

胡悦,王德成,张思怡,等. 10-11 易位蛋白 2 缺失加剧银屑病小鼠模型皮肤炎症损伤 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33 (5): 623-632.

HU Y, WANG D C, ZHANG S Y, et al. Ten-eleven translocation 2 (*TET2*) deficiency exacerbates skin inflammatory damage in psoriasis mouse models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 623-632.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.001

10-11 易位蛋白 2 缺失加剧银屑病小鼠模型 皮肤炎症损伤

胡悦[#], 王德成[#], 张思怡, 韩珊珊^{*}, 晁金^{*}

(三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002)

【摘要】 目的 利用 10-11 易位蛋白 2 (ten-eleven translocation 2, *TET2*) 基因敲除 (*TET2*^{-/-}) 小鼠模型, 探究 *TET2* 突变在咪喹莫特 (imiquimod, IMQ) 诱导的小鼠银屑病皮炎损伤中的影响。**方法** 将小鼠随机分为野生型 (wild type, WT) 凡士林组、WT 咪喹莫特组、*TET2*^{-/-} 凡士林组、*TET2*^{-/-} 咪喹莫特组, 在小鼠背部涂抹 IMQ 建立银屑病样皮炎模型; 造模期间每日观察对比 WT 咪喹莫特组及 *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠的皮损程度及病理变化; 待皮损达到最高峰处死小鼠, 评估 4 组小鼠脾指数; RT-qPCR 检测小鼠背部病灶处炎症因子 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-17A* 与 *IL-23* 的 mRNA 表达水平; 制作皮肤病理切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色对比 4 组皮肤组织病理学变化; 免疫组化检测 4 组小鼠背部皮肤中 *IL-17*、*INF-γ* 和 *TNF-α* 的表达情况; 利用透射电镜对比观察 4 组小鼠真表皮层超微结构。**结果** WT 咪喹莫特组小鼠皮损处 *TET2* 表达下调; *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组较 WT 咪喹莫特组小鼠皮炎损伤进程更快更严重, 总 PASI 评分及脾指数更高; *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠皮损组织中 *TNF-α*、*IL-6*、*IL-17A* 与 *IL-23* 在 mRNA 的表达均高于 WT 咪喹莫特组小鼠; *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠表皮增厚及炎症细胞浸润更为显著; *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠皮损处 *IL-17*、*INF-γ* 和 *TNF-α* 蛋白的阳性表达显著高于 WT 咪喹莫特小鼠; 超微病理观察显示 *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠皮损处细胞连接消失, 并存在大量线粒体脊断裂溶解、线粒体空泡以及线粒体膜质地变深现象。**结论** *TET2* 缺失会促进炎症反应, 从而加剧 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮炎损伤。

【关键词】 银屑病; 10-11 易位蛋白 2; 咪喹莫特; 皮肤炎症; 基础生物学实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0623-10

Ten-eleven translocation 2 (*TET2*) deficiency exacerbates skin inflammatory damage in psoriasis mouse models

HU Yue[#], WANG Decheng[#], ZHANG Siyi, HAN Shanshan^{*}, CHAO Jin^{*}

(Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University;

College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Corresponding author: HAN Shanshan. E-mail: feihu.1991@163.com; CHAO Jin. E-mail: chaojin028@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目 (82000914), 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室开放基金项目 (2023KZL017, 2023KZL029)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82000914), the Open Foundation of Hubei Province Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy (2023KZL017, 2023KZL029).

【作者简介】 胡悦, 女, 硕士, 研究方向: 分子病理与表观遗传。Email: 2410791894@qq.com;

王德成, 男, 博士, 教授, 研究方向: 慢性炎症性疾病的机制。Email: dcwang99@163.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 韩珊珊, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 分子病理与表观遗传。Email: feihu.1991@163.com;

晁金, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 慢性炎症性疾病的机制。Email: chaojin028@163.com。

^{*} 共同通信作者

【Abstract】 Objective To explore the impact of ten-eleven translocation 2 (*TET2*) mutations on imiquimod (IMQ)-induced psoriatic skin inflammation using a *TET2*-knockout (*TET2*^{-/-}) mouse model. **Methods** Mice were divided randomly into a wild-type (WT) vaseline group, WT imiquimod group, *TET2*^{-/-} vaseline group, and *TET2*^{-/-} imiquimod group. IMQ was used to establish a psoriasis-like dermatitis model, and the degree of skin lesions and pathological changes in mice in the WT imiquimod and *TET2*^{-/-} imiquimod groups were observed and compared daily during the modeling period. The mice were sacrificed when the phenotype had reached the peak and the spleen index was recorded in each group. Gene expression levels of the inflammatory factors tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-17A, and IL-23 in mouse back lesions were detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Skin histopathology was compared in hematoxylin/eosin-stained sections. IL-17, interferon (INF)- γ , and TNF- α protein expression levels in the back skin of mice in the four groups were detected by immunohistochemistry. The ultrastructure of the dermis and epidermis was observed using transmission electron microscopy. **Results** *TET2* expression was down-regulated in skin lesions in WT imiquimod group. Dermatitis lesions were more severe and progressed faster in *TET2*^{-/-} imiquimod group compared with WT imiquimod group, and the psoriasis area and severity index score and spleen index were both higher. mRNA expression levels of TNF- α , IL-6, IL-17A, and IL-23 in skin lesions were higher and epidermal thickening and inflammatory cell infiltration were increased, and protein expression levels of IL-17, INF- γ , and TNF- α were significantly higher in skin lesions in *TET2*^{-/-} imiquimod group compared with WT imiquimod group. In addition, cell junctions were absent in skin lesions in *TET2*^{-/-} imiquimod group and mitochondrial ridges were broken and dissolved, mitochondrial vacuoles were present, and the texture of the mitochondrial membrane was darker. **Conclusions** Loss of *TET2* promotes the inflammatory response and exacerbates IMQ-induced psoriasis-like dermatitis injury in mice.

【Keywords】 psoriasis; ten-eleven translocation 2; imiquimod; skin inflammation; biological experiment
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

银屑病是一种免疫介导的慢性炎症性皮肤病,在全球范围内发病率约为 3%^[1]。其患者典型的临床特征主要表现为边界清晰的红斑丘疹,以及附着在皮肤表面的银白色鳞屑。组织病理学表现为表皮异常增厚、网脊向下延伸及炎症细胞浸润等^[2]。该病极易反复发作,给患者的身心健康造成了巨大伤害。但银屑病的发病机理至今尚未阐明,临床仍缺乏有效治疗手段。因此发掘新的致病或易感基因,探究其参与调节银屑病发生发展的病理过程和发病机制,对临床早期预防银屑病及开发针对性治疗药物具有重要意义。

近年来,表观遗传修饰与免疫系统之间的关联已成为医学研究热点,为许多疾病的致病机理提供了新的研究思路。DNA 的甲基化与羟甲基化为表观遗传修饰的互补过程,它们可以在不改变基因序列的前提下,调控基因的表达和功能^[3]。据报道,DNA 甲基化与去甲基化失衡参与了众多自身免疫疾病的发生发展过程^[4]。其中,10-11 易位蛋白 2 (ten-eleven translocation 2, *TET2*) 是一种关键的甲基化调节酶,可通过改变 DNA 甲基化状态来调节特定基因的表达从而参

与多种炎症疾病的发生发展^[5-6]。例如,*TET2* 可以广泛抑制众多免疫细胞中的促炎基因,对调节机体免疫反应具有关键作用^[7]。此外,*TET2* 还在细胞分化和增殖中发挥着重要作用^[8]。在最近的研究中,研究人员通过注射慢病毒的方式敲低小鼠体内 *TET2* 的表达,观察到小鼠银屑病样皮炎症减轻。虽然研究暂未涉及 *TET2* 缺失引起银屑病的致病机理,但其揭示了 *TET2* 与银屑病之间的重要关联^[9]。然而,由于目前仍然缺乏 *TET2* 缺陷的动物模型,使得有关 *TET2* 参与调节银屑病皮炎进程的研究较少且不同研究团队的研究结果之间存在较大差异。因此,本研究构建了一个新的 *TET2* 全基因敲除 (*TET2*^{-/-}) 的银屑病小鼠模型,拟通过该模型进一步探究 *TET2* 突变对银屑病样皮肤炎症反应和进展的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

16 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (本文用 wild-type, WT 表示), 6 ~ 7 周龄 (体质量约 20 g), 雌

雄不限,购买及饲养均在三峡大学实验动物中心【SCXK(鄂)2022-0012】、【SYXK(鄂)2022-0061】。8只SPF级 $TET2^{-/-}$ 小鼠由本课题组利用CRISPR/Cas9技术构建,雌雄不限,6~7周龄(体质量约20g)。食用全价营养饲料和无菌水,饲养条件:温度为21~22℃,湿度为50%~60%,光照周期为12h明暗交替。本研究经三峡大学实验动物福利与伦理委员会批准(2023020Y)。

1.1.2 主要试剂与仪器

咪喹莫特(imiquimod, IMQ)乳膏(alclara, d06bb10);凡士林(德新康医疗, q/371402dxk027);Triton-X100(索莱宝, t8200);甲苯胺蓝染色液(索莱宝, g3661);BSA(索莱宝, 4240gr250);4%多聚甲醛固定液(赛维尔, g1101);DEPC水(索莱宝, r1600);RNA isolater Total RNA Extraction Reagent(诺唯赞, r401-01);SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞, q311-02)。

ABI PCR仪9902(applied biosystems, veriti™

96-well thermal cycler);核酸电泳仪(上海天能科技, tanon eps300);紫外分析仪(上海嘉鹏科技, uv-1000);奥林巴斯显微镜BX53F(OLYMPUS, bx53f);化学发光成像系统(上海勤翔, chemiscope6100)。

1.2 方法

1.2.1 模型构建

将小鼠随机分为4组(WT凡士林组、WT咪喹莫特组、 $TET2^{-/-}$ 凡士林组、 $TET2^{-/-}$ 咪喹莫特组),每组4只。造模前每只小鼠使用小型剃毛器及温和脱毛膏处理小鼠背部皮肤,形成约2cm×3cm裸露区域。次日起连续5d,每日1次给咪喹莫特组小鼠背部皮肤涂抹5%IMQ乳膏,剂量为62.5mg,同时给凡士林组小鼠涂抹等量凡士林。期间每日进行拍照及使用银屑病面积和严重程度指数(psoriasis area and severity index, PASI)评分记录小鼠背部皮肤病变进展(如图1所示)。

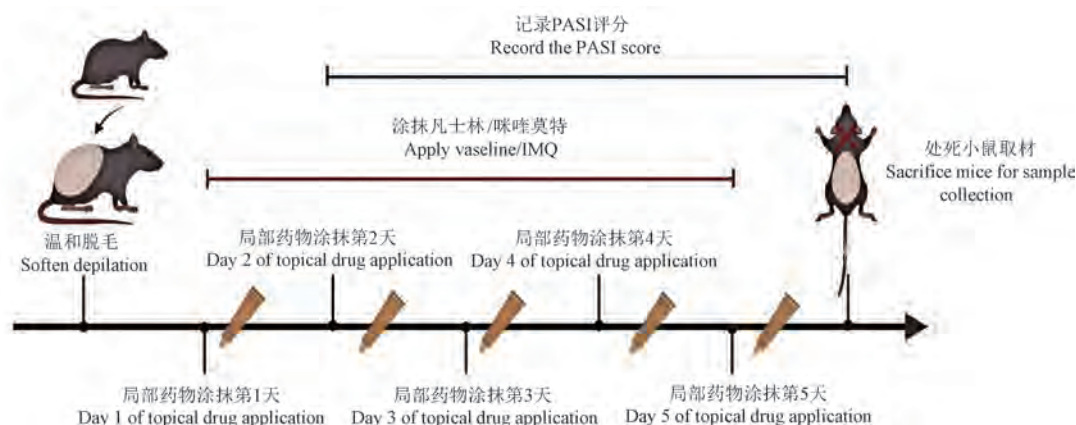


图1 小鼠银屑病造模流程

Figure 1 Procedure of mouse psoriasis model establishment

PASI评分是评估皮肤皮疹、红斑、浸润和鳞屑病损程度,具体评分方案见表1。待表型达到高峰后,处死小鼠并取材,进行后续实验。脾体积即为在取材时用尺子测量脾的大小,脾指数为脾质量(mg)/处死时体质量(g)的值。

1.2.2 苏木素-伊红(HE)染色

将小鼠皮肤组织用4%多聚甲醛固定12h,完成后进行组织修块、脱水、石蜡包埋切片(厚度约4μm)、脱蜡及乙醇浓度梯度的水化处理,后将切片进行HE染色和中性树脂封片,镜下观察皮肤组织病理改变。

HE染色结果中,小鼠表皮厚度测定是在显微镜下利用配备的测量工具进行精确测量。

1.2.3 免疫组织化学染色

制备切片过程同HE染色。用柠檬酸盐缓冲液将切片用95℃高温水浴修复20min,冷却至室温。3% H_2O_2 室温孵育15min后,用5%BSA于37℃封闭1h,吸尽废液后滴加相应一抗,4℃孵育过夜。次日二抗室温孵育1h。PBS润洗3次,每次5min。应用DAB显色液显色,蒸馏水冲洗3遍后,再次乙醇浓度梯度脱水至透明,置于通风橱内风干后,使用中性树脂封片固定。

表 1 小鼠银屑病模型 PASI 评分方案

Table 1 PASI scoring scheme for psoriasis model in mice

评估类别 Evaluation category	评分标准 Scoring criteria						
	0 分 0 points	1 分 1 point	2 分 2 points	3 分 3 points	4 分 4 points	5 分 5 points	6 分 6 points
皮疹面积 Area of rash	无皮疹 Rash-free	1% ~ 9%	10% ~ 29%	30% ~ 49%	40% ~ 59%	60% ~ 79%	80% ~ 100%
红斑 Erythema	无红斑 No erythema	呈淡红色 Light red	红色 Red	深红色 Dark red	广泛暗红色 Widespread dusky erythema	-	-
浸润 Infiltration	皮损与正常皮肤齐平 Lesions flush with normal skin	皮损轻微高于正常皮肤 Slightly raised lesions	中等程度隆起, 斑块边缘为圆型或斜坡型 Moderately elevated plaques with rounded or sloped borders	皮损肥厚, 隆起明显 Markedly elevated, hypertrophic lesions	皮损高度增厚, 隆起极为明显 Severely hypertrophic, markedly elevated lesions	-	-
鳞屑 Scale	表面无可见鳞屑 No visible scale on the epidermis	部分皮损表面上附有鳞屑, 以细微的鳞屑为主 Partial scaling present, predominantly fine scales	大多数皮损表面完全或不完全覆有鳞屑, 鳞屑呈片状 Most lesions are partially or completely covered with patchy scales	几乎全部皮损表面覆有鳞屑, 鳞屑较厚成层 Nearly all lesions are covered with thick, laminated scales	全部皮损表面均覆有鳞屑, 鳞屑很厚成层 All lesions are completely covered with thick, laminated scales	-	-

1. 2. 4 透射电镜(transmission electron microscope, TEM) 观察

取 5 mm × 5 mm 左右的皮层浸泡于 2.5%戊二醛溶液中,后将组织置于 1%四氧化锇中固定 2 h,并脱水。将组织利用环氧丙烷处理后进行烘干、包埋、超薄切片及醋酸铀与柠檬酸铅染色。最后利用高分辨率透射电子显微镜观察小鼠超微病理变化。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0.0 软件作图并进行统计学分析,数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析两组间对比采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为具有统计学意义。每组实验至少独立重复 3 次。

2 结果

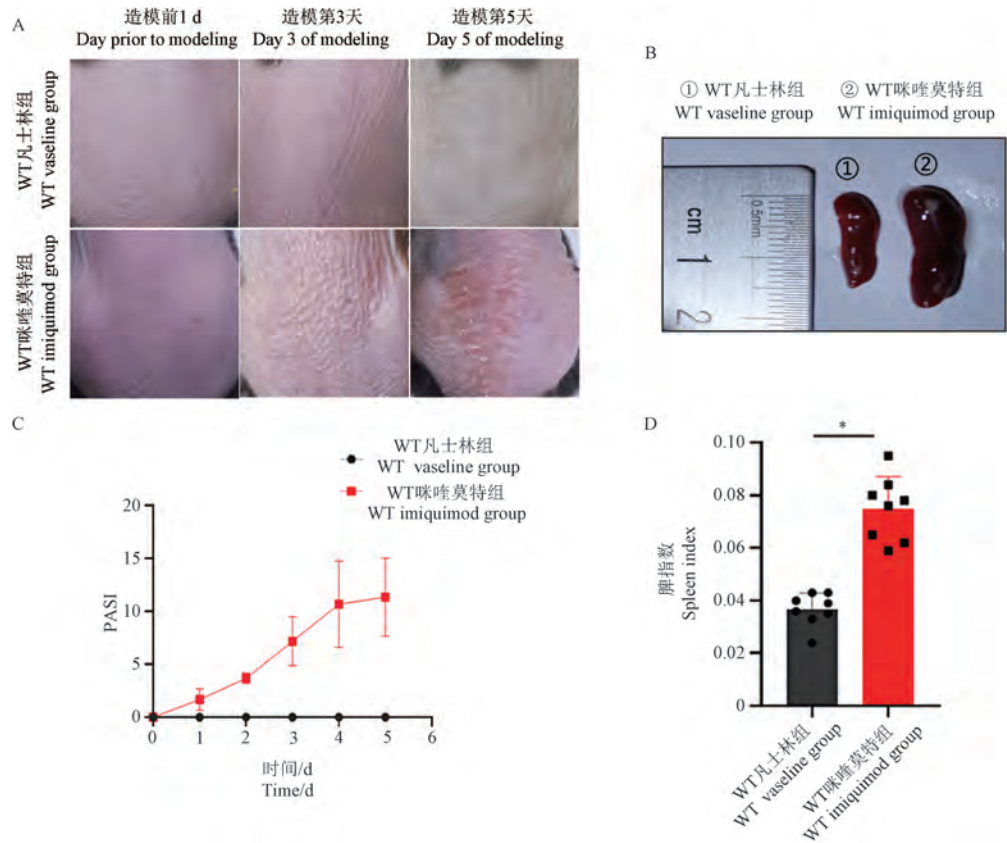
2.1 构建 IMQ 诱导的银屑病小鼠模型

研究人员按照图 1 中的造模示意对 WT 小鼠进行造模及表型记录。结果显示 WT 凡士林组背部皮肤光滑平整且无任何炎性症状,但咪喹莫特

组背部皮肤出现红斑、鳞屑等类银屑病皮炎症状。与凡士林组相比,咪喹莫特组小鼠的 PASI 总评分从造模第 2 天起持续上升,第 5 天达到表型高峰。处死小鼠后,称量小鼠体质量和脾质量,计算脾指数,发现咪喹莫特组小鼠的脾体积及脾指数均大于凡士林组($t = 4.037, P < 0.05$),见图 2,表明咪喹莫特组小鼠脾免疫功能更活跃。

2.2 WT 银屑病小鼠病灶处 TET2 表达下调

通过对两组小鼠的皮肤组织进行 HE 染色,发现 WT 凡士林组小鼠表皮平坦、角质层较薄且无炎症浸润等现象,但 WT 咪喹莫特组小鼠表皮明显增厚,并存在网脊向下延伸、角化过度及部分可见的炎性细胞浸润等类银屑病样病变(图 3A)。于是研究人员利用 RT-qPCR 技术检测了皮损处代表性炎症因子的表达,结果显示与 WT 凡士林组相比,*TNF-α*、*IL-6*、*IL-17A* 与 *IL-23* 在模型小鼠皮损处的 mRNA 表达呈不同程度的升高($t = 1.934, 3.190, 3.859, 6.345, P < 0.05$),见图 3B。以上结果表明,本研究成功构建了由 IMQ 诱

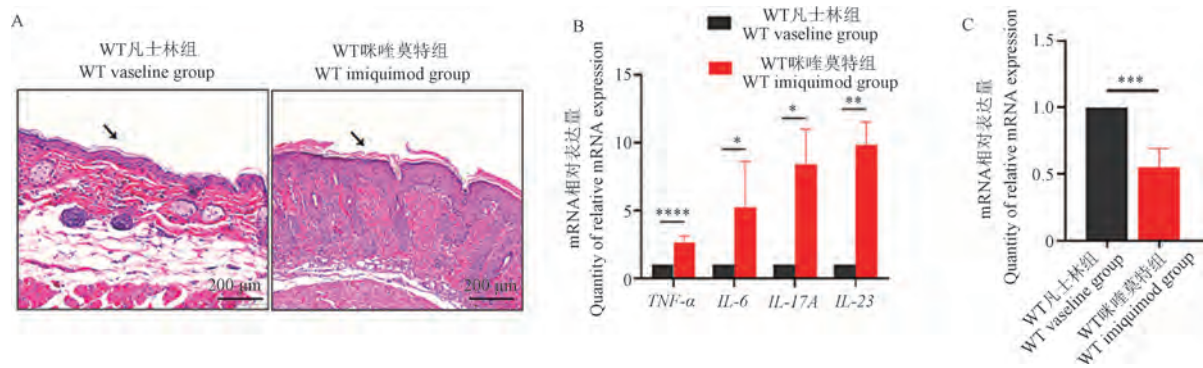


注:A:小鼠造模期间背部表型图;B:小鼠表型高峰时脾大体观;C:小鼠银屑病模型 PASI 评分统计图;D:WT 凡士林组与 WT 咪喹莫特组小鼠脾指数统计图;与 WT 凡士林组相比, * $P < 0.05$ 。(下同)

图 2 IMQ 诱导小鼠银屑病模型构建

Note. A. Phenotyping of the black of mice during modeling. B. Gross view of spleen of mice at peak phenotype. C. Statistical plot of PASI scores in a mouse psoriasis model. D. Statistical plots of spleen index of WT vaseline group and WT imiquimod group. Compared with WT vaseline group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Construction of IMQ-induced psoriasis model in mice



注:A:小鼠皮肤组织 HE 染色结果;B:小鼠皮肤组织炎症因子 mRNA 表达分析;C:WT 小鼠银屑病皮炎组织处 *TET2* 的 mRNA 表达水平;与 WT 凡士林组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。(下同)

图 3 WT 小鼠 HE 染色与关键因子分析

Note. A. HE staining results of mouse skin tissue. B. Analysis of mRNA expression of inflammatory factors in mouse skin tissue. C. *TET2* mRNA expression levels in psoriatic dermatitis tissues of WT mice. Compared with WT vaseline group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 3 HE staining and key factor analysis in WT mice

导的 WT 银屑病小鼠模型。利用该模型,在 mRNA 水平上初步探究了 WT 小鼠银屑病样皮损处 *TET2* 的表达情况。结果显示,WT 银屑病小鼠病灶处 *TET2* 的表达显著下调($t = 8.891, P < 0.001$),见图 3C,提示 *TET2* 可能参与调节银屑病皮损的消退。

2.3 *TET2* 缺失明显加重 IMQ 诱导的银屑病皮损表型

研究人员再次按照上述造模方法对 *TET2*^{-/-} 小鼠进行银屑病造模。如图 4A 所示,经 IMQ 诱导的 *TET2*^{-/-} 小鼠红斑遍布整个背部裸露区域并伴有厚层鳞屑,表皮显著增厚隆起,其病变累及范围较 WT 咪喹莫特组相比更为广泛、皮肤损伤更严重。PASI 评分显示 *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠表型进展更快(图 4C)。此外,*TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠脾体积异常增大,且脾指数远高于 WT 咪

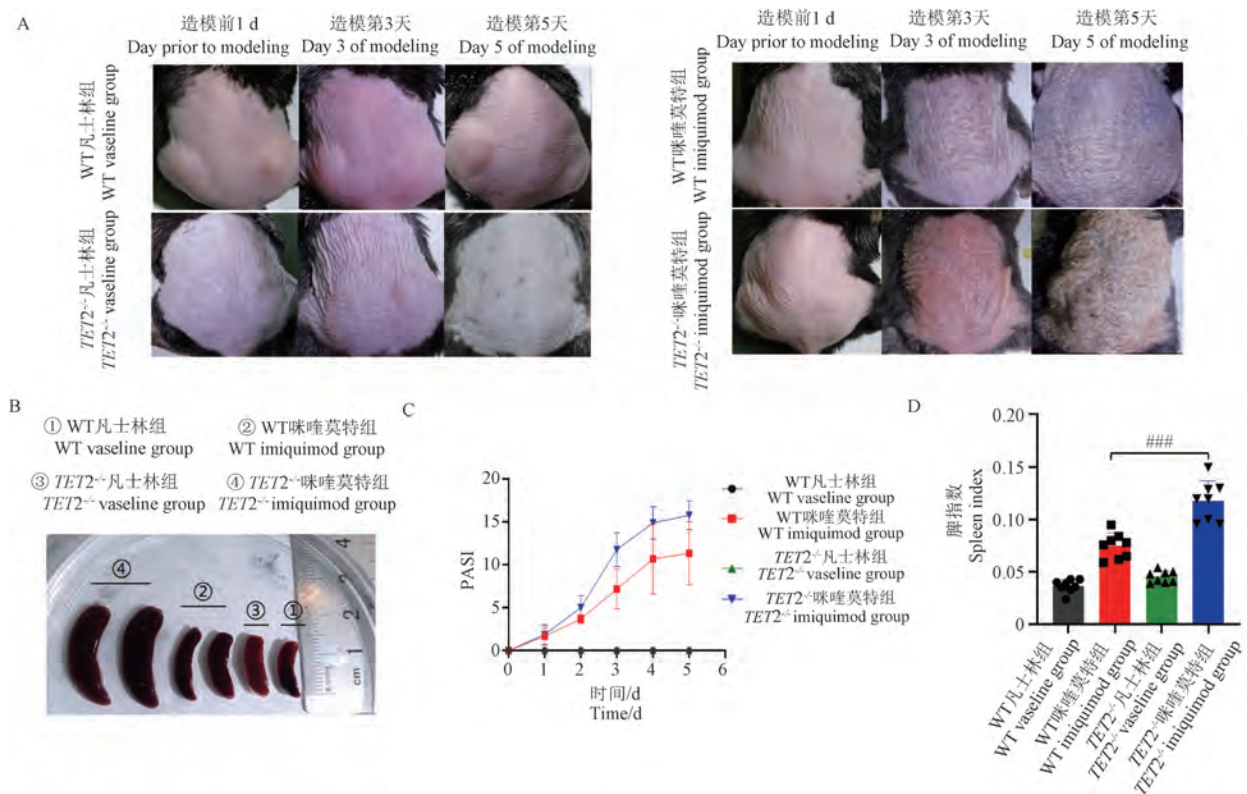
喹莫特组($t = 5.311, P < 0.001$),见图 4B,图 4D。

2.4 *TET2* 缺失对银屑病小鼠表皮的影响

同样在造模完成后将 4 组小鼠的病变组织进行 HE 染色,通过对比,发现 WT 咪喹莫特组与 *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠的表皮较 WT 凡士林组均存在不同程度增厚(图 5A)。测量小鼠表皮垂直厚度,发现 *TET2*^{-/-} 咪喹莫特组小鼠表皮增厚程度远高于 WT 咪喹莫特组小鼠($t = 7.191, P < 0.0001$),见图 5B,表明 *TET2* 突变会加重小鼠银屑病的皮肤炎症表型。

2.5 *TET2* 缺失加剧小鼠银屑病样皮肤炎症反应

为了探究 *TET2* 缺失加剧小鼠银屑病样皮损损伤的潜在机制,首先检测了模型小鼠病灶处炎症因子及分化调节因子的表达。图 6 结果显示,

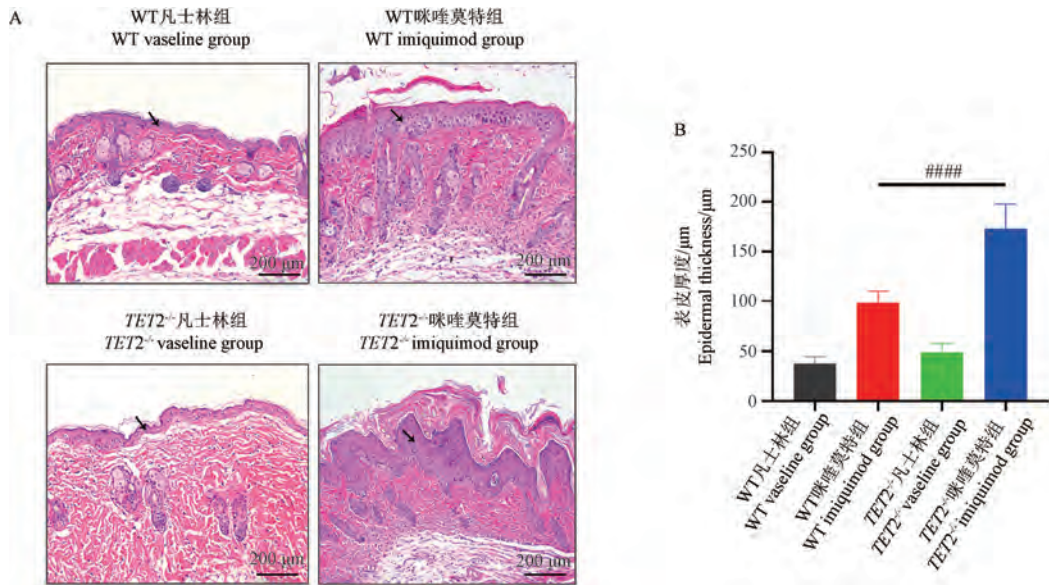


注:A:小鼠造模期间背部表型图;B:小鼠表型高峰时脾大体观;C:银屑病小鼠模型的 PASI 评分统计图;D:4 组小鼠脾指数统计分析图;与 WT 咪喹莫特组相比,### $P < 0.001$ 。(下同)

图 4 WT 与 *TET2*^{-/-} 银屑病小鼠模型大体病变表型分析

Note. A. Phenotyping of the back of mice during modeling. B. Gross view of spleen of mice at peak phenotype. C. Statistical plot of PASI scores in a mouse psoriasis model. D. Statistical analysis of spleen index in four groups of mice. Compared with WT imiquimod group, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 4 Analysis of gross lesion phenotypes between WT and *TET2*^{-/-} psoriasis mouse model

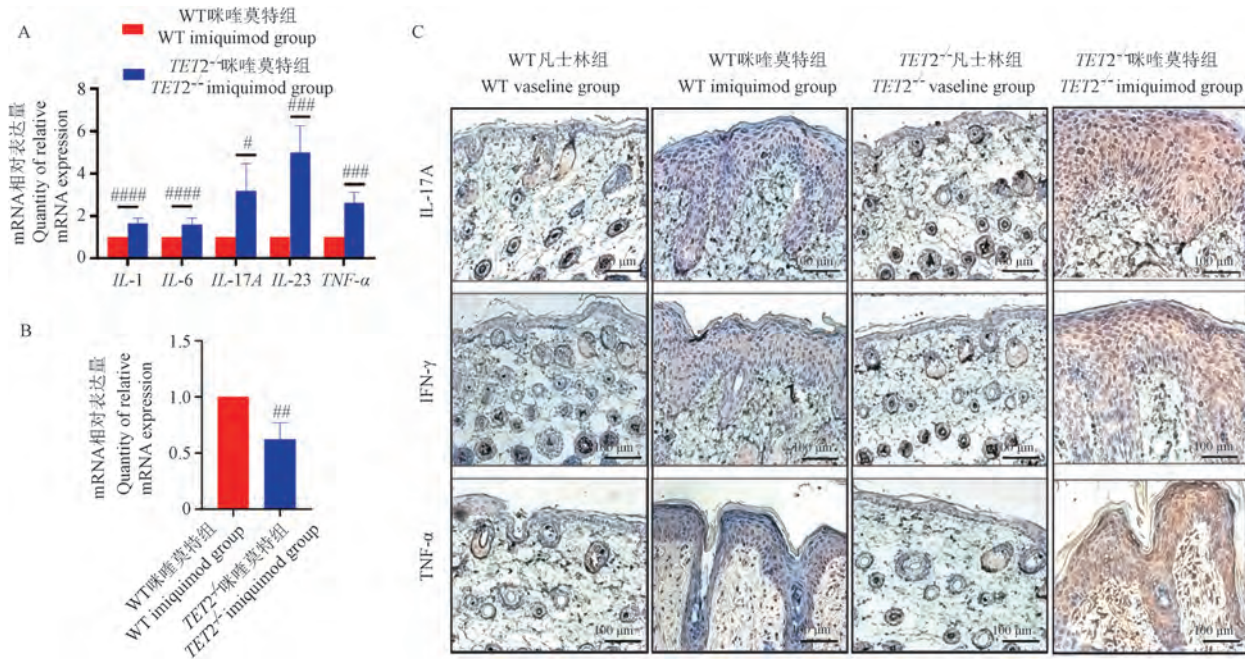


注:A:小鼠的皮肤组织 HE 染色结果;B:小鼠的表皮厚度测定;与 WT 咪喹莫特组相比,#### $P < 0.0001$ 。(下同)

图 5 各组小鼠皮肤组织 HE 染色

Note. A. HE staining results of mouse skin tissue. B. Determination of epidermal thickness in mice. Compared with WT imiquimod group, #### $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 5 HE staining of mouse skin tissue in each group



注:A:银屑病小鼠病灶处炎症因子 *IL-1*、*IL-6*、*IL-17A*、*IL-23* 与 *TNF-α* 的 mRNA 表达水平分析图;B:晚期分化标志因子 *K10* 的 mRNA 表达水平;C:小鼠背部皮肤组织 *IL-17A*、*IFN-γ* 和 *TNF-α* 免疫组化染色结果;与 WT 咪喹莫特组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 银屑病小鼠皮肤炎症损伤及分化探究

Note. A. Analysis of mRNA expression levels of inflammatory factors *IL-1*, *IL-6*, *IL-17A*, *IL-23* and *TNF-α* in lesions of psoriatic mice. B. mRNA expression levels of the late differentiation marker *K10*. C. Immunohistochemical staining results for *IL-17A*, *IFN-γ* and *TNF-α* in mouse dorsal skin tissues. Compared with WT imiquimod group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Investigation of skin inflammatory injury and differentiation in psoriasis mice

TET2^{-/-}咪喹莫特组小鼠炎症因子 *IL-1*、*IL-6*、*IL-17A*、*IL-23* 及 *TNF-α* 的 mRNA 表达较 WT 咪喹莫特组均显著上调 ($t = 5.150$ 、 5.973 、 3.190 、 9.900 、 6.134 , $P < 0.05$), 见图 6A。此外, 晚期分化因子 *K10* 在 *TET2*^{-/-}咪喹莫特组小鼠病灶处表达显著降低 ($t = 4.343$, $P < 0.01$), 提示 *TET2*^{-/-}模型小鼠分化异常, 见图 6B。随后采用免疫组化的方法检测了 *IL-17*、*INF-γ* 与 *TNF-α* 在 4 组小鼠背部皮损处的表达情况。经探究发现 3 者在两组造模小鼠皮损处的表达均上调, 但 *TET2*^{-/-}咪喹莫特组小鼠阳性信号更多、更强烈, 见图 6C。以上结果表明, *TET2* 缺失会加重由 IMQ 诱导的小鼠皮肤炎症水平。

2.6 表皮超微病理分析

为了进一步探究 *TET2* 缺失加剧银屑病样皮损的原因, 选用 TEM 来观察小鼠病变处超微病理结构。结果显示, 4 组小鼠除 WT 凡士林组外均存在细胞间隙增大现象, 以 *TET2*^{-/-}咪喹莫特组最为严重。有研究指出表皮细胞紧密连接蛋白异常也属于银屑病的病理学特征^[10]。此外, *TET2*^{-/-}咪喹莫特组小鼠病灶处大量线粒体存在脊断裂溶解、空泡及质膜变深现象(图 7), 提示 *TET2* 突变可能会破坏线粒体的结构和功能, 这可能是 *TET2* 参与银屑病发生发展的潜在机制, 但其具体机制还需进一步探究。

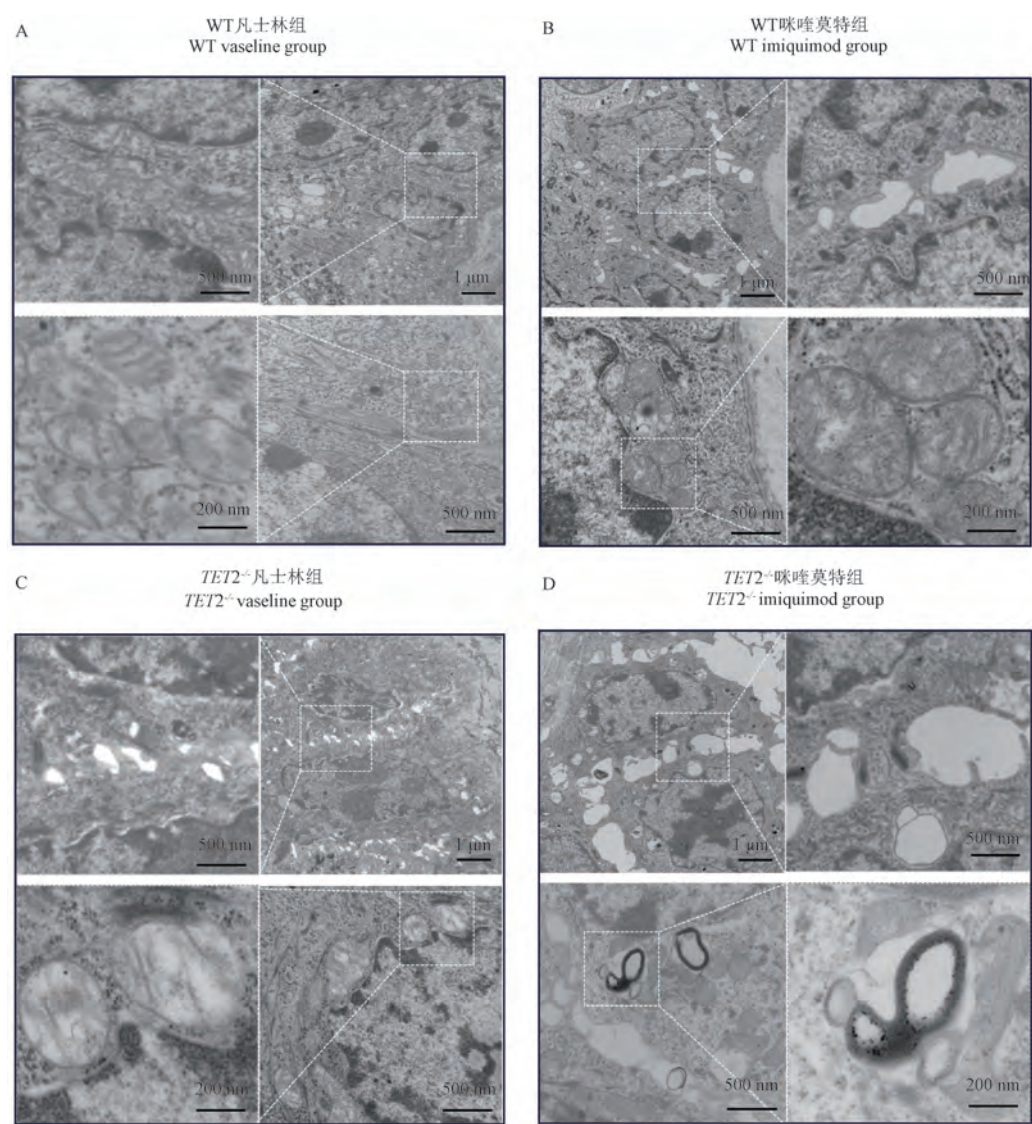


图 7 银屑病小鼠模型的 TEM 超微病理结构分析

Figure 7 TEM ultrastructural analysis of psoriasis mouse model

3 讨论

银屑病具有强遗传易感性,多因素均可引起该病发生,如遗传、表观遗传修饰、环境诱因和免疫功能障碍等^[11-12]。IMQ 是 Toll 样受体(toll-like receptors, TLR)7/8 的激动剂,将其给小鼠局部用药可诱导小鼠表皮出现增厚、角化不全等类似与临床银屑病患者的皮炎表型^[13-14]。尽管 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型表型同人的银屑病病征高度相似,但仍存在一些差异。例如:人银屑病发病因素复杂,而 IMQ 诱导的银屑病致病原因相对单一;人银屑病病程长疾病顽固,而 IMQ 诱导的模型造模周期快,平均 5 d 即可达到表型高峰,达高峰后表型则逐日消退;人银屑病发病过程中会促使新生血管增多,然而 IMQ 诱导的银屑病模型在实验过程中未见新生血管明显增多现象。在过去的几十年里, *TET2* 通过介导 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)的氧化来调节 DNA 甲基化与去甲基化的功能已经取得了显著的进展。大量研究表明, *TET2* 蛋白和 5-羟甲基胞嘧啶(5-hydroxymethylcytosine, 5hmC)在表观遗传调控与免疫系统中具有重要意义^[13,15]。据报道, *TET2* 通过调控多种免疫细胞内的促炎介质的表达,具有广泛的抑炎作用^[16]。因此,当 *TET2* 缺失时会导致组织炎症损伤、炎性细胞浸润等促炎表型。尽管 *TET2* 在调节免疫反应中的重要作用已被广泛报道,但 *TET2* 在银屑病中的致病机理仍未清晰。

在本研究中,首次建立了 *TET2* 全身敲除的银屑病小鼠模型。通过对该模型的表型分析,发现本结果与 WANG 等^[9]发表的研究在表型上存在差异。WANG 等^[9]在敲低小鼠体内 *TET2* 的表达后,发现小鼠银屑病样皮炎症状减轻。然而,本研究在 *TET2*^{-/-}小鼠体内观察到银屑病皮炎症状加剧的现象。在另一些炎症疾病(如脑神经炎,心肌炎以及足底皮肤炎症等)的研究中,全身敲除 *TET2* 的表达后,均使得原有疾病模型的炎症加重^[17-20]。此外,有研究报道有 BALB/c 小鼠可以自发产生银屑病,并将这种小鼠命名为 Asebia 小鼠^[21-22]。因此,推测这种表型差异可能是由两个原因引起的:(1)本研究使用的是 C57BL/6J 品系的小鼠,这与 BALB/c 品系的小鼠

在遗传背景上存在较大差异,使它们对银屑病的易感性不同;(2)本研究与 WANG 等^[9]构建 *TET2* 缺陷小鼠的方式不同, WANG 等^[9]是通过注射慢病毒的方式敲低小鼠体内 *TET2* 的表达,而本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *TET2* 全基因敲除小鼠。这些原因可能共同造成了表型上的差异。

此外,本研究在 WT 模型小鼠病灶处检测到了 *TET2* 的表达下调,提示 *TET2* 可能参与银屑病的发生发展。后通过利用 *TET2*^{-/-}小鼠构建银屑病小鼠模型以观察其与 WT 银屑病小鼠表型,发现 *TET2* 突变会加剧银屑病小鼠的皮肤炎症反应水平,使病程进展更快、病理损伤更严重。并在超微病理结构分析中,观察到细胞连接及线粒体异常的现象,为后续进一步揭示 *TET2* 在银屑病中的致病机理提供了重要思路。综上,研究表明 *TET2* 突变会加剧 IMQ 诱导的小鼠银屑病样皮炎进展,证明 *TET2* 在银屑病发生发展中具有重要作用,但具体机制仍需进一步探究。本研究为探究 *TET2* 参与银屑病发生发展的机制提供了一个新的、理想的动物模型,并为发掘银屑病新的致病或易感基因提供了新思路。

参 考 文 献(References)

- [1] GRIFFITHS C E M, ARMSTRONG A W, GUDJONSSON J E, et al. Psoriasis [J]. Lancet, 2021, 397(10281): 1301-1315.
- [2] KAUSHIK S B, LEBWOHL M G. Psoriasis: which therapy for which patient: psoriasis comorbidities and preferred systemic agents [J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 80(1): 27-40.
- [3] STIRZAKER C, ZOTENKO E, CLARK S J. Genome-wide DNA methylation profiling in triple-negative breast cancer reveals epigenetic signatures with important clinical value [J]. Mol Cell Oncol, 2015, 3(1): e1038424.
- [4] GREENBERG M V C, BOURC'HIS D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(10): 590-607.
- [5] LI J, LI L, SUN X, et al. Role of Tet2 in regulating adaptive and innate immunity [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 665897.
- [6] LIO C J, RAO A. TET enzymes and 5hmC in adaptive and innate immune systems [J]. Front Immunol, 2019, 10: 210.
- [7] CARRILLO-JIMENEZ A, DENIZ Ö, NIKLISON-CHIROU M V, et al. *TET2* regulates the neuroinflammatory response

- in microglia [J]. Cell Rep, 2019, 29(3): 697–713.
- [8] SOLARY E, BERNARD O A, TEFFERI A, et al. The ten-eleven translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases [J]. Leukemia, 2014, 28(3): 485–496.
- [9] WANG X, LIU X, DUAN X, et al. Ten-eleven translocation-2 regulates DNA hydroxymethylation status and psoriasiform dermatitis progression in mice [J]. Acta Derm Venereol, 2018, 98(6): 585–593.
- [10] FOGEL O, RICHARD-MICELI C, TOST J. Epigenetic changes in chronic inflammatory diseases [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2017, 106: 139–189.
- [11] AKIYAMA T, NIYONSABA F, KIATSURAYANON C, et al. The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function [J]. J Innate Immun, 2014, 6(6): 739–753.
- [12] GANGWAR R S, GUDJONSSON J E, WARD N L. Mouse models of psoriasis: a comprehensive review [J]. J Invest Dermatol, 2022, 142(3): 884–897.
- [13] CONG B, ZHANG Q, CAO X. The function and regulation of TET2 in innate immunity and inflammation [J]. Protein Cell, 2021, 12(3): 165–173.
- [14] 彭玲玲, 延祝, 夏育民. 银屑病的动物模型与细胞模型研究进展 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2020, 27(3): 204–206.
- PENG L L, YAN Z, XIA Y M. Research progress in animal and cell models of psoriasis [J]. J Diagn Ther Derm Venereol, 2020, 27(3): 204–206.
- [15] ZENG Z, CHEN J, WU P, et al. OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7475–7491.
- [16] FUSTER J J, MACLAUCHLAN S, ZURIAGA M A, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice [J]. Science, 2017, 355(6327): 842–847.
- [17] 孟庆余, 李春华, 马灵杰, 等. 10-11 易位蛋白 2 调节足底炎症和炎性疼痛 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(10): 739–746.
- MENG Q Y, LI C H, MA L J, et al. Ten-eleven translocation 2 regulates plantar inflammation and inflammatory pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(10): 739–746.
- [18] ZHANG Q, ZHAO K, SHEN Q, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6 [J]. Nature, 2015, 525(7569): 389–393.
- [19] YAN H, TAN L, LIU Y, et al. Ten-eleven translocation methyl-cytosine dioxygenase 2 deficiency exacerbates renal ischemia-reperfusion injury [J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 98.
- [20] PAN W, ZHU S, QU K, et al. The DNA methylcytosine dioxygenase Tet2 sustains immunosuppressive function of tumor-infiltrating myeloid cells to promote melanoma progression [J]. Immunity, 2017, 47(2): 284–297.
- [21] SCHÖN M P, MANZKE V, ERPENBECK L. Animal models of psoriasis-highlights and drawbacks [J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 147(2): 439–455.
- [22] GATES A H, KARASEK M. Hereditary absence of sebaceous glands in the mouse [J]. Science, 1965, 148(3676): 1471–1473.

[收稿日期] 2024-08-20

王甜,羊璞,张熙,等. 不同剂量完全弗氏佐剂建立慢性炎性疼痛抑郁共病大鼠模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 633-643.

WANG T, YANG P, ZHANG X, et al. Establishment of a rat model of comorbid chronic inflammatory pain and depression using different doses of complete Freund's adjuvant [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 633-643.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.002

不同剂量完全弗氏佐剂建立慢性炎性疼痛抑郁 共病大鼠模型的实验研究

王甜¹, 羊璞², 张熙³, 李欣¹, 黄文静¹, 郑广玫¹, 黄心雨¹, 许智迤¹,
黄颖¹, 尹丽莉¹, 栗胜勇^{3*}

(1. 广西中医药大学第一临床医学院, 南宁 530023; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院,
成都 610072; 3. 广西中医药大学第一附属医院针灸科, 南宁 530023)

【摘要】 目的 比较不同剂量的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)足底注射诱导的慢性疼痛抑郁共病大鼠模型的成功率和稳定性。**方法** 将60只SD大鼠随机分为空白组、CFA低剂量(CFA-L)组、CFA高剂量(CFA-H)组,每组20只。CFA-L组及CFA-H组大鼠分别以左后足足底注射50、100 μ L CFA,空白组左后足足底注射0.9%氯化钠溶液。造模后第0、7、14、21、28天分别观察各组大鼠一般状态、体质量变化,机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)、热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)评价大鼠的疼痛反应,旷场实验(open field test, OFT)、强迫游泳实验(forced swim test, FST)、悬尾实验(tail suspension test, TST)评价大鼠的抑郁行为,酶联免疫吸附实验检测大鼠前扣带回皮层的谷氨酸(glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的含量,免疫组化法检测大鼠前扣带回皮层脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的改变,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠前扣带回皮层的病理变化。**结果** (1)一般情况:造模后第7天,CFA-L组和CFA-H组大鼠左后足踝关节和足趾均红肿明显,CFA-H组肿胀更甚;造模后第14、21、28天,CFA-L组大鼠左后足踝关节和足趾红肿渐恢复,CFA-H组大鼠仍红肿明显,且饮水进食量减少;(2)体质量:造模后第14、21、28天,CFA-H组大鼠体质量显著低于空白组、CFA-L组($P < 0.05$, $P < 0.05$);(3)疼痛相关行为学:造模后第7、14天,与空白组比较,CFA-L组、CFA-H组的MWT、TWL明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$);造模后第21天,CFA-H组的MWT显著低于空白组和CFA-L组($P < 0.05$, $P < 0.05$),CFA-L组、CFA-H组的TWL显著低于空白组($P < 0.05$, $P < 0.05$);造模后第28天,CFA-H组的MWT、TWL显著低于空白组和CFA-L组($P < 0.05$, $P < 0.05$);(4)抑郁相关行为学:造模后第7天,CFA-H组的OFT运动总距离较空白组、CFA-L组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$);造模第14、21、28天,与空白组、CFA-L组比较,CFA-H组OFT运动总距离及中央停留时间明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$),FST、TST明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$);(5)Glu、GABA、BDNF表达:CFA-H组Glu含量较空白组、CFA-L组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$),GABA含量、Glu/GABA和BDNF表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$);(6)前扣带回皮层病理:CFA-L组前扣带回皮层区有较少损伤,锥体细胞数量较多,细胞排列较整齐,核仁清晰,少量细胞表现出核固缩和深染色;与CFA-L组比较,CFA-H组前扣带回皮层损伤区细胞排列紊乱,大量神经元细

【基金项目】国家自然科学基金(82160934),广西自然科学基金重点项目(2023GXNSFDA026052),广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2025181)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82160934), Guangxi Natural Science Foundation Key Project (2023GXNSFDA026052), Innovation Project of Guangxi Graduate Education(YCBZ2025181).

【作者简介】王甜,女,在读博士研究生,研究方向:针灸治疗痛症及脑病。Email:932266904@qq.com

【通信作者】栗胜勇,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:针灸治疗痛症及脑病。Email:1037097555@qq.com

胞固缩、深染,锥体细胞数量明显减少、甚至消失,组织间隙有空泡、红细胞和神经纤维缠结出现。**结论** 足底注射 100 μ L CFA 可成功建立慢性炎性疼痛抑郁共病大鼠动物模型,引起大鼠痛觉过敏、抑郁样行为改变及前扣带回皮层 Glu、GABA、BDNF 改变,诱导前扣带回皮层病理形态变化,符合慢性疼痛抑郁共病的生理病理学特点。

【关键词】 完全弗氏佐剂;不同剂量;慢性疼痛抑郁共病;谷氨酸; γ -氨基丁酸;脑源性神经营养因子;模型研究

【中图分类号】Q95-33 【文献标志码】A 【文章编号】1005-4847 (2025) 05-0633-11

Establishment of a rat model of comorbid chronic inflammatory pain and depression using different doses of complete Freund's adjuvant

WANG Tian¹, YANG Pu², ZHANG Xi³, LI Xin¹, HUANG Wenjing¹, ZHENG Guangmei¹,
HUANG Xinyu¹, XU Zhiyi¹, HUANG Ying¹, YIN Lili¹, SU Shengyong^{3*}

(1. the First School of Clinical Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;

2. Sichuan Academy of Medical Sciences · Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China;

3. Department of Acupuncture and Moxibustion, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

Corresponding author: SU Shengyong. E-mail: 1037097555@qq.com

【Abstract】 **Objective** To compare the success rate and stability of rat models of comorbid chronic pain and depression induced by different doses of complete Freund's adjuvant (CFA). **Methods** Sixty SD rats were divided randomly into a control group, low-dose CFA group (CFA-L), and high-dose CFA group (CFA-H) ($n = 20$ rats per group). Rats in the CFA-L and CFA-H groups were injected with 50 and 100 μ L CFA, respectively, and rats in the control group were injected with 0.9% sodium chloride solution. The general state, body weight, mechanical withdrawal threshold (MWT), and thermal withdrawal latency (TWL) were observed at 0, 7, 14, 21, and 28 days after modeling. Depressive behavior was evaluated using the open field test (OFT), forced swim test (FST), and tail suspension test (TST). Glutamate (Glu) and γ -aminobutyric acid (GABA) levels in the anterior cingulate cortex were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the anterior cingulate cortex was detected by immunohistochemistry, and pathological changes in the anterior cingulate cortex were observed by HE staining. **Results** (1) Regarding the general condition of the rats, the left ankle joint and toes were obviously red and swollen in the CFA-L and CFA-H groups on the 7th day after modeling, and the swelling was more severe in the CFA-H group. The redness and swelling of the left hind foot and ankle joint and toes gradually recovered in the CFA-L group on days 14, 21, and 28 after modeling, but were still obvious in the CFA-H group, and the water and food intake decreased. (2) The body mass was significantly lower in rats in the CFA-H group compared with those in the blank and CFA-L groups on days 14, 21, and 28 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.05$). (3) Regarding pain-related behavior, the MWT and TWL were significantly decreased in the CFA-L and CFA-H groups on the 7th and 14th days after modeling, compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.05$). On day 21 after modeling, MWT was significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$), and TWL was significantly lower in the CFA-L and CFA-H groups than in the blank group ($P < 0.05$, $P < 0.05$). On day 28 after modeling, MWT and TWL were significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$). (4) In terms of depression-related behaviors, the total OFT movement distance was significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups on day 7 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.05$). The total OFT distance and central dwell time were significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups on days 14, 21, and 28 after modeling ($P < 0.05$, $P < 0.05$), and the result in the FST and TST were significantly higher than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$). (5) Glu, GABA, and BDNF expression levels were significantly higher in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups

($P < 0.05$, $P < 0.05$), while GABA, Glu/GABA, and BDNF levels were significantly lower in the CFA-H group than in the blank and CFA-L groups ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). (6) The CFA-L group showed less damage in the anterior cingulate cortex, more pyramidal cells, more arranged cells, clear nucleoli, and a small number of cells with karyokinesis and deep staining. Compared with the CFA-L group, rats in the CFA-H group showed a disordered cell arrangement in the injured area of the anterior cingulate cortex, a large number of pyknotic and hyperchromatic neurons, significantly fewer or absent pyramidal cells, and vacuoles, red blood cells, and neurofibrillary tangles in the interstitial space. **Conclusions** Injection of CFA 100 μL can be used to establish a rat model of chronic inflammatory pain and depression, showing hyperalgesia, depression-like behavioral changes, changes in levels of Glu, GABA, and BDNF in the anterior cingulate cortex, and pathological changes in the anterior cingulate cortex, consistent with the pathophysiological characteristics of chronic pain and depression.

【Keywords】 complete Freund's adjuvant; different doses; comorbid chronic pain and depression; glutamate; γ -aminobutyric acid; brain-derived neurotrophic factor; model study

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

国际疼痛研究协会将持续 3 个月及以上的疼痛称为慢性疼痛^[1]。流行病学调查显示,慢性疼痛作为一种长期的应激源,可引起 30% ~ 60% 的慢性疼痛患者出现抑郁状态^[2]。临床上慢性疼痛和抑郁一旦共病,易发展成难治性疾病,造成患者躯体功能下降,影响预后^[3]。但目前其共病的病因及发病机制尚不明确,患者对慢性疼痛抑郁共病治疗方式的开发需求日益迫切,因此,建立合理、可靠、切合临床的动物模型是该病研究的基础,对慢性疼痛抑郁共病的发病机制研究有着重大意义。

目前,慢性疼痛抑郁共病动物造模方式众多,常用的造模方法为使用一定剂量的完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)对实验动物进行干预^[4]。但在实验过程中 CFA 足底注射所致的慢性炎性动物模型存在自限性,即在造模完成后的一定时间内,在不对造模动物进行任何干预的情况下,其慢性炎性病理学改变会逐渐减轻,抑郁障碍也会逐渐恢复,只能通过缩短实验周期或在实验期间增加造模次数解决上述问题。如王雅娟等^[5]对 CFA 诱导的慢性疼痛抑郁共病模型仅进行了 7 d 内的实验观察。羊璞^[6]采用足底注射 2 次 CFA 复制慢性疼痛抑郁共病大鼠模型。上述方法虽都能成功建立慢性疼痛抑郁共病模型,但是无法观察远期疗效,或是操作频次过多,造模时对实验动物造成损害,导致实验结果的不确定性因素增多。并且既往相关研究中, CFA 造模剂量未完全统一,引起诸多研究者无法成功模拟文献报道中的模型。然而不同剂量

CFA 建立慢性疼痛抑郁共病大鼠模型有何差异未见报道,且尚未有研究对慢性炎性抑郁共病大鼠模型进行长期观察,明确其病变消退的规律。故探索最符合慢性疼痛抑郁共病的发病机制及进程的 CFA 有效造模剂量,减少足底注射的次数成功建立慢性疼痛抑郁共病模型是目前亟待解决的基础研究问题。

Cell 曾提出大脑皮层的重要组成部分——前扣带回皮层是缓解慢性疼痛的中枢核团之一,亦有研究发现,前扣带回皮层参与了疼痛及抑郁间的信息传导^[7]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及谷氨酸(glutamate, Glu)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是疼痛抑郁共病的关键机制^[8-9]。基于此,本研究采用 50、100 μL CFA 足底注射诱导慢性疼痛抑郁共病大鼠模型,进行为期 28 d 的追踪观察,验证不同剂量 CFA 慢性疼痛抑郁共病大鼠模型的稳定性及可靠性,并通过观察大鼠疼痛和抑郁相关行为学改变,及监测大鼠前扣带回皮层中 BDNF、Glu、GABA 的变化,并结合前扣带回皮层病理学检测,旨在减少造模次数的基础上,确定 CFA 制备慢性疼痛抑郁共病大鼠模型的最佳造模剂量,为寻求有效疗法并探讨机制提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 200

~ 240 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。大鼠饲养及观察均在广西中医药大学动物实验中心进行【SYXK(桂)2019-0001】。保持饲养温度 23 ~ 25 ℃, 湿度 50% ~ 60%, 12 h 昼夜对半循环照明节律, 大鼠自由饮水摄食。本实验经过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审批(DW 20240919-204)。

1.1.2 主要试剂与仪器

完全弗氏佐剂(7009, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 异氟醚(R510-22, 深圳瑞沃德生命科技有限公司), 伊红染液(BA-4024, 珠海贝索生物技术有限公司), 75% 乙醇(1001-0038, 天津市永大化学试剂有限公司), 95% 乙醇(1001-0044, 天津市永大化学试剂有限公司), 苏木素染色液(BA-4041, 珠海贝索生物技术有限公司), 分化液(C0163M, 上海碧云天生物技术有限公司), 无水乙醇(1001-0254, 天津市永大化学试剂有限公司), 二甲苯(1001-0220, 天津市永大化学试剂有限公司), 中性树胶(ZLI-9555, 北京中杉金桥生物技术有限公司), DAB 显色剂(ZLI-9018, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 一抗(DF6387, Affinity)、二抗(PV-6000, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 5% BSA(AR0004, 武汉博士德), Glu 比色法测试盒(E-BC-K903-M, 武汉伊莱瑞特), GABA 比色法测试盒(E-BC-K852-M, 武汉伊莱瑞特)。

Von Frey 纤维丝(NC12775-79, 上海玉研科学仪器有限公司), 小动物专用麻醉机(CDS9000, 美国 Harvard), 热板痛觉测试仪(II TC39, 美国 Life Science), 旷场实验系统(XR-XZ301, 上海欣软信息科技有限公司), 智能热板测痛仪(KW-RB, 南京卡尔文生物科技有限公司), 强迫游泳实验系统(XR-XQ202, 上海欣软信息科技有限公司), 生物安全柜(SW. TFG-15, 广州瑞智净化设备有限公司), 低温冰箱(MDF-382E 型, 日本三洋), 涡旋振荡仪(QL-902, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 离心机(Centrifuge 5417R, Eppendorf), 电热恒温水箱(HH. W21. 600, 余姚市东方电工仪器厂), 酶标仪(Elx800, BIO-TEK), 干燥箱(MIR-153 型, 日本三洋), 石蜡切片机(RM2135, 德国 LEICA), 电子天平(AE100 型, 瑞士 METTER), 电磁炉(JYC-21ES55C 型, 九阳), 电脑生物组织摊烤片机(KD-T, 浙江省金华市科

迪仪器设备有限公司), 光学显微镜(BX43, 日本 OLYMPUS), 成像系统(UC90, 日本 OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模

所有大鼠适应性喂养 1 周后, 用随机数字表法将 60 只大鼠分为空白组、CFA 低剂量(CFA-L)组、CFA 高剂量(CFA-H)组, 每组各 20 只。

大鼠予 2% 异氟醚吸入麻醉后俯卧位固定, CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠分别接受 50、100 μL CFA 于左后爪足底注射, 空白组于左后爪足底注射 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 大鼠一般情况观察

观察并记录各组大鼠造模后第 7、14、21、28 天的精神状态、饮水进食情况及左后足肿胀等情况。

1.2.3 大鼠体质量变化

分别于造模后第 0、7、14、21、28 天称量大鼠体质量。

1.2.4 大鼠行为学检测

分别于造模后第 0、7、14、21、28 天进行行为学检测。

(1) 机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT): 使用 Von Frey 纤维丝的 Up-down 法依次对每只大鼠进行评估^[10]。放置大鼠于测试笼中适应 3 min, 将 Von Frey 纤维丝于左后肢足底中部垂直施加压力, 直至纤维丝轻微弯曲, 每次刺激时间 ≤ 5 s, 刺激间隔时间 > 120 s。刺激时观察大鼠的反应, 当大鼠出现缩足或舔足行为时, 为阳性反应, 标记为“X”, 下一次刺激以较低强度纤维丝替代; 反之, 如果出现阴性反应(无缩足或舔足行为), 则记为“O”, 下一次刺激以较高强度纤维丝替代。在出现“OX”或“XO”组合的情况下, 再进行另外 4 次测量。机械痛阈的计算和分析采用公式: $MPT(g) = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10\ 000$, Xf : 最后测试纤维丝编号; δ : 所取各根纤维丝取对数后的平均差值(约为 0.224); k : 测试所得序列根据查表后获得的系数值。

(2) 热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL): 将每只大鼠依次置入热板测痛仪测试箱中适应环境 3 min, 待大鼠无探索等行为时, 记录从开始照射至大鼠出现抬腿舔足行为的时间。每只大鼠共测定 3 次, 每次间隔 5 min, 取

3 次测量的平均值。

(3) 旷场实验(open field test, OFT): 将每只大鼠单独放置在黑色敞箱的中心区域内适应环境 3 min 后开始实验, 通过旷场视频分析软件分析每只大鼠 5 min 内的运动轨迹, 依次记录每只大鼠的运动总距离和中央停留时间。

(4) 强迫游泳实验(forced swim test, FST): 将大鼠放入有机玻璃测试圆桶中, 圆桶中的水深约 30 cm, 水温 18 ~ 22 °C, 待大鼠适应环境后, 用视频分析软件记录 5 min 内大鼠累计不动时间。

(5) 悬尾实验(tail suspension test, TST): 予绳子固定大鼠尾部距末端约 1/3 处, 并将其倒挂于悬尾仪顶部适应 3 min, 开始实验时使用行为学软件观察并记录大鼠在 5 min 内的不动时间。

1.2.5 大鼠前扣带回皮层 Glu 及 GABA 测定

造模后第 28 天, 待所有行为学实验完成后, 大鼠予 2% 异氟醚吸入麻醉后开胸, 暴露心脏。每组随机选取 3 只大鼠使用 0.9% 氯化钠溶液灌注, 随后剥离出大脑组织后置于无菌培养皿中, 并于冰上快速分离大脑, 取前扣带回皮层组织, 于 -80 °C 冰箱保存备用。检测时, 取大鼠前扣带回皮层组织, 加入 9 倍体积的生理盐水, 4 °C, 以 2500 r/min 离心 10 min, 取 10% 匀浆上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书检测 Glu 及 GABA 含量。

1.2.6 大鼠前扣带回皮层 BDNF 测定

造模后第 28 天, 所有行为学实验完成后, 大鼠予 2% 异氟醚吸入麻醉后开胸, 暴露心脏。每组随机选取 3 只大鼠使用 4% 多聚甲醛于左心室进行灌注, 取大脑前扣带回皮层组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 脱水, 切片, 抗原修复, 冷却, 使用 PBS 缓冲液清洗, 滴加 5% BSA, 室温孵育 30 min, 滴加一抗(BDNF 1:80), 4 °C 孵育 12 h, PBS 冲洗 3 次, 滴加二抗, 37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次, 加入 DAB 显色液, 苏木素复染、分化、反蓝, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片。光学显微镜下进行观察, 以棕黄色为阳性标准判定染色结果, 细胞核呈蓝色, 对阳性细胞进行定量分析。在阳性区域中选取 1 个间断高倍视野($\times 400$), 分析免疫阳性区域比例, 并计算其平均光密度值。

1.2.7 大鼠前扣带回皮层病理变化

前扣带回皮层取材方法同上, 流水冲洗组织样本, 依次梯度乙醇进行脱水, 常规石蜡包埋后

切片, 65 °C 烤片 4.5 h, 进行脱蜡、水洗、返蓝、染色、封片, 采用光学显微镜观察, 选取目标区域进行拍照, 分析前扣带回皮层组织形态变化。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析处理。计量以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态分布且方差齐采用 LSD 法检验, 方差不齐采用 Dunnett's T_3 检验。以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

空白组大鼠在观察期间均活动自如, 精神状态佳, 饮水进食正常, 毛发柔顺光亮。造模后第 7 天, CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠出现活动不利, 两组大鼠均左后足踝关节和足趾红肿明显, CFA-H 组肿胀更甚; 造模后第 14、21、28 天, CFA-L 组大鼠左后足踝关节和足趾红肿渐恢复, CFA-H 组大鼠仍红肿明显, 活动不利, 懒动, 精神萎靡不振, 饮水进食量减少, 毛发无光泽。见图 1。

2.2 各组大鼠体质量变化

实验期间各组大鼠体质量整体呈上升趋势。造模后第 0 和 7 天, 与空白组比较, CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠体质量, 无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$); 造模后第 14、21、28 天, 与空白组比较, CFA-L 组体质量, 无统计学意义($P > 0.05$), 而 CFA-H 组体质量增长缓慢, 显著低于空白组和 CFA-L 组($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组大鼠行为学比较

2.3.1 各组大鼠疼痛相关行为学比较

(1) MWT: 造模第 0 天, CFA-L 组和 CFA-H 组与空白组相比, 无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$); 造模后第 7、14 天, CFA-L 组及 CFA-H 组的 MWT 明显低于空白组($P < 0.05$, $P < 0.05$), CFA-H 组比 CFA-L 组降低更为显著($P < 0.05$); 造模后第 21、28 天, 与空白组比较, CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$), 而与空白组和 CFA-L 组比较, CFA-H 组显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 3A。

(2) TWL: 造模第 0 天, 与空白组 TWL 比较, CFA-L 组和 CFA-H 组, 无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$); 造模后第 7、14、21 天, CFA-L 组和

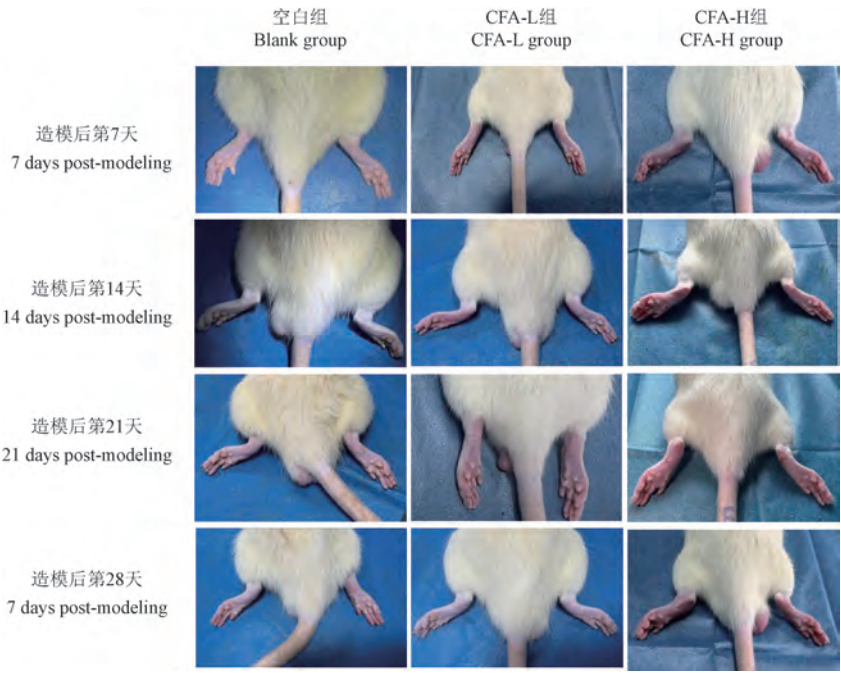
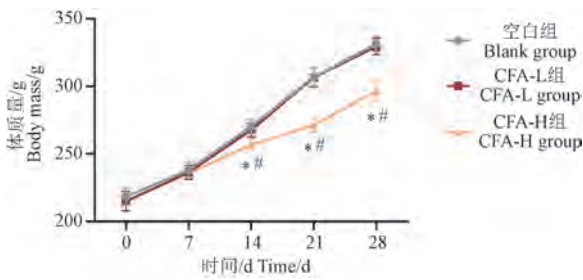


图 1 各组大鼠造模后左后足脚踝及足趾变化情况比较

Figure 1 Comparison of ankle and toe changes of left hind foot of rats in each group after modeling



注:与空白组相比, * $P < 0.05$; 与 CFA-L 组相比, # $P < 0.05$ 。(下图同)

图 2 各组大鼠体质量变化

Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$. Compared with CFA-L group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Changes in body mass of rats in each group

CFA-H 组明显低于空白组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$), CFA-H 组显著低于 CFA-L 组 ($P < 0.05$); 造模后第 28 天, CFA-L 组与空白组比较, 无统计学意义 ($P > 0.05$), CFA-H 组比空白组、CFA-L 组明显降低, 具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 3B。

结果表明 CFA-L 组、CFA-H 组均出现大鼠 MWT 和 TWL 的敏感性增加, 并引起大鼠疼痛反应。但在造模后第 14、21、28 天, CFA-L 组 MWT 和 TWL 的敏感性降低, 而 CFA-H 组仍存在大鼠持续性疼痛。

2.3.2 各组大鼠抑郁相关行为学比较

(1) OFT: 造模后第 0 天, 与空白组比较,

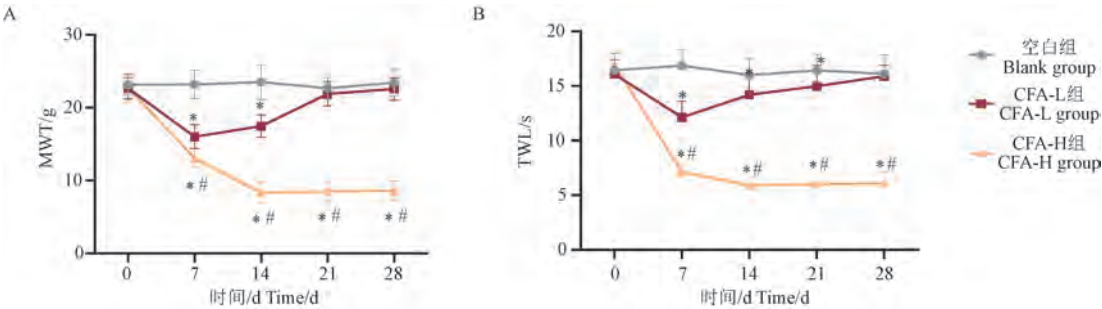


图 3 各观察时点各组大鼠 MWT 和 TWL 变化比较

Figure 3 Comparison of MWT and TWL changes of rats in each group at each observation time point

CFA-L 组和 CFA-H 组 OFT 运动总距离、中央停留时间,均无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$)。造模后第 7 天,与空白组比较,CFA-L 组运动总距离、中央停留时间,无统计学意义;与空白组、CFA-L 组比较,CFA-H 组运动总距离明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$),而中央停留时间,无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$)。造模后第 14、21、28 天,空白组与 CFA-L 组比较运动总距离、中央停留时间无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$),而与空白组、CFA-L 组比较,CFA-H 组运动总距离、中央停留时间均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4A ~ 图 4B。

(2) FST: 造模后第 0、7 天, CFA-L 组和 CFA-H 组与空白组 FST 比较,无统计学意义($P >$

0.05 , $P > 0.05$);造模后第 14、21、28 天,与空白组比较,CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$),与空白组及 CFA-L 组比较,CFA-H 组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4C。

(3) TST: 造模后第 0、7 天,与空白组比较, CFA-L 组和 CFA-H 组 TST 比较,无统计学意义($P > 0.05$, $P > 0.05$);造模后第 14、21、28 天,与空白组比较,CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$),而 CFA-H 组与空白组及 CFA-L 组比较明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$)。见图 4D。

表明仅有 CFA-H 组可引起 OFT、FST、TST 改变,诱导大鼠出现持续性抑郁样行为,且该类抑郁样行为在造模后第 14 天开始逐渐显著,至造模后第 28 天仍明显存在。

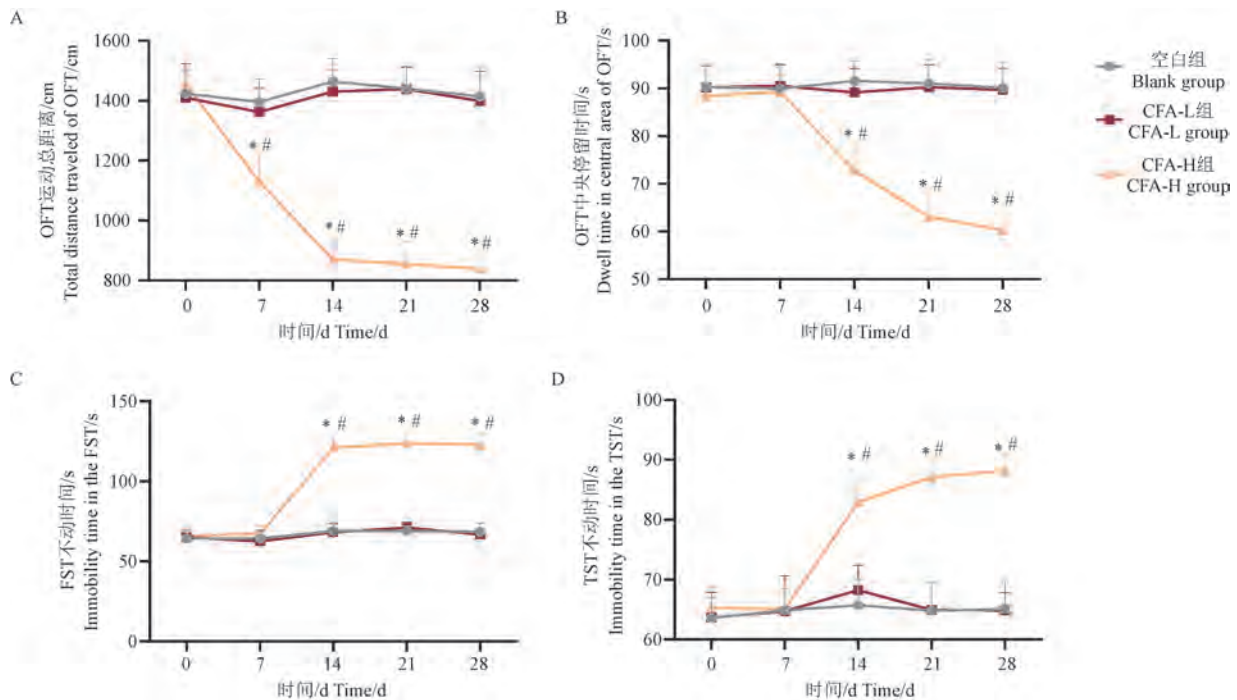


图 4 各观察时点各组大鼠 OFT、FST 及 TST 变化比较

Figure 4 Comparison of OFT, FST and TST changes of rats in each group at each observation time point

2.4 各组大鼠前扣带回皮层 Glu 和 GABA 比较

ELISA 测定 Glu 及 GABA 含量结果显示,与空白组比较,CFA-L 组无统计学意义($P > 0.05$), CFA-H 组 Glu 较空白组和 CFA-L 组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.05$), GABA、Glu/GABA 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。结果提示,CFA-H 组可诱导慢性疼痛抑郁共病大鼠出现 Glu 升高、GABA 含量显著降低,Glu/GABA 稳态失衡。见图 5。

2.5 各组大鼠前扣带回皮层 BDNF 比较

免疫组化测定 BDNF 含量结果显示,空白组与 CFA-L 组棕黄色区域均较少,呈弱阳性表达;与空白组、CFA-L 组比较,CFA-H 组棕黄色染色区域增多,表现为强阳性表达。此外,与空白组比较,CFA-L 组 BDNF 的平均光密度值差异无统计学意义($P > 0.05$),而 CFA-H 组与空白组、CFA-L 组比较明显降低($P < 0.05$, $P < 0.05$)。

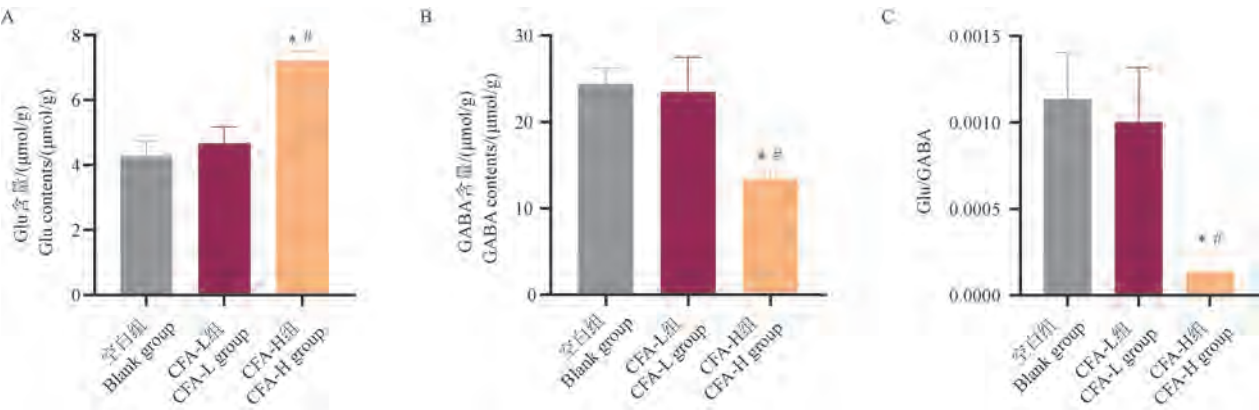


图 5 各组大鼠 Glu 和 GABA 含量比较

Figure 5 Comparison of Glu and GABA contents of rats in each group

结果提示,CFA-H 组可引起慢性疼痛抑郁共病大鼠 BDNF 降低。见图 6。

2.6 各组大鼠前扣带回皮层组织病理形态变化

空白组大鼠前扣带回皮层区形态正常,有大量锥体细胞,细胞排列整齐,未见固缩神经元出现;与空白组比较,CFA-L 组有较少损伤,锥体细

胞数量较多,细胞排列较整齐,核仁清晰,少量细胞表现出核固缩和深染色;与 CFA-L 组比较,CFA-H 组前扣带回皮层损伤区细胞排列紊乱,大量神经元细胞固缩、深染,锥体细胞数量明显减少、甚至消失,组织间隙有空泡、红细胞和神经纤维缠结出现。见图 7。

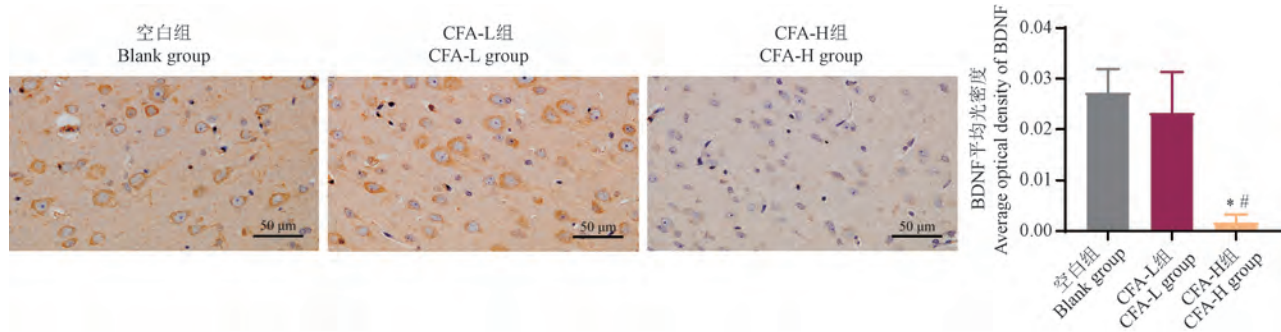
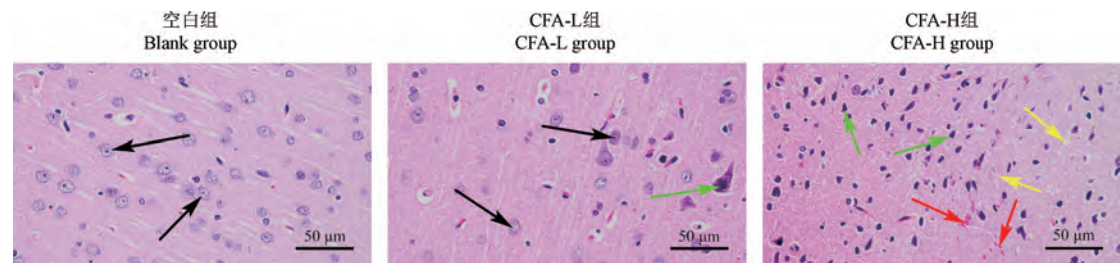


图 6 各组大鼠 BDNF 平均光密度值比较

Figure 6 Comparison of average optical density values of BDNF of rats in each group



注:黑色箭头:锥体细胞;绿色箭头:固缩神经元;红色箭头:红细胞;黄色箭头:组织间隙空泡和神经纤维缠结。

图 7 各组大鼠前扣带回皮层结构

Note. Black arrows. Pyramidal cells. Green arrows. Pyknotic neurons. Red arrows. Erythrocytes. Yellow arrows. Interstitial vacuoles and neurofibrillary tangles.

