injection of FeDx to induce iron overload; then: inject Mycobacterium tuberculosis via the caudal vein	每次 7.5 mg,每周 3 次,共 12 次 7.5 mg each time, three times a week, for a total of 12 times	90 mg	4 周 4 weeks	体质量,血清铁、铁蛋白、转铁蛋白及可溶性转铁蛋白受体含量,心脏、肝、脾、肺、肾、小肠组织形态及铁含量、铁沉积病理分析 Body mass of mice, the contents of serum iron, ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor, the tissue morphology, iron content and pathological analysis of iron deposition in the heart, liver, spleen, lung, kidney and small intestine tissues

续表 3

分类 Classify	小鼠品种 Mouse species	造模方法 Modelling method	给药方案 Dosing regimen	给药总剂量 Total dose	造模时长 Duration	铁过载评价指标 Evaluation indicators of iron overload
铁过载移植模型 ^[45] Iron overload transplantation model ^[45]	BALB/c	先:腹腔注射 FeDx 引发铁过载;后:行 6.5 Gy 清髓照射后移植 First: intraperitoneal injection of FeDx to induce iron overload; then; perform myeloablative irradiation at a dose of 6.5 Gy and then carry out transplantation	25 mg/mL, 每次 0.2 mL, 每周 2 次, 共 8 次 25 mg/mL, 0.2 mL each time, twice a week, for a total of 8 times	40 mg	4 周 4 weeks	血常规, 血清铁蛋白, 肝、脾、心脏、骨髓的形态及铁沉积情况 Blood cell count, serum ferritin level, the morphology and iron deposition status of the liver, spleen, heart and bone marrow
肾衰竭合并铁过载 ^[46-47] Renal failure combined with iron overload ^[46-47]	C57BL/6J	先:行 5/6 肾切除术构建肾衰竭模型;后:腹腔注射 FeDx 引发铁过载 First: perform 5/6 nephrectomy to construct a renal failure model; then; intraperitoneal injection of FeDx to induce iron overload	以 0.2 mg/g, 每日 1 次, 连续注射 5 d 后间隔 2 d 再注射 5 d, 连续 4 周;后以 0.05 mg/g, 每日 1 次, 连续注射 5 d 后间隔 2 d 再注射 5 d, 连续 8 周 Inject at a dose of 0.2 mg/g once a day. After 5 d of injection, take a 2 d interval and then inject for another 5 d, repeat this cycle for 4 consecutive weeks; then, inject at a dose of 0.05 mg/g once a day, after 5 d of injection, take a 2 d interval and then inject for another 5 d, repeat this cycle for 8 consecutive weeks	6 g/kg	12 周 12 weeks	心脏组织结构变化、铁沉积情况 Changes in the organizational structure of the heart and the situation of its iron deposition
			以 200 mg/kg, 5 次/周, 连续 4 周;后以 50 mg/kg, 3 次/周, 连续 8 周 Inject at a dose of 200 mg/kg, 5 times a week for 4 consecutive weeks; then, inject at a dose of 50 mg/kg, 3 times a week for 8 consecutive weeks	5.2 g/kg	12 周 12 weeks	心肌损伤及心肌中铁沉积情况 Myocardial injury and the situation of iron deposition in the myocardium
骨性关节炎合并铁过载 ^[48] Knee osteoarthritis combined with iron overload ^[48]	C57BL/6	先:腹腔注射铁糊精引发铁过载;后:手术诱导膝关节骨性关节炎 First: intraperitoneal injection of iron dextran to induce iron overload; then; induce knee osteoarthritis through surgery	500 mg/kg, 每周 1 次, 共 8 次 500 mg/kg, once a week, for a total of 8 times	4 g/kg	8 周 8 weeks	血清和肝中的铁水平, 膝关节和滑膜中的铁沉积 Iron levels in serum and liver, and the iron deposition in the knee joint and synovium

续表 3

分类 Classify	小鼠品种 Mouse species	造模方法 Modelling method	给药方案 Dosing regimen	给药总 剂量 Total dose	造模 时长 Duration	铁过载评价指标 Evaluation indicators of iron overload
非酒精性肝病合并铁过载 ^[26] Non-alcoholic liver disease combined with iron overload ^[26]	C57BL/6J	先:经高脂饮食诱导建立非酒精性肝病模型; 后:肌肉注射 FeDx 引发铁过载 First: establish a non-alcoholic liver disease model by inducing with a high-fat diet; then: intramuscular injection of FeDx to induce iron overload	100 mg/kg 每周 2 次,共 16 次 100 mg/kg, twice a week, for a total of 16 times	1.6 g/kg	8 周 8 weeks	血清铁,肝生化指标,肝病理改变,铁代谢和脂代谢相关基因表达 Serum iron, biochemical indices of the liver, pathological changes of the liver, and the expression of genes related to iron metabolism and lipid metabolism

庆庆^[61]连续 16 周每天以高低两种剂量(1.25%, 2.5 μg/d; 5%, 10 μg/d) FC 溶液灌胃小鼠,发现高剂量 FC 可显著增加小鼠血清铁含量,降低采食量和体重,提高肝和肾铁含量。夏玉^[62]对 C57BL/6N 小鼠采取连续 16 周灌胃 1.25%、2.5%、5% 三种浓度 FC 溶液(0.1 mL/10 g, 每日一次)后,发现高剂量 FC 导致结肠铁转运蛋白表达下降,铁蛋白累积。上述研究表明,FC 能有效诱导小鼠铁过载。研究者通过不同浓度 FC 溶液饮食干预小鼠,发现铁过载程度与剂量呈正相关。

在构建铁过载模型时,羰基铁与 FC 在铁离子释放速率、吸收机制及其体内分布与储存方面存在显著差异。羰基铁通过饲料添加,经胃酸作用缓慢释放铁离子,主要在肠道上部被吸收。FC 因优越的溶解性和吸收效率,通常以不同浓度溶液灌胃给药,显著增加肠道铁吸收。操作层面,饲料投喂虽简便但难以精确计量铁剂摄入,而溶液给药便于控制剂量。此外,经饮食消化吸收铁的程度与喂养时间、小鼠的品种及鼠龄直接相关。与幼龄小鼠相比,老年小鼠体内容易造成更多的铁沉积。因此常选择 9 月龄左右小鼠进行实验。经食源性肠道吸收诱导铁过载,能更准确地反映铁在体内的自然吸收和代谢过程。口服铁剂诱导的慢性铁过载小鼠模型,更贴合临床铁过载患者慢性铁摄入的病理进程。该方法操作简单,并能规避因腹腔、皮下或肌肉注射等给药方式可能导致的组织损伤,能够有效降低实验动物的损耗。然而,口服铁制剂的吸收效率低于注射给药,需要的造模周期较长,一般在 8 ~ 16 周。

3 自发性铁过载的构建方法

3.1 筛选适宜的铁过载小鼠品系

在探索铁过载相关疾病模型构建的初期,研究人员尝试从现有的铁过载相关疾病谱中筛选出适宜构建自发性铁过载模型的小鼠品系。地中海贫血是一种由于基因缺陷导致 β-珠蛋白生成障碍,致使血红蛋白生成减少的遗传溶血性疾病。红细胞的快速破坏和无效造血,增加了铁的积累,形成铁过载。低转铁蛋白血症因转铁蛋白缺乏或功能异常导致铁的运输能力下降,铁在体内的分布和利用受阻,引起铁过载。RAJA 等^[63]在 1994 年对遗传性杂合 α-地中海贫血小鼠、纯合 β-地中海贫血小鼠和纯合低转铁蛋白血症(hypotransferrinemic, hpx)小鼠进行了详尽的比较分析。其中,hpx 小鼠表现出最大量的肠道铁吸收和铁过载,表明 hpx 小鼠作为一种自发性铁过载模型具有较高的适用性。

3.2 修饰铁代谢相关基因位点

通过基因工程技术对小鼠模型进行铁代谢相关基因位点的精确修饰,可产生多样化的铁过载表型。此策略主要模拟人类 HH 的不同遗传变异。HH 是以铁过载为主要病理特征的一种常染色体隐性遗传病,因不同位点的基因突变可分为四个类型。I 型 HH 最为常见,主要由位于 6 号染色体上的 *Hfe* 基因突变引起。*Hfe* 基因有两种常见的突变:C282Y 和 H63D^[53]。II 型 HH 由 1 号染色体上的 *Hju* 基因(II a 型)或 19 号染色体上的 *Hamp* 基因(II b 型)突变引起。转铁蛋白受

体-2 基因 (*TfR2*) 突变和铁转运蛋白基因 (*FPN*) 突变分别导致Ⅲ型 HH 和Ⅳ型 HH^[64]。从这些位点入手,可帮助构建特异性铁过载小鼠模型。1998 年,ZHOU 等^[65]使用 129/SvJ 小鼠构建的 *Hfe* 基因敲除小鼠铁过载模型 (*Hfe*^{-/-}小鼠) 较为贴合人体 HH 的生化异常和组织病理学,是最经典的基因修饰铁过载动物模型^[66-67]。随后 WANG 等^[58]的研究中发现,与 *Hfe*^{-/-}小鼠相比,*Hju*^{-/-}小鼠表现出更高水平的铁过载。2014 年,ALTAMURA 等^[68]通过在小鼠 *FPN* 基因中引入一个点突变 (C326S) 来阻止 *HEPC* 介导的 *FPN* 降解过程,从而实现系统性铁过载,其表现类似于Ⅳ型 HH。随后,*Tfr* 敲除小鼠^[69-70]、*HEPC* 敲除 (*Hamp1*^{-/-}) 小鼠^[66-71] 也被广泛用于了解铁稳态和血色素沉着症的研究中。

近年来,更多的基因位点被引入铁稳态和铁代谢的研究中。PAUK 等^[72]在铁过载对胰腺影响的研究中,选择骨形态发生蛋白 6 敲除 (*Bmp6*^{-/-}) 小鼠与野生型小鼠的血清和胰腺组织进行生化和组织学分析。结果表明,*Bmp6*^{-/-}小鼠 3 月龄时在外分泌胰腺中表现出铁积累,10 月龄时在外分泌胰腺中出现进行性铁沉积,并导致胰腺变性和损伤。2021 年,CORRADINI 等^[73]的研究中发现铜蓝蛋白变异与高铁蛋白水平、肝铁沉积和更严重的肝疾病相关。

3.3 杂交模型以探究病理关联

此外,通过将基因修饰后的铁过载小鼠模型与其他小鼠品系进行杂交,有助于进一步探究铁过载与多种病理状态之间的关联。VINCHI 等^[74]在铁过载与动脉粥样硬化的研究中,将 *FPN*^{wt/C326S} 敲入小鼠与 *ApoE* 缺陷小鼠杂交,构建了遗传性铁过载的小鼠模型 (*ApoE*^{-/-} *FPN*^{wt/C326S})。该模型可见非转铁蛋白结合血清铁显著升高,进一步触发氧化应激、炎症和血管铁沉积,显著加重动脉粥样硬化。SCHWARTZ 等^[75]为研究 *HEPC* 对 HIF-2 α 的作用,将在血清白蛋白启动子 (*Alb*) 的控制下表达他莫昔芬诱导型 *Cre*^{ERT2} 融合蛋白的小鼠与 *HEPC* 1-floxed (*Hamp*-floxed) 小鼠 (*Alb*^{CreERT2} *Hamp*^{fl/fl}) 杂交,构建了一种新的诱导性模型,并在 12 周时观察到显著的铁积累和细胞结构和组织结构的破坏。2024 年,DUARTE 等^[71]将 *Nrf2* 缺陷小鼠与 *Hfe*^{-/-} 或 *Hamp1*^{-/-} 小鼠杂交,

双基因敲除小鼠出现无效红细胞生成和骨髓增生异常的特征,包括大细胞性贫血、脾肿大和未成熟异型骨髓细胞的积累。这表明铁过载可能诱导 *Nrf2* 缺陷小鼠无效造血。通过这些研究,有助于揭示铁过载在不同疾病进程中的角色,并为未来的治疗策略提供实验依据。

与外源性铁过载模型的构建方法不同,自发性铁过载模型的构建尝试从小鼠品系与基因修饰入手。其中,经一系列基因位点的定向修饰培育出的多种铁过载小鼠模型,能更好的模拟人体先天性铁代谢障碍引起的原发性铁过载,在实验研究中应用更广。然而,基因修饰法只限于特定的基因研究,实验操作复杂,条件要求严格,实验成本较高。

