

陈炎森,林浩伟,张予菲,等. 月桂酸钠诱导脑小血管病大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 779-789.

CHEN Y S, LIN H W, ZHANG Y F, et al. Establishment and evaluation of a rat model of cerebral small vessel disease induced by sodium laurate [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 779-789.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.001

月桂酸钠诱导脑小血管病大鼠模型的建立与评价

陈炎森^{1#}, 林浩伟^{1#}, 张予菲², 林雨星¹, 曹长源¹, 赖可欣³,
吴钰婷³, 蔡巧燕^{1,4*}, 张铃^{1,4*}

(1. 福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院,福州 350122;2. 陕西学前师范学院
生命科学与食品工程学院,西安 710100;3. 福建中医药大学中医学院,福州 350122;
4. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室,福州 350122)

【摘要】 目的 通过颈内动脉单侧、单次注射月桂酸钠,建立脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)大鼠模型,并通过检测行为学、血清相关指标、脑梗死体积、脑微血管密度、血流动力学、脑组织病理学及血脑屏障相关指标,评估模型的有效性。**方法** 将SPF级雄性SD大鼠随机分为对照组(Control组)和模型组(Model组),每组6只。模型组经颈内动脉,单次注射100 μL的月桂酸钠(2 g/L),对照组行相同手术,注射等体积的生理盐水。利用Longa评分及姿势反射实验进行大鼠神经行为学评估;ELISA检测大鼠血清同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)含量;核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)检测脑梗死体积、脑血管成像观察脑血管密度改变;超声检测颈动脉血管阻力指数(resistance index, RI)及血流灌注指数(perfusion index, PI);苏木素-伊红(HE)染色观察大脑组织病理变化;免疫组化(IHC)检测脑组织中脑微血管密度CD31及紧密连接蛋白(ZO-1、Occludin)的表达。**结果** 与对照组相比,模型组Longa评分与姿势反射评分均显著升高($P < 0.05$),脑梗死体积显著增加($P < 0.05$),脑血管密度明显下降,颈动脉RI、PI值及血清中HCY的含量均显著升高($P < 0.05$);HE染色结果发现模型组的脑皮质区神经元核固缩,血管周围间隙变大;免疫组化结果显示脑皮质区CD31、ZO-1、Occludin的表达显著减少($P < 0.05$)。**结论** 通过颈内动脉单侧、单次注射高浓度月桂酸钠可以快速、有效地建立CSVD模型;该方法建立的CSVD大鼠模型,存在神经行为学异常、脑梗死、脑供血不足、血管密度减少和血脑屏障破坏现象,可作为CSVD研究的有效动物模型。

【关键词】 脑小血管病;动物模型;血脑屏障;同型半胱氨酸;CD31

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0779-11

Establishment and evaluation of a rat model of cerebral small vessel disease induced by sodium laurate

【基金项目】 国家自然科学基金(82374282),福建省自然科学基金(2022J01876, 2022J01875),国家级大学生创新创业训练计划项目(202310393006),福建中医药大学青年科技创新培育计划项目(XQC2024004)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (82374282), Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01876, 2022J01875), National Innovation and Entrepreneurship Training Programme Project for College Students (202310393006), Fujian University of Traditional Chinese Medicine Youth Science and Technology Innovation Cultivation Program (XQC2024004).

【作者简介】 陈炎森,男,在读本科生,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:1467919312@qq.com;

林浩伟,男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:1437439469@qq.com。

#共同第一作者

【通信作者】 蔡巧燕,女,博士,正高级实验师,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:cqy2005899@163.com;

张铃,女,博士,副研究员,研究方向:中西医结合防治心脑血管病。Email:remona1986@126.com。

* 共同通信作者

CHEN Yansen^{1#}, LIN Haowei^{1#}, ZHANG Yufei², LIN Yuxing¹, CAO Changyuan¹, LAI Kexin³,
WU Yuting³, CAI Qiaoyan^{1,4*}, ZHANG Ling^{1,4*}

(1. College of Integrative Medicine/Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. College of Life Sciences and Food Engineering, Shanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710100, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 4. Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China)

Corresponding author: CAI Qiaoyan. E-mail: cqy2005899@163.com;

ZHANG Ling. E-mail: remona1986@126.com

【Abstract】 Objective A rat model of cerebral small vessel disease (CSVD) was established by unilateral injection of a single dose of sodium laurate into the internal carotid artery. The effectiveness of the model was assessed by behavior scoring and analysis of serum-related indicators, cerebral infarction volume, cerebral microvascular density, hemodynamics, brain histopathology and the expression of blood-brain barrier (BBB)-related proteins. **Methods** SPF-grade male SD rats were divided randomly into a control group and a model group ($n = 6$ per group). The model group received a single injection of 100 μ L of sodium laurate (2 g/L) via the internal carotid artery, while the control group underwent the same surgical procedure but received an equal volume of saline. Neurobehavioral assessments were conducted using the Longa score and postural reflex test. Serum homocysteine (HCY) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Cerebral infarction volume was detected by magnetic resonance imaging and changes in cerebral vascular density were observed by cerebrovascular imaging. The resistance index (RI) and perfusion index (PI) were measured by ultrasonography. Histopathological changes in brain tissue were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Expression of the cerebral microvascular marker CD31 and tight junction proteins ZO-1 and Occludin in brain cortex tissue were detected by immunohistochemical staining. **Results** The Longa score, postural reflex score ($P < 0.05$), and cerebral infarction volume were significantly increased ($P < 0.05$) while the cerebral vascular density was decreased in the model group compared with the control group. Serum HCY levels, carotid RI, and PI values were all significantly increased in the model group ($P < 0.05$). HE staining revealed solidified neuronal nuclei and enlarged perivascular spaces in the brain cortex in the model group. Immunohistochemical staining revealed that CD31, ZO-1, and Occludin expression were significantly reduced in the brain cortex in the model group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** A rat model of CSVD can be established rapidly and effectively by a single unilateral injection of high-concentration sodium laurate via the internal carotid artery. This model is characterized by neurobehavioral abnormalities, cerebral infarction, insufficient cerebral blood supply, reduced vascular density, and disruption of the BBB, suggesting that it may serve as an effective rat model for the study of CSVD.

【Keywords】 cerebral small vessel disease; animal model; blood-brain barrier; homocysteine; CD31
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑小血管病 (cerebral small vessel disease, CSVD) 是由于颅内微小血管的动态弥漫性病变所致的脑微血管疾病, 是脑卒中和血管性痴呆的主要病因, 具有高隐匿性、高发病率、高致残率等特点^[1]。该疾病的隐匿性强, 对脑部的损害又不及脑卒中迅速且明显, 临床上往往难以发现而进展为更严重的脑卒中和血管性痴呆等脑部疾病^[2]。近年来, CSVD 逐渐成为国内外学者研究的热点, 但目前关于该疾病的动物模型尚不成

熟, 缺乏统一性。若能模拟 CSVD 的病理发展进程与疾病临床特点, 对于该病发病机理研究和相关治疗方法的探索及治疗药物的研发具有重要的理论与现实意义。

目前有 4 种常见的 CSVD 动物模型: 低灌注损伤^[3]、高血压相关性^[4]、基因修饰相关^[5] 和微小栓子栓塞^[6]。以上 4 种造模方式虽能够造成脑组织影像学以及神经行为学改变, 但存在不同程度的靶器官 (如肾等) 功能损害、微梗死的偶发

性、造模周期长、价格昂贵以及操作复杂性、难以全面推广等缺点。

研究发现,脑小血管病与低灌注^[7]、内皮功能障碍及血脑屏障破坏^[8]、组织间液回流障碍^[9]、炎症反应和遗传因素^[7]等相关。而颅内小血管内皮损伤在脑白质的缺血损伤中扮演着重要角色,是 CSVD 发病机制的重要环节^[10]。月桂酸钠因其对血管内皮具有强烈的损伤作用,可造成内皮细胞脱落,常常被用于构建外周动脉血栓模型^[11-12]。因此,本研究通过对大鼠进行颈内动脉单侧、单次注射月桂酸钠,创建一个快速、经济、易推广的 CSVD 动物模型,并通过检测大鼠的行为学、血清相关指标、脑梗死体积、脑微血管密度、血流动力学、脑组织病理学及血脑屏障完整性等指标,系统评估模型的有效性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只体质量为 (260 ± 20) g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠,7 ~ 8 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(京)2019-0008】,于福建中医药大学动物实验中心【SYXK(闽)2019-0007】饲养。饲养条件为室温:20 ~ 26 °C,相对湿度:45% ~ 60%,12 h 明暗交替,采用自由饮水和进食方式进行喂养。所有动物饲养及其他实验操作均符合相关管理要求准则及实验动物伦理要求,本研究中所有实验动物操作均按照《实验动物护理与使用指南》指导进行,并经福建中医药大学动物伦理委员会批准(FJTCM IACU 2023080)。

1.1.2 主要试剂与仪器

月桂酸钠(批号:CSN51476,购自美国 CSNpharm 公司);苏木素-伊红(HE)染液(批号:分别为 G1140、G1100,购自北京索莱宝科技有限公司);免疫组化试剂盒和 DAB 染色液(批号分别为 KIT-9720、DAB-0031,购自福州迈新生物技术开发有限公司);ZO-1 和 Occludin(批号分别为 61-7300、33-1500,购自美国 Invitrogen 公司);CD31(批号:AB222783,购自 Abcam 公司);HCY(批号:MM-0293R2,购自江苏酶免实业有限公司)。

超高分辨率小动物超声成像系统(型号:

Vevo2100,加拿大 Visual Sonics 公司);小动物核磁共振成像仪(型号:BioSpec70/20USR,德国 BRUKER 公司);生物组织自动脱水机、生物组织石蜡包埋机、生物组织摊烤机(型号分别为 ZT-12P2、YB-9LF、YT-7FB,湖北孝感亚光医用电子技术有限公司);全自动石蜡切片机(型号:RM2265,德国 Leica 公司);光学显微镜(型号:DM300,德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 CSVD 模型的构建

小鼠适应性喂养 1 周后,进行造模。采用颈内动脉注射月桂酸钠溶液制备大鼠 CSVD 模型:大鼠通过腹腔注射 2%戊巴比妥钠进行麻醉,剂量为 0.2 mL/100 g,术中监测呼吸和心跳等重要生命体征,呈仰卧位固定,剃去手术区域毛发,75%乙醇消毒,沿大鼠颈部中线剪开,钝性分离出颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA)。结扎 CCA 和 ECA,并将 ICA 用动脉夹夹闭。在 CCA 近心端处剪一小口,PE50 导管插入 CCA,向前插入至 ICA,缓慢注入 100 μ L 的月桂酸钠溶液(月桂酸钠与 0.9%的氯化钠溶液充分溶解,配制成 2 g/L 剂量)。对照组,行相同手术,注入等体积的生理盐水。模型组选用 10 只 SD 大鼠进行手术,根据 MRI 结果,造模成功且存活下来用于实验的有 6 只。死亡原因可能与以下因素有关:梗死灶面积过大(2 只,可能与穿刺过深、注射速度过快导致血管损伤或栓塞风险增加有关)、操作时间过久(1 只,长时间的手术应激和创口暴露,导致机体代谢紊乱、感染风险增加,进而使器官功能受损)、麻醉过量(1 只,直接导致大鼠死亡)。此外,个体差异、血管状态及注射位置等因素也可能影响实验结果。另取 6 只作为对照组。

1.2.2 神经行为学评分

于实验第 1、3、5 天分别用大鼠神经受损评分(Longa 评分)及姿势反射实验对两组大鼠进行神经行为学评估。

Longa 评分标准:0 分,无症状;1 分,提尾时损伤对侧前肢不能伸直;2 分,向损伤侧旋转;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识不清。

姿势反射实验:距地面 1 m 提起鼠尾,通过观

察其双前肢的姿势进行评分。无神经功能缺损者为 0 分,表现为双前肢完全伸展;轻度神经功能缺损者为 1 分,表现为左前肢贴向前胸;重度神经功能缺损者为 2 分,除有 1 分的表现外,其上半身卷曲。

1.2.3 ELISA 检测大鼠血清同型半胱氨酸 (homocysteine, HCY) 含量

准备试剂,样品和标准品,将样品和标准品加入到相应的孔中,37 °C 反应 30 min,取出酶标板,洗板 5 次,加入酶标抗体,37 °C 反应 30 min,取出酶标板,洗板 5 次,加入显色液 A、B,37 °C 避光显色 10 min,加入终止液终止反应,用酶标仪测定各孔的吸光度值,根据标准曲线计算大鼠血清中 HCY 的含量。

1.2.4 小动物核磁共振扫描计算脑梗死体积

使用 7.0 T 小动物核磁共振成像仪 (magnetic resonance imaging, MRI) 进行扫描。首先,用异氟烷麻醉大鼠,在扫描过程中,监测呼吸和心跳等重要生命体征,大鼠以俯卧位固定,并用水循环加热维持体温,随时检测。进行定位扫描和 T2 加权成像扫描。具体扫描参数如下: T2WI 是弛豫增强快速采集 (RARE) 序列、重复时间 (repetition time, TR) = 2500 ms、回波时间 (echo time, TE) = 33 ms、厚度 0.8 mm、层间隔 0 mm、视野 (field of view, FOV) = 30 mm × 30 mm、矩阵 256 × 256、翻转角度 (angle of flip, FA) 180°, 扫描时间为 5 min 23 s。梗死灶体积 = 各层面梗死区域面积之和/各层面脑片面积之和 × 100%。

1.2.5 血管成像

采用 7.0 T 小动物 MRI 扫描进行 3D-TOF 核磁共振血管成像。首先,用异氟烷麻醉大鼠,在扫描过程中,监测呼吸和心跳等重要生命体征,大鼠以俯卧位固定,并用水循环加热维持体温,随时检测。具体扫描参数如下: TR = 15 ms, TE = 2.7 ms, FOV = 30 mm × 30 mm × 24 mm, 采集次数 = 1, 层数 = 1, 层厚 = 24 mm, 扫描时间为 5 min 5 s 280 ms。

1.2.6 小动物超声检测大鼠颈总动脉血流动力学改变

用异氟烷麻醉大鼠后,去除颈部、胸部及腹部毛发,采用彩色多普勒小动物超声诊断仪观察 2 组大鼠颈总动脉超声影像,使用 Vevo Lab

(3.1.0) 软件对数据进行分析,并分析左侧颈总动脉每个心动周期速度时间积分 (velocity time integral, VTI), 以及相应收缩末期流速 (peak systolic velocity, PSV)、舒张末期流速 (end diastolic velocity, EDV) 等,并通过上述检测,仪器自动计算颈动脉血管阻力指数 (resistance index, RI) 及血流灌注指数 (perfusion index, PI)。每个指标测量 5 次,取平均值。

1.2.7 HE 染色法观察缺血侧大脑皮质区病理变化

2%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉,剂量为 0.2 mL/100 g,心脏灌注生理盐水和 4%多聚甲醛。待大鼠肢体僵硬后迅速取脑,将脑组织置于 4%多聚甲醛中先固定 2 h,随后取出切为 3 等分,继续固定 24 h 后切换至 75%乙醇中;随后使用生物组织自动脱水机进行梯度乙醇脱水;梯度脱水完成后进行石蜡包埋和切片。使用石蜡切片机将石蜡块切成厚度为 4 μm 切片,脱蜡复水,室温下进行 HE 染色,中性树脂封片并拍照。

1.2.8 免疫组化法检测各组大鼠缺血侧脑皮质区 CD31、ZO-1 及 Occludin 的表达

4 μm 石蜡切片脱蜡复水后进行抗原修复,免疫组化笔圈出组织,0.3% Triton 破膜,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,滴加封闭液,分别用 CD31、ZO-1、Occludin (抗体稀释比例均为 1:200) 4 °C 孵育过夜,二抗 (抗体稀释为 1:200) 室温孵育 1 h,滴加链霉素。DAB 染色,苏木素染核,树脂封片并拍照,采用 Image J 1.51j8 软件分析系统对阳性区域进行半定量分析。

1.3 统计学分析

所有实验结果均使用 SPSS (Ver. 22.0) 软件进行统计分析,实验结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组数据间比较,符合正态分布且方差齐的,采用单因素方差 (ANOVA) 分析。若不符合正态性分布,则需使用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 CSVD 大鼠行为学的变化

为了评估 CSVD 大鼠的神经行为学的损伤,通过 Longa 评分与姿势反射实验评分对两组大鼠进行动态监测,结果见表 1,表 2。对照组大鼠在

单侧颈内动脉注射生理盐水后生命活动正常,双上肢完全伸展;而模型组在单侧颈内动脉注射月桂酸钠后,于术后的第 1、3、5 天均发生不同程度左前肢贴向前胸,提尾时向左侧旋转等姿势步态平衡障碍等表现。模型组的 Longa 评分与姿势反射实验评分均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

表 1 两组大鼠 Longa 评分对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Comparison of Longa scores between two groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 3 天 Day 3	第 5 天 Day 5
对照组 Control group	0.00	0.00	0.00
模型组 Model group	2.33 ± 0.52*	1.8 ± 0.45*	1.75 ± 0.50*

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

表 2 两组大鼠姿势反射评分对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of postural reflex scores between two groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 3 天 Day 3	第 5 天 Day 5
对照组 Control group	0.00	0.00	0.00
模型组 Model group	2.50 ± 0.55*	2.00 ± 0.71*	1.75 ± 0.50*

2.2 CSVD 大鼠血清中 HCY 含量的变化

HCY 通过生成超氧化物和过氧化物酶,加剧血管内皮损伤,并导致血管平滑肌缺氧,这是 CSVD 发展过程中关键的病理机制^[13-14]。采用

ELISA 法检测两组大鼠血清中 HCY 的含量,以评估造模对血管内皮损伤的影响。结果显示:与对照组相比,模型组血清中 HCY 的显著升高 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 两组大鼠血清中 HCY 含量对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of the content of serum HCY between two groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

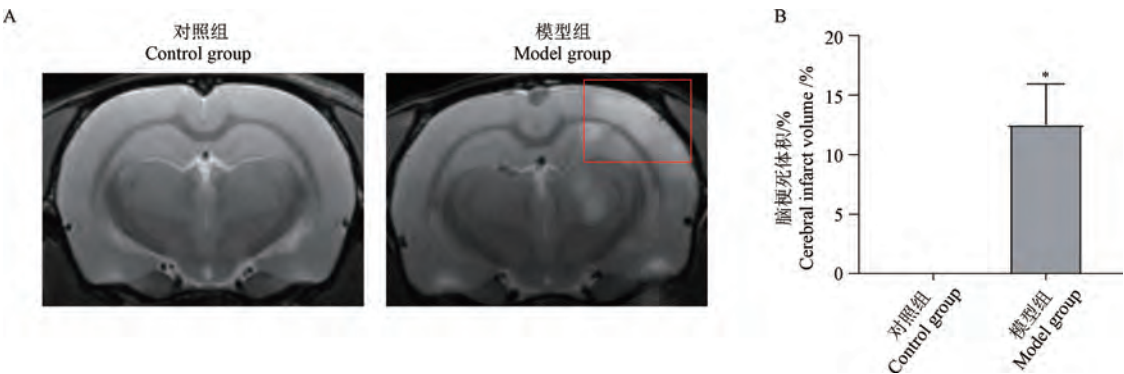
组别 Groups	HCY/($\mu\text{mol/L}$)
对照组 Control group	10.60 ± 0.62
模型组 Model group	13.31 ± 1.15*

2.3 CSVD 大鼠脑梗死体积的变化

进一步利用 MRI 检测 CSVD 大鼠脑梗死体积,结果显示:与对照组相比,模型组右侧出现多发性脑微梗死灶,梗死体积显著升高 ($12.52 \pm 9.07\%$, $P < 0.05$),见图 1。

2.4 CSVD 大鼠脑微血管密度的变化

在造模后 24 h 行脑血管成像检测造模对大鼠脑微血管密度的影响。与对照组相比,模型组脑微血管密度明显下降,见图 2。此外,利用免疫组化检测脑血管密度标志物 CD31 的表达,结果显示:对照组与模型组的 CD31 表达量分别为 ($7.05 \pm 0.36\%$)、($2.19 \pm 0.47\%$)%,与对照组相比,模型组脑皮质区中 CD31 的表达显著减少 ($P < 0.05$),结果说明了模型组的脑微血管密度降低,见图 3。



注:A:两组大鼠 MRI 成像代表图,红框:脑梗死;B:两组大鼠脑梗死体积统计。

图 1 两组大鼠的 MRI 成像及梗死体积的对比

Note. A. Representative MRI images of the two groups of rat. Red box. Cerebral infarction. B. Statistical of cerebral infarction volume of the two groups of rats.

Figure 1 Comparison of MRI imaging and infarct volume between two groups of rats

2.5 CSVD 大鼠血流动力学的变化

慢性低灌注是 CSVD 的核心病理机制^[15]。如图 4,通过超声检测大鼠颈动脉的 RI 和 PI,初

步评估造模后是否成功诱导脑部低灌注状态。结果显示:对照组的颈动脉血管阻力指数 RI 与血流灌注指数 PI 分别为 0.65 ± 0.02 、 1.10 ± 0.06 ;

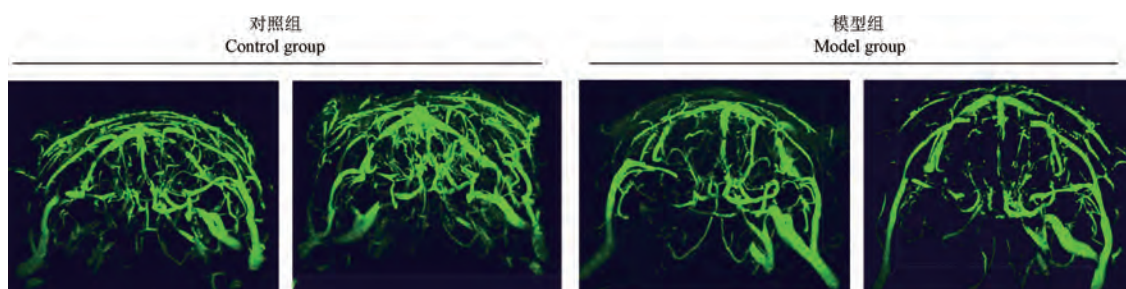
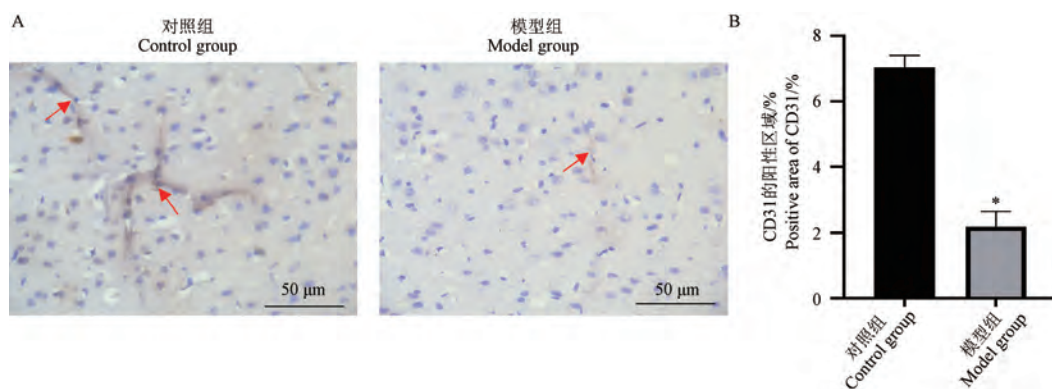


图 2 两组大鼠脑微血管密度的对比

Figure 2 Comparison of cerebral microvessel density between two groups of rats



注:A: 两组大鼠脑皮质区 CD31 表达量的代表图,红色箭头:阳性区域;B: 两组大鼠脑皮质区 CD31 的阳性区域统计。

图 3 两组大鼠脑皮质区中 CD31 表达量的对比

Note. A. Representative images of CD31 expression in the cerebral cortex of the two groups of rats. Red arrow. Positive area. B. Statistical of positive area of CD31 in the cerebral cortex of the two groups of rats.

Figure 3 Comparison of CD31 expression in the cortical regions of the brain between two groups of rats

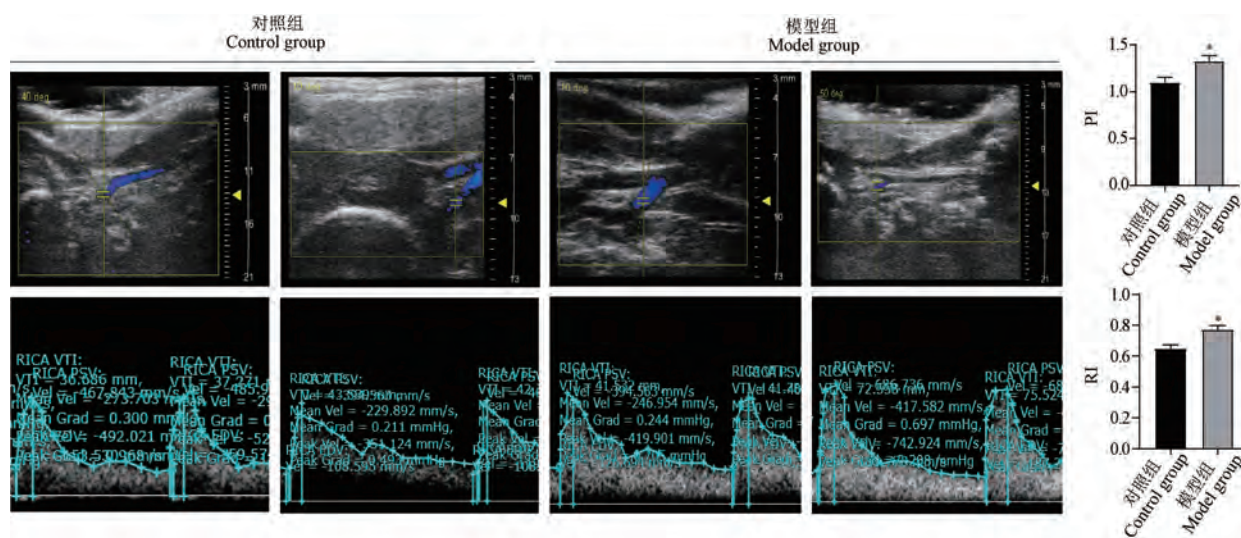


图 4 两组大鼠颈动脉 RI 和 PI 的对比

Figure 4 Comparison of carotid artery RI and PI between two groups of rats

模型组的 RI 与 PI 分别为 0.77 ± 0.03 、 1.33 ± 0.06 ;与对照组相比,模型组 RI 及 PI 均显著升高 ($P < 0.05$)。

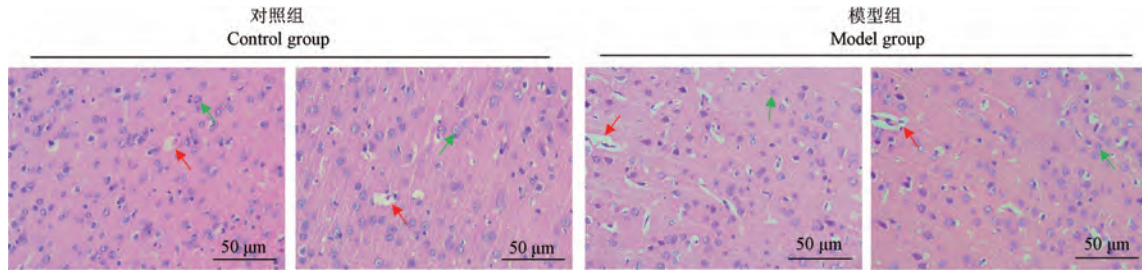
2.6 CSVD 大鼠脑皮质区病理学的变化

通过 HE 染色评估 CSVD 大鼠脑小血管结构及神经元的改变,结果显示:对照组大鼠脑皮质

区神经元排列整齐,血管管腔完整。模型组大鼠脑皮质区的神经元存在固缩及血管周围间隙变大的现象,见图 5。

2.7 CSVD 大鼠血脑屏障的变化

CSVD 发展过程中会发生不同程度的血脑屏障破坏^[16-17],如图 6,图 7,为了检测造模后 CSVD

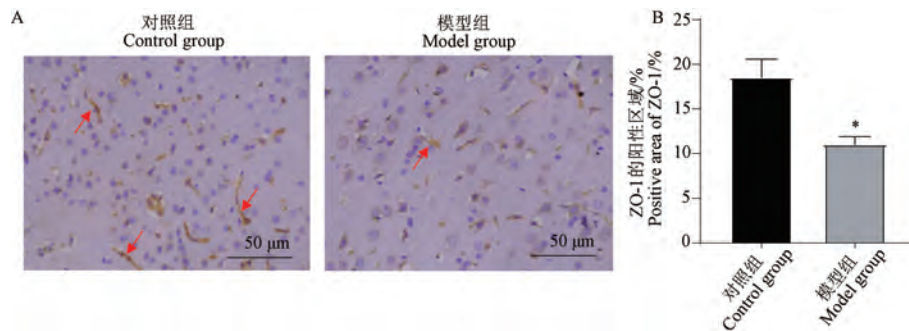


注:绿色箭头:神经元固缩;红色箭头:血管周围间隙变大。

图 5 两组大鼠脑皮质区 HE 染色

Note. Green arrow. Neuronal shrinkage. Red arrow. Enlarged perivascular spaces.

Figure 5 HE staining of the cortical area of the brain between two groups of rats



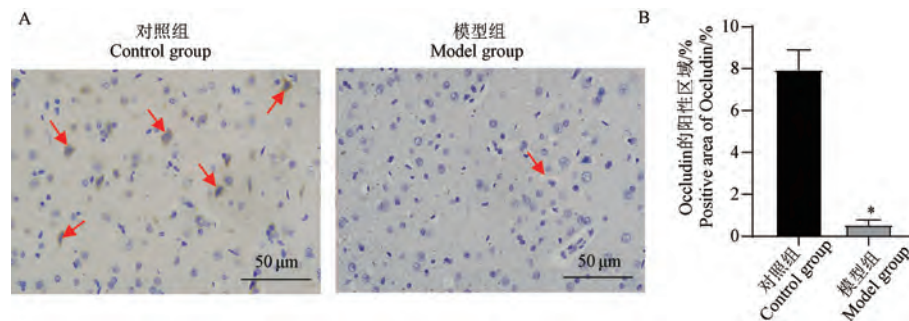
注:A:两组大鼠脑皮质区 ZO-1 表达量的代表图,红色箭头:阳性区域;B:两组大鼠脑皮质区 ZO-1 的阳性区域统计图。

图 6 两组大鼠脑组织皮质区 ZO-1 表达量的对比

Note. A. Representative images of ZO-1 expression in the cerebral cortex of the two groups of rats. Red arrow. Positive area.

B. Statistical of the positive area of ZO-1 in the cerebral cortex of the two groups of rats.

Figure 6 Comparison of ZO-1 expression in the cortical regions of the brain between two groups of rats



注:A:两组大鼠脑皮质区 Occludin 表达量的代表图,红色箭头:阳性区域;B:两组大鼠脑皮质区 Occludin 的阳性区域统计。

图 7 两组大鼠脑组织皮质区 Occludin 表达量的对比

Note. A. Representative images of Occludin expression in the cerebral cortex of the two groups of rats. Red arrow. Positive area.

B. Statistical of the positive area of Occludin in the cerebral cortex of the two groups of rats.

Figure 7 Comparison of Occludin expression in the cortical regions of the brain between two groups of rats

大鼠血脑屏障的改变,通过免疫组化检测血脑屏障相关紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达,结果显示:对照组的 ZO-1、Occludin 的表达分别为 $(18.53 \pm 1.79)\%$ 、 $(7.94 \pm 0.95)\%$;模型组的 ZO-1、Occludin 的表达分别为 $(10.98 \pm 0.79)\%$ 、 $(0.54 \pm 0.23)\%$;与对照组相比,模型组大鼠 ZO-1、Occludin 的表达均显著减少 ($P < 0.05$),说明 CSVD 大鼠发生了血脑屏障的功能障碍。

3 讨论

CSVD 是严重危害我国人民健康的常见疾病,由于其具有隐匿性,患者无或仅有轻微的临床表现,导致其诊断和防治受限,而无较好的动物模型又使其临床前基础研究受限^[18]。国外曾有学者将月桂酸钠在实验的第 1、3 天分别注入大鼠颈内动脉,选择性地损伤脑穿支动脉内皮,导致微小动脉内原位血栓形成^[19]。然而,该方法存在手术难度大、需两次麻醉增加戊巴比妥钠暴露风险、造模周期长以及手术过程中模型大鼠死亡率较高等局限性。与上述实验不同,本研究采用单侧、单次注射高浓度(2 g/L)月桂酸钠后并对颈内动脉进行结扎,同样可以造成脑微血管的损伤及脑组织低灌注状态。相较于上述实验,本实验方法具有安全、耗时短、操作相对简便,避免了多次手术造成实验大鼠死亡等优点。在造模的基础上,通过行为学、脑梗死体积、脑微血管密度、血流动力学、脑组织病理学及血脑屏障等多方面的检测结果验证,均表明 CSVD 大鼠模型建立成功,并且与 CSVD 的病理特点、发病机制有高度的相适性。

近年来,越来越多的研究开始关注 CSVD 对肢体障碍的影响。CSVD 患者会出现以卒中样症状、步态异常等神经功能损伤为主的临床表现^[20]。本研究观察到,单侧、单次经颈内动脉注射月桂酸钠后,大鼠出现不同程度的左前肢贴向前胸,提尾时向左侧旋转等姿势步态平衡障碍等表现,即 Longa 评分和姿势反射实验分值较对照组均有显著升高 ($P < 0.05$)。鉴于本实验诱导的 CSVD 模型大鼠均会出现不同程度的姿势平衡障碍,与 CSVD 临床特点相符。

研究表明,CSVD 患者所表现出来的认知功能障碍与血清 HCY 的含量密切相关^[21-22]。临床

上,CSVD 合并认知功能障碍患者的 HCY 含量更高,重度认知功能障碍患者 HCY 含量明显高于轻度认知功能障碍患者,说明 HCY 含量可以反映 CSVD 患者认知功能障碍及水平^[23-25]。HCY 属于蛋氨酸代谢的中间产物,该产物可以通过产生超氧化物及过氧化酶,加重机体血管内皮损伤,促使血管平滑肌缺氧,最终将逐渐形成 CSVD 的病理状态^[13-14]。本研究中观察到,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组血清同型半胱氨酸的含量明显高于对照组 ($P < 0.05$),提示模型组可能存在认知功能障碍,这与临床上 CSVD 患者的血清 HCY 增高的征象相符,说明 CSVD 大鼠模型建构成功。

CSVD 临床表现多样,部分患者起病隐匿、缓慢进展、高度依赖影像学的诊断。而头部的 MRI 为筛查 CSVD 的有效手段^[26]。临床上 CSVD 在 MRI 的主要表现为腔隙性脑梗死^[27]。本研究中观察到,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组右侧出现多发性脑微梗死灶,且脑梗死体积远大于对照组 ($P < 0.05$),提示出现典型的脑小血管缺血的影像学表现,受损部位常与 CSVD 模型大鼠出现不同程度的姿势平衡障碍密切相关,进一步可验证 CSVD 大鼠模型的成功建立。

在 CSVD 引起的微循环障碍病理过程中,血管内皮细胞功能及结构的异常起着关键作用^[28-29]。CD31 在发育中和成熟个体的所有血管内皮细胞均有高度表达,CD31 表达越高,提示微血管数量越多,因此 CD31 是一种重要的微血管标志物^[30]。本研究发现,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组脑组织 CD31 表达减少,脑微血管成像结果也显示,模型组脑微血管密度明显下降,均证实月桂酸钠诱导的 CSVD 模型大鼠脑微血管数量减少,这与 CSVD 临床特点相符。

脑内小血管皮质区功能的损伤及结构的改变达到一定程度后可直接形成脑血流量的低灌注状态,长此以往出现脑组织缺血性的改变^[15]。颈动脉超声是一种无创性检查技术,它能够直观地监测血管内的血流动力学变化。目前,该技术已成为筛查脑血管病的主要影像学手段之一^[31-32]。本研究中观察到,单侧、单次经颈内动

脉注月桂酸钠后,模型组的颈动脉 RI 及 PI 升高 ($P < 0.05$),提示模型组大鼠颈动脉血运不畅,可能存在血管狭窄,脑血流量下降、血流动力学不稳定等表现,与 CSVD 的疾病演变相符。进一步的 HE 染色结果显示,模型大鼠脑皮质区呈现广泛的神经元核固缩及血管周围间隙增大的病理特征,符合 CSVD 的典型病理改变。

血脑屏障受损引起功能障碍是 CSVD 的重要发病机制^[16-17]。紧密连接蛋白是血脑屏障的重要组成部分,对维持血脑屏障的结构和功能发挥重要作用^[33]。而紧密连接蛋白的表达下降以及血脑屏障受损增加血管的渗漏,使得血浆白蛋白等大分子物质通过血脑屏障进入脑实质造成脑白质病变^[9]。在本研究中观察到,单侧、单次经颈内动脉注射高浓度月桂酸钠后,模型组大鼠脑组织中的紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 的表达量减少,说明月桂酸钠造模后大鼠出现了血脑屏障的受损。

此外,本研究不足之处在于样本量偏小,仅探索了加倍剂量的造模方案,且未尝试更高浓度月桂酸钠对微血管及冠状动脉的损伤程度,因而未明确当剂量增加至何种水平时会导致大鼠的死亡率升高或损伤到大血管,后续实验可在此基础上进一步探索。另外,月桂酸钠可能会导致全身微循环障碍,本研究未进行相关评估,后续实验中应注意观察。同时,需要注意的是,该造模方法对操作者有如下要求:(1)需熟悉相关的实验动物解剖学的知识,掌握该模型的构建原理;(2)需提高操作的熟练度,以便在短时间内完成操作;(3)术中密切关注大鼠状况,及时调整麻醉深度,避免因麻醉过浅致苏醒挣扎或麻醉过深致呼吸抑制而死亡;(4)需精准暴露颈动脉,避免损伤迷走神经和交感神经;(5)注意区分 CCA、ICA、ECA,经 ICA 注入月桂酸钠时要求匀速、轻柔及缓慢,同时严格控制穿刺力度及深度。

综上所述,单侧、单次颈内动脉注射高浓度月桂酸钠创建的 CSVD 大鼠模型,会造成不同程度的左前肢贴向前胸并且提尾时向左侧旋转等姿势平衡障碍的表现;血清同型半胱氨酸数值增高;脑组织出现多发性微梗死灶;脑微血管数量减少;脑供血不足;脑组织中的神经元固缩、血管周围间隙变大;并出现了血脑屏障损坏,符合

CSVD 的临床表现可为 CSVD 研究提供一种简便、稳定、有效的实验动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] 王香元,余瑞宁,方锐,等. 脑小血管病实验动物模型及制备方法研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5851-5860.
WANG X Y, SHE R N, FANG R, et al. Research progress on experimental animal models and preparation methods of cerebral small vessel disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(18): 5851-5860.
- [2] DAS A S, REGENHARDT R W, VERNOOIJ M W, et al. Asymptomatic cerebral small vessel disease: insights from population-based studies [J]. J Stroke, 2019, 21(2): 121-138.
- [3] 郭文娟. 慢性脑低灌注小鼠模型构建及活血方对其神经纤维损伤的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2023.
GUO W J. Construction of a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion and the effect of blood-activating formula on its nerve fiber damage [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2023.
- [4] MENG P, LIU T, ZHONG Z, et al. A novel rat model of cerebral small vessel disease based on vascular risk factors of hypertension, aging, and cerebral hypoperfusion [J]. Hypertens Res, 2024, 47(8): 2195-2210.
- [5] HAINSWORTH A H, MARKUS H S. Do *in vivo* experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(12): 1877-1891.
- [6] 陈超, 聂郁林, 陆心恬, 等. 改良线栓法建立 SD 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 [J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(10): 569-573.
CHEN C, NIE Y L, LU X T, et al. Modified thread embolization method for establishment of focal cerebral ischemia-reperfusion model in SD rats [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2023, 18(10): 569-573.
- [7] 张阳, 何俐. 脑小血管病的病因和发病机制的最新进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2024, 41(4): 296-297, 288.
ZHANG Y, HE L. Latest advances in the etiology and pathogenesis of small cerebral vessel disease [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2024, 41(4): 296-297, 288.
- [8] 孔倩倩, 黄浩, 骆翔. 血脑屏障与脑小血管病相关研究进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2023, 23(11): 972-977.
KONG Q Q, HUANG H, LUO X. Research progress on the correlation between blood-brain barrier and cerebral small vessel disease [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg, 2023, 23(11): 972-977.

- [9] 胡文立, 杨磊, 李譔婷, 等. 中国脑小血管病诊治专家共识 2021 [J]. 中国卒中杂志, 2021, 16(7): 716-726.
HU W L, YANG L, LI X T, et al. Chinese consensus on diagnosis and therapy of cerebral small vessel disease 2021 [J]. Chin J Stroke, 2021, 16(7): 716-726.
- [10] 陈雪梅. 内皮功能障碍与脑小血管病 [J]. 国际脑血管病杂志, 2016, 24(12): 1111-1114.
CHEN X M. Endothelial dysfunction and cerebral small vessel disease [J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2016, 24(12): 1111-1114.
- [11] ASHIDA S, ISHIHARA M, OGAWA H, et al. Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats [J]. Thromb Res, 1980, 18(1/2): 55-67.
- [12] SHIRAKURA S, HIGO K, TAKEDA M, et al. Antithrombotic effects of KW-3635, a thromboxane A₂-receptor antagonist, in guinea pigs [J]. Jpn J Pharmacol, 1994, 65(2): 93-98.
- [13] 饶容丽, 王守章, 谷丽娟. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征对老年脑小血管病患者认知功能及血清同型半胱氨酸和胱抑素 C 水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(6): 1149-1151.
RAO R L, WANG S Z, GU L J. Effects of obstructive sleep apnea hypoventilation syndrome on cognitive function and serum homocysteine and cystatin C levels in elderly patients with cerebral small vessel disease [J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(6): 1149-1151.
- [14] 郝栋, 李孟文, 孔艳妮, 等. 脑小血管病患者血清 Hcy、VEGF 水平及意义 [J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15(7): 423-424.
HAO D, LI M W, KONG Y N, et al. Serum Hcy and VEGF levels and significance in patients with cerebral small vessel disease [J]. Neural Inj Funct Reconstr, 2020, 15(7): 423-424.
- [15] BARNES S R, NG T S C, MONTAGNE A, et al. Optimal acquisition and modeling parameters for accurate assessment of low K_{trans} blood-brain barrier permeability using dynamic contrast-enhanced MRI [J]. Magn Reson Med, 2016, 75(5): 1967-1977.
- [16] ZHANG C E, WONG S M, VAN DE HAAR H J, et al. Blood-brain barrier leakage is more widespread in patients with cerebral small vessel disease [J]. Neurology, 2017, 88(5): 426-432.
- [17] WALSH J, TOZER D J, SARI H, et al. Microglial activation and blood-brain barrier permeability in cerebral small vessel disease [J]. Brain, 2021, 144(5): 1361-1371.
- [18] 王珊珊, 徐昊, 侯培媚, 等. 基于脑小血管病临床脑血流特点构建并评估不完全性全脑缺血再灌注大鼠模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(7): 1330-1338.
WANG S S, XU H, HOU P M, et al. Construction and evaluation of an incomplete global cerebral ischemia-reperfusion rat model based on hemodynamic characteristics of cerebral small vessel disease [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(7): 1330-1338.
- [19] 刘茅茅, 李小玲, 王拥军, 等. 腔隙性脑梗死动物模型的建立 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2003, 5(5): 334-337.
LIU M M, LI X L, WANG Y J, et al. The development of cerebral lacunar infarction model in rats [J]. Editor Dep Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis, 2003, 5(5): 334-337.
- [20] 关双, 徐蕊, 刘骏, 等. 脑小血管病诊治的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(23): 4696-4701.
GUAN S, XU R, LIU J, et al. Progress in diagnosis and treatment of cerebral small vessel disease [J]. Med Recapitul, 2019, 25(23): 4696-4701.
- [21] WANG T, SUN Z W, SHAO L Q, et al. Diagnostic values of serum levels of homocysteine and uric acid for predicting vascular mild cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 2217-2225.
- [22] ZHENG X, SHE H D, ZHANG Q X, et al. Cystatin C predicts the risk of incident cerebrovascular disease in the elderly: a meta-analysis on survival date studies [J]. Med (Baltimore), 2021, 100(28): e26617.
- [23] 郁洁, 王滨, 洪侃, 等. 合并认知功能障碍的脑小血管病老年患者血同型半胱氨酸及炎症介质水平的改变及意义 [J]. 川北医学院学报, 2018, 33(4): 496-499.
YU J, WANG B, HONG K, et al. Change and significance of plasma homocysteine and inflammatory mediators in elderly patients with cerebral small vessel disease combined with cognitive impairment [J]. J N Sichuan Med Coll, 2018, 33(4): 496-499.
- [24] 田婧, 白永杰, 尤爱民. 血清 Hcy、SAA 和 MCP-1 在脑梗死后血管性认知功能障碍患者血清中的表达及意义 [J]. 广东医学, 2021, 42(7): 810-813.
TIAN J, BAI Y J, YOU A M. The expression and clinical value of serum Hcy, SAA and MCP-1 in vascular cognitive dysfunction after cerebral infarction [J]. Guangdong Med J, 2021, 42(7): 810-813.
- [25] 张晨, 郝建春, 李云峰, 等. 血清 HCY、Cys-C 水平在老年脑小血管病合并 OSAHS 认知障碍中的表达及严重程度评估价值 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2024, 41(3): 270-275.
ZHANG C, HAO J C, LI Y F, et al. Value of serum HCY and Cys-C levels for cognitive impairment assessment in elderly patients with both cerebral small vessel disease and

- obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2024, 41(3): 270-275.
- [26] 郭雅芹, 吴雪梅, 邢海英, 等. 脑小血管病患者磁共振成像总体负荷与颈动脉内中膜厚度的相关性研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023, 40(6): 540-543.
- GUO Y Q, WU X M, XING H Y, et al. Correlation between total magnetic resonance imaging burden and carotid intima-media thickness in patients with cerebral small vessel disease [J]. *J Apoplexy Nerv Dis*, 2023, 40(6): 540-543.
- [27] 崔羽, 冉娟娟, 王益, 等. 脑小血管病患者多模态磁共振成像特征及其与认知功能损伤的相关性分析 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2020, 28(4): 43-48.
- CUI Y, RAN J J, WANG Y, et al. Characteristics of multimodal MRI and their correlations with cognitive impairment in patients with cerebral small vessel disease [J]. *Pract J Card Cereb Pneumal Vasc Dis*, 2020, 28(4): 43-48.
- [28] FORD T J, ROCCHICCIOLI P, GOOD R, et al. Systemic microvascular dysfunction in microvascular and vasospastic angina [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(46): 4086-4097.
- [29] PRIES A R, REGLIN B. Coronary microcirculatory pathophysiology: can we afford it to remain a black box? [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(7): 478-488.
- [30] 张宏如, 陈静, 徐森磊, 等. 针刺内关和足三里双穴位对大鼠心肌缺血再灌注损伤后的血管重塑作用 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(1): 42-49.
- ZHANG H R, CHEN J, XU S L, et al. The effect of combination acupuncture treatment of Neiguan and Zusanli on vascular remodeling after myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 39(1): 42-49.
- [31] 卓晓英, 薛金光, 赵宁军, 等. 急诊颈部血管超声检查应用于急性脑梗死患者的临床价值 [J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2016, 11(12): 1165-1168.
- ZHUO X Y, XUE J G, ZHAO N J, et al. Clinical value of emergency application of cervical vascular ultrasound in diagnosis of cerebral infarction [J]. *Chin J Emerg Resusc Disaster Med*, 2016, 11(12): 1165-1168.
- [32] 汪宁, 彭兆快. 脑梗死老年患者经颅多普勒超声及颈动脉超声血管检测 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(12): 2844-2847.
- WANG N, PENG Z K. Transcranial Doppler ultrasound and carotid ultrasound angiography in elderly patients with cerebral infarction [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(12): 2844-2847.
- [33] 廖华宁, 汪宁, 王艳. 紧密连接蛋白与血脑屏障 [J]. *安徽医药*, 2012, 16(3): 377-379.
- LIAO H N, WANG N, WANG Y. Tight junction proteins and the blood-brain barrier [J]. *Anhui Med Pharm*, 2012, 16(3): 377-379.

[收稿日期] 2024-12-30

刘瑶,史银玥,崔瑛,等. 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠安胎作用的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 790-801.

LIU Y, SHI Y Y, CUI Y, et al. Research on the anti-abortion effect of Taxilli Herba aqueous decoction in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 790-801.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.002

桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠 安胎作用的研究

刘瑶¹, 史银玥¹, 崔瑛^{1,2}, 李玲玲^{1*}, 冯志毅^{1*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 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)

【摘要】 目的 探讨桑寄生水煎液对先兆流产大鼠的安胎作用及其机制。**方法** 将 72 只 SPF 级雌雄比例为 2:1 的 SD 大鼠合笼后, 将 48 只孕鼠分为正常组、先兆流产模型组、阳性对照组、桑寄生水煎液高、中、低剂量组, 每组 8 只。阳性对照组给予灌胃 3.02 mg/kg 的地屈孕酮, 桑寄生水煎液低剂量、桑寄生水煎液中剂量、桑寄生水煎液高剂量分别给予 2.5、5、10 g/kg 桑寄生水煎液灌胃, 正常组和先兆流产模型组灌胃等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续给药 10 d。第 10 天灌胃相应药液后, 除正常组, 其余各组灌胃 3.75 mg/kg 的米非司酮混悬液, 观察桑寄生对阴道出血率、流产率等的影响; ELISA 法检测大鼠血清促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (luteinising hormone, LH)、雌激素 (estrogen, E)、孕酮 (progesterone, P)、睾酮 (testosterone, T)、芳香化酶 (aromatase)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和大鼠卵巢 E、P 含量; 免疫荧光法观察孕鼠子宫蜕膜组织雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕酮受体 (progesterone receptor, PR)、血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、血小板内皮细胞粘附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 阳性表达情况, 并进行半定量分析。**结果** 米非司酮造模后, 各组孕鼠阴道出血率和流产率均极显著升高, 桑寄生治疗组能够有效降低大鼠的阴道出血率和流产率, 能够升高血清 E、P、VEGF 和卵巢 E、P 的含量 ($P < 0.05$), 降低血清 LH 含量, 维持 FSH 的分泌, 增强蜕膜组织中 ER、PR、VEGFR2、CD31 的表达活性。**结论** 桑寄生水煎液对先兆流产大鼠有明显的安胎作用, 作用机制与调整子宫上游 HPG 轴的正常生理功能、增强 P/PR/VEGF/VEGFR2、E/ER/VEGF/VEGFR2 通路的下游表达有关。

【关键词】 桑寄生; 先兆流产; 安胎功效; 下丘脑-垂体-性腺轴; 孕鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0790-12

Research on the anti-abortion effect of Taxilli Herba aqueous decoction in rats

LIU Yao¹, SHI Yinyue¹, CUI Ying^{1,2}, LI Lingling^{1*}, FENG Zhiyi^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金 (82204639), 河南省博士后科研项目 (HN2025089)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82204639), Henan Provincial Postdoctoral Research Project (HN2025089)。

【作者简介】 刘瑶, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药性与应用。Email: 853177520@qq.com

【通信作者】 李玲玲, 女, 博士, 讲师, 硕士生导师, 研究方向: 中药药性与应用。Email: openleeling@163.com;

冯志毅, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药药性物质基础。Email: fengzy8@163.com。

* 共同通信作者

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Disease Co-Constructed by Henan Province & Ministry of Education, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Corresponding author: LI Lingling. E-mail: openleeling@163.com; FENG Zhiyi. E-mail: fengzy8@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of Taxilli Herba decoction in preventing miscarriage in rats with threatened abortion. **Methods** Seventy-two SPF-grade SD rats were co-housed at a male-to-female ratio of 2 : 1. Forty-eight pregnant rats were subsequently divided into a normal group, a threatened abortion model group, a positive control group, as well as Taxilli Herba decoction low/medium/high dose groups ($n = 8$ rats per group). Rats in the positive control group received 3.02 mg/kg dydrogesterone intragastrically, and rats in the low-, medium-, and high-dose Taxilli Herba decoction groups received 2.5, 5, and 10 g/kg Taxilli Herba decoction intragastrically, respectively. The normal and model groups received intragastric distilled water once a day for 10 consecutive days. On day 10 after administration of the corresponding treatment, rats in all groups except the normal group received intragastric administration of 3.75 mg/kg mifepristone suspension. The effects of Taxilli Herba on the vaginal bleeding rate and abortion rate were observed. Serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estrogen (E), progesterone (P), vascular endothelial growth factor (VEGF), testosterone (T), and aromatase and E and P levels in the ovary in pregnant rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Expression levels of E receptor (ER), P receptor (PR), VEGF receptor 2 (VEGFR2), and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in the uterine decidua in pregnant rats were detected by immunofluorescence staining, and semi-quantitative analysis was performed. **Results** Mifepristone significantly increased the vaginal bleeding rate and abortion rate in pregnant rats, but these were effectively reduced by treatment with Taxilli Herba water decoction. Taxilli Herba water decoction also increased serum E, P, and VEGF, and ovary levels of E and P ($P < 0.05$). The treatment also decreased serum LH, maintained the secretion of FSH, and enhanced ER, PR, VEGFR2, and CD31 expression in decidual tissue. **Conclusions** Taxilli Herba demonstrated effective miscarriage-prevention effects in a rat model of threatened abortion. Its mechanism of action involves regulating the normal physiological function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis upstream of the uterus, and enhancing the expression of the downstream P/PR/VEGF/VEGFR2 and E/ER/VEGF/VEGFR2 pathways.

【Keywords】 Taxilli Herba; threatened abortion; miscarriage prevention; hypothalamic-pituitary-gonadal axis; pregnant rat

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

先兆流产是指妊娠 28 周前,出现少量阴道流血,随之可出现阵发性下腹痛或腰背痛等症状的疾病,是常见的妊娠期并发症,若阴道出血量持续增多、腹痛加剧可发展为难免流产^[1]。流行病学统计显示,先兆流产在妊娠类疾病中较为常见,占比达 10% ~ 15%,其发生率约在 20% ~ 25%。具体而言,早期先兆流产发生率为 20%,而晚期先兆流产发生率呈逐年递增趋势,现已攀升至 5%,给孕妇的身心健康带来极大的负面影响^[2]。目前认为先兆流产的病因较为复杂,黄体功能不全导致孕激素分泌不足是最常见的原因^[3-4],这也是目前先兆流产模型常用造模药物米非司酮的作用机制,米非司酮可竞争性结合孕

酮受体,使孕激素作用下降,发挥类似自然流产的作用^[5]。治疗黄体功能不全的常规方法为补充孕激素如注射黄体酮和口服地屈孕酮,黄体酮作为天然的孕激素补充制剂,已成为临床上针对先兆流产最主要的治疗药物^[6],但有副作用包括皮肤反应和生殖系统反应,严重时会出现皮下脂肪坏死、液化等情况^[7],地屈孕酮副作用较小,保胎效果有限,故寻找更为安全有效的治疗方法尤为重要。由于中医药治疗先兆流产具有临床疗效好、副作用小、患者易于接受等优点^[8],因此目前适用先兆流产的中成药如寿胎丸、滋肾育胎丸、固肾安胎丸、孕康颗粒等^[9-10],都取得了良好的疗效,并且这些方剂的组成药物中均具有桑寄

生,可见桑寄生对先兆流产具有确切的疗效。

桑寄生首载于《神农本草经》^[11],为桑寄生科植物桑寄生(*Taxillus chinensis*(DC.) Danser)的干燥带叶茎枝,2020 年版《中国药典》记载:“味苦、甘,平,归肝、肾经。祛风湿、补肝肾、强筋骨、安胎元。用于风湿痹痛,腰膝酸软,筋骨无力,崩漏经多,妊娠漏血,胎动不安,头晕目眩”^[12]。其补肾安胎之功,为古今临床医家所常用,如《药性论》载:“能令胎牢固,主怀妊漏血不止”^[13]。现代药理研究表明,桑寄生主要含有黄酮类、甾醇类及萜类、酚酸类、挥发油类等多种化学成分,具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、利尿、强心、降压降脂降血糖等作用^[14]。主要活性成分是以黄酮醇类为代表的黄酮类化合物,包括槲皮苷、槲皮素、蒽薹苷、金丝桃苷、槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷等^[15-16]。研究表明,桑寄生水煎液中存在的槲皮苷、蒽薹苷,是桑寄生发挥祛风湿、补肝肾、强筋骨作用的主要活性成分^[17-18],在安胎功效上,仍缺乏现代药理学层面的深入探究,桑寄生发挥保胎作用的具体机制至今尚不明确。因此,本实验以传统中药煎汤用药方式,通过建立大鼠先兆流产模型,观察桑寄生对先兆流产动物的影响并探讨其作用机制,为桑寄生药性物质基础的深入研究及开发利用,为中医药治疗先兆流产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

9 周龄,SPF 级雌性 SD 大鼠 48 只,雄性大鼠 24 只,体质量均为 (230 ± 20) g,购于山东济南朋悦实验动物繁育有限公司【SCXK(鲁)2019 0003】,饲养于河南中医药大学动物实验中心【SYXK(豫)2021-0015】。饲养环境为大鼠 IVC 独立送风隔离系统内恒温恒湿分笼饲养,温度 (22 ± 2) °C,湿度 $55\% \pm 10\%$,每天 12 h 光照,自由饮水和摄食(标准饲料)。本实验已通过河南中医药大学实验动物伦理委员会的审核和批准(DWLLGZR202202200)。

1.1.2 药物

桑寄生(批号:20160614,购自河南郑州张仲景大药房)经河南中医药大学药学院陈随清教授

鉴定,该批饮片为桑寄生科植物桑寄生的干燥带叶茎枝;地屈孕酮片(批号:362291,产自 Abbott Biologicals B. V.);米非司酮片(批号:05200701,产自湖北葛店人福药业有限责任公司)。

1.1.3 主要试剂与仪器

96 T 试剂盒:大鼠血清促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)(货号:MM-70867R1,购自江苏酶免实业有限公司);大鼠促黄体生成素(luteinising hormone, LH)(货号:MM-0624R1,购自江苏酶免实业有限公司);大鼠睾酮(testosterone, T)(货号:MM-0577R1,购自江苏酶免实业有限公司);大鼠芳香化酶(aromatase)(货号:MM-70577R1,购自江苏酶免实业有限公司);大鼠雌激素(estrogen, E)(货号:MM-0552R1,购自江苏酶免实业有限公司);大鼠孕酮(progesterone, P)(货号:MM-70918R1,购自江苏酶免实业有限公司);大鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(货号:MM-0807R1,购自江苏酶免实业有限公司);一抗:血小板内皮细胞粘附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31)(批号:GB113151,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);孕酮受体(progesterone receptor, PR)(批号:GB11262,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);雌激素受体(estrogen receptor, ER)(批号:21244-1-AP,购自武汉三鹰生物技术有限公司);血管内皮细胞生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)(批号:26415-1-AP,购自武汉三鹰生物技术有限公司);荧光二抗:CY3 标记的山羊抗兔(批号:GB21303,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);DAPI(批号:G1012,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);抗荧光淬灭封片剂(批号:G1401,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);无水乙醇(批号:100092183,购自国药集团化学试剂有限公司);二甲苯(批号:1330-20-7,购自上海凌峰化学试剂有限公司);柠檬酸(pH = 6.0)抗原修复液(批号:G1202,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);PBS 缓冲液(批号:G0002,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);自发荧光淬灭剂(批号:G1401,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);BSA(批号:G5001,购自武汉赛维尔生物科技有限公司)。

IVC-II 型独立送风隔离笼具系统(苏州冯氏动物笼具厂, 中国); 全自动样品快速研磨仪(上海净信科技有限公司, 中国); Epoch 酶标仪(BioTeK Instruments, Inc, 美国); Donatello 脱水机(DIAPATH, 意大利); JB-P5 包埋机、JB-L5 冻台(武汉俊杰电子有限公司, 中国); RM2016 病理切片机(上海徕卡仪器有限公司, 中国); KD-P 组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, 中国); TSY-B 脱色摇床、MX-F 涡旋混合器、D1008E 掌上离心机(Servicebio, 中国); GT1001 组化笔(Gene tech, 美国); NIKONECLIPSE C1 正置荧光显微镜、NIKON DS-U3 成像系统(Nikon, 日本); 电子天平(Sartorius, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 桑寄生水煎液的制备

取桑寄生饮片, 加入 10 倍量的蒸馏水, 浸泡 30 min 后武火煮沸, 沸后文火煮 30 min; 药渣加 8 倍量的蒸馏水再次煎煮 20 min。合并两次煎煮液, 浓缩至 1 g/mL, 临用时分别配制为 1、0.5、0.25 g/mL 的桑寄生水煎液。

1.2.2 阳性药与模型药的配制

取每片含地屈孕酮 10 mg 的地屈孕酮片适量, 于研钵中研成细末后加入适量蒸馏水, 摇匀后超声, 使其完全混匀, 得到 3.02 mg/kg 的地屈孕酮混悬液。

取每片含米非司酮 25 mg 的米非司酮片适量, 于研钵中研成细末后加入适量蒸馏水, 摇匀后超声, 使其完全混匀, 得到 3.75 mg/kg 的米非司酮混悬液。

1.2.3 模型建立与给药

将 SPF 级 SD 雌鼠不限食水适应性饲养 5 d, 于第 5 天 17:00 ~ 20:00 以雌雄 2:1 的比例与 SPF 级 SD 雄鼠合笼, 自由饮水、摄食。每日 8:00 ~ 10:00 时观察雌鼠阴栓及显微镜下阴道涂片, 以发现阴栓或阴道涂片显示大量精子记为妊娠第 1 天, 将孕鼠按体质量随机分为正常组、先兆流产模型组、阳性对照组、桑寄生水煎液高、中、低剂量组, 每组 8 只。各组孕鼠于妊娠第 1 天开始灌胃, 其中, 正常组与先兆流产模型组每日灌胃蒸馏水, 阳性对照组每日灌胃地屈孕酮混悬液, 桑寄生水煎液高、中、低剂量组每日灌胃高(10 g/kg)、中(5 g/kg)、低(2.5 g/kg)剂量的桑

寄生水煎液, 给药体积 1 mL/100 g, 连续灌胃 10 d。第 10 天灌胃相应药液后, 除正常组, 其余各组加灌米非司酮混悬液, 观察 24 h 内各组孕鼠阴道出血情况及其他各项指标。

先兆流产的判定: 以孕鼠造模 24 h 内出现阴道出血为判定指标。灌胃米非司酮造模后, 观察 24 h 内孕鼠阴道有无血液自然流出, 出血作为判定造模成功的指标。

1.2.4 一般状态与孕期观察

一般状态: 雌鼠的精神、活动、皮毛、尾色、有无缩肩拱背、向腹蜷缩等情况。

1.2.5 基础指标检测

于受孕第 11 天腹主动脉取血, 分离血清及血浆, -80 ℃ 保存备用; 大鼠处死后立即在冰台上剖取各脏器, -80 ℃ 保存备用。每组随机选取 3 只孕鼠的子宫包裹胚胎置于 4% 多聚甲醛内固定, 留用免疫荧光检测。观察每只孕鼠子宫内瘀血情况, 记录各组孕鼠总胎数、存活胚胎数、吸收胚胎数, 计算胚胎存活率、流产率。

存活胚胎、吸收胚胎的判断标准: 存活胚胎通常具有完整的外形, 呈圆形或椭圆形, 表面光滑, 有清晰的胎膜和血管分布, 透过胎膜可以看到胚胎的身体结构, 如头部、四肢等, 有些胚胎还能观察到心跳。吸收胚胎则表现为形态不完整, 体积较小, 颜色发暗, 呈灰白色或黑褐色, 质地较软, 表面无血管分布或血管稀少, 有时可见到胚胎组织的溶解和吸收迹象。

胚胎存活率 = (存活胚胎数 / 总胎数) × 100%;

流产率 = (吸收胚胎数 / 总胎数) × 100% =

[(总胎数 - 存活胚胎数) / 总胎数] × 100%

1.2.6 血清 FSH、LH、E、P、T、芳香化酶、VEGF 含量测定

将冻存于 -80 ℃ 冰箱内的大鼠血清解冻。根据 ELISA 试剂盒说明书实验操作步骤进行血清中 FSH、LH、E、P、T、芳香化酶、VEGF 的测定并计算含量。

1.2.7 卵巢中 E、P 含量测定

将冻存于 -80 ℃ 冰箱内的大鼠卵巢取出, 解冻, 剪碎, 加入 4 倍量预冷的生理盐水, 即卵巢(g): 生理盐水(mL) = 1:4, 用组织研磨仪研匀, 涡旋振荡器匀浆后, 置于低温高速离心机内, 设 4 ℃、3500 r/min 离心 20 min, 迅速转移上清液

至新标记好的 Ep 管内,即得 20%的卵巢组织匀浆。根据 ELISA 试剂盒说明书实验操作步骤进行卵巢中 E、P 的测定并计算含量。

1.2.8 子宫组织免疫荧光染色

子宫蜕膜组织 ER、PR、VEGFR2、CD31 阳性表达:制作切片后,脱蜡至水,抗原修复,画圈,自发荧光淬灭,血清封闭,加一抗、二抗,复染细胞核,封片,显微镜检,图像采集。其中 DAPI 所染细胞核在紫外线的激发下为蓝色,阳性表达为相应荧光素(ER、PR、VEGFR2、CD31)标记的红光。

子宫内膜免疫荧光半定量分析:对孕鼠子宫内膜滋养层部位的 200 倍镜下免疫荧光染色图像进行相应荧光的阳性率分析。

1.3 统计学分析

实验数据用 SPSS 25.0 软件进行分析,以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。其中各组间雌鼠总胎数、活胎数、吸收胎数、胚胎存活率、流产率进行单因素方差分析,采用 LSD 法检验;各组间雌鼠阴道出血百分率进行交叉表分析,采用 χ^2 (卡方)费希尔精确检验。检验结果以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

表 1 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠阴道出血率的改善作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Improvement effect of Taxilli Herba aqueous decoction on vaginal bleeding rate in threatened abortion model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	剂量/(g/kg) Dose/(g/kg)	阴道出血/% Vaginal bleeding/%
正常组 Normal group	—	0.0
先兆流产模型组 Threatened abortion model group	—	75.0**
阳性对照组 Positive control group	0.003 02	12.5##
桑寄生水煎液高剂量组 Taxilli Herba decoction high dose group	10	12.5##
桑寄生水煎液中剂量组 Taxilli Herba decoction medium dose group	5	37.5##
桑寄生水煎液低剂量组 Taxilli Herba decoction low dose group	2.5	37.5##

注:与正常组相比, ** $P < 0.01$;与先兆流产模型组相比, ## $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with threatened abortion model group, ## $P < 0.01$. (The same in the following tables)

2.3 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠子宫形态的影响

正常组孕鼠子宫呈串珠状,色粉红,无瘀血,

2 结果

2.1 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠一般状态的影响

造模前,各组大鼠均无明显异常。灌胃米非司酮造模后,与正常组比较,先兆流产模型组大鼠均出现萎靡不振,活动度下降的现象,毛色枯槁不顺,尾色发白、无力,多向腹、缩肩拱背、蜷缩在角落,符合临床上先兆流产下腹坠痛的症状。与先兆流产模型组比较,各给药组孕鼠体征与状态均有不同程度的改善。

2.2 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠阴道出血的影响

与正常组孕鼠比较,先兆流产模型组孕鼠的阴道出血百分比显著升高($P < 0.01$);与先兆流产模型组比较,阳性对照组、桑寄生水煎液高、中、低剂量组的阴道出血百分比均有不同程度的降低($P < 0.01$);阳性对照组、桑寄生水煎液高、中、低剂量组组间,桑寄生水煎液高剂量组、阳性对照组与桑寄生水煎液中、低剂量组比较,孕鼠阴道出血百分比显著下降($P < 0.01$)(表 1)。

胚胎发育良好,圆润饱满、大小均匀,呈淡红色。先兆流产模型组子宫多呈黑褐色“竹节状”,两侧子宫瘀血明显,胚胎体积明显缩小、大小不一,呈

黑褐色,有明显出血。与先兆流产模型组比较,阳性对照组和桑寄生水煎液高、中、低剂量组的子宫上述现象均有不同程度的改善,可见两侧子宫少数位点呈“竹节状”,有部分瘀血,胚胎体积饱满、黑瘪大小不一(图 1)。

2.4 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠子宫内胚胎的影响

如表 2,与正常组比较,先兆流产模型组活胎

数显著降低($P < 0.01$),胚胎存活率显著下降($P < 0.01$),吸收胎数显著升高($P < 0.01$),流产率显著升高($P < 0.01$);与先兆流产模型组比较,阳性对照组、高、中、低剂量组活胎数显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),胚胎存活率显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),桑寄生水煎液高、中剂量吸收胎数显著降低($P < 0.05$),阳性对照组、桑寄生水煎液高、中、低剂量组流产率显著下降($P < 0.05$

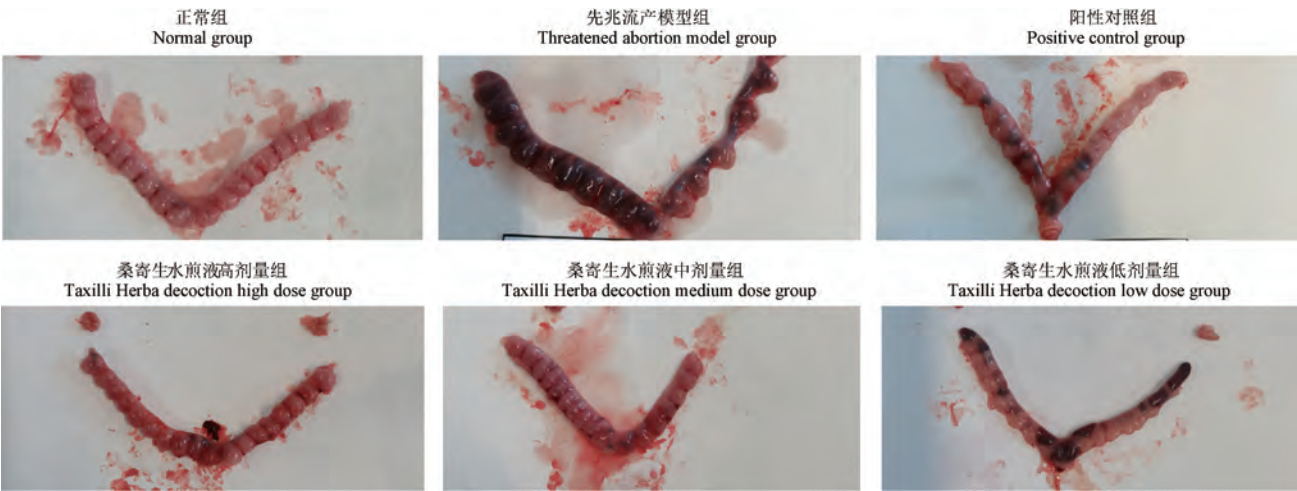


图 1 各组孕鼠子宫形态
Figure 1 Uterine morphology of pregnant rats in each group

表 2 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠胚胎存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Taxilli Herba aqueous decoction on embryo survival rate in threatened abortion model rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Groups	剂量/(g/kg) Dose/(g/kg)	总胎数/ <i>n</i> Total number of fetuses/ <i>n</i>	活胎数/ <i>n</i> Number of live births/ <i>n</i>	胚胎存活率/% Embryo survival rate/%	吸收胎数/ <i>n</i> Fetal resorption/ <i>n</i>	胚胎吸收率/% Fetal resorption rate/%
正常组 Normal group	—	16.9 ± 1.7	16.9 ± 1.7	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
先兆流产模型组 Threatened abortion model group	—	16.1 ± 6.7	10.5 ± 5.4**	64.9 ± 27.6**	5.6 ± 4.7**	35.1 ± 27.6**
阳性对照组 Positive control group	0.003 02	17.5 ± 3.5	14.9 ± 1.7##	87.0 ± 13.6#	2.6 ± 2.9	13.0 ± 13.6#
桑寄生水煎液高剂量组 Taxilli Herba decoction high dose group	10	16.3 ± 1.9	14.6 ± 2.0#	90.2 ± 9.2##	1.6 ± 1.5#	9.8 ± 9.2##
桑寄生水煎液中剂量组 Taxilli Herba decoction medium dose group	5	17.4 ± 3.7	15.4 ± 2.9##	90.2 ± 14.9##	2.0 ± 3.4#	9.8 ± 14.9##
桑寄生水煎液低剂量组 Taxilli Herba decoction low dose group	2.5	17.0 ± 3.8	14.1 ± 3.8#	84.6 ± 20.1#	2.9 ± 3.6	15.4 ± 20.1#

注:与先兆流产模型组相比, # $P < 0.05$ 。(下表同)
Note. Compared with threatened abortion model group, # $P < 0.05$. (The same in the following tables)

或 $P < 0.01$)。

2.5 桑寄生水煎液对先兆流产模型大鼠生化指标的影响

与正常组比较,先兆流产模型组卵巢 E、P 含量均显著降低 ($P < 0.01$),血清 E、P 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),FSH 的含量显著升高 ($P < 0.01$),VEGF 的含量显著降低 ($P < 0.05$),芳香化酶活性显著降低 ($P < 0.01$);与先兆流产模型组比较,桑寄生水煎液高、中、低剂量组卵巢

E 的含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),中剂量组卵巢 P 的含量显著升高 ($P < 0.05$),高剂量组血清 E 的含量显著升高 ($P < 0.01$),阳性对照组、桑寄生水煎液高、低剂量组血清 P 的含量显著升高 ($P < 0.05$),高剂量组 LH 含量显著降低 ($P < 0.05$),阳性对照组血清 FSH 含量显著降低 ($P < 0.05$),高剂量组 FSH 的含量显著升高 ($P < 0.01$),阳性对照组、高、中剂量组 VEGF 的含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 3)。

表 3 桑寄生水煎液对大鼠 E、P、LH、FSH、VEGF、T、芳香化酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Taxilli Herba aqueous decoction E, P, LH, FSH, VEGF, T and aromatase in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

生化指标 Biochemical indicators		正常组 Normal group	先兆流产模型组 Threatened abortion model group	阳性对照组 Positive control group	桑寄生水煎液高剂量组 Taxilli Herba decoction high dose group	桑寄生水煎液中剂量组 Taxilli Herba decoction medium dose group	桑寄生水煎液低剂量组 Taxilli Herba decoction low dose group
卵巢 Ovary	E/(pg/mL)	23.28 ± 0.66	20.94 ± 0.57**	22.08 ± 1.43	22.15 ± 1.87 [#]	23.19 ± 1.13 ^{##}	22.88 ± 0.66 ^{##}
	P/(ng/mL)	2.45 ± 0.23	2.23 ± 0.10**	2.30 ± 0.12	2.32 ± 0.10	2.38 ± 0.18 [#]	2.32 ± 0.10
	E/(pg/mL)	27.16 ± 1.51	25.69 ± 1.64 [*]	26.24 ± 1.43	27.73 ± 1.14 ^{##}	26.29 ± 0.78	25.91 ± 1.36
	P/(ng/mL)	2.84 ± 0.12	2.64 ± 0.13**	2.78 ± 0.1 [#]	2.80 ± 0.14 [#]	2.69 ± 0.11	2.77 ± 0.13 [#]
	LH/(mIU/mL)	7.41 ± 0.46	7.68 ± 0.31	7.58 ± 0.3	7.30 ± 0.37 [#]	7.43 ± 0.25	7.48 ± 0.17
血清 Serum	FSH/(IU/L)	1.53 ± 0.13	1.73 ± 0.12**	1.58 ± 0.07 [#]	1.94 ± 0.14 ^{##}	1.81 ± 0.19	1.68 ± 0.06
	VEGF/(pg/mL)	49.52 ± 4.64	45.51 ± 3.43 [*]	49.80 ± 3.89 [#]	52.10 ± 3.47 ^{##}	49.27 ± 3.45 [#]	48.33 ± 2.05
	T/(pg/mL)	53.75 ± 1.97	51.66 ± 3.37	50.98 ± 2.5	51.23 ± 2.05	49.54 ± 1.77	49.01 ± 3.65
	芳香化酶/(ng/mL) Aromatase/(ng/mL)	1.81 ± 0.15	1.58 ± 0.06**	1.56 ± 0.10	1.50 ± 0.12	1.52 ± 0.08	1.53 ± 0.10

注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。
Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$.