Figure 7 Structure of the anterior cingulate cortex of rats in each group

3 讨论

了解慢性疼痛抑郁共病的病理机制成为目前研究的热点,稳定的动物模型是研究该病病理机制、探寻有效防治方法及机制的关键,建立符合该共病病理发展机制的动物模型有助于探索慢性疼痛与抑郁之间的联系,并有助于临床研发新的治疗方式。多种因素可诱导慢性疼痛抑郁共病动物模型,如 CFA 注射、硬脑膜致炎剂灌注、神经结扎等^[11-13],其中 CFA 诱导的慢性疼痛抑郁共病模型因其易操作、刺激性强、提供持久的抗原释放、与人类疾病典型特征相似等优点而应用广泛^[14];诱导方式有右胫骨关节内注射、足底注射,以足底注射尤为常见^[15]。而在以往研究中,CFA 的造模剂量未完全统一,导致慢性疼痛抑郁共病的病理机制研究和药物作用评价均受限制,选用最符合临床及疾病发展机制的造模剂量是制定研究方案的前提和基础。故本研究采用 50、100 μL CFA 足底注射制备不同剂量的慢性疼痛抑郁共病大鼠模型,并延长观察周期,对大鼠进行为期 28 d 的行为学观察,旨在对比不同造模剂量制备的慢性疼痛抑郁共病模型在不同时间节点的整体情况,明确其病理阶段,评价其成模特点。

慢性疼痛患者在临床上表现为触痛觉超敏和热痛觉过敏,这些现象在大鼠模型中可用 MWT 和 TWL 观察到^[16]。本研究发现,CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠的 MWT 和 TWL 在造模后第 7 天明显降低,但 CFA-L 组的 MWT 和 TWL 在造模后第 21 及 28 天恢复,不可建立大鼠持续性疼痛,而 CFA-H 组大鼠 MWT 和 TWL 在造模后第 7 天至造模后第 28 天仍持续性降低。疼痛感觉是相关情绪和认知功能活动改变的基础,慢性疼痛可引起大鼠出现奖赏机制缺乏和快感缺失等,OFT、FST、TST 及糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT)相关行为学测试是用于评估大鼠行为绝望的检测方法^[17]。本研究采用 CFA 诱导慢性疼痛抑郁共病模型,在此状态下,大鼠呈现持续躯体疼痛、运动功能受限及抑郁样行为。故行为学评价时,应重点关注与“疼痛-抑郁交互作用”相关指标。OFT 用于评估大鼠疼痛导致的活动抑制与抑郁行为叠加效应;FST 和 TST 可交叉验证大

鼠行为绝望表现,减少假性结果的可能,可靠区分抑郁行为与运动功能改变。然而,疼痛症状可能干扰大鼠的摄食行为,SPT 在本模型中的特异性较低,无法区分是疼痛导致摄食抑制还是抑郁相关快感缺失。因此,在本研究采用 OFT、FST、TST 对慢性疼痛抑郁共病模型大鼠进行行为学评估。本研究结果显示,造模后第 14 天,CFA-H 组出现 OFT 运动总距离和中央区停留时长减少、FST、TST 不动时间增加,提示采用 100 μL CFA 足底注射在造模后第 14 天可诱导出大鼠的抑郁样行为,并且该抑郁样行为至造模后第 28 天仍存在。实验期间观察到,在造模后第 7 天,CFA-L 组及 CFA-H 组大鼠左后足踝关节及足趾可见明显红肿,大鼠活动不利,而在造模后第 14 天,CFA-L 组大鼠左后足踝关节及足趾红肿恢复,CFA-H 组仍存在红肿,且出现饮食减少,此现象亦证实了 CFA-L 组和 CFA-H 组大鼠体质量增长率的变化。从造模后第 14 天开始,CFA-H 组大鼠体质量增长缓慢,饮水进食量减少,体质量增长率符合疼痛及抑郁相关行为学检测变化结果,提示 100 μL CFA 诱导的大鼠疼痛及抑郁样行为可抑制大鼠体质量增长。

前扣带回皮层是大脑边缘系统中的重要信息处理区域,是接受参与感觉知觉和情绪反应的重要调节枢纽^[7]。慢性疼痛可引起前扣带回皮层神经元激活,前扣带回皮层内神经元突触连接紊乱,并导致抑郁样行为的发生。人类基因研究表明,当疼痛与抑郁呈共病状态时,前扣带回皮层内不仅存在 BDNF 表达异常,还发现神经递质表达失衡。BDNF 是神经营养因子家族中的一员,在 CFA 模型致慢性疼痛模型中,BDNF 呈下降趋势^[18]。GABA 是 Glu 脱羧后的代谢产物,被认为是一种重要的抑制性递质;而 Glu 则被认为是一种兴奋性神经递质,GABA 及 Glu 作为神经递质参与中枢神经系统的兴奋与抑制的调节,Glu/GABA 稳态失衡可能导致大鼠抑郁样行为及慢性疼痛的重要机制^[19]。BDNF 及 Glu/GABA 的失衡是疼痛抑郁共病的关键机制,针对前扣带回皮层内 BDNF、Glu/GABA 探讨慢性疼痛抑郁共病的发病机制具有显著意义,因此本研究以 BDNF、Glu/GABA 表达为切入点,进一步探究三者在前扣带回皮层内表达情况。研究结果发现,CFA-H

组大鼠前扣带回皮层内 Glu 含量显著升高, GABA 含量明显降低, Glu/GABA 失衡, BDNF 表达减少, 证实了足底注射 100 μ L CFA 诱导的慢性炎性疼痛抑郁共病行为, 其机制可能与 BDNF 减少、Glu/GABA 失衡密切相关。本研究亦发现, 与空白组和 CFA-L 组比较, CFA-H 组前扣带回皮层损伤区细胞排列紊乱, 神经元细胞出现大量固缩、深染, 锥体细胞数量明显减少, 组织间隙有空泡、红细胞和神经纤维缠结出现。提示前扣带回皮层损伤情况与行为学实验及 Glu/GABA、BDNF 检测结果相一致。

本研究结果表明, 足底注射 100 μ L CFA 可成功制备慢性疼痛抑郁共病模型, 但 100 μ L 的 CFA 相较于低剂量组存在一定刺激性, 对大鼠的生长抑制更加明显。同时本研究也对实验设计有一些启示, 进行慢性疼痛抑郁共病相关实验时可根据实验目的选择恰当的时间点进行观察, 在进行损伤机制相关研究或进行疗程相对较长的疗效及机制研究时, 观察的时间点可选用造模后第 14 ~ 28 天观察。但本研究仍存在部分局限之处: 本实验仅检测了前扣带回皮层内 BDNF、Glu、GABA 的表达, 未对三者的关系进行进一步探索, 未来研究会以此研究为基础, 深入探究前扣带回皮层内 BDNF、Glu、GABA 在慢性疼痛抑郁共病中三者的联系。

综上, 足底注射 100 μ L CFA 建立慢性疼痛抑郁共病动物模型方法可行, 符合本病发病机制及临床治疗进程。在后续研究中运用不同治疗方式干预慢性疼痛抑郁共病大鼠的机制研究具有一定的研究价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] BRAIN K, BURROWS T L, ROLLO M E, et al. A systematic review and meta-analysis of nutrition interventions for chronic noncancer pain [J]. *J Hum Nutr Diet*, 2019, 32 (2): 198–225.
- [2] KREMER M, BECKER L J, BARROT M, et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(1): 236–270.
- [3] NERURKAR L, SIEBERT S, MCINNES I B, et al. Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective [J]. *Lancet Psychiatry*, 2019, 6 (2): 164–173.
- [4] DURIC V, MCCARSON K E. Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression [J]. *J Pain*, 2006, 7(8): 544–555.
- [5] 王雅娟, 杨彬, 曾学晴, 等. 右美托咪定上调海马脑源性神经营养因子-酪氨酸激酶受体 B 的表达及改善完全费氏佐剂所致小鼠焦虑样和抑郁样行为 [J]. *解剖学报*, 2023, 54(2): 181–187.
- WANG Y J, YANG B, ZENG X Q, et al. Dexmedetomidine improving complete Freund's adjuvant-induced anxiety-like and depression-like behaviour by promoting the expression of brain-derived neurotrophic factor-tyrosine kinase receptor B in mice hippocampus [J]. *Acta Anat Sin*, 2023, 54(2): 181–187.
- [6] 羊璞. 基于 BDNF/TrkB/CREB 信号通路探讨电针对疼痛抑郁共病大鼠的作用机制研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学; 2024.
- YANG P. Investigating the mechanism of electroacupuncture on comorbid chronic pain and depression in rats based on BDNF/TrkB/CREB signaling pathway [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine; 2024.
- [7] IQBAL Z, LIU S, LEI Z, et al. Astrocyte L-lactate signaling in the ACC regulates visceral pain aversive memory in rats [J]. *Cells*, 2022, 12(1): 26.
- [8] ISHIKAWA K, YASUDA S, FUKUHARA K, et al. 4-methylcatechol prevents derangements of brain-derived neurotrophic factor and TrkB-related signaling in anterior cingulate cortex in chronic pain with depression-like behavior [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(4): 226–232.
- [9] HUANG H Y, LIAO H Y, LIN Y W. Effects and mechanisms of electroacupuncture on chronic inflammatory pain and depression comorbidity in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4951591.
- [10] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55–63.
- [11] ZHANG G F, WANG J, HAN J F, et al. Acute single dose of ketamine relieves mechanical allodynia and consequent depression-like behaviors in a rat model [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 631: 7–12.
- [12] ZHANG M, LIU Y, ZHAO M, et al. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine [J]. *J Headache Pain*, 2017, 18(1): 27.
- [13] BRÜNING C A, MARTINI F, SOARES S M, et al. M-trifluoromethyl-diphenyl diselenide, a multi-target selenium compound, prevented mechanical allodynia and depressive-like behavior in a mouse comorbid pain and depression model [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015, 63: 35–46.
- [14] KIM H, CHEN L, LIM G, et al. Brain indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and

- depression [J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2940–2954.
- [15] 国笑, 王瑜, 李少源, 等. 抑郁与慢性疼痛共病动物模型的研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(4): 689–695.
- GUO X, WANG Y, LI S Y, et al. Research progress of animal models of depression-chronic pain comorbidity [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2019, 21(4): 689–695.
- [16] 樊静杰, 袁普卫, 郑洁, 等. 基于脊髓大麻素受体 CB2 介导的 MAPK 信号通路探讨电针治疗膝骨性关节炎慢性疼痛的机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1582–1586.
- FAN J J, YUAN P W, ZHENG J, et al. Study on mechanism of electroacupuncture therapy for chronic pain in knee osteoarthritis based on MAPK signaling pathway mediated by spinalcannabinoid receptor CB2 [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(13): 1582–1586.
- [17] 王小玲. 前扣带回皮层 FTO 在神经病理性疼痛致焦虑抑郁样行为中的作用及其机制 [D]. 郑州: 郑州大学; 2022.
- WANG X L. The role and mechanism of FTO in anxiety and depression-like behaviors induced by neuropathic pain in anterior cingulate cortex [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2022.
- [18] 王倩, 张娟, 周一, 等. CFA 注射致炎性疼痛过程中海马内 BDNF 的表达及作用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(36): 7001–7006.
- WANG Q, ZHANG J, ZHOU Y, et al. The expression and role of BDNF in the hippocampus during inflammatory pain after CFA administration [J]. Prog Mod Biomed, 2014, 14(36): 7001–7006.
- [19] 黄硕. 慢性心理和疼痛应激对大鼠神经递质及内分泌腺轴的影响 [D]. 杭州: 浙江理工大学; 2017.
- HUANG S. Effects of chronic psychological stress and chronic pain on neurotransmitters and endocrine gland axis in rats [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University; 2017.

[收稿日期] 2024-12-04

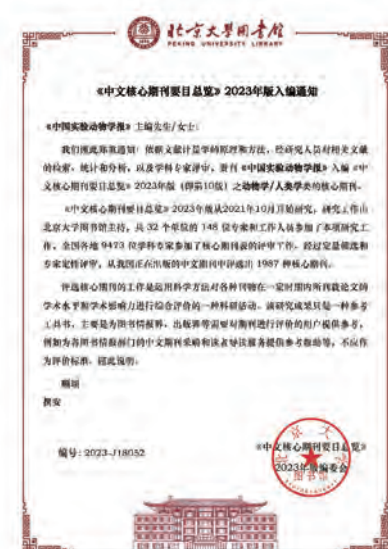
《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

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

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

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



张泽宇,梅晓峰,陶柳颖,等. 香烟烟雾联合肺炎克雷伯杆菌诱导慢阻肺模型小鼠气道重塑机制 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 644–655.

ZHANG Z Y, MEI X F, TAO L Y, et al. Mechanism of airway remodeling in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke combined with *Klebsiella pneumoniae* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 644–655. Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.003

香烟烟雾联合肺炎克雷伯杆菌诱导慢阻肺模型 小鼠气道重塑机制

张泽宇^{1,2,3}, 梅晓峰^{1,2,3}, 陶柳颖^{1,2,3}, 刘览^{1,2,3}, 李建生^{1,2,3}, 赵鹏^{1,2,4*}

(1. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046; 2. 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046; 3. 河南中医药大学第一附属医院呼吸科, 郑州 450000; 4. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

【摘要】 目的 采用香烟烟雾 (cigarette smoke, CS) 暴露联合肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 滴鼻建立慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 小鼠模型, 探讨 COPD 气道重塑及其机制。**方法** 将 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为对照 (Control) 组、香烟烟雾 (CS) 组、肺炎克雷伯菌 (KP) 组和香烟烟雾联合肺炎克雷伯菌 (CS + KP) 组。1 ~ 8 周造模, 每 4 周检测肺功能, 于第 4、8、16 和 24 周取材。观察小鼠肺功能、肺组织病理结构、炎症因子、胶原纤维、胶原蛋白及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 的变化。采用 CS 提取物和脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 刺激人支气管上皮细胞 16HBE, 检测细胞间连接蛋白、自噬及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号等。**结果** 与 Control 组比, CS + KP 组小鼠肺功能第 4 ~ 24 周每分钟通气量 (minute volume, MV) 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 第 8 ~ 24 周气道狭窄指数 (enhanced pause, Penh) 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); CS 组在第 8 ~ 16 周 MV 显著降低、Penh 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Control 组比, CS + KP 组小鼠第 8 ~ 24 周肺组织大量炎细胞浸润、肺泡壁增厚、肺泡破裂和融合、气管壁增厚等, 第 4 ~ 24 周平均肺泡数 (mean alveolar number, MAN) 显著降低, 肺泡平均截距 (mean linear intercept, MLI)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); CS 组、KP 组第 8 ~ 16 周肺组织出现以上炎症与组织损伤。与 Control 组比, CS + KP 组小鼠第 8 ~ 16 周肺组织 I 型胶原蛋白 (collagen I, COL I)、III 型胶原蛋白 (collagen III, COL III)、 α -SMA 和 TGF- β 1 显著升高 ($P < 0.01$); CS 组、KP 组第 8 ~ 16 周 COL I 显著升高 ($P < 0.01$)。此外, 与 Control 组比, CS 与 LPS 联合诱导 16HBE 细胞 E-钙粘蛋白 (E-cadherin, E-cad) 显著降低和 N-钙粘蛋白 (N-cadherin, N-cad) 显著升高 ($P < 0.05$), 自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin-1 显著降低 ($P < 0.05$), p-mTORC1、p-P70-S6K、及 p-4E-BP1 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 香烟烟雾联合肺炎克雷伯菌诱导的 COPD 小鼠肺功能下降、肺组织病变及气道重塑出现早、持续时间长, 其机制可能与激活 mTORC1 信号抑制细胞自噬诱导气道上皮细胞损伤有关。

【基金项目】 河南省科技研发计划联合基金项目 (222301420020, 222301420070), 2023 年度河南省本科高校青年骨干教师培养计划 (2023GGJS084), 2024 年度河南省高校科技创新人才支持计划 (24HASTIT073)。

Funded by Joint Fund for Science and Technology Research of Henan Province (222301420020, 222301420070), Youth Elite Teachers Training Program for Undergraduate Colleges of Henan Province in 2023 (2023GGJS084), Support Program for Scientific and Technological Innovation Talents in Higher Education Institutions of Henan Province on 2024 (24HASTIT073)。

【作者简介】 张泽宇, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。Email: zhangzeyu_2024@163.com

【通信作者】 赵鹏, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药防治呼吸病物质基础与作用机制。Email: zhaopeng@hactcm.edu.cn

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;香烟烟雾;肺炎克雷伯菌;气道重塑;自噬

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2025) 05-0644-12

Mechanism of airway remodeling in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke combined with *Klebsiella pneumoniae*

ZHANG Zeyu^{1,2,3}, MEI Xiaofeng^{1,2,3}, TAO Liuying^{1,2,3}, LIU Lan^{1,2,3}, LI Jiansheng^{1,2,3}, ZHAO Peng^{1,2,4*}

(1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-Constructed by Henan Province & Ministry of Education, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046, China; 3. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 4. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: ZHAO Peng. E-mail: zhaopeng@hactcm.edu.cn

【Abstract】 Objective Cigarette smoke (CS) exposure combined with *Klebsiella pneumoniae* (KP) infection in mice was used to establish a model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to investigate the mechanism of airway remodeling. **Methods** Male BALB/c mice were randomly divided into a Control group, CS group, KP group, and CS + KP group. The mice were exposed to CS, KP, and CS + KP from weeks 1 to 8, and were sacrificed in weeks 4, 8, 16, and 24. MV, Penh, MLI, MAN, and changes in lung pathological structure were detected. The expression levels of IL-1 β and TNF- α in lung tissue were detected by ELISA. Collagen deposition was observed by Masson staining and immunohistochemistry. α -SMA and TGF- β 1 expression in lung tissue was detected by immunofluorescence. Human bronchial epithelioid cells (16HBE) were also stimulated by CS and lipopolysaccharide (LPS) *in vitro*, and the expression levels of airway epithelial junction proteins, autophagy-related protein, and mTOR signaling proteins were detected. **Results** Compared with the Control group, the CS + KP group mice had significantly decreased MV from weeks 4 to 24 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and significantly increased Penh from weeks 8 to 24 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); while the CS group had markedly decreased MV and markedly increased Penh from weeks 8 to 16 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the Control group, massive inflammatory cell infiltration, alveolar wall thickening, alveolar rupture and fusion, and airway wall thickening were observed by HE staining in CS + KP group from weeks 4 to 24. The CS + KP group mice had significantly decreased MAN and significantly increased MLI, IL-1 β and TNF- α in their lung tissue from weeks 4 to 24 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The aforementioned inflammation and tissue damage were observed in the CS group and the KP group from week 8 to 16. Compared with the Control group, COL I, COL III, α -SMA, and TGF- β 1 were significantly increased in lung tissue of mice in the CS + KP group from weeks 8 to 16 ($P < 0.01$); COL I was significantly increased in the CS group and KP group from weeks 8 to 16 ($P < 0.01$). In addition, increased E-cad and decreased N-cad ($P < 0.05$); significantly decreased LC3B and Beclin-1 ($P < 0.05$); and significantly increased p-mTORC1, p-P70-S6K, and p-4E-BP1 expression were observed in 16HBE cells exposed to CS and LPS ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Pulmonary functional decline, pathological changes in lung tissue, and airway remodeling appeared to occur early and persist in COPD mice induced by CS and KP. The mechanisms may be related to the activation of mTORC1 signaling pathway and subsequent inhibition of autophagy.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; cigarette smoke; *Klebsiella pneumoniae*; airway remodeling; autophagy

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

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续性的呼吸系统症状和气流受限为特征常见疾病。我国 40 岁及以上人群的 COPD 患病率高达 13.7%, 患病人数接近 1 亿。COPD 成为我国导致伤残调整寿命年的第 3 位疾病^[1-2]。

由于长期吸入有毒颗粒或气体引发炎症细胞与气道、肺泡结构细胞相互作用, 通过释放各种介质引发持续的炎症损伤、异常修复形成气道重塑, 最终导致肺功能持续下降、COPD 进行性恶化^[3-4]。其中, 气道重塑是 COPD 患者肺功能进行性下降、疾病持续进展的关键因素^[5]。气道上皮细胞通过 E-钙粘蛋白 (E-cadherin, E-cad)、闭锁小带蛋白-1 等蛋白连接形成连续完整的屏障, 可以有效抵御外界有害物质和病原体^[6-7]。但当香烟烟雾、病原微生物持续刺激下, 气道上皮细胞受损而低表达 E-cad, 高表达 N-钙粘蛋白 (N-cadherin, N-cad)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 等, 并转化为成纤维细胞或肌成纤维细胞, 触发细胞外基质沉积并导致组织修复不完全, 进一步引起底层组织损伤, 诱导气道结构变化^[8-9]。此外, 香烟烟雾等有害气体暴露可以显著激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 减弱气道上皮细胞自噬, 导致气道上皮细胞功能紊乱, 释放 TGF- β 1 等因子^[10-12]。然而, 香烟烟雾及病原体感染诱导 COPD 气道重塑机制尚不清楚, 本研究采用香烟烟雾暴露联合肺炎克雷伯菌感染建立 COPD 小鼠模型, 探讨两种因素联合作用诱导的气道重塑机制, 为 COPD 的发生发展机制、预防及治疗策略研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 96 只, 雄性, 6 ~ 8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2021-0006】。小鼠在河南中医药大学动物实验中心【SYXK (豫) 2021-0015】日常饲养。饲养环境: 昼夜明暗交替时间各半, 温度控制在 22 ~ 25 °C, 日昼夜温差

≤ 4 °C, 相对湿度控制在 30% ~ 70%。本实验符合动物伦理要求, 经过河南中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (DWLL202003210)。

1.1.2 细胞

人支气管上皮细胞 (16HBE) 购自上海富衡生物科技有限公司 (货号: FH1013)。

1.1.3 菌株

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 购自中国生物制品检验鉴定所, 菌株 ID: 46114。

1.1.4 主要试剂与仪器

红旗渠香烟 (烤烟型), 焦油量 10 mg, 烟气烟碱量 0.8 mg, 烟气一氧化碳量 12 mg, 生产于河南中烟工业有限责任公司。脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) (Sigma, L4268-10MG), DMEM 高糖培养基 (Solarbio, Cat. No12100), 胎牛血清 (Lonsera, S711-001S), PBS 缓冲液 (Servicebio, GA2305002), 胰蛋白酶 (Procell, PB180225), BCA 蛋白定量试剂盒、7.5% SDS-PAGE 凝胶试剂盒均购自雅酶 (货号依次为 ZJ102L、PG111), E-cad、N-cad、GAPDH 抗体以及 Multi-rAb 重组二抗购自 Proteintech (货号依次为 20874-1-AP、22018-1-AP、10494-1-AP、RGAR001), 微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated proteins 1 light chain 3B, LC3B) 购自 Genetex (货号: GTX127375), 磷酸化真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (p-4E-BP1) 购自 Affinity (货号: AF3830), 自噬相关蛋白 Beclin-1、p-mTORC1、磷酸化 P70 核糖体 S6 蛋白激酶 (p-P70-S6K) 均购自 CST (货号依次为 3738、5536S、9234S), 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β ELISA Kit 购自 RD (货号: DY401), 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA Kit 购自 BD Biosciences (货号: 558534)。动物全身体积描记检测系统 (Buxco, 美国), Thermo Multiskan GO 酶标仪 (Thermo Fisher, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与分组

将 96 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为对照 (Control) 组、香烟烟雾 (CS) 组、肺炎克雷伯菌 (KP) 组和香烟烟雾联合肺炎克雷伯菌 (CS + KP) 组, 每组各 24 只。第 1 ~ 8 周, CS 组单用 CS 熏吸 (小鼠置于封闭装置中, 然后暴露于香烟烟

雾中(烟雾浓度: 3000 ± 500 ppm), 每次 40 min, 每天 2 次。KP 组小鼠每 7 d 给予一次鼻内滴注 KP (5×10^6 CFU/mL, 每只小鼠 0.02 mL), 滴注时固定小鼠头部, 用注射器将预先制备好的菌液滴入小鼠鼻腔, 观察小鼠的呼吸, 确保其通畅^[13]。CS + KP 组采用 CS 熏吸联合 KP 滴鼻。分别于第 4、8、16 及 24 周取材。

1.2.2 CS 提取物制备

将红旗渠香烟烟雾溶解于 DMEM 高糖培养基中, 使用全波长酶标仪在 320 nm 波长处测定吸光值, 后将其浓度稀释至吸光值 1.8 ~ 2.2 作为 100% 香烟烟雾提取物, 用无菌滤器过滤后备用^[14]。

1.2.3 KP 培养

将复苏后的 KP 菌液离心后去上清, 加入 5 mL 生理盐水吹打混匀。用灭菌后的接种环蘸取菌液于培养基中呈“Z”字形涂布, 将涂布好细菌的培养皿置于 37 °C 恒温培养箱中培养。待观察到有连成线的单个菌落时, 用棉签蘸取细菌菌落收集入生理盐水中。梯度稀释后测定菌液浓度, 用生理盐水稀释到 5×10^6 CFU/mL 备用。

1.2.4 细胞模型建立与分组

使用 10% 胎牛血清和 90% DMEM 高糖基础培养基混匀后制成完全培养基备用。将 16HBE 细胞接种在完全培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 环境。当细胞的密度达到 70% ~ 80% 时, 用胰蛋白酶消化、离心机离心、完全培养基重悬、计数仪测浓度, 以 2×10^5 个/皿的密度接种到 35 mm 细胞培养皿中, 待细胞密度达到 70% ~ 80% 后, 使用基础培养基饥饿 3 h, CS 组加入 10% CS 提取物, LPS 组加入 LPS (100 ng/mL), CS + LPS 组采用上述两种方法结合, 作用 24 h 后使用 RIPA 裂解细胞, 收取细胞蛋白样本。

1.2.5 肺功能测定

每 4 周通过动物全身体积描记检测系统检测小鼠的每分钟通气量 (minute volume, MV) 和气道狭窄指数 (enhanced pause, Penh), 测量时保持环境安静, 温度恒定在 22 °C, 相对湿度保持在 55% 左右。

1.2.6 肺组织病理

采用 4% 多聚甲醛固定左肺组织, 并用石蜡包埋和苏木素-伊红 (HE) 染色。每张肺组织切片随机截取 6 个肺泡视野图片, 在图片中央画出

“十”字, 计算每个视野的肺泡数、肺泡隔膜数、测量长度和面积, 计算公式如下: 肺泡平均截距 (mean linear intercept, MLI) (μm) = 测量长度/肺泡隔膜数, 平均肺泡数 (mean alveolar number, MAN) (mm^{-2}) = 肺泡数/面积^[15]。

1.2.7 炎症因子水平检测

采用 PBS 冲洗小鼠右肺组织, 称取 50 mg 肺组织加入相应体积 PBS 和研磨珠研磨成匀浆取上清。根据 ELISA kit 产品操作方法, 将捕获抗体加入到 96 孔板中孵育过夜, 第 2 天洗板并依次加入封闭液、标准品和样本、检测抗体、HRP、显色剂、中止液等步骤。使用酶标仪在 450 和 570 nm 波长处检测样本中 TNF- α 和 IL-1 β 水平。

1.2.8 Western Blot

采用 RIPA 裂解液裂解细胞离心后收集上清, BCA 法对蛋白进行定量处理, 然后通过 Western Blot 检测样本中 E-cad、N-cad、Beclin-1、LC3B、p-mTORC1、p-P70-S6K 和 p-4E-BP1 的蛋白表达水平, 并使用 Image J 1.8 软件分析。

1.2.9 免疫组化

采用 4% 多聚甲醛固定肺组织, 72 h 后包埋于石蜡中, 并依次通过二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇、蒸馏水等步骤脱蜡, 使用柠檬酸钠抗原修复液进行抗原修复, PBS 洗涤, 5% 山羊血清封闭, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 第 2 天 PBS 洗涤后滴加二抗室温孵育 50 min, 滴加 DAB 显色液染色、重复脱水、中性树脂封片后, 在显微镜下观察肺组织 I 型胶原蛋白 (collagen I, COL I)、III 型胶原蛋白 (collagen III, COL III) 的表达水平。利用 Image-ProPlus 6.0 软件计算积分光密度 (integrated optical density, IOD) 进行数字化处理。

1.2.10 免疫荧光

采用 4% 多聚甲醛固定肺组织后, 进行石蜡包埋, 并依次通过二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇、蒸馏水等步骤脱蜡, 使用柠檬酸钠抗原修复液进行抗原修复, PBS 洗涤, 5% 山羊血清室温封闭 1 h, 将 α -SMA 和 TGF- β 1 抗体滴加在肺组织上于 4 °C 孵育过夜, 第 2 天 PBS 洗涤后滴加二抗室温避光孵育, 在 PBS 中浸洗后孵育 DAPI, 滴加放淬灭荧光封片剂后盖上载玻片。在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学分析

数据通过 SPSS 23.0 进行分析。采用单因素方差分析进行统计检验。首先使用方差齐性检验,对于方差齐的情况,采用 LSD-*t* 进行分析;对于方差不齐的情况,采用 Dunnett's *T3* 进行分析。数据采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

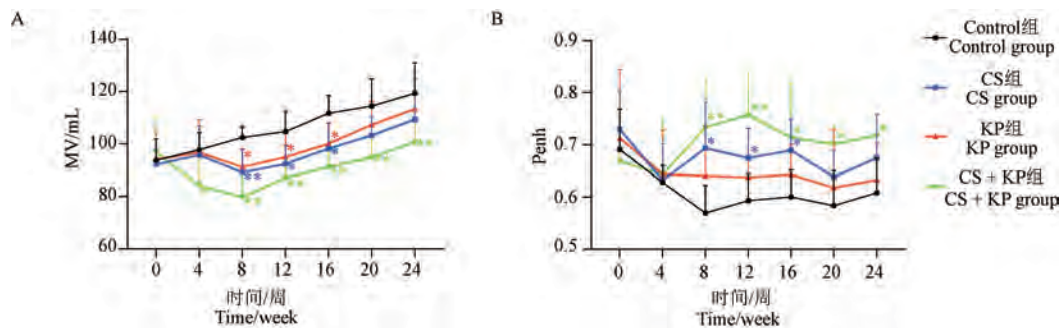
2.1 烟雾暴露联合细菌感染对 COPD 模型小鼠肺功能的影响

与 Control 组比较,第 0 周,各组 MV 和 Penh

无显著性差异;第 8 ~ 16 周,CS 暴露组肺功能 MV 显著降低、Penh 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第 8 ~ 16 周,KP 组 MV 显著降低 ($P < 0.05$)、Penh 无显著性差异;第 4 ~ 24 周,CS + KP 组 MV 显著降低,第 8 ~ 24 周 Penh 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 1。

2.2 烟雾暴露联合细菌感染对 COPD 模型小鼠肺组织病理的影响

肺组织 HE 染色结果如图 2 显示,Control 组小鼠肺组织结构清晰,未见明显炎性细胞浸润;第 8 周,CS 组和 CS + KP 组小鼠肺组织出现炎性细胞大量渗出、气道壁厚度明显增加、部分肺泡



注:A:各组小鼠 MV 的变化;B:各组小鼠 Penh 的变化;与 Control 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 CS 和 KP 对小鼠肺功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Changes of MV in mice in each group. B. Changes of Penh in mice in each group. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of CS and KP on pulmonary function of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

结构破坏并出现相互融合、肺泡腔扩张形成大面积气腔等病理变化,KP 组小鼠肺组织仅出现炎症细胞浸润、肺泡腔扩张;其中 CS + KP 组小鼠肺组织病变在 16 周仍稳定存在,并持续至 24 周(图 2A)。

与 Control 组相比,第 4 周 CS + KP 组的 MAN 显著降低、MLI 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余干预组无明显改变;第 8 ~ 16 周 CS 组和 CS + KP 组的 MAN 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),CS 组、KP 组和 CS + KP 组的 MLI 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第 24 周 CS + KP 组的 MAN 显著降低、MLI 显著升高 ($P < 0.01$) (图 2B)。

2.3 烟雾暴露联合细菌感染对 COPD 模型小鼠炎症反应的影响

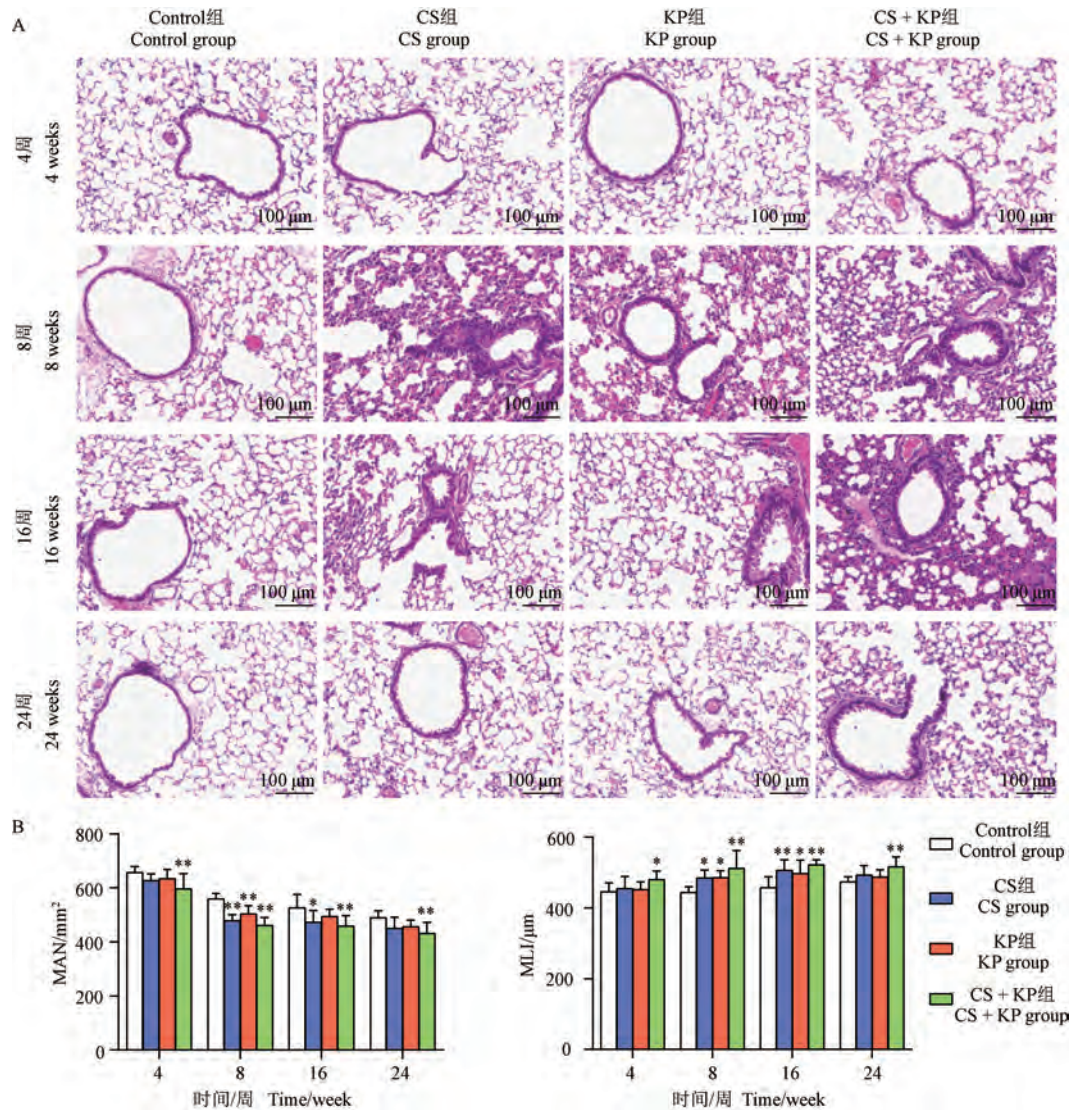
与 Control 组相比,各组炎症因子在第 4 周表

达无显著性差异;CS 组、KP 组和 CS + KP 组 IL-1 β 和 TNF- α 的表达在第 8 ~ 16 周显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);CS + KP 组 IL-1 β 、TNF- α 的表达在第 24 周显著升高 ($P < 0.01$),CS 组 IL-1 β 的表达在第 24 周显著升高 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 烟雾暴露联合细菌感染对 COPD 小鼠肺组织胶原沉积影响

肺组织 Masson 染色结果如图 4 显示,第 4 周 CS + KP 组出现胶原蛋白沉积、平滑肌增生和气道壁增厚,第 8 ~ 24 周 CS 组、KP 组和 CS + KP 组观察到胶原蛋白沉积、平滑肌增生和气道壁增厚。

免疫组化结果显示,与 Control 组相比,第 8 周 KP 组和 CS + KP 组的 COL I 和 COL III 显著升高 ($P < 0.01$),CS 组的 COL I 显著升高 ($P < 0.01$);第 16 周 CS + KP 组的 COL I 和 COL III

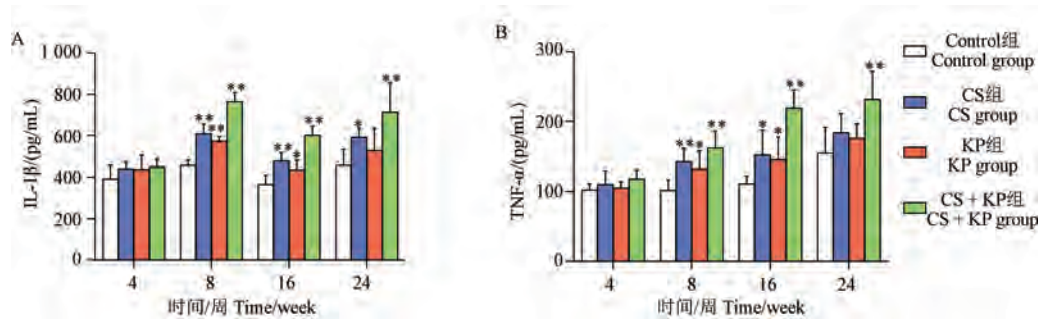


注:A:各组小鼠肺组织病理结构变化;B:MAN 和 MLI 量化。

图 2 CS 和 DP 对小鼠肺组织病理的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Pathological changes in lung tissues of mice in each group. B. Quantification of MAN and MLI.

Figure 2 Effects of CS and KP on pathological changes in lung tissues of mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)



注:A:小鼠肺组织中 IL-1β 的表达;B:小鼠肺组织中 TNF-α 的表达。

图 3 CS 和 KP 对小鼠炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Expression of IL-1β in lung tissues of mice. B. Expression of TNF-α in lung tissues of mice.

Figure 3 Effects of CS and KP on inflammatory cytokines in mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

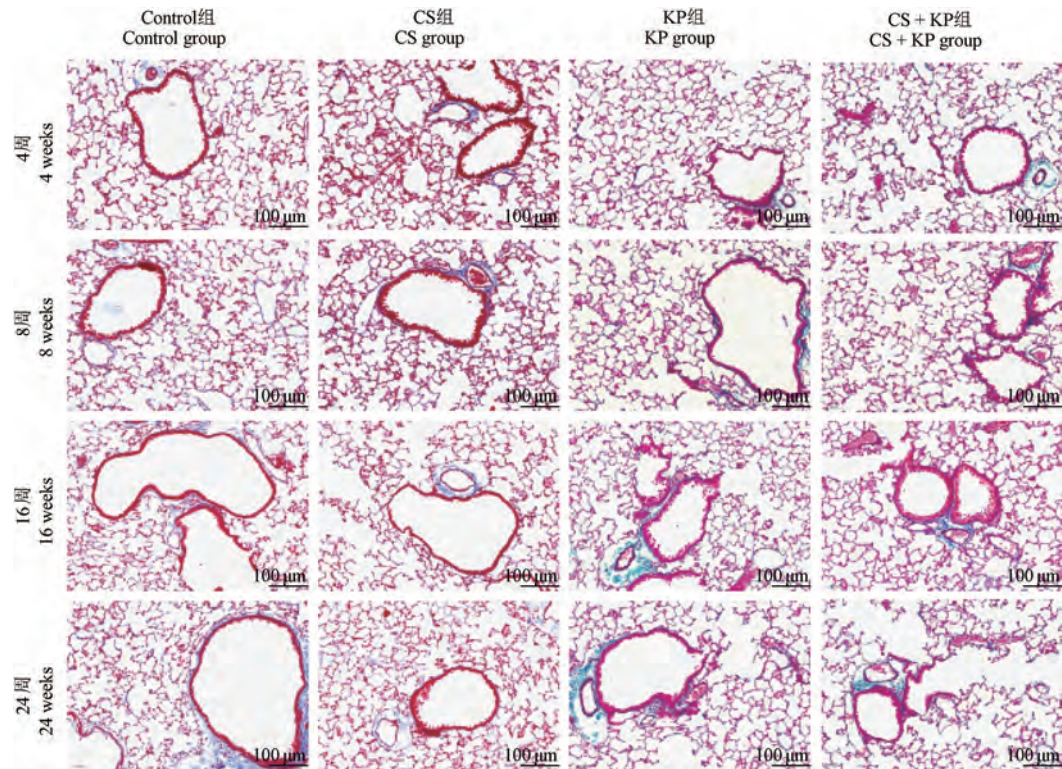


图 4 CS 和 KP 对小鼠肺组织胶原沉积的影响 (Masson 染色, $n = 6$)

Figure 4 Effects of CS and KP on collagen deposition in lung tissue of mice (Masson staining, $n = 6$)

显著升高 ($P < 0.01$), CS 组和 KP 组的 COL I 显著升高 ($P < 0.01$) (图 5)。

2.5 烟雾暴露联合细菌感染对 COPD 小鼠肺组织 α -SMA 和 TGF- β 1 影响

免疫荧光染色结果显示,与 Control 组相比,第 8 ~ 16 周 CS 组和 CS + KP 组小鼠的肺组织 α -SMA 和 TGF- β 1 表达水平升高 (图 6)。

2.6 香烟烟雾联合 LPS 对气道上皮细胞间连接蛋白、自噬及 mTORC1 信号的影响

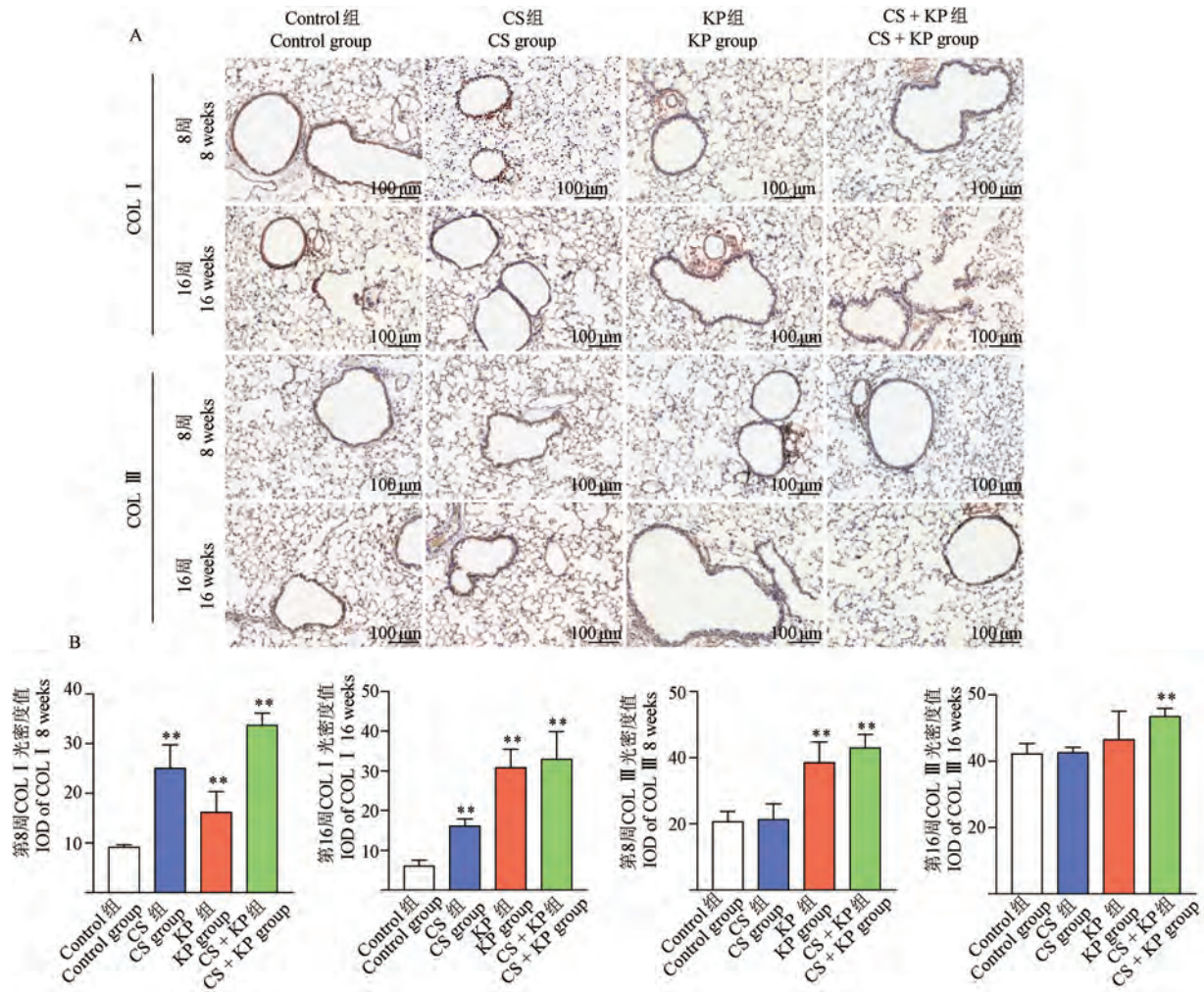
与 Control 组比较,CS 组和 LPS 组可以升高 N-Cad、降低 E-Cad 表达,但无显著性差异;CS + LPS 显著升高 N-Cad、降低 E-Cad 表达 ($P < 0.05$)。

与 Control 组相比,CS 组、LPS 组和 CS + LPS 组的 LC3B 和 Beclin-1 的蛋白表达显著降低, p-mTORC1、p-P70-S6K、p-4E-BP1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 7)。

3 讨论

COPD 是一种全球性的公共卫生问题,全球 ≥ 40 岁人群的 COPD 患病率高达 11.7%,成年患者约 1.75 亿,死亡患者约 320 万人,导致了 2.6%

全球伤残调整寿命年,已成为全球第 3 大致死原因^[16-17];随着发展中国家吸烟率的升高和高收入国家人口老龄化加剧,预计 COPD 的患病率在未来 40 年仍将持续上升,至 2060 年可能每年有超过 540 万人死于 COPD 及其相关疾病^[18]。COPD 发病机制复杂多元,主要包括慢性炎症反应、氧化应激和蛋白酶/抗蛋白酶失衡等引起的气道和肺实质结构性改变,其主要表现为上皮细胞增生、黏液腺增生、气道壁细胞外基质沉积及血管增生。其中由 CS 和病原体感染引起的炎症细胞与气道、肺泡结构细胞相互作用,通过释放各种介质引发持续的炎症损伤以及诱发上皮细胞化生、胶原沉积、气道壁增厚等异常修复的气道重塑过程,造成细支气管狭窄闭塞、扭曲以及肺泡附着处消失导致气流受限异常修复形成气道重塑,最终导致 COPD 患者肺功能进行性下降、疾病持续进展的关键原因^[19]。目前 COPD 气道重塑发生机制尚未完全阐明,建立适宜的动物模型有助于其机制的深入研究。本团队前期基于 COPD 常见致病因素,采用香烟、细菌、病毒等因素建立 COPD 小鼠模型,发现均可引起肺功能下降、肺组



注:A:免疫组织化学染色检测小鼠肺组织中 COL I 和 COL III 的表达;B:第 8 周和第 16 周小鼠肺组织中 COL I 和 COL III 量化。

图 5 CS 和 KP 对小鼠肺组织 COL I 和 COL III 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A. Expression of COL I and COL III in lung tissues of mice were measured by immunohistochemistry staining. B. Quantification of COL I and COL III in lung tissues of mice at week 8 and 16.

Figure 5 Effects of CS and KP on COL I and COL III in lung tissue of mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

织结构损伤^[20]。本研究采用 CS 联合细菌感染建立 COPD 小鼠模型、CS 联合 LPS 诱导气道上皮细胞模型,考察 COPD 气道重塑变化及其潜在机制。

肺功能下降不仅反映气流受限程度,还与气道重塑后引发的气道狭窄有关。当气道损伤后发生异常修复,导致气道结构狭窄及通气功能下降,表现为肺功能的进行性减退^[21]。肺功能中 MV 反映了呼吸系统的通气功能,Penh 反映了气道阻力和狭窄程度^[22-23]。同时肺泡腔、肺实质内的炎症细胞如中性粒细胞、巨噬细胞的大量聚集,高表达多种炎症因子,诱发肺组织持续炎症反应,加重气道损伤和重塑发生^[24]。本研究显

示,CS + KP 组小鼠在第 4 周出现肺功能降低,肺组织中炎细胞浸润、肺泡壁扩张等病理改变及炎症反应显著,并持续至 24 周;而 CS 组和 KP 组的肺功能、肺组织及炎症反应的改变仅在第 8 ~ 16 周出现。以上结果表明,CS 联合 KP 诱导的小鼠 COPD 样病变出现早,持续时间长。

由于气道长期受到 CS 及其诱发的慢性炎症刺激,可以引发气道平滑肌细胞的增殖和肥大、胶原蛋白沉积、气道壁增厚等结构改变,加剧气流受限^[25]。其中, α -SMA 作为气道平滑肌细胞的标志性蛋白,其高表达常与气道平滑肌的活化、增殖和转化有关^[26];TGF- β 1 是成纤维细胞增殖、

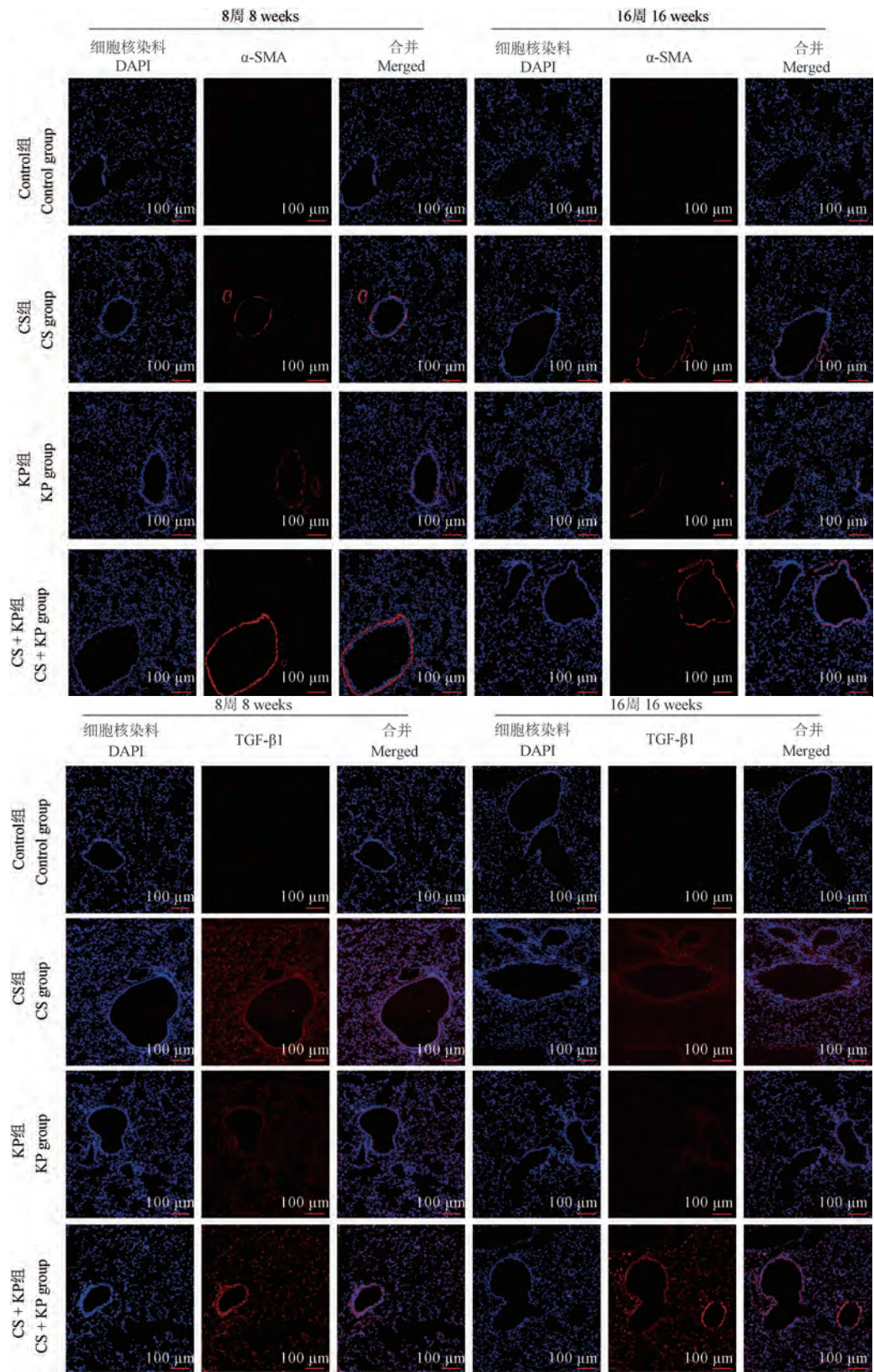


图 6 CS 和 KP 对小鼠肺组织 α -SMA 和 TGF- β 1 的影响($n = 6$)

Figure 6 Effects of CS and KP on α -SMA and TGF- β 1 expression in lung tissue of mice($n = 6$)

活化和胶原蛋白合成的重要刺激因子^[27];COL I 和 COL III 作为胶原蛋白的重要成分沉积于气道周围,导致气道结构改变^[28]。临床研究显示 COPD 患者 α -SMA、TGF- β 1、COL I 及 COL III 表

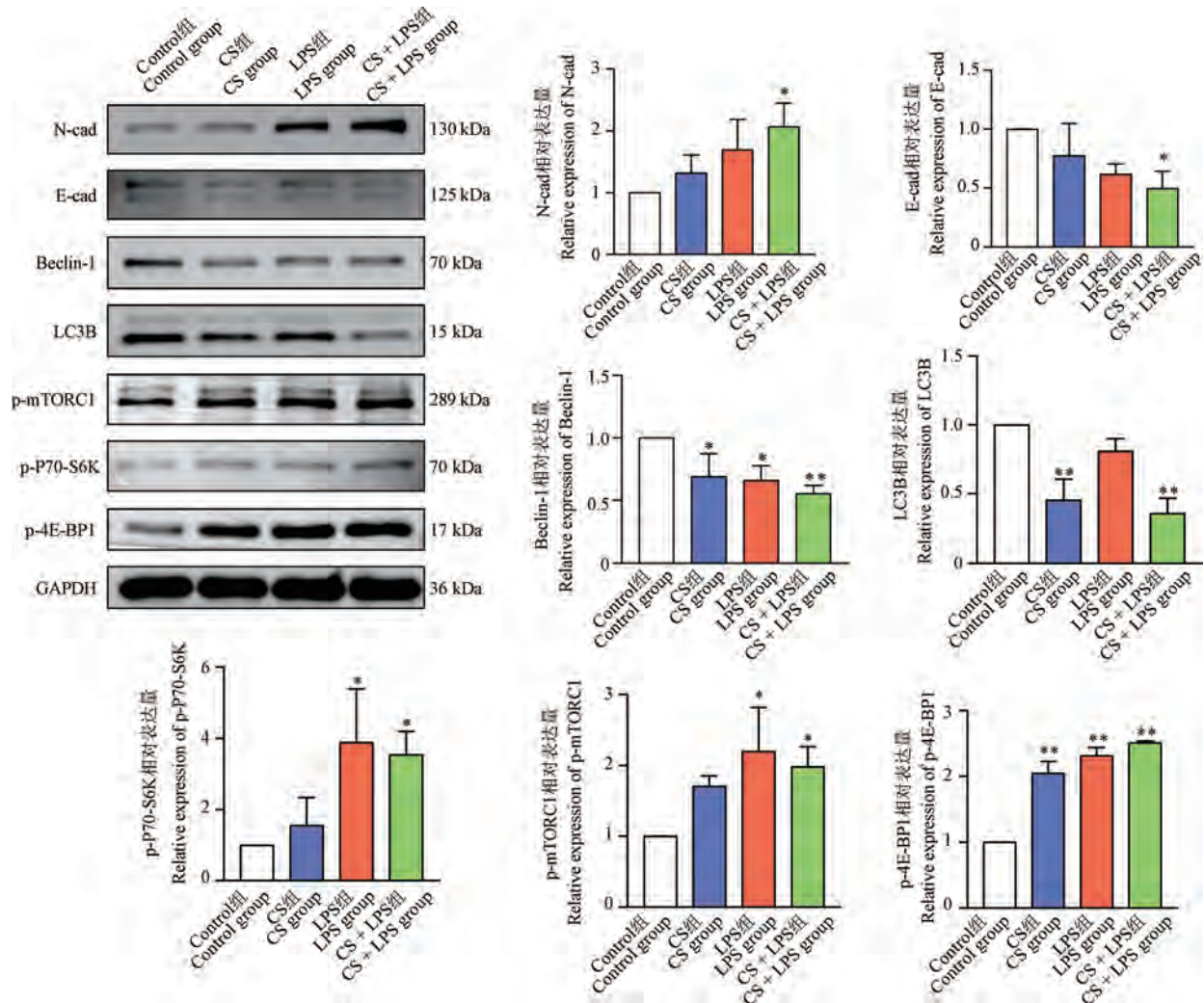


图 7 CS 和 LPS 对气道上皮细胞间连接蛋白、自噬及 mTORC1 信号的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 7 Effects of CS and LPS on airway epithelial junction proteins, autophagy and mTORC1 signaling($\bar{x} \pm s, n = 3$)

达水平均显著升高,且与患者气道重塑密切相关^[29-31]。本研究发现 CS + KP 组在第 4 周出现胶原蛋白沉积、平滑肌增生和气道壁增厚等病理变化,并持续至第 24 周;而 CS 组和 KP 组在第 8 周出现上述变化,并持续至第 24 周。以上结果表明,CS 联合 KP 诱导的小鼠气道重塑出现早,持续时间长。

气道上皮细胞通过 E-cad 等连接蛋白介导细胞间的连接形成上皮屏障抵御 CS、细菌等外界有害因素的影响^[32-33]。COPD 患者的气道屏障受损,气道上皮细胞间 E-cad 等连接蛋白表达降低,上皮细胞向间质细胞转变,参与气道损伤的异常修复^[34-37]。本研究采用 CS、LPS、CS 联合 LPS 诱导气道上皮细胞 16HBE 建立细胞模型。结果显示,各干预组的细胞间连接蛋白 E-cad 均减少,间

质化细胞标志蛋白 N-cad 表达增加,其中联合干预的变化更为明显。此外,COPD 患者气道上皮的自噬受损,导致香烟烟雾等有害因素刺激损伤的细胞器、蛋白质积累,引发气道上皮细胞功能紊乱及气道上皮受损^[38]。LC3B、Beclin-1 与多种蛋白相互作用调控自噬体形成与成熟,其在 COPD 患者肺组织表达显著减少^[39-40]。mTORC1 可以通过磷酸化 P70-S6K 和 4E-BP1 等调控细胞生长、增殖、分化、代谢以及细胞自噬^[41-43]。本研究发现,CS 联合 LPS 可以显著升高 p-mTORC1、p-P70-S6K、p-4E-BP1 水平,降低气道上皮细胞 LC3B、Beclin-1 等自噬相关蛋白水平。因此,CS 联合 LPS 可以降低气道上皮细胞自噬水平,其机制可能与激活 mTORC1 信号通路有关。

综上所述,CS 联合 KP 诱导的 COPD 小鼠肺

功能、肺组织病变及气道重塑出现早、持续时间长,其机制可能与激活 mTORC1 信号抑制细胞自噬损伤气道上皮细胞有关。

参 考 文 献(References)

- [1] FANG L, GAO P, BAO H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in China: a nationwide prevalence study [J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(6): 421–430.
- [2] WANG C, XU J, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391: 1706–1717.
- [3] HOU W, HU S, LI C, et al. Cigarette smoke induced lung barrier dysfunction, EMT, and tissue remodeling: a possible link between COPD and lung cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2025636.
- [4] MAHMOOD M Q, SOHAL S S, SHUKLA S D, et al. Epithelial mesenchymal transition in smokers: large versus small airways and relation to airflow obstruction [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10: 1515–1524.
- [5] MAHMOOD M Q, WALTERS E H, SHUKLA S D, et al. β -catenin, twist and snail; transcriptional regulation of EMT in smokers and COPD, and relation to airflow obstruction [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10832.
- [6] CARLIER F M, DE FAYS C, PILETTE C. Epithelial barrier dysfunction in chronic respiratory diseases [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 691227.
- [7] 魏焱鑫, 魏毓, 刘新光, 等. 通塞颗粒对 AECOPD 大鼠气道上皮屏障及 EGFR/ERK 通路的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(12): 2204–2213.
- WEI Y X, WEI Y, LIU X G, et al. Effect of Tong sai granules on airway epithelial barrier in a rat model of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and role of EGFR/ERK signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(12): 2204–2213.
- [8] WANG X, WU R, HAO T, et al. Effects of cigarette smoke extract on E-cadherin expression in cultured airway epithelial cells [J]. *J Tongji Med Univ*, 2000, 20(1): 32–35.
- [9] SHUKLA S, WARD C, WALTERS E H. Mechanistic insights on EMT and smoking-related COPD [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(4): 1503–1504.
- [10] LIAO S X, SUN P P, GU Y H, et al. Autophagy and pulmonary disease [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2019, 13: 1753466619890538.
- [11] BARNES P J. Senescence in COPD and its comorbidities [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 517–539.
- [12] RACANELLI A C, KIKKERS S A, CHOI A M K, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 221–232.
- [13] LI K, MEI X, XU K, et al. Comparative study of cigarette smoke, *Klebsiella pneumoniae*, and their combination on airway epithelial barrier function in mice [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(5): 1133–1142.
- [14] 江宇航, 梅晓峰, 贾利丹, 等. 香烟烟雾诱导慢性阻塞性肺疾病模型小鼠气道上皮屏障损伤的机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(7): 1297–1303.
- JIANG Y H, MEI X F, JIA L D, et al. Mechanism of airway epithelial barrier damage in a mouse model of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(7): 1297–1303.
- [15] LU X, LI Y, LI J, et al. Sequential treatments with Tong sai and Bu fei yi shen granules reduce inflammation and improve pulmonary function in acute exacerbation-risk window of chronic obstructive pulmonary disease in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 1359105.
- [16] COLLABORATORS G C R D. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(6): 585–596.
- [17] GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015 [J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(9): 691–706.
- [18] BARNES P J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 16–27.
- [19] HIGHAM A, QUINN A M, CANÇADO J E D, et al. The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 49.
- [20] 梅晓峰, 赵鹏, 卢瑞龙, 等. 慢性阻塞性肺疾病小鼠模型制备方法的比较研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(1): 178–185.
- MEI X F, ZHAO P, LU R L, et al. Comparative study on establishment of a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(1): 178–185.
- [21] TANTUCCI C, MODINA D. Lung function decline in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2012, 7: 95–99.
- [22] YUM H K, KIM H R, CHANG Y S, et al. Safety and effectiveness of indacaterol in chronic obstructive pulmonary disease patients in South Korea [J]. *Tuberc Respir Dis*, 2017, 80(1): 52–59.
- [23] HAMELMANN E, SCHWARZE J, TAKEDA K, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic

- mice using barometric plethysmography [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(3): 766–775.
- [24] BRIGHTLING C, GREENING N. Airway inflammation in COPD: progress to precision medicine [J]. Eur Respir J, 2019, 54(2): 1900651.
- [25] WANG Y, XU J, MENG Y, et al. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 3341–3348.
- [26] HINZ B, PHAN S H, THANNICKAL V J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling [J]. Am J Pathol, 2012, 180(4): 1340–1355.
- [27] MAKINDE T, MURPHY R F, AGRAWAL D K. The regulatory role of TGF- β in airway remodeling in asthma [J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(5): 348–356.
- [28] 李亚, 王元元, 李建生, 等. 调补肺肾法对 COPD 大鼠肺组织胶原和基质金属蛋白酶的影响及远后效应 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(9): 615–619.
- LI Y, WANG Y Y, LI J S, et al. Influence and long-term effect of therapy of regulating and supplementing lung and kidney on collagen and matrix metalloproteinase in lung tissue in COPD rats [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(9): 615–619.
- [29] KARVONEN H M, LEHTONEN S T, HARJU T, et al. Myofibroblast expression in airways and alveoli is affected by smoking and COPD [J]. Respir Res, 2013, 14(1): 84.
- [30] 崔世超, 于文成, 刘嫻嫻, 等. 气道平滑肌细胞 TGF- β_1 表达与 COPD 气道重塑关系 [J]. 青岛大学医学院学报, 2012, 48(1): 57–58, 61.
- CUI S C, YU W C, LIU X X, et al. The relationship between TGF- β_1 expression in airway smooth muscle and airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Acad Med Qingdao Univ, 2012, 48(1): 57–58, 61.
- [31] 吴纪珍, 马利军, 李素云, 等. 慢性阻塞性肺疾病发作期与缓解期体内胶原、细胞因子变化及临床意义 [J]. 中国实用内科杂志, 2005, 25(8): 703–704.
- WU J Z, MA L J, LI S Y, et al. Changes and clinical significance of collagen and cytokine during COPD episode and remission episode [J]. Chin J Pract Intern Med, 2005, 25(8): 703–704.
- [32] ROSCIOLI E, JERSMANN H P, LESTER S, et al. Zinc deficiency as a codeterminant for airway epithelial barrier dysfunction in an *ex vivo* model of COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12: 3503–3510.
- [33] TSUKITA S, TANAKA H, TAMURA A. The claudins: from tight junctions to biological systems [J]. Trends Biochem Sci, 2019, 44(2): 141–152.
- [34] WEI Y, LIU X, JIANG Y, et al. Maintenance of airway epithelial barrier integrity via the inhibition of AHR/EGFR activation ameliorates chronic obstructive pulmonary disease using effective-component combination [J]. Phytomedicine, 2023, 118: 154980.
- [35] REZAEI F, GEORAS S N. Breaking barriers. New insights into airway epithelial barrier function in health and disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 50(5): 857–869.
- [36] AGHAPOUR M, RAEE P, MOGHADDAM S J, et al. Airway epithelial barrier dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: role of cigarette smoke exposure [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 58(2): 157–169.
- [37] HAN L, LUO H, HUANG W, et al. Modulation of the EMT/MET process by E-cadherin in airway epithelia stress injury [J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 669.
- [38] ALBANO G D, MONTALBANO A M, GAGLIARDO R, et al. Autophagy/mitophagy in airway diseases: impact of oxidative stress on epithelial cells [J]. Biomolecules, 2023, 13(8): 1217.
- [39] VISHNUPRIYA S, PRIYA DHARSHINI L C, SAKTHIVEL K M, et al. Autophagy markers as mediators of lung injury-implication for therapeutic intervention [J]. Life Sci, 2020, 260: 118308.
- [40] FUJITA Y, ARAYA J, ITO S, et al. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4: 28388.
- [41] WULLSCHLEGER S, LOEWITZ R, HALL M N. TOR signaling in growth and metabolism [J]. Cell, 2006, 124(3): 471–484.
- [42] KIM Y C, GUAN K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation [J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 25–32.
- [43] HAY N, SONENBERG N. Upstream and downstream of mTOR [J]. Genes Dev, 2004, 18(16): 1926–1945.

[收稿日期] 2024-05-17

黄帅, 马秋婷, 洪滔, 等. 乳腺癌荷瘤裸鼠模型证候属性和姜制江香薷多糖的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 656-664.

HUANG S, MA Q T, HONG T, et al. Impact of ginger-processed Jiangxiangru polysaccharides on establishment of a breast cancer tumor-bearing nude mice model and its pathological characteristics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 656-664.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.004

乳腺癌荷瘤裸鼠模型证候属性和姜制江香薷多糖的影响

黄帅^{1#}, 马秋婷^{1#}, 洪滔², 钟祥铭¹, 张文凯¹, 黄云^{1*}, 刘志勇^{1,3*}

(1. 江西中医药大学实验动物科技中心, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学临床医学院, 南昌 330004; 3. 南昌市实验动物病理重点实验室, 南昌 330004)

【摘要】 目的 观察乳腺癌荷瘤裸鼠病症结合特点及姜制江香薷多糖对其中医证候的改善作用。**方法** 取 38 只实验裸鼠进行造模然后分成 6 组, 设定为正常组、模型组、阳性组、姜制江香薷多糖低、中、高剂量组。正常组不接种肿瘤, 正常组和模型组给予生理盐水灌胃; 阳性组给予塞来昔布溶液灌胃; 姜制江香薷多糖低、中、高剂量组给予同剂量不同浓度姜制江香薷多糖溶液灌胃。连续给药 4 周, 记录裸鼠体质量和肿瘤大小变化。实验结束后观察裸鼠的病症特点, 通过采集各组裸鼠舌、尾、爪照片, 分析记录裸鼠舌、尾、爪的 RGB 值依据计量化辨证的方法计算裸鼠的血虚程度、阴虚程度、肿瘤痰瘀邪盛程度, 剥离肿瘤, 称重, 计算肿瘤体积和抑瘤率, 探究姜制江香薷多糖对乳腺癌荷瘤裸鼠中医证候的改善作用。**结果** 乳腺癌荷瘤裸鼠存在血虚、阴虚和痰瘀邪盛表现, 姜制江香薷多糖给药组可以明显减少肿瘤的大小, 姜制江香薷多糖能够抑制肿瘤生长, 对乳腺癌荷瘤裸鼠血虚程度、阴虚程度、肿瘤痰瘀邪盛体质有改善效果, 且姜制江香薷多糖高剂量组最佳。**结论** 姜制江香薷多糖对乳腺癌荷瘤裸鼠的血虚、阴虚、肿瘤痰瘀邪盛体质有改善作用, 且高剂量组效果最佳。

【关键词】 姜制江香薷多糖; 乳腺癌; 病症结合模型; 中医证候

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0656-09

Impact of ginger-processed Jiangxiangru polysaccharides on establishment of a breast cancer tumor-bearing nude mice model and its pathological characteristics

HUANG Shuai^{1#}, MA Qiuting^{1#}, HONG Tao², ZHONG Xiangming¹,
ZHANG Wenkai¹, HUANG Yun^{1*}, LIU Zhiyong^{1,3*}

【基金项目】 江西省教育厅科技项目 (GJJ180661), 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划 (CXTD-22004)。

Funded by Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ180661), School-Level Science and Technology Innovation Team Development Programme of Jiangxi University of Chinese Medicine (CXTD-22004).

【作者简介】 黄帅, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理。Email: 921904738@qq.com;

马秋婷, 女, 硕士, 研究方向: 中药药理。Email: 928372868@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 黄云, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中药药理。Email: 530772404@qq.com;

刘志勇, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药药理。Email: liuzhiyong0791@163.com。

* 共同通信作者

(1. Science & Technology Center for Experimental Animal of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Clinical Medical College of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. Key Laboratory of Pathological Research on Experimental Animals of Nanchang, Nanchang 330004, China)

Corresponding author: HUANG Yun. E-mail: 530772404@qq.com; LIU Zhiyong. E-mail: liuzhiyong0791@163.com

【Abstract】 Objective To observe the characteristic symptoms in breast cancer-bearing mice and the beneficial effect of ginger-processed Jiangxiangru polysaccharides on traditional Chinese medical symptoms. **Methods** Thirty-eight mice were used for modeling and divided into normal, model, positive, and low-, medium-, and high-dose ginger-processed Jiangxiangru polysaccharide groups. Mice in the normal group were not inoculated with tumors and mice in the normal and model groups received physiological saline intragastrically. Mice in the positive group received celecoxib solution intragastrically, and mice in the low-, medium-, and high-dose groups received the same dose but different concentrations of ginger-processed Jiangxiangru polysaccharide solution intragastrically. Changes in body weight and tumor size were recorded after 4 weeks of continuous administration. Symptoms were observed at the end of the experiment. RGB values in photographs of the tongues, tails, and claws from mice in each group were analyzed and recorded. The degrees of blood deficiency, yin deficiency, and tumor phlegm stasis were calculated based on the method of quantitative dialectical diagnosis. The tumors were isolated and weighed, and the tumor volume and inhibition rate were calculated to determine the beneficial effect of ginger-processed Jiangxiangru polysaccharides on traditional Chinese medical symptoms. **Results** Mice in the breast cancer model group showed signs of blood deficiency, yin deficiency, and phlegm stasis. Tumor size was significantly reduced in mice in the ginger-processed Jiangxiangru polysaccharide groups. Ginger-processed Jiangxiangru polysaccharides inhibited tumor growth and improved blood deficiency, yin deficiency, and tumor phlegm stasis in breast cancer-bearing mice, with the best result in the high-dose group. **Conclusions** Ginger-processed Jiangxiangru polysaccharides can improve the symptoms of blood deficiency, yin deficiency, and tumor phlegm stasis in breast cancer-bearing mice, especially at high doses.

【Keywords】 ginger-processed Jiangxiangru; breast cancer; disease combination model; TCM symptoms

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

乳腺癌严重威胁女性健康,当前治疗乳腺癌的方式有很多种,但从患者依从性和治疗成效来看,目前的手段依然存在难以根治,患者痛苦大等缺点。传统中医药在治疗一些疑难杂症方面,拥有良好的表现,特别是中医药还能弥补传统手术切除、化学放疗等治疗方式所带来的副作用,能够很好的减轻患者治疗过程中的痛苦,提高患者生活质量,改善患者的症状,所以中医药抗肿瘤,在实际生活中具有一定的意义。

中医治疗讲究辨证论治的思路,通过望、闻、问、切的四诊方式判断总结出机体在疾病变化过程中所产生的表现,进而经过辩证判断相应的证候,通过研究其证候来诊断机体状态,进而判断治疗成效。张思静^[1]的研究指出乳腺癌的证素种类多而杂,以虚实夹杂和肝与气滞表现最为常见。董斐斐等^[2]的研究指出乳腺癌在治疗上应

当以中医辩证论治为核心,结合中医整体治疗观进行辨证论治。乳腺癌的中医证候存在正虚和邪实并存的特点,癌细胞因为其容易转移,因而具有难治疗的特性,但是中医药能够降低乳腺癌细胞对人体其他器官的侵袭,改善临床症状,总体提高疗效,具有很大的发展潜力^[3]。建立肿瘤模型是筛选抗癌药物的重要方法,但是以往一般只观察肿瘤的抑制率和相关信号通路的影响,对于药物对荷瘤鼠中医证候的改善,国内陈小野等^[4]做过研究,但总体关注不多。

江香薷为常见中药材,具有发汗解表、消肿利尿等功效^[5],现代药理学研究发现,江香薷具有很好的降血脂和抗炎作用^[6-7],经过姜汁浸泡炮制后的江香薷多糖抗炎作用更强^[8],同时植物多糖能够通过多种途径抗肿瘤,使肿瘤的生长得到延缓,因而,本实验选用姜制江香薷为原料^[9]

提取姜制江香薷多糖,首先观察乳腺癌荷瘤裸鼠的病症特点,并通过研究姜制江香薷多糖对乳腺癌荷瘤裸鼠的中医证候改善情况,探究其对乳腺癌荷瘤裸鼠的中医证候的影响,为中医特色的中医药抗肿瘤研究提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

38 只 SPF 级 BALB/c 雌性裸鼠,体质量 12 ~ 15 g,5 周龄,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供【SCXK(京)2019-0010】,裸鼠饲养在江西中医药大学实验动物科技中心的 SPF 级屏障系统内【SYXK(赣)2022-0002】,饲养环境温度为 20 ~ 23 ℃,湿度在 45% ~ 55%,光照为 12 h 光明和 12 h 黑暗交替循环。本实验中涉及的动物造模及相关操作程序均得到江西中医药大学伦理委员会审核批准(JZLLSC2023755),实验设计及动物使用遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

人 MCF-7 乳腺癌细胞采购自中国科学院细胞资源中心库(批号:TCH-C247),在液氮中储藏备用。

1.1.3 主要试剂与仪器

江香薷饮片(江西江中中药饮片有限公司,批号:200723);生姜(江西九山生姜,批号:205021);RPMI 1640 培养基(北京索莱宝科技有限公司,批号:31800);青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1400);95%乙醇(西陇化工股份有限公司,批号:64-17-5);氯仿(成都市科隆化学品有限公司,批号:67-66-3);硫酸(成都市科隆化学品有限公司,批号:7664-93-9);正丁醇(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C13080161);无水葡萄糖(北京索莱宝科技有限公司,批号:SG8510);胎牛血清(美国 Zeta Life,批号:S11213202G21);PBS(美国 Zeta Life,批号:S5120420202)。

个人笔记本电脑(型号:机械师 F117-7);电子天平(JH03K2,北京京衡伟业科技有限公司,最小称量 0.1 g);华为手机(深圳华为公司,麦芒 9);量尺(普通市售,精度 1 mm);Image J 图像分析软件(National Institutes of Health,NIH 研发,软

件版本:v1.8.0.345);SPSS Statistics IBM 研发,软件版本:20.0。

1.2 方法

1.2.1 造模方法

人 MCF-7 乳腺癌细胞按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度培养在 RPMI1640 培养基中,该培养体系含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素,培养于恒温细胞培养箱中,培养箱温湿度条件为:37 ℃、5% CO_2 、100% 湿度,按时观察细胞生长情况,待细胞长满培养瓶的底面 80% ~ 90% 时,消化液(含 0.04% EDTA 和 0.25% 胰酶)进行消化并传代^[10]。本实验取上述培养条件下对数生长期的 MCF-7 细胞,在细胞生长到 80% 时候,将细胞收集起来,用 PBS 调整细胞浓度至 $4 \times 10^6/\text{mL}$,裸鼠右侧腋窝皮下注射 0.2 mL,制备荷瘤乳腺癌模型。当可触及直径 2 ~ 3 mm 的皮下肿瘤时,提示肿瘤模型成功建立。

1.2.2 姜制江香薷多糖的提取

制备生姜汁:先取生姜洗净泥沙,待水分稍干后切片,干燥处理并称重。后加入 4 倍量的水煎煮 3 次,每次煎煮 30 min。煎煮完毕后,合并滤液,减压浓缩至生药质量浓度为 1 g/mL,即可得到生姜汁。

在六号自封袋中加入 40 g 江香薷饮片并加入等体积的生姜汁放置阴凉处闷润 6 h,然后炒制 8 min。江香薷是全草类药材,遇到液体后会很快吸收,所以倒入生姜汁后快速搅拌,使其充分接触。用超声波辅助提取多糖。在超声功率 80 W、料液比 1:20 的条件下,超声处理 10 min,随后进行热水浸提。浸提温度为 90 ℃,浸提时间为 1 h。浸提完成后,抽滤得滤液,减压浓缩至原体积的 1/4。用 Sevage 试剂(氯仿:正丁醇 = 4:1)除蛋白 3 次。除蛋白后的粗多糖溶液置于 4 ℃ 冰箱中,加入 95% 乙醇沉淀过夜。沉淀物以 4800 r/min 离心 10 min,收集多糖沉淀,最后进行冷冻干燥,得到姜制江香薷多糖。

1.2.3 动物分组

裸鼠检疫 5 d,接种,成瘤后获得 36 只荷瘤裸鼠,随机分为 6 组:正常组、模型组、阳性组、姜制江香薷多糖低、中、高剂量组,每组各 6 只。

1.2.4 姜制江香薷多糖对乳腺癌荷瘤裸鼠的影响

在开始给药后,每 2 d 对荷瘤裸鼠体质量、肿

瘤的长径和短径进行一次测量,并且对测量数据进行记录,在最后一次给药后处死荷瘤裸鼠。将肿瘤进行剥离,称重,并且计算肿瘤体积,并计算抑制率。瘤体积 = (长径 × 短径²) × 0.5

1.2.5 乳腺癌荷瘤裸鼠中医证型特点与姜制江香薷多糖对其中医证候的影响

在最后一次给药后,在相同的光照和位置下对荷瘤裸鼠的左后爪、尾巴中后段、舌面进行拍照并且储存照片。将照片导入电脑,使用 Image J V1.8.0.345 图像分析软件,对照片做白平衡处理并使用工具框定出荷瘤裸鼠爪、尾巴、舌头的范围,采集其 RGB 模式下红色 (red, R), 绿色 (green, G), 蓝色 (blue, B) 的分量值。

依据潘志强等^[11]的计量化辨证的方法计算荷瘤裸鼠的血虚程度,阴虚程度,肿瘤痰瘀邪盛程度。公式如下: $r = R / (R + G + B)$; 血虚程度 = (舌 r 值/正常组均数) × 0.5 + (爪 r 值/正常组均数) × 0.3 (~ 0.4) + (尾 r 值/正常组均数) × 0.2 (~ 0.1); 阴虚程度 = 各动物体质量/正常组均数; 肿瘤痰瘀邪盛 = 各动物瘤重/所有动物瘤重均数。

评价标准:综合考虑荷瘤裸鼠个体大小设定辨证权重,血虚程度的辨证标准:与正常组比较,

> 1.1 为血充盈, < 0.95 为血虚, < 0.9 为血虚重, < 0.85 为血亏; 阴虚程度辨证标准:与正常组相比,数值 > 1.2 判为形丰,数值 < 0.85 判为阴虚,数值 < 0.7 判为阴亏, < 0.6 为液脱; 肿瘤痰瘀邪盛程度的辨证标准:与正常组比较,数值 > 1.5 的为邪毒甚,数值 > 2.0 判为邪毒壅盛,数值 < 0.75 的为邪较弱,数值为 0.5 的判为邪弱。

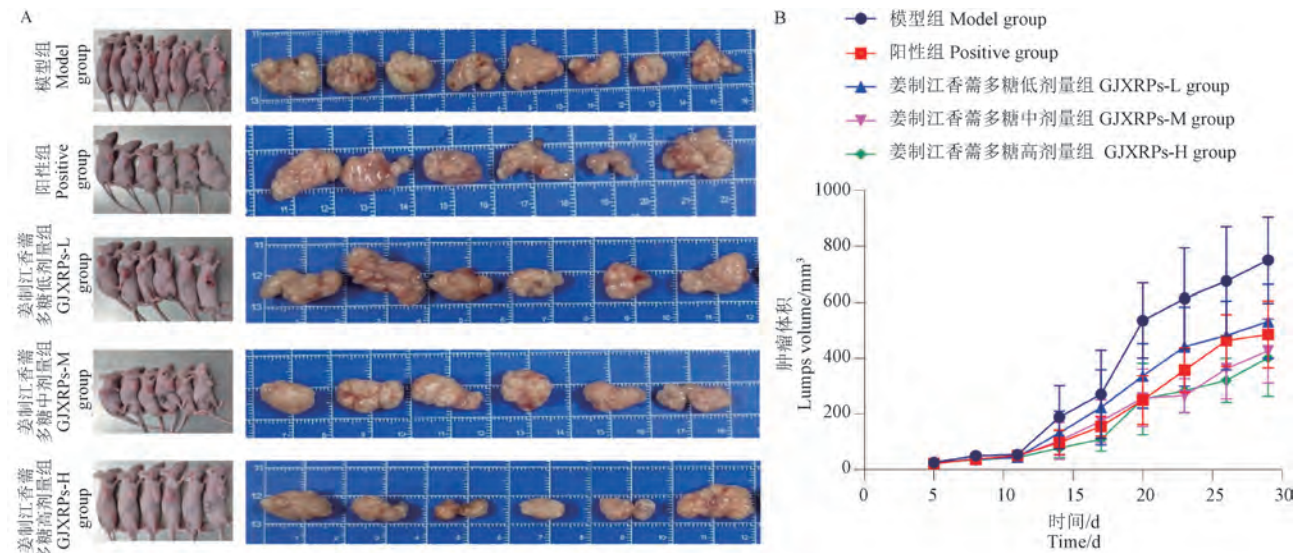
1.3 统计学分析

实验结果分析采用 SPSS 20.0 统计学软件,实验数据均表示为平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。多组数据若全部满足正态分布而且方差齐,采用单因素方差分析法比较组间的差异,组间两两比较则选择用 LSD 法进行多重比较;如果没有完全满足,那么就选择采用非参数检验。两组数据的比较采取独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。最后采用 Graph Prism 8.0.1 做图。

2 结果

2.1 姜制江香薷多糖对乳腺癌荷瘤裸鼠肿瘤大小的影响

结果如图 1 所示,实验开始后,除正常组外,各组荷瘤裸鼠肿瘤体积均逐渐增大,第 1 周肿瘤体积增长缓慢,之后逐渐增大。其中模型组增长



注:A:各组荷瘤裸鼠肿瘤大小;B:姜制江香薷多糖对荷瘤裸鼠肿瘤的影响。

图 1 各组荷瘤裸鼠肿瘤变化

Note. A. Tumor size of tumor-bearing nude mice in each group. B. Effect of ginger-processed Jiangxiang on tumors in tumor-bearing nude mice.