4 小结

铁过载是临床常见疾病,为进一步明确其发病机制及其对器官组织的影响,不少研究通过动物模型加以论证研究。本文综述了目前铁过载小鼠模型构建中较为常用的两类方法:(1)通过摄入外源性铁剂增加机体铁负荷构建外源性铁过载模型,摄入途径分为肠外与肠内给药。肠外给药多选择 FeDx 等,给药途径以腹腔注射为主;肠内给药常将羧基铁或 FC 作为食源性添加剂引入饮食中;(2)通过对铁代谢调控基因 (*HFE*, *HJV*, *HAMP*, *TFR2*, *FPN* 等) 进行修饰,破坏 *HEPC*/*FPN* 调节系统,导致铁代谢紊乱,进而构建自发性铁过载动物模型。

建立铁过载模型时,外源性铁剂的摄入量因研究对象、实验目的、疾病种类而异。腹腔注射外源性铁制剂是目前铁过载小鼠模型中应用最多的造模方法,具有复制周期短、成功率高等优势,适用于构建单一铁过载和复合铁过载模型。但肠外补铁的方式铁剂吸收水平高,易引发一定的毒性反应,为减少损耗,注射铁剂应在预实验期间设立多个剂量梯度,寻找最合适的剂量。口服食源性铁制剂的造模操作简单,实验过程安全,动物损耗率低,但口服吸收率低,造模周期较长。从基因层面尝试构建的自发性铁过载小鼠模型,主要用来模拟人体先天性铁代谢障碍引起的铁过载。但其仅限于特异的基因研究,实验操作复杂,条件要求严格,实验成本较高。上

述三种方法均有其适用范围,可根据具体情况选择性采用。

参 考 文 献(References)

- [1] 张之南,郝玉书,赵永强,等. 血液病学 [M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2011.
ZHANG Z N, HAO Y S, ZHAO Y Q, et al. Hematology [M]. 2nd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011.
- [2] SOHAL A, KOWDLEY K V. A review of new concepts in iron overload [J]. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2024, 20 (2): 98-107.
- [3] MIAO R, FANG X, ZHANG Y, et al. Iron metabolism and ferroptosis in type 2 diabetes mellitus and complications; mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(3): 186.
- [4] ZEIDAN R S, HAN S M, LEEUWENBURGH C, et al. Iron homeostasis and organismal aging [J]. Ageing Res Rev, 2021, 72: 101510.
- [5] HANUDEL M R, CZAYA B, WONG S, et al. Enteral ferric citrate absorption is dependent on the iron transport protein ferroportin [J]. Kidney Int, 2022, 101(4): 711-719.
- [6] KATSAROU A, PANTOPOULOS K. Basics and principles of cellular and systemic iron homeostasis [J]. Mol Aspects Med, 2020, 75: 100866.
- [7] MERCADANTE C J, PRAJAPATI M, PARMAR J H, et al. Gastrointestinal iron excretion and reversal of iron excess in a mouse model of inherited iron excess [J]. Haematologica, 2019, 104(4): 678-689.
- [8] RU Q, LI Y, CHEN L, et al. Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases; mechanisms and therapeutic prospects [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9 (1): 271.
- [9] GATTERMANN N, MUCKENTHALER M U, KULOZIK A E, et al. The evaluation of iron deficiency and iron overload [J]. Dtsch Arztebl Int, 2021, 118(49): 847-856.
- [10] LEDESMA-COLUNGA M G, WEIDNER H, VUJIC SPASIC M, et al. Shaping the bone through iron and iron-related proteins [J]. Semin Hematol, 2021, 58(3): 188-200.
- [11] 李大航,徐杉,蒋丽,等. 铁泵蛋白 Ferroportin 生理功能及其调控机制研究进展 [J]. 生命科学, 2022, 34(7): 754-777.
LI D H, XU S, JIANG L, et al. Physiological functions of iron exporter Ferroportin and its regulatory mechanism [J]. Chin Bull Life Sci, 2022, 34(7): 754-777.
- [12] 米海潮,崔芳,杜玉涛,等. 慢性病贫血铁代谢调节机制的研究进展 [J]. 生理学报, 2022, 74(4): 639-647.
MI H C, CUI F, DU Y T, et al. Research progress on the regulation mechanisms of iron metabolism in anemia of chronic disease [J]. Acta Physiol Sin, 2022, 74(4): 639-647.
- [13] 王晓楠,孙彤彤,吴巧玲,等. 采用 MRI 探究不同输血依赖性疾病患者肝脏铁过载及其影响因素 [J]. 放射学实践, 2023, 38(6): 726-730.
WANG X N, SUN T T, WU Q L, et al. Quantitative MRI analysis of liver iron content and its influencing factors in patients with different types of blood transfusion dependent diseases [J]. Radiol Pract, 2023, 38(6): 726-730.
- [14] 方学贤,蔡昭贤,王浩,等. 铁过载及铁死亡在心脏疾病中的研究进展 [J]. 科学通报, 2019, 64(S2): 2974-2987.
FANG X X, CAI Z X, WANG H, et al. Role of iron overload and ferroptosis in heart disease [J]. Chin Sci Bull, 2019, 64(S2): 2974-2987.
- [15] 黄蕾,付蓉. 铁过载影响骨髓造血特点及机制研究进展 [J]. 中华血液学杂志, 2019, 40(8): 709-712.
HUANG L, FU R. Research progress of characteristics and mechanisms of iron overload affecting bone marrow hematopoiesis [J]. Chin J Hematol, 2019, 40(8): 709-712.
- [16] RÍOS-SILVA M, CÁRDENAS Y, ORTEGA-MACÍAS A G, et al. Animal models of kidney iron overload and ferroptosis: a review of the literature [J]. Biometals, 2023, 36(6): 1173-1187.
- [17] RIECKER H H. A study of experimental anemia in dogs: the action of beef liver and iron salts on hemoglobin regeneration [J]. J Clin Invest, 1927, 5(1): 141-160.
- [18] NISSIM J A. Histological appearances following intravenous saccharated iron oxide, and the factors governing precipitation of the compound *in vivo* [J]. Guys Hosp Rep, 1953, 102(2): 164-179.
- [19] 吴昊. 低分子右旋糖酐的酶法制备、氧化修饰及其与铁离子的络合研究 [D]. 合肥:合肥工业大学; 2020.
WU H. Enzymatic preparation, oxidative modification of low molecular weight dextran and its applicability in iron chelation [D]. Hefei: Hefei University of Technology; 2020.
- [20] 钟丽雯,鲁迎瑞,张卫兵,等. 补铁剂及多肽铁复合物的研究进展 [J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(4): 63-69.
ZHONG L W, LU Y R, ZHANG W B, et al. Progress in research on iron supplements and polypeptide-iron complexes [J]. J Dairy Sci Technol, 2022, 45(4): 63-69.
- [21] SAFFARIONPOUR S, DIOSADY L L. Preparation and characterization of an iron- β -cyclodextrin inclusion complex: factors influencing the host-guest interaction [J]. Food Funct, 2023, 14(11): 5062-5077.
- [22] 王冰菁,张惠琴,谢俊霞,等. 枸橼酸铁铵对少突胶质细胞铁代谢相关蛋白表达影响 [J]. 青岛大学学报(医学

- 版), 2022, 58(3): 367-369.
- WANG B J, ZHANG H Q, XIE J X, et al. Effect of ferric ammonium citrate on the expression of iron metabolism-related proteins in oligodendrocytes [J]. J Qingdao Univ Med Sci, 2022, 58(3): 367-369.
- [23] BURNS D L, MASCIOLI E A, BISTRAN B R. Parenteral iron dextran therapy: a review [J]. Nutrition, 1995, 11(2): 163-168.
- [24] AUERBACH M, ADAMSON J W. How we diagnose and treat iron deficiency Anemia [J]. Am J Hematol, 2016, 91(1): 31-38.
- [25] TAM W Y, CHEUNG K K. Phenotypic characteristics of commonly used inbred mouse strains [J]. J Mol Med (Berl), 2020, 98(9): 1215-1234.
- [26] 陈洁, 陈睿然, 郭福川. 铁过载对不同类脂膳食所致肝损伤的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(12): 334-341.
- CHEN J, CHEN R R, GUO F C. Effects of iron overload on liver injury caused by different types of high-fat diets [J]. Sci Technol Food Ind, 2024, 45(12): 334-341.
- [27] 刘梅. 姜黄素对再生障碍性贫血小鼠铁过载的干预作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学; 2018.
- LIU M. Research on the Mechanism of the Curcumin's Intervention on the iron overload of mice with aplastic anemia [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University; 2018.
- [28] 吴迪炯, 温晓文, 刘文宾, 等. 补肾活血方对再生障碍性贫血合并铁负荷过载小鼠铁代谢的调节作用 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3856-3862.
- WU D J, WEN X W, LIU W B, et al. Iron metabolism regulation effect of Bushen Huoxue Formula in aplastic Anemia mouse complicated with iron overload [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(7): 3856-3862.
- [29] 施俊巍, 邹洪, 金玫蕾. 用适应性实验对 ICR、BALB/c 和 C57BL/6 小鼠探索行为及记忆能力的评价 [J]. 动物学研究, 2008, 29(1): 49-55.
- SHI J W, ZOU H, JIN M L. Assessing exploratory behavior and memory in ICR, BALB/c and C57BL/6 mice using habituation [J]. Zool Res, 2008, 29(1): 49-55.
- [30] 赵晋英, 刘涛, 刘鹏, 等. 机体铁过载导致小鼠脑铁异常、脉络丛铁沉积和纤维化 [J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(5): 577-583.
- ZHAO J Y, LIU T, LIU P, et al. Systemic iron overload leads to brain iron abnormality, iron deposition and fibrosis in choroid plexus of mice [J]. Chin J Neuroanat, 2021, 37(5): 577-583.
- [31] 柴笑, 赵明峰, 李德冠, 等. 小鼠铁过载模型的建立及其对骨髓造血功能的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(5): 547-552.
- CHAI X, ZHAO M F, LI D G, et al. Establishment of an mouse model of iron-overload and its impact on bone marrow hematopoiesis [J]. Acta Acad Med Sin, 2013, 35(5): 547-552.
- [32] MUSUMECI M, MACCARI S, MASSIMI A, et al. Iron excretion in iron dextran-overloaded mice [J]. Blood Transfus, 2014, 12(4): 485-490.
- [33] 王静文, 许吕宏, 姚茜, 等. 铁调素及膜铁转运蛋白在铁过载小鼠模型中表达变化的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(3): 936-940.
- WANG J W, XU L, YAO X, et al. Expression changes of hepcidin and ferroportin 1 in murine model of iron overload [J]. J Exp Hematol, 2017, 25(3): 936-940.
- [34] 徐艳军, 易甜甜, 徐肖肖, 等. 环磷酸腺苷对铁过载小鼠骨髓造血干细胞的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(1): 110-117.
- XU Y J, YI T T, XU X X, et al. Effect of cyclophosphamide on hematopoietic stem cells in mice with iron overload [J]. J South Med Univ, 2020, 40(1): 110-117.
- [35] 秦弦. 慢性铁过载对雌性 C57BL/6J 小鼠卵巢功能的影响及机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学; 2021.
- QIN X. The effect and mechanism of chronic overloaded iron on the ovarian function in female C57BL/6J mice [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2021.
- [36] WANG W, JING X, DU T, et al. Iron overload promotes intervertebral disc degeneration via inducing oxidative stress and ferroptosis in endplate chondrocytes [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 190: 234-246.
- [37] LIANG M, CHEN L, HE Q, et al. Intraperitoneal injection of iron dextran induces peripheral iron overload and mild neurodegeneration in the nigrostriatal system in C57BL/6 mice [J]. Life Sci, 2023, 320: 121508.
- [38] TIAN C, ZHAO J, XIONG Q, et al. Secondary iron overload induces chronic pancreatitis and ferroptosis of acinar cells in mice [J]. Int J Mol Med, 2023, 51(1): 9.
- [39] 于娇娇. 小鼠铁过载模型的建立及其对细胞端粒长度的影响 [D]. 北京: 首都医科大学; 2016.
- YU J J. Establishment of a mouse model of iron-overload and its impact on the telomere length of bone marrow cell subsets [D]. Beijing: Capital Medical University; 2016.
- [40] GOLBERG L, SMITH J P, MARTIN L E. The effects of intensive and prolonged administration of iron parenterally in animals [J]. Br J Exp Pathol, 1957, 38(3): 297-311.
- [41] CHAPPELLE E, GABRIO B W, STEVENS A R JR, et al. Regulation of body iron content through excretion in the mouse [J]. Am J Physiol, 1955, 182(2): 390-392.
- [42] 王啸, 刘禄林, 赵国阳, 等. 铁蓄积小鼠去势前后骨吸收活性的差异 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(1): 53-