2.6 桑寄生水煎液对孕鼠子宫内膜上相关因子表达的影响

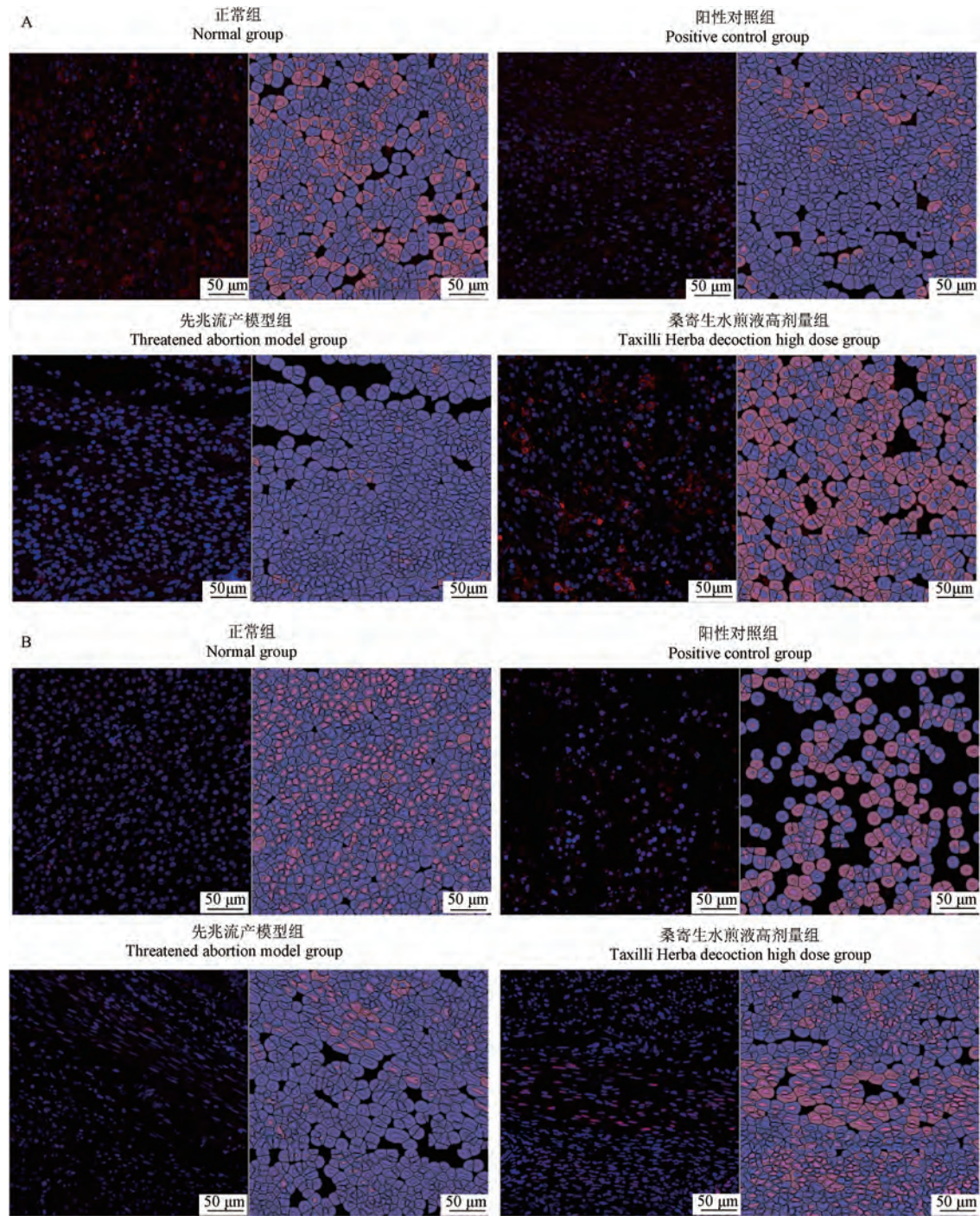
与正常组比较,先兆流产模型组子宫内膜上 PR 的表达显著下降 ($P < 0.05$);与先兆流产模型

组比较,桑寄生水煎液高、中剂量 ER 的表达显著升高 ($P < 0.05$),阳性对照组中 PR、VEGFR2、CD31 的表达显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (表 4,图 2,图 3)。

表 4 桑寄生水煎液对孕鼠子宫内膜上 ER、PR、VEGFR2、CD31 阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

Table 4 Effect of Taxilli Herba aqueous decoction on the positive rates of ER, PR, VEGFR2 and CD31 in the endometrium of pregnant rats ($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

组别 Groups	ER	PR	VEGFR2	CD31
正常组 Normal group	19.49 ± 13.10	46.30 ± 8.05	41.46 ± 10.91	14.35 ± 4.85
先兆流产模型组 Threatened abortion model group	3.49 ± 0.74	15.30 ± 4.40 [*]	27.22 ± 13.27	11.44 ± 6.71
阳性对照组 Positive control group	7.71 ± 5.56	58.39 ± 23.04 ^{##}	70.15 ± 8.03 [#]	31.75 ± 21.03 [#]
桑寄生水煎液高剂量组 Taxilli Herba decoction high dose group	35.64 ± 24.54 [#]	35.02 ± 14.63	52.35 ± 21.85	24.84 ± 4.98
桑寄生水煎液中剂量组 Taxilli Herba decoction medium dose group	38.58 ± 23.43 [#]	38.00 ± 10.30	48.00 ± 15.57	24.38 ± 7.55
桑寄生水煎液低剂量组 Taxilli Herba decoction low dose group	14.73 ± 7.32	22.50 ± 22.80	58.38 ± 33.30	16.78 ± 13.36



注:A:ER 免疫荧光染色扫描结果;B:PR 免疫荧光染色扫描结果。

图 2 子宫内膜免疫荧光染色扫描结果

Note. A. ER immunofluorescence staining scan results. B. PR immunofluorescence staining scan results.

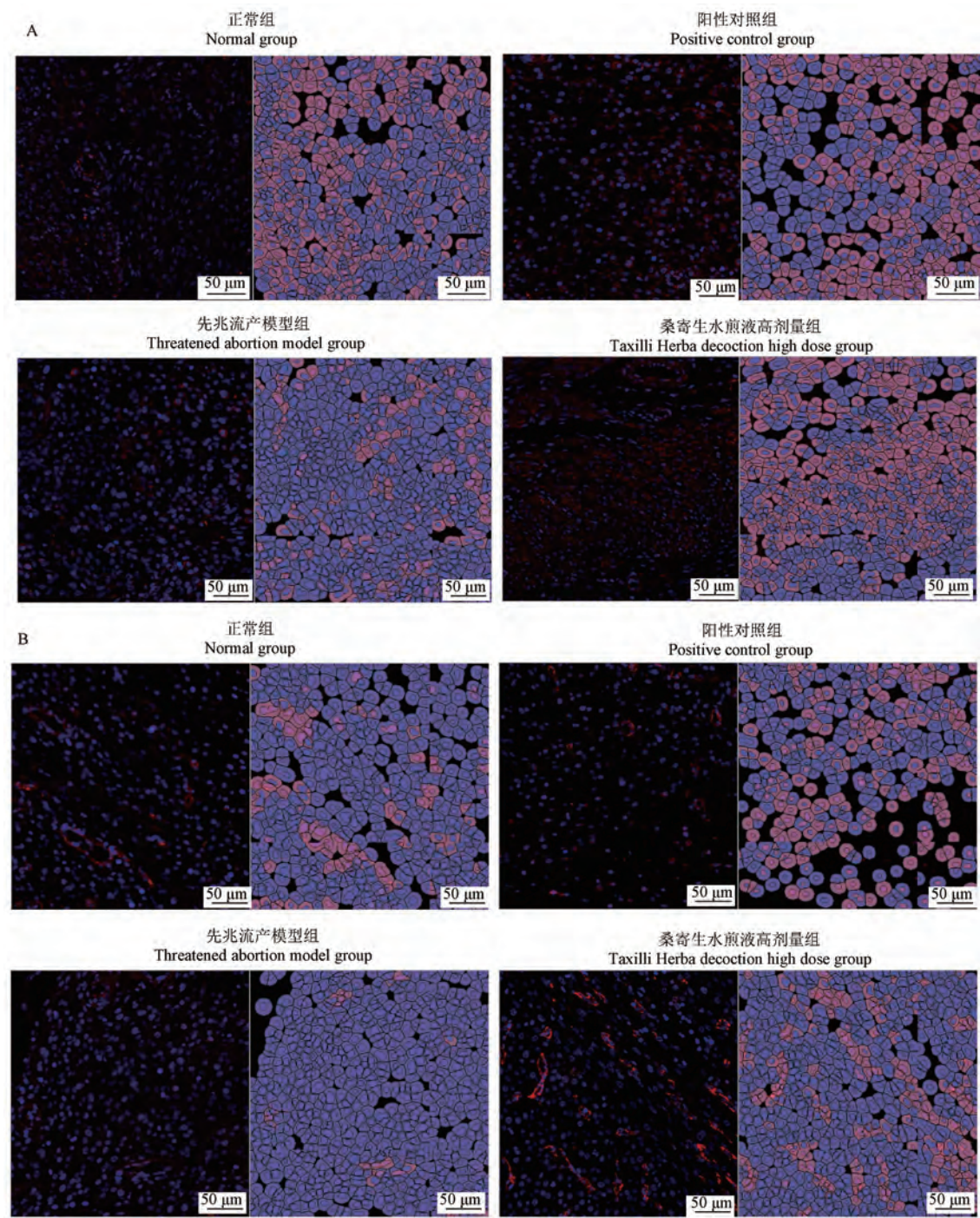
Figure 2 Results of endometrial immunofluorescence staining scan

3 讨论

3.1 桑寄生对先兆流产的治疗效果

桑寄生补肝肾,安胎元,自古被中医用于治疗妇人胎漏、胎动不安,现代广泛用于治疗先兆

流产。目前,常见的流产动物模型分为内分泌功能障碍型和免疫功能异常型,诱导内分泌障碍的药物包括溴隐亭和米非司酮^[19]。采用米非司酮构建先兆流产模型的方法目前比较公认,米非司酮作为一种孕酮受体水平的抗孕激素药,可对



注：A；VEGFR2 免疫荧光染色扫描结果；B；CD31 免疫荧光染色扫描结果。

图 3 子宫内膜免疫荧光染色扫描结果

Note. A. VEGFR2 immunofluorescence staining scan results. B. CD31 immunofluorescence staining scan results.

Figure 3 Results of endometrial immunofluorescence staining scan

早、中期妊娠大鼠发挥良好的抗生育作用^[5]，故本研究采用米非司酮灌胃的方法构建先兆流产模型。地屈孕酮作为天然孕激素，有稳定的生物利用度及高度的生物活性，且副作用小^[20]，因此本文选择地屈孕酮作为阳性药进行研究。结果

显示造模雌鼠出现阴道出血的现象，萎靡不振、活动度降低、向腹蜷缩等表现，符合临床上先兆流产下腹坠痛、阴道少量出血的症状，提示造模成功。桑寄生和地屈孕酮给药后，孕鼠的体征与子宫状态均有不同程度的改善，阴道出血率和流

产率均显著降低,由此证明,桑寄生和地屈孕酮对先兆流产模型大鼠具有明显的安胎作用。

3.2 桑寄生对下丘脑-垂体-性腺轴的调节机制

下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonad, HPG)轴分泌功能紊乱是先兆流产发病的主要机制之一。健康状态下,下丘脑可分泌促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), LH、FSH 和泌乳素(prolactin, PRL), PRL 作用于乳腺,促进乳腺发育并分泌产生乳汁。FSH 可以促进卵泡发育和成熟,促进卵巢生长;黄体生成素可以促进发育成熟的卵泡分泌 E、排卵,并促进卵巢内黄体的生成和维持,以正常分泌 E、P^[21]。本实验大鼠处于孕期,故孕期激素主要来源于黄体的分泌,而黄体的生成和维持一方面有赖于 LH 的正常分泌,另一方面与卵巢的功能息息相关^[22]。相关研究发现,米非司酮可以拮抗 P 的分泌,抑制卵泡发育,非竞争性拮抗 E 的分泌^[5]。本研究发现,造模后,米非司酮拮抗了 E、P 的分泌,在负反馈调节下,位于 HPG 轴上游的垂体分泌的 LH、FSH 含量升高,同时由于抑制卵巢的正常分泌功能,使得卵巢处于衰退状态。桑寄生给药后,一方面直接改善卵巢的分泌功能,使得 E、P 含量升高;另一方面, E、P 含量的升高,又削弱 HPG 轴的负反馈调节作用,使 LH 分泌趋缓,同时促进 HPG 轴上 FSH 的持续分泌,改善卵巢的衰退状态,并协同 LH 保证卵巢中黄体的正常功能,间接保证 E、P 的正常分泌,维持胎儿的正常发育。故给药后桑寄生水煎液高、中剂量组 FSH 含量升高,与子宫形态结果中桑寄生水煎液高、中剂量组较阳性对照组、桑寄生水煎液低剂量组更加完整、阴道出血率和流产率也相对更低的现象具有一致性。

3.3 桑寄生对子宫内膜血管的调节机制

此外,母胎界面血管重铸是妊娠正常进行的前提和保障,蜕膜血管新生障碍也会导致先兆流产^[23]。VEGF 作为最有效的促血管生成因子,广泛存在于胚胎发育和血管生成中, VEGFR2 是其功能性受体,广泛存在于子宫血管内皮细胞。血液中释放的 VEGF 可与子宫血管内皮细胞中的 VEGFR2 结合,作用于血管内皮细胞,增加血管通透性,促进血管新生^[24-26]。研究表明,卵巢分泌的 P 可与蜕膜基质细胞上的 PR 结合,刺激蜕膜

基质细胞分泌 VEGF-A,而 VEGF-A 与 VEGFR2 结合,启动“VEGF/VEGFR2”血管生成信号通路,进而促进蜕膜血管的生成^[27],因此 P 的含量高低可间接影响蜕膜血管的生成。另有研究表明, E 可与子宫内膜上的 ER 结合,直接启动“VEGF/VEGFR2”血管生成信号通路^[28]。结果显示,造模后,孕鼠血清中 VEGF 含量显著降低,蜕膜组织中 PR、ER、VEGFR2、CD31 的表达均受到抑制。桑寄生给药后,不仅纠正了上游 HPG 轴的功能促进 E、P 的正常分泌,还升高血清中 VEGF 的含量,增强蜕膜组织中 PR、ER、VEGFR2、CD31 的表达, E、P 又与子宫内膜上的 ER、PR 受体结合,启动了蜕膜组织血管生成信号通路^[27,29-30],激活了蜕膜组织中 VEGFR2 受体的表达,增强了 VEGF 与 VEGFR2 的结合力, VEGF 得以顺利参与蜕膜血管新生和重塑,进而维持了子宫的稳态和母胎界面的血流灌注^[30]。

综上,桑寄生对先兆流产大鼠具有明显安胎作用,其作用机制可能与两方面有关:(1) HPG 轴方面,桑寄生在 HPG 轴上游促进 FSH 的持续分泌,维持卵巢和黄体的功能性,间接促进 E、P 的分泌;同时在下游作用于卵巢,直接促进黄体分泌 E、P;(2) 子宫内膜血管方面,增强“P/PR/VEGF/VEGFR2”、“E/ER/VEGF/VEGFR2”通路的表达活性,促进蜕膜血管的生成和重塑,改善蜕膜组织血管的新生障碍和母胎血流灌注,进而保证胚胎的生长发育。

参 考 文 献(References)

- [1] 中国医师协会生殖医学专业委员会, 乔杰. 孕激素维持妊娠与黄体支持临床实践指南 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2021, 41(2): 95-105.
Chinese Association of Reproductive Medicine, QIAO J. Clinical practice guidelines for progesterone in pregnancy maintenance and luteal phase support [J]. Chin J Reprod Contracept, 2021, 41(2): 95-105.
- [2] GREENE M F. Progesterone for threatened abortion [J]. N Engl J Med, 2019, 380(19): 1867-1868.
- [3] 金丽君, 宣柏云, 赵红玲, 等. 止血保胎饮治疗先兆流产的效果及对 β -HCG、PRL 水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(5): 1240-1242.
JIN L J, XUAN B Y, ZHAO H L, et al. Study on effect of Zhixue Baotai Yin on levels of PRL and β -HCG in patients with threatened abortion [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(5): 1240-1242.

- [4] 王松平, 刘倩晨, 陈茹. 黄体酮加 hCG 治疗反复性早期流产 29 例分析 [J]. 中国计划生育学杂志, 2007, 15(5): 316-317.
WANG S P, LIU Q C, CHEN R. Analysis of 29 cases of recurrent early abortion treated by progesterone plus hCG [J]. Chin J Fam Plan, 2007, 15(5): 316-317.
- [5] 陈燕. 小剂量米非司酮治疗子宫肌瘤的临床效果 [J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(28): 102-104.
CHEN Y. Clinical efficacy of low-dose mifepristone in the treatment of uterine fibroids [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2021, 14(28): 102-104.
- [6] 郑新, 秦小莲, 王缉义, 等. 黄体酮在妇产科外领域的研究及临床应用进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(16): 2292-2295.
ZHENG X, QIN X L, WANG J Y, et al. Progress in research and clinical application of progesterone in fields other than obstetrics and gynecology [J]. Chin Pharm, 2016, 27(16): 2292-2295.
- [7] 刘小清, 刘婕, 龙凯欣, 等. 黄体酮制剂的不良反应与临床合理用药 [J]. 医学理论与实践, 2015, 28(20): 2836-2838.
LIU X Q, LIU J, LONG K X, et al. Adverse reactions of progesterone preparations and rational clinical medication [J]. J Med Theory Pract, 2015, 28(20): 2836-2838.
- [8] 高悦, 高月平. 中医药治疗先兆流产临床研究进展 [J]. 河北中医, 2014, 36(5): 774-777.
GAO Y, GAO Y P. Progress in clinical research on the treatment of threatened abortion with traditional chinese medicine [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2014, 36(5): 774-777.
- [9] 关木馨, 王宇, 朱梦一, 等. 寿胎丸治疗早期先兆流产研究进展 [J/OL]. [2024-10-14]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20241012.1853.027.html>.
GUAN M X, WANG Y, ZHU M Y, et al. Research progress in the treatment of early threatened abortion [J/OL]. [2024-10-14]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20241012.1853.027.html>.
- [10] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗先兆流产临床应用指南(2024 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(11): 1285-1294.
Standardization Project Group of the Clinical Application Guidelines for Chinese Patent Medicines in Treating Dominant Disease Types. Clinical guidelines of treating threatened abortion by traditional Chinese patent medicines (2024) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2024, 44(11): 1285-1294.
- [11] 陈企望. 神农本草经注 [M]. 北京: 中医古籍出版社; 2018.
CHEN Q W. Annotations on Shennong's classic of materia medica [M]. Beijing: Chinese Ancient Books Publishing House; 2018.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部) [S]. 北京: 化学工业出版社; 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020) Volume I [S]. Beijing: Chemical Industry Press; 2020.
- [13] 甄权. 《药性论: 药性趋向分类论》[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社; 2006.
ZHEN Q. Yao xing lun: classification theory of medicinal tendencies [M]. Hefei: Anhui Science&Technology Publishing House; 2006.
- [14] 杨珊, 程延安, 鲍和, 等. 桑寄生的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中医药导报, 2024, 30(5): 199-202.
YANG S, CHENG Y A, BAO H, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *taxillus chinensis* [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 30(5): 199-202.
- [15] 李华莹, 陈霏帆, 崔官炜, 等. 桑寄生的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J/OL]. [2025-01-08]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1308.R.20250108.1643.004.html>.
LI H Y, CHEN F F, CUI G W, et al. Research progress of *Taxilli parasitica* and prediction and analysis of its quality markers [J/OL]. [2025-01-08]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1308.R.20250108.1643.004.html>.
- [16] 陆希, 林翠英, 张维琦, 等. 桑寄生植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(12): 209-221.
LU X, LIN C Y, ZHANG W Q, et al. Chemical components and pharmacological effect of *trib. loranthae* in China: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(12): 209-221.
- [17] 赵华伟, 汪晶, 崔瑛, 等. 基于“病证-效应-生物样本分析”方法的桑寄生补肝肾强筋骨功效物质及归经研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(4): 626-631.
ZHAO H W, WANG J, CUI Y, et al. A research of effective chemicals of *Taxillus chinensis* danser on osteoporosis and channel tropism based on disease-effect-bioanalysis [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2016, 18(4): 626-631.
- [18] 李玲玲, 管俊, 冯静, 等. 基于“病证-效应-生物样本分析”方法的桑寄生总黄酮祛风湿功效物质及归经研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 2203-2208.
LI L L, GUAN J, FENG J, et al. Study on the anti-rheumatism effective substances and meridian tropism of the total flavonoids of *Taxillus chinensis* (DC.) based on “syndrome-efficacy-analysis of biological samples” [J].

- Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(5): 2203–2208.
- [19] 谢宝珍, 郜洁, 曾丽华, 等. 中医妇科病证结合流产动物模型的研究思路 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 589–594.
- XIE B Z, GAO J, ZENG L H, et al. Research ideas of animal models combining spontaneous abortion with traditional Chinese medicine syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(2): 589–594.
- [20] 张宝月. 地屈孕酮治疗先兆流产的临床研究进展 [J]. 中国处方药, 2019, 17(7): 26–28.
- ZHANG B Y. Clinical research progress on the treatment of threatened miscarriage with dydrogesterone [J]. J Chin Prescr Drug, 2019, 17(7): 26–28.
- [21] GOTLIEB N, MOELLER J, KRIEGSFELD L J. Circadian control of neuroendocrine function: implications for health and disease [J]. Curr Opin Physiol, 2018, 5: 133–140.
- [22] 张晨露, 潘宇, 龙亚玲, 等. 卵巢低反应人群的个体化控制性卵巢刺激的研究进展 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2022(1): 86–90.
- ZHANG C L, PAN Y, LONG Y L, et al. Progress of individualized controlled ovarian stimulation in people with poor ovarian response [J]. Chin J Reprod Contracept, 2022(1): 86–90.
- [23] CAO W, XU W, CHEN T, et al. CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells and cytokines interact with estradiol in cases of missed abortion [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(2): 417–422.
- [24] 陆莎莎. 补肾安胎冲剂调控 PI3K/Akt 信号通路改善母胎界面血管重铸的机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学; 2021.
- LU S S. Study on the mechanism of bushen antai granule regulating PI3K/Akt signaling pathway to improve maternal fetal vascular recasting [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine; 2021.
- [25] 储继军, 李伟莉, 吴献群, 等. 补肾安胎冲剂对复发性自然流产小鼠蜕膜血管内皮生长因子及其受体调控作用研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(2): 70–75.
- CHU J J, LI W L, WU X Q, et al. Regulatory effect of granule for tonifying the kidney and preventing miscarriage on decidual vascular endothelial growth factor and its receptor in mice with recurrent spontaneous abortion [J]. J Anhui Univ Chin Med, 2016, 35(2): 70–75.
- [26] 熊程俏, 李伟莉. 反复自然流产小鼠蜕膜 VEGF、VEGFR2 的表达及中药干预研究 [J]. 中医药临床杂志, 2013, 25(2): 164–166.
- XIONG C Q, LI W L. Expression of VEGF and VEGFR2 in the decidua of mice with recurrent spontaneous abortion and intervention with traditional Chinese medicine [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2013, 25(2): 164–166.
- [27] KIM M, PARK H J, SEOL J W, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy [J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(9): 1415–1430.
- [28] ALBRECHT E D, BABISCHKIN J S, LIDOR Y, et al. Effect of estrogen on angiogenesis in co-cultures of human endometrial cells and microvascular endothelial cells [J]. Hum Reprod, 2003, 18(10): 2039–2047.
- [29] 江慧敏. 基于 SDF-1 α 、E₂ 含量与 CXCR-4 的表达研究补肾安胎冲剂对肾虚流产模型 EPCs 归巢机制的影响 [D]. 合肥: 安徽中医药大学; 2020.
- JIANG H M. Based on SDF-1 α 、E₂ and CXCR-4 expression, the effect of bushenantai granule on the homing mechanism of EPCs in kidney-deficiency abortion model was studied [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine; 2020.
- [30] OTILIA M, PIRICI D, CL M. VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke [J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(4): 1283–1292.

[收稿日期] 2024-09-18

黄莉莉,肖凡,陈桂蓉,等. 结肠炎相关结肠癌小鼠模型不同阶段病理变化的动态评估 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 802–810.

HUANG L L, XIAO F, CHEN G R, et al. Dynamic assessment of pathological changes at different stages in a mouse model of colitis-associated colon cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 802–810.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.003

结肠炎相关结肠癌小鼠模型不同阶段病理变化的动态评估

黄莉莉,肖凡,陈桂蓉,邓贵方,宋锦彬,杜群,李燕舞*

(广州中医药大学科技创新中心,广州 51000)

【摘要】 目的 探讨结肠炎相关性结肠癌(colitis-associated colon cancer, CAC)小鼠模型不同时间点肠道病理发展的动态变化特征。**方法** 采用偶氮甲烷(AOM)/葡聚糖硫酸钠(DSS)构建 C57BL/6 小鼠结肠炎-癌模型,分别在造模后的第 7、10、14 周 3 个时间点取材,观测小鼠脾指数、结肠长度、质量及结肠单位长度质量;苏木素-伊红(HE)、Masson 染色观察小鼠结肠病理学变化特征;实时荧光定量逆转录 PCR 法检测不同病理阶段肿瘤干细胞标记物 CD44 及 Wnt 信号通路 *Wnt2b*、*Lrp5*、*Axin2*、*Znrf3* 基因表达;多重免疫荧光组化(mIHC)和细胞免疫荧光(IF)检测成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)、CD44、增殖标记物 Ki67、杯状细胞 MUC2 蛋白表达。同时,体外分离培养第 10、14 周模型小鼠来源的结肠类器官,观察类器官的形态及特征标记物变化。**结果** AOM/DSS 诱导 7 周模型小鼠结肠病理表现为隐窝结构减少、扭曲、分支等变化,伴随少量胶原纤维沉积,10、14 周模型小鼠结肠呈现不同程度上皮内瘤变,并随着时间延长出现高级别上皮内瘤变的比例增加,胶原纤维沉积范围增多,伴随结肠长度缩短、肠壁增厚,脾增大等现象。与正常组相比,第 14 周模型小鼠结肠 CD44、*Wnt2b* 表达显著升高($P < 0.05$),*Axin2* 表达下降($P < 0.01$)。与第 7 周相比,*Wnt2b*、*Lrp5*、*Znrf3* 表达升高($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),*Axin2* 表达下降($P < 0.01$)。多重免疫荧光组化染色显示:第 10、14 周模型小鼠结肠 FAP、CD44 表达增多,而 MUC2 表达降低。其来源的体外类器官呈现囊球样扩张,尤以 14 周模型来源的类器官更为突出,Ki67 和 CD44 在 14 周模型来源的类器官中表达明显增强。**结论** AOM/DSS 诱导的小鼠模型在 7、10、14 周可分别呈现结肠慢性炎症、低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变为主的动态病理改变,病变区域以成纤维细胞激活及上皮细胞异常增殖为特征。

【关键词】 结肠炎相关性结肠癌;结肠类器官;成纤维细胞;Wnt 通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0802-09

Dynamic assessment of pathological changes at different stages in a mouse model of colitis-associated colon cancer

HUANG Lili, XIAO Fan, CHEN Guirong, DENG Guifang, SONG Jinbin, DU Qun, LI Yanwu*

(Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)

Corresponding author: LI Yanwu. E-mail: liyanwu@gzucm.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(82274600)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82274600).

[作者简介] 黄莉莉,女,在读硕士研究生,研究方向:脾胃药理。Email:2374009048@qq.com

[通信作者] 李燕舞,女,博士,研究员,研究方向:肠道炎-癌转化机制及中药的干预作用。Email:liyanwu@gzucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the dynamic characteristics of intestinal pathological development at different time points in a mouse model of colitis-associated colon cancer. **Methods** A colitis-cancer model was established in C57BL/6 mice using azoxymethane (AOM) combined with dextran sulfate sodium (DSS). Samples were collected at 7, 10, and 14 weeks post-modeling and the spleen index, colon length, mass, and colon mass per unit length were measured. Histopathological changes in the colon were observed by hematoxylin and eosin and Masson staining. Expression levels of the cancer stem cell marker *CD44* and Wnt signaling pathway genes *Wnt2b*, *Lrp5*, *Axin2*, and *Znrf3* at different pathological stages were detected by reverse transcription quantitative real time PCR. Cancer-associated fibroblasts (FAP), *CD44*, the proliferation marker Ki67, and goblet cell MUC2 protein were detected by multiple immunofluorescence histochemistry (mIHC) and immunofluorescence. In addition, colon organoids were isolated from model mice at ten and fourteen weeks and cultured *in vitro* to observe changes in organoid morphology and marker expression. **Results** AOM/DSS-induced mice showed reduced, distorted, and branched colon crypt structures with a few collagen fibers at 7 weeks, and varying degrees of colon intraepithelial neoplasia, with an increased proportion of high-grade intraepithelial neoplasia over time and increased collagen fiber staining at ten and fourteen weeks. mRNA levels of *CD44* and *Wnt2b* in the colon were significantly increased ($P < 0.05$) and *Axin2* was decreased ($P < 0.01$) in model mice compared with control mice at fourteen week, and levels of *Wnt2b*, *Lrp5*, and *Znrf3* were increased compared with seven-week mice ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), and *Axin2* was decreased ($P < 0.01$). mIHC staining showed increased expression of FAP and *CD44* in the colon in model mice at ten and fourteen weeks, with decreased MUC2 expression. Colon organoids showed cystic dilation, especially at fourteen weeks, with more prominent expression of Ki67 and *CD44*. **Conclusions** The AOM/DSS-induced mouse model exhibited chronic colonic inflammation, low-grade intraepithelial neoplasia, and high-grade intraepithelial neoplasia at seven, ten, and fourteen weeks, respectively. The pathological microenvironment was characterized by fibroblast activation and abnormal proliferation of epithelial cells.

【Keywords】 colitis-associated colon cancer; colon organoids; fibroblasts; Wnt pathway
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结肠炎相关结肠癌 (colitis-associated colon cancer, CAC) 疾病过程复杂, 一直是医学研究的热点之一, CAC 是炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 最严重的并发症, 长期 IBD 患者十年内发生 CAC 的风险升高约 3 ~ 5 倍^[1-2]。CAC 涉及从炎症到癌变的多个复杂阶段, 病程漫长且治疗时间窗不明确, 在临床防治中尤为棘手。以往的研究大多集中在单一时间点的特定病理变化上^[3-4], 缺乏对 CAC 整个发展过程的动态评估。研究表明 STAT3、NF- κ B、Wnt 信号通路相关的细胞因子^[5-6]和特殊细胞 (如肿瘤起始细胞^[7]、成纤维细胞、帕内特细胞等) 均参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等过程, 被认为是推动炎-癌病理发展的关键因素^[8]。本研究通过构建 AOM/DSS 诱导的 CAC 小鼠模型^[9], 以成纤维细胞、肠干细胞及 Wnt 通路为切入点, 动态评估 CAC 不同病理阶段的特征, 为肠道炎-癌转化病理机制及药物干预的时间窗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 24 只雄性, 8 ~ 10 周龄, 体质量 19 ~ 21 g, 购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2022-0002】, 饲养于广州中医药大学动物实验中心【SYXK(粤)2023-0347】, 室温 22 ~ 25 °C, 湿度 40% ~ 70%, 昼夜各半循环照明, 本动物实验过程经由广州中医药大学动物伦理委员会审核批准 (20240305041)。

1.1.2 主要试剂与仪器

结直肠癌类器官试剂盒 (colorectal cancer organoid kit, Cacm)、小鼠结肠类器官试剂盒 (mouse intestinal organoid kit, Mcm)、类器官基质胶 (organoid culture ecm) 和肿瘤组织消化液 (tumor tissue digestion solution) (货号分别为: K2103-CR、K2204-MC、M315066 和 K601003, 伯桢

生物科技(苏州)有限公司);预混型定量用反转录试剂盒和 TB Green 染料法标准型定量试剂盒(货号分别为:RR036A 和 RR820A,上海百赛生物技术股份有限公司广州分公司);CD44、MUC2 和 FAP(货号分别为:15675-1-AP、27675-1-AP 和 PA5-99458,广州真知生物);KI67(货号 ab15580, Abcam);氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)(货号 25843-45-2, Sigma-Aldrich 公司);葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)(货号 160110, MP Biomedicals 公司)。

荧光定量 PCR 仪(货号 1855202, 美国(BIO-RAD)公司);倒置显微镜(货号 10093070, 广州微域光学仪器有限公司);二氧化碳培养箱(货号 3111, 美国 Thermo Scientific 公司);5417R 型台式高速冷冻离心机(货号 5404GN527718, 德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

除正常组外,其余小鼠采用 AOM/DSS 诱导制备 CAC 模型:一次性腹腔注射 12 mg/kg AOM

1 周后,小鼠连续自由饮用添加 1.5% DSS 溶液 1 周,随后 2 周正常饮水,此为一个 DSS 循环。分别于第 2 个 DSS 循环结束(第 7 周)、第 3 个 DSS 循环结束(第 10 周)和第 4 个 DSS 循环结束后 1 周(第 14 周)取材(如图 1)。

1.2.2 小鼠结肠类器官的原代分离及传代

参照本实验室建立的方法提取小鼠结肠类器官。主要步骤如下:将结肠经过多次反复的清洗后剪成碎片,放入 37 ℃ 培养箱消化组织碎片,消化结束后收集并计算隐窝数量,接种至 24 孔板中,每孔正中滴加 10 μL 隐窝混悬液 + 20 μL 基质胶,使其形成圆拱状,待基质胶凝固后每孔加入 500 mL 培养基置于 37 ℃ CO₂ 培养箱中,24 h 开始成球生长,5 ~ 6 d 可传代一次。传代步骤为:用加样枪吹散基质胶并收集每孔的类器官至 1.5 mL 离心管中,于 1500 r/min, 5 min, 4 ℃ 离心后弃上清,加入 1 mL 消化液于 37 ℃ 培养箱消化 4 min,取出吹打 40 下后加入 4%(40 μL) FBS 终止消化,1500 r/min 5 min 4 ℃ 离心种板。为保证实验一致性,后续实验选用第 7 代进行实验研究。

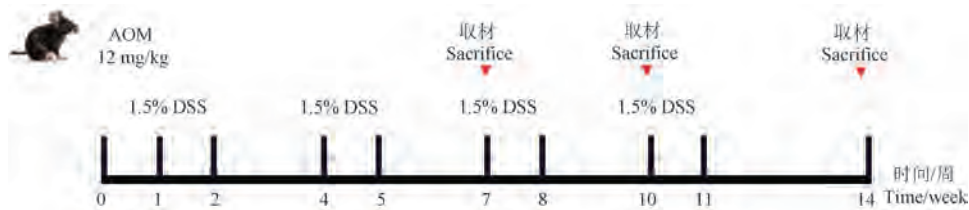


图 1 CAC 小鼠模型造模不同阶段示意

Figure 1 Schematic of different stages in the establishment of the CAC mouse model

1.2.3 实时荧光定量逆转录 PCR 反应(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测基因表达

小鼠结肠组织提取总 RNA,并逆转录为 cDNA,以 TBP 作内参基因,将各扩增反应的 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt} 计算方法得到 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.4 多重免疫荧光组化(multiplex immunohistochemistry, mIHC)、免疫荧光法(immunofluorescence, IF)

小鼠结肠组织的包埋、石蜡切片、苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色均由武汉赛维尔生物科技有限公司完成。多重免疫荧光组化:将组织白片经过脱蜡、抗原修复处理后,再使用封闭液

表 1 CD44、Wnt2b、Lrp5、Axin2、Znrf3 和 TBP 引物序列

Table 1 Primers sequence for CD44、Wnt2b、Lrp5、Axin2、Znrf3 and TBP

引物名称 Primers name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
CD44	F:ACTTTGCCTCTTGCACTTGAG R:TTTCTCCACATGGAATACACCTG
Wnt2b	F:CCGACGTGTCCCCATCTTC R:GCCCCTATGTACCACCAGGA
Lrp5	F:ACGTCCCCTAAGGTTCTCTTC R:GCCAGTAAATGTCGGAGTCTAC
Axin2	F:ATGACTAGCGCCGTGTTAGTG R:GGGCATAGGTTTGTTGGACT
Znrf3	F:GGCGACTATACCACCCACAC R:CTTCACCACTCTACCCAGC
TBP	F:ATGATGCCTTACGGCACAGG R:GTTGCTGAGATGTTGATTGCTG

对组织进行 1 h 的孵育,以阻断非特异性结合。随后,依次进行一抗和二抗的孵育,并与荧光染色放大信号孵育,镜下确认染色情况后第二轮修复和染色,重复步骤直至三重染色结束。最后滴加 DAPI 进行细胞核染色封片,荧光显微镜观察。免疫荧光:结肠癌类器官接种于 96 孔板中,使用 4% 多聚甲醛固定、经过通透封闭处理后,加一抗孵育过夜,次日滴加荧光二抗和 DAPI 复染核,荧光显微镜下观察。

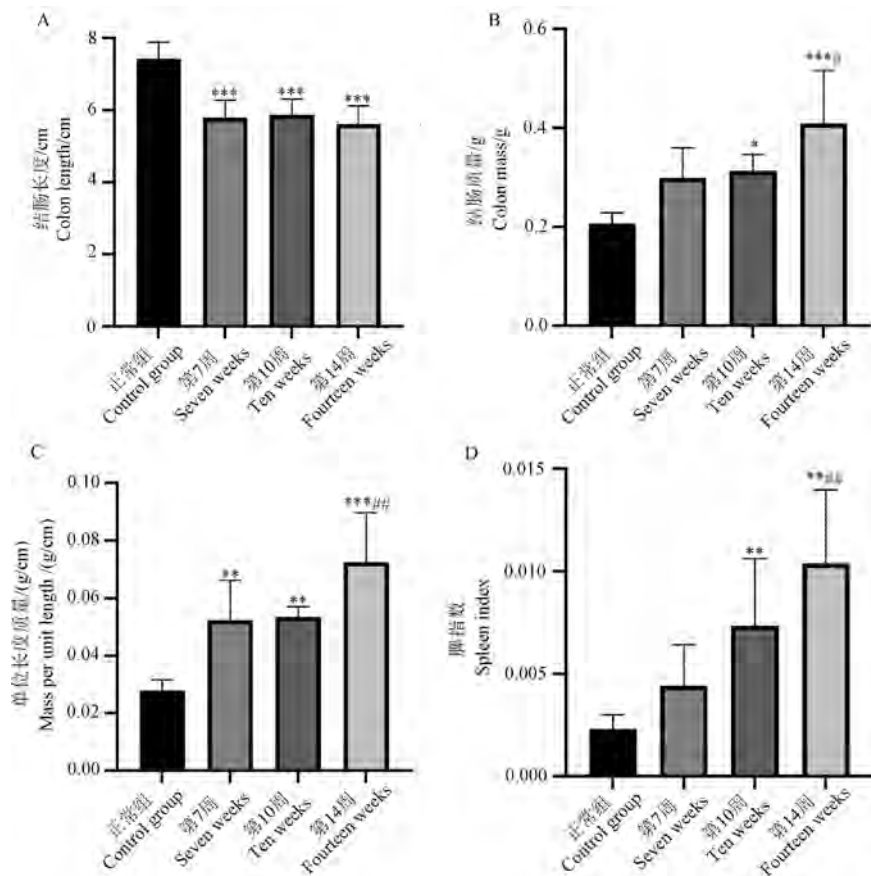
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析实验数据。统计分析采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 CAC 模型小鼠不同阶段结肠长度、质量、结肠单位长度质量和脾指数变化

如图2与正常组相比,第7、10、14周模型小



注:A:结肠长度;B:结肠质量;C:单位长度质量;D:脾指数;与正常组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与第7周相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。(下同)

图2 结肠长度、质量、结肠单位长度质量、脾指数($n = 6$)

Note. A. Colon length. B. Colon mass. C. Mass per unit length. D. Spleen index. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with seven weeks, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

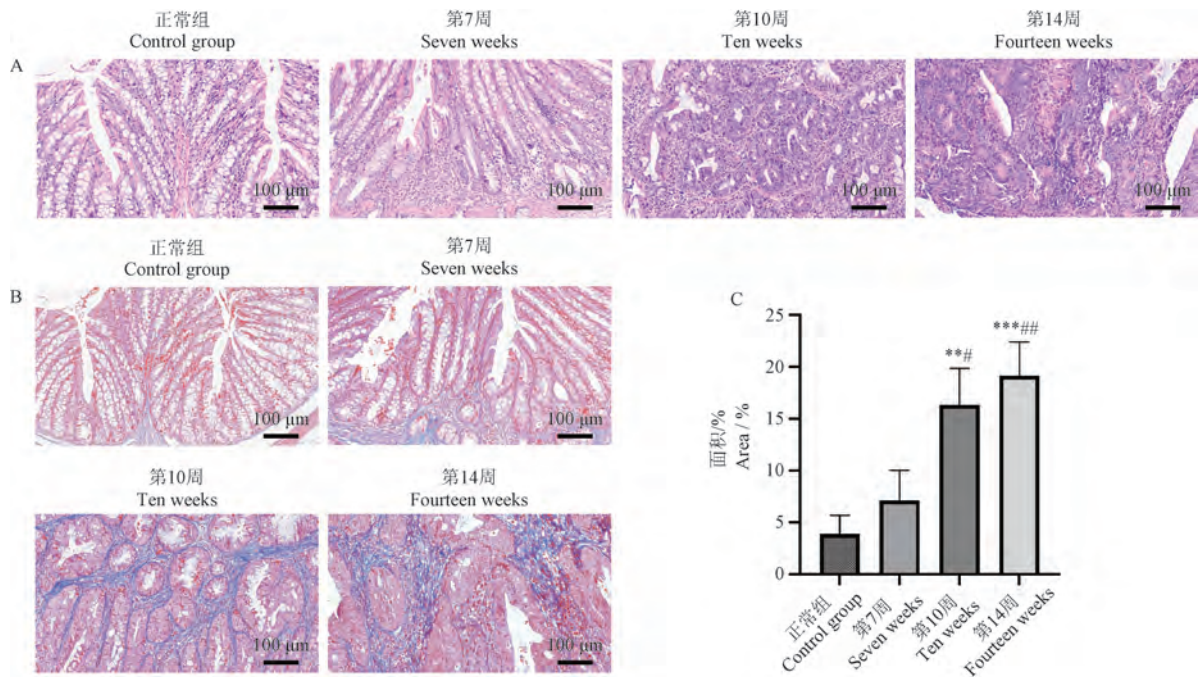
Figure 2 Length of the colon, mass of the colon, mass per unit length of the colon and spleen index($n = 6$)

鼠的结肠长度显著缩短($P < 0.001$);与正常组相比,第10、14周结肠质量升高($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$);与第7周相比,14周结肠质量升高($P < 0.05$);与正常组相比,第7、10、14周结肠单位长度质量(质量/长度)显著升高($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$);与第7周相比,14周结肠单位

长度升高($P < 0.01$);与正常组相比,第10、14周脾指数均显著升高($P < 0.01$);与第7周相比,第14周脾指数显著升高($P < 0.01$)。

2.2 CAC 模型小鼠不同阶段结肠病理形态、Masson 染色及胶原纤维面积

如图3正常组小鼠结肠腺体排列规整,可见



注:A:HE 染色;B:Masson 染色;C:结肠胶原纤维面积。

图3 CAC 模型小鼠结肠不同病理阶段形态及胶原纤维面积

Note. A. HE staining. B. Masson staining. C. Area of colonic collagen fibers.

Figure 3 Morphological features and collagen fiber area of the colon at different pathological stages in the CAC mouse model

大量的杯状细胞,无明显炎性细胞浸润,黏膜下层和肌层无改变;第7周模型小鼠结肠腺体数量减少,排列紊乱,部分腺体结构扭曲变形,可见炎性细胞浸润或者结节状淋巴节细胞聚集,甚至出现隐窝脓肿、肠壁增厚等炎性病理阶段表现。第10周腺体结构紊乱,大小不一,杯状细胞及细胞内黏液减少,细胞核极性发生改变,可见腺瘤样变等低级别上皮内瘤变改变。第14周细胞核极性破坏更明显,部分样本结肠病理显示腺体破坏严重、腺体可侵犯黏膜下层及肌层,出现原位癌属于高级别上皮内瘤变。Masson 染色与正常组相比较,第10、14周胶原纤维沉积显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$),与第7周相比较,第10、14周胶原纤维沉积增多($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示病理等级越高,病变部位胶原纤维沉积更显著。

2.3 不同病理阶段结肠 FAP、CD44、MUC2 蛋白表达

如图4所示,正常小鼠结肠组织中很少表达成纤维细胞活化蛋白 FAP,10、14周模型小鼠的结肠组织 FAP 表达明显增多。肿瘤干细胞标记物 CD44 较少表达在正常结肠组织,而7、10、14

周模型小鼠结肠 CD44 表达依次增强,提示 CD44 可能是肠道炎-癌转化早期出现的一个标记物。杯状细胞 MUC2 在正常小鼠结肠组织中表达丰富,随着造模时间延长而表达逐渐减少,第14周模型小鼠结肠高级别上皮内瘤变区域几乎不表达 MUC2。

2.4 不同病理阶段结肠 CD44、Wnt2b、Lrp5、Axin2、Znrf3 基因表达

如图5所示,与正常组相比,第14周的 CD44、Wnt2b 基因水平明显升高($P < 0.05$), Axin2 表达下降($P < 0.01$)。与第7周相比, Wnt2b、Lrp5、Znrf3 表达升高($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), Axin2 表达下降($P < 0.01$)。提示 Wnt 信号通路的异常激活在高级别上皮内瘤变阶段更为突出。

2.5 不同病理阶段结肠类器官形态和 Ki67、CD44 荧光表达

如图6所示,正常小鼠的结肠类器官培养第7代5d时,光镜下呈现环形腺腔,腔内可见分泌物较多,提示分化细胞较多,如杯状细胞、肠内分泌细胞等肠上皮细胞^[10]。而第10周模型小鼠来

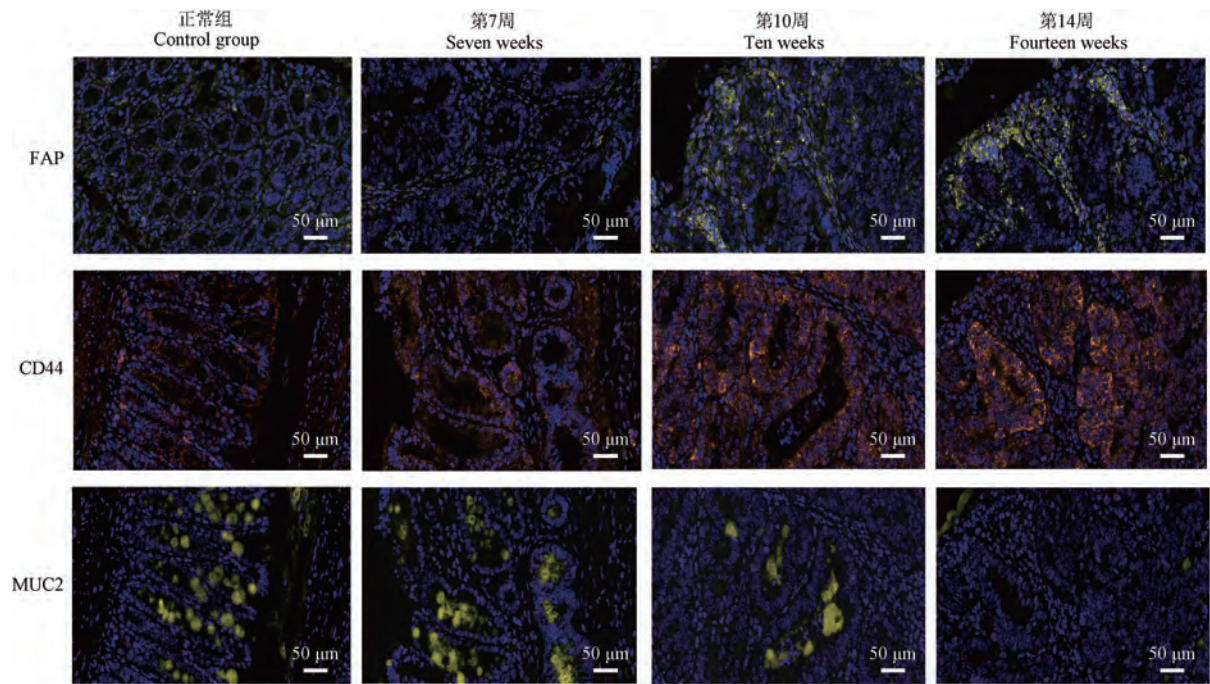


图 4 CAC 模型小鼠结肠不同病理阶段 FAP、CD44、MUC2 的蛋白表达

Figure 4 Protein expression of FAP, CD44 and MUC2 in the colon at different pathological stages in the CAC mouse model

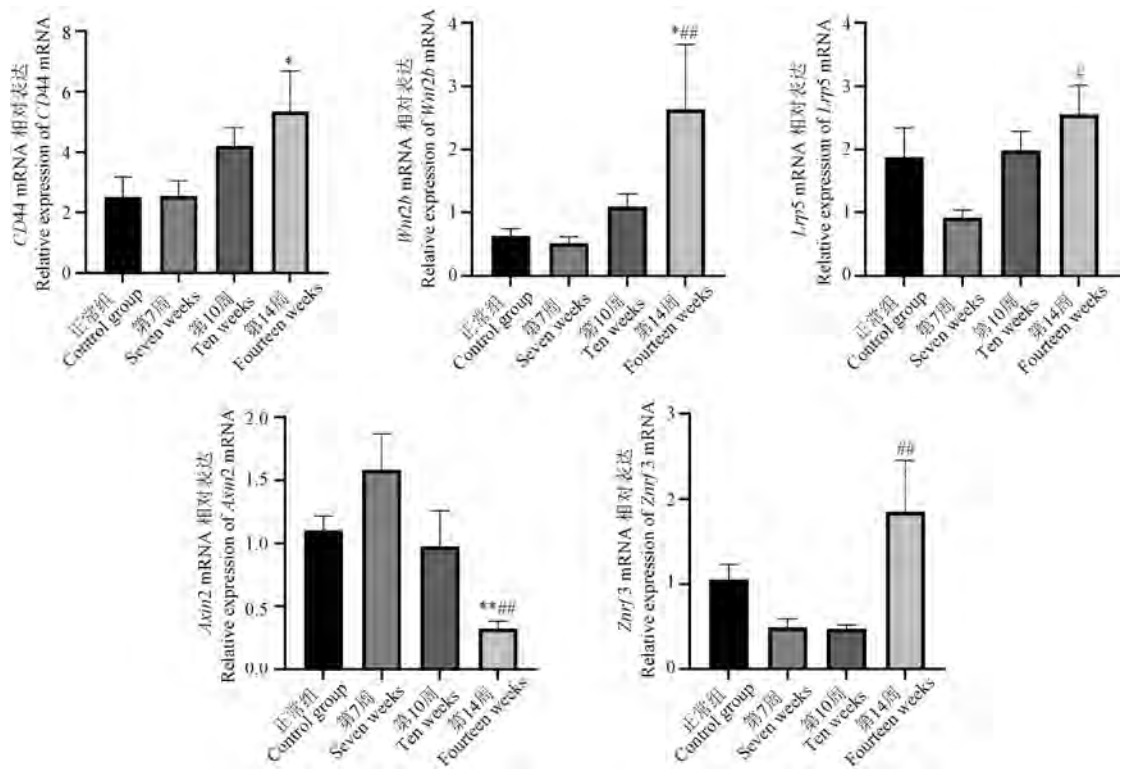
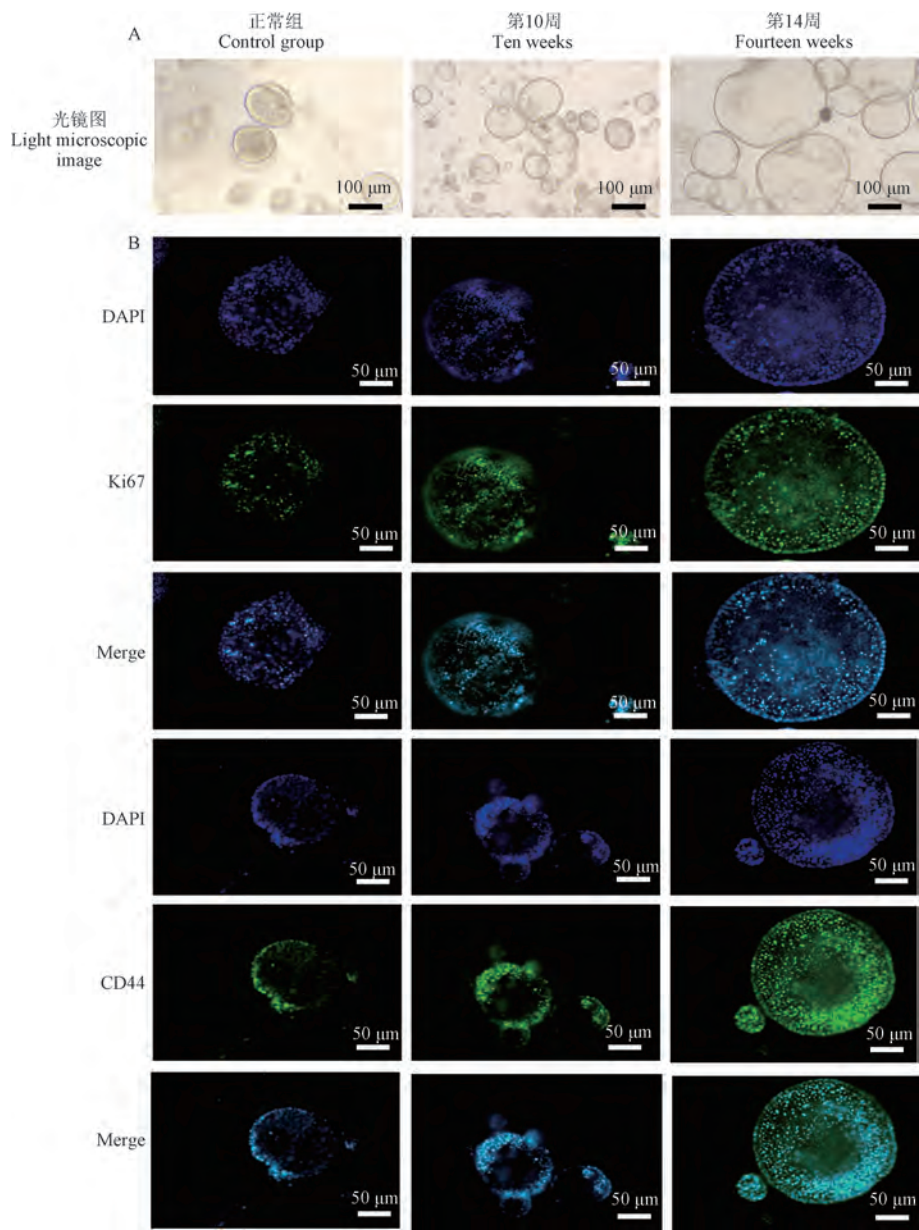


图 5 CAC 模型小鼠结肠不同病理阶段 mRNA 表达

Figure 5 mRNA expression at different pathological stages of the colon in CAC mouse model

源的第 7 代类器官直径大小与正常无明显区别，但腺腔壁明显变薄，腺腔内分泌物减少。14 周模型小鼠结肠第 7 代类器官则呈现显著增大的囊球样形态，腺腔壁薄且腔内分泌物少，形态不一，提



注:A:不同病理阶段结肠类器官形态;B:Ki67 和 CD44 荧光表达。

图 6 不同病理阶段结肠类器官形态和 Ki67、CD44 荧光表达

Note. A. Morphologies of colonic organoids at different pathological stages. B. Fluorescent expression of Ki67 and CD44.

Figure 6 Morphology of colonic organoids and fluorescent expression of Ki67 and CD44 at different pathological stages

示该阶段干细胞增殖能力增强而分化减弱。免疫荧光结果显示,14 周模型来源的结肠类器官中 Ki67、CD44 表达明显增强。

3 讨论

AOM/DSS 模型最早用于结直肠癌的发病机制和早期检测研究,这一模型通过模拟人类结直肠癌的发展过程,可进行药物效果测试、基因表达分析等^[11]。该模型中 AOM 能够诱导结直肠上

皮细胞的 DNA 损伤,促进细胞增殖^[12],DSS 则能够诱导肠道炎症,促进炎症与肿瘤的相互作用^[13]。这种模型能够模拟人类结直肠癌发生的多个关键步骤,如慢性炎症、DNA 损伤修复缺陷、细胞增殖调控失常等,有助于研究人员更好地理解结直肠癌的发病机制及潜在治疗策略。本研究的动态观察发现,第 7、10、14 周小鼠分别呈现了炎症阶段、低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变^[14-15]序列变化,病变位置以黏膜层为主,较

少出现黏膜下浸润,可模拟人类结肠癌的早期病理进展。特别是 10 周阶段,是肠道慢性炎症转化为低级别上皮内瘤变的重要转折点,该阶段腺体中出现异型细胞,细胞核上移,杯状细胞显著减少,而至 14 周时则以高级别上皮内瘤变为主,细胞增殖迅速,而分化的杯状细胞几乎消失,提示 10 ~ 14 周期间的病理阶段可能是药物干预的关键节点。从第 7 ~ 14 周 Masson 染色逐渐增多加深,表明纤维细胞活化及胶原沉积可能在炎症向癌症转化的过程中持续存在,且在高级别上皮内瘤变中更加明显^[16-18]。成纤维细胞与隐窝干细胞形成的微环境在肠道炎-癌进展中发挥重要作用,值得进一步深入研究。另外,脾指数是评估小鼠免疫功能和脾大小的指标^[19],当机体出现炎症渗出、水肿、淤血等情况时会导致脾指数升高。本研究中第 7、10、14 周的脾指数均显著升高,且呈现阶梯式上升趋势,提示肠道炎-癌进展中脾淋巴细胞可能发挥重要作用。

研究显示,在 CAC 中存在一类具备干细胞特性的肿瘤起始细胞(tumor-initiating cells, TICs),这些肠道干细胞拥有自我更新和分化的潜能,是驱动肿瘤增长的核心要素^[20]。它们可以被 CD133、CD24、CD44 和 ALDH1 等标记^[21],典型干细胞途径(如 Wnt 信号)可以驱动 TIC 表型^[22-23],同时 CD44 也属于 Wnt 信号通路靶基因之一^[24]。Wnt 信号通路可以维持肠道干细胞稳态和促进肠道再生,然而,在 CAC 中,异常激活的 Wnt 信号通路会引发肠道干细胞出现异常的增殖与分化现象。此外基质细胞-肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)也参与肿瘤生长的微环境^[25],其分泌的因子不仅加速了肿瘤细胞的生长与转移,并同时削弱了免疫细胞的效能,从而让肿瘤能够规避机体的免疫监测。Wnt 信号通路的异常激活和肿瘤相关成纤维细胞均被认为是干细胞异常增殖和肿瘤形成的动力来源。本文研究结果显示在第 14 周 CD44、Ki67、Wnt 信号通路的相关因子 *Lrp5*、*Wnt2b* 均表达升高,且 *Lrp5*、*Wnt2b* 较炎症阶段升高更显著, Wnt 抑制基因 *Axin2*^[26-27] 在第 7 周炎症阶段表达呈升高的趋势,但第 14 周表达下降,以上结果均提示存在 Wnt 信号通路激活。*Znrf3* 被认为是 Wnt 通路中的负调控因子^[28-29],它与 *Rnf43* 共同调控 Wnt 通

路^[30]。本研究中发现其在 14 周基因表达显著升高,可能是与 Wnt 信号中的其他调控因子相互影响,如 *Rnf43*,其在 CAC 进展中的作用机制有待进一步研究。此外,成纤维细胞活化蛋白 FAP 在第 10 和 14 周表达明显,提示活化的成纤维细胞可能参与肿瘤细胞的增殖过程。

肠类器官可以在体外较好地模拟肠干细胞增殖和分化过程,其中成熟的杯状细胞、肠内分泌细胞会分泌黏液,形成较厚的黏液层^[10]。LUO 等^[31]发现不同人来源的类器官保留了原发腺瘤组织的组织病理学特征、突变指纹和分子特征。本研究发现 CAC 14 周模型小鼠肠类器官直径显著增大,呈现扩张囊球样形态,且与同期正常类器官比较,囊腔内分泌物减少,提示这一阶段存在肠干细胞异常增殖,分化的肠上皮细胞减少,增殖标记物显著增高,与体内高级别上皮内瘤变的病理形态一致,为体外药物干预提供了筛选的模型。

参 考 文 献(References)

- [1] GAO H, ZHENG S, YUAN X, et al. Causal association between inflammatory bowel disease and 32 site-specific extracolonic cancers: a mendelian randomization study [J]. BMC Med, 2023, 21(1): 389.
- [2] MAJUMDER S, SHIVAJI U N, KASTURI R, et al. Inflammatory bowel disease-related colorectal cancer: past, present and future perspectives [J]. World J Gastrointest Oncol, 2022, 14(3): 547-567.
- [3] XIE Q, LI H, MA R, et al. Effect of *Coptis chinensis* franch and *Magnolia officinalis* on intestinal flora and intestinal barrier in a TNBS-induced ulcerative colitis rats model [J]. Phytomedicine, 2022, 97: 153927.
- [4] SCHEPELMANN M, KUPPER N, GUSHCHINA V, et al. AOM/DSS induced colitis-associated colorectal cancer in 14-month-old female Balb/C and C57/Bl6 mice-a pilot study [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 5278.
- [5] YANG X, WANG Q, ZHANG X, et al. Purple yam polyphenol extracts exert anticarcinogenic and anticarcinogenic-associated colorectal cancer effects through inactivation of NF- κ B/p65 and STAT3 signaling pathways [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(32): 12177-12189.
- [6] QUANDT J, ARNOVITZ S, HAGHI L, et al. Wnt- β -catenin activation epigenetically reprograms Treg cells in inflammatory bowel disease and dysplastic progression [J]. Nat Immunol, 2021, 22(4): 471-484.
- [7] BI Q, WU J Y, QIU X M, et al. Tumor-associated inflammation: the tumor-promoting immunity in the early stages of tumorigenesis [J]. J Immunol Res, 2022,

- 2022; 3128933.
- [8] ERSHAID N, SHARON Y, DORON H, et al. NLRP3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4375.
- [9] BAI B, WU F, YING K, et al. Therapeutic effects of dihydroartemisinin in multiple stages of colitis-associated colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2021, 11(13): 6225–6239.
- [10] GUSTAFSSON J K, JOHANSSON M E V. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(12): 785–803.
- [11] 褚志杰, 张敬涛, 马艳, 等. AOM/DSS 诱导小鼠结肠癌炎症转化模型的研究进展 [J]. *山东医药*, 2019, 59(17): 87–90.
- CHU Z J, ZHANG J T, MA Y, et al. Research progress of AOM/DSS-induced colorectal cancer transformation model in mice [J]. *Shandong Med J*, 2019, 59(17): 87–90.
- [12] RIEHL T E, GEORGE R J, STURMOSKI M A, et al. Azoxymethane protects intestinal stem cells and reduces crypt epithelial mitosis through a COX-I-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(6): G1062-G1070.
- [13] GAN F, LIN Z, TANG J, et al. Deoxynivalenol at No-observed adverse-effect levels aggravates DSS-induced colitis through the JAK2/STAT3 signaling pathway in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(9): 4144–4152.
- [14] SCHLEMPER R J, RIDDELL R H, KATO Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia [J]. *Gut*, 2000, 47(2): 251–255.
- [15] HURLSTONE D P, KIESSLICH R, THOMSON M, et al. Confocal chromoscopic endomicroscopy is superior to chromoscopy alone for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in chronic ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2008, 57(2): 196–204.
- [16] QIN J C, YU W T, LI H X, et al. Cold exposure and capsaicin promote 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats correlates with extracellular matrix remodeling [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(39): 6615–6630.
- [17] WANG J, ZHANG H, CHEN L, et al. CircDCBLD2 alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis via facilitating STUB1-mediated PARK7 ubiquitination degradation [J]. *J Gastroenterol*, 2024, 59(3): 229–249.
- [18] VAN DE VLEKKERT D, MACHADO E, D' AZZO A. Analysis of generalized fibrosis in mouse tissue sections with Masson's trichrome staining [J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(10): e3629.
- [19] LEE C M, LEE S S, CHOI W M, et al. An index based on deep learning-measured spleen volume on CT for the assessment of high-risk Varix in B-viral compensated cirrhosis [J]. *Eur Radiol*, 2021, 31(5): 3355–3365.
- [20] RAMADAN R, VAN DRIEL M S, VERMEULEN L, et al. Intestinal stem cell dynamics in homeostasis and cancer [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(5): 416–425.
- [21] DAVIES S, BECKENKAMP A, BUFFON A. CD26 a cancer stem cell marker and therapeutic target [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 71: 135–138.
- [22] DINARELLO A, MAY M, AMO-APARICIO J, et al. IL-38 regulates intestinal stem cell homeostasis by inducing WNT signaling and beneficial IL-1 β secretion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(45): e2306476120.
- [23] CORDERO J B, SANSOM O J. Wnt signalling and its role in stem cell-driven intestinal regeneration and hyperplasia [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204(1): 137–143.
- [24] WALTER R J, SONNENTAG S J, MUNOZ-SAGREDO L, et al. Wnt signaling is boosted during intestinal regeneration by a CD44-positive feedback loop [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 168.
- [25] MA C, YANG C, PENG A, et al. Pan-cancer spatially resolved single-cell analysis reveals the crosstalk between cancer-associated fibroblasts and tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 170.
- [26] ZHAI J, CHEN H, WONG C C, et al. ALKBH5 drives immune suppression via targeting AXIN2 to promote colorectal cancer and is a target for boosting immunotherapy [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(2): 445–462.
- [27] WANG M, XIAN P, ZHENG W, et al. Axin2 coupled excessive Wnt-glycolysis signaling mediates social defect in autism spectrum disorders [J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15(6): e17101.
- [28] FARNHAMMER F, COLOZZA G, KIM J. RNF43 and ZNRF3 in Wnt signaling-a master regulator at the membrane [J]. *Int J Stem Cells*, 2023, 16(4): 376–384.
- [29] DE LAU W, PENG W C, GROS P, et al. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(4): 305–316.
- [30] SUN T, ANNUNZIATO S, BERGLING S, et al. ZNRF3 and RNF43 cooperate to safeguard metabolic liver zonation and hepatocyte proliferation [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(10): 1822–1837.
- [31] LUO Z, WANG B, LUO F, et al. Establishment of a large-scale patient-derived high-risk colorectal adenoma organoid biobank for high-throughput and high-content drug screening [J]. *BMC Med*, 2023, 21(1): 336.