Figure 1 Tumor changes in various groups of tumor-bearing nude mice

最为迅速,阳性组肿瘤体积增长较为缓慢,姜制江香薷多糖高剂量组肿瘤体积增长最为缓慢。实验结束时模型组、阳性组、姜制江香薷多糖低、中、高剂量组的肿瘤体积分别为: $(750.26 \pm 154.71) \text{ mm}^3$ 、 $(485.20 \pm 120.26) \text{ mm}^3$ 、 $(531.46 \pm 132.74) \text{ mm}^3$ 、 $(426.61 \pm 115.30) \text{ mm}^3$ 、 $(400.97 \pm 138.38) \text{ mm}^3$,与模型组相比,阳性组和姜制江香薷多糖低、中、高剂量组肿瘤体积降低,见图 1A。各组肿瘤体积增长曲线如图 1B。

2.2 姜制江香薷多糖对乳腺癌荷瘤裸鼠体质量、瘤质量及抑瘤率的影响

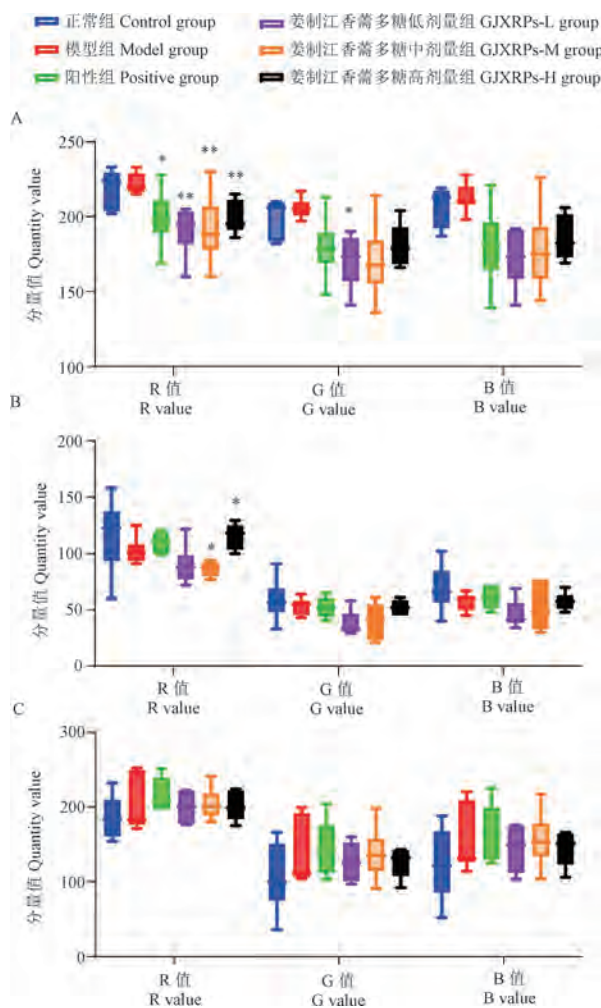
结果如表 1 所示,与正常组比较,阳性组和姜制江香薷多糖低、中、高剂量组荷瘤裸鼠体质量增加,但无显著性差异;与模型组比较,阳性组和姜制江香薷中、高剂量组荷瘤裸鼠瘤质量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。阳性组和姜制江香薷多糖低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 39.37%、21.57%、36.49%、55.15%。

2.3 乳腺癌荷瘤裸鼠舌爪尾 RGB 值和姜制江香薷多糖的影响

如图 2 所示,与模型组相比,姜制江香薷多糖低、中、高 3 个剂量组的尾巴 R 值具有显著性差异($P < 0.01$),与模型组相比,姜制江香薷低剂量组荷瘤裸鼠尾巴的 G 值具有显著性差异($P < 0.05$),与模型组相比,姜制江香薷多糖中、高剂量组荷瘤裸鼠的舌头 R 值具有显著性差异($P < 0.05$),从整体来看模型组和其他给药组与正常组相比,荷瘤裸鼠的舌 RGB 值显著低于正常组;正常组与其他给药组和模型组相比下,正常组的爪 RGB 值低于其他给药组;正常组与其他给药组模型组相比下,正常组尾巴的 RGB 值明显高于其他组。由此表明,姜制江香薷多糖对荷瘤裸鼠舌、爪、尾的颜色都有所改变。

2.4 乳腺癌荷瘤裸鼠舌尾爪颜色比较和姜制江香薷多糖的影响

从舌面来看,与正常组相比,其他组荷瘤裸鼠舌面颜色都偏暗,但随着给药组剂量的增加,舌面颜色逐渐趋近于正常组;从爪来看,正常组爪颜色偏红润,其他组的荷瘤裸鼠爪颜色相对苍白,但中、高剂量组的爪颜色明显比其他给药组要红润;尾巴上来看各组无明显差异。提示姜制江香薷多糖对荷瘤裸鼠的舌、爪颜色有明显改善



注:A:尾 RGB 值比较图;B:舌 RGB 值比较图;C:爪 RGB 值比较图。

图 2 各组荷瘤裸鼠尾、舌和爪 RGB 值比较

Note. A. Comparison of tail RGB values chart. B. Comparison of tongue RGB value chart. C. Comparison of paw RGB value chart.

Figure 2 Comparison of RGB values of tail, tongue and paw in various groups of hormonal tumor-bearing nude mice

效果。如图 3 所示。

2.5 荷瘤裸鼠证型特点和姜制江香薷对乳腺癌荷瘤裸鼠证型的影响

如表 2 所示,从血虚程度看,模型组荷瘤裸鼠血虚程度 < 0.95 ,提示荷瘤裸鼠有血虚证型,在进行给药后,荷瘤裸鼠的血虚程度值明显提升至与正常组相接近的水平,证明姜制江香薷多糖对荷瘤裸鼠的血虚证型有明显改善;从阴虚程度值判断,模型组荷瘤裸鼠阴虚程度为 1.09,其他组数值均也大于正常组,且随给药剂量的增大,其数值有下降趋势,但可见血虚和阴虚证表现来看

表 1 姜制江香薷多糖对荷瘤裸鼠体质量、瘤质量及抑瘤率的影响

Table 1 Influence of ginger-processed Jiangxiangru on body mass, tumor mass and tumor inhibition rate in tumor-bearing nude mice

组别 Groups	剂量/(mg/kg) Dosage/(mg/kg)	体质量/g Body mass/g	瘤质量/g Tumor mass/g	抑瘤率/% Tumor inhibition rate/%
正常组 Control group	—	18.28 ± 0.85	—	—
模型组 Model group	—	19.93 ± 1.55	0.83 ± 0.16	—
阳性组 Positive group	200	19.96 ± 1.28	0.50 ± 0.09*	39.37
姜制江香薷多糖 低剂量组 GJXRPs-L group	200	21.02 ± 1.25	0.65 ± 0.11	21.57
姜制江香薷多糖 中剂量组 GJXRPs-M group	400	19.58 ± 0.94	0.53 ± 0.12 [#]	36.49
姜制江香薷多糖 高剂量组 GJXRPs-H group	600	19.37 ± 0.52	0.37 ± 0.13 ^{##}	55.15

注：与正常组相比，[#]*P* < 0.05，^{##}*P* < 0.01；与模型组相比，**P* < 0.05，***P* < 0.01。（下图/表同）
Note. Compared with the control group, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01. Compared with the model group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01. (The same in the following figures and tables)



注 A:各组荷瘤裸鼠舌;B:各组荷瘤裸鼠爪;C:各组荷瘤裸鼠尾。
图 3 各组荷瘤裸鼠舌、爪和尾的比较

Note. A. Tongue of tumor-bearing nude mice in each group. B. Paw of tumor-bearing nude mice in each group. C. Tail of tumor-bearing nude mice in each group.
Figure 3 Comparison of tongue, paw and tail in various groups of tumor-bearing nude mice

表 2 荷瘤裸鼠舌、尾和爪 r 值和中医证候评价积分

Table 2 r values of tumor-bearing nude mice tongue、tail and paw and the scoring of traditional Chinese medicine syndrome evaluation

组别 Groups	舌头 r 值 r values of tongue	爪 r 值 r values of paw	尾 r 值 r values of tail	瘤质量 Tumor mass	体质量 Body mass	血虚程度 Blood deficiency	阴虚程度 Yin deficiency
正常组 Control group	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.09	0.35 ± 0.00	—	18.28 ± 0.85	1.00	1.00
模型组 Model group	0.41 ± 0.05	0.48 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.83 ± 0.16	19.93 ± 1.55	0.94	1.09
阳性组 Positive group	0.51 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.36 ± 0.01	0.50 ± 0.09*	19.96 ± 1.28	1.01	1.09
姜制江香薷多糖 低剂量组 GJXRPs-L group	0.52 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.65 ± 0.11	21.02 ± 1.25	1.03	1.15
姜制江香薷多糖 中剂量组 GJXRPs-M group	0.49 ± 0.09	0.42 ± 0.04	0.36 ± 0.01	0.53 ± 0.12#	19.58 ± 0.94	0.98	1.07
姜制江香薷多糖 高剂量组 GJXRPs-H group	0.48 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.13##	19.37 ± 0.52	0.98	1.06

看,由于本模型是接种模型,这两个证型模型组和正常组差异不大。经过给药后,各组肿瘤瘀瘀邪盛程度值有明显下降,且以姜制江香薷中、高剂量组最佳。

3 讨论

模拟中医的望、闻、问、切,本研究使用拍摄乳腺癌荷瘤裸鼠的舌、爪、尾的图片,进而用图像分析软件进行分析打分,通过颜色的深浅判断动物血虚情况,从裸鼠体形胖瘦、体质量大小可以反映阴虚程度,肿瘤的大小和体积可以反映荷瘤裸鼠肿瘤瘀瘀邪盛程度,对乳腺癌模型组荷瘤裸鼠进行打分,发现乳腺癌模型组荷瘤裸鼠存在血虚、阴虚和瘀瘀邪盛表现,姜制江香薷多糖给药组可以明显减少肿瘤的大小,姜制江香薷多糖能够抑制肿瘤生长,对乳腺癌荷瘤裸鼠血虚程度、阴虚程度、肿瘤瘀瘀邪盛体质有改善效果,且姜制江香薷多糖高剂量组最佳。

在现代生物医学研究中,人类疾病研究的动物模型是一个极为重要的实验方法和手段,但是中医药的实验研究中,没有符合中医药特点的疾病动物模型,而主要采用西医思维建立的病理模型,因而受一定“外因论”“局部定位论”的束缚,造成了在评价中医药方法治疗疾病的观察方法和指标,停留在“病”的概念上,往往会导致临床

疗效与实验结果间出现不一致,给阐述中药治疗疾病原理带来一定的困难^[12]。中医证候动物模型的研究,产生了各类“证”的动物模型^[4,13-15],其中以肾虚、脾虚、血瘀为特色的中医动物模型体系的陆续建立,为中医证候动物模型的丰富和发展奠定了基础。但是,仅有中医的证候模型远远不能满足现代中医药的发展需求,病症结合模型发展起来,这种模型是在临床诊疗中既重视对西医疾病的诊断,又注重对中医证候进行观察的一种新的动物模型研究范式,因而病症结合动物模型既有西医疾病的特征特点,又有中医证候表现的特征,适应了中医临床治疗辨病辨证相结合的实际,建立病症结合动物模型逐渐成为中医药研究所用实验动物模型发展的新方向^[16-17]。中医四诊是中医临床诊病的重要方法,中医证候是对疾病发展过程中特定的病理表现的观察,是疾病的发生位置和疾病的性状在舌、脉、形、神、色等的直观表现内容的综合判断,然而动物的四诊等由于实验动物的特殊性,难以定性和定量判断^[18],但通过图像和软件分析的方式可以对荷瘤裸鼠进行评价诊断。对于肿瘤模型的病症结合一般从裸鼠体形胖瘦、体质量大小可以反映阴虚程度,肿瘤的大小和体积可以反映荷瘤裸鼠肿瘤瘀瘀邪盛程度,荷瘤裸鼠舌、尾、爪,颜色的深浅色泽可以反映荷瘤裸鼠血虚程度^[19],结合起来就

可以对动物进行类似中医临床的辨证,荷瘤小鼠虚证、兼证的类型与人类肿瘤患者很相似,且存在个体化差异,因而能够进行辨证论治,可用于个体的比较和评价^[20],因此本研究在实验动物模型的基础上进行了初步的探索。

辨证论治是中医学的基本方法和基础,本研究表明,RGB 值,肿瘤大小和舌、尾、爪的外观色泽结合中医四诊可以在一定程度上帮助建立实验动物的定量分析,有助于评价判断裸鼠的中医证候指标。建立和持续完善中医疾病证候动物模型的研究和评价体系,对中医药学的发展和精准医疗研究无疑具有重大意义。现代医学研究中进行动物实验的主要目的是为了解决和避免人类防病治病的伦理问题,模拟中医病症结合动物模型目的也是一样,现代中医病症动物模型的建立和评价体系的完成,是对之前动物实验的发展和提升,有利于应用动物模型研究中药复方配伍规律,有利于对方剂配伍规律的物质基础研究的推进,进一步减少中医临床的随意性,使得中医临床辨病施治和辨证施治有证可循,有标准可依,这将促进传统中医理论与现代医学科技结合,可为中医方药和临床研究提供广阔的前景^[21-22],结合实验结果,姜制江香薷多糖是根据中医理论,采用生姜汁去炮制江香薷药材后可以增加江香薷原药材的抗炎效果^[8],本实验发现姜制江香薷能通过改善荷瘤裸鼠的舌、爪、尾的颜色,从而能够改善乳腺癌荷瘤裸鼠血虚程度,通过改善荷瘤裸鼠的体质量降低瘤质量,而改善肿瘤的阴虚程度,虽然姜制江香薷各剂量没有达到显著性差异,但有改善的趋势,通过和肿瘤瘀瘀邪盛程度,且效果具有剂量效应关系,低剂量达到显著性差异($P < 0.05$),中高剂量达到极显著性差异($P < 0.01$),值得进一步探索。

参 考 文 献(References)

- [1] 张思静. 乳腺癌中医证素特点及其雌激素代谢组学研究 [D]. 福州: 福建中医药大学; 2023.
ZHANG S J. Study on the characteristics of TCM syndrome elements of breast cancer and its estrogen metabonomics [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [2] 董斐斐, 任秦有. 乳腺癌中医证候与治法研究 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(1): 22-23, 93.
DONG F F, REN Q Y. Study on the evidence and treatment of breast cancer in Chinese medicine [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacol, 2018, 27(1): 22-23, 93.
- [3] 李孟, 梁则徐, 李冠男, 等. 中医中药治疗乳腺癌的研究进展 [J]. 中医药学报, 2023, 51(2): 103-108.
LI M, LIANG Z X, LI G N, et al. Research progress in treatment of breast cancer with TCM [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(2): 103-108.
- [4] 陈小野, 邹世洁, 张晓娟, 等. 2 种小鼠乳腺癌模型的证候属性研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(17): 2244-2245, 2280.
CHEN X Y, ZOU S J, ZHANG X J, et al. Syndrome property study of two types of breast cancer mouse models [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2005, 14(17): 2244-2245, 2280.
- [5] 张亚红, 刘红宁, 朱卫丰. 江香薷研究进展 [J]. 中药材, 2002, 25(2): 146-147.
ZHANG Y H, LIU H N, ZHU W F. Research progress of elsholtzia serrata [J]. J Chin Med Mater, 2002, 25(2): 146-147.
- [6] WANG X, CHENG K, LIU Z, et al. Bioactive constituents of *Mosla chinensis*-cv. Jiangxiangru ameliorate inflammation through MAPK signaling pathways and modify intestinal microbiota in DSS-induced colitis mice [J]. Phytomedicine, 2021, 93: 153804.
- [7] 陈雨然, 刘莉, 李龙雪, 等. 江香薷水提液对高脂血症大鼠胃肠生理生化及免疫功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 84-90.
CHEN Y R, LIU L, LI L X, et al. Effects of aqueous extract of *Mosla chinensis* Maxim cv. Jiangxiangru on serum biochemical and physiological indexes and immune function in rats with hyperlipidemia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 84-90.
- [8] 马秋婷, 徐磊, 朱钰晨, 等. 江香薷炮制前后多糖含量及消炎、止血和抗氧化活性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 79-88.
MA Q T, XU L, ZHU Y C, et al. Effects of polysaccharide content and anti-inflammatory, hemostatic, and antioxidant activities before and after preparation of *Mosla chinensis*-Jiangxiangru [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 79-88.
- [9] 张依欣. 姜汁制香薷特色炮制机理研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学; 2019.
ZHANG Y X. Study on the processing mechanism moslae herba produced by ginger juice [D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine; 2019.
- [10] 郭俊, 陈毅, 王贵, 等. 三种抗肿瘤药物对 MCF-7 乳腺癌干细胞作用的初步研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(3): 30-37.
WU J, CHEN Y, WANG G, et al. Preliminary study on the

- effect of three kinds of antineoplastic on MCF-7 breast cancer stem cells [J]. *Res Pract Chin Med*, 2022, 36(3): 30-37.
- [11] 潘志强, 方肇勤. 论方肇勤对中医辨证论治学术的探索 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(4): 541-544.
PAN Z Q, FANG Z Q. Essence academic thoughts of TCM syndrome differentiation and treatment by professor FANG Zhao-Qin [J]. *J Basic Chin Med*, 2021, 27(4): 541-544.
- [12] 何朝, 张唯佳, 张彤, 等. 基于病证结合特点构建寒热错杂型溃疡性结肠炎大鼠模型的实验研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(8): 88-96.
HE C, ZHANG W J, ZHANG T, et al. Experimental study on establishment of a rat model of ulcerative colitis with cold-heat complex syndrome based on characteristics of combination of disease and syndromes [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2024, 58(8): 88-96.
- [13] 贺嘉, 刘福宇, 苗明三, 等. 基于中西医临床病症特点的肠易激综合征动物模型评价 [J]. *世界中医药*, 2024, 19(13): 1988-1992.
HE J, LIU F Y, MIAO M S, et al. Evaluation of animal models of irritable bowel syndrome based on the clinical evidence of traditional Chinese and western medicine [J]. *World Chin Med*, 2024, 19(13): 1988-1992.
- [14] 惠香香, 白明, 张亚楠, 等. 基于中西医类风湿关节炎临床病症结合特点的动物模型分析 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(3): 92-96.
HUI X X, BAI M, ZHANG Y N, et al. Animal model analysis of rheumatoid arthritis based on clinical symptoms intraditional Chinese and western medicine [J]. *Chin Med Pharm Clin*, 2023, 39(3): 92-96.
- [15] 陈小野, 邹世洁. 大鼠 CAG 证病结合模型的造模方法和思路 [J]. *实验动物科学与管理*, 2002, 19(3): 35-37, 41.
CHEN X Y, ZOU S J. The method and the design about CAG model combining syndrome with disease in rats [J]. *Lab Anim Sci Adm*, 2002, 19(3): 35-37, 41.
- [16] 李琳, 蒋亚超, 蒋佳岑, 等. 基于“利水消肿”功效考察麻黄水煎液对肾性水肿病症结合模型的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(4): 130-133.
LI L, JIANG Y C, JIANG J C, et al. Effect of ephedrae herba on the combined model of renal edema disease based on “lishuixiaozhong” [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2019, 35(4): 130-133.
- [17] 张树明, 白海玉, 许庆瑞, 等. 心肌缺血的大鼠病症结合模型研究 [J]. *黑龙江中医药*, 2012, 41(3): 45-46.
ZHANG S M, BAI H Y, XU Q R, et al. Study on the model of syndrome combination in rats with myocardial ischemia [J]. *Heilongjiang J Tradit Chin Med*, 2012, 41(3): 45-46.
- [18] 王婷, 刘志勇, 罗黎明, 等. 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(12): 37-48.
WANG T, LIU Z Y, LUO L M, et al. Effects of Angelica sinensis, ginger and mutton soup on Chinese medicine symptoms in spleen and kidney yang deficiency type IBS-D rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(12): 37-48.
- [19] 肖芸, 方肇勤, 袁亚丽. H22 荷瘤小鼠早期阶段的辨证论治尝试 [J]. *江苏中医药*, 2009, 41(6): 73-75.
XIAO Y, FANG Z Q, YUAN Y L. An attempt to treat H22 tumor-bearing mice in early stage based on syndrome differentiation [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2009, 41(6): 73-75.
- [20] 方肇勤, 潘志强, 卢文丽, 等. 大鼠/小鼠是证候研究的主要模式生物 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(5): 352-353.
FANG Z Q, PAN Z Q, LU W L, et al. Rats/mice are the main model organisms for syndrome research [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2009, 15(5): 352-353.
- [21] 徐珉, 董燕, 黄健玲, 等. 应用正交设计探讨肾虚胚胎着床障碍小鼠病症结合模型制作中药物的最佳配比 [J]. *新乡医学院学报*, 2008, 25(4): 328-332.
XU M, DONG Y, HUANG J L, et al. Study on the pharmaceutical optimal proportion in the mouse model of integrated disease and syndrome of embryo implantation dysfunction with kidney Asthenia by orthogonal design [J]. *J Xinxiang Med Coll*, 2008, 25(4): 328-332.
- [22] 王靖怡, 高嘉良, 王阶. 病证结合动物模型研究概述 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(7): 2160-2164.
WANG J Y, GAO J L, WANG J. Overview of animal model research in integration of disease and syndrome [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2020, 22(7): 2160-2164.

[收稿日期] 2024-08-24

田瑞渊,魏超,李勇. 肝硬化门静脉血栓大鼠模型建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 665-672.

TIAN R Y, WEI C, LI Y. Establishment and evaluation of portal vein thrombosis model in cirrhotic rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 665-672.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.005

肝硬化门静脉血栓大鼠模型建立与评价

田瑞渊¹, 魏超², 李勇^{3*}

(1. 山东大学齐鲁医院高新区医院消化科, 济南 250101; 2. 济宁医学院中西医结合学院, 山东 济宁 272067; 3. 山东中医药大学附属医院肝病科, 济南 250014)

【摘要】 目的 评价在肝硬化模型大鼠的基础上, 建立肝硬化门静脉血栓 (PVT) 模型的可行性。**方法** 将 50 只 10 ~ 12 周龄、体质量 300 ~ 350 g、雄性 SD 大鼠随机分为模型组和空白组, 模型组首先建立肝硬化模型, 在此基础上, 通过门静脉间断结扎联合钳夹方法建立门静脉血栓模型, 空白组仅开腹后行门静脉游离术。大鼠造模后 1 周行肝彩色多普勒超声检查确认门静脉血栓。而后模型组随机分为模型对照组和模型恢复组。模型对照组、空白组开腹后游离截取肝、门静脉待检, 模型恢复组继续饲养 2 周后截取肝、门静脉。各组肝、门静脉标本进行苏木素-伊红 (HE)、Masson 染色、门静脉弹力纤维 (EVG) 染色。**结果** 超声检查显示术后 1 周模型组门静脉内形成稳定血栓, 造模成功率 68%; 模型对照组与模型恢复组 HE 和 Masson 染色均发现肝组织假小叶、门静脉血栓, 中膜水肿增厚, 胶原纤维附着, EVG 染色显示门静脉血管内膜损伤; 空白组门静脉内未见血栓形成, 血管结构完整; 透射电镜肝硬化大鼠肝窦出现胶原纤维束, 肝细胞线粒体大小不一、呈多形性、灶性聚集。门静脉内皮脱落、凋亡、平滑肌细胞表型化迁移至原内皮处、内膜下纤维组织增生。至术后 3 周, 模型恢复组大鼠无一死亡且 PVT 稳定存在。**结论** 肝硬化时门静脉内皮脱落、内膜纤维化、平滑肌细胞表型化并向内膜迁移是肝硬化门静脉血栓形成的重要病理基础。在肝硬化基础上, 利用间断结扎联合钳夹法可成功建立稳定的大鼠肝硬化门静脉血栓模型, 其血管内皮损伤、内膜增厚和纤维化、血流速度减慢等病理改变, 与肝硬化 PVT 形成机制一致, 并且模型大鼠至少可生存 3 周以上, 为深化肝硬化门静脉血栓研究提供了建模方法及生存时间依据。

【关键词】 大鼠; 肝硬化门静脉血栓; 动物模型; 组织病理

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0665-08

Establishment and evaluation of portal vein thrombosis model in cirrhotic rats

TIAN Ruiyuan¹, WEI Chao², LI Yong^{3*}

(1. Qilu Gaoxin Hospital of Shandong University Gastroenterology Department, Jinan 250101, China;
2. Jining Medical University College of Integrative Chinese and Western Medicine, Jining 272067, China;
3. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine Department of Hepatology, Jinan 250014, China)

Corresponding author: LI Yong. E-mail: liy1958@163.com

【基金项目】 山东省中西医结合专病防治项目 (YXH2019ZXY003)。

Funded by the Shandong Provincial Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Special Disease Prevention Project (YXH2019ZXY003) .

【作者简介】 田瑞渊, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肝病。Email: castiel9527@foxmail.com

【通信作者】 李勇, 女, 博士, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中医肝胆病学。Email: liy1958@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of establishing a portal vein thrombosis (PVT) model in cirrhotic rats. **Methods** Fifty male SD rats aged 10 ~ 12 weeks and body mass about 300 ~ 350 g were divided randomly into a model group and a blank group. Cirrhosis was initially established in the model group. PVT was then established by intermittent portal vein ligation with clamping, and was confirmed by hepatic color Doppler ultrasonography 1 week after modeling. The model group was then divided randomly into a model control group and a model recovery group. Liver and portal vein tissues were extracted from the model control and blank groups after laparotomy, and from the model recovery group after continued feeding for 2 weeks. Liver and portal vein samples in each group were stained with hematoxylin eosin (HE) and Masson stain and portal vein samples were stained with Elastica van Gieson (EVG) stain. **Results** Ultrasound examination showed stable thrombus formation in the portal vein in the model group 1 week after surgery, with a modeling success rate of 68%. HE and Masson staining showed false lobules and PVT, media edema and thickening, and collagen fiber adhesion, and EVG staining showed portal vein intimal injury in the model and model recovery groups. In contrast, there was no PVT and the vascular structure was intact in the blank group. Transmission electron microscopy showed collagen fiber bundles in the hepatic sinuses of cirrhotic rats, and hepatocyte mitochondria were heterogeneous in size, with focal aggregation. Portal vein endothelium exfoliation, apoptosis, phenotypic migration of smooth muscle cells to the protoendothelium, and subintimal fibrous tissue proliferation were also detected. No rats in the model recovery group had died 3 weeks after surgery and PVT remained stable. **Conclusions** Shedding of the portal vein endothelium, intimal fibrosis, phenotypic smooth muscle cells and migration to the intima are important pathologic findings of PVT in cirrhosis. Intermittent ligation combined with clamping can be used to establish a stable model of PVT in rats with liver cirrhosis, and the pathological changes, including vascular endothelial injury, intima thickening and fibrosis, and slow blood flow, are consistent with the formation mechanism of PVT in liver cirrhosis. Model rats can survive for at least 3 weeks, thus providing a suitable model and survival time for further studies of PVT in liver cirrhosis.

【Keywords】 rat; cirrhosis portal vein thrombosis; animal model; histopathology
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

门静脉血栓 (portal vein thrombosis, PVT) 是由多种病因引发的门静脉主干及其分支血管阻塞性病变,可合并或不合并肠系膜静脉与脾静脉血栓。临床数据表明,肝硬化患者 PVT 发生率为 10% ~ 25%^[1-2]。相关研究显示,PVT 患病率与肝硬化严重程度呈正相关:代偿期肝硬化患者中占 10%, Child-Pugh B/C 级肝硬化患者升至 17%,而肝移植候选患者中可达 26%^[3]。另有研究证实,失代偿期肝硬化人群 PVT 患病率高达 40%^[4]。急性 PVT 可引发肠系膜缺血、肠坏死等严重并发症,慢性 PVT 则可能导致门静脉闭塞、海绵样变性,进而诱发或加剧门静脉高压,甚至可能引发急性肾损伤、消化道出血、顽固性腹水等临床事件,增加患者远期死亡风险及肝移植术后病死率。

但肝硬化 PVT 的发病机制至今尚未完全阐明,是新治疗方法与药物的研发现阶段无法突破的瓶颈。构建 PVT 动物模型可为深入探究其发病机制及发掘新型治疗靶点提供重要研究基础。

目前虽然有成功建立大鼠 PVT 动物模型的文献^[5-7],但均以健康大鼠建立 PVT,并鲜有对大鼠 PVT 模型的稳定性和生存期的报道,模型用于 PVT 深化研究的可行性尚未可知。因此,建立支持肝硬化 PVT 可行性研究的动物模型至关重要。

本课题组前期预实验已成功建立健康大鼠 PVT 模型,并证实大鼠 PVT 模型生存期与血栓稳定存在时间至少 30 d。在此基础上,研究人员进一步探索创建了大鼠肝硬化 PVT 模型。

本实验以 SD 大鼠为研究对象,首先建立肝硬化大鼠模型,以肝硬化大鼠,采用门静脉间断结扎减慢血流联合钳夹破坏血管内膜的方法建立肝硬化 PVT 大鼠模型。对大鼠肝、门静脉标本进行苏木素-伊红 (HE)、Masson、弹力纤维 (EVG) 染色以观察其病理特征;并对肝硬化大鼠肝及门静脉进行透射电镜扫描,以揭示肝硬化大鼠门静脉形成血栓的重要病理基础,为防治肝硬化门静脉血栓提供新的思路。实验证实,肝硬化 PVT 大鼠模型生存期与血栓稳定存在时间至少 3 周以

上,这为深化研究 PVT 形成机制、病理特点和药物干预提供了技术支撑和实验可行性证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,10 ~ 12 周龄,体重 300 ~ 350 g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司【SCXK(鲁)2022 0006】,大鼠饲养于齐鲁师范学院实验室动物房【SYXK(鲁)2022 0023】,动物房通风良好,在可控动物房内分笼饲养,饲养条件为温度(23 ± 2)℃、湿度(60 ± 10)%和压差(25 ± 2)Pa,自由饮食、水,标准 12 h 光照/12 h 黑暗节律,6:00 ~ 18:00 为光照条件。每天给予普通饲料喂养,大鼠自由饮食。所有实验操作均通过山东中医药大学附属医院伦理委员会审批(2021-99)。

1.1.2 主要试剂与仪器

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(山东恩众医疗科技有限公司,20240409001);Masson 三色染色液试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,BA4079A);EVG 染色液试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,BA4083A)。徕卡切片机(上海徕卡仪器有限公司,FM2235);动物彩色多普勒超声诊断系统(深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司,Vetus7-VET);恩众染色机(山东恩众医疗科技有限公司,EHZ-CTS-II);数字病理扫描仪(江丰生物,KF-PRO-005);透射电镜(日本 JEOL 公司,JEM-1200EX);透射电镜数字摄像头(德国 Osis 公司,MORADA-G2 型 CCD);自动组织脱水处理机(德国,TP1020);石蜡包埋机(德国,EG1150)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

大鼠适应性喂养 1 周后随机分为空白组和模型组,空白组 10 只,模型组 40 只。两组大鼠分别按以下操作步骤建立模型。

1.2.2 建立肝硬化模型

参照王奎淞等^[8]的大鼠肝硬化造模方法,并根据实验目的进行优化改进:适应性喂养 1 周,采用 CCl₄ 联合苯巴比妥钠、乙醇与甜味剂四因素综合法 8 周,制备肝硬化大鼠模型,模型制备分为两

期:诱导期和成模期。

(1)诱导期:饲料使用普通大鼠饲料。在诱导前以 0.35 g/L 苯巴比妥钠蒸馏水溶液为大鼠的唯一饮用水,时间为 1 周。

(2)成模期:首次皮下注射 0.5 mL/100 g 的 40% CCl₄ 中性菜籽油溶液,间隔 3 d,剂量改为 0.3 mL/100 g,每周 2 次,持续 4 周;以 10%乙醇蒸馏水溶液为其唯一饮用水。第 5 周开始,以 0.4 mL/100 g 标准皮下注射 50% CCl₄ 中性菜籽油溶液,每周 2 次,持续 3 周,以 15%乙醇蒸馏水溶液为其唯一饮用水。肝硬化门脉高压症大鼠模型时间共计 8 周。4 只大鼠在造模过程中死亡,成功 36 只。

1.2.3 肝硬化 PVT 模型的建立

(1)肝硬化大鼠随机分为肝硬化组 2 只,PVT 模型组 34 只。PVT 模型组:①术前禁食 12 h,备皮,大鼠以 3%戊巴比妥钠溶液(2 mL/kg)麻醉,取仰卧位,将大鼠固定于手术台上,常规碘伏消毒,乙醇脱碘;②于胸骨剑突下沿腹正中线作约 3 cm 纵行切口,逐层切开腹腔,暴露肝门区域,首先寻及肠系膜上静脉,沿其走行向上暴露门静脉;③钝性分离门静脉主干,仔细剥离周围结缔组织,分离门静脉;④结扎门静脉:取 2.5 cm 静脉注射头皮针软管与门静脉平行放置,以 4-0 号缝合线分别于门静脉远近两端穿过结扎门静脉,结扎远近两端(静脉和软管一起结扎),结扎的间距始终为 1.5 cm,结扎成功后,小肠充血,颜色变成深紫色,肠系膜静脉血停滞,每隔 5 min 将结扎线打开 1 次,恢复门静脉的血流,门静脉血流重新流动,小肠恢复为最初的颜色;⑤对门静脉实施钳夹处理时,于结扎后的 5 min 内,使用无齿镊按近端至远端顺序依次钳夹门静脉以破坏血管内膜,单次钳夹时长为 3 s,5 min 内累计完成 4 次钳夹操作。按上述步骤重复操作 4 次,以诱导 PVT 形成(见图 1)。继而于门静脉周围注射适量术尔泰溶液以预防组织黏连,腹腔内注射 2 mL 3%头孢他啶溶液以预防术后感染。肠管按解剖位置复位,连续缝针关闭腹腔,单结缝合皮肤。空白组仅做游离门静脉操作,未对门静脉进行结扎和钳夹。5 只大鼠在造模过程及术后 1 周内死亡,剩余 29 只大鼠在造模后 1 h 左右逐渐恢复意识。造模后 24 h,29 只大鼠均无异常情况。



图 1 门静脉血栓造模手术

Figure 1 Portal vein thrombosis modeling surgery

(2)门静脉超声:术后 7 d 模型组大鼠以 3% 戊巴比妥钠溶液 (2 mL/kg) 麻醉,以彩色多普勒超声门静脉扫查,检测门静脉血流、血栓形成情况。结果显示,29 只中 3 只未出现门静脉血栓,总造模成功率 68%。随机将 26 只 PVT 模型大鼠分为模型对照组、模型恢复组。模型恢复组继续给予普通饲料喂养、自由饮水 2 周。

(3)肝与门静脉样本的采集与处理:空白组、肝硬化组、模型对照组于分组次日,模型恢复组于分组后 2 周,术前禁食 12 h,备皮,沿胸骨剑突下,腹正中线做约 3 cm 的纵行切口,逐层打开腹腔,暴露肝门处,迅速取 1 mm × 3 mm 肝组织,1 min 内快速投入 4% 戊二醛溶液中固定;分离门静脉,迅速取 1 mm × 3 mm 门静脉,1 min 内快速投入 4% 戊二醛溶液中固定;而后取 3 cm × 3 cm 左右肝组织、长 1 cm 左右门静脉标本,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,进行 HE、Masson 及 EVG 染色。

2 结果

2.1 模型建立情况

成功建立肝硬化模型大鼠 36 只,建模成功率 90%。成功建立肝硬化 PVT 模型大鼠 26 只,建模成功率 68%,且存活及 PVT 存续时间至少 3 周。

2.2 彩色多普勒超声

彩色多普勒超声显示,空白组大鼠门静脉血流通畅,模型对照组大鼠门静脉未有血流信号,说明血栓存在,模型恢复组大鼠仅有门静脉近肝门端有少量血流信号,说明仅有少量血栓再通。见图 2。

2.3 大鼠肝组织 HE、Masson 染色

HE 染色:空白组肝小叶结构规整,汇管区结构正常;模型对照组及模型恢复组均显示肝小叶结构被破坏,肝细胞出现不同程度的变形和坏死,纤维组织弥漫性增生,形成纤维间隔,假小叶形成;Masson 染色:空白组肝小叶结构规整,汇管区结构正常,肝小叶内无纤维沉积,仅管腔结构着色;模型对照组及模型恢复组均显示,大量的蓝色胶原纤维的沉积和增生,肝小叶结构被破坏,肝组织内形成明显的纤维间隔,将原有的肝小叶结构破坏并重新排列成假小叶。见图 3。

2.4 大鼠门静脉组织 HE、Masson、EVG 染色

HE 染色:空白组门静脉结构正常,内膜规整、光滑,管腔内无血栓形成,管壁正常;模型对照组与模型恢复组均可见门静脉结构紊乱,中膜水肿增厚、内膜显示不清、高低不平,管腔内血栓形成;Masson 染色:空白组门静脉结构正常,内膜规整、光滑,内膜下无胶原纤维沉积,管壁正常;模型对照组与模型恢复组均除相同于 HE 染色门静脉病理表现外,内膜下大量蓝色胶原纤维沉积;EVG 染色:空白组门静脉内膜蓝黑色弹力纤维连续、完整的层状结构,紧密地附着在血管壁的内层;模型对照组与模型恢复组均除相同于 HE 染色门静脉病理表现外,均门静脉内膜蓝黑色弹力纤维缺失,门静脉内膜损伤。见图 4。

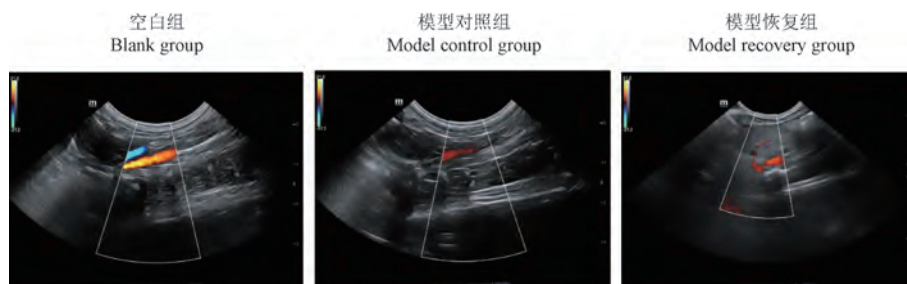


图 2 各组大鼠门静脉彩色多普勒超声图像

Figure 2 Color Doppler ultrasound images of portal vein in each group of rats

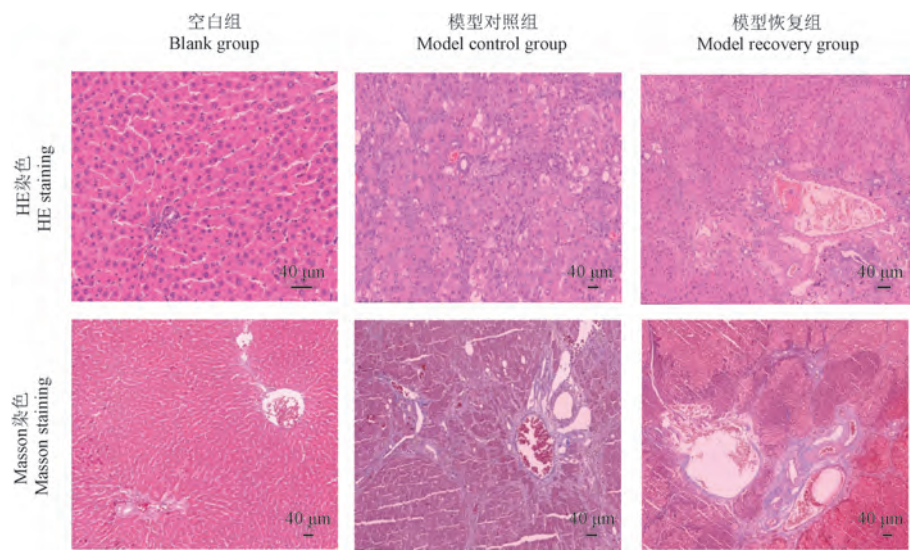


图 3 肝组织病理染色
Figure 3 Pathological staining of liver tissue

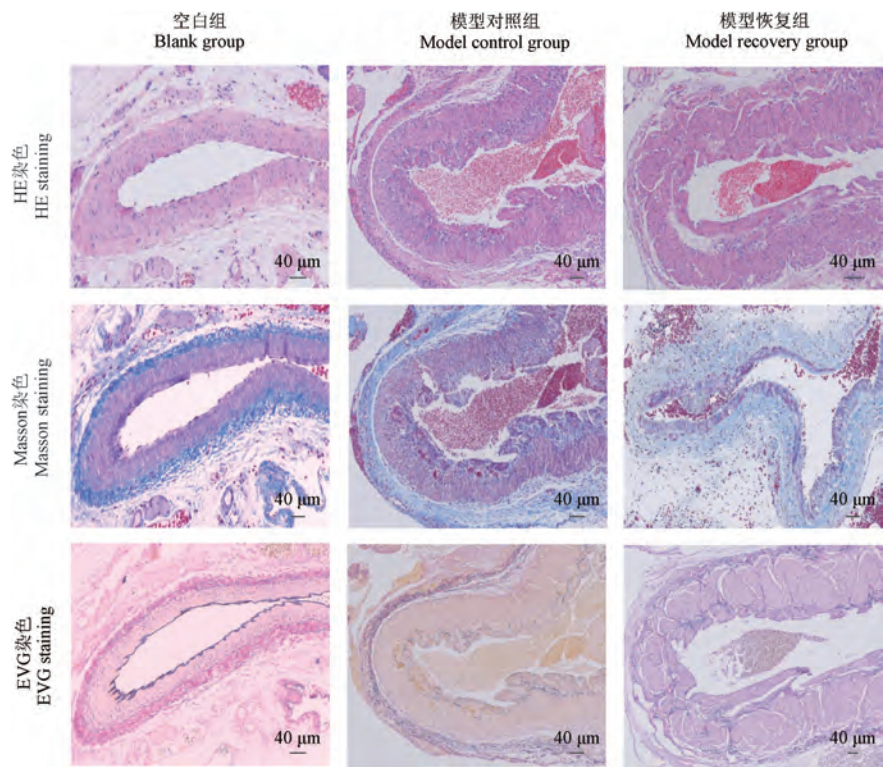


图 4 门静脉病理染色
Figure 4 Pathological staining of portal vein

2.5 肝硬化大鼠肝组织电镜

空白组肝细胞边界清晰、线粒体形态规则、双层膜结构清晰、嵴排列整齐。内质网在肝细胞内广泛分布；肝硬化大鼠肝细胞边界模糊、脂肪变性、水样变性，线粒体肿胀、嵴断裂或消失、大小不一、呈多形性、灶性聚集。内质网扩张，细胞

间质大量胶原纤维增生。见图 5。

2.6 肝硬化大鼠门静脉电镜

空白组门静脉中层平滑肌细胞排列整齐、内膜规整、内皮细胞连续；肝硬化组门静脉内皮细胞脱落、凋亡，内膜下大量纤维组织增生，平滑肌细胞排列紊乱表型化迁移至原内皮处。见图 6。

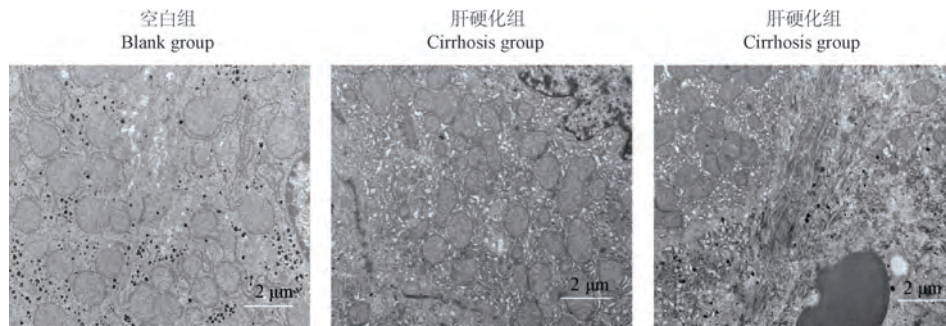


图 5 肝硬化大鼠肝组织电镜

Figure 5 Electron microscopy of liver tissue in cirrhotic rats

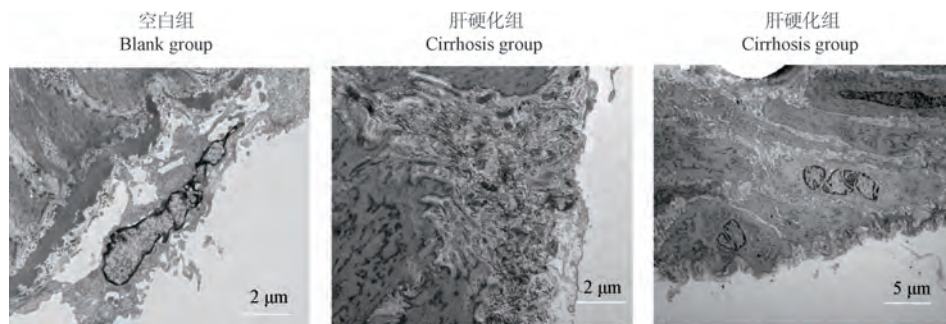


图 6 肝硬化大鼠门静脉电镜

Figure 6 Electron microscopy of portal vein in cirrhotic rats

3 讨论

目前国内外对于肝硬化门静脉血栓形成的机制与治疗药物研究存在瓶颈。深化该领域的研究,成熟、稳定的动物模型是不可或缺的。但迄今为止,仅有健康大鼠门静脉血栓模型建立方法的报道^[5-7],尚无建立肝硬化门静脉血栓模型的方法。为突破研究瓶颈,建立肝硬化门静脉血栓模型势在必行。

本研究建立的肝硬化 PVT 动物模型方法,是在对建立肝硬化模型、门静脉血栓模型,进行反复实验、总结经验与教训的基础上,进行了优化。成功在大鼠肝硬化的基础上建立了门静脉血栓模型。模型成功率可达 68%,并且 3 周后门静脉管腔内仍存在血栓。

首先建立肝硬化大鼠模型,研究人员在实验的经验与教训中得出:(1) CCl_4 建立肝硬化大鼠模型,一般采用腹腔注射,但实验中发现,腹腔注射 CCl_4 溶液,由于 CCl_4 刺激可造成腹腔多器官黏连、在肝纤维化阶段及肝硬化早期即出现腹水等问题,以致肝组织肝硬化程度较轻、早期腹水、

腹腔器官黏连等,并且大鼠的状态无法接受下一步建立门静脉血栓模型的手术创伤,因此采用皮下注射 CCl_4 溶液;(2) 实验证实第 5 周开始将文献中的 25% 乙醇溶液 + 添加甜味剂为其唯一饮用水至实验结束的方法,会在造模 7 周时出现大鼠的高死亡率,故修改为以 15% 乙醇溶液 + 添加甜味剂为其唯一饮用水至实验结束;(3) 实验证实 6 周末大鼠肝组织即出现假小叶之肝硬化病理特征,肝硬化造模 9 周时,则出现腹水。为保证第二阶段门静脉血栓建模的成功,将参考文献^[9-10]中肝硬化造模时间 9 周改为 8 周。

肝硬化模型的基础上建立 PVT 模型,研究人员同样进行了方法的优化:(1) 肝硬化时门静脉血管壁增厚、弹性降低、脆性增加,缝合线结扎容易截断门静脉,头皮针管与门静脉平行放置,缝合线一并结扎头皮针管与门静脉,即可阻断门静脉血流,又避免门静脉断开;(2) 门静脉间断结扎联合钳夹完成后,门静脉周围注射适量术尔泰预防门静脉与周围组织器官黏连,为利于实验结束获取门静脉创造条件。因此,在肝硬化的基础上建立大鼠肝硬化门静脉血栓模型,其关键技术是

确定手术麻醉量、采用一并结扎头皮针管与门静脉联合钳夹门静脉方法形成门静脉血栓、预防术后感染,减轻术后炎症造成门静脉与相邻组织器官的黏连等。

肝硬化 PVT 的确切病理生理学尚不清楚,但门静脉血流速度降低和肝病严重程度是肝硬化患者 PVT 的重要危险因素^[11-13]。虽然有人认为高凝状态也可能是 PVT 发展的风险因素^[14-15],然而,这些因素促进肝硬化合并 PVT 发生的具体机制尚未完全明确。既往研究大多聚焦于血液高凝状态的探讨,而忽略了肝硬化门静脉高压及血栓的病理特征。一项最新研究阐明了肝硬化 PVT 的组成与结构特点,其不同于传统的静脉和动脉血栓。研究证实,所有肝硬化 PVT 患者样本均存在门静脉内膜增厚和纤维化,纤维化内膜的中位厚度为 2406 μm ,其中仅 1/3 的患者伴有富含纤维蛋白的血栓。而无 PVT 的肝硬化患者中位纤维化内膜厚度为 358 μm ^[16]。因此,随着研究的深入,肝硬化的严重程度是形成门脉血栓的关键^[2]。肝硬化门静脉高压时门静脉血流缓慢、血管内皮损伤,出现血管内膜增厚与纤维化是肝硬化门脉血栓形成的核心病理机制^[16]。

鉴于肝硬化患者肝清除功能减退、肠道屏障功能异常、菌群紊乱及细菌易位等因素,肠道-腹腔-门静脉炎症反应与肠源性内毒素血症共同作用,致使肝硬化患者门静脉系统凝血酶生成潜力增强,进而促进局部高凝状态形成^[3,17-19],并诱导富含纤维蛋白的血栓产生。内毒素可激活血小板,增强其黏附与聚集功能,促使血小板释放磷脂并形成凝血酶原激活物,从而引发血液高凝状态^[20]。此外,内毒素入血后通过作用于 TLR4,进一步激活核转录因子 NF- κ B 等通路,诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 等炎症因子生成。HUANG 等^[21]研究发现,在肝硬化合并食管胃底静脉曲张患者中,PVT 组 IL-6 及 TNF- α 水平显著高于无 PVT 组。炎症因子刺激成纤维细胞、血管平滑肌细胞增殖向门静脉内膜下迁移^[22-23],造成内膜增厚与纤维化,与门静脉血栓形成有独立的关系。

多项基于多普勒超声的研究显示,若肝硬化患者门静脉血流速度低于 15 cm/s,其发生 PVT 的风险可增加 10 ~ 20 倍^[24-28]。其潜在机制可能

与肝硬化所致门静脉入肝阻力增加、血流速度减慢,进而导致血管剪应力升高有关,这不仅会引发血管内皮损伤及功能障碍,并且由于剪切应力和周向拉伸,压力升高可导致的血管形态和分子变化,包括内皮损伤、新内膜形成、炎症级联激活、血管平滑肌细胞肥大、迁移和表型变化^[29-30]。

探索肝硬化 PVT 动物模型造模方法,创建肝硬化 PVT 动物模型,其意义重大。本实验的结果,吻合了肝硬化形成 PVT 的基本病理过程,模型大鼠的肝组织与门静脉病理表现与文献报道^[16]的肝硬化 PVT 患者的病理高度一致。因此,本研究成功建立了大鼠肝硬化 PVT 模型,为深化研究肝硬化 PVT 形成的机制、PVT 病理特点、突破肝硬化 PVT 的防治研究瓶颈,提供了科学性与可行性。

参 考 文 献 (References)

- [1] 刘彦君,李光明. 肝硬化并发门静脉血栓防治研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4): 605-608.
LIU Y J, LI G M. Prophylaxis and management of patients with portal vein thrombosis complicating liver cirrhosis [J]. J Pract Hepatol, 2019, 22(4): 605-608.
- [2] PAN J, WANG L, GAO F, et al. Epidemiology of portal vein thrombosis in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Intern Med, 2022, 104: 21-32.
- [3] SENZOLO M, GARCIA-TSAO G, GARCÍA-PAGÁN J C. Current knowledge and management of portal vein thrombosis in cirrhosis [J]. J Hepatol, 2021, 75(2): 442-453.
- [4] 吴治念,肖滢,王亚东. 肝硬化门静脉血栓形成机制和治疗新认识 [J]. 中华肝病杂志, 2022, 30(11): 1280-1284.
WU Z N, XIAO Y, WANG Y D. New understanding of the mechanism and treatment of portal vein thrombosis in cirrhosis [J]. Chin J Hepatol, 2022, 30(11): 1280-1284.
- [5] 张津瑜,陈文显,沈华,等. 大鼠门静脉系统血栓形成模型的建立和观察 [J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(6): 724-731.
ZHANG J Y, CHEN W X, SHEN H, et al. Establishment and observation of portal vein thrombosis model in rats [J]. Chin J Gen Surg, 2018, 27(6): 724-731.
- [6] 姚露露,潘闻证,葛立峰,等. 门静脉血栓大鼠模型的建立及评价 [J]. 四川解剖学杂志, 2018, 26(2): 1-4.
YAO L L, PAN W Z, GE L F, et al. Establishment and evaluation of rat model with portal vein thrombosis [J]. Sichuan J Anat, 2018, 26(2): 1-4.
- [7] 刘壮,陈纪宏,祁兴顺,等. 门静脉血栓动物模型的建立和应用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(1): 29-32.
LIU Z, CHEN J H, QI X S, et al. Establishment and application of animal models for portal vein thrombosis [J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(1): 29-32.
- [8] 王奎淞,赵鲲鹏,张秋菊. 常用肝纤维化实验动物模型研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(11): 113

- 116.
WANG K S, ZHAO K P, ZHANG Q J. Research progress on commonly used animal models of liver fibrosis [J]. Med Pharm J Chin People's Liberation Army, 2021, 33(11): 113-116.
- [9] 陈学新, 丁向春, 熊利泽, 等. 四因素综合法制备大鼠肝硬化模型的评价 [J]. 中华麻醉学杂志, 2007, 27(9): 835-838.
CHEN X X, DING X C, XIONG L Z, et al. Four factor synthesis preparation of liver cirrhosis in rats model of evaluation [J]. J Anesthesiol Med, 2007, 27(9): 835-838.
- [10] 叶春华, 刘浔阳. 四氯化碳综合法制备大鼠肝硬化模型 [J]. 医学临床研究, 2005, 22(5): 619-622.
YE C H, LIU X Y. Carbon tetrachloride synthesis preparation of rat liver cirrhosis model [J]. J Clin Res, 2005, 22(5): 619-622.
- [11] NICOARĂ-FARCAŢU O, SOY G, MAGAZ M, et al. New insights into the pathogenesis, risk factors, and treatment of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis [J]. Semin Thromb Hemost, 2020, 46(6): 673-681.
- [12] GABALLA D, BEZINOVER D, KADRY Z, et al. Development of a model to predict portal vein thrombosis in liver transplant candidates: the portal vein thrombosis risk index [J]. Liver Transpl, 2019, 25(12): 1747-1755.
- [13] NORONHA FERREIRA C, MARINHO R T, CORTEZ-PINTO H, et al. Incidence, predictive factors and clinical significance of development of portal vein thrombosis in cirrhosis: a prospective study [J]. Liver Int, 2019, 39(8): 1459-1467.
- [14] INTAGLIATA N M, CALDWELL S H, TRIPODI A. Diagnosis, development, and treatment of portal vein thrombosis in patients with and without cirrhosis [J]. Gastroenterology, 2019, 156(6): 1582-1599.
- [15] TSOCHATZIS E A, SENZOLO M, GERMANI G, et al. Systematic review: portal vein thrombosis in cirrhosis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 31(3): 366-374.
- [16] DRIEVER E G, VON MEIJENFELDT F A, ADELMEIJER J, et al. Nonmalignant portal vein thrombi in patients with cirrhosis consist of intimal fibrosis with or without a fibrin-rich thrombus [J]. Hepatology, 2022, 75(4): 898-911.
- [17] CARNEVALE R, RAPARELLI V, NOCELLA C, et al. Gut-derived endotoxin stimulates factor VIII secretion from endothelial cells. Implications for hypercoagulability in cirrhosis [J]. J Hepatol, 2017, 67(5): 950-956.
- [18] 韩建波, 丁永斌, 束青华, 等. 促抗凝失衡与肝硬化门静脉高压症脾切断流术后门静脉血栓形成的关系 [J]. 肝胆胰外科杂志, 2023, 35(4): 225-229.
HAN J B, DING Y B, SHU Q H, et al. Contribution of coagulation imbalance in development of portal vein thrombosis after splenectomy and esophagogastric devascularization for cirrhotic portal hypertension [J]. J Hepatopancreatobiliary Surg, 2023, 35(4): 225-229.
- [19] RAPARELLI V, BASILI S, CARNEVALE R, et al. Low-grade endotoxemia and platelet activation in cirrhosis [J]. Hepatology, 2017, 65(2): 571-581.
- [20] 刘正泉, 赵自刚. 防治内毒素休克凝血功能紊乱的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 146-150.
LIU Z Q, ZHAO Z G. Advances in prevention and treatment drug therapy for coagulation disorders during endotoxin shock [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 146-150.
- [21] HUANG X, FAN X, ZHANG R, et al. Systemic inflammation and portal vein thrombosis in cirrhotic patients with gastroesophageal varices [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2020, 32(3): 401-405.
- [22] CHEN D, MA L, THAM E L, et al. Fibrocytes mediate intimal hyperplasia post-vascular injury and are regulated by two tissue factor-dependent mechanisms [J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(5): 963-974.
- [23] PYO R T, SATO Y, MACKMAN N, et al. Mice deficient in tissue factor demonstrate attenuated intimal hyperplasia in response to vascular injury and decreased smooth muscle cell migration [J]. Thromb Haemost, 2004, 92(3): 451-458.
- [24] QI X, HAN G, YE C, et al. Splenectomy causes 10-fold increased risk of portal venous system thrombosis in liver cirrhosis patients [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 2528-2550.
- [25] 张红阳, 曾于珍, 罗忠光, 等. 肝硬化伴门静脉血栓形成诊治研究进展 [J]. 上海医药, 2020, 41(19): 7-11.
ZHANG H Y, ZENG Y Z, LUO Z G, et al. Progress in the diagnosis and treatment of portal vein thrombosis with liver cirrhosis [J]. Shanghai Med Pharm J, 2020, 41(19): 7-11.
- [26] NERY F, CORREIA S, MACEDO C, et al. Nonselective beta-blockers and the risk of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis: results of a prospective longitudinal study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 49(5): 582-588.
- [27] TURON F, DRIEVER E G, BAIGES A, et al. Predicting portal thrombosis in cirrhosis: a prospective study of clinical, ultrasonographic and hemostatic factors [J]. J Hepatol, 2021, 75(6): 1367-1376.
- [28] NEUBAUER K, ZIEGER B. Endothelial cells and coagulation [J]. Cell Tissue Res, 2022, 387(3): 391-398.
- [29] RAUTOU P E, VION A C, LUYENDYK J P, et al. Circulating microparticle tissue factor activity is increased in patients with cirrhosis [J]. Hepatology, 2014, 60(5): 1793-1795.
- [30] ANWAR M A, SHALHOUB J, LIM C S, et al. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression [J]. J Vasc Res, 2012, 49(6): 463-478.

[收稿日期] 2024-11-07

张欣欣, 谢铤子, 黄慧婷, 等. 不同浓度博来霉素诱导特发性肺纤维化小鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 673–683.

ZHANG X X, XIE Y Z, HUANG H T, et al. Comparative study of idiopathic pulmonary fibrosis in mice induced by bleomycin of different concentrations [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 673–683.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.006

不同浓度博来霉素诱导特发性肺纤维化小鼠模型的比较研究

张欣欣^{1,2,3,4}, 谢铤子^{1,2,3,4}, 黄慧婷¹, 江勇⁵, 李航⁶, 廖钢⁵, 温武金⁵,
詹少锋^{1,4*}, 黄秀芳^{1,3,4*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510000; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510000;
3. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广州 510000; 4. 广东省中医临床研究院, 广州 510000;
5. 深圳市中西医结合医院, 广东 深圳 518072; 6. 深圳市宝安中医院, 广东 深圳 518133)

【摘要】 目的 探讨气管内滴注不同浓度的博来霉素 (bleomycin, BLM) 诱导特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 小鼠的建立与评价。**方法** 雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型低 (1.5 mg/kg BLM)、中 (2.5 mg/kg BLM)、高 (3.5 mg/kg BLM) 剂量组。采用一次性气管内滴注博来霉素构建 IPF 小鼠, 比较不同组小鼠的一般状态、体质量、生存率和肺系数, 观察小鼠肺组织病理学改变、羟脯氨酸、纤维化标志物和炎症因子水平。**结果** 与对照组相比, 模型低、中、高剂量组生存率降低, 体质量呈下降趋势, 肺系数均显著增加; 模型低、中、高剂量组肺组织出现炎性浸润 ($P < 0.01$) 和胶原沉积 ($P < 0.0001$); 肺组织和血清中的羟脯氨酸显著升高 ($P < 0.05$); 纤维化标志物 α -Sma、Fn1 和 Col1a1 的 mRNA 水平表达上调 ($P < 0.001$), 相应蛋白表达也显著上调 ($P < 0.05$), 炎症因子 Tgfb1 的 mRNA 表达增加 ($P < 0.0001$)。**结论** 1.5、2.5 和 3.5 mg/kg 的博来霉素均可诱导 C57BL/6J 小鼠 IPF, 结合生存率、体质量和肺系数变化、肺组织大体观和病理学改变、纤维化和炎症相关指标等结果, 2.5 mg/kg 博来霉素为诱导的 IPF 小鼠的最适宜浓度。

【关键词】 特发性肺纤维化; 博来霉素; 小鼠; 气管内滴注

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0673-11

Comparative study of idiopathic pulmonary fibrosis in mice induced by bleomycin of different concentrations

ZHANG Xinxin^{1,2,3,4}, XIE Yizi^{1,2,3,4}, HUANG Huiting¹, JIANG Yong⁵,
LI Hang⁶, LIAO Gang⁵, WEN Wujin⁵, ZHAN Shaofeng^{1,4*}, HUANG Xiufang^{1,3,4*}

【基金项目】 深圳市“医疗卫生三名工程”项目 (SZZYSM202206013), 广州市科技计划项目 (202201020457), 国家中医优势专科建设项目 (广州中医药大学第一附属医院肺病科), 广东省重点科室 (中西医协同科室) 建设项目, 广州中医药大学青年拔尖人才 (团队) “揭榜挂帅”项目。

Funded by the Sanming Project of Medicine in Shenzhen (SZZYSM202206013), the Guangzhou Science and Technology Project (202201020457), National Chinese Medicine Specialty Construction Project (Department of Lung Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine), Guangdong Province Key Department (Chinese and Western Medicine Coordination Department) Construction Project, Guangzhou University of Chinese Medicine Young Top Talents (Team) “Jie Bang Gua Shuai” Project.

【作者简介】 张欣欣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。Email: zxinxin72@163.com

【通信作者】 詹少锋, 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。Email: zsfstone@163.com;

黄秀芳, 女, 博士, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。Email: huangxiufang@gzzyydxdyfsy.wecom.work。

* 共同通信作者

- (1. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;
2. the First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;
3. Lingnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;
4. Guangdong Clinical Research Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China; 5. Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shenzhen 518072, China; 6. Shenzhen Bao'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518133, China)

Corresponding author: ZHAN Shaofeng. E-mail: zsfstone@163.com;

HUANG Xiufang. E-mail: huangxiufang@gzzyydxdfsyy.wecom.work

【Abstract】 Objective To investigate the establishment and evaluation of an idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) mouse model induced by the intratracheal infusion of bleomycin (BLM) of different concentrations. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly divided into a control group, Model-L group (1.5 mg/kg, BLM), Model-M group (2.5 mg/kg, BLM), and Model-H group (3.5 mg/kg, BLM). An IPF mouse model was constructed by one-time intratracheal infusion of BLM. The general status, body mass, survival rate, and lung coefficient of mice in different groups were compared. Pathological changes in lung tissue, the hydroxyproline content, fibrosis markers and inflammatory factor levels were observed. **Results** Compared with the control group, the survival rate decreased and body weight showed a downward trend in the low-, medium-, and high-dose model groups, with significant increases in lung coefficients. Inflammatory infiltration ($P < 0.01$) and collagen deposition ($P < 0.0001$) were observed in the lung tissues of all model groups. Hydroxyproline levels in lung tissue and serum were significantly elevated ($P < 0.05$). The mRNA levels of fibrosis markers α -Sma, Fn1, and Col1a1 were upregulated ($P < 0.001$), with significant increases in corresponding protein expression ($P < 0.05$). The mRNA expression of the inflammatory factor Tgfb1 also increased ($P < 0.0001$). **Conclusion** 1.5, 2.5 and 3.5 mg/kg BLM can induce an IPF model in C57BL/6J mice. Based on the results observed for survival rate, body mass, lung coefficient changes, lung tissue gross and pathological changes, and fibrosis-related biomarkers, 2.5 mg/kg BLM is the optimal concentration for inducing an IPF mouse model.

【Keywords】 idiopathic pulmonary fibrosis; bleomycin; animal model; intratracheal infusion

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 作为一种发病机制复杂, 治疗手段有限, 最终致命的肺部进行性疾病^[1]。IPF 临床症状多出现肺功能减退、呼吸困难, 组织病理学表现为蜂窝样改变和/或牵拉性支气管扩张, 多发于老年男性^[2]。此外, IPF 常合并肺气肿、肺动脉高压、胃食管反流等多种慢性疾病^[3]。较少的治疗手段和无法避免的快速进展病情要求更加迫切的寻找抗纤维化的药物或治疗策略^[4]。基于此, 构建稳定的动物实验模型对于精准医学的初步探索尤为重要。

动物模型是一种用于模拟人类疾病病理特征进行疾病研究的一种基础工具, 具有可重复性^[5]。目前, IPF 造模动物选择多聚焦于啮齿类动物如小鼠 (ICR、C57BL6、KM 小鼠等)、大鼠 (SD、Wister 大鼠等)、豚鼠等, 主要通过博来霉素

(bleomycin, BLM)、百草枯、二氧化硅及异硫氰酸荧光素等诱导造模^[6-7]。BLM 是一种氨基糖肽类产物, 临床多用于治疗各种癌症, 肺纤维化是主要的毒副作用^[8]。采用 C57BL/6J 小鼠进行 BLM 一次性气管内滴注是最常见、最直接的无创造模方式, 具有更符合人体病理学特征、死亡率低、造模成本低和操作较简便的优势^[9]。然而, 以 C57BL/6J 小鼠为例, 不同研究中 BLM 构建模型的用量不一致^[10-11], 因此, 本研究旨在聚焦于 BLM 一次性经气管内滴注构建 IPF 小鼠模型, 探讨 BLM 的最佳用量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 ~ 10 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 76

只,体质量(23 ± 2)g,购于广东维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(粤)2022-0063】。饲养于广州中医药大学实验动物中心【SYXK(粤)2023-0347】,实验维持室温 $22 \sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\% \sim 50\%$,光暗交替时间为 12 h/12 h,自由饮水饮食。本动物实验所有操作均经过广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(20240102003)。

1.1.2 主要试剂与仪器

硫酸博来霉素(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号 B802467),氯化钠注射液(信合援生制药股份有限公司,国药准字 H41023363),4% PFA 固定液(白鲨生物科技有限公司,货号 BL539A),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒和 Masson 三色染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为 G1003 和 G1006),羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号 A030-2-1),TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司,货号 1596026),Prime ScriptTM RT reagent Kit with g DNA Eraser 反转录试剂盒, TB Green Premix Ex TaqTM 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,货号分别:RR047A 和 RR820A),小鼠 I 型胶原蛋白(collagen type I alpha 1, COL1A1)抗体(美国 CST 公司,货号 72026), α -平滑肌激动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、纤连蛋白(fibronectin, FN)、 β -tubulin 抗体、HRP 标记的羊抗兔二抗(中国 Affinity 公司,货号分别为 AF1032、AF5335、AF7011、S0001),RIPA 裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术公司,货号分别为 P0013C 和 P0010),蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(美国 TargetMol 公司,货号分别为 C0001 和 C0002)。

小动物喉镜(上海玉研科学仪器有限公司,型号 SR310-M),数字病理切片扫描系统(3D HISTEC,型号 Pannoramic MIDI),全波长酶标仪(美国 ThermoFisher 公司,型号 Multiskan GO),恒温水槽与水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司,型号 BWS-0505),低温型研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号 KZ-III-F/FP),超微量分光光度计(德国 Implen 公司,型号 NanoPhotometer N50 Touch),96 孔热循环仪(美国 Thermo Fisher 公司,型号 Veriti),实时荧光定量 PCR 仪(美国 ThermoFisher 公司,型号 QuantStudio 5),

PowerPacTM 基础电泳仪电源(BIO-RAD,型号 1645050),化学发光成像分析系统(北京百晶生物技术有限公司,型号 BG-gdsAUTO 710pro)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型构建

76 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为模型低、中、高剂量组和对照组,每组各 19 只。采用一次性气管内滴注法构建 IPF 小鼠模型。小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后垂直固定于操作台,镊子轻拉小鼠舌头以便采用喉镜观察声门裂开合情况,顺应小鼠呼吸缓慢滴入对应组别的液体使其自主吸入,对照组滴注生理盐水 2 mL/kg,模型组低(1.5 mg/kg)、中(2.5 mg/kg)、高(3.5 mg/kg)剂量组滴注相应体积的 BLM。待小鼠经气管吸入液体后迅速直立并左右旋转小鼠 1 min,苏醒后继续饲养,自由饮食。造模后第 21 天,经过腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后迅速处死小鼠,收集肺组织和血清用于后续检测。动物实验流程,见图 1。

1.2.2 观察小鼠一般状态及体质量

饲养期间观察小鼠一般状态并记录体质量,计算小鼠每日体质量变化。同时选取第 7、14、21 天 3 个时间点计算终末体质量变化率(死亡小鼠则计入死亡前 1 d 体质量)。

体质量变化百分比 = (小鼠当天体质量 - 第 0 天体质量) / 第 0 天体质量 $\times 100\%$

1.2.3 肺系数检测

获取小鼠全肺组织,生理盐水清洗并用滤纸拭干表面水分,称量全肺质量并计算肺系数。

肺系数 = 全肺质量 / 第 21 天的体质量 $\times 100\%$

1.2.4 HE、Masson 染色观察小鼠肺组织病理学变化

4% PFA 固定肺组织,经石蜡包埋,制备切片进行 HE 染色和 Masson 染色,通过数字病理切片扫描系统观察小鼠肺组织炎症浸润程度和纤维化改变。HE 染色采用 Szapiel 评分评估小鼠肺组织炎症程度,Masson 染色通过 Image J(V1.53 t)分析胶原面积评估小鼠肺纤维化情况。

1.2.5 碱水解法检测肺组织和血清中 HYP 含量

取肺组织 50 mg 或血清 100 μL ,经过水解、调节 pH、定容等步骤后,设置样本管、标准管和空白管,按照试剂盒说明书加入试剂,检测 A550 nm

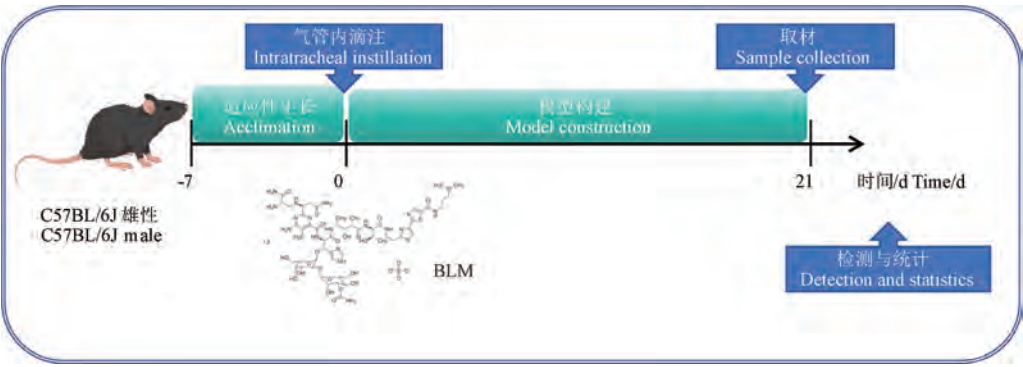


图 1 动物实验流程
Figure 1 Flow BLM of animal experiment

处的吸光度,计算 HYP 含量。

$$\text{HYP} = \frac{(A_{\text{样本}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times 5 \times V_{\text{水解液}}}{M_{\text{样本}} (\text{肺组织质量或血清体积})}$$

1.2.6 RT-PCR 检测小鼠肺组织的 $\alpha\text{-Sma}$ 、 Col1a1 、 Fn1 和 Tgfb1 的 mRNA 含量

TRIzol 法提取小鼠肺组织的 mRNA。微量分光光度计检测浓度及纯度,根据反转录试剂盒说明书,进行 RNA 逆转录。PCR 扩增共 40 个循环,条件为 95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s。 $\beta\text{-actin}$ 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Primerbank 数据库 (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) 设计鼠源性引物序列,由北京擎科生物科技股份有限公司合成,序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences			
基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物长度/bp Primer length/bp	NCBI ID
$\beta\text{-actin}$	R: CCAGTTGGAACAATGCCATGT	154	11461
	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG		
$\alpha\text{-Sma}$	R: TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	102	11475
	F: GTCCCAGACATCAGGGAGTAA		
Col1a1	R: CCACGTCTCACCATTG GGG	103	12842
	F: GCTCCTCTTAGGGGCCACT		
Fn1	R: CTAGCTAGGTCCGTTCCCACT	115	14268
	F: GCTCAGCAAATCGTGCAGC		
Tgfb1	R: GCCTTAGTTTGACAGGATCTG	133	21803
	F: CTCCTCGTGCTTCTAGTGC		

1.2.7 Western Blot 检测小鼠肺组织 $\alpha\text{-SMA}$ 、 COL1A1 和 FN 的蛋白含量

称取小鼠 30 mg 肺组织按比例加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂进行裂解研磨,取上清液进行 BCA 蛋白定量分析。经凝胶电泳、转膜、封闭、洗膜后,4 ℃ 过夜孵育一抗: $\alpha\text{-SMA}$ (1 : 1000)、 COL1A1 (1 : 1000)、 FN (1 : 1000) 和 $\beta\text{-tubulin}$ (1 : 3000)。一抗孵育结束后再次洗膜,室温 1 h 孵育二抗 (1 : 3000),TBST 洗膜后进行显影,采用 Image J 软件 (V1.53 t) 分析。

1.3 统计学分析

采用 Graphad Prism 8.4.3 软件进行统计学分析,剂量资料以平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,多组间采用单因素方差分析,根据方差齐性组间两两比较采用 Dunnett's 法或 Dunnett's T3 法;不符合正态分布采用 Kruskal Wallis 非参数检验,组间两两比较采用 Dunns 法校正。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般状态及生存率

对照组小鼠精神良好,毛发柔顺,活动正常;相较于对照组,模型低、中、高剂量组小鼠精神稍差,出现畏寒蜷缩,活动减少等现象。经气管内滴注术后模型低剂量组死亡 3 只,考虑造模操作及麻醉不当,不纳入后续实验统计。后续实验过程中对照组小鼠无死亡;模型低剂量组死亡 1 只,生存率为 93.75% ($P > 0.05$);模型中剂量组死亡 3 只,生存率为 84.21% ($P > 0.05$),模型高剂量组死亡 5 只,生存率为 73.68% ($P < 0.05$)。生存曲线见图 2。

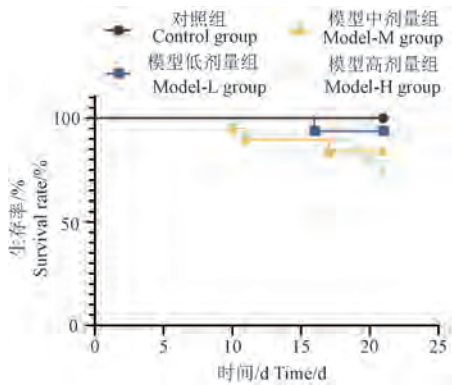


图2 各组小鼠的生存曲线($n = 16 \sim 19$)

Figure 2 Survival curve of each group of mice($n = 16 \sim 19$)

2.2 BLM 对小鼠体质量和体质量变化率的影响

与对照组相比,模型低、中、高剂量组小鼠体质量均呈下降趋势,其中下降速度:模型高剂量组 > 模型中剂量组 > 模型低剂量组;模型低剂量组第 9 天体质量开始正向增长,模型中、高剂量组第 12 天体质量进行性增长,体质量恢复速度与

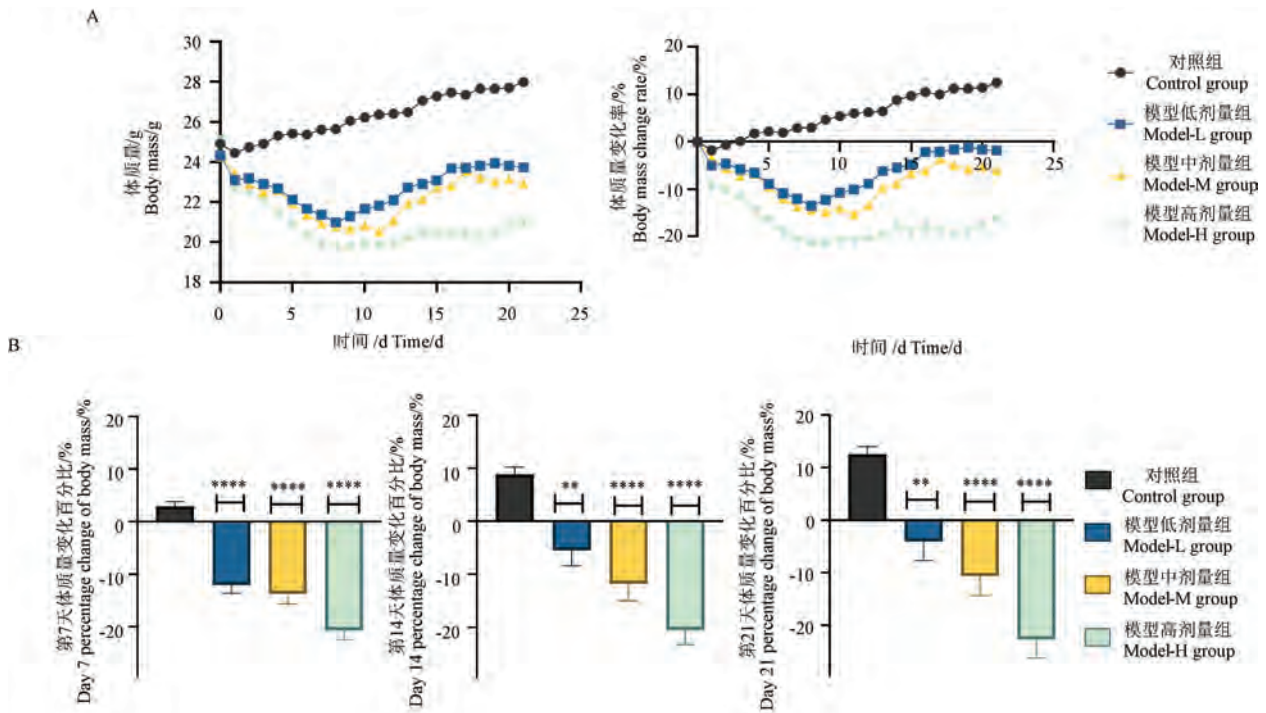
BLM 造模剂量呈负相关,见图 3A。BLM 诱导后第 7 天,除对照组外,模型组 3 个剂量体质量均出现显著降低($P < 0.0001$),第 14 天和第 21 天时,模型中剂量组($P < 0.0001$)和模型高剂量组($P < 0.0001$)较模型低剂量组($P < 0.01$)体质量变化更加显著,见图 3B。

2.3 BLM 对小鼠肺质量和肺系数的影响

肺质量量结果显示,与对照组相比,模型低剂量组($P < 0.0001$)、模型中剂量组($P < 0.0001$)和模型高剂量组($P < 0.0001$)的小鼠肺质量显著增加;相较于对照组肺系数,模型低剂量组($P < 0.001$)、模型中剂量组($P < 0.0001$)和模型高剂量组($P < 0.0001$),3 组均显著增长,见图 4。

2.4 BLM 对小鼠肺组织的大体观变化的影响

与对照组相比,模型组小鼠肺组织大体呈现颜色暗红、色泽不均、水肿瘀血,部分组织出现点状出血点;模型低剂量组的肺组织大体观变化程度较模型中、高剂量组轻,见图 5。

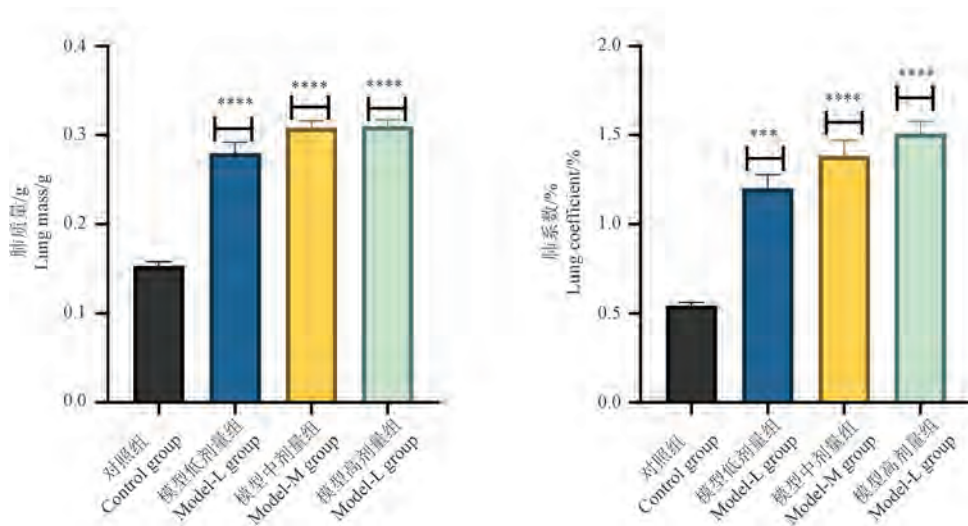


注:A:各组小鼠的体质量和体质量变化率曲线;B:各组小鼠第 7、14、21 天的终末体质量变化百分比;与对照组相比,** $P < 0.01$,**** $P < 0.0001$ 。(下同)

图3 各组小鼠的体质量及体质量变化百分比($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 16 \sim 19$)

Note. A. Body mass and body mass change rate of mice in each group. B. Percentage change of final body mass on day 7, day 14 and day 21 of each group. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Body mass and percentage change of mice in each group($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 16 \sim 19$)



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下同)

图 4 各组小鼠的肺质量及肺系数($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 14 \sim 19$)

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

Figure 4 Lung mass and lung coefficient of mice in each group($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 14 \sim 19$)



图 5 各组小鼠肺组织代表图像($n = 8$)

Figure 5 Representative images of lung tissue of mice in each group($n = 8$)

2.5 BLM 对小鼠肺组织病理学改变

HE 染色结果显示,对照组小鼠肺组织中未见炎性细胞浸润,肺泡结构清晰,无明显异常。与对照组相比,模型低剂量组($P < 0.01$)、模型中剂量组($P < 0.001$)、模型高剂量组($P < 0.001$)肺内炎性细胞浸润明显,肺泡壁增厚,结构破坏,见图 6。Masson 染色结果显示,模型低剂量组($P < 0.0001$)、模型中剂量组($P < 0.0001$)、模型高

剂量组($P < 0.0001$)肺内纤维灶明显,出现大量胶原沉积,纤维化程度显著,见图 7。

2.6 BLM 对小鼠肺组织和血清中 HYP 含量变化的影响

HYP 检测结果显示,与对照组相比,肺组织和血清中的 HYP 含量在模型低剂量组($P < 0.0001$, $P < 0.001$)、模型中剂量组($P < 0.05$, $P < 0.001$)和模型高剂量组($P < 0.0001$, $P <$

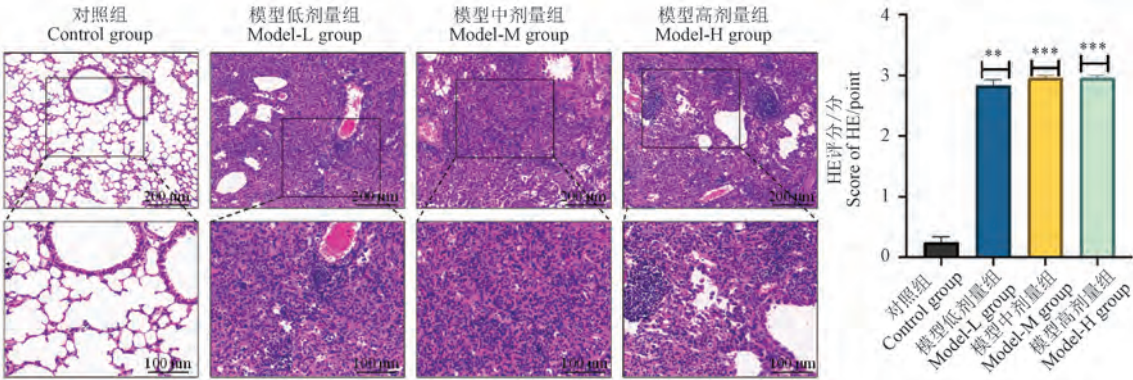


图 6 各组小鼠的肺组织病理学改变($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

Figure 6 Pathological changes in lung tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