58.
WANG X, LIU L L, ZHAO G Y, et al. Variations in bone resorption activity between normal and ovariectomized mice with iron accumulation [J]. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21 (1): 53-58.
- [43] 金鑫, 隋松男, 徐萍, 等. MDS 铁过载小鼠模型建立及鉴定 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(4): 1129-1136.
- JIN X, SUI S N, XU P, et al. Establishment and identification of MDS mouse model with iron overload [J]. *J Exp Hematol*, 2018, 26(4): 1129-1136.
- [44] 李军丽, 石亚男, 占玲俊. 活动性结核病铁过载小鼠模型建立及相关指标分析 [J]. *中国医学科学院学报*, 2021, 43(3): 357-365.
- LI J L, SHI Y N, ZHAN L J. Establishment of an iron-overloaded mouse model with tuberculosis and analysis of the iron metabolism index [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2021, 43 (3): 357-365.
- [45] 缪文静. 铁过载参与移植后血小板减少相关机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学; 2020.
- MIAO W J. Mechanism of prolonged thrombocytopenia after hematopoietic stem cell transplantation affected by iron overload [D]. Suzhou: Soochow University; 2020.
- [46] 盛丹丹, 王琳. 抑制 MLK3 对铁过载肾衰竭小鼠心肌纤维化的作用观察 [J]. *山东医药*, 2023, 63(14): 12-15.
- SHENG D D, WANG L. Effect of inhibition of MLK3 on myocardial fibrosis in iron overload mice with renal failure [J]. *Shandong Med J*, 2023, 63(14): 12-15.
- [47] 张昱培, 王琳. 铁过载通过激动 IL-11 信号促进肾衰竭小鼠的心肌纤维化 [J]. *医学研究杂志*, 2023, 52(5): 21-27, 33.
- ZHANG Y P, WANG L. Iron overload promotes myocardial fibrosis in mice with renal failure by agonizing IL-11 signaling [J]. *J Med Res*, 2023, 52(5): 21-27, 33.
- [48] HE Q, YANG J, PAN Z, et al. Biochanin A protects against iron overload associated knee osteoarthritis via regulating iron levels and NRF2/System xc-/GPX4 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113915.
- [49] LYLE L, HIROSE A. Iron overload in myelodysplastic syndromes: pathophysiology, consequences, diagnosis, and treatment [J]. *J Adv Pract Oncol*, 2018, 9(4): 392-405.
- [50] 金朋. 再生障碍性贫血铁代谢及铁过载状况研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2013.
- Jin P. Abnormalities of iron metabolism and prevalence of iron overload in patients with aplastic anemia [D]. Beijing: Peking Union Medical College(PUMC); 2013.
- [51] BATCHELOR E K, KAPITSINOU P, PERGOLA P E, et al. Iron deficiency in chronic kidney disease: updates on pathophysiology, diagnosis, and treatment [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(3): 456-468.
- [52] NASHWAN A J, YASSIN M A, MOHAMED IBRAHIM M I, et al. Iron overload in chronic kidney disease: less ferritin, more T2 * MRI [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 865669.
- [53] CAI C, HU W, CHU T. Interplay between iron overload and osteoarthritis: clinical significance and cellular mechanisms [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 817104.
- [54] 马成祥, 曹林忠, 汪小敏, 等. 铁过载对骨稳态的影响及相关机制的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29 (3): 413-419.
- MA C X, CAO L Z, WANG X M, et al. Effects of iron overload on bone homeostasis and its related mechanism [J]. *Chin J Osteoporos*, 2023, 29(3): 413-419.
- [55] GU K, WU A, YU B, et al. Iron overload induces colitis by modulating ferroptosis and interfering gut microbiota in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 905: 167043.
- [56] PIGEON C, TURLIN B, IANCU T C, et al. Carbonyl-iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALB/CJ male mice [J]. *J Hepatol*, 1999, 30(5): 926-934.
- [57] AREZZINI B, LUNGHI B, LUNGARELLA G, et al. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35 (4): 486-495.
- [58] WANG H, AN P, XIE E, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis [J]. *Hepatology*, 2017, 66(2): 449-465.
- [59] CAMBERLEIN E, ABGUEGUEN E, FATIH N, et al. Hepsidin induction limits mobilisation of splenic iron in a mouse model of secondary iron overload [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(3): 339-346.
- [60] 马文静. 慢性食源性铁过载致小鼠帕金森模型的构建 [D]. 雅安: 四川农业大学; 2019.
- MA W J. Construction of mouse Parkinson's model induced by chronic food-borne iron overload [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University; 2019.
- [61] 李庆庆. 慢性铁过载对小鼠肝肾功能及组织病理损伤的评估 [D]. 雅安: 四川农业大学; 2022.
- LI Q Q. Evaluation of chronic iron overload on liver and kidney function and histopathological damage in mice [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University; 2022.
- [62] 夏玉. 慢性食源性铁过载对小鼠结肠黏膜屏障的影响及机制研究 [D]. 雅安: 四川农业大学; 2023.
- XIA Y. Effect of chronic food-derived iron overload on the mucosal barrier of mouse colon and its mechanism [D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University; 2023.
- [63] RAJA K B, SIMPSON R J, PETERS T J. Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload [J]. *Br*

- J Haematol, 1994, 86(1): 156–162.
- [64] ALQANATISH J, ALSOWAILMI B, ALFARHAN H, et al. Juvenile hemochromatosis: rheumatic manifestations of 2 sisters responding to deferasirox treatment. A case series and literature review [J]. Open Access Rheumatol, 2021, 13: 15–21.
- [65] ZHOU X Y, TOMATSU S, FLEMING R E, et al. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2492–2497.
- [66] LUNOVA M, SCHWARZ P, NURALDEEN R, et al. Hepcidin knockout mice spontaneously develop chronic pancreatitis owing to cytoplasmic iron overload in acinar cells [J]. J Pathol, 2017, 241(1): 104–114.
- [67] YANG L, WANG H, YANG X, et al. Auranofin mitigates systemic iron overload and induces ferroptosis via distinct mechanisms [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 138.
- [68] ALTAMURA S, KESSLER R, GRÖNE H J, et al. Resistance of ferroportin to hepcidin binding causes exocrine pancreatic failure and fatal iron overload [J]. Cell Metab, 2014, 20(2): 359–367.
- [69] LEVY J E, JIN O, FUJIWARA Y, et al. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system [J]. Nat Genet, 1999, 21(4): 396–399.
- [70] PARROW N L, LI Y, FEOLA M, et al. Lobe specificity of iron binding to transferrin modulates murine erythropoiesis and iron homeostasis [J]. Blood, 2019, 134(17): 1373–1384.
- [71] DUARTE T L, LOPES M, OLIVEIRA M, et al. Iron overload induces dysplastic erythropoiesis and features of myelodysplasia in Nrf2-deficient mice [J]. Leukemia, 2024, 38(1): 96–108.
- [72] PAUK M, KUFNER V, RUMENOVIC V, et al. Iron overload in aging Bmp6^{-/-} mice induces exocrine pancreatic injury and fibrosis due to acinar cell loss [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(4): 60.
- [73] CORRADINI E, BUZZETTI E, DONGIOVANNI P, et al. Ceruloplasmin gene variants are associated with hyperferritinemia and increased liver iron in patients with NAFLD [J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 506–513.
- [74] VINCHI F, PORTO G, SIMMELBAUER A, et al. Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction [J]. Eur Heart J, 2020, 41(28): 2681–2695.
- [75] SCHWARTZ A J, DAS N K, RAMAKRISHNAN S K, et al. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload [J]. J Clin Invest, 2019, 129(1): 336–348.

[收稿日期] 2024-11-11

张忠海,孙惠,苏曦晨,等. 猪肠道类器官的培养技术及其进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 607-615.

ZHANG Z H, SUN H, SU X C, et al. Cultivation techniques and research progress of porcine intestinal organoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 607-615.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.014

猪肠道类器官的培养技术及其进展

张忠海¹, 孙惠¹, 苏曦晨^{2,3*}, 崔立^{2,3}

(1. 上海市浦东新区畜牧水产技术推广中心, 上海 201299; 2. 上海交通大学农业与生物学院动物科学系, 上海 200240; 3. 上海交通大学上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

【摘要】 猪肠道类器官是一种由猪干细胞或者含有干细胞的猪肠道隐窝在体外增殖分化、形成能够自我更新并分化成和体内组织结构相似的 3D 培养物。基于猪和人在结构和生理上高度的相似性,猪肠道类器官不仅可以满足农业生产和生态环境研究的需求,还可以作为人的体外模型进行药物筛选和毒理研究。相比于其他体外模型,猪肠道类器官拥有和体内组织相似,有稳定表型和遗传特性等优势。猪肠道类器官在模拟宿主与微生物相互作用、药物筛选和营养发育研究中展现出巨大潜力,但其构建仍缺少固定流程,这会影响实验重复性。本文将回顾猪肠道类器官的培养,顶端绒毛暴露方法、微生物和宿主之间的相互作用以及目前所面临的挑战。

【关键词】 猪;肠道;类器官

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0607-09

Cultivation techniques and research progress of porcine intestinal organoids

ZHANG Zhonghai¹, SUN Hui¹, SU Xichen^{2,3*}, CUI Li^{2,3}

(1. Shanghai Pudong New Area Livestock and Aquaculture Products Technology Promotion Center, Shanghai 201299, China; 2. Department of Animal Science, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Corresponding author: SU Xichen. E-mail: wenkedaxuezh@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Porcine intestinal organoids are 3D cultures derived from porcine stem cells or porcine intestinal crypts containing stem cells, which can self-renew and differentiate into tissues similar to those *in vivo*. Due to the high structural and physiological similarity between pigs and humans, porcine intestinal organoids can not only meet the needs of agricultural production and ecological environment research, but also serve as an *in vitro* model for human drug screening and toxicology studies. Compared with other *in vitro* models, porcine intestinal organoids have the advantages of being similar to *in vivo* tissues, stable phenotypes and genetic properties. Porcine intestinal organoids show great potential in simulating host-microbial interactions, drug screening and nutritional development studies, but their construction still lacks a fixed process, which affects experimental repeatability. In this review, we will review

【基金项目】上海市科委科技创新项目(实验动物专项)(23141900100,21140901400)。

Funded by Science and Technology Innovation Project of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (Experimental Animal Project) (23141900100, 21140901400).

【作者简介】张忠海,男,硕士,兽医师,研究方向:动物疾病诊疗。Email:zhonghaiz@126.com

【通信作者】苏曦晨,男,硕士,研究助理,研究方向:动物疫苗研发。Email:wenkedaxuezh@sjtu.edu.cn

culture of porcine intestinal organoids, the exposure method of apical villi, the interactions between microorganisms and hosts, and the current challenges.