王娜,陆正峰,王明刚,等. 一种慢性肝衰竭大鼠动物模型的制备方法研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 811-822.

WANG N, LU Z F, WANG M G, et al. Preparation of a rat model of chronic liver failure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 811-822.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.004

一种慢性肝衰竭大鼠动物模型的制备方法研究

王娜¹, 陆正峰², 王明刚¹, 吴凤兰¹, 张日云³, 张荣臻¹,
冯雯倩³, 刘好³, 杜洋³, 舒发明¹, 蓝艳梅^{1*}, 毛德文^{1*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 中医临床研究重点实验室, 南宁 530023; 2. 广西壮族自治区民族医院, 南宁 530001; 3. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530299)

【摘要】 目的 制备稳定的慢性肝衰竭大鼠动物模型, 为开展相关基础研究提供造模方法。**方法** 取66只SPF级SD大鼠, 随机分为正常组18只, 造模组48只, 造模组以50% CCl₄ 橄榄油混合溶液腹腔注射, 剂量为1.5 mL/kg, 每周2次, 分别于第8、16、24周B超观察各组大鼠的肝形态、测量肝硬度值、门静脉直径、出现腹水症状后, 采集血清、血浆, 剖取肝, 肉眼观察各组大鼠肝组织变化, 检测大鼠肝功能、凝血功能, 苏木素-伊红(HE)染色观察各时间点大鼠肝组织损伤情况, Masson染色观察肝组织纤维化程度, 水迷宫实验检测各组大鼠肝性脑病发生情况, 并统计不同时间点大鼠死亡情况。**结果** 与正常组对比, 造模组大鼠出现不同程度活动减少、食欲下降、尿液变黄、腹部变大等体征; 随着造模时间延长, 超声下可见大鼠肝实质回声逐渐增高、增粗, 继发出腹水, 门静脉直径变宽并门脉高压形成; 水迷宫及血氨检测发现造模组24周大鼠出现记忆力、定向力减退, 在重度肝损伤基础上发生肝性脑病; 肉眼观察造模组大鼠肝组织外观逐渐变粗糙、凹凸不平, 最终肝体积缩小; 肝组织HE染色见不同程度肝细胞肿胀、脂肪病变、坏死; Masson染色见肝纤维化程度逐渐加重, 伴假小叶形成; 肝功能AST、ALT、TBIL水平在造模周期持续攀升, 凝血酶原时间延长, 国际标准比值升高, 血氨水平持续上升。**结论** 50% CCl₄ 橄榄油混合溶液大鼠腹腔注射24周(每周1.5 mL/kg), 能较好地再现持续慢性肝损伤病理进程, 且能在肝硬化失代偿的基础上出现慢性肝衰竭的典型病理改变及并发症, 能较好地模拟人体从肝炎→肝纤维化→肝硬化代偿期→肝硬化失代偿期→慢性肝衰竭的病理演变过程, 可作为慢性肝衰竭基础研究的模型参考。

【基金项目】 广西重点研发计划项目(桂科 AB25069020), 广西自然科学基金(2023GXNSFAA026176, 2024GXNSFBA010218, 2021GXNSFAA220112), 国家中医药传承创新中心建设项目(发改办社会[2022]366号), 国家自然科学基金(82274434, 82360912, 82160881), 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2024ky0123); 广西壮族自治区民族医院孵化项目(民科 FY202404), 广西中医药大学青年基金项目(2023QN007), 广西中医药大学第一附属医院青年基金项目(2022QN009)。

Funded by Guangxi Key Research and Development Program Project (Guike AB25069020), Guangxi Natural Science Foundation (2023GXNSFAA026176, 2024GXNSFBA010218, 2021GXNSFAA220112), Construction Project of the National Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Center (Document No. [2022]366 of the Office of the National National Development and Reform Commission in Social Affairs), National Natural Science Foundation of China (82274434, 82360912, 82160881), Guangxi University Young and Middle-Aged Teachers Research Basic Ability Improvement Project (2024ky0123), Guangxi Zhuang Autonomous Region Ethnic Hospital Incubation Project (MingkeFY202404), Guangxi University of Chinese Medicine Youth Fund Project (2023QN007), Youth Fund Project of the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine (2022QN009).

【作者简介】 王娜, 女, 学士, 副教授, 研究方向: 中医药防治肝病基础。Email: wangna0607@163.com

【通信作者】 蓝艳梅, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中医药防治肝衰竭基础。Email: lanyanmeixueshu@163.com;

毛德文, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治疑难重症肝病。Email: mdwboshi2005@163.com。

* 共同通信作者

【关键词】 慢性肝衰竭;四氯化碳;动物模型;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2025) 06-0811-12

Preparation of a rat model of chronic liver failure

WANG Na¹, LU Zhengfeng², WANG Minggang¹, WU Fenglan¹, ZHANG Riyun³, ZHANG Rongzhen¹,
FENG Wenqian³, LIU Hao³, DU Yang³, SHU Faming¹, LAN Yanmei^{1*}, MAO Dewen^{1*}

(1. Key Laboratory of Chinese Medicine Clinical Research, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Zhuang Autono Mous Region Ethnic Hospital, Nanning 530001, China; 3. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530299, China)

Corresponding author: LAN Yanmei. E-mail: lanyanmeixueshu@163.com;

MAO Dewen. E-mail: mdwboshi2005@163.com

【Abstract】 Objective To prepare a stable rat model of chronic liver failure to provide a tool for basic research. **Methods** Sixty-six SPF SD rats were divided into a normal group ($n = 18$) and a modeling group ($n = 48$). Rats in the modeling group received an intraperitoneal injection of 50% CCl₄ olive oil solution (1.5 mL/kg, twice a week). Multidimensional assessment was performed at 8, 16, and 24 weeks, respectively, including ultrasonic examination of liver morphology, hardness, portal vein diameter, and ascites, and collection of serum, plasma, and liver tissue to detect liver function, coagulation function, and blood ammonia levels. Liver tissue injury and fibrosis were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Cognitive function was assessed using the water maze test. Survival were recorded simultaneously. **Results** Rats in the model group showed decreased activity and appetite, yellow urine, and increased abdominal circumference compared with the normal group. Ultrasound showed enhanced liver parenchyma echo in the model group that thickened with time, secondary ascites formation, portal vein dilation, and portal hypertension. Water maze and blood ammonia tests confirmed cognitive decline (memory and orientation loss) and hepatic encephalopathy in the model group. Gross observation showed that the liver in the model group was atrophied and appeared rough and uneven. HE staining showed hepatocyte swelling, steatosis, and necrosis, and Masson staining confirmed fibrosis progression with pseudolobule formation. The liver function indexes AST, ALT, TBIL and blood ammonia continued to increase, and coagulation dysfunction (prolonged PT and increased INR) gradually increased with the modeling process. **Conclusions** Intraperitoneal injection of 50% CCl₄ olive oil solution (1.5 mL/kg, every week) for 24 weeks can stably simulate persistent chronic liver injury in rats and lead to the typical pathological changes and complications of chronic liver failure, based on the decompensation stage of cirrhosis. This model replicates the pathological evolution of human hepatitis from liver fibrosis → liver cirrhosis compensation → decompensation → chronic liver failure, providing a reliable modeling reference for the study of the mechanism of chronic liver failure.

【Keywords】 chronic liver failure; carbon tetrachloride; animal model; rat

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

肝衰竭(liver failure)以大面积肝细胞死亡为病理特征,该病救治难度大、病死率高,属内科危急重症之一^[1]。根据有无基础肝病、诱因与发病时间间隔以及临床表现,可分为急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)、亚急性肝衰竭(subacute liver failure, SALF)、慢加急性(亚急性)肝衰竭(acute(subacute)-on-chronic liver failure, ACLF 或

SACLF)和慢性肝衰竭(chronic liver failure, CLF) 4 类^[2]。全球数据统计发现^[3-4],全球肝病患者超过 4 亿,大部分由于病毒感染、酗酒和代谢性因素造成的慢性肝损伤,有 700 万肝病患者发展为肝硬化,最终每年有超过 40 万例发展为终末期肝病(肝衰竭和肝癌等)。在我国,早年间肝衰竭患者病死率高达 80%以上^[5],近年来随着人工肝支持

系统的开发和普及应用,内科综合治疗肝衰竭的水平较已大为提高^[6],但该病的死亡率仍维持在 50%以上^[7],其中 CLF 是在肝硬化基础上,缓慢出现肝功能进行性减退导致的以腹水、门静脉高压、凝血功能障碍和肝性脑病等为主要表现的慢性肝功能失代偿性疾病,其发病机制复杂,并发症多、病死率高,尚无针对性特效药物和手段。据统计,全世界约有 8.44 亿人患有慢性肝病,每年死于慢性肝病的患者有 200 万人^[8],其中就包含慢性肝衰竭在内。随着慢性肝病的长期进展,都有可能发展为慢性肝衰竭,因此对 CLF 发病机制的研究及治疗显得尤为重要,这对延缓慢性肝病的发展,提高终末期肝病患者的生活质量、延长生存时间具有重要意义。

当前,针对 CLF 大鼠动物模型制备方面的研究极少,造模药物、造模时间、判定标准等均缺乏一致意见。有鉴于此,本次研究致力于探索一种高效、稳定、便于操作的慢性肝衰竭大鼠动物模型,旨在为 CLF 相关基础研究提供动物模型借鉴。在本研究中,开发了一种 CLF 大鼠动物模型,通过长期低剂量给予四氯化碳(CCl_4)橄榄油腹腔注射产生慢性肝损伤逐步进展到 CLF,通过超声、水迷宫、生化等检测确认 CLF 模型的典型病理改变及并发症,为研究 CLF 的病理过程、发病机制及临床药效靶点提供动物模型参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 66 只,6 ~ 8 周龄,体重(200 ± 50) g,购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2022-0011】,饲养于广西中医药大学科学实验中心【SYXK(桂)2019-0001】。饲养环境:室内温度控制在 20 ~ 25 ℃,相对湿度控制在 50% ~ 60%,12 h 光照昼夜交替,自由进食,常规饲料饲养。本实验已获得广西中医药大学动物伦理委员会批准(DW20221017-221)。

1.1.2 主要仪器与试剂

CCl_4 (批号:20220421,购自广东光华科技股份有限公司)、橄榄油(批号:20221228,购自益海嘉里食品有限公司)、伊红(批号:C230804,购自珠海贝索生物技术有限公司)、苏木素(批号:

C23801,购自珠海贝索生物技术有限公司)、改良 Masson 三色染色试剂盒(批号:240004002,购自索莱宝生物科技有限公司)。全自动生化分析仪(中国,迈瑞,BS-240Vet)、全自动血细胞分析仪(中国,迈瑞,BC-5000)、全自动凝血分析仪(中国,赛科希德,SF-880C)、全自动脱水机(德国,徕卡,LEICA ASP300S)、组织包埋机(美国,赛默飞,Thermo HISTOSTAR)、切片机(美国,赛默飞,Thermo Shandon A788081)、展烤片机(日本,爱华,ZKPJ-1A)、封染一体机(中国,达科为,DP360 + CS500)、正置光学显微镜(日本,Olympus,BX63)、visutrack 高端行为学分析系统(中国,上海欣软,XR-VT)、彩色多普勒超声诊断仪,SL10-2 探头,探头频率 4 ~ 15 MHz,配备有剪切波弹性成像(SWE)功能等(Supersonic Imagine, Aixplorer)。

1.2 方法

1.2.1 模型构建方法、流程及分组

大鼠适应性喂养 1 周后进行实验。将 66 只大鼠分为正常组 18 只、造模组 48 只,各组自由饮食、进水。其中造模组给予 50% CCl_4 橄榄油混合溶液(CCl_4 :橄榄油 = 1:1)腹腔注射,剂量为 1.5 mL/kg,每周 2 次。正常组、造模组分别于 8、16、24 周各随机选取 6 只大鼠进行检测,并观察每个时间点正常组、造模组的大鼠死亡率等。(见图 1)。

1.2.2 标本采集

戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉无菌无热源采血,3000 r/min 离心 10 min,提取血清、血浆以全自动生化分析仪、血氨及凝血分析仪检测;剖取肝,进行各组大鼠肝外观观察,剪取大鼠肝左叶 3 cm × 4 cm 放置 4%多聚甲醛于 4 ℃ 冰箱固定保存,用于 HE 及 Masson 染色。

1.2.3 指标检测及模型鉴定

(1)大鼠一般状态观察:观察各组大鼠各个时间点的精神状态、毛发色泽、尿液、粪便、腹水等改变。

(2)大鼠生存时间分析:取材完毕,记录每周两组大鼠的死亡时间。

(3)水迷宫检测大鼠肝性脑病的变化:将各组大鼠在正式训练前 1 d 分别放入水迷宫水中自由游泳 2 min,并将其引导至平台区域,使其熟悉

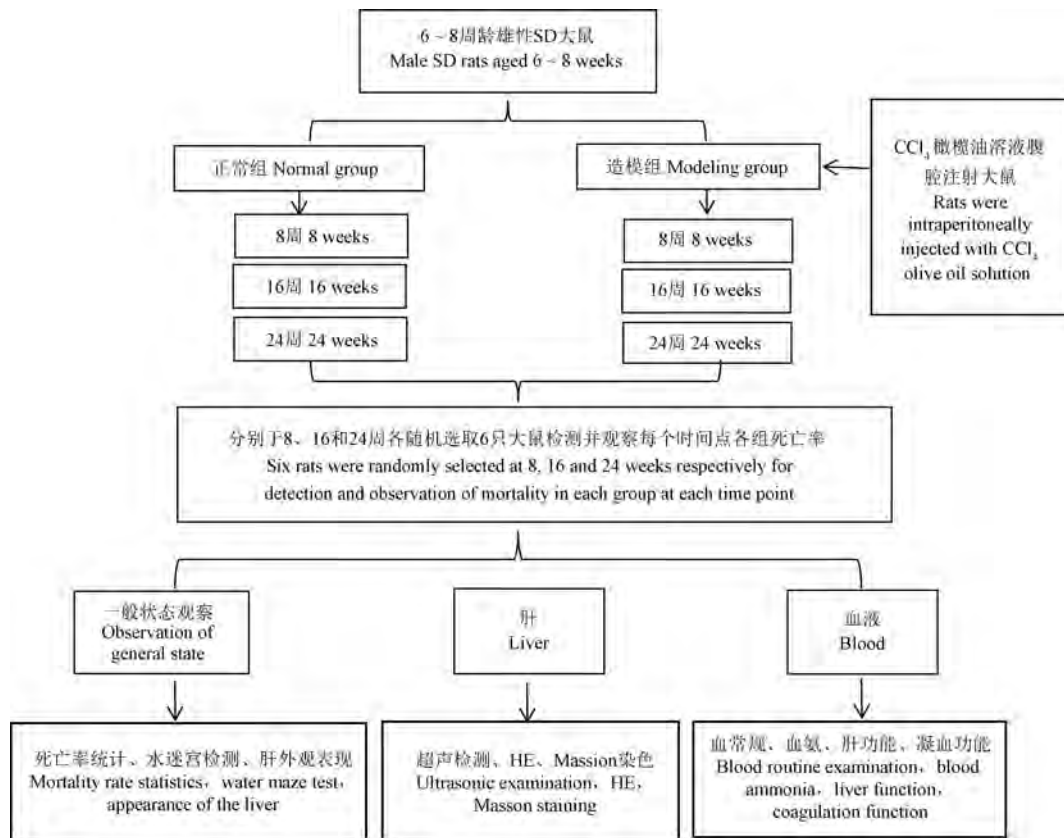


图1 实验流程

Figure 1 Experimental procedure

环境。然后对各组大鼠正式进行 Morris 水迷宫测试。使用航行定位和空间探索实验对大鼠的学习能力和记忆能力进行测试。前 5 d 进行定位航行实验,将大鼠从标记的 4 个象限入水点依次朝向池壁轻轻放入水中,采集大鼠在 60 s 内寻找到并爬上平台所用的时间(平台在第 3 象限,平台低于水位 2 cm 左右),如果大鼠 60 s 内未找到平台,需将其牵引到平台,并停留 15 s。第 6 天进行空间探索实验,撤除平台,重复上述实验,记录大鼠在 60 s 在平台所放置的目标象限停留时间和穿越平台所在区域的次数。

(4) 超声仪观察大鼠肝形态变化、腹水、肝硬度值、门静脉直径:将大鼠麻醉后,剔除上腹部毛发,利用超声仪观察肝形态、腹水、测量肝硬度值及门静脉直径。

(5) 肉眼观察肝组织形态变化,HE 染色观察肝组织病理损伤:各时间点处死大鼠,剖取肝时,对各组大鼠肝进行拍照,肉眼观察肝的变化情况。肝组织经多聚甲醛 24 h 固定后,剪取 1 cm × 0.2 cm × 0.2 cm 大小肝组织置于组织包埋盒中,

流水冲洗,将包埋盒放入全自动脱水机进行梯度脱水,包埋成蜡块,全自动切片机切成 4 μm 厚切片,烤片机上烤 40 min 后放入封染一体机进行脱蜡、水洗、染色、脱水透明,封片机封片,采集图像。

(6) Masson 染色检测大鼠肝组织的纤维沉积及评分:包埋切片脱蜡至水后在恒温培养箱中媒染液浸染,水洗甩干天青石蓝染色液滴染,水洗 2 次后,苏木素染色并酸性分化液分化,水洗终止分化;丽春红品红染色液滴染,磷钼酸溶液处理,倾去上液直接滴加苯胺蓝染色液染色;弱酸溶液洗去苯胺蓝溶液后,继续滴加弱酸溶液覆盖切片,加以 95%、无水乙醇脱水,二甲苯透明 2 次,中性树胶封固,显微镜观察图像,进行肝纤维化 Ishark 评分。

(7) 全自动血细胞分析仪检测大鼠血清的白细胞、红细胞、血小板、血氨:将 EDTA 采血管收集的全血离心后置于全自动血细胞分析仪中检测。

(8) 全自动生化分析仪检测肝功能指标(丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总

胆红素 (total bilirubin, TBil)、白蛋白 (albumin, ALB): 将真空采血管采集的全血离心后置于全自动生化分析仪中检测。

(9) 全自动凝血分析仪检测凝血功能的凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、国际标准化比值 (international normalized ratio, INR): 将枸橼酸钠采血管收集的全血离心置于全自动凝血分析仪中检测凝血功能。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行实验数据分析, 计量资料数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本间的比较采用单因素方差分析, 组间率的比较采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 造模大鼠一般情况

正常组大鼠精神状态良好, 毛发光泽, 饮食情况良好, 体质量明显增长, 二便正常。与正常组比较, 造模组 8 周大鼠出现活动正常, 食欲稍有下降, 体质量增长, 二便正常; 16 周大鼠毛发缺乏光泽, 部分大鼠出现掉毛, 活动较前减少, 逐渐出现腹部胀大, 尿液变黄, 粪便稀烂等症状; 24 周大鼠毛发枯槁, 体型瘦长, 静默怠动, 精神萎靡, 腹部胀大如鼓, 尿液少且颜色深黄, 少部分出现便溏, 眼球发白等症状 (见图 2)。

2.2 不同造模时间点大鼠死亡情况分析

实验全程共有大鼠正常组 18 只, 造模组 48

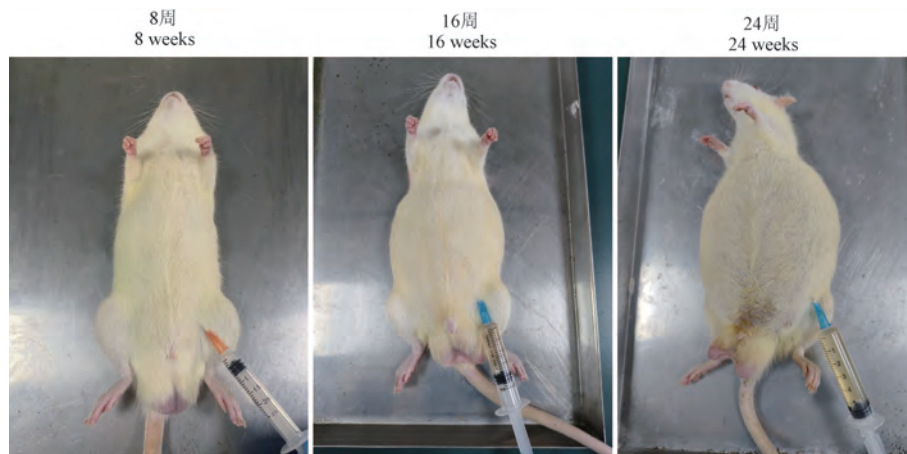


图 2 造模组不同时间点大鼠一般情况

Figure 2 General situation of rats at different time points of modeling group

只, 分别于不同时间点随机各选取 6 只取材检测, 统计不同时间点大鼠的死亡率及观察并绘制大鼠的生存曲线。随着造模时间延长, 造模组的死亡逐渐升高, 并且死亡率两两比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。造模至第 8 周结束大鼠共死亡 4 只, 至第 16、24 周结束大鼠死亡各 6 只, 说明造模时间达到 24 周时大鼠生存数显著下降 (见图 3, 表 1)。

2.3 不同造模时间点大鼠肝形态变化、腹水、肝硬度值、门静脉直径、门静脉血流速度比较

超声下可见正常组大鼠肝密度均匀, 边缘光滑; 造模组 8 周大鼠肝密度稍欠均匀, 边缘尚且光滑; 造模组 16 周大鼠肝体积增大, 肝表面凹凸不平, 肝实质回声增高、增粗, 出现腹水, 与造模组

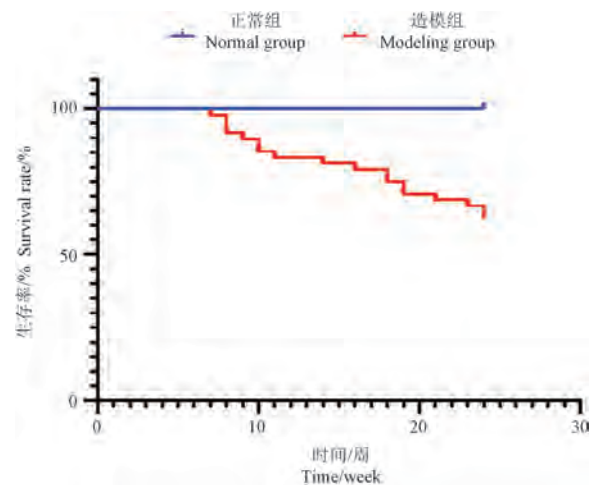


图 3 正常组与造模组生存曲线

Figure 3 Survival curve of normal group and modeling group

表 1 不同时间点大鼠的死亡率
Table 1 Mortality of rats at different time points

组别 Groups	时间点 Time points	死亡只数/ <i>n</i> Death counts/ <i>n</i>	每个时间点剩余大鼠总数/ <i>n</i> Number of remaining rats at each time point/ <i>n</i>	死亡率/% Mortality/%
8 周 8 weeks	正常组 Normal group	0	18	0
	造模组 Modeling group	4	48	8.33 *
16 周 16 weeks	正常组 Normal group	0	12	0
	造模组 Modeling group	6	38	15.79 *
24 周 24 weeks	正常组 Normal group	0	6	0
	造模组 Modeling group	8	26	34.78 *

注:与正常组相比, **P* < 0.05。(下图同)
Note. Compared with normal group, **P* < 0.05. (The same in the following figures)

8 周比较,肝硬度值显著升高(*P* < 0.0001);造模组 24 周肝体积明显缩小,与正常组 24 周大鼠比较,肝硬度值增高(*P* < 0.0001),门静脉直径增宽(*P* < 0.01),出现大量的腹水(*P* < 0.0001)。与造模组 16 周大鼠相比较,造模组 24 周大鼠的肝门静脉血流速度升高(*P* < 0.01)(见图 4)。

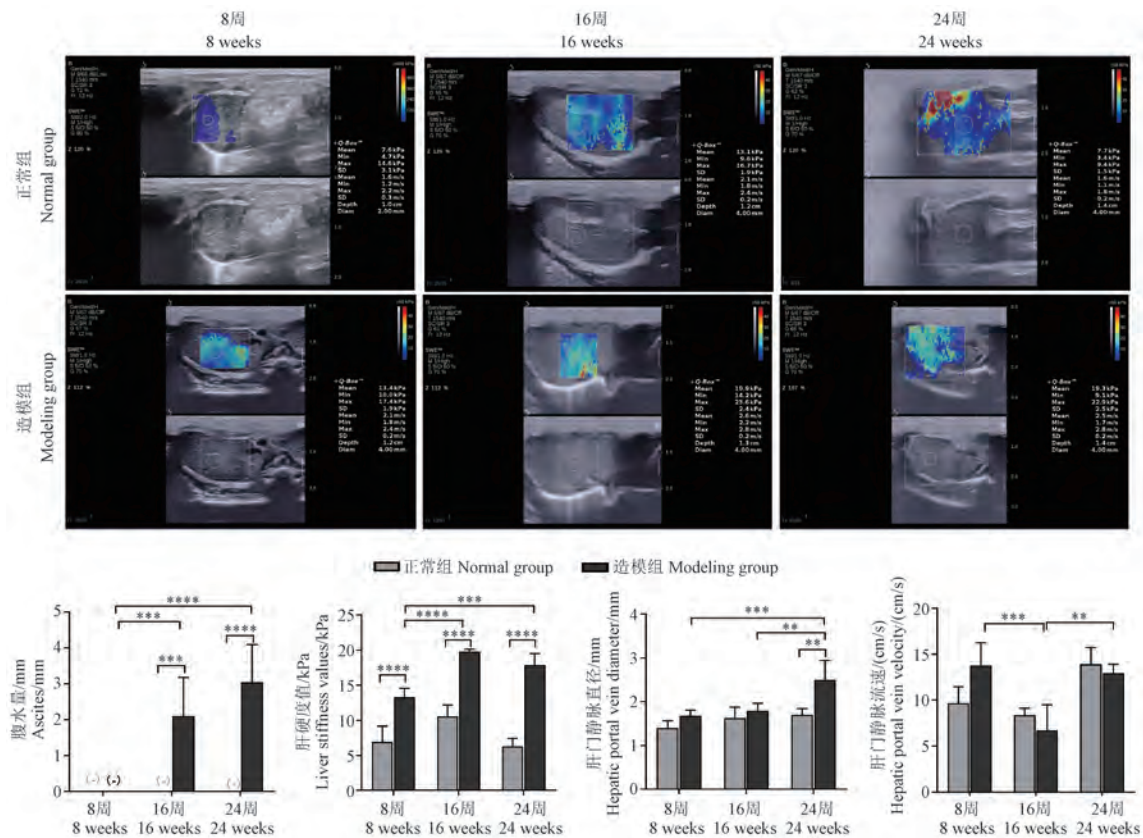


图 4 不同时间点各组大鼠肝超声数值比较
Figure 4 Comparison of ultrasonic values of rats liver in each group at different time points

Note. Compared with normal group, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001. (The same in the following figures)

2.4 不同造模时间点大鼠肝性脑病并发情况

肝性脑病是慢性肝衰竭的代表性并发症,该病由严重肝病末期引起的、以代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调的综合病征,其主要临床表现是意识障碍、行为失常和昏迷,水迷宫实验是检测肝性脑病的重要检测方法。造模组 8 周大鼠的血氨稍升高,与正常组 8 周大鼠比较无显著性差异($P > 0.05$),其水迷宫检测未见明显异常;

造模组 16 周大鼠出现血氨水平上升,造模组 24 周大鼠血氨水平显著上升,两者比较具有统计学意义($P < 0.0001$)。水迷宫数据可看出随着造模时间的延长,造模组 24 周大鼠逃避潜伏期延长,进入平台次数减少,在平台所在象限停留时间缩短,与正常组 24 周大鼠比较具有显著性差异(均有 $P < 0.05$),提示大鼠记忆力、定向力减退,出现肝性脑病(见图 5)。

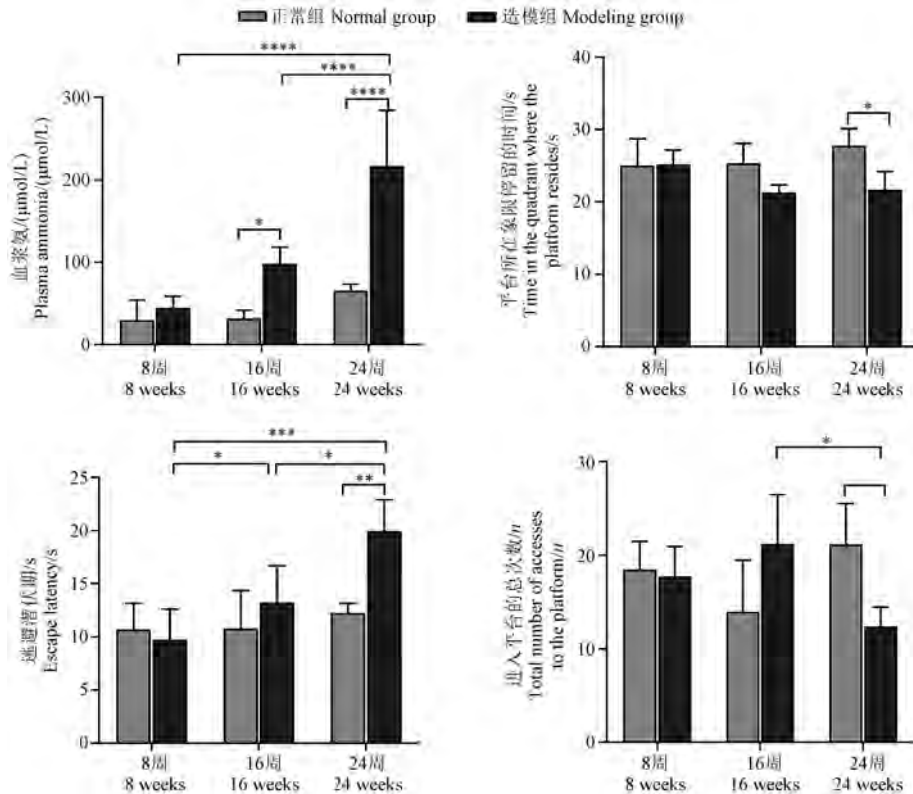


图 5 不同时间点各组大鼠血氨水平及水迷宫数据比较

Figure 5 Comparison of blood ammonia level and water maze data of rats in each group at different time points

2.5 不同造模时间点大鼠肝外观及 HE 染色情况

正常组大鼠在不同时期肝均呈鲜红色,表面光滑,质地柔软,肉眼观察未见明显异常病变。造模组 8 周大鼠肝呈鲜红色,表面稍粗糙,质地稍硬,造模组 16 周大鼠肝呈红黄色,表面凹凸不平,体积变大,质地变硬,造模组 24 周大鼠肝呈黄灰色,肝组织缩小,表面凹凸不平,质地坚硬(见图 6)。光镜下见正常组大鼠肝小叶结构清晰、完整,肝细胞及肝血窦呈放射状整齐排列,随着时间的延长,正常组 24 周大鼠肝细胞可见小泡性脂肪病变。造模组 8 周大鼠肝内可见肝小叶排列紊乱,肝血窦扩张,可见少许的炎症细胞浸润,肝细

胞相对排列整齐,肝细胞未见明显坏死;造模组 16 周大鼠肝内可见粗大纤维组织增生,纤维再分隔,假小叶形成,炎症细胞浸润,少部分肝细胞排列紊乱,肝细胞核消失,出现部分肝细胞坏死;造模组 24 周大鼠肝内出现纤维大量沉积并包绕广泛形成假小叶,假小叶内有点状、小片状肝细胞坏死增多,可见肝血窦扩张(见图 7)。

2.6 不同造模时间点大鼠肝组织 Masson 染色及 Ishark 评分

如图 8,图 9,正常组大鼠肝组织仅于汇管区和中央静脉周围有少许胶原纤维存在,细且短,各时期 Ishark 评分均为 0 分。造模组 8 周大鼠肝组织中胶原纤维形成,可相互连接形成纤维间

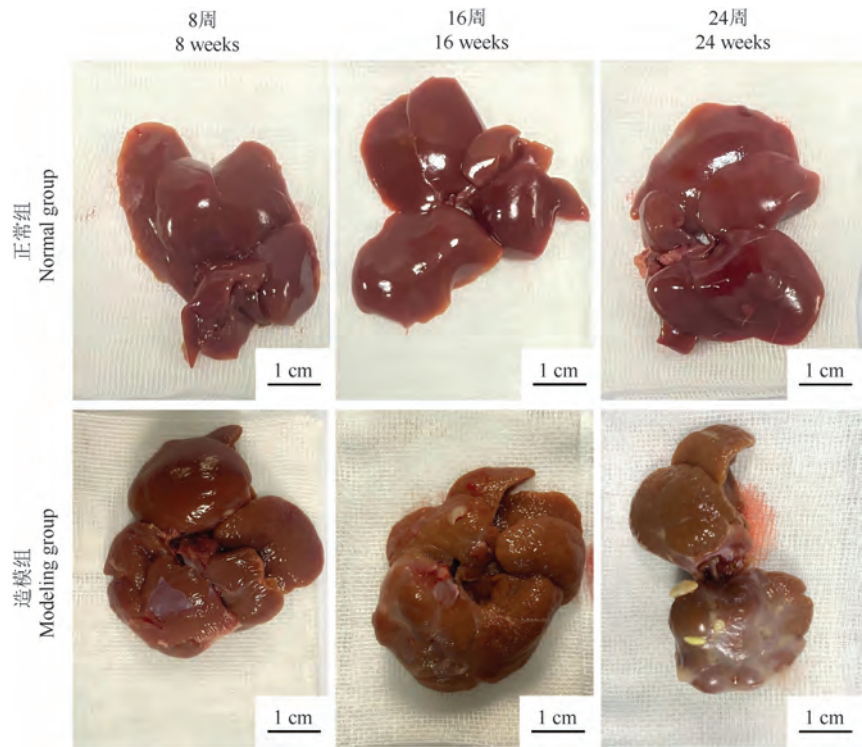


图 6 不同时间点各组大鼠肝外观

Figure 6 Liver appearance of rats in each group at different time points

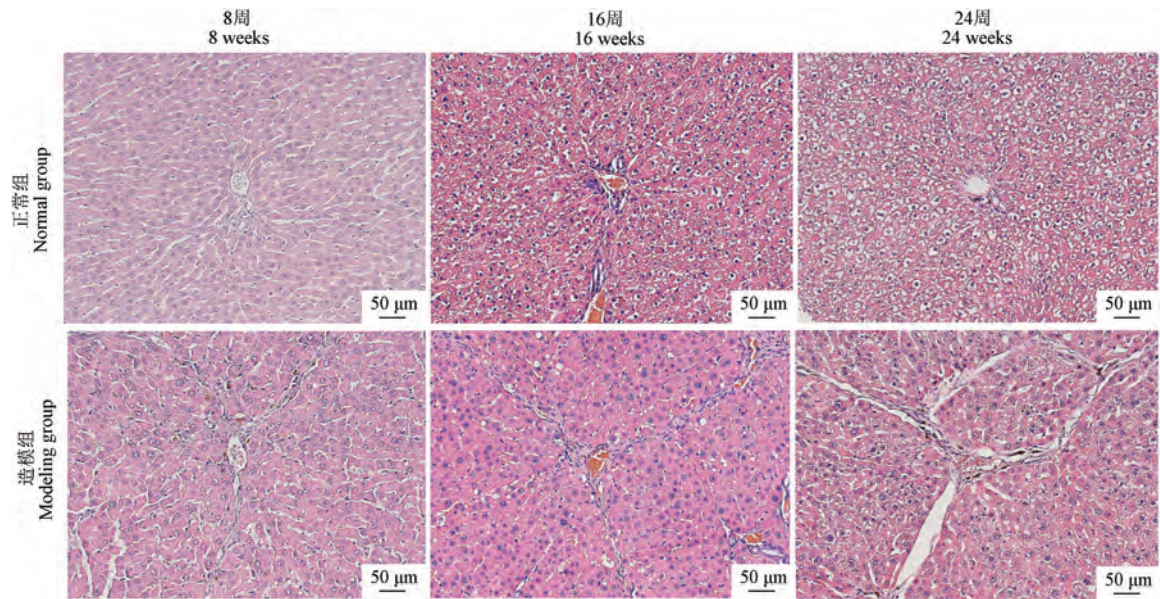


图 7 不同时间 HE 染色

Figure 7 HE staining at different times

隔,Ishark 评分为(2.64 ± 0.84)分;造模组 16 周大鼠肝组织中胶原纤维明显增多,部分已经形成假小叶,Ishark 评分为(4.0 ± 0.65)分;造模组 24 周大鼠肝组织胶原纤维变粗,假小叶广泛形成,Ishark 评分为(5.61 ± 0.5)分,组间比较均有显著性差异($P < 0.0001$)。

2.7 不同造模时间点大鼠血常规比较

与正常组比较,造模组 8、16 周大鼠的白细胞、红细胞、中性粒细胞百分比、血小板差异不大($P > 0.05$);造模组 8 周与造模组 16 周大鼠的白细胞、中性粒细胞百分比、血小板比较无显著性差异($P > 0.05$),但血小板数值有所下降;造模组

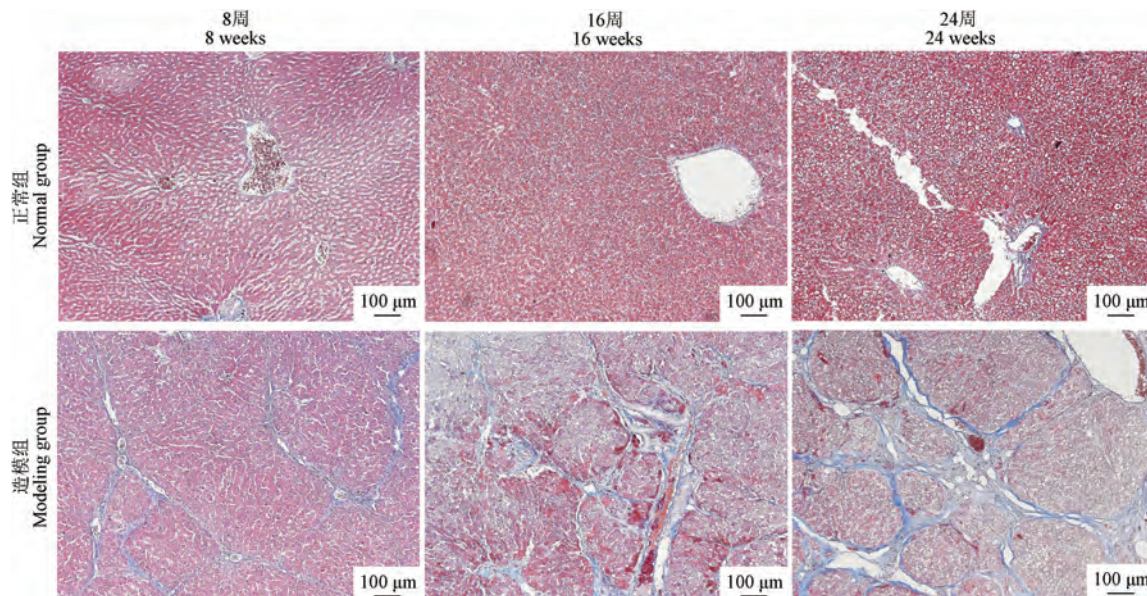


图 8 不同时间点各组大鼠 Masson 染色

Figure 8 Masson staining of rats in each group at different time points

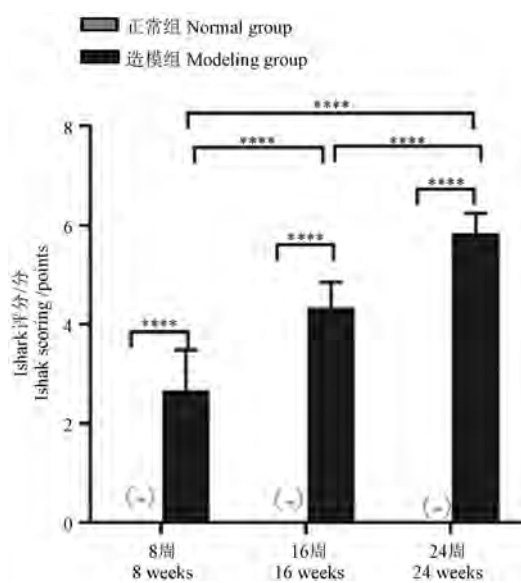


图 9 各组大鼠 Ishak 评分

Figure 9 Ishak scoring of rats in each group

16 周大鼠与造模组 24 周大鼠比较,造模组 24 周大鼠的白细胞、中性粒细胞百分比显著升高,血小板明显下降,红细胞轻度下降,说明可能存在感染;与正常组比较,随着造模时间延长,造模组的小血小板逐渐明显下降(见图 10)。

2.8 不同造模时间点大鼠肝功能变化情况

与正常组比较,造模组 8 周大鼠的转氨酶升高, TBIL 轻度升高, AST/ALT 比值、白蛋白水平无显著性差异;造模组 8 周大鼠与造模组 16 周大

鼠相比较,造模组 16 周大鼠的 AST、ALT、TBIL 显著升高 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$), AST/ALT 比值比较无差异 ($P > 0.05$), 白蛋白水平略有下降;造模组 16 周大鼠与造模组 24 周大鼠相比较,造模组 24 周大鼠的转氨酶升高幅度较造模组 16 周大鼠低, TBIL 仍显著升高(高于正常组约 5 倍), AST/ALT 比值下降明显并且更接近于 1, 说明肝细胞线粒体遭到大量破坏, AST 从线粒体和胞浆内释出;造模组 24 周大鼠白蛋白水平明显下降,与造模组 16 周大鼠比较均有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 11)。

2.9 不同造模时间点大鼠凝血功能比较

如图 12,与正常组相比,造模组 8 周大鼠凝血功能未见明显异常,随造模周期的延长,造模组 16 周大鼠 PT 出现延长 (16.5 ± 2.52) s, INR 比值增大 (1.34 ± 0.22) 小于 1.5;与造模组 16 周相比较,造模组 24 周大鼠的 PT 值显著延长 (21.88 ± 7.95) s, INR 比值显著增大 (1.80 ± 0.68) 且大于 1.5,提示凝血功能严重障碍甚至可能出血。

3 讨论

CLF 仍具有较高的发病率和死亡率,究其原因是对其发病机制及病理演变过程的研究不足,面对此类病患,如何提高其生存质量,减少并发

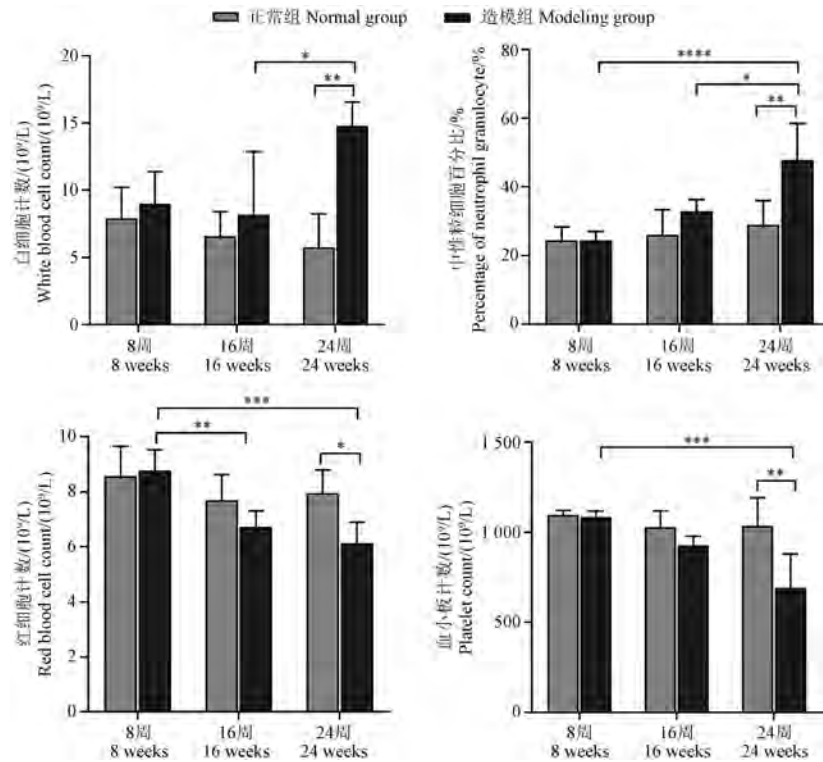


图 10 不同时间点各组大鼠白细胞、红细胞、中性粒细胞、血小板比较

Figure 10 Comparison of white blood cell, red blood cell, neutrophils and platelets of rats in each group at different time points

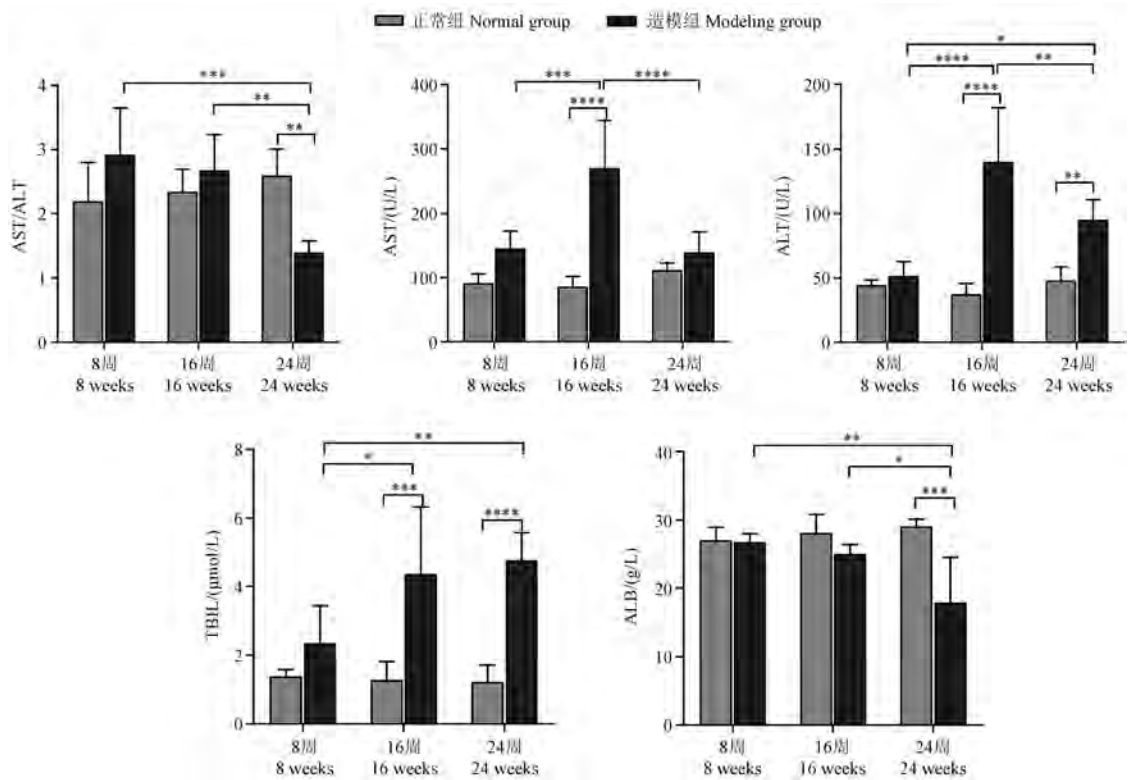


图 11 不同时间点各组大鼠肝功能对比

Figure 11 Comparison of liver function of rats at different time points

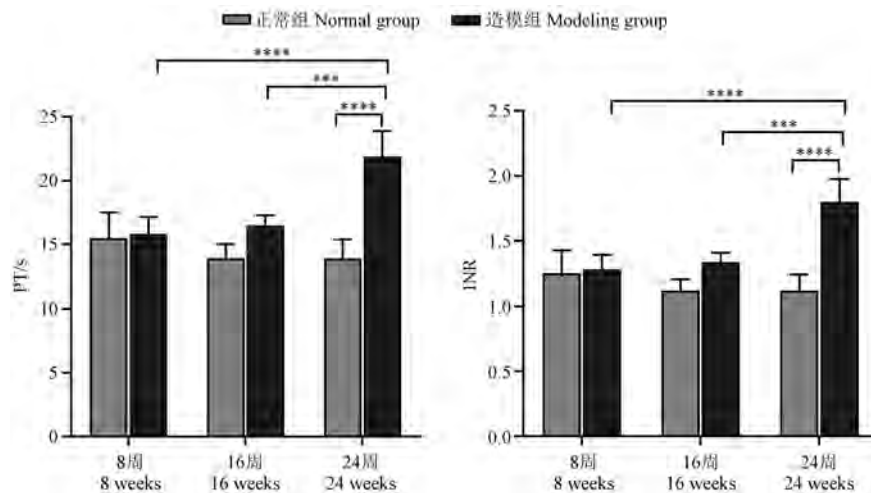


图 12 不同时间点各组大鼠凝血功能比较

Figure 12 Comparison of blood coagulation function in each group at different time points

症的发生,延长生命周期迫在眉睫^[9]。目前,该病的主要挑战之一是对潜在发病机制理解不充分,导致肝性脑病、感染和顽固性腹水等并发症的快速进展且难以挽回。现阶段,国际及国内尚未发现一种较好的 CLF 动物模型制备方法能完整地模拟人类 CLF 病理演变过程,以至于在深入理解发病机制并形成有效治疗策略方面难有创新性突破,迫切需要开发一种高效、稳定、便于操作的慢性肝衰竭大鼠动物模型,为开展相关基础研究提供关键技术支撑。

CLF 发病的前驱基础是慢性肝病/肝硬化,而肝硬化动物造模方法大多为 CCl_4 诱导法、总胆管结扎法、二甲基亚硝胺诱导法、乙醇诱导法等。目前,针对不同肝衰竭疾病动物模型构建方法有所不同,建立 ACLF 动物模型常用的方法有以下 4 种: CCl_4 联合 D-半乳糖胺/脂多糖法、肿瘤相关抗原联合脂多糖法、血清白蛋白法、胆管结扎术法。在大多数 ACLF 模型中,慢性损伤是由 CCl_4 、胆管结扎或猪血清诱导的,而急性损伤是由 D-半乳糖胺/脂多糖诱导的^[10]。相对而言,肝硬化、慢加急性肝衰竭的动物模型造模方法较多,而慢性肝衰竭的动物实验研究却止步不前,课题组致力于急性肝衰竭,慢加急性肝衰竭的基础和临床研究,在基础实验方面,经验丰富,配备有专业的科研人员,基于此,在本研究中从既往慢加急性肝衰竭及慢性肝衰竭造模实验中寻找了经验,借鉴临床 CLF 患者的病理变化特点,完整地构建了成模率高、重复性好的 CLF 大鼠动物模型。

在本研究中,设置了正常组、造模组,各组大鼠的饲养环境、饮食等情况相同,仅造模周期不同。在造模第 8 周大鼠出现转氨酶、胆红素升高,肝组织 HE、Masson 染色显示纤维形成,说明该阶段存在慢性肝炎过程;在造模第 16 周,转氨酶、胆红素显著升高,白蛋白下降,PT 延长,INR 增大,血小板减少,肝超声显示肝硬度值增加、门静脉直径变宽、门静脉流速下降及血流阻力增加,出现腹水,肉眼可见肝表面变粗,凹凸不平,Masson 染色可见纤维结缔组织增生假小叶形成,证明该阶段存在肝纤维化→肝硬化代偿期/失代偿期过程;在造模第 24 周除了上述指标出现更显著异常以外,存在低蛋白血症,合并感染,出现顽固性腹水,HE 染色显示有不同程度的肝细胞坏死,血氨升高显著,大鼠记忆力、定向力下降出现肝性脑病,这一系列表现符合肝衰竭诊治指南中慢性肝衰竭的诊断^[2],可表明大鼠慢性肝衰竭模型建立成功。

综上所述,本研究采取的低剂量 CCl_4 橄榄油腹腔注射长期诱导能较好模拟肝从肝炎→肝纤维化→肝硬化→慢性肝衰竭的疾病全程^[11],从血液学指标、病理学指标、超声检测等方面均较好地复制了慢性肝衰竭的疾病特征,且具有较高的成模率和较低的死亡率,操作简单,具有良好的稳定性,可作为慢性肝衰竭模型制备标准的参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] LIN D, CHEN H, XIONG J, et al. Mesenchymal stem cells

- exosomal let-7a-5p improve autophagic flux and alleviate liver injury in acute-on-chronic liver failure by promoting nuclear expression of TFEB [J]. Cell Death Dis, 2022, 13 (10): 865.
- [2] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(1): 18-26.
- Liver Failure and Artificial Liver Group, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association, Severe Liver Disease and Artificial Liver Group, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Guideline for diagnosis and treatment of liver failure [J]. Chin J Hepatol, 2019, 27(1): 18-26.
- [3] LOU T W, YANG R X, FAN J G. The global burden of fatty liver disease: the major impact of China [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2024, 13(1): 119-123.
- [4] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: analysis from a Chinese perspective [J]. J Hepatol, 2019, 71(1): 212-221.
- [5] WLODZIMROW K A, ESLAMI S, ABU-HANNA A, et al. Systematic review: acute liver failure-one disease, more than 40 definitions [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35 (11): 1245-1256.
- [6] LI N, GU H, ZHU Y, et al. Recent advances in the treatment of liver failure [J]. Med. Philos, 2018, 39 (8B): 50-54.
- [7] MEZZANO G, JUANOLA A, CARDENAS A, et al. Global burden of disease: acute-on-chronic liver failure, a systematic review and meta-analysis [J]. Gut, 2022, 71 (1): 148-155.
- [8] SINGANAYAGAM A, TRIANTAFYLLOU E. Macrophages in chronic liver failure: diversity, plasticity and therapeutic targeting [J]. Front Immunol, 2021, 12: 661182.
- [9] ARORA G, KEEFFE E B. Management of chronic liver failure until liver transplantation [J]. Med Clin North Am, 2008, 92(4): 839-860.
- [10] LI F, MIAO L, SUN H, et al. Establishment of a new acute-on-chronic liver failure model [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(3): 326-333.
- [11] ARROYO V, ANGELI P, MOREAU R, et al. The systemic inflammation hypothesis: towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis [J]. J Hepatol, 2021, 74(3): 670-685.

[收稿日期] 2024-10-23

《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;被中国生物医学文献数据库、《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。



冯丹丹,周茨,庞子瑶,等. D-半乳糖诱导的衰老大鼠肾 S100A8/9 及介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 823-835.

FENG D D, ZHOU Y, PANG Z Y, et al. Changes in S100A8/9 and NLRP3/Caspase-1/interleukin-1 β pathway in kidney-aging rats induced by D-galactose [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 823-835.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.005

D-半乳糖诱导的衰老大鼠肾 S100A8/9 及介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路的变化

冯丹丹^{1,2}, 周茨³, 庞子瑶², 蔡月琴², 陈楚², 张建友^{1*}, 王德军^{2*}

(1. 浙江工业大学食品科学与工程学院, 杭州 310014; 2. 浙江中医药大学中医药科学院, 杭州 310053; 3. 西湖大学, 杭州 310024)

【摘要】 目的 探讨 S100A8/9 及介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路在由 D-gal 诱导的大鼠肾衰老模型和 H₂O₂ 诱导的 HK-2 细胞衰老模型中的作用。方法 12 只 SD 大鼠随机分为正常组和 D-gal 组, 经颈背部皮下注射 D-gal (150 mg/kg) 建立大鼠肾衰老模型, 8 周后麻醉状态下收集肾标本, 荧光定量逆转录 PCR 检测衰老相关基因 p21, p16 和 p53 mRNA 表达水平; SA- β -Gal 染色观察肾组织衰老情况, 苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察肾组织病理学变化; 检测血清中 BUN 和 CREA 含量, 检测肾组织中 SOD、CAT、GSH-PX 和 MDA 活性, DHE 染色观察肾组织 ROS 水平变化; 免疫荧光染色检测 S100A8/9 蛋白表达水平, Western Blot 检测纤维化标志物 Collagen III、 α -SMA 和 TGF- β 1 以及 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路上相关蛋白的表达水平。体外利用 H₂O₂ 构建 HK-2 细胞肾衰老模型, 检测衰老蛋白 p21、p16 表达水平和炎症因子 IL-18、TNF- α mRNA 表达水平, SA- β -Gal 染色观察细胞衰老情况; 并使用 S100A8/9 抑制剂帕奎莫德 (paquinimod, PAQ) 干预, 检测 S100A8/9 及 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路上相关蛋白的表达水平。结果 与正常组大鼠比较, D-gal 组大鼠肾组织衰老基因 p21, p16 和 p53 mRNA 表达水平显著增加 ($P < 0.01$), 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 染色显示衰老细胞数量显著增多 ($P < 0.01$); 血清中 BUN 和 CREA 含量上升 ($P < 0.05$); 组织内 CAT、GSH-PX 和 SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$), MDA 活性显著增加 ($P < 0.01$); 纤维化标志物 Collagen III、 α -SMA 和 TGF- β 1 的蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 组织内 ROS 含量增多 ($P < 0.05$); D-gal 组大鼠肾小球出现一定程度的萎缩及缺失, 肾小囊囊腔和肾小管管腔增大, 细胞核深染、固缩, 出现大量胶原纤维沉积; S100A8 和 S100A9 蛋白表达增加 ($P < 0.01$); NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路上 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。H₂O₂ 诱导 HK-2 细胞衰老后, 使用 S100A8/9 抑制剂 PAQ 减轻了 HK-2 细胞衰老情况, 衰老蛋白 p21、p16 表达水平和炎症因子 IL-18、TNF- α mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), SA- β -Gal 染色显示衰老细胞数量减少 ($P < 0.01$), 并抑制 S100A8 和 S100A9 蛋白表达 ($P < 0.01$) 以及 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白的过表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 S100A8/9 通过激活 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路参与慢性炎症反应, 从而促进 D-gal 诱导的肾衰老过程。

【关键词】 肾衰老; S100 钙结合蛋白 A8/9; NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路; 慢性炎症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0823-13

【基金项目】 浙江省自然科学基金项目 (LTGY24H290004), 浙江省药物安全性评价与研究重点实验室开放项目 (ZJDSE202202)。Funded by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LTGY24H290004), Open Project of Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province (ZJDSE202202)。

【作者简介】 冯丹丹, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 实验动物与比较药理。Email: 22749782932@qq.com

【通信作者】 张建友, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品加工与贮藏。Email: zhjianyou@zjut.edu.cn;

王德军, 男, 硕士, 正高级实验师, 研究方向: 实验动物与比较药理。Email: wdj@zcmu.edu.cn。

* 共同通信作者

Changes in S100A8/9 and NLRP3/Caspase-1/interleukin-1 β pathway in kidney-aging rats induced by D-galactose

FENG Dandan^{1,2}, ZHOU Ying³, PANG Ziyao², CAI Yueqin², CHEN Chu², ZHANG Jianyou^{1*}, WANG Dejun^{2*}

(1. College of Food Science and Technology, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

2. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

3. Westlake University, Hangzhou 310024, China)

Corresponding author: ZHANG Jianyou. E-mail: zhjianyou@zjut.edu.cn; WANG Dejun. E-mail: wdj@zcmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate changes in the pro-inflammatory mediator S100A8/9 and NLRP3/Caspase-1/IL-1 β pathway in a rat kidney-aging model induced by D-galactose. **Methods** Twelve SD rats were divided into control and D-galactose groups, and injected subcutaneously in the back of the neck with D-galactose (150 mg/kg) to establish a rat model of kidney aging. Kidney samples were collected under anesthesia after 8 weeks. Kidneys were stained for senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -Gal), mRNA expression levels of the aging-related genes p21, p16, and p53 were detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and histopathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Serum urea nitrogen and creatinine, and catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) levels in the kidney tissues were detected. Reactive oxygen species (ROS) were detected by dihydroethidium staining and protein expression levels of collagen III, α -smooth muscle actin (α -SMA), Protein expression of S100A8/9 was detected by immunofluorescence, and transforming growth factor (TGF)- β 1 levels in kidney tissues and key factors in the NLRP3/Caspase-1/IL-1 β inflammatory pathway were detected by Western Blot. A renal senescence model using HK-2 cells was constructed using H₂O₂ *in vitro*, and expression levels of the senescence proteins p21 and p16 and mRNA expression levels of the inflammatory factors IL-18 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected. Cell senescence was observed by SA- β -Gal staining. The effects of the S100A8/9 inhibitor paquinimod on expression levels of S100A8/9 and NLRP3/Caspase-1/IL-1 β pathway-related proteins in the aging model were also detected. **Results** mRNA levels of the aging genes p21, p16, and p53 in kidney tissues were significantly increased in rats in the D-galactose group compared with the control group ($P < 0.01$), and SA- β -Gal staining showed a significant increase in senescent cells ($P < 0.01$). Serum blood urea nitrogen and creatinine levels increased ($P < 0.05$), CAT, GSH-PX, and SOD activities decreased ($P < 0.01$), while MDA activity increased in the D-galactose group ($P < 0.01$). Collagen III, α -SMA, and TGF β 1 expression and the ROS content in tissues increased ($P < 0.05$). Glomeruli were atrophied or absent in the D-galactose group, the lumens of the renal sacs and renal tubules were enlarged, the nuclei were deeply stained and constricted, and numerous collagen fibers were deposited. Levels of S100A8 and S100A9 protein ($P < 0.01$), as well as NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β increased ($P < 0.05$). Paquinimod alleviated HK-2 cell senescence and decreased expression levels of the senescence proteins p21 and p16, and mRNA levels of the inflammatory factors IL-18 and TNF- α ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The number of senile cells was also decreased, shown by SA- β -Gal staining ($P < 0.01$). Paquinimod also inhibited the protein expression of S100A8 and S100A9 ($P < 0.01$) and NLRP3, Caspase-1, and IL-1 β ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** S100A8/9 participates in the chronic inflammatory response by activating the NLRP3/Caspase-1/IL-1 β pathway, thereby promoting D-galactose-induced renal aging.