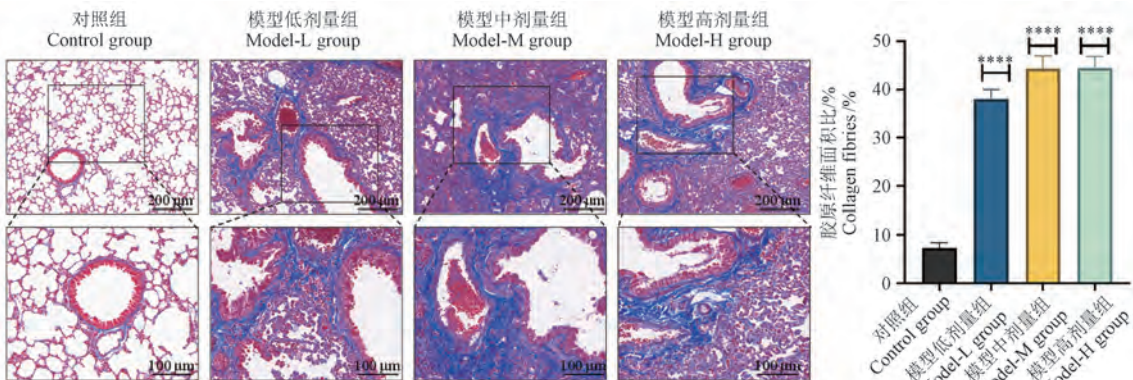


图 7 各组小鼠的肺组织病理学改变($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

Figure 7 Pathological changes in lung tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 8$)

0.0001) 显著升高, 见图 8。

2.7 BLM 对小鼠肺组织中 α -Sma、Fn1、Col1a1 和 Tgfb1 的 mRNA 表达影响

与对照组相比, 模型低剂量组 ($P < 0.0001$)、

模型中剂量组 ($P < 0.0001$) 和模型高剂量组 ($P < 0.001$) 中肺组织的纤维化标志物 α -Sma、Fn1、Col1a1 和炎症因子 Tgfb1 的 mRNA 表达均明显上调, 见图 9。

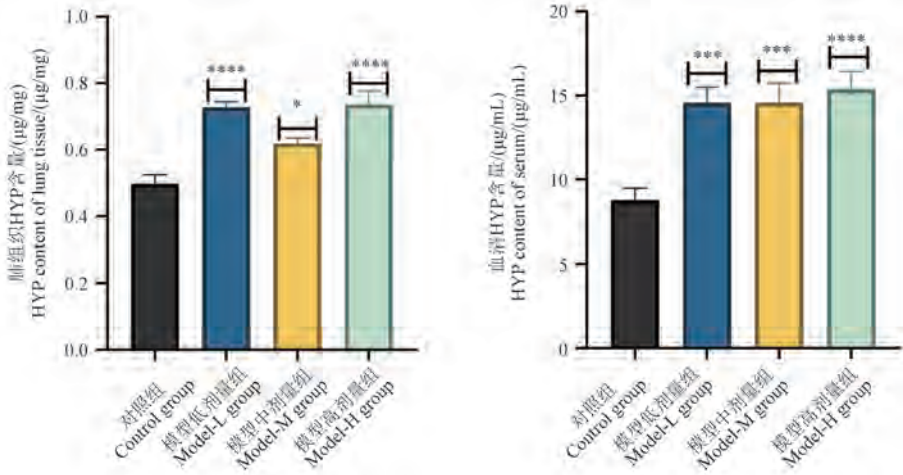


图 8 各组小鼠肺组织和血清中 HYP 含量($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 14 \sim 19$)

Figure 8 HYP content in lung tissue and serum of mice in each group($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 14 \sim 19$)

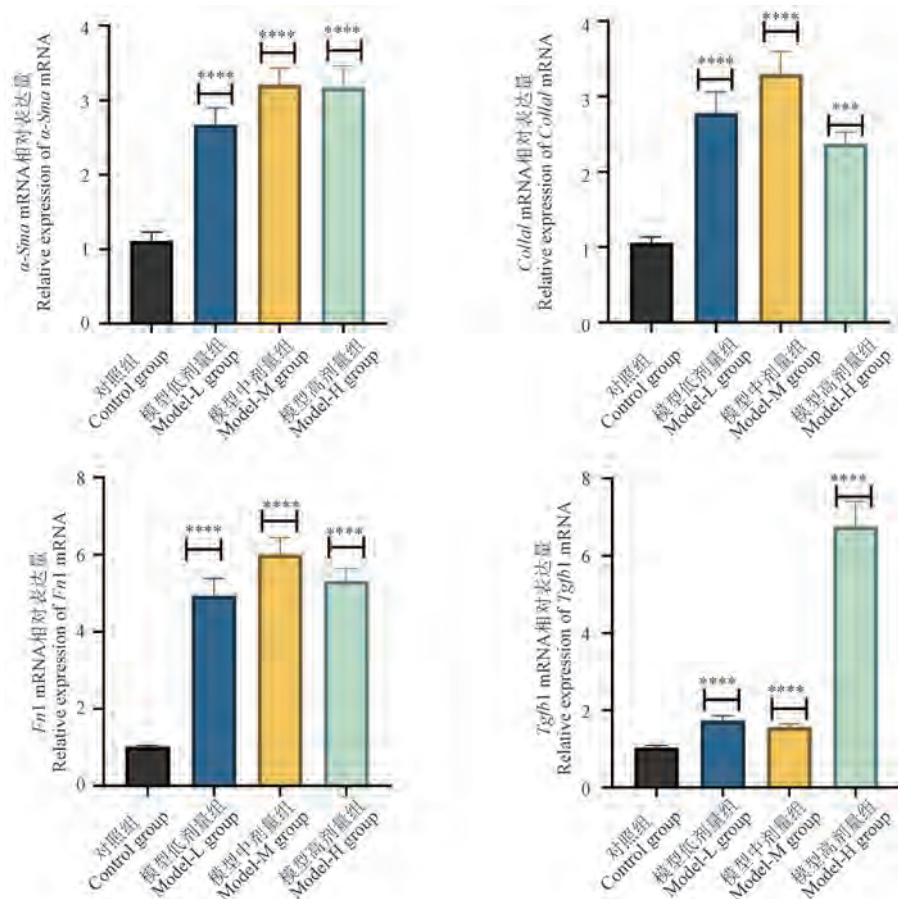


图 9 各组小鼠肺组织中 α -Sma、Fn1、Col1a1 和 Tgfb1 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 14 \sim 19$)

Figure 9 mRNA expression of α -Sma, Fn1, Col1a1 and Tgfb1 in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 14 \sim 19$)

2.8 BLM 对小鼠肺组织 α -SMA、FN 和 COL1A1 蛋白表达的影响

与对照组相比,小鼠肺组织中的纤维化生物标志物 α -SMA、FN 和 COL1A1 的蛋白表达在模型低剂量组 ($P < 0.05$)、模型中剂量组 ($P < 0.05$) 和模型高剂量组 ($P < 0.001$) 均显著升高,见图 10。

3 讨论

IPF 作为间质性肺疾病中最常见的一种疾病,死亡率高,现有疗法疗效不佳,患者生活质量低^[12]。适宜的动物模型是探讨 IPF 发病机制、药物开发的首要基础。BLM 构建 IPF 模型的给药方式包括气管内滴注、雾化吸入、滴鼻、腹腔注射、尾静脉注射等^[13]。一次性气管内滴注的方式给药,造模时间短,给药剂量少,药物直接作用于肺部,相比于气管切开方式,无创的方式对动物

损伤更小^[7]。C57BL/6J 小鼠对气管内注射 BLM 反应明显,是最适宜的复制 IPF 模型的动物^[14-15]。BLM 一次性给药的方式诱导 IPF 动物模型可复制性强,然而具有自限性,因此需要恰当的诱导时间。研究表明,HYP 含量在 BLM 诱导的 IPF 小鼠中含量逐渐升高至第 4 周,此后逐渐下降,而 IPF 关键标志物的表达在第 3 周达到峰值^[16],因此本研究采用 21 d 造模方式。

肺系数、HYP 含量的测定、肺组织病理学和纤维化指标表达的测定等是评估 IPF 模型是否成功的标准^[17-18]。本研究结果显示模型组小鼠 BLM 诱导后均出现体质量下降趋势,且模型高剂量组下降趋势最明显,模型中剂量组次之。此外,纤维化小鼠肺重量和肺系数显著增高,总体呈现剂量依赖性增长。肺组织大体观和组织病理学均提示 2.5 和 3.5 mg/kg 的 BLM 诱导效果更佳,表现出明显的胶原纤维沉积和炎症浸润。

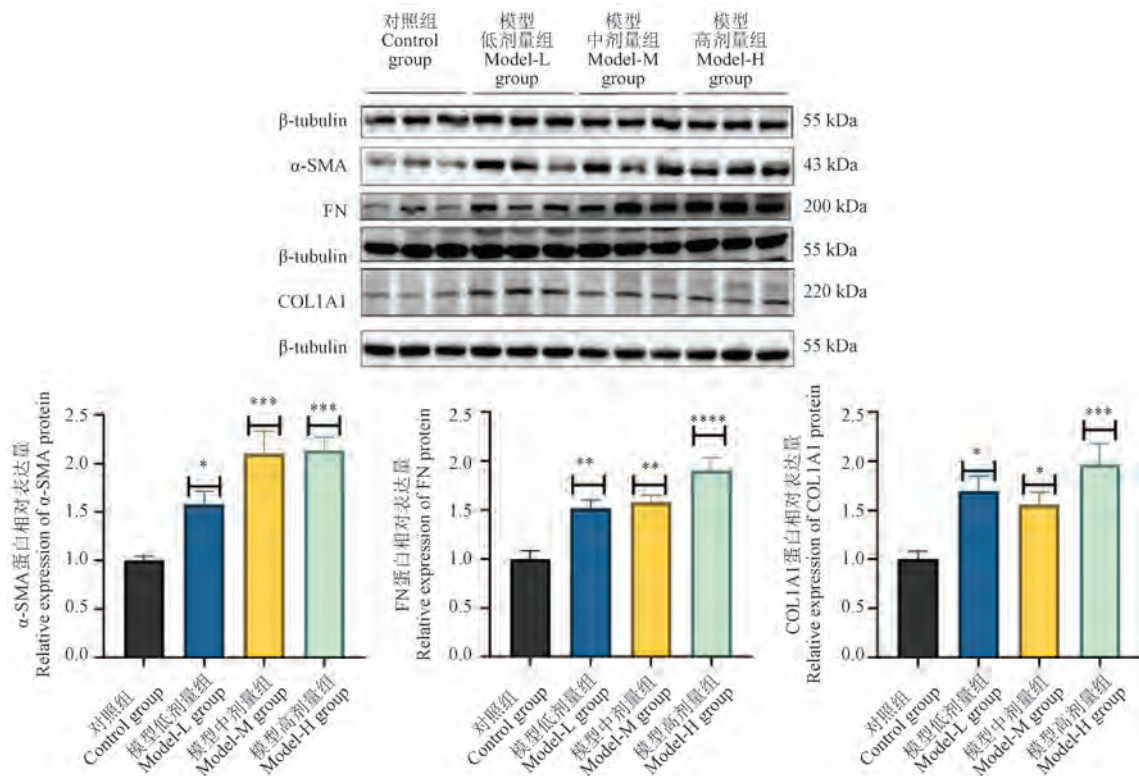


图 10 各组小鼠肺组织 α -SMA、FN 和 COL1A1 的蛋白表达($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 6$)

Figure 10 Protein expression of α -SMA, FN and COL1A1 in lung tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s\bar{x}, n = 6$)

纤维化的发生与细胞外基质过度沉积、胶原蛋白增多相关,调节细胞外基质稳态有利于保护纤维化^[19]。本研究中 BLM 诱导后的肺组织和血清的 HYP 含量均显著增加。胶原沉积是 IPF 的显著病理特征,而 HYP 是存在于胶原蛋白的一种物质,因此,HYP 含量能反映纤维化程度^[20]。FN,胶原蛋白(包括 COL1A1)、层黏连蛋白等是细胞外基质的组成成分之一^[21]。此外, α -SMA 是成纤维细胞的标志,与细胞外基质的收缩和重塑有关^[22]。而 TGF- β_1 作为一种调节因子,调控炎症反应,细胞分化等生物过程,阻断 TGF- β_1 受体能够降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子释放^[23-24]。此外,TGF- β_1 还参与介导纤维细胞转化为成纤维细胞,介导 Smad、MAPK、ERK 信号通路等促进 IPF 纤维化过程^[25]。综合 mRNA 表达和蛋白水平表达,模型中、高剂量组的肺组织 α -SMA, FN, COL1A1 和 TGF- β_1 表达更为优势。生存率是考虑模型是否适用的标准之一,本研究发现模型低、中剂量组存率差异无统计学意义,然而,模型高剂量组死亡个数较多,不利于后续的实验研究。

综上所述,本研究采用 1.5、2.5、3.5 mg/kg

的 BLM 均成功构建 IPF 小鼠模型,结合小鼠体质变化、肺系数、肺组织病理学改变、纤维化相关生物标志物含量和生存率分析,用 2.5 mg/kg 的 BLM 进行一次性气管内滴注的方式构建 C57BL/6J 的 IPF 小鼠模型是最合适的用量,为进一步探索 IPF 的相关发病机制和治疗方法提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] KARAMPITSAKOS T, JUAN-GUARDELA B M, TZOUVELEKIS A, et al. Precision medicine advances in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. EBioMedicine, 2023, 95: 104766.
- [2] RAGHU G, REMY-JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 205(9): e18-e47.
- [3] LUPPI F, KALLURI M, FAVERIO P, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis beyond the lung: understanding disease mechanisms to improve diagnosis and management [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 109.
- [4] GANDHI S, TONELLI R, MURRAY M, et al. Environmental causes of idiopathic pulmonary fibrosis [J].

- Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16481.
- [5] BRYCE ROBINSON N, KRIEGER K, KHAN F M, et al. The current state of animal models in research: a review [J]. Int J Surg, 2019, 72: 9–13.
- [6] 李智慧, 余学庆, 杨曙光, 等. 特发性肺纤维化实验模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 118–127.
- LI Z H, YU X Q, YANG S G, et al. Research progress on experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 118–127.
- [7] 郭琦琦, 李毅, 翁恒泽, 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.
- [8] 谢新宇, 王晶珂, 邓佩佩, 等. 抗肿瘤抗生素博来霉素的研究进展 [J]. 煤炭与化工, 2016, 39(3): 76–78.
- XIE X Y, WANG J K, DENG P P, et al. Research progress of bleomycin as antitumor antibiotic [J]. Coal Chem Ind, 2016, 39(3): 76–78.
- [9] 宋淑萍, 张晓晔. 博来霉素诱导 G57BL/6 与 ICR 小鼠肺间质纤维化模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(4): 289–291, 366.
- SONG S F, ZHANG X Y. Comparison of the effects of bleomycin on the induction of pulmonary fibrosis in C57BL/6 and ICR mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(4): 289–291, 366.
- [10] 徐梦真, 刘传国, 巩丽丽, 等. 基于 PD-1/PD-L1 信号通路探讨麦门冬汤对特发性肺纤维化小鼠的影响 [J]. 中成药, 2024, 46(2): 437–443.
- XU M Z, LIU C G, GONG L L, et al. Effects of Ophiopogonis Root Decoction on a mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis based on PD-1/PD-L1 signaling pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(2): 437–443.
- [11] TANNER L, SINGLE A B, BHONGIR R V, et al. Small-molecule-mediated OGG1 inhibition attenuates pulmonary inflammation and lung fibrosis in a murine lung fibrosis model [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 643.
- [12] HOPKINS R B, BURKE N, FELL C, et al. Epidemiology and survival of idiopathic pulmonary fibrosis from national data in Canada [J]. Eur Respir J, 2016, 48(1): 187–195.
- [13] 闫丹丹, 李兰, 朱庆均. 特发性肺纤维化造模方法及其在中医药研究中的应用 [J]. 中南药学, 2016, 14(6): 620–624.
- YAN D D, LI L, ZHU Q J. Model of idiopathic pulmonary fibrosis and its application in the research of Chinese medicine [J]. Cent South Pharm, 2016, 14(6): 620–624.
- [14] 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.
- [15] 肖洋, 张俊威, 王伟明. 特发性肺间质纤维化动物模型制作探讨 [J]. 吉林医学, 2016, 37(4): 941–943.
- XIAO Y, ZHANG J W, WANG W M. Discussion on making animal model of idiopathic pulmonary interstitial fibrosis [J]. Jilin Med J, 2016, 37(4): 941–943.
- [16] SONG S, FU Z, GUAN R, et al. Intracellular hydroxyproline imprinting following resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir J, 2022, 59(5): 2100864.
- [17] 冯嘉文, 黄恺, 景菲, 等. 扶正化痰方调控 TGF- β /Smad 信号通路对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响 [J]. 中成药, 2024, 46(6): 2042–2047.
- FENG J W, HUANG K, JING F, et al. Effect of Fuzheng Huayu recipe regulating TGF- β /Smad signaling pathway on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(6): 2042–2047.
- [18] 于睿智, 王天娇, 臧凝子, 等. 博来霉素联合脂多糖诱导大鼠特发性肺纤维化急性加重动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 833–845.
- YU R Z, WANG T J, ZANG N Z, et al. Establishment of model of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in rats induced by bleomycin and lipopolysaccharide [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 833–845.
- [19] EVANGELISTA-LEITE D, CARREIRA A C O, GILPIN S E, et al. Protective effects of extracellular matrix-derived hydrogels in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2022, 28(3): 517–530.
- [20] DURAIRAJ P, VENKATESAN S, NARAYANAN V, et al. Curcumin inhibition of bleomycin-induced changes in lung collagen synthesis, deposition and assembly [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(12): 7775–7785.
- [21] THEOCHARIS A D, SKANDALIS S S, GIALELI C, et al. Extracellular matrix structure [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 97: 4–27.
- [22] SHINDE A V, HUMERES C, FRANGOGIANNIS N G. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(1): 298–309.
- [23] MASSAGUÉ J, SHEPPARD D. TGF- β signaling in health and disease [J]. Cell, 2023, 186(19): 4007–4037.

- [24] ALYOUSSEF A. Blocking TGF- β type 1 receptor partially reversed skin tissue damage in experimentally induced atopic dermatitis in mice [J]. Cytokine, 2018, 106: 45–53. idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Mol Med, 2021, 48 (1): 132.
- [25] YE Z, HU Y. TGF- β 1: Gentlemanly orchestrator in [收稿日期] 2024-07-23

小鼠疾病模型中肠道微生物群与溃疡性结肠炎炎症反应之间相互作用的新见解以及使用 PE&AFWE 治疗的可能作用机制

炎症性肠病(IBD)是一种异质性的慢性肠道炎症,包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)。包括先天性免疫细胞在内的肠道先天性免疫可抵御病原体和肠道微生物群的过度进入,同时保持对常驻肠道微生物群的免疫耐受,其特点可能是产生快速和非特异性反应。微生物群失调与 IBD 发病机制之间的关系是复杂和动态的。当肠道生态系统菌群失调时,肠道微生物群的丰度和多样性降低,使宿主更容易受到外源性和内源性致病性肠道微生物群的攻击。本研究旨在全面评估 UC 内微生物种群、其中致病性肠道微生物的信号通路与炎症反应之间的关系,并了解使用 PE&AFWE(罂粟提取物[*Papaver nudicaule* L.]和青蒿提取物)对 UC 调节的效果。

利用 UC 小鼠模型,在元基因组测序确定肠道微生物组特征的基础上,利用随机森林和贝叶斯网络分析方法以及组织病理学分析进一步研究了肠道微生物菌群失调与肠道微生物菌群之间的关系:(1)发现炎症性肠病 UC 模型肠道微生物群中相对丰度最高的 5 个肠道微生物群与排名前 5 位的天然细菌一致。模型组的丰度变化有 3 种类型:衣原体/蛋白质细菌和变形杆菌增加、真菌减少和类杆菌未发生明显变化。模型组与对照组有显著差异,有 1308 个差异表达物种的丰度变化大于或等于 2 倍;(2)与治疗前的对照组相比,UC 组粪便菌群中的固缩菌比例下降了 37.5%,蛋白菌比例上升了 14.29%;(3)筛选出信号通路明显丰富和增加的是“花生四烯酸代谢通路”和“吞噬体通路”,两者在用药后都呈下降趋势;(4)根据不同 OTU 与 UC 模型/PE&AFWE 给药的因果关系,筛选出直接相关的 OTU 网络,发现 UC 组直接影响 OTU69,随后对 OTU12、OTU121、OTU93 和 OTU7 产生一连串影响,这可能是启动正常小鼠病理变化的作用途径;(5)发现在 PE&AFWE 处理前后组中,常见差异表达 OTU 与 PE&AFWE 和 UC 之间存在因果关系。由此,我们了解到 PE&AFWE 可直接影响 OTU90,然后抑制 UC,通过影响 OTU118 抑制花生四烯酸代谢途径的活性,进而抑制 OTU93 和 OTU7 在肠道微生物群中的定植;(6)结肠组织病理学观察和评分(HS)显示,模型组与对照组具有显著性差异($P < 0.001$),且用药后磺胺沙拉嗪组(SASP)和 PE&AFWE 组均具有显著性恢复($P < 0.0001$)。

本文展示了肠道微生物群失调与 IBD 的因果关系和炎症代谢途径,其中 5 种机会性病原体直接导致了 IBD。PE&AFWE 降低了肠道微生物群中蛋白菌的丰度,组织病理学也有显著改善。

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(2): 83–97. doi: 10.1002/ame2.12405)。

张小玉,张依曼,刘佳,等. 急性高原低氧诱导心肌损伤小鼠模型免疫印迹实验内参蛋白的选择 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 684–694.

ZHANG X Y, ZHANG Y M, LIU J, et al. Loading control for Western Blot in myocardial injury models induced by acute high altitude [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 684–694.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.007

急性高原低氧诱导心肌损伤小鼠模型免疫印迹实验内参蛋白的选择

张小玉^{1,2}, 张依曼^{1,2}, 刘佳², 来宝长², 乌仁塔娜³, 田红燕¹, 殷倩^{1,2*}

(1. 西安交通大学第一附属医院周围血管科, 西安 710061; 2. 西安交通大学心血管研究中心, 西安 710061; 3. 青海大学医学院高原医学研究中心, 青海大学高原医学应用重点实验室, 西宁 810001)

【摘要】 目的 急性高原低氧通过调控蛋白表达诱导心肌细胞损伤, 常用 Western Blot 检测蛋白变化, 但内参蛋白的选择及其变化尚无系统研究。**方法** 本文主要应用低压低氧大舱模拟 6000 m 海拔低氧 24 和 72 h, 苏木素-伊红 (HE) 染色确定心肌损伤模型的成功建立; Western Blot 检测不同内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 表达, 同时应用丽春红 S 染色和考马斯亮蓝染色检测总蛋白的表达; 进一步体外应用成年小鼠心肌细胞 (AMCMs) 建立低氧 12 和 24 h 损伤模型, TUNEL 染色确定细胞损伤模型的建立, Western Blot 检测上述不同内参蛋白表达, 同时应用丽春红 S 染色和考马斯亮蓝染色检测总蛋白的表达。**结果** 在成功建立急性高原低压低氧 24 和 72 h 模型的基础上, 总蛋白表达量一致; 内参蛋白 vinculin、EIF5、 β -actin、cyclophilin B 和 cofilin 表达量一致; α -tubulin 在低压低氧 24 h 组和平原对照组表达一致, 低压低氧 72 h 组较平原对照组明显下降; 而 GAPDH 在低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组表达较平原对照组明显上升。在成功建立低氧 12 和 24 h 诱导 AMCMs 损伤的基础上, 总蛋白表达量一致, 内参蛋白 EIF5 和 β -actin 表达量一致, vinculin、 α -tubulin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 在低氧 12 h 组和低氧 24 h 组较常氧对照组表达升高。**结论** 急性高原低压低氧和体外低氧诱导心肌细胞损伤模型进行 Western Blot 时, EIF5 和 β -actin 可作为合适的内参蛋白选择, 选择总蛋白作为内参更客观。

【关键词】 高原低氧; 心肌细胞损伤; 免疫印迹实验; 内参蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0684-11

Loading control for Western Blot in myocardial injury models induced by acute high altitude

ZHANG Xiaoyu^{1,2}, ZHANG Yiman^{1,2}, LIU Jia², LAI Baochang²,
WUREN Tana³, TIAN Hongyan¹, YIN Qian^{1,2*}

【基金项目】 西安交通大学第一附属医院院基金 (2023GYZX02, 2018QN-04), 西安交通大学基本科研业务费 (xzy012023131)。

Funded by hospital foundation of the Frist Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (2023GYZX02, 2018QN-04), Basic Scientific Research Fund of Xi'an Jiaotong University (xzy012023131).

【作者简介】 张小玉, 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 低氧诱导的心血管损伤的防治作用及机制。Email: zhangxy_ynu@163.com

【通信作者】 殷倩, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 缺血及低压低氧诱导心血管损伤的组织修复机制及药物研发。

Email: yinqian610@xjtu.edu.cn

(1. Department of Peripheral Vascular, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Cardiovascular Research Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Research Center of High-Altitude Medicine, School of Medicine, Qinghai University, Key Laboratory for Application of High-Altitude Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China)

Corresponding author: YIN Qian. E-mail: yinqian610@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective The myocardial injury was induced by hypobaric hypoxia through regulating the expression of various proteins. The expression of proteins was mainly detected by western blot, but the selection of internal reference proteins and their variations have not been systematically studied. **Methods** Myocardial injury was induced in a low-pressure, low-oxygen chamber simulating an altitude of 6000 m, for 24 and 72 h. Establishment of the myocardial injury model was confirmed by hematoxylin eosin (HE) staining. Expression levels of internal control proteins, including vinculin, α -tubulin, eukaryotic translation initiation factor-5 (EIF5), β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), cyclophilin B, and cofilin, were detected by Western Blot and total protein expression was detected by Ponceau S and Coomassie Blue staining. An adult mouse cardiomyocytes (AMCMs) injury model was induced by hypoxia for 12 and 24 h and confirmed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL staining). Internal control proteins were detected by Western Blot, as in the *in vivo* model, and total protein expression was detected by Ponceau S and Coomassie Blue staining. **Results** A myocardial injury model was established by hypobaric hypoxia for 24 and 72 h, the total protein expression levels remained consistent. The expression of internal control proteins including vinculin, EIF5, β -actin, cyclophilin B, and cofilin was consistent between the control and model groups. Expression levels of α -tubulin were similar in the plain control and 24 h hypobaric hypoxia group, but were significantly lower in the 72 h hypobaric hypoxia group compared with the plain control group. GAPDH expression was significantly higher in the 24 and 72 h hypobaric hypoxia groups than in the plain control group. An AMCM injury model was established by hypoxia for 12 and 24 h. Total protein levels and expression levels of the internal control proteins EIF5 and β -actin were consistent, but vinculin, α -tubulin, GAPDH, cyclophilin B, and cofilin expression levels were higher in both hypoxia groups compared with the normoxic control group. **Conclusions** EIF5 and β -actin may be the suitable loading control proteins for studies of hypobaric hypoxia-induced myocardial injury using Western Blot. Total protein is also a good choice for hypobaric hypoxia studies.

【Keywords】 hypobaric hypoxia; myocardial injury; Western Blot; loading control proteins

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

急性高原低氧是指人体在短时间内进入高海拔地区,由于大气中氧气分压降低,导致机体组织细胞供氧不足的病理生理现象^[1]。这种低氧状态对成年小鼠心肌细胞 (adult mouse cardiomyocytes, AMCMs) 的损伤尤为关键,因为心肌细胞对氧气的依赖性极高,任何程度的低氧都可能导致心肌细胞功能障碍,甚至引发心肌梗死等严重心血管事件^[2]。因此,研究急性高原低氧对心肌细胞的损伤对于理解高原病的病理生理机制、开发预防和治疗策略具有至关重要的意义。

蛋白表达层面的研究对于低氧后心肌细胞损伤的机制与药物探索具有重要的意义,如低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF)^[3-4]、凋亡

相关蛋白 (如 Bax、Bcl-2)^[4]、炎症介质 (如 TNF- α 、IL-6)^[5] 在低氧心肌损伤进程中发挥重要作用。检测蛋白表达的方法有 Western Blot^[6]、酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[7]、免疫荧光染色^[8]、质谱分析^[9]、单分子荧光^[10]、原位杂交和免疫组化^[11] 等。在这些检测方法中,Western Blot 因其成本低、高灵敏度和特异性而被广泛应用。该技术通过电泳分离蛋白质,将蛋白转印到 NC 膜或 PVDF 膜上,使用特异性抗体检测目标蛋白的存在和表达水平^[12]。Western Blot 的关键步骤之一是选择合适的内参蛋白,以校正样本间上样量的差异,确保实验结果的准确性^[13]。常用的内参包括黏着斑

蛋白(vinculin)、微管蛋白(tubulin)、真核翻译起始因子 5(eukaryotic translation initiation factor 5, EIF5)、肌动蛋白(actin)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、亲环蛋白 B(cyclophilin B)和丝切蛋白(cofilin)等,选择合适的内参蛋白对于标准化目的蛋白的表达水平具有重要意义^[14]。

内参蛋白的选择需要考虑不同条件下内参蛋白的稳定性和可靠性^[15]。低氧对内参蛋白的表达具有一定的影响,已有研究表明在内皮细胞、肝癌细胞或结肠癌细胞中由于低氧会导致 GAPDH 的表达量增高^[16]。而目前针对急性低氧条件下内参蛋白的选择尚未有系统明确的研究。因此,本研究通过 Western Blot 方法检测急性高原不同低氧条件下损伤的心肌细胞中不同内参蛋白的表达水平,并以总蛋白进行系统校正,以明确不同低氧条件下损伤心肌细胞的内参蛋白选择,为更多的急性高原心肌损伤的机制研究和药物开发提供蛋白表达研究的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 18 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20 ~ 25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。小鼠饲养期间,恒温在(23 ± 2)℃,相对湿度为 40% ~ 60%,光照明暗交替时间 12 h/12 h,每笼(塑料小鼠笼,长 × 宽 × 高:403 mm × 165 mm × 175 mm)饲养 3 只小鼠,自由采食和饮水,所有器材、垫料、饲料等均在使用前进行高压灭菌处理,饲养于西安交通大学动物中心 SPF 级屏障环境【SYXK(陕)2023-004】。所有实验操作符合动物福利和动物实验伦理要求,并通过西安交通大学生物医学伦理委员会审查批准(XJTUAE2024-1931)后施行。

1.1.2 主要试剂与仪器

AMCMs 分离所需耗材和试剂参考团队已发表文章^[17],1 × PBS(Servicebio, G0002),多聚甲醛(Coolaber, SL18301-500 mL),伊红染液(Servicebio, G1005-2),苏木素染液(Servicebio, G1005-1), anti-vinculin rabbit pAb(Servicebio,

GB111328-100), EIF5 抗体(C-14, Santa Cruz Biotechnology, sc-282), β-actin(C4, Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), anti-GAPDH mouse mAb(Servicebio, GB12002-100), α-tubulin(DM1A) mouse mAb(Cell Signaling, 3873T), cyclophilin B polyclonal antibody(Proteintech, 11607-1-AP), cofilin polyclonal antibody(Proteintech, 10960-1-AP), PIPA 裂解液(Servicebio, G2002),脱脂奶粉(美国 BD 公司, 232100), 20 × TBST buffer(Coolaber, SL13271)增强型 ECL 化学发光检测试剂盒(Vazyme, E411-04),丽春红 S(Solarbio, P8330),考马斯亮蓝 G250(沃凯生物, D10828), BCA 蛋白质测定试剂盒(Thermo Pierce, USA), 0.5 mol/L Tris HCl pH = 6.8(Proandy, 10157-2), 1.5 mol/L Tris HCl pH = 8.8(Proandy, 10152-2), 30% Acr-Bis(Proandy, 10149-2)。

低压低氧高原舱(中航风雷,中国),生物安全柜(Thermo Fisher Scientific,美国),共聚焦显微镜(NIKON,日本),石蜡切片机(Thermo Fisher Scientific,美国),全自动数字切片扫描仪(Pannoramic,匈牙利),荧光显微镜(ZERSS,德国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠急性高原低氧模型建立

将 18 只实验小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为 3 组,分别为平原对照组、低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组,每组 6 只。将平原对照组的 6 只小鼠放在海拔 400 m 的西安交通大学清洁级动物实验室饲养,将低压低氧组的 12 只小鼠放在青海大学高原医学中心低压低氧舱内饲养,模拟海拔为 6000 m。小鼠组织样本采集在海拔 4000 m 低压低氧舱内进行。避免进一步复氧对蛋白表达的影响,步骤如下:称重后用 1%戊巴比妥钠,按照 5 μL/g 小鼠体质量的剂量,腹腔注射进行麻醉,开胸后剪开右心耳,应用 4℃预冷的 1 × PBS 灌注左心室,待肝血液冲洗后变为白色时,收集心脏组织,心底部置于 4%多聚甲醛固定,留作组织染色用,心尖部置于液氮冻存,用于 Western Blot。

1.2.2 AMCMs 分离及低氧模型的建立

采用非 Langendorff 方法分离 AMCMs,将小鼠麻醉后,开胸,暴露心脏,沿脊柱剪断降主动脉和

下腔静脉。EDTA 灌注快速注入右心室。以止血钳夹住主动脉,将心脏剪下,放在 EDTA 缓冲液中。之后依次从左心室灌注 EDTA 灌注液、混合酶消化液到一定程度,将组织撕碎,轻吹分离消化好的细胞,加入终止液终止消化。通过过滤、沉降、梯度复钙、沉降后,以适当密度种于包被层粘连蛋白的培养皿中^[16]。分离好的 AMCMs 置于 1% O₂、5% CO₂ 的低氧舱中,分别低氧 12 和 24 h 后应用 RIPA 裂解液进行裂解,进行 Western Blot。

1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色

应用心脏组织切片依次进行:二甲苯中脱蜡 5 min × 2 次,无水乙醇 5 min × 2 次,95% 乙醇 2 min × 2 次,70% 乙醇 2 min,50% 乙醇 2 min,30% 乙醇 2 min,蒸馏水 2 min。苏木素染色 3 min,蒸馏水漂洗洗去浮色,进而用流水冲洗 5 min,1% 盐酸酒精分化 5 s,用流水冲洗 5 min。30% 乙醇 2 min,50% 乙醇 2 min,70% 乙醇 2 min,95% 乙醇 2 min,伊红染色 3 min,无水乙醇 5 min × 2 次。二甲苯 5 min × 2 次,最后中性树胶封片。

1.2.4 TUNEL 染色

低氧后的 AMCMs,应用 1 × PBS 洗涤细胞 1 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,1 × PBS 洗涤 1 次。0.3% Triton X-100 室温孵育 5 min,1 × PBS 洗涤两次。参照说明书配制适当量的 TUNEL 检测液,应用 50 μL TUNEL 检测液覆盖细胞样本,37 °C 避光孵育 90 min,用 1 × PBS 洗涤 2 次。抗荧光淬灭封片液(含 hoechst)封片,应用荧光显微镜进行观察。

1.2.5 Western Blot

在放射免疫沉淀测定法 RIPA 裂解缓冲液中裂解心脏组织,研磨仪 60 Hz 研磨 60 s,冰上放置 10 min。通过在 4 °C 下以 12 000 r/min 离心分离上清液 15 min,并使用牛血清白蛋白作为标准的 BCA 蛋白质测定试剂盒检测总蛋白质浓度。将蛋白质样品与 5 × 上样缓冲液混合,于金属浴 96 °C 中变性 10 min,然后冷却并储存在 -80 °C 进行进一步研究。每个样品上样 50 μg 用 10% SDS-PAGE 凝胶分离,在电泳条件下(400 mA, 1.5 h)转移到 NC 膜中。在丽春红染液中染色 3 min 并进行图像采集。其后用 1 × TBST 洗至无色,在含有 5% 脱脂奶粉中封闭膜 1 h。4 °C 过夜孵育一抗 vinculin(1:1000 稀释度)、α-tubulin(1:

2000 稀释度)、EIF5(1:5000 稀释度)、β-actin(1:1000 稀释度)和 GAPDH(1:1000 稀释度)。其后 1 × TBST 摇床洗膜 8 min,共 4 次,室温孵育辣根过氧化物酶偶联兔抗小鼠二抗(1:8000 稀释度)、羊抗兔二抗(1:2000 稀释度)1 h。1 × TBST 摇床洗膜 8 min,共 4 次,并进行发光及胶片扫描。

1.2.6 考马斯亮蓝染色

与 Western Blot 对应相同上样量及上样顺序进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将凝胶置于考马斯亮蓝溶液(0.25% G250,45% 甲醇,10% 冰乙酸)中室温孵育 60 min,并在脱色溶液(8% 冰乙酸,25% 甲醇)中脱色过夜,最后应用双蒸水洗涤,并进行图像采集。

1.3 统计学分析

应用 Image J 1.54 g 对条带灰度值和荧光阳性信号进行定量统计,Western Blot 灰度值归一化处理。所有数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 GraphPad Prism 8.0 进行统计处理。单因素方差分析对低氧不同时间进行统计学评价, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

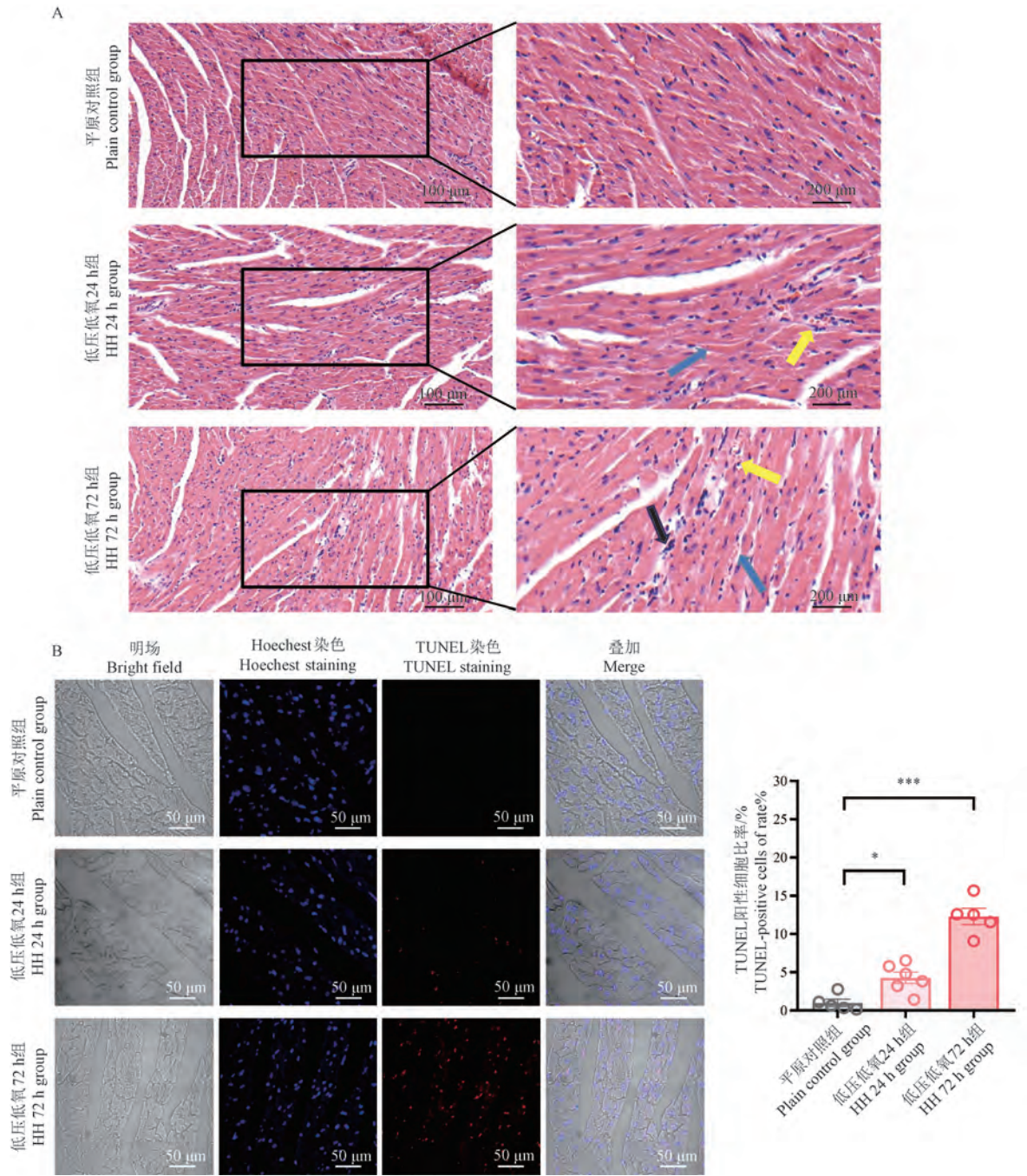
2 结果

2.1 急性高原低氧诱导心肌损伤模型的建立

本部分主要明确 6000 m 海拔诱导 24 和 72 h 可成功建立小鼠心肌细胞损伤模型,应用 HE 染色观察心肌细胞形态、炎症浸润等指标。HE 染色显示低倍镜下和高倍镜下平原对照组小鼠心脏组织结构未见明显异常,心肌细胞染色清楚,细胞核致密,心肌纤维排列整齐;低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组低倍镜下可见小鼠心肌间质血管明显充血,横纹不清;高倍镜下可见部分心肌肿胀,胞浆成颗粒样变性,偶见炎性细胞浸润。为进一步验证急性高原低氧诱导心肌损伤模型建立成功,本研究使用 TUNEL 对小鼠心脏组织进行染色,TUNEL 染色显色低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组 40 倍镜下可见明显阳性信号,见图 1。

2.2 不同内参的 Western Blot 分析

通过 Western Blot 检测心脏组织中 vinculin、α-tubulin、EIF5、β-actin 和 GAPDH 的蛋白表达水平(图 2A)。内参蛋白 vinculin、EIF5、β-actin、cyclophilin B 和 cofilin 在不同条件下表达水平无



注:A:低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织 HE 染色;蓝色箭头:心肌细胞肿胀;黑色箭头:炎性细胞浸润;黄色箭头:心肌间质血管充血;B:低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织 TUNEL 染色及统计结果;与平原对照组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

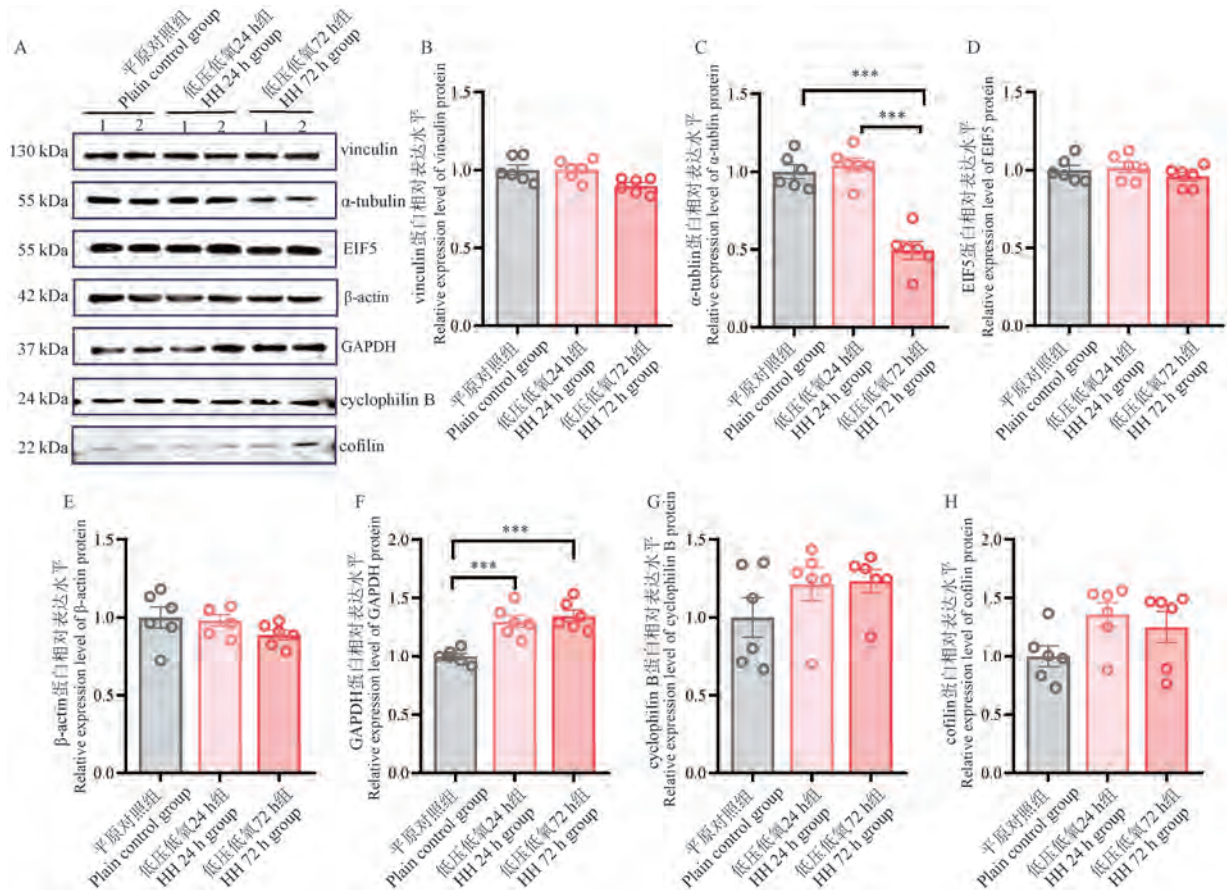
图 1 低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织 HE 和 TUNEL 染色

Note. A. HE staining of mouse heart tissue with injury induced by hypobaric hypoxia. Blue arrows. Swelling of cardiomyocytes. Black arrows. Infiltration of inflammatory cells. Yellow arrows. Vasodilation of myocardial interstitial vessels. B. TUNEL staining and statistical results of mouse heart tissue with injury induced by hypobaric hypoxia. Compared with the plain control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 HE and TUNEL staining of mouse heart tissue with injury induced by hypobaric hypoxia

显著性差异(图 2B、图 2D ~ 图 2E、图 2G ~ 图 2H),在高原低氧模型中不同低氧时间心脏组

织中 α -tubulin 和 GAPDH 的蛋白水平各不相同。 α -tubulin 在低压低氧 24 h 组和平原对照表达一



注:A:Western Blot 检测小鼠心脏组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达;1 和 2 为同组两个样本;B:vinculin 蛋白的相对表达水平;C: α -tubulin 蛋白的相对表达水平;D:EIF5 蛋白的相对表达水平;E: β -actin 蛋白的相对表达水平;F:GAPDH 蛋白的相对表达水平;G:cyclophilin B 蛋白的相对表达水平;H:cofilin 蛋白的相对表达水平。

图 2 Western Blot 检测低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达

Note. A. Protein expressions of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in mouse heart tissue under hypobaric hypoxic conditions were detected by Western Blot. Samples 1 and 2 are biological replicates from the same experimental group. B. Relative expression level of vinculin protein. C. Relative expression level of α -tubulin protein. D. Relative expression level of EIF5 protein. E. Relative expression level of β -actin protein. F. Relative expression level of GAPDH protein. G. Relative expression level of cyclophilin B protein. H. Relative expression level of cofilin protein.

Figure 2 Western Blot test protein expression of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in injury mouse heart tissue induced by hypobaric hypoxia

致,低压低氧 72 h 较平原对照的蛋白水平下降(图 2C)。相反,GAPDH 在低压低氧 24 和 72 h 蛋白水平增加(图 2F)。

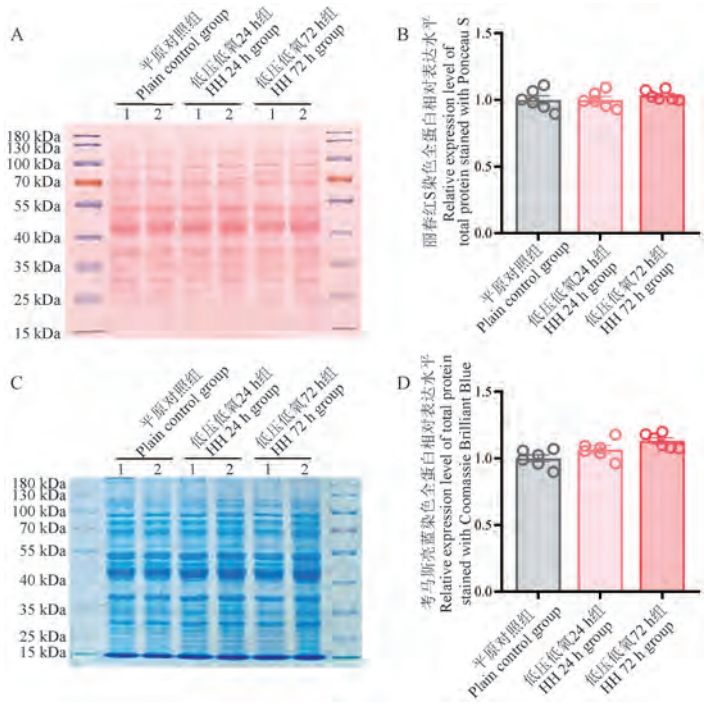
2.3 急性高原低氧诱导心肌损伤模型心脏组织中的总蛋白水平

进一步,应用总蛋白进行上样量的校正,首先在 Western Blot 转膜结束后,应用丽春红对 NC 膜染色(图 3A),统计结果显示总蛋白水平一致(图 3B)。并同时 Western Blot 电泳时对应跑胶并进行考马斯亮蓝染色(图 3C),结果显示不

同急性高原低氧诱导心肌损伤模型的心脏组织中总蛋白表达一致(图 3D)。

2.4 AMCMs 细胞分离和低氧模型的建立

心肌细胞是心脏组织低氧损伤最易累及的细胞,凋亡是心肌细胞低氧诱导损伤的主要死亡模式,本部分在团队建立 AMCMs 分离方法的基础上,进一步探究低氧诱导 AMCMs 损伤的不同内参选择。首先应用 TUNEL 染色确定心肌细胞低氧损伤模型建立,应用 1% O_2 、5% CO_2 条件低氧 12 和 24 h,TUNEL 染色结果(图 4)显示低氧

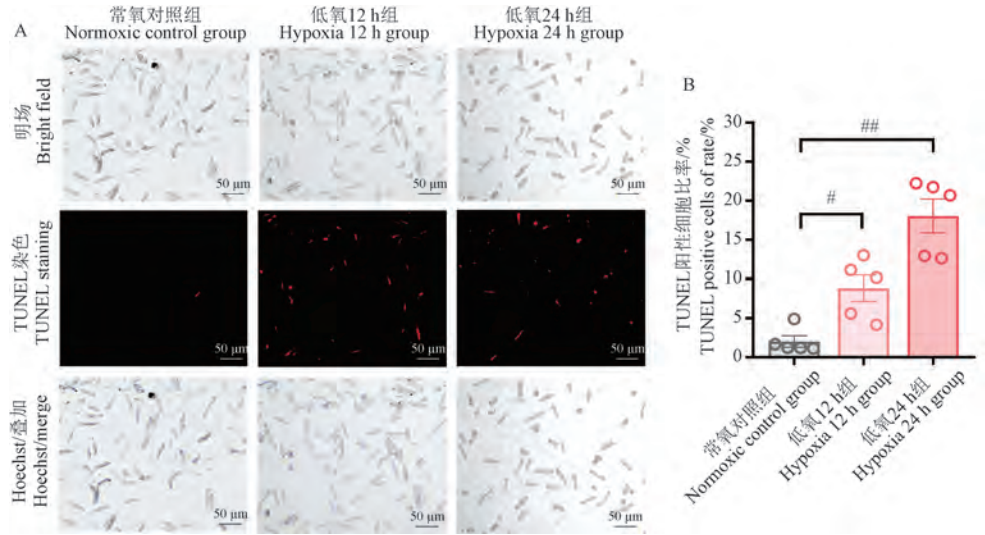


注:A:NC 膜丽春红 S 染色总蛋白图像;B:丽春红染色总蛋白的定量分析;C:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;D:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析。

图 3 低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织中总蛋白水平

Note. A. Image of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. B. Quantitative analysis of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. C. Image of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel. D. Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel.

Figure 3 Total protein expression level in injury mouse heart tissue induced by hypobaric hypoxia



注:A:分离培养的 AMCMs 细胞经 TUNEL 染色观察凋亡数目,Hoechst 染色确定细胞总数;B:低氧 12 h 和低氧 24 h 组与常氧对照组 TUNEL 阳性细胞比率;与常氧对照组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。(下图同)

图 4 低氧诱导 AMCMs 损伤模型的建立

Note. A. Number of apoptosis cells of isolated and cultured AMCMs was observer by TUNEL staining, and the total number of cells was determined by Hoechst. B. Ratio of TUNEL-positive cells in the hypoxia 12 h and hypoxia 24 h groups compared to the normoxia control group. Compared with the normoxic control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$. (The same in the following figures)

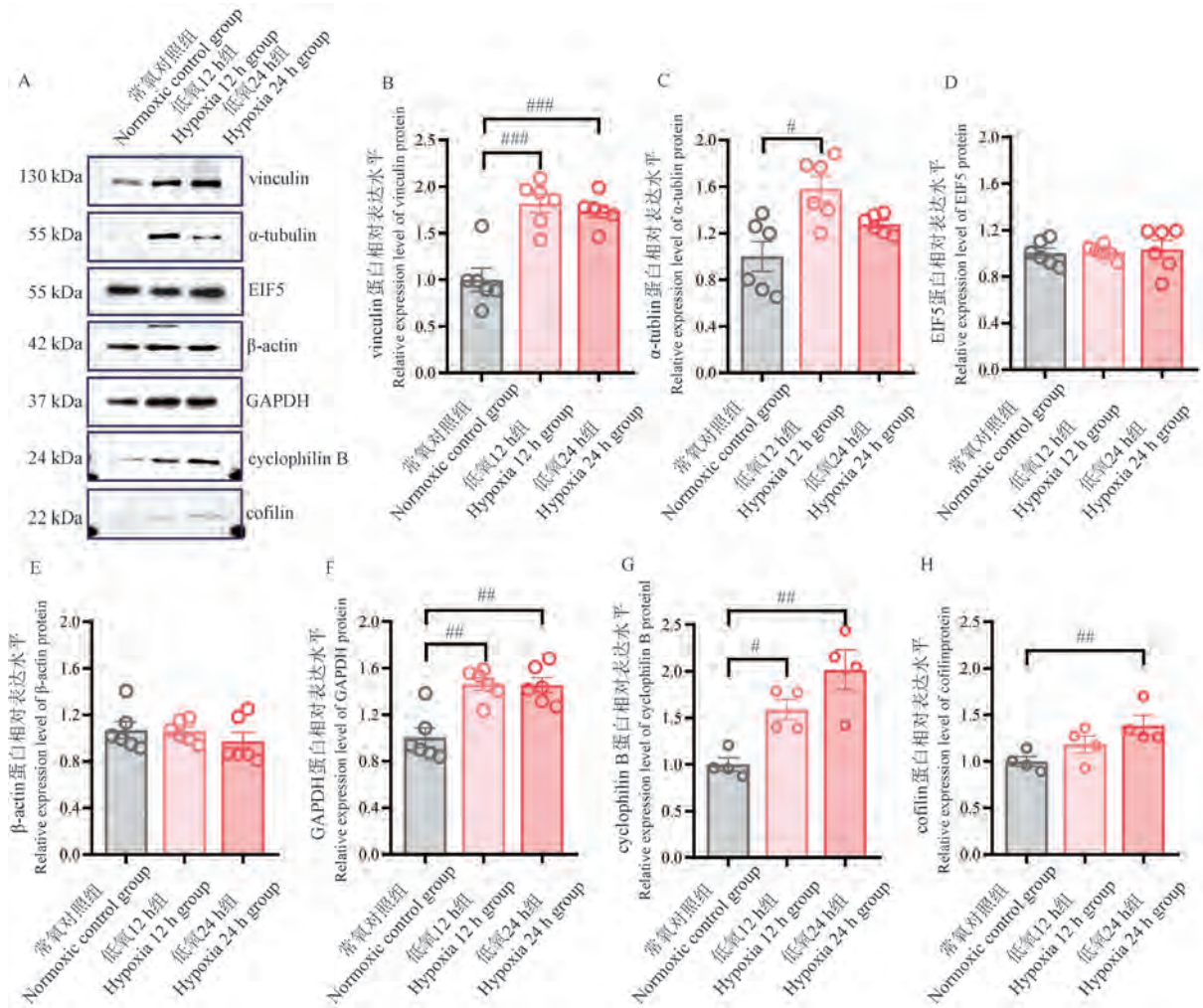
Figure 4 Establishment of a hypoxia-induced damage model in AMCMs

12h 和 24 h 条件下 AMCMs 凋亡细胞比例显著增加,提示低氧损伤心肌细胞模型的成功建立。

2.5 不同内参蛋白的 Western Blot 分析

通过 Western Blot 检测损伤 AMCMs 中不同内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH 的蛋白表达变化(图 5A),结果显示内参

蛋白 EIF5 和 β -actin 在不同条件下表达水平无显著性差异性(图 5D,图 5E);在不同低氧时间可诱导 α -tubulin、vinculin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 的蛋白水平变化,低氧 12 和 24 h 可诱导 vinculin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白水平上升(图 5B,图 5F ~ 图 5H),而低氧 12 h 可诱导



注:A:Western Blot 检测低氧诱导的损伤 AMCMs 中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达;B:vinculin 蛋白的相对表达水平;C: α -tubulin 蛋白的相对表达水平;D:EIF5 蛋白的相对表达水平;E: β -actin 蛋白的相对表达水平;F:GAPDH 蛋白的相对表达水平;G:cyclophilin B 蛋白的相对表达水平;H:cofilin 蛋白的相对表达水平;与常氧对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 5 Western Blot 检测低氧诱导的损伤 AMCMs 中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达

Note. A. Protein expressions of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in AMCMs under hypoxic induce conditions were detected by Western Blot. B. Relative expression level of vinculin protein. C. Relative expression level of α -tubulin protein. D. Relative expression level of EIF5 protein. E. Relative expression level of β -actin protein. F. Relative expression level of GAPDH protein. G. Relative expression level of cyclophilin B protein. H. Relative expression level of cofilin protein. Compared with the normoxic control group, *** $P < 0.001$.

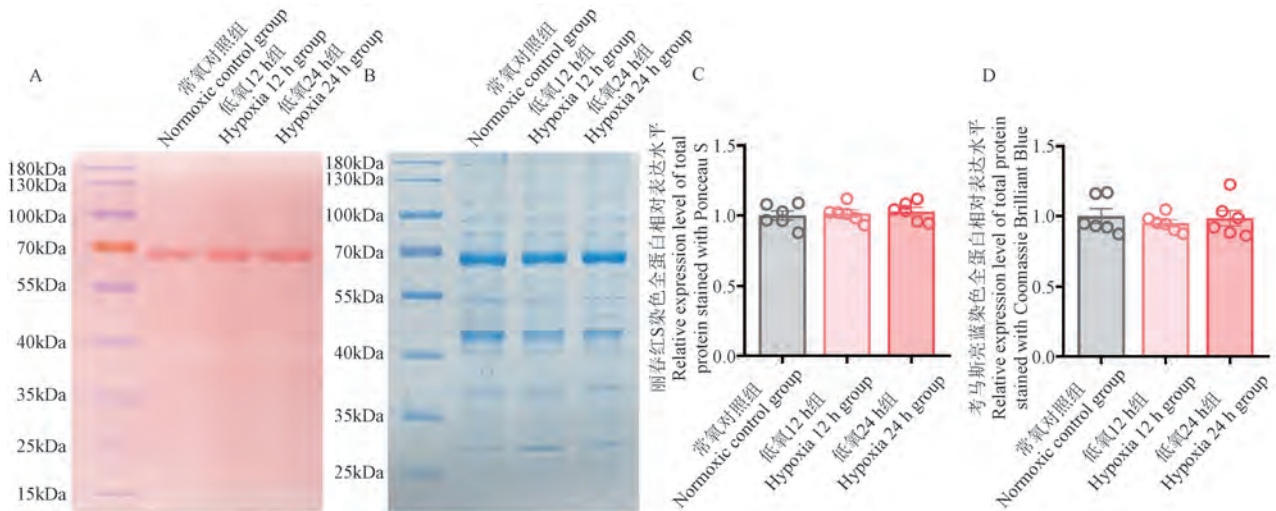
Figure 5 Protein expression of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in injury AMCMs induced by hypoxia

α -tubulin 蛋白水平上升(图 5C)。

2.6 AMCMs 细胞低氧模型中的总蛋白水平

与组织样本一致,在 Western Blot 转膜后应用丽春红对 NC 膜进行染色结果显示总蛋白水平

一致(图 6A,图 6C)。同时,Western Blot 电泳时对应跑胶,并应用考马斯亮蓝对凝胶进行染色,结果显示 AMCMs 细胞低氧模型中总蛋白水平一致(图 6B,图 6D)。



注:A:NC 膜丽春红 S 染色总蛋白图像;B:NC 膜丽春红染色总蛋白的定量分析;C:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;D:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析。

图 6 低氧诱导的损伤 AMCMs 中总蛋白表达水平

Note. A. Image of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. B. Quantitative analysis of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. C. Image of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel. D. Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel.

Figure 6 Total protein expression level in injury AMCMs induced by hypoxia

3 讨论

高原低氧是一种常见于高海拔地区的病理生理现象,长期处于高原低氧环境下,人体将面临一系列健康问题,包括低氧引起的心肺负荷增加、脑部损伤、免疫功能下降等^[18]。因此,研究高原低氧的危害不仅有助于揭示高原环境下的生理变化和适应机制,还有助于制定相应的预防和保健措施,保护高原地区居民的身体健康^[19]。低氧诱导的损害主要是由 HIFs 协调,在低氧条件下,HIF-1 α 与 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)及 p300 等共激活因子相互作用,共同调节靶基因的表达^[20]。这些基因参与细胞代谢、细胞生长/死亡、细胞增殖、糖酵解和免疫反应等多个过程。总体来说,低氧导致蛋白质合成、能量代谢和线粒体呼吸等发生变化^[21]。蛋白作为细胞的基本功能单位,其表达水平的变化可以反映出细胞对高原

低氧的适应能力和损伤程度^[22]。通过蛋白表达研究,可以深入了解高原低氧环境下细胞信号传导、代谢途径等方面的变化,为探讨高原低氧机制提供重要线索^[23]。在蛋白表达研究中,内参蛋白至关重要,主要是作为上样量标准化和校正的参考。

选择合适的内参对于确保研究结果的准确性和可靠性至关重要,有助于避免实验误差和扭曲结果的风险,从而确保研究结论的科学性^[24]。目前应用的内参主要包括 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH。Vinculin 是一种重要的肌动蛋白丝(F-actin)结合蛋白,积极参与细胞-基质和细胞-细胞粘附^[25];Tubulin 分为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 等多种 tubulin,其中 α -tubulin 和 β -tubulin 可以形成异源二聚体,是形成微管的最主要的两种 tubulin^[26];EIF5 蛋白是 43S 前起始复合物(43S PIC)的关键成员^[27];肌动蛋白(actin)是细胞的一种重要骨架蛋白,在不同物种之间高度保守;

GAPDH 是一种重要的糖酵解酶,可催化 3-磷酸甘油醛生成 1,3-二磷酸甘油酸。这 5 个基因通常被用作 Western Blot 的内参蛋白。在高原低氧条件下,不同内参的表达水平可能会受到影响,进而影响心肌细胞功能和代谢。这种变化主要来源于高原低氧环境对细胞内代谢通路和信号传导的影响,导致内参表达水平发生变化。本研究主要探讨此 5 种常用内参在低氧诱导心肌损伤中的变化,旨在为高原低氧心肌细胞的后续研究以及其他相关研究提供内参选择的依据和参考。

已有研究显示,某些常用内参蛋白(vinculin、actin 或 tubulin)在低氧等刺激条件下,其表达水平或稳定性可能发生变化,如 MISRA 等^[28]发现在 A431 细胞低氧未引起 vinculin 或 paxillin 的表达改变;LEMLER 等^[29]发现在新生犊牛中损伤的右心室心肌,与对照组相比,vinculin 的总含量变化不大,微管蛋白含量增加。而在高原低氧中目前无系统研究损伤心肌的内参蛋白的变化,本研究发现在急性高原低氧 72 h 心脏组织中 vinculin 的含量未发生变化,而在 AMCMs 低氧 12 h 后 vinculin 的表达水平升高。心脏组织和 AMCMs 低氧损伤 vinculin 的表达趋势不同,AMCMs 为了适应低氧环境而增强细胞粘附和细胞骨架重组,已有研究发现低氧条件下新生大鼠心肌细胞骨架 vinculin 发生变化,且 92 kDa 胶原酶增加,伴随 92 kDa 胶原酶释放的细胞骨架变化可能代表了心肌细胞的一种防御机制^[30]。而在心脏组织中有其他的细胞,如成纤维细胞、内皮细胞可以参与低氧损伤机制的调控,可能导致出现组织 vinculin 和心肌细胞体外低氧 vinculin 变化不一致。WANG 等^[15]报道称在缺血性心脏组织中,actin 和 tubulin 发生显著变化。本研究发现在急性高原低氧 72 h 心脏组织中 α -tubulin 的表达水平下降;而 AMCMs 低氧 24 h 相比低氧 12 h 中 α -tubulin 表达下降,而与常氧对照无统计学意义。AMCMs 低氧 12 h 可能由代偿机制来应对这种应激。YIN 等^[31]在研究中发现低氧会通过增加泛素-蛋白酶活性来减少 γ -tubulin 的水平。ZHANG 等^[32]也发现 β -tubulin 在低氧/复氧后的 mRNA 和蛋白表达水平下降。这也证明了心脏组织在急性低氧条件下损伤会诱导 α -tubulin 的减少。GRAVEN 等^[33]研究发现低氧调节内皮细胞

中 GAPDH 表达上调。本研究发现在急性高原低氧 72 h 心脏组织中 GAPDH 和 AMCMs 低氧 24 h 的表达水平均增加。由于 GAPDH 是一种经典的糖酵解酶,在低氧后 HIF-1 调节糖酵解相关的多种酶,导致 GAPDH 表达升高^[21]。EIF5 和 β -actin 的表达水平在高原低氧和 AMCMs 低氧中均表达稳定。本研究提示,急性高原低氧诱导心脏组织损伤和低氧诱导 AMCMs 损伤进行 Western Blot 检测时可选择 EIF5 和 β -actin 作为内参。

本研究还通过丽春红 S 对 NC 膜染色和使用考马斯亮蓝凝胶,发现总蛋白的含量在低氧条件下是稳定表达的。因此,使用总蛋白分析提供了一种蛋白质含量的测量方法,该测量避免了使用单个内参蛋白由于低氧导致表达水平的改变,而总蛋白在比较来自不同模型时保持不变。因此,本研究结果建议研究急性高原低氧诱导心脏损伤时可选择 EIF5 和 β -actin 作为内参蛋白,同时样本量充足条件下也可将总蛋白作为上样量校正标准。

参 考 文 献(References)

- [1] MALLET R T, BURTSCHER J, PIALOUX V, et al. Molecular mechanisms of high-altitude acclimatization [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1698.
- [2] 黄岚. 逐梦喜马拉雅 开拓通往生命禁区的心路 [J]. *中华心血管病杂志*, 2021, 49(10): 943-944.
HUANG L. Dreaming of the Himalaya: pioneering a path to the forbidden regions of life [J]. *Chin J Cardiol*, 2021, 49(10): 943-944.
- [3] YUAN X, RUAN W, BOBROW B, et al. Targeting hypoxia-inducible factors: therapeutic opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(3): 175-200.
- [4] FENG J, ZHAN J, MA S. LRG1 promotes hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis and autophagy by regulating hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8897-8907.
- [5] WANG G, WANG J, LI X, et al. Hypoxia and TNF- α synergistically induce expression of IL-6 and IL-8 in human fibroblast-like synoviocytes via enhancing TAK1/NF- κ B/HIF-1 α signaling [J]. *Inflammation*, 2023, 46(3): 912-924.
- [6] PILLAI-KASTOORI L, SCHUTZ-GESCHWENDER A R, HARFORD J A. A systematic approach to quantitative Western blot analysis [J]. *Anal Biochem*, 2020, 593: 113608.
- [7] HAYRAPETYAN H, TRAN T, TELLEZ-CORRALES E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and

- applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2612: 1–17.
- [8] 贾坤, 苏建荣. 细胞中同时检测特定标志物蛋白和基因表达方法的建立 [J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(2): 120–125.
- JIA K, SU J R. Establishment of a technique for simultaneous detection of specific marker proteins and gene expression levels in cells [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2021, 16(2): 120–125.
- [9] VALLEJO D D, ROJAS RAMÍREZ C, PARSON K F, et al. Mass spectrometry methods for measuring protein stability [J]. *Chem Rev*, 2022, 122(8): 7690–7719.
- [10] PODE Z, PERI-NAOR R, GEORGESON J M, et al. Protein recognition by a pattern-generating fluorescent molecular probe [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(12): 1161–1168.
- [11] OLIVER A, HAGEN J, YANG S, et al. In situ hybridization (ISH) combined with immunohistochemistry (IHC) for co-detection of eGFR RNA and phosphorylated EGFR protein in lung cancer tissue [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2593: 221–232.
- [12] MEFTAHİ G H, BAHARI Z, ZAREI MAHMOUDABADI A, et al. Applications of western blot technique: from bench to bedside [J]. *Biochem Mol Biol Educ*, 2021, 49(4): 509–517.
- [13] WU L, HU X, TANG H, et al. Valid application of western blotting [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 3517–3520.
- [14] NERIS R L S, DOBLES A M C, GOMES A V. Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: advantages of stain-free technology [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2261: 443–456.
- [15] WANG Q, HAN W, MA C, et al. Western blot normalization: time to choose a proper loading control seriously [J]. *Electrophoresis*, 2023, 44(9/10): 854–863.
- [16] ZHANG J Y, ZHANG F, HONG C Q, et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells [J]. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(1): 10–22.
- [17] 李笑汝, 姚新叶, 刘佳, 等. 成年小鼠心肌细胞腺病毒转染及低氧/复氧诱导损伤模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(4): 435–443.
- LI X R, YAO X Y, LIU J, et al. Models of adenoviral transfection and hypoxia/reoxygenation-induced injury in AMCMs of adult mouse cardiomyocytes [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(4): 435–443.
- [18] 孔晓婷, 汪元汲, 沈国双, 等. 高原低氧环境对人体的影响及药物干预研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2022, 38(9): 1523–1527.
- KONG X T, WANG Y J, SHEN G S, et al. The effects of high altitude hypoxia on the human body and the progress of drug intervention [J]. *J Mod Med Health*, 2022, 38(9): 1523–1527.
- [19] CHEN X, ZHANG J, LIN Y, et al. Mechanism, prevention and treatment of cognitive impairment caused by high altitude exposure [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1191058.
- [20] KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(5): 1469–1480.
- [21] LUO Z, TIAN M, YANG G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 218.
- [22] MA Y, HOU J, HUANG D, et al. Expression of protein phosphatase 4 in different tissues under hypoxia [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2023, 66(3): 577–583.
- [23] KIERANS S J, TAYLOR C T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology [J]. *J Physiol*, 2021, 599(1): 23–37.
- [24] JANES K A. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(371): rs2.
- [25] BAYS J L, DEMALI K A. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(16): 2999–3009.
- [26] LIU N, XIONG Y, REN Y, et al. Proteomic profiling and functional characterization of multiple post-translational modifications of tubulin [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3292–3304.
- [27] RAM A K, MALLIK M, REDDY R R, et al. Altered proteome in translation initiation fidelity defective eIF5^{G31R} mutant causes oxidative stress and DNA damage [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5033.
- [28] MISRA A, PANDEY C, SZE S K, et al. Hypoxia activated EGFR signaling induces epithelial to mesenchymal transition (EMT) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49766.
- [29] LEMLER M S, BIES R D, FRID M G, et al. Myocyte cytoskeletal disorganization and right heart failure in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(3): H1365–1376.
- [30] VANWINKLE W B, SNUGGS M, BUJA L M. Hypoxia-induced alterations in cytoskeleton coincide with collagenase expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27(12): 2531–2542.
- [31] YIN C, LUI E S W, JIANG T, et al. Proteolysis of γ -tubulin small complex proteins is mediated by the ubiquitin-proteasome system [J]. *FEBS Lett*, 2021, 595(15): 1987–1996.
- [32] ZHANG X, ZHOU Y, CHANG X, et al. Tongyang Huoxue decoction (TYHX) ameliorating hypoxia/reoxygenation-induced disequilibrium of calcium homeostasis via regulating β -tubulin in rabbit sinoatrial node cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318: 117006.
- [33] GRAVEN K K, TROXLER R F, KORNFELD H, et al. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(39): 24446–24453.

[收稿日期] 2024-06-11

赵永智,张亦文,罗燕琴,等. 基于行为实验的睡眠干扰应激诱发焦虑抑郁共患动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 695-703.

ZHAO Y Z, ZHANG Y W, LUO Y Q, et al. Establishment of an animal model of comorbid anxiety and depression induced by sleep interruption stress based on behavioral experiments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 695-703.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.008

基于行为实验的睡眠干扰应激诱发焦虑抑郁 共患动物模型的建立

赵永智^{1,3,4}, 张亦文³, 罗燕琴^{1,3}, 陈芳³, 许燕飞³, 潘瑞乐³, 常琪³,
刘萌潮^{1,3}, 何清湖², 姜宁^{3*}, 刘新民^{1,2,4*}

(1. 石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832003; 2. 湖南医药学院/
中国-巴基斯坦中医药中心, 湖南 怀化 418000; 3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,
北京 100193; 4. 宁波大学新药技术研究院, 浙江 宁波 315211)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨不同周期睡眠干扰(sleep interruption, SI)应激对 ICR 小鼠情绪行为的影响, 建立 SI 应激致焦虑抑郁共患小鼠模型。**方法** 雄性 ICR(4 ~ 5 周龄)小鼠 72 只, 分别按 1、2、3 周应激周期, 随机分为空白组和模型组; 除空白组外, 模型组分别给予 1、2、3 周的 SI 应激。应激结束后采用旷场、高架十字迷宫、明暗箱、大理石掩埋和强迫游泳行为学检测方法评估小鼠情绪行为, 并采用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清皮质酮(CORT)的含量。**结果** 在 SI 应激 1 周后, 模型组小鼠的大理石掩埋个数较空白组均显著增加($P < 0.05$); 应激 2 周后, 与对照组相比, 模型组小鼠明暗箱穿箱次数显著降低($P < 0.05$)、大理石掩埋个数显著增加($P < 0.01$); 应激 3 周后, 模型组小鼠大理石掩埋个数显著增加($P < 0.05$), 明暗箱穿箱次数显著降低($P < 0.05$), 小鼠强迫游泳的不动时间显著增加($P < 0.01$)。**结论** 睡眠干扰应激 2 周时小鼠表现出明显的焦虑样行为, 而 3 周后出现显著的焦虑和抑郁行为变化, 表明睡眠干扰应激 3 周后成功构建了小鼠焦虑抑郁共患模型。

【关键词】 睡眠干扰; 焦虑抑郁; 动物模型; 行为学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0695-09

Establishment of an animal model of comorbid anxiety and depression induced by sleep interruption stress based on behavioral experiments

ZHAO Yongzhi^{1,3,4}, ZHANG Yiwen³, LUO Yanqin^{1,3}, CHEN Fang³, XU Yanfei³, PAN Ruile³,
CHANG Qi³, LIU Mengchao^{1,3}, HE Qinghu², JIANG Ning^{3*}, LIU Xinmin^{1,2,4*}

【基金项目】 中国医学科学院创新工程(2021-I2M-1-034), 自治区重大科技专项(2023A02010-3), 新疆生产建设兵团 NGHJC 项目(2023AA503), 2024 年国家中医药管理局中医药国际合作专项(中心类项目 XDZYJZC-001)。

Funded by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(2021-I2M-1-034), Major Science and Technology Project in the Autonomous Region (2023A02010-3), NGHJC Project of Xinjiang Production and Construction Corps (2023AA503), 2024 International Cooperation Special Project of Traditional Chinese Medicine by the National Administration of Traditional Chinese Medicine (Center Category Project, XDZYJZC-001).

【作者简介】 赵永智, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理学。Email: ZhaoYongZh1@163.com

【通信作者】 刘新民, 男, 博士, 教授, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理学。

Email: liuxinmin@hotmail.com;

姜宁, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 动物行为学和神经精神药理学。Email: jiangning0603@163.com。

* 共同通信作者

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Sino-Pakistan Center on Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China; 3. China Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 4. Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)
Corresponding author: JIANG Ning. E-mail: jiangning0603@163.com; LIU Xinmin. E-mail: liuxinmin@hotmail.com

【Abstract】 Objective This study aimed to investigate the effects of sleep interruption (SI) cycles on emotional behavior in ICR mice, and to establish a mouse model of comorbid anxiety and depression induced by SI. **Methods** Seventy-two male ICR mice (4 ~ 5 weeks old) were divided randomly into a blank group and a model group. Mice in the model group were subjected to SI stress modeling for 1, 2, and 3 weeks, respectively. After modeling, emotional behaviors were evaluated using open-field, elevated plus maze, light-dark box, marble-burying, and forced-swimming tests. Serum corticosterone levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Mice in the model group buried significantly more marbles after 1 week of SI stress, compared with the blank group ($P < 0.05$). After 2 weeks of stress, mice in the model group also showed a significant decrease in the number of crossings in the light-dark box ($P < 0.05$) and a significant increase in the number of marbles buried ($P < 0.01$) compared with the control group. After 3 weeks of stress, mice in the model group showed a significant increase in the number of marbles buried ($P < 0.05$), a significant decrease in the number of crossings in the light-dark box ($P < 0.05$), and a significant increase in immobility time in the forced-swim test ($P < 0.01$). **Conclusions** ICR mice exhibited significant anxiety-related behaviors after 2 weeks of SI modeling and significant anxiety- and depressive-related behavioral changes after 3 weeks. Three weeks of SI stress can be used to establish a model of comorbid anxiety and depression.