[Keywords] swine; intestine; organoid

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

猪肠道类器官 (porcine intestinal organoids, PIOs) 的出现为人类医学、兽医医学和生物环境等领域的研究提供了一种新的工具。PIOs 是一种猪干细胞或者是含有干细胞的猪肠道隐窝在体外增殖分化形成的 3D 培养物,其组织结构与体内相似。PIOs 呈空心管腔花瓣状,含有潘氏细胞 (paneth cell, PC)、干细胞、杯状细胞和肠上皮细胞等多种细胞,包含绒毛和隐窝等结构,拥有长期的自我更新能力,可稳定低温保存和复苏^[1-2]。长期传代的 PIOs 的转录组仍可以保持稳定,并且 PIOs 比传统的肠道模型猪空肠上皮细胞系 (IPEC-J2) 更接近于人的肠道上皮组织,这会在药物研发过程中具有重要意义^[3]。

肠道内丰富的干细胞使其在构建类器官方面相较于其他组织具有更大的优势。基于肠道功能和结构复杂性,肠道上皮更容易受到来自外界环境的刺激 (如肠道微生物、食物等),因此小肠上皮会进行 3 ~ 5 d 为一周期的自我更新,从而能维持其基本的生物学功能^[4]。小肠需要丰富的干细胞去支持高频率的自我更新,由此可以分离出相对丰富的肠道成体干细胞 (adult stem cell, ASCs) 去构建类器官。

有关动物福利的 3R 原则,即动物实验的替换 (replacement)、减少 (reduction) 和优化 (refinement),已被广泛接受,并被视为动物实验中使用实验动物时的最高伦理标准。近年来,类器官作为一种符合 3R 原则中替换原则的动物模型,能够有效地减少了实验动物的使用,同时能够满足一部分的实验需求。随着社会文明的进步,研究人员就开始意识到动物福利的重要性,希望能够有效地减轻动物实验给实验动物带来的痛苦。

相比于传统 2D 单层培养物,类器官已经有分化成熟的细胞,且具有与体内相似的组织结构,能够更好模拟体内组织器官的生理学和病理学变化^[5-6]。类器官通常是由各种干细胞产生,能够在保持较长时间培养的条件下不发生基因

组的改变。

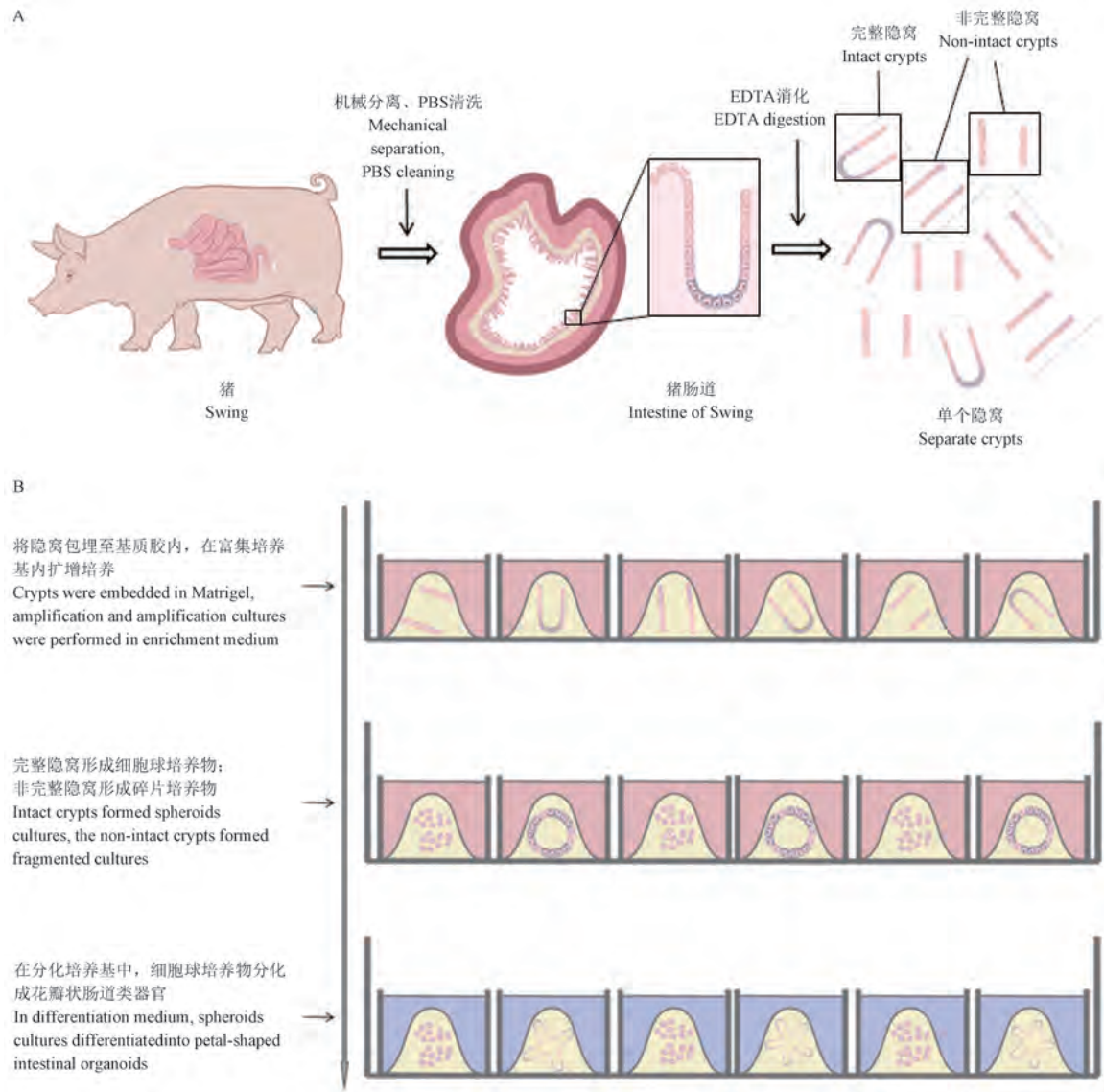
尽管实验动物在肠道内分子机制研究、疾病模型构建及药物筛选等领域仍然占据重要地位,但近年来已有大量研究开始在基因编辑、人类医学、生物制剂开发及肠道营养等领域应用 PIOs。这些迹象表明,PIOs 有潜力在未来逐步替代部分实验动物的使用。本文将回顾 PIOs 的分离培养和具体运用,指出 PIOs 的当前的局限性并阐述已有的优化方案。

1 猪肠道类器官的建立方法进展

目前常见的 PIOs 建立方法是在体外对干细胞进行相关信号通路的调控,以促进其增殖和分化,从而形成细胞球培养物。随后将这些细胞球进一步分化为具有明显组织结构的 3D 培养物。2007 年 BARKER 等^[7]发现了位于肠道隐窝底部的基底柱状细胞 (cylindrical base cell, CBC) 富含亮氨酸的重复序列 G 蛋白偶联受体 5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5, LGR5),这些细胞可以在 60 d 内分化成为所有的肠上皮细胞谱系,这说明 CBC 是小肠和结肠的干细胞。基于这项研究,2009 年 SATO 等^[8]通过在特定的分化培养基中培养小鼠 *Lgr5* 阳性肠干细胞,并成功建立了小鼠肠道类器官。2011 年,该研究团队基于之前建立的小鼠类器官培养基进行特定成分的修改,成功建立了人隐窝来源的肠道类器官^[14]。随后,其他研究人员陆续报道了牛^[2]、猪^[10]、狗^[11]、猫^[12]、鸡^[12]的类器官培养和建立。

1.1 3 种类型的干细胞获得猪肠道类器官的基本流程

目前,研究人员可以通过诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)、ASCs 和胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESCs) 这 3 种干细胞获得肠道类器官。目前报道最多的类器官构建方法大多是 ASCs (如图 1),大致为:首先需要通过机械分离和酶分离相结合的方式获得隐窝



注:a:猪肠道隐窝分离流程;b:猪肠道隐窝体外扩增分化流程。

图1 猪肠道成体干细胞分离和猪肠道类器官培养

Note. a. Porcine intestinal crypt isolation procedure. b. *In vitro* expansion and differentiation process of porcine intestinal crypts.

Figure 1 Isolation of adult stem cells from the Intestine of swing and culture of porcine intestinal organoids

结构,再通过富集培养形成相应的细胞球培养物,最后在分化培养基上形成具有明显组织结构的类器官。与报道最多的 ASCs 来源的类器官相比,目前利用 iPSCs 和 ESCs 诱导产生的类器官中通常包括下面几个步骤:先将 2D 培养的 iPSCs 传代构建成 3D 细胞球状培养物,再通过相关信号通路诱导分化为胚状体,最后转移到分化培养基上形成对应的类器官^[1,13]。

1.2 含猪肠道成体干细胞隐窝的分离

在 PIOs 的培养前还需要合适的分离肠隐窝组织的方法。隐窝位于肠绒毛之间的凹陷处,底

部是由干细胞和 Paneth 细胞排列组成的“U”形结构。较早用于 PIOs 的隐窝分离方法是:需要用磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS) 反复洗涤的猪肠道中的微生物,再用 EDTA 处理使其结构松动,最后用移液管反复吹制获得隐窝悬液^[14-15]。随后,也有研究根据需求优化了方法,将含有 EDTA 和二硫苏糖醇的 PBS 孵化组织,反复摇床获得悬浮的肠道组织^[1]。该方法可以减少组织损失,有效地避免了肠道隐窝破碎。

1.3 猪肠道类器官的培养基

目前常用的类器官培养基细胞外基质凝胶

是一种小鼠肉瘤衍生的培养基——Matrigel 是一种凝胶状培养基,它支持细胞附着和存活成长,起到支架和提供营养物质的作用^[15-16]。Matrigel 通过基底膜提供相关信号分子,促进类器官的生长成熟。尽管该培养基源自小鼠,但由于肠道类器官的体外培养并不涉及血管连接和免疫细胞的参与,因此可以根据不同物种的特异性,调整相关信号分子的浓度和配比,用于培养不同物种的肠道类器官。相关研究表明,减少基质凝胶的浓度让培养基变成液态,可以培养出鸡肠道类器官^[17]。LI 等^[18]通过更改了常规 Matrigel 的成分,阻隔了干细胞的 Wnt 和 PGE2 的信号通路,使传统 Matrigel 培养出的细胞球状 3D 培养物分化为具有明显体内组织结构的猪结肠类器官。培养基的成分直接决定了类器官生长命运。目前有研究通过饲养细胞上清短暂维持猪 iPSCs 的无饲养培养状态,然后通过激活剂 A、成纤维细胞生长因子 4 和 Wnt3a 成功诱导猪 iPSCs 形成细胞球 3D 培养物。最后将形成的细胞球 3D 培养物嵌入基质凝胶中,并通过添加各种生长因子让 3D 结构成熟形成肠道类器官^[1]。该类器官可以被猪肠道冠状病毒感染,为后续的治疗和药物评测提供了一个理想的模型。

1.4 猪肠道类器官的信号通路

PIOs 的生长和分化是由不同的信号通路调控的。肠干细胞的自我更新和分化促进了类器官的生长,这个过程受到多种信号通路的调控。不同物种的肠道干细胞生长分化都依赖各种信号分子, Wnt、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 等的信号分子都是通过 PC 来合成分泌^[14,19]。Wnt 信号通路在促进干细胞增殖和自我更新中起着重要作用。抑制 Wnt 通路,会抑制干细胞的增殖和更新,促进细胞的分化成熟^[20-21]。Notch 通路则决定了细胞分化的类型, Wnt 和 Notch 通路共同控制了干细胞的命运^[22]。Notch 通路抑制时导致干细胞向分泌细胞类型分化,若再抑制 Wnt 通路,则会让干细胞分化产生杯状细胞;而当 Wnt 和 Notch 通路都激活时,会保持干细胞的更新和增殖, Wnt 通路抑制, Notch 通路激活时,会让干细胞分化为肠上皮细胞等肠吸收性细胞^[23]。BMP 信号通路可以抑制 β -连环蛋白活性^[24-25]。EGF 则会促进细胞增

殖^[26-27]。因此,调控培养基中这些信号因子的浓度和配比,可以构建出 PIOs 特定的富集培养基和特定的分化培养基^[18]。这些信号因子的研究为类器官的构建奠定了一定的基础。

1.5 细胞球培养物作为培养类器官过程中经历的一个阶段

有研究曾经尝试使用小鼠肠道类器官的无血清商业培养基 IntestiCult 来建立 PIOs,但目前这种方法培养出来的猪肠道 3D 培养物分化程度较低^[28]。也有研究基于人和猪在生理和结构上相似的这一特点,打算利用已经标准化的人类器官培养基来建立 PIOs,但相得到的 3D 培养物分化程度同样也很低,并且没有观察到和体内组织相似的结构^[9]。这些分化程度低的 3D 培养物成为细胞球培养物 (spheroids)。与类器官相比,细胞球培养物没有明显的组织结构,不能模拟体内的生理状况^[29]。在早期的研究中,人们会把细胞球培养物和类器官混为一谈,而如今,细胞球被定义为从干细胞中分离培养获得的细胞团,通常被认为是培养类器官中经历的一个阶段, LI 等^[18]的研究发现,利用人类器官富集培养基培养猪结肠类器官时就会呈现了球状的 3D 培养结构,短期内没有观察到出芽结构,将细胞球培养物放入到特定的分化培养基后,则观察到明显的隐窝结构。