【Keywords】 kidney senescence; S100A8/9; NLRP3/Caspase-1/IL-1 β pathway; chronic inflammation

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

衰老是机体各器官和组织随着年龄增长导致其结构和功能衰退的一种复杂自然现象,也是大多数慢性疾病发病的主要危险因素之一^[1]。

肾是机体排泄废物和血液过滤的重要器官,相比于其他关键器官,肾衰老更易发生内部结构和功能的变化,例如肾单位数减少、肾小球硬化、肾小

管萎缩和间质纤维化^[2-3]。随着人口的老龄化加剧,由肾衰老导致的慢性肾病已在全球社会造成了巨大的社会负担,因此深入研究肾衰老的潜在机制,对于遏制慢性肾病的蔓延及改善老年人群生活质量具有重要的学术价值与实践意义。

有研究表明衰老过程中伴随的全身性慢性炎症是影响组织功能障碍的重要因素之一,衰老细胞分泌的衰老相关分泌表型,包括细胞因子、趋化因子、生长因子等,可引起慢性炎症的产生,并反作用诱导正常细胞加速衰老^[4];同时慢性炎症加速免疫细胞衰老,导致免疫功能减弱,无法正常清除衰老细胞和炎症因子,造成衰老的恶性循环,器官组织内的炎症水平持续升高,不能及时消除,导致器官损伤和衰老相关疾病^[5]。因此从慢性炎症角度探究肾衰老相关机制,对研发新的治疗方案具有重要意义。

促炎介质 S100 钙结合蛋白 A8/9 (S100 calcium binding protein, S100A8/9) 是 S100 蛋白家族的成员,来源于免疫细胞,如中性粒细胞和巨噬细胞,是慢性炎症反应中的重要促炎介质^[6]。在多种肾疾病的发展过程中(例如糖尿病肾病、狼疮性肾炎、肾细胞癌、急性肾损伤) S100A8/A9 扮演着促进肾纤维化发展和炎症产生的重要角色,因此 S100A8/A9 也被认为是某些肾疾病发展前期的潜在标志物^[7-10]。虽然目前研究人员对慢性肾病的机制发展尚不完全清楚,但抑制 S100A8/9 可能是阻止慢性肾病发展的一种治疗策略^[11]。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 属于 NOD 样受体家族,是一种模式识别受体,是先天免疫系统的关键组成部分,可介导半胱天冬酶-1 (cysteine aspartate specific proteinase-1, Caspase-1) 激活和促炎细胞因子白细胞介素-1 β -18 (interleukin-1 β /18, IL-1 β /IL-18) 的分泌,导致炎症反应的激活^[12]。研究表明 S100A8/9 可以激活 NLRP3 炎症小体信号传导,参与多种组织器官的炎症性疾病进展,例如肝纤维化^[13]、心肌梗死^[14]和急性肺损伤^[15],激活下游 Caspase-1 和 IL-1 β 分泌,形成级联反应,促进炎症反应过程。目前 S100A8/9 及其介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路虽然已在多种疾病模型中得到初步阐明^[15-19],但在

肾衰老过程中的具体作用机制仍属未知领域,亟待深入探索。

本课题组在前期实验中发现,经 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的衰老大鼠心脏中 S100A8/9 的 mRNA 和蛋白水平均显著上调^[20],而 S100A8/9 及其介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症信号通路在衰老肾中的变化尚不清楚,因此本实验通过皮下注射 D-gal 建立大鼠肾衰老模型,同时利用 S100A8/A9 抑制剂帕奎莫德 (paquinimod, PAQ) 进行体外验证,为揭示肾衰老的分子基础、探索慢性肾病防治新途径提供重要线索与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只,8 ~ 10 周龄,体重 250 ~ 300 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2022-0004】,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK(浙)2021-0012】,环境温度 22 ~ 24 °C,相对湿度 40% ~ 65%,昼夜各半、明暗交替,实验期间自由摄食和饮水。本实验经浙江中医药大学动物福利与伦理审查委员会批准(IACUC-202302-04)。

1.1.2 细胞

人肾近曲小管细胞系 HK-2 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,批号:SCSP-511。

1.1.3 主要试剂及仪器

D-gal (G5388, 购自 Sigma Aldrich), 活性氧二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 试剂盒 (KGAF019, 购自江苏凯基生物技术股份有限公司), 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 染色试剂盒 (G1580, 购自北京索莱宝科技有限公司), Anti-S100A8 (15792-1-AP, 购自 Proteintech Group), Anti-S100A9 (14226-1-AP, 购自 Proteintech Group), Anti-III 型胶原蛋白 (type III collagen, Collagen III) (ab7778, 购自 Abcam), Anti- α -平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle actin, α -SMA) (AF1032, 购自 Affinity Biosciences), Anti-转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)

(21898-1-AP, 购自 Proteintech Group), Anti-NLRP3 (DF7438, 购自 Affinity Biosciences), Anti-IL-1 β (AF5103, 购自 Affinity), Anti-Caspase-1/P10/P20 (22915-1-AP, 购自 Proteintech Group), Anti-p21 (ab109199, 购自 Abcam), Anti-p16 (ab51243, 购自 Abcam), Anti-GAPDH (ET1601-4, 购自华安生物技术有限公司), PAQ 抑制剂 (HY-100442, 购自 MedChemExpress)。

全自动生化分析仪 (HITACHI, 日本), Precellys24 生物样品匀质机 (Bertin, 法国), 荧光定量 PCR 仪 (ABI StepOnePlus, 美国), 蛋白电泳及转膜系统 (BIO-RAD, 美国), 近红外激光成像系统 (LI COR, 美国), 微量核酸定量检测仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 多功能酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 封闭式组织脱水机、包埋机、半自动石蜡切片机和自动染色机 (Microm, 德国), 数字病理 (荧光) 切片扫描分析仪 (Olympus, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

大鼠适应性饲养 1 周后称体质量, 按体质量随机分为正常组和 D-gal 组, 每组 6 只。参考文献^[21], D-gal 组大鼠颈背部每日一次皮下注射 D-gal (150 mg/(kg · d)), 正常组注射同等体积的生理盐水, 连续 8 周。实验期间, 观察各组大鼠精神状态, 二便情况及毛色状态。

1.2.2 细胞培养及处理

HK-2 细胞用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基在 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。H₂O₂ 作为诱导剂用于构建体外肾衰老模型^[22], 实验前先进进行噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 实验, 参考文献^[23] 内容实验 H₂O₂ 最佳浓度。随后将 HK-2 细胞提前接种于六孔板中, 待细胞密度达到 80% ~ 90% 后分为 3 组: 空白组, H₂O₂ 组和 H₂O₂ + S100A8/9 抑制剂 PAQ (H₂O₂ + PAQ) 组, PAQ 浓度为 50 μ mol/L^[20], 每组 3 复孔, 共同孵育 48 h。

1.2.3 荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 检测

取适量大鼠肾组织, 使用 TRIzol 法提取大鼠肾组织总 RNA, 并测定总 RNA 浓度和纯度, 用反转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA, 使用实时荧光定量 PCR 仪将 cDNA 进行扩增, 以 GAPDH

作为标准参照进行相对定量, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算大鼠肾组织中相关目的基因 mRNA 相对表达水平。目的基因引物序列均由生工生物工程 (上海) 有限公司设计并合成 (表 1)。

表 1 qRT-PCR 的引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

mRNA 名称 mRNA name	引物序列 (5' -3') Sequences of primers (5' -3')
p21	F: TCCTGGTGATGTCCGACCTGTTC
	R: GCGGCTCAACTGCTCACTGTC
p16	F: GAGGGCTTCCTAGACACTCTGGTA
	R: AGATACCGCAAATACCGCAGCAGAC
p53	F: CCTTACCATCATCAGCGTGAAGAC
	R: AGGACAGGCACAAACACGAACC
IL-18	F: ACCAAGTTCTCTTCATTGACCAAGG
	R: TCCGGGCTGCATTATCTCTACAG
TNF- α	F: ATGAGCACTGAAAGCATGATCCG
	R: AGGAGAAGAGGCTGAGGAACAAG
GAPDH	F: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
	R: ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA

1.2.4 SA- β -Gal 染色

将新鲜的大鼠肾组织冰冻切片, 根据试剂盒说明书用 SA- β -Gal 固定液固定 30 min, 体积以充分覆盖组织为宜, 用 PBS 充分漂洗干净。加入 SA- β -Gal 染色液, 用保鲜膜封住防止蒸发, 37 ℃ 孵育过夜, 弃掉染色液后在光学显微镜下观察拍照并计算衰老细胞比例。

1.2.5 大鼠肾功能相关指标检测

将各组大鼠麻醉后取血, 分离血清, 按照试剂盒说明书应用全自动生化分析仪检测大鼠血清中尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和肌酐 (creatinine, CREA) 含量。

1.2.6 ELISA 检测

将各组大鼠麻醉后收集肾样本, 取适量肾组织置于低温均质机匀浆裂解, 将制备好的匀浆液于 6000 r/min 离心 5 min, 留取上清检测。根据 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠肾组织中的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 和 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 活性水平。

1.2.7 大鼠肾组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平检测

采用 DHE 染色法,将适量新鲜的大鼠肾组织冰冻切片,用配好的 DHE 溶液,于 37 ℃ 避光孵育 20 min, PBS 充分漂洗干净。甩干后滴加 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液, 避光孵育 10 min, 在荧光显微镜下观察, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 ROS 表达水平。

1.2.8 Western Blot 分析

取适量大鼠肾组织于低温均质机中匀浆裂解, 根据试剂盒说明书要求提取组织总蛋白, 并对样本进行蛋白定量。加入变性剂后煮沸变性, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 随后用恒压湿转法进行转膜, 将凝胶上的蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上, 于 3% 牛血清白蛋白溶液中室温封闭 2 h, 分别与稀释好的 Collagen III、 α -SMA、TGF- β 1、NLRP3、Caspase-1/P10/P20 和 IL-1 β 等抗体 4 ℃ 孵育过夜, 洗涤膜上多余的一抗, 与荧光染料标记的二抗室温孵育 1.5 h, 洗涤膜上多余的二抗, 将膜置于 Odyssey 近红外双色激光成像系统上进行蛋白定量分析, 检测各目的蛋白的表达水平。

1.2.9 大鼠肾病理组织学观察

将大鼠肾组织置于 10% 中性甲醛中固定, 经脱水、包埋、切片后, 行苏木素-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色, 观察肾组织形态变化, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算每个样本肾组织纤维化程度。肾组织纤维化程度 = 胶原纤维蓝色阳性面积/肾组织总面积 $\times$ 100%

1.2.10 免疫荧光染色

将蜡块切片后脱蜡, 经热修复和血清封闭后, 滴加稀释过的 S100A8 和 S100A9 抗体于 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤后滴加荧光二抗, 37 ℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤, 滴加 DAPI 复染核后封片, 于荧光显微镜下观察, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算肾组织内 S100A8 和 S100A9 的阳性表达率。

1.3 统计学分析

所有数据结果均用 SPSS 22.0 和 Image-Pro Plus 6.0 软件进行处理, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 D-gal 对大鼠肾组织衰老指标和组织病理学的影响

如图 1 所示, D-gal 连续诱导 8 周后, 与正常组比较, D-gal 组大鼠肾组织 SA- β -Gal 染色出现大片蓝色阳性区域, 提示衰老细胞数量增加 ($P < 0.01$); 并且 D-gal 组大鼠肾组织衰老基因 p21, p16 和 p53 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$)。HE 染色结果显示, 正常组大鼠肾小球结构完整清晰, 细胞形态正常, 肾小囊囊腔大小正常; 肾小管管腔规整, 其内部刷状缘结构完整。而 D-gal 组大鼠肾小球形状不规则, 呈现一定程度的萎缩及缺失, 肾小囊囊腔增大, 肾小管管腔也见明显增大, 细胞核深染、固缩, 排列杂乱。Masson 染色显示, 正常组大鼠肾中血管周围有少许纤维化现象, 而 D-gal 组大鼠血管周围纤维化组织面积增大, 胶原纤维化沉积明显加重 ($P < 0.05$)。以上结果表明 D-gal 皮下注射可成功诱导大鼠肾衰老。

2.2 D-gal 对大鼠肾功能评价指标 (BUN、CREA) 的影响

进一步检测了血清中 BUN 和 CREA 的含量以评价大鼠肾功能损伤情况, 与正常组比较, D-gal 组大鼠血清中 BUN 和 CREA 含量明显上升 ($P < 0.05$), 表明肾衰老后大鼠肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 异常, 肾功能受损下降 (图 2)。

2.3 D-gal 对大鼠肾组织抗氧化指标 (CAT、GSH-PX、SOD、MDA) 的影响

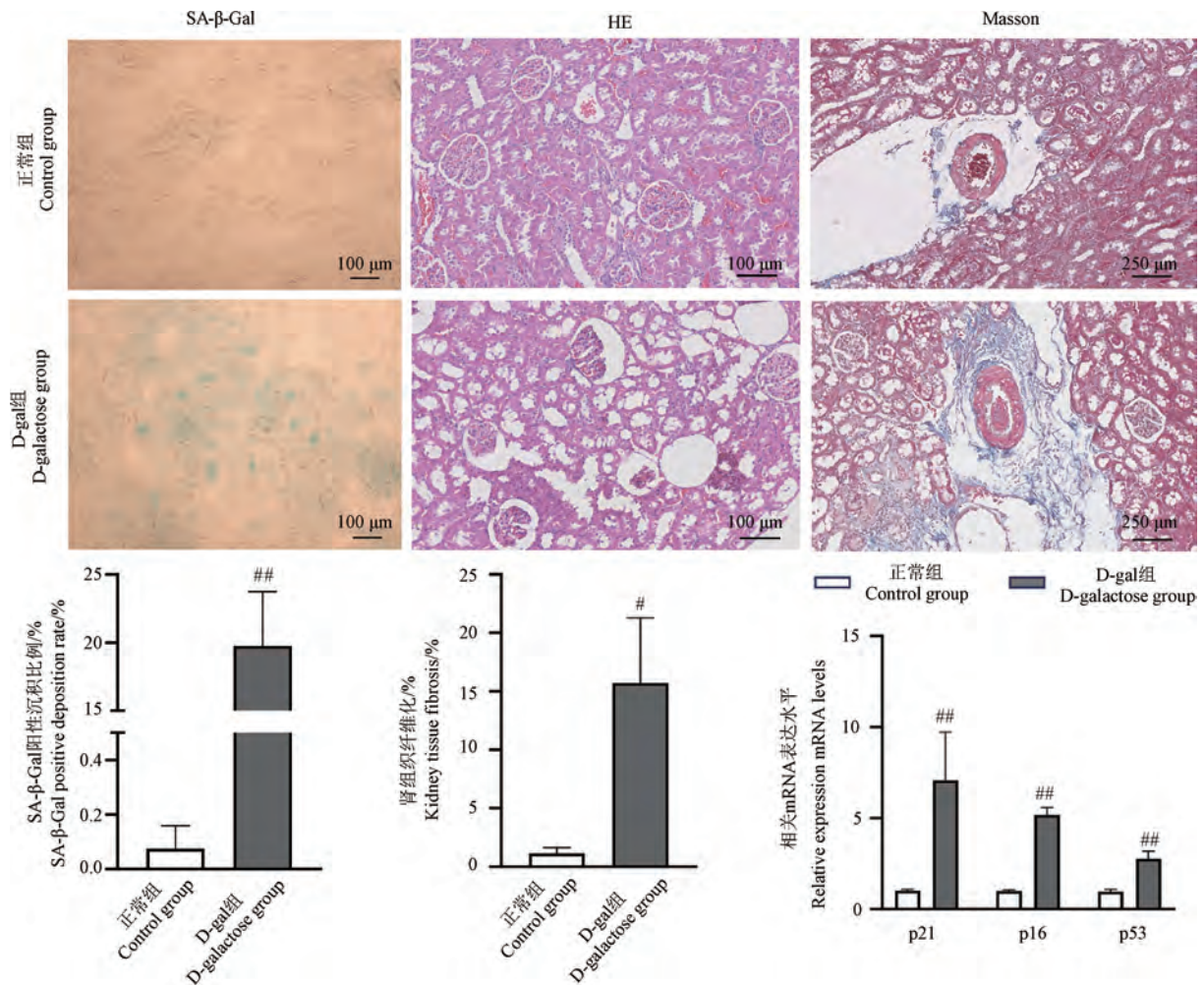
使用 ELISA 方法检测大鼠肾组织的氧化应激水平, 与正常组比较, D-gal 组的 CAT、GSH-PX 和 SOD 活性均显著下降 ($P < 0.01$), MDA 活性增加 ($P < 0.01$) (图 3)。以上结果表明, D-gal 诱导大鼠肾衰老后组织内抗氧化能力降低。

2.4 D-gal 对大鼠肾组织 ROS 产生的影响

将新鲜的大鼠肾组织冰冻切片后行 DHE 染色 (图 4), 病理结果显示, 与正常组比较, D-gal 组大鼠肾组织的 ROS 含量明显增加 ($P < 0.05$), 提示肾衰老后组织内可产生过量 ROS。

2.5 D-gal 对大鼠肾组织纤维化关键蛋白表达水平的影响

与正常组比较, D-gal 组大鼠肾组织中纤维化



注:与正常组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图1 大鼠肾组织衰老基因 p21, p16, p53 mRNA 差异表达和组织病理学结果

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

Figure 1 Differential expression of aging genes p21, p16 and p53 mRNA and histopathological results in rat kidney tissue

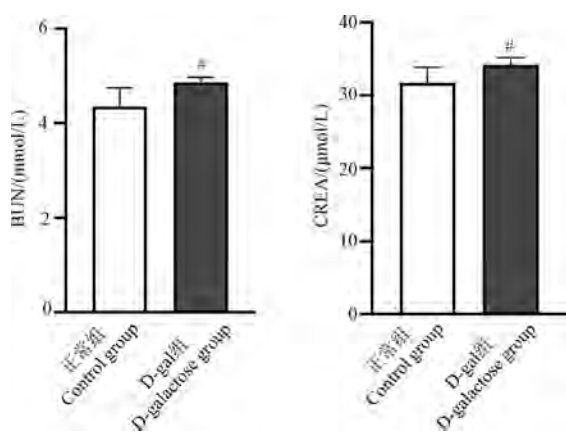


图2 大鼠血清 BUN 和 CREA 含量

Figure 2 Contents of BUN and CREA in serum of rat
标志物 Collagen III、α-SMA 和 TGF-β1 的蛋白表

达明显增加($P < 0.05$) (图 5)。说明 D-gal 诱导后的大鼠肾组织纤维化程度加深。

2.6 D-gal 对大鼠肾组织 S100A8/9 以及其介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 通路关键因子表达的影响

与正常组比较,免疫荧光染色显示 D-gal 组大鼠肾组织中促炎介质 S100A8 和 S100A9 的阳性表达显著增加($P < 0.01$) (图 6)。

NLRP3/Caspase-1/IL-1β 信号通路是 S100A8/9 的下游通路之一,检测了该通路上关键因子 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1β 的蛋白表达水平。从图 6 中看出,与正常组比较,D-gal 组大鼠 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达明显增加(P

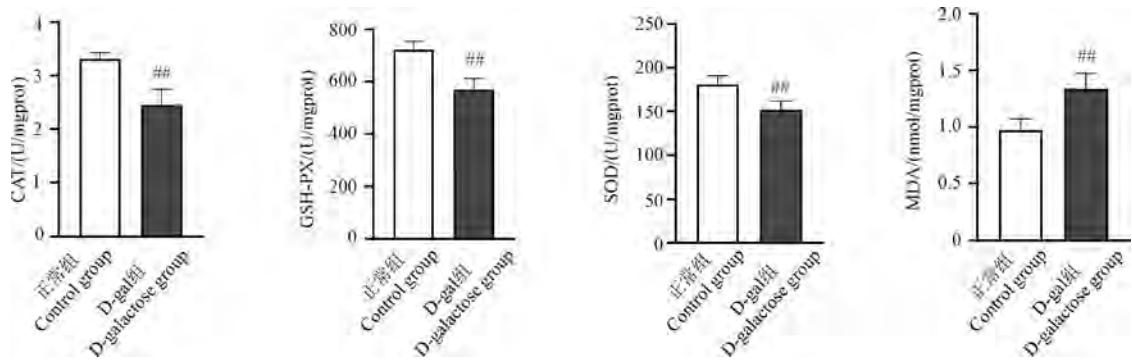


图3 大鼠肾组织 CAT、GSH-PX、SOD 和 MDA 含量

Figure 3 Contents of CAT, GSH-PX, SOD and MDA in rat kidney tissue

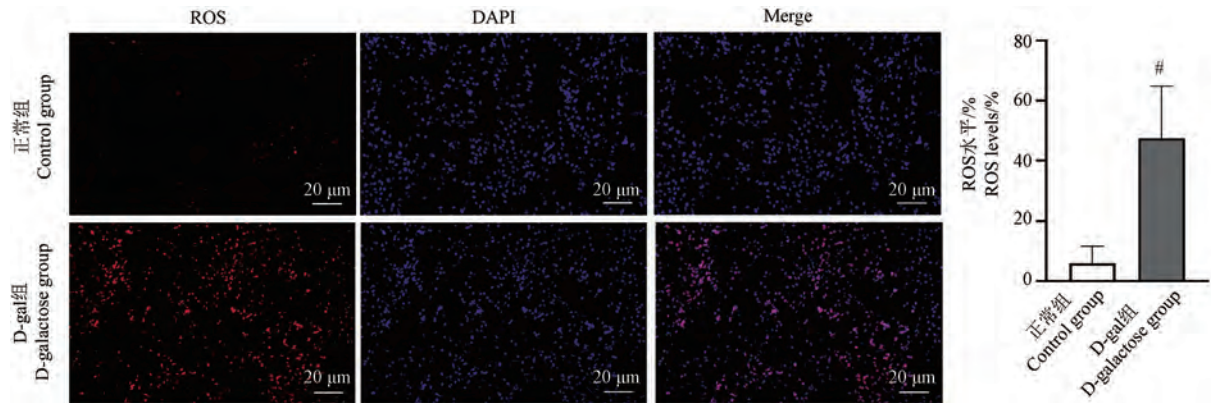


图4 大鼠肾组织 ROS 染色结果

Figure 4 ROS staining results of rat kidney tissue

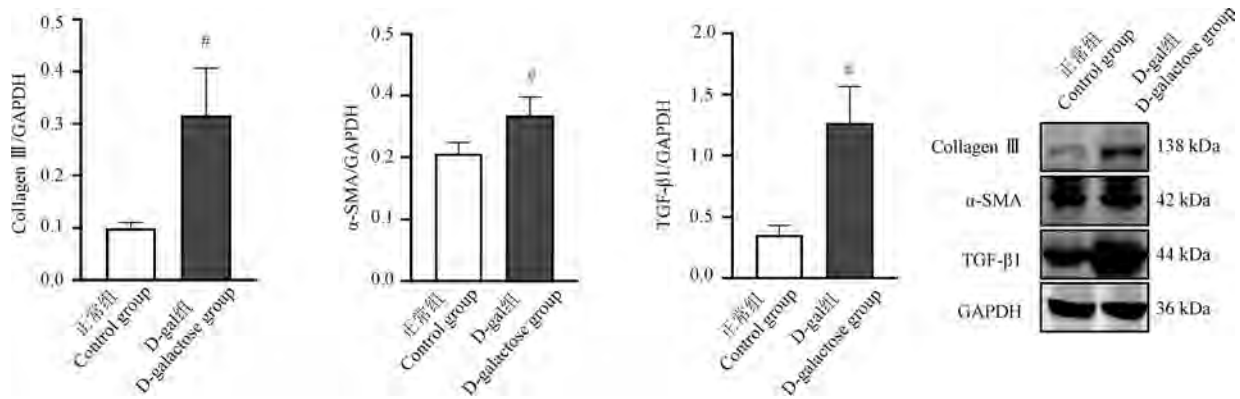


图5 大鼠肾组织 Collagen III、α-SMA 和 TGF-β1 蛋白表达水平

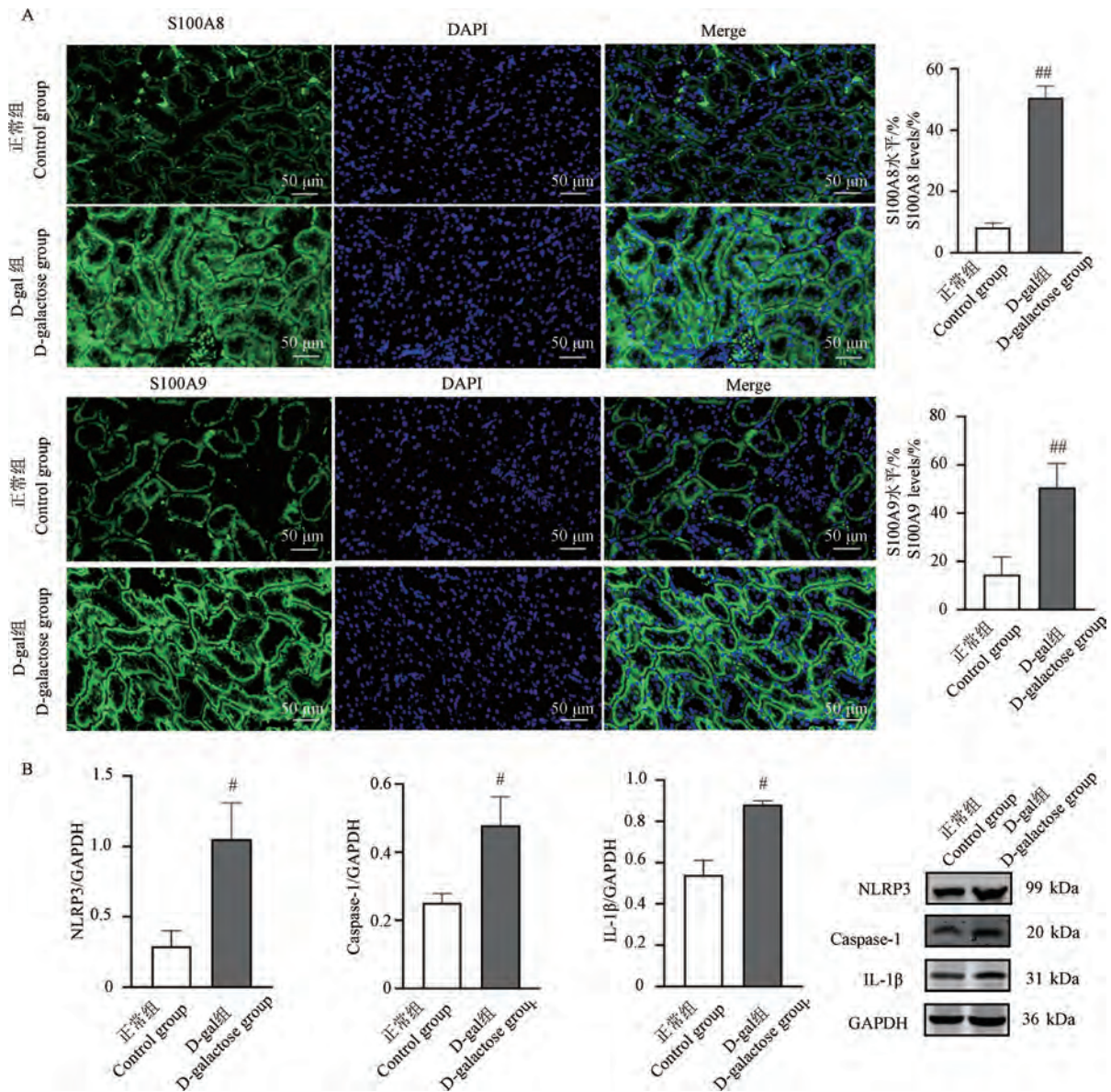
Figure 5 Protein expression levels of Collagen III, α-SMA and TGF-β1 in rat kidney tissue

< 0.05, 图 6B)。

2.7 S100A8/9 抑制剂 PAQ 对 H₂O₂ 诱导的 HK-2 细胞体外肾衰老模型的影响

为了进一步明确在肾衰老过程中 S100A8/9 是否介导 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 炎症级联通路,研究人员利用 H₂O₂ 构建了 HK-2 细胞体外衰老模型,加入 S100A8/9 抑制剂 PAQ 进行干预,观

察其对衰老细胞及相关通路的影响。如图 7 所示,通过 MTT 实验确定造模浓度为 1000 μmol/L; SA-β-Gal 染色结果显示,与空白组比较,H₂O₂ 组衰老细胞明显增多($P < 0.01$),p21 和 p16 蛋白表达增加($P < 0.05$),炎症因子 IL-18 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平增高($P < 0.01$);PAQ 干预后 H₂O₂+ PAQ 组的衰老细胞数量降低($P < 0.01$),



注: A: S100A8 和 S100A9 的免疫荧光染色; B: NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达水平。

图 6 大鼠肾组织 S100A8、S100A9 及 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 通路上关键蛋白表达差异

Note. A. S100A8 and S100A9 immunofluorescence staining. B. NLRP3, Caspase-1 and IL-1β protein expression levels.

Figure 6 Expression difference of key proteins in S100A8, S100A9 and NLRP3/Caspase-1/IL-1β pathway in rat kidney tissue

p21 和 p16 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), IL-18 和 TNF-α 的 mRNA 表达水平也明显降低 ($P < 0.01$)。

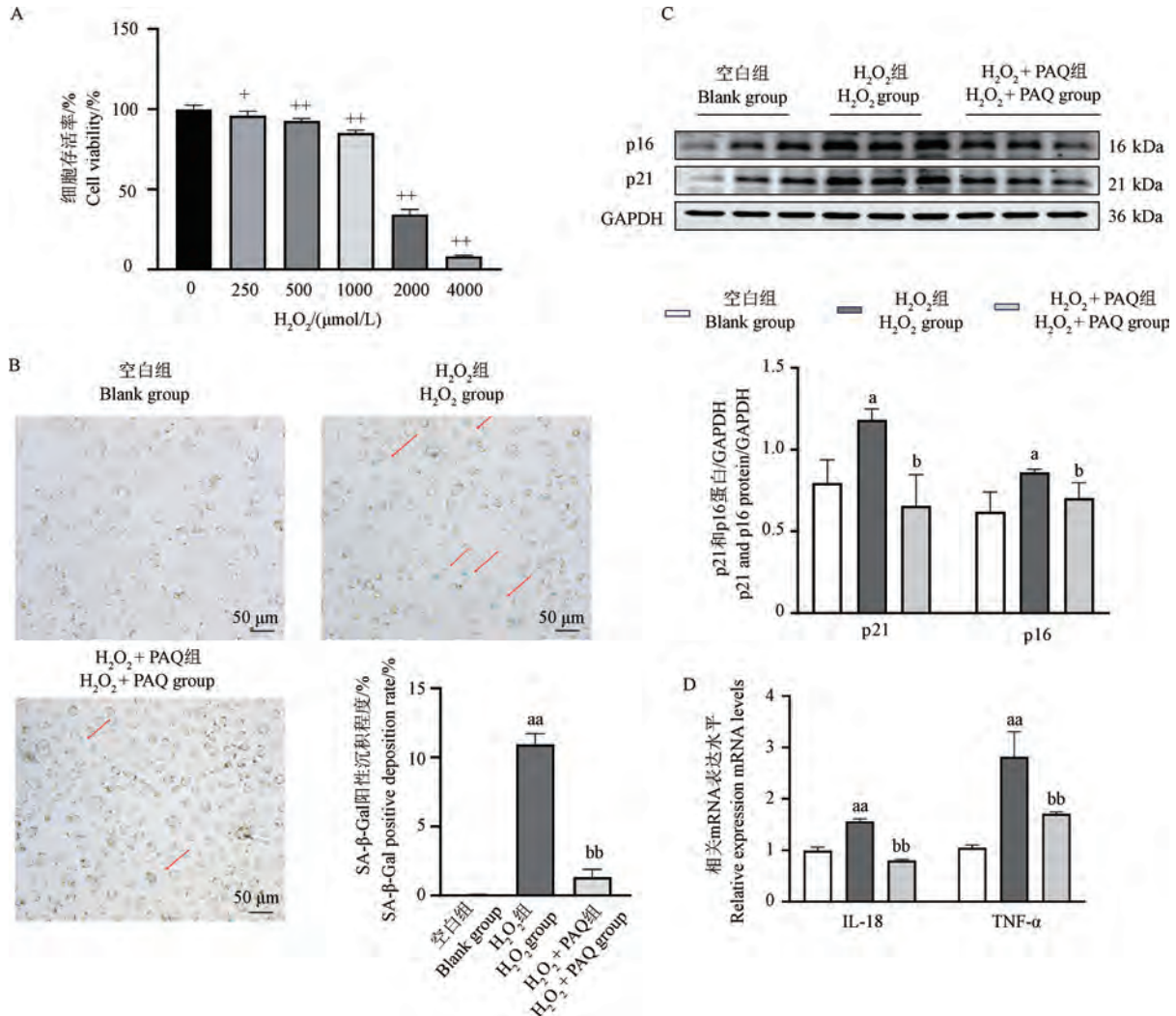
2.8 S100A8/9 抑制剂 PAQ 对 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 通路的影响

如图 8 所示, 与空白组比较, H₂O₂ 组的 S100A8 和 S100A9 的蛋白表达增加 ($P < 0.01$), 下游 NLRP3 蛋白表达也明显增加 ($P < 0.01$), Caspase-1 和 IL-1β 的蛋白表达均增加 ($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 组比较, 加入 S100A8/9 抑制剂

PAQ 后, H₂O₂ + PAQ 组的 S100A8 和 S100A9 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 同时下游 NLRP3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), Caspase-1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), IL-1β 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。

3 讨论

目前由 D-gal 诱导的动物加速衰老模型是衰老疾病动物模型中使用最广泛的, 相比于自然衰



注:A:不同浓度的 H₂O₂ 对 HK-2 细胞存活率的影响;B: SA-β-Gal 染色;C: p21 和 p16 蛋白表达水平;D:炎症因子 IL-18、TNF-α mRNA 表达水平;与 0 μmol/L H₂O₂ 相比, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$;与空白组相比, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$;与 H₂O₂ 组相比, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 7 S100A8/9 抑制剂 PAQ 对 H₂O₂ 诱导的体外肾衰老模型的影响

Note. A. Effect of different concentration of H₂O₂ on survival rate of HK-2 cells. B. SA-β-Gal staining. C. p21 and p16 protein expression levels. D. mRNA expression levels of inflammatory factors IL-18 and TNF-α. Compared with the 0 μmol/L H₂O₂, ⁺ $P < 0.05$, ⁺⁺ $P < 0.01$. Compared with blank group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$. Compared with H₂O₂ group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 7 Effect of S100A8/9 inhibitor PAQ on H₂O₂-induced renal senescence model *in vitro*

老模型的耗时长和费用高,D-gal 诱导的动物模型凭借其实验周期短、副作用小、存活率高,且引起的全身不同组织器官的退行性改变符合自然衰老时所出现的症状而广受青睐^[24]。本研究采用 D-gal 皮下注射构建大鼠肾衰老模型,体外利用 H₂O₂ 构建 HK-2 细胞衰老模型,探索 S100A8/9 及其介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 信号通路在大鼠肾衰老中的变化。

本实验结果表明,与正常组比较,D-gal 大鼠衰老基因 p21,p16 和 p53 mRNA 表达显著增加,衰老细胞增多,这与其他相关报道一致^[25-26]。肾是衰老过程中最容易受到影响的器官,易发生结构改变导致功能性退化^[2],在本实验中,从组织形态学可观察到 D-gal 大鼠肾小球有一定程度的萎缩,肾小囊囊腔和肾小管管腔增大,细胞核深染、固缩,血管周围胶原纤维化加重,呈现明显的

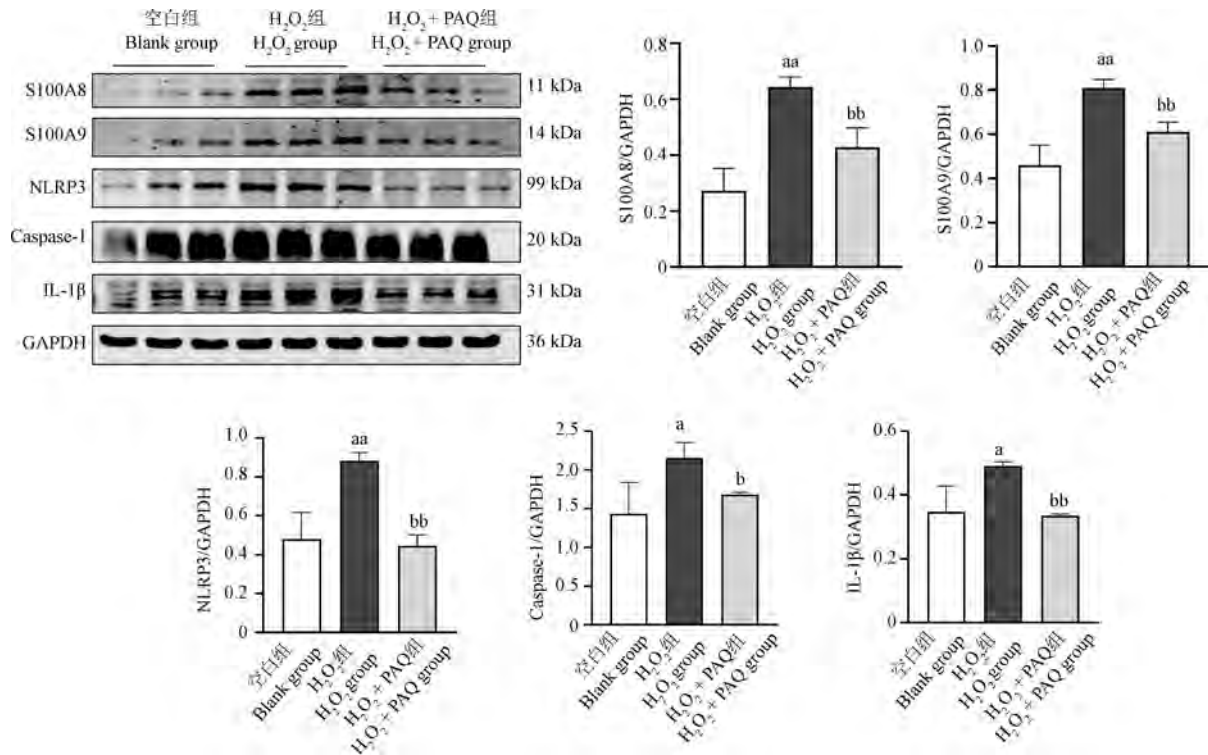


图 8 S100A8/9 抑制剂 PAQ 对 NLRP3/Caspase-1/IL-1β 通路的影响

Figure 8 Effect of S100A8/9 inhibitor PAQ on the NLRP3/Caspase-1/IL-1β pathway

病理性改变,表明 D-gal 大鼠发生肾功能受损^[27];肾功能受损的另一个标志是 GFR 的降低,临床上 BUN 和 CREA 是评价 GFR 的敏感标志物,当 GFR 显著降低时($\geq 50\%$ 减少),BUN 和 CREA 的血中浓度会明显上升^[28],本研究结果显示 D-gal 组大鼠 BUN 和 CREA 含量增加,证实了 D-gal 大鼠的肾功能损伤。多项研究表明长期使用 D-gal 可增加细胞内 ROS 的产生^[29-31],可模拟自然衰老状态下的细胞代谢紊乱和损伤,增加氧化应激、脂质氢过氧化物水平和炎症反应^[32],表现为肾 AGEs、MDA、ROS、NO 和 NADPH 氧化酶水平增加,SOD、CAT 和 GSH-Px 水平下降,总抗氧化能力降低^[33],本研究结果证实了 D-gal 大鼠肾抗氧化防御系统(如 CAT、GSH-Px、SOD 活性下降)受损及氧化应激产物(如 MDA、ROS 增加)的累积。此外,ROS 生成增加和炎症反应激活会导致肾纤维化加速发展^[34],本研究结果显示 D-gal 大鼠肾组织 Collagen III、 α -SMA 和 TGF- β 1 的蛋白表达增加,表明了肾纤维化的发生。以上这些结果综合反映了肾在衰老过程中的功能障碍与病理重构^[35-36]。

全身性的慢性低度炎症是衰老的主要特征,

也被认为是衰老的主要机制之一,从慢性炎症的角度探索干预靶点,可能是一种潜在的抗衰老策略^[37]。目前 S100A8/9 在各种急慢性炎症反应中的决定性作用已被证实,研究表明其丰度变化与衰老呈正相关,且可能与衰老伴随的慢性炎症有关^[6,38],已发现在衰老心脏、肝和大脑等组织中表达增加^[20,39-40],但在肾衰老方面相关文献较少。DU 等^[41]在糖尿病小鼠肾病期间观察到 S100A8/A9 在肾中表达显著增加,通过腺病毒敲低 S100A8/A9 改善了糖尿病肾病期间的肾间质纤维化进展,本研究免疫荧光结果显示 D-gal 大鼠肾组织中 S100A8 和 S100A9 的蛋白表达均增加,与 DU 等^[41]的结果相似,由此可见,S100A8/9 参与肾相关的慢性炎症。

NLRP3 炎症小体是炎症反应机制研究中最广泛和核心的部分,它在慢性炎症的产生和发展中占据了重要位置^[42],主要机制之一是诱导 pro-Caspase-1 活化,使无酶活性的 pro-Caspase-1 转化为有活性的成熟 Caspase-1,进一步激活切割下游 pro-IL-1 β 或 pro-IL-18,转化为 IL-1 β 和 IL-18,促进炎症因子的分泌积累,导致细胞凋亡和纤维化发展,从而损伤组织功能^[12]。相关研究发现,

NLRPS 炎症小体已在不同肾疾病中起重要作用,可在巨噬细胞、肾小管上皮细胞和系膜细胞中响应各种刺激的激活,增加促炎因子的释放,参与急性肾损伤和纤维化的发展^[43],另外 S100A8/9 在细胞中的过表达可介导 NLRP3 炎症小体的激活并引起下游一系列炎症反应^[14,44]。ZHAO 等^[45]在用脂多糖诱导的肺损伤中发现阻断 S100A9 可以抑制肺部 NLRP3 激活,减轻肺部的炎症反应和细胞凋亡,并发现 NLRP3 不是 S100A9 的上游分子;SREEJIT 等^[46]在心肌梗死模型中证实了在中性粒细胞中 S100A8 和 S100A9 的释放可刺激 NLRP3 炎症小体分泌,并促进 IL-1 β 分泌;另有相关研究表明促炎基因 S100A8、S100A9、NLRP3 和 IL-1 β 在 db/db 小鼠肾病期间显著上调^[47],结合以上文献结论研究人员推测在 D-gal 诱导的肾衰老过程中,S100A8/9 同样能激活 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 信号通路,因此研究人员分别检测了 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路上关键因子的蛋白表达。与正常组比较,D-gal 大鼠肾组织内 NLRP3 蛋白表达明显增加,且成熟的 Caspase-1 和下游 IL-1 β 蛋白表达明显增加。为了进一步明确 S100A8/9 是否诱导 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 通路,研究人员利用 H₂O₂ 成功构建了 HK-2 细胞衰老模型,使用 S100A8/9 抑制剂 PAQ 干预后,H₂O₂+PAQ 组的衰老蛋白 p21、p16 表达水平及炎症因子 IL-18、TNF- α mRNA 表达水平均明显降低,且衰老细胞数量减少;更重要的是 PAQ 在抑制 S100A8 和 S100A9 蛋白过表达之后,也抑制了 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 蛋白过表达。因此以上研究结果印证了研究人员的猜想,即 S100A8/9 可能通过激活 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症通路,参与肾衰老的发展。

综上所述,本研究不仅成功构建了 D-gal 诱导的大鼠肾衰老模型,还探讨了 S100A8/9 及其介导的 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 炎症通路在肾衰老过程中的作用。然而,关于这一通路的精确调控网络及其与肾衰老全貌的复杂关系,仍需未来研究进一步阐明。

参 考 文 献(References)

- [1] KIM E N, LIM J H, KIM M Y, et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(1): 83–99.
- [2] ZHANG J Q, LI Y Y, ZHANG X Y, et al. Cellular senescence of renal tubular epithelial cells in renal fibrosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1085605.
- [3] REX N, MELK A, SCHMITT R. Cellular senescence and kidney aging [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2023, 137(24): 1805–1821.
- [4] SINGH A, SCHURMAN S H, BEKTAS A, et al. Aging and inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2024, 14(6): a041197.
- [5] LI X, LI C, ZHANG W, et al. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 239.
- [6] WANG S, SONG R, WANG Z, et al. S100A8/A9 in inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1298.
- [7] YAO W, CHEN Y, LI Z, et al. Single cell RNA sequencing identifies a unique inflammatory macrophage subset as a druggable target for alleviating acute kidney injury [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(12): e2103675.
- [8] ZHANG L, JIANG H, XU G, et al. Proteins S100A8 and S100A9 are potential biomarkers for renal cell carcinoma in the early stages: results from a proteomic study integrated with bioinformatics analysis [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4093–4100.
- [9] GAO J, ULVIK A, MCCANN A, et al. Microheterogeneity and preanalytical stability of protein biomarkers of inflammation and renal function [J]. *Talanta*, 2021, 223(1): 121774.
- [10] FAVA A, BUYON J, MAGDER L, et al. Urine proteomic signatures of histological class, activity, chronicity, and treatment response in lupus nephritis [J]. *JCI Insight*, 2024, 9(2): e172569.
- [11] TAMMARO A, FLORQUIN S, BROK M, et al. S100A8/A9 promotes parenchymal damage and renal fibrosis in obstructive nephropathy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 193(3): 361–375.
- [12] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301–316.
- [13] LIU Y, KONG X, YOU Y, et al. S100A8-mediated NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in macrophages facilitates liver fibrosis progression [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3579.
- [14] TOUSIF S, SINGH A P, UMBARKAR P, et al. Ponatinib drives cardiotoxicity by S100A8/A9-NLRP3-IL-1 β mediated inflammation [J]. *Circ Res*, 2023, 132(3): 267–289.
- [15] FAN S Y, ZHAO Z C, LIU X L, et al. Metformin mitigates sepsis-induced acute lung injury and inflammation in young mice by suppressing the S100A8/A9-NLRP3-IL-1 β signaling pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 3785–3799.

- [16] WACKERBARTH L M, SEIFERT S B, NAPOLI M, et al. Neonatal neutrophils exhibit reduced NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Leukoc Biol*, 2025, 117(2): qiae206.
- [17] CHI J, WANG Q, WANG Z, et al. S100 calcium-binding protein A8 exacerbates deep vein thrombosis in vascular endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 831.
- [18] TSUJI G, HASHIMOTO-HACHIYA A, YEN V H, et al. Metformin inhibits IL-1 β secretion via impairment of NLRP3 inflammasome in keratinocytes: implications for preventing the development of psoriasis [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 11.
- [19] ZHANG J N, GONG R, WANG Y Q, et al. Critical role of S100A9 in sepsis-associated acute kidney injury: mechanistic insights through pyroptosis pathway modulation [J/OL]. [2025-03-12]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10753-024-02161-9>
- [20] 周炎, 苑婕, 吕东颖, 等. D-半乳糖诱导的衰老大鼠心脏 S100A8/A9 及相关炎症通路基因表达的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(10): 1746-1755.
- ZHOU Y, YUAN J, LYU D Y, et al. Gene expression of S100A8/A9 and related inflammatory pathways in D-galactose-induced aged rat hearts [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2023, 39(10): 1746-1755.
- [21] PANTIYA P, THONUSIN C, ONGNOK B, et al. Chronic D-galactose administration induces natural aging characteristics, in rat's brain and heart [J]. *Toxicology*, 2023, 492: 153553.
- [22] ZENG L, LI J, GAO F, et al. SGLT2i improves kidney senescence by down-regulating the expression of LTBP2 in SAMP8 mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(6): e18176.
- [23] KIM M N, MOON J H, CHO Y M. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibition reduces cellular senescence in the diabetic kidney by promoting ketone body-induced NRF2 activation [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2021, 23(11): 2561-2571.
- [24] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. *Biogerontology*, 2019, 20(6): 763-782.
- [25] HUANG W, HICKSON L J, EIRIN A, et al. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(10): 611-627.
- [26] YANG L, WANG B, GUO F, et al. FFAR4 improves the senescence of tubular epithelial cells by AMPK/Sirt3 signaling in acute kidney injury [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 384.
- [27] 牛衍龙, 曹建民, 周绮云, 等. 虾青素复合有氧运动对 D-半乳糖诱导大鼠肾脏衰老的干预作用及其机制 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(4): 433-438.
- NIU Y L, CAO J M, ZHOU Q Y, et al. Effects of astaxanthin combined with aerobic exercise on renal aging of rat induced by D-galactose and its mechanism [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2021, 37(4): 433-438.
- [28] NORONHA I L, SANTA-CATHARINA G P, ANDRADE L, et al. Glomerular filtration in the aging population [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 769329.
- [29] WANG H H, SUN Y N, QU T Q, et al. Nobiletin prevents D-galactose-induced C2C12 cell aging by improving mitochondrial function [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11963.
- [30] GAO X, LIU J, LUO Y, et al. Various fractions of alcoholic extracts from *Dendrobium nobile* functionalized antioxidation and antiaging in D-galactose-induced aging mice [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, 27(11): 315.
- [31] GARCÍA-TREJO S S, GÓMEZ-SIERRA T, EUGENIO-PÉREZ D, et al. Protective effect of curcumin on D-galactose-induced senescence and oxidative stress in LLC-PK1 and HK-2 cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(4): 415.
- [32] WANG B, YU W, ZHANG W, et al. Enhanced TRPC3 transcription through AT1R/PKA/CREB signaling contributes to mitochondrial dysfunction in renal tubular epithelial cells in D-galactose-induced accelerated aging mice [J]. *Aging Cell*, 2024, 23(6): e14130.
- [33] KUMAR H, BHARDWAJ K, VALKO M, et al. Antioxidative potential of *Lactobacillus* sp. in ameliorating D-galactose-induced aging [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(13/14/15/16): 4831-4843.
- [34] MIGUEL V, TITUAÑA J, HERRERO J I, et al. Renal tubule Cpt1a overexpression protects from kidney fibrosis by restoring mitochondrial homeostasis [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(5): e140695.
- [35] NAGHIBI N, SADEGHI A, MOVAHEDINIA S, et al. Ellagic acid ameliorates aging-induced renal oxidative damage through upregulating SIRT1 and NRF2 [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 77.
- [36] EL-FAR A H, LEBDA M A, NORELDIN A E, et al. Quercetin attenuates pancreatic and renal D-galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4348.
- [37] LI X, MA L. From biological aging to functional decline: Insights into chronic inflammation and intrinsic capacity [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 93: 102175.
- [38] SWINDELL W R, JOHNSTON A, XING X, et al. Robust shifts in S100a9 expression with aging: a novel mechanism for chronic inflammation [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1215.
- [39] LIN Y, LI Y, LIANG G, et al. Single-cell transcriptome analysis of aging mouse liver [J]. *FASEB J*, 2024, 38(4): e23473.

- [40] GRUEL R, BIJNENS B, VAN DEN DAELE J, et al. S100A8-enriched microglia populate the brain of tau-seeded and accelerated aging mice [J]. Aging Cell, 2024, 23(5): e14120.
- [41] DU L, CHEN Y, SHI J, et al. Inhibition of S100A8/A9 ameliorates renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Metabolism, 2023, 144: 155376.
- [42] MA Q. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome: structure, molecular activation, and inhibitor-NLRP3 interaction [J]. Pharmacol Rev, 2023, 75(3): 487–520.
- [43] HENEDAK N T, EL-ABHAR H S, SOUBH A A, et al. NLRP3 Inflammasome: a central player in renal pathologies and nephropathy [J]. Life Sci, 2024, 351: 122813.
- [44] SHI L, ZHAO Y, FEI C, et al. Cellular senescence induced by S100A9 in mesenchymal stromal cells through NLRP3 inflammasome activation [J]. Aging, 2019, 11(21): 9626–9642.
- [45] ZHAO B, LU R, CHEN J, et al. S100A9 blockade prevents lipopolysaccharide-induced lung injury via suppressing the NLRP3 pathway [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 45.
- [46] SREEJIT G, ABDEL-LATIF A, ATHMANATHAN B, et al. Neutrophil-derived S100A8/A9 amplify granulopoiesis after myocardial infarction [J]. Circulation, 2020, 141(13): 1080–1094.
- [47] XIAO X, GE H, WANG Y, et al. (-)-gallicocatechin gallate mitigates metabolic syndrome-associated diabetic nephropathy in db/db mice [J]. Foods, 2024, 13(11): 1755.

[收稿日期] 2025-03-12

《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。



王丹阳,崔竞雯,刘新民,等. 槟榔碱对慢性不可预知温和应激小鼠抗抑郁作用及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 836-847.

WANG D Y, CUI J W, LIU X M, et al. Anti-depressant effect and mechanism of arecoline in mice with chronic and unpredictable mild stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 836-847.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.006

槟榔碱对慢性不可预知温和应激小鼠抗抑郁作用及机制研究

王丹阳^{1,2}, 崔竞雯^{1,2}, 刘新民³, 范蓓^{1,2}, 王凤忠^{1,2*}, 卢聪^{1,2*}

(1. 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 晋中 030801; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 3. 宁波大学新药技术研究院, 浙江 宁波 315211)

【摘要】 目的 以槟榔碱为研究对象, 采用慢性不可预知温和应激 (chronic and unpredictable mild stress, CUMS) 所致小鼠抑郁模型, 旨在评估槟榔碱在抗抑郁方面的潜在活性, 并初步探讨其可能涉及的作用机制, 从而为深入挖掘槟榔的健康功能提供实验依据, 并为其资源的科学开发与利用提供理论支撑。**方法** 选取 60 只检疫合格的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 根据体质量随机分为空白组、模型组、氟西汀组 (20 mg/kg)、槟榔碱低剂量组 (10 mg/kg)、槟榔碱中剂量组 (20 mg/kg)、槟榔碱高剂量组 (40 mg/kg), 每组 10 只。采用旷场、悬尾和强迫游泳等行为学方法评价槟榔碱对抑郁小鼠的行为影响; 采用酶联免疫法检测分析小鼠血清 Cort 含量、血清和脑组织中 SOD、MDA、CAT 水平以及脑组织中 5-HT、NE、DA、GABA、TNF- α 、IL-10 和 IL-1 β 等生化指标; Western Blot 检测 BDNF、TrkB、CREB 的表达。**结果** 实验结果表明, 槟榔碱能显著降低模型小鼠在旷场活动中总路程、平均速度, 增加小鼠活动次数; 显著降低模型小鼠在悬尾和强迫游泳实验的不动时间。槟榔碱显著降低小鼠血清皮质酮水平, 提高 SOD、CAT 水平同时降低 MDA 水平; 显著增加神经递质 5-HT、DA、NE、GABA 水平; 显著降低细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平; 以及显著上调小鼠脑组织内 BDNF、TrkB 和 CREB 的表达水平。**结论** 根据研究发现, 槟榔碱具有显著的抗抑郁能力, 其机制可能通过减轻氧化应激伤害、抑制神经炎症、调节神经递质平衡, 以及调节 BDNF/TrkB/CREB 信号通路来实现。本研究挖掘了槟榔碱的抗抑郁功效并初步揭示其可能的调控机制, 可为槟榔发挥神经活性提供数据支持并为槟榔的药用开发奠定理论基础。

【关键词】 槟榔碱; 抗抑郁; 氧化应激; 神经炎症; 神经递质

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0836-12

【基金项目】 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项” (YBXM2417), 三亚中国农业科学院国家南繁研究院“南繁专项” 2022 年院院联合攻关项目 (YYLH05), 中国农业科学院农产品加工研究所创新工程 (CAAS-ASTIP-2024-IFST)。

Funded by Sanya China Academy of Agricultural Sciences National Research Institute of Southern Breeding “Southern breeding special Project” (YBXM2417), Sanya China Academy of Agricultural Sciences National Research Institute of Southern Breeding “Southern breeding special Project” 2022 Joint Research Project (YYLH05), Innovation Project of Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2024-IFST).

【作者简介】 王丹阳, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药食同源功能因子挖掘。Email: wdanyang1111@163.com

【通信作者】 王凤忠, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品时空多维品质评价及综合利用。Email: wangfengzhong@sina.com;

卢聪, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食药同源物质功能挖掘、功效评价及机制。Email: lucong198912@126.com。

* 共同通信作者

Anti-depressant effect and mechanism of arecoline in mice with chronic and unpredictable mild stress

WANG Danyang^{1,2}, CUI Jingwen^{1,2}, LIU Xinmin³, FAN Bei^{1,2}, WANG Fengzhong^{1,2*}, LU Cong^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3. Institute of New Drug Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Corresponding author: LU Cong. E-mail: lucong198912@126.com;

WANG Fengzhong. E-mail: wangfengzhong@sina.com

【Abstract】 Objective We explored the anti-depressant activity and mechanism of arecoline *in vivo* in a mouse model of depression induced by chronic unpredictable mild stress. The aim was to explore the possible mechanisms of action, providing experimental evidence for further research into the health benefits of arecoline and theoretical support for the scientific development and utilization of this resource. **Methods** Sixty quarantine-qualified SPF C57BL/6J mice were divided randomly into a control group, model group, fluoxetine group (20 mg/kg), and arecoline low-, medium-, and high-dose groups (10, 20, and 40 mg/kg, respectively) according to body mass ($n = 10$ mice per group). The effects of arecoline on the behavior of the mice were evaluated by open-field, tail-suspension, and forced-swimming tests. Serum corticosterone and serum and brain levels of superoxide dismutase (SOD) were detected by enzyme-linked immunoassay. Malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), 5-hydroxytryptamine (5-HT), and norepinephrine (NE) levels in brain tissue, and dopamine (DA), gamma-aminobutyric acid (GABA), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin (IL)-10, IL-1 β , brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin receptor kinase B (TrkB), and cAMP-response element binding protein (CREB) were detected by Western Blot. **Results** Arecoline significantly reduced the total distance and average speed of the model mice in open field tests and increased activities, and significantly reduced the immobility time in the tail suspension and forced swimming tests. Arecoline also significantly decreased serum corticosterone levels, increased SOD and CAT, and decreased MDA levels. 5-HT, DA, NE, and GABA levels were significantly increased, and the cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1 β were significantly decreased. Expression levels of BDNF, TrkB, and CREB in the brain tissue were significantly increased. **Conclusions** Research has found that arecoline has a significant antidepressant ability, and its mechanism may be achieved by reducing oxidative stress damage, inhibiting neuroinflammation, regulating neurotransmitter balance, and regulating the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. This study explored the antidepressant efficacy of arecoline and preliminarily revealed its possible regulatory mechanism, which can provide data support for the neuroactivity of arecoline and lay a theoretical foundation for the development of arecoline as medicine.

【Keywords】 arecoline; anti-depressant; oxidative stress; neuroinflammation; neurotransmitters

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

槟榔(*Areca catechu* L.)是棕榈科槟榔属的一种常绿树种^[1],常见于我国南方的热带和亚热带地区,是一种重要的经济作物。它不仅在“四大南药”中占据首位,还因其药用和食用双重价值而备受关注。槟榔有广泛的生物活性作用,如抗炎^[2]、抗病毒^[3]、抗氧化^[4]、抗衰老^[5]、抗疲劳^[6]、抗抑郁^[7]、抗缺氧^[8]、抗血栓^[9]以及降血糖^[10-12]、血管保护^[13]和胃肠道蠕动增强^[14]。其干燥、成熟的种子被称为槟榔果。槟榔碱作为槟榔果的

重要活性物质之一,具有强大的生物学作用,特别是对神经系统^[15]。抑郁症是一种严重的复发性神经精神疾病,常见症状有情绪低落、失去快感、睡眠问题、食欲下降和体力减弱等,这些症状可能导致严重的后果,如自杀^[16]。全球范围内,抑郁症患者人数已突破 3.5 亿,约占全球总人口的 4.4%。该疾病不仅对各国公共健康体系构成严峻挑战,也对经济发展带来了显著的负面影响^[17]。目前治疗抑郁症的药物主要集中在提高

突触间隙中单胺类神经递质的水平,如传统的三环类抗抑郁药、选择性 5-HT 再摄取抑制剂以及去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)再摄取抑制剂等,已广泛用于临床治疗。但其药理机制尚不明确,并且部分患者疗效滞后、治疗反应不佳、自杀率难以有效控制^[18]。建立动物模型是推进抑郁症研究的关键^[19],实验室研究中常用的抑郁动物模型有慢性不可预见温和束缚小鼠抑郁模型和慢性不可预见节律紊乱小鼠躁狂模型等。慢性不可预见温和应激(chronic unpredicted mild stress, CUMS)引发的动物模型表现出与人类抑郁症核心症状高度相似的特点,因此该模型在抗抑郁药物的研发中得到了广泛应用^[20]。作为槟榔中一种生物碱有效组分,槟榔碱的活性报道尤其是抗抑郁具体作用机制不明。因此,本研究选取槟榔碱作为研究对象,构建 CUMS 小鼠模型,运用行为测试与分子机制分析手段,评估其抗抑郁活性及其潜在机制,为槟榔功能性研究提供数据参考,并为其资源的高效利用奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄, SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只, 体质量 18 ~ 22 g, 购于广东维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(粤)2022-0063】, 在湖南普瑞玛药物研究中心有限公司屏蔽环境 D 区饲养【SYXK(湘)2020-0015】。环境保持 12 h 的光和暗循环, 稳定温度为 23 ~ 25 °C, 相对湿度约为 55% ~ 65%。小鼠自由饮食饮水。本实验通过山西农业大学食品与工程学院伦理审批(SXAU202310), 并按照中国实验动物管理和使用委员会指导原则开展。

1.1.2 主要试剂与仪器

槟榔碱(批号:A14660, 购自上海吉至生化科技有限公司); 盐酸氟西汀片(批号:202109102, 规格:每片 10 mg, 购自常州四药有限公司); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、皮质酮(corticosterone, Cort)试剂盒(批号:A001-3-2、A003-1-2、A007-1-1、H205-1-2, 购自南京建成生物工程); IL-1 β 、IL-6、TNF- α 试剂盒(批

号:H002-1-2、H007-1-2、H052-1-2, 购自南京建成生物工程); 多巴胺(dopamine, DA)、5-HT、NE、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)试剂盒(批号:H170-1-2、H104-1-2、H096-1-2、H168-1-2, 购自南京建成生物工程); TrkB 抗体(批号:28205-1-AP、13129-1-AP, 购自 Proteintech Group); P-TrkB 抗体(批号:AB229908, 购自 Abcam); CREB、P-CREB 抗体(批号:9197、9198, 购自美国 Cell Signaling Technology); HRP 标记的山羊抗兔、HRP 标记的山羊抗小鼠(批号:111-035-003、115-035-003, 购自 Jackson 实验室)。Behav 动物行为分析系统(型号:JLbehv, 购自上海吉量科技有限公司); 电子天平(型号:ME2002E, 购自梅特勒公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只, 根据体质量随机分为 6 组, 分别为空白组、模型组、氟西汀组(20 mg/kg)、槟榔碱低剂量组(10 mg/kg)、槟榔碱中剂量组(20 mg/kg)、槟榔碱高剂量组(40 mg/kg), 每组 10 只。如表 1 所示, 在测试之前, 小鼠有 1 周的时间来适应动物设施内的新环境, 除空白组外, 其余小鼠在 14 d 内每天随机接受 2 ~ 3 种不同类型的温和应激处理。为防止适应性产生, 相同应激源不连续施加, 确保刺激的不可预期性。在此期间同步进行灌胃给药, 空白组和模型组给予等量蒸馏水, 其他组给予相应药液, 给药体积为 20 mL/kg, 每日 1 次。

1.2.2 行为学检测指标

连续给药 14 d 后进行行为学评价。

旷场检测(open field test, OFT): 给药 14 d 后末次给药后 30 min, 用 Behav 动物行为分析系统, 检测时间为 10 min。实验开始时, 将待测小鼠放入测试箱中央, 且保证每次实验从同一位置同一方向放入小鼠。观察小鼠在测试时间内的活动情况。

悬尾检测(tail suspension test, TST): 小鼠 OFT 次日, 进行 TST。实验开始时, 尾部悬吊使小鼠呈倒悬体位, 头部与箱底保持一定距离。如多只小鼠同时进行实验, 每两只动物间需用不透明挡板隔开。实验时间为 6 min, 记录后 4 min 内小鼠的不动时间。

表 1 慢性不可预知性应激时间表
Table 1 Schedule of chronic unpredictability stress

时间 Time	造模方式 Molding method	具体时间 Specific time
第 1 天 Day 1	束缚 12 h + 倾笼 12 h Bind 12 h + dump cage 12 h	9:30 ~ 21:30 束缚; 21:30 ~ 9:30 倾笼 9:30 ~ 21:30 bind; 21:30 ~ 9:30 dump cage
第 2 天 Day 2	禁食 12 h + 湿笼 12 h + 昼夜颠倒 Fasting 12 h + wet cage 12 h + day and night reversal	8:30 ~ 20:30 禁食; 21:00 ~ 9:00 湿笼 8:30 ~ 20:30 fasting; 21:00 ~ 9:00 wet cage
第 3 天 Day 3	冰水游泳 10 min + 频闪 12 h(噪音 30 min) Ice water swimming 10 min + stroboscopic 12 h(noise 30 min)	8:50 ~ 9:00 冰水游泳; 9:00 ~ 21:00 频闪; 9:00 ~ 9:30 噪音 8:50 ~ 9:00 ice water swimming; 9:00 ~ 21:00 stroboscopic; 9:00 ~ 9:30 noise
第 4 天 Day 4	禁水 12 h + 禁食 12 h + 昼夜颠倒 No water 12 h + fasting 12 h + day and night reversal	8:30 ~ 20:30 禁水; 20:30 ~ 8:30 禁食 8:30 ~ 20:30 no water; 20:30 ~ 8:30 fasting
第 5 天 Day 5	束缚 12 h + 倾笼 12 h Bind 12 h + dump cage 12 h	8:30 ~ 20:30 倾笼; 21:30 ~ 9:30 束缚 8:30 ~ 20:30 dump cage; 21:30 ~ 9:30 bind
第 6 天 Day 6	冰水游泳 10 min + 频闪 12 h(噪音 30 min) Ice water swimming 10 min + stroboscopic 12 h(noise 30 min)	8:50 ~ 9:00 冰水游泳; 9:00 ~ 21:00 频闪; 9:00 ~ 9:30 噪音 8:50 ~ 9:00 ice water swimming; 9:00 ~ 21:00 stroboscopic; 9:00 ~ 9:30 noise
第 7 天 Day 7	禁水 12 h + 频闪 12 h(噪音 30 min) No water 12 h + stroboscopic 12 h (noise 30 min)	8:30 ~ 20:30 禁水; 9:00 ~ 9:00 频闪; 9:00 ~ 9:30 噪音 8:30 ~ 20:30 no water; 9:00 ~ 9:00 stroboscopic; 9:00 ~ 9:30 noise

强迫游泳检测(forced swim test, FST):小鼠 TST 次日,进行 FST。实验前测试水箱水温,应为 23 ~ 25 ℃。水深据动物体质量进行调整。实验时间 6 min,记录后 4 min 内小鼠的游泳时间和不动时间。不动时间越长表明抑郁程度越重^[21]。

1. 2. 3 样本收集及生化指标检测

在 FST 测试结束后,对每只小鼠进行采血。将这些样品在 4 ℃ 和 3500 r/min 下离心 10 min 获得血清。取出脑组织样本保存在-80 ℃ 内以作进一步分析。采用 ELISA 检测血清中 Cort 含量,血清和脑组织中 SOD、MDA、CAT 的活性,检测脑组织中神经递质 5-HT、DA、NE、GABA 以及炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平。

1. 2. 4 Western Blot 分析

使用裂解缓冲液提取蛋白质,并补充磷酸酶抑制剂,确保全面的蛋白质恢复,同时防止去磷酸化。裂解后,将混合物在 4 ℃ 以 12 000 r/min 离心 15 min,从而收集含有蛋白质含量的上清液。等量的蛋白质样品(30 μg)在 8%的 SDS-PAGE 上进行电泳,电泳条件:浓缩胶 90 V,约 20 min;分离胶 120 V,通过预染蛋白 Marker 来确定电泳停止时间。随后,分离的蛋白,用湿转法转膜至 PVDF 膜上,转膜条件:300 mA 恒流,0.45 μm 孔径 PVDF 膜,转膜时间 60 min。然后 5%的 BSA-TBST 稀释一抗在 4 ℃ 下孵育过夜,确保最佳的结合亲和力和特异性。孵育后,用 TBST 洗涤膜 3

次,再用山羊抗兔 IgG(H + L)HRP(1 : 10 000),室温孵育 1 h。Western Blot 结果通过凝胶成像系统进行检测,用于 Western Blot 的可视化和强度测量。随后,采用 Image J 软件(版本 6.0)对条带信号进行分析,并以 β -actin 为内参对目标蛋白的相对表达水平进行归一化处理。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件(版本 8.0.2)作图。通过 SPSS 软件(版本 25.0)进行统计学处理,结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析对各组均值进行整体比较,然后采用 Fisher 最小显著差异法(LSD)事后检验来比较两组。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

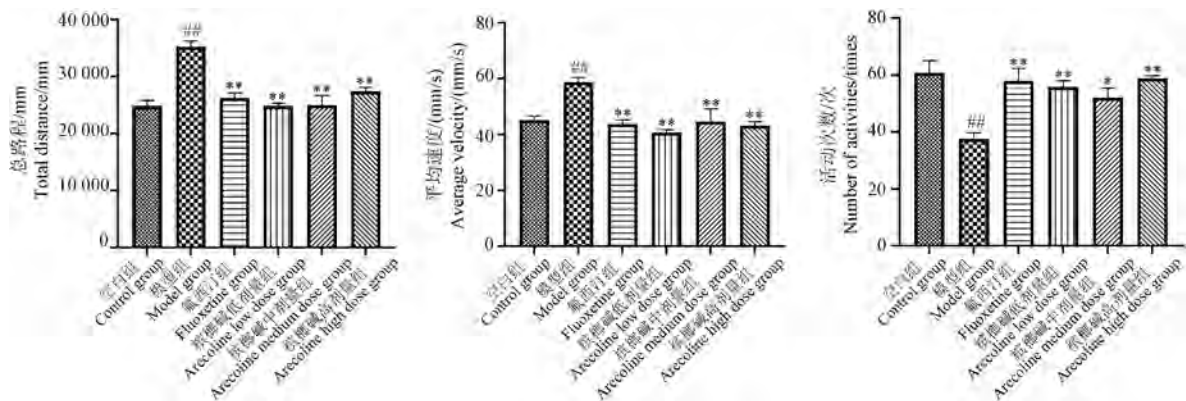
2 结果

2.1 槟榔碱对小鼠旷场自主活动的影响

如图 1 所示,与空白组比较,模型组小鼠总路程和平均速度显著升高($P < 0.01$),而活动次数显著减少($P < 0.01$)。与模型组比较,氟西汀组及槟榔碱各组小鼠总路程、平均速度显著降低($P < 0.01$),活动次数显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明,槟榔碱干预下小鼠抑郁样行为有所改善。

2.2 槟榔碱对小鼠悬尾和强迫游泳活动时间的影

如图 2 所示,与空白组比较,模型组小鼠 TST



注:与空白组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 槟榔碱对小鼠 OFT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

Figure 1 Effects of arecoline on OFT of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

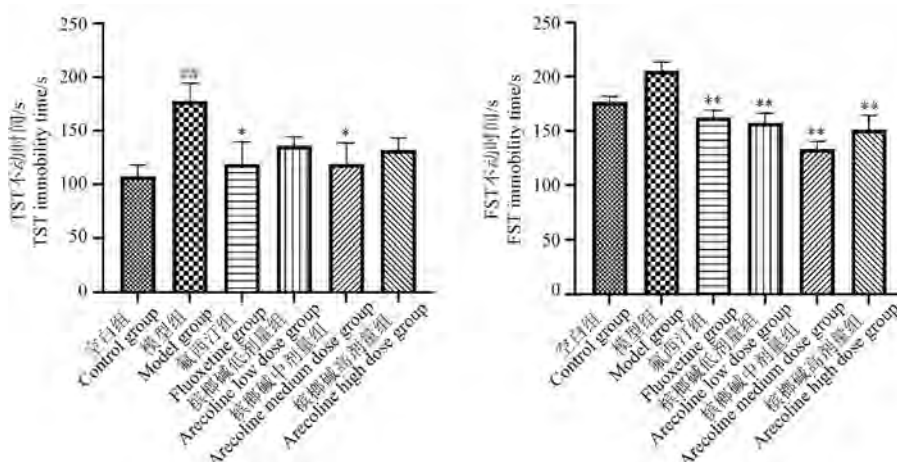


图 2 槟榔碱对小鼠 TST 和 FST 活动时间的影

Figure 2 Effects of arecoline on TST and FST activity time in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

不动时间显著升高 ($P < 0.01$), FST 不动时间明显升高。与模型组比较, 氟西汀组小鼠 TST 不动时间和 FST 不动时间均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 槟榔碱中剂量组小鼠 TST 不动时间显著降低 ($P < 0.05$), 槟榔碱各剂量组小鼠 FST 不动时间显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明, 槟榔碱可改善小鼠在 TST 和 FST 测试中的绝望抑郁样行为。

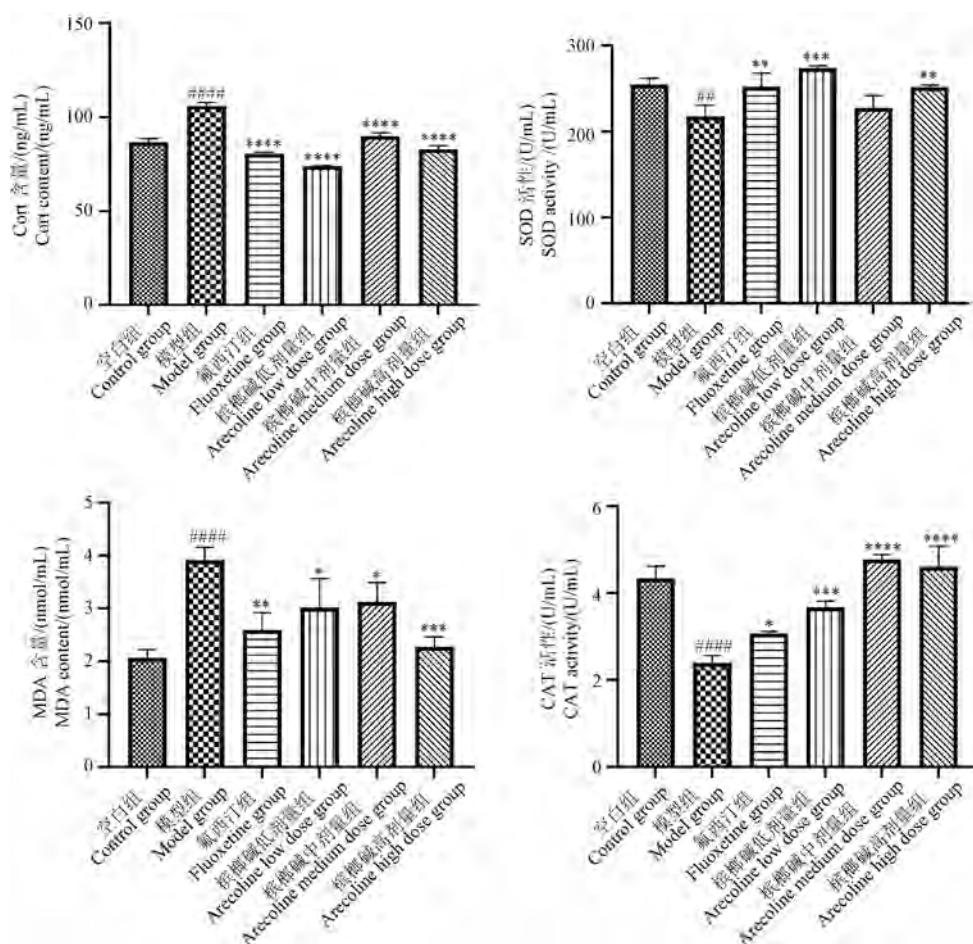
2.3 槟榔碱对小鼠血清氧化应激指标的影响

如图 3 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠 Cort、MDA 显著增加 ($P < 0.0001$), SOD、CAT 显著减少 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$)。与模型组比较, 氟西汀组小鼠血清 Cort、MDA 显著下降 ($P < 0.001$, $P < 0.01$), SOD、CAT 显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 槟榔碱低、中、高剂量小鼠 Cort