【Keywords】 sleep interruption; anxiety-depression; animal model; behavior
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

睡眠问题作为一种常见的健康困扰,与焦虑抑郁等情绪障碍密切相关^[1-3]。特别是在快节奏的现代社会,长期的睡眠问题正困扰着大量的群体。中国睡眠研究会发布的《2024 情绪与健康睡眠白皮书》显示,约 95% 的受访者认为睡眠问题是其首要健康问题,这进一步凸显了睡眠健康与心理健康之间的密切联系^[4]。睡眠是维持机体正常生理和心理功能的关键过程,其长期缺失或不足会引发一系列健康问题,尤其是在情绪调控方面,睡眠不足可能导致大脑相关区域功能异常,从而加剧焦虑、抑郁情绪^[5-6]。因此探索睡眠问题与焦虑抑郁障碍之间的关联,不仅有助于揭示情绪障碍的潜在机制,也为心理健康的干预措施提供了新的视角^[7-9]。

动物模型是研究情绪行为和应激反应的重要工具。构建稳定、可靠的动物模型对于推动神经精神系统疾病的病理机制研究及治疗方案的开发具有重要意义,这也成为当前科学研究的热点领域^[10-11]。睡眠干扰(sleep interruption, SI)是

通过模拟现代社会多重压力下人类睡眠障碍特征的造模方法,是将动物置于睡眠干扰仪中,使其睡眠时间不足、睡眠质量下降,比较贴近现代社会睡眠问题的实际特征^[12]。已有研究表明睡眠干扰会破坏正常睡眠结构,减少深度睡眠时间,会增加实验动物的焦虑行为^[13-14]。但关于睡眠干扰造模周期、造模时间各文献较少且有所不同,本研究采用睡眠干扰范式,利用旷场实验、高架十字迷宫实验、明暗箱实验、大理石掩埋实验和强迫游泳实验等焦虑和抑郁行为学实验比较不同 SI 应激周期对 ICR 小鼠焦虑抑郁行为的影响,旨在为建立稳定的 SI 导致焦虑和焦虑抑郁模型提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 72 只,4 ~ 5 周龄,体重 24 ~ 27 g,采购于北京维通利华实验动物技术

有限公司【SCXK(京)2021-0006】,动物饲养于中国医学科学院药用植物研究所【SYXK(京)2023-0008】,饲养期间小鼠自由饮食饮水,温度 22 ~ 24 ℃,湿度(55 ± 10)%,明暗各半循环照明。实验期间所有操作遵循动物实验 3R 原则,并经过中国医学科学院药用植物研究所实验伦理委员会审批(SLXD-20240409021)。

1.1.2 主要试剂与仪器

小鼠皮质酮(corticosterone, CORT)试剂盒购于南京建成生物工程研究所(货号:H205-1-2;检测方法:干粉法)。滚筒式睡眠干扰仪 KSXE01、小鼠旷场实验测试箱 KSZ02、明暗箱测试箱 KSL01、KSQT6 型小鼠强迫游泳分析仪(均由中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员中心和北京康森益友科技有限公司联合研制);高架十字迷宫视频分析软件(版本 7.15,美国 Any Maze 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

ICR 小鼠 72 只,按照造模周期分为 1、2、3 周,每个周期小鼠各 24 只,随机分为 2 组:空白组($n = 12$)和模型组($n = 12$),实验期间所有动物自由饮水摄食。

1.2.2 SI 模型的建立

睡眠干扰模型组小鼠采用睡眠干扰仪应激造模,仪器由滚筒和计算机控制系统两部分组成,根据本课题组前期的工作基础建议设置参数:转速(1 r/min),转 1 圈,休息(2 min),转动方向随机^[15]。所有模型组小鼠在正式开始造模前先经过 3 d 的滚筒适应期(3 h/d),随后将模型组小鼠放入滚筒中按照预设参数开始造模,每天累计转动时间为 8 h,直至造模周期结束。当 SI 应激 1 周结束后,即第 2 天开始旷场、高架、明暗箱、大理石掩埋和强迫游泳行为学检测,每天一种测试,同理应激 2 和 3 周结束后依次进行上述行为学测试,结果用于统计分析。

1.2.3 旷场实验

实验测试前提前将动物放置在测试房间适应环境。测试仪器由黑色测试桶和连接摄像头的计算机实时分析检测系统构成。其中测试桶参数(直径 × 高度:40 cm × 40 cm);测试时间为 5 min;采用的评价指标是:(1)中央区运动路程

(cm);(2)中央区运动时间(s),通常焦虑状态的动物更少去中央区域活动。

1.2.4 高架十字迷宫实验

实验测试前先将动物放置测试房间适应环境,结束后开始实验,将小鼠放置在高架十字迷宫中央区同时小鼠面向开臂。测试时间:5 min;采用的评价指标:(1)开臂时间百分比(percentage of time spent in open arm, OT)% = 实验动物进入开臂的时间/(实验动物进入开臂的时间 + 实验动物进入闭臂的时间) × 100%;(2)开臂次数百分比(percentage of open arm entries, OE)% = 实验动物进入开臂的次数/(实验动物进入开臂的次数 + 实验动物进入闭臂的次数) × 100%。

1.2.5 明暗箱实验

实验测试前先将动物放置测试房间适应环境,结束后开始实验。测试时间:10 min;评价指标:(1)明室时间;(2)穿箱次数。通常焦虑状态的小鼠表现出明室时间和穿箱次数降低。

1.2.6 大理石掩埋实验

实验测试方法:(1)适应期:为了排除珠子带来的新恐惧,正式测试前需要把小鼠放在装有新垫料和珠子的笼子中适应 20 ~ 30 min;(2)检测期:测试时间为 20 min,珠子被玉米芯垫料覆盖 2/3 以上算被掩埋,实验采用的珠子为普通玻璃弹珠(直径约 14 mm),共 20 颗,4 × 5 的形式排开;玉米芯垫料 3 ~ 5 cm 厚;测试箱的尺寸:长 38 cm,宽 27 cm,高 17 cm;测试期间测试箱上方用透明的亚克力盖板覆盖防止小鼠逃逸,整个测试采用盲法控制。

1.2.7 强迫游泳实验

将小鼠放入小鼠强迫游泳仪中(高度为 20 cm、直径为 18 cm 的测试桶),测试水深 12 cm 保持水温(23 ~ 25 ℃)。动物放入仪器中先适应 2 min 后,点击开始,系统自动记录动物后 4 min 内的累积不动时间(不动状态即小鼠四肢有轻微动作以保持头在水面,呈现出停止挣扎或者呈漂浮状态)。

1.3 统计学分析

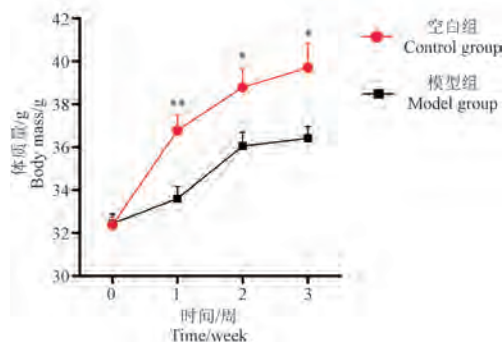
数据统计分析使用软件 SPASS 26.0,若数据符合正态分布,两组间比较使用独立样本 T 检验,否则使用 Mann-Whitney U 检验,结果表示为平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),当 $P < 0.05$ 为具有统计

学意义,并用 Graphpad Pism 9.5 绘制图表。

2 结果

2.1 不同周期 SI 应激对 ICR 小鼠体质量的影响

如图 1 所示为小鼠经 SI 应激 1 ~ 3 周后体质量的变化情况。与空白组相比,SI 应激 1 ~ 3 周后,ICR 模型组小鼠体质量均显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05, P < 0.05$)。其中,应激 1 周,相较于空白组体质量下降最为明显。



注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 SI 应激 1 ~ 3 周对 ICR 小鼠体质量的影响

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

Figure 1 Effects of 1 ~ 3 weeks of SI stress on the body mass of ICR mice

2.2 不同周期 SI 应激 ICR 小鼠旷场实验结果

如图 2 所示,通过对 ICR 小鼠进行 1 ~ 3 周的 SI 应激干预后,模型组与空白组小鼠在运动路程和运动时间中均未表现出显著性差异。这表明在本实验设定的条件下,1 ~ 3 周的 SI 应激并不会影响 ICR 小鼠的运动能力。

2.3 不同周期 SI 应激 ICR 小鼠高架十字迷宫实验结果

如图 3 所示,通过对 ICR 小鼠进行 1 ~ 3 周的 SI 应激干预后,模型组与空白组小鼠在开臂次数百分比和开臂时间百分比中均未表现出统计学意义。这一结果表明,在本实验条件下,ICR 小鼠可能对该应激模式的焦虑敏感性较低。

2.4 不同周期 SI 应激 ICR 小鼠明暗箱实验结果

如图 4 所示,ICR 小鼠经 SI 应激 1 周后,其模型组和空白组小鼠明暗箱实验明室时间和穿箱次数结果并无显著性差异;而应激 2 ~ 3 周后,其模型组小鼠均表现出穿箱次数显著下降 ($P < 0.05$),但明室停留时间均无明显变化。

2.5 不同周期 SI 应激 ICR 小鼠大理石掩埋实验结果

如图 5 所示,ICR 小鼠经 SI 应激 1 ~ 3 周后,其模型组小鼠掩埋珠子个数较空白组均显著增

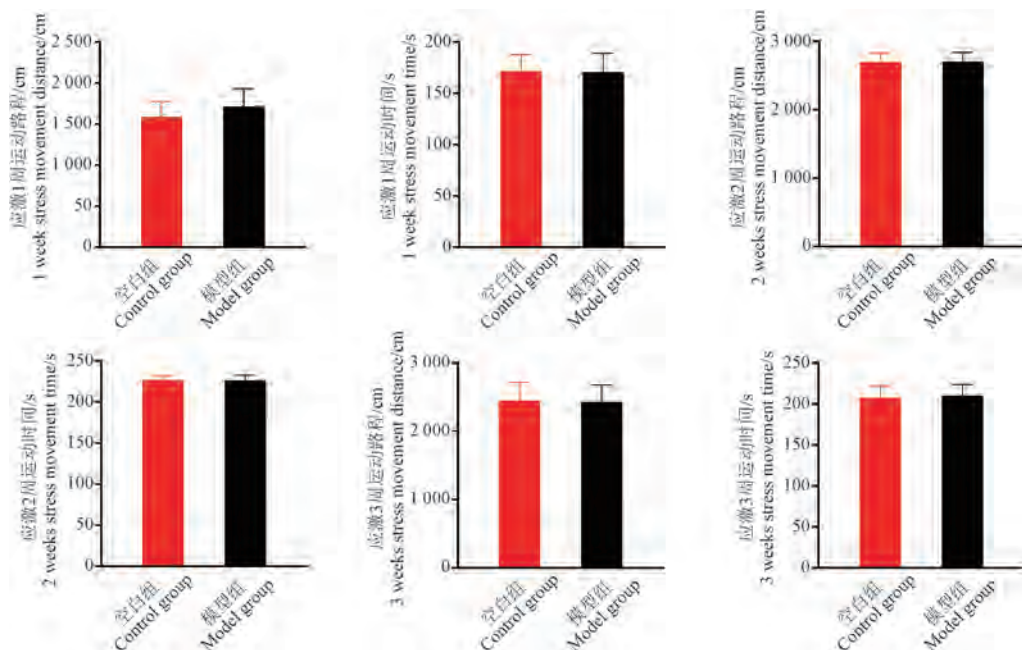


图 2 SI 应激 1 ~ 3 周 ICR 小鼠旷场实验结果

Figure 2 Results of the open field test in ICR mice after 1 ~ 3 weeks of SI stress

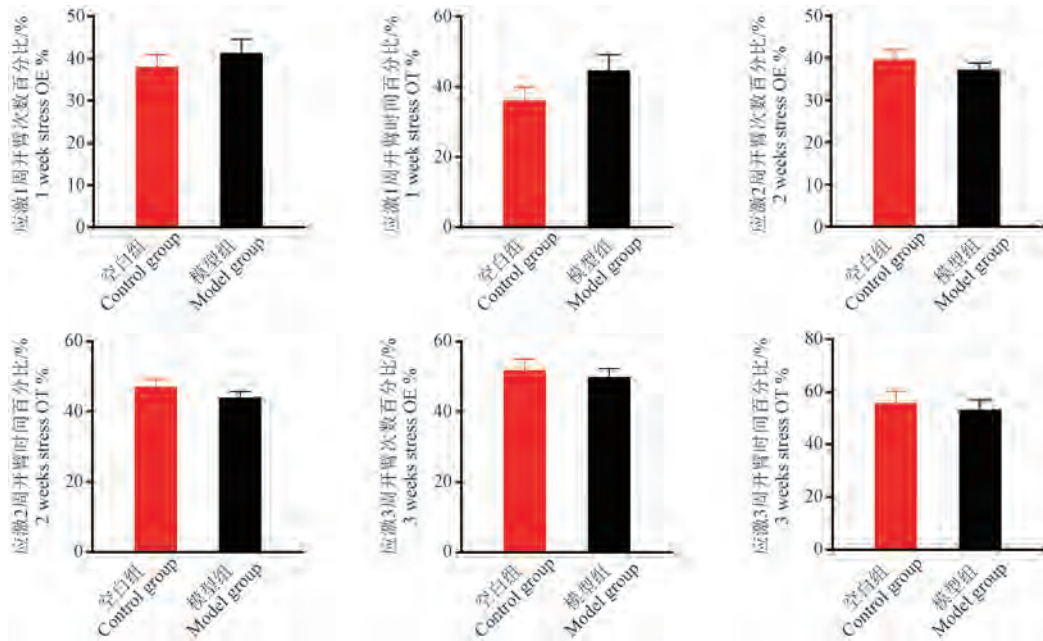


图3 SI 应激 1 ~ 3 周 ICR 小鼠高架十字迷宫实验结果

Figure 3 Results of the elevated plus-maze test for ICR mice after 1 ~ 3 weeks of SI stress

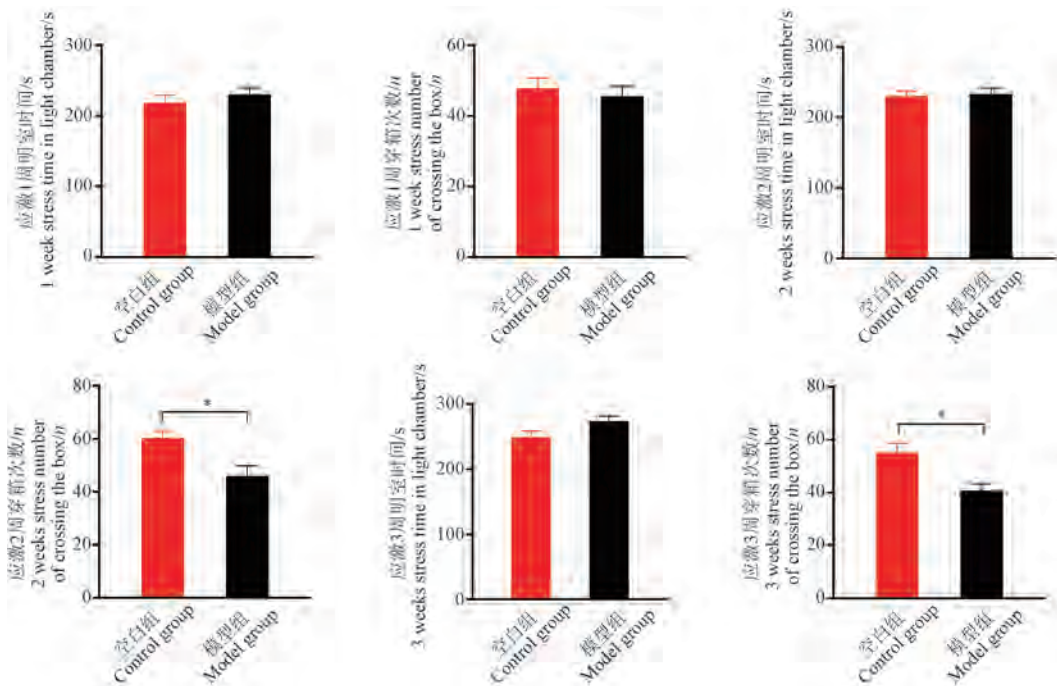


图4 SI 应激 1 ~ 3 周 ICR 小鼠明暗箱实验结果

Figure 4 Results of the light-dark test for ICR mice after 1 ~ 3 weeks of SI stress

加($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), 表明 ICR 小鼠在接受 SI 应激后, 会产生防御性掩埋行为。

2.6 不同周期 SI 应激 ICR 小鼠强迫游泳实验结果

如图 6 所示, 本实验还通过强迫游泳实验对

ICR 小鼠进行抑郁样行为评估, 与空白组相比, 经历 1 ~ 2 周 SI 应激的模型组小鼠无统计学意义, 而 ICR 小鼠经 SI 应激 3 周后, 模型组小鼠表现出不活动时间显著增加($P < 0.01$), 表明 ICR 小鼠出现了行为绝望的抑郁样状态。

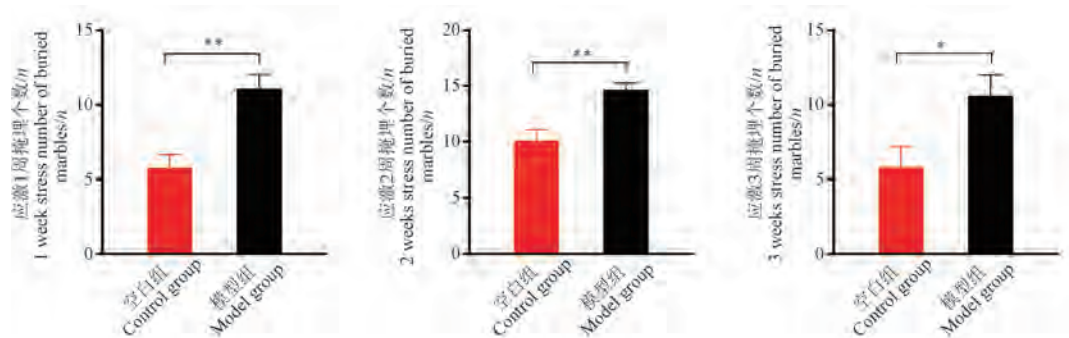


图 5 SI 应激 1 ~ 3 周 ICR 小鼠大理石掩埋实验结果

Figure 5 Results of the marble burying test for ICR mice after 1 ~ 3 weeks of SI stress

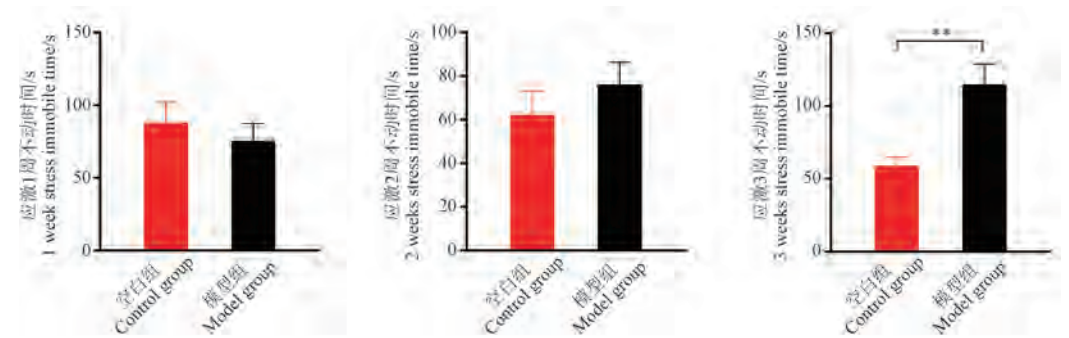


图 6 SI 应激 1 ~ 3 周 ICR 小鼠强迫游泳实验结果

Figure 6 Results of the forced swimming test in ICR mice after 1 ~ 3 weeks of SI stress

2.7 不同周期 SI 应激对 ICR 小鼠行为学实验结果汇总

后行为学检测结果汇总情况。汇总结果显示, ICR 小鼠经 SI 应激 2 周后即可出现焦虑样行为; 而应激 3 周后出现了焦虑抑郁共患的状态。

如表 1 所示,为 ICR 小鼠经 SI 应激 1 ~ 3 周

表 1 ICR 小鼠 SI 应激 1 ~ 3 周行为学结果汇总

Table 1 Summary of behavioral results in ICR mice subjected to 1 ~ 3 weeks of SI stress

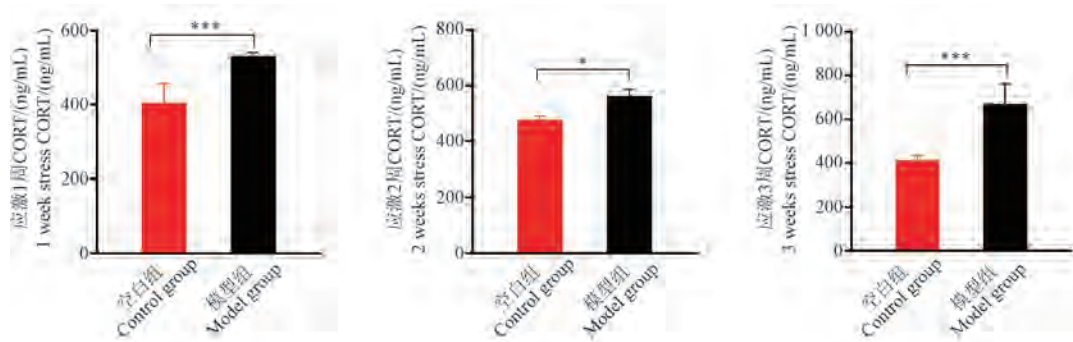
检测方法 Test methods	评价指标 Evaluation indexes	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks
旷场实验 Open field test	运动路程/cm Movement distance/cm	↑	↑	↑
	运动时间/s Time spent/s	↑	↑	↑
高架十字迷宫实验 Elevated plus-maze test	开臂次数百分比/% OE/%	↑	↓	↓
	开臂时间百分比/% OT/%	↑	↓	↓
明暗箱实验 Light-dark test	穿箱次数/n Number of crossing the box/n	↓	↓ *	↓ *
	明室时间/s Time spent in lighting room/s	↑	↑	↑
大理石掩埋实验 Marble burying test	掩埋个数/n Number of buried marbles/n	↑ **	↑ **	↑ *
强迫游泳实验 Forced swimming test	不动时间/s Immobile time/s	↓	↑	↑ **

注: ↑: 上升趋势; ↓: 下降趋势。
Note. ↑. Upward trend. ↓. Downward trend.

2.8 不同周期 SI 应激对 ICR 小鼠血清 CORT 含量的影响

如图 7 所示,分别为 ICR 小鼠经 SI 应激 1 ~ 3 周后空白组和模型组小鼠血清中 CORT 的含量。结果显示,SI 应激 1 和 3 周后,模型组小鼠血

清 CORT 含量极显著增加($P < 0.001$),而应激 2 周模型组小鼠血清 CORT 含量显著增加($P < 0.05$),这一结果也证明了 SI 应激的模式会使 ICR 小鼠产生压力性反应。



注:与空白组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 7 SI 1 ~ 3 周对 ICR 小鼠血清 CORT 含量的影响

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

Figure 7 Effects of 1 ~ 3 weeks of SI on serum CORT levels in ICR mice

3 讨论

在临床前研究中,封闭群 ICR 小鼠作为一种常见的实验动物品系,广泛应用于神经精神疾病(如焦虑、抑郁症等)发生机制的探索及新药筛选研究。本实验使用 SI 应激范式,并采用多种常见的焦虑行为学评估方法,包括旷场实验、高架十字迷宫实验、明暗箱实验及大理石掩埋实验,同时结合抑郁样行为评价方法强迫游泳实验,从多角度综合评估 SI 应激对 ICR 小鼠品系情绪行为的影响。

实验结果显示,ICR 小鼠接受 1 ~ 3 周的 SI 应激后,表现出实验穿箱次数显著减少;且大理石掩埋个数 1 ~ 3 周应激后也均表现出显著减少。大理石掩埋实验是一种针对啮齿类动物的防御性行为测试,常用于检测强迫症和自闭症中的重复刻板行为^[16-17],并被认为是动物恐惧和焦虑状态的行为表达方式。尽管该实验可用于抗焦虑药物的筛选,但由于其存在一定的局限性^[18-19],只能作为辅助性指标。因此,应将大理石掩埋实验与其他焦虑行为学评估方法结合使用,而不宜单独作为焦虑行为的评价标准。结果表明 ICR 小鼠在 SI 应激 2 ~ 3 周后,表现出显著的焦虑样行为,且旷场实验运动路程和运动时间

也均无显著性差异,表明该应激范式不会对 ICR 小鼠的运动能力产生影响;同时高架十字迷宫实验也无显著性差异。虽然 SI 应激 1 周后模型组小鼠大理石掩埋数量显著增加,但未出现其他行为学变化,无法直接判断小鼠出现了焦虑样行为,同时也体现出 ICR 小鼠在此应激方式下对明亮环境具有较高的敏感性。综合分析来看,ICR 小鼠接受 SI 应激后,表现出对旷场中央区和高架十字迷宫高悬开臂的条件低敏感性,但对明亮环境条件较为敏感。因此,明暗箱实验结合大理石掩埋实验更适用于 ICR 小鼠在 SI 应激诱导下焦虑行为的评估,可以多方面地揭示小鼠的焦虑行为特征。此外,本研究还采用了强迫游泳实验用来评估实验动物是否表现出抑郁样行为。结果显示,ICR 小鼠在经历 3 周的 SI 应激后不动时间显著增加,表现出明显的行为绝望状态,这一结果结合明暗箱和大理石掩埋实验的结果,可以进一步支持 ICR 小鼠在该应激范式下存在焦虑与抑郁共患的状态。

SI 和失眠与焦虑抑郁共患之间存在密切的生理和心理联系^[20]。研究表明,SI 会导致下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴的过度激活,增加 CORT 的分泌。而长期高水平的 CORT 会损害海马体功能,降低情绪调

节能力,从而诱发焦虑和抑郁^[21-22]。睡眠干扰还会影响前额叶皮层、杏仁核和海马等与情绪处理和应激反应密切相关的区域^[23]。本研究也检测了 ICR 小鼠 SI 应激 1 ~ 3 周小鼠血清中的“压力标志物”CORT 的水平^[24-25],来验证 SI 应激模式是否对小鼠产生压力性应激反应,结果显示应激 1 ~ 3 周后,ICR 小鼠血清 CORT 水平均显著升高,证实了此应激方式会引起小鼠 HPA 轴的激活。关于 SI 应激范式焦虑行为的发生机制,以及对情绪相关脑区前额叶皮层、海马和杏仁核等区域功能的影响,将在后续工作中进一步研究揭示。

综上所述,本研究通过 3 周的慢性 SI 应激成功构建了 ICR 小鼠的焦虑抑郁共患模型,并通过多种行为学实验从不同角度对模型进行了评估。本实验也是首次研究封闭群 ICR 小鼠品系应用 SI 范式成功建立焦虑抑郁共患模型报道。尽管 ICR 小鼠在旷场实验和高架十字迷宫实验中未表现出显著的焦虑样行为,但在明暗箱实验和大理石掩埋实验中对相关实验条件表现出较高的敏感性,特别是在明亮环境下呈现出显著的焦虑样行为,这也为后面模型的研究提供了合适的评价方法。此外,结合血清 ELISA 检测 CORT 结果,进一步证实了 SI 应激可导致小鼠 HPA 轴紊乱,表明该模型能够较好地模拟睡眠障碍诱发的情绪障碍特征。本研究为焦虑与抑郁共患的病理机制研究提供了一种可参考的动物模型,并在新药筛选和情绪障碍研究领域具有一定的应用价值。

参 考 文 献(References)

- [1] BEN SIMON E, VALLAT R, BARNES C M, et al. Sleep loss and the socio-emotional brain [J]. Trends Cogn Sci, 2020, 24(6): 435-450.
- [2] PALMER C A, ALFANO C A. Anxiety modifies the emotional effects of sleep loss [J]. Curr Opin Psychol, 2020, 34: 100-104.
- [3] LEWIS K S, GORDON-SMITH K, FORTY L, et al. Sleep loss as a trigger of mood episodes in bipolar disorder: individual differences based on diagnostic subtype and gender [J]. Br J Psychiatry, 2017, 211(3): 169-174.
- [4] 中国睡眠研究会. 2024 情绪与健康睡眠白皮书 [EB/OL]. (2024-03-11) [2024-08-30]. <https://www.derucci.com/static/home/images/ny19/2024>
- China Sleep Research Society. 2024 white paper on emotion and healthy sleep [EB/OL]. (2024-03-11) [2024-08-30]. <https://www.derucci.com/static/home/images/ny19/2024>
- [5] YAN T, QIU Y, YU X, et al. Glymphatic dysfunction: a bridge between sleep disturbance and mood disorders [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 658340.
- [6] BEN SIMON E, ROSSI A, HARVEY A G, et al. Overanxious and underslept [J]. Nat Hum Behav, 2020, 4(1): 100-110.
- [7] JEMCOV A, OLTHUIS J V, WATT M C, et al. Do anxiety sensitivity cognitive concerns and/or depression symptoms independently explain sleep disturbances in a high anxiety sensitive treatment-seeking sample? [J]. J Anxiety Disord, 2023, 97: 102731.
- [8] JAVAKHISHVILI M, SPATZ WIDOM C. Childhood maltreatment, sleep disturbances, and anxiety and depression: a prospective longitudinal investigation [J]. J Appl Dev Psychol, 2021, 77: 101351.
- [9] ZHANG Q, TONG M, JI Y, et al. The impact of sleep disturbances on treatment efficacy and prognosis in patients with depressive and anxiety disorders [J]. Front Psychiatry, 2024, 15: 1432538.
- [10] GORDON J, DZIRASA K. Animal models of psychiatric disorders [J]. Neuroscience, 2016, 321: 1-2.
- [11] PHELPS E A, LEDOUX J E. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior [J]. Neuron, 2005, 48(2): 175-187.
- [12] WANG H, LV J, JIANG N, et al. Ginsenoside Re protects against chronic restraint stress-induced cognitive deficits through regulation of NLRP3 and Nrf2 pathways in mice [J]. Phytother Res, 2021, 35(5): 2523-2535.
- [13] SAPOLSKY R M. Psychiatric distress in animals versus animal models of psychiatric distress [J]. Nat Neurosci, 2016, 19(11): 1387-1389.
- [14] KAISER T, ZHOU Y, FENG G. Animal models for neuropsychiatric disorders: prospects for circuit intervention [J]. Curr Opin Neurobiol, 2017, 45: 59-65.
- [15] 黄红, 陈碧清, 姜宁, 等. 鲜天麻对睡眠干扰诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2509-2516.
- HUANG H, CHEN B Q, JIANG N, et al. Fresh gastrodia elata ameliorates learning and memory impairments in sleep interruption induced mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(9): 2509-2516.
- [16] BURGETT L A, ALEXANDER T B, MOYA H A, et al. A revision to marble burying: video analysis during the marble burying task is imperative to understanding rodent behavior [J]. Lab Anim (NY), 2024, 53(12): 387-389.
- [17] CHANG Y C, COLE T B, COSTA L G. Prenatal and early-life diesel exhaust exposure causes autism-like behavioral

- changes in mice [J]. Part Fibre Toxicol, 2018, 15 (1): 18.
- [18] DE BOER S F, KOOLHAAS J M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 463(1/2/3): 145–161.
- [19] NICOLAS L B, KOLB Y, PRINSSEN E P M. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 547(1/2/3): 106–115.
- [20] CAO D, ZHAO Y, WANG Y, et al. Effects of sleep deprivation on anxiety-depressive-like behavior and neuroinflammation [J]. Brain Res, 2024, 1836: 148916.
- [21] MEERLO P, SGOIFO A, SUCHECKI D. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity [J]. Sleep Med Rev, 2008, 12(3): 197–210.
- [22] BAGLIONI C, BATTAGLIESE G, FEIGE B, et al. Insomnia as a predictor of depression: a meta-analytic evaluation of longitudinal epidemiological studies [J]. J Affect Disord, 2011, 135(1/2/3): 10–19.
- [23] GOLDSTEIN A N, WALKER M P. The role of sleep in emotional brain function [J]. Annu Rev Clin Psychol, 2014, 10: 679–708.
- [24] IONADI A, JOHNSON J D. Interaction between corticosterone and PER2 in regulating emotional behaviors in the rat [J]. Psychoneuroendocrinology, 2022, 137: 105628.
- [25] ROTH K A, KATZ R J. Stress, behavioral arousal, and open field activity-a reexamination of emotionality in the rat [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1979, 3(4): 247–263.
- [收稿日期] 2024-01-15

《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!

张震,邹吉宇,臧凝子,等. 特发性肺纤维化动物模型及中药干预作用的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 704–720.

ZHANG Z, ZOU J Y, ZANG N Z, et al. Research progress in animal models of idiopathic pulmonary fibrosis and interventional effect of traditional Chinese medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 704–720.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.009

特发性肺纤维化动物模型及中药干预作用的研究进展

张震¹, 邹吉宇¹, 臧凝子², 王天娇², 庞立健², 吕晓东^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

【摘要】 特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性进行性疾病, 确诊后生存期较短, 目前西药治疗效果欠佳, 且肺移植治疗价格高昂, 因此亟须寻求新的、安全有效的治疗手段。动物实验研究是验证药物作用机制的重要手段, 合理的 IPF 动物模型建立方法对 IPF 实验研究尤为重要。当前使用博来霉素 (bleomycin, BLM) 诱导 IPF 模型较为普遍。传统中药具有治疗靶点多、不良反应小等优点, 在 IPF 的治疗中正逐渐受到重视。通过中药干预 IPF 动物模型进而验证中药治疗 IPF 的具体作用靶点及作用机制是目前实验研究的中心内容。本文通过对 IPF 动物模型的选用、诱导方法、建立过程、评估方法及中药对模型的干预作用进行综述, 总结出 IPF 动物模型最佳建模方法及中药治疗现状, 以期 IPF 的科学研究和临床治疗提供依据。

【关键词】 特发性肺纤维化; 中药干预作用; 动物模型; 造模方法; 造模过程; 模型评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0704-17

Research progress in animal models of idiopathic pulmonary fibrosis and interventional effect of traditional Chinese medicine

ZHANG Zhen¹, ZOU Jiyu¹, ZANG Ningzi², WANG Tianjiao², PANG Lijian², LYU Xiaodong^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

Corresponding author: LYU Xiaodong. E-mail: deanofctcm@126.com

【Abstract】 Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic progressive disease with a short survival time after diagnosis. Current treatments using western medicines have shown poor efficacy and lung transplantation is costly, highlighting the need to find new, safe, and effective treatments. Animal experiments are important for investigating the mechanisms of drug action, and suitable animal models of IPF are required for experimental research. Bleomycin is commonly used to induce IPF models. Traditional Chinese medicine (TCM) has the advantages of multiple therapeutic targets and few adverse reactions, and is gradually gaining attention for the treatment of IPF. Ongoing experimental research is being carried out to verify the specific targets and mechanisms of TCM in the

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (82274440), 辽宁省教育厅高校基本科研项目储备项目 (2024-JYTCB-040)。

Funded by General Project of National Natural Science Foundation of China (82274440), Liaoning Provincial Department of Education University Basic Scientific Research Project Reserve Project (2024-JYTCB-040).

【作者简介】 张震, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肺系疾病。Email: 2228292024@qq.com

【通信作者】 吕晓东, 女, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治肺系疾病。Email: deanofctcm@126.com

treatment of IPF, utilizing animal models of IPF. This review considers the selection of animal models of IPF, the method used to induce, establish, and evaluate the models, and the interventional effects of TCM. We also summarize the best modeling method for animal models of IPF and the current status of TCM treatments to provide a basis for further scientific research and the clinical treatment of IPF.

【Keywords】 idiopathic pulmonary fibrosis; intervention of traditional Chinese medicine; animal model; modeling method; modeling process; model evaluation

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

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明的慢性、进行性且无法逆转的间质性肺疾病^[1], 临床主要表现为咳嗽、咳痰、呼吸困难、肺通气功能下降, 患者生存质量严重受损, IPF 患病人群主要为老年人^[2], 确诊后中位生存期仅 2 ~ 3 年^[3]。IPF 的病因不明, 发病机制错综复杂^[4], 尚未完全阐释清晰, 主要包括氧化应激、上皮间质转化、巨噬细胞极化失衡及细胞凋亡等, 可能还存在其他机制, 因此进一步探寻 IPF 的具体发病机制对延缓 IPF 疾病进程、改善预后及提高生存率极为重要。

目前 IPF 的治疗手段较为局限, 美国食品药品监督管理局批准的药物为吡非尼酮与尼达尼布^[5], 但这两种药物的价格昂贵, 且作用有限、不良反应严重^[6]。肺移植作为唯一根治手段, 存在肺源不足、费用高昂、术后排斥反应大、并发症多等弊端^[7]。祖国传统医学中未提及肺纤维化这一病名, 现代中医根据辨证分型将其划归于“肺痿”“肺痹”“咳嗽”“肺胀”等范畴, 其中以“肺痿”最为普遍^[8]。“肺痿”的基本病机为肺虚损, 津气大伤导致肺叶枯萎, 病理性质属本虚标实。传统中药具有治疗靶点多、不良反应小、价格低等优势, 在 IPF 的治疗中逐渐受到关注。运用传统中医中药寻求 IPF 新的治疗方案是目前研究的一个重要方向。在现代生物医学研究中, 动物模型是一个不可或缺的环节。动物模型在模拟临床相关疾病、进行中医药干预及观察相应疗效的过程中尤为重要^[9]。本文梳理总结 IPF 动物模型的选用与建立方法、模型的评估方法及中医药对 IPF 动物模型的干预作用现状, 以期 IPF 的相关科学研究与临床治疗提供参考价值。

1 IPF 动物模型的选用

选用合适的实验动物是成功建立动物模型

的基础, 动物的类别、年龄、性别、性格特点等均应加以考虑^[10]。当前用来诱导建立 IPF 模型的动物主要包括鼠、兔、马、犬、羊等^[11]。根据美国胸科协会 (American Thoracic Society, AST) 官方研讨会报告, 肺纤维化临床前测试的动物一线选择是小鼠, 其次是大鼠^[12]。鼠类与人类有大约 90% 的相似基因, 在众多的生理通路及病理过程中可能与人类极为相似^[13]。鼠类模型因其个体相似度高、造模周期短、实验效率高、价格低廉及可重复性好等优势, 是实验应用最多的造模动物^[14], 但鼠类同时也存在死亡率高、不能重复采样、体型小故不适用于放射影像学的研究等缺陷。目前 IPF 模型常用的有 SD、Wistar 大鼠; C57BL/6、ICR、BALB/c、KM 小鼠。Wistar 大鼠性格较为温顺, 抗病能力强且自发性肿瘤的发生率低; 而 SD 大鼠是用 Wistar 大鼠培育而成的, 其适应性和抗病能力更强, 尤其是对呼吸系统疾病抵抗力较强^[15]。小鼠中 C57BL/6 小鼠在造模过程中对博来霉素 (bleomycin, BLM) 和百草枯的敏感性均比 ICR 小鼠和 KM 小鼠高^[16-17]。与鼠类相比, 兔、犬、羊等动物体型大小适中, 心脏结构和血液循环系统与人类较为相似, 更适合心血管疾病的实验研究, 但兔、犬、羊等动物肺内结构显示清楚、高分辨率 CT (high resolution CT, HRCT) 等影像学形态与人类更接近, 更易观察肺内结构组织变化, 且可以大量采集组织样本, 减少因动物过小而带来的操作难度和组织样本误差^[18]。此外, 树鼯作为一种小型哺乳动物, 在基因、代谢、组织解剖学以及免疫系统等方面与灵长类动物关系密切, 且具有体型较小、饲养成本较低、繁殖周期短等优点。CHE 等^[19]通过气管内注射 BLM 导致树鼯肺部出现的病理特征较为符合人类 IPF 病理特征, 因此树鼯可能会成为新的 IPF 实验模型动物^[20-21]。

综合考量实验各方面要求及动物的优缺点,研究者在实验中应用最为广泛的模型动物为小鼠和大鼠,其中 Wistar 大鼠和 C57BL/6 小鼠是一般中药作用机制研究的最佳选择,兔、犬、羊等较大动物则更适合中药对 IPF 影像学改变的相关研究。

2 IPF 动物模型的诱导方法和建立过程

2.1 模型的诱导方法

IPF 动物模型的诱导方法众多,现阶段用于构建 IPF 动物模型的诱导方法标准不一,主要包括 BLM 诱导、石棉/二氧化硅诱导、百草枯诱导、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 诱导、辐射诱导和基因修饰技术诱导等^[18]。BLM 诱导的 IPF 大鼠肺部病理变化早期以肺泡炎症改变为主,晚期以肺间质纤维化为主^[22]。石棉的主要成份为二氧化硅,长时间暴露于二氧化硅,会导致二氧化硅在肺中沉积,引起炎症细胞浸润、肺泡破坏等病理改变,最终形成纤维化结节^[23]。二氧化硅诱导产生的肺纤维化结节类似于暴露于粉尘或微小颗粒的肺纤维化结节,更接近于矽肺模型^[24]。百草枯作为一种毒性较强的除草剂,进入机体后会导致机体出现氧化应激、炎症损伤等表现,最终引起多器官的衰竭甚至死亡^[25],因其造模死亡率高,现已多用于百草枯毒性的研究^[26]。FITC 可以用于气道,作为半抗原与其他的肺组织蛋白结合,通过趋化因子受体 2 与趋化因子配体 12 的相互作用使纤维细胞进入肺,诱导肺纤维化^[27]。由于超声处理的 FITC 颗粒的大小不一,致使其诱导的纤维化反应程度可变性过大,已经很少应用于 IPF 模型建立。辐射诱导具有依赖性,具体机制是辐射通过使 DNA 损伤直接诱导肺泡上皮细胞死亡、巨噬细胞涌入进而激活单核细胞产生炎症因子、促纤维化细胞因子等促使肺纤维化发生^[28-29]。基因修饰技术通过在模型动物基因组中删除或者插入内源基因而建成^[18],是近些年较为新式的造模方法,但是价格昂贵。此外,异种移植是将人细胞、组织或器官移植到免疫缺陷动物体内的方法,在 IPF 特异性病理机制和个性化治疗策略方面具有独特价值。

不同诱导手段都存在各自的优点与局限性。

综上,BLM 诱导方法最为实用,其操作简便、造模成功率高、可重复性好、病理表现与人类 IPF 最为相似。美国 ATS 的一份报告证实,BLM 诱导模型是最佳特征动物模型^[30]。在使用 BLM 诱导模型时,相较于雌鼠,雄鼠对 BLM 的反应更为强烈,是更加理想的模型动物^[31]。具体造模方法选择的优点和局限性总结,见表 1。

2.2 模型的建立过程

截至目前,如何构建一个与人类 IPF 相似的实验动物模型依然面临重大考验,造模方法选择的不同和操作的差异均会影响模型的最终情况。在各种 IPF 模型中,BLM 诱导模型目前应用最多、特性最好^[32]。BLM 诱导包括无创气管插管滴注^[33]、有创气管滴注^[34]、气管内雾化吸入^[35]、滴鼻吸入^[36]、腹腔注射^[37]、尾静脉注射^[38]。此外,还有一些研究者选择腹腔注射百草枯^[39]、X 射线诱导^[40]及口咽滴注 SiO₂ 混悬液^[41]等方法诱导建立 IPF 动物模型。造模具体操作总结,见表 2。

3 IPF 动物模型的评估方法

动物模型建立后,要明确模型是否建立成功,因此模型建立后评估指标的选择同样是不可忽视的重点。目前的研究者使用的评估指标主要包括动物一般体征、肺系数、肺功能、肺组织病理、肺组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量等,其中肺组织病理学检查和肺组织 HYP 含量是检查 IPF 动物模型成功与否的主要指标。

3.1 一般体征及肺系数评估

模型建立后,动物的一般体征可通过肉眼直接观察记录。一般情况下,造模后动物会出现活跃度下降、精神萎靡、弓背抱头、反应迟钝、摄食及饮水量减少、体质量减轻、呼吸困难、毛色干枯或脱毛甚至动物死亡等现象,存活的实验动物在造模后 7 ~ 10 d 生活状态开始恢复^[42]。处死动物,分离出完整肺,使用 PBS 缓冲液清洗肺血迹,吸干表面水分后马上称量肺湿重并计算肺系数,在造模成功的状况下,与空白组比较,模型组动物的肺湿重及肺系数会升高^[43]。

3.2 肺功能评估

通过肺功能检测,可以评估动物有无气流受

表 1 IPF 动物造模方法优点、局限性和适用情况

Table 1 Advantages, limitations and applicability of IPF animal modeling methods

诱导方式 Induction methods	建立途径 Establishing pathways	优点 Advantages	局限性 limitations	适用情况 Applicability
博来霉素 BLM	气管内滴注/雾化吸入、腹腔注射、尾静脉注射、滴鼻吸入等 Intratracheal instillation/nebulized inhalation, intraperitoneal injection, tail vein injection, nasal drip inhalation, etc	操作简便,建模时间短,可重复性高,能复制出 IPF 典型肺组织病变,多次重复气管滴注和雾化吸入效果更为理想 Easy to operate, short modeling time, high reproducibility, and reproduce lung tissue lesions typical of IPF, repeated tracheal drops and nebulization work better	纤维化改变存在自限性和可逆性,缺少间质性肺炎进行性和不可逆性的特征,存在自愈倾向,不同给药途径所导致的纤维化病变部位及病理特点不一 Fibrotic changes are self-limited and reversible, and lack the progressive and irreversible characteristics of interstitial pneumonia, self-healing tendency, the fibrotic lesions and pathological features caused by different routes of administration vary	广泛适用于潜在抗纤维化药物的筛选及药物治疗靶点的研究 Widely applicable to the screening of potential anti-fibrosis drugs and the research of drug treatment targets
二氧化硅/ 石棉 Silica/ asbestos	气管内滴注/雾化吸入、口咽滴注等 Intratracheal instillation/nebulized inhalation, oropharyngeal instillation, etc	操作简便,沉积肺部的二氧化硅/石棉粒子难以清除,会形成一个持久性的刺激因素 Easy to operate, silica/asbestos particles that deposit in the lungs are difficult to remove and can form a persistent irritant	建模时间长,肺叶病变分布不均匀,缺少间质性肺炎典型特征,建立的模型与矽肺/石棉肺模型更为相似,石棉可能引起人罕见的间皮瘤发生 Long modeling time, uneven distribution of lobar lesions, lack typical features of interstitial pneumonia, and the created model is more similar to the silicosis/asbestosis model	适合矽肺/石棉肺治疗药物相关研究 Suitable for research on drugs related to silicosis/asbestosis treatment
百草枯 Paraquat	腹腔注射、灌胃给药等 Intraperitoneal injection, intragastric administration, etc	操作简便,模型成功率高 Easy to operate, high model success rate	致死率高,会引起各脏器损伤,影响动物生理状态,缺少间质性肺炎的典型特征,纤维化病理特点更符合百草枯致人肺纤维化病理特点 High lethality, cause damage to various organs, affect animal physiological state, lack typical features of interstitial pneumonia, the pathological features of fibrosis are more in line with the pathological characteristics of lung fibrosis caused by paraquat	适合于百草枯致人肺纤维化研究 Suitable for research on paraquat-induced pulmonary fibrosis
异硫氰酸 荧光素 Fluorescein isothiocyanate	气管内滴注 Intratracheal instillation	可用免疫荧光的方法定位肺纤维化的具体位置 Locate the specific location of pulmonary fibrosis using the immunofluorescence method	稳定性较差,造模动物会出现急性中毒或死亡,标准化和重复性较难实现,无临床相关性 Poor stability, modeling animals can be acutely poisoned or die, difficult to achieve standardization and repeatability, no clinical relevance	现已很少用于 IPF 治疗药物研究 Now rarely used in drug research for IPF
辐射 Radiation	X 线照射 X-ray irradiation	有多种相关因子参与纤维化病变过程,纤维化病变持续时间较长 Multiple related factors are involved in the fibrotic lesion process, the fibrotic lesions last for a relatively long time	建模时间长,辐射量难以把控,价格高昂,个体差异大,有剂量依赖性,射线不正确使用会对动物和操作人员造成伤害 Long modeling time, difficult to control radiation levels, expensive, great individual differences, dose-dependent and improper use of the rays can harm animals and operators	早期可作放射性肺炎模型,晚期可作放射性肺纤维化模型 Early-stage can be used as radiation pneumonia model, late-stage can be used as radiation-induced pulmonary fibrosis model

续表 1

诱导方式 Induction methods	建立途径 Establishing pathways	优点 Advantages	局限性 limitations	适用情况 Applicability
基因修饰 Gene modification	转基因、基因点突变、 基因敲除等 Genetic modification, gene point mutation, gene knockout, etc	靶点明确,可诱导多种基 因模式模型,可观察疾病 自然进程,利于对 IPF 特 定机制进行探索和研究 Clear target, inducible multiple gene pattern models, able to observe the natural course of the disease, beneficial for exploring and researching specific mechanisms of IPF	建模时间长、价格高昂,有 种属依赖性,介导转基因用 的病毒载体本身具有潜在 危害性,单一基因模型与 人多基因相关的 IPF 存在 一定差异 Long modeling time, expensive, species-dependent, the viral vectors used for mediating transgenes inherently possess potential hazards, and differences between single-gene model and human multi-gene-related IPF	适合筛选特定抗纤维化药 物的具体成分相关研究 Suitable for research on the specific components of specific anti-fibrotic drugs in screening
异种移植 Xenotrans plantation	移植人类细胞、组织 或器官至免疫缺陷动物 体内 Transplanting human cells, tissues or organs into immunodeficient animals	更贴近临床病理,保留了 人类基因和表型特征,可 针对特定患者亚群 More clinicopathologically, preserving human genetic and phenotypic signatures, allowing for specific patient subpopulations	建模时间长,价格高昂,仅 模拟局部纤维化病灶,移植 细胞存活率低,依赖高免疫 缺陷宿主,存在伦理问题 Long modeling time, expensive, only simulating localized fibrotic lesions, low survival rate of transplanted cells and rely on highly immunodeficient hosts, ethical issues exist	适合探索人类特异性病理 机制和个性化治疗策略 Suitable for exploring human-specific pathological mechanisms and personalized treatment strategies

表 2 IPF 动物造模过程

Table 2 IPF animal modeling process

造模方法 Modeling methods	动物选择 Animal selection	造模过程 Modeling process	参考文献 References
气管内滴注 BLM Intratracheal instillation of BLM	雄性, C57BL/6J 小鼠, 7 ~ 8 周 龄, 20 ~ 22 g Male, C57BL/6J mice, 7 ~ 8 weeks, 20 ~ 22 g	腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (70 μg/kg) 麻醉小鼠, 经声门裂 气管插管, 滴入 BLM 溶液 (5 mg/kg) 后悬垂旋转小鼠, 使 药物均匀分布肺组织 Intraperitoneal injection of 1% sodium pentobarbital (70 μg/kg) anesthetized the mice, intubated through the tracheal cleft of the glottic cleft, and then draped and rotated the mice after dropping BLM solution (5 mg/kg) to evenly distribute the drug in the lung tissue	[33]
	雄性, SD 大鼠, 6 ~ 7 周龄, 180 ~ 210 g Male, SD rat, 6 ~ 7 weeks, 180 ~ 210 g	腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (0.04 mg/g) 麻醉大鼠固定, 沿颈 正中切开皮肤, 暴露气管, 经气管缓慢滴入 BLM 溶液 (5 mg/kg) 后直立旋转大鼠, 使药物均匀分布肺组织 Intraperitoneal injection of 2% sodium pentobarbital (0.04 mg/g) anesthetized the rat for fixation, incision of the skin along the median of the neck, exposure of the trachea, and slow instillation of BLM solution (5 mg/kg) through the trachea and upright rotation of the rat to evenly distribute the drug to the lung tissue	[34]
气管内雾化吸入 BLM Endotracheal nebulized inhalation of BLM	雄性, SD 大鼠, 6 ~ 8 周龄, (253.18 ± 5.37) g Male, SD rat, 6 ~ 8 weeks, (253.18 ± 5.37) g	雾化吸入 BLM 溶液 (40 mmol/L) 30 min, 连续 3 d Atomized inhalation of BLM solution (40 mmol/L) for 30 min for 3 days	[35]
滴鼻吸入 BLM Nasal inhalation BLM	雌性, ICR 小鼠, 6 ~ 8 周龄, (16 ± 2) g Female, ICR mice, 6 ~ 8 weeks, (16 ± 2) g	麻醉小鼠后, 用微量移液器将 BLM 溶液 (15 mg/kg) 经鼻腔缓缓滴入小鼠气管内 After anesthetized the mice, BLM solution (15 mg/kg) was slowly dripped into the trachea of the mice through the nasal cavity with a micropipette	[36]

续表 2

造模方法 Modeling method	动物选择 Animal selection	造模过程 Modeling process	参考文献 References
腹腔注射 BLM Intraperitoneal injection of BLM	雄性, C57BL/6 小鼠, 8 周龄 Male, C57BL/6 mice, 8 weeks	在第 1、5、8、11 和 15 天分别腹腔内注射 BLM 溶液 (5 mg/kg) BLM solution (5 mg/kg) was injected intraperitoneally on the 1st, 5th, 8th, 11th, and 15th days, respectively	[37]
尾静脉注射 BLM Tail vein injection of BLM	雄性, C57BL/6J 小鼠, 8 周龄, 18 ~ 22 g Male, C57BL/6J mice, 8 weeks, 18 ~ 22 g	适应性喂养后分为单次组和多次组, 单次组经尾静脉注入 BLM 溶液 (200 mg/kg); 多次组每周经尾静脉注射 BLM 溶液 (50 mg/kg), 连续 6 周 After adaptive feeding, they were divided into single group and multiple group, and the single group was injected with BLM solution (200 mg/kg) through the tail vein. The multiple groups were injected with BLM solution (50 mg/kg) through the tail vein every week for 6 consecutive weeks	[38]
腹腔注射百草枯 Intraperitoneal injection glyphosate	雌性, C57BL/6J 小鼠, 7 ~ 8 周龄, 14 ~ 16 g Female, C57BL/6J mice, 7 ~ 8 weeks, 14 ~ 16 g	麻醉小鼠后, 一次性腹腔注射百草枯 (20 mg/kg) After anesthetizing the mice, a one-time intraperitoneal injection of paraquat (20 mg/kg)	[39]
X 射线诱导 X-ray induction	雄性, Wistar 大鼠, 5 周龄, (200 ± 20) g Male, Wistar rat, 5 weeks, (200 ± 20) g	前 1 d 禁食水, 麻醉后大鼠取仰卧位, 用铅板挡住除胸部外 皮肤, 辐射区域严格限制在胸部, 使用 48 cm 的源表面距 离照射场进行 X 射线 40 Gy 单次局部照射 Fast the rats for 1 d prior to the experiment, place rats in a supine position after anesthesia, shield the entire body with lead plates except for the chest skin to strictly restrict the radiation field to the chest area, and perform a single local X-ray irradiation at a dose of 40 Gy using a source-to- surface distance of 48 cm	[40]
滴鼻吸入 SiO ₂ 混悬液 Nasal inhalation of SiO ₂ suspension	雄性, C57BL/6 小鼠, 6 ~ 8 周 龄, 20 ~ 25 g Male, C57BL/6 mice, 6 ~ 8 weeks, 20 ~ 25 g	连续 4 d 经小鼠鼻腔滴注 0.05 mL 的 SiO ₂ 混悬液 (1.664 mol/L) 0.05 mL of SiO ₂ suspension (1.664 mol/L) was instilled through the mice nasal cavity for 4 consecutive days	[41]

限情况、肺组织是否处于病理状态。IPF 模型动物在进行肺功能检测时, 肺活量 (vital capacity, VC)、吸气气流高峰流速 (peak inspiratory flow, PIF)、吸气容积 (tidal volume, TV)、每分钟通气量 (minute ventilation, MV)、呼出 50% 气量时流速 (50% tidal volume expiratory flow, EF50) 等指标显著下降, 提示动物出现气流受限情况^[44-45]。

3.3 肺组织病理评估

模型动物的肺组织病理可以直观显示肺组织的改变情况, 肺组织病理检测是 IPF 确诊的重要指标之一。麻醉动物后取出肺, 经甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红 (HE) 和 (或) Masson 染色等操作后, 在显微镜下观察肺组织病理学变化。在 IPF 模型动物肺组织中, 可见模型组动物肺组织破坏严重, 肺泡间隔变宽, 肺泡壁断裂, 肺泡代偿性萎缩或增大, 肺泡腔内大量炎症细胞浸润, 肺间质出现大量条索状瘢痕及胶原纤维^[46-47]。

3.4 肺组织 HYP 含量评估

IPF 的一个主要病理特征是胶原蛋白的沉积, HYP 是胶原蛋白特有的氨基酸之一, 因此, 测定肺组织中 HYP 含量能够评估动物肺组织纤维化程度。测定 HYP 含量的方法有比色法和酶联免疫吸附测定法等。在应用比色法时, 烘干的肺组织所测得的 HYP 含量更高, 结果更稳定可靠^[48]。

3.5 其他指标评估

其他指标如肺组织中各种炎症因子含量、肺泡灌洗液炎性细胞计数、血氧饱和度、细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平、氧化应激指标和 CT 等影像学的检测均对模型评估有重要辅助作用。

4 中药对 IPF 动物模型的干预作用

4.1 抗氧化应激

氧化应激是指机体内氧化与抗氧化作用失

衡,导致 ROS 和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)等氧化产物过度积累。ROS 和 RNS 的大量堆积可直接损伤肺上皮细胞,促使肺上皮细胞凋亡而导致间质纤维化倾向,同时 ROS 和 RNS 还可通过改变与 IPF 发病机制有关的介质,如促纤维化生长因子、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的表达来促进肺纤维化的发展^[49]。在 IPF 的发生发展过程中,氧化应激可诱导炎症细胞活化并释放炎症介质,如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等,引发炎症反应,这些介质又可进一步促进 ROS 和 RNS 的产生,加重氧化应激,二者相互作用,共同推动 IPF 的病情进展,这是包括 IPF 在内多种疾病的病理过程^[50-51]。

中药防己提取所得的汉防己甲素具有抗炎、抗纤维化及免疫调节的作用^[52],严业超等^[53]对重复多次气管内滴注 BLM 建立的 IPF 小鼠模型连续灌胃,发现汉防己甲素能够抑制 TGF- β /Smad3 通路诱导的成纤维细胞活化相关蛋白纤连蛋白(fibronectin)、I 型胶原(collagen type I, collagen I)、波形蛋白(vimentin)和 α -平滑肌激动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达水平,且细胞实验结果表明汉防己甲素可能通过表达 *AGTRAP* 及 *MPP6* 基因进而降低 ROS 水平,抑制成纤维细胞活化,从而达到治疗效果。梁梓琛等^[54]研究证实桔梗素 D 除了可以介导 P2X7r-NLRP3 信号通路或抑制 TLR4 信号通路调控肺纤维化外,还可下调瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6(transient receptor potential cation channel 6, TRPC6)表达进而减少 ROS 产生,减弱肺纤维化程度。

4.2 抑制上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)

EMT 指上皮细胞向间质细胞转化,进而赋予细胞迁移、侵袭和分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)能力的过程。在 IPF 患者的肺组织中, TGF- β 的表达通常上调,它可通过与细胞表面受体结合,激活下游 Smad 蛋白等信号分子,诱导上皮细胞发生 EMT,转化后的上皮细胞会改变其 ECM 的分泌模式,分泌大量的胶原蛋白、纤维连接蛋白等,加快纤维组织的沉积,同时发生 EMT 的上皮细胞可分泌多种炎症因子和趋化因子,如

白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等,引发炎症反应,形成炎症与 EMT 的恶性循环,推动 IPF 的进展^[55-56]。

虫草素可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路发挥抗纤维化作用,王小叶等^[57]发现虫草素可作用于组蛋白去乙酰化酶 7(histone deacetylase 7, HDAC7)的活性位点,使 vimentin 乙酰化降解,抑制 collagen I 蛋白表达与 EMT,从而明显改善 IPF 小鼠的病理状态与肺组织结构。黄芪总黄酮可下调 BLM 诱导的 IPF 小鼠体内 miRNA-21 及 TGF- β 1 表达,加强 Smad7 表达及 Smad7 对 Smad3 磷酸化水平的抑制,显著减少 α -SMA 蛋白表达,阻滞 EMT,发挥对 IPF 的治疗效果^[58]。

4.3 调控巨噬细胞极化

巨噬细胞是维持组织稳态的关键参与者^[59],在不同的微环境信号刺激下,巨噬细胞会被诱导极化成 M1 型和 M2 型两种表型, M1 型巨噬细胞会释放大量的炎症介质(如 IL-1、TNF- α 等)和 ROS,引发炎症反应和氧化应激水平升高,导致肺组织损伤;而 M2 型巨噬细胞分泌的 TGF- β 会激活肺成纤维细胞,并使其增殖并转化为肌成纤维细胞,促进细胞外基质如胶原蛋白、纤维连接蛋白等的合成和沉积,导致肺组织纤维化,在 IPF 患者的肺组织中,二者动态平衡被打破, M2 型巨噬细胞极化占优势且功能异常增强,持续分泌促纤维化因子,导致 IPF 不断进展^[60-61]。

升陷化纤方(黄芪、知母、桔梗等)及其拆方可降低 IPF 大鼠血清 IL-6、TGF- β 1 含量,上调 SOCS1、SOCS3 蛋白表达,阻抑 STAT6/PPAR- γ 通路活性,进而抑制巨噬细胞极化为 M2 型,并促进 M2 型向 M1 型转化,维持二者动态平衡,达到抑制 IPF 效果^[62]。中药桔梗分离得到的桔梗皂苷 E 能够降低血清中白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)、IL-6、TNF- α 等细胞因子浓度及 p-STAT6、p-JAK1 蛋白表达,抑制 JAK/STAT 信号通路阻抑巨噬细胞极化为 M2 型,减少胶原沉积从而有效改善 IPF 小鼠肺组织病理损伤^[63]。

4.4 抑制细胞凋亡

细胞凋亡是指细胞主动死亡从而维持细胞

内稳态的程序性死亡。细胞内促凋亡因子与抗凋亡因子平衡失调是 IPF 发生的重要原因,促凋亡因子 C/EBP 同源蛋白可诱导肺上皮细胞凋亡,激活成纤维细胞,使其增殖并转化为肌成纤维细胞并促进 ECM 沉积,导致肺组织的异常重塑及纤维化^[64]。同时 IPF 患者体内的成纤维细胞可通过分泌高水平的促凋亡分子(半胱天冬蛋白酶-3、肿瘤坏死因子受体 1 等)和下调 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 基因表达来诱导肺组织 T 细胞凋亡和功能障碍,无法有效控制炎症反应,使炎症持续存在,促进肺纤维化发展^[65]。

升陷汤可有效改善 IPF 患者的临床症状和生活质量,LIANG 等^[66]发现升陷汤可以降低血清中 TNF- α 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子水平,抑制肺组织中纤维蛋白的表达,具体机制为通过抑制泛凋亡体 (PANoptosis) 进而抑制细胞凋亡以延迟或逆转大鼠肺纤维化的病理变化。芪冬活血饮(黄芪、麦冬、虎杖等)在临床上治疗间质性肺疾病疗效较好,贺倩雯等^[67]进一步研究证实芪冬活血饮能降低 IPF 小鼠肺组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白磷酸化水平以及蛋白 PI3K、Akt、mTOR mRNA 的表达,抑制细胞凋亡,延缓 IPF 进程。

4.5 促进细胞自噬

自噬是细胞在应急状态下的一种自我保护方式,在机体组织修复和细胞凋亡等过程中发挥重要作用^[68]。正常情况下,自噬参与细胞外基质降解酶的合成和分泌调节,自噬缺陷时 ECM 的合成增加而降解减少,使得 ECM 在肺间质过度沉积,而且自噬缺陷时会使得细胞内的 TGF- β 信号增强,诱导肺泡上皮细胞发生 EMT,促进 ECM 的分泌和沉积,推动肺纤维化的发生发展^[69]。

TGF- β 1 能通过激活 PI3K/Akt-mTOR 通路使 p62 蛋白表达降低,诱导自噬的发生,而 Beclin-1 可参与自噬体膜形成并触发自噬,扶正通络方(生地黄、山萸肉、女贞子等)能够使 BLM 诱导的 IPF 大鼠体内自噬小体和 Beclin-1 蛋白表达增加但降低 p62 蛋白表达,从而促进自噬以改善肺纤维化^[70]。于竞泽等^[71]发现益肺散结方(黄芪、防风、白术等)可以降低 BLM 诱导的 COPD-IPF 模型大鼠的肺中炎症相关细胞因子白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、TNF- α 含量,增高自噬相关

基因 Beclin-1 与 LC3B 的表达,促进细胞自噬明显改善大鼠肺组织损伤,减弱肺纤维化程度。

4.6 调控凝血系统

当肺组织损伤后,凝血系统会激活进而导致纤维蛋白原转化为纤维蛋白沉积于肺泡和间质中,沉积的纤维蛋白还会进一步诱导成纤维细胞增殖和迁移,同时凝血酶可通过激活蛋白酶激活受体-1 (protease activated receptors-1, PAR-1),刺激肺泡上皮细胞和成纤维细胞释放 TGF- β ,促进胶原合成和肌成纤维细胞分化,致使肺组织发生纤维化^[72-73]。此外,血小板中所含有大量的 TGF- β 是诱导各种组织发生纤维化的主要促纤维化细胞因子,且血小板活化后引发的高凝状态和持续纤维蛋白沉积亦可导致 IPF 发生发展^[74]。

血栓通注射液是以三七总皂苷为主要有效成分的注射液,常用于临床瘀血证的治疗,高云航等^[75]证实血栓通注射液可通过调控 PAR-1 mRNA 水平与可溶性血纤蛋白单体复合体 (soluble fibrinmonomer complex, SFMC)、纤维蛋白降解产物 (fibrinogen degradation products, FDP) 蛋白水平,抑制凝血酶激活进而改善凝血途径,达到治疗 IPF 的作用。刘勇明等^[76]发现益气养阴活血通络方(黄芪、北沙参、熟地黄等)可抑制血小板活化和 CD40-CD40L 系统,显著降低 IPF 大鼠体内血小板 CD41、CD62P 表达水平及 PAI-1、FIX、FVII 表达水平,改善凝血功能障碍并延缓 IPF 进展。

传统中医在治疗疾病的过程中更多强调辨证论治、三因制宜、同病异治,根据不同患者患病时自身的体质、身体机能情况以及证型,采取不同措施进行干预治疗。随着现代医学对中药成分的不断探索挖掘,中药治疗多靶点、多途径的优势越来越明显,因此,IPF 患者可在口服西药干预纤维化进程时,同时服用中药汤剂,通过辨证论治、因证组方、随证加减,进而达到既缓解临床症状(标),又恢复身体整体机能(本)的效果,最终延缓纤维化进展甚至治愈纤维化。中药干预作用机制总结,见表 3。

5 小结

综上,在 IPF 动物模型中,大鼠和小鼠因其饲养简单、价格低廉、个体差异性小等优点被大多

数研究者所选择,树鼯因自身种属优势及 BLM 诱导后肺部出现的病理特征较符合人 IPF,可能会成为新的 IPF 实验模型动物。在 IPF 动物模型的建立方法中,BLM 诱导模型造模简单、造模周期短、与人类 IPF 病理表现最为相似,应用最为普遍,但同样缺少人类 IPF 进行性和不可逆性特征。在 IPF 动物模型的评估方法中,肺组织病理改变和肺组织 HYP 含量是最稳定且直观的评估方法,此外,还可以借助动物的一般体征、肺系数、肺功能、血氧饱和度、ROS 水平及 CT 影像学等指标共同评价模型建立情况。

当前各种 IPF 诱导模型的病理表现都与人类存在一定的差异,无法完全复制人类间质性肺炎进行性和不可逆性特征,而且在建模过程中并无明确的操作流程及药物剂量规定,造模结束后的具体评估方法也未标准化、规范化,所以还需要不断完善并探索新的规范化的 IPF 动物模型建立方法。目前研究者对 IPF 动物模型的建立上主要

以西医“病”的建立为主,对于中医“肺痿”“肺痹”具体的“证”的诱导建立较少。IPF 动物模型建立后,在未进行中医“证”的诱导的情况下,研究者给予动物中药干预以验证中药的治疗效果,并未将中医“辨证论治”的核心理论应用其中,缺乏中医治疗疾病的独特思维。未来应将中医思维与现代研究相结合,建立中医病证结合的 IPF 动物模型,根据不同证型因证施治,进一步探索中医药治疗 IPF 的有效药物及具体作用靶点。IPF 的常见中医证型主要有肺气虚证、肺肾气虚证、阴虚肺燥证、痰湿证及血瘀证 5 种证型^[77]。传统中医的“辨证论治”强调整体和个体差异,现代研究方法更注重客观和可重复性,二者结合,关键在于将证候标准转化为可以监测到的量化指标。如肺气虚证不仅涉及呼吸系统,同时也涉及免疫、消化和神经等多个系统的变化。因此,在构建动物模型时,可通过基因编辑或药物诱导等技术模拟出具体疾病,再结合中医病因如饮食

表 3 中药干预作用机制

Table 3 Mechanism of intervention of traditional Chinese medicine

作用机制 Mechanism of action	中药 Traditional Chinese medicine	相关信号通路 及分子 Related signaling pathways and molecules	动物选择 Animal selection	造模方法 Modeling methods	模型组动物指标 Model group animal indicators	参考文献 References
抗氧化应激 Anti-oxidative stress	汉防己甲素 Tetrandrine	TGF-β/Smad3 通路, fibronectin、collagen I、vimentin 和 α-SMA, <i>AGTRAP</i> 和 <i>MPP6</i> 基因 TGF-β/Smad3 pathway, fibronectin、collagen I、vimentin、α-SMA, <i>AGTRAP</i> and <i>MPP6</i> genes	雄性, C57BL/6J 小鼠, 6 ~ 8 周龄, 22 g Male, C57BL/6J mice, 6 ~ 8 weeks, 22 g	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1) 肺功能检测: 小鼠深吸气量及 呼吸系统顺应性降低; 肺重指数和 HYP 含量增加 (2) 肺组织 HE 及 Masson 染色; 小鼠肺组织结构混乱, 肺泡壁变厚, 肺 泡及间质腔内有大量炎症细胞浸润 及纤维化改变 (1) Lung function test: deep inhalation volume and respiratory system decreased; lung weight index and HYP content increased (2) HE and Masson staining of lung tissue: structure of the lung tissues of mice were chaotic, the alveolar wall were thickened, and abundant inflammatory cells infiltrated and fibrosed in the alveoli and interstitial cavity	[53]
	桔梗素 D Platycodonin D	TRP 通道, P2X7r-NLRP3 通 路, TRPC6 TRP channel, P2X7r-NLRP3 pathway, TRPC6	雄性, C57BL/6J 小鼠, 6 ~ 8 周龄, 20 ~ 24 g Male, C57BL/6J mice, 6 ~ 8 weeks, 20 ~ 24 g	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	肺组织 HE 染色: 小鼠肺组织肺泡间 隔增宽, 肺泡腔内纤维化渗出和血管 周围炎细胞浸润较明显 HE staining of lung tissue: alveolar septum widened, fibrotic exudation in the alveolar cavity and perivascular cell infiltration were obvious in the lung tissues of mice	[54]

续表 3

作用机制 Mechanism of action	中药 Traditional Chinese medicine	相关信号通路 及分子 Related signaling pathways and molecules	动物选择 Animal selection	造模方法 Modeling methods	模型组动物指标 Model group animal indicators	参考文献 References
抑制 EMT Inhibit EMT	虫草素 Cordycepin	HDAC7 活性位 点, collagen I HDAC7 active site, collagen I	雄性, C57BL/6J 小 鼠, 6 ~ 8 周龄 Male, C57BL/6J mice, 6 ~ 8 weeks	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	肺组织 HE 染色: 小鼠肺泡壁增厚, 肺 泡结构紊乱, 肺泡间隔增宽, 出现大 量炎性细胞渗出, 有纤维灶形成 HE staining of lung tissue: thickening of alveolar walls, disruption of alveolar structure, widening of alveolar septa, and the presence of abundant inflammatory cell infiltration with fibrous foci formation (1) 造模后小鼠毛发枯黄蓬乱, 精神 萎靡, 活动度减少, 体质量减轻 (2) 肺组织 HE 染色: 肺组织炎性细 胞浸润, 肺泡塌陷, 肺间隔增厚 (3) 肺组织 Masson 染色: 肺实变区胶 原增生明显, 胶原纤维聚集成块状 (4) 肺组织 HYP 含量明显增高 (1) After modeling, mice's fur had become dry, disheveled, their spirit were low, their activity decreased, and their body mass decreased (2) HE staining of lung tissue: inflammatory cell infiltration in lung tissue, collapse of alveoli, and thickening of lung interstitium (3) Masson staining of lung tissue: collagen proliferation in the area of pulmonary consolidation was evident, with collagen fibers forming clumps (4) Lung tissue HYP content was significantly increased	[57]
	黄芪总黄酮 Astragalus total flavonoids	miRNA-21, let-7d 及 TGF- β /Smad 通路, α -SMA miRNA-21, let- 7d, and TGF- β / Smad pathway, α -SMA	雄性, C57BL/6 小 鼠, 8 周龄, 19 ~ 21 g Male, C57BL/6 mice, 8 weeks, 19 ~ 21 g	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1) 造模后小鼠毛发枯黄蓬乱, 精神 萎靡, 活动度减少, 体质量减轻 (2) 肺组织 HE 染色: 肺组织炎性细 胞浸润, 肺泡塌陷, 肺间隔增厚 (3) 肺组织 Masson 染色: 肺实变区胶 原增生明显, 胶原纤维聚集成块状 (4) 肺组织 HYP 含量明显增高 (1) After modeling, mice's fur had become dry, disheveled, their spirit were low, their activity decreased, and their body mass decreased (2) HE staining of lung tissue: inflammatory cell infiltration in lung tissue, collapse of alveoli, and thickening of lung interstitium (3) Masson staining of lung tissue: collagen proliferation in the area of pulmonary consolidation was evident, with collagen fibers forming clumps (4) Lung tissue HYP content was significantly increased	[58]
	升陷化纤方 及其拆方 Shengxian Huaxian Fang and Its Deconstructed Formula	STAT6/PPAR- γ 通路, IL-6、TGF- β 1, SOCS1、 SOCS3 STAT6/PPAR- γ pathway, IL-6、 TGF- β 1, SOCS1、 SOCS3	雄性, SD 大鼠, 6 ~ 8 周龄, (200 $\pm$ 20) g Male, SD rat, 6 ~ 8 weeks, (200 $\pm$ 20) g	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1) 肺功能检测: 大鼠 PEF、PIF、 EF50 均降低 (2) 肺组织 Masson 染色: 大鼠肺间 质出现大量条索状或片状蓝色胶原 纤维沉积 (1) Lung function test: PEF, PIF, and EF50 were all decreased in rats (2) Masson staining of lung tissue: abundant cord-like or flaky blue collagen fibrillary deposits were found in the interstitium of rats lungs	[62]
调控巨噬细 胞极化 Regulating macrophage polarization	桔梗皂苷 E Platycodon saponin E	JAK/STAT 通路, IL-10、IL-4、IL-6、 TNF- α , p- STAT6, p-JAK1 JAK/STAT pathway, IL-10、 IL-4、IL-6、TNF- α , p-STAT6、 p-JAK1	雌性, BALB/c 小鼠, 17 ~ 22 g Female, BALB/c mice, 17 ~ 22 g	滴鼻吸 入 BLM Nasal inhalation BLM	(1) 肺组织 HE 染色: 小鼠肺组织 结构呈扭曲状态, 肺泡壁增厚且肺间 质有很多胶原沉积 (2) 肺组织 Masson 染色: 小鼠肺泡 壁增厚, 肺泡隔塌陷, 有炎性细胞浸 润, 大量沉积胶原蛋白 (1) HE staining of lung tissue: structure of mice lung tissues appeared twisted, with thickened alveolar walls and abundant collagen deposition in the interstitium (2) Masson staining of lung tissue: alveolar walls of the mice lung were thickened, alveolar septa have collapsed, and there were infiltration of inflammatory cells with abundant deposition of collagen protein	[63]

续表 3

作用机制 Mechanism of action	中药 Traditional Chinese medicine	相关信号通路 及分子 Related signaling pathways and molecules	动物选择 Animal selection	造模方法 Modeling methods	模型组动物指标 Model group animal indicators	参考文献 References
抑制细胞 凋亡 Inhibit cell apoptosis	升陷汤 Shengxian Decoction	泛凋亡体, TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-18 PANoptosis, TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-18	雄性, SD 大鼠, 7 周龄, (200 $\pm$ 10) g Male, SD rat, 7 weeks, (200 $\pm$ 10) g	气管内滴注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1) 肺功能检测: 大鼠 PIF、PEF、MV、EF50 均较低 (2) 肺组织 HE 及 Masson 染色: 大鼠肺组织沉积大量胶原蛋白 (3) Micro-CT 示: 肺组织出现较大灰白色高密度阴影及毛玻璃样变化 (1) Lung function test: PIF, PEF, MV, and EF50 were lower (2) HE and Masson staining of lung tissue: large amounts of collagen were deposited in rat lung tissues (3) Micro-CT: lung tissues showed a large gray-white high-density shadow and ground-glass changed	[66]
	芪冬活血饮 Qidong Huoxue Decoction	PI3K/Akt/mTOR 通路 PI3K/Akt/mTOR pathway	雄性, C57BL/6 小鼠, (20 $\pm$ 2) g Male, C57BL/6 mice, (20 $\pm$ 2) g	气管内滴注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1) 造模后小鼠体质量显著降低, 毛发有脱落, 活动量及饮食减少 (2) 肺组织 HE 染色: 小鼠肺泡壁增厚, 肺泡腔狭窄塌陷, 大量炎性细胞浸润 (3) 肺组织 Masson 染色: 小鼠肺组织大量胶原纤维蓝染 (1) After modeling, body mass of mice was significantly reduced, hair was lost, and the amount of activity and diet decreased (2) HE staining of lung tissue: alveolar walls of the mice were thickened, alveolar cavities were narrow and collapsed, and there were extensive infiltration of inflammatory cells (3) Masson staining of lung tissue: abundant collagen fibers indigo staining in mice lung tissue	[67]
	扶正通络方 Fuzheng Tongluo Formula	自噬小体、p62 与 becline-1 蛋白 Autophagosome, p62 and becline-1 protein	雄性, SD 大鼠, 10 ~ 12 周龄, (200 $\pm$ 20) g Male, SD rat, 10 ~ 12 weeks, (200 $\pm$ 20) g	气管内滴注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1) 大鼠肺大体见散状出血, 黑色瘀斑, 肺重量及硬度增加, 表面呈结节样 (2) 肺组织 HE 染色: 支气管壁及血管壁外周出现炎细胞聚集, 外膜小血管扩张 (3) 肺组织 Masson 染色: 支气管周围及肺泡间隔出现大量蓝绿色胶原纤维 (4) 肺系数增加, 肺组织 HYP 增加 (1) Rat lungs showed scattered hemorrhage, black bruises, increased lung weight and hardness, and a nodular appearance on the surface (2) HE staining of lung tissue: inflammation cells gathered around bronchial and vascular walls, and outer layer of small blood vessels expanded (3) Masson staining of lung tissue: abundant blue-green collagen fibers appeared around bronchi and alveolar septa (4) Lung coefficient increased, and HYP of lung tissue increased	[70]
促进自噬 Promote autophagy						

续表 3

作用机制 Mechanism of action	中药 Traditional Chinese medicine	相关信号通路 及分子 Related signaling pathways and molecules	动物选择 Animal selection	造模方法 Modeling methods	模型组动物指标 Model group animal indicators	参考文献 References
调控凝血 途径 Regulating the blood clotting pathway	益肺散结方 Yifei Sanjie Formula	自噬相关基因 <i>Beclin1</i> 与 <i>LC3B</i> , IL-8、TNF- α Autophagy-related genes <i>Beclin-1</i> and <i>LC3B</i> , IL-8、 TNF- α	雄性,SD 大 鼠,4 周龄, (200 $\pm$ 20) g Male, SD rat, 4 weeks, (200 $\pm$ 20) g	气管内滴 注 BLM + 香烟烟雾 刺激 Intratracheal instillation of BLM + cigarette smoke irritation	(1)造模结束随机处死 3 只大鼠初步 观察病理情况 (2)取材后肺组织 HE 染色:大鼠 支气管纤毛上皮细胞变性、坏死、脱 落,支气管周围大量炎性细胞浸润, 肺泡结构紊乱,肺泡壁变薄、断裂,肺 泡腔扩大融合 (1)At the end of modeling, 3 rats were randomly sacrificed to observe the pathological conditions (2)HE staining of lung tissue after sampling: degeneration, necrosis, and shedding of ciliated epithelial cells in the bronchi of rats, accompanied by extensive inflammatory cell infiltration around the bronchi, disruption of alveolar structure, thinning and rupture of alveolar walls, and enlargement and fusion of alveolar spaces	[71]
	血栓通注 射液 Xueshuantong injection	凝血级联途 径,PAR-1, SFMC、FDP Coagulation cascade pathway, PAR-1, SFMC、FDP	雄性, Wistar 大鼠, 8 ~ 10 周龄, (200 $\pm$ 20) g Male, Wistar rat, 8 ~ 10 weeks, (200 $\pm$ 20) g	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1)造模后大鼠食量及饮水量下降, 精神状态差,毛发黄粗糙,部分大 鼠拱背,口唇及爪甲暗紫,少数口鼻 出血,呼吸较困难 (2)肺 CT:大鼠肺纹理模糊,有致密 阴影及蜂窝样改变 (1)After modeling, food intake and water consumption of rats decreased, their spirit was low, their fur became yellow and rough, some rats hunched their backs, their lips and claws turned dark purple, and a few experienced nosebleeds and difficulty breathing (2)CT of lung: lung texture of rat was blurred, with dense shadows and honeycomb-like changed	[75]
	益气养阴活 血通络方 Yiqi Yangyin Huoxue Tongluo Formula	CD40-CD40L 系 统,PAI、FIX、FVII CD40-CD40L system, PAI、 FIX、FVII	雄性, Wistar 大鼠, 6 ~ 8 周龄, (180 $\pm$ 20) g Male, Wistar rat, 6 ~ 8 weeks, (180 $\pm$ 20) g	气管内滴 注 BLM Intratracheal instillation of BLM	(1)造模后大鼠精神萎靡,毛发黄 脱落,呼吸困难,进食减少 (2)病理学:第 7 天肺泡间隔增宽,有 炎症细胞聚集,肺间质见水肿;第 14 天肺泡腔缩小,腔内炎症细胞减少成 纤维细胞增多,间质内见胶原纤维增 生;第 28 天肺泡间隔塌陷,大量胶原 纤维沉积,见纤维瘢痕与蜂窝肺 (3)模型组大鼠第 7、14、28 天肺组织 HYP 含量均显著升高 (1)After modeling, rats appeared lethargic, with yellowing and shedding fur, difficulty breathing, and reduced appetite (2)Pathology demonstration: on the 7th day, alveolar septum was widened, inflammatory cells were accumulated, and edema was seen in the lung interstitium; on the 14th day, alveolar cavity shrank, inflammatory cells in the cavity decreased, fibroblasts increased, and collagen fibrils proliferated in the interstitium; on the 28th day, alveolar septum collapsed, and abundant collagen fibers were deposited, as seen in fibrous scars and honeycomb lungs. (3)Lung tissue hydroxyproline content of model group rats at 7, 14, and 28 days significantly increased	[76]

不节、情志内伤等内外因构建出完整的所需证候的动物模型,如肺气虚模型可在经 BLM 进行诱导后,对动物进行强制游泳和吸烟,使小鼠达到肺气虚的临床表现。在进行模型评价时,因传统“望闻问切”四诊在动物身上无法应用,这就需要根据生理生化指标、行为学测试等手段更为精确的评估模型是否符合中医的证候标准。

西药治疗 IPF 效果并不理想,中医药具有治疗靶点多、疗效较好、安全性高等优势。通过中药组方或单味药对 IPF 动物模型进行干预,确定中药治疗 IPF 的具体作用机制,是动物实验研究的重点与目的,同样是临床新药研发与推广的关键依据。综合分析中医药治疗 IPF 的研究现状,经典方和自拟方受到研究者的重点关注,此外经典方和自拟方中起主要治疗作用的单味药及其成分亦是研究的热点^[78]。研究者应关注方剂中君臣佐使的配伍关系,某些中药在组方中可能并未直接治疗 IPF,但是其佐助和引经作用亦不容忽视,中药方剂正是从多药物搭配、联合奏效的角度去治疗疾病,各味药物的作用都不可小觑。多个机制互相串扰、互为因果、共同作用是 IPF 的发病机制特点,因此从多药物联合作用、多机制串扰关系研究中医药治疗 IPF 前景可观。

动物实验研究的最终目的是应用于临床,改变患者的疾病状态,因此,应及时掌握目前研究现状,找出问题并尽力完善,模拟出最符合的人类 IPF 病理表现的动物模型,再加以中药干预,验证疗效,发挥出中医药治疗 IPF 的最大优势。

参 考 文 献 (References)

- [1] HOYER N, PRIOR T S, BENDSTRUP E, et al. Risk factors for diagnostic delay in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 103.
- [2] RAGHU G, REMY-JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults; an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.
- [3] RAGHU G, COLLARD H R, EGAN J J, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824.
- [4] 罗婷,袁德政,李蕾,等. 天龙竭调控 Notch 信号通路干预肺纤维化大鼠的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(9): 2092-2098.
- LUO T, YUAN D Z, LI L, et al. Experimental study for TianLongjie regulation on pulmonary fibrosis rats by notch signaling pathway [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2024, 35(9): 2092-2098.
- [5] 陈孟毅. 小鼠博来霉素多次染毒肺纤维化模型建立及 ABT263 治疗作用观察 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2017.
- CHEN M Y. Establishment of murine pulmonary fibrosis model induced by repetitive intratracheal administration of bleomycin and observation of the ABT263 treatment effect of on lung fibrosis [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2017.
- [6] 韩伟红,王明航,李建生,等. 特发性肺纤维化中医康复临床文献应用分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(2): 875-880.
- HAN W H, WANG M H, LI J S, et al. Analysis on the application of clinical literature of traditional Chinese medicine rehabilitation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(2): 875-880.
- [7] 石耀楠,王雪慧. 中药单体干预博来霉素诱导肺纤维化动物模型相关调控机制研究进展 [J]. *老年医学研究*, 2024, 5(4): 64-68.
- SHI Y N, WANG X H. Research progress on the regulatory mechanism of Chinese herbal monomer intervention in bleomycin-induced pulmonary fibrosis animal model [J]. *Geriatr Res*, 2024, 5(4): 64-68.
- [8] 赵文清,郑敏宇. 特发性肺纤维化的中西医结合治疗进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(2): 402-405.
- ZHAO W Q, ZHENG M Y. Traditional Chinese medicine and western treatment progress of IPF [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2016, 34(2): 402-405.
- [9] 臧凝子,李品,庞立健,等. 肺脏病相关证候动物模型研究进展述评 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 26(3): 721-730.
- ZANG N Z, LI P, PANG L J, et al. Review of research progress in animal model of lung disease related syndromes [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2024, 26(3): 721-730.
- [10] 张永龙,马唯刚,钱星羽,等. 脾虚证实验动物模型构建及评价方法的研究述评 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(3): 385-396.
- ZHANG Y L, MA W G, QIAN X Y, et al. Construction of experimental animal models and evaluation of spleen deficiency syndrome: a review [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(3): 385-396.
- [11] 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.
- [12] JENKINS R G, MOORE B B, CHAMBERS R C, et al. An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 667–679.
- [13] JONES B, DONOVAN C, LIU G, et al. Animal models of COPD: what do they tell us? [J]. *Respirology*, 2017, 22(1): 21–32.
- [14] LIU T, DE LOS SANTOS F G, PHAN S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 27–42.
- [15] 袁仨, 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.
- [16] 杨珊珊, 贾晓民, 赵杰, 等. 三个品系小鼠百草枯肺纤维化模型的比较 [J]. *山西医科大学学报*, 2014, 45(6): 456–459, 547.
- YANG S S, JIA X M, ZHAO J, et al. Comparative study on pulmonary fibrosis models between three strains of mice [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2014, 45(6): 456–459, 547.
- [17] 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]. *China J Mod Med*, 2017, 27(4): 13–16.
- [18] 李智慧, 余学庆, 杨曙光, 等. 特发性肺纤维化实验模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 118–127.
- LI Z H, YU X Q, YANG S G, et al. Research progress on experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(1): 118–127.
- [19] 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.
- [20] YAO Y G. Creating animal models, why not use the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*)? [J]. *Zool Res*, 2017, 38(3): 118–126.
- [21] 吴芳芳, 李太平, 方衡, 等. H1N1 病毒感染树鼯模型的血清代谢组学研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(5): 597–605.
- WU F F, LI T P, FANG H, et al. Serum metabolomics study of a tree shrew model of H1N1 influenza virus infection [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(5): 597–605.
- [22] 金晓光, 代华平, 庞宝森, 等. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织的动态病理变化及其发生机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4): 708–714.
- JIN X G, DAI H P, PANG B S, et al. Kinetics of pathologic changes in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis model [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2009, 25(4): 708–714.
- [23] 刘琬薰, 王利民, 邓建军. 石棉诱导细胞凋亡信号通路研究进展 [J]. *工业卫生与职业病*, 2017, 43(5): 386–389.
- LIU W X, WANG L M, DENG J J. Research progress of asbestos-induced apoptosis signal pathway [J]. *Ind Health Occup Dis*, 2017, 43(5): 386–389.
- [24] 侯润苏, 田燕歌, 李建生. 尘肺病动物和细胞模型研究进展 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2022, 40(7): 547–552.
- HOU R S, TIAN Y G, LI J S. Research progress on animal and cell models of pneumoconiosis [J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2022, 40(7): 547–552.
- [25] 王晓凤, 赵敏. 基于网络药理学研究黄连治疗百草枯中毒致急性肝损伤的分子机制 [J]. *中国医科大学学报*, 2023, 52(8): 724–730.
- WANG X F, ZHAO M. Molecular mechanism of Huanglian for the treatment of paraquat-induced acute liver injury based on network pharmacology [J]. *J Chin Med Univ*, 2023, 52(8): 724–730.
- [26] 李全, 陈群, 陈宏. 雷公藤甲素通过转化生长因子- β 1 通路抑制百草枯诱导的肺纤维化机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(2): 815–818.
- LI Q, CHEN Q, CHEN H. Mechanism of triptolide inhibiting pulmonary fibrosis induced by paraqua through the transforming growth factor β 1 pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(2): 815–818.
- [27] MOORE B B, MURRAY L, DAS A, et al. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(2): 175–181.
- [28] MORGAN G W, BREIT S N. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, 31(2): 361–369.
- [29] 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.
- [30] JENKINS R G, MOORE B B, CHAMBERS R C, et al. An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(5): 667–679.