2 猪肠道类器官的运用

2.1 绒毛结构的暴露方法

PIOs 是一种 3D 结构模型,在常见的基质凝胶类器官培养基的培养下,呈现出绒毛朝内、隐窝结构向外突起、肠道内腔被基质胶包裹的花瓣状结构。这种结构限制了病毒、细菌、寄生虫、药物和其他物质进入到类器官腔内。这需要特定的方法将类器官的绒毛结构暴露出来。

在探究肠道中宿主和微生物关系的研究中,最直接的方法是进行微注射,即将微生物注射到类器官腔内。HILL 等^[30]通过薄壁毛细玻璃管,在显微镜下注射大肠杆菌到人的肠道类器官中,可以在体外模拟人肠道和大肠杆菌之间的相互作用。

相比于传统的 2D 培养物,由猪肠道类器官衍生出来的单分子层膜 (organized-derived

monolayers, ODM) 在药物筛选和毒理学研究中更具有优势。ODM 即可以将绒毛结构暴露出来, 又可以保留猪肠道上皮组织结构功能。HOFFMANN 等^[31]通过将 PIOs 植入到渗透过滤支架上, 得到了类器官来源的猪空肠 ODM, 并且探究了该 ODM 的生理转运特性, 发现了 ODM 物质转运过程和体内组织相似。VAN 等^[32]优化了传统的肠道类器官机械破碎和部分酶解离后接种到培养基的 ODM 培养方法, 利用跨膜电阻测定通透性, 控制 ODM 细胞密度, 形成了一套更快速的 ODM 培养方案。BARNETT 等^[33]在前人基础上通过可渗透的 Transwell 插入物和组织培养液处理后的聚苯乙烯板培养 ODM, 并发现不同的细胞接种密度, 培养方式以及培养基内细胞因子都会影响 ODM 的成熟程度。

此外, 研究人员还可以通过特定方法将 PIOs 的极性改变, 可以在不破坏 3D 结构的前提下将肠道类器官的绒毛顶端倒置暴露出来。一般可以通过降低基质胶浓度的来液化培养基, 在液态培养基下培养的 PIOs 极性就会发生改变。STROULIOS 等^[34]提供了两种去除基质胶的方法, 经由这两种方法得到 PIOs 绒毛组织结构都倒置暴露出来。除了去除基质胶, 还可以控制相应的细胞因子来改变 PIOs 的极性。CO 等^[35]发现了整合素 $\beta 1$ 在控制肠道细胞极性中的重要性, 他们通过阻断了整合素 $\beta 1$ 的信号通路, 同样也培养出极性反转的肠道类器官^[36]。该方法已经在 PIOs 中得到应用, 并成功建立了绒毛顶端外露的 PIOs。这种极性改变的 PIOs 以及可以作为作为猪传染性肠胃炎病毒的体外模型^[37]。

2.2 宿主和微生物之间的相互作用

PIOs 含有和体内组织相似的管腔结构, 可以耐受外来细菌数天, 由此可以模拟肠道内细菌和宿主之间的相互作用^[38-39]。ETEC 型大肠杆菌会分泌肠毒素, 引起肠道内的水和电解质平衡失调, 在生产上会引起断奶仔猪的严重腹泻, 对农业生产造成了严重的影响。BEAUMONT 等^[40]发现早期哺乳期仔猪微生物产生的三甲酸和丁酸盐不会对 PIOs 肠道上皮稳态造成影响, 早期微生物群可能不是仔猪易感断奶仔猪腹泻的主要因素。而目前已经有研究将 ETEC 型大肠杆菌成功感染 PIOs 来源的 ODM, 发现这些 ODM 同样也出

现了电解质平衡失调的病理状况^[28]。也有研究将 PIOs 作为体外模型与体内模型进行对比探究, 发现肠毒素会通过下调 Wnt/ β -连环蛋白信号通路来抑制隐窝内干细胞增殖和更新, 进一步破坏肠道上皮黏膜的完整性^[41]。也有多个报道将 PIOs 作为体外模型来探究其他细菌和宿主的相互作用。DERRICOTT 等^[2]成功通过显微注射的方式将鼠伤寒沙门菌成功感染了 PIOs。HOFFMANN 等^[31]在 PIOs 来源的 ODM 中加入霍乱毒素, 会导致 ODM 中肠上皮细胞氯离子浓度失衡, 出现了和霍乱弧菌感染相同的病理变化。未来 PIOs 可以成为一种细菌体外研究的有效模型。

基于类器官的复杂的组织结构, 类器官还可以作为研究寄生虫和宿主之间的相互作用的体外模型^[42]。目前已经有其他物种的类器官用于研究血液、神经元、肝和肠道寄生原虫(即恶性疟原虫、刚地弓形虫和十二指肠贾第鞭毛虫)^[43]。DERRICOTT 等^[2]发现弓形虫可以感染 PIOs, 这意味着 PIOs 可以为预防和控制寄生虫提供一个具有潜力的体外模型。

2.3 猪肠道类器官在营养发育等领域的应用

猪肠道类器官含有与体内相似的结构, 能够更好模拟实验中加药前后体内组织器官的生理学变化。因此, 猪肠道可以作为复杂性低的单种细胞培养物和复杂性高的动物模型之间的中间模型。这对研究农业生产中肠道对营养条件变化的反应具有重要意义。MADSEN 等^[44]构建了不同肠段、不同饲料效率的猪肠道类器官类器官, 确定了不同饲料效率下的类器官表达差异, 以及大肠杆菌攻击下组织的先天免疫反应。MEDIDA 等^[45]利用猪肠道类器官探究猪肠道类器官对有机形式的 Zn 对炎症分子的影响, 发现经过 Zn 供药的猪肠道类器官中 *MT1* 和 *ZIP4* 的表达变化和文献报告的一致。YIN 等^[46]通过猪肠道类器官探究了铁元素促进了肠上皮细胞成熟, 这对实际畜牧生产具有重大意义。上述研究表明, 猪肠道类器官可以作为营养发育探究的重要工具。

2.4 猪肠道类器官的其他应用

类器官也可以用于评价药物效果。人的 iPSCs 或者是病变隐窝组织的肠道类器官已经用

于进行药物筛选。但目前隐窝病变组织来源的类器官会有组织来源差异性,这会影响最后的实验结果^[1]。而人的 iPSCs 诱导形成肠道类器官的时间很长^[47]。考虑到猪和人在器官组织的相似性,PIOs 在药物筛选上也具有重大的潜力。已经有研究报道了利用 PIOs 来评估两种临床使用的抗结肠癌药物伊立替康和瑞戈非尼,相比于猴的肠道类器官,PIOs 对该两种药物的敏感性更接近人^[18]。利用 PIOs 来评估药物效果,还能有效避免伦理问题。

PIOs 可以作为一种的疾病模型探究发病机制。基于肠道类器官可以模拟部分体内的生理环境,STIELER 等^[48]从猪缺血肠祥中分离和培养肠隐窝构建了 PIOs,进而模拟了人类缺血性损伤的病理状况,以此作为体外模型探究是否能在体外进行由干细胞调节的上皮修复。也有研究通过对炎症性肠道疾病的相关细胞因子的筛选,发现白介素等一系列的炎症因子会影响肠道干细胞的活性,这在开发肠道疾病的治疗方法时有重要启示^[49-51]。

3 猪肠道类器官发展所面对挑战和展望

尽管这几年来 PIOs 的相关领域都有一定的突破,但目前仍然会面临很多的挑战。首先,PIOs 的培养缺乏一个固定标准的流程,类器官培养基内的成分也未标准化,这都会影响体外实验的重复性和结果。Wnt3a、R-spondin1 和 Noggin 的比例和浓度对类器官的分化十分重要,目前有研究考虑使用商业化学合成的 Wnt3a、R-spondin1 和 Noggin 来培养类器官,但价格昂贵,不适合一些大规模的实验^[1]。此外,许多实验室通过实验室自制的条件培养基作为 PIOs 培养基的补充。这些条件培养基可能根据实验室环境不同而有很大的差异,这同样会影响实验的可重复性^[49]。其主要原因在于物种之间的细胞分化调控存在差异,不同物种所需细胞因子种类及比例存在差异。采用统一培养基培养不同物种细胞,其分化结果明显不同^[18]。现有研究多基于成熟的人或小鼠肠道类器官培养体系,探究如何降低减少猪肠道类器官构建的体内外之间的差异,通过优化

细胞因子占比以促进猪肠道类器官分化。其次,不同肠段对细胞因子的需求存在差异,在构建不同肠段的类器官时,需要优化其中特定的细胞因子。而目前针对不同肠段的猪肠道类器官构建的研究报道相对较少。因此,当前尚缺乏一套标准化、可重复的猪肠道类器官成熟培养方案。目前一个解决方案是开发出新的培养基基质代替目前常用的 Matrigel, FINKBEINER 等^[52]开发了一种去细胞猪肠道基质和人工聚羟基乙酸/聚 L 乳酸支架,该支架可以支持人的肠道类器官培养。此外,还可以通过利用猪体内来源的材料来进一步模仿体内相似的微环境,减少类器官构建的体内外之间的差异。XU 等^[53]构想出一种基于猪小肠黏膜下层细胞的细胞外基质研发出的新型生物墨水配方,这种生物墨水可以为肠道的 ASCs 提供具有一种与体内相似的仿生结构和生态环境。相对于传统的 Matrigel, PIOs 可以在该培养基内更好地重现猪肠道上皮细胞和其他肠道成分的相互作用,进一步发挥出类器官的应用优势。

PIOs 和体内组织也存在着体外模型代表性的差异。其一在于分化成熟程度和体内组织仍然存在着差异。相比于体内组织,PIOs 的干细胞标志物 Sox9 和 Lgr5 基因表达水平更高,而 Atoh1、Cga 和 Muc2 基因表达水平在结肠上皮细胞中更低^[54]。其二在于缺少循环系统和完整的免疫系统参与,这导致其与体内微环境之间存在显著差异。目前已经有研究将小鼠类器官移植到小鼠体内,并成功在小鼠体内进行共培养^[55]。SUGIMOTO 等^[56]发现移植到大鼠体内的体外类器官可以形成相应的绒毛结构,这对猪体外类器官培养移植体内进行治疗也有一定的启示。还可以通过生物工程等多种方式构建类器官的共培养体系,控制该体系中的细胞类型、组织结构以及细胞与细胞/细胞基质的相互作用,弥补类器官不能与其他组织和器官相互作用的缺点^[57]。此外,类器官也可以融入到器官芯片中这一技术中,通过微传感技术联络每个不同的微组织,实现各个芯片相互联系,进一步模拟体内复杂的生理状况^[58]。

4 结论

近年来,类器官的发展十分迅速。类器官在

符合 3R 原则基础上提供了一种有价值的体外模型。基于猪的组织器官和人在生理和结构上的相似性,猪的相关研究也备受广大科研人员青睐。如今,PIOs 的培养方法和技术正在不断的优化,但目前仍有培养方法无法标准化、分化程度和体内存在差异、缺少循环系统和免疫系统的参与等问题。目前 PIOs 已经运用在探究病毒、细菌、寄生虫和宿主的相互作用。此外,PIOs 还可以用于药物筛选和医疗策略中,未来 PIOs 还可以在营养学研究和病理学研究中成为一种有潜力的工具。PIOs 为研究疾病、测试不同物种的不同器官系统上的环境刺激物的作用和开发新的治疗方法提供了一种有价值的体外方法。

参 考 文 献(References)