显著降低 ($P < 0.0001$)、MDA 显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.001$), 槟榔碱低、高剂量组小鼠 SOD 显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 槟榔碱低、中、高剂量组小鼠 CAT 显著增加 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$)。结果表明, 槟榔碱干预可显著提高模型小鼠血清中抗氧化水平。

2.4 槟榔碱对小鼠脑组织氧化应激指标的影响

结果如图 4 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠 MDA 显著增加 ($P < 0.0001$), SOD、CAT 显著减少 ($P < 0.0001$)。与模型组比较, 氟西汀组小鼠脑组织 MDA 显著下降 ($P < 0.001$), SOD、CAT 显著升高 ($P < 0.0001$); 槟榔碱低、中、高剂量小鼠 MDA 显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$), 槟榔碱低、中、高剂量组小鼠 SOD 显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$), 槟榔碱



注: 与空白组相比, ^{####} $P < 0.0001$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.001$, ^{***} $P < 0.0001$ 。(下图同)

图 3 槟榔碱对小鼠血清氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Note. Compared with control group, ^{####} $P < 0.0001$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.001$, ^{***} $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of arecoline on serum oxidative stress indexes in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

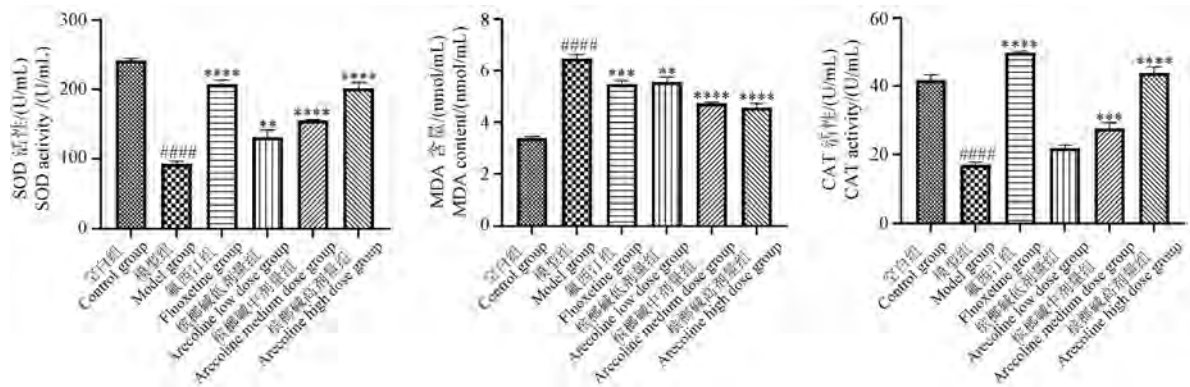


图 4 槟榔碱对小鼠脑组织氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

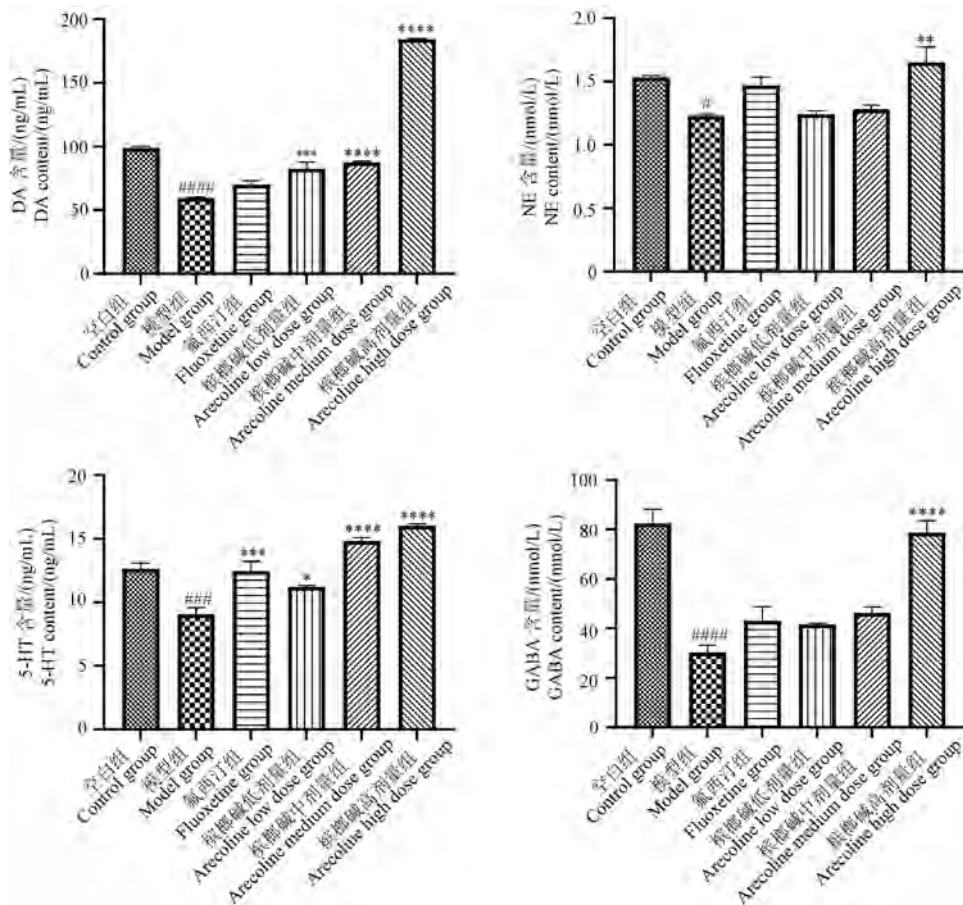
Figure 4 Effect of arecoline on oxidative stress indexes in brain tissue of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

中、高剂量组小鼠 CAT 显著增加($P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$)。结果表明,槟榔碱干预可显著提升模型小鼠脑内抗氧化酶活力并抑制氧化应激水平。

2.5 槟榔碱对小鼠脑组织神经递质的影响

如图 5 所示单胺类神经递质假说中,神经元

之间的 5-HT、DA、NE 等单胺类神经递质浓度减少时,可能会导致抑郁症状的发生,GABA 也参与了情绪调控过程^[22]。与空白组比较,模型组小鼠 DA、NE、5-HT 和 GABA 均显著降低($P < 0.0001$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$)。与模型组比



注:与空白组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 5 槟榔碱对脑组织中 5-HT、DA、NE、GABA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

Figure 5 Effects of arecoline on 5-HT, DA, NE and GABA in brain tissue($\bar{x} \pm s, n = 10$)

较,氟西汀组小鼠 5-HT 显著增加 ($P < 0.001$), DA、NE 和 GABA 均有所升高;槟榔碱低、中、高剂量小鼠 DA 和 5-HT 显著增加 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.0001$), 槟榔碱高剂量组小鼠 NE 和 GABA 显著增加 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.0001$)。结果表明,槟榔碱干预可通过显著提升小鼠脑内神经递质释放水平来达到抗抑郁效果。

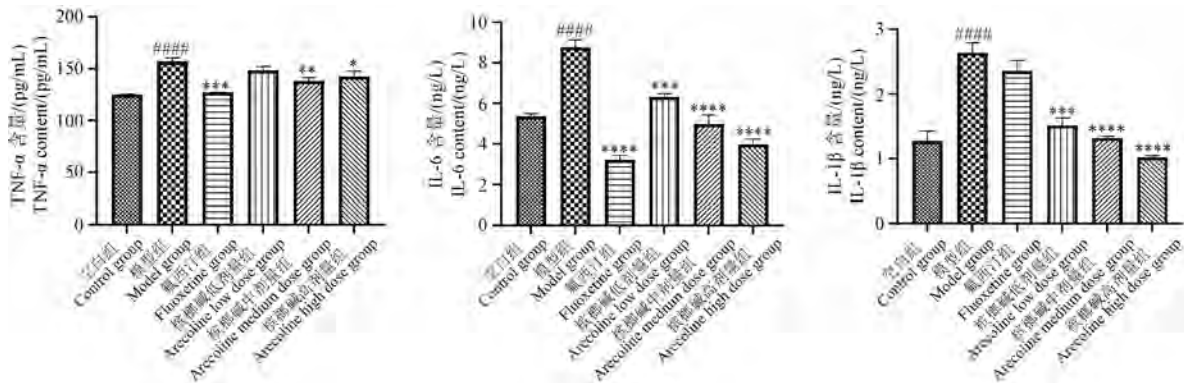


图 6 槟榔碱对脑组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 6 Effects of arecoline on TNF- α , IL-6 and IL-1 β in brain tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.7 槟榔碱对小鼠脑组织 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的影响

如图 7 结果所示,与空白组相比,模型组小鼠脑组织内 BDNF/ β -actin 比值、P-TrkB/TrkB 比值和 P-CREB/CREB 比值显著降低 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.01$)。与模型组相比,槟榔碱高剂量组可显著上调 BDNF 蛋白表达 ($P < 0.05$);氟西汀、槟榔碱中和高剂量组可显著上调 P-TrkB/TrkB 比值 ($P < 0.0001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.0001$);氟西汀组可显著上调 P-CREB/CREB 比值 ($P < 0.001$), 槟榔碱高剂量组 P-CREB/CREB 比值有所升高。该结果表明槟榔碱对抑郁小鼠的改善作用可能与其对 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的调控密切相关。

3 讨论

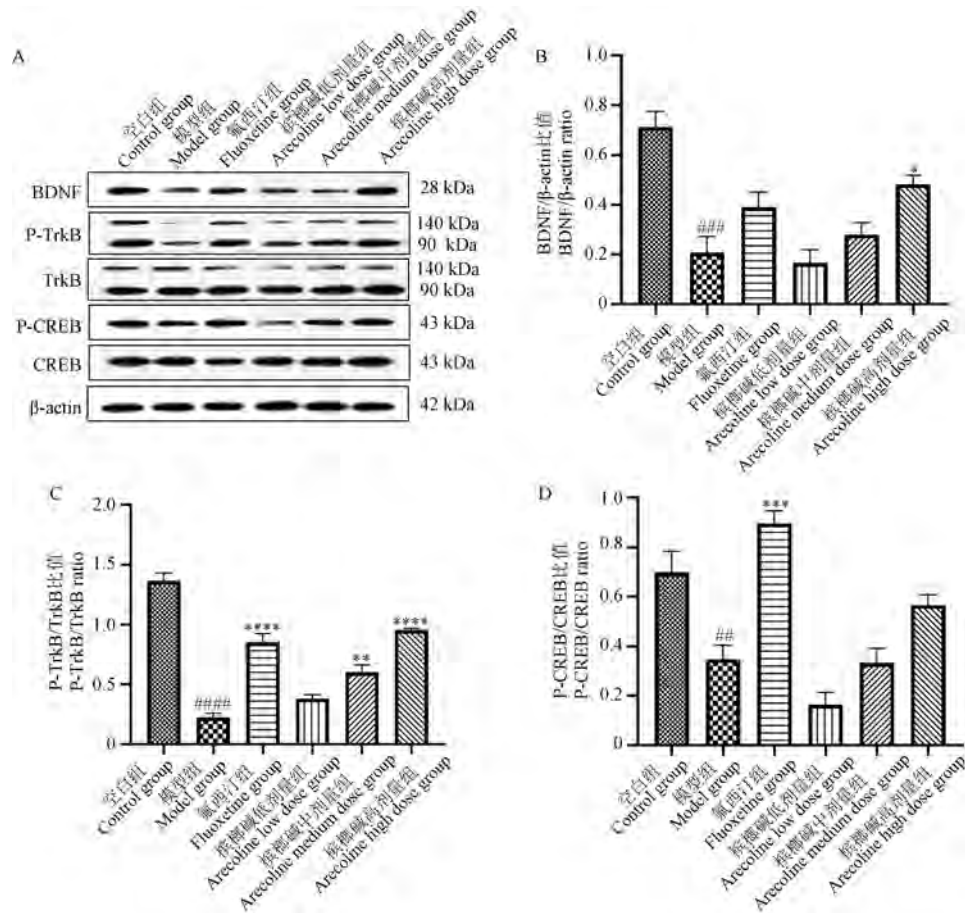
抑郁症是一种常见的精神疾病,其发病机制复杂,目前的发病假说主要包括:下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴功能失调假说、单胺假说、神经炎症假说、遗传和表观遗传异常假说、大脑结构和功能重塑假说以及社会心理学假说^[24]。然而这些假说本身都不能完

2.6 槟榔碱对小鼠脑组织细胞因子的影响

细胞因子的水平也是评价抑郁症的重要指标^[23]。如图 6 所示,与空白组相比,模型组小鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量显著增加 ($P < 0.0001$)。与模型组比较,槟榔碱中、高剂量小鼠 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 槟榔碱各剂量组小鼠 IL-6、IL-1 β 含量显著降低 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$)。

全解释抑郁症的病理基础,许多机制是相互作用的,并且单一细胞类型或脑区有限的病理变化不足以解释其机制^[25]。虽传统的三环类抗抑郁药、选择性 5-HT 及 NE 再摄取抑制剂已广泛用于抑郁症的临床治疗。但其药理机制尚不明确,并且部分患者疗效滞后、治疗反应不佳、自杀率难以有效控制。已发现的抗抑郁药,氯胺酮^[26]及其他一些迷幻药具有快速且持久的抗抑郁作用,但仍需深入研究确切的分子机制,同时进一步探索新的潜在治疗靶点和策略。本研究通过 CUMS 模型构建小鼠抑郁模型,小鼠的行为学检测结果显示模型组较比空白对照组旷场自主活动次数显著减少,总路程和平均速度显著增加;TST 和 FST 不动时间显著提高,提示造模成功。同时经过槟榔碱的干预,活动次数显著增加,总路程和平均速度显著降低;TST 和 FST 不动时间显著降低,说明槟榔碱的干预可以达到显著的抗抑郁效果。

HPA 轴的持续激活和失衡是抑郁症发展中的关键机制之一。已有研究表明,血清 Cort 水平可作为啮齿类动物 HPA 轴活动增强的有效生物标记物^[27]。为探究槟榔碱对这一通路的调控效应,本研究测定了实验动物血清及脑组织中的



注: A: 免疫蛋白印迹结果; B: BDNF 蛋白表达; C: TrkB 蛋白磷酸化水平; D: CREB 蛋白磷酸化水平。

图 7 槟榔碱对 CUMS 小鼠 BDNF/TrkB/CREB 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. Western Blot result. B. BDNF protein expression. C. TrkB protein phosphorylation level. D. CREB protein phosphorylation level.

Figure 7 Effect of arecoline on BDNF/TrkB/CREB pathway in CUMS mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Cort 浓度。结果表明, 槟榔碱干预可显著降低小鼠血清 Cort 含量。脂质过氧化终产物 MDA 可用来衡量细胞内氧化应激的程度^[28]。另一方面, SOD 与 CAT 这两种酶在维持细胞抗氧化平衡方面具有重要意义^[29]。裴海月等^[30]的研究发现, 经过 14 d 的槟榔干预, 小鼠体内抗氧化相关酶 SOD 和 CAT 活性显著提高, 而氧化应激标志物 MDA 水平则明显下降, 进一步证明了槟榔具有显著的体内抗氧化能力。本研究结果表明, 不同剂量的槟榔碱处理均能有效减少小鼠体内 MDA 的积累, 显著提高小鼠 SOD 和 CAT 表达水平, 且槟榔碱抗氧化应激损伤能力比氟西汀强。表明槟榔碱可通过调节 HPA 轴功能, 对抗氧化应激损伤来达到抗抑郁效果。传统的单胺假说认为, 5-HT、DA 和 NE 等单胺类神经递质的缺乏是临床

抑郁症的根本原因^[31]。通过检测小鼠脑组织单胺类神经递质 5-HT、DA、NE 和 GABA, 结果表明, 槟榔碱各剂量组显著增加小鼠 5-HT 和 DA 含量且作用强于氟西汀, 同时槟榔碱高剂量组显著增加小鼠 NE 和 GABA 含量, 且槟榔碱低、中浓度干预下 NE 和 GABA 水平升高程度与氟西汀干预结果无明显差异。本研究表明, 槟榔碱在 CUMS 模型中具有调节单胺类神经递质水平的作用, 可显著回升 5-HT、DA、NE 和 GABA 的表达水平。由此推测, 其抗抑郁作用可能部分依赖于对胆碱能系统的调节与改善。CHU^[32]研究发现, 槟榔中的生物碱具有较强的 GABA 摄取抑制作用。咀嚼槟榔还可能作用于交感神经系统, 导致血液中去甲肾上腺素水平上升, 本研究结果与之一致。神经炎症假说揭示, 在抑郁症中, 促炎细胞因子与

营养因子的水平出现异常。进一步研究表明,活性氧、炎症细胞因子以及炎症小体的激活过程可以触发神经炎症反应,进而加剧抑郁症状的形成。有报道称有细胞会引起并加剧神经炎症和神经变性,同时释放 IL-1 β 、TNF- α 等促炎细胞因子,减少神经营养因子的产生,影响神经元的功能和形态,参与抑郁症的发生发展^[33]。本研究通过检测槟榔碱干预下小鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的水平,与模型组相比,槟榔碱中、高剂量组(20、40 mg/kg)小鼠 TNF- α 含量显著降低,槟榔碱低、中、高剂量小鼠的 IL-6、IL-1 β (10、20、40 mg/kg)含量显著降低,表明槟榔碱通过抑制神经炎症反应、调节神经递质水平达到抗抑郁作用。脑源性营养因子 BDNF 等是与抑郁症密切相关的蛋白质,在认知、学习和记忆等方面起着重要作用^[34]。研究表明,较低水平的 BDNF 与抑郁症的易感性增加有关^[35]。TrkB 信号传导提高了大脑的可塑性,对抑郁症的发生机制和抗抑郁药物的效果具有重要影响^[36]。CREB 作为一个重要的转录因子,参与调节 BDNF 的表达及记忆的形成。CREB 通过活化并与 BDNF 的下游靶点结合,发挥其神经修复和保护功能^[37]。本研究通过进一步检测小鼠脑组织中 BDNF、TrkB、CREB 等蛋白,结果表明,与模型组相比,槟榔碱高剂量组可显著上调 BDNF 蛋白表达($P < 0.05$);槟榔碱中、高剂量组可显著上调 P-TrkB/TrkB 比值($P < 0.01$, $P < 0.0001$);槟榔碱高剂量组 P-CREB/CREB 比值有所升高。该结果表明槟榔碱可通过调控脑组织 BDNF/TrkB/CREB 信号通路对抑郁小鼠起到改善作用。

综上,本研究采用 CUMS 抑郁小鼠模型,通过 OFT、TST、FST 等行为学评价槟榔碱对抑郁小鼠的行为影响,结果发现槟榔碱具备显著抗抑郁活性,分子生物学实验还揭示,该成分的作用机制与其抵抗氧化应激损伤、抑制神经炎症反应、调节神经递质平衡,以及调控 BDNF/TrkB/CREB 信号通路密切相关。相比传统抗抑郁药,槟榔碱具有多靶点作用,这可能为某些对传统治疗反应不佳的患者提供另一种治疗途径。本研究首次挖掘了槟榔碱的抗抑郁功效并初步揭示其可能的调控机制,可为槟榔发挥神经活性提供数据支持并为槟榔的药用开发奠定理论基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 孔丹丹,李歆悦,赵祥升,等.药食两用槟榔的国内外研究进展[J].中国中药杂志,2021,46(5):1053-1059.
KONG D D, LI X Y, ZHAO X S, et al. Domestic and international research progress of edible and medicinal Arecae Semen [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(5): 1053-1059.
- [2] 赵佳亮,田田,刘元法,等.槟榔的化学成分及其功能活性研究进展[J].食品研究与开发,2023,44(18):212-218.
ZHAO J L, TIAN T, LIU Y F, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Areca catechu* L. [J]. Food Res Dev, 2023, 44(18): 212-218.
- [3] 吕俊辰,弓宝,孙佩文.槟榔药用和食用安全性研究概况[J].中草药,2017,48(2):384-390.
LV J C, GONG B, SUN P W. Research progress in safety for medicinal and edible areca catechu [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(2): 384-390.
- [4] 唐敏敏,宋菲,王辉,等.槟榔多糖的抗氧化活性及其对细胞内氧化损伤抑制作用的研究[J].热带作物学报,2015,36(6):1136-1141.
TANG M M, SONG F, WANG H, et al. *In vitro* antioxidant activities and protective effects of polysaccharides from *Areca catechu* L. seed [J]. Chin J Trop Crops, 2015, 36(6): 1136-1141.
- [5] 尹明松,丁贺辉,潘飞兵,等.响应面优化超声辅助双水相提取槟榔多糖及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2021,42(19):163-170.
YIN M S, DING H H, PAN F B, et al. Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of *Areca catechu* L. Polysaccharide using response surface design and assessment of its antioxidant activities [J]. Food Res Dev, 2021, 42(19): 163-170.
- [6] 祁静. 槟榔酚类化合物的提取、抗氧化及抗疲劳作用研究[D].海口:海南大学;2011.
QI J. Extraction, antioxidant and anti-fatigue effects of phenolic compounds of betel nut [D]. Haikou: Hainan University; 2011.
- [7] 孙娟,曹立幸,陈志强,等.中药槟榔及其主要成分的药理和毒理研究概述[J].广州中医药大学学报,2018,35(6):1143-1146.
SUN J, CAO L X, CHEN Z Q, et al. Review of pharmacological and toxicological studies on Semen arecae and its main component [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(6): 1143-1146.
- [8] 马江红,杜兴,赵安鹏,等.槟榔多酚的抗缺氧药理作用[J].中南大学学报(医学版),2022,47(4):512-520.
MA J H, DU X, ZHAO A P, et al. Anti-hypoxic pharmacological effects of betelnut polyphenols [J]. J Cent

- South Univ (Med Sci), 2022, 47(4): 512–520.
- [9] 山雨梅, 张锦超, 赵艳玲, 等. 槟榔碱抗动脉粥样硬化分子机制的研究 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(2): 146–151.
- SHAN L M, ZHANG J C, ZHAO Y L, et al. Molecular mechanisms for arecoline against atherosclerosis [J]. Chin Pharmacol Bull, 2004, 20(2): 146–151.
- [10] HUANG L W, HSIEH B S, CHENG H L, et al. Arecoline decreases interleukin-6 production and induces apoptosis and cell cycle arrest in human basal cell carcinoma cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 258(2): 199–207.
- [11] 亓竹青. 槟榔碱对 2 型糖尿病大鼠胰腺细胞的保护作用及其机制 [D]. 衡阳: 南华大学; 2010.
- QI Z Q. Protection effect of Arecoline on pancreas cells in type 2 diabetic rats and its mechanism [D]. Hengyang: University of South China; 2010.
- [12] 姚起鑫. 槟榔碱通过 CAR/PXR 改善高糖诱导的 2 型糖尿病大鼠肝糖代谢紊乱 [D]. 衡阳: 南华大学; 2010.
- YAO Q X. Arecoline improved glucose metabolism in type 2 diabetes rats by CAR and PXR [D]. Hengyang: University of South China; 2010.
- [13] 王佑权, 周寿红. 槟榔碱对高糖诱导血管内皮依赖性舒张功能损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(6): 461–464.
- WANG Y Q, ZHOU S H. Arecoline prevents the injury of endothelium dependent relaxation induced by high glucose [J]. Chin J Arterioscler, 2010, 18(6): 461–464.
- [14] 栾剑, 陶晓月. 关于传统中药槟榔生物活性的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2018, 24(13): 8–10, 12.
- LUAN J, TAO X Y. Study on the biological activity of Areca catechu [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2018, 24(13): 8–10, 12.
- [15] 胡金颖, 陈玺, 马腾, 等. 槟榔碱对神经损伤的缓解和修复作用及机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(7): 497.
- HU J Y, CHEN X, MA T, et al. Effects of arecoline on nerve injury and its mechanism [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2023, 37(7): 497.
- [16] MONROE S M, HARKNESS K L. Major depression and its recurrences: life course matters [J]. Annu Rev Clin Psychol, 2022, 18: 329–357.
- [17] MORENO-AGOSTINO D, WU Y T, DASKALOPOULOU C, et al. Global trends in the prevalence and incidence of depression: a systematic review and meta-analysis [J]. J Affect Disord, 2021, 281: 235–243.
- [18] WONG V W, HO F Y, SHI N K, et al. Lifestyle medicine for depression: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. J Affect Disord, 2021, 284: 203–216.
- [19] PENG Y Y, TANG C, WANG H Y, et al. p75NTR mediated chronic restraint stress-induced depression-like behaviors in mice via hippocampal mTOR pathway [J]. Life Sci, 2024, 358: 123175.
- [20] LI R, WANG X, QIN T, et al. Apigenin ameliorates chronic mild stress-induced depressive behavior by inhibiting interleukin-1 β production and NLRP3 inflammasome activation in the rat brain [J]. Behav Brain Res, 2016, 296: 318–325.
- [21] LIU L, DONG Y, SHAN X, et al. Anti-depressive effectiveness of baicalin *in vitro* and *in vivo* [J]. Molecules, 2019, 24(2): 326.
- [22] DELGADO P L. Depression: the case for a monoamine deficiency [J]. J Clin Psychiatry, 2000, 61(6): 7–11.
- [23] TING E Y, YANG A C, TSAI S J. Role of interleukin-6 in depressive disorder [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2194.
- [24] WANG H Q, WANG Z Z, CHEN N H. The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: genetic bases and biological correlates [J]. Pharmacol Res, 2021, 167: 105542.
- [25] TARTT A N, MARIANI M B, HEN R, et al. Dysregulation of adult hippocampal neuroplasticity in major depression: pathogenesis and therapeutic implications [J]. Mol Psychiatry, 2022, 27(6): 2689–2699.
- [26] 赖增燕, 钱妍, 赵春景, 等. 氯胺酮及其衍生物的抗抑郁研究进展 [J]. 中国药物评价, 2024, 41(5): 372–376.
- LAI Z Y, QIAN Y, ZHAO C J, et al. Advanced in antidepressant research of ketamine and its derivatives [J]. Chin J Drug Eval, 2024, 41(5): 372–376.
- [27] ROTH M K, BINGHAM B, SHAH A, et al. Effects of chronic plus acute prolonged stress on measures of coping style, anxiety, and evoked HPA-axis reactivity [J]. Neuropsychopharmacology, 2012, 63(6): 1118–1126.
- [28] HSU W H, CHUNG C P, WANG Y Y, et al. Dendrobium nobile protects retinal cells from UV-induced oxidative stress damage via Nrf2/HO-1 and MAPK pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 288: 114886.
- [29] KRZYSZCZAK A, DYBOWSKI M, JOŚKO I, et al. The antioxidant defense responses of *Hordeum vulgare* L. to polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in biochar-amended soil [J]. Environ Pollut, 2022, 294: 118664.
- [30] 裴海月, 姜宁, 王孟迪, 等. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 24–32.
- PEI H Y, JIANG N, WANG M D, et al. Antidepressant effect of *Areca catechu* L. on mice and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 24–32.
- [31] 王元翀, 邱喜龙, 王博瑶. 中药调控单胺类神经递质治

- 疗抑郁症的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(9): 2182-2196.
- WANG Y C, QIU X L, WANG B Y. Research progress in treatment of depression with traditional Chinese medicine by regulating monoamine neurotransmitters [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(9): 2182-2196.
- [32] CHU N S. Effects of Betel chewing on the central and autonomic nervous systems [J]. J Biomed Sci, 2001, 8(3): 229-236.
- [33] 刘燕, 彭梦薇, 张文娟, 等. 脑内星形胶质细胞-神经元相互作用参与抑郁症发病研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 124-129.
- LIU Y, PENG M W, ZHANG W X, et al. Research progress of brain astrocyte-neuron interactions involved in the pathogenesis of depression [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 124-129.
- [34] EGAN M F, KOJIMA M, CALLICOTT J H, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function [J]. Cell, 2003, 112(2): 257-269.
- [35] LIM Y Y, MARUFF P, BARTHÉLEMY N R, et al. Association of BDNF Val66Met with tau hyperphosphorylation and cognition in dominantly inherited Alzheimer disease [J]. JAMA Neurol, 2022, 79(3): 261-270.
- [36] ZHANG J C, YAO W, HASHIMOTO K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-TrkB signaling in inflammation-related depression and potential therapeutic targets [J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(7): 721-731.
- [37] ROSA E, FAHNESTOCK M. CREB expression mediates amyloid β -induced basal BDNF downregulation [J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(8): 2406-2413.
- [收稿日期] 2024-12-06

《中国实验动物学报》稿约

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

一、杂志介绍

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

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

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

梁晓,李昂昂,彭勍,等. LPS 诱导的小鼠急性肺损伤后肺纤维化模型构建与机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33 (6): 848-857.

LIANG X, LI A A, PENG Q, et al. Construction and mechanism of pulmonary fibrosis model in mice induced by lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 848-857.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.007

LPS 诱导的小鼠急性肺损伤后肺纤维化模型构建与机制研究

梁晓¹, 李昂昂^{1,2}, 彭勍¹, 刘建勋^{1*}, 李军梅^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京 100091; 2. 广东药科大学中医药研究院, 广州 510006)

【摘要】 目的 肺纤维化的进展是急性肺损伤(acute lung injury, ALI)后临床上常见的预后问题, 本实验通过脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)多次打击筛选构建模拟临床上 ALI 后肺纤维化的模型, 观察急性肺损伤后到肺纤维化的发展过程, 并探索介导炎症损伤向纤维化转化的可能机制。**方法** 采用 1、2、4、8 mg/kg 不同剂量的脂多糖不同次数经鼻腔滴入造成急性肺损伤, 分别于造模后 7、14、21、28、35、42 d, 通过观察肺组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、胶原蛋白-1(collagen-1, Col-1)的表达, 肺组织中羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量, Masson 染色观察肺组织胶原纤维沉积, 比较不同造模方法肺组织纤维化形成过程及纤维化程度, 检测各节点肺组织中白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的表达变化, 探讨纤维化形成的机制。**结果** 以 1、4、4 mg/kg LPS 连续 3 d 进行打击的 M-1 组小鼠可以构建稳定的 ALI 后肺纤维化模型: M-1 组小鼠肺组织中 α -SMA、Col-1 的表达、HYP 含量和胶原纤维沉积从 7 d 后开始随时间依赖性增加, 造模后 21 d 肺组织间质出现明显的胶原沉积, 第 28、35、42 d 纤维化指标持续显著性升高。其余不同剂量、不同打击次数的各模型组小鼠肺组织 HYP 含量、胶原纤维表达与对照组小鼠比较没有增加或增加不显著。Western Blot 结果显示: M-1 组小鼠肺组织中的 TGF- β 1 在打击后的 14 d 开始表达逐渐增加, 到 28 d 显著高于对照组, 促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 在第 7 天(急性期)均显著增加, TNF- α 的表达至观察的 28 d 持续增加, IL-1 β 则在第 7 天急性期后表达逐渐下降。其余未形成纤维化的各模型组小鼠肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 在急性期后表达均持续降低。**结论** LPS 以 1、4、4 mg/kg 剂量连续 3 次打击可成功构建 ALI 后肺纤维化模型, 其机制可能与 TNF- α 持续高表达调控 TGF- β 1 诱导成纤维细胞活化与增殖有关。

【关键词】 急性肺损伤; 肺纤维化; 脂多糖; 炎症; 模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0848-10

Construction and mechanism of pulmonary fibrosis model in mice induced by lipopolysaccharide-induced acute lung injury

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程(CI2021A04603)。

Funded by China Academy of Chinese Medical Sciences Science and Technology Innovation Project(CI2021A04603)。

【作者简介】 梁晓, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 18550779676@163.com

【通信作者】 刘建勋, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: liujx0324@sina.com;

李军梅, 女, 学士, 副主任技师, 研究方向: 中药药理学。Email: junmei0907@163.com。

* 共同通信作者

LIANG Xiao¹, LI Angang^{1,2}, PENG Qing¹, LIU Jianxun^{1*}, LI Junmei^{1*}

- (1. Chinese Medicine Research Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, Beijing 100091, China;
2. Chinese Medicine Research Institute, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Corresponding author: LIU Jianxun. E-mail: liujx0324@sina.com;

LI Junmei. E-mail: junmei0907@163.com

【Abstract】 Objective The progression of pulmonary fibrosis is a common clinical issue after acute lung injury (ALI). We aimed to construct a model simulating clinical ALI-induced pulmonary fibrosis by repeated challenges with lipopolysaccharide (LPS). We then observed the development from ALI to pulmonary fibrosis, to explore the possible mechanisms mediating the transition from inflammatory injury to fibrosis. **Methods** Mice were treated with LPS (1, 2, 4, 8 mg/kg) intranasally to induce ALI. At 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 35 d, and 42 d after modeling respectively, α -smooth muscle actin (SMA), collagen 1 (Col-1), and hydroxyproline levels in lung tissue, and collagen fiber deposition were observed by Masson staining and compared to determine the process and degree of fibrosis formation in different modeling method. Expression changes in interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , and transforming growth factor (TGF)- β 1 in lung tissue at each time point were detected to explore the mechanisms of fibrosis formation. **Results** Treatment of mice with 1, 4, and 4 mg/kg LPS for 3 consecutive days (M-1 group) resulted in a stable ALI-induced pulmonary fibrosis model. Masson staining showed that α -SMA, Col-1, hydroxyproline, and collagen fiber deposition in the lung tissue began to increase in M-1 group mice in a time-dependent manner after 7 d. Collagen deposition in the lung tissue interstitium was significantly increased at 21 d post-modeling, and fibrosis indicators were significantly increased at 28 d, compared with control mice. Collagen deposition continued to increase until 42 d. Hydroxyproline and collagen fibers in the lung tissue in the other model groups with different doses and hit times did not increase significantly compared with the control group. TGF- β 1 expression detected by Western blot began to increase gradually 14 d after modelling in the M-1 group, and was significantly higher than in the control group at 28 d. The pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β increased significantly on day 7 (acute phase), and TNF- α expression continued to increase until 28 d, while IL-1 β gradually decreased after day 7. TNF- α and IL-1 β in the lung tissue both continued to decrease after the acute phase in the other model groups without fibrosis. **Conclusions** LPS 1, 4, and 4 mg/kg for 3 consecutive days can be used to construct an ALI/acute respiratory distress syndrome-induced pulmonary fibrosis model, via a mechanism that may be related to the sustained high expression of TNF- α regulating TGF- β 1 to induce fibroblast activation and proliferation.

【Keywords】 acute lung injury; pulmonary fibrosis; lipopolysaccharide; inflammation; model

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

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)主要是由各种因素引起的肺泡上皮细胞损伤,肺泡毛细血管通透性增加及中性粒细胞大量浸润诱发的急性炎症反应,是重症监护室常见的疾病^[1],其严重阶段可发展为进行性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。ALI 作为呼吸道传染病,病毒、细菌、支原体等病原体感染皆可能是其诱因,如大流行性流感和包括新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 CoV, SARS-CoV-2)和导致非典型肺炎(severe acute respiratory syndrome, SARS)和中东呼吸综合征(middle east respiratory syndrome, MERS)在内

的新型病毒造成全球 ALI/ARDS 发病率与死亡率居高不下,据统计,ALI/ARDS 在全球每年死亡率高达 30% ~ 40%,而在疾病发展后期遗留的炎症后肺纤维化的概率高达 70%,也造成 ALI/ARDS 病死率进一步增加^[2-4]。肺纤维化的形成主要与肺泡上皮细胞损伤、肺泡上皮间质转化、成纤维细胞活化以及胶原蛋白过度沉积有关,其纤维化发展与前期持续的炎症损伤和异常修复密切相关^[4],是临床上影响 ALI 患者预后不良及康复质量的重要原因^[5]。目前在各种 ALI/ARDS 实验模型中,关于肺部损伤后肺纤维化发展的信息很少,现有纤维化模型与临床上急性肺损伤后

纤维化形成存在差异,因此,通过构建 ALI 模型探索模拟临床上 ALI 向肺纤维化动态演变过程,为防治肺纤维化提供思路并推动药物研发发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

140 只清洁级雄性 BALB/c 小鼠,6 ~ 8 周龄,体质量 18 ~ 20 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2024-0001】。实验动物分笼饲养于中国中医科学院西苑医院动物房【SYXK(京)2023-0053】,饲养温度 20 ~ 24 ℃,相对湿度 40 % ~ 70 %,12 h/12 h 光照黑暗交替自由饮水饮食。本实验经中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审查通过(2022XLC035-受 2)。

1.1.2 主要试剂与仪器

LPS(来源于 *Escherichia coli* O55: B5,批号:0000135216,购自美国 Sigma 公司),戊巴比妥钠(批号:020402,购自北京化学试剂公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:PC0020,购自北京索莱宝科技有限公司),高效 RIPA 组织/细胞裂解液(货号:R0010,购自北京索莱宝科技有限公司);转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1), α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α),白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),GAPDH 抗体以及羊抗兔的 II 抗(HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H + L))(货号分别为:21898-1-AP,67735-1-1g,60291-1-1g,16806-1-AP,10494-1-AP,SA00001-2,均购自武汉三鹰生物技术有限公司),胶原蛋白-1(collagen-1,Col-1)(货号:AB270993,购自美国 abcam 公司)。

手术器械(上海金钟);Synergy 4 酶标检测仪(型号:Epoch,购自美国 BioTek 公司);高速冷冻离心机(型号:H2500R2,购自湖南湘仪公司);蛋白质凝胶成像系统(型号:ND11-GIS-300,购自美国 Bio-Rad 公司);电子天平(型号:AUX220D,购自日本岛津 Shimadzu)。

1.2 方法

1.2.1 纤维化模型造模方法、指标检测

(1)不同构建纤维化模型方法比较:将 120 只健康雄性 BALB/c 小鼠随机分为 6 组,分别为:

空白对照组(Con)、模型一(M-1)组、模型二(M-2)组、模型三(M-3)组、模型四(M-4)组、模型五(M-5)组,每组每时间节点各 5 只,M-1 组分别于第 1、2、3 天鼻滴 LPS 1、4、4 mg/kg,M-2 组分别于第 1、3 天鼻滴 LPS(1、4 mg/kg),第 2 天腹腔注射 LPS 4 mg/kg,M-3 组分别于第 1、2、3、4 天鼻滴 LPS 1、4、4、4 mg/kg,M-4 组分别于第 1、2、3 天鼻滴 LPS 2、4、4 mg/kg,M-5 组分别于第 1、14 天鼻滴 LPS 8、8 mg/kg,Con 组分别于第 1、2、3 天鼻滴等剂量的生理盐水。具体造模方法如下:将 LPS 配制为 0.4 mg/mL 的母液放置于 4 ℃ 备用,小鼠在异氟烷气体麻醉后,经单侧鼻孔滴入 LPS 进行造模,滴入后迅速将小鼠直立,待小鼠苏醒后放回笼,各组小鼠分别于第 7、14、21、28 天进行取材与检测。

(2)纤维化模型持续时间(窗口期)观察:将 20 只健康雄性 BALB/c 小鼠随机分为 2 组:Con 组、M-1 组。M-1 组小鼠分别于第 1、2、3 天鼻滴 LPS(1、4、4 mg/kg)造模,具体造模方法同实验(1),Con 组鼻滴等剂量的生理盐水,各组小鼠分别于造模后 35、42 d 进行取材与检测,每组每节点各 5 只,观察 M-1 组小鼠肺纤维化的持续时间。

1.2.2 肺指数计算

取材前将小鼠称重,各组小鼠于各时间节点使用 0.6 % 戊巴比妥钠溶液(0.1 mL/10 g)腹腔注射麻醉小鼠,取全肺组织称重,计算肺指数,肺指数 = 全肺组织湿重/小鼠体质量 $\times$ 100 %。

1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理及病理评分

取各组小鼠右肺上叶,石蜡包埋切片,进行 HE 染色,置于在显微镜下观察各组小鼠肺组织病理形态变化,并进行病理评分。

1.2.4 Masson 染色观察胶原沉积及纤维化评分

取各组小鼠右肺上叶,石蜡包埋切片,进行 Masson 染色,置于在显微镜下观察各组小鼠肺组织胶原沉积变化,并使用 Image J 软件(v1.8.0)对整张扫描切片中的蓝色胶原纤维面积进行定量分析,肺纤维化程度由胶原纤维面积百分数表示,即胶原纤维面积/肺组织面积 $\times$ 100 %。

1.2.5 肺组织 HYP 含量检测

取各组小鼠肺组织左叶,称重、裂解,按照 HYP 试剂盒说明书进行操作,根据每个样本测定

的实际吸光度(OD)值计算 HYP 值。

1.2.6 肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、 α -SMA、Col-1 蛋白检测

取各组小鼠肺组织进行裂解、变性、电泳、转膜、封闭,测 IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 1、 α -SMA、Col-1 蛋白,通过化学发光显色后摄取图像,用 Image-J 图像分析系统(v1.8.0)定量各组蛋白灰度值后计算其相对表达,公式:相对表达 = 待测蛋白灰度值/内参蛋白灰度值,以 GAPDH 作为内参对照。

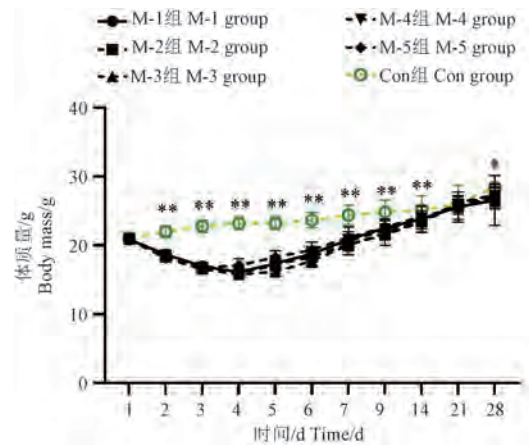
1.3 统计学分析

作图采用 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行图像绘制。实验结果应用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行分析,结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,当数据正态分布并且方差齐时,组间的比较应用 One-way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠体质量变化与整体状态改变

Con 组小鼠生理和行为状态正常,主要包括饮食饮水正常、毛发健康、排便和粪便形态正常以及反应灵敏,保持良好的健康状况;相比之下,各模型组小鼠在造模后 1 ~ 4 d 出现抱团、活动减少、毛发枯燥、呼吸急促和精神萎靡等行为和生理状态的异常改变,在 7 d 后,各模型组小鼠状态开始出现改善;如图 1 所示,与 Con 组小鼠相比,各模型组小鼠在造模后 4 d 体质量降到最低($P < 0.01$),随后逐渐升高,至 21 d 时接近 Con



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

图 1 各组小鼠体质量的变化($\bar{x} \pm s, n = 5$)

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

Figure 1 Changes in body mass of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组水平。各模型组间体质量整体变化趋势相似, M-1 组小鼠 28 d 体质量仍低于 Con 组($P < 0.05$)。

2.2 肺指数变化

肺指数是小鼠体质量与肺组织的质量比,是评估小鼠肺部水肿和反映肺组织损伤的重要指标。实验结果如图 2 所示:与 Con 组相比,各模型组小鼠在造模后 7 d 时(炎症急性期)的肺指数升高最显著($P < 0.01$),之后伴随炎症消退逐渐减轻,肺指数随时间推移有所下降,但仍高于 Con 组水平($P < 0.05$);7 d 时各组肺指数相比较, M-3 组升高最明显, M-2 组升高幅度最小。M-1 组、M-2 组、M-3 组、M-4 组小鼠肺指数变化趋势相似, M-5 组小鼠后期肺指数降低不呈时间依赖降低,

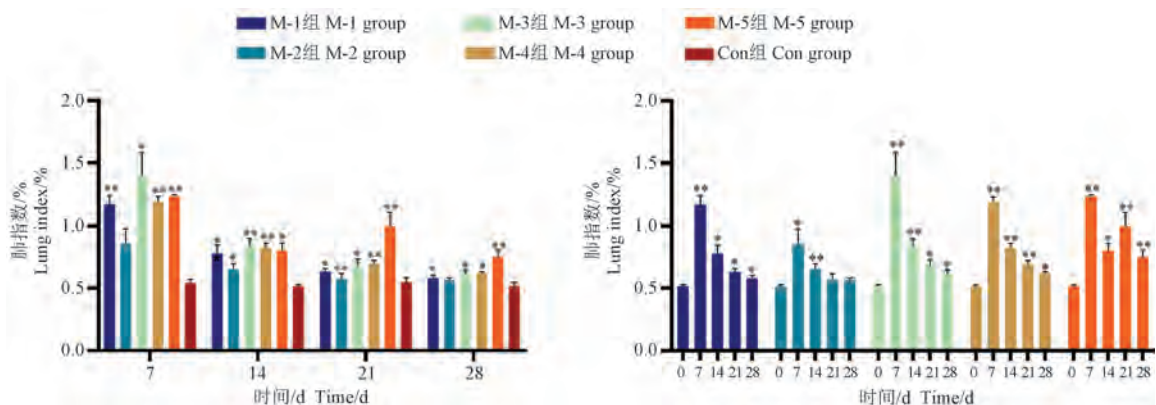


图 2 各组小鼠肺指数的变化($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 2 Changes in the lung index of the mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

推测 M-5 组的打击方式,观察时间内肺组织始终处于急性炎症反应期,肺指数未明显降低。

2.3 肺组织病理学观察及半定量评分变化

纤维化是在炎症损伤后修复过程中形成的病理改变,通过肺组织 HE 染色观察各组小鼠在不同时间节点肺组织炎症损伤程度,分析探讨各造模方法所致肺组织损伤修复与纤维化的关系。按照表 1 的评分准则进行病理评分。

HE 染色结果显示(图 3):Con 组小鼠肺组织结构完整、肺泡壁薄、未见出血或炎性细胞浸润;相比之下,造模 7 d 后各模型组小鼠表现出显著的肺部损伤,表现为中性粒细胞浸润、肺泡间隔

增厚、肺泡结构紊乱甚至消失,出现肺实性变等改变;M-1、M-2、M-3、M-4 组在造模 7 d 时,损伤最严重,病理评分最高($P < 0.01$),M5 组在 21 d 时病理评分最高($P < 0.01$),其中 M2 组较其他模型组损伤相对轻($P < 0.05$)。随时间推移,M-1 ~ M-4 组肺组织损伤呈逐渐恢复趋势,病理评分逐渐降低。M-2(2 次打击)、M3(4 次打击)组病理评分相较 M-1(3 次打击)降低快。M-4(3 次打击,首次 2 mg/kg)组在 14 d 病理评分明显降低,21 ~ 28 d 病理评分降低不明显。M5 组造模后在整个观察期间肺组织损伤没有表现出明显的恢复($P < 0.01$)。

表 1 肺损伤病理学评分标准
Table 1 Pathology classification standard of lung injury

等级 Grade	评分依据 Rating basis
0	肺泡壁完好无增厚,无炎性浸润,无充血 Alveolar wall was intact without thickening, inflammatory infiltration and congestion
1	肺泡壁轻微弥散性炎性细胞浸润(中性粒细胞),肺泡壁未见增厚 Alveolar wall showed slight disseminated inflammatory cell infiltration (neutrophils) and no thickening
2	明显和广泛的炎性细胞(中性粒细胞和单核细胞)浸润,肺泡壁轻微增厚(1 ~ 2 倍) Significant and extensive infiltration of inflammatory cells (neutrophils and monocytes) and slight thickening of the alveolar wall (1 ~ 2 times)
3	严重的炎性细胞浸润,个别区域肺泡壁增厚 2 ~ 3 倍 Severe inflammatory cell infiltration, alveolar wall thickening 2 ~ 3 times in individual areas
4	严重的炎性细胞浸润,肺泡壁明显增厚,25% ~ 50% 肺组织实化 Severe inflammatory cell infiltration, obvious alveolar wall thickening, 25% ~ 50% lung tissue compaction
5	严重的炎性细胞浸润,肺泡壁明显增厚, > 50% 肺组织实化 Severe inflammatory cell infiltration, marked thickening of the alveolar wall and compaction of > 50% lung tissue

2.4 肺组织胶原沉积观察及纤维化评分变化

根据 Image J(v1.8.0) 软件对纤维化进行分析,以单个视野蓝色胶原面积与组织视野面积的比值(%)代表纤维化程度。结果显示(图 4),Con 组小鼠肺组织结构完整,无炎症细胞浸润,肺泡壁无增厚,仅在气管壁和血管壁显示少量胶原染色;M-1 组小鼠肺组织胶原纤维随时间依赖性增加,在造模 21 d 可见肺组织间质出现胶原沉积,到 28 d 时肺间质中可见明显胶原纤维沉积,胶原面积比值显著增加($P < 0.01$);M-2 组以及 M-3 组小鼠 21 d 可见支气管附近的肺组织间质有少量的胶原纤维沉积,28 d 无明显增加,胶原面积比与 Con 组相比无显著性增加;M-4 组及 M-5 组小鼠肺组织中胶原纤维也仅局限于血管和气

管壁,未见间质有胶原沉积。

2.5 肺组织 HYP 测定结果

HYP 是胶原蛋白中的一种特殊氨基酸,它在胶原蛋白的交联和结构稳定性中起着重要作用,HYP 的含量常被用作评估组织中胶原蛋白含量的一个指标,进而用于评价纤维化程度^[6]。根据 HYP 含量检测(图 5)可见,与 Con 组相比,各模型组在 LPS 打击后肺组织中 HYP 含量在 7 d 降低($P < 0.01$)(推测可能由于急性期肺组织的严重水肿,使单位质量的肺组织密度降低造成的),从 14 d 开始呈现上升趋势。M-1、M-2、M-3 组在 28 d 时,HYP 含量与 Con 组相比明显增加,M-1 组与 Con 比较增加显著($P < 0.01$),而其余各组在相同时间点下与 Con 组相比,无统计学意义。

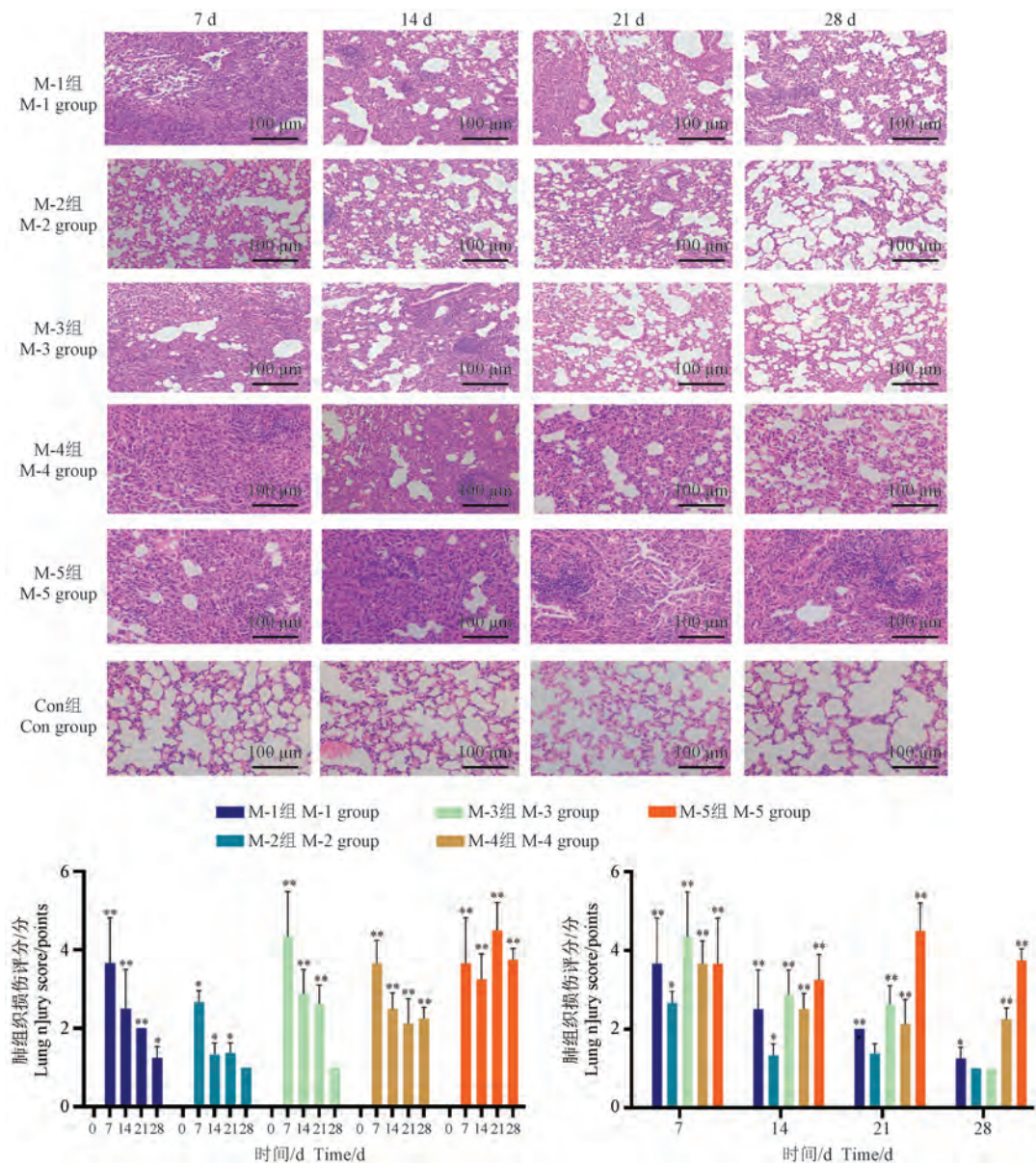


图3 各组小鼠在不同时间节点的肺组织病理形态及肺组织病理评分(HE染色, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 3 Lung histopathology and lung histopathology scores of each group of mice at different time points (HE staining, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.6 肺组织中 TGF-β1、α-SMA、Col-1 蛋白表达水平变化

TGF-β1 是纤维化介质,在所有类型的组织纤维化的发生和发展中起着至关重要的作用,是肺纤维化研究的一个重点。实验结果显示(图6),各模型组在造模后第7天(急性炎症期)肺组织 TGF-β1 表达减少,M-1 组 14 d 后表达量逐渐升高,第 21、28 天显著高于 Con 组($P < 0.01$),与纤维化程度高度一致。M-2 组 ~ M-5 组各时间节点 TGF-β1 的表达并未有增加甚至减少。证实了

TGF-β1 在急性肺损伤后期的纤维化中的关键作用。同时,TGF-β1 的持续表达能够促进成纤维细胞的增殖,并转化为表达 α-SMA 的肌成纤维细胞,介导 Col-1 的形成,触发组织自我修复和随后的纤维化过程^[7]。实验结果显示(图6),造模后 M-1 组小鼠肺组织中 α-SMA、Col-1 蛋白表达 7 d 后稳步增加,28 d 时 TGF-β1、α-SMA、Col-1 表达均增加显著($P < 0.01$)。M-2 组 ~ M-4 组小鼠各时间节点下 α-SMA 虽有短暂的表达增加,但未导致胶原蛋白表达未有持续的增加;M-5 组小鼠由

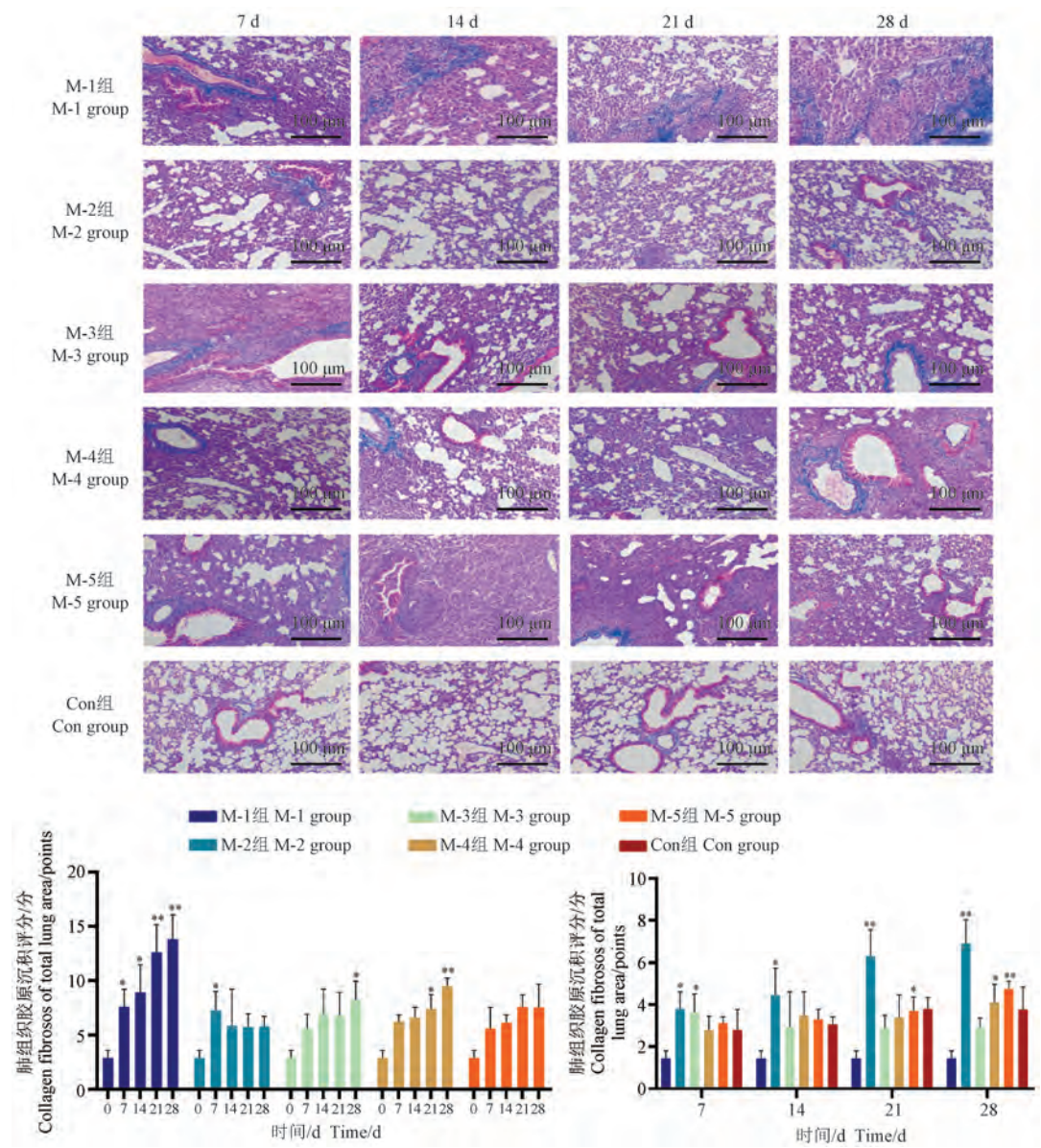


图 4 小鼠不同时间节点的肺组织胶原沉积分析(HE 染色, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 4 Analysis of collagen deposition in lung tissues of mice at different time points (HE staining, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

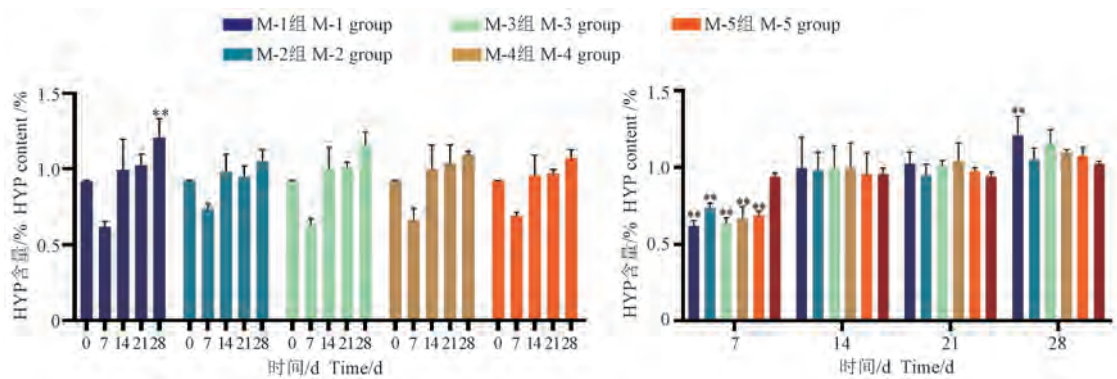


图 5 小鼠不同时间节点肺组织中 HYP 含量($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 5 HYP content in lung tissue at different time nodes of mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

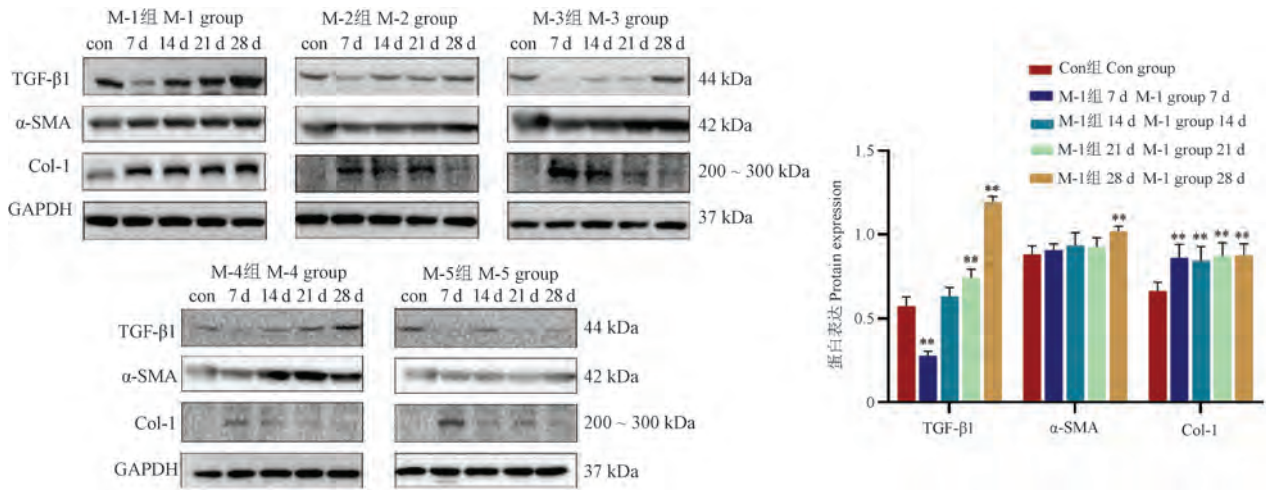


图 6 各组小鼠不同时间节点肺组织中 TGF- β 1、 α -SMA、Col-1 的蛋白表达及 M-1 组小鼠肺组织各节点下的蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 6 Protein expression of TGF- β 1、 α -SMA、Col-1 in lung tissues at different time nodes in mice of each group and protein expression of lung tissues of M-1 mice at each node($\bar{x} \pm s, n = 5$)

于打击剂量大,打击次数间隔长,在 28 d 的观察周期内始终处于急性反应期,未观察到组织增殖与重塑,TGF- β 1、 α -SMA 和 Col-1 的表达未见增加。

2.7 肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 表达水平变化

TGF- β 的调控是一个复杂的过程,大量文献

报道炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 可通过调控 TGF- β 影响纤维化的发展^[8-9]。本实验结果显示(图 7),M-1 组肺组织中 TNF- α 在造模第 7 天急性炎症期显著性升高($P < 0.01$),且一直至观察的第 28 天持续升高($P < 0.01$)。而其它各组 TNF- α 在第 7 天显著升高,之后无持续增加。各组造模

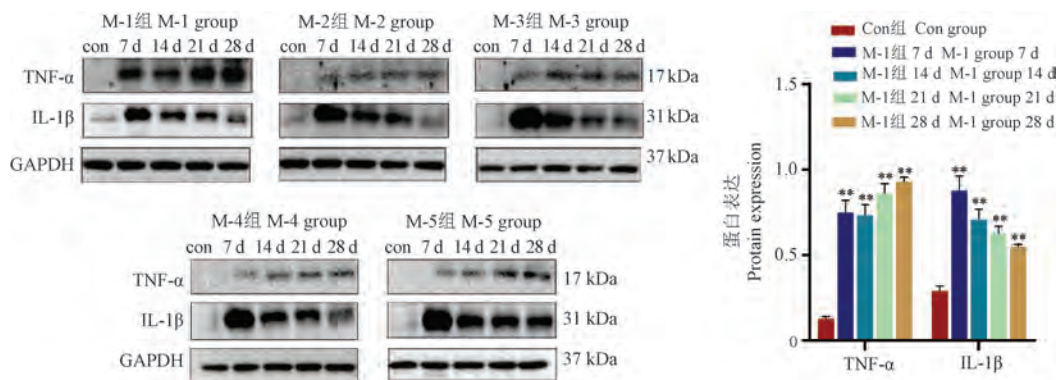


图 7 各组小鼠不同时间节点肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 的蛋白表达及 M-1 组小鼠肺组织各节点下的蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 7 Protein expression of IL-1 β 、TNF- α in lung tissues at different time nodes in mice of each group and protein expression of lung tissues of M-1 mice at each node($\bar{x} \pm s, n = 5$)

第 7 天 IL-1 β 表达均显著性升高,随后的观察时间逐渐降低,包括 M-1 在内的各组 IL-1 β 表达量变化趋势相似($P < 0.01$)。结果表明,TNF- α 是急性肺损伤后肺纤维化形成中的重要因素。

2.8 纤维化模型持续时间(窗口期)观察结果

根据图 8 显示,LPS 以 1、4、4 mg/kg 剂量连

续 3 次打击,在第 28 天肺组织间质可出现明显的胶原纤维沉积。以相同的造模方法,延长观察期至 42 d,通过 Masson 染色和肺组织羟脯氨酸含量测定,观察延长期肺纤维化程度的变化。实验结果显示,造模后 35 d Masson 染色胶原沉积明显、羟脯氨酸含量与 Con 组比较显著增加($P <$

0.01)。造模 42 d 两个指标升高更显著 ($P < 0.01$), 表明纤维化程度更为严重。

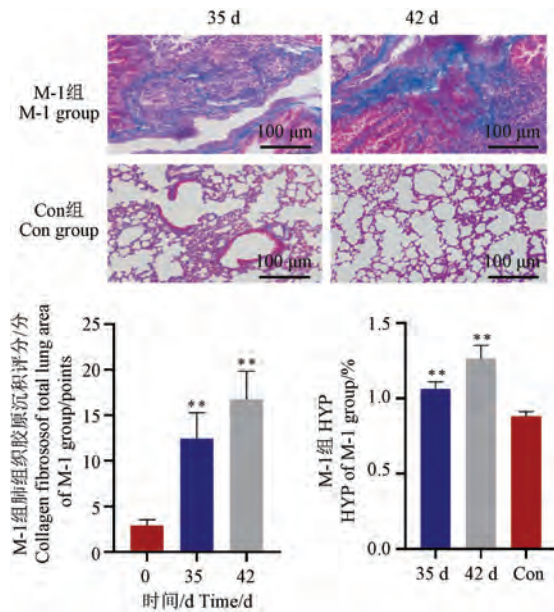


图 8 M-1 组小鼠肺组织的显著纤维化及 HYP 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Figure 8 Significant fibrosis and HYP content in lung tissue of M-1 group mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

ALI/ARDS 因其复杂的病因和发病机制以及高发病率和病死率,已成为临床危重病研究的热点和难点。尽管部分 ALI 患者能度过急性炎症风暴期,但后期肺纤维化发生率极高严重影响患者的肺功能和生存率^[2-3]。目前,对于 ALI/ARDS 的治疗主要依靠机械通气和糖皮质激素,预后疗效不佳,相反长期使用可能会增加死亡风险^[10-11]且并不能降低/解决 ALI 后期纤维化形成的问题,目前也尚未有针对 ALI/ARDS 后肺纤维化的确切疗效药物,亟须深入探索 ALI 后肺纤维化发病的机制,寻找有效的干预节点和靶点,可为临床防治 ALI/ARDS 及预后提供重要信息,促进药物的研发。

在临床上,ALI/ARDS 主要表现为弥漫性肺泡损伤,这包括肺泡和间质水肿、渗出期透明膜形成后诱导细胞外基质沉积修复异常,最终发展为不可逆的纤维化期^[12-13]。LPS 打击是 ALI 研究中最常用的模型之一,LPS 是革兰氏阴性细菌细胞外膜的成分,与 TLR4 受体结合激活巨噬细

胞,诱导中性粒细胞在肺内聚集,释放大量的促炎细胞因子,引起血管通透性增加,造成肺组织损伤^[14-15],其诱发的 ALI 模型与人类 ALI/ARDS 的病理反应一致^[16-17]。因此,通过采用 LPS 不同剂量和不同打击次数的方法诱导 ALI/ARDS,摸索能够引起急性期后纤维化的条件,以构建可以模拟 ALI/ARDS 后形成肺纤维化的模型。

在本次研究中,通过使用不同剂量的 LPS (1、4、4 mg/kg) 连续打击,成功构建了 M-1 模型组,病理结果显示,该造模方法在 7 d 内形成严重肺组织损伤(肺部结构改变,呈现肺泡塌陷、肺泡间隔增厚、炎性细胞浸润等病理改变),在 14 ~ 28 d TGF- β 1 表达持续增加,肺组织损伤逐渐恢复,进入增殖修复期,第 21 天后肺间质可见有明显的纤维形成,并且至观察期的 42 d 纤维化程度持续加重,该过程与临床 ALI 患者肺组织增殖周期相近,说明该建模方法成功模拟了 ALI/ARDS 后的肺纤维化形成^[18-19]。病理结果显示 M-4 组、M-5 组在第 7 天也造成了严重的肺损伤,在 14 ~ 28 d TGF- β 1 表达无明显增加,病理改善明显差于 M-1 组,尤其 M-5 组病理损伤未见明显改善,说明这两种造模方法在观察期内未能诱导修复增殖发生。M-2 组可能由于两次打击对肺组织损伤相对较轻,未能诱导触发纤维化机制。M-3 组 4 次打击,在第 7 天能引起肺组织的严重损伤,但 28 d 的恢复速度相较 M-1 组更快,可能是由于多次打击造成内毒素的耐受未能触发纤维化机制^[20-21]。

TNF- α 、IL-1 β 作为巨噬细胞分泌的促炎因子,是急性炎症反应的关键介质,可响应包括 LPS 在内多种刺激物,促进中性粒细胞在肺部聚集并激活,加剧急性炎症反应,并且可以通过激活 TGF- β 1 促进成纤维细胞分化为表达 α -SMA 的肌成纤维细胞,介导胶原蛋白的积累,驱动纤维化的发展^[7-8,22]。本研究测定在急性炎症中发挥重要作用的 TNF- α 、IL-1 β ,观察其动态变化,探索急性肺损伤后纤维化的可能机制。实验结果显示,在可成功诱导急性肺损伤后纤维化模型的 M-1 组肺组织 TNF- α 在纤维化形成的观察期内持续性增高表达,其它组 TNF- α 表达无明显增高表达趋势;所有造模组肺组织 IL-1 β 的表达则表现出急性炎症期高表达,7 d 后逐渐降低的相同变化趋势。由此说明,TNF- α 在急性肺损伤恢复后纤

维化的形成中更为关键,虽然纤维化形成的调控机制是复杂的,但此结果提示在急性肺损伤期间降低 TNF- α 表达或许是阻止急性肺损伤向肺纤维化转变的有效手段。

综上,本实验研究表明,LPS 以 1、4、4 mg/kg 剂量连续打击可以成功构建急性肺损伤后纤维化模型,肺组织 TNF- α 可能是促进急性肺损伤进展为肺纤维化的重要因子。在本研究中,采用了由 LPS 构建的 ALI 后肺纤维化动物模型,该模型能够精准模拟临床上 ALI/ARDS 后期所引发的纤维化病理过程,为深入探究 ALI/ARDS 后纤维化的发病机制提供了有力工具,从而为临床治疗提供更具针对性的干预措施。

参 考 文 献(References)

- [1] GORMAN E A, O' KANE C M, MCAULEY D F. Acute respiratory distress syndrome in adults: diagnosis, outcomes, long-term sequelae, and management [J]. *Lancet*, 2022, 400(10358): 1157–1170.
- [2] MATTHAY M A, ZEMANS R L, ZIMMERMAN G A, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 18.
- [3] SUSANTO A D, TRIYOGA P A, ISBANIAH F, et al. Lung fibrosis sequelae after recovery from COVID-19 infection [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2021, 15(3): 360–365.
- [4] PARIMON T, HOHMANN M S, YAO C. Cellular senescence: pathogenic mechanisms in lung fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6214.
- [5] LI H, DU S, YANG L, et al. Rapid pulmonary fibrosis induced by acute lung injury via a lipopolysaccharide three-hit regimen [J]. *Innate Immun*, 2009, 15(3): 143–154.
- [6] LEE H S, SHUN C T, CHIOU L L, et al. Hydroxyproline content of needle biopsies as an objective measure of liver fibrosis: emphasis on sampling variability [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(7): 1109–1114.
- [7] ENZEL D, KRIVENTSOV M, SATAIEVA T, et al. Cellular and molecular genetic mechanisms of lung fibrosis development and the role of vitamin D: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16): 8946.
- [8] KOLB M, MARGETTS P J, ANTHONY D C, et al. Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(12): 1529–1536.
- [9] SAVIN I A, ZENKOVA M A, SEN' KOVA A V. Pulmonary fibrosis as a result of acute lung inflammation: molecular mechanisms, relevant *in vivo* models, prognostic and therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14959.
- [10] KINOSHITA Y, ISHII H, KUSHIMA H, et al. High-dose steroid therapy for acute respiratory distress syndrome lacking common risk factors: predictors of outcome [J]. *Acute Med Surg*, 2017, 5(2): 146–153.
- [11] ZHANG J, GE P, LIU J, et al. Glucocorticoid treatment in acute respiratory distress syndrome: an overview on mechanistic insights and clinical benefit [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12138.
- [12] ZARRILLI G, ANGERILLI V, BUSINELLO G, et al. The immunopathological and histological landscape of COVID-19-mediated lung injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 974.
- [13] ZEMANS R L, MATTHAY M A. Bench-to-bedside review: the role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2004, 8(6): 469–477.
- [14] MILLAR M W, FAZAL F, RAHMAN A. Therapeutic targeting of NF- κ B in acute lung injury: a double-edged sword [J]. *Cells*, 2022, 11(20): 3317.
- [15] FAJGENBAUM D C, JUNE C H. Cytokine storm [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2255–2273.
- [16] WANG K, WANG Y, CAO Y, et al. Lumican is elevated in the lung in human and experimental acute respiratory distress syndrome and promotes early fibrotic responses to lung injury [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 392.
- [17] WU C, EVANS C E, DAI Z, et al. Lipopolysaccharide-induced endotoxemia in corn oil-preloaded mice causes an extended course of lung injury and repair and pulmonary fibrosis: a translational mouse model of acute respiratory distress syndrome [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174327.
- [18] MARSHALL R, BELLINGAN G, LAURENT G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane [J]. *Thorax*, 1998, 53(10): 815–817.
- [19] LIEBLER J M, QU Z, BUCKNER B, et al. Fibroproliferation and mast cells in the acute respiratory distress syndrome [J]. *Thorax*, 1998, 53(10): 823–829.
- [20] VERWEYEN E, HOLZINGER D, WEINHAGE T, et al. Synergistic signaling of TLR and IFN α/β facilitates escape of IL-18 expression from endotoxin tolerance [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(5): 526–539.
- [21] LÓPEZ-COLLAZO E, DEL FRESNO C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences [J]. *Crit Care*, 2013, 17(6): 242.
- [22] CHAMORRO-H I, ZAMBRANO A. Modeling of respiratory diseases evolving with fibrosis from organoids derived from human pluripotent stem cells [J]. *Sci*, 2023, 24(5): 4413.