- [31] REDENTE E F, JACOBSEN K M, SOLOMON J J, et al. Age and sex dimorphisms contribute to the severity of bleomycin-induced lung injury and fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 301(4): L510-L518.
- [32] GUL A, YANG F, XIE C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1): 91.
- [33] 孙玉洁, 吕文亮, 杨瑞华, 等. 新冠康复 1 号方治疗小鼠肺纤维化的抗氧化保护机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(8): 12-15, 259-263.
- SUN Y J, LYU W L, YANG R H, et al. Mechanism of Xinguan Kangfu No. 1 prescription in treatment of pulmonary fibrosis in mice [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(8): 12-15, 259-263.
- [34] 崔子龙, 张碧涛, 范培健, 等. 基于 p38 MAPK/NF- κ B 炎症通路探讨逍遥散联合吡非尼酮对特发性肺纤维化合并抑郁大鼠的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(20): 1-11.
- CUI Z L, ZHANG B T, FAN P J, et al. Regulatory effect of Xiaoyaosan combined with pirfenidone on idiopathic pulmonary fibrosis and depression in rats based on p38 MAPK/NF- κ B inflammatory pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(20): 1-11.
- [35] 林景, 莫俊俏, 宋艳, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨血府逐瘀汤治疗特发性肺纤维化的作用机制 [J]. *中成药*, 2024, 46(2): 658-665.
- LIN J, MO J Q, SONG Y, et al. Exploring the mechanism of action of Xuefu Zhuyu decoction in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis based on network pharmacology and experimental validation [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(2): 658-665.
- [36] 栾智华, 刘军艳, 魏砚明, 等. 基于网络药理学和动物实验探究羟基红花黄色素 A 治疗肺纤维化的作用机制 [J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(11): 1949-1958.
- LUAN Z H, LIU J Y, WEI Y M, et al. Mechanism of hydroxysafflower yellow A in the treatment of pulmonary fibrosis based on network pharmacology and animal experiment [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2024, 36(11): 1949-1958.
- [37] LIU Y, LIU B, ZHANG G Q, et al. Calpain inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via switching the development of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2018, 391(7): 695-704.
- [38] 涂常力, 刘香, 郑晓滨, 等. 静脉注射博来霉素诱导肺纤维化模型小鼠的稳定性评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(40): 6436-6443.
- TU C L, LIU X, ZHENG X B, et al. Intravenous injection of bleomycin induces pulmonary fibrosis in mice: a stability evaluation [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2015, 19(40): 6436-6443.
- [39] 邓艳, 赵红玉, 朱丽萍, 等. 硫酸羟氯喹通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对百草枯致小鼠肺纤维化影响 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2024, 23(3): 192-199.
- DENG Y, ZHAO H Y, ZHU L P, et al. Effect of hydroxychloroquine sulphate on paraquat-induced lung fibrosis in mice via PI3K/Akt/mTOR signalling pathway [J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2024, 23(3): 192-199.
- [40] 严紫艳. DNA-PKcs 在放射性肺纤维化中的作用机制研究及放射性肺纤维化潜在治疗靶标的筛选和验证 [D]. 北京: 军事科学院; 2022.
- YAN Z Y. The role and mechanism of DNA-PKcs in radiation-induced pulmonary fibrosis and screening and verification of potential therapeutic targets for radiation-induced pulmonary fibrosis [D]. Beijing: Academy of Military Sciences; 2022.
- [41] 张静, 郭一铭, 李恩红, 等. 甘草甜素对小鼠矽肺纤维化的干预作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(1): 121-125.
- ZHANG J, GUO Y M, LI E H, et al. Interventive effect of glycyrrhizin on silicotic fibrosis in mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(1): 121-125.
- [42] 卢锦辉, 张丽, 刘子豪, 等. 博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的建立及评价 [J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2019, 45(6): 37-42.
- LU J H, ZHANG L, LIU Z H, et al. Development and evaluation of mouse model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin [J]. *J Lanzhou Univ (Med Sci)*, 2019, 45(6): 37-42.
- [43] 冯嘉文, 黄恺, 景菲, 等. 扶正化痰方调控 TGF- β /Smad 信号通路对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响 [J]. *中成药*, 2024, 46(6): 2042-2047.
- FENG J W, HUANG K, JING F, et al. Effect of Fuzheng Huayu recipe regulating TGF- β /Smad signaling pathway on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(6): 2042-2047.
- [44] 燕苗苗, 赵亚昆, 王搏, 等. 博来霉素诱导大鼠与小鼠肺纤维化模型的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(2): 179-186.
- YAN M M, ZHAO Y K, WANG B, et al. Comparison and evaluation of different doses of bleomycin-induced pulmonary fibrosis models in mice and rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(2): 179-186.
- [45] 侯润苏, 闫鑫华, 杨帆, 等. 保金尘肺方对矽肺大鼠肺纤维化及肺组织 Akt/Gsk-3 β 通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(2): 897-902.
- HOU R S, YAN X H, YANG F, et al. Effects of Baojin Chenfei Formula on fibrosis and lung tissue Akt/Gsk-3 β pathway in silicosis rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med*

- Pharm, 2024, 39(2): 897–902.
- [46] 陈凤, 段乃凡, 张兴, 等. 基于 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路探讨扶正通络颗粒对肺纤维化大鼠模型巨噬细胞焦亡的影响 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(23): 6399–6406.
- CHEN F, DUAN N F, ZHANG X, et al. Effect of Fuzheng Tongluo Granules on macrophage pyroptosis in rat model with pulmonary fibrosis based on NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway [J]. Chin J Chin Mater Med, 2024, 49(23): 6399–6406.
- [47] 吴静, 杜燕, 陈龙飞, 等. 基于血清代谢组学研究金水缓纤方治疗肺纤维化机制 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(2): 743–749.
- WU J, DU Y, CHEN L F, et al. Study on the mechanism of Jinshui Huanxian Formula for the treatment of pulmonary fibrosis based on serum metabolomics [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39(2): 743–749.
- [48] 陈以文, 盛春瑞, 刘珊珊, 等. 小鼠肺组织羟脯氨酸含量测定的实验方法优化 [J]. 医学研究生学报, 2020, 33(3): 301–306.
- CHEN Y W, SHENG C R, LIU S S, et al. Optimized experimental method for determination of hydroxyproline in lung tissue of mice [J]. J Med Postgrad, 2020, 33(3): 301–306.
- [49] ESTORNUT C, MILARA J, BAYARRI M A, et al. Targeting oxidative stress as a therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 794997.
- [50] BAI Y, LI J, ZHAO P, et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress via upregulating Nrf2 [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 628.
- [51] VÁSQUEZ-GARZÓN V R, RAMÍREZ-COSMES A, REYES-JIMÉNEZ E, et al. Liver damage in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2019, 392(12): 1503–1513.
- [52] JIANG Y, LIU M, LIU H, et al. A critical review: traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Stephania tetrandra* S. Moore (Fen Fang Ji) [J]. Phytochem Rev, 2020, 19(2): 449–489.
- [53] 严业超, 郭春佚, 张家铭, 等. 汉防己甲素抑制 ROS 介导的成纤维细胞活化治疗肺纤维化 [J]. 药学报, 2024, 59(8): 2216–2226.
- YAN Y C, GUO C Y, ZHANG J M, et al. Tetrandrine ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting ROS-mediated fibroblast activation [J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(8): 2216–2226.
- [54] 梁梓琛, 余常辉, 梁世秀, 等. 桔梗素 D 通过下调成纤维细胞 TRPC6 表达改善小鼠肺纤维化 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(1): 60–69.
- LIANG Z C, YU C H, LIANG S X, et al. Platycodin D improves pulmonary fibrosis in mice by down-regulating TRPC6 expression and reducing ROS production in lung fibroblasts [J]. J South Med Univ, 2024, 44(1): 60–69.
- [55] ISHIDA Y, KUNINAKA Y, MUKAIDA N, et al. Immune mechanisms of pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3149.
- [56] 黄元, 管艳云, 蔡欣蕊, 等. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展 [J]. 中国医刊, 2024, 59(10): 1054–1059.
- HUANG Y, GUAN Y Y, CAI X R, et al. Advances in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin J Med, 2024, 59(10): 1054–1059.
- [57] 王小叶, 程明涵, 盛光丽, 等. 虫草素靶向 HDAC7 介导上皮细胞-间充质转化改善肺纤维化 [J]. 药学报, 2024, 59(6): 1627–1638.
- WANG X Y, CHENG M H, SHENG G L, et al. Cordycepin targets HDAC7 to mediate epithelial-mesenchymal transition to ameliorate pulmonary fibrosis [J]. Acta Pharm Sin, 2024, 59(6): 1627–1638.
- [58] 徐昌君, 王鹏飞, 黄雅薇, 等. 黄芪总黄酮对特发性肺纤维化 miRNA-21、let-7 d 及 TGF- β /smad 信号干预作用 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1308–1311.
- XU C J, WANG P F, HUANG Y W, et al. Relationship between miRNA-21, let-7 d and autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis and the intervention effect of Astragalus total flavonoids [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(6): 1308–1311.
- [59] WYNN T A, VANNELLA K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis [J]. Immunity, 2016, 44(3): 450–462.
- [60] VASSE G F, NIZAMOGLU M, HEIJINK I H, et al. Macrophage-stroma interactions in fibrosis: biochemical, biophysical, and cellular perspectives [J]. J Pathol, 2021, 254(4): 344–357.
- [61] KISHORE A, PETREK M. Roles of macrophage polarization and macrophage-derived miRNAs in pulmonary fibrosis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 678457.
- [62] 杨虹, 周世欣, 李红梅, 等. 基于 STAT6/PPAR- γ 通路探讨升陷化纤方及其拆方调控 M2 型巨噬细胞极化对肺纤维化的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2025, 32(1): 113–119.
- YANG H, ZHOU S X, LI H M, et al. Exploration on the effects of Shengxian Huaxian prescription on pulmonary fibrosis with regulating the polarization of M2 type macrophages based on STAT6/PPAR- γ pathway [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2025, 32(1): 113–119.
- [63] 刘芸芸, 李雅茹, 李霄, 等. 桔梗皂苷 E 通过抑制 JAK/STAT 信号抑制巨噬细胞 M2 极化改善肺纤维化的机制 [J/OL]. [2024-05-20]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20240517.1111.004.html>.
- LIU Y Y, LI Y R, LI X, et al. Mechanism of platycodon

- saponin E improving pulmonary fibrosis by inhibiting JAK/STAT signaling to block M2 polarization in macrophages [J/OL]. [2024-05-20]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20240517.1111.004.html>.
- [64] DELBREL E, SOUMARE A, NAGUEZ A, et al. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17939.
- [65] CHAVEZ-GALAN L, BECERRIL C, RUIZ A, et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis induce apoptosis and reduce the migration capacity of T lymphocytes [J]. Front Immunol, 2022, 13: 820347.
- [66] LIANG Y, YAN Y, LIU N, et al. Shengxian decoction improves lung function in rats with bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis through the inhibition of PANoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 329: 118153.
- [67] 贺倩雯, 黄文涵, 沈泉, 等. 芪冬活血饮通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善博来霉素诱导的肺纤维化 [J/OL]. [2024-06-04]. <https://link.cnki.net/doi/10.13863/j.issn1001-4454.2024.05.029>.
- HE Q W, HUANG W H, SHEN X, et al. Qidong Huoxue Drink improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J/OL]. [2024-06-04]. <https://link.cnki.net/doi/10.13863/j.issn1001-4454.2024.05.029>.
- [68] 邹恩国, 黄天宇, 王木兰, 等. 特发性肺纤维化的发病机制及中药调节作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(10): 280-289.
- ZOU E G, HUANG T Y, WANG M L, et al. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and modulating effect of Chinese medicine: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(10): 280-289.
- [69] KUWANO K, ARAYA J, HARA H, et al. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. Respir Investig, 2016, 54(6): 397-406.
- [70] 张兴, 张炜, 蔡淦. 扶正通络方调控自噬对肺纤维化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5455-5459.
- ZHANG X, ZHANG W, CAI G. Effects of Fuzheng Tongluo Formula on autophagy in treating pulmonary fibrosis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5455-5459.
- [71] 于竞泽, 孙春斌, 应艺, 等. 益肺散结方激活自噬缓解 COPD-PIF 大鼠肺纤维化的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2): 260-263.
- YU J Z, SUN C B, YING Y, et al. Experimental research of yifei Sanjie recipe activated autophagy to alleviate pulmonary fibrosis in COPD-PIF rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(2): 260-263.
- [72] ZHANG T, LIU M, GAO Y, et al. Salvianolic acid B inhalation solution enhances antifibrotic and anticoagulant effects in a rat model of pulmonary fibrosis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111475.
- [73] BETENSLEY A, SHARIF R, KARAMICHOS D. A systematic review of the role of dysfunctional wound healing in the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Clin Med, 2016, 6(1): 2.
- [74] 刘勇明, 吕晓东, 庞立健, 等. 从瘀论治特发性肺纤维化研究进展 [J/OL]. [2024-09-20]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240919.1800.036.html>.
- LIU Y M, LYU X D, PANG L J, et al. Research progress on the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis from stasis [J/OL]. [2024-09-20]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240919.1800.036.html>.
- [75] 高云航, 宋玲, 陈腾飞, 等. 基于凝血级联途径研究血栓通注射液对博来霉素诱导肺纤维化大鼠的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(16): 4313-4320.
- GAO Y H, SONG L, CHEN T F, et al. Mechanism of Xueshuantong injection on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats based on coagulation cascade pathway [J]. Chin J Chin Mater Med, 2024, 49(16): 4313-4320.
- [76] 刘勇明, 李斯宇, 庞立健, 等. 益气养阴活血通络方对特发性肺纤维化模型大鼠血小板活化及肺组织 CD40-CD40L 系统的影响 [J]. 中医杂志, 2023, 64(5): 504-511.
- LIU Y M, LI S Y, PANG L J, et al. Effect of Yiqi Yangyin Huoxue Tongluo Formula on platelet activation and lung tissue CD40-CD40L system in idiopathic pulmonary fibrosis model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(5): 504-511.
- [77] 李建生, 王至婉, 春柳, 等. 特发性肺纤维化中医证候诊断标准(2019 版) [J]. 中医杂志, 2020, 61(18): 1653-1656.
- LI J S, WANG Z W, CHUN L, et al. Syndrome diagnostic criteria of idiopathic pulmonary fibrosis in traditional Chinese medicine (2019 edition) [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(18): 1653-1656.
- [78] 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.

[收稿日期] 2024-11-28

李梦瑶,黄敏丽,李鹏,等. 基因编辑在肿瘤类器官中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 721-729.

LI M Y, HUANG M L, LI P, et al. Research progress in gene-editing technology in tumor organoids [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 721-729.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.010

基因编辑在肿瘤类器官中的研究进展

李梦瑶^{1,2}, 黄敏丽^{1,2}, 李鹏^{2,3}, 谢俊科², 郭梦甜², 张永斌^{3*}, 师长宏^{2*}

(1. 广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032;
3. 广州中医药大学动物实验中心, 广州 510405)

【摘要】 类器官已成为肿瘤研究的重要技术平台,但在模拟肿瘤组织结构 and 功能方面依旧存在问题。基因编辑技术的发展,尤其与肿瘤类器官相结合时,为精准、全面地模拟体内肿瘤模型特征提供了新的途径。通过基因编辑技术在肿瘤类器官中引入特定基因变异或修正突变,可以深入解析肿瘤的发生发展机制,探索潜在的治疗靶点,并加速药物筛选过程,为肿瘤个体化治疗提供了新的思路。本文综述了肿瘤类器官的形成及基因编辑策略应用于肿瘤类器官研究的技术要点,重点阐述了基因编辑技术在肿瘤类器官上的独特应用及前景。同时,提出准确模拟体内微环境,推动类器官基因编辑技术的标准化和稳定性,优化基因编辑效率,可以加速肿瘤类器官在精准医学研究中的应用。

【关键词】 基因编辑;肿瘤类器官;CRISPR/Cas9;干细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0721-09

Research progress in gene-editing technology in tumor organoids

LI Mengyao^{1,2}, HUANG Minli^{1,2}, LI Peng^{2,3}, XIE Junke², GUO Mengtian², ZHANG Yongbin^{3*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Innovation Centre for Science and Technology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;
3. Animal Laboratory Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

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

ZHANG Yongbin. E-mail: yongbinzhang@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Organoids have become an important technological platform in cancer research, but simulating the primary tumor tissue structure and function still presents problems. The development of gene-editing technology, especially when combined with tumor organoids, provides a new approach for accurately and comprehensively simulating the *in vivo* characteristics of tumor models. Introducing specific gene mutations or correcting mutations in tumor organoids through gene-editing technology can allow detailed analysis of the mechanisms of tumor initiation and progression, as well as exploring potential therapeutic targets, accelerating the drug-screening process, and providing new insights for personalized cancer treatment. This article reviews the formation of tumor organoids and the technical aspects of gene-editing strategies, emphasizing their unique applications and prospects in tumor organoids. We also

【基金项目】 国家自然科学基金(32070532,32270566)。

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

【作者简介】 李梦瑶,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合基础。Email: 18211574812@163.com

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

张永斌,男,博士,正高级实验师,硕士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: yongbinzhang@gzucm.edu.cn。

* 共同通信作者

propose that accurately simulating the *in vivo* microenvironment, promoting the standardization and stability of organoid gene-editing technology, and optimizing the efficiency of gene editing can accelerate the application of organoids in precision medicine research.

【Keywords】 gene-editing; tumor organoids; CRISPR/Cas9; stem cell

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

全球癌症每年致使近 1000 万人失去生命,且这一数字预计仍将持续攀升^[1]。令人遗憾的是,有效的癌症治疗手段数量却未能跟上这一严峻趋势。其中一个关键因素在于缺乏能够精准模拟人类肿瘤形态、分子特征以及微环境多样性的体外临床前模型。鉴于此,研究人员提出了肿瘤类器官这一概念。肿瘤类器官是在体外培养的 3D 细胞模型,在适当的培养条件下,肿瘤细胞或肿瘤干细胞可自行组装成与原始肿瘤组织相似的细胞结构和功能特征^[2]。相比于细胞系,类器官更能代表人类肿瘤的多样性,因为细胞系通常无法再现体内细胞的结构、功能和生理方面^[3]。且由于肿瘤细胞系随着时间推移会发生多个额外突变,导致其细胞极性和酶活性等发生改变^[4-5]。虽患者源性异种移植 (patient-derived xenografts, PDX) 模型有助于克服与细胞系使用相关的局限性,保留原始患者肿瘤的基因组特征、组织病理学和异质性,但其构建周期长、成功率低,因此,在患者临床治疗中并不适用。此外, PDX 模型只适用于检测有限数量的药物组合,并不适于高通量筛选。而类器官模型可以降低实验的复杂性,构建效率明显提升,且可快速扩增、长期培养,并且适合应用实时成像技术^[6-8]。总之,与细胞系和 PDX 模型相比,类器官具有前沿性、精准性、高效性,以及功能多样性等优势。但如何使类器官更好地发挥其优势,使其更加精确、全面地模拟各种肿瘤,为研究人员提供一个良好的体外模型,成为了当前研究重点。

在过去数年中,基因编辑技术的发展,尤其是 CRISPR/Cas9 系统的发现,将与肿瘤相关的遗传变异精准设计到干细胞中成为可能,进而培养了各式各样的类器官^[9],这些类器官保留着患者特定的致病突变与表观遗传背景,为有效模拟体内肿瘤特征开辟了全新的路径。此外,由于 CRISPR/Cas9 系统具备高精度、可重复性、易用性、成本效益以及在众多研究领域广泛的实用性

等诸多优势^[10],其与类器官培养技术的有机结合为深入探究肿瘤相关信息以及推动精准医学的发展构建了一个独一无二的模型。

构建基因编辑的肿瘤类器官模型不仅为肿瘤研究提供了更为精准的工具,还有助于在肿瘤发生发展机制、药物筛选、个性化治疗等多方面取得更为显著的突破,从而为应对肿瘤这一全球性健康挑战带来新的希望与可能。在这篇综述中,讨论了肿瘤类器官的形成以及用于肿瘤类器官的基因编辑方法和递送靶基因的方式,重点关注了基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术在肿瘤类器官中的关键作用和应用潜能,期望为肿瘤研究提供一个新的实验工具。

1 肿瘤类器官的来源

干细胞作为原始且未分化的细胞,具备自我更新能力,同时还能够分化产生某种特定组织类型的细胞。鉴于其自我更新以及多向分化的潜能,类器官得以从干细胞中构建生成,包括诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)、胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)、成体干细胞 (adult stem cells, ASCs) 以及肿瘤组织^[11]。在肿瘤类器官的培育过程中,正常干细胞通常会被置于三维培养系统内的基质胶 (如 Matrigel) 之中,并且会添加适宜的细胞因子,以此来模拟组织发育过程中的各类信号^[12]。干细胞发展演变成类器官后,利用 CRISPR/Cas9 技术对驱动突变进行序列敲除和敲入,生成肿瘤类器官,作为进一步研究肿瘤发病机制的方法^[13]。

1.1 成体干细胞来源

ASCs 衍生的类器官技术有助于模拟不同肿瘤的表型,利用这些模型,不仅可进行药物筛选,还可开展基础研究。例如,通过 CRISPR/Cas9 技术构建小鼠结肠癌类器官,揭示 SOX17 在早期结肠癌免疫逃避中的关键作用^[14]。且 ASCs 衍生类器官培养方案简单、耗时短且成熟度高,与成

人组织相似度高^[15-16]。但其细胞成分单一,主要为上皮细胞^[11],且对不同组织的培养基了解有限,这些都限制了 ASCs 衍生类器官的应用。

1.2 诱导多能干细胞来源

除了 ASCs,类器官还能源自 ESCs 或 iPSCs。人类 ESCs 因受到伦理法规的约束,其应用范围受到限制,无法广泛普及。相较而言,iPSCs 是通过特定转录因子对体细胞进行重编程而获得,具备与 ESCs 相似的多能性,能够分化成多种不同类型的细胞^[17]。通过在不同发育阶段引入癌基因过表达或抑癌基因的功能丧失来从 iPSCs 建立肿瘤类器官。这种来源的类器官可用于研究基因突变在肿瘤发生和肿瘤发展中的作用^[18-19]。然而,在从 iPSCs 产生类器官的过程中存在一个难点,传统的分化方法通常只能使 iPSCs 分化为特定类型的细胞,难以形成构成肿瘤中的多种细胞类型,这就导致了 iPSCs 衍生的类器官肿瘤细胞之间缺乏关键的相互作用^[20]。

1.3 肿瘤组织来源

基于 ASCs 衍生类器官的培养方案,研究人员可以从肿瘤组织(包括原发性肿瘤、循环肿瘤细胞和继发性转移瘤)中分离的肿瘤细胞或肿瘤干细胞在特定培养条件下形成肿瘤类器官,该种类器官很好地保留了肿瘤的组织病理学特征、基因特征和异质性,可用于肿瘤研究、药物筛选和个性化医疗,如胰腺癌^[21]、前列腺癌^[22]、肺癌^[23]、胃癌^[24]等多种肿瘤的种类器官模型已被成功建立。

类器官的来源多种多样,每种来源都有其独特的优势和应用场景,为肿瘤的研究和治疗提供了重要的工具和模型。

2 肿瘤类器官基因编辑技术的类型

2.1 应用于肿瘤类器官的基因编辑技术

类器官培养体系为探索肿瘤相关机制提供了良好的实验工具,但深入揭示基因在肿瘤中的作用需要精确的基因编辑方法。传统的同源重组技术在小鼠 ESCs 中展现出较高的基因编辑效率,但当应用于人类 ESCs 或 iPSCs 时,其靶向效率存疑。为了切实提高基因编辑效率,科研人员成功研发出了基于锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)和 TALE 核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术的基

因编辑方法^[25]。然而,设计 ZFN 和 TALENs 以精准地靶向不同序列在技术层面仍然充满困难,并且需要投入较高的成本^[26]。CRISPR 和 CRISPR 相关蛋白的发现与发展,因其编程相对简便、具有高度特异性以及多功能性,为肿瘤类器官的研究提供了良好的基因编辑方法。

其中,CRISPR/Cas9 是一种 RNA 介导的 DNA 内切酶,通过与目标序列互补的单引导 RNA(single guide RNA, sgRNA)引导识别靶 DNA。为了使 Cas9 结合并切割 DNA,目标序列下游需要存在一个原间隔邻接基序(proto-spacer adjacent motif, PAM),从而在 DNA 上产生钝端或交错末端的双链断裂(double-strand break, DSB)。随后,通过同源定向修复(homology-directed repair, HDR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)等不同的 DNA 修复机制,实现基因工程的应用^[27-28]。基于 CRISPR/Cas9 的特点,只需针对目标序列与其互补的 sgRNA 设计,便可降低操作的复杂性和成本。此外,通过表达不同的 sgRNA,可以在同一细胞中进行多个基因位点的编辑,为系统化、网络化研究肿瘤发生发展的分子机制提供了有效途径^[29-30]。

肿瘤相关的基因突变通常受多因素调控,在类器官模型中应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以更好地模拟临床病例的遗传异质性,这对于全面深入地理解肿瘤发生发展的原因,以及开发适宜的治疗手段具有重要意义^[31-32]。然而,CRISPR/Cas9 仍面临脱靶效应、DNA 损伤引起的细胞毒性以及免疫原性等限制因素^[33-34]。在 2D 细胞培养中,NHEJ 的效率足以实现群体基因敲除,验证结果时,可以直接对细胞进行分析,避免了扩大单细胞克隆的要求。然而,在类器官中进行基因编辑时,CRISPR/Cas9 诱导的 NHEJ 效率不如在 2D 细胞系中高,因此编辑后需要对单个克隆进行验证,以确保靶向需求的准确性^[35]。

2.2 编辑基因的递送方式

在进行基因编辑时,也需要慎重考虑采用何种方式将基因精准地运送至目标细胞,进而实现最佳的转染效率。目前用于类器官编辑基因递送的方式主要有两种:病毒法(如逆转录病毒、慢病毒和腺病毒)和非病毒方法(如电穿孔和脂质体感染)。

逆转录病毒和慢病毒转染利用病毒的感染机制来稳定整合外源基因序列,使其表达可以持续传递给后代。然而,逆转录病毒需要宿主细胞处于分裂状态才能将遗传信息整合到基因组中,因此无法感染终末分化和非分裂的细胞。此外,逆转录病毒感染需要高病毒滴度,可能引起免疫反应,从而降低基因组整合的效率。相比之下,慢病毒具有规避此限制的适应性,因此常用于难以感染的细胞,如免疫细胞或非分裂细胞^[36]。然而,慢病毒方法的实验周期长以及构建过程复杂,载体本身存在的致病性和生物安全性问题,并且可能导致宿主基因突变。另一种方法是腺病毒转染,它通过转染后保持为表位体,从而避免了永久整合,适用于分裂和非分裂细胞。腺病毒转染还可以轻松生成高病毒滴度,以实现更高水平的转基因表达。然而,由于缺乏基因组整合,引入的基因可能在宿主细胞分裂过程中丢失^[34]。

在选择病毒颗粒作为基因编辑的载体时,由于 Matrigel 作为类器官营养支持和结构支撑,对类器官的存活不可或缺^[35],但病毒颗粒却无法穿过 Matrigel。因此,如何让病毒在成功感染类器官的同时又不影响其存活成为了一大挑战。目前常用方法是使用 TrypLE Express 消化液将类器官解离成单细胞,然后与病毒颗粒混合^[36]。混合后在 37 ℃ 的二氧化碳培养箱中培养 6 h,随后将类器官包埋在 30 μ L 的 Matrigel 中,再覆盖培养基。但这样的感染过程涉及到对类器官的多次离心,可能导致类器官细胞活性的降低。为了避免细胞的二次损耗,有研究提出将类器官和慢病毒混合液直接平铺在 Matrigel 上孵育过夜^[37]。于第 2 天,吸除含死细胞的培养基,再次覆盖 Matrigel,覆盖底部附着的细胞,Matrigel 凝固后添加培养基。

在非病毒载体中,脂质转染利用 Lipofectamine 或相关脂质分子形成脂质体,封装 DNA 并将其引入细胞。这种方法相对简单,通常对多数细胞有效,但转基因表达通常是短暂的,且其转染效率相对较低。相比之下,电穿孔技术会比脂质体的转染效率高 30% ~ 70%^[38],但电穿孔需要相对昂贵的设备和广泛的实验,且可能会对类器官造成不可逆的损伤。

此外,在对类器官进行电穿孔时,是否需要将类器官解离成单个细胞需要考虑细胞的类型。最近一项研究发现,对单个完整的肝导管类器官不需要消化直接进行电穿孔就可以确保细胞的存活^[39]。但与之不同,肝细胞类器官由于具有致密的结构,通常需要将类器官制备成单细胞悬浮液才能进行有效转染。但同时,需要注意的是,过度解离可能会限制类器官从单细胞到重新聚团的能力。

3 基因编辑技术在肿瘤类器官的应用

3.1 靶向肿瘤的发生发展

肿瘤发生是基因突变累积的动态过程^[9]。利用基因组工程技术改造的肿瘤类器官模型,因其三维结构与细胞异质性特征,能够精准模拟正常-癌变转化过程中转录调控网络的时序性演变。通过将 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术整合到人类 iPSCs、ESCs 及 ASCs 来源的类器官体系,研究者可系统解析未转化细胞与转化细胞间的互作机制,并动态追踪早期分子事件如何驱动恶性转化。

针对结直肠癌的多阶段演进,DROST 等^[40]通过 CRISPR/Cas9 在肠道类器官中依次引入 APC、P53、KRAS 和 SMAD4 突变,首次建立了体外模拟“腺瘤-癌序列”的类器官模型。该模型不仅再现了 APC/P53 共缺失诱导的染色体不稳定性 and 异倍体演化过程,更重要的是通过类器官的传代培养系统,动态捕捉到突变累积与肿瘤恶性表型间的定量关系。类似地,MATANO 等^[41]在肠上皮类器官中同步编辑 APC、P53、KRAS、SMAD4 及 PIK3CA 基因,发现染色体不稳定性是类器官突破基底膜侵袭的关键节点,这一发现得益于类器官微环境中细胞-基质互作的精确模拟。

在脑肿瘤研究中,BIAN 等^[42]基于脑类器官模型构建了人类中枢神经系统原始神经外胚层肿瘤 (central nervous system primitive neuroectodermal tumor, CNS-PNET) 病理模型。通过 CRISPR-Cas9 特异性过表达 MYC 致癌基因,成功诱导类器官产生与 CNS-PNET 高度一致的组织病理特征、细胞异质性和转录组特征。值得注意的是,该研究利

用脑类器官的发育可塑性,证实仅 *MYC* 单基因异常即可在脑类器官中快速诱发 CNS-PNET 样病变,而传统动物模型则需要联合 *P53* 缺失等额外突变且耗时更长,这凸显了类器官在单因素致癌机制中的独特价值。

肿瘤类器官的基因编辑平台还拓展至多种癌种的关键驱动突变研究^[43-45]。例如,GEURTS 等^[46]采用 CRISPR 碱基编辑器在 ASCs 源性类器官中引入组织特异性突变:在肝类器官中构建 *CTNNB1* 突变模拟肝癌起始,在子宫内膜类器官中敲除 *PTEN* (Q245/R130 位点)再现内膜癌早期病变。这种基于类器官的靶向编辑策略,能够保留组织特异性微环境对突变表型的影响,从而更真实地揭示 *PTEN* 缺失诱发癌变的微环境依赖性机制。

上述研究表明,肿瘤类器官与基因编辑技术的协同应用具有双重优势:一方面,类器官的三维结构为基因突变的表型表达提供了近似体内的微环境;另一方面,基因编辑使研究者能在类器官中精确重构肿瘤发生的时间与空间维度。这种结合不仅建立了从突变累积到临床表型转化的可调控研究体系,更重要的是为肿瘤发生机制研究和个体化治疗策略开发开辟了新途径。

3.2 靶向癌基因

类器官作为肿瘤研究的临床前模型,其三维结构允许观察基因编辑后细胞极性改变、侵袭伪足形成等表型,为解析基因突变在肿瘤演进中的作用提供了独特平台。TONELLI 等^[47]利用胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 类器官模型,发现转录因子 *SPDEF* 通过调控粘液分泌相关基因 (*AGR2*、*ERN2/IRE1 β*) 驱动肿瘤进展。研究通过在小鼠 PDAC 类器官中敲低 *SPDEF*,在三维环境中观察到肿瘤从粘液分泌型向基底样的转化,并证实其生长抑制效应。这种亚型转化的动态过程在传统二维细胞系中难以捕捉,凸显了类器官在模拟肿瘤可塑性方面的优势。

ROE 等^[48]基于 PDAC 类器官培养模型,该模型保留了正常、胰腺上皮内瘤变、肿瘤和转移病灶的独特生物学特征。通过对比原发灶与转移灶类器官的转录组特征,发现转移性肿瘤中增强子活性的重塑依赖于先驱因子 *FOXA1*,揭示

FOXA1 驱动的增强子重编程可激活胚胎前肠内胚层转录程序,进而促进类器官在侵袭实验中表现出更强的迁移能力。

转录共激活因子 *YAP1* 是 *Hippo* 通路的下效应器,它能调节组织稳态、器官大小、再生和肿瘤发生^[49]。多种肿瘤细胞的增殖和存活发生都依赖于 *YAP1* 的持续表达,但相应的分子基础并不十分清楚。为了找出能在功能上替代 *YAP1* 的基因,KIM 等^[50]分别利用 *APC* 野生型 (*APC* wild-type, *APC* WT) 和 *APC* 基因敲除型 (*APC* knockout, *APC* KO) 小鼠建立了结肠癌类器官模型。发现 *Hippo* 通路效应因子 *YAP1* 的缺失可激活 *PRDM14-CALM2/SLC2A1* 代谢代偿轴。研究利用类器官的长期传代能力,动态追踪了 *YAP1* 抑制后葡萄糖转运通路的重编程过程,并证实 *PRDM14* 是 *YAP1* 驱动诱发肿瘤的治疗靶点。

上述研究展示了类器官结合基因编辑技术在类器官中精准模拟致癌基因的动态调控,并直接观察其对肿瘤生物学行为的影响,为生物医学机制研究提供了一种创新的工具。

3.3 靶向耐药基因

基因突变常与耐药性有关,而类器官的敏感性与其突变谱之间存在一定的关联。通过对类器官进行靶向测序,可以揭示与特定基因区域相关的突变,进而结合基因编辑技术可筛选出与耐药相关的关键基因^[51]。

BOOS 等^[52]通过从原发性和肝转移性结直肠癌患者构建类器官,并用典型的一线联合治疗^[53],FOLFIRI (亚叶酸、5-氟尿嘧啶、伊立替康) 联合西妥昔单抗 (cetuximab, Cmax) 处理,构建化疗耐受的类器官模型。使用 CRISPR/Cas9 技术,将 *KRASG12D* 突变通过电穿孔导入化疗耐受的结肠癌类器官中,结果显示 *KRASG12D* 突变使类器官对 FOLFIRI/Cmax 的耐药性增强。而 G2/M 检查点激酶 *AURKA* 可以降低 *KRAS* 突变体 FOLFIRI/Cmax 耐药类器官的细胞活力并引发细胞凋亡。数据表明,*AURKA* 是 *KRAS* 突变型结直肠癌的一个很有前景的治疗靶点。

另一项研究通过比较不同模型间的染色质可及性差异,筛选出影响药物敏感性的靶基因。XIANG 等^[54]建立了匹配的结直肠癌类器官、PDX 以及类器官衍生的异种移植瘤 (patient-derived

organoids xenografts, PDOX)。通过 ATAC-seq 和 RNA-seq 技术,发现相对于类器官,*KLF14* 和 *EGR2* 的表达在 PDOX 中更为富集。此外,*EPHA4* 作为 *KLF14* 和 *EGR2* 的共同下游靶基因,可能通过染色体重塑影响靶向药物的敏感性和耐药性。为了进一步探究 *KLF14* 和 *EGR2* 介导的 *EPHA4* 染色体重塑如何影响药物敏感性,作者在类器官中敲除了 *EPHA4*,发现其导致 *pERK1/2* 水平降低;相反,过表达 *EPHA4* 则导致 *pERK1/2* 水平升高。作者进一步使用类器官对 147 种 FDA 批准的抗癌化合物进行筛选,结果显示 *EPHA4* 会显著影响类器官对这些药物的反应。综上所述,*KLF14* 和 *EGR2* 的不同结合模式及其调控下游 *EPHA4* 的表达水平,可能在药物治疗中扮演关键角色,影响肿瘤细胞的药物敏感性。

总体而言,通过对类器官在耐药和敏感状态下的基因组、转录组和蛋白组的数据分析,人们能够识别出与药物耐药性相关的生物标志物,这有助于深入了解耐药的发生机制。此外,通过这种分析,可以探讨有效的应对策略,并针对耐药机制制定改进的治疗方案。最终,这些研究成果将有助于早期预测患者对特定治疗的反应,提高个体化医疗的精准性,从而优化治疗效果并减少不必要的副作用。

3.4 靶向药物研发与筛选

在类器官技术出现之前,细胞系和动物模型是药物筛选和研发的主要平台,但这两者都有显著的局限性。细胞系因其高效的时间和成本效益而受到关注,然而许多细胞系源自肿瘤或经过永生化处理,因此其基因表达谱与人类细胞存在差异。尽管动物模型在评估药物的疗效和安全性方面发挥了重要作用,但其长久的时间和高昂的经济成本以及伦理问题限制了其广泛应用。类器官技术的引入显著解决了细胞系和动物模型在预测人体临床试验结果时所面临的挑战,从而加快了药物开发进程,节约了资源。结合基因编辑技术,类器官作为药物测试的预测模型,能够更全面地模拟人类肿瘤的复杂性,并预测正常器官中的药物毒性反应,适用于大规模高通量药物筛选和开发。

ZHAO 等^[55]从胃癌患者的肿瘤组织中建立了 57 例患者来源的类器官,将其暴露于不同的化

疗药物中,包括 5-氟尿嘧啶和奥沙利铂等,分为 5-氟尿嘧啶敏感和耐药,奥沙利铂敏感和耐药的类器官。通过基因表达分析,发现了一些在 5-氟尿嘧啶敏感和耐药类器官中差异表达的基因,如 *MSMB* 和 *S1PR4* 等。敲除这些敏感基因会导致 PDOs 对 5-氟尿嘧啶的敏感性降低。同样,也鉴定出了一些在奥沙利铂敏感和耐药类器官中差异表达的基因,如 *MYO1A* 和 *NDUFA4L2* 等。该研究结果为胃癌的个性化治疗提供了重要的依据。通过分析患者肿瘤组织中的基因表达特征,可以确定患者对不同化疗药物的敏感性,从而选择最适合患者的治疗方案。并针对一些关键的信号通路和基因靶点,开发新的抗癌药物。

TAKEDA 等^[56]在小鼠结肠癌类器官中应用 CRISPR/Cas9 技术进行筛选和验证,研究发现了结直肠癌中新型的肿瘤抑制因子,包括 *Activins* (*Acrv1b*, *Acrv2a*) 和染色体重塑因子 *Arid2*,并确定了 *TP53* 是导致结直肠癌转移的候选基因。

利用类器官对肿瘤组织结构和功能的高度模拟,将高通量筛选与类器官技术相结合能够加速药物研发过程,缩短新药推向市场的时间,推动药物筛选和个性化治疗的快速发展。

4 总结和展望

肿瘤类器官与基因编辑技术的结合为肿瘤研究提供了前所未有的精准工具^[57],极大推动了肿瘤发生机制、药物筛选及个体化治疗的发展。通过 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术,研究者能够在类器官中精确模拟肿瘤的遗传异质性,动态追踪突变累积与表型演化的关联,并揭示耐药机制与潜在治疗靶点。然而,当前研究仍面临以下关键挑战:

首先,现有类器官多局限于上皮细胞,缺乏免疫细胞、血管系统及基质成分的整合,难以全面模拟肿瘤微环境的复杂性。尽管类器官芯片 (organoid-on-a-chip) 通过微流控系统实现了营养梯度和机械应力的调控,但血管化仍是技术难点^[58-59]。此外,通过共培养各种细胞 (包括癌细胞和其他辅助细胞,如基质细胞、血管细胞和免疫细胞) 来创造更完整类器官的方法仍在完善中^[60-61]。其次,类器官培养和基因编辑流程的标准化程度低,导致实验结果可重复性低。长期传

代中基因组的不稳定性可能引入额外突变,影响模型的临床预测价值,这一问题在高通量药物筛选中尤为突出^[62]。故必须建立国际统一的类器官培养与基因编辑操作指南,引入自动化培养系统以提高效率与一致性。再者,CRISPR/Cas9 的脱靶效应、递送系统对类器官结构的破坏,以及病毒载体的潜在生物安全性问题,限制了技术的临床应用。目前多数研究停留于基础阶段,如何将基因编辑类器官转化为临床诊断工具或治疗决策支持系统仍待突破。最后,需要促进多学科交叉融合,例如合成成像技术^[63]、人工智能^[64]、纳米医学^[65-66]等前沿技术与类器官平台的协同应用。

基因编辑肿瘤类器官,正逐步打破传统模型的局限。未来,通过技术革新与跨学科协作,这一平台有望在精准医学、药物开发及肿瘤生物学研究中发挥更核心的作用。

参 考 文 献 (References)

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] MEI J, LIU X, TIAN H X, et al. Tumour organoids and assembloids: patient-derived cancer avatars for immunotherapy [J]. Clin Transl Med, 2024, 14(4): e1656.
- [3] SAĞRAÇ D, ŞİŞLİ H B, ŞENKAL S, et al. Organoids in tissue transplantation [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1347: 45-64.
- [4] BROOKS A, LIANG X, ZHANG Y, et al. Liver organoid as a 3D *in vitro* model for drug validation and toxicity assessment [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105608.
- [5] LV J, DU X, WANG M, et al. Construction of tumor organoids and their application to cancer research and therapy [J]. Theranostics, 2024, 14(3): 1101-1125.
- [6] YOSHIDA G J. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 4.
- [7] BLEIJS M, VAN DE WETERING M, CLEVERS H, et al. Xenograft and organoid model systems in cancer research [J]. EMBO J, 2019, 38(15): e101654.
- [8] LI Y, GAO X, NI C, et al. The application of patient-derived organoid in the research of lung cancer [J]. Cell Oncol (Dordr), 2023, 46(3): 503-519.
- [9] SUN Y, DING Q. Genome engineering of stem cell organoids for disease modeling [J]. Protein Cell, 2017, 8(5): 315-327.
- [10] CHAI C, JI P, XU H, et al. Targeting cancer drug resistance utilizing organoid technology [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158: 114098.
- [11] KIM J, KOO B K, KNOBLICH J A. Human organoids: model systems for human biology and medicine [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(10): 571-584.
- [12] DRIEHUIS E, KRETZSCHMAR K, CLEVERS H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications [J]. Nat Protoc, 2020, 15(10): 3380-3409.
- [13] CHO J, LEE H, RAH W, et al. From engineered heart tissue to cardiac organoid [J]. Theranostics, 2022, 12(6): 2758-2772.
- [14] GOTO N, WESTCOTT P M K, GOTO S, et al. SOX17 enables immune evasion of early colorectal adenomas and cancers [J]. Nature, 2024, 627(8004): 636-645.
- [15] SCHUTGENS F, CLEVERS H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 211-234.
- [16] VAN DER VAART J, BOSMANS L, SIJBESMA S F, et al. Adult mouse and human organoids derived from thyroid follicular cells and modeling of Graves' hyperthyroidism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(51): e2117017118.
- [17] MESSINA A, LUCE E, HUSSEIN M, et al. Pluripotent-stem-cell-derived hepatic cells: hepatocytes and organoids for liver therapy and regeneration [J]. Cells, 2020, 9(2): 420.
- [18] BREUNIG M, MERKLE J, WAGNER M, et al. Modeling plasticity and dysplasia of pancreatic ductal organoids derived from human pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(6): 1105-1124.
- [19] WEN J, LIU F, CHENG Q, et al. Applications of organoid technology to brain tumors [J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(10): 2725-2743.
- [20] CSÖBÖNYEIOVÁ M, KLEIN M, KUNIAKOVÁ M, et al. Induced pluripotent stem cell-derived organoids: their implication in COVID-19 modeling [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3459.
- [21] PARTE S, KAUR A B, NIMMAKAYALA R K, et al. Cancer-associated fibroblast induces acinar-to-ductal cell transdifferentiation and pancreatic cancer initiation *via* LAMA5/ITGA4 axis [J]. Gastroenterology, 2024, 166(5): 842-858.
- [22] SU X A, STOPSACK K H, SCHMIDT D R, et al. RAD21 promotes oncogenesis and lethal progression of prostate cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(36): e2405543121.
- [23] WANG H M, ZHANG C Y, PENG K C, et al. Using

- patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: a real-world study [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(2): 100911.
- [24] HUO C, ZHANG X, GU Y, et al. Organoids: construction and application in gastric cancer [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5): 875.
- [25] HOSSEINI S A, SALEHIFARD JOUNEGHANI A, GHATREHSAMANI M, et al. CRISPR/Cas9 as precision and high-throughput genetic engineering tools in gastrointestinal cancer research and therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 223: 732–754.
- [26] ZHOU H, YE P, XIONG W, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 screening in stem cells: theories, applications and challenges [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 218.
- [27] RAMAKRISHNA G, BABU P E, SINGH R, et al. Application of CRISPR-Cas9 based gene editing to study the pathogenesis of colon and liver cancer using organoids [J]. *Hepatol Int*, 2021, 15(6): 1309–1317.
- [28] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [29] NIE J, HASHINO E. Organoid technologies meet genome engineering [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(3): 367–376.
- [30] DRIEHUIS E, CLEVERS H. CRISPR/Cas 9 genome editing and its applications in organoids [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(3): G257–G265.
- [31] BORESTRÖM C, JONEBRING A, GUO J, et al. A CRISPR (e) R view on kidney organoids allows generation of an induced pluripotent stem cell-derived kidney model for drug discovery [J]. *Kidney Int*, 2018, 94(6): 1099–1110.
- [32] SONG T, KONG B, LIU R, et al. Bioengineering approaches for the pancreatic tumor organoids research and application [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(1): e2300984.
- [33] HENDRIKS D, CLEVERS H, ARTEGIANI B. CRISPR-cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(5): 705–731.
- [34] WANG L, YE Z, JANG Y Y. Convergence of human pluripotent stem cell, organoid, and genome editing technologies [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(7): 861–875.
- [35] MENCHE C, FARIN H F. Strategies for genetic manipulation of adult stem cell-derived organoids [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(10): 1483–1494.
- [36] MARU Y, ONUMA K, OCHIAI M, et al. Shortcuts to intestinal carcinogenesis by genetic engineering in organoids [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(3): 858–866.
- [37] LIN S C, HAGA K, ZENG X L, et al. Generation of CRISPR-Cas9-mediated genetic knockout human intestinal tissue-derived enteroid lines by lentivirus transduction and single-cell cloning [J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(4): 1004–1027.
- [38] MARU Y, ORIHASHI K, HIPPO Y. Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422: 13–21.
- [39] HENDRIKS D, ARTEGIANI B, HU H, et al. Establishment of human fetal hepatocyte organoids and CRISPR-Cas9-based gene knockin and knockout in organoid cultures from human liver [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(1): 182–217.
- [40] DROST J, VAN JAARSVELD R H, PONSIOEN B, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells [J]. *Nature*, 2015, 521(7550): 43–47.
- [41] MATANO M, DATE S, SHIMOKAWA M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 256–262.
- [42] BIAN S, REPIC M, GUO Z, et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(8): 631–639.
- [43] YAN H H N, CHAN A S, LAI F P, et al. Organoid cultures for cancer modeling [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(7): 917–937.
- [44] YUCER N, AHDOOT R, WORKMAN M J, et al. Human iPSC-derived fallopian tube organoids with BRCA1 mutation recapitulate early-stage carcinogenesis [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(13): 110146.
- [45] LEE B C H, ROBINSON P S, COORENS T H H, et al. Mutational landscape of normal epithelial cells in Lynch Syndrome patients [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2710.
- [46] GEURTS M H, GANDHI S, BORETTO M G, et al. One-step generation of tumor models by base editor multiplexing in adult stem cell-derived organoids [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4998.
- [47] TONELLI C, YORDANOV G N, HAO Y, et al. A mucus production programme promotes classical pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Gut*, 2024, 73(6): 941–954.
- [48] ROE J S, HWANG C I, SOMERVILLE T D D, et al. Enhancer reprogramming promotes pancreatic cancer metastasis [J]. *Cell*, 2017, 170(5): 875–888.
- [49] CHEUNG P, XIOL J, DILL M T, et al. Regenerative reprogramming of the intestinal stem cell state via hippo signaling suppresses metastatic colorectal cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(4): 590–604.
- [50] KIM M, LY S H, XIE Y, et al. YAP1 and PRDM14 converge to promote cell survival and tumorigenesis [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(2): 212–227.

- [51] XIANG D, HE A, ZHOU R, et al. Building consensus on the application of organoid-based drug sensitivity testing in cancer precision medicine and drug development [J]. *Theranostics*, 2024, 14(8): 3300–3316.
- [52] BOOS S L, LOEVENICH L P, VOSBERG S, et al. Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(2): 517–540.
- [53] MZOUGH S, SCHWARZ M, WANG X, et al. Oncofetal reprogramming drives phenotypic plasticity in WNT-dependent colorectal cancer [J]. *Nat Genet*, 2025, 57(2): 402–412.
- [54] XIANG K, WANG E, MANTYH J, et al. Chromatin remodeling in patient-derived colorectal cancer models [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(16): e2303379.
- [55] ZHAO Y, LI S, ZHU L, et al. Personalized drug screening using patient-derived organoid and its clinical relevance in gastric cancer [J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(7): 101627.
- [56] TAKEDA H, KATAOKA S, NAKAYAMA M, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(31): 15635–15644.
- [57] 李鹏, 黄敏丽, 谭邓旭, 等. 胰腺癌类器官模型的构建与应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(6): 40–46.
- LI P, HUANG M L, TAN D X, et al. Construction and application of patient-derived pancreatic tumor organoid model [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(6): 40–46.
- [58] DUZAGAC F, SAORIN G, MEMEO L, et al. Microfluidic organoids-on-a-chip: quantum leap in cancer research [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4): 737.
- [59] ZHANG J, TAVAKOLI H, MA L, et al. Immunotherapy discovery on tumor organoid-on-a-chip platforms that recapitulate the tumor microenvironment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 187: 114365.
- [60] ZHOU Z, CONG L, CONG X. Patient-derived organoids in precision medicine: drug screening, organoid-on-a-chip and living organoid biobank [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 762184.
- [61] HOFER M, LUTOLF M P. Engineering organoids [J]. *Nat Rev Mater*, 2021, 6(5): 402–420.
- [62] CHEN L, WEI X, GU D, et al. Human liver cancer organoids: biological applications, current challenges, and prospects in hepatoma therapy [J]. *Cancer Lett*, 2023, 555: 216048.
- [63] PICCA F, GIANNOTTA C, TAO J, et al. From cancer to immune organoids: innovative preclinical models to dissect the crosstalk between cancer cells and the tumor microenvironment [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19): 10823.
- [64] WANG F, SONG P, WANG J, et al. Organoid bioinks: construction and application [J]. *Biofabrication*, 2024, 16(3): 032006.
- [65] SUN Y, CHATTERJEE S, LIAN X, et al. *In vivo* editing of lung stem cells for durable gene correction in mice [J]. *Science*, 2024, 384(6701): 1196–1202.
- [66] TRIVEDI P, LIU R, BI H, et al. 3D modeling of epithelial tumors-the synergy between materials engineering, 3D bioprinting, high-content imaging, and nanotechnology [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6225.

[收稿日期] 2024-07-10

徐源,杨永生,张天,等. *Ercc1* 基因缺陷模型在衰老相关疾病中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 730–738.

XU Y, YANG Y S, ZHANG T, et al. Research advances on *Ercc1*-deficient models in aging-related diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 730–738.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.011

Ercc1 基因缺陷模型在衰老相关疾病中的研究进展

徐源^{1,2}, 杨永生^{3*}, 张天⁴, 张岩^{1,2*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 筋骨理论与治法教育部重点实验室, 上海 200032; 3. 呼和浩特市中医蒙医医院, 呼和浩特 010010; 4. 内蒙古医科大学, 呼和浩特 010107)

【摘要】 DNA 修复对于遗传物质的成功复制和转录的保真性至关重要。切除修复交叉互补组 1 (*Ercc1*) 是一种结构特异性核酸内切酶, 参与核苷酸切除修复和 DNA 双链断裂修复途径而修复 DNA 损伤。衰老是 DNA 损伤和细胞损伤随着时间的推移而积累的结果。*Ercc1* 的缺陷会导致 DNA 损伤修复功能失常, 使细胞损伤不断累积, 最终诱导衰老发生。本综述总结了 *Ercc1* 在 DNA 损伤过程中的生物学功能和 *Ercc1* 缺陷小鼠模型的表型, 并讨论了 *Ercc1* 在衰老和衰老相关退行性疾病的不同组织所产生的生物学影响, 为开发针对衰老相关疾病的创新疗法、动物模型、药物研制提供了潜在的干预靶点和理论依据。

【关键词】 切除修复交叉互补组 1; DNA 损伤; DNA 修复; *Ercc1* 缺陷小鼠模型; 衰老相关疾病

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0730-09

Research advances on *Ercc1*-deficient models in aging-related diseases

XU Yuan^{1,2}, YANG Yongsheng^{3*}, ZHANG Tian⁴, ZHANG Yan^{1,2*}

(1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Key Laboratory of Theory and Therapy of Muscles and Bones, Ministry of Education, Shanghai 200032, China; 3. Hohhot Traditional Chinese Medicine of Mongolian Hospital, Hohhot 010010, China; 4. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010107, China)

Corresponding author: YANG Yongsheng. E-mail: 1255068013@qq.com;

ZHANG Yan. E-mail: medicineyan@aliyun.com

【Abstract】 DNA repair is essential for the successful replication of genetic material and for transcriptional fidelity. Excision repair cross-complementation group 1 (*Ercc1*) is a structure-specific nucleic acid endonuclease that repairs DNA damage by participating in the nucleotide excision repair and DNA double-strand break repair pathways. The accumulation of various types of molecular and cellular damage over time lead to aging. Defects in *Ercc1* are associated with malfunctions in DNA damage repair, resultsing in the accumulation of cellular damage and ultimately inducing aging. This paper summarizes the biological functions of *Ercc1* during DNA damage and the phenotypes of

【基金项目】 科技部重点研发计划中医药现代化重点专项(2023YFC3504305)。

Funded by Key Special Project for Modernization of Traditional Chinese Medicine of the Ministry of Science and Technology (2023YFC3504305).

【作者简介】 徐源, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: xuyuan18235993788@163.com

【通信作者】 杨永生, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 肌骨代谢性疾病。Email: 1255068013@qq.com;

张岩, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 药理学。Email: medicineyan@aliyun.com。

* 共同通信作者

Ercc1-deficient mouse models, and discusses the biological effects of *Ercc1* in different tissues associated with senescence and age-related degenerative diseases. This review highlights potential intervention targets and provides a theoretical basis for the development of innovative therapeutics, animal models, and drug discovery for senescence-associated diseases.

【Keywords】 excision repair cross-complementation group 1; DNA damage; DNA repair; *Ercc1*-deficient mouse model; aging-related diseases

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

人类基因组经常遇到各种外源性和内源性刺激,这会导致各种类型的 DNA 损伤,从而威胁基因组稳定性^[1]。为了保护基因组完整性并防止损伤传递给细胞后代,因此细胞配备了 DNA 损伤反应(DNA damage response,DDR)的敏感信号级联反应。DDR 是感知信号和修复遗传损伤以及在 DNA 损伤无法修复时诱导细胞凋亡或细胞衰老的途径^[2]。DDR 缺陷会导致基因突变的积累,从而诱导与年龄相关的早衰表型^[3-4]。切除修复交叉互补组 1 (excision repair cross-complementation group 1, *Ercc1*) 是一种结构特异性核酸内切酶,其独特的催化裂解性,对于参与修复受损的 DNA 从而维持基因组稳定性非常重要^[5]。*Ercc1* 在核苷酸切除修复(nucleotide excision repair,NER)途径中执行关键的切口步骤,还参与双链断裂修复(double-strand break repair,DSB)途径^[6-8]。*Ercc1* 的主要作用形式 *Ercc1*-XPF 与端粒序列的重组和染色体末端端粒突出端的丢失有关^[9]。*Ercc1* 缺陷小鼠表现出 DNA 损伤修复受损,随着 DNA 损伤积累,进一步表现出与自然小鼠衰老和人类衰老相似的衰老表型^[10]。

在本文中,综述了 *Ercc1* 在 DDR 过程中的生物学功能,并介绍了与 *Ercc1* 相关的 3 种小鼠模型,并讨论了在衰老和衰老相关疾病的背景下 *Ercc1* 对不同组织系统产生的具体影响。系统分析了 *Ercc1* 的生物功能与 *Ercc1* 缺陷小鼠的应用对于理解衰老的分子机制和开发新的与年龄相关疾病干预措施的重要意义。

1 *Ercc1* 的基本生物学特性

1.1 *Ercc1* 的结构

Ercc1 基因位于人染色体 19q13.2-q13.3, 包含 10 个外显子,通过替代剪接编码至少 4 种不同

的异构体。*Ercc1* 由一个中心结构域和一个螺旋-发夹-螺旋结构域组成,前者可与蛋白质和 DNA 相互作用,后者可确保与 XPF 亚基(包含核酸酶催化区的亚基)和双链 DNA 片段相互作用。*Ercc1*/F 组着色性干皮病偶联因子(xeroderma pigmentosum, complementation group F, XPF)异源二聚体是 XPF/MUS81 基因家族的成员,*Ercc1*/XPF 异源二聚体是 *Ercc1* 参与 DNA 修复的主要形式。它的主要功能是识别并切割病变 5' 侧极性明显的 DNA 支链结构,从而切割受损链。

1.2 *Ercc1* 的生物学功能

1.2.1 NER

在 NER 过程中,完整的核苷酸通过多蛋白修复过程从受损基因组中去除。这些 NER 蛋白以单链寡核苷酸的形式对损伤进行高度协调的切除,并以非损伤链为模板恢复原始 DNA 序列^[11]。NER 处理的最常见病变包括由紫外光诱导的病变(如环丁烷嘧啶二聚体和 6-4 光产物)和由亲电化合物(如芳胺致癌物、芳香烃和顺铂)形成的 DNA 加合物。30 多种蛋白质参与了复杂的核还原网络,并合作完成 4 个基本步骤:(1)损伤识别;(2)验证损伤;(3)切除损伤 DNA 片段;(4)DNA 合成和连接,以恢复和弥合缺口^[12]。DNA 损伤通过两种 NER 途径识别:当病变时触发识别全局基因组 NER(global genome-NER,GG-NER),当转录停滞时触发转录偶联 NER(transcriptionally coupled-NER,TC-NER)。在 GG-NER 中,由损伤感应的 DNA 损伤结合蛋白(DNA damage binding protein,DDB)和 XPC-Rad23B 复合物识别损伤。在 TC-NER 中,由 RNA 聚合酶 II(RNA polymerase II, RNA Pol II)识别,并通过 Cockayne 综合征蛋白 CSB 和 CSA 转位 RNA Pol II。损伤识别后,两个途径经历相同的关键事件:形成切口前复合物,然后通过转录因子 II H

(transcription factor II H, TFIIH) 和 XPG 解开病变附近的 DNA, 在病变周围形成一个开放的 DNA 结构, 通常由 25 ~ 30 个包含病变的不成对 DNA 碱基组成。这种结构由 DNA 结合蛋白复制蛋白 A (replication protein A, RPA) 和 XPA 稳定。RPA 被认为可以结合未受损的 DNA 链, 并有助于定位两种核酸内切 Ercc1-XPF 和 XPG, 并在修复合成

过程中保护间隙。Ercc1-XPF 是一种重要的结构特异性核酸酶, 用于修复复制和非复制细胞中的此类损伤 DNA。Ercc1-XPF 在 NER 过程中形成的开放中间体的 5' 侧切开受损的 DNA 链^[13]。在这里, Ercc1-XPF 与 NER 切口过程所需的其它蛋白因子 (即 XPC-RAD23B、XPA、RPA、TFIIH 和 XPG) 协同作用^[14], 具体作用模式如图 1。

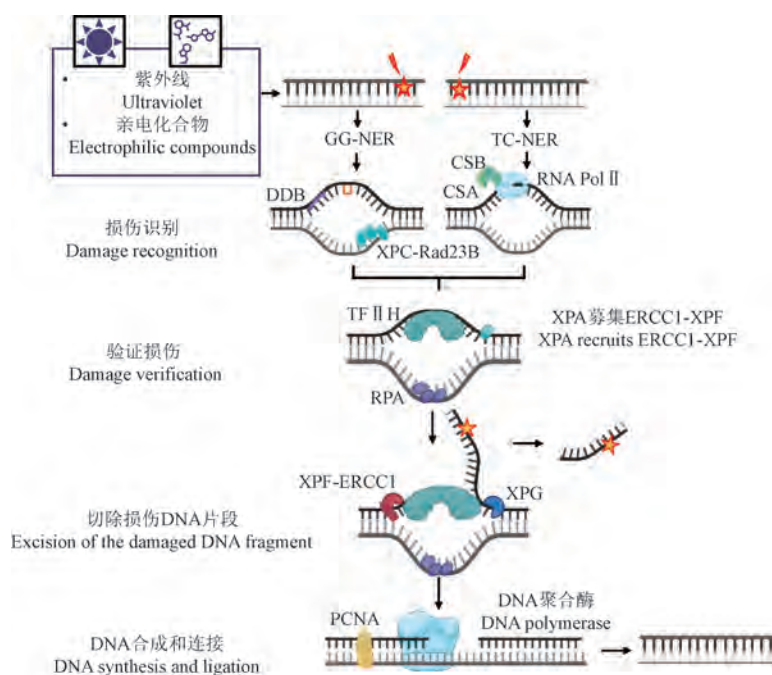


图 1 Ercc1 在 NER 中的作用概述

Figure 1 Overview of the role of Ercc1 in the NER

1.2.2 DSB

由电离辐射、自由基和化疗药物 (如顺铂、丝裂霉素-C 和拓扑异构酶抑制剂依托泊苷) 诱导的双链 DNA 断裂可通过同源重组 (homologous recombination, HR) 或非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 进行修复。虽然同源重组的主要途径是无差错的, 但 NHEJ 涉及在一个依赖于 Ku70/Ku80 的过程中自由 DNA 末端的连接, 从而导致容易出错的修复, 原因是碱基的添加或丢失, 或连接了错误的末端。在 NHEJ 中, Ercc1-XPF 参与修剪 3' 突出端^[15]。在 HR 单链退火过程中, Ercc1-XPF 参与负责 DNA 切口。此外, XPF 可以 DNA 非依赖性方式与 Rad52 的 N 端 DNA 结合区相互作用。这种相互作用可以促进 Ercc1-XPF 对 3'-突出端的切割, 以及 DSB 修复过程中出现的复合中间体的加工^[16]。具体作

用模式如图 2。总之, Ercc1-XPF 在这两种类型的 DSB 中的关键活性是它能够在断裂的 3' 突出处对受损或多余末端进行切除^[17]。Ercc1-XPF 在 DSB 中的重要性最初是在芽殖酵母中显示出来的, Ercc1 和 XPF 的酵母直向同源物 RAD10 或 RAD1 的突变抑制了 HR^[18]。Ercc1-XPF 突变的哺乳动物细胞对 DSB 很敏感^[17], DSB 的 HR 和 NHEJ 途径都会减弱^[19]。

2 Ercc1 缺陷小鼠模型

2.1 Ercc1 敲除小鼠模型

通过 Ercc1 基因敲除小鼠模型对于了解 Ercc1 的体内生物学意义至关重要。目前有两种 Ercc1 基因敲除等位基因模型被广泛认可, 这两种基因敲除等位基因是通过中断不同的外显子而产生的^[20]。第 1 种基因敲除小鼠模型是通过中

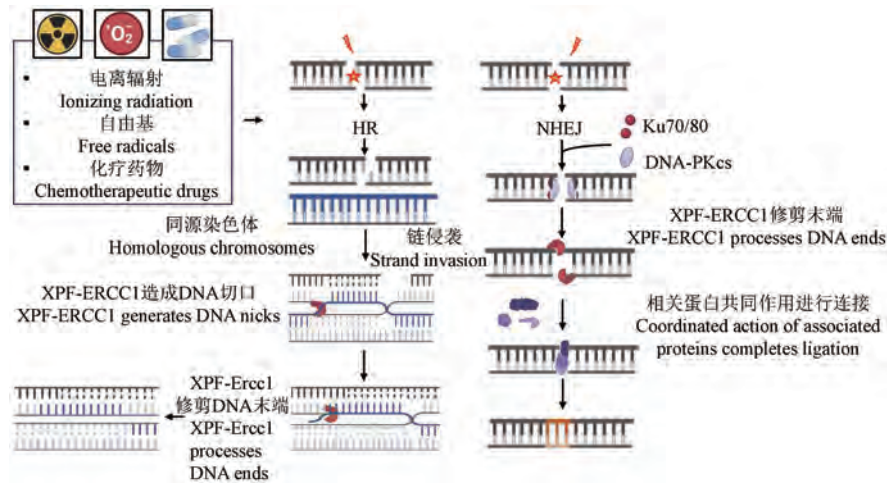


图 2 Ercc1 在 DSB 中的作用概述

Figure 2 Graphical overview of the role of Ercc1 in DSB

断 *Ercc1* 的第 5 号外显子实现的,该模型导致截短的转录本缺失最后 4 个外显子,而这 4 个外显子包含 XPF 相互作用结构域^[20]。第 2 种基因敲除模型是通过在 *Ercc1* 第 7 号外显子中插入新霉素抗性盒产生的^[21],其结果是截断了与 XPF 相互作用所需的螺旋-发夹-螺旋结构^[22]。

在完全近交的遗传背景中,*Ercc1* 的缺失是致死的^[23]。在以 C57BL/6 : FVB/n (50 : 50) 遗传背景的这两种基因敲除品系中,小鼠出生后生长严重迟缓,大约在 3 周龄时死亡,此时小鼠体质量仅为同窝野生鼠的 20%^[20-21]。两种 *Ercc1* 敲除小鼠全身性均会出现不同程度的病理状态。在神经系统中,*Ercc1*^{-/-}小鼠出现进行性神经变性的特征性症状,包括肌张力障碍、颤抖和共济失调^[23]。在造血系统中,早期的 *Ercc1*^{-/-}小鼠发育正常,然而随着时间推移,*Ercc1*^{-/-}小鼠出现白细胞减少和血小板减少,骨髓出现广泛的脂肪变性,骨髓造血干细胞储备过早耗竭^[24]。*Ercc1*^{-/-}小鼠的肝出现肝细胞多倍体、非整倍体和 G2 期停滞^[20,25]。*Ercc1*^{-/-}小鼠的体细胞、泌乳素和甲状腺激素轴受到抑制,这也是其生长迟缓和体型矮小的原因^[23]。*Ercc1*^{-/-}小鼠的机体退化和内分泌异常的病理状态与衰老小鼠相似^[26]。然而,由于 *Ercc1* 敲除小鼠短暂的寿命,使用 *Ercc1* 敲除小鼠作为衰老模型的应用较不广泛。

2.2 *Ercc1* 突变小鼠模型

为了进一步探究 *Ercc1* 在体内的 DNA 修复功能,在编码 *Ercc1* 蛋白 mRNA 的 292 位点设计

了一个过早终止密码子^[21]。这导致小鼠蛋白质的 C 端缺失 7 个氨基酸,包括 293 位的苯丙氨酸,而苯丙氨酸被认为是 *Ercc1* 与 XPF 结合所必需的氨基酸^[22]。因此,这种突变会在不影响蛋白质稳定性的情况下削弱 DNA 修复功能^[27]。与任何一种无效等位基因不同,在突变小鼠的组织中可以检测到正常水平的突变 *Ercc1* 转录本^[21]。同基因 *Ercc1*^{*292} (也称为 *Ercc1*^{ΔΔ}) 小鼠的寿命长达 6 个月,与 *Ercc1*^{-/-}小鼠类似,*Ercc1*^{ΔΔ} 小鼠不能生育,皮肤萎缩且缺乏皮下脂肪^[21]。*Ercc1*^{-/-}小鼠的几乎所有表型都能在这种寿命较长的突变株中重现。*Ercc1*^{ΔΔ}小鼠的脾中铁蛋白和血色素沉积增加,表明红细胞周转率高。肾表现为肾小管扩张并伴有透明铸模。肝和肾常见核多倍体。来自 *Ercc1*^{ΔΔ}小鼠的原代小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) 对交联剂丝裂霉素 C 的敏感性略低于来自 *Ercc1*^{-/-}小鼠的 MEFs,这表明它们寿命的延长是由于 DNA 修复能力的提高^[21]。尽管如此,对 *Ercc1*^{ΔΔ}小鼠局部施用肿瘤诱导剂 DMBA 会导致急性中毒,而不是致癌,这说明 *Ercc1*^{ΔΔ}小鼠的 DNA 修复机制仍存有较大缺陷^[21]。

2.3 *Ercc1* 亚型小鼠模型

结合一个空位和一个 292 位点突变的 *Ercc1* 等位基因产生的小鼠 (*Ercc1*^{-/*292}; *Ercc1*^{-ΔΔ} 或 *Ercc1*^{d/-}, 以下皆称为 *Ercc1*^{-ΔΔ}) 符合孟德尔遗传规律,最大寿命为 7 个月^[28],在实验模型中应用最为广泛。与野生型小鼠相比,*Ercc1*^{-ΔΔ} 小鼠体型

矮小^[29]。与 *Ercc1*^{-/-} 小鼠类似,都具有肌张力障碍、震颤、脊柱后凸和共济失调表型^[29]。虽然与 *Ercc1*^{-/-} 小鼠具有相似表型,*Ercc1*^{-Δ} 小鼠则进一步证明了其表型的不同不是由于发育异常导致的,因为 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠在性成熟前发育正常,性发育成熟后,开始表现出快速衰老的迹象,而这一现象与自然衰老小鼠模型相似^[30]。*Ercc1*^{-Δ} 小鼠与转基因 lacZ 报告品系杂交,测量体内突变频率^[28]。与正常同窝小鼠相比,5 ~ 6 个月大的 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠肝中的突变频率略有升高。这些突变主要是老龄野生型小鼠特有的染色体重排,而不是 NER 缺陷小鼠特有的点突变^[28]。这表明 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠具有与自然衰老小鼠染色体重排相似的特点,可以更准确模拟老年小鼠的生理状态。

Ercc1^{-Δ} 小鼠相对于野生型同窝小鼠的全基因组表达变化与自然衰老发生的变化出现明显的重叠,这为 DNA 损伤可能导致衰老的观点提供了一些支持。此外,*Ercc1*^{-Δ} 小鼠的全基因组表达谱分析显示,*Ercc1*^{-Δ} 小鼠与许多长寿模型的转录组高度相关,包括 Ames 和 Snell 侏儒模型小鼠和热量受限模型小鼠^[26]。因此尽管 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠在表型上出现种种衰老迹象,但是基因水平上,由于对 DNA 修复的失败,激活体内应激反应作为代偿机制从而促进长寿基因表达^[31]。虽然这可能是有益的,但从长远来看,面对持续的 DNA 损伤,这不足以维持机体的生存^[23]。研究表明,这种应激反应也是由营养匮乏引发的,并且是通过抑制 GH-IGF1 信号传导的,这一点可以从与 Ames 和 Snell 侏儒模型小鼠的显著相关性中得到证明^[26]。对 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠血清和尿液中代谢物的分析进一步证实了这一点^[30]。其中一些代谢变化与热量限制引起的变化相似,包括高密度脂蛋白增加、低密度脂蛋白和超低密度脂蛋白减少。然而,*Ercc1*^{-Δ} 小鼠的一些代谢变化也与退化相一致,如尿液中葡萄糖、柠檬酸盐和琥珀酸盐增加,表明肾功能失调,代谢性碱中毒表明肝功能失调^[30]。

总之,这些数据支持以下结论:*Ercc1*^{-Δ} 小鼠正常发育至性成熟,随后出现染色体重排和代谢差异等退行性变化,这都表明 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠与自然衰老小鼠之间的相似性。然而值得注意的是,与自然衰老小鼠不同,*Ercc1*^{-Δ} 小鼠由于 DNA 损

伤引发的应激反应,表现出与长寿模型相似的转录组^[26],这或许在实验中表现出与自然衰老模型小鼠不同的实验结果。

3 *Ercc1* 在衰老相关疾病中的作用

3.1 心血管系统疾病

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD),如心力衰竭、动脉粥样硬化和心肌梗塞,通常被认为是与衰老相关的病理状况^[32]。随着年龄的增长,心血管系统逐渐经历一系列功能、结构和细胞变化,这些变化导致 CVD 的发生,包括左心室收缩和舒张功能的改变、鼻窦功能障碍、心肌肥大、动脉僵硬和纤维化的发生率增加^[33-34]。

Ercc1 表达的降低与稳定型心绞痛和心肌梗死有关^[35]。*Ercc1*^{-Δ} 小鼠表现出与人类血管衰老的典型特征,即血管硬度、收缩压和脉压增加,反应性充血减少^[36]。*Ercc1* 在去除心脏中内源性 DNA 损伤至关重要^[37]。特异性敲除心肌细胞中的 *Ercc1* 会导致小鼠在 6 月龄中出现扩张型心肌病和猝死,并且与任何外源性基因毒素无关^[38]。4 周龄 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠心脏功能正常,随着时间推移,*Ercc1*^{-Δ} 小鼠表现为年龄依赖性的左心室壁变薄和心室扩张,并伴有心肌细胞横截面积的显著增加^[39]。研究认为 *Ercc1* 缺陷小鼠中自发的氧化 DNA 加合物水平降低,内源性 DNA 损伤不断累积,驱动体内细胞凋亡,这是导致心室壁变薄主要机制之一^[38]。综上所述 *Ercc1* 的缺陷不会影响发育进程,而通过累积 DNA 损伤导致小鼠心脏功能的逐渐恶化并最终猝死。

3.2 肌肉骨骼系统疾病

在 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠身上观察到的突出肌肉骨骼变化之一是骨密度下降和骨结构变化,表现出与年龄相关的骨质疏松症特征^[40]。对 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠进行的 Micro-CT 分析表明,骨的微观结构发生了与年龄相关的变化,包括腰椎骨小梁厚度和数量减少,椎体孔隙率增加^[40]。特别是这些小鼠会出现与年龄相关的椎间盘退化,并伴有骨质疏松的骨表型,其特征是椎间盘高度损失和椎间盘内的退行性变化^[41]。在 20 周大的 *Ercc1*^{-Δ} 小鼠中,观察到腰椎间盘高度显著降低。这种降低相当于在自然年龄为 2 岁的小鼠中观察到的椎体高度降低^[41]。此外,肿瘤坏死因子(tumour necrosis

factor- α , TNF- α) 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 受体激活剂的表达升高表明, *Ercc1* 缺陷小鼠的骨质疏松症发病较早^[42-43]。这归因于骨髓干细胞的衰老增加, 导致这些小鼠的成骨细胞功能降低, 破骨细胞生成增加。

在肌肉相关表型方面, *Ercc1*^{-/-} 小鼠表现出握力减弱、步态障碍、脊柱侧弯和震颤, 表明肌肉功能障碍和萎缩^[29,44]。通过握力、转棒和旷场测试评估的运动活动下降也证明了 *Ercc1*^{-/-} 小鼠肌肉力量和功能的降低^[29]。此外, 在 16 周时, *Ercc1*^{-/-} 小鼠表现出肌少症表型, 其特征是肌肉尺寸变小, 趾长伸肌和比目鱼肌等肌肉的质量下降^[44]。这种肌肉损失归因于与年龄相关的肌肉质量下降。此外, 与老年野生型小鼠相比, *Ercc1*^{-/-} 小鼠因凋亡和坏死而表现出更高比例的肌纤维死亡^[45]。此外, 因参与调节肌肉肥大而闻名的 Akt 通路在突变 *Ercc1* 小鼠中上调^[40]。这一发现表明, 蛋白质合成途径的激活抵消了在这些小鼠中观察到的萎缩性肌肉表型。因此, 刺激蛋白质合成途径有可能成为一种补偿机制, 以弥补在 *Ercc1*^{-/-} 小鼠模型中观察到的严重肌肉萎缩。

3.3 神经系统疾病

DNA 损伤的积累是与年龄相关的神经退行性疾病的标志, 例如阿尔茨海默综合征、帕金森病、亨廷顿病和肌萎缩侧索硬化症^[46]。先天性 DNA 修复缺陷通常与人类和相应动物模型中的神经系统症状有关^[47]。无法修复的 DNA 损伤会干扰有丝分裂后神经元的持续转录, 或阻碍分裂神经胶质细胞中 mRNA 合成和 DNA 复制的过程, 从而导致细胞功能障碍、细胞衰老或细胞死亡^[48-49]。为了抵消 DNA 损伤, 哺乳动物细胞依靠部分重叠的基因组维持通路来修复 DNA 损伤并保持基因组完整性^[50]。

Ercc1 缺陷小鼠模型的大脑在早期出现神经退行性改变, 例如运动异常和认知能力下降、大脑中广泛的星形胶质细胞增生、小胶质细胞增生和神经元变性, 以及脊髓中的进行性运动神经元丢失^[29,51-52]。*Ercc1*^{-/-} 小鼠中的小胶质细胞表现出肥大形态和胞体大小增加^[53], 小胶质细胞的这种形变可能是为了覆盖和监视大脑中更大的区域, 从而增强对 DNA 损伤的响应。在功能上, *Ercc1*^{-/-} 小鼠中的小胶质细胞表现出吞噬作用、

增殖和 ROS 产生增加。值得注意的是, *Ercc1*^{-/-} 小鼠中的小胶质细胞被启动, 表明对全身外周炎症的促炎反应增强^[54]。前脑神经元中 *Ercc1* 的特异性缺失表明神经元遗传毒性应激足以诱导小胶质细胞启动^[53]。此外, 研究认为 *Ercc1* 是小胶质细胞的必需蛋白, 其缺失会导致细胞死亡^[53]。

在 *Ercc1*^{-/-} 小鼠的脊髓中也发现了神经退行性病变, 这些 *Ercc1*^{-/-} 小鼠还表现为年龄依赖性的运动神经元丧失, 远端运动轴突的神经丝积累和骨骼肌的去神经支配萎缩 *Ercc1*^{-/-} 小鼠的坐骨神经也出现周围神经退行性病变^[55]。*Ercc1*^{-/-} 小鼠 8 周龄时, 神经束比对照组小 20%, 但组织正常发生了神经退行性表型的快速进展。在 20 周龄时, 神经束不仅变小, 而且组织紊乱, 大神经纤维丢失, 小神经纤维比例增加, 髓磷脂丢失, 神经内膜结缔组织增多, 该表型的超微结构特征表明轴突萎缩伴继发性髓鞘变性^[55]。

4 结论和未来展望

老龄化和与年龄相关的疾病对全球老龄化人口构成了重大挑战。伦理和实验限制决定了需要严重依赖动物模型来研究人类衰老, 在这种情况下, 小鼠仍然是最合适的动物。DNA 修复损伤的 *Ercc1* 缺陷小鼠表现出过早衰老和早衰病变, 这证明 DNA 损伤诱导的衰老参与了衰老过程^[56]。对 *Ercc1* 缺陷小鼠的研究可以提供有关衰老的基本机制以及促进长寿的自然防御系统的宝贵信息, 并且还可作为临床前研究的快速模型, 用于解决衰老的某些方面问题^[57]。

Ercc1 基因在人和小鼠之间具有高度保守性, 核心功能域(如与 XPF 形成异源二聚体的结构域)高度相似^[58]。然而, *Ercc1* 缺陷小鼠诱发的加速衰老模型与人类 *Ercc1* 缺陷仍有物种差异。由于 *Ercc1* 部分功能是依赖于端粒实现的, 然而人类端粒较短, *Ercc1* 缺陷可能加速端粒功能异常, 而小鼠端粒较长, 其表型可能被部分掩盖, 需结合端粒酶敲除模型进一步验证。未来研究应当进一步关注 *Ercc1* 端粒依赖性方面的研究, 以提高对人类衰老疾病的模拟精度。

Ercc1 缺陷小鼠诱发的加速衰老模型并不能替代小鼠自然衰老模型^[59]。具体表现在 *Ercc1* 缺陷小鼠组织病理学病变与自然衰老小鼠的组织

病理学病变往往不完全重合,例如,*Ercc1* 缺陷小鼠相较于自然衰老小鼠的肝显著衰老,表现为细胞凋亡、多倍体化和增殖显著增加^[60]。*Ercc1* 缺陷小鼠的表型集中于成年期快速衰老,难以模拟自然衰老中多阶段、渐进性的器官衰退。此外,*Ercc1* 缺陷小鼠核心机制为 DNA 修复缺陷,导致基因组不稳定性增加,进而驱动细胞衰老和炎症因子释放,而自然衰老小鼠机制复杂,涉及端粒缩短、线粒体功能障碍、代谢失调及慢性炎症等多机制共同作用,因此未来在模拟自然衰老模型中应当从多模型联合分析,并且对 *Ercc1* 模型小鼠的遗传图谱进行更详细的探索,有望揭示更多与衰老相关的途径和基因,并将构成 *Ercc1* 缺陷衰老小鼠模型的基础。

衰老是生物体遗传学与特定环境压力之间复杂相互作用的结果^[61]。环境因素(包括饲养条件、传染源和饮食)可能对小鼠模型衰老表型的表达有影响,或许对人类也有影响^[62]。另一个重要的考虑因素是动物的性别。除了与生殖相关的病变外,小鼠模型和临床前研究中的衰老表型描述通常不会报告动物的性别,衰老研究中使用的小鼠模型所检测的许多特征都受到与性别相关的生物因素的影响,如骨密度和神经变性^[63]。*Ercc1* 缺陷雄性小鼠相较于缺陷雌性小鼠的生存期显著减少^[38],缺陷雄性小鼠相对于缺陷雌性小鼠表现出心力衰竭加速,部分原因可能归因于雌激素的保护作用^[64]。事实上,已发现的几种能影响野生型小鼠寿命的疗法只对雄性小鼠有效^[65],或对雌性小鼠有较大程度的疗效^[66]。未来关于 *Ercc1* 模型小鼠中雌雄差异仍需进一步探索。

在寿命研究中,最脆弱的器官或身体系统会首先衰竭导致动物死亡,从而无法获得关于对其他可能更相关的器官系统的长期影响的信息。*Ercc1* 组织特异性基因缺陷模型导致 DNA 损伤积累或 mtDNA 突变,仅仅影响该组织病变(细胞自主衰老机制),或是也可以影响其他组织病变(非细胞自主衰老机制)仍需要进一步研究^[67]。未来结合 *Ercc1* 缺陷动物模型进行的研究无疑将促进基因或药物治疗干预措施的快速发展和完善,这些干预措施可减少 DNA 损伤、促进 DNA 修复或优化细胞对 DNA 损伤的反应,从而延长健康寿命和延缓衰老。

参 考 文 献(References)

- [1] DE SILVA N S, SIEWIERA J, ALKHOURY C, et al. Nuclear envelope disruption triggers hallmarks of aging in lung alveolar macrophages [J]. *Nat Aging*, 2023, 3(10): 1251–1268.
- [2] LI M, SHAO G. Senataxin attenuates DNA damage response activation and suppresses senescence [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(11): 1337.
- [3] CHENG B, PAN W, XING Y, et al. Recent advances in DDR (DNA damage response) inhibitors for cancer therapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 230: 114109.
- [4] ZHANG X, ZHAO Q, WANG T, et al. DNA damage response, a double-edged sword for vascular aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 92: 102137.
- [5] POMMIER Y, SUN Y, HUANG S N, et al. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(11): 703–721.
- [6] YU J, YAN C, PAUL T, et al. Molecular architecture and functional dynamics of the pre-incision complex in nucleotide excision repair [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 8511.
- [7] MUNIESA-VARGAS A, THEIL A F, RIBEIRO-SILVA C, et al. XPG: a multitasking genome caretaker [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(3): 166.
- [8] GOHIL D, SARKER A H, ROY R. Base excision repair: mechanisms and impact in biology, disease, and medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14186.
- [9] ZHU X D, NIEDERNHOFER L, KUSTER B, et al. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes [J]. *Mol Cell*, 2003, 12(6): 1489–1498.
- [10] PAINE P T, RECHSTEINER C, MORANDINI F, et al. Initiation phase cellular reprogramming ameliorates DNA damage in the ERCC1 mouse model of premature aging [J]. *Front Aging*, 2024, 4: 1323194.
- [11] SANTIAGO F E, ADIGE T, MAHMUD S, et al. miR-96-5p expression is sufficient to induce and maintain the senescent cell fate in the absence of stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(40): e2321182121.
- [12] MARTEIJN J A, LANS H, VERMEULEN W, et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7): 465–481.
- [13] SIJBERS A M, DE LAAT W L, ARIZA R R, et al. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease [J]. *Cell*, 1996, 86(5): 811–822.
- [14] ABOUSSEKHRA A, BIGGERSTAFF M, SHIVJI M K, et

- al. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components [J]. *Cell*, 1995, 80(6): 859–868.
- [15] FARIDOUNNIA M, FOLKERS G E, BOELEN R. Function and interactions of ERCC1-XPF in DNA damage response [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3205.
- [16] MOTYCKA T A, BESSHO T, POST S M, et al. Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(14): 13634–13639.
- [17] AHMAD A, ROBINSON A R, DUENSING A, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(16): 5082–5092.
- [18] SCHIESTL R H, PRAKASH S. *RAD10* an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in the RAD1 pathway of mitotic recombination [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(6): 2485–2491.
- [19] AL-MINAWI A Z, SALEH-GOHARI N, HELLEDAY T. The *ERCC1/XPF* endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(1): 1–9.
- [20] MCWHIR J, SELFRIDGE J, HARRISON D J, et al. Mice with DNA repair gene (*ERCC-1*) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning [J]. *Nat Genet*, 1993, 5(3): 217–224.
- [21] WEEDA G, DONKER I, DE WIT J, et al. Disruption of mouse *ERCC1* results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(6): 427–439.
- [22] DE LAAT W L, SIJBERS A M, ODIJK H, et al. Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(18): 4146–4152.
- [23] NIEDERNHOFER L J, GARINIS G A, RAAMS A, et al. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1038–1043.
- [24] PRASHER J M, LALAI A S, HEIJMANS-ANTONISSEN C, et al. Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient *Ercc1*^{-/-} mice [J]. *EMBO J*, 2005, 24(4): 861–871.
- [25] CHIPCHASE M D, O' NEILL M, MELTON D W. Characterization of premature liver polyploidy in DNA repair (*Ercc1*)-deficient mice [J]. *Hepatology*, 2003, 38(4): 958–966.
- [26] SCHUMACHER B, VAN DER PLUIJM I, MOORHOUSE M J, et al. Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(8): e1000161.
- [27] SIJBERS A M, VAN DER SPEK P J, ODIJK H, et al. Mutational analysis of the human nucleotide excision repair gene *ERCC1* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(17): 3370–3380.
- [28] DOLLÉ M E T, BUSUTTIL R A, GARCIA A M, et al. Increased genomic instability is not a prerequisite for shortened lifespan in DNA repair deficient mice [J]. *Mutat Res*, 2006, 596(1/2): 22–35.
- [29] DE WAARD M C, VAN DER PLUIJM I, ZUIDERVEEN BORGESIU N, et al. Age-related motor neuron degeneration in DNA repair-deficient *Ercc1* mice [J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 120(4): 461–475.
- [30] NEVEDOMSKAYA E, MEISSNER A, GORALER S, et al. Metabolic profiling of accelerated aging *ERCC1*^{d/-} mice [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(7): 3680–3687.
- [31] GREGG S Q, ROBINSON A R, NIEDERNHOFER L J. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2011, 10(7): 781–791.
- [32] RODGERS J L, JONES J, BOLLEDDU S I, et al. Cardiovascular risks associated with gender and aging [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2019, 6(2): 19.
- [33] SANTOS F, CORREIA M, DIAS R, et al. Age-associated metabolic and epigenetic barriers during direct reprogramming of mouse fibroblasts into induced cardiomyocytes [J]. *Aging Cell*, 2025, 24(2): e14371.
- [34] ALRADWAN I, AL FAYEZ N, ALOMARY M N, et al. Emerging trends and innovations in the treatment and diagnosis of atherosclerosis and cardiovascular disease: a comprehensive review towards healthier aging [J]. *Pharmaceutics*, 2024, 16(8): 1037.
- [35] ZHAO L, ZHANG B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44735.
- [36] DURIK M, KAVOUSI M, VAN DER PLUIJM I, et al. Nucleotide excision DNA repair is associated with age-related vascular dysfunction [J]. *Circulation*, 2012, 126(4): 468–478.
- [37] DE MAJO F, MARTENS L, HEGENBARTH J C, et al. Genomic instability in the naturally and prematurely aged myocardium [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(36): e2022974118.
- [38] HENPITA C, VYAS R, HEALY C L, et al. Loss of DNA repair mechanisms in cardiac myocytes induce dilated cardiomyopathy [J]. *Aging Cell*, 2023, 22(4): e13782.
- [39] DE BOER M, TE LINTEL HEKKERT M, CHANG J, et al. DNA repair in cardiomyocytes is critical for maintaining cardiac function in mice [J]. *Aging Cell*, 2023, 22

- (3): e13768.
- [40] CHEN Q, LIU K, ROBINSON A R, et al. DNA damage drives accelerated bone aging via an NF- κ B-dependent mechanism [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(5): 1214–1228.
- [41] VO N, SEO H Y, ROBINSON A, et al. Accelerated aging of intervertebral discs in a mouse model of progeria [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(12): 1600–1607.
- [42] FLORES R R, CLAUSON C L, CHO J, et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells with aging in the bone marrow of mice through a NF- κ B-dependent mechanism [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(3): 480–487.
- [43] KIM D E, DOLLÉ M E T, VERMEIJ W P, et al. Deficiency in the DNA repair protein ERCC1 triggers a link between senescence and apoptosis in human fibroblasts and mouse skin [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13072.
- [44] ALYODAWI K, VERMEIJ W P, OMAIRI S, et al. Compression of morbidity in a progeroid mouse model through the attenuation of myostatin/activin signalling [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10(3): 662–686.
- [45] VAN DEN HEUVEL D, KIM M, WONDERGEM A P, et al. A disease-associated XPA allele interferes with TFIIH binding and primarily affects transcription-coupled nucleotide excision repair [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(11): e2208860120.
- [46] ARVANITAKI E S, GOULIELMAKI E, GKIRTZIMANAKI K, et al. Microglia-derived extracellular vesicles trigger age-related neurodegeneration upon DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(17): e2317402121.
- [47] RIECKHER M, GARINIS G A, SCHUMACHER B. Molecular pathology of rare progeroid diseases [J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27(9): 907–922.
- [48] DELINT-RAMIREZ I, MADABHUSHI R. DNA damage and its links to neuronal aging and degeneration [J]. *Neuron*, 2025, 113(1): 7–28.
- [49] KHODYREVA S N, DYRKHEEVA N S, LAVRIK O I. Proteins associated with neurodegenerative diseases: link to DNA repair [J]. *Biomedicines*, 2024, 12(12): 2808.
- [50] HOEIJMAKERS J H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 366–374.
- [51] BORGESIU N Z, DE WAARD M C, VAN DER PLUIJM I, et al. Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(35): 12543–12553.
- [52] VÉGH M J, DE WAARD M C, VAN DER PLUIJM I, et al. Synaptic proteome changes in a DNA repair deficient *ercc1* mouse model of accelerated aging [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1855–1867.
- [53] RAJ D D A, JAARSMA D, HOLTMAN I R, et al. Priming of microglia in a DNA-repair deficient model of accelerated aging [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(9): 2147–2160.
- [54] CUNNINGHAM C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation [J]. *Glia*, 2013, 61(1): 71–90.
- [55] GOSS J R, STOLZ D B, ROBINSON A R, et al. Premature aging-related peripheral neuropathy in a mouse model of progeria [J]. *Mech Ageing Dev*, 2011, 132(8/9): 437–442.
- [56] CAI N, WU Y, HUANG Y. Induction of accelerated aging in a mouse model [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1418.
- [57] YOUSEFZADEH M J, FLORES R R, ZHU Y, et al. An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs [J]. *Nature*, 2021, 594(7861): 100–105.
- [58] WILSON M D, RUTTAN C C, KOOP B F, et al. ERCC1: a comparative genomic perspective [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2001, 38(2/3): 209–215.
- [59] PEREZ K, PARRAS A, PICÓ S, et al. DNA repair-deficient premature aging models display accelerated epigenetic age [J]. *Aging Cell*, 2024, 23(2): e14058.
- [60] VOUGIOUKALAKI M, DEMMERS J, VERMEIJ W P, et al. Different responses to DNA damage determine ageing differences between organs [J]. *Aging Cell*, 2022, 21(4): e13562.
- [61] WU H, WANG Y, ZHANG H, et al. An investigation into the health status of the elderly population in China and the obstacles to achieving healthy aging [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 31123.
- [62] BORREGO-RUIZ A, BORREGO J J. Epigenetic mechanisms in aging: extrinsic factors and gut microbiome [J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15(12): 1599.
- [63] GUAN Q, ZHANG Y, WANG Z K, et al. Skeletal phenotypes and molecular mechanisms in aging mice [J]. *Zool Res*, 2024, 45(4): 724–746.
- [64] DU X J. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(3): 510–519.
- [65] HARRISON D E, STRONG R, ALLISON D B, et al. Acarbose, 17- α -estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males [J]. *Aging Cell*, 2014, 13(2): 273–282.
- [66] MILLER R A, HARRISON D E, ASTLE C M, et al. Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction [J]. *Aging Cell*, 2014, 13(3): 468–477.
- [67] YOUSEFZADEH M J, ZHAO J, BUKATA C, et al. Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13094.