- [1] MA P, FANG P, REN T, et al. Porcine intestinal organoids: overview of the state of the art [J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 1110.
- [2] DERRICOTT H, LUU L, FONG W Y, et al. Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species [J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 375(2): 409–424.
- [3] VAN DER HEE B, MADSEN O, VERVOORT J, et al. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 375.
- [4] RIZK P, BARKER N. Gut stem cells in tissue renewal and disease: methods, markers, and myths [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2012, 4(5): 475–496.
- [5] BAI L, ZHOU D, LI G, et al. Engineering bone/cartilage organoids: strategy, progress, and application [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 66.
- [6] O'CONNELL L, WINTER D C. Organoids: past learning and future directions [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(5): 281–289.
- [7] BARKER N, VAN ES J H, KUIPERS J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5* [J]. *Nature*, 2007, 449(7165): 1003–1007.
- [8] SATO T, VRIES R G, SNIPPERT H J, et al. Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262–265.
- [9] SATO T, STANGE D E, FERRANTE M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762–1772.
- [10] GONZALEZ L M, WILLIAMSON I, PIEDRAHITA J A, et al. Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66465.
- [11] CHANDRA L, BORCHERDING D C, KINGSBURY D, et al. Derivation of adult canine intestinal organoids for translational research in gastroenterology [J]. *BMC Biol*, 2019, 17(1): 33.
- [12] POWELL R H, BEHNKE M S. WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals [J]. *Biol Open*, 2017, 6(5): 698–705.
- [13] OLAYANJU A, JONES L, GRECO K, et al. Application of porcine gastrointestinal organoid units as a potential *in vitro* tool for drug discovery and development [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(1): 4–15.
- [14] ZHANG J, CHEN Y, GUO X, et al. The gut microbial metabolite indole-3-aldehyde alleviates impaired intestinal development by promoting intestinal stem cell expansion in weaned piglets [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2024, 15(1): 150.
- [15] GOPALLAWA I, GUPTA C, JAWA R, et al. Applications of organoids in advancing drug discovery and development [J]. *J Pharm Sci*, 2024, 113(9): 2659–2667.
- [16] XU C, INOKUMA M S, DENHAM J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 971–974.
- [17] BEAUCHAMP P, MORITZ W, KELM J M, et al. Development and characterization of a scaffold-free 3D spheroid model of induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015, 21(8): 852–861.
- [18] LI H, WANG Y, ZHANG M, et al. Establishment of porcine and monkey colonic organoids for drug toxicity study [J]. *Cell Regen*, 2021, 10(1): 32.
- [19] VERMA M, GARG M, KHAN A S, et al. Cadmium modulates intestinal Wnt/ β -catenin signaling ensuing intestinal barrier disruption and systemic inflammation [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 277: 116337.
- [20] ZHENG L, DUAN S L. Molecular regulation mechanism of intestinal stem cells in mucosal injury and repair in ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(16): 2380–2396.
- [21] LI L H. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through antagonizing Wnt signaling [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4): A702.
- [22] MILANO J, MCKAY J, DAGENAIS C, et al. Modulation of Notch processing by γ -secretase inhibitors causes intestinal goblet cell Metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation [J]. *Toxicol Sci*,

- 2004, 82(1): 341–358.
- [23] YIN X, FARIN H F, VAN ES J H, et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5⁺ intestinal stem cells and their progeny [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 106–112.
- [24] XIE Z, ZHOU G, ZHANG M, et al. Recent developments on BMPs and their antagonists in inflammatory bowel diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 210.
- [25] HE X C, ZHANG J, TONG W G, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(10): 1117–1121.
- [26] MIZUNO S, JINNOH Y, ARITA A, et al. New maintenance culture method for intestinal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, 47(1): 120–129.
- [27] FENG Y, BOMMER G T, ZHAO J, et al. Mutant KRAS promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(3): 1003–1013.
- [28] VERMEIRE B, GONZALEZ L M, JANSENS R J J, et al. Porcine small intestinal organoids as a model to explore ETEC-host interactions in the gut [J]. *Vet Res*, 2021, 52(1): 94.
- [29] SIMIAN M, BISSELL M J. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions [J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(1): 31–40.
- [30] HILL D R, HUANG S, NAGY M S, et al. Bacterial colonization stimulates a complex physiological response in the immature human intestinal epithelium [J]. *eLife*, 2017, 6: e29132.
- [31] HOFFMANN P, SCHNEPEL N, LANGEHEINE M, et al. Intestinal organoid-based 2D monolayers mimic physiological and pathophysiological properties of the pig intestine [J]. *PLoS One*, 2021, 16(8): e0256143.
- [32] VAN DER HEE B, LOONEN L P, TAVERNE N, et al. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids [J]. *Stem Cell Res*, 2018, 28: 165–171.
- [33] BARNETT A M, MULLANEY J A, MCNABB W C, et al. Culture media and format alter cellular composition and barrier integrity of porcine colonoid-derived monolayers [J]. *Tissue Barriers*, 2024, 12(2): 2222632.
- [34] STROULIOS G, STAHL M, ELSTONE F, et al. Culture methods to study apical-specific interactions using intestinal organoid models [J]. *J Vis Exp*, 2021(169): 1–10.
- [35] CO J Y, MARGALEF-CATALÀ M, LI X, et al. Controlling epithelial polarity: a human enteroid model for host-pathogen interactions [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(9): 2509–2520.
- [36] JOO S S, GU B H, PARK Y J, et al. Porcine intestinal apical-out organoid model for gut function study [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(3): 372.
- [37] LI Y, YANG N, CHEN J, et al. Next-generation porcine intestinal organoids: an apical-out organoid model for swine enteric virus infection and immune response investigations [J]. *J Virol*, 2020, 94(21): e01006–01020.
- [38] WANG Q, WANG F, TANG L, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 alleviated intestinal damage induced by inflammatory via modulating intestinal microbiota and intestinal stem cell proliferation and differentiation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 130: 111675.
- [39] WILSON S S, BROMME B A, HOLLY M K, et al. Alpha-defensin-dependent enhancement of enteric viral infection [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(6): e1006446.
- [40] BEAUMONT M, LENCINA C, BERTIDE A, et al. The early life microbiota is not a major factor underlying the susceptibility to postweaning diarrhea in piglets [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(4): e0069423.
- [41] ZHOU J Y, HUANG D G, GAO C Q, et al. Heat-stable enterotoxin inhibits intestinal stem cell expansion to disrupt the intestinal integrity by downregulating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Stem Cells*, 2021, 39(4): 482–496.
- [42] DELGADO BETANCOURT E, HAMID B, FABIAN B T, et al. From entry to early dissemination-toxoplasma gondii's initial encounter with its host [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 46.
- [43] KLOTZ C, AEBISCHER T, SEEGER F. Stem cell-derived cell cultures and organoids for protozoan parasite propagation and studying host-parasite interaction [J]. *Int J Med Microbiol*, 2012, 302(4–5): 203–209.
- [44] MADSEN O, RIKKERS R S C, WELLS J M, et al. Transcriptomic analysis of intestinal organoids, derived from pigs divergent in feed efficiency, and their response to *Escherichia coli* [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 173.
- [45] MEDIDA R L, SHARMA A K, GUO Y, et al. Dietary zinc supplemented in organic form affects the expression of inflammatory molecules in swine intestine [J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(15): 2519.
- [46] YIN L, ZHANG Y, LI J, et al. Mechanism of iron on the intestinal epithelium development in suckling piglets [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(9): 2070–2085.
- [47] SPENCE J R, MAYHEW C N, RANKIN S A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro [J]. *Nature*, 2011, 470(7332): 105–109.
- [48] STIELER STEWART A, FREUND J M, BLIKSLAGER A T, et al. Intestinal stem cell isolation and culture in a porcine model of segmental small intestinal ischemia [J]. *J*

- Vis Exp, 2018(135): 57647.
- [49] ZWARYCZ B. Extrinsic regulation of intestinal STEM cell proliferation and differentiation by niche components [M]. North Carolina: The University of North Carolina at Chapel Hill; 2018.
- [50] ZHANG Y, YANG N, LI Y, et al. Transmissible gastroenteritis virus induces inflammatory responses via RIG-I/NF- κ B/HIF-1 α /glycolysis axis in intestinal organoids and in vivo [J]. J Virol, 2024, 98(6): e0046124.
- [51] WANG Q, WANG F, ZHOU Y, et al. Bacillus amyloliquefaciens SC06 relieving intestinal inflammation by modulating intestinal stem cells proliferation and differentiation via AhR/STAT3 pathway in LPS-challenged piglets [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(12): 6096–6109.
- [52] FINKBEINER S R, FREEMAN J J, WIECK M M, et al. Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids [J]. Biology Open, 2015, 4(11): 1462–1572.
- [53] XU Z Y, HUANG J J, LIU Y, et al. Extracellular matrix bioink boosts stemness and facilitates transplantation of intestinal organoids as a biosafe Matrigel alternative [J]. Bioeng Transl Med, 2022, 8(1): e10327.
- [54] BARNETT A M, MULLANEY J A, HENDRIKS C, et al. Porcine colonoids and enteroids keep the memory of their origin during regeneration [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2021, 320(5): C794–C805.
- [55] MANSOUR A A, GONÇALVES J T, BLOYD C W, et al. An *in vivo* model of functional and vascularized human brain organoids [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(5): 432–441.
- [56] SUGIMOTO S, KOBAYASHI E, FUJII M, et al. An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome [J]. Nature, 2021, 592(7852): 99–104.
- [57] YIN X, MEAD B E, SAFAEE H, et al. Engineering stem cell organoids [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(1): 25–38.
- [58] CLAPP N, AMOUR A, ROWAN W C, et al. Organ-on-chip applications in drug discovery: an end user perspective [J]. Biochem Soc Trans, 2021, 49(4): 1881–1890.

[收稿日期] 2024-11-06

《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!

李夏莹,田永路,韦玉生,等. 实验动物福利伦理审查要点 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(4): 616-622.

LI X Y, TIAN Y L, WEI Y S, et al. Key aspects for the ethical review of laboratory animal welfare protocols [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(4): 616-622.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.04.015

实验动物福利伦理审查要点

李夏莹¹, 田永路², 韦玉生^{1*}, 庞万勇^{3*}

(1. 北京大学 生命科学学院 实验动物中心, 北京 100871;

2. 北京大学 心理与认知科学学院, 北京 100871;

3. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京 100022)

【摘要】 作为重要的科研基础资源,实验动物已成为生命探索、医学研究、药物研发等领域不断发展的重要工具。随着实验动物福利法律法规的发展,实验动物福利日益被国际社会和科研共同体所重视。为了维护实验动物福利,规范实验动物伦理审查工作,参考国外的先进经验,结合中国实验动物福利伦理审查的特点,本文主要针对研究人员和审查委员,概述了研究计划的审查和批准流程、福利伦理评估的标准,旨在为实验动物研究计划的撰写提供参考,为实验动物福利伦理的审查工作提供借鉴。

【关键词】 实验动物;动物福利;伦理审查;监督管理

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 04-0616-07

Key aspects for the ethical review of laboratory animal welfare protocols

LI Xiaying¹, TIAN Yonglu², WEI Yusheng^{1*}, PANG Wanyong^{3*}

(1. Laboratory Animal Research Center, School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China;

2. School of Psychological and Cognitive Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

3. Translational *in Vivo* Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Corresponding author: WEI Yusheng. E-mail: yusheng.wei@pku.edu.cn;

PANG Wanyong. E-mail: pang1yong@outlook.com

【Abstract】 As an important and fundamental resource of scientific research, laboratory animals have become essential tools for the continuous advancements in life sciences, medical research, drug development, and other fields. With the development of related laws and regulations, the welfare of laboratory animals is increasingly valued by the general public and international research communities alike. To ensure the welfare of laboratory animals, the ethical review and conduct of laboratory animal practitioners should be standardized, incorporating and adapting advanced international practices with those in China. This article primarily outlines the process for reviewing and approving animal use protocols, along with the standards for evaluation, with the aim of providing a reference for researchers writing animal use protocols and for International Animal Care and Use Committee members conducting ethical reviews of laboratory animal welfare.