[收稿日期] 2024–12–06

郭亚茜,王昭华,杜晓鹏,等. SPF 级和 GF 级金黄地鼠血液、脂代谢相关细胞因子及组织病理学特性初步比较分析 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 858–865.

GUO Y X, WANG Z H, DU X P, et al. Preliminary comparative analysis of cytokines related to blood and lipid metabolism and histopathological characteristics in SPF grade and GF grade golden hamsters [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 858–865.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.008

SPF 级和 GF 级金黄地鼠血液、脂代谢相关细胞因子及组织病理学特性初步比较分析

郭亚茜,王昭华,杜晓鹏,刘凯慧,朱华*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家动物模型技术创新中心,国家卫生健康委比较医学重点实验室,国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

【摘要】 目的 对 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠的血常规、血生化、组织病理学及脂代谢相关细胞因子进行比较分析。**方法** 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠各 20 只,雌雄各半。采用全自动血液细胞分析仪、全自动血液生化分析仪、ELISA 试剂盒分别测定血常规、血生化及脂代谢相关血清细胞因子指标。并对盲肠、小肠、肺、脾、前胃、腺胃进行组织病理学观察。**结果** 8 周龄 SPF 级金黄地鼠和 GF 级金黄地鼠比较:(1) 血液生理指标中雌性白细胞数(white blood cell, WBC)、血红蛋白浓度(hemoglobin, HGB)、平均红细胞血红蛋白(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)的测量值具有显著性差异($P < 0.05$),平均红细胞血红蛋白浓度(mean erythrocyte hemoglobin concentration, MCHC)、血小板分布宽度(platelet distribution width, PDW)、淋巴细胞(lymphocyte, LYM)的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$);雄性平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、MCH、LYM、嗜中性粒细胞(neutrophil, NEUT)、嗜碱性粒细胞(basophils, BAS)、嗜碱性粒细胞百分比(percentage of basophils, BAS%)的测量值具有显著性差异($P < 0.05$),MCHC、PDW、淋巴细胞百分比(percentage of lymphocytes, LYM%)、嗜中性粒细胞百分比(percentage of neutrophil, NEUT%)的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$);(2) 血液生化指标中雌性低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP)的测量值有显著性差异($P < 0.05$),甘油三酯(triglycerides, TG)的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$);雄性 GSP 的测量值有显著性差异($P < 0.05$),总胆固醇(total cholesterol, TC)、TG、LDL-C、FINS、C-肽(C-peptide)的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$);(3) 脂代谢相关血清细胞因子指标中雌性白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)、脂联素(adiponectin, ADP)的测量值有显著性差异($P < 0.05$),白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、超敏 C 反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$);雄性 hs-CRP 的测量值有显著性差异($P < 0.05$),ADP 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$);(4) HE 结果显示与 SPF 级金黄地鼠相比,GF 级金黄地鼠盲肠肌层变薄,附着于黏膜皱裂的隐窝数量减少;回肠管腔增大,杯状细胞数量增多;肺泡隔增宽;脾白髓中免疫细胞增多,血窦中含血量增加;前胃黏膜层变薄;腺胃管状腺嗜碱性强度减弱。**结论** 通过对 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠的血常规、血生化、组织病理学及脂代谢相关细胞因子的比较分析。初步得出其血常规、血生化、组织病理学及脂代谢相关细胞因子参数的参考范围。

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2022-12M-1-020)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(CIFMS)(2022-12M-1-020)。

[作者简介] 郭亚茜,女,本科,主管技师,研究方向:无菌动物技术。Email:GYX409@163.com

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

【关键词】 SPF 级金黄地鼠; GF 级金黄地鼠; 血常规; 血生化; 细胞因子

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2025) 06-0858-08

Preliminary comparative analysis of cytokines related to blood and lipid metabolism and histopathological characteristics in SPF grade and GF grade golden hamsters

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

(Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, National Center of Technology Innovation for animal model, NHC Key Laboratory of Comparative Medicine, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021, China)

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

【Abstract】 Objective To compare the hematological parameters, biochemical profiles, histopathological characteristics, and cytokines associated with lipid metabolism in 8-weeks-old specific pathogen-free (SPF) grade and germ-free (GF) golden hamsters. **Methods** Twenty 8-weeks-old SPF grade and GF golden hamsters, with equal numbers of males and females, were utilized in this study. Serum cytokines associated with routine blood parameters, blood biochemistry, and lipid metabolism were quantified using automated hematology and biochemical analyzers, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. The cecum, small intestine, lung, spleen, forestomach, and glandular stomach were examined by histopathology. **Results** We compared the result between SPF grade and GF golden hamsters at 8 weeks of age. Regarding hematological parameters, females showed significant differences ($P < 0.05$) in white blood cell count, hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean platelet volume between the two groups, and highly significant differences ($P < 0.001$) in MCH concentration (MCHC), platelet distribution width (PDW), and lymphocyte count (LYM). Males showed significant differences ($P < 0.05$) in mean corpuscular volume, MCH, LYM, neutrophil count, basophil count, and basophil percentage, and highly significant differences ($P < 0.001$) in MCHC, PDW, lymphocyte percentage, and neutrophil percentage. In terms of biochemical parameters, females showed significant differences ($P < 0.05$) in low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol, fasting insulin (FINS), and glycosylated serum protein (GSP), and highly significant differences ($P < 0.001$) in triglycerides (TG). Males showed significant differences ($P < 0.05$) in GSP levels and highly significant differences ($P < 0.001$) in total cholesterol, TG, LDL-C, FINS, and C-peptide levels. For serum cytokines related to lipid metabolism, females showed significant differences ($P < 0.05$) in interleukin (IL)-10, adiponectin (ADP), and IL-6 levels, and highly significant differences ($P < 0.001$) in high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). Males showed significant differences ($P < 0.05$) in hs-CRP levels and highly significant differences ($P < 0.001$) in ADP and tumor necrosis factor- α levels. Hematoxylin/eosin staining showed that the cecal muscle layer was thinner and the number of crypts attached to the mucous membrane was reduced in GF compared with SPF grade golden hamsters. In addition, the ileocece was enlarged and the number of goblet cells was increased, the alveolar septum was widened, immune cells in the white pulp of the spleen were increased, and the blood content in the blood sinuses was increased. There was also thinning of the anterior gastric mucosa and the basophilic strength of the glandular gastric tube gland was weakened. **Conclusions** This study established the differences in routine blood parameters, blood biochemistry indicators, histopathological features, and cytokines associated with lipid metabolism between 8-weeks-old SPF grade and GF golden hamsters, to establish preliminary reference ranges.

【Keywords】 SPF grade golden hamster; GF grade golden hamster; complete blood count; blood biochemistry; cytokine

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

报道显示,金黄地鼠(*Mesocricetus auratus*, golden hamster)与其他啮齿类动物相比是较为理想的脂代谢疾病动物模型^[1]。与大鼠相比,对高含量胆固醇饮食所致高脂血症更为敏感。较低胆固醇含量、较短时间即可建立理想的动物模型^[2-3]。在胆固醇代谢方面,人类内源性胆固醇由肝外合成比例约为 90%,金黄地鼠肝外合成比例约为 85%,小鼠肝外合成比例约为 55%,而大鼠只有 35%是肝外合成^[4]。在脂蛋白代谢方面,金黄地鼠血脂蛋白成分、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein, LDL)的代谢率、LDL 和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein, HDL)的循环等方面也与人类相似。有研究表明肠道菌群可以通过调控能量摄取影响糖、脂代谢,肠道菌群紊乱可以促使糖、脂代谢紊乱,刺激肠道促进细胞因子释放,加剧血管内皮细胞炎症反应^[5-6]。无菌动物微生物背景清晰,可对菌群、基因及饮食等环境因素进行有效控制,是研究肠道菌群(gut microbiota, GM)与人类健康关系的有效动物模型之一。一些研究表明,移植代谢性疾病人源化肠道菌群的无菌小鼠除了疾病的表型特征,同时还出现菌群失调和代谢紊乱^[7],为能够明确微生物组与疾病因果关系,本课题组前期已经通过剖宫产净化方式,成功建立无菌金黄地鼠模型,为肠道菌群与脂代谢相关疾病关系研究提供了更多的动物模型选择。在前期工作基础上,本实验对 8 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级和无菌(germ-free, GF)级金黄地鼠的血常规、血生化、组织病理学及脂代谢相关细胞因子进行了测定,尝试建立参考范围,为相关从业人员提供基础数据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级金黄地鼠 20 只,雌雄各半,体质量约为 100 g,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0011】,8 周龄 GF 级金黄地鼠 20 只,雌雄各半,体质量约为 100 g,由中国医学科学院医学实验动物研究所悉生课题组繁育【SYXK(京)2023-0037】。SPF 级和 GF 级金黄地鼠均饲养于中国医学科学院医学实验

动物研究所专用无菌隔离器内【SYXK(京)2023-0037】。饲养期间动物自由摄入经 50 kGy ⁶⁰Co γ 射线辐照灭菌的定制无菌地鼠饲料,自由饮水,饮用水经过 132 $^{\circ}$ C, 1 h 的高温高压灭菌处理。饲养环境:温度 21 ~ 25 $^{\circ}$ C,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗比为 12 h : 12 h。本实验已获得中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准(ZH23002)。

1.1.2 主要试剂与仪器

白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、超敏 C 反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、脂联素(adiponectin, APN)、C-肽(C-peptide)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、糖化血清蛋白(glycosylated serum protein, GSP) ELISA 试剂盒(批号:JM-06129001、JM-06092301、JM-06131601、JM-06092801、JM-06092601、JM-06133001、JM-06133401、JM-06134201、JM-06133801、JM-06134501,购自:江苏晶美生物技术有限公司);舒泰 50(批号:001,购自:北京宠泰福林生物技术有限公司);血细胞分析用溶血剂(批号:697307850064,购自:ABX);无水乙醇(批号:TG10015,购自:北京通广精细化工公司);二甲苯(批号:TG10065,购自:北京通广精细化工公司);苏木素染液(批号:G1004-500 mL,购自:武汉赛维尔生物科技有限公司);伊红染液(批号:G1001-500 mL,购自:武汉赛维尔生物科技有限公司);盐酸乙醇快速分化液(批号:C0163M,购自:北京环宇创科科技有限公司)。全自动血液细胞分析仪(型号:DX 120,购自:ABX);全自动血液生化分析仪(型号:7100,购自:日立);轮转式切片机(型号:S700A,购自:深圳市瑞沃德生命科技有限公司);染色封片一体机(型号:DRS-Prisma-P-JCS&Film-JC2,购自:北京泉智汇锦科技有限公司);正置显微镜(型号:BX43,购自:北京深景量光科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血液生理学指标

动物禁食 12 h,腹腔注射 0.1 mL/100 g 舒泰 50 麻醉后,经眼眶动静脉丛采血,全血采用全自动血液细胞分析仪测定白细胞数(white blood

cell, WBC)、红细胞数(red blood cell, RBC)、血红蛋白浓度(hemoglobin, HGB)、红细胞压积(hematocrit, HCT)、平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(mean erythrocyte hemoglobin concentration, MCHC)、血小板数(platelet, PLT)、血小板压积(platelet hematocrit, PCT)、平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)、血小板分布宽度(platelet distribution width, PDW)、淋巴细胞(lymphocyte, LYM)、单核细胞(monocyte, MON)、嗜中性粒细胞(neutrophil, NEUT)、嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)、嗜碱性粒细胞(basophils, BAS)、淋巴细胞百分比(percentage of lymphocytes, LYM%)、单核细胞百分比(percentage of monocyte, MON%)、嗜中性粒细胞百分比(percentage of neutrophil, NEUT%)、嗜酸性粒细胞百分比(percentage of eosinophils, EOS%)、嗜碱性粒细胞百分比(percentage of basophils, BAS%),共 21 项血液生理学指标。

1.2.2 血液生化学指标

全血经 3500 r/min,离心 10 min,分离血清,采用全自动血液生化分析仪测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、LDL-C、HDL-C、空腹血糖(fasting blood glucose,

FBG),采用 ELISA 试剂盒测定 C-peptide、FINS、GSP,共 8 项血液生化学指标。

1.2.3 细胞因子测定

采用 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、hs-CRP、APN 共 7 项脂代性疾病相关细胞因子。

1.2.4 组织病理学

动物安乐死后取盲肠、小肠、肺、脾、前胃、腺胃固定于 4%多聚甲醛。组织经修块,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚度 5 μ m,进行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下检查。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件 10.0 版本,进行数据处理及差异分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异分析采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠血液生理指标结果

共测定 21 项血液生理指标,见表 1。其中雌性 WBC、HGB、MCH、MPV 的测量值有显著性差异($P < 0.05$),MCHC、PDW、LYM 的测量值有极其显著性差异($P < 0.001$),其余 14 项均无显著性差异;雄性 MCV、MCH、LYM、NEUT、BAS、

表 1 8 周龄 SPF 和 GF 级金黄地鼠的血液生理参数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Blood physiological parameters of 8-weeks-old SPF and GF grade golden hamsters($\bar{x} \pm s, n = 10$)

检测项目 Test item	雌性 Female		雄性 Male	
	SPF	GF	SPF	GF
WBC/($10^9/L$)	7.32 $\pm$ 1.55	10.11 $\pm$ 1.97*	8.01 $\pm$ 1.59	8.66 $\pm$ 1.15
RBC/($10^{12}/L$)	7.25 $\pm$ 0.61	6.83 $\pm$ 1.53	7.38 $\pm$ 0.42	7.68 $\pm$ 0.86
HGB/(g/L)	159.90 $\pm$ 8.70	168.90 $\pm$ 8.60*	155.70 $\pm$ 7.76	168.86 $\pm$ 17.17
HCT/(L/L)	0.473 $\pm$ 0.027	0.446 $\pm$ 0.098	0.466 $\pm$ 0.025	0.473 $\pm$ 0.054
MCV/fL	65.30 $\pm$ 2.10	65.40 $\pm$ 0.92	63.30 $\pm$ 0.78	61.71 $\pm$ 0.88*
MCH/pg	22.16 $\pm$ 0.80	23.23 $\pm$ 0.44*	21.20 $\pm$ 0.34	22.00 $\pm$ 0.47*
MCHC/(g/L)	339.30 $\pm$ 4.27	355.80 $\pm$ 4.17***	335.60 $\pm$ 5.26	356.29 $\pm$ 7.19***
PLT/($10^9/L$)	747.60 $\pm$ 88.81	753.60 $\pm$ 102.84	647.10 $\pm$ 187.14	596.14 $\pm$ 130.00
PCT/(%)	0.437 $\pm$ 0.050	0.403 $\pm$ 0.043	0.395 $\pm$ 0.098	0.370 $\pm$ 0.058
MPV/fL	5.85 $\pm$ 0.33	5.37 $\pm$ 0.25*	6.38 $\pm$ 0.62	6.30 $\pm$ 0.50
PDW/%	13.42 $\pm$ 0.50	12.07 $\pm$ 0.29***	13.47 $\pm$ 0.42	11.97 $\pm$ 0.37***
LYM/($10^9/L$)	5.35 $\pm$ 1.02	7.90 $\pm$ 1.61***	5.31 $\pm$ 1.08	6.89 $\pm$ 1.00*

续表 1

检测项目 Test item	雌性 Female		雄性 Male	
	SPF	GF	SPF	GF
MON/(10 ⁹ /L)	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.01
NEUT/(10 ⁹ /L)	1.83 ± 0.71	1.91 ± 0.69	2.48 ± 0.66	1.68 ± 0.46 [*]
EOS/(10 ⁹ /L)	0.02 ± 0.03	0.08 ± 0.12	0.08 ± 0.10	0.03 ± 0.03
BAS/(10 ⁹ /L)	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.01 [*]
LYM/%	73.73 ± 6.03	78.18 ± 4.24	66.56 ± 5.96	79.26 ± 4.40 ^{***}
MON/%	0.06 ± 0.05	0.09 ± 0.09	0.18 ± 0.19	0.11 ± 0.10
NEUT/%	24.56 ± 6.21	19.96 ± 2.83	30.91 ± 5.42	19.26 ± 4.51 ^{***}
EOS/%	0.40 ± 0.41	0.71 ± 1.12	0.91 ± 0.91	0.33 ± 0.38
BAS/%	1.25 ± 0.35	1.06 ± 0.32	1.44 ± 0.29	1.04 ± 0.18 [*]

注:与 SPF 级相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$ 。(下图同)
Note. Compared with SPF grade, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$. (The same in the following figures)

BAS% 的测量值有显著性差异 ($P < 0.05$), MCHC、PDW、LYM%、NEUT% 的测量值有极其显著性差异 ($P < 0.001$), 其余 11 项均无显著性差异。

2.2 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠血液生化指标结果

血液生化指标检测 8 项, 见图 1。其中雌性 LDL-C、HDL-C、FINS、GSP、C-peptide 的测量值有显著性差异 ($P < 0.05$), TG 的测量值有极其显著性差异 ($P < 0.001$), 其余 2 项均无显著性差异; 雄性 GSP 的测量值有显著性差异 ($P < 0.05$), TC、TG、LDL-C、FINS、C-peptide 的测量值有极其显著性差异 ($P < 0.001$), 其余 2 项均无显著性差异。

2.3 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠脂代谢相关细胞因子指标结果

共检测脂代性疾病相关细胞因子 7 项, 见图

2。其中雌性 IL-10、ADP 的测量值有显著性差异 ($P < 0.05$), IL-6、hs-CRP 的测量值有极其显著性差异 ($P < 0.001$), 其余 3 项无显著性差异 ($P > 0.05$); 雄性 hs-CRP 的测量值有显著性差异 ($P < 0.05$), ADP 和 TNF- α 的测量值有极其显著性差异 ($P < 0.001$), 其余 4 项无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 8 周龄 SPF 级和 GF 级金黄地鼠组织病理学结果

与 SPF 级金黄地鼠相比, GF 级金黄地鼠盲肠肌层变薄, 附着于黏膜皱裂的隐窝数量减少 (图 3A); 回肠管腔增大, 杯状细胞数量增多 (图 3B); 肺泡隔增宽 (图 3C); 脾白髓中免疫细胞增多, 血窦中含血量增加 (图 3D); 前胃黏膜层变薄 (图 3E); 腺胃管状腺嗜碱性强度减弱 (图 3F)。

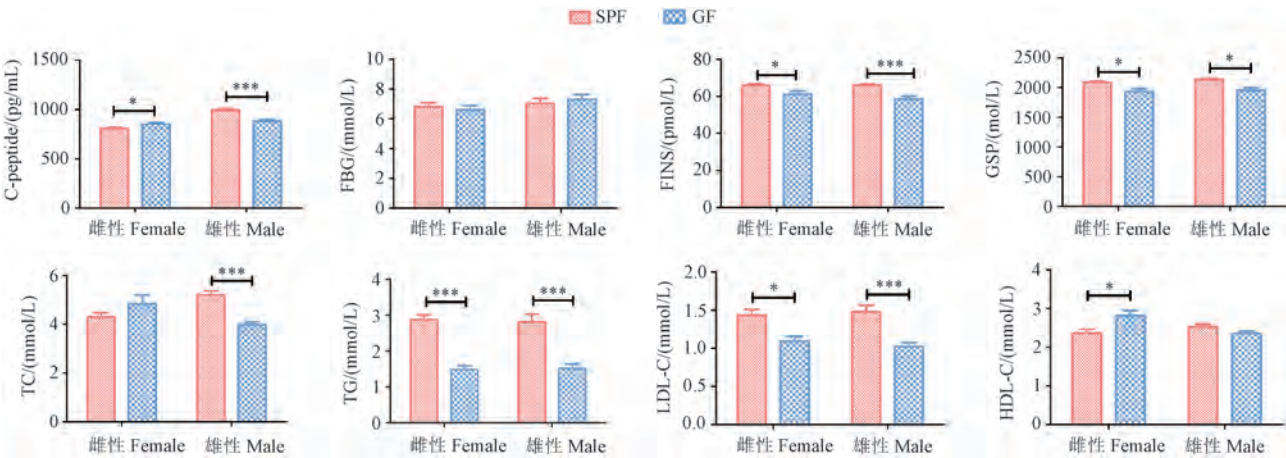


图 1 8 周 SPF 和 GF 级金黄地鼠的血液生化参数值

Figure 1 Blood biochemical parameters of 8-weeks-old SPF and GF grade golden hamsters

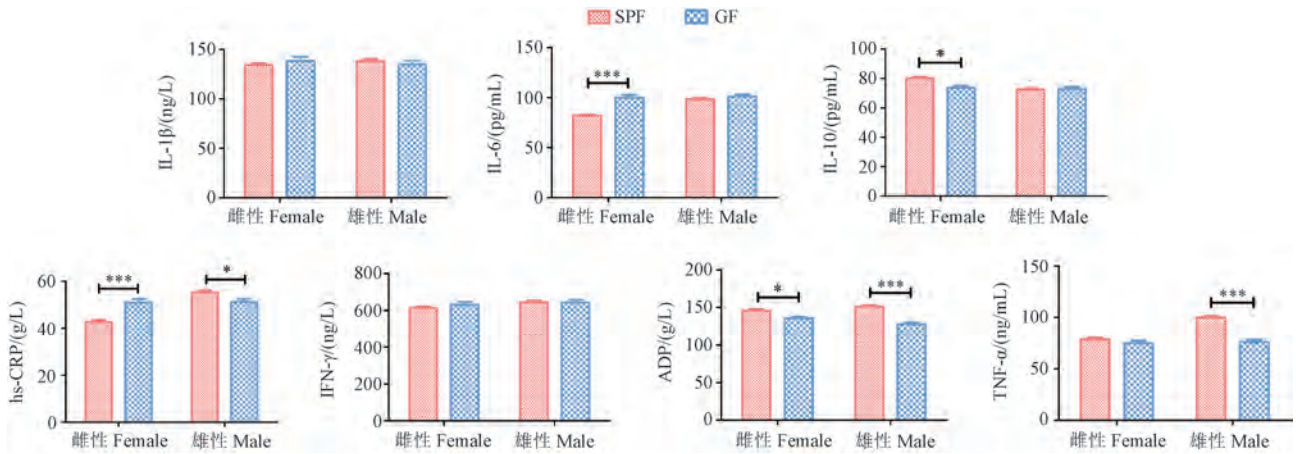
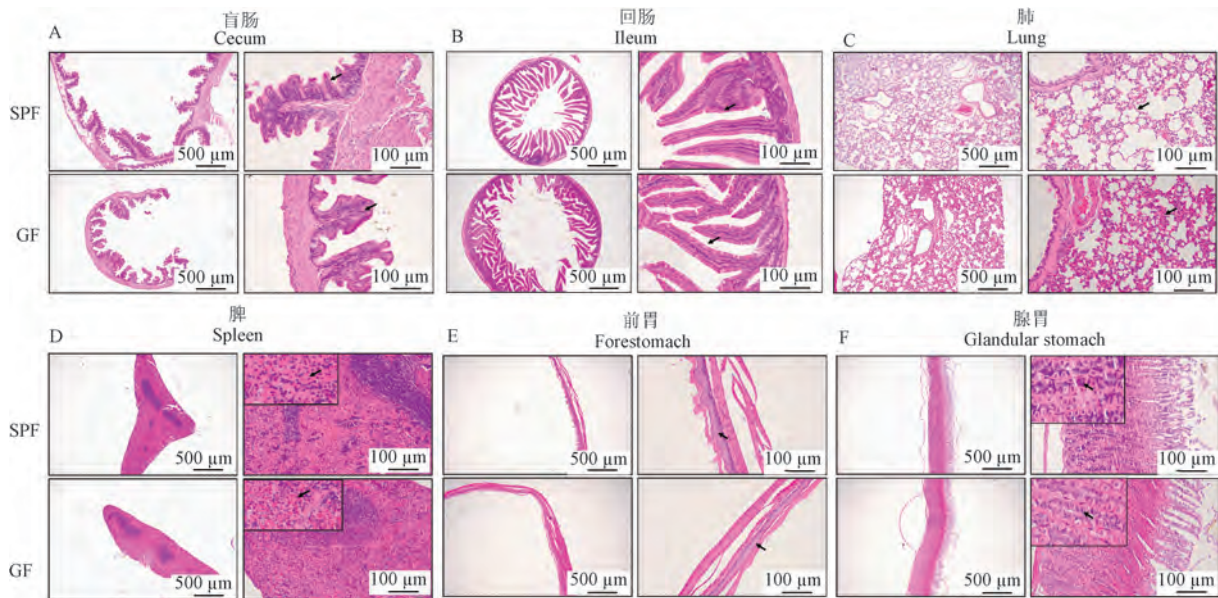


图 2 8 周龄 SPF 和 GF 级金黄地鼠的脂代谢相关细胞因子参数值

Figure 2 Cytokine parameter values of 8-weeks-old SPF and GF grade golden hamsters



注: A: 盲肠 HE 染色; B: 回肠 HE 染色; C: 肺 HE 染色; D: 脾 HE 染色; E: 前胃 HE 染色; F: 腺胃 HE 染色。

图 3 8 周龄 SPF 和 GF 级金黄地鼠盲肠、回肠、肺、脾、前胃、腺胃 HE 染色图

Note. A. HE staining of cecum. B. HE staining of ileum. C. HE staining of lung. D. HE staining of spleen. E. HE staining of forestomach. F. HE staining of glandular stomach.

Figure 3 HE staining of cecum, ileum, lung, spleen, forestomach and glandular stomach of 8-weeks-old SPF and GF grade golden hamsters

3 讨论

本研究发现, 血液生理指标中雌性 WBC、HGB、MCH、MCHC、LYM 的测量值 GF 级高于 SPF 级, MPV、PDW 的测量值 SPF 级高于 GF 级; 雄性 MCH、MCHC、LYM、LYM% 的测量值 GF 级高于 SPF 级, MCV、PDW、NEUT、BAS、NEUT%、BAS% 的测量值 SPF 级高于 GF 级。血液生化指标中雌性 HDL-C、C-peptide 的测量值 GF 级高于 SPF 级,

TG、LDL-C、FINS、GSP 的测量值 SPF 级高于 GF 级; 雄性 TC、TG、LDL-C、FINS、C-peptide、GSP 的测量值 SPF 级高于 GF 级。以上生理生化指标在净化前后差异显著, 可能是净化后 GF 金黄地鼠的生活环境发生变化; 也可能由于异种代乳难度大, 哺育成活 F0 代数量有限, 远交品种进行近亲交配繁殖有关, 进一步表明血液生理生化参考值变化与遗传因素和环境因素有关^[8]。病理组织学结果显示, GF 金黄地鼠肠壁变薄、杯状细胞增

多、隐窝数量减少等与王荫槐等^[9]等指出的 GF 级大鼠、豚鼠和兔消化道组织的特点一致。这种组织学上的差异是否与 GF 级动物生物学特性相关,还需要更多实验数据证实。

近年来研究结果显示,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)、非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)及肥胖都与代谢性炎症(meta-inflammation)密切相关。众多细胞因子中,IL-1 β 是推动动脉粥样硬化慢性炎症反应的标志性因子^[10-11];IL-6 是心血管危险事件强有力的预测因子^[12];高表达的 TNF- α 可诱导细胞因子的分泌,促进脂质合成,导致肝脂肪变形和血脂水平升高,是非酒精性脂肪肝的独立危险因素^[13-14]。而 ADP 可通过抑制 TNF- α 的合成和释放,延缓肝组织炎症和纤维化进展,或与 NAFLD 的发生有关^[15]。hs-CRP 和血脂 4 项等指标水平在 DM 新发患者的诊断中有重要参考价值^[16-17]。FBG、C-peptide、FINS 反映的是被检查者当时的指标水平,对糖尿病患者而言,最主要的是监测血糖的控制情况^[18-20]。GSP 可反映糖尿病患者 2~3 周的血糖控制水平,是糖尿病近期血糖水平灵敏指标之一^[21]。IFN- γ 可通过直接或间接途径损伤胰岛细胞,促进胰岛细胞凋亡,参与糖尿病发病过程^[22]。很多研究表明,肠道菌群也可以通过多种方式直接或间接的参与代谢性疾病的发生和发展。例如,肠道菌群可以直接参与胆固醇和甘油三酯代谢,其代谢产物 YMAO 促进斑块发育,从而影响动脉粥样硬化^[23];肠道菌群失调可引起肠黏膜屏障破坏以及代谢紊乱的发生,促使致病菌及内毒素通过门静脉进入肝,加剧 NAFLD 发病机制中的炎症过程和脂肪堆积。本次实验结果显示,细胞因子指标中雌性 IL-6、hs-CRP 的测量值 GF 级高于 SPF 级,IL-10、ADP 的测量值 SPF 级高于 GF 级;雄性 ADP、hs-CRP、TNF- α 的测量值 SPF 级高于 GF 级,提示肠道菌群可能在脂代谢相关疾病中通过炎症代谢通路发挥作用。

本研究发现 GF 级金黄地鼠的部分血常规、血生化、组织病理学及脂代谢相关细胞因子指标的测量值与 SPF 级金黄地鼠有显著性差异,提示 GF 级金黄地鼠可能在研究肠道菌群与脂代谢相

关疾病关系中发挥重要作用。实验动物血液生理生化测量值不仅与遗传因素相关,还受动物日龄、性别、营养水平、饲养环境、饲养方式、血液采集方式等因素影响^[24]。本研究中样本量较少且动物年龄单一,为提供更可靠的基础数据,还需要进行大样本、不同年龄阶段的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] ZHAO Y, QU H, WANG Y, et al. Small rodent models of atherosclerosis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110426.
- [2] LANGHI C, VALLIER M, OTERO Y F, et al. Totum-070, a polyphenol-rich plant extract, prevents hypercholesterolemia in high-fat diet-fed hamsters by inhibiting intestinal cholesterol absorption [J]. Nutrients, 2023, 15(24): 5056.
- [3] SHI L, ZOU M, ZHOU X, et al. Comparison of protective effects of hesperetin and pectolarigenin on high-fat diet-induced hyperlipidemia and hepatic steatosis in golden syrian hamsters [J]. Exp Anim, 2023, 72(1): 123-131.
- [4] 江春迎, 杨康敏, 杨柳, 等. 金黄地鼠动脉粥样硬化发展过程中的 NMR 代谢组学研究 [J]. 药学报, 2013, 48(4): 495-502.
JIANG C Y, YANG K M, YANG L, et al. A 1H NMR based metabonomics approach to progression of coronary atherosclerosis in a hamster model [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48(4): 495-502.
- [5] 牛尚梅, 赵晓玲, 李欣欣. 2 型糖尿病伴冠心病患者肠道菌群分布及其与糖、脂代谢指标的相关性 [J]. 中国微生物学杂志, 2024, 36(1): 61-65, 70.
NIU S M, ZHAO X L, LI X X. The intestinal flora distribution and its correlation with glucose and lipid metabolism indexes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease [J]. Chin J Microecol, 2024, 36(1): 61-65, 70.
- [6] 朱华, 李卓, 苏磊, 等. 冠心病来源肠道菌群小鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 716-724.
ZHU H, LI Z, SU L, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 716-724.
- [7] 郭亚茜, 杜晓鹏, 刘凯慧, 等. 无菌金黄地鼠模型建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 87-93.
GUO Y X, DU X P, LIU K H, et al. Establishment of sterile golden hamster model [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 87-93.
- [8] 王洪, 张华琼, 黄麟, 等. 雌雄金黄地鼠血液生理生化指标的比较分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2):

- 35-42.
- WANG H, ZHANG H Q, HUANG L, et al. Comparison of blood physiological and biochemical values in male and female mesocricetus auratus [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(2): 35-42.
- [9] 王荫槐, 王钊. 悉生动物学 [M]. 沈阳: 辽宁大学出版社; 2007.
- WANG Y H, WANG J. Gnotobiotic animals [M]. Shenyang: Liaoning University Press; 2007.
- [10] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 131.
- [11] RIDKER P M. From C-reactive protein to interleukin-6 to interleukin-1: moving upstream to identify novel targets for atheroprotection [J]. Circ Res, 2016, 118(1): 145-156.
- [12] GAGER G M, BIESINGER B, HOFER F, et al. Interleukin-6 level is a powerful predictor of long-term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome [J]. Vasc Pharmacol, 2020, 135: 106806.
- [13] DUAN Y, PAN X, LUO J, et al. Association of inflammatory cytokines with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Front Immunol, 2022, 13: 880298.
- [14] FEINGOLD K R, GRUNFELD C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia [J]. Diabetes, 1992, 41(2): 97-101.
- [15] 郝蕾, 高卫东, 胡娟娟, 等. 非酒精性脂肪性肝病患者血清脂联素、维生素 D 和载脂蛋白 B 水平变化及其临床意义探讨 [J]. 实用肝脏病杂志, 2023, 26(2): 189-192.
- HAO L, GAO W D, HU J J, et al. Changes of serum adiponectin, vitamin D and apolipoprotein B levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Pract Hepatol, 2023, 26(2): 189-192.
- [16] TUTUNCU Y, SATMAN I, CELIK S, et al. A comparison of hs-CRP levels in new diabetes groups diagnosed based on FPG, 2-hPG, or HbA1c criteria [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 5827041.
- [17] 温春尧, 谢亦娴, 林松, 等. 超敏 C-反应蛋白与血脂检验在糖尿病新发患者检验中的作用分析 [J]. 糖尿病新世界, 2022, 25(18): 59-62.
- WEN C Y, XIE Y X, LIN S, et al. Analysis of the role of high-sensitivity C-reactive protein and blood lipid testing in new-onset diabetes patients [J]. Diabetes New World, 2022, 25(18): 59-62.
- [18] HARREITER J, RODEN M. Diabetes mellitus-definition, classification, diagnosis, screening and prevention (update 2019) [J]. Wien Klin Wochenschr, 2019, 131(1): 6-15.
- [19] MADDALONI E, BOLLI G B, FRIER B M, et al. C-peptide determination in the diagnosis of type of diabetes and its management: a clinical perspective [J]. Diabetes Obes Metab, 2022, 24(10): 1912-1926.
- [20] HARREITER J, RODEN M. Diabetes mellitus: definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023) [J]. Wien Klin Wochenschr, 2023, 135(1): 7-17.
- [21] BAI Y, FANG Y, MING J, et al. Serum glycated albumin as good biomarker for predicting type 2 diabetes: a retrospective cohort study of China [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2022, 38(1): e3477.
- [22] NANO E, PETROPAVLOVSKAIA M, ROSENBERG L. Islet neogenesis associated protein (INGAP) protects pancreatic β cells from IL-1 β and IFN γ -induced apoptosis [J]. Cell Death Discov, 2021, 7: 56.
- [23] JONSSON A L, BÄCKHED F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(2): 79-87.
- [24] 张薇, 唐彬, 付新录, 等. 不同月龄 SPF 级 SD 大鼠临床生理生化背景数据分析 [J]. 热带医学杂志, 2018, 18(1): 5-10.
- ZHANG W, TANG B, FU X L, et al. Analysis of the background data of hemocytology and biochemistry in the blood of SPF Sprague Dawley rats at different ages [J]. J Trop Med, 2018, 18(1): 5-10.

[收稿日期] 2024-12-03

朱超,郭星,王金娥,等. 组学技术在疾病动物模型评价中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 866–877.
ZHU C, GUO X, WANG J E, et al. Progress in evaluation of animal disease models based on omics technologies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 866–877.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.009

组学技术在疾病动物模型评价中的应用

朱超^{1,2,3*}, 郭星^{1,4}, 王金娥^{1,2}, 董平轩^{1,2,3}, 高倩倩^{1,2,3}, 王晓玥^{1,2,3},
戚晓杰^{1,2,3}, 田金举^{1,2,3}

(1. 德州学院药学院, 山东 德州 253023; 2. 新型药用辅料与缓控释制剂山东省工程研究中心,
山东 德州 253023; 3. 德州市组学技术与健康工程研究中心, 山东 德州 253023;
4. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

【摘要】 疾病动物模型是医学基础研究的重要生物载体。构建理想的动物模型是获取可靠实验数据的关键前提。组学技术在分子水平为动物模型的精准评价提供数据支持,从而提高动物模型的评价标准。本文对组学技术在疾病动物模型评价研究中的应用进行综述,并对组学技术在动物模型质量控制中的应用前景进行展望,为动物模型的精准评价提供新思路。

【关键词】 组学技术; 疾病动物模型; 评价标准; 质量控制; 生物标志物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0866-12

Progress in evaluation of animal disease models based on omics technologies

ZHU Chao^{1,2,3*}, GUO Xing^{1,4}, WANG Jine^{1,2}, DONG Pingxuan^{1,2,3}, GAO Qianqian^{1,2,3},
WANG Xiaoyue^{1,2,3}, QI Xiaojie^{1,2,3}, TIAN Jinju^{1,2,3}

(1. School of Pharmacy, Dezhou University, Dezhou 253023, China; 2. Shandong Engineering Research Center of Novel Pharmaceutical Excipients, Sustained and Controlled Release Preparations, Dezhou 253023, China;
3. Omics Technologies and Health Engineering Research Center, Dezhou 253023, China; 4. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Corresponding author: ZHU Chao. E-mail: zhuchao830111@163.com

【Abstract】 Animal disease models are important biological tools for basic medical research. Establishing an ideal animal model is a critical prerequisite for acquiring reliable experimental data. By enabling molecular-level characterization, omics technologies can enhance the precision of animal model assessments, thereby improving the evaluation criteria. This review summarizes the current applications of omics in evaluating animal disease models, discusses their potential for quality control implementation, and proposes novel frameworks for standardized model validation.

【Keywords】 omics technologies; animal disease model; evaluation standard; quality control; biomarkers

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

【基金项目】 国家自然科学基金(32071392), 山东省自然科学基金(ZR2024QH557), 德州学院科研启动基金(2022xjrc420)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (32071392), Shandong Province Natural Science Foundation (ZR2024QH557),
Dezhou University Scientific Research Start-Up Foundation (2022xjrc420).
【作者简介】 朱超,男,博士,副教授,研究方向: 代谢组学。Email: zhuchao830111@163.com

疾病动物模型是基础医学研究中模拟人类疾病发生发展过程的生物载体。理想的动物模型应满足 3 个与人类疾病的一致性,即发病机理一致性、行为表象一致性和治疗反应一致性^[1]。在疾病动物模型的评估过程中,常以人类疾病的行为学、病理学和生物学特性作为参照标准(图 1)。然而,由于人体和动物之间结构上的固有差异,评价结果的不准确性(如假阳性)难以避免,这可能会对后续实验结果产生影响^[2-3]。因此,为了避免上述问题,模型评价体系亟需引入更为精确的评价方法和指标,以提升评价标准,确保获得更准确、更可靠的动物模型,特别是针对同种疾病不同分型模型的评价。

近年来,随着分析检测技术的不断革新,组学技术包括基因组学(genomics)、转录组学(transcriptomics)、蛋白组学(proteinomics)和代谢

组学(metabolomics)等,被广泛用于探究疾病的发生机制、细胞增殖与凋亡的分子路径、潜在生物标志物的筛查,以及药物作用潜在靶点的发现^[4-5]。通过多维度的分析,揭示生物体在疾病侵袭、药物治疗等外界因素影响下所发生的代谢动态变化,从而反映出生物机体组织器官的功能状态及其代谢活动特征^[6]。目前,基于组学技术的动物模型的评价研究表现出巨大的应用价值,其评价方法更加科学、精准,可提高模型评价的准确性、灵敏性和特异性,为疾病发病机制的深入研究及其治疗药物的筛选创造有利条件^[7]。本文主要对组学技术在疾病动物模型评价研究中的应用进行综述,并对组学技术在动物模型精准评价和质量控制中的应用前景进行展望,为动物模型的精准评价提供可借鉴的组学方法和可参考的评价指标体系。

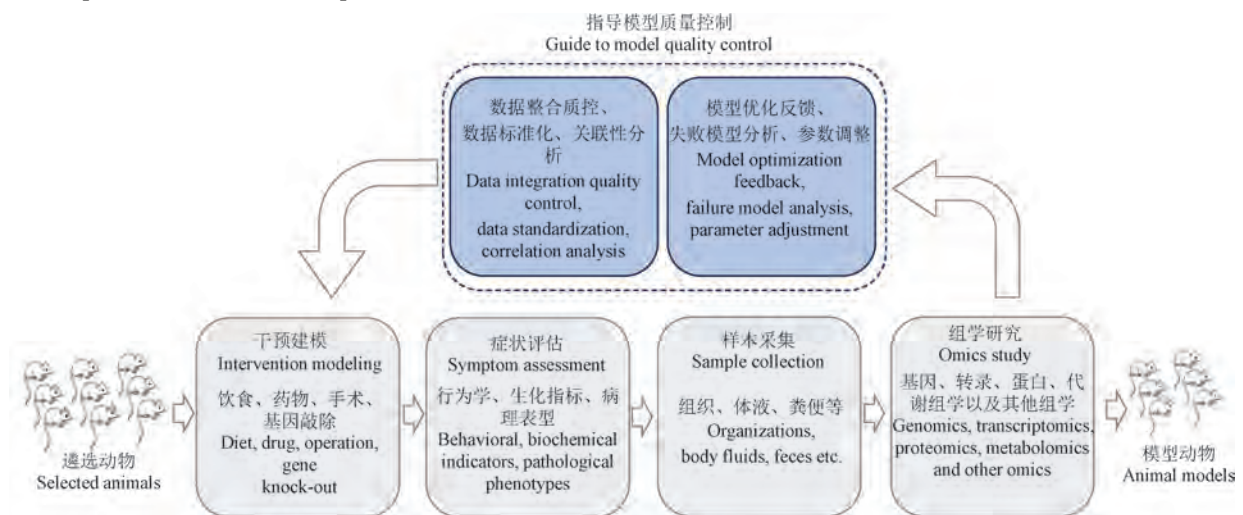


图 1 疾病动物模型构建与评价流程

Figure 1 Process of disease animal model construction and evaluation

1 组学研究策略

组学研究旨在通过系统性地分析生物体内分子组成及其动态变化,揭示生命活动的规律。组学技术主要包括基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学和表型组学(phenomics)等多个分支,研究组织细胞结构、蛋白、基因以及分子间的相互作用,通过整体分析反映生物组织器官的功能状态和代谢活动^[8]。组学技术的核心优势在于其高通量、系统性的分析能力,能够并行处理大量样本极大地提升研究人员对生物样本的分

析能力,从而发现微小而精确的生物学路径、机制及其调控差异^[9]。不同层次的组学技术要求对生物样本中相应层次的物质进行精准的定性定量分析再利用深度的机器学习和数据处理方法挖掘出疾病相关的潜在生物标志物,并进行生物学意义的阐释和验证(图 2)。其中基因组学检测技术主要包括高通量测序、生物信息学、基因编辑等^[10];转录组学检测技术主要有杂交技术,如基因芯片技术、测序技术,表达序列标签和 RNA 测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)^[11];蛋白组学检测技术有二维凝胶电泳技术、质谱技

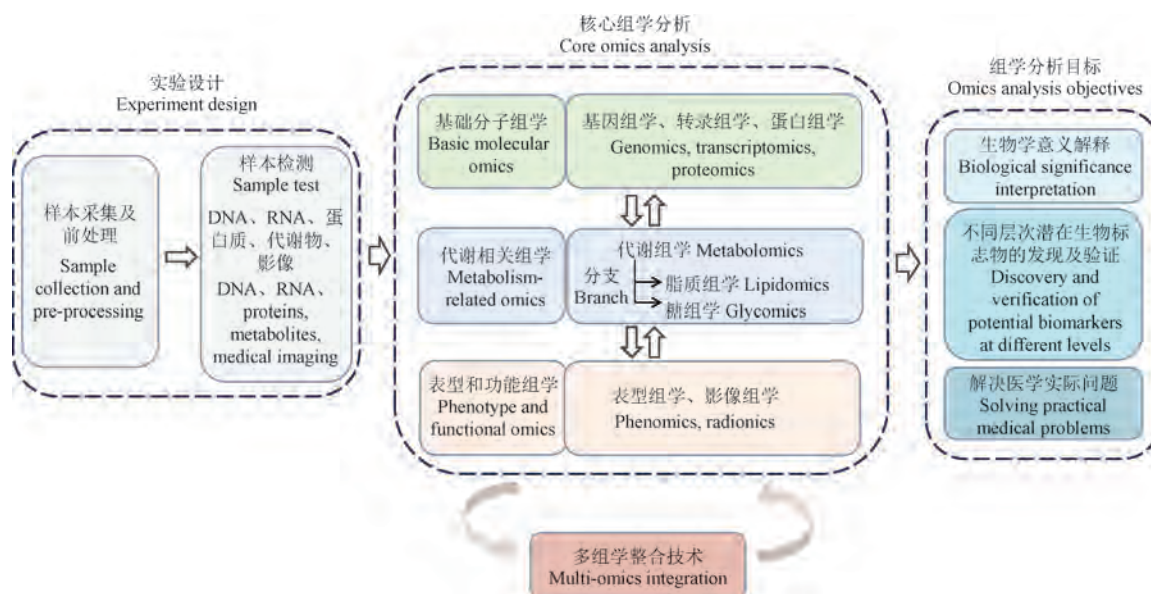


图2 组学研究的一般策略

Figure 2 General strategy for omics study

术、二维毛细管电泳技术、酵母双杂交技术等^[12]；代谢组学检测技术主要包括核磁共振光谱以及气、液相色谱-质谱联用技术等^[13-14]。在动物模型评价研究中,组学技术的应用为发现模型动物分子水平的特征指标提供了新方法和新思路。

2 组学技术在疾病模型评价中的应用

2.1 基于基因组学的动物模型评价

基因组学专注于生物基因组研究,包括基因作图、测序以及功能分析,以期望探究基因在生物体中的作用机制^[15],包括结构基因组学、功能基因组学和比较基因组学。结构基因组学主要研究基因组的结构,包括基因在染色体上的位置、排列顺序、基因间的距离、核苷酸序列等。功能基因组学侧重于对基因表达、蛋白质功能、代谢途径和信号传导网络的研究,包括基因如何表达、调控以及如何相互作用以影响生物体的表型^[16]。比较基因组学则通过比较不同生物间基因和基因组结构的差异,以增进对基因功能的了解和阐明物种进化关系^[17]。

DUAN 等^[18]利用病毒宏基因组学和代谢组学技术,发现慢性束缚应激小鼠肠道病毒组和神经递质代谢均发生改变,且两者之间存在相关性,肠道病毒组可能通过影响神经递质代谢参与

抑郁症的发生发展,为抑郁症的判定提供了新的参考指标。XU 等^[19]对所构建糖尿病小鼠模型的粪便宏基因组学和肝转录组学数据进行分析,揭示金耳多糖影响了肠道菌群组成以及肝代谢相关基因的表达。周绮纯等^[20]构建了气虚痰湿证小鼠模型,并利用宏基因组和代谢组学技术评估模型。结果显示模型小鼠肠道菌群和代谢物发生显著改变,且参苓白术散可以逆转这些改变,为中医证候模型构建提供了科学依据。胡双双等^[21]利用宏基因组学技术评估运动对炎症性肠病小鼠模型的干预效果。结果表明适度跑台运动能有效改善小鼠结肠上皮损伤,并引起小鼠肠道菌群的物种多样性和优势群落丰度变化。刘源等^[22]通过基因芯片和实时逆转录聚合酶链反应等技术发现罗哌卡因致神经损伤与炎症相关信号通路有关,为临床安全使用罗哌卡因提供了依据。徐婷婷等^[23]研究了商陆对大鼠肾损伤的影响,并利用基因组学技术深入探讨了其作用机制。研究发现,其机制可能与激活 MAPK、JAK-STAT 和细胞凋亡信号通路有关。

2.2 基于转录组学的动物模型评价

转录组学主要研究细胞在特定时间点或特定条件下所有 RNA 分子信息以及基因结构和功能、基因表达的调控信息^[24]。通过分析动物模型内的基因表达变动,可以评估这些模型在人类疾

病分子特征方面的精确性,并揭示关键分子通路中导致人类疾病发生的重要基因表达差异,进而促进对潜在疾病机制的理解及药物靶点发现并助力治疗方法的开发与评估^[25]。

对于全球范围内关注的公共卫生问题,转录组学技术的发展为从分子层面理解疾病的异质性提供了新的途径,通过比较患者和健康人以及不同患者的转录组数据分析可以识别出与疾病相关的特征分子通路^[26]。结合动物模型用来验证这些分子通路在疾病发病机制中的作用,并评估靶向这些通路的生物疗法的疗效有助于预先发现、诊断以及病情评估,为患者提供更有效的个体化治疗方案^[27-28]。姚冰等^[29]通过建立呼吸道合胞病毒感染后骨髓间充质干细胞来源的外泌体动物模型,并利用 RNA-seq 分析揭示了差异基因和关键通路,深入探究了外泌体在哮喘发病中的作用机制。YAN 等^[30]通过分析支气管上皮转录组数据确定了与哮喘严重程度相关的中性粒细胞浸润机制,并通过动物模型和细胞模型验证了关键基因的表达和潜在药物瑞帕利辛的有效性,为哮喘的精准治疗提供了新的思路。窦童等^[31]构建卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导哮喘小鼠模型,并利用转录组学技术分析基因表达变化,并与蛋白质组学数据结合,发现罗汉果皂苷 V 可能通过调节 PI3K/Akt 信号通路来改善哮喘小鼠的肺部炎症。宋栋等^[32]通过转录组测序技术分析了嗜酸性粒细胞型哮喘 (eosinophilic asthma, EA) 患者和健康志愿者的外周血样本,筛选出 EA 的差异表达基因。并结合网络药理学构建“中药-活性成分-关键靶点”网络,揭示了其通过调节炎症因子水平和抑制气道炎症发挥作用的机制。WANG 等^[33]根据中药白屈菜止咳平喘的功效,建立 OVA 诱导的过敏性哮喘大鼠模型,通过整合代谢组和转录组分析,发现白屈菜可以调节与能量代谢和炎症相关的基因表达,恢复哮喘大鼠的能量代谢和炎症紊乱。慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 同样是一种常见的慢性呼吸道疾病,是以吸入有毒物质后促发气道炎症反应继而引起气流受限的一类疾病,促发 COPD 的有毒吸入物中以香烟烟雾为最常见。LI 等^[34]通过构建 COPD 小鼠模型发现有氧训练可以有效改善暴露于香烟烟雾小鼠的气道

阻力和肺通气指标,但对受损的肺泡的影响较弱。并通过转录组学分析与炎症和代谢相关的差异表达基因,为进一步研究运动训练改善 COPD 患者肺功能的分子机制提供了重要线索。MAO 等^[35]发现褪黑素可以减轻慢性脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠肺破坏和慢性肺炎症,并整合转录组学和代谢组学数据分析,褪黑素可以调节与氨基酸和能量代谢相关的代谢途径,进而可以作为缓解 COPD 相关慢性炎症的潜在治疗剂。部分患者具有重叠的疾病特征,称为哮喘-慢性阻塞性肺病重叠 (asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome, ACOS)。TU 等^[36]通过结合暴露于屋尘螨和香烟烟雾来模拟人类 ACOS 的关键特征构建一种新的小鼠 ACOS 模型,经转录组分析分离的气道和肺实质组织,发现了实验性哮喘、COPD 和 ACOS 中共同和独特的基因和通路,为 ACOS 的治疗提供了新的靶点。此外,哮喘症状易于引发多种其他疾病,其中精神疾病发病率较高。BASTAWY 等^[37]通过 RNA 转录组测序,比较经 LPS 或 OVA 过敏原刺激的哮喘小鼠和对照组小鼠下丘脑的基因表达差异,发现多个与炎症神经递质信号直接相关的基因集发生变化。这些发现有助于阐明哮喘引起的肺炎症与大脑之间的联系,并为未来干预提供潜在的途径和靶点。

2.3 基于蛋白质组学的动物模型评价

蛋白质组学技术能够对蛋白质进行定性和定量分析,监测疾病状态下蛋白质的一系列变化,并探究药物的作用靶点及与之相关的蛋白质问题。通过比较不同条件下蛋白质组的差异,可以识别出那些在疾病发生或影响治疗效果中起关键作用的蛋白质,进而作为潜在的生物标志物^[38-39]。在蛋白质组学的早期阶段,二维凝胶电泳是主要的分析手段,该技术主要提供蛋白质的分离及其相对丰度信息。当前,质谱技术已成为蛋白质组学研究的关键工具。液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术能够高效、高灵敏度地鉴定和定量蛋白质,与传统的 Western Blot 和酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 相比,LC-MS/MS 在蛋白质定量方面实现了数量级上的提升^[40-41]。

SACCO 等^[42]通过高灵敏度的质谱分析,深入研究肥胖糖尿病小鼠和正常小鼠胰岛细胞的蛋白质组和磷酸化蛋白质组。发现糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase-3, GSK3)激酶在控制胰岛 β 细胞特异性转录启动因子 1(pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1)方面起着关键作用,并最终导致胰岛素分泌功能障碍。而药理抑制 GSK3 可以几乎完全恢复糖尿病胰岛细胞的胰岛素分泌能力,为 2 型糖尿病的治疗提供了新的思路和潜在靶点。ZHANG 等^[43]通过 RNA 测序及质谱分析构建了食蟹猴肥胖和 2 型糖尿病的转录组和蛋白质组图谱,并识别出在肥胖中的葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1)和前蛋白转化酶枯草溶菌素 1(proprotein convertase subtilisin/kexin type 1, PCSK 1)以及 2 型糖尿病中的锌转运蛋白 8(zinc transporter member 8, ZNT8)和葡萄糖转运蛋白 2(glucose transporter 2, GLUT2)一些关键潜在药物靶点。林震鸣等^[44]结合转录组学和蛋白质组学技术,分析筛选出糖尿病性心肌病(diabetic myocardial disorder, DCM)潜在的关键治疗靶点。并证实抑制酰基辅酶 A 硫酯酶 2(acyl-CoA thioesterase 2, ACOT2)可以有效减轻 DCM 小鼠的心肌损伤,改善心功能。王玮甯等^[45]通过建立糖尿病肾疾病(diabetic kidney disease, DKD)大鼠模型,并利用磷酸化蛋白组学技术分析益糖康干预前后大鼠肾组织的磷酸化修饰位点变化,发现益糖康能够显著减轻 DKD 大鼠的肾损伤程度,并影响与糖代谢相关的通路。王雪等^[46]发现羟基- α -山椒素能够改善经诱导糖尿病心肌病小鼠的心功能损伤和心肌组织病理变化。蛋白质组学分析显示,其主要通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路发挥作用,该通路上的蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)多种蛋白存在互作关系,并通过 Western Blot 验证进一步证实了这一机制的存在。LIU 等^[47]结合转录组学和蛋白质组学分析发现混合使用 5 种中草药提取物可以显著促进糖尿病大鼠溃疡伤口的愈合的潜在机制。该提取物可以促进血管生成、M2 巨噬细胞的增殖和胶原合成,并激活自噬、磷脂酰肌醇(-3)激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway, PI3-Akt)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian

target of rapamycin, mTOR)信号通路,有效地促进了糖尿病溃疡伤口的愈合。GU 等^[48]利用质谱技术分析脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)治疗后糖尿病大鼠背部伤口中蛋白质的变化,揭示了包含 224 个关键蛋白在内的 474 个差异表达蛋白。并进一步分析发现,细胞表面抗原 Thy 1(cell surface antigen, Thy 1)和 G 蛋白偶联受体 177(G protein-coupled receptor 177, GPR177)在 ADSCs 组中显著上调,可能成为 ADSCs 治疗糖尿病伤口的关键靶点。

2.4 基于代谢组学的动物模型评价

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门学科,是系统生物学的重要组成部分。基因组学和蛋白质组学分别从基因和蛋白质层面探寻生命的活动,而实际上细胞内许多生命活动是发生在代谢物层面的,代谢组学正是对某一生物或细胞在一特定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析的新学科^[49]。基因与蛋白质的表达紧密相连,而代谢物则更多地反映了细胞所处的环境,这又与细胞的营养状态、药物和环境污染物的作用,以及其它外界因素的影响密切相关^[50]。研究人员可通过深入研究机体代谢产物判断机体是否处于正常状态。

代谢组学已在疾病的早期诊断和预防中得到广泛应用。代谢组学主要技术手段包括核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)、质谱(mass spectrometry, MS)、气相色谱(gas chromatography, GC)以及液相色谱(liquid chromatography, LC)联用技术,各有其应用优势^[51]。NMR 技术具有无创分析优势,能够同时进行化合物的定性和定量分析定性和定量分析化合物,且具有良好的重现性。不过, NMR 的灵敏度较低,不适用于分析低浓度或信号重叠的代谢物^[52]。质谱技术则快速、灵敏、具有选择性,能够同时识别和测定多种代谢物,是代谢组学研究的重要工具。但是,质谱在鉴定未知化合物时需要依赖标准对照物,从而限制了其在精准定性方面的应用^[53-54]。

GUPTA 等^[55]通过 $^1\text{H-NMR}$ 光谱分析,揭示了安格尔曼综合症(Angelman syndrome, AS)小鼠胚胎脑组织在代谢方面的显著变化。与野生型

小鼠相比,AS 小鼠脑组织中与丙酮酸代谢和糖酵解途径密切相关的乳酸、乙酸和琥珀酸等代谢物的水平显著升高。GONG 等^[56]通过 GC-MS 进行代谢物测定,揭示了冷暴露后小鼠棕色脂肪组织、白色脂肪组织、血清、肝、脾和肾中多种代谢物的变化,并确定了与氨基酸、脂肪酸和能量代谢相关的 12 条差异代谢途径。WANG 等^[57]利用代谢组学技术,通过对小鼠粪便、血清和大脑皮层的代谢物进行分析,评估了脑部 X 射线照射对肠道菌群和代谢的影响。REN 等^[58]通过代谢组学技术分析揭示了电子烟主要影响氨基酸代谢,从而影响三羧酸循环。此外,经代谢组学分析还发现,2 型糖尿病、丙酸血症、长链脂肪酸转运缺陷和肺癌等疾病可能与电子烟相关。这些发现为电子烟急性暴露的代谢生物标志物提供了重要线索,并有助于相关疾病的预防。DACOMO 等^[59]通过 LC-MS/MS 联用及 RNA 测序对衰老加速小鼠模型 (senescence accelerated mouse/prone 8, SAMP8) 与同龄的正常小鼠 (senescence accelerated mouse/resistant 1, SAMR1) 分析比较。发现 SAMP8 小鼠在 2.5 个月大时酰基肉碱和脂质水平显著降低且基因表达发生显著变化,并出现记忆缺陷、肌肉无力和运动障碍。这些发现表明,SAMP8 小鼠中的特定基因变化和血浆代谢组学变化可能允许早期评估导致痴呆发展的虚弱状态。LI 等^[60]结合 HPLC-MS 对小鼠早期暴露于 2,2',4,4'-四溴联苯醚 (2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, BDE-47) 后的脑、血和尿中的代谢物变化进行高通量分析。虽然 BDE-47 在停用 3 个月后已然低于检测限,但其引起的代谢紊乱却持续存在,并可能对神经发育产生长期影响。并表明代谢组学在探索环境污染物长期效应机制中的重要作用,并为 BDE-47 的风险评估提供了新的思路。SEGERS 等^[61]利用毛细管电泳-质谱联用 (capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS) 对急性癫痫小鼠模型中的极低量血浆样品进行代谢组学分析,并发现了与癫痫发作相关的代谢变化。表明 CE-MS 技术在分析小鼠少量血浆样本中的适用性和可靠性。

2.5 基于其他组学的动物模型评价

2.5.1 脂质组学

代谢组学对脂质的初步分析难以揭示单个

脂质分子在生物体内调控生命活动的具体作用,也无法深入解析脂质分子变化的内在联系。而脂质组学能够有效克服局限对各种脂质分子进行全面的鉴定和定量分析,揭示脂质在细胞代谢、信号传导和能量平衡中的关键作用^[62]。作为代谢组学的一个重要分支,主要研究方法比较类似,是以质谱为基础联合色谱、软电离技术等对样品进行分析。如 GC-MS、LC-MS 及逐渐发展起来的超高效液相色谱飞行时间质谱法 (ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF-MS) 和超高效液相色谱电喷雾串联四极杆质谱法 (ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, UPLC-ESI-MS/MS) 等联合检测技术,其具有分析速度快、灵敏度高以及分离度好的优势,对脂质样品的分析效果显著^[63-64]。

TSUGAWA 等^[65]通过构建不同培养周期小鼠样本,对与衰老相关的常见和组织特异性脂质组变化的 109 个脂质亚类的 2704 个分子进行分析,以阐明衰老与脂质代谢之间潜在联系。JANSSENS 等^[66]对年轻与老年小鼠的 10 种组织的脂质分析,从 1200 余种脂质中发现双 (单酰基甘油) 磷酸盐 (bis-monoacylglycerol phosphate, BMP) 在小鼠衰老过程中逐渐积累,并在人类衰老脂质组中发现类似显著的 BMP 积累。WANG 等^[67]发现高剂量聚苯乙烯微塑料 (polystyrene-microplastics, PS-MPs) 会诱导小鼠葡萄糖耐受性受损和肝脂质沉积,并显著改变肝脂质种类,为深入理解 PS-MPs 的代谢毒性和潜在机制提供了新的见解。张振涛等^[68]分析脂质组学数据发现,越鞠丸能够改善抑郁小鼠的血脂水平和肝功能,并通过调控甘油磷脂代谢通路发挥抗抑郁作用。郝世奇等^[69]通过脂质组学分析骆驼乳可能通过调节鞘脂类代谢等代谢通路有效改善非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 小鼠的健康状况,包括减轻体质量、降低血糖和血脂,以及改善肝结构。

2.5.2 影像组学

影像组学旨在从医学影像图像中高通量地提取大量定量特征。这些特征不仅包括影像的形态学信息,如肿瘤的形状、大小和边缘,还包括

纹理、强度、体积和表观扩散系数等反映组织异质性的信息。影像组学通过将这些高通量特征与临床信息、病理结果和患者的遗传数据相结合,为精准医疗提供了一种有力的工具^[70-71]。

LI 等^[72]利用影像组学技术发现,慢性社会挫败应激会导致小鼠脑部多个区域出现结构异常,而逍遥散可以有效预防此模型小鼠脑部结构的异常改变,并改善其抑郁样行为。这表明影像组学技术在评估小鼠模型脑部结构改变方面具有指导意义,可以帮助研究人员更好地理解抑郁症的神经影像学机制,并指导中医药的治疗方案。DRAYSON 等^[73]利用锥形束计算机断层扫描图像特征,成功区分了接受不同剂量胸部放疗的小鼠,并发现人胚胎干细胞衍生外泌体治疗能够减轻放疗引起的肺损伤。结果表明,影像组学技术在小鼠模型中具有评估放疗毒性和治疗疗效的潜力,为临床研究提供了新的方向。

2.5.3 糖组学

糖组学技术专注于研究生物体内糖类分子(糖缀合物)的结构、功能、生物学作用以及它们与蛋白质和脂质的相互作用^[74]。继基因组学和蛋白质组学后发展起来的重要组学技术,糖组学揭示了细胞表面和细胞外基质中复杂糖链的多样性和动态性,这些糖链在细胞识别、信号转导、免疫应答、病原体感染和细胞黏附等生物过程中扮演着关键角色。糖组学的研究不仅有助于研究人员深入理解生命现象的本质,还为疾病诊断、治疗靶点发现和新药开发提供了宝贵的信息^[75-76]。

MOH 等^[77]通过分析小鼠脑部糖组学数据,揭示了区域特异性糖链特征,并强调了糖基化在神经免疫相互作用中的重要作用,为神经免疫学研究提供了新的方向。SETHI 等^[78]基于质谱的糖组学和蛋白质组学分析,发现可卡因和甲基苯丙胺两种药物诱导后的小鼠大脑外侧下丘脑和纹状体两个关键区域的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)和硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)丰度及硫酸化程度显著改变,并影响相关蛋白和通路。结果表明,增加硫酸软骨素 4-O-硫酸化水平可以改善药物依赖症状,并指出硫酸肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)可能成为治疗药物依赖的新靶点^[78]。

2.6 基于整合组学技术的动物模型评价

随着科学技术的不断发展,单一组学技术在生物体分析研究中逐渐暴露出其局限性。为了更全面、深入地揭示生物体的复杂结构和功能,联合多种组学技术已成为当前研究的重要方向。这种多组学整合策略,通过系统性地分析基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等多个层面的信息,有助于研究者从不同角度挖掘生物体的内在联系,提高研究的准确性和全面性^[79-81]。

JI 等^[82]通过整合代谢组学、脂质组学和蛋白质组学,基于 LC-MS/MS 联用技术,发现 BDE-47 诱导的小鼠脑部出现多种与帕金森病的典型病理特征相符的变化,表明在 BDE-47 环境中可能加剧帕金森病的病理进程。SONG 等^[83]通过整合多组学技术分析三氯卡班(triclocarban, TCC)环境诱导小鼠模型,发现 TCC 能够扰乱与内吞作用和神经退行性疾病相关的蛋白质,并引起鞘脂信号通路变化与线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mROS)的过量产生进而增强神经细胞凋亡。AON 等^[84]通过制定两种饮食和 3 种喂食策略结合转录、代谢组学数据分析对小鼠健康和寿命的影响。揭示甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢轴在寿命延长中的作用,以及短链脂肪酸和必需多不饱和脂肪酸代谢与维持健康的关系,表明这些发现可能是抗衰老治疗的潜在靶点。QIAN 等^[85]通过整合多组学技术,发现 APP/PS 1 小鼠肠道菌群、甘油磷脂代谢和神经炎症存在异常,并相互关联,揭示了肠道菌群在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)进程中的作用。STREFFELER 等^[86]分析 AD 小鼠模型的脑组织代谢变化,揭示了 AD 小鼠大脑中氨基酸和溶血磷脂代谢的性别特异性改变,以及脂肪酸延长途径的失调。这些发现有助于更好地理解 AD 的分子机制,并为开发针对不同性别的治疗策略提供依据。

3 总结与展望

组学技术的发展越发成熟,其在疾病动物模型研究中的应用越来越广泛。组学技术是揭示疾病发病机制,指导制定诊疗方案的强有力手段^[39]。特别是通过组学技术筛选出的特征生物标志物在模型评价和疾病相关机理研究中扮演

了非常重要的角色,促使组学技术成为动物模型评价及质量控制的重要手段(图 3)。整合模型动物的行为特征、病理特征和组学分析结果能够提

高模型的判断标准,降低模型的假阳性率,为实验研究提供更为规范、可靠的疾病模型。组学研究结果为模型验证提供了可靠的理论支持,同

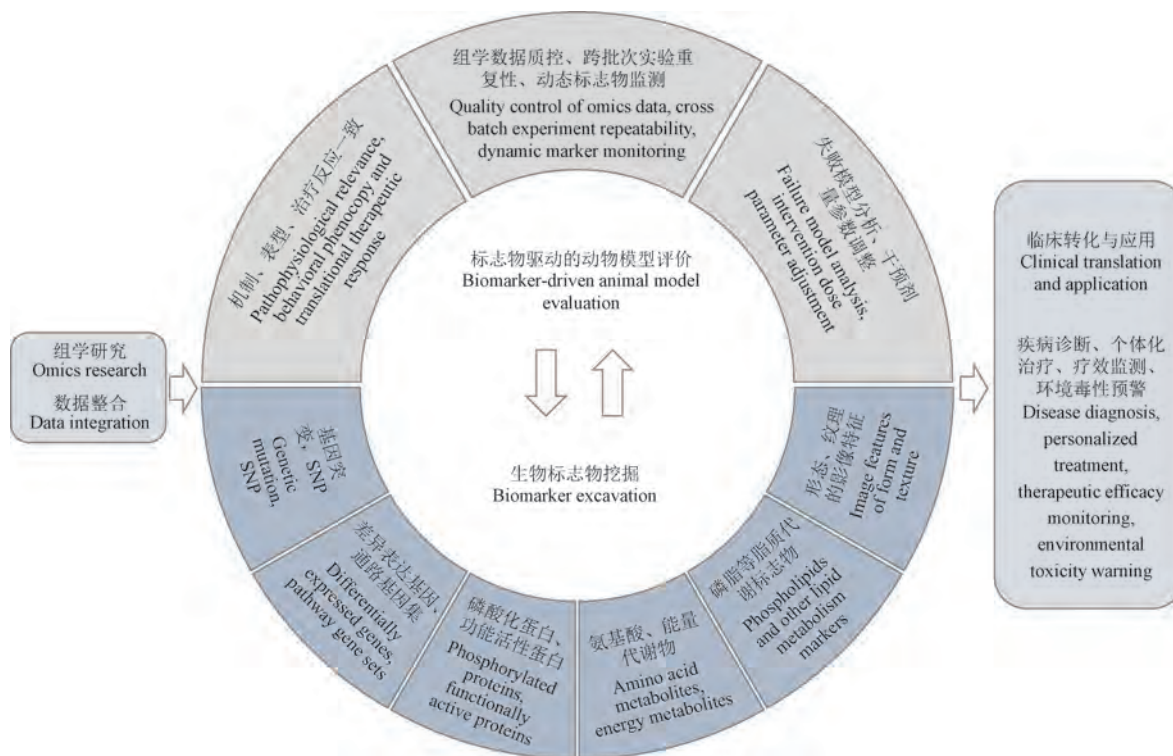


图 3 组学标志物在动物模型评价中的角色

Figure 3 Role of omics technologies based biomarkers in animal model evaluation

时,应用于模型评价的标志物为疾病的临床诊断与治疗提供了潜在指标,当该标志物在临床疾病中表现出与动物模型相同规律时有成为新的临床诊断指标的可能。

随着系统生物学的快速发展,将两种或两种以上不同的组学技术有机结合将成为该领域的发展趋势^[87-89]。将代谢组学与转录组学、基因组学及蛋白质组学进行整合,全面跟踪模型动物在疾病发生发展中的代谢变化,获得更加准确的诊断、评估和判断预后的潜在生物标志物,有利于揭示疾病发生发展的基本规律。同时结合生物信息学、数学建模和建立数据库等方法,以动物行为学、病理学、生化特征和组学数据建立动物疾病模型的综合评价指标体系,有利于疾病模型的精确评价,有利于疾病模型的质量控制^[90]。因此,快速、准确、稳定、高通量的组学技术,为动物模型的精准评价提供了新技术、新方法,将推动疾病动物模型评价研究的新发展。组学研究也

将为实验动物质量控制提供数据支持和理论依据,在药物筛选、疾病诊断和防治领域发挥更大的应用价值。

参 考 文 献 (References)

- [1] 王倩茹, 侯久文, 梅其炳. 人类肾脏疾病动物模型研究进展 [J]. 神经药理学报, 2023, 13(4): 29-35.
WANG Q R, HOU J W, MEI Q B. Research progress on animal models of human kidney disease [J]. Acta Neuroparmacol, 2023, 13(4): 29-35.
- [2] TABIBZADEH N, MORIZANE R. Advancements in therapeutic development: kidney organoids and organs on a chip [J]. Kidney Int, 2024, 105(4): 702-708.
- [3] KRIAA A, MARIAULE V, DE RUDDER C, et al. From animal models to gut-on-chip: the challenging journey to capture inter-individual variability in chronic digestive disorders [J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2333434.
- [4] PANG H, HU Z. Metabolomics in drug research and development: the recent advances in technologies and applications [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(8): 3238-3251.