司雨欣,张庆祥,安家莹,等. 慢性疼痛伴焦虑动物模型的建立及针刺干预效应的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 739-755.

SI Y X, ZHANG Q X, AN J Y, et al. Overview of construction of effector platforms and behavioral assessments of acupuncture intervention in animal models of chronic pain accompanied by pain anxiety [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 739-755.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.012

慢性疼痛伴焦虑动物模型的建立及针刺干预效应的研究进展

司雨欣^{1,2}, 张庆祥^{1,2}, 安家莹^{1,2}, 张祐霖^{1,2}, 张淼^{1,2}, 傅予^{1,3},
于玉杰^{1,2}, 张涵^{1,2}, 房钰鑫^{1,2*}

(1. 天津中医药大学实验针灸学研究中心, 天津 301617; 2. 天津中医药大学针灸推拿学院, 天津 301617; 3. 天津中医药大学医学技术学院, 天津 301617)

【摘要】 慢性疼痛已成为当今社会普遍的医疗难题之一。在遭受慢性疼痛困扰的同时, 患者往往还伴随着焦虑、抑郁、创伤后应激障碍以及各类精神综合征等心理疾病。这些心理问题不仅严重影响着患者对疼痛的感知与反应, 更可能成为疼痛治疗过程中的关键阻碍。针灸, 作为一种拥有悠久历史的临床实践方法, 已被大量研究证实对多种类型疼痛具有显著的缓解效果, 并且在改善焦虑和抑郁等情绪问题方面也展现出良好的疗效。然而, 目前针刺镇痛以及抗焦虑的具体机制仍有待进一步探究。在此背景下, 构建理想且稳定的动物模型对于深入研究疼痛情绪的发生发展以及针刺效应机制显得尤为关键。因此, 本文综合近年来相关领域发表的文献, 从实验动物的选择、模型的建立以及行为学评估等多维度对慢性疼痛伴发痛焦虑动物模型平台的现状进行总结; 同时, 从针刺参数、选穴、干预周期等多方面深入探讨了针刺干预慢性疼痛伴发痛焦虑动物模型效应平台的研究进展。本文旨在为针刺干预慢性疼痛伴随焦虑情绪的机制研究提供更为广泛且具有参考价值的前期动物模型构建思路, 以期推动相关领域的科学研究发展。

【关键词】 针刺; 慢性痛; 焦虑; 动物模型; 行为学评估

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0739-17

Overview of construction of effector platforms and behavioral assessments of acupuncture intervention in animal models of chronic pain accompanied by pain anxiety

SI Yuxin^{1,2}, ZHANG Qingxiang^{1,2}, AN Jiaying^{1,2}, ZHANG Youlin^{1,2}, ZHANG Miao^{1,2},
FU Yu^{1,3}, YU Yujie^{1,2}, ZHANG Han^{1,2}, FANG Yuxin^{1,2*}

(1. Experimental Acupuncture Research Center, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. School of Acupuncture and Tuina, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. School of Medical Technology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)
Corresponding author: FANG Yuxin. E-mail: meng99_2006@126.com

【基金项目】 天津市教委科研计划项目 (2023ZD027)。

Funded by the Science & Technology Development Fund of Tianjin Education Commission for Higher Education (2023ZD027).

【作者简介】 司雨欣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针刺的作用机理。Email: 554340281@qq.com

【通信作者】 房钰鑫, 女, 博士, 副研究员, 博士生导师, 研究方向: 针刺的作用机理。Email: meng99_2006@126.com

【Abstract】 Chronic pain has emerged as a prevalent medical challenge in contemporary society. Patients suffering from chronic pain frequently develop comorbid psychological disorders, including anxiety, depression, post-traumatic stress disorder, and various psychiatric syndromes. These psychological complications not only affect patients' pain perception and responses, but may also constitute critical obstacles during pain management interventions. Acupuncture is a long-established clinical practice that has demonstrated remarkable efficacy in alleviating diverse pain types and has shown favorable therapeutic outcomes in ameliorating emotional disturbances such as anxiety and depression. The precise mechanisms underlying acupuncture-induced analgesia and anxiolytic effects, however, remain to be fully elucidated. In this context, it is essential to establish suitable and stable animal models to allow in-depth investigations into the pathogenesis of pain-related emotional disorders and the mechanistic foundations of acupuncture. This article presents a comprehensive review of recent literature regarding the selection of experimental animals, model-establishment methodologies, and behavioral-assessment paradigms pertaining to animal model platforms of chronic pain with comorbid anxiety. We also provide an in-depth discussion of research advancements regarding acupuncture intervention parameters, including needling techniques, acupoint selection, treatment duration, and efficacy evaluation within these animal models. This review proposes comprehensive and reference strategies for constructing preclinical animal models to investigate the mechanisms of acupuncture in managing chronic pain with comorbid anxiety, thus supporting scientific advancements in related research fields.

【Keywords】 acupuncture; chronic pain; anxiety; animal model; behavioral assessment

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

慢性痛是临床上最常见的症状之一,它不仅引起疼痛感,还广泛影响患者的生活质量,包括情绪、睡眠和认知功能等多个方面^[1]。流行病学调查显示,全球各地慢性疼痛的患病率在 11% ~ 40%^[2],且慢性疼痛患者出现焦虑、抑郁等负性情绪的比例可高达 50%^[3]。国际疼痛协会(International Association for the Study of Pain, IASP)在 2020 年提出了有关疼痛的最新定义^[4]:“与实际或潜在组织损伤相关的,或类似的不愉快感觉和情感体验”。这表明疼痛可能源自多种疾病,并且可能伴随抑郁、焦虑等负性情绪。疼痛伴发的焦虑情绪、恐惧心理等因素也可能会进一步加剧疼痛感,形成“疼痛-焦虑-深度疼痛”的恶性循环,从而增加了临床治疗的复杂性。针刺作为一种非药物、非侵入性疗法,其操作简便、起效迅速等特点使其成为一种安全且可接受的治疗选择,已被广泛应用于疼痛和焦虑等情绪障碍的临床治疗^[5-6]。针刺治疗能够显著提高患者的痛阈,降低其对疼痛的敏感性,并能有效缓解患者的低落心境和负性情绪,减轻失眠、焦虑等相关症状,且无明显不良反应。然而,针灸的作用机制尚未得到广泛认可的科学解释。动物模型作为现代实验研究的重要工具,在针灸研究中扮演着分析针刺原理和疗效的关键角色。因此,构

建理想的动物模型平台是研究针刺治疗慢性痛及痛情绪作用机制的必要前提。本综述旨在总结目前广泛应用、稳定且具有良好重复性的慢性痛伴焦虑情绪的动物模型及针刺干预平台的现状,为针刺治疗慢性痛伴焦虑情绪的机制研究提供更广泛的前期动物模型构建参考。

1 慢性痛伴发痛焦虑动物模型的构建

通过对中国知网、万方、维普三大中文数据库及 PubMed、Web of Science 两大外文数据库的深入检索,本文系统地汇总了慢性痛伴发痛焦虑样情绪动物模型的动物种类和造模方法。选取了具有代表性的模型,详细列述于表 1 中。

1.1 模型动物的选取

目前,啮齿类动物如小鼠和大鼠因其来源充足、繁殖快、成本低等优势,在临床前疼痛伴焦虑模型的构建中占据着主导地位^[21-23]。此外,斑马鱼、果蝇、线虫等动物的基因测序结果较为完善,基因序列信息容易控制,结构简单,生命周期较短,在慢性疼痛遗传和分子机制方面的研究具有一定的优势,然而,由于难以捕捉它们痛情绪的行为变化,这些模型在疼痛伴焦虑研究中的应用相对较少。更大的哺乳动物,例如狗、猪等因体

表 1 不同类型慢性痛伴发痛焦虑动物模型及其行为学检测

Table 1 Animal models of different types of chronic pain with pain anxiety and their behavioral tests

动物模型 Animal models	动物种类 及品系 Animal specie and strain	行为学测试 Behavioral tests	痛相关焦虑情绪 出现时间 Onset time of pain- related anxiety	行为学表现 Behavioral manifestation	参考文献 References
坐骨神经分 支损伤 Spared nerve injury	SD 大鼠 SD rat	机械痛,旷场,高架十字 迷宫 Paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze	术后 28 d 28 d after surgery	机械痛缩足反射阈值降低,中 央区活动距离减少,开放臂进 入次数和停留时间减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased distance traveled in the central zone, reduced number of open arms entries and dwell times	[7]
	Wistar 大鼠 Wistar rat	机械痛,旷场,高架十字 迷宫 Paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze	术后 8 周 8 weeks after surgery	机械痛缩足反射阈值显著降 低,中央区进入次数、停留时间 减少,开放臂进入次数、停留时 间减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased number of entries and dwell time in the central zone, reduced number of open arms entries and dwell times	[8]
	C57Bl/6J 小鼠 C57Bl/6J mouse	Von Frey 测试,高架零迷 宫,明暗箱,悬尾实验,强 迫游泳 Von Frey test, elevated zero maze, light-dark box, tail suspension test, forced swimming	术后 10 周 10 weeks after surgery	机械痛缩足反射阈值显著降 低,开放臂进入次数、停留时间 减少,暗箱停留时间增加,不动 时间增加 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased number of open arms entries and dwell times, increased dark box dwell time, increased immobilization time	[9]
	SD 大鼠 SD rat	机械痛,旷场,高架十字 迷宫 Paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze	术后 10 d 10 d after surgery	机械痛缩足反射阈值显著降 低,中央区停留时间减少,开放 臂停留时间减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased time spent in the central area, reduced time spent in the open arms	[10]
脊神经结扎 Spinal nerve ligation	SD 大鼠 SD rat	机械痛,条件性位置偏 好,糖水偏好,强迫游泳 Paw withdrawal threshold, conditioned place preference, sucrose preference, forced swimming	术后 4 周 4 weeks after surgery	机械痛缩足反射阈值显著降 低,蔗糖溶液的偏好显著降低, 不动时间增加 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, significant decrease in sucrose solution preference, increased immobilization time	[11]

续表 1

动物模型 Animal models	动物种类 及品系 Animal specie and strain	行为学测试 Behavioral tests	痛相关焦虑情绪 出现时间 Onset time of pain- related anxiety	行为学表现 Behavioral manifestation	参考文献 References
	SD 大鼠 SD rat	热板测试, 丙酮滴落实 验, 旷场, 高架十字迷宫, 悬尾实验, 强迫游泳 Hot plate test, acetone drop test, open field, elevated plus maze, tail suspension test, forced swimming	术后 22 d 22 d after surgery	热痛缩足潜伏期显著降低, 冷 痛觉异常评分增加, 中央区停 留时间减少, 开放臂停留时间 减少, 不动时间增加, 游泳时间 和爬升时间减少 Significant decrease in paw withdraw latency, increased cold nociceptive abnormality scores, decreased central zone dwell time, decreased open arms dwell time, increased immobility time, decreased swimming time and climbing time	[12]
坐骨神经慢性 压迫损伤 Chronic constriction injury	Wistar 大鼠 Wistar rat	机械痛, 高架十字迷宫, 强迫游泳 Paw withdrawal threshold, elevated plus maze, forced swimming	术后 25 d 25 d after surgery	机械痛缩足反射阈值显著降 低, 开放臂停留的时间减少, 不 动时间增加 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased time spent in open arms, increased immobilization time	[13]
	C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mouse	热辐射痛, 机械痛, 旷场, 高架十字迷宫, 糖水偏好 Paw withdraw latency, paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze, sucrose preference	术后 21 d 21 d after surgery	热痛、机械痛缩足反射阈值显 著降低, 中央区停留时间减 少, 开放臂进入次数、停留时间 减少, 蔗糖溶液的偏好显著 降低 Paw withdraw latency and paw- withdrawal thresholds significantly reduced, decrease in central zone dwell time, number of open arms entries and dwell time decreased, preference for sucrose solution significantly decreased	[14]
远端眶下神经 慢性缩窄损伤 Distal infraorbital nerve chronic constriction injury	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mouse	Von Frey 测试, 旷场, 高架十字迷宫 Von Frey test, open field, elevated plus maze	术后 14 d 14 d after surgery	机械痛缩足反射阈值显著降 低, 中央区进入次数、停留时间减 少, 开放臂进入次数、停留时间 减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased number of central zone entries and dwell time, reduced number of entries and dwell time in open arms	[15]

续表 1

动物模型 Animal models	动物种类 及品系 Animal specie and strain	行为学测试 Behavioral tests	痛相关焦虑情绪 出现时间 Onset time of pain- related anxiety	行为学表现 Behavioral manifestation	参考文献 References
完全弗氏佐剂 Complete Freund's adjuvant	SD 大鼠 SD rat	机械痛,旷场,高架零迷 宫,高架十字迷宫 Paw withdrawal threshold, open field, elevated zero maze, elevated plus maze	CFA 注射后 30 d 30 d after CFA injection	机械痛缩足反射阈值显著降 低,中央区停留时间减少,开放 臂进入次数、停留时间减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased time spent in the central area, reduced number of entries and time spent in the open arms	[16]
	Wistar 大鼠 Wistar rat	机械痛,旷场,高架十字 迷宫,明暗箱 Paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze, light-dark box	CFA 注射后 10 d 10 d after CFA injection	机械痛缩足反射阈值显著降 低,开放臂进入次数、停留时间 减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, reduced number of entries and time spent in the open arms	[17]
	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mouse	Von Frey 测试,旷场,高 架十字迷宫,新奇抑制摄 食实验,明暗箱 Von Frey test, open field test, elevated plus maze, novelty suppressed feeding, light-dark box	CFA 注射后 3 d 3 d after CFA injection	机械痛缩足反射阈值显著降 低,中央区停留时间减少,开放 臂停留时间减少 Paw withdrawal thresholds significantly reduced, decreased time spent in the central area, reduced dwell time in open arms	[18]
炎症性肠病 Inflammatory bowel disease	SD 大鼠 SD rat	旷场,高架零迷宫,明暗 箱,声学惊吓测试 Open field, elevated zero maze, light-dark box, acoustic stress response	三硝基苯磺酸注射 后 50 d 50 d after trinitro-benzene- sulfonic acid injection	中央区活动距离减少,垂直运 动减少,声学惊吓反应持续时 间增加 Reduced distance traveled in the central zone, decreased vertical movement, increased duration of acoustic startle response	[19]
慢性偏头痛 Chronic migraine	SD 大鼠 SD rat	机械痛,热板测试,旷场, 高架十字迷宫 Mechanical withdrawal threshold, hot plate test, open field, elevated plus maze	术后 7 d 和 14 d 7 d and 14 d after surgery	眶周机械痛反射阈值显著降 低,中央区活动距离、停留时 间、进入次数减少,开放臂进入 次数、停留时间减少 Significantly lower periorbital mechanical pain thresholds, decreased distance, dwell time, and number of entries in the central zone of activity, decreased number of entries and dwell time in open arms	[20]

型、费用和饲养等问题很少用于疼痛及焦虑方面的研究。虽然灵长类动物与人类高度相似,能较完整地模拟疾病进程,但其也受到来源、成本和伦理等限制,无法利用其广泛开展动物实验。

大、小鼠在疼痛伴发焦虑的基础研究中有着各自的优势,例如大鼠较小鼠体型较大且在进行操作时表现出更少的应激反应,更易进行手术模拟损伤,压力诱导等,这使它们成为涉及外科手术模

型的首选动物^[24]。小鼠尺寸小,饲养所需成本和空间更少,且减少了药理实验所需的药物量,并更易进行光遗传和深部神经结构成像等实验。且小鼠对外界环境变化敏感,不耐冷热、强光和噪声,常用于人类疾病模型的研究^[25-26],如癌症、疼痛及焦虑症等。

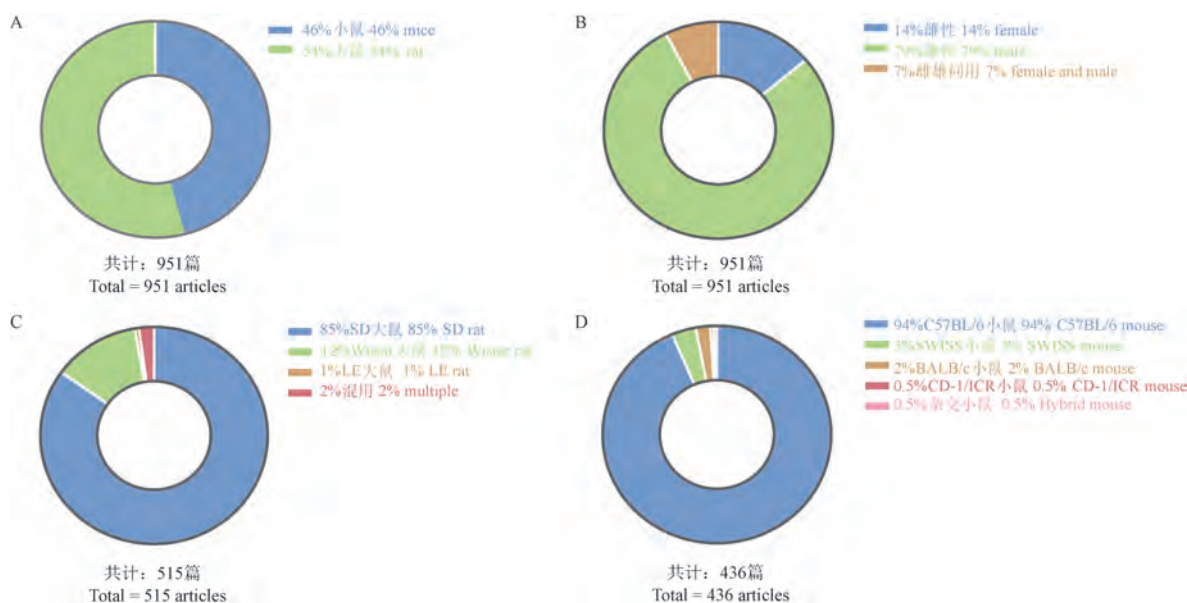
动物和人类的疼痛、情绪和压力是紧密相连的行为结构,每一种都由一系列遗传和环境因素决定^[27]。选取模型动物的品系、年龄、性别等都需要考虑。通过检索上述中文及外文数据库回顾了近 25 年发表的疼痛伴发焦虑样情绪的研究(关键词:慢性疼痛,焦虑,大鼠/小鼠),共纳入 951 篇中、英文相关文献,具体分析了包括“动物物种分类”“动物性别”“大鼠品系”“小鼠品系”四方面(见图 1)。

发现大鼠和小鼠的使用占比相当,大鼠的使用略多于小鼠(图 1A)。此外,只有约 14% 使用了雌鼠,7% 同时使用了雌鼠和雄鼠(图 1B)。虽然有明确的研究显示疼痛及相关行为的神经和免疫机制存在显著的性别差异^[28],但既往研究中使用雌鼠造模的仍是少数。大鼠研究中,大约

85% 都使用了远交系(主要是 SD,图 1C)。其中不到 5% 的小鼠研究使用远交系小鼠(例如 SWISS,图 1D),而有 90% 以上的研究使用了 C57BL/6 近交系小鼠,与其他近交系相比, C57BL/6 小鼠表现出对热刺激的高敏感性及对损伤引起的超敏反应的快速恢复性^[29]。但也有研究指出,在慢性疼痛的相关研究中,选择远交系小鼠或许能更好地模拟患者的慢性疼痛,具有“广泛性表型”的特征^[30]。慢性疼痛伴随焦虑的发病与复杂的生活史息息相关,慢性疼痛临床好发于中年,病程迁延难愈,常累及情绪,但目前大多数研究选择的 6 ~ 12 周龄的年轻大鼠、小鼠(相当于人类的 15 ~ 20 岁)可能更适用于急性疼痛的研究。因此,开展慢性疼痛相关基础研究也应尝试较大周龄的大、小鼠进行实验,更贴合临床发病特点。选取合适的模型动物需要考虑包括上述在内的多重因素对啮齿动物模型产生的影响,从而建立更具有异质性的动物模型。

1.2 动物模型的建立

理想的动物模型应能够相对准确模拟临床患者表型的时间、解剖和病理生理等特征。同时



注:A:研究使用大鼠或小鼠作为主要模型动物的百分比;B:研究使用动物性别的百分比;C:研究使用大鼠品系的百分比;D:研究使用小鼠品系的百分比。

图 1 1999 ~ 2024 年 10 月发表的疼痛伴焦虑研究中使用到的啮齿动物分析

Note. A. Percentage of studies using rats or mouse as the primary model animals. B. Percentage of studies using animal sex. C. Percentage of studies using rat strains. D. Percentage of studies using mouse strains.

Figure 1 Rodent analyses used in studies of pain with anxiety published from 1999 to October 2024

具有高稳定性和可重复性,以确保动物实验结果的可靠性。慢性疼痛机制较急性疼痛更为复杂。目前,根据成因,慢性疼痛可分为神经性疼痛、炎症性疼痛和其他疾病诱发的慢性疼痛,涉及机体的系统性病变,其特点为自发性或诱发性的疼痛、痛觉过敏和感觉异常^[31]。这些慢性痛模型伴发行为学改变,均可作为慢性痛诱发痛情绪的动物模型。每种模型都会产生一个独特的疼痛反应的时间过程,持续时间短则几分钟(如福尔马林),长到几个月(如坐骨神经分支损伤),可以对不同时间出现的痛情绪进行短期或长期的研究,根据各模型自身优点和局限性,可用于解决广泛的实验问题。

1.2.1 慢性神经痛模型

慢性神经病理性疼痛(chronic neuropathic pain, CNP)是指外周或中枢神经系统损伤或功能障碍引起的慢性疼痛综合征,在普通人群中的患病率为 6.9% ~ 10%^[32]。在啮齿类动物中,诱导慢性神经性疼痛最常见的实验方法是通过完全或部分结扎、横断或压迫坐骨神经造成创伤性神经损伤,如最常用的外周神经病理性疼痛动物模型:坐骨神经分支损伤(spared nerve injury, SNI)模型、脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)模型、坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)模型。SONG 等^[33]将小鼠(6 周龄)用三溴乙醇(0.2 mL/10 g)麻醉并维持 37 °C 体温,通过左侧股外侧切口暴露坐骨神经束,以尼龙线结扎腓总神经与胫神经后切除 2 mm 神经段,从而建立小鼠 SNI 模型。该模型通过精准控制神经损伤类型和数量,展现出高度可重复性优势。PRESTO 等^[34]用异氟醚对大鼠(8 周龄)进行麻醉,暴露大鼠左侧 L5 脊神经并用 6-0 无菌丝线将其紧密结扎,持续使用局部抗生素 5 d 以防感染,从而建立大鼠 SNL 神经病理性疼痛模型,诱导稳定而持久的周围神经病变。SILVA-CARDOSO 等^[35]在大鼠后肢肌内注射 10% 盐酸氯胺酮(75 mg/kg)和 2% 盐酸甲苯噻嗪(10 mg/kg)进行麻醉,将动物背侧位置于手术台上,通过坐骨神经股骨小转子近端 8 mm 处 4-0 镀铬线部分结扎(直径 3/4 处)从而建立大鼠 CCI 模型,术中强调严格消毒与肌群分层缝合,虽操作相对经典,但易受结扎力度差异影响且感染风

险需重点防控。综合而言, SNI 模型以标准化神经损伤见长; SNL 模型在脊髓功能分区研究中更具针对性, SNL 模型克服了 CCI 模型结扎神经松紧程度不一致的缺点,且能够将脊髓损伤与未损伤节段明确分开,有利于研究初级传入纤维在疼痛中的作用机制,需注意模型制作过程相对复杂,创伤严重,容易继发感染;而 CCI 模型则需权衡操作稳定性与结果可靠性,实际应用中需结合研究目标和实验条件择优选。

1.2.2 慢性炎症痛模型

慢性炎症性疼痛是由于持续炎性反应、组织结构改变以及神经系统疾病等引起的关节、骨骼、肌肉、肌腱以及相关软组织的慢性疼痛。常见的炎性痛模型有完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、角叉菜胶炎性痛(carrageenan inflammatory pain)、福尔马林痛(formalin pain)模型等。但角叉菜胶作为急性组织炎症引起的持续痛模型,局部痛觉过敏反应一般持续 6 ~ 8 h。福尔马林通常被用于诱导持续 45 ~ 90 min 的伤害性反应(即缩爪和舔舐),但无明显的后续痛过敏反应。角叉菜胶、福尔马林模型主要适用于检测消炎镇痛药物的效价等^[36]。其中在痛情绪的研究中最常用的是 CFA 模型。CFA 主要包含热灭活的结核杆菌,由石蜡油包水乳剂组成,刺激强烈且可引起持久的免疫反应,可用于诱导大、小鼠的持续性炎症疼痛模型等,主要引起 Th1 或 Th17 细胞免疫应答^[37]。WANG 等^[38]在小鼠后爪跖内表面单侧注射 20 μ L CFA,建立 CFA 诱导的小鼠慢性炎症性疼痛模型。PARENT 等^[39]在 SD 大鼠左后脚掌跖内注射 100 μ L CFA,注射量(以 1 : 1 的油和 0.9% 生理盐水乳液形式注射),其中含有相当于 200 μ g 结核分枝杆菌,诱发大鼠炎性疼痛。该模型发病周期长,造模方法操作简单,并可维持长达 4 周以上的痛觉过敏反应。

1.2.3 其他慢性痛模型

除上述常见的神经病理痛和炎性痛模型常伴有情绪样变化外, BURSTON 等^[40]待大鼠异氟醚麻醉后,将 50 μ L 单碘乙酸钠(sodium iodoacetate, MIA)溶液(1 mg MIA 稀释在 50 μ L 无菌盐水溶液中稀释)注射到大鼠膝髁下韧带关节腔中用于建立成年雄性 SD 和 Wistar Kyoto

(WKY)大鼠的骨关节炎(osteoarthritis, OA)和焦虑共病的啮齿动物疼痛模型,更好地模拟了关节病理学和临床 OA 疼痛的关键要素。此外,内脏疼痛模型也被广泛的运用于痛情绪的相关研究中。BAI 等^[41]通过向大鼠腹部导管内注入 2%三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱发胰腺炎,建立大鼠慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)疼痛模型并诱发疼痛相关的焦虑。LUO 等^[42]通过在 SD 大鼠饮用水中加入 0.1%碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)建立实验性胃炎模型,探究胃肠道炎症是否会对心理行为产生影响。ŠUTULOVIĆ 等^[43]通过向 Wistar 大鼠前列腺内单次注射 3% λ -角又菜胶诱导慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征(chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, CP/CPPS),该实验模型已被证明是探索其病因病理和合并症的有价值的模型之一。慢性疼痛中包含的癌痛也能引发诸多不良情绪,然而由于其发病相关复杂社会因素的不确定性,因此很少在痛情绪的动物研究中使用该模型。

2 行为学检测与评估

为了更好地验证上述相关动物疼痛伴发焦虑模型的构建成功与否,需要通过观察动物的疼痛行为和焦虑行为来评估模型的可靠性。诱发痛行为学评估方法主要用于研究痛觉过敏,诱发方式包括电、温度、机械和化学刺激等。旷场和高架十字迷宫实验是评估动物焦虑水平最常用的行为学检测方法。此外,还有明暗箱、新奇抑制摄食实验、大理石掩埋等行为学检测方法用于焦虑行为的研究。但值得注意的是:实验前应设定刺激的最高限值,当刺激量达到限值后,即使实验动物未出现预期的疼痛反应也不应再增加刺激量,以免产生组织损伤。上述相关行为学方法较为成熟,普及率高且实验器材容易获得,但观察者的操作熟练程度对实验结果影响较大,反复测试会引起实验动物产生焦虑情绪,从而影响测试结果。

2.1 疼痛行为学检测方法

机械性疼痛检测(如 Von Frey test, VFT)主要通过使用 Von Frey 纤维丝产生既定压力,刺激动物足底,以此压力-缩腿阈(paw withdrawal

threshold, PWT)作为伤害性感受阈,记录动物的机械缩足阈值。这种方法可以评估动物对机械刺激的反应,从而量化其疼痛程度;热辐射痛测试即哈格里夫斯测试(hargreaves test),通过辐射/红外热光源照射动物足底,记录动物产生缩足反应(thermal paw withdrawal latency, PWL)的时间,专门用于评估大鼠和小鼠等啮齿动物神经损伤和再生后的疼痛敏化或热痛反应恢复的实验^[44];冷/热板测试是将动物放置在温度设置为 4℃或 55℃的冷热板上,当动物接触到冷/热板时,会抬起爪子,抬起的次数将显示动物对冷/热刺激程度的反应,通过记录动物的反应时间(跳跃或舔脚表现)来评估它们对冷或热的疼痛反应。记录其出现躲避反应所需时间或者在一定时间内出现躲避反应的次数,以评价冷痛阈和热痛阈^[45]。此外,还有研究使用鬼脸量表^[46],它通过观察和量化痛苦表情来区分疼痛与非疼痛状态,并为疼痛程度提供量化指标。主要观察动物面部表情的变化,如面部眼眶收紧、耳廓伸展变为扁平。

2.2 焦虑行为学检测方法

常用的行为学检测方法包括旷场实验(open field test, OFT)、高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)、明暗箱实验(light-dark box test, LDB)等。这些方法可以测试不同的慢性痛模型所产生的焦虑样情绪,且不同模型在不同时间产生的情绪有所差异。旷场行为学检测是将动物置于旷场的中央区域,然后在一定的时间内观察动物的活动情况,中心区域对动物而言既新奇又可能构成威胁,而边缘区域则相对安全。因此,若动物焦虑水平较高,它们更可能选择停留在边缘区域;相反,如果动物对中心区域的探索次数和停留时间增加,则表明其焦虑水平较低^[47]。高架十字迷宫实验利用了动物对新奇环境的探索倾向以及对高空开放臂的恐惧感,通过这种矛盾的心理状态来评估动物的焦虑水平。实验中,动物进入开放臂和闭合臂的次数总和和被用来衡量其运动活动能力;而它们向下探索的次数则显示了在无保护环境下的探索行为。此外,动物在开放臂中所花费的时间比例和进入开放臂的次数比例也是评估其焦虑状态的重要指标^[48]。明暗箱实验是一种利用大鼠和小鼠对明亮区域的自然回避行为以及它们对轻微压力源(如新环境和

光照)的自发探索反应的心理行为实验。该实验通过监测动物在明亮区域(或黑暗区域)停留的时间和它们在两个区域之间穿梭的次数,来评估它们的焦虑水平,这些是评价焦虑的经典行为指标^[49]。新奇抑制摄食(novelty suppressed feeding, NSF)测试是一种广泛应用于评估抗抑郁药物的效果以及研究动物模型中的情绪反应的实验方法。该测试通过观察动物在新奇环境中对新奇食物的摄取行为来进行。在禁食后,动物会因饥饿而产生摄食动机,但同时新环境会引发恐惧感,从而产生摄食需求与恐惧新环境之间的矛盾冲突。动物的焦虑水平会影响其摄食的潜伏期,即从放入新奇环境到开始摄食的时间长度。通过测量这一潜伏期,可以推断动物的应激反应和焦虑程度^[50]。大理石埋藏实验(marble burying test, MBT)也常用于焦虑行为的研究中,实验动物(如小鼠)被放置在一个装有干净松木屑和若干小球(如大理石)的笼子中。动物可能会因为焦虑而将小球埋在松木屑中,观察动物埋藏小球的数量和速度,旨在衡量动物的焦虑和强迫症状^[51]。尽管这些模型并不完全等同于人类焦虑情绪的表现,但它们在研究焦虑的生物化学基础和抗焦虑药物的作用机理方面具有重要价值。这些实验主要基于动物的自然行为,无需额外训练,使用的实验设备简单但需精确操作。通过数据分析软件对行为指标进行量化,可以较为客观地评估动物的焦虑症状,进而评价抗焦虑干预措施的有效性。

2.3 模型构建的行为学评估

不同的造模方式代表动物处于不同的特定环境和病理状态,通过观察和分析动物疼痛状态下的焦虑行为,可推断其焦虑程度。每种方法都有其独特的应用范围和利弊,研究者可以根据实验的具体需求选择适用的行为学检测方法。GAO 等^[52]利用 SNI 慢性神经性疼痛模型诱导小鼠表现出明显的痛觉过敏症状,造模后 SNI 小鼠疼痛感知的机械阈值急剧降低。采用旷场和高架十字迷宫观察模型大鼠的焦虑样行为。在术后 2 周,与假手术小鼠相比,虽然在旷场实验中移动的总距离相似,但 SNI 小鼠在旷场中心区域停留的时间更短,在高架十字迷宫开放臂的停留时间和进入开放臂的百分比减少。SANG 等^[8]采用

上述相同的模型和行为学检测发现大鼠出现机械性异常性疼痛,其特征为同侧(受伤)侧触觉刺激的 PWT 降低。SNI 大鼠的神经性疼痛状态始终持续存在实验的整个时期(1 ~ 8 周),同时诱发慢性疼痛相关的焦虑样行为。术后第 8 周,在高架十字迷宫测试中,显示 SNI 组大鼠进入开放臂次数和在两个开放臂停留的时间显著减少。在旷场实验中,与盐水组相比,SNI 大鼠进入中心区次数显著减少。但旷场移动总距离无显著差异,表明 SNI 大鼠的运动能力不受影响。MAZZITELLI 等^[53]使用成熟的 SNL 模型在大鼠的左后爪诱导神经病变,与假手术组相比,SNL 大鼠的急性期和慢性期 Von Frey 实验中的机械阈值均显著降低,在旷场实验中心区花费的时间均显著减少,而大鼠在高架十字迷宫中进入开放臂的次数仅在 SNL 诱导后 4 周后显著减少,大鼠开始出现明显的焦虑样情绪。JIANG 等^[10]基于此模型,在造模后 10 d 观察大鼠焦虑样行为,发现大鼠在旷场中央区停留时间显著减少,高架十字迷宫开放臂停留时间显著减少。

YU 等^[54]分别建立了小鼠炎症性疼痛、SNI 模型研究小鼠急性痛和慢性痛诱发的焦虑样行为,分别在 CFA 注射 4 h 和 SNI 术后 21 d 检测机械痛及旷场、高架十字迷宫评估小鼠痛焦虑行为学变化,发现 CFA 小鼠和 SNI 小鼠的机械痛阈值显著降低,旷场中心区停留时间、高架十字迷宫开放臂停留时间均显著降低,证实无论急性还是慢性疼痛均会诱发小鼠的焦虑样行为。YAMAUCHI 等^[55]建立了小鼠 SNI 模型,通过 Von Frey 机械痛测试以评估触觉异常性疼痛,采用旷场、高架十字迷宫、明暗箱、新奇摄食抑制实验并应用 Z-score 归一化来评估小鼠不同行为的情绪变化。发现术后 4 周内 SNI 小鼠受伤(同侧)后爪机械刺激的阈值均降低,表明存在机械异常性疼痛。手术 4 周后,SNI 小鼠的旷场实验中进入中心区的次数、高架十字迷宫开放臂和明暗箱实验中明亮区的停留时间均较低,表明焦虑样行为增强。在高架十字迷宫测试中,SNI 小鼠在开放臂双臂活动的距离与总活动距离的百分比显著低于假手术组,表明 SNI 小鼠开放臂探查的减少不是由于运动活动的减少。研究者还计算了情绪 Z-score 来评估这些测试中行为的一致性。SNI

小鼠的情绪 Z-score 显著低于假手术组,表明慢性疼痛增强了焦虑样行为。此外,在新奇抑制摄食测试中,SN1 小鼠咬食颗粒的潜伏期增加,这也表明焦虑样行为增强。

3 针刺干预慢性痛伴发痛焦虑动物模型的效应研究平台

针灸是一门防病治病的实用科学,也是中医中的一个重要分支。针刺技术是指通过不同种类的针具或非针具配合一定的手法或电刺激人体某些部位(穴位)的方法。手针(manual acupuncture, MA)是将针刺入穴位,然后以不同的手法力度捻转针头,而电针(electroacupuncture, EA)则是通过插入的针头向穴位输送刺激电流^[56]。目前针刺治疗疼痛伴焦虑研究基于上述多种模型的构建及行为学评估方法,结合不同的穴位、刺激频率、治疗周期等不同针刺干预条件逐渐形成了较为多样的针刺干预慢性痛伴发痛焦虑样情绪动物模型平台。检索相关基础研究发现,针刺在无论在炎性痛还是神经痛相关模型中都显示积极干预作用(见表 2),并且大多数研究都使用了电针干预的方法。电针的参数、频率及干预时间都可能对针刺效应产生影响,有研究表明对于急性疼痛相关症状多数选用高频、弱刺激、短时间为佳;而慢性痛可选用低频、强刺激、长时间为佳^[57]。就具体疾病而言,如神经病理痛模型而言,多数研究干预以低频(2 Hz)或变频(2/100 Hz),中低强度刺激(1 ~ 3 mA),时间 30 ~ 45 min,每日或隔日 1 次为优;慢性炎性痛模型干预上选用高频(100 Hz)或变频(2/15 Hz 或 2/100 Hz)中低强度刺激(1 ~ 3 mA),时间 30 ~ 45 min。此外,SHAO 等^[58]还对比了电针和强刺激(strong manual acupuncture, sMA, 每分钟 180 次)、弱刺激(mild manual acupuncture, mMA, 每分钟 60 次)手针对 SNL 大鼠疼痛及焦虑的改善情况,发现无论强刺激还是弱刺激手针都能显著缓解大鼠神经病理性疼痛模型的机械过敏性,增加大鼠在开放臂中的探索和停留时间,减轻疼痛和焦虑样行为,而电针刺激则没有改善焦虑效果。表明在缓解机械过敏和伴随的焦虑方面,sMA 比 mMA 和 EA 更有效,不同的效果可能反映了脊髓

上通路,特别是大脑神经核传入激活的差异。在穴位选取上,在神经性病理模型中,常选择环跳(GB 30)作为主穴,阳陵泉(GB 34)作为配穴来缓解 SNL 引起的神经病理性疼痛^[59]。在解剖学上,L4、L5 和 L6 脊神经合并为坐骨神经,坐骨神经又分为腓总神经和胫神经^[60]。而 GB 30 解剖学定位位于臀部,是股骨大转子和骶管裂孔连线的中外 1/3 的位置,其浅层布有臀上皮神经,深层有坐骨神经、臀下神经、股后皮神经^[61]。因为 L5 脊神经结扎引起的神经病理性疼痛在临床上与腰背痛相似。腰背痛常以 GB 30 为主穴或基本穴,腰背痛伴有下肢麻木、疼痛时以 GB 34 为配穴^[62]。在炎性痛模型中,常选用足三里(ST36)作为主穴^[63],足三里具有调补气血,疏通经络的良好疗效,在中医理论中被视为“保健要穴”^[64]。现代研究证明电针刺激足三里穴的抗炎作用可能与其能够降低迷走神经背核中乙酰胆碱能神经元上抑制性受体的表达,兴奋颈/膈下迷走神经有关,为穴位相对特异性的存在提供了现代神经解剖学基础^[65]。手针或电针镇痛抗焦虑本质上是痛区传入冲动与穴位之间在背根神经节和中枢神经系统的整合过程^[66-67]。此外,针刺在不同模型治疗持续时间从 1 ~ 30 d 不等,表明针刺对疼痛不同类型干预的效应周期与治疗的频率和持续时间紧密相关,与其在临床上中医“同病异治”理论异曲同工。

4 讨论

疼痛带来的负面情绪,可能会使患者对疼痛本身以及可能导致疼痛的活动产生恐惧反应,严重影响持续性疼痛患者的日常生活。疼痛伴焦虑的治疗是一个复杂且充满挑战的领域,有必要区分疼痛治疗中的感觉变化和情感变化,这种行为学变化的背后机制仍有许多需要探索的地方。

疼痛诱发焦虑样行为的研究需要依赖于临床前动物模型来深入探讨该疾病的相关机制,与人类研究相比较,动物研究无法通过自述或者问卷调查的形式直接获知其情绪,只能通过行为学检测对其情绪进行测量,所以确定疼痛伴痛焦虑情绪的动物模型的成功构建,需要经典的情绪行为学方法来评估。然而动物模型有着自身的局限性,实验中会出现假阳性和假阴性的可能,有

表 2 针刺干预慢性痛伴发焦虑动物模型的平台

Table 2 Platforms for acupuncture intervention in animal models of chronic pain accompanied by pain anxiety

动物种类 及品系 Animal species and strain	动物模型 Animal models	针刺干预方 式及参数 Acupuncture intervention modalitie and parameter	穴位选择 Point selection	干预周期 Intervention period	行为学测试 Behavioral test	行为学表现 Behavioral performance	参考文献 References
SD 大鼠 SD rat	坐骨神经慢 性压迫损伤 Chronic constriction injury	EA, 2 Hz, 0.5 ~ 1.5 mA, 30 min	足三里 阳陵泉 Zusanli Yanglingquan	术后第 8 ~ 28 天,隔天 1 次,共 11 次 Days 8 ~ 28 after surgery, every other day, 11 times in total	机械痛,旷场, 高架十字迷宫, 强迫游泳 Mechanical withdrawal threshold, open field, elevated plus maze, forced swimming	机械痛缩足反射阈值显 著升高,中央区活动距离 及停留的时间增加,开放 臂活动距离及停留的时 间增加,不动时间缩短 Significant increase in mechanical withdrawal thresholds, increased distance traveled and time spent in the central region, increase in distance traveled and time spent in the open arms, decreased immobilization time	[68]
	脊神经结扎 Spinal nerve ligation	EA, 2/100 Hz, 0.5 ~ 1.5 mA, sMA, 180 times/min, mA, 60 times/min, 30 min	环跳 阳陵泉 Huantiao Yanglingquan	术后第 1 ~ 12 天,间隔两 天 1 次,共 4 次 Days 1 ~ 12 after surgery, two days apart, 4 times in total	机械痛,高架 零迷宫 Paw withdrawal threshold, elevated zero maze	开放臂活动距离百分比、 停留时间均增加 Increased percentage of distance traveled and time spent in open arms	[58]
	完全弗氏 佐剂 Complete Freund's adjuvant	EA, 2/100 Hz, 0.5 ~ 1.5 mA, 30 min	足三里 昆仑 Zusanli Kunlun	注射 CFA 后 第 28 ~ 30 天,每天 1 次 Day 28 ~ 30 after CFA injection, once daily	机械痛,旷场, 高架零迷宫 Paw withdrawal threshold, open field, elevated zero maze	机械痛缩足反射阈值升 高,旷场中心活动距离百 分比及停留时间增加,开 放臂进入次数、停留时间 均增加 Increase in mechanical withdrawal thresholds, increased percentage of distance traveled in central zone and dwell time, increased number of open arms entries and dwell time	[69]
	完全弗氏 佐剂 Complete Freund's adjuvant	EA, 2/100 Hz, 0.5 ~ 1.5 mA, 30 min	足三里 昆仑 Zusanli Kunlun	注射 CFA 后 第 26 ~ 31 天,每天 1 次 Day 26 ~ 31 after CFA injection, once daily	机械痛,旷场, 高架零迷宫,新 奇抑制摄食 实验 Paw withdrawal threshold, open field, elevated zero maze, novelty suppressed feeding	机械痛缩足反射阈值显 著升高,中央区活动距离 百分比、停留时间增加, 开放臂活动距离百分比、 停留时间增加,进食潜伏 期显著降低 Significant increase in mechanical withdrawal thresholds, increased percent distance traveled, dwell time in central zone, percentage of distance traveled, dwell time increased in open arms, significant decrease in feeding latency	[70]

续表 2

动物种类 及品系 Animal species and strain	动物模型 Animal models	针刺干预方 式及参数 Acupuncture intervention modalitie and parameter	穴位选择 Point selection	干预周期 Intervention period	行为学测试 Behavioral test	行为学表现 Behavioral performance	参考文献 References
Wistar 大鼠 Wistar rat	完全弗氏 佐剂 Complete Freund's adjuvant	EA, 100 Hz, 0.5 ~ 1.5 mA, 60 min	足三里 三阴交 Zusanli Sanyinjiao	注射 CFA 后 第 29 天 Day 29 after CFA injection	机械痛,旷场 Paw withdrawal threshold, open field	机械痛缩足反射阈值 显著升高,中央区停 留时间增加 Significant increase in mechanical withdrawal thresholds, increased central zone dwell time	[71]
	角叉菜胶 Carrageenan	EA, 2/100 Hz, 1 ~ 2 mA, 30 min	足三里 Zusanli	注射后 5 h, 第 1 ~ 5 天, 每天 1 次 5 h post- injection, days 1 ~ 5, once daily	机械痛,高架零 迷宫,旷场 Paw withdrawal threshold, elevated zero maze, open field	机械痛缩足反射阈值升 高,中央区停留时间增 加,开放臂停留时间增加 Increase in mechanical withdrawal thresholds, increased central zone dwell time, increased open arms dwell time	[72]
	完全弗氏 佐剂 Complete Freund's adjuvant	EA, 2/100 Hz, 0.5 ~ 1.0 mA, 10 min	足三里 昆仑 百会 印堂 Zusanli Kunlun Baihui Yintang	注射 CFA 后 第 22 ~ 28 天,每天 1 次 Day 22 ~ 28 after CFA injection, once daily	热辐射痛,机械 痛,旷场大理石 掩埋,糖水偏好, 强迫游泳, 条件位置偏好 Paw withdraw latency, paw withdrawal threshold, open field, sucrose preference, marble burying, forced swimming, conditioned place preference	热痛及机械痛缩足 反射阈值升高,中 央区停留的时间 增加,蔗糖溶液的 消耗量增加,埋弹 珠的次数减少, 不动的时间缩短 Paw withdraw latency and mechanical withdrawal thresholds significantly reduced, increased time spent in the central zone, increased consumption of sucrose solution, decreased number of marbles buried, decreased duration of immobilization	[73]
	BALB/c 小鼠 BALB/c mouse	坐骨神经慢 性压迫损伤 Chronic constriction injury	足三里 阳陵泉 Yanglingquan	术后第 8 ~ 15 天, 每天 1 次 Once a day on days 8 ~ 15 after surgery	热辐射痛,机械 痛,旷场,悬尾 实验,强迫游泳 Mechanical withdraw latency, mechanical withdrawal threshold, open field, tail suspension test, forced swimming	热痛及机械痛缩足 反射阈值升高,中 央区停留的时间 增加,不动时间 缩短 Paw withdraw latency and mechanical withdrawal thresholds significantly reduced, increased duration of stay in the central zone, shorter duration of immobilization	[74]

续表 2

动物种类及品系 Animal species and strain	动物模型 Animal models	针刺干预方式及参数 Acupuncture intervention modalitie and parameter	穴位选择 Point selection	干预周期 Intervention period	行为学测试 Behavioral test	行为学表现 Behavioral performance	参考文献 References
C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mouse	眶下神经横断 Infraorbital nerve transection	EA, 2 Hz, 1 mA, 30 min	百会 下关 Baihui Xiaguan	术后第 7 天开始,连续 14 d(即第 1、3、5、7、9、11 和 13 天),隔天 1 次 Starting on day 7, every other day for 14 consecutive days (i. e., days 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 13).	机械痛,旷场,高架十字迷宫,丙酮实验,转棒疲劳实验 Paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze, acetone test, rotarod test	机械痛缩足反射阈值升高,中央区停留时间和穿越次数显著增加,开放臂的进入次数、停留时间显著增加,口面擦拭时间显著减少 Increase in mechanical withdrawal thresholds, significant increase in central zone dwell time and traversals, significantly increased number of entries and dwell times in the open arms, significant decrease in orofacial wipe time	[75]
	坐骨神经分支损伤 Spared nerve injury	EA, 0.3 mA, 2.0 Hz, 30 min	足三里 三阴交 Zusanli Sanyinjiao	术后第 8、10、12、14、16 天,每天 1 次 Once a day on day 8, 10, 12, 14 and 16 after surgery	机械痛,旷场,高架十字迷宫 Paw withdrawal threshold, open field, elevated plus maze	机械痛缩足反射阈值升高,中央区停留时间增加,开放臂停留时间增加 Increase in mechanical withdrawal thresholds, increased central zone dwell time, increased open arms dwell time	[76]

研究表明,近交系 C57BL/6 小鼠的情绪状态不由疼痛的存在而改变^[77],在痛情绪研究中使用该品系的小鼠还存在一定的争议。因此主张纳入多种行为学进行全面评价并应用 Z-score 归一化来评估动物不同行为的情绪变化,为后续无论针刺或药物干预机制研究提供更坚实的动物模型基础。

针刺治疗能有效缓解焦虑情绪及不同类型慢性疼痛症状。与其他疗法相比,针刺更具安全性及经济性,这对长期身处疼痛的患者而言是一个显著的优势。但目前针刺刺激强度和方式的不同可能导致治疗效果的差异,不同研究往往会选取不同的腧穴进行针刺镇痛及抗焦虑的机制探索,手针和电针在治疗疼痛伴焦虑症模型动物使用的最优参数尚不明确。此外,对于由其他病因引起的疼痛,如肌纤维痛、内脏痛、带状疱疹后遗痛等引发的负面情绪,针刺干预其参数及周期

鲜有报道,以上都值得进一步研究。

为更好地推进针刺干预慢性痛伴发痛焦虑动物模型的效应平台构建及行为学评估科学研究,今后相关研究的开展还需从以下 4 个方面考虑:(1) 优化针刺参数,如针刺频率、强度、时间等,以提高针刺干预的疗效。例如,不同频率的电针刺激对慢性疼痛和焦虑的改善效果存在差异,高频电针刺激可能更有利于缓解疼痛,而低频电针刺激可能对焦虑的改善更为有效;(2) 深入探讨针刺的选穴规律,寻找与慢性疼痛伴发痛焦虑相关的特定穴位或穴位组合,对于提高针刺治疗的效果至关重要;(3) 在行为学评估过程中,建立时间序列,即在不同的时间点对动物进行行为学测试,以观察针刺干预对痛焦虑的动态变化,有助于了解针刺干预的起效时间、持续时间以及长期效果,为临床应用提供重要参考;(4) 在动物模型研究的基础上,加强与临床研究的结

合,建立动物模型与临床的桥梁。通过比较动物模型和临床患者的疼痛和焦虑症状、神经生物学指标等,可以验证动物模型的可靠性和有效性,为临床研究提供重要参考。

虽然慢性疼痛伴痛焦虑动物模型平台仍然存在一些挑战和限制,例如缺乏临床对应性、不同品系的鼠类对模型反应的异质性等,但随着技术的更新和提高,预计会有更多更准确的动物模型及评估方法被开发和运用于疼痛伴焦虑的研究中。针刺对疼痛伴焦虑干预的研究和临床应用正处在一个快速发展的阶段,未来的研究将需要更多的创新和跨学科合作,以实现更有效的疼痛和焦虑管理。

参 考 文 献(References)

- [1] ZHUO M. Neural mechanisms underlying anxiety-chronic pain interactions [J]. *Trends Neurosci*, 2016, 39(3): 136–145.
- [2] COHEN S P, VASE L, HOOTEN W M. Chronic pain; an update on burden, best practices, and new advances [J]. *Lancet*, 2021, 397(10289): 2082–2097.
- [3] FEINGOLD D, BRILL S, GOOR-ARYEH I, et al. Depression and anxiety among chronic pain patients receiving prescription opioids and medical marijuana [J]. *J Affect Disord*, 2017, 218: 1–7.
- [4] RAJA S N, CARR D B, COHEN M, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises [J]. *Pain*, 2020, 161(9): 1976–1982.
- [5] ZHANG H, SUN J, WANG C, et al. Randomised controlled trial of contralateral manual acupuncture for the relief of chronic shoulder pain [J]. *Acupunct Med*, 2016, 34(3): 164–170.
- [6] AMORIM D, BRITO I, CASEIRO A, et al. Electroacupuncture and acupuncture in the treatment of anxiety-A double blinded randomized parallel clinical trial [J]. *Complement Ther Clin Pract*, 2022, 46: 101541.
- [7] FU S, SUN H, WANG J, et al. Impaired neuronal macroautophagy in the prelimbic cortex contributes to comorbid anxiety-like behaviors in rats with chronic neuropathic pain [J]. *Autophagy*, 2024, 20(7): 1559–1576.
- [8] SANG K, BAO C, XIN Y, et al. Plastic change of prefrontal cortex mediates anxiety-like behaviors associated with chronic pain in neuropathic rats [J]. *Mol Pain*, 2018, 14: 1744806918783931.
- [9] LAX N C, PARKER S J, HILTON E J, et al. Cyanobacterial extract with serotonin receptor subtype 7 (5-HT₇ R) affinity modulates depression and anxiety-like behavior in mice [J]. *Synapse*, 2018, 72(11): e22059.
- [10] JIANG H, FANG D, KONG L Y, et al. Sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala *via* the decreased GABAergic inhibition contributes to the development of neuropathic pain-related anxiety-like behaviors in rats [J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 72.
- [11] JIANG H, LIU J P, XI K, et al. Contribution of AMPA receptor-mediated LTD in LA/BLA-CeA pathway to comorbid aversive and depressive symptoms in neuropathic pain [J]. *J Neurosci*, 2021, 41(34): 7278–7299.
- [12] MOKHTARI T, YUE L P, HU L. Exogenous melatonin alleviates neuropathic pain-induced affective disorders by suppressing NF- κ B/NLRP3 pathway and apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 2111.
- [13] CASPANI O, REITZ M C, CECI A, et al. Tramadol reduces anxiety-related and depression-associated behaviors presumably induced by pain in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 124: 290–296.
- [14] ABDUL M, YAN H Q, ZHAO W N, et al. VTA-NAc glutaminergic projection involves in the regulation of pain and pain-related anxiety [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1083671.
- [15] CHEN W J, NIU J Q, CHEN Y T, et al. Unilateral facial injection of Botulinum neurotoxin A attenuates bilateral trigeminal neuropathic pain and anxiety-like behaviors through inhibition of TLR2-mediated neuroinflammation in mice [J]. *J Headache Pain*, 2021, 22(1): 38.
- [16] WEI N, GUO Z, QIU M, et al. Astrocyte activation in the ACC contributes to comorbid anxiety in chronic inflammatory pain and involves in the excitation-inhibition imbalance [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(9): 6934–6949.
- [17] SPINIELI R L, CAZUZA R A, SALES A J, et al. Persistent inflammatory pain is linked with anxiety-like behaviors, increased blood corticosterone, and reduced global DNA methylation in the rat amygdala [J]. *Mol Pain*, 2022, 18: 17448069221121307.
- [18] CHEN Z J, SU C W, XIONG S, et al. Enhanced AMPAR-dependent synaptic transmission by S-nitrosylation in the vmPFC contributes to chronic inflammatory pain-induced persistent anxiety in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(5): 954–968.
- [19] SALAMEH E, MELEINE M, GOURCEROL G, et al. Chronic colitis-induced visceral pain is associated with increased anxiety during quiescent phase [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 316(6): G692–G700.
- [20] LI Y, LI C, CHEN Q Y, et al. Alleviation of migraine

- related pain and anxiety by inhibiting calcium-stimulating AC1-dependent CGRP in the Insula of adult rats [J]. *J Headache Pain*, 2024, 25(1): 81.
- [21] 康美美, 王蓉. CCI 和 SNI 神经病理性疼痛动物模型的认知功能研究进展 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2021, 21(11): 761-764.
- KANG M M, WANG R. Research progress on the cognitive function of CCI and SNI neuropathic pain models [J]. *J Neurosci Ment Health*, 2021, 21(11): 761-764.
- [22] 殷利军, 陈辉, 熊利泽. 神经病理性疼痛动物模型的选择与建立 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2023, 29(10): 725-730.
- YIN L J, CHEN H, XIONG L Z. Selection and establishment of animal models of neuropathic pain [J]. *Chin J Pain Med*, 2023, 29(10): 725-730.
- [23] 刘曦, 龚黎燕. 基于急慢性疼痛的动物模型研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2023, 61(27): 126-129.
- LIU X, GONG L Y. Research progress of animal models based on acute and chronic pain [J]. *Chin Mod Dr*, 2023, 61(27): 126-129.
- [24] 张秀娟, 郭铁成. 多种神经病理性疼痛大鼠模型的对比评价 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2020, 42(8): 755-759.
- ZHANG X J, GUO T C. Comparative evaluation of various rat models of neuropathic pain [J]. *Chin J Phys Med Rehabil*, 2020, 42(8): 755-759.
- [25] PATTISON L A, CLOAKE A, CHAKRABARTI S, et al. Digging deeper into pain: an ethological behavior assay correlating well-being in mice with human pain experience [J]. *Pain*, 2024, 165(8): 1761-1773.
- [26] WANG Y, ZHANG X, YAO Y, et al. Inferior social hierarchy is vulnerable to anxiety-like behavior in chronic pain mice: Potential role of gut microbiota and metabolites [J]. *Neurobiol Dis*, 2024, 191: 106402.
- [27] NIELSEN C S, STUBHAUG A, PRICE D D, et al. Individual differences in pain sensitivity: genetic and environmental contributions [J]. *Pain*, 2008, 136(1/2): 21-29.
- [28] DANCE A. Why the sexes don't feel pain the same way [J]. *Nature*, 2019, 567: 448-450.
- [29] SADLER K E, MOGIL J S, STUCKY C L. Innovations and advances in modelling and measuring pain in animals [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2022, 23(2): 70-85.
- [30] Tuttle A H, Philip V M, Chesler E J, et al. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice [J]. *Nature methods*, 2018, 15(12): 994-996.
- [31] FINCO G, EVANGELISTA M, SARDO S. Basic guide to chronic pain assessment: from neurophysiology to bedside [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2020, 86(12): 1321-1330.
- [32] 杜涛, 袁文茜, 曹伯旭, 等. 慢性神经病理性疼痛 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(7): 481-485.
- DU T, YUAN W Q, CAO B X, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain [J]. *Chin J Pain Med*, 2021, 27(7): 481-485.
- [33] SONG Q, WEI A, XU H, et al. An ACC-VTA-ACC positive-feedback loop mediates the persistence of neuropathic pain and emotional consequences [J]. *Nature Neuroscience*, 2024, 27(2): 272-285.
- [34] PRESTO P, JI G, PONOMAREVA O, et al. Hmgb1 silencing in the amygdala inhibits pain-related behaviors in a rat model of neuropathic pain [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 11944.
- [35] SILVA-CARDOSO G K, LAZARINI-LOPES W, HALLAK J E, et al. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 197: 108712.
- [36] BAI L, WANG W, DONG Y L, et al. Attenuation of mouse somatic and emotional inflammatory pain by hydralazine through scavenging acrolein and inhibiting neuronal activation [J]. *Pain Physician*, 2012, 15(4): 311-326.
- [37] STOOP J N, TIBBITT C A, VAN EDEN W, et al. The choice of adjuvant determines the cytokine profile of T cells in proteoglycan-induced arthritis but does not influence disease severity [J]. *Immunology*, 2013, 138(1): 68-75.
- [38] WANG T Z, WANG F, TIAN Z C, et al. Cingulate cGMP-dependent protein kinase I facilitates chronic pain and pain-related anxiety and depression [J]. *Pain*, 2023, 164(11): 2447-2462.
- [39] PARENT A J, BEAUDET N, BEAUDRY H, et al. Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain [J]. *Behav Brain Res*, 2012, 229(1): 160-167.
- [40] BURSTON J J, VALDES A M, WOODHAMS S G, et al. The impact of anxiety on chronic musculoskeletal pain and the role of astrocyte activation [J]. *Pain*, 2019, 160(3): 658-669.
- [41] BAI Y, MA L T, CHEN Y B, et al. Anterior insular cortex mediates hyperalgesia induced by chronic pancreatitis in rats [J]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 76.
- [42] LUO J, WANG T, LIANG S, et al. Experimental gastritis leads to anxiety- and depression-like behaviors in female but not male rats [J]. *Behav Brain Funct*, 2013, 9: 46.
- [43] ŠUTULOVIĆ N, GRUBAČ Ž, ŠUVAKOV S, et al. Experimental chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome increases anxiety-like behavior: the role of brain oxidative stress, serum corticosterone, and hippocampal

- parvalbumin-positive interneurons [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6687493.
- [44] DEUIS J R, DVORAKOVA L S, VETTER I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 284.
- [45] INALTEKIN A, KIVRAK Y. Evaluation of the effect of vortioxetine on pain threshold by hot-plate test in mice [J]. *Noro Psikiyatr Ars*, 2021, 58(4): 274–277.
- [46] DE RANTERE D, SCHUSTER C J, REIMER J N, et al. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models [J]. *Eur J Pain*, 2016, 20(3): 417–426.
- [47] ZHANG X Y, DIAZ-DELCASTILLO M, KONG L, et al. A systematic review and meta-analysis of thigmotactic behaviour in the open field test in rodent models associated with persistent pain [J]. *PLoS One*, 2023, 18(9): e0290382.
- [48] DANDUGA R C S R, KOLA P K. Elevated plus maze for assessment of anxiety and memory in rodents [J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2761: 93–96.
- [49] SHANAZZ K, DIXON-MELVIN R, BUNTING K M, et al. Light-dark open field (LDOF): a novel task for sensitive assessment of anxiety [J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 363: 109325.
- [50] FRANCOIS M, CANAL DELGADO I, SHARGORODSKY N, et al. Assessing the effects of stress on feeding behaviors in laboratory mice [J]. *eLife*, 2022, 11: e70271.
- [51] NICOLAS L B, KOLB Y, PRINSEN E P M. A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 547(1/2/3): 106–115.
- [52] GAO F, HUANG J, HUANG G B, et al. Elevated prefrontal cortex-to-basolateral amygdala circuit activity mediates comorbid anxiety-like behaviors associated with chronic pain [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(9): e166356.
- [53] MAZZITELLI M, YAKHNITSA V, NEUGEBAUER B, et al. Optogenetic manipulations of CeA-CRF neurons modulate pain- and anxiety-like behaviors in neuropathic pain and control rats [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 210: 109031.
- [54] YU L, ZHU X, PENG K, et al. Propofol alleviates anxiety-like behaviors associated with pain by inhibiting the hyperactivity of PVN^{CRH} neurons via GABA_A receptor $\beta 3$ subunits [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(28): e2309059.
- [55] YAMAUCHI N, SATO K, SATO K, et al. Chronic pain-induced neuronal plasticity in the bed nucleus of the stria *Terminalis* causes maladaptive anxiety [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(17): eabj5586.
- [56] ZHAO Z Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(4): 355–375.
- [57] LIANG Y, ZHOU J, SUN J, et al. The dose-effect relationship of electroacupuncture analgesia and its stimulus parameters: Progress in the last 3 decades [J]. *World J Acupunct Moxibust*, 2023, 33(1): 12–19.
- [58] SHAO X M, SHEN Z, SUN J, et al. Strong manual acupuncture stimulation of “Huantiao” (GB 30) reduces pain-induced anxiety and p-ERK in the anterior cingulate cortex in a rat model of neuropathic pain [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 235491.
- [59] WANG H, CUI J, ZHAO S, et al. Progress on the experimental research of sciatic nerve injury with acupuncture [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 1401756.
- [60] ARIZA J, SUTACHÁN J J, et al. Relationship between functional deficiencies and the contribution of myelin nerve fibers derived from L-4, L-5, and L-6 spinolumbar branches in adult rat sciatic nerve [J]. *Exp Neurol*, 2002, 173(2): 266–274.
- [61] CHAPPLE W. Proposed catalog of the neuroanatomy and the stratified anatomy for the 361 acupuncture points of 14 channels [J]. *J Acupunct Meridian Stud*, 2013, 6(5): 270–274.
- [62] KIM G, KIM D, MOON H, et al. Acupuncture and acupoints for low back pain: systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(2): 223–247.
- [63] OH J E, KIM S N. Anti-inflammatory effects of acupuncture at ST36 point: a literature review in animal studies [J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 813748.
- [64] CHIANG P, CHANG D, MOON H, et al. Neuroanatomical characteristics of the traditional acupuncture point location ST36 [J]. *Acupunct Med*, 2023, 41(6): 376–377.
- [65] LIU S, WANG Z, SU Y, et al. A neuroanatomical basis for electroacupuncture to drive the vagal-adrenal axis [J]. *Nature*, 2021, 598(7882): 641–645.
- [66] FANG J Q, DU J Y, LIANG Y, et al. Intervention of electroacupuncture on spinal p38 MAPK/ATF-2/VR-1 pathway in treating inflammatory pain induced by CFA in rats [J]. *Mol Pain*, 2013, 9: 13.
- [67] MEN C, WANG J, DENG B, et al. Decoding acupuncture electrical signals in spinal dorsal root ganglion [J]. *Neurocomputing*, 2012, 79: 12–17.
- [68] ZHANG X H, FENG C C, PEI L J, et al. Electroacupuncture attenuates neuropathic pain and comorbid negative behavior: the involvement of the dopamine system in the amygdala [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 657507.
- [69] DU J, FANG J, WEN C, et al. The effect of electroacupuncture on PKMzeta in the ACC in regulating

- anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain [J]. Neural Plast, 2017, 2017: 3728752.
- [70] SHAO F, FANG J, QIU M, et al. Electroacupuncture ameliorates chronic inflammatory pain-related anxiety by activating PV interneurons in the anterior cingulate cortex [J]. Front Neurosci, 2021, 15: 691931.
- [71] SHEN Z, ZHANG H, WU Z, et al. Electroacupuncture alleviates chronic pain-induced anxiety disorders by regulating the rACC-thalamus circuitry [J]. Front Neurosci, 2021, 14: 615395.
- [72] LI X, ZHU Y, SUN H, et al. Electroacupuncture inhibits pain memory and related anxiety-like behaviors by blocking the GABA_B receptor function in the midcingulate cortex [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(11): 6613–6626.
- [73] YANG Y, WEI X, TIAN J, et al. Scalp electroacupuncture targeting the VTA^{DA} neurons to relieve negative emotions and promote the alleviation of chronic pain [J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1323727.
- [74] CONG W, PENG Y, MENG B, et al. The effect of electroacupuncture on regulating pain and depression-like behaviors induced by chronic neuropathic pain [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(1): 104–113.
- [75] JIA Y Z, LI H T, ZHANG G M, et al. Electroacupuncture alleviates orofacial allodynia and anxiety-like behaviors by regulating synaptic plasticity of the CA1 hippocampal region in a mouse model of trigeminal neuralgia [J]. Front Mol Neurosci, 2022, 15: 979483.
- [76] CHEN Y, TONG S, XU Y, et al. Involvement of basolateral amygdala-rostral anterior cingulate cortex in mechanical allodynia and anxiety-like behaviors and potential mechanisms of electroacupuncture [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(9): e70035.
- [77] PITZER C, PORTA C L, TREEDE R D, et al. Inflammatory and neuropathic pain conditions do not primarily evoke anxiety-like behaviours in C57BL/6 mice [J]. Eur J Pain, 2019, 23(2): 285–306.

[收稿日期] 2024-12-11

《中国比较医学杂志》再次入编《中文核心期刊要目总览》

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

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

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

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



檀丽丽,黄巍,杨子璇,等. 特发性肺纤维化动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 756-769.

TAN L L, HUANG W, YANG Z X, et al. Research progress in animal models of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 756-769.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.013

特发性肺纤维化动物模型的研究进展

檀丽丽¹, 黄巍², 杨子璇³, 阙平鑫毅¹, 张宏^{4*}, 唐宋琪^{1,3*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611130; 2. 成都中医药大学基础医学院, 成都 611130; 3. 海南医科大学
中医学院, 海口 571199; 4. 成都中医药大学附属医院, 成都 610040)

【摘要】 作为一种预后不良的慢性进行性肺病, 特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的发病机制至今尚未明确, 其治疗方法仍在不断探索。动物模型是研究疾病的发病机制与治疗作用的重要工具。本文将基于 IPF 动物模型与人 IPF 在疾病表型等方面的相似度, 从药物和环境因素所诱导的纤维化机制、组织病理学改变、纤维化阶段、造模时间等方面梳理 IPF 动物模型的研究进展, 阐述不同动物模型的优缺点、特征及应用概况。

【关键词】 特发性肺纤维化; 动物模型; 表型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0756-14

Research progress in animal models of idiopathic pulmonary fibrosis

TAN Lili¹, HUANG Wei², YANG Zixuan³, QUE Pingxinyi¹, ZHANG Hong^{4*}, TANG Songqi^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China; 2. School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 4. Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610040, China)

Corresponding author: ZHANG Hong. E-mail: zhanghong1874@cdutcm.edu.cn;

TANG Songqi. E-mail: tangsongqi@muhn.edu.cn

【Abstract】 As a chronic progressive lung disease with poor prognosis, the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) has not yet been clarified, and its treatment is still being explored. Animal models are important tools for studying the pathogenesis and therapeutic effects of diseases. Based on the similarity between animal models and human of IPF in terms of disease phenotype, this paper will review the research progress of IPF animal models in terms of the fibrosis mechanism induced by drugs and environmental factors, histopathological alterations, fibrosis stage, modelling time, etc., and describe the advantages and disadvantages of different animal models, their characteristics and application profiles.

【Keywords】 idiopathic pulmonary fibrosis; animal models; phenotype

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

【基金项目】 国家自然科学基金 (82474436), 成都中医药大学附属医院基金 (2017-D-YY-15)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82474436), Hospital Fund of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (2017-D-YY-15).

【作者简介】 檀丽丽, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药效和毒理应用。Email: 1936829717@qq.com

【通信作者】 张宏, 男, 硕士, 副主任医师, 研究生导师, 研究方向: 中医药防治急危重症和疑难病的基础与临床。

Email: zhanghong1874@cdutcm.edu.cn;

唐宋琪, 男, 博士, 教授, 研究生导师, 研究方向: 中医药防治变态反应性疾病的临床。

Email: tangsongqi@muhn.edu.cn。

* 共同通信作者

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明的慢性进行性的特发性间质性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia, IIP)^[1-2]。2018 年, 中国将 IPF 纳入《第一批罕见病目录》^[3], 可影响全球约 300 万人^[4]。其特征为肺泡上皮重复性异常瘢痕形成, 以及间质、远端呼吸道和肺泡腔的重塑, 这些病理改变会导致细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚和病理性肺重塑^[5]。IPF 占有间质性肺疾病 (interstitial lung disease, ILD) 的 20%, 是 ILD 中最常见的类型^[6]。患者主要为中老年人, 其中男性患者居多^[4]。尽管 IPF 的发病率较低, 但肺泡上皮的损伤使气体交换障碍、肺容量减少、呼吸困难, 最终易导致死亡^[5]。

肺组织病理学检测被认为是评估 IPF 的黄金标准, 其组织病理学表型包括: (1) 肺泡和肺泡壁结构破坏呈蜂窝状, 导致气体交换效率降低, 是患者出现呼吸困难的主要原因; (2) 中性粒细胞和巨噬细胞的炎症浸润, 它们释放的炎症介质对肺泡上皮细胞造成损伤, 促进成纤维细胞的活化, 并参与 ECM 的降解和合成, 从而加剧肺组织的炎症和纤维化过程; (3) 伴有 II 型肺泡上皮细胞 (type II alveolar epithelial cell, AT2) 和支气管上皮细胞的增生, 异常增生的 AT2 会分泌肺泡表面活性物质, 使肺泡稳定性丧失; (4) IPF 中活化的成纤维细胞和肌成纤维细胞会组成成纤维细胞灶, 肺中胶原沉积增加, 这些是肺组织硬化和功能丧失的重要原因; (5) ECM 的过度沉积会改变肺组织的微环境, 增加组织硬度, 影响细胞行为, 促进纤维化的持续发展^[4,7-9]。这些组织病理学变化通常对胸膜下和膈膜旁实质的影响最为严重^[4], 其中代表活动性病变区域的成纤维细胞灶是 IPF 常见的组织病理学特征^[4,7]。

目前 IPF 发病机制尚未明确、无确切的治疗方法, 因此进一步探索 IPF 的发病机制和治疗方法十分重要。动物模型在疾病的发病机制、病理学表型等方面的研究设计中发挥了重要作用, 但 IPF 动物模型的建立方法多样, 尚无明确的统一标准。目前已有文献对 IPF 动物模型进行综述, 但缺少对其模型诱导时间、维持时间及不同纤维化阶段模型表型差异的总结。因此, 本文从药物和环境因素所诱导的纤维化机制、组织病理学改

变、纤维化阶段、造模时间等方面梳理 IPF 动物模型的研究进展, 旨在完善 IPF 动物模型与人 IPF 疾病表型等方面的相似度, 同时为 IPF 动物模型的选择和评价指标的优化提供理论依据。

1 IPF 的发病机制与表型

IPF 的发生涉及多种因素, 不良生活习惯^[10]、环境影响^[11]、职业危害^[12]、遗传因素^[13]等均可能导致 IPF 的发生。但其发病机制尚未完全阐明, 目前, 关于 IPF 发病机制的研究主要集中在慢性炎症、氧化应激和肺泡上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 等方面^[14-16] (图 1)。

长期暴露于含有多种危险因素的环境中, 会导致肺损伤, 诱发异常的炎症反应和氧化应激, 两者可相互促进^[17]。炎症反应中的巨噬细胞分化为 M1 型和 M2 型两种不同的状态^[18], M1 型巨噬细胞诱导产生的促炎细胞因子, 如白介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 会加快炎症产物对肺组织的浸润^[19-20]。氧化应激通过氧化还原激活核转录因子- κ B (nuclear transcription factor, NF- κ B) 信号通路释放 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 等炎症因子激活 EMT^[21-23], 并导致 M2 巨噬细胞极化^[21-25]。M2 型巨噬细胞及其亚型产生的转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等促肺纤维化因子来介导胶原蛋白沉积和 EMT^[19-20]。EMT 与成纤维细胞相互作用, 诱导肌成纤维细胞大量形成、肺上皮细胞中胶原蛋白、ECM 等物质产生, 最终导致肺纤维化^[26]。

2 实验动物

目前, 用于 IPF 动物模型的实验动物种类众多, 包括小鼠、大鼠、仓鼠、树鼯、美利奴羊、恒河猴、叙利亚仓鼠等^[27]。由于给药剂量及给药途径的不同, 这些动物模型具有高度的不均一性。大鼠和小鼠模型是应用最为广泛的 IPF 动物模型^[28], 小鼠与人类基因相似性高、繁殖能力高、品系多样, 以 C57BL/6J、C57BL/6、C6BL/8J、KM 小

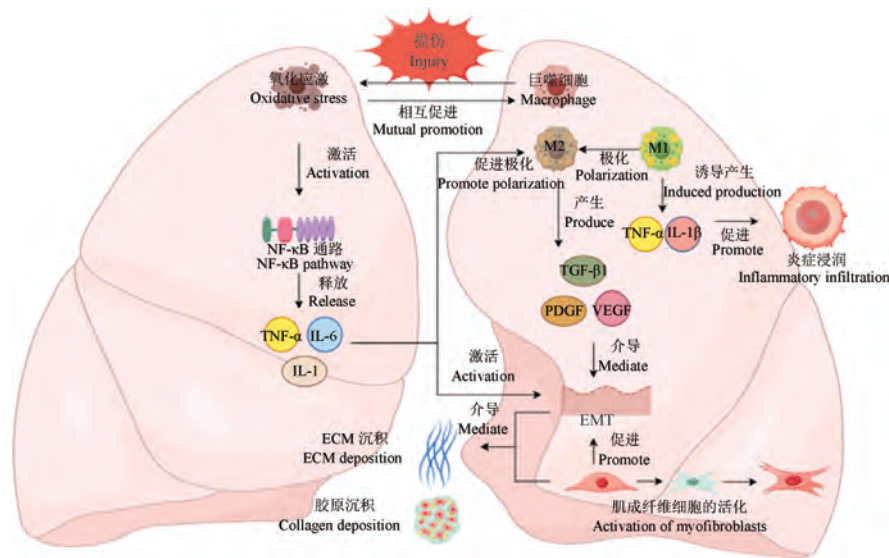


图 1 IPF 发病机制(由 Figdraw 绘制)
Figure 1 IPF pathogenesis(By Figdraw)

鼠为代表;大鼠的呼吸系统在解剖学和生理学上与人类有许多相似之处,且易于饲养和操作,以 Wister 和 SD 为主。树鼯、美利奴羊、恒河猴、叙利亚仓鼠等动物在基因、解剖学和代谢上更接近于人类^[29-30],但因其价格昂贵,较少应用于实验研究。

3 IPF 动物模型评价指标

评价指标是判断动物模型建立成功与否的重要依据。在 IPF 临床前模型中,模型动物需具有人类 IPF 类似的病理学特征,并且常使用 ASHCROFT 等^[31]建立的评分系统(表 1)^[32-33]作为模型评估的终点^[7,10]。

4 造模方法

现有的造模方法包括药物诱导模型、环境诱导模型以及基因工程技术诱导模型。药物诱导包括博来霉素(bleomycin, BLM)、百草枯(paraquat, PQ)、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、胺碘酮(amiodarone, AMD)、油酸(oleic acid)等(表 2),其中最常用的为 BLM。环境诱导包括游离结晶二氧化硅(crystalline silica, CS)、石棉(asbestosis)、辐射、高浓度氧等(表 3),其中最常用的为 CS。基因工程技术通过敲除特定的基因使小鼠自发的发生肺纤维化或加快特定 IPF 模型的诱导进程。由于药物的化学

表 1 肺纤维化分级标准

Table 1 Grading criteria for pulmonary fibrosis	
纤维化分级 Fibrosis classification	组织学特征 Histological characteristics
0	正常肺,肺组织结构正常 Normal lungs with normal lung tissue structure
1	肺泡或细支气管壁轻度纤维性增厚 Mild fibrous thickening of alveolar or bronchial walls
2 ~ 3	中度纤维性增厚对肺组织结构无明显损害 Moderate fibrous thickening without significant damage to lung tissue structure
4 ~ 5	纤维化增加,并对肺组织结构造成一定的损害,形成纤维带或小纤维团 Increased fibrosis and some damage to the lung tissue structure, forming fibrous bands or small fibrous masses
6 ~ 7	肺组织结构严重扭曲,纤维区域较大,即出现“蜂窝状肺” Severe distortion of the lung tissue structure with large fibrous areas, i. e. “honeycomb lung”
8	视野完全纤维性闭塞 Complete fibrous occlusion of the visual field

注:肺组织染色后镜下观察评分。
Note. Score for microscopic observation after staining of lung tissue.