【基金项目】 国家重点研发计划(2023YFF0724902)。

Funded by National Key Research and Development Program(2023YFF0724902)。

【作者简介】 李夏莹,女,博士,高级工程师,研究方向:实验动物福利伦理和微生物检测。Email:lixiaying@pku.edu.cn

【通信作者】 韦玉生,男,博士,高级工程师,研究方向:基因修饰动物模型研发与实验动物管理。

Email:yusheng.wei@pku.edu.cn;

庞万勇,男,博士,实验动物高级医师,研究方向:实验动物福利伦理。Email:pang1yong@outlook.com。

* 共同通信作者

【Keywords】 laboratory animal; animal welfare; ethical review; supervision

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

我国 1988 年颁布的《实验动物管理条例》^[1]标志着我国实验动物工作从此进入了法治化管理阶段;后于 2006 年 9 月由国家颁布了《关于善待实验动物的指导意见》^[2]。2014 年,中国实验动物学会福利伦理专业委员会立项并制定国家标准《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018),并于 2018 年 9 月 1 日正式实施,这标志着我国实验动物福利伦理工作进入了新的阶段^[3]。2020 年 10 月 17 日我国正式通过了《中华人民共和国生物安全法》^[4],加快完善国家生物安全体系,促进我国生物安全体系建设和社会安全。2021 年 8 月,科技部组织有关部门和业界专家对《实验动物管理条例》进行了全面修订,形成了《中华人民共和国实验动物管理条例(修订草案征求意见稿)》,同时也向全社会公开征求了意见。2022 年 3 月,中共中央办公厅、国务院办公厅印发了《关于加强科技伦理治理的意见》^[5],进一步完善科技伦理体系。2023 年 9 月科学技术部发布了《科技伦理审查办法(试行)》^[6],涉及实验动物的科技活动作为主要审查内容之一。2024 年 2 月,科学技术部为促进脑机接口、人—非人动物嵌合体等领域的规范研究,国家科技伦理委员会人工智能伦理分委员会研究编制了《脑机接口研究伦理指引》^[7],生命科学伦理分委员会研究编制了《人—非人动物嵌合体研究伦理指引》^[8],供相关科研机构 and 科研人员参考使用。

实验动物福利伦理审查委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)依据国家相关法律法规和标准的要求进行审查,促使动物实验人员用最佳的实验方法、最优的实验流程、对动物伤害最小的实验手段进行动物实验,以达到最好的动物实验效果。动物研究方案,是研究人员撰写的供 IACUC 审查和批准的动物实验的详细说明。涉及动物的研究、测试和教学活动只有在获得 IACUC 的审查和批准后才能开始。本文通过查询国内外的参考文献,结合中国实验动物福利伦理审查的特点,对 IACUC 的审查流程和审查过程中的关键点进行概述。

1 实验动物福利伦理审查工作程序

实验动物福利伦理审查工作在北京大学的审查流程简述如下:由项目负责人(principal investigator, PI)或了解实验目的和设计的人员完整填报实验研究计划,填写完毕之后,提交至北京大学 IACUC。IACUC 审查主要有全体委员会审查和指定委员两种形式。形式审查主要审核实验动物从业人员资质、申请资料的完整性和规范性等形式内容,一般由 IACUC 秘书进行;兽医初审由 IACUC 主席指定的兽医进行,通常关注可能影响动物福利健康的操作(如,安乐死方法、外科手术、科学终点以及麻醉剂和镇痛剂的适当使用)。全体委员会审查时,以(GB/T 35892—2018)中规定的审查原则(必要性原则和保护原则、福利原则、伦理原则、利益平衡性原则、公正性原则、合法性原则、符合国情原则等)为准^[9-10],并同时参考 EU^[11]和 NRC^[12]资料进行全面审查,包括研究目的、设计等是否遵循 3R 原则(替代(Replacement);减少(Reduction);优化(Refinement))^[13],是否符合实验动物的福利伦理要求;有效会议应由半数以上的委员参加,伦理委员会应尽可能采用协商一致的方式做出决议,如无法协商一致,应根据少数服从多数的原则,做出伦理审查决议。指定委员审查时,也是参照同样的审查原则和标准,如有其他委员提请,可转为全体委员会审查。

2 实验动物伦理审查过程中的关注点

2.1 研究目的和科学意义

研究方案要求对研究目的进行简要解释,以及本研究在科学进步、人类或动物健康保护中的重要性。根据要求, IACUC 应由广泛的专家组成,包括一个非科学领域的成员^[14]。解释研究目的是向 IACUC 提供拟开展的动物研究的简单明了概述,无论其科学背景如何,委员会的所有成员都可以轻松理解。对研究目标的初步概述也有助于委员会了解该研究潜在的社会影响,以平

衡研究的潜在益处与动物福利问题。IACUC 也会考虑研究方案是否已经进行了科学界的同行评审(例如基于资金来源的项目)。

2.2 实验动物的选择

说明动物实验的必要性,是否可以用非动物实验进行替代。

说明选择动物种类、性别、周龄、动物模型的科学性。

2.2.1 动物的使用和替代实验的考虑

研究人员被要求提供必须使用动物以实现研究目标的原因,并要把 1959 年首次提出的 3R 原则视为确定动物数量、使用范围以及如何使用的基本原则^[15-16]。充分考虑:只有在彻底寻找了非动物替代品但不能满足研究目的后,才能在科学研究中使用动物。当使用动物时,研究应该以最人道的方式进行,确保获得有效结果所需的动物数量最少。具体而言,替代原则将解决为什么不能使用非动物模型(体外、计算)或系统发育较低等的动物模型。减少原则将通过提供研究方案所使用的动物数量的理由来解决,这应该包括对研究的不同内容、所需的群体规模、实验所设置时间点的解释。优化原则通过设计将疼痛、痛苦和不适降至最低的程序来解决^[17]。需要提供具体的例子来说明如何改进程序以最大限度地减少疼痛或痛苦,例如术后镇痛药的使用、无创成像程序、最大限度地降低频繁处理、使用活体动物前的适应性训练等来实现。

此外,实验动物饲养管理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(2011))^[12]要求保证动物实验不是非必要地重复先前的研究,并描述研究者考虑过用其它方法来替代可能导致实验动物经历较长时间或较大痛苦或紧张反应的实验步骤。前者通过研究计划上项目负责人的声明来实现,后者则通过搜索科学数据库来实现,提供搜索数据库名称、查找期限、关键词、结论等信息^[17-18]。

2.2.2 品种和品系的选择

提供选择特定品种、品系和动物模型(基因编辑模型、自发模型等)的理由。即动物模型具有解决所研究的特定假设和研究问题的有效性,同时也解释了一个系统发育水平较低的物种不合适的原因^[12]。

2.2.3 动物数量的确定

证明使用动物数量的合理性是实验方案的一个关键部分,由于福利的要求,应尽可能少地使用动物。样本量过大可能会不必要地使用超过所需数量的动物,使用过小的样本量可能没办法达到实验目的,从而浪费动物。确定动物数量可参考以下方法,如使用相同或相似动物模型的已发表文章或预实验结果。对于需要动物组织细胞的体外研究,基于所需的组织或细胞的数量来确定动物的数量,并且这些组织或细胞只能从特定动物的组织或器官中提取。繁殖群体的大小应该根据能够提供实验所需的动物数量的多少来确定,而不产生大量的额外动物,然后又必须对其进行不必要的安乐死处理。应解释不需要的基因型如何处理,可以考虑其他的潜在用途(例如,用于训练新员工或预实验)。鉴于越来越强调同时使用雄性和雌性进行动物研究,应该有适当的对照组、随机实验和性别选择的讨论^[19]。

2.3 实验设计及操作

对研究中的实验设计和操作步骤进行完整、简洁的描述。IACUC 成员需要获取足够的信息,了解在整个实验流程中会对动物做什么,以评估实验对动物福利的总体影响。细节太少会影响 IACUC 开展充分的审查,细节过多限制了研究人员在实验过程中进行微小程序更改的灵活性,甚至增加了偏离研究方案的可能性^[12]。

2.3.1 动物分组

说明动物的识别方法,比如编号系统。

2.3.2 动物饲养

按照国家标准的要求,保证饲养环境的温度、湿度、通风、光照和压力等条件,提供充足的可以表达动物天性的活动空间,以及足够的饲料和饮水。

2.3.3 非手术的实验程序

(1)给药:给药的途径、频率、剂量。如果给药的物质存在已知毒性,要提供动物身体状况监控的详细信息,并说明观察到不良影响时所提供的干预措施。对人类或者环境有危害的物质,需要进行额外的说明。

(2)采血:抽血频率、体积、方法。IACUC 应制定血液采样程序指南,如每周采集的总血液的最大限度、采集次数的限制以及采集之间的最短

恢复期。任何偏离指南的行为都应该有科学依据。

(3) 成像:包括麻醉方法、麻醉深度的确定和监测、体温维持等方法。此外,还要求提供其他信息,如成像设备的位置、往返该位置的交通、对动物健康的任何影响,以及如何在不同动物之间对设备进行消毒等。

(4) 行为学测试:行为测试的方法、使用的设备、动物监测和动物适应过程,在实验之前对动物进行的训练。正向训练法比负向训练法更被认可。

(5) 肿瘤模型:包括实验细节,如如何测量肿瘤大小、测量频率、对健康和福利的预期影响、肿瘤的最大体积大小、出现溃疡以及身体状况评分或体重下降时的处理方式、人道终点设置等。

2.3.4 实验中涉及活动限制、饮水和饲料的限制

(1) 活动限制:需要考虑到有没有更好的替代方法存在。一旦需要限制,需要考虑限制时间是否是为了达到科学目的所需的最短时间;操作人员是否经过了正确的培训;动物假如不能适应活动限制,是否有替代方案^[20]。

(2) 饮水和饲料限制:每天观察动物体质量、行为学和其他生理指标,保存每天对动物的观察记录。如果完全禁食的目的是为了减少麻醉后诱导及复苏阶段出现的呕吐,禁食 8 ~ 16 h 对犬、猫、雪貂、灵长类动物是适当的,但对没有呕吐功能的兔子和啮齿类动物是不必要的。

2.3.5 外科手术

(1) 手术类型(大型或者微创,存活与非存活)、手术人员、手术地点等信息都是必须的。非存活手术是指在动物麻醉复苏前进行安乐死的手术^[21]。

(2) 手术人员:必须经过培训,并提供相应的培训记录。

(3) 手术地点:非啮齿类哺乳动物的主要存活手术必须在专门的手术室进行。如果经常进行无菌手术,手术室不能用于任何其他活动。

(4) 术前准备:如食物和液体限制(术前禁食)、基础数据采集(如体质量、血液)、术前镇静(如需要)以及准备术后恢复所需物品。

(5) 术后护理:需要详细方案,包括饲养和保守疗法、缝线移除、提供镇痛和其他术后药物、恢

复期间监测疼痛和痛苦参数、术后恢复的其他评估、潜在并发症的管理,以及在疼痛或痛苦未缓解的情况下的任何人道终点。方案还应指明负责术后护理和评估以及定期更新记录的人员,包括周末、下班后和节假日。

(6) 同一动物进行多次手术:多次主要存活手术是指需要在一个动物个体上实施两个或更多的这样的手术的情况,应尽量避免此类手术。如果这样的多次存活手术必须进行,需要在向 IACUC 递交的申请中描述这一做法在科学上的必要性,并写清楚一次手术后如何确定动物状态可接受下一次手术,而且必须专门经过 IACUC 批准才能实施。

2.4 疼痛管理

对疼痛的耐受性和对各种疼痛刺激的反应表现出的反应在不同物种、品种和品系之间,甚至在不同性别或同一物种的不同个体之间都有所不同。尽管如此,还是要对实验类型做出一般性假设,即实验操作是否引起疼痛或痛苦,是否是一过性的或更持久,以及后者是否会用麻醉剂、镇痛药和/或镇静剂缓解,还应描述减少疼痛或痛苦的任何非药物方法。许多 IACUC 使用美国农业部(United States Department of Agriculture, USDA)的疼痛和痛苦分类,美国农业部的疼痛类别为:

B 类:为研究而饲养或饲养但尚未用于研究目的的动物。

C 类:将对其进行实验的动物,不涉及或仅涉及短暂的疼痛、痛苦或使用止痛药物。

D 类:将对动物进行涉及疼痛或痛苦的实验,并将使用适当的麻醉、镇痛或镇定药物。

E 类:将对动物进行涉及疼痛或痛苦的实验,但不使用麻醉剂、镇痛药或镇静剂,因为会对实验产生不利影响^[18]。

对于诱发慢性疾病的研究,如肿瘤研究或传染病研究,疼痛类别可能并不总是明确的。研究者应就如何对此类研究的疼痛分类向 IACUC 寻求指导。

2.5 科学终点与人道终点

建立人道终点标准是为了确定何时应该实施安乐死,人道终点不一定与科学终点相同,因为科学终点是根据科学目的来设计的,而人道终

点指的是一些动物在达到科学终点之前,出于福利伦理原因采取干预措施,防止动物疼痛或痛苦,甚或实施安乐死。安乐死指标可能是肿瘤大小、体质量减轻百分比、无法进食或饮水、行为异常或严重感染或呼吸窘迫的临床迹象,这些必须与实验方案一起进行描述^[20-21]。对于任何已知会导致明显症状或可能致命的研究,如肿瘤细胞、生物制品、传染性病原、辐射或有毒化学物质,必须描述预期的临床症状和人道终点。安乐死通常是在科学目标实现后的最早阶段,如果将动物的死亡作为科学终点,IACUC 将需对该研究进行严格评估。

2.6 其他相关信息

2.6.1 非标准化的饲养管理

应详细描述与标准饲养流程之间的偏差,以及说明充分理由。包括使用代谢或其他专门的笼具、光周期的变化、单笼饲养、特殊饮食饮水、食物或饮水调节,或各种其他特殊的研究需求^[22]。如果是基因修饰动物,必须提及任何预期的表型后果(体型小、攻击性强、非典型行为)和所需的任何特殊护理(将饲料放在笼底,将个体分开,需要额外的环境丰富)。

2.6.2 动物进出设施

大多数机构都有运输的规定,跨区域运输需要遵守相应的法律法规。如果动物要在机构内的设施之间运输,例如用于成像或行为学等测试,则应在方案中进行描述。对运输方法、时间表和路线的描述将有助于评估非研究人员是否有任何暴露风险。运输是否需要特殊容器/笼具,以及运输动物的人员是否需要特殊培训。

2.6.3 物种特异性的环境丰富

应该为动物提供适当的环境丰富产品,以促进动物的身体和心理健康以及物种特定行为的表达^[23]。如果要求取消环境丰富,则必须向 IACUC 提供科学依据,以及豁免环境丰富的时间计划。对非人灵长类动物环境丰富的任何限制,都必须加以描述和科学论证。

2.6.4 非药品级物质的使用

在活体动物身上使用非药物级的物质时,如果有药物级的替代品,IACUC 将要求对其使用非药品级物质进行科学论证^[24]。研究人员还需提供非药物级物质的纯度、无菌性、储存、有效期、

已知副作用和不良反应的相关信息^[12]。

2.6.5 危险因素

IACUC 要求研究方案包含危险物质名称、类别、半衰期、给药剂量、动物处置,以及如何保证危险因素不会对设施中的环境、人类或其他动物构成风险。此外,还要描述应采取必要的防护措施如危险标识、设施人员告知、特殊的个人防护设备和饲养措施等。

2.6.6 生物材料

涉及在动物中使用生物材料的方案需要额外的审查和批准程序,即 IACUC 在批准之前需要咨询生物安全委员会的意见,在确保实验室的生物安全等级、人员操作符合要求的前提下,才可批准。在动物设施外采集的材料,如人类或动物来源的细胞、重组或合成 DNA、细菌或病毒、病毒载体、组织和体液,都需要经过筛查程序,以确保其安全使用。此外,根据生物安全等级要求,受试动物应被适当安置在 ABSL-2 和 ABSL-3 的设施中,且动物饲养员和实验人员要做好相应的防护措施。

2.6.7 野外研究

如果研究活动以任何方式影响了野外动物或其环境,影响动物的活动可能是会造成伤害的处理,如捕捉、捆绑或文身,以及生物采样,也可能是没有直接接触但仍影响动物的程序,例如声音播放、人类接近。为了评估研究的潜在影响,IACUC 可以咨询专家,如野生动物学家、生态学家等^[25]。IACUC 在审查研究方案时应考虑是否符合国家和当地法律法规的要求,诱捕方法是否科学合理、疼痛和痛苦的最小化、可用的紧急安乐死方法、执行这些程序的人员的培训,以及相配套的职业健康和安全计划^[26-27]。

2.6.8 合作研究机构

如果机构之间的合作涉及到动物的使用(除动物运输外),那么机构应有一份正式的书面文件(如合同、备忘录或协议)来阐明动物饲养管理和使用由哪一方来负责,动物的所有权归哪一方,IACUC 审核和监督由哪一方负责等^[28]。

3 结语

IACUC 通过对研究方案的审查将促进在科学研究中对动物合理、科学且符合福利伦理要求

的使用。研究人员应尽可能使用通俗易懂的描述方式提供所有所需信息,以便任何审查该研究方案的 IACUC 成员能全面了解所提出的研究。IACUC 还应努力使研究方案审查的过程尽可能方便研究人员,尽量降低时间和精力成本。科学合理的方案模板设计、标准化 SOP 的使用、兽医咨询和方案预审查、数据库的使用、与其他审批活动的配合以及审查标准的一致性都有助于更高效、更直接的审查^[29-32]。此外,由于我国目前尚未有健全的实验动物伦理审查法律依据,因此,践行伦理审查还需结合国情而实施,同时行业与相关部门也要积极推动相关工作的立法进程!

参 考 文 献(References)

- [1] 中华人民共和国国家科学技术委员会. 实验动物管理条例. 国家科学技术委员会令第 2 号 [R]. 北京: 国家科委; 1988.
National Science and Technology Commission of the People's Republic of China. Regulations on the management of experimental animals. Order No. 2 of the National Science and Technology Commission [R]. Beijing: National Science and Technology Commission; 1988.
- [2] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导意见. 国科发财字[2006]398 号 [R]. 北京: 中华人民共和国科学技术部; 2006.
Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guiding opinions on treating experimental animals well. Guoke Caifa Zi [2006] No. 398 [R]. Beijing: Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China; 2006.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 福利伦理审查指南: GB/T 35892-2018 [S]. 北京: 中国标准出版社; 2018.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, China National Standardization Administration. Guidelines for ethical review of laboratory animal welfare: GB/T 35892-2018 [S]. Beijing: China Standard Press; 2018.
- [4] 全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国生物安全法 国家主席令[2020]56 号 [R]. 北京: 全国人民代表大会常务委员会; 2020.
The Standing Committee of the National People's Congress. biosafety law of the People's Republic of China presidential decree [2020] No. 56 [R]. Beijing: Standing Committee of the National People's Congress; 2020.
- [5] 中共中央办公厅, 国务院办公厅. 关于加强科技伦理治理的意见 国务院公报[2022]10 号 [R]. 北京: 中共中央办公厅, 国务院办公厅; 2022.
General Office of the Communist Party of China Central Committee, General Office of the State Council. Opinions on strengthening ethical governance in science and technology state council bulletin [2022] No. 10 [R]. Beijing: General Office of the Communist Party of China Central Committee, General Office of the State Council; 2022.
- [6] 中华人民共和国科技部, 中华人民共和国教育部, 中华人民共和国工业和信息化部, 等. 科技伦理审查办法(试行): 国科发监[2023]167 号 [R]. 北京: 中华人民共和国科技部; 2023.
Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China, Ministry of Education of the People's Republic of China, Ministry of Industry and Information Technology of the People's Republic of China, et al. Measures for ethical review of science and technology (trial): Guokefajian [2023] No. 167 [R]. Beijing: Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China; 2023.
- [7] 中华人民共和国科技部, 脑机接口研究伦理指引 [R]. 北京: 科技部; 2023.
Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China, Ethical guidelines for brain computer interface research [R]. Beijing: Ministry of Science and Technology; 2023.
- [8] 中华人民共和国科技部, 人-非人动物嵌合体研究伦理指引 [R]. 北京: 科技部; 2023.
Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Ethical guidelines for human non-human animal chimera research [R]. Beijing: Ministry of Science and Technology; 2023.
- [9] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 133-137.
SUN D M, LI W O, WANG T Q, et al. Standardization of ethical review for laboratory animal welfare and interpretation of the new national standards in China [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(10): 133-137.
- [10] 鹿双双, 师晓萌, 刘晓宇, 等. 实验动物福利伦理审查与监管实践及探索 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(4): 339-343.
LU S S, SHI X M, LIU X Y, et al. Practice and exploration on laboratory animal welfare and ethical reviewing and monitoring [J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(4): 339-343.
- [11] EU. Directive 2010/63/EU of The European Parliament And of The Council on the protection of animals used for scientific purposes [R]. Bruxelles, Belgium Official Journal of the European Union L 276; 2010.

- [12] NRC. Guide for the care and use of laboratory animals. in: the national academies collection; reports funded by national institutes of health. 8th ed. [R]. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
- [13] 中国实验动物学会. 实验动物福利伦理委员会工作指南: T/CALAS 73-2019 [S]. 北京: 中国实验动物学会; 2019.
- Chinese Society for Laboratory Animals. Working guidelines for the ethics committee on the welfare of laboratory animals: T/CALAS 73-2019 [S]. Beijing: Chinese Society for Laboratory; 2019.
- [14] PHS. Public health service policy on humane care and use of laboratory animals [R]. Washington, DC: Fed Regist; 1985.
- [15] RUSSELL W M S, BURCH R L. The principles of humane experimental technique [R]. London: Methuen; 1959.
- [16] BURCH R L. The progress of humane experimental technique since 1959: a personal view [J]. Altern Lab Anim, 2009, 37(3): 269-275.
- [17] Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique [R]. London: Methuen; 2020.
- [18] USDA. Animal care policy manual. In: USDA/APHIS/AC [R]. Washington, DC: USDA; 2017.
- [19] CLAYTON J A. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine [J]. FASEB J. 2016; 30(2): 519-524.
- [20] AVMA. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals; 2020 Edition [R]. Washington, DC: USDA; 2020.
- [21] 中国国家认证认可监督管理委员会. 动物实验人道终点评审指南: RB/T 173-2018 [S]. 北京: 中国国家认证认可监督管理委员会; 2018.
- China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Guidelines for the evaluation of humane end points in animal experiments: RB/T 173-2018 [S]. Beijing: China National Accreditation Service for Conformity Assessment; 2018.
- [22] OLAW. Departures from the guide [R]. Washington, DC: USDA; 2018.
- [23] HUTCHINSON E, AVERY A, VANDEWOUDE S. Environmental enrichment for laboratory rodents [J]. ILAR J, 2005, 46(2): 148-161.
- [24] WOLFF A, GARNETT N, POTKAY S, et al. Frequently asked questions about the public health service policy on humane care and use of laboratory animals [J]. Lab Anim (NY), 2003, 32(9): 33-36.
- [25] SIKES R S, PAUL E. Fundamental differences between wildlife and biomedical research [J]. ILAR J, 2013, 54(1): 5-13.
- [26] LABER K, KENNEDY B W, YOUNG L. Field studies and the IACUC: protocol review, oversight, and occupational health and safety considerations [J]. Lab Anim (NY), 2007, 36(1): 27-33.
- [27] PETRIE W P, WALLACE S L The care and feeding of an IACUC: the organization and management of an institutional animal care and use committee (2nd ed.) [M]. Florida: CRC Press; 2015.
- [28] UNDERWOOD W J. Contracting in vivo research: what are the issues? [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2007, 46(4): 16-19.
- [29] KLEIN H J, BAYNE K A. Establishing a culture of care, conscience, and responsibility: addressing the improvement of scientific discovery and animal welfare through science-based performance standards [J]. ILAR J, 2007, 48(1): 3-11.
- [30] 刘丽艳, 张宏馨, 边佳悦, 等. 实验动物福利伦理审查发现问题之思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 63-68.
- LIU L Y, ZHANG H X, BIAN J Y, et al. Reflection of the problems found in the ethical review of experimental animal welfare [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9): 63-68.
- [31] 王贵平, 周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 683-689.
- WANG G P, ZHOU Z Y. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 683-689.
- [32] 苏美洋伊, 陈昱君, 陈星, 等. 我国实验动物福利伦理审查质量评价指标体系构建研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 109-117.
- SU M Y Y, CHEN Y J, CHEN X, et al. Development of an indicator system of quality evaluation for welfare ethical review of laboratory animal care and use in China [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 109-117.

[收稿日期] 2024-08-02