- [5] YAN Y, ZHU S, JIA M, et al. Advances in single-cell transcriptomics in animal research [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2024, 15(1): 102.
- [6] KAUR P, SINGH A, CHANA I. Computational techniques and tools for omics data analysis: state-of-the-art, challenges, and future directions [J]. *Arch Comput Meth Eng*, 2021, 28(7): 4595–4631.
- [7] POUSINIS P, BEGOU O, BOZIKI M K, et al. Recent advances in metabolomics and lipidomics studies in human and animal models of multiple sclerosis [J]. *Metabolites*, 2024, 14(10): 545.
- [8] MOHAMMADI-SHEMIRANI P, SOOD T, PARÉ G. From omics to multi-omics technologies: the discovery of novel causal mediators [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2023, 25(2): 55–65.
- [9] PLUMB R S, GETHINGS L A, RAINVILLE P D, et al. Advances in high throughput LC/MS based metabolomics: a review [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2023, 160: 116954.
- [10] 李律瑄, 李招应. 基因组学技术在生物多样性保护研究应用中面临的挑战及应对策略 [J]. *中阿科技论坛*, 2024, 1: 89–93.
- LI L X, LI Z Y. Study on the challenges faced by genomics in the application of biodiversity conservation research and response strategies [J]. *Chin Arab States Sci Technol Forum*, 2024, 1: 89–93.
- [11] KERTZ N C, BANERJEE P, DYCE P W, et al. Harnessing genomics and transcriptomics approaches to improve female fertility in beef cattle—a review [J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(20): 3284.
- [12] CUI M, CHENG C, ZHANG L. High-throughput proteomics: a methodological mini-review [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(11): 1170–1181.
- [13] DING J, FENG Y Q. Mass spectrometry-based metabolomics for clinical study: recent progresses and applications [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2023, 158: 116896.
- [14] DOGAN H O. Metabolomics: a review of liquid chromatography mass spectrometry-based methods and clinical applications [J]. *Turk J Biochem*, 2024, 49(1): 1–14.
- [15] JUAN D, SANTPERE G, KELLEY J L, et al. Current advances in primate genomics: novel approaches for understanding evolution and disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2023, 24(5): 314–331.
- [16] KWON S B, ERNST J. Learning a genome-wide score of human-mouse conservation at the functional genomics level [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2495.
- [17] MEADOWS J R S, LINDBLAD-TOH K. Dissecting evolution and disease using comparative vertebrate genomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(10): 624–636.
- [18] DUAN J, WANG W, JIANG T, et al. Viral metagenomics combined with metabolomics reveals the role of gut viruses in mouse model of depression [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1046894.
- [19] XU X, LIU X, LIU L, et al. Metagenomic and transcriptomic profiling of the hypoglycemic and hypotriglyceridemic actions of Tremella fuciformis-derived polysaccharides in high-fat-diet- and streptozotocin-treated mice [J]. *Food Funct*, 2024, 15(22): 11096–11114.
- [20] 周绮纯, 朱港星, 邹永春, 等. 气虚痰湿证小鼠模型的构建及评价 [J/OL]. [2025–05–21]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfx.20241514>.
- ZHOU Q C, ZHU G X, ZOU Y C, et al. Construction and evaluation of the mouse model of qi deficiency and phlegm dampness syndrome [J/OL]. [2025–05–21]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfx.20241514>.
- [21] 胡双双, 俞益, 董静梅. 基于宏基因组学技术的炎症性肠病小鼠的运动干预研究 [J]. *中国体育科技*, 2022, 58(2): 89–95.
- HU S S, YU Y, DONG J M. Intervention study of exercise on mice with inflammatory bowel disease based on metagenomic technique [J]. *Chin Sport Sci Technol*, 2022, 58(2): 89–95.
- [22] 刘源, 郭曲练, 张重, 等. 基于基因组学探讨鞘内注射罗哌卡因对大鼠脊髓的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(4): 431–442.
- LIU Y, GUO Q L, ZHANG Z, et al. Effects of intrathecal injection of ropivacaine on spinal cord in rats based on genomics [J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2022, 47(4): 431–442.
- [23] 徐婷婷, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆致大鼠肾损伤的基因组学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(11): 1591–1600.
- XU T T, YAO G T, JIN R M, et al. Genomics research on *Phytolacca Radix* induced renal injury in rats [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(11): 1591–1600.
- [24] JIANG L, GOH D X, KOH J H Z, et al. Applications of genomics and transcriptomics in precision medicine for myopia control or prevention [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(3): 494.
- [25] WANAPAT M, DAGAEW G, SOMMAI S, et al. The application of omics technologies for understanding tropical plants-based bioactive compounds in ruminants: a review [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2024, 15(1): 58.
- [26] TU X, GOMEZ H M, KIM R Y, et al. Airway and parenchyma transcriptomics in a house dust mite model of experimental asthma [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 32.
- [27] BUNYAVANICH S, BECKER P M, ALTMAN M C, et al.

- Analytical challenges in omics research on asthma and allergy: a national institute of allergy and infectious diseases workshop [J]. J Allergy Clin Immunol, 2024, 153(4): 954–968.
- [28] RAY A, CAMIOLO M, FITZPATRICK A, et al. Are we meeting the promise of endotypes and precision medicine in asthma? [J]. Physiol Rev, 2020, 100(3): 983–1017.
- [29] 姚冰, 周智, 王孟清, 等. 基于转录组学探讨外泌体诱导病毒性哮喘动物模型的作用机制及潜在的中药干预 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(8): 82–89.
- YAO B, ZHOU Z, WANG M Q, et al. Mechanism of exosome-induced viral asthma model based on transcriptomics and potential traditional Chinese medicine intervention [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(8): 82–89.
- [30] YAN Q, ZHANG X, XIE Y, et al. Bronchial epithelial transcriptomics and experimental validation reveal asthma severity-related neutrophilic signatures and potential treatments [J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 181.
- [31] 窦童, 王娟, 刘以撒, 等. 转录组学结合蛋白质组学筛选罗汉果皂苷 V 缓解 OVA 诱导哮喘小鼠的关键通路 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(12): 1809–1816.
- DOU T, WANG J, LIU Y S, et al. Transcriptomic and proteomic screening of key pathways of mogroside V relieving OVA-induced mouse asthma [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(12): 1809–1816.
- [32] 宋栋, 李慧聪, 高雪歌, 等. 基于转录组学与网络药理学分析射麻止喘液治疗嗜酸性粒细胞型哮喘的分子机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(12): 1886–1894.
- SONG D, LI H C, GAO X G, et al. Integrative transcriptomics and network pharmacology to analyze the molecular mechanism of Shema Zhichuan liquid in treating eosinophilic asthma [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(12): 1886–1894.
- [33] WANG R, SUI X, DONG X, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals the therapeutic mechanism underlying *Chelidonium majus* L. in the treatment of allergic asthma [J]. Chin Med, 2024, 19(1): 65.
- [34] LI J, CHEN C T, LI P, et al. Lung transcriptomics reveals the underlying mechanism by which aerobic training enhances pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Pulm Med, 2024, 24(1): 154.
- [35] MAO K, LUO P, GENG W, et al. An integrative transcriptomic and metabolomic study revealed that melatonin plays a protective role in chronic lung inflammation by reducing necroptosis [J]. Front Immunol, 2021, 12: 668002.
- [36] TU X, KIM R Y, BROWN A C, et al. Airway and parenchymal transcriptomics in a novel model of asthma and COPD overlap [J]. J Allergy Clin Immunol, 2022, 150(4): 817–829.
- [37] BASTAWY E M, ERASLAN I M, VOGLSANGER L, et al. Novel insights into changes in gene expression within the hypothalamus in two asthma mouse models: a transcriptomic lung-brain axis study [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(13): 7391.
- [38] JOSHI N, GARAPATI K, GHOSE V, et al. Recent progress in mass spectrometry-based urinary proteomics [J]. Clin Proteomics, 2024, 21(1): 14.
- [39] HIBBERT S A, OZOLS M, GRIFFITHS C E M, et al. Defining tissue proteomes by systematic literature review [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 546.
- [40] ZHAO Y, XUE Q, WANG M, et al. Evolution of mass spectrometry instruments and techniques for blood proteomics [J]. J Proteome Res, 2023, 22(4): 1009–1023.
- [41] MARZANO V, TILOCCA B, FIOCCHI A G, et al. Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics [J]. J Proteomics, 2020, 215: 103636.
- [42] SACCO F, SEELIG A, HUMPHREY S J, et al. Phosphoproteomics reveals the GSK3-PDX1 axis as a key pathogenic signaling node in diabetic islets [J]. Cell Metab, 2019, 29(6): 1422–1432.
- [43] ZHANG X, HU L G, LEI Y, et al. A transcriptomic and proteomic atlas of obesity and type 2 diabetes in cynomolgus monkeys [J]. Cell Rep, 2023, 42(8): 112952.
- [44] 林震鸣, 张明超, 和梦颖, 等. 基于转录组学和蛋白质组学筛选糖尿病心肌病的关键靶点 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(5): 910–917.
- LIN Z M, ZHANG M C, HE M Y, et al. Screening of key targets for diabetic cardiomyopathy based on transcriptomics and proteomics [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(5): 910–917.
- [45] 王玮鼎, 于嘉祥, 石岩, 等. 基于磷酸化蛋白质组学技术研究益糖康防治糖尿病肾脏疾病的机制 [J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(11): 1486–1497.
- WANG W N, YU J X, SHI Y, et al. Study on the mechanism of Yitangkang in preventing and treating diabetic nephropathy based on phosphorylated protein genomics technology [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2023, 40(11): 1486–1497.
- [46] 王雪, 黄硕, 杨羚, 等. 基于蛋白质组学探讨羟基- α -山椒素对糖尿病心肌病的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(3): 537–544.
- WANG X, HUANG S, YANG L, et al. Study on mechanism of hydroxy- α -sanshool on diabetic cardiomyopathy based on proteomics [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(3): 537–544.

- [47] LIU Y, ZHANG X, YANG L, et al. Proteomics and transcriptomics explore the effect of mixture of herbal extract on diabetic wound healing process [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154892.
- [48] GU Y, MU Z, CHEN Y, et al. Therapeutic potential of ADSCs in diabetic wounds: a proteomics-based approach [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1468220.
- [49] 李卓颖, 项永兵. 代谢组学技术在肝癌病因学研究中的应用与进展 [J]. *中国肿瘤*, 2024, 33(11): 952-959.
LI Z Y, XIANG Y B. Application and progress of metabolomics in the etiology of liver cancer [J]. *Chin Cancer*, 2024, 33(11): 952-959.
- [50] 刘景芳, 李维林, 王莉, 等. 多组学技术及其在生命科学研究中应用概述 [J]. *生物工程学报*, 2022, 38(10): 3581-3593.
LIU J F, LI W L, WANG L, et al. Multi-omics technology and its applications to life sciences: a review [J]. *Chin J Biotechnol*, 2022, 38(10): 3581-3593.
- [51] MCCULLAGH J, PROBERT F. New analytical methods focusing on polar metabolite analysis in mass spectrometry and NMR-based metabolomics [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2024, 80: 102466.
- [52] POWERS R, ANDERSSON E R, BAYLESS A L, et al. Best practices in NMR metabolomics: current state [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2024, 171: 117478.
- [53] YU H, LOW B, ZHANG Z, et al. Quantitative challenges and their bioinformatic solutions in mass spectrometry-based metabolomics [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2023, 161: 117009.
- [54] SOGA T. Advances in capillary electrophoresis mass spectrometry for metabolomics [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2023, 158: 116883.
- [55] GUPTA P K, BARAK S, FEUERMANN Y, et al. 1H-NMR-based metabolomics reveals metabolic alterations in early development of a mouse model of Angelman syndrome [J]. *Mol Autism*, 2024, 15(1): 31.
- [56] GONG L, ZHAO S, CHU X, et al. Assessment of cold exposure-induced metabolic changes in mice using untargeted metabolomics [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1228771.
- [57] WANG X, GUO L, QIN T, et al. Effects of X-ray cranial irradiation on metabolomics and intestinal flora in mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 270: 115898.
- [58] REN X, LIN L, SUN Q, et al. Metabolomics-based safety evaluation of acute exposure to electronic cigarettes in mice [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 839: 156392.
- [59] DACOMO L, VITOLA P L, BRUNELLI L, et al. Transcriptomic and metabolomic changes might predict frailty in SAMP8 mice [J]. *Aging Cell*, 2024, 23(10): e14263.
- [60] LI Y, YU N, LI M, et al. Metabolomic insights into the lasting impacts of early-life exposure to BDE-47 in mice [J]. *Environ Pollut*, 2020, 263: 114524.
- [61] SEGERS K, ZHANG W, AOURZ N, et al. CE-MS metabolic profiling of volume-restricted plasma samples from an acute mouse model for epileptic seizures to discover potentially involved metabolomic features [J]. *Talanta*, 2020, 217: 121107.
- [62] 曹智, 许毛斗, 刘金璐, 等. 基于脂质组学技术分析畜禽脂质代谢差异的研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(12): 15-22.
CAO Z, XU M D, LIU J L, et al. Research progress on analysis of lipid metabolism difference of livestock and poultry by lipomonic technique [J]. *Chin J Anim Sci*, 2023, 59(12): 15-22.
- [63] CHALLENGER B, CRAMER R. Advances in ionisation techniques for mass spectrometry-based omics research [J]. *Proteomics*, 2022, 22(15-16): e2100394.
- [64] WU B, WEI F, XU S, et al. Mass spectrometry-based lipidomics as a powerful platform in foodomics research [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 107: 358-376.
- [65] TSUGAWA H, ISHIHARA T, OGASA K, et al. A lipidome landscape of aging in mice [J]. *Nat Aging*, 2024, 4(5): 709-726.
- [66] JANSSENS G E, MOLENAARS M, HERZOG K, et al. A conserved complex lipid signature marks human muscle aging and responds to short-term exercise [J]. *Nat Aging*, 2024, 4(5): 681-693.
- [67] WANG Q, WU Y, ZHANG W, et al. Lipidomics and transcriptomics insight into impacts of microplastics exposure on hepatic lipid metabolism in mice [J]. *Chemosphere*, 2022, 308(3): 136591.
- [68] 张振涛, 苏丹, 李惠珍, 等. 基于脂质组学探究越鞠丸对抑郁小鼠的治疗作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(1): 85-94.
ZHANG Z T, SU D, LI H Z, et al. Exploring therapeutic effect of yuejuwan on depressed mice based on lipidomics [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2025, 31(1): 85-94.
- [69] 郝世奇, 李雅菲, 吕浩迪, 等. 基于脂质组学研究骆驼乳对小鼠非酒精性脂肪肝的缓解作用 [J]. *中国食品学报*, 2024, 24(6): 128-141.
HAO S Q, LI Y F, LYU H D, et al. The alleviating mechanism of camel milk on non-alcoholic fatty liver disease in mice based on lipidomics [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2024, 24(6): 128-141.
- [70] LI S, DENG Y Q, ZHU Z L, et al. A comprehensive review on radiomics and deep learning for nasopharyngeal carcinoma imaging [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(9): 1523.

- [71] YAO L, ZHANG Z, KELES E, et al. A review of deep learning and radiomics approaches for pancreatic cancer diagnosis from medical imaging [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2023, 39(5): 436–447.
- [72] LI Y. Effect of Xiaoyaosan on brain volume and microstructure diffusion changes to exert antidepressant-like effects in mice with chronic social defeat stress [J]. *Front Psychiatry*, 2024, 15: 1414295.
- [73] DRAYSON O G G, MONTAY-GRUEL P, LIMOLI C L. Radiomics approach for identifying radiation-induced normal tissue toxicity in the lung [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 24256.
- [74] TRBOJEVIC-AKMAČIĆ I, LAGEVEEN-KAMMEIJER G S M, HEIJES B, et al. High-throughput glycomic methods [J]. *Chem Rev*, 2022, 122(20): 15865–15913.
- [75] 郑义, 曹翠岩, 郭志谋, 等. 色谱在糖组学分析中的应用 [J]. *色谱*, 2024, 42(7): 646–657.
- ZHENG Y, CAO C Y, GUO Z M, et al. Applications of chromatography in glycomics [J]. *Chin J Chromatogr*, 2024, 42(7): 646–657.
- [76] TANG W, LIU D, NIE S P. Food glycomics in food science: recent advances and future perspectives [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2022, 46: 100850.
- [77] MOH E S X, DALAL S, HUTCHINSON M R, et al. Mouse brain glycomics-Insights from exploring the Allen Brain Atlas and the implications for the neuroimmune brain [J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 113: 83–90.
- [78] SETHI M K, MACCIONI R, HOGAN J D, et al. Comprehensive glycomic and proteomic analysis of mouse striatum and lateral hypothalamus following repeated exposures to cocaine or methamphetamine [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2024, 23(8): 100803.
- [79] LIU J C, DONG S S, SHEN H, et al. Multi-omics research in sarcopenia: current progress and future prospects [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 76: 101576.
- [80] NAKAJIMA S, NAKAMIZO S, NOMURA T, et al. Integrating multi-omics approaches in deciphering atopic dermatitis pathogenesis and future therapeutic directions [J]. *Allergy*, 2024, 79(9): 2366–2379.
- [81] 朱超, 梁琼麟, 王义明, 等. 代谢组学的整合化发展及其新进展 [J]. *分析化学*, 2010, 38(7): 1060–1068.
- ZHU C, LIANG Q L, WANG Y M, et al. Integrated development of metabonomics and its new progress [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(7): 1060–1068.
- [82] JI F, SREENIVASMURTHY S G, WEI J, et al. Study of BDE-47 induced Parkinson's disease-like metabolic changes in C57BL/6 mice by integrated metabolomic, lipidomic and proteomic analysis [J]. *J Hazard Mater*, 2019, 378: 120738.
- [83] SONG Q, HU C, ZHANG X, et al. Integrated multi-omics approaches reveal the neurotoxicity of triclocarban in mouse brain [J]. *Environ Int*, 2024, 191: 108987.
- [84] AON M A, BERNIER M, MITCHELL S J, et al. Untangling determinants of enhanced health and lifespan through a multi-omics approach in mice [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(1): 100–116.
- [85] QIAN X, HAI W, CHEN S, et al. Multi-omics data reveals aberrant gut microbiota-host glycerophospholipid metabolism in association with neuroinflammation in APP/PS1 mice [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(2): 2282790.
- [86] STREFELER A, JAN M, QUADRONI M, et al. Molecular insights into sex-specific metabolic alterations in Alzheimer's mouse brain using multi-omics approach [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2023, 15(1): 8.
- [87] CHU L X, WANG W J, GU X P, et al. Spatiotemporal multi-omics: exploring molecular landscapes in aging and regenerative medicine [J]. *Mil Med Res*, 2024, 11(1): 31.
- [88] SAUCEDA C, BAYNE C, SUDQI K, et al. Stool multi-omics for the study of host-microbe interactions in inflammatory bowel disease [J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2154092.
- [89] WEI S, TANG W, CHEN D, et al. Multiomics insights into the female reproductive aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 95: 102245.
- [90] MANSOOR S, HAMID S, TUAN T T, et al. Advance computational tools for multiomics data learning [J]. *Biotechnol Adv*, 2024, 77: 108447.

[收稿日期] 2024-11-27

孙郑青,元绍爽,赵桐,等. 体表慢性难愈创面动物模型制备及研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 878–892.

SUN Z Q, YUAN S S, ZHAO T, et al. Preparation and evaluation of animal models of chronic ulcers on the body surface [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 878–892.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.010

体表慢性难愈创面动物模型制备及研究进展

孙郑青¹, 元绍爽¹, 赵桐¹, 张宇¹, 张朝晖², 徐强^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250)

【摘要】 体表慢性难愈创面是一种创面不愈合状态, 建立一种与人类相似的慢性难愈创面动物模型是防治和了解人体慢性创面形成复杂性及相关病理机制的重要工具。一般来说, 创面动物模型是通过一定外界损伤干预引起机体创面形成, 诱发分子生物学异常来进行构建的, 常用的造模方法有手术切除法、加压缺血处置法、药物处置法、放射线处置法等, 通常模型建造是否成功可通过常规治疗后创面能否恢复、创面大小测量、体征观察、体质量测定、脏器指数、红外成像等方法进行评判。尽管当前存在着多种多样的慢性创面动物模型构建与评价方法, 但目前这一领域仍缺乏统一的标准。鉴于此, 研究者们需高度重视造模方法及模型评价手段的选择, 务必依据自身的实际研究需求, 精心挑选最为合适的方案。这一举措对于确保实验结果的准确性和可靠性至关重要, 是获取最佳科研成果不可或缺的一环。

【关键词】 慢性创面; 慢性溃疡; 难愈性创面; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0878-15

Preparation and evaluation of animal models of chronic ulcers on the body surface

SUN Zhengqing¹, YUAN Shaoshuang¹, ZHAO Tong¹, ZHANG Yu¹, ZHANG Zhaohui², XU Qiang^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. the Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China)

Corresponding author: XU Qiang. E-mail: qa1122334@126.com

【Abstract】 Chronic ulcers on the body surface are non-healing wounds. Establishing a suitable animal model of chronic wounds will provide an important tool for research aimed at preventing and understanding the complexity of chronic wound formation and related pathological mechanisms in the human body. Animal wound models are usually constructed by inducing molecular abnormalities via external injury interventions to induce wound formation. Common modeling method include surgical resection, pressure ischemia, drugs, and radiation treatment. The success of model construction can then be evaluated by various monitoring method, such as natural recovery of the wound without intervention, measurement of wound size observation of physical signs, measurement of body mass, organ index, and

【基金项目】 国家自然科学基金(81904211, 81573972), 天津中医药大学中医疮疡研究所建设项目(津中医科研[2022]6号), 国家重点研发计划(2019YFC1709303)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81904211, 81573972), Construction Project of the Traditional Chinese Medicine Institute of Score and Ulcer, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (Jin Chinese Medicine Research [2022] No. 6), National Key Research and Development Program of China (2019YFC1709303)。

【作者简介】 孙郑青, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 疮疡疾病。Email: 982214057@qq.com

【通信作者】 徐强, 男, 硕士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 疮疡疾病。Email: qa1122334@126.com

infrared imaging. Despite the existence of numerous modeling and evaluating method, however, there is currently a lack of unified standards for animal chronic wound models. Researchers should thus choose appropriate modeling and model-evaluation method based on their actual needs, to obtain the best experimental result.

【Keywords】 chronic wound; chronic ulcer; refractory wound; animal model

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

体表慢性难愈创面是指在机体皮肤及皮下组织因不同原因损伤形成的创面,在接受超过 1 个月的系统治疗后,仍无法正常修复达到愈合及功能完整,也无明显愈合倾向者^[1-2]。属于中医学“疮疡、顽疮”等病的范畴^[3]。目前对慢性难愈性创面时间划定尚未达成一致,多数学者认为慢性难愈创面是在治疗 1 个月以后没有愈合或缺乏愈合倾向^[4]。“难愈创面”的概念于 2006 年首次被医学界提出,指接受标准的医疗治疗措施后,无法按照预期的时间和顺序实现愈合的伤口,由于本定义较为宽泛且模糊,因此在实际使用中,它经常与“慢性创面”这一概念相互混淆或被视作同义词使用,从而有时导致理解偏差^[5-7]。目前慢性难愈性创面临床愈发常见,其发生与老年人基础疾病多、营养不良、下肢血液回流欠佳相关^[8]。慢性创面无法经过及时而有序的修复过程促使机体组织恢复其功能和形态完整性^[9-10]。发达国家慢性难愈创面患病率约占总人口的 1% ~ 2%^[11-12]。美国公众每年为创面治疗所投入的资金数额巨大,其成本范围广泛,在 281 亿 ~ 968 亿美元^[13]。在中国情况同样严峻,据统计,每年约有 1 亿人次的患者需要接受创面治疗服务,其中病情较为严重、治疗难度较大的患者占据了相当大的比例,约达 3000 万人次^[14]。这些数据不仅揭示了慢性创面治疗在目前我国医疗领域中的广泛需求,也提示需要更加重视对慢性创面相关治疗技术的进一步探索。随着老年人口比例的不断上升,慢性伤口问题正逐渐成为全球范围内日益严重的健康挑战和经济负担,据世界卫生组织调查,慢性创面已成为继癌症、心血管疾病、肥胖和糖尿病后,又一危及健康的“杀手”。与急性创面相比,慢性创面不仅具有愈合慢、治疗经济消耗大,且伴随创面长期暴露,易招惹感染、癌变危险等严重威胁民众生命安全等不良后果,故深入对体表慢性难愈创面形成机制、治疗等机理的进一步研究十分重要。

构建更贴近人体的慢性创面动物模型,有助于增进对慢性难愈创面形成机理的理解,并为改进临床诊疗手段及新药研发工作提供相关实验平台^[15-16]。建立体表慢性难愈创面动物模型,对于深入探索难愈创面的发病机制及促进创面恢复的有效机制至关重要,这不仅有助于更全面地理解难愈创面的成因,还能为减少其发病率提供科学依据,并指导临床治疗策略的制定。然而,当前医学界对于慢性创面造模的认识尚不统一,这在一定程度上限制了相关研究的进展,相关慢性创面模型干预治疗相关实验比较多,但动物造模本身的实验内容相对匮乏,原有的动物模型也是各有不一,大部分研究动物创面模型制作仍以急性创面模型为主^[17],而关于慢性难愈创面模型的评价方法也缺少统一的标准,尤其是缺乏对体表慢性难愈创面模型实施验证性治疗佐证的研究。本文综述了体表慢性难愈创面动物模型的构建方法与评价标准,通过广泛搜集并梳理相关文献,旨在为研究者提供一份详实的参考指南。本文不仅总结了多种造模方法,还深入探讨了模型评价的关键要素,从而帮助研究者根据具体研究需求,精准选择适合的造模技术和评估手段,推动相关研究的深入与发展。

1 动物模型的选择

在选择实验动物时,应严格遵循一个基本原则,所选动物应在结构、功能、代谢以及疾病特征上与人类高度相似,以确保实验结果的准确性和可靠性。创面动物模型常用的哺乳类动物有大鼠^[18-23]、小鼠^[24-26]、小型猪^[27-29]、兔^[30-31]、犬^[32]等,其选取主要以动物生理结构和功能与人的相似程度、实验目的以及实验的可操作性等为依据^[33]。大鼠和小鼠在目前创面实验中得到极为广泛的应用,因为它们具备以下显著的优点:体型小巧,便于在实验室内进行管理和操作;繁殖能力强且饲养成本相对较低,使得在造模数量上

易于满足实验需求;实验操作性强,能够很好地适应各种实验条件和操作技术;更重要的是,它们的价格相对低廉,容易通过正规渠道获得,从而降低了实验的整体成本。这些特点共同促使大鼠和小鼠成为科学研究中不可或缺的实验动物模型。其中大鼠因其对炎症反应的高度敏感性^[34],常被作为慢性创面研究的首选实验动物,我国相关研究构建溃疡创面模型时,常采用 SD 大鼠或 Wistar 大鼠^[35-36]。因雌性大鼠的生理周期特性及妊娠可能使实验受到干扰,且雌性大鼠耐受力较差易死亡^[37],通常,实验会倾向于选用雄性大鼠,或者同时选用雄性和雌性大鼠各半,保持性别比例均衡。猪的解剖和生物学特性,尤其是皮肤结构、上皮再生性和人体皮肤最为相似,且猪的生理解剖和血液生化指标与人类接近^[38],其愈合主要是通过表皮细胞的迁移完成的。但猪的购买和维护成本相对较高、体积较大,并且存在重复性低等缺点。兔性情较为温顺,对造模操作较能配合。NGUYEN 等^[39]建议,对于皮肤紧致的年轻患者群体的创面研究,可把猪作为类比研究对象;而对于皮肤薄且松弛的老年患者创面,则优先考虑使用大鼠或兔进行研究。犬类动物作为模型亦有见于报道^[40-41],但犬的性情难以操控,加之伦理问题较为复杂,目前较少运用于动物创面造模。

2 造模部位

目前动物创面造模部位多选用面积较大,且较为平坦的背部位置^[42-45],便于伤口造模处理和后续换药、切片等操作。其余动物造模部位也有耳部^[46]、后腿部^[47]、肛周部^[48-49]、尾部^[50]等。但是背部肌肉丰厚,血供丰富,通过药物及物理处置干预多会形成急性创面,在短期内迅速愈合,不能达到慢性创面的造模标准。由于临床慢性难愈性创面以下肢,尤其是胫前部位溃疡多为常见,因该部位的软组织菲薄、血运较为薄弱,导致一旦出现损伤则创面愈合缓慢^[51]。且胫前部位缺乏丰富的肌肉覆盖,软组织弹性及延展性欠佳,难以直接缝合创面。慢性难愈性创面的动物模型制备,在创面大小能满足条件的情况下,可选择动物下肢部位进行。下肢造模的不足之处包括动物下肢面积较小、因此可造模创面较小,

不易延展开,导致创面极易自行愈合等;且造模操作过暴易导致骨折。除下肢外, FALANGA 等^[52]用 SMAD3 敲除小鼠的小鼠尾巴模型进行慢性伤口研究,在尾巴上创建一个全厚度 0.3 mm × 10 mm 的切除伤口。尾巴由软骨组织和肌腱组成,收缩力最小,需要 21 ~ 24 d 才能完全闭合,与人类慢性伤口闭合时间较为类似^[53]。

3 处置方法

动物实验形成的创面,在非人为干预处理的情况下,大多数 1 个月内可自行愈合^[54],说明此类动物造模创面与人体慢性创面存在一定差异,如在不合乎规范的造模下盲目进行药物干预,其实验数据可信度可能有所偏颇。因此需要实验造模后进行一定的常规治疗干预措施进行验证,如出现长期不愈合状态,则慢性创面模型的制备相对成功,反之则存疑。因此,如何更好的造出贴合人体临床实际慢性创面的模型,需要进一步探讨研究,对于药物评价疗效大有裨益。处置方法除对造模动物进行常规固定、备皮、麻醉、消毒、手术切除,根据实验目的采取不同的方案,最大程度模拟慢性溃疡形成的内外部环境,同时加强促进慢性创面形成的人为干预,如阻止上皮爬行、异物缺血处置^[55]、压力损伤性缺血处置、感染处置、弹簧纱条制备瘘管处置、药物干预、癌性创面制备处置、放射处置等,并在模型制备完毕后加以临床治疗验证。

4 针对慢性难愈性创面主要影响因素处置法

大量的研究表明,临床上常见的有创伤性溃疡、静脉性溃疡、压力性损伤、糖尿病慢性创面等^[56]。实验室探究慢性难愈性创面的影响因素主要包括:持续性感染状态、创伤及压力因素、代谢及神经性因素、免疫抑制状态、人为因素等。本节按照慢性难愈性创面形成的主要影响因素来归纳总结目前慢性难愈性创面动物模型的造模方法与评价,以期为研究者实验提供理论支持。

4.1 持续性感染

感染性创面模型主要通过接种病原菌来模拟临床感染情况。常用的方法包括在创面表面

接种金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌等,以建立局部感染模型。临床发现生肌油膏的不合理使用而造成“恋邪”疮面,腐蚀上皮组织,形成大量粉渣样的坏死物,使得创面处于持续感染状态。同时为增强感染的持续性,也可结合植入异物法或使用抗生素耐药菌株等方法。

4.1.1 外用细菌干预

创面局部若发生感染,细菌繁殖,机体过度炎症免疫反应形成的自身损伤,削弱纤维细胞的分裂和肉芽细胞的生长,导致创面难以愈合^[57-58]。皮损法联合涂菌法造模,常用的细菌有:金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌^[59]等。目前实验普遍在大鼠背部进行模拟创面,通过手术剪制备全层皮肤缺损,滴加 25% 乙酸溶液 50 μ L,再进行涂菌操作,如联合接种粪悬液(1 mL)及大肠埃希菌悬液(0.5 mL)^[19]、健康成人的新鲜粪便制备粪便悬混液^[60]、大肠杆菌液^[61]等以模拟肛周脓肿术后创面模型。当观察到伤口出现坏死组织、脓性渗出物伴粪臭味时,即视为造模成功。此后,在每次更换敷料前,滴加粪液模拟粪便污染创面情况。造模术后 24 h 开始换药,凡士林纱条组平均 22 d 即可愈合。感染法具有可能会导致感染扩散,造模动物死亡,但仍是造成急性创面的风险。还有实验采用 3 M 膜对伤口进行封闭处理,切断了其与外界空气的接触,促进了伤口渗出液的积聚^[62],加速了腐肉的形成过程,也促进创面微生物持续滋生,破坏菌群平衡,细菌定植形成生物膜覆盖伤口。然而,该方法所创建的创面并未通过抗生素治疗来验证局部感染的效果。尽管可以说明慢性难愈合溃疡与感染有关^[63],但感染并不是导致慢性溃疡的唯一或充分条件。

4.1.2 制备瘘管难愈模型

由于窦道瘘管狭窄不易愈合、反复破溃、持续或间歇性流脓、感染难以控制的特性,所以也属于慢性创面范畴。制作窦道瘘管模型也是慢性创面造模研究之一,传统的瘘管窦道动物模型一般采用松弛挂线法^[64-66]、钢丝挂线引流、背部埋置加植致病细菌弹簧纱条^[67]、针刺造瘘法^[68]等。BUCHANAN 等^[69]利用硅胶管、聚酯编织线及尼龙线等多种材质的引流线,采用松弛挂线技术,在猪的肛周部位建立了肛瘘模型,而这种建模方

法仅适用于构建低位单纯性肛瘘的动物模型,存在一定的局限性。AIKAWA 等^[70]使用钢丝在大鼠肛周实施挂线引流,并通过损伤的方式构建大鼠肛瘘模型,该模型与临床肛瘘的形成机制不相符,且由于钢丝异物刺激性强,导致模型大鼠死亡率较高,因此钢丝挂线法进行肛瘘造模成功率较低。亦有针刺造瘘法,采用无菌别针经肛管括约肌贯穿(进针点距肛缘 1 cm),固定别针,形成虚挂引流状态,配合隔日旋转防止组织粘连,持续干预 30 d 构建慢性肛瘘。有研究探索了在大鼠颈背部埋置并植入带有致病细菌的弹簧纱条的方法,成功构建出体表瘘管的大鼠模型^[68],此法规避了肛门解剖损伤及异物反应,具有操作简便、易于重复且模型稳定性良好的优势。在造模后第 45 天,瘘管动物模型中愈合率为 56.25%。

4.1.3 外用药物干预

药物干预是目前慢性创面干预采用的较多的方法。目前常规伤口处理多用醋酸、乙酸烧灼,使创面蛋白质失活、坏死;注射 3-氨基-1,2,4-三唑抑制过氧化氢酶,形成体内高水平氧化应激状态,易致伤口不愈合;使用化疗药物等以抑制细胞增殖。此外中药外用药物干预的特殊造模方法崭露头角。中医药治疗慢性溃疡疮面,常常会选择使用油膏制剂作为外部涂抹的药物,目的是通过中药外用药物的渗透作用,促进疮面组织的生长与修复,加速皮肤的新生与愈合过程。值得注意的是,尽管这种治疗方法在许多情况下都取得了良好的疗效,但有部分患者在使用了这类具有生肌长皮功效的油膏制剂后,反而出现了严重的病情恶化的迹象。相关学者认为这一现象的发生,可能与生肌油膏的不合理使用而造成疮面“恋邪”有关^[71]。根据这样的思考结合大量临床实践观察证实,在皮肤组织结构保持完整且处于娇嫩肉芽组织新生的关键时期,采用中药象皮生肌膏外敷可促进患者伤口的生肌长皮,取效较速^[72]。但在慢性溃疡病程的初期或中期阶段,如果疮面存在脓腐物质未完全清除的情况,此时外用象皮生肌膏时,往往出现疮面逐渐增大或加深的情况^[73]。针对此现象,分析其原因可能是中药生肌类油膏这类外用药物制剂具有相当黏腻的特性,使用时能够紧密贴合疮面。然而,它们的缺点是透气性不佳,妨碍疮面内部湿浊邪气的排

出,导致伤口渗液大量积聚。渗液过多会浸渍皮肤外层,进而腐蚀上皮组织,形成粉渣样的坏死物。更严重的情况是这些坏死物还可能会向内渗透,穿透筋膜层,这种情形轻则导致疮面长期无法愈合,重则可能穿透肌肤、侵蚀骨骼,威胁患者生命。针对生肌象皮膏油蜡混合物能阻碍伤口的透气的这一特性,在创面形成初期的“恋邪”之性,可以反向利用进行慢性创面的造模。

4.2 创伤或压力因素

持续压力直接作用于皮肤及皮下组织,压迫毛细血管,导致局部血流量减少甚至中断,引发组织缺血缺氧和代谢障碍,同时压力还会导致细胞骨架变形,触发机械信号通路异常(如整合素信号),促进细胞发生凋亡。压力接触再灌注时组织发生氧化应激,即压力解除后血流恢复,但大量活性氧爆发性生成,引发脂质过氧化、DNA 损伤及蛋白质变性,会加重组织损伤。

外置机械压力缺血处置:压力性损伤是由压力或压力联合剪切力导致的皮肤和/或皮下组织的局部损伤,通常位于骨隆突处^[74-76]。由于传统的缺血损伤造模方法存在组织受损严重和死亡率高等不足,正逐渐被更为优化的缺血-再灌注循环损伤动物模型所取代^[77]。缺血再灌注损伤的原理是目前 PI 形成的公认机制^[78-79]。

目前压力性损伤常用的造模方法有:磁力压迫法^[80-81]、简易施压装置法、倒置注射器施压法等。磁力压迫法是做一深至筋膜的切口,将磁片或铁片植入皮下,待切口完全愈合后,体外采用磁铁施加压力^[82]。而这种方法存在一些问题,包括铁片植入可能引起的皮肤和皮下组织损伤、对严格无菌操作条件的要求,及麻醉操作过程可能带来的非压疮相关损伤。STADLER 等^[83]利用两个磁铁磁力夹持实验动物背部皮肤的方法,成功模拟出了对称性的压疮伤口。该方法无额外的损伤,被广泛采用如仿照 STADLER 等^[83]的造模方式,改良为提起大鼠背部皮肤,两侧对称放置强力磁铁作压迫处理。磁铁压迫与释放进行循环。此法可能会因大鼠烦躁活动,导致磁铁脱落;此外本法施力方向与临床压力性溃疡体位压力不符(轴向夹持 vs 垂直体轴施力)与慢性溃疡形成的机制存在一定出入。GUNTHER 等^[84]制作出了改良版的机械压力装置,采用计算机技术

实现对施加给皮肤压力的持续监控与调节。确保对造模动物皮肤局部施加的压力保持稳定,同时压力头配置了超声多普勒血流仪探针,能实时追踪造模部位的皮肤血流的动态变化。这种压力动物造模方法精确度高,但其操作的复杂性和高昂的设备成本限制了本法在大规模样本造模研究中的应用。有研究自行设计了一种新型机械式装置利用螺钉锥度的横截面积来确定压疮缺血-再灌注模型的面积^[85],通过螺母旋转调节托盘及钢珠的升降,钢珠的压力垂直作用于造模部位,形成缺血期与再灌注期循环进行造模,具有操作简便、无需麻醉、无需埋置铁片且灵活调整压力的优点。在压力处置创面造模过程中,注意观察创面皮肤的颜色变化、形态是否出现水肿,是否有水泡形成,以及是否有渗出物出现,并观察渗出物的性质(血性、脓性、水性等)。同时还需注意创面是否结痂,结痂的质地是软还是硬,以及结痂是位于创面的中心还是周边区域^[86]。

4.3 代谢及神经性因素

此类较为典型的是糖尿病溃疡模型以及慢性肾病模型。糖尿病模型高血糖损伤血管内皮细胞,导致微血管基底膜增厚、血流减少,局部缺氧和缺乏营养,同时糖尿病神经病变患者丧失保护性感觉,反复受伤而不自知,易导致慢性难愈性创面的形成。慢性肾病模型以代谢障碍、毒素蓄积为主要特点,影响细胞增殖和免疫功能,从而影响创面愈合进程。

研究者大多采用化学药物如链脲佐菌素诱导或者同时结合高脂饲料喂养的方法来进行糖尿病的动物建模,或直接选用研究者直接选用经基因敲除的糖尿病(db/db)小鼠。张广静等^[87]将大鼠高脂饲料喂养4周后,经腹腔注射1%链脲佐菌素(60 mg/kg),1周后经尾静脉检测血糖,当血糖 ≥ 16.7 mmol/L,表明糖尿病大鼠模型制备成功。将大鼠常规麻醉后行全层皮肤切除,深度触及筋膜层,3 d后建成糖尿病溃疡模型。结果显示模型组术后第2周愈合率为 $41.36\% \pm 6.24\%$,术后第4周愈合率为 $62.15\% \pm 5.32\%$,说明糖尿病诱导联合单纯手术切除法形成的创面,自我愈合倾向良好。

人类慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)

的造模方法包括非手术方法的药物处理,如给狗静脉注射 5 mg/kg 的硝酸铀⁵ 诱导肾功能衰竭^[88] 或对大鼠进行腹腔注射 5 mg/kg 的顺铂^[89];而手术途径诱导肾功能衰竭的方法包括损伤肾、切除肾或两种技术的结合^[90-91]。SETH 等^[91] 用 8 ~ 10 周龄雄性 C57BL/6 近交系小鼠中进行 CKD 诱导手术,创新性采用同时进行肾切除和对侧损伤,术后即刻腹腔注射 PBS(1 mL)。术后至少 6 周,小鼠在 CKD 状态下进行背部双夹板切除伤口的建立,置入 8 mm 内径硅胶夹板(6-0 尼龙线水平褥式缝合固定于创周皮肤),半封闭敷料覆盖伤口,并在手术部位周围放置一层保护性敷料,防止小鼠与半封闭敷料或硅胶环发生抓挠。于术后 0、3、7、14 d 系统性取材,进行组织学分析。SETH 等^[91] 采用对上皮间隙闭合百分比进行量化,当上皮间隙 = 0 时,伤口被认为完全再上皮化,结果显示在 CKD 伤口中,第 7 天的 CKD 小鼠的上皮间隙为 $(37.8 \pm 7.0)\%$,而正常小鼠为 $(3.1 \pm 1.9)\%$,而第 14 天,CKD 小鼠上皮间隙 $27.3\% \pm 9.2\%$,而对照组小鼠为 0%,即创面完全愈合。结果显示 CKD 确导致伤口延缓愈合,但不足之处本实验周期为 14 d,无法进一步观察 1 月后 CKD 创面能否实现完全愈合。

4.4 免疫抑制状态

免疫抑制状态导致人体出现炎症反应缺陷、细胞增殖与修复受阻等。具体表现为:中性粒细胞功能受损、补体系统抑制,导致病原体清除不足。CD4⁺ T 细胞减少导致 IL-2、IFN- γ 的分泌不足,影响成纤维细胞的活化,同时生长因子水平下降,导致新生血管生成减少以及胶原合成减少。干细胞功能被抑制,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 迁移和分化能力受损,影响上皮再生功能。同时免疫抑制状态会导致创面微生物定植增多,细菌生物膜形成,进一步影响创面愈合。

4.4.1 癌性创面制备处置

癌细胞侵入正常组织,破坏正常组织结构,形成持久的免疫炎症反应,影响正常创面愈合。相关小鼠乳腺癌模型采用 4T1 细胞株移植法建立^[92]。在对小鼠的接种部位进行消毒处理后,用注射器把 4T1 细胞悬液注入其右肩背部皮下脂肪层,接种完毕后 10 ~ 14 d,观察并等待肿瘤尺寸

增大至 1.0 cm $\times$ 1.0 cm 时,手术切除建模小鼠肿瘤组织送病理石蜡检查,病理检验诊断为乳腺癌后,标志着小鼠乳腺癌模型构建成功。进而在 BALB/c 小鼠肩背部建立乳腺癌皮肤创面模型,常规处理后,在肿瘤的中心部位人为制造缺损,切除了一个 1.0 cm $\times$ 0.5 cm 的全层皮肤区域,同时病理学检查显示,创口的边缘存在乳腺癌细胞的浸润,模拟晚期乳腺癌所导致的皮肤溃疡病理情况。接种 4T1 细胞的小鼠乳腺癌创面对照组 21 d 的愈合率约为 66%,由此可推之癌性创面基本符合慢性创面的临床情况。因此使用癌细胞建立癌性创面可作为一种思路运用于慢性难愈合溃疡模型制备中,但需要考虑癌细胞对动物机体的整体影响。

4.4.2 放射处置

放射复合伤是战时核武器爆炸、平时核事故以及临床放疗等情境中出现的较为特殊的一种损伤类型^[93-95]。其中放射损伤合并创伤称为放创复合伤,创伤愈合显著延缓是此类创伤的突出问题^[96-97]。研究显示,辐射(包括全身辐射与局部辐射)可能延迟皮肤伤口的愈合过程,且这种影响与辐射的剂量和暴露时间存在一定的关联。放创复合伤创面炎症反应削弱被认为是修复启动延迟的重要原因。在放创复合伤的研究中,局部和全身照射大鼠模型被广泛采用。近期,有研究采用了更为精细的照射方法,即使用 X-射线对 MRL/MpJ 和 C57BL/6 两种小鼠进行局部照射(剂量为 10 Gy),以及结合局部照射(3 Gy)与全身照射(7 Gy)的复合照射方式,来构建鼠耳创伤模型。这一新方法为放创复合伤的研究提供了新的视角和深入探索的可能。

FORCHERON 等^[98] 采用 Gottingen 猪建立了皮下放射综合征的伤口模型,此模型用于探究极高剂量辐射对局部皮肤软组织产生的影响。HADAD 等^[99] 在 Yorkshire 猪模型上通过辐射手段成功创立慢性伤口模型。有研究者将钴-60 γ (60 Co γ) 射线进行全身 6 Gy 均匀照射小鼠,制备全身辐射损伤后,联合局部皮肤全层切除的方法制备皮肤创伤^[24]。结果显示单纯创伤组在伤后第 10 天已经完全愈合,而辐射损伤组伤后第 10 天仍然未愈合。在显微镜下观察,辐射处理组的创面肉芽组织生长情况不佳,具体表现为细胞构

成显著减少,且再上皮化过程未完成。放射后创面虽未完全愈合,若拉长实验周期,能进一步观察放射后创面的愈合率,更好地判断造模是否更贴近临床慢性创面的情况。也有实验采用 60 Co γ 射线对大鼠进行一次性 6 Gy 全身照射^[100]。照射后 1 h 内致创伤,在背部肩胛稍靠后脊柱两侧 1.5 cm 处切除深度及全层皮肤,未伤及皮下筋膜层。对照组模型在造模后 23 d 伤口完全愈合,即大鼠对照组放射伤口未经处理 23 d 后也实现了愈合。除鼠放射模型外,有研究选用健康日本大耳白兔用 60 Co γ 射线进行一次性全身照射^[101],照射后 1 h 内备皮、局麻,在背部脊柱两侧肩胛稍后部位切出圆型创面,切口深达皮下全层。对照组模型在伤后 21 d 创面愈合率为 100%,即日本大耳白兔对照组放射伤口未经处理 21 d 后实现自行愈合。这些结果表明射线照射能够延缓皮肤创面的愈合,但放射复合伤作为慢性创面模型建立不完全符合临床慢性创面要求,分析其原因可能与放射量大小、切除创面深度未达筋膜层有关。在动物实验造模中,可辅助结合使用放射线干预,以延缓伤口愈合时间。通过单一放射线 + 手术切除术干预进行慢性创面造模仍需进一步探究完善。

4.5 人为机械因素

人为干预采用机械措施如缝合固定、异物置入等方法来阻碍愈合,施加张力或者限制血液供应,使伤口保持开放状态。当血液循环障碍发生,致使局部缺血缺氧 ATP 生成减少、回流受阻、代谢废物堆积、中性粒细胞黏附血管内皮,破坏细胞外基质, M1 巨噬细胞占据主导炎症持续存在、修复细胞功能抑制,破坏了正常创面愈合的“炎症-增殖-重塑”进程,导致创面停滞于炎症期。但单纯的机械阻碍,难以模拟慢性难愈性创面复杂的病理过程。可结合以上其他方法或使用遗传模型动物(如 db/db 小鼠)以增强病理真实性。同时动物模型的伤口愈合能力比人类强,所以即使缝合固定,可能愈合仍然较快,需要评估单一机械因素造模的模型有效性。

4.5.1 阻止上皮爬行处置

GALIANO 等^[102]首次报道了使用夹板缝合伤口的小鼠模型,以外夹板的干预,来延长创面愈合时间塑造慢性创面模型。在小鼠背部中

线处形成全层切除皮肤创面(模拟完整皮肤结构)^[103]。同时用缝线缝合环形硅胶夹板固定在创面周围,造模后拍照记录面积,测量创口闭合程度^[104]。此方法用硅胶板干预阻止上皮爬行,能够达到创面不愈合的效果,但是自然慢性创面愈合中一般无阻碍上皮爬行的因素,若解除硅胶板固定,此创面仍有正常生长的可能性,故与临床慢性创面的模拟有一定出入。

4.5.2 异物缺血处置

缺血导致血红蛋白含量降低,影响伤口周围细胞的代谢和修复过程,同时缺血导致伤口组织获取营养不足进一步影响愈合。皮下硅胶片防止了下层组织的再黏附和再灌注,此法多用于猪模型的制作。ROY 等^[105]创新性构建了首个标准化猪缺血性慢性伤口模型,,其通过皮下加垫隔绝血供阻断技术模拟临床缺氧微环境,实验使用家白猪诱导多个双蒂皮瓣,切口采用电灼术,将真皮皮瓣从皮下组织中抬起,并将经皮瓣下植入 0.254 mm Sil-Tec 医用级薄膜, 3-O Ethilon 连续缝线固定后,在每个皮瓣的中心处创建 8 mm 全层缺损。未治疗的缺血性伤口术后 30 d 未能愈合^[106]。JUNG 等^[107]构建了基于异物反应相关的延迟伤口愈合和血运重建失败的一种猪的慢性创面模型。母猪 Yorkshire pigs 具有 10 个 4 cm $\times$ 4 cm 的全层皮肤缺损。创面经背部棘旁手术刀切除,创面间间隔 50 mm,将矩形双法兰硅胶块应用于一半的伤口,并用尼龙缝线固定,以创建缺血感染的伤口环境并激活异物反应,即引起局部伤口感染,诱发异物反应并抑制上皮化。实验中,术后第 1、2 和 3 周的平均伤口大小分别为 (25.71 $\pm$ 2.06) mm、(21.70 $\pm$ 2.31) mm 和 (30.72 $\pm$ 3.36) mm。3 周时,平均伤口大小增加,在 4 周硅胶块移除后迅速减小到 (10.20 $\pm$ 1.9) mm。但术后 4 周仍未完全愈合,提示该模型成功复现异物介导的延迟愈合特征。

5 造模评价

5.1 实验动物选择的评价维度

在构建慢性创面动物模型时,常用的实验动物包括大鼠、小鼠、小型猪、兔等,其选取主要基于它们与人类在生理结构和功能上的相似性、实验的具体目标以及实验操作的可行性(详见表 1)。

在国内,SD 大鼠或 Wistar 大鼠常被用来制作溃疡创面模型。大鼠和小鼠因体积小、繁殖与饲养便捷、操作性强且成本相对较低,而被广泛应用。大鼠因其对炎症反应的敏感性而成为目前慢性创面研究的首选实验动物。相较于其他模型,大鼠全层皮肤创伤模型的构建过程相对简单、实验周期短且成模率高,因此成为研究皮肤创面愈合相关机制时最常用的创伤模型。裸鼠作为其中较为特殊的存在,具有明显的免疫功能缺陷特点且无毛发覆盖,表现出严重的创面炎症反应,造模成功率较高且能够动态的可视化伤口愈合情况^[108]。猪模型的购买和维护成本相对较高、体积较大、可重复性低等缺点,所以难以普及,且由于肠出血性综合征、肠扭曲等无法治疗的疾病,模型猪可能面临猝死的风险,大型动物的突然死亡会对研究结果产生重大影响。

5.2 伤口愈合特性评价指标

主要以各造模动物的愈合机制特异性、愈合时间动力学参数为角度进行比较。猪类模型皮肤分层结构与人类高度相似,其全层创面愈合过程(炎症期→增殖期→再上皮化→重塑期)与人类较为相似。而鼠类作为实验动物,啮齿类动物与人类的皮肤生理结构存在明显不同,啮齿类动物的皮肤和肌肉之间仅有一层膜样的疏松结构,而人类的皮肤下方是大量的脂肪、血管、淋巴管、神经细胞等复杂的组织结构,紧密地与深层肌肉相连。啮齿动物的伤口收缩和愈合的速度是人类皮肤无法比拟的^[109]。这种结构上的差异,导致了两者在创面愈合过程中表现出明显的不同。

啮齿动物因其皮肤与肌肉间的疏松连接,使得创面愈合过程中的组织修复和再生更为迅速;而人类皮肤下方复杂的组织结构,使得创面愈合过程更为复杂,涉及更多生理机能的协同作用。

因此,在研究创面愈合机制时,需充分考虑啮齿动物与人类皮肤生理结构的这些差异。这些小型哺乳动物主要通过收缩而不是人类的再上皮化来关闭伤口。因此,这类小型哺乳动物研究的结果显示,与人类研究的一致性仅为 53%,相比之下,对猪的伤口愈合研究显示,其与人类研究的一致性达到了 78%^[110]。猪的解剖和生物学特性,尤其是皮肤结构、上皮再生性和人体皮肤最为相似,猪的生理解剖和血液生化指标与人类接近,猪的皮肤在愈合进程中呈现出与人类皮肤高度相近的特性,尤其是在皮下血液供应和创面修复机制方面。猪的皮肤创面愈合过程同样包含炎症、收缩、增殖、再上皮化及重塑等核心阶段,这一相似性确立了猪在整形外科与创面愈合动物实验模型造模研究中的重要地位。猪的皮肤愈合过程在很大程度上依赖于表皮细胞的迁移和增殖,这一机制与人类皮肤的愈合机制存在着高度的相似性和可比性,换言之,猪的皮肤在受损后的修复方式,与人类的皮肤在受到伤害后的自我恢复过程有着诸多共通之处。但 Yorkshire pig 和 Yucatan minipig 这类猪作为实验对象时,存在生长速度过快的限制因素,不同年龄段猪的全厚创面愈合速度以及细胞因子水平有所不同^[111],可能会对实验治疗因素的研究结果产生干扰。

表 1 实验常见造模动物优劣势比较

Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of common modeling animals in experiments

常见模型动物 Common model animals	优势 Advantages	劣势 Disadvantages
小鼠 Murine	价格较低廉,易获得,体型大小易于饲养、操作处理,有丰富的先前研究 Price is relatively low and it is easy to obtain, size of the body is easy to raise and handle, abundant previous studies	伤口愈合方式不同:伤口收缩,可造模部位有限,不利于造成部分厚度的伤口 Ways of wound healing are different: the wound contracts, parts available for mold making are limited, not conducive to causing wounds of partial thickness
大鼠 Rat	价格较低廉,易获得,体型大小易于饲养、操作处理,有丰富的先前研究,可有多层造模点,适宜全层造模 Price is relatively low and it is easy to obtain, size of the body is easy to raise and handle, abundant previous studies, there can be multiple molding points, suitable for full-layer molding	伤口愈合方式不同:伤口收缩,可造模部位有限,不利于造成部分厚度的伤口 Ways of wound healing are different: the wound contracts, parts available for mold making are limited, not conducive to causing wounds of partial thickness

续表 1

常见模型动物 Common model animals	优势 Advantages	劣势 Disadvantages
兔 Lapine	可造全层、部分深度的创面,伤口愈合肉芽化、上皮化,可有多个造模点 Full-layer and partial depth wounds can be created, wound heals with granulation and epithelialization, there can be multiple molding points	易出现严重的胃肠道和行为并发症,愈合方式伴有伤口收缩,价格高,手术方式较复杂 Serious gastrointestinal and behavioral complications are prone to occur, healing mode is accompanied by wound contraction, not cost effective, surgical method is rather complicated
猪 Porcine	与人体皮肤最为相似,愈合机制类似人体,可有多个造模点,增生性瘢痕模型 It is most similar to human skin, mechanism of wound healing is similar to that of the human body, there can be multiple molding points, hypertrophic scar model	价格高,体型较大,饲养难度较高,手术方式较复杂,不利于后期大样本实验 Price is high, it is relatively large in size and difficult to raise, surgical method is rather complicated, it is not conducive to large-scale experiments in the later stage

6 结语

综上所述,动物创面模型是开展创面动物实验的基础,并进一步探究创面的愈合机制,从而为创面的临床诊疗提供更多参考依据。慢性难愈创面相关机制以及面向老年群体的研究,可首选大鼠或小鼠模型,尤其是 SD 大鼠或 Wistar 大鼠,成本低、操作简便、成模率高。猪模型适用于需要高度模拟人类皮肤愈合以及面向中青年群体的相关研究,尤其是 Yorkshire pig 或 Yucatan Minipig,其皮肤结构和愈合机制与人类高度相似。需要长期进行慢性创面研究可考虑用犬模型,但需权衡成本和伦理问题。重点针对免疫功能缺陷、炎症反应等对慢性难愈性创面影响的研究首选裸鼠模型,同时进一步拓展寻找新的动物造模种类。建议对传统的造模部位进行改良,可优先选择尾部和下肢等血供较少的部位。造模方法可根据所需模拟的创面条件进行单一选择或者联合选用,如皮损涂菌法与生肌象皮油膏敷贴联合造模。除生肌象皮膏之外,其他的中药外用用药的不当使用,是否能促进慢性难愈创面的形成,亟待研究者们进一步发现探究。然而,用于伤口愈合研究的合适模型的总体缺乏仍然是一个重大限制,模型开发主要采用切除或切口伤口创建。这些模型对功能失调的慢性伤口环境提供了有限的代表。此外,目前还没有动物模型能够完全再现与人体解剖学相关的压力性损伤^[112]。当前,针对慢性创面的动物造模研究尚显不足,多数研究是在急性创面造模方法的基础上进行改良,通过降低应激源的刺激强度和缩短

刺激时间,来尝试构建慢性创面动物模型。然而,这一过程中,关于慢性创面造模所需的确切应激源刺激量、刺激时长或诱导药物剂量等关键参数,目前仍缺乏统一且精确的认识。同时,对于模型的评价方法也尚未形成广泛共识,导致现有的造模方法存在诸多争议。且临床上患者经常出现多种慢性病及创面并存的情况,如何能够造出更加贴近临床患者情况的创面模型,也是一个亟待深入探讨的重要课题。因此,为了获得最优的实验成果,研究者应当依据具体的研究需求,精心选择恰当的造模手段与模型评估方式。

参 考 文 献 (References)

[1] LIU J, SHEN H. Clinical efficacy of chitosan-based hydrocolloid dressing in the treatment of chronic refractory wounds [J]. Int Wound J, 2022, 19(8): 2012–2018.

[2] 莫生福, 黄大波, 韦仁杰, 等. 抗生素骨水泥覆盖治疗慢性难愈性创面 30 例 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32(6): 85–89.

MO S F, HUANG D B, WEI R J, et al. Report of 30 cases of antibiotic-loaded bone cement coverage for the treatment of chronic refractory wounds [J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop, 2024, 32(6): 85–89.

[3] 尹少平, 徐泽宇, 闵文, 等. 中药外用制剂在慢性创面治疗中的应用与思考 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 690–695.

YIN S P, XU Z Y, MIN W, et al. Research progress on external preparations of traditional Chinese medicine for chronic wound treatment [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(5): 690–695.

[4] CLINTON A, CARTER T. Chronic wound biofilms: pathogenesis and potential therapies [J]. Lab Med, 2015, 46(4): 277–284.