性质和物理因素对肺损伤的诱导效果不同,因此它们在实验动物中诱导的纤维化机制、组织病理学变化、纤维化阶段以及造模时间等方面也存在差异。

表 2 药物诱导的 IPF 模型
Table 2 Models of drug-induced IPF

药物种类 Drug type	动物品系 Strain of animal	造模时间/周 Moulding time/ week	表型 Phenotype						参考文献 References
			肺泡结构的 改变与破坏 Alteration and destruction of alveolar structure	炎症细胞 浸润 Inflammatory cell infiltrate	肺上皮细 胞增生 Lung epithelial cell hyperplasia	胶原 沉积 Collagen deposition	成纤维 细胞灶 Fibroblastic focus	ECM 沉积 Extracellular matrix deposition	
BLM	C57BL/6、 C57BL/6J 小鼠 C57BL/6、 C57BL/6J mice	2 ~ 4	√	√	√	√	√	-	[34-35]
	瑞士白化小鼠 Swiss albino mice		√	√	√	√	√	-	[36]
	SD、Wistar 大鼠 SD、Wistar rat		√	√	-	√	-	-	[37-38]
	树鼩 Tree shrew		-	√	-	√	-	√	[29,39]
	美利奴羊 Merino		√	-	-	√	√	-	[40-42]
PQ	C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	2 ~ 4	√	√	√	√	-	-	[43-44]
	SD、Wistar 大鼠 SD、Wistar rat		√	√	-	√	-	-	[45-46]
	恒河猴 Rhesus monkey		√	√	-	√	-	-	[47]
FITCF	BALB/c、 C57BL/6 小鼠 BALB/c、 C57BL/6J mice	2 ~ 4	-	√	-	√	-	√	[48]
AMD	KM 小鼠 KM mice	2 ~ 4	√	√	√	√	-	-	[49]
	SD、Wistar 大鼠 SD、Wistar rat		√	√	-	√	√	-	[31,50]
	叙利亚仓鼠 Syrian hamster		√	√	√	√	-	-	[51]
油酸 Oleic acid	SD 大鼠 SD rat	1 ~ 4	√	√	√	√	-	-	[52]

注:√:具有此表型;-:不具有此表型。(下表同)
Note. √. Has this phenotype. -. Does not have this phenotype. (The same in the following tables)

4.1 药物诱导的 IPF 动物模型

4.1.1 BLM 诱导的 IPF 模型

BLM 是从垂直链霉菌中分离得到的 1 组糖肽类抗生素,由 5 种氨基酸组成,通过产生自由基与体内的铁结合形成络合物,诱导 DNA 的断裂,导致细胞凋亡或坏死,引起炎症反应和纤维化^[65-67]。自 1970 年以来,BLM 被用于诱导动物纤维化^[68],是诱导纤维化的典型药物。
BLM 诱导纤维化的给药方式较多,大多通过单剂量气管内滴注^[34]、尾静脉注射^[34]、腹腔注

射^[34]、鼻腔雾化^[35]等。模型的建立通常为 2 ~ 4 周,6 ~ 8 周后肺纤维化会消失^[69-71]。重复 BLM 滴注诱导的 IPF 模型中纤维化可持续 3 ~ 6 个月^[72-73],产生此差异的机制尚不清楚,可能与研究中使用 BLM 的不同剂量或小鼠品系有关。其中 C57BL/6 小鼠对 BLM 具有更好的反应性^[34-35,74]。
BLM 诱导 IPF 的过程可分为 3 个阶段,第 1 阶段为给药后的第 1 周主要以炎症为主,炎症细胞大量涌入,并激活和分泌多种炎症介质,原因

表 3 环境诱导的 IPF 模型
Table 3 Environmentally induced IPF models

药物种类 Drug type	动物品系 Strain of animal	造模时间/周 Moulding time/weeks	表型 Phenotype						参考文献 References
			肺泡结构的改变与破坏 Alteration and destruction of alveolar structure	炎症细胞浸润 Inflammatory cell infiltrate	肺上皮细胞增生 Lung epithelial cell hyperplasia	胶原沉积 Collagen deposition	成纤维细胞灶 Fibroblastic focus	ECM 沉积 Extracellular matrix deposition	
BLM	C57BL/6、C57BL/6J 小鼠 C57BL/6、C57BL/6J mice	4 ~ 12	✓	✓	✓	✓	—	—	[53–56]
	KM 小鼠 KM mice		✓	✓	—	—	—	—	[57]
	SD、Wistar 大鼠 SD、Wistar rat		✓	✓	✓	✓	—	—	[57–59]
石棉 Asbestosis	C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	1 ~ 2	✓	—	—	✓	—	—	[41–42]
X 射线 X-ray	C57BL/6 小鼠 C57BL/6J mice	24 ~ 28	✓	✓	✓	✓	✓	—	[60–61]
高浓度氧 High oxygen concentration	SD、Wistar 大鼠 SD、Wistar rat	2	✓	—	—	✓	—	—	[62–64]

是上皮损伤,并有血管渗透,促炎细胞因子、趋化因子的上调^[72]。第 2 阶段为给药后的第 2 周从炎症发展为纤维化的过渡期,此阶段可见炎症反应减弱、纤维增生增加、肌成纤维细胞出现^[75]。第 3 阶段为给药后的第 3 ~ 4 周为慢性纤维化阶段,可见肺泡结构破坏、肺泡内及肺间隔纤维化明显、肺泡壁和肺泡间隔增厚、炎症细胞浸润(如巨噬细胞)、成纤维细胞灶、胶原沉积增加、基底膜增厚、I 型肺泡上皮细胞变形、崩解脱落、肿胀、II 型肺泡上皮细胞增殖、畸形层状体、层状小体液泡样转化,EMT 水平升高,ECM 的更新和重塑,Ashcroft 肺纤维化评分升高^[34–36,65,76–78],出现明显的牵引性支气管扩张和胸膜下纤维化^[73];可见 IPF 模型中的炎症因子 TGF-β1、TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达水平升高^[34–35,78–79]。BLM 诱导 IPF 具有价格实惠、易于处理、重复性高的优点,并出现了多种人 IPF 疾病表型,是实验室最常用的造模方式之一。但此模型并不能保证所有动物都能完全发展成肺纤维化,疾病发展的时间间隔较长^[65,76]。不同给药方式产生的肺纤维化会有差异,如 BLM 鼻腔雾化给药,药物在体内分布较均匀,肺纤维化病变更均匀、范围更广、可达胸膜下

区域,形成胸膜下纤维化,更符合人肺纤维化的临床特点,但需要特殊的设备,使用较少^[35];腹腔注射和尾静脉注射 BLM 纤维化主要位于胸膜下,胶原分布在肺间质间隙,但给药次数和剂量较大,造模时间长,成本高^[34];单剂量气管内给 BLM 为目前最常用的造模方式,胶原主要分布在支气管附近,对操作者技术要求较高^[34,71]。

近年来,BLM 诱导的 IPF 模型在 IPF 的研究中被广泛应用。例如,在此模型基础上开展的与 IPF 发病相关的机制研究,包括炎症^[80–81]和氧化应激^[80,82]、EMT^[83–85]等。此外,该模型还用于筛选治疗 IPF 的潜在药物,如川芎嗪^[86]、黄芪^[87]、白芍^[87]、生陷汤^[88]、橘皮素^[83]、罗红霉素^[89]等。同时,也被用于评估新治疗方法的疗效,如 IL-11 的 siRNA 纳米颗粒的吸入法^[90]、超分子纳米纤维法^[91]、高压氧疗法^[92–93]等。

4.1.2 PQ 诱导的 IPF 模型

PQ 是一种被广泛使用的高效非选择性接触性除草剂。PQ 中毒会导致肺、胃肠道、胰腺、肾、肝、心脏、脑等多器官功能衰竭,其中主要的靶器官为肺和肾,肺纤维化是 PQ 中毒最典型的特征^[94]。PQ 导致肺纤维化主要是引起肺泡损伤和

肺泡上皮细胞的重构;因此产生氧化应激反应、炎症反应和基因表达异常^[95]。PQ 动物模型的建立常用的实验动物为 C57BL/6J 小鼠^[43-44]、Wistar 大鼠^[45]、SD 大鼠^[46]、恒河猴^[47]等,常通过一次性灌胃^[45-47]和腹腔注射给药^[43-44],造模时间为 2 ~ 4 周^[43-47]。PQ 给药 3 d 后,可见支气管和肺泡壁充血、水肿和炎症细胞浸润;给药 14 d 后,可见肺泡间隔增厚伴肺泡管腔变窄、弥漫性肺出血及有透明膜形成;给药 28 d 后,可见肺泡壁增厚,纤维细胞增生,胶原纤维增加,TGF- β 1、IL-4 表达水平升高;给药 28 d 后肺纤维化水平明显下降^[43,45-47]。PQ 诱导的 IPF 模型具有死亡率高,操作困难,给药剂量难控制等缺点^[96]。

PQ 诱导的 IPF 模型适用于研究 IPF 发病机制,包括非免疫机制^[97]、氧化应激^[97-99]、炎症反应^[97-99]以及 EMT^[100]等途径。此外,该模型还可用于筛选潜在的 IPF 治疗药物,例如雷帕霉素^[101]、雷公藤内酯^[102]、阿米替林^[103]等。同时,RASOOLI 等^[104]应用该模型评估了吡非尼酮加泼尼松龙的联合疗法治疗 PQ 诱导 IPF 的疗效,为联合治疗策略提供了实验依据。

4.1.3 FITC 诱导的 IPF 模型

FITC 是一种可用于诱导肺纤维化的化学荧光分子,能与呼吸道蛋白结合,附着在肺蛋白上,持续定位于最初的损伤区域,可通过荧光识别受损区域和周围的纤维化^[48,105]。常用的实验动物为 BALB/c、C57BL/6 小鼠^[48]。单次气管内滴注 FITC,纤维化的出现需要 2 ~ 4 周,并一直持续至 24 周^[48,105]。首先,给药 1 d 后,出现肺泡壁水肿和肺泡渗出物,表现为急性肺损伤,给药 7 d 后,可见急性和慢性炎症细胞浸润,如单核细胞;给药 21 d 后,可见斑片状肺纤维化、ECM 增加、单核细胞持续存在、胶原沉积增加^[48]。但实际上很少使用该药物诱导肺纤维化模型,因为该模型明显缺乏 UIP 表现和主要的炎性浸润物,某些组织病理学特征观察不到,如成纤维病灶,而且不同批次的 FITC 所产生的纤维化反应有较大的差异^[48,105-106]。

4.1.4 AMD 诱导的 IPF 模型

AMD 是一种广泛用于治疗心律失常的Ⅲ类抗心律失常药,但因其会诱导严重的肺毒性,临床上很少用于疾病的治疗^[107-108]。AMD 诱导肺

纤维化的发病机制与多种细胞、线粒体破坏、免疫调节机制和血管紧张素酶系统的综合作用有关,但目前并没有明确的定论^[109-110]。其诱导的 IPF 模型常用的实验动物为 KM 小鼠^[49]、叙利亚仓鼠^[51]、Wistar 大鼠^[31]和 SD 大鼠^[50]等,可通过单次气管内注入 AMD 或者连续灌胃给药,在 4 周内发展为肺纤维化,4 周后肺纤维化水平下降^[51]。AMD 给药 1 d 后,可见肺泡腔内急性炎症细胞浸润,并伴有出血;给药 5 d 后,可见间质增厚、单核细胞进入肺间隔、肺泡上皮细胞增生、纤维蛋白渗出明显并且急性炎症细胞消失;在给药 14 d 后,肺泡间隔明显增厚,充斥炎症细胞、纤维蛋白渗出物和Ⅱ型肺泡上皮细胞明显增加、急性炎症细胞再次出现;给药 21 d 后,可见间质和肺泡腔中含有大量中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞、胶原沉积增加、肺泡间隔增厚、含有大量巨噬细胞;给药 28 d 后,肺纤维化改变有所恢复^[32,49,51,107]。临床上对胺碘酮所致纤维化的认识和治疗有限,该药不良反应众多,在引起肺毒性的同时也会造成其他损伤,其诱导产生肺毒性的发病机制,至今没有确切结论,因此对其进一步研究尤为重要。目前该模型可用于肺纤维化治疗药物的筛选,包括川陈皮素^[111]、硫辛酸^[107]、左旋肉碱^[112]等潜在药物。

4.1.5 油酸诱导的 IPF 模型

油酸是动植物体内的一种不饱和脂肪酸,是健康人体内常见的一种营养素,但油酸可通过触发不同的细胞途径,改变细胞功能,刺激组织发生纤维化^[113]。通过尾静脉注射油酸,诱导 IPF 模型,7 d 可见肺泡壁明显增厚、肺泡和肺间质水肿,大量中性粒细胞浸润,肺泡腔缩小,肺泡塌陷等,以急性肺泡炎为主;14 d 可见肺泡炎症减轻,病灶内出现肺泡萎缩和肺泡上皮细胞增生,局部出现胶原沉积及斑片状纤维,部分肺泡结构消失;28 d 可见肺泡结构萎陷、破坏,炎症细胞减少,病变部位扩大,胶原沉积在新生毛细血管周围,肺泡间隔及部分肺泡腔中充满胶原和纤维蛋白,肺泡壁增厚^[52]。油酸诱导的肺纤维化模型虽然不能完全模拟人类疾病的全过程,但该模型重复性好,更接近人类肺纤维化病变的分布特点,缺点是需要掌握尾静脉注射的技术,且成功率不高^[113-114]。

4.2 环境诱导的 IPF 动物模型

4.2.1 CS 诱导的 IPF 模型

矽肺病是由于人体吸入大量 CS 或二氧化硅 (SiO_2) 引起的^[115], CS 会导致肺部炎症, 纤维化和肺功能障碍, 但其导致机体疾病的机制尚不清楚, 实验研究中用 SiO_2 粉末诱导 IPF 模型的建立有利于了解其致病机制, 为疾病的治疗, 药物的研究提供理论依据^[116-117]。 SiO_2 诱导的 IPF 是一种弥漫性间质性纤维化疾病, 其特征是肺组织中 ECM 的大量沉积^[118]。模型中常用动物为 C57BL/6 小鼠^[53-54]、C57BL/6J 小鼠^[55-56]、KM 小鼠^[119]和 Wistar 大鼠^[57-58]、SD 大鼠^[59], 给药途径多为气管内滴注 SiO_2 ^[53-59], 少部分使用鼻腔吸入^[119]; 造模时间最短为 28 d^[57-58], 最长可达 5 个月^[55-56]。 SiO_2 给药后 28 d 可见肺部出现纤维化; 给药 2 个月后, 可见细胞性结节(肉芽肿)并伴有明显的上皮增生; 给药 4 个月后, 可见肺泡结构破坏、肺泡壁增厚、肺上皮细胞增生、细胞性结节(肉芽肿)、炎性细胞浸润、肺泡腔内有渗出液、肺间质充血、胶原沉积增加、ECM 沉积增加^[56-59], 还可见 IL-1 β 、IL-6、IL-4、TNF- α 、IL-18 等炎症因子的表达水平升高, Ashcroft 肺纤维化评分升高^[56-59]。CS 诱导的 IPF 操作简单, 成果率高, 诱导的肺纤维化组织病理变化与人类更相似, 但 SiO_2 动物模型所需的造模时间较长难以广泛应用^[54-56]。该模型被用于 IPF 治疗药物的筛选和潜在疗效的评估^[120-121]。

4.2.2 石棉诱导的 IPF 模型

石棉纤维为天然存在的矿物硅酸盐(角闪石和温石棉), 在环境中暴露时会导致肺和胸腔纤维化、肺癌等, 但其诱导疾病的机制尚未完全确定。石棉纤维进入人体后会被血管内皮细胞内化, 导致产生铁衍生的活性氧物种, DNA 损伤和细胞凋亡, 诱导的肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)的凋亡是石棉纤维引起肺纤维化的早期事件^[122]。常用的实验动物为 C57BL/6 小鼠^[123]、C57BL/6J 小鼠^[124], 闪石纤维通过气管内滴注给药, 第 7 天可见肺部出现纤维化, 第 14 天肺纤维化达到成熟, 并可持续 60 d, 不会自发消退^[123], 可见肺结构破坏, 支气管周围纤维化, 并延伸至邻近的肺泡实质, 胶原沉积增加^[123-124]。该模型也存在一定的局限性, 诱导的

纤维化病变在肺组织中分布不均匀, 大多位于肺组织的中间而非胸膜下^[125]。吸入法诱导的 IPF 的病变更接近胸膜, 但所需的时间较长, 常使用温石棉^[126]。

目前, 该模型主要用于预测 IPF 的潜在治疗靶点, 包括腺嘌呤核苷酸转位酶 1^[127]、去乙酰化酶 3^[128-129]、NADPH 氧化酶 4^[130]等。

4.2.3 辐射诱导的 IPF 模型

放射性肺损伤(radiation-induced lung injury, RILI)是放射治疗中最常见的副作用, 其中包括急性放射性肺炎和慢性放射性肺纤维化^[131]。辐射是通过导致成纤维细胞和肌成纤维细胞的积累、增殖、分化, 最终增加胶原蛋白的产生、炎症细胞的浸润和 ECM 的重塑从而诱导肺的纤维化^[132]。辐射诱导的 IPF 模型常用 C57BL/6 小鼠, 对其最为敏感^[132]; 采用 12 ~ 20 Gy X 射线照射, 4 ~ 8 周后, 可见肺泡间隔增宽、肺泡完整性降低、肺纹理轻度增厚、胶原沉积出现; 16 ~ 24 周后可见肺间质细胞增多、肺泡壁增厚、胶原沉积增加, 肺纤维化面积增大、炎症细胞浸润、肌成纤维细胞分化增加、IL-6、TGF- β 表达升高^[60-61]。辐射造模所采用的技术较为复杂, 因为其无法避免照射到其他器官, 但造模时应只辐射于肺部; 而且辐射造模所需的时间较长, 多为 24 ~ 28 周, 限制了其在临床前环境中的有效应用^[60-61, 106, 132]。

该模型可用于 IPF 发病机制的研究, 通过靶向寡肽/组氨酸转运体来调节巨噬细胞中的氧化应激^[133]; TU 等^[134]应用该模型探究了尼达尼布对辐射诱导肺纤维化的抗纤维化影响, 并揭示其基本机制。DADRICH 等^[135]应用该模型评估了血小板衍生生长因子和 TGF- β 信号传导的小分子抑制剂的联合使用是一种安全有效的治疗辐射诱导 IPF 的方法。

4.2.4 高浓度氧诱导的 IPF 模型

高浓度氧可用于治疗缺氧性呼吸衰竭, 但高浓度的氧也会影响肺的发育, 导致肺泡损伤、肺间质纤维化和肺血管发育不良等, 使早产儿患上支气管发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)^[136]。暴露于 95% ~ 100% 的氧浓度环境中 72 ~ 96 h, 会导致急性肺损伤, 长时间暴露于 50% ~ 85% 氧浓度环境中可导致渐进性肺纤维化^[137]。高氧引起的肺纤维化的特征为

EMT^[62,136]。其诱导的 IPF 模型常用的动物为新生出生的大鼠,将新生大鼠与母鼠一同置于高氧环境中,持续高氧培养 14 d,新生大鼠在第 3 ~ 7 天肺部开始出现纤维化,在第 14 天纤维化达到最高峰,可见肺泡数量减少,肺泡扩张,间质增厚,肺间质纤维化增加,胶原沉积增加,肌成纤维细胞分化增加,TGF- β 1 表达水平升高^[62-64,136-137]。高浓度氧诱导的肺纤维模型所需的时间较短,但所需的条件比较高,要将氧的浓度控制在一定范围,才可导致肺纤维化。

4.3 其他

近年来随着研究的不断深入,一些转基因小鼠及基因敲除小鼠也成为了研究的热点。*Fra2*^{tg} 转基因小鼠(*Fra2* transgenic mice, *Fra2*^{tg})来源于转基因小鼠异位表达 *Fra2*,小鼠异位表达 *Fra2* 可导致多器官的纤维化,肺组织的纤维化最严重^[138]。几种与人类肺纤维化有关的生长因子、趋化因子和细胞因子在 *Fra2*^{tg} 转基因小鼠的病变肺中高度表达,且在 IPF 的人肺纤维化标本中可见强烈的 *Fra2* 免疫反应,因此 *Fra2*^{tg} 转基因小鼠可成为 IPF 研究中一种有前途的动物模型^[138-140]。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)为色氨酸中提取的单胺分子,可由色氨酸羟化酶 2 (tryptophan hydroxylase 2, TPH2)和色氨酸羟化酶 1 (tryptophan hydroxylase 1, TPH1)合成,中枢的 5-HT 由 TPH2 合成,外周的由 TPH1 合成。外周的 5-HT 可调节血小板凝集、骨骼发育、免疫反应和炎症反应等。研究发现 5-HT 可以通过促进肺胶原蛋白沉积、炎症和氧化应激加速博来霉素诱导的肺纤维化,因此在肺纤维小鼠血清、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)、肺组织中可见 5-HT 水平显著升高^[141]。

黏蛋白 1(mucin 1, MUC1)是一种 I 型跨膜糖蛋白,其可通过抑制巨噬细胞中 TLR/NF- κ B 通路的激活来干扰 NLRP3 炎性体的活性,MUC1 的缺乏就可能通过增加 IL-1 β 的产生而加剧肺纤维化^[142]。通过转基因技术使小鼠自发的发生肺纤维化或者通过敲除特定的基因加快肺纤维模型的建立有利于进一步研究 IPF,同时也有利于缩短实验的时间,也可增加造模的成果率,但该实验模型的建立有价格昂贵的局限性。

5 总结与展望

本文系统总结了 IPF 动物模型的研究进展,从药物诱导和环境诱导两个方面,梳理了不同模型的造模方法、表型特征、优缺点及应用概括。理想的 IPF 动物模型的发病机制、组织病理学改变、生化指标等应较全面的与人类 IPF 疾病相近,但目前尚无一个模型能够完全模拟人类身上检测到的 IPF 所有典型特征。未来研究应注重模型的标准化,规范造模流程,统一评价指标;开发多因素诱导模型,结合药物、环境因素和遗传背景,更真实地模拟人类 IPF 的发病过程;引入新技术,如单细胞测序和基因编辑,以构建更接近人类病理特征的模型;加强跨物种研究,寻找更适合的模型动物或开发人源化动物模型;同时,关注慢性纤维化阶段的研究,为 IPF 的长期治疗提供理论支持。通过这些优化和创新,推动 IPF 的发病机制研究和临床治疗策略的开发。

参 考 文 献(References)

- [1] PODOLANCZUK A J, THOMSON C C, REMY-JARDIN M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: state of the art for 2023 [J]. Eur Respir J, 2023, 61(4): 2200957.
- [2] MEI Q, LIU Z, ZUO H, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: an update on pathogenesis [J]. Front Pharmacol, 2022, 12: 797292.
- [3] 国家卫生健康委员会. 关于公布第一批罕见病目录通知 [R]. 北京:国家卫生健康委员会; 2018.
National Health Commission of the People's Republic of China. Circular on the announcement of the first batch of rare disease directory [R]. Beijing: National Health Commission of the People's Republic of China; 2018.
- [4] RAGHU G, REMY-JARDIN M, MYERS J L, et al. Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(5): e44-e68.
- [5] HENNION N, DESSEYN JL, GOTTRAND F, et al. La fibrose pulmonaire idiopathique [J]. Med Sci (Paris). 2022; 38(6-7): 579-584.
- [6] MUNCHEL J K, SHEA B S. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. R I Med J (2013), 2021, 104(7): 26-29.
- [7] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [8] 中华医学会病理学分会胸部疾病学组. 中国特发性肺纤

- 维化临床-影像-病理诊断规范 [J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(2): 81-86.
- Thoracic Disease Group of the Chinese Medical Association Pathology Branch. Chinese clinical-imaging-pathological diagnostic norms for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin J Pathol, 2018, 47(2): 81-86.
- [9] 杜欣倩, 崔烨. 肺泡上皮细胞和巨噬细胞在特发性肺纤维化中的相互作用 [J]. 微生物学免疫学进展, 2023, 51(5): 61-67.
- DU X Q, CUI Y. Research progress on the cross-talk between alveolar epithelial cells and macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Prog Microbiol Immunol, 2023, 51(5): 61-67.
- [10] RAGHU G, COLLARD H R, EGAN J J, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824.
- [11] SGALLA G, BIFFI A, RICHELDI L. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis, epidemiology and natural history [J]. Respirology, 2016, 21(3): 427-437.
- [12] MIYAKE Y, SASAKI S, YOKOYAMA T, et al. Occupational and environmental factors and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan [J]. Ann Occup Hyg, 2005, 49(3): 259-265.
- [13] GARCÍA-SANCHO C, BUENDÍA-ROLDÁN I, FERNÁNDEZ-PLATA M R, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Med, 2011, 105(12): 1902-1907.
- [14] DING Q, LUCKHARDT T, HECKER L, et al. New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Drugs, 2011, 71(8): 981-1001.
- [15] KIFFIN R, BANDYOPADHYAY U, CUERVO A M. Oxidative stress and autophagy [J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(1/2): 152-162.
- [16] FU J, LU L, WANG H, et al. Hirsutella sinensis mycelium regulates autophagy of alveolar macrophages via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Int J Med Sci, 2021, 18(8): 1810-1823.
- [17] TONG B, FU L, HU B, et al. Tauroursodeoxycholic acid alleviates pulmonary endoplasmic reticulum stress and epithelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced lung fibrosis [J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 149.
- [18] DESAI O, WINKLER J, MINASYAN M, et al. The role of immune and inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Front Med (Lausanne), 2018, 5: 43.
- [19] MOU Y, WU G R, WANG Q, et al. Macrophage-targeted delivery of siRNA to silence Mecp2 gene expression attenuates pulmonary fibrosis [J]. Bioeng Transl Med, 2022, 7(2): e10280.
- [20] LI G, JIN F, DU J, et al. Macrophage-secreted TSLP and MMP9 promote bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 366: 10-16.
- [21] 陈锴, 张蓝熙, 田燕歌, 等. 慢性阻塞性肺疾病氧化应激机制及中医药治疗进展 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(19): 4881-4885.
- CHEN K, ZHANG L X, TIAN Y G, et al. Mechanism of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease and progress of Chinese medicine treatment [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(19): 4881-4885.
- [22] BOLOURANI S, BRENNER M, WANG P. The interplay of DAMPs, TLR4, and proinflammatory cytokines in pulmonary fibrosis [J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(10): 1373-1384.
- [23] BOROK Z, BUHL R, GRIMES G J, et al. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet, 1991, 338(8761): 215-216.
- [24] WANG L, LI S, YAO Y, et al. The role of natural products in the prevention and treatment of pulmonary fibrosis: a review [J]. Food Funct, 2021, 12(3): 990-1007.
- [25] BAI Y, LI J, ZHAO P, et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress via upregulating Nrf2 [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 628.
- [26] WYNN T A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. J Exp Med, 2011, 208(7): 1339-1350.
- [27] CARRINGTON R, JORDAN S, PITCHFORD S C, et al. Use of animal models in IPF research [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2018, 51: 73-78.
- [28] GISLI JENKINS R, MOORE B B, CHAMBERS R C, et al. An official American thoracic society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56(5): 667-679.
- [29] LARSON-CASEY J L, HE C, CHE P, et al. Technical advance: the use of tree shrews as a model of pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0241323.
- [30] FAN Y, HUANG Z Y, CAO C C, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
- [31] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467-470.
- [32] NASRI H R, JOUKAR S, KHERADMAND H, et al. Coadministration of atorvastatin and amiodarone increases the risk of pulmonary fibrosis in rats [J]. Med Princ Pract, 2016, 25(2): 150-154.
- [33] LIU X, KHADTARE N, PATEL H, et al. Transient

- blockade of endothelin-1 mitigates amiodarone-induced pulmonary fibrosis [J]. *Lung*, 2018, 196(3): 321–327.
- [34] GUL A, YANG F, XIE C, et al. Pulmonary fibrosis model of mice induced by different administration methods of bleomycin [J]. *BMC Pulm Med*, 2023, 23(1): 91.
- [35] SONG D, CHEN Y, WANG X, et al. A mouse model of pulmonary fibrosis induced by nasal bleomycin nebulization [J]. *J Vis Exp*, 2023, 20: 191.
- [36] BALE S, SUNKOJU M, REDDY S S, et al. Oropharyngeal aspiration of bleomycin: an alternative experimental model of pulmonary fibrosis developed in Swiss mice [J]. *Indian J Pharmacol*, 2016, 48(6): 643–648.
- [37] LUO Y, YI H, HUANG X, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a therapeutic target in bleomycin-induced pulmonary fibrosis rats [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(1): L6–L16.
- [38] SONG X, YU W, GUO F. Pirfenidone suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis and periostin expression in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 1800–1806.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] ORGAN L, BACCI B, KOUMOUNDOUROS E, et al. A novel segmental challenge model for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in sheep [J]. *Exp Lung Res*, 2015, 41(3): 115–134.
- [42] DERSEH H B, GOODGER J Q D, SCHEERLINCK J Y, et al. The efficacy and safety of pinocembrin in a sheep model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *PLoS One*, 2021, 16(12): e0260719.
- [43] DONG M N, XIAO Y, LI Y F, et al. Amelioration of paraquat-induced pulmonary fibrosis in mice by regulating miR-140-5p expression with the fibrogenic inhibitor Xuebijing [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2020, 34: 2058738420923911.
- [44] SHAO X, LI M, LUO C, et al. Effects of rapamycin against paraquat-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(1): 52–61.
- [45] CHEN H, CUI J, WANG J, et al. 5-aminosalicylic acid attenuates paraquat-induced lung fibroblast activation and pulmonary fibrosis of rats [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(2): 58.
- [46] GUO F, SUN Y B, SU L, et al. Losartan attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34(5): 497–505.
- [47] SHAO M, YANG S, ZHENG A, et al. Pathophysiological changes in Rhesus monkeys with paraquat-induced pulmonary fibrosis [J]. *Lung*, 2022, 200(5): 549–560.
- [48] CHRISTENSEN P J, GOODMAN R E, PASTORIZA L, et al. Induction of lung fibrosis in the mouse by intratracheal instillation of fluorescein isothiocyanate is not T-cell-dependent [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(5): 1773–1779.
- [49] NIU C H, WANG Y, LIU J D, et al. Protective effects of neferine on amiodarone-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1/3): 112–119.
- [50] SHARAF EL-DIN A A I, ABD ALLAH O M. Impact of olmesartan medoxomil on amiodarone-induced pulmonary toxicity in rats: focus on transforming growth factor- β 1 [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 119(1): 58–67.
- [51] CANTOR J O, OSMAN M, CERRETA J M, et al. Amiodarone-induced pulmonary fibrosis in hamsters [J]. *Exp Lung Res*, 1984, 6(1): 1–10.
- [52] 周平, 王磊, 何春香, 等. 博来霉素和油酸致大鼠肺纤维化病理模型的比较 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(87): 47–50.
- ZHOU P, WANG L, HE C X, et al. Comparison of bleomycin and oleic acid-induced pathological models of pulmonary fibrosis in rats [J]. *World Latest Med Inf*, 2015, 15(87): 47–50.
- [53] YANG M, WANG D, GAN S, et al. Triiodothyronine ameliorates silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 790: 148041.
- [54] LI C, LU Y, DU S, et al. Dioscin exerts protective effects against crystalline silica-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Theranostics*, 2017, 7(17): 4255–4275.
- [55] PEUKERT K, STEINHAGEN F, FOX M, et al. Tetracycline ameliorates silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis via inhibition of caspase-1 [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1): 21.
- [56] HUANG H, CHEN M, LIU F, et al. N-acetylcysteine therapeutically protects against pulmonary fibrosis in a mouse model of silicosis [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(7): BSR20190681.
- [57] BO C, ZHANG J, SAI L, et al. Integrative transcriptomic and proteomic analysis reveals mechanisms of silica-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 13.
- [58] BO C, GENG X, ZHANG J, et al. Comparative proteomic analysis of silica-induced pulmonary fibrosis in rats based on tandem mass tag (TMT) quantitation technology [J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0241310.
- [59] 沙焱, 谢英, 陈志军, 等. 脐带间充质干细胞对矽肺大鼠

- 肺纤维化的干预研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2019, 37(6): 401-407.
- SHA Y, XIE Y, CHEN Z J, et al. Interference research of umbilical cord mesenchymal stem cells on the pulmonary fibrosis in silicosis rats [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2019, 37(6): 401-407.
- [60] WEI W, ZHANG H Y, GONG X K, et al. Mechanism of MEN1 gene in radiation-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Gene, 2018, 678: 252-260.
- [61] FU X, LI T, YAO Q. The effect of ophiopogonin C in ameliorating radiation-induced pulmonary fibrosis in C57BL/6 mice: an update study [J]. Front Oncol, 2022, 12: 811183.
- [62] ZHAO S, LUO G, WU H, et al. Placental growth factor gene silencing mitigates the epithelial-to-mesenchymal transition via the p38 MAPK pathway in rats with hyperoxia-induced lung injury [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(6): 4867-4874.
- [63] HU Y, FU J, XUE X. Association of the proliferation of lung fibroblasts with the ERK1/2 signaling pathway in neonatal rats with hyperoxia-induced lung fibrosis [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 701-708.
- [64] QI X J, NING W, XU F, et al. Fasudil, an inhibitor of Rho-associated coiled-coil kinase, attenuates hyperoxia-induced pulmonary fibrosis in neonatal rats [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12140-12150.
- [65] DELLA LATTA 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.
- [66] WILLIAMSON J D, SADOFSKY L R, HART S P. The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Exp Lung Res, 2015, 41(2): 57-73.
- [67] SACCONI N, BASS J, RAMIREZ M L. Bleomycin-induced lung injury after intravenous iron administration [J]. Cureus, 2022, 14(7): e27531.
- [68] ADAMSON I Y, BOWDEN D H. The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Am J Pathol, 1974, 77(2): 185-197.
- [69] HOCHHEGGER B, MARCHIORI E, ZANON M, et al. Imaging in idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and mimics [J]. Clinics (Sao Paulo), 2019, 74: e225.
- [70] REDETE E F, BLACK B P, BACKOS D S, et al. Persistent, progressive pulmonary fibrosis and epithelial remodeling in mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 64(6): 669-676.
- [71] LAWSON W E, POLOSUKHIN V V, STATHOPOULOS G T, et al. Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin [J]. Am J Pathol, 2005, 167(5): 1267-1277.
- [72] MOORE B B, HOGABOAM C M. Murine models of pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(2): L152-L160.
- [73] LIMJUNYAWONG N, MITZNER W, HORTON M R. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Physiol Rep, 2014, 2(2): e00249.
- [74] LIU T, DE LOS SANTOS F G, PHAN S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1627: 27-42.
- [75] CHAUDHARY N I, SCHNAPP A, PARK J E. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(7): 769-776.
- [76] AYILYA B L, BALDE A, RAMYA M, et al. Insights on the mechanism of bleomycin to induce lung injury and associated in vivo models: a review [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110493.
- [77] JIA K, WU J, LI Y, et al. A novel pulmonary fibrosis murine model with immune-related liver injury [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(3): 274-282.
- [78] LIU W, WAN J, HAN J Z, et al. Antiflammin-1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Respir Res, 2013, 14(1): 101.
- [79] YANG X H, WANG F F, CHI X S, et al. Disturbance of serum lipid metabolites and potential biomarkers in the Bleomycin model of pulmonary fibrosis in young mice [J]. BMC Pulm Med, 2022, 22(1): 176.
- [80] PAN L, CHENG Y, YANG W, et al. Nintedanib ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis, inflammation, apoptosis, and oxidative stress by modulating PI3K/Akt/mTOR pathway in mice [J]. Inflammation, 2023, 46(4): 1531-1542.
- [81] TANNER L, SINGLE A B, BHONGIR R V, et al. Small-molecule-mediated OGG1 inhibition attenuates pulmonary inflammation and lung fibrosis in a murine lung fibrosis model [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 643.
- [82] LAN Y W, CHEN Y C, YEN C C, et al. Kefir peptides mitigate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through modulating oxidative stress, inflammation and gut microbiota [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116431.
- [83] LI J, WEI Q, SONG K, et al. Tangeretin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition via the PI3K/Akt pathway [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1247800.
- [84] HASHIMOTO N, PHAN S H, IMAIZUMI K, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced

- pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 43(2): 161–172.
- [85] PARK S J, RYU H W, KIM J H, et al. Daphnetin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and IL-17A [J]. *Cells*, 2023, 12(24): 2795.
- [86] GONG H, LYU X, LIU Y, et al. Eupatilin inhibits pulmonary fibrosis by activating Sestrin2/PI3K/Akt/mTOR dependent autophagy pathway [J]. *Life Sci*, 2023, 334: 122218.
- [87] JIANG H, ZHOU R, AN L, et al. Exploring the role and mechanism of Astragalus membranaceus and radix paeoniae rubra in idiopathic pulmonary fibrosis through network pharmacology and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 10110.
- [88] LIANG Y, YAN Y, LIU N, et al. Shengxian decoction improves lung function in rats with bleomycin-induced idiopathic pulmonary fibrosis through the inhibition of PANoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 329: 118153.
- [89] ZHANG X, DONG Y, LI W C, et al. Roxithromycin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting senescent cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(12): 2058–2068.
- [90] BAI X, ZHAO G, CHEN Q, et al. Inhaled siRNA nanoparticles targeting IL11 inhibit lung fibrosis and improve pulmonary function post-bleomycin challenge [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(25): eabn7162.
- [91] ZHENG D, GUO J, LIANG Z, et al. Supramolecular nanofibers ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by restoring autophagy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(28): e2401327.
- [92] YUAN Y, QIAO G, ZHOU J, et al. Integrated analysis reveals the protective mechanism and therapeutic potential of hyperbaric oxygen against pulmonary fibrosis [J]. *Genes Dis*, 2023, 10(3): 1029–1039.
- [93] YUAN Y, LI Y, QIAO G, et al. Hyperbaric oxygen ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 675437.
- [94] SUKUMAR C A, SHANBHAG V, SHASTRY A B. Paraquat: the poison potion [J]. *Indian J Crit Care Med*, 2019, 23(4): S263-S266.
- [95] 邵雪, 陈江华. 急性百草枯中毒导致肺纤维化的发生机制及治疗进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2014, 43(6): 717–727.
- SHAO X, CHEN J H. Progress on pathogenesis and treatment of paraquat-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2014, 43(6): 717–727.
- [96] ISHIDA Y, TAKAYASU T, KIMURA A, et al. Gene expression of cytokines and growth factors in the lungs after paraquat administration in mice [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2006, 8(2): 102–109.
- [97] LI Q, DENG M S, WANG R T, et al. PD-L1 upregulation promotes drug-induced pulmonary fibrosis by inhibiting vimentin degradation [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106636.
- [98] MAHMOUDI Z, KALANTAR H, MANSOURI E, et al. Dimethyl fumarate attenuates paraquat-induced pulmonary oxidative stress, inflammation and fibrosis in mice [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2023, 190: 105336.
- [99] SHEN H, WU N, WANG Y, et al. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 46: 16–22.
- [100] ZHAO Z, YANG X. Inhibition of SMYD2 attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition through the GLIPR2/ERK/p38 axis [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2024, 202: 105971.
- [101] TAI W, DENG S, WU W, et al. Rapamycin attenuates the paraquat-induced pulmonary fibrosis through activating Nrf2 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1759–1768.
- [102] CHEN H, CHEN Q, JIANG C M, et al. Triptolide suppresses paraquat induced idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting TGF β 1-dependent epithelial mesenchymal transition [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 284: 1–9.
- [103] CHEN J, JIAN X, LI C, et al. Therapeutic potential of amitriptyline for paraquat-induced pulmonary fibrosis: involvement of caveolin-1-mediated anti-epithelial-mesenchymal transition and inhibition of apoptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 254: 114732.
- [104] RASOOLI R, POURGHOLAMHOSEIN F, KAMALI Y, et al. Combination therapy with pirfenidone plus prednisolone ameliorates paraquat-induced pulmonary fibrosis [J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 134–142.
- [105] DEGRYSE A L, LAWSON W E. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Med Sci*, 2011, 341(6): 444–449.
- [106] YANAGIHARA T, CHONG S G, VIERHOUT M, et al. Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2020, 15(8): 931–941.
- [107] IBRAHIM FOUAD G, R MOUSA M. The protective potential of alpha lipoic acid on amiodarone-induced pulmonary fibrosis and hepatic injury in rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(9): 3433–3448.
- [108] SR M U S, SAPONE G, PLASTINA U R, et al. Amiodarone-induced lung toxicity: a case initially not correctly framed [J]. *Cureus*, 2023, 15(3): e36818.

- [109] ROTH F C, MULDER J E, BRIEN J F, et al. Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 204(3): 135–139.
- [110] PAPIRIS S A, TRIANTAFILLIDOU C, KOLILEKAS L, et al. Amiodarone: review of pulmonary effects and toxicity [J]. *Drug Saf*, 2010, 33(7): 539–558.
- [111] EL TABAA M M, EL TABAA M M, ELGHARABAWY R M, et al. Suppressing NLRP3 activation and PI3K/AKT/mTOR signaling ameliorates amiodarone-induced pulmonary fibrosis in rats; a possible protective role of nobilentin [J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(3): 1373–1386.
- [112] DAWOOD S A, ASSERI A A, SHATI A A, et al. L-carnitine ameliorates amiodarone-mediated alveolar damage: oxidative stress parameters, inflammatory markers, histological and ultrastructural insights [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(8): 1004.
- [113] GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE C F, SILVA A R, BURTH P, et al. Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 260465.
- [114] 郭琦琦, 李毅, 翁恒泽, 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.
- [115] LEUNG C C, YU I T S, CHEN W. Silicosis [J]. *Lancet*, 2012, 379(9830): 2008–2018.
- [116] CAO Z, SONG M, LIU Y, et al. A novel pathophysiological classification of silicosis models provides some new insights into the progression of the disease [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 202: 110834.
- [117] ZHANG L, TIAN J, MA L, et al. Mechanistic insights into severe pulmonary inflammation caused by silica stimulation: The role of macrophage pyroptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 258: 114975.
- [118] QU Y, ZHAI R, WANG D, et al. Mitochondrial folate pathway regulates myofibroblast differentiation and silica-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 365.
- [119] QIU M, QIN L, DONG Y, et al. The study of metabolism and metabolomics in a mouse model of silica pulmonary fibrosis based on UHPLC-QE-MS [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2022, 50(1): 322–330.
- [120] CHENG D, XU Q, WANG Y, et al. Metformin attenuates silica-induced pulmonary fibrosis via AMPK signaling [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 349.
- [121] VARTIAINEN V, RAULA J, BIMBO L M, et al. Pulmonary administration of a dry powder formulation of the antifibrotic drug tilorone reduces silica-induced lung fibrosis in mice [J]. *Int J Pharm*, 2018, 544(1): 121–128.
- [122] KAMP D W, LIU G, CHERESH P, et al. Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. the role of endoplasmic reticulum stress response [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(6): 892–901.
- [123] CHERESH P, KIM S J, HUANG L S, et al. The sphingosine kinase 1 inhibitor, PF543, mitigates pulmonary fibrosis by reducing lung epithelial cell mtDNA damage and recruitment of fibrogenic monocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5595.
- [124] CHERESH P, MORALES-NEBRED A L, KIM S J, et al. Asbestos-induced pulmonary fibrosis is augmented in 8-oxoguanine DNA glycosylase knockout mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52(1): 25–36.
- [125] 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.
- [126] COIN P G, OSORNIO-VARGAS A R, ROGGLI V L, et al. Pulmonary fibrogenesis after three consecutive inhalation exposures to chrysotile asbestos [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(5): 1511–1519.
- [127] SUI J, BOATZ J C, SHI J, et al. Loss of ANT1 increases fibrosis and epithelial cell senescence in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 69(5): 556–569.
- [128] CHERESH P, KIM S J, JABLONSKI R, et al. SIRT3 overexpression ameliorates asbestos-induced pulmonary fibrosis, mt-DNA damage, and lung fibrogenic monocyte recruitment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6856.
- [129] JABLONSKI R P, KIM S J, CHERESH P, et al. SIRT3 deficiency promotes lung fibrosis by augmenting alveolar epithelial cell mitochondrial DNA damage and apoptosis [J]. *FASEB J*, 2017, 31(6): 2520–2532.
- [130] LARSON-CASEY J L, GU L, KANG J, et al. NOX4 regulates macrophage apoptosis resistance to induce fibrotic progression [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(1): 100810.
- [131] ARROYO-HERNÁNDEZ M, MALDONADO F, LOZANO-RUIZ F, et al. Radiation-induced lung injury: current evidence [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1): 9.
- [132] JIN H, YOO Y, KIM Y, et al. Radiation-induced lung fibrosis: preclinical animal models and therapeutic strategies [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): 1561.
- [133] LUO J, LI P, DONG M, et al. SLC15A3 plays a crucial role in pulmonary fibrosis by regulating macrophage oxidative stress [J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31(4): 417–430.

- [134] TU J, CHEN X, LI C, et al. Nintedanib mitigates radiation-induced pulmonary fibrosis by suppressing epithelial cell inflammatory response and inhibiting fibroblast-to-myofibroblast transition [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(9): 3353–3371.
- [135] DADRICH M, NICOLAY N H, FLECHSIG P, et al. Combined inhibition of TGF β and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(5): e1123366.
- [136] CHEN I T, HUANG L T, CHEN C C, et al. Molecular mechanisms underlying hyperoxia-induced lung fibrosis [J]. *Pediatr Neonatol*, 2022, 63(2): 109–116.
- [137] 李燕飞, 胡长平, 李峰. 肺纤维化动物模型研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(2): 211–215.
- LI Y F, HU C P, LI F. Progress of research on animal models of pulmonary fibrosis [J]. *Med Sci J Cent South China*, 2016, 44(2): 211–215.
- [138] UCERO A C, BAKIRI L, ROEDIGER B, et al. Fra-2-expressing macrophages promote lung fibrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(8): 3293–3309.
- [139] EFERL R, HASSELBLATT P, RATH M, et al. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(30): 10525–10530.
- [140] TABELING C, WIENHOLD S M, BIRNHUBER A, et al. Pulmonary fibrosis in Fra-2 transgenic mice is associated with decreased numbers of alveolar macrophages and increased susceptibility to pneumococcal pneumonia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 320(5): L916–L925.
- [141] ZHANG J, CUI R, FENG Y, et al. Serotonin exhibits accelerated bleomycin-induced pulmonary fibrosis through TPH1 knockout mouse experiments [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 7967868.
- [142] KATO K, ZEMSKOVA M A, HANSS A D, et al. Muc1 deficiency exacerbates pulmonary fibrosis in a mouse model of silicosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(3): 1230–1235.

[收稿日期] 2024-09-29

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊)。征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。栏目设置包括研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等栏目。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、被《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》、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、中国生物医学期刊数据库等数据库收录。

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。文章正文字数在 5000 字左右。

投稿网址: <http://zggydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

王广龙,张锁. 苯酚胶浆在妇科疾病动物模型中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 770-778.

WANG G L, ZHANG S. Application of phenolic adhesive slurry in animal models of gynecological diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 770-778.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.014

苯酚胶浆在妇科疾病动物模型中的应用

王广龙,张锁*

(内蒙古医科大学中医学院,呼和浩特 010059)

【摘要】 苯酚胶浆造模法是一种在妇科疾病动物实验模型中广泛采用的造模技术。在构建盆腔炎、宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎、阴道炎等妇科疾病动物模型时,苯酚胶浆作为粘堵剂被注入大鼠子宫内,造成盆腔器官组织的化学性烧伤。这种烧伤会引起充血、水肿、炎性渗出、炎性粘连和阻塞,进而形成慢性炎症。此外,苯酚胶浆也被应用于复制中医妇科的动物模型,利用其腐蚀性和黏滞性,制作以湿瘀互结为基础证候的动物模型。该模型的成功建立,为研究妇科疾病的病理机制和治疗方法提供了关键的实验基础。

【关键词】 苯酚胶浆;妇科疾病;动物模型;中医证型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0770-09

Application of phenolic adhesive slurry in animal models of gynecological diseases

WANG Guanglong, ZHANG Suo*

(College of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China)

Corresponding author: ZHANG Suo. E-mail: Zhangsuo20052005@126.com

【Abstract】 The phenol glue modeling method is a widely used modeling technique in animal experimental models of gynecological diseases. Phenol glue is injected into the rat uterus as an adhesive agent, causing chemical burns to the pelvic organ tissues, to construct animal models of pelvic inflammatory disease, cervicitis, endometritis, salpingitis, vaginitis, and other gynecological diseases. The burns induce hyperemia, edema, inflammatory exudation, inflammatory adhesions, and blockages, leading to chronic inflammation. The corrosive and adhesive properties of phenol paste are also used to create animal models replicating gynecological diseases in traditional Chinese medicine, based on the syndrome of dampness and blood stasis. The successful establishment of the phenol glue model provides a crucial experimental basis for studying the pathological mechanisms and treatment method of gynecological diseases.

【Keywords】 phenolic paste; gynecological diseases; animal models; TCM syndrome and signs

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

【基金项目】 内蒙古自治区蒙医药协同创新中心科研项目 (MYXTPY202301), 内蒙古教育厅青年英才科技计划项目 (NJYT22022), 内蒙古自治区卫健委项目 (202201224), 名中医朱宗元教授验方配伍规律及作用机制研究创新团队 (20220922), 内蒙古自治区科技厅 (2020LH08017)。

Funded by Inner Mongolia Autonomous Region Mongolian Medicine Collaborative Innovation Center Scientific Research Project (MYXTPY202301), Inner Mongolia Education Department Young Elite Science and Technology Plan Project (NJYT22022), Inner Mongolia Autonomous Region Health Commission Project (202201224), Research Innovation Team on the Compatibility Rules and Mechanism of Action of the Proven Prescriptions of Professor Zhu Zongyuan, a Famous Traditional Chinese Medicine Doctor (20220922), Inner Mongolia Autonomous Region Science and Technology Department (2020LH08017).

【作者简介】 王广龙,男,在读博士研究生,研究方向:中蒙医诊断学。Email:guanglong0223@126.com

【通信作者】 张锁,男,博士,教授,研究方向:中蒙医诊断学。Email:Zhangsuo20052005@126.com

苯酚胶浆是一种由苯酚和其他成分混合制成的胶状化学物质。苯酚, 又称石炭酸, 是一种具有特殊气味的无色晶体, 是生产多种化工产品和中间体的重要原料。它也用作溶剂和消毒剂, 在医疗领域具有杀菌和防腐作用。苯酚胶浆可能用于科研实验或医疗治疗中, 以产生特定的炎症反应。

在科研实验中, 苯酚胶浆被用作化学性腐蚀剂, 模拟盆腔内器官组织的炎症反应和粘连。尽管其致炎机制与人类的生物性因子不同, 但病理结果相似, 因此适用于科学研究。苯酚胶浆还用于妇科疾病的动物模型研究, 包括宫颈炎、子宫内膜炎等多种炎症。

1 盆腔炎动物模型中苯酚胶浆的应用

盆腔炎, 也被称为盆腔炎性疾病, 是指生殖系统中女性上生殖道器官及其周围组织(子宫、输卵管、卵巢宫旁组织及盆腔腹膜)发生的炎症。炎症可局限于一个部位, 也可同时累及几个部位, 其中输卵管炎、输卵管卵巢炎最为常见。盆腔炎按照发病过程及临床表现可分为急性盆腔炎和慢性盆腔炎两类。

苯酚胶浆在盆腔炎的动物模型中, 多用于慢

性盆腔炎的动物模型, 选择的动物种类包括 SD 雌性大鼠^[1]、Wister 雌性大鼠^[2]、KM 雌性小鼠^[3], 其中选择 SD 雌性大鼠最多; 采用的造模方法使用了苯酚胶浆法^[1-8]、苯酚胶浆联合机械损伤^[5], 其中常用的是苯酚胶浆法; 具体操作方法大多采用开腹注射法^[1]、极少数采用阴道注射方法^[4]; 操作部位包括子宫体(子宫分岔处)^[5]、子宫角(一侧子宫)^[7]、输卵管^[9], 极少在输卵管部位操作; 有单侧(左或右)操作^[1,5-6]、双侧操作^[8], 单侧操作一般在子宫角, 即一侧子宫向卵巢方向缓慢注入苯酚胶浆; 双侧操作一般在子宫体, 即子宫分岔处进入宫腔内, 分别朝双侧卵巢方向缓慢注入苯酚胶浆。造模时间一般在 7 ~ 30 d^[1], 多数在 7 ~ 16 d^[6-7], 大部分是一次性注射, 持续观察。苯酚胶浆使用的剂量在 0.06 ~ 0.25 mL 不等。

在盆腔炎的动物模型中, 苯酚胶浆的主要成分包括多数采用苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水, 极少数使用苯酚、阿拉伯胶、甘油、蒸馏水或苯酚、羧甲基纤维素钠^[6-7]。苯酚胶浆的浓度一般在 15% ~ 30%, 多数采用 25% 的苯酚胶浆^[1,6-7]。(见表 1)。

苯酚胶浆在盆腔炎动物模型中的应用价值主要体现在其能够模拟盆腔炎的病理过程, 为相

表 1 苯酚胶浆在盆腔炎动物模型中的应用

Table 1 Application of phenolic adhesive in animal models of pelvic inflammatory disease

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animal	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	单侧、双侧 Unilateral, bilateral	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste concentration	造模时间 Modeling time
盆腔炎 Pelvic inflammatory disease	SD 雌性大鼠 SD female rat	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method	开腹注射 Laparotomy injection	子宫体 Uterine body	单侧 (左或右) Unilateral (left or right)	苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水 Phenol, tragacanth gum, glycerin, distilled water	15% ~ 30%	7 ~ 30 d
	Wister 雌性大鼠 Wister female rat	苯酚胶浆联合机械损伤法 Phenol resin adhesive combined with mechanical damage method	阴道灌注 Vaginal irrigation	子宫角 Uterine horn	双侧 Bilateral	苯酚、阿拉伯胶、甘油、蒸馏水 Phenol, gum arabic, glycerol, distilled water		
	KM 雌性小鼠 KM female mouse			输卵管 Fallopian tube		苯酚、羧甲基纤维素钠 Phenol, sodium carboxymethylcellulose		

关研究提供可靠的实验基础。在盆腔炎动物模型的制作中,苯酚胶浆通过化学性烧伤引起子宫内膜的炎症反应,模拟了盆腔炎的病理过程。实验证明,苯酚胶浆造模后,动物子宫壁会出现充血、粘连等病理变化,光镜下可观察到子宫内膜上皮及腺上皮细胞增生,大量淋巴细胞、浆细胞浸润,以及少量中性粒细胞等炎性细胞浸润,这些病理特征与人类的盆腔炎相似。

2 宫颈炎动物模型中苯酚胶浆的应用

宫颈炎是妇科常见疾病之一,主要发生在女性宫颈部位,是宫颈管黏膜及宫颈阴道部因损伤和病原体侵袭而引发的炎症。宫颈具有防止下生殖道病原体进入上生殖道的重要功能,但同时也容易受到同房、分娩及宫腔操作损伤,并且宫颈管单层柱状上皮抗感染能力较差,容易发生感染。

苯酚胶浆除了在盆腔炎动物模型中广泛应用外,在宫颈炎动物模型中的应用仍较多。选用的大鼠类型分别是 SD 雌性大鼠^[10]、Wister 雌性大鼠^[11];造模方法多是苯酚胶浆法,操作部位在阴道内 1 ~ 2 cm 处^[10]。具体方法为将注射针头尖端剪去,磨平,使头部光滑,用处理过的注射针头轻轻插入大鼠阴道深处约 1 ~ 2 cm 处,注入苯酚胶浆,为了防止苯酚胶浆外溢,一般会取棉球

固定阴道口,并保持大鼠倒立状态 5 min。此外,造模时间一般在 0.5 ~ 14 d,其中包括一次性注射和间歇性注射(1 d 1 次或 2 d 1 次)。

在宫颈炎的动物模型中,苯酚胶浆的主要成分包括多数采用苯酚、阿拉伯胶、甘油、蒸馏水^[12]和苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水^[13]。苯酚胶浆浓度一般在 20% ~ 37.5%,多数采用 25% 苯酚胶浆^[10-13]。苯酚胶浆使用剂量在 0.06 ~ 0.25 mL^[10-13]。(见表 2)。

苯酚胶浆在宫颈炎动物模型制作中具有显著的应用价值。与盆腔炎的造模方法相比,通过特定部位与特定的方法,可以成功诱导出宫颈炎的病理状态,这些病理变化与临床上宫颈炎患者的表现相似,使得苯酚胶浆制备的宫颈炎动物模型具有较高的模拟度和可靠性。

3 子宫内膜炎动物模型中苯酚胶浆应用

子宫内膜炎是指子宫内膜发生的炎症,一般由结核菌和病原菌感染所致,是育龄期女性常见的妇科疾病,属于盆腔炎性疾病范畴。

苯酚胶浆也可作为子宫内膜炎动物模型的一种方法^[14],选择的动物种类一般为 SD 雌性大鼠^[14]、Wister 雌性大鼠^[15];造模方法主要为苯酚胶浆法;操作方法有开腹宫内注射^[14]以及阴道灌注^[16];操作部位有子宫体、子宫角以及输卵

表 2 苯酚胶浆在宫颈炎动物模型中的应用

Table 2 Application of phenolic adhesive in animal models of cervicitis

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animal	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste concentration	造模时间 Modeling time
宫颈炎 Cervicitis	SD 雌性大鼠 SD female rat	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method	阴道灌注 Vaginal irrigation	阴道 1 ~ 2 cm Vaginal irrigation 1 ~ 2 cm	苯酚、阿拉伯 胶、甘油、蒸 馏水 Phenol, gum arabic, glycerol, distilled water	20% ~ 37.5%	0.5 ~ 14 d
	Wister 雌性大鼠 Wister female rat				苯酚、西黄蓍 胶、甘油、蒸 馏水 Phenol, tragacanth gum, glycerin, distilled water		

管^[14-19];以单侧操作较多,但其中有几篇文献未明确描述操作单侧双侧,如“各组大鼠每 2 d 向其阴道内注入 25% 苯酚胶浆 0.1 mL”“开腹后暴露双侧子宫,选用 4 号针头于子宫分叉处进入宫腔内,朝卵巢方向缓慢推注 0.05 mL 苯酚胶浆”^[16-18],因此不排除双侧操作的可能;造模时间

一般在 7 ~ 30 d^[14-19]。

在子宫内膜炎的动物模型中,苯酚胶浆的主要成分多数采用苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水^[14-18]和苯酚、生理盐水^[19]。苯酚胶浆的浓度一般在 15% ~ 25%,多数采用 25% 的苯酚胶浆。苯酚胶浆使用剂量在 0.04 ~ 0.15 mL^[14-19]。(见表 3)。

表 3 苯酚胶浆在子宫内膜炎动物模型中的应用

Table 3 Application of phenolic adhesive in animal models of endometritis

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animal	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	单侧、双侧 Unilateral, bilateral	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste concentration	造模时间 Modeling time
子宫内膜炎 Endometritis	SD 雌性大鼠 SD female rat	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method	开腹注射 Laparotomy injection	子宫体 Uterine body	单侧 (左或右) Unilateral (left or right)	苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水 Phenol, tragacanth gum, glycerin, distilled water	15% ~ 25%	7 ~ 30 d
				子宫角 Uterine horn				
	Wister 雌性大鼠 Wister female rat		阴道灌注 Vaginal irrigation	输卵管 Fallopian tube	双侧 Bilateral	苯酚、生理盐水 Phenol, saline solution		

4 宫腔粘连动物模型中苯酚胶浆应用

宫腔粘连是指子宫内壁粘连,使宫腔部分或者全部闭塞。正常的子宫宫腔是一个中空的腔体,子宫内膜覆盖在宫腔内表面,当子宫内膜受到损伤,如因手术操作、感染等导致子宫前后壁相互粘连在一起,就形成了宫腔粘连。

苯酚胶浆在宫腔粘连动物模型的应用中,选用的大鼠种类为 SD 雌性大鼠^[20-21];造模方法一般为苯酚胶浆法^[20-21],操作方法多选用开腹宫内注射^[20-21];注射部位分为子宫体或子宫角且多为单侧操作^[20-21];开腹宫内注射的具体操作,如:于下腹部正中和尿道上端约 1.00 cm 处切开皮肤,暴露子宫,选取一侧子宫,在一侧子宫及阴道上端连接处用 5-0 慕丝线缠绕标记,使用 4 号针头(微量注射器)在选取的一侧子宫腔进行轻柔注射,注射过程缓慢,从子宫远端向阴道方向涂抹或向卵巢方向缓慢注射,从而制备大鼠宫腔粘连的模型。

宫腔粘连的动物模型中,苯酚胶浆的主要成

分多数采用苯酚、阿拉伯树胶、甘油、蒸馏水^[20-21]。苯酚胶浆的浓度一般在 25%^[20-21]。苯酚胶浆使用的剂量在 0.04 mL^[20-21]。造模时间为 10 ~ 14 d^[20-21]。(见表 4)。

5 输卵管炎动物模型中苯酚胶浆应用

输卵管炎是指发生在输卵管部位的炎症性疾病,是女性常见的妇科疾病,多是由于病原体侵入输卵管或阴道、子宫、卵巢等邻近器官及盆腔周围组织炎症直接蔓延所致。

在研究输卵管炎时,研究者通常采用苯酚胶浆作为造模剂,并选择 SD 大鼠或特定品种的蛋鸡(如海兰灰、白莱航)作为实验动物^[22-23]。造模过程一般涉及苯酚胶浆的使用,而操作方法则倾向于通过开腹手术进行注射^[22-23]。注射部位通常位于输卵管或子宫角靠近输卵管的部分,且通常在动物的两侧进行操作^[22-23]。具体操作:开腹后,暴露子宫,采用 1 mL 注射器接 4 号针头分别在子宫角近输卵管处进针,向输卵管-卵巢方向缓慢注射苯酚胶浆,术毕,分层关腹。

表 4 苯酚胶浆在宫腔粘连动物模型中的应用

Table 4 Application of phenolic adhesive in animal models of intrauterine adhesions

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animal	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	单侧、双侧 Unilateral, bilateral	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste concentration	造模时间 Modeling time
宫腔粘连 Intrauterine adhesions	SD 雌性大鼠 SD female rat	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method	开腹注射 Laparotomy injection	子宫体 Uterine body 子宫角 Uterine horn	单侧 (左或右) Unilateral (left or right)	苯酚、阿拉伯胶、甘油、蒸馏水 Phenol, gum arabic, glycerol, distilled water	25%	10 ~ 14 d

输卵管的动物模型中,苯酚胶浆的主要成分多数采用苯酚、西黄耆胶、甘油、蒸馏水^[23]。苯酚胶浆的浓度一般在 25%^[23]。苯酚胶浆使用的剂量在 0.04 ~ 0.1 mL^[22-23]。SD 大鼠造模时间为 7 ~ 8 d^[23], 蛋鸡造模时间可 24 h^[22]。(见表 5)。

表 5 苯酚胶浆在输卵管炎动物模型中的应用

Table 5 Application of phenolic adhesive in animal models of salpingitis

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animal	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	单侧、双侧 Unilateral, bilateral	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste concentration	造模时间 Modeling time
输卵管炎 Salpingitis	SD 雌性大鼠 SD female rat					苯酚、西黄		7 ~ 8 d
	海兰灰蛋鸡 Hyland's Gray Laying hen	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method	开腹注射 Laparotomy injection	输卵管 Fallopian tube	双侧 Bilateral	耆胶、甘油、蒸馏水 Phenol, tragacanth gum, glycerin, distilled water	25%	24 h
	白莱航蛋鸡 White Lai Hang Laying hen							

苯酚胶浆在输卵管炎动物模型中具有独特应用,作为粘堵剂引发子宫内膜慢性炎症,模拟病理过程,成为构建模型的重要工具。

6 阴道炎动物模型中苯酚胶浆应用

阴道炎是指阴道的炎症,是外阴阴道症状如瘙痒、灼痛、刺激和异常流液的一组病症,可由各种原因引起,与感染、菌群失调、激素水平有关,常表现为阴道分泌物增多、瘙痒、白带异常。

在阴道炎动物模型中,研究者采用苯酚胶浆作为造模剂^[24],并选择 SD 雌性大鼠^[24]、Wister 雌性大鼠^[25]、新西兰雌性大耳兔^[26]。造模方法包括苯酚胶浆法^[27]或苯酚胶浆联合细菌法^[24]。以阴道灌注的方法进行操作,操作部位为阴道内

1 ~ 2 cm,也有在阴道宫颈内注射苯酚胶浆从而制作阴道宫颈炎的模型^[27]。具体方法为:用 1 mL 注射器轻轻插入大鼠阴道深处约 1 ~ 2 cm 处或阴道宫颈内,注入同时向外撤针,一般原位停留 1 ~ 2 min,防止液体溢出。新西兰大耳兔的阴道炎造模方法具体为:用 10 号导尿管于阴道深处约 6 cm 处,注入 25% 苯酚胶浆 0.5 mL,隔日 1 次,共 4 次^[26]。

阴道炎的动物模型中,苯酚胶浆的主要成分多数采用苯酚、阿拉伯胶、蒸馏水^[25],或者苯酚、甘油、羧甲基纤维素钠^[24]。苯酚胶浆的浓度一般在 8% ~ 37.5%。苯酚胶浆使用的剂量一般在 0.1 ~ 0.2 mL^[26]。造模时间为 1.5 ~ 9 d^[24-27]。(见表 6)。

表 6 苯酚胶浆在阴道炎动物模型中的应用

Table 6 Application of phenolic adhesive in animal models of vaginitis

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animals	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste Concentration	造模时间 Modeling time
阴道炎 Vaginitis	SD 雌性大鼠 SD female rat	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method			苯酚、阿拉伯胶、蒸馏水 Phenol, gum arabic, glycerol, distilled water		
	Wister 雌性大鼠 Wister female rat	苯酚胶浆联合细菌法 Phenol adhesive paste combined with bacterial method	阴道灌注 Vaginal irrigation	阴道 1 ~ 2 cm Vagina 1 ~ 2 cm	苯酚、甘油、羧甲基纤维素钠 Phenol, glycerol, sodium carboxymethylcellulose	8% ~ 37.5%	1.5 ~ 9 d
	新西兰雌性大耳兔 New Zealand female big eared rabbit						

7 输卵管阻塞动物模型中苯酚胶浆应用

输卵管阻塞是一种常见的妇科疾病。它指的是通往卵巢的输卵管被堵住或受阻,导致卵子无法穿过输卵管到达子宫内膜受精,从而不能受孕的情况。

在输卵管阻塞动物模型中^[28-29],研究者采用苯酚胶浆作为造模剂,并选择 SD 雌性大鼠和

Wister 雌性大鼠^[28-29]。造模方法包括苯酚胶浆法^[28-29]。以开腹注射的方法进行操作,操作部位为输卵管^[28-29]。具体方法为:开腹,暴露子宫,用 4 号针头距离卵巢 1 cm 处向卵巢方向缓慢推注苯酚胶浆,然后分层缝合腹腔^[28-29]。

输卵管阻塞的动物模型中,苯酚胶浆的主要成分多数采用苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水^[28-29]。苯酚胶浆的浓度一般在 25%^[28-29]。苯酚胶浆使用的剂量在 0.04 ~ 0.05 mL^[28-29]。SD 大鼠造模时间为 9 ~ 20 d^[28-29]。(见表 7)。

表 7 苯酚胶浆在输卵管阻塞动物模型中的应用

Table 7 Application of phenolic adhesive in animal models with fallopian tube obstruction

动物模型 Animal models	动物种类 Species of animals	造模方法 Modeling method	操作方法 Operation method	操作部位 Operational location	主要成分 Main components	苯酚胶浆浓度 Phenol resin paste concentration	造模时间 Modeling time
输卵管阻塞 Fallopian tube obstruction	SD 雌性大鼠 SD female rat	苯酚胶浆法 Phenol resin paste method	开腹注射 Laparotomy injection	输卵管 Fallopian tube	苯酚、西黄蓍胶、甘油、蒸馏水 Phenol, tragacanth gum, glycerin, distilled water	25%	9 ~ 20 d

8 中医证型动物模型中苯酚胶浆应用

苯酚胶浆在中医证型妇科疾病动物模型中具有显著的应用价值。首先,它作为一种化学性

腐蚀烧伤剂,能够模拟中医理论中的“血瘀”证,为研究活血化瘀、疏通胞脉等中医治疗方法提供了实验基础。其次,苯酚胶浆以苯酚、阿拉伯胶或西黄蓍胶、甘油等制备,具有湿邪的黏滞重浊的特性,影响津液输布代谢,从而导致水湿之邪

的生成。此外,由于瘀血已成,更加影响津液代谢,使得湿邪加重,反之影响血液运行,血瘀加剧,最终湿瘀互结的基础证候。

在妇科疾病动物模型中,苯酚胶浆常被用于制作盆腔炎、输卵管炎、子宫内膜炎及炎性粘连等病理变化。这些病理变化与中医理论中的癥瘕形成相似,多因气滞、血瘀、痰湿所致。苯酚胶浆造模能够导致大鼠或家兔等实验动物的生殖系统管道发生病理性阻塞,形成受精障碍,从而模拟中医证型中的相关妇科疾病。通过苯酚胶浆造模,可以观察到实验动物子宫颜色暗红、浆膜面肿胀充血、子宫重量增加、盆腔粘连等病理变化。镜下观察可见子宫粘连闭塞或扩张,子宫壁完全被破坏,失去原有正常形态,结构紊乱,模糊不清。这些病理变化与人类慢性盆腔炎等妇科疾病相似,具有较好的代表性。

基于苯酚胶浆制作湿瘀互结的基础证候,可以增加或改变目的证候,如湿热瘀结型、寒凝血瘀型等。湿热瘀结型,在苯酚胶浆法制作动物模型的基础之上,增加饮食(如高脂高糖饮食、油脂、白酒)和环境因素^[30](相对湿度的人工恒温恒湿气候箱),以苯酚胶浆制作盆腔局部的湿瘀环境,以饮食加环境因素改变大鼠体质为湿热体质,以局部加整体的造模方法维持并提高湿热瘀结证型的成熟度。

此外,单纯应用苯酚胶浆法或脂多糖诱导也可以制作湿热瘀结的动物模型^[30]。由于苯酚胶浆制作湿瘀互结的基础证候,湿邪、瘀血久郁化热、与中医“内生无邪”中的“邪郁化火”相符,为了增加热邪形成的可能性,可以增加环境温度来提高中医证型的成熟率^[31]。

9 总结

苯酚胶浆法是一种在妇科病动物实验模型中常用的造模方法。该方法利用苯酚胶浆作为化学性腐蚀烧伤剂,通过注射到动物体内特定部位,引发炎症反应,从而模拟人类妇科病的病理过程。在盆腔炎、宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎、阴道炎等妇科病动物模型中,苯酚胶浆被用作粘堵剂,通过注射到大鼠的子宫内,造成子宫内膜的化学性烧伤。选择的动物种类多数为 SD 雌性大鼠,苯酚胶浆浓度大多在 25% 左右,操作方法

与部位因疾病的不同而稍有差异,因此在进行相关实验时应严格区分不同疾病造模之间的方法。此外,苯酚胶浆还被用于复制中医妇科的动物模型。利用苯酚胶浆的腐蚀性和黏滞性,从而制作湿瘀互结为基础证候的动物模型。

苯酚胶浆法在妇科病动物实验模型中的应用具有重要意义。首先,该方法能够模拟人类妇科病的病理过程,为研究妇科病的发病机制和治疗方法提供了重要的实验平台。其次,通过动物实验模型的构建,可以筛选出有效的治疗药物和方法,为临床治疗提供科学依据。最后,该方法还可以用于评价药物的疗效和安全性,为新药研发提供重要支持。随着该方法的不断完善和发展,相信将为妇科病的研究和治疗提供更加有力的支持。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李静,余涛,齐耀群,等. 三黄四物汤不同溶剂提取物的抗炎作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 2024-2031.
LI J, YU T, QI Y Q, et al. Anti-inflammatory effects of extracts from Sanhuang-Siwu-Tang in different solvents [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2024, 44(11): 2024-2031.
- [2] 余晓晖,邵晶,王志旺,等. 复方当归妇微灌肠剂抗炎镇痛作用研究[J]. 解放军药学报, 2018, 34(4): 301-304, 312.
YU X H, SHAO J, WANG Z W, et al. Anti-inflammatory and analgesic effect of compound angelica fuyan micro Enema [J]. Pharm J Chin PLA, 2018, 34(4): 301-304, 312.
- [3] 余晓晖,王志旺,邵晶,等. 复方当归妇微灌肠剂的抗炎作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(2): 88-93.
YU X H, WANG Z W, SHAO J, et al. Research of the anti-inflammatory effect and mechanism of compound Angelica fuyan micro-Enema [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2018, 34(2): 88-93.
- [4] 李瑶,杨倩,蔺瑞,等. 飞扬肠胃炎胶囊对盆腔炎性后遗症大鼠的治疗作用及机制探讨[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 153-157.
LI Y, YANG Q, LIN R, et al. The effect of Feiyangchangweiyan capsules on sequelae of pelvic inflammatory disease in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2017, 33(5): 153-157.
- [5] 朱玉莹,包晓霞,宗春晓,等. 丹白颗粒对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2023, 24(6): 629

- 633.
- ZHU Y Y, BAO X X, ZONG C X, et al. Mechanism of Danbai Granule in the treatment of sequelae of pelvic inflammatory disease in rats based on TLR4/MyD88/NF- κ B p65 signaling pathway [J]. Chin J Clin Obstet Gynecol, 2023, 24(6): 629-633.
- [6] 宋路瑶, 施婷婷, 马云, 等. 菝葜总黄酮对慢性盆腔炎大鼠的保护作用研究 [J]. 现代医药卫生, 2024, 40(5): 727-734, 740.
- SONG L Y, SHI T T, MA Y, et al. Protective effect of total flavonoids of Sarsaparilla on chronic pelvic inflammatory disease in rats [J]. J Mod Med Health, 2024, 40(5): 727-734, 740.
- [7] 龙茜, 余阳祺, 冯睿, 等. 从铁死亡角度探讨盆炎丸治疗盆腔炎后遗症的作用机制 [J]. 广西医学, 2024, 46(7): 1057-1066.
- LONG X, YU Y Q, FENG R, et al. Mechanism of Penyan Pills for the treatment of sequelae of pelvic inflammatory disease from the perspective of ferroptosis [J]. Guangxi Med J, 2024, 46(7): 1057-1066.
- [8] 邓蒂斯, 黄叶芳, 龚道银. 银甲片对盆腔炎性疾病大鼠模型炎性因子及输卵管纤毛形态的影响研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2022, 45(2): 69-74.
- DENG D S, HUANG Y F, GONG D Y. Study of Yinjia tablet regulating inflammatory factors and oviductal Cilia morphology in rats with pelvic inflammatory disease [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2022, 45(2): 69-74.
- [9] 吴大章, 苏泰安, 代华均, 等. 金刚藤多糖对大鼠慢性盆腔炎的治疗作用及对血清免疫球蛋白的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 127-129.
- WU D Z, SU T A, DAI H J, et al. Therapeutic effect of clematis montana polysaccharides on chronic pelvic inflammatory disease in rats and its influence on serum immunoglobulins [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2015, 31(4): 127-129.
- [10] 刘鑫, 李华, 齐磊, 等. 重组胶原蛋白妇科凝胶对大鼠宫颈炎的治疗作用 [J]. 生物技术进展, 2024, 14(1): 42-47.
- LIU X, LI H, QI L, et al. Therapeutic effect of recombinant collagen gynecological gel on cervicitis in rats [J]. Curr Biotechnol, 2024, 14(1): 42-47.
- [11] 宋凤媛, 阚默, 董坤园, 等. 治糜康栓对宫颈炎模型大鼠 IL-1 β 、EGFR 及 TNF- α 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2373-2376.
- SONG F Y, KAN M, DONG K Y, et al. Effect of Zhimikangshuan on the expression of IL-1 β , EGFR and TNF- α in cervicitis model rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(10): 2373-2376.
- [12] 张赫林, 龚春香, 赵解南, 等. 基于 Nrf2/HO-1 通路探讨二十五味鬼臼丸对宫颈炎大鼠的治疗作用及机制 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(12): 2608-2616.
- ZHANG H L, GONG C X, ZHAO J N, et al. Study on therapeutic effects and mechanism of Ershiwuwei Guijiu pills on cervicitis rats based on Nrf2/HO-1 pathway [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(12): 2608-2616.
- [13] 李思琪, 王飘, 郭媛媛, 等. 龙血竭温敏凝胶对宫颈炎模型大鼠炎症的修复作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2023, 42(9): 600-605.
- LI S Q, WANG P, GUO Y Y, et al. Repair effect of resina draconis temperature-sensitive gel on inflammation in cervicitis model rats [J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2023, 42(9): 600-605.
- [14] 魏桢楠, 柴守辉, 王福萍, 等. 雷公藤红素调节 HMGB1/RAGE 信号通路对子宫内膜炎大鼠炎症反应的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(12): 2518-2524.
- WEI Y N, CHAI S H, WANG F P, et al. Influence of celastrol on inflammatory response in endometritis rats by regulating HMGB1/RAGE signaling pathway [J]. Chin J Immunol, 2024, 40(12): 2518-2524.
- [15] 黄敏, 王林. 金英胶囊对盆腔炎大鼠模型子宫内膜炎症和炎性粘连的作用 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(14): 20-23.
- HUANG M, WANG L. The effect of jinying capsule on the endometritis and inflammatory adhesion of the pelvic inflammation rat model [J]. Asia Pac Tradit Med, 2016, 12(14): 20-23.
- [16] 王玲玲, 崔亚茹, 陈兰英, 等. 白头翁皂苷 B₄ 对慢性子宫内膜炎大鼠的治疗作用及其相关因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 54-60.
- WANG L L, CUI Y R, CHEN L Y, et al. Therapeutic effect of anemoside B₄ on chronic endometritis in rats and its related factors [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(15): 54-60.
- [17] 邵锐锋, 王莹, 曾丽, 等. 欧前胡素通过抑制 NLRP3 炎性通路改善大鼠慢性子宫内膜炎症 [J]. 免疫学杂志, 2023, 39(10): 865-871.
- SHAO R F, WANG Y, ZENG L, et al. Imperatorin alleviates chronic endometrial inflammation by inhibiting the NLRP3 inflammatory pathway in rats [J]. Immunol J, 2023, 39(10): 865-871.
- [18] 谢昕, 王嘉伟, 赵蕴肖, 等. 阿托伐他汀对慢性子宫内膜炎大鼠的治疗作用及其机制研究 [J]. 中国临床新医学, 2022, 15(3): 213-217.
- XIE X, WANG J W, ZHAO Y X, et al. A study on the therapeutic effect of atorvastatin on chronic endometritis in rats and its mechanisms [J]. Chin J New Clin Med, 2022, 15(3): 213-217.
- [19] 乌恩岳苏, 杨晓燕. 蒙药苏格木勒-7 通过抑制 TLR4/NF-

- κ B 通路减轻子宫内膜炎大鼠炎症反应 [J]. 中国医科大学学报, 2024, 53(9): 845-852.
- WU E Y S, YANG X Y. Mongolian medicine sugemule-7 alleviates inflammatory response in rats with endometritis by inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway [J]. J Chin Med Univer, 2024, 53(9): 845-852.
- [20] 杨雅媚, 何浩, 王文平, 等. 自交联透明质酸钠凝胶对大鼠宫腔粘连形成的预防作用及对 NF- κ B 相关因子的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(6): 1257-1262.
- YANG Y M, HE H, WANG W P, et al. Preventive effect of self-crosslinking sodium hyaluronate gel on intrauterine adhesion formation in rats and its influence on NF- κ B related factors [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(6): 1257-1262.
- [21] 李从青. CXCL5 和 MMP-9 在宫腔粘连子宫内纤维化中的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学; 2020.
- LI C Q. The expression of CXCL5 and MMP-9 in endometriu of intrauterine adhesions and the mechanism of endometrial fibrosis were preliminarily study [D]. Hefei: Anhui Medical University; 2020.
- [22] 吴丽飞, 史自强, 赵鹏宇, 等. 甜叶菊异绿原酸对海兰灰蛋鸡输卵管炎的治疗作用研究 [J]. 中国家禽, 2022, 44(9): 47-52.
- WU L F, SHI Z Q, ZHAO P Y, et al. Therapeutic effect of isochlorogenic acid on salpingitis in hy-line grey laying hens [J]. Chin Poult, 2022, 44(9): 47-52.
- [23] 申旭霁, 郑蕾, 陈玉龙, 等. 新工艺妇炎舒对大鼠慢性输卵管炎治疗作用的研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(4): 24-27.
- SHEN X J, ZHENG L, CHEN Y L, et al. Therapeutic effects of the new process fuyanshu on chronic salpingitis of rats [J]. Res Pract Chin Med, 2016, 30(4): 24-27.
- [24] 车玉林, 卢倩, 马云涛, 等. 康复新栓对慢性阴道炎大鼠血清 MDA、SOD 及组织 PGE2 的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 9-13.
- CHE Y L, LU Q, MA Y T, et al. Effect of kangfuxin suppository on serum MDA, SOD and tissue PGE2 in rats with chronic vaginitis [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(1): 9-13.
- [25] 石菊, 于艳辉, 徐建, 等. 消糜栓对非特异性阴道炎的治疗机制研究 [J]. 黑龙江中医药, 2017, 46(6): 47-49.
- SHI J, YU Y H, XU J, et al. Study on the therapeutic effect of Xiaomishuan on nonspecific vaginitis [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2017, 46(6): 47-49.
- [26] 于艳辉, 石菊, 许艳茹, 等. FK1 栓对实验性阴道炎的抗炎作用 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 214-217.
- YU Y H, SHI J, XU Y R, et al. Anti-inflammatory effects of FK1 suppository in vaginitis [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2012, 28(5): 214-217.
- [27] 赵媛. 绿茶提取物对大鼠阴道及宫颈炎症的治疗作用 [J]. 黑龙江农业科学, 2015(8): 67-69.
- ZHAO Y. Therapeutic effect of green tea extract on vaginal and cervical inflammation in rats [J]. Heilongjiang Agric Sci, 2015(8): 67-69.
- [28] 李林璐, 陈悦, 赵维哲, 等. 天台乌药散对输卵管的影响 [J]. 中医药信息, 2016, 33(6): 31-35.
- LI L L, CHEN Y, ZHAO W Z, et al. Effect of Tiantai Wuyao San on fallopian tube [J]. Inf Tradit Chin Med, 2016, 33(6): 31-35.
- [29] 成自霞. 针刺对输卵管阻塞性不孕症大鼠炎症因子和免疫机制的调节研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学; 2014.
- CHENG Z X. To research the inflammatory cytokines and immune mechanisms of tubal obstruction infertility rats by effects of acupuncture [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine; 2014.
- [30] 朱玉莹. 基于 TLR4/p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路探讨丹白颗粒治疗湿热瘀结型 SPID 作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2023.
- ZHU Y Y. Exploring the Mechanism of danbai granules in treating damp-heat stasis type of SPID based on TLR4/p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2023.
- [31] 郑洪新, 杨柱. 中医基础理论 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2021.
- ZHENG H X, YANG Z. Basic theories of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine; 2021.

[收稿日期] 2025-01-14