[5] TROXLER M, VOWDEN K, VOWDEN P. Integrating

- adjunctive therapy into practice; the importance of recognising 'hard-to-heal' wounds [J]. *World Wide Wounds*, 2006, 32(1): 99-105.
- [6] WHITE R. Hard-to-heal wounds; results of an international survey [J]. *Wounds UK*, 2011, 7(4): 22-31.
- [7] 韩春茂, 乔亮, 王新刚, 等. 伤口卫生系列国际专家共识的解读 [J]. *浙江医学*, 2023, 45(4): 337-341.
HAN C M, QIAO L, WANG X G, et al. Interpretation of the consensus of international experts on wound hygiene series [J]. *Zhejiang Med J*, 2023, 45(4): 337-341.
- [8] MARCK R E, GARDIEN K L M, STEKELENBURG C M, et al. The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns; a randomized, double-blind, intra-patient controlled study [J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(4): 712-720.
- [9] 黄欣, 尹星, 狄钾骐, 等. MEBT/MEBO 联合壮医解毒祛邪法促进慢性难愈创面修复机制研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(10): 3786-3796.
HUANG X, YIN X, DI J Q, et al. Study on mechanism of promoting chronic refractory wound healing by MEBT/MEBO combined with Zhuang medicine detoxification [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2022, 24(10): 3786-3796.
- [10] 杨建平. 比较研究人酸性成纤维细胞生长因子与人碱性成纤维细胞生长因子联合封闭式负压吸引对慢性难愈性创面的影响 [D]. 南充: 川北医学院; 2021.
YANG J P. To compare the effects of closed negative pressure suction combined with human acidic fibroblast growth factor and human basic fibroblast growth factor on chronic refractory wounds [D]. Nanchong: North Sichuan Medical College; 2021.
- [11] HEYER K, HERBERGER K, PROTZ K, et al. Epidemiology of chronic wounds in Germany; analysis of statutory health insurance data [J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(2): 434-442.
- [12] GUEST J F, AYOUB N, MCILWRAITH T, et al. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK [J]. *BMJ Open*, 2015, 5(12): e009283.
- [13] NUSSBAUM S R, CARTER M J, FIFE C E, et al. An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds [J]. *Value Health*, 2018, 21(1): 27-32.
- [14] 付小兵. 战时治烧伤, 平时治创面: 有关烧伤学科发展的一点思考 [J]. *中华烧伤杂志*, 2018, 34(7): 434-436.
FU X B. Treatment of burns in wartime and cutaneous wounds in peacetime; some consideration on the development of burn discipline [J]. *Chin J Burns*, 2018, 34(7): 434-436.
- [15] 苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药动物模型研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 141-146.
MIAO M S, MA L N, PENG M F, et al. Animal model research and applications in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(1): 141-146.
- [16] 董雨蓉, 解存, 刘畅, 等. 基于病证结合的冠心病动物模型制备研究进展与思考 [J]. *天津中医药*, 2024, 41(2): 264-272.
DONG Y R, XIE C, LIU C, et al. Research progress and thinking of coronary heart disease animal model based on the combination of traditional Chinese medicine disease and syndrome [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2024, 41(2): 264-272.
- [17] 欧雪, 余志杰, 何瑶, 等. 基于物理方法的皮肤创伤动物模型构建及评价指标研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(1): 128-138.
OU X, YU Z J, HE Y, et al. Research progress on the construction and evaluation indicators of skin-wound animal models based on physical methods [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(1): 128-138.
- [18] 马红娥, 胡睿, 王新甫, 等. 冰清膏调控 p38 MAPK/ATF2 信号通路促进深 II 度烫伤创面愈合 [J/OL]. [2024-09-03]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=HNZK2024083100F&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
MA H E, HU R, WANG X F, et al. Bingqing ointment regulates p38 MAPK/ATF2 signal pathway to promote wound healing of deep second degree scald [J/OL]. [2024-09-03]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=HNZK2024083100F&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [19] 杨会举, 刘佃温, 崔世超, 等. 基于 LuxS/AI-2 群体感应系统研究疮愈膏促进肛周慢性创面愈合的作用机制 [J]. *中医药临床杂志*, 2024, 36(4): 715-719.
YANG H J, LIU D W, CUI S C, et al. Study on the mechanism of Chuangyu ointment in promoting perianal chronic wound healing based on LuxS/AI-2 quorum sensing system [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2024, 36(4): 715-719.
- [20] 宋开超. 基于纳米载药的经皮给药创新制剂的关键技术研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2023.
SONG K C. Research on key technologies for innovative transdermal drug delivery preparations based on nano-drug loading [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2023.
- [21] 张笑天. 三妙散促进下肢慢性溃疡愈合的初步探索性实验研究 [D]. 上海: 上海中医药大学; 2020.
ZHANG X T. Preliminary exploratory experimental study on the promotion of healing of chronic ulcers in the lower limbs by Sanmiao San [D]. Shanghai: Shanghai University of

- Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [22] 牟丹丹, 顾云慧, 李晨, 等. 生肌玉红胶原抑菌与调节创面金属蛋白酶的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(11): 2407-2410.
- MOU D D, GU Y H, LI C, et al. Anti-bacteria effects and controlling contents of metalloproteinases improves chronic wound healing with shenji Yuhong collagen [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43(11): 2407-2410.
- [23] 李惠雯, 严建, 宾东华, 等. 参榆洗液改善痔术后大鼠痛觉敏化及对 cAMP/PKA 信号通路的影响 [J]. 中医药导报, 2024, 30(10): 41-47.
- LI H W, YAN J, BIN D H, et al. Effect of Shenju Lotion on pain sensitization and cAMP/PKA signaling pathway in rats after hemorrhoid surgery [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 30(10): 41-47.
- [24] 吕晓凡, 汪国建, 赵娜, 等. 创面 siRNA 敲降 HO-1 改善小鼠放射复合伤创面愈合的实验研究 [J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(11): 1194-1205.
- LYU X F, WANG G J, ZHAO N, et al. Topical knockdown of HO-1 through siRNA improves skin wound healing in mice with radiation-wound combined injury [J]. J Army Med Univ, 2024, 46(11): 1194-1205.
- [25] 胡清越, 王震宇, 熊力辉, 等. 分心木水提物可溶性微针的制备及其对小鼠皮肤溃疡的治疗效果研究 [J]. 四川农业大学学报, 2024, 42(3): 681-688.
- HU Q Y, WANG Z Y, XIONG L H, et al. Study on the preparation of dissolving microneedles loaded with the water extract of Diaphragma juglandis fructus and its therapeutic effect on skin ulcer in mice [J]. J Sichuan Agric Univ, 2024, 42(3): 681-688.
- [26] 张锐, 房志锐, 任秀云, 等. 肉桂酸促进糖尿病小鼠创面愈合及创口修复细胞迁移作用研究 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3388-3398.
- ZHANG R, FANG Z R, REN X Y, et al. Effect of cinnamic acid on wound healing and wound repair cell migration in diabetic mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(10): 3388-3398.
- [27] 郭晶, 孙巍巍, 王一鸣, 等. 橡皮生肌膏对实验猪创面模型愈合的影响及创面模型制备动物品种选择 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(18): 1899-1904.
- GUO J, SUN W W, WANG Y M, et al. Effect of Xiangpishengji Ointment on wound healing of experimental pig and consideration on animal breed selection for wound model development [J]. Chin J New Drugs, 2023, 32(18): 1899-1904.
- [28] 高兵, 韩志芬, 曲滨, 等. 猪烧伤创面渗出液蛋白质组学及创面修复过程中蛋白水解动态变化研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(9): 1406-1411.
- GAO B, HAN Z F, QU B, et al. Study on the proteomics of exudate from burn wounds of porcine and protease dynamics in cutaneous wound healing [J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(9): 1406-1411.
- [29] 陈斯文, 李思放, 陈雅南, 等. 小型猪创面修复模型在组织工程真皮体内验证中的应用 [J]. 江西化工, 2020, 36(2): 49-53.
- CHEN S W, LI S F, CHEN Y N, et al. Application of mini-pigs wound-repairing model in the validation of tissue-engineered dermis *in vivo* [J]. Jiangxi Chem Ind, 2020, 36(2): 49-53.
- [30] 赵京玉. 含透明质酸 PADM 与自体断层皮复合移植对兔创面愈合质量的影响及其机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院; 2011.
- ZHAO J Y. Effects of transplantation of PADM containing hyaluronic acid with autologous split-thickness skin on wound healing and its mechanisms in rabbit [D]. Beijing: Chinese PLA Medical School; 2011.
- [31] 张同威. 新西兰兔结核性创面模型的构建及不同药物对创面愈合的影响 [D]. 张家口: 河北北方学院; 2018.
- ZHANG T W. The construction of the model of tuberculosis wound in New Zealand rabbit and the effects of different drugs on wound healing [D]. Zhangjiakou: Hebei North University; 2018.
- [32] 王铭伟. 新型肠管暂时性寄存装置在单纯小肠枪弹伤犬模型中的应用 [D]. 福州: 福建医科大学; 2020.
- WANG M W. The application of temporary intestinal deposit device in the model of small intestine bullet injury in dogs [D]. Fuzhou: Fujian Medical University; 2020.
- [33] SOROP O, VAN DE WOUW J, CHANDLER S, et al. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(4): 756-770.
- [34] VASILENKO T, KOVÁČ I, SLEZÁK M, et al. Agrimonia eupatoria L. aqueous extract improves skin wound healing: an in vitro study in fibroblasts and keratinocytes and in vivo study in rats [J]. In Vivo, 2022, 36(3): 1236-1244.
- [35] 黄文华, 马居里, 韩曼. 中医药实验研究中实验动物的选择与动物模型的应用 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(8): 1459-1460.
- HUANG W H, MA J L, HAN M. Selections of laboratory animals and applications of animal models in empirical study of traditional Chinese medicine [J]. Study J Tradit Chin Med, 2004, 22(8): 1459-1460.
- [36] 李文华, 刘筱, 周雯婷, 等. 慢性难愈合创面动物模型的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(8): 246-248.
- LI W H, LIU X, ZHOU W T, et al. Research progress on animal models of chronic difficult to heal wounds [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2018, 34(8): 246-248.
- [37] 陈银燕, 张敏, 王雪儿, 等. 一种皮肤感染性慢性溃疡动物模型的构建方法 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2023, 41(5): 565-571, 577.

- CHEN Y Y, ZHANG M, WANG X E, et al. A method of constructing an animal model of cutaneous infectious chronic ulcer [J]. *Chin J Clin Anat*, 2023, 41 (5): 565–571, 577.
- [38] QIAO G L, BROOKS J D, BAYNES R E, et al. The use of mechanistically defined chemical mixtures (MDCM) to assess component effects on the percutaneous absorption and cutaneous disposition of topically exposed chemicals. I. studies with parathion mixtures in isolated perfused porcine skin [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 141 (2): 473–486.
- [39] NGUYEN P T, SMITH A L, REYNOLDS K J. A literature review of different pressure ulcer models from 1942–2005 and the development of an ideal animal model [J]. *Australas Phys Eng Sci Med*, 2008, 31 (3): 223–225.
- [40] 王海洋, 林焱斌, 余光书. 生物力学因素诱导股骨颈骨折后股骨头坏死: 单侧股骨颈骨折内固定犬模型验证 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22 (27): 4364–4368.
- WANG H Y, LIN Y B, YU G S. Osteonecrosis of the femoral head after femoral neck fractures induced by biomechanical factors: testified by dog models of internal fixation for unilateral femoral neck fracture [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22 (27): 4364–4368.
- [41] 蔡志聪. 肠管暂时性寄存装置在多处非连续性肠损伤伴失血性休克犬模型中的应用 [D]. 福州: 福建医科大学; 2018.
- CAI Z C. Application of intestinal temporary storage device in canine model of multiple discontinuous intestinal injury with hemorrhagic shock [D]. Fuzhou: Fujian Medical University; 2018.
- [42] 王霞, 刘志青, 秦志娟, 等. 紫榆膏对创面愈合大鼠肉芽组织 TGF- β /Smad 信号通路的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2025, 41 (2): 387–392.
- WANG X, LIU Z Q, QIN Z J, et al. Effect of Ziyu Ointment on TGF- β /Smad signal pathway in granulation tissue of wound healing rats [J]. *Chin J Immunol*, 2025, 41 (2): 387–392.
- [43] 丁友军. 白藜芦醇对糖尿病小鼠皮肤创面愈合的影响及机制研究 [D]. 镇江: 江苏大学; 2023.
- DING Y J. Effect and mechanism of resveratrol on skin wound healing in diabetic mice [D]. Zhenjiang: Jiangsu University; 2023.
- [44] 谭梅鑫. 托里消毒散调控创面炎症反应对糖尿病皮肤溃疡愈合的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学; 2023.
- TAN M X. Effect of toli Xiaodu Powder on the healing of diabetes skin ulcer by regulating wound inflammation [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine; 2023.
- [45] 陈继源, 杨盟, 王蓉, 等. 冰石长皮软膏修复大鼠创面的药效学研究 [J]. *西部中医药*, 2024, 37 (9): 12–16.
- CHEN J Y, YANG M, WANG R, et al. Pharmacodynamic study of bingshi zhangpi ointment on wound healing in rats [J]. *West J Tradit Chin Med*, 2024, 37 (9): 12–16.
- [46] 李玲. 皮肤创面诱导凝胶对兔子创面愈合影响的研究 [D]. 太原: 山西医科大学; 2012.
- LI L. The study of skin wound induced gel on the wound healing of rabbit [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University; 2012.
- [47] GUO L, GUAN N, MIAO W, et al. An electrospun scaffold loaded with an Enteromorpha polysaccharide for accelerated wound healing in diabetic mice [J]. *Mar Drugs*, 2022, 20 (2): 95.
- [48] 谢璐, 张莉莉, 李玲, 等. 不同动物大肠癌造模方法的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (17): 227–234.
- XIE L, ZHANG L L, LI L, et al. Research progress on different animal models for colorectal carcinoma [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2018, 24 (17): 227–234.
- [49] ZHAO M, WANG A, ZHANG L, et al. Establishment of a novel experimental model of infected anal fistula in rat [J]. *Lab Anim Res*, 2022, 38 (1): 15.
- [50] HASSANEIN A H, SINHA M, NEUMANN C R, et al. A murine tail lymphedema model [J]. *J Vis Exp*, 2021 (168): 61848.
- [51] 王丹. 下肢慢性创面病人的生活质量、社会支持及其相关性研究 [J]. *全科护理*, 2019, 17 (4): 389–391.
- WANG D. The status and the correlation of quality of life and social support in patients with lower extremity chronic wounds [J]. *Chin Gen Pract Nurs*, 2019, 17 (4): 389–391.
- [52] FALANGA V, SCHRAYER D, CHA J, et al. Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice [J]. *Wound Repair Regen*, 2004, 12 (3): 320–326.
- [53] WEARING H J, SHERRATT J A. Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing [J]. *Math Biosci*, 2000, 165 (1): 41–62.
- [54] 蒯权. SVF-gel 促进糖尿病鼠慢性创面愈合的实验研究 [D]. 南昌: 南昌大学; 2019.
- KUAI Q. Study of SVF-gel promoting wound healing in diabetic mice [D]. Nanchang: Nanchang University; 2019.
- [55] 张百荣, 李梦秋, 范华娜, 等. 慢性皮肤溃疡大鼠模型的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30 (3): 392–399.
- ZHANG B R, LI M Q, FAN H N, et al. Rat models of chronic skin ulcers: a comparative study [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30 (3): 392–399.
- [56] MUSTOE T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy [J]. *Am J Surg*, 2004, 187 (5): S65–S70.

- [57] CONNERY S A, YANKOWITZ J, ODIBO L, et al. Effect of using silver nylon dressings to prevent superficial surgical site infection after cesarean delivery: a randomized clinical trial [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 221(1): 57.
- [58] DAVIS S C, LI J, GIL J, et al. Preclinical evaluation of a novel silver gelling fiber dressing on pseudomonas aeruginosa in a porcine wound infection model [J]. *Wound Repair Regen*, 2019, 27(4): 360–365.
- [59] 肖洒, 孙军, 彭冬冬, 等. 不同造模方法对皮肤损伤及愈合情况的病理学评价 [J]. *实验动物科学*, 2024, 41(3): 18–25.
- XIAO S, SUN J, PENG D D, et al. Pathological evaluation of skin injury and healing by different modeling methods [J]. *Lab Anim Sci*, 2024, 41(3): 18–25.
- [60] 徐志强. 基于“煨脓长肉法”探究血香散促进肛周脓肿术后创面愈合的动物实验研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学; 2023.
- XU Z Q. Animal experimental study on xuexiang powder promoting wound healing of perianal abscess surgery based on the “therapy of roasting pus to promote regeneration” [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [61] 钟艺莲. 使用消毒灵注射液构建体表瘘管大鼠模型的实验性研究 [D]. 泸州: 西南医科大学; 2023.
- ZHONG Y L. Experimental study of Xiaozhiling on the establishment of surface fistula in rats [D]. Luzhou: Southwest Medical University; 2023.
- [62] KUO T Y, HUANG C C, SHIEH S J, et al. Skin wound healing assessment via an optimized wound array model in miniature pigs [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 445.
- [63] SCHILRREFF P, ALEXIEV U. Chronic inflammation in non-healing skin wounds and promising natural bioactive compounds treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4928.
- [64] HAN J G, XU H M, SONG W L, et al. Histologic analysis of acellular dermal matrix in the treatment of anal fistula in an animal model [J]. *J Am Coll Surg*, 2009, 208(6): 1099–1106.
- [65] BA-BAI-KE-RE M A, CHEN H, LIU X, et al. Experimental porcine model of complex fistula-in-ano [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(10): 1828–1835.
- [66] 马木提江·阿巴拜克热, 陈慧, 刘学. 橡皮筋挂线手术方法制备复杂性肛瘘大动物模型与评估 [J]. *安徽医药*, 2017, 21(3): 458–461.
- MAMUTJIANG A B B K R, CHEN H, LIU X. Establishment and evaluation of large animal model of complex anal fistula using rubber ligation surgery [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2017, 21(3): 458–461.
- [67] 王琛, 曹永清, 郭修田, 等. 体表瘘管大鼠模型的建立 [J]. *上海中医药大学学报*, 2007, 21(6): 62–65.
- WANG C, CAO Y Q, GUO X T, et al. A rat model of fistula induced by infection [J]. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai*, 2007, 21(6): 62–65.
- [68] 叶倩倩, 陈静静, 柳奕诚, 等. 湿热下注证大鼠肛瘘模型的建立与评价 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2025, 31(2): 266–271.
- YE Q Q, CHEN J J, LIU Y C, et al. Establishment and evaluation of a rat model of anal fistula with damp-heat descending syndrome [J]. *J Basic Chin Med*, 2025, 31(2): 266–271.
- [69] BUCHANAN G N, SIBBONS P, OSBORN M, et al. Experimental model of fistula-in-ano [J]. *Dis Colon Rectum*, 2005, 48(2): 353–358.
- [70] AIKAWA M, MIYAZAWA M, OKADA K, et al. A newly designed anal fistula plug: clinicopathological study in an experimental iatrogenic fistula model [J]. *Int Surg*, 2013, 98(2): 122–128.
- [71] 徐强, 卢旭亚, 冀晓娜, 等. 基于疮面“恋邪”现象探析生肌油膏的合理应用 [J]. *中医杂志*, 2020, 61(4): 307–310.
- XU Q, LU X Y, JI X N, et al. Rational application of Shengji ointment based on the phenomenon of “Lianxie” in the sore [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 61(4): 307–310.
- [72] 朱朝军, 徐强, 张朝晖, 等. 辨证施药外治法在糖尿病足坏疽治疗中的应用 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2): 494–496.
- ZHU C J, XU Q, ZHANG Z H, et al. Application of external therapy with differentiation spraying in treatment of diabetic gangrene [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2014, 29(2): 494–496.
- [73] 卢旭亚, 胡建功, 李品川, 等. 止痛生肌散联合生肌象皮膏治疗慢性小腿疼痛性皮肤溃疡疗效观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 4174–4176.
- LU X Y, HU J G, LI P C, et al. Observation on the effects of Zhitong Shengji powder combined with Shengji Xiangpi paste on treating chronic painful cutaneous ulcer in leg [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(11): 4174–4176.
- [74] ALSHAHRANI B, SIM J, MIDDLETON R. Nursing interventions for pressure injury prevention among critically ill patients: a systematic review [J]. *J Clin Nurs*, 2021, 30(15/16): 2151–2168.
- [75] EDSBERG L E, BLACK J M, GOLDBERG M, et al. Revised national pressure ulcer advisory panel pressure injury staging system: revised pressure injury staging system [J]. *J Wound Ostomy Continence Nurs*, 2016, 43(6): 585–597.
- [76] 唐萌, 沈薇, 高翔, 等. 负压引流联合皮瓣移植治疗深度压力性损伤的系统评价 [J]. *护理实践与研究*, 2023, 20(12): 1852–1859.

- TANG M, SHEN W, GAO X, et al. A systematic evaluation of negative pressure drainage combined with skin flap transplantation for the treatment of deep pressure injury [J]. *Nurs Pract Res*, 2023, 20(12): 1852–1859.
- [77] 王雪玲. 动物压疮模型及压疮形成的分子机制研究进展 [J]. *护理学杂志*, 2011, 26(7): 90–92.
- WANG X L. Research progress in animal models and molecular mechanism of pressure ulcers [J]. *J Nurs Sci*, 2011, 26(7): 90–92.
- [78] 宁翠霞, 毕越英. 压疮的基础实验研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(27): 3075–3078.
- NING C X, BI Y Y. Progress in basic experimental research of pressure ulcer [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2017, 26(27): 3075–3078.
- [79] 李妍雁, 周晓兰. 国外压疮动物模型研究进展 [J]. *护理学报*, 2015, 22(21): 23–26.
- LI Y Y, ZHOU X L. Research progress of animal models of pressure sore abroad [J]. *J Nurs Chin*, 2015, 22(21): 23–26.
- [80] STRONG A L, BOWLES A C, MACCRIMMON C P, et al. Adipose stromal cells repair pressure ulcers in both young and elderly mice: potential role of adipogenesis in skin repair [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(6): 632–642.
- [81] 张铭, 于浩, 邵阳, 等. 纳米脂肪联合富血小板血浆治疗大鼠压力性损伤创面的实验研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(12): 2061–2070.
- ZHANG M, YU H, SHAO Y, et al. Effect of nanofat combined with platelet-rich plasma for treatment of pressure injury wounds in rats [J]. *J South Med Univ*, 2023, 43(12): 2061–2070.
- [82] 燕群美, 赵炎, 郭娜. 不同浓度给氧治疗压疮的实验研究 [J]. *护理研究*, 2009, 23(19): 1708–1711.
- YAN Q M, ZHAO Y, WU S. Experimental study on different concentrations of oxygen therapy to treat pressure sores [J]. *Chin Nurs Res*, 2009, 23(19): 1708–1711.
- [83] STADLER I, ZHANG R Y, OSKOU P, et al. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse [J]. *J Invest Surg*, 2004, 17(4): 221–227.
- [84] GUNTHER R A, CLARK M. The effect of a dynamic pressure-redistributing bed support surface upon systemic lymph flow and composition [J]. *J Tissue Viability*, 2000, 10(3): 10–15.
- [85] 于杰, 孙忠人, 李洪玲, 等. 对大鼠压疮缺血-再灌注损伤模型构建及应用的思考 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(7): 1210–1214.
- YU J, SUN Z R, LI H L, et al. Reflection on the establishment and application of the model of pressure ulcer in rats with ischemia reperfusion injury [J]. *Prog Mod Biomed*, 2017, 17(7): 1210–1214.
- [86] 郑敏, 甘秀妮, 胡亚丽. III期压疮豚鼠模型的构建 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(28): 5185–5190.
- ZHENG M, GAN X N, HU Y L. Construction of an animal model for stage III pressure ulcer in guinea pigs [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2012, 16(28): 5185–5190.
- [87] 张广静, 王正想, 刘杰, 等. 组织工程皮肤在糖尿病皮肤溃疡模型大鼠创面修复中的应用研究 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2024, 53(12): 715–720.
- ZHANG G J, WANG Z X, LIU J, et al. Application of tissue-engineered skin for wound repair in a rat model of diabetic skin ulcer [J]. *J Clin Dermatol*, 2024, 53(12): 715–720.
- [88] NAYMAN J. Effect of renal failure on wound healing in dogs. Response to hemodialysis following uremia induced by uranium nitrate [J]. *Ann Surg*, 1966, 164(2): 227–235.
- [89] MYLONAS A I, MASSOULAS G B, NICOLATOU O, et al. Progress of ossification and epithelialization of wounds after simple or surgical extractions of teeth in rats with chronic renal failure: an experimental study [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 38(1): 35–43.
- [90] ZOTTA E, OCHOA F, TIRONI FARINATI C, et al. UT-a expression in pars recta from a rat model of chronic renal failure [J]. *J Nephrol*, 2008, 21(6): 947–958.
- [91] SETH AK, DE LA GARZA M, FANG RC, et al. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease [J]. *PLoS One*. 2013, 8(3): e59979.
- [92] 字春泽. 小鼠骨髓间充质干细胞对乳腺癌创面愈合的作用探索 [D]. 昆明: 昆明医科大学; 2021.
- ZI C Z. Effect of mouse bone marrow mesenchymal stem cells on wound healing of breast cancer [D]. Kunming: Kunming Medical University; 2021.
- [93] 刘霞, 刘建忠, 周元国, 等. 局部辐射对大鼠伤口愈合过程中细胞增殖和凋亡的影响规律 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2002, 22(3): 187–188.
- LIU X, LIU J Z, ZHOU Y G, et al. Effect of local radiation on cell proliferation and apoptosis during wound healing in rats [J]. *Chin J Radiat Mediat Prot*, 2002, 22(3): 187–188.
- [94] ZOU Z, SUN H, SU Y, et al. Progress in research on radiation combined injury in China [J]. *Radiat Res*, 2008, 169(6): 722–729.
- [95] RAN X Z, SHI C M, ZHENG H E, et al. Experimental research on the management of combined radiation-burn injury in China [J]. *Radiat Res*, 2011, 175(3): 382–389.
- [96] 史春梦, 程天民. 放射损伤对创面愈合的影响 [J]. *国外医学(放射医学核医学分册)*, 2005, 29(1): 30–32.
- SHI C M, CHENG T M. Effects of radiation injury on wound healing [J]. *Foreign Med Sci (Sect Radiat Med Nucl Med)*, 2005, 29(1): 30–32.

- [97] 王涛,冉新泽,王军平. 放射复合伤的研究进展与展望 [J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2023, 18(4): 353-357.
WANG T, RAN X Z, WANG J P. Research progress and prospects of radiation composite injury [J]. Chin J Inj Rep (Electronic Edition), 2023, 18(4): 353-357.
- [98] FORCHERON F, AGAY D, SCHERTHAN H, et al. Autologous adipocyte derived stem cells favour healing in a minipig model of cutaneous radiation syndrome [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31694.
- [99] HADAD I, JOHNSTONE B H, BRABHAM J G, et al. Development of a porcine delayed wound-healing model and its use in testing a novel cell-based therapy [J]. Int J Radiat Oncol, 2010, 78(3): 888-896.
- [100] 罗平,陈晓红,孙仁山,等. 丹参对复合全身放射损伤大鼠创面的影响 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(6): 156-157.
LUO P, CHEN X H, SUN R S, et al. Effects of Radix salviae militiorrhizae on the wound healing in rats with whole-body radiation injury [J]. Chin J Clin Rehabil, 2005, 9(6): 156-157.
- [101] 陈晓红,孙仁山,程天民,等. C 反应蛋白对合并⁶⁰Co γ 射线放射损伤家兔创面的影响 [J]. 基础医学与临床, 2006, 26(6): 575-578.
CHEN X H, SUN R S, CHENG T M, et al. Effects of C-reactive protein on wound healing of rabbits irradiated by ⁶⁰Co γ ray [J]. Basic Clin Med, 2006, 26(6): 575-578.
- [102] GALIANO R D, MICHAELS J 5th, DOBRYANSKY M, et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing [J]. Wound Repair Regen, 2004, 12(4): 485-492.
- [103] SPARKS H D, MANDLA S, VIZELY K, et al. Application of an instructive hydrogel accelerates re-epithelialization of xenografted human skin wounds [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 14233.
- [104] DUNN L, PROSSER H C, TAN J T, et al. Murine model of wound healing [J]. J Vis Exp, 2013, 75: e50265.
- [105] ROY S, BISWAS S, KHANNA S, et al. Characterization of a preclinical model of chronic ischemic wound [J]. Physiol Genomics, 2009, 37(3): 211-224.
- [106] PATIL P, MARTIN J R, SARETT S M, et al. Porcine ischemic wound-healing model for preclinical testing of degradable biomaterials [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2017, 23(11): 754-762.
- [107] JUNG Y, SON D, KWON S, et al. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors [J]. Int Wound J, 2013, 10(3): 295-305.
- [108] KANG M C, YUMNAM S, PARK W S, et al. Ulmus parvifolia accelerates skin wound healing by regulating the expression of MMPs and TGF- β [J]. J Clin Med, 2019, 9(1): 59.
- [109] GRADA A, MERVIS J, FALANGA V. Research techniques made simple: animal models of wound healing [J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(10): 2095-2105.
- [110] SULLIVAN T P, EAGLSTEIN W H, DAVIS S C, et al. The pig as a model for human wound healing [J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(2): 66-76.
- [111] YAO F, VISOVATTI S, JOHNSON C S, et al. Age and growth factors in porcine full-thickness wound healing [J]. Wound Repair Regen, 2001, 9(5): 371-377.
- [112] AHMED A K, GOODWIN C R, SARABIA-ESTRADA R, et al. A non-invasive method to produce pressure ulcers of varying severity in a spinal cord-injured rat model [J]. Spinal Cord, 2016, 54(12): 1096-1104.

[收稿日期] 2024-11-12

薛茜尹,吴淑雅,许婧余,等. 慢性心理应激造模方法在病证结合动物模型中的应用与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 893-904.

XUE Q Y, WU S Y, XU J Y, et al. Application and evaluation of animal model of chronic psychological stress modeling methods in the combination of disease and syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 893-904.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.011

慢性心理应激造模方法在病证结合动物模型中的应用与评价

薛茜尹¹, 吴淑雅¹, 许婧余¹, 刘步平¹, 张怡¹, 张铭珈², 敖海清^{1*}

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

【摘要】 随着生物-心理-社会医学模式的发展,慢性心理应激对疾病的影响越来越受到研究者的关注。慢性心理应激属于中医的情志病因范畴,本文系统回顾了慢性心理应激相关病证模型的研究进展,分析了不同模型的优点与局限性,并就未来慢性心理应激相关病证模型研究的方向和改进提出了自己的思考。

【关键词】 慢性心理应激;情志病因;病证结合;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0893-12

Application and evaluation of animal model of chronic psychological stress modeling methods in the combination of disease and syndrome

XUE Qianying¹, WU Shuya¹, XU Jingyu¹, LIU Buping¹, ZHANG Yi¹, ZHANG Mingjia², AO Haiqing^{1*}

(1. School of Public Health and Management, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. School of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

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

【Abstract】 The development of bio-psycho-social medical models has focused attention on the impact of chronic psychological stress on diseases. Chronic psychological stress falls within the category of emotional etiology in traditional Chinese medicine. This paper systematically reviews research progress into the chronic psychological stress-related combination of disease and syndrome, and analyzes the advantages and limitations of different models. We also provide insights into the direction and improvements of future research into chronic psychological stress-related disease pattern models.

【Keywords】 chronic psychological stress; emotional etiology; combination of disease and syndrome; animal model

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

【基金项目】 国家自然科学基金(81673838), 国家自然科学基金青年项目(82205229)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81673838), Youth Project of the National Natural Science Foundation of China (82205229).

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

【通信作者】 敖海清,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:肝藏象理论及中医药抗应激损伤。

Email:aohaiqing@gzucm.edu.cn

应激(stress)是指在受到各种内外环境因素和心理因素刺激时,机体出现全身范围的非特异性反应^[1]。研究发现适当强度的应激可以增强机体应对不良环境的能力,但长时程高强度的应激对中枢神经系统、心脑血管系统以及消化系统等重要器官均具有损害作用^[2]。慢性心理应激概念属病理生理学或生理心理学范畴,既非直接的致病因素,也非病理结果,而是介于因果之间的机体的非特异性复杂心身反应过程,是临床多种疾病发生发展过程中的重要参与机制,具有多因素综合作用、多系统共同参与、表现复杂多样的特点^[3]。

慢性心理应激对应中医病因病机理论中的情志因素,情志致病是因为突然、强烈而持久的情志刺激超过人体能承受的正常范围,导致人体气机发生紊乱,脏腑气血失调,最终形成疾病^[4]。辨证论治是中医认识和治疗疾病的基本原则,“证”是在发病过程中对患者症状和体质进行分析归纳后的某一阶段病理状态的综合描述。病证结合动物模型同时兼顾现代医学“病”的特点和中医学“证”的特征,是微观和宏观、分析论与整体论的结合^[5]。因为对证候的本质暂无定论,现代研究中评价病证结合模型的成功构建是在病理改变基础上通过实验动物的体征及行为改变判断其证候特征,因此建立合适的慢性应激病证结合模型不仅有助于探究中医情志致病的证候形成机制,而且可以为临床诊疗方案和中医药创新研发提供重要支持。通过对慢性应激病证结合动物模型的研究,实现中医情志致病临床辨证的客观化、规范化。

本文较为全面地总结评价慢性心理应激造模方法在病证结合动物模型中的应用,为后续中医情志病因理论及病证结合动物模型研究提供参考。

1 常用慢性心理应激造模方法的选择

1.1 慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)/慢性不可预知应激(chronic unpredictable stress, CUS)

CUMS/CUS 造模方法是将动物暴露于一系

列未知的温和刺激,如潮湿、斜笼、无垫料、昼夜颠倒、禁食、禁水等来模拟现实世界的应激环境。Mate 分析研究发现白噪音、新气味以及饲养笼内放置异物不足以影响糖水偏好结果,但是低温和物理固定则会造成较大的生理应激^[6]。CUMS/CUS 造模方法虽然避免了单一刺激源导致模型动物应激耐受的问题,但是造模周期长,且在不同品种动物间造模效果有所差异,如与 C57BL/6 小鼠造模后出现焦虑抑郁样行为且糖水偏好降低相比,同样应激源处理的 ICR 小鼠仅表现出糖水偏好降低^[7],而 BALB/c 小鼠因为基础运动活性较低反而对 CUMS 应激源具有更高的应激反应性^[8]。食蟹猴的 CUS 造模方法^[9]运用空间限制、禁食、禁水、巨响和假蛇恐吓等与啮齿动物类似的造模方式,通过观察食蟹猴行为学改变确定造模效果。刘燕等^[10]采用 CUMS 复合应激方法,通过行为学测试、逍遥散反证,建立了较为稳定的肝郁脾虚证小鼠模型。后宗等^[11]采用连续 15 d 尾部固定 5% 体质量金属游泳至力竭(鼻尖浸水时间 > 5 s)的方法建立气虚模型。CUMS/CUS 造模方法是慢性心理应激造模中常用的方法,虽然耗时长且工作量较大,但是具有应激种类多不易产生适应性、成模有效性高的优势。只是在不同课题组论文之间^[6-10],造模时间及方法都难以统一使得该方法可重复性较差。

1.2 慢性束缚应激(chronic restraint stress, CRS)

常用的 CRS 造模方法是将动物束缚在通风良好的束缚管内或固定动物四肢使其无法自如活动,每天在固定时间段内束缚 3 ~ 6 h 且不提供食物和水。研究发现与小鼠相比,大鼠对 CRS 造模更敏感^[12],并且 CRS 对大鼠认知的影响存在性别差异,在同样条件下,雄性大鼠空间记忆和认知受到损害而雌性大鼠无明显变化^[13],但是雌性大鼠对糖皮质激素负反馈比雄性大鼠更敏感^[14]。郑建华等^[15]发现 CRS 造模 14 d 可以引发 BALB/c 小鼠的肠道炎症反应,有助于构建肠道应激损伤模型。赵海滨等^[16]采用 CRS 联合孤养方法构建肝气郁结证大鼠模型,模型大鼠表现为躲避、活动减少、大便松散、皮色失去光泽,造模第 2 周开始生长较对照组缓慢,摄食量减少,检测血清皮质酮和促肾上腺皮质激素释放激素

含量明显升高。李伟^[17]对慢性束缚应激大鼠模型的证型进行探讨,通过逍遥散、四君子汤和金匮肾气丸的对比反证,发现 21 d CRS 大鼠模型的证型为肝郁脾虚型。需要指出的是,CRS 模型为单一应激源,容易造成实验动物适应,影响造模结果。同时在对恒河猴的研究中发现,在经历约 5 次猴椅保定后,实验猴攻击行为即会得到改善、血清中皮质酮(cortisol, CORT)水平也呈明显降低趋势^[18]。因此,CRS 造模是否适用于非人灵长类造模仍待进一步研究确定。

1.3 母婴分离应激(maternal separation, MS)

MS 造模方法可以模拟真实世界的早期生活应激。幼鼠在出生后早期将会反复经历与母鼠分离,常选择幼鼠出生后第 9 天开始进行 MS 造模^[19]。研究显示夜间进行分离操作的大鼠幼崽外周血糖皮质激素水平高于日间进行分离操作的大鼠幼崽^[20],而长时间(180 min)MS 大鼠焦虑指数显著高于短时间(15 min)MS 大鼠^[21]。卞尧尧等^[22]对 C57BL/6 小鼠采用 MS 造模,发现造模后的小鼠表现出阳虚证的证候特征。在恒河猴的 MS 模型研究中发现,出生后与母亲分离 4 个月的幼崽会出现持久性的攻击性和繁殖行为异常、血清皮质醇峰值反应明显延迟,并且在恢复正常社会生活后也无法改善^[23]。MS 造模方法适用于研究早期应激损伤,但是操作要求比较高,容易出现幼崽伤亡现象,影响实验结果。

1.4 慢性社交挫败应激(chronic social defeat stress, CSDS)

CSDS 是从社会层面模拟真实世界的社交压力。该模型将动物反复暴露在更强壮的同类面前,占上风的个体对屈从个体表现出更强的攻击性使其产生应激反应,从而产生长期的行为(如群体交流频率降低、性行为减少)^[24]及生理改变^[25]。CSDS 的使用基于雄性动物对其他闯入其领地的雄性动物的先天攻击性,因此难以在雌性动物群体中使用 CSDS 造模。虽然有研究者通过在雌性小鼠尾巴和阴道口涂抹雄性小鼠尿液的方法诱导 CSDS 雌性小鼠模型^[26],但是将 CSDS 造模方法用在雌性小鼠的文献仍较少。社会等级差距是一种在真实世界中常见的慢性社会心理应激源,在非人灵长类动物的研究中常用到此类应激来模拟人类社会社会中社会地位较低群体的

压力经历。自然状态下每个稳定的食蟹猴社会群体(17 ~ 22 个受试对象)中都会出现 1 ~ 2 个受试对象表现出抑郁表型^[27]。在进行压力与肥胖相关性研究中发现,同一群体中地位较低的雌性恒河猴表现出全天候觅食且食物消耗量增加的慢性应激反应^[28]。CSDS 模型多用于成年雄性动物,成模效果的个体差异性较大。

1.5 慢性社会孤立应激(chronic social isolation stress, CSIS)

CSIS 模型通过隔绝同种动物之间的社会性互动,意在模拟人类社会缺乏社会互动与支持的环境。与群养小鼠相比,单笼饲养小鼠表现出更多焦虑样行为、绝望程度更甚以及快感缺乏状态。CSIS 造模的性别差异表现在雄性小鼠更强攻击性而雌性小鼠为社交退缩^[29]。LI 等^[30]在构建雌性食蟹猴的抑郁症模型时发现,与对照组相比,社交孤立(social isolated standard single cage, SSC)组和社交孤立且无视觉接触(no visual contact single cage, NVC)组均在性行为 and 友好行为方面得分降低、在拥抱行为和蜷缩行为方面得分增加,但两组的抑郁行为表现各有侧重。赵琪等^[31]对比单笼和配对饲养食蟹猴后发现,虽然配对饲养能够有效改善食蟹猴的异常行为,但是两者血液学与免疫应激指标无明显差别。CSIS 造模方法标准化程度高,因此具有较强的可重复性。但是因为应激种类单一,无法全面模拟真实社会压力的所有因素。

1.6 习得性无助(learned helplessness, LH)

LH 是将实验动物暴露于不可预知且无法回避的伤害环境中使其受到伤害逐渐放弃逃避的造模方式。常用的方法是连续且随机电击尾部或脚掌,电击时伴有光信号,电击后将电击笼的穿梭箱门打开,进行光信号提示及电击刺激,对照组会迅速逃离带电网的一侧箱体,而经历 LH 应激的动物往往不逃避电击^[32]。李文佳^[33]对 BALB/c 小鼠进行 LH 造模后,发现小鼠产生抑郁伴气虚样表现。LH 造模方法操作标准化程度高,但仍具有应激源单一易造成实验动物适应的缺点。同时需要注意在通过 LH 方法造模时,需要筛选实验动物属于习得性无助敏感(learned helplessness sensitiveness, LHS)还是习得性无助抵抗(learned helplessness resistance, LHR)状态^[34]。

2 慢性应激造模方法在病证结合动物模型中的应用

2.1 抑郁症 (major depression disorder, MDD) 病证结合动物模型

抑郁症是多种原因导致的精神疾病,表现为显著持久的心境低落、兴趣减退和快感缺失等,有高发病率、高复发率、高自杀率及高致残率等特点^[35]。CUMS/CUS 是抑郁症研究中常用造模方法。临床研究发现抑郁症患者常见中医证型为肝郁气滞型、肝郁脾虚型和心脾两虚型^[36]。

在肝郁气滞型抑郁症模型构建中,王伟等^[37]采用“CRS + 孤养”方法,发现肝气郁结型抑郁大鼠调节认知和行为的脑区葡萄糖代谢失代偿,而柴胡疏肝散可以改善其相关脑区功能。于琦等^[38]通过对比使用四逆散、逍遥散和四君子汤治疗 CUS 肝郁型大鼠,发现具有疏肝作用的方剂均有抗抑郁作用,而单纯健脾方无明显效应。进一步说明 CUS 可构建肝郁型抑郁症大鼠模型。

肝郁脾虚型抑郁症有关研究较多,造模方法也各有特点。童萍等^[39]采用“CUMS + 大黄灌胃”的方法构建抑郁症肝郁脾虚型小鼠,造模后小鼠出现纳差、体质量增长缓慢、大便稀溏的肝郁脾虚症状。岳利峰等^[40]和韩双双^[41]均采用 CRS 构造肝郁脾虚型抑郁症模型。前者造模 14 d 后,大鼠神态倦怠、烦躁、毛发枯黄散乱无光泽、扎堆或蛰伏在角落、大便多稀溏等表现逐渐加重,形成“肝郁脾虚证”表现,通过尿 D-木糖排泄率作为大鼠脾虚程度的指标,并使用逍遥散反证大鼠模型的肝郁脾虚证型^[42]。后者通过 8 周造模,发现加味逍遥散可以通过调节肠道菌群丰度改善肝郁脾虚型抑郁症小鼠的抑郁症状。周国儿等^[43]在 CRS 基础上将饮用水换成 5% 食醋溶液以构建肝郁脾虚型抑郁症小鼠模型,通过行为学测试发现证候造模方法比传统 CRS 造模方法更能造成小鼠绝望行为。

孟丹华^[44]使用“MS + CRS”的造模方式,通过以方测证的方法,发现在应激 7 d 未形成典型肝郁证候,但是在应激 21 d 时以阳虚肝郁证候表现为主。余楷杰等^[45]通过“MS + CRS”建立肝郁阳虚型抑郁小鼠模型。在仔鼠出生后第 5 ~ 14

天施行 8 h/d 的母婴分离,待出生后第 91 天开始进行 3 h/d、持续 21 d 的束缚应激,通过使用二仙汤、逍遥散和温阳解郁方(二仙汤、逍遥散合方)进行反证,结果显示虽然 3 种方剂对小鼠行为学结果均有所改善,但温阳解郁方的总和疗效和药理作用优于单独使用其余两方。

刘萌萌等^[46]采用“CUMS + 皮下注射氢化可的松 25 mg/kg”造肾虚型抑郁症大鼠模型,采用“CUMS + 腹腔注射利血平 0.5 mg/kg”造脾虚型抑郁症大鼠模型。与空白组比较,肾虚型和脾虚型抑郁大鼠表现出不同的行为(如肾虚型出现饮水减少、尿量增多;脾虚型出现摄食减少、便溏)特征,对肝、脑和肾代谢物比较发现肾虚型抑郁症大鼠和脾虚型抑郁症大鼠的脑组织代谢物不存在交集,提示可通过代谢物差异对证型进行判定。曹灵修等^[47]采用同样方法构建肾阳虚型抑郁症大鼠模型,结果显示与空白组比较,模型大鼠的肛温、血清中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)含量及海马环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、Ras 相关蛋白 1(Ras-related protein 1, RAP1)、丝裂原活化蛋白激酶激酶 1(RAF-1 proto-oncogene, RAF1)蛋白表达均低于正常组。

研究认为血浆 cAMP 升高是阴虚证的共有规律^[48],而血清雌二醇(estradiol 2, E2)升高、睾酮(testosterone, T)含量降低是肾虚的特异性指标^[49]。陈晓阳等^[50]通过“CUS + 孤养 + 灌胃甲状腺素 2.5 mg/kg”建立肾阴虚型抑郁大鼠模型,与空白组对比,模型大鼠毛无光泽、大便干燥、易激怒、饮水量显著增加,检测血浆 cAMP 水平上升,血清 E2 含量 E2/T 比值升高,后续通过六味地黄丸和忧虑康液进行反证模型证候为肾阴虚型^[51]。巫晓慧等^[52-53]采用“CUMS + 8 mg/mL 甲状腺素灌胃”复合方法制备阴虚内热证型抑郁症小鼠模型,发现造模小鼠无论雌雄均出现肛温异常升高、热区停留比例降低的内热表现以及饮水量、血浆 cAMP 异常升高的阴虚表现。

2.2 慢性疲劳综合征病证 (chronic fatigue syndrome, CFS) 结合动物模型

CFS 是一种复杂的、慢性的疾病状态,其核心

症状包括疲劳、睡眠不振、运动后不适以及认知障碍等,且以上症状持续超过数月,是涉及机体的多系统障碍,全球约有 1% 的人口罹患此病^[54]。鉴于 CFS 症状的不确定性和波动性以及病理机制的尚未明确,应激造模是 CFS 的常用造模方法^[55]。田骄等^[56]对比发现,在 ICR 和 C57BL/6 同品系小鼠之间进行 CFS 造模,雄性小鼠焦虑程度会重于雌性小鼠。临床 CFS 的病位主要涉及脾和肝,病机特点以正虚为主^[57]。

谢亚娜等^[58]采用 21 d“强迫游泳 + CRS + 饮食控制”方法制备 CFS 大鼠肝郁脾虚模型,模型大鼠表现出运动能力减退以及精神萎靡、倦怠纳差、易激惹、大便稀溏等与肝郁脾虚型 CFS 患者相似症状,针刺疏肝健脾穴位后,模型大鼠的运动能力及焦虑、抑郁表现明显改善。冯玉华等^[59]采用 4 周“饮食不节 + 疲劳过度 + 情致所伤”的方法构建脾气虚型 CFS 大鼠模型,模型大鼠表现出运动活动减少、情绪易激惹、纳差、大便稀溏等症状,检测发现模型大鼠 D-木糖排泄率下降、血清胃动素和血管活性肠肽先升高后降低,说明模型大鼠胃肠功能紊乱。贺恋词^[60]采用“力竭游泳 + CRS”复制出 CFS 模型后,对 CFS 大鼠灌胃番泻叶水煎剂以建立 CFS 脾肾阳虚大鼠模型,模型大鼠表现为活动减少、精神萎靡、倦怠蜷卧、喜扎堆拱背、毛发稀疏无泽、纳差、便溏等,满足脾肾阳虚证候判断标准,经药膳神仙粥治疗后大鼠疲劳表现及脾肾阳虚诸证均见明显改善,说明该脾肾阳虚证 CFS 动物模型行之有效。卢秋玉等^[61]采用“力竭游泳 + CRS + 番泻叶灌胃”的方法构建脾肾阳虚型 CFS 大鼠,与空白组比较发现,脾肾阳虚型 CFS 大鼠胸腺和脾指数、脾 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖能力明显降低,说明其免疫功能显著下降。王宇航等^[62]采用“肌注氢化可的松 30 mg/kg + 冷水游泳”构造 CFS 肾虚证模型,通过游泳造成大鼠体力下降,产生疲劳;通过肌注激素得到大鼠精神萎靡、毛色光泽减退、眯眼、喜扎堆等肾虚症状。

2.3 肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS) 病证结合动物模型

肠易激综合征 IBS 是一种慢性肠道功能紊乱性疾病,临床常表现为持续或间歇发作的腹痛、腹胀、排便行为和大便性状异常,而缺乏胃肠道

结构改变和生物化学异常依据,临床可以分为便秘型 IBS (IBS-C) 和腹泻型 IBS (IBS-D)^[63], IBS 的发病常与饮食不节、情绪应激有关^[64]。马晓玲等^[65]通过对比发现当饲料中乳糖比例在 30% 以上、束缚时间在 1 h 以上时,造模大鼠在造模 7 ~ 14 d 会产生典型的 IBS-D 病理表现。

赵迎盼等^[66]采用“MS + CRS + 番泻叶灌胃”建立肝郁脾虚型 IBS 大鼠模型,研究发现该造模方法比使用单因素或 MS 联合 CRS 造模方法在内脏敏感性、腹泻、肝郁脾虚证型方面的差异具有统计学意义,且模型符合肝郁脾虚型 IBS-D 疾病特点。涂星等^[67]综合对比 MS、冰水灌胃、限水单因素与双因素复合造模方法构建 IBS-C 大鼠模型,发现使用“MS + 冰水灌胃”大鼠出现明显的毛色无光泽且竖起、活动减少、易躁易怒、进食量减少、形体消瘦、大便数量减少且颗粒变小质地坚硬、肠道敏感性显著升高,结合逍遥散能有效改善“MS + 冰水灌胃”所致 IBS-C 大鼠的排便异常和肠道超敏感性的反证,提示以 MS 结合冰水灌胃所建立的 IBS-C 模型符合中医肝郁脾虚证的特点。张智轶^[68]在 2 型糖尿病大鼠模型的基础上,采用“番泻叶灌胃 + CRS”建立的肝郁脾虚型 IBS-D 合并 2 型糖尿病大鼠模型,成模后大鼠皮毛干枯凌乱、精神状态萎靡、饮食饮水明显减少,粪便形状分级和稀便指数显著增加,表现出肝郁脾虚症状。何佳慧等^[69]综合对比冰水灌胃、束缚、夹尾单因素与双因素复合造模方法,发现使用冰水灌胃结合夹尾法大鼠表现出明显的胃肠道转运减慢、内脏敏感性显著增加、焦虑和抑郁行为反应,因此冰水灌胃结合夹尾法可以用以建立肝郁证 IBS-C 大鼠模型。

徐秋颖等^[70]采用“CUMS + 高温高湿度高糖高脂饲养 + 56% 酒精灌胃”构建 IBS 脾胃湿热型大鼠模型,联合造模大鼠的粪便性状评分、痛阈评分高于 CUMS 大鼠而糖水偏好低于 CUMS 大鼠,以此证明病证联合造模方法比单纯使用 CUMS 方法更好地模拟人类 IBS 病证特征且具有更好的可重复性。

艾宜婧^[71]采用“CRS + 番泻叶 10 mg/kg 灌胃 + 氢化可的松 25 mg/kg 肌注”构建脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠模型。成模后大鼠出现精神低迷、慵懒嗜睡、食少、腹泻、对刺激反应迟钝、被捆绑

束缚后抵抗和撕咬程度降低、体质量增加迟缓、毛发肮脏凌乱缺少光泽等一系列改变。使用温肾暖脾中药四神丸可以改善模型大鼠以上表征并降低其血清 P 物质 (substance P, SP)、血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、胃动素 (motilin, MTL) 和 5-HT 水平。

2.4 其他应激相关疾病病证结合动物模型

陈冬雪等^[72]采用“食管十二指肠侧吻合术 + CUS”制备胃食管返流病肝郁证大鼠模型,与单纯胃食管返流病模型大鼠比较,病证结合大鼠不仅在一般情况和行为学上更符合肝郁证候表现特点,而且食管病理表现更严重、血清 Ghrelin 含量更高、下丘脑 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 含量更低。

姜珊等^[73]对单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus 1, HSV-1) 潜伏小鼠模型给予 CRS, 通过对比发现清肝泻火的丹栀逍遥散比清肺热的泻白散治疗效果更好,以此构建情志应激引起潜伏 HSV-1 复发的肝郁化火小鼠模型。

阮璐薇等^[74]采用“去势法 + CUMS”建立围绝经期综合征肝郁证大鼠模型,与仅去势组相比,使用联合造模方法的大鼠比仅使用去势造模方法的大鼠表现出更加明显的肝郁证表型,如精神倦怠、嗜卧,反应迟缓,毛色暗淡粗糙,进食量明显减少等。

陈帅等^[75]对自发性高血压大鼠采用 CRS 建立高血压肝郁化火证模型。与自发性高血压大鼠比较发现,模型大鼠高架十字迷宫开臂停留时间比降低、易激惹评分升高、旋转耐受时间降低、体质量降低、舌色 r 值升高,以上均为肝郁化火证的评判表征,并通过丹栀逍遥散反证模型所属肝郁化火证候。

3 评价与展望

3.1 慢性心理应激证候动物模型的意义

随着医疗技术的发展和生活水平的提升,对疾病的认识不仅仅只局限于细菌、病毒等具体的致病因素,在中医病因学说中,七情过极、房劳虚损、劳倦过度、饮食起居不节等均是内伤杂病的主要致病因素。慢性应激属于精神心理刺激,由此产生的病理变化,一定程度上可以归为中医情志致病范畴。综上所述,慢性应激造模方法在证

候动物模型的应用主要集中于与肝、脾、肾三脏相关的证候研究中。相比于使用化学药物的造模方法,证候造模时采用慢性心理应激造模方法更接近中医临床对病因病机的理解。

3.2 目前慢性心理应激证候动物模型存在的问题

因为中医病因与病证之间常常并不是一一对应的关系,因此用传统情志致病的造模方法可能造不出所需要的证候模型;并且外界病因不一定是能直接引起相应病证的客观因素,单纯的外在因素可能只是证候的诱发因素^[76]。

“证”是动态变化的,在应激反应过程中会存在不同脏腑功能活动的变化及其所形成的不同证候,动物模型也会在不同时间表现出不同证型,而且中医证候是由致病因素、遗传体质、疾病阶段三个方面共同作用形成^[77],因此考虑到不同实验动物的禀赋,也可能出现某一个或几个证候的偏向性。比如在 CUMS 过程中的冰泳,可能造成动物寒邪犯表证,也可能造成更严重的寒凝血瘀证。

对于慢性应激结合化学药物的病证结合模型,会出现新的问题,比如慢性应激导致的肝郁气滞、肝郁脾虚到底是不是该模型疾病的病因?如果是,那么单纯的慢性应激造模方法能否表现出相应的疾病证候?如果能,为何还需要给予化学药物;如果不能,是否说明单纯慢性应激造模方式在对该疾病证候的研究上仍存在问题?

除了造模方法的问题以外,另一个问题是慢性应激病证结合动物模型评价体系的建立。由于证候的诊断主要通过宏观外在表象,难以通过传统中医四诊收集动物的外在表现,比如慢性应激导致动物表现出的易激惹状态,可能是肝郁气滞证的表现,也可能是造模过程引起动物身体疼痛不适的表现。因此,如何将动物的外在表现与人类证候的宏观表现结合对应,是有效评价病证结合动物模型需要解决的一大问题。

3.3 展望

社会发展带来了生活、工作等多方面的变化,这些变化不可避免地影响了人们的生活质量和心理健康。中医学有着独特的理论体系来解释人体的生理和病理现象,从整体的角度出发,强调人与自然、人与社会的和谐相处,以及人体

内部的平衡状态。慢性心理应激病证结合动物模型的研究对今后中医药防治情志致病有着重要的现实意义,今后的工作中还需要发展相对较为纯粹的心理应激反应的动物模型,即尽可能的排除躯体性应激反应因素的干扰^[78]。随着基因编辑技术的不断发展和完善,基因编辑动物模型在本研究领域具有巨大的应用潜力。在对不同疾病的基因表达特点研究的同时,可以利用基因编辑技术构建更符合人类疾病特征的动物模型,进一步深入研究疾病的发病机制,并且进一步从基因角度阐述中医证型的物质基础,开发更有效的治疗方法。同时,在应用基因编辑动物模型过程中需要关注的技术挑战和伦理问题,在推动研究发展的同时确保研究的科学性和合规性。具体来说,有关慢性心理应激病证结合动物模型的研究还应该从确定造模对象、精准选择造模因素、完善模型评价标准等角度着手,以期建立更加稳定可靠且贴近真实世界情况的慢性心理应激病证结合模型。

笔者认为,在“证候”实质尚未明确之前,慢性心理应激造模方法建立病证结合模型可以通过对成熟的疾病模型或自发性动物模型,设置合适的对照方药,采用“方证相应”进行中医证候判定。随着深入探究慢性心理应激病证结合模型,将会对揭示情志致病有关证候的实质、明确方药的作用机制起到积极的作用。

通过建立高水平的慢性心理应激病证结合动物模型,对于明确中医情志致病证候本质、扩大中医药的国际认可度、创新中药研发等方面具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

- [1] SAPOLSKY R M. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18 (10): 1344–1346.
- [2] GOLBIDI S, FRISBEE J C, LAHER I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(12): H1476–H1498.
- [3] 孙琪, 敖海清, 王全年, 等. 慢性应激动物模型的应用与思考 [J]. *广东医学*, 2012, 33(14): 2182–2184.
SUN Q, AO H Q, WANG Q N, et al. Application and thinking of animal model of chronic stress [J]. *Guangdong Med J*, 2012, 33(14): 2182–2184.
- [4] 邢玉瑞. 五行模式对中医情志理论建构的影响 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(20): 1795–1796.
XING Y R. Influence of five elements model on the construction of emotion theory of traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 55 (20): 1795–1796.
- [5] 赵慧辉, 王伟. 病证结合证候模型研究基本思路 [J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(12): 762–764.
ZHAO H H, WANG W. Basic ideas of study on syndrome model of combination of disease and syndrome [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2006, 21(12): 762–764.
- [6] ANTONIUK S, BIJATA M, PONIMASKIN E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 99: 101–116.
- [7] JUNG Y H, HONG S I, MA S X, et al. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression and anxiety in mice [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 22(5): 453–459.
- [8] WILLNER P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation and usage [J]. *Neurobiol Stress*, 2016, 6: 78–93.
- [9] YIN Y Y, TIAN C Y, FANG X X, et al. The faster-onset antidepressant effects of hypidone hydrochloride (YL-0919) in monkeys subjected to chronic unpredictable stress [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 586879.
- [10] 刘燕, 邹小娟, 丁秀芳, 等. 基于复合应激的肝郁脾虚证小鼠模型的建立与评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31 (5): 1840–1844.
LIU Y, ZOU X J, DING X F, et al. Establishment and evaluation of mouse models with syndrome of stagnation of liver qi and spleen deficiency based on multiple stresses [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(5): 1840–1844.
- [11] 后宗, 刘舒, 宋凤瑞, 等. 基于非靶向尿液代谢组学方法的气虚模型评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (19): 121–127.
HOU Z, LIU S, SONG F R, et al. Evaluation of qi-deficiency model based on urine non-targeted metabolomics [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(19): 121–127.
- [12] MAO Y, XU Y, YUAN X. Validity of chronic restraint stress for modeling anhedonic-like behavior in rodents: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Int Med Res*, 2022, 50(2): 3000605221075816.
- [13] LUINE V. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats [J]. *Stress*, 2002, 5(3): 205–216.
- [14] ZAVALA J K, FERNANDEZ A A, GOSSELINK K L. Female responses to acute and repeated restraint stress differ

- from those in males [J]. *Physiol Behav*, 2011, 104(2): 215–221.
- [15] 郑建华, 陈菁青, 董巧燕, 等. 慢性束缚肠道应激损伤小鼠模型的构建与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(2): 190–201.
- ZHENG J H, CHEN J Q, DONG Q Y, et al. Construction and evaluation of a mouse model of chronic restraint intestinal stress injury [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(2): 190–201.
- [16] 赵海滨, 刘子旺, 张秀静. 肝气郁结证动物模型的建立及 HPA 轴相关激素的初步研究 [J]. *天津中医药*, 2011, 28(6): 489–492.
- ZHAO H B, LIU Z W, ZHANG X J. Establishment of syndrome of stagnation of liver Qi model in rats and primary study on related hormones of hypothalamus-pituitary-adrenal axis [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2011, 28(6): 489–492.
- [17] 李伟. 慢性束缚应激大鼠模型的证治相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2003.
- LI W. Study of correlation of syndrome with treatment of rats model of chronic immobilization stress [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2003.
- [18] 赵琪, 刘永涛, 周超, 等. 猴椅保定训练对恒河猴应激的影响 [J]. *实验动物科学*, 2024, 41(2): 74–77.
- ZHAO Q, LIU Y T, ZHOU C, et al. Stress effect of monkey chair restraint training in *Rhesus* macaques [J]. *Lab Anim Sci*, 2024, 41(2): 74–77.
- [19] 刘守恒, 滕腾, 李泽钧, 等. 母婴分离模型的应用及其诱导抑郁的相关机制研究进展 [J]. *国际精神病学杂志*, 2019, 46(4): 597–600.
- LIU S H, TENG T, LI Z J, et al. Research progress on the application of the maternal-infant separation model and the related mechanisms of depression induction [J]. *J Int Psychiatry*, 2019, 46(4): 597–600.
- [20] DE SOUZA J A, DA SILVA M C, DE SOUZA FERRAZ JUNIOR J C, et al. Maternal separation in the light or dark phase of the circadian cycle has different effects on the corticosterone levels and anxiety-like behavior in male adult rats [J]. *Physiol Behav*, 2022, 247: 113725.
- [21] ZHANG X, LI H, SUN H, et al. Effects of BDNF signaling on anxiety-related behavior and spatial memory of adolescent rats in different length of maternal separation [J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 709.
- [22] 卞尧尧, 杨丽丽, 王中立, 等. C57/BL6 小鼠母婴分离模型中医证型探讨 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(2): 138–142.
- BIAN Y Y, YANG L L, WANG Z L, et al. Investigation of TCM syndromes on maternal separation in C57/BL6 mice [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2015, 31(2): 138–142.
- [23] FENG X, WANG L, YANG S, et al. Maternal separation produces lasting changes in cortisol and behavior in *Rhesus* monkeys [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(34): 14312–14317.
- [24] SHIMAMOTO A. Social defeat stress, sex, and addiction-like behaviors [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2018, 140: 271–313.
- [25] YOSHIOKA T, YAMADA D, KOBAYASHI R, et al. Chronic vicarious social defeat stress attenuates new-born neuronal cell survival in mouse hippocampus [J]. *Behav Brain Res*, 2022, 416: 113536.
- [26] HARRIS A Z, ATSAK P, BRETTON Z H, et al. A novel method for chronic social defeat stress in female mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(6): 1276–1283.
- [27] XU F, WU Q, XIE L, et al. Macaques exhibit a naturally-occurring depression similar to humans [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9220.
- [28] WILSON M E, FISHER J, FISCHER A, et al. Quantifying food intake in socially housed monkeys: social status effects on caloric consumption [J]. *Physiol Behav*, 2008, 94(4): 586–594.
- [29] WANG Z J, SHWANI T, LIU J, et al. Molecular and cellular mechanisms for differential effects of chronic social isolation stress in males and females [J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(7): 3056–3068.
- [30] LI X, XU F, XIE L, et al. Depression-like behavioral phenotypes by social and social plus visual isolation in the adult female *Macaca fascicularis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73293.
- [31] 赵琪, 刘永涛, 汪溪洁, 等. 单笼和配对饲养对食蟹猴血液学和血清生化、行为学和免疫应激的影响 [J]. *实验动物科学*, 2024, 41(1): 33–38.
- ZHAO Q, LIU Y T, WANG X J, et al. Effect of single-housing and pair-housing on hematological and biochemical parameters, ethology and immune stress of *Cynomolgus* monkeys [J]. *Lab Anim Sci*, 2024, 41(1): 33–38.
- [32] MAIER S F. Learned helplessness and animal models of depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1984, 8(3): 435–446.
- [33] 李文佳. 从肠道菌群角度探讨慢性习得性无助模型 Balb/c 小鼠抑郁伴气虚模型与归脾汤对其进行表型验证 [D]. 南京: 南京中医药大学; 2020.
- LI W J. The phenotype of learned helplessness model Balb/c mice with depression and Qi-deficiency was verified by using the intestinal flora [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine; 2020.
- [34] 陈羽佳. 基于 PET 对伴有自杀特征的青幼期抑郁样小鼠神经炎症变化的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学; 2024.

- CHEN Y J. Pet-based study of neuroinflammatory changes in adolescent depressed-like mice with suicide-related features [D]. Chongqing: Chongqing Medical University; 2024.
- [35] LEMOULT J, GOTLIB I H. Depression: a cognitive perspective [J]. Clin Psychol Rev, 2019, 69: 51–66.
- [36] 张佳怡, 张顺玲, 钟琳炜, 等. 基于文献分析抑郁症的证型分布及用药规律 [J]. 中医临床研究, 2024, 16(6): 33–38.
- ZHANG J Y, ZHANG S L, ZHONG L W, et al. Analysis of depression syndrome distribution and medication rules based on the literature [J]. Clin J Chin Med, 2024, 16(6): 33–38.
- [37] 王伟, 陈英茂, 王玉来, 等. 柴胡疏肝散改善肝气郁结型大鼠抑郁症的机制: 基于 microPET/CT 方法 [J]. 分子影像学杂志, 2023, 46(4): 575–582.
- WANG W, CHEN Y M, WANG Y L, et al. Mechanism of Chaihu Shugan powder in improving depression rats with liver-qi stagnation based on microPET/CT [J]. J Mol Imag, 2023, 46(4): 575–582.
- [38] 于琦, 金光亮. 三种复方对慢性应激模型大鼠海马 CREB、BDNF 基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(3): 591–594.
- YU Q, JIN G L. The Effects of three complex prescriptions on BDNF and CREB expression of liver depression model by chronic unpredictable mild stress in rats [J]. Chin J Pathophysiol, 2009, 25(3): 591–594.
- [39] 童萍, 李玉芳, 李睿博, 等. 基于“病证结合”构建与评价一种新的抑郁症肝郁脾虚证小鼠模型 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1): 50–53.
- TONG P, LI Y F, LI R B, et al. Construction and evaluation of a new mouse model of depression with liver depression and spleen deficiency syndrome based on “combination of disease and syndrome” [J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(1): 50–53.
- [40] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6): 396–400.
- YUE L F, DING J, CHEN J X, et al. Establishment and review of rat model of syndrome of liver depression with spleen insufficiency [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2008, 31(6): 396–400.
- [41] 韩双双. 加味逍遥散干预抑郁症肝郁脾虚模型小鼠的作用研究 [D]. 广州: 南方医科大学; 2021.
- HAN S S. Study on the effect of Jiawei Xiaoyao powder on depression model mice with liver depression and spleen deficiency [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2021.
- [42] 刘玥芸, 郭晓玲, 赵宏波, 等. 逍遥散提取物对肝郁脾虚证模型大鼠疗效的行为学评价 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(7): 2138–2141.
- LIU Y Y, GUO X L, ZHAO H B, et al. Behavior evaluation of rat model with stagnation of liver qi and spleen deficiency syndrome regulating by Xiaoyao San extract [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(7): 2138–2141.
- [43] 周国儿, 吴静, 黄云娟, 等. “肝郁气滞”及“肝郁脾虚”型抑郁症动物模型建立初探 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(5): 1035–1038.
- ZHOU G E, WU J, HUANG Y J, et al. Study of mice models of liver-qi stagnation and liver-qi stagnation with spleen insufficiency depression [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(5): 1035–1038.
- [44] 孟丹华. HPA 轴对母婴分离“二次打击”模型小鼠阳虚肝郁证候形成的影响 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2024.
- MENG D H. Effect of HPA axis on the formation of Yang Deficiency and liver depression syndrome in mice with a “Second-Hit” model of maternal separation [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2024.
- [45] 余楷杰, 高静静, 巩子汉, 等. 母婴分离/束缚应激模型小鼠海马小胶质细胞变化及温阳解郁方的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 49–57.
- SHE K J, GAO J J, GONG Z H, et al. Changes of microglia in hippocampus of mice induced by maternal separation with restraint stress and regulatory effect of Wenyang Jieyu prescription [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(18): 49–57.
- [46] 刘萌萌, 路静, 李唯嘉, 等. 3 种抑郁症大鼠模型代谢组学的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(16): 149–159.
- LIU M M, LU J, LI W J, et al. Comparison of metabolomics in three depression rat models [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(16): 149–159.
- [47] 曹灵修, 任路. 温肾通督针法对抑郁症肾阳虚证模型大鼠相关神经递质及 cAMP-RAF1 信号通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(1): 141–148.
- CAO L X, REN L. Effect of the warming kidney for dredging governor channel acupuncture method on related neurotransmitters and the cAMP-RAF1 signal pathway on depression with kidney Yang deficiency syndrome model rats [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(1): 141–148.
- [48] 李清宋, 乔欣, 候梦雨, 等. 鳖血制柴胡抑制其偏性及对肝阴虚证大鼠的保护作用 [J/OL]. [2025-05-21]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250339>.
- LI Q S, QIAO X, HOU M Y, et al. Study on inhibition of side effect and effect on liver yin deficiency syndrome by making bupleuri radix with trionyx sinensis blood [J/OL]. [2025-05-21]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki>.

- syfjx. 20250339.
- [49] 彭炎, 张亚大. 肾虚与性激素研究现状 [J]. 黑龙江中医药, 2003, 32(6): 50-52.
PENG Y, ZHANG Y D. Current research status of kidney deficiency and sex hormones [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2003, 32(6): 50-52.
- [50] 陈晓阳, 陈容, 李晟, 等. 肾虚抑郁症大鼠模型的建立及评价 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(5): 28-31.
CHEN X Y, CHEN R, LI S, et al. Establishment and evaluation on experimental model of kidney-Yin deficiency and depression syndrome [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan, 2007, 27(5): 28-31.
- [51] 史冰, 李晟, 陈晓阳, 等. 忧虑康液对抑郁肾虚模型大鼠的滋肾阴作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 171-175.
SHI B, LI S, CHEN X Y, et al. The effect of you Lv Kang on the model rat of kidney-Yin deficiency and depression syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2010, 16(5): 171-175.
- [52] 巫晓慧, 王君明, 秦玲玉, 等. 生地黄抗抑郁性别差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(19): 5326-5336.
WU X H, WANG J M, QIN L Y, et al. Gender differences in antidepressant effect of raw Rehmanniae Radix [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(19): 5326-5336.
- [53] 巫晓慧, 王君明, 秦玲玉, 等. 滋阴清热功效助力生地黄抗抑郁作用探究 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(5): 2340-2349.
WU X H, WANG J M, QIN L Y, et al. Exploration on the antidepressant effects of Rehmanniae Radix based on the efficacy of nourishing Yin and clearing heat [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 38(5): 2340-2349.
- [54] LIM E J, AHN Y C, JANG E S, et al. Systematic review and meta-analysis of the prevalence of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME) [J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 100.
- [55] 李悦, 韩秀珍, 徐秋露, 等. 慢性疲劳综合征动物模型的构建与评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(9): 234-242.
LI Y, HAN X Z, XU Q L, et al. Establishment and evaluation of animal models of chronic fatigue syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(9): 234-242.
- [56] 田骄, 苏芮, 王婷婷, 等. 聚肌胞苷酸复合游泳诱导的慢性疲劳综合征模型小鼠行为学及性别差异研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 24-33.
TIAN J, SU R, WANG T T, et al. Strain and gender differences in behavioral models of chronic fatigue syndrome induced by polyinosinic-polycytidylic acid and swimming in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 24-33.
- [57] 彭敏, 马宏博, 司国民. 慢性疲劳综合征中医证候及证素特点的文献评析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(6): 691-693.
PENG M, MA H B, SI G M. A literature review on Chinese medicine syndrome and syndrome elements of chronic fatigue syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2014, 34(6): 691-693.
- [58] 谢亚娜, 嵇波, 张琴, 等. 电针对肝郁脾虚型慢性疲劳综合征大鼠血清炎症因子及肠道菌群的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(11): 63-68.
XIE Y N, JI B, ZHANG Q, et al. Effects of electroacupuncture on serum inflammatory cytokines and intestinal flora in chronic fatigue syndrome rats with liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(11): 63-68.
- [59] 冯玉华, 杨育同, 王坤芳. 脾气虚慢性疲劳型亚健康状态大鼠模型的构建及评估 [J]. 山西中医学院学报, 2015, 16(3): 21-23.
FENG Y H, YANG Y T, WANG K F. Construction and evaluation of spleen-deficiency type sub-health state of chronic fatigue rat model [J]. J Shanxi Coll Tradit Chin Med, 2015, 16(3): 21-23.
- [60] 贺恋词. 基于分子对接方法探究药膳神仙粥对慢性疲劳综合征脾肾阳虚证大鼠的免疫调节机制 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2020.
HE L C. Effects of Shenxianzhou on immunoregulatory mechanism of chronic fatigue syndrome rats with spleen and kidney Yang deficiency based on molecular docking [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [61] 卢秋玉, 刘金花, 宾彬, 等. 参杞强精颗粒对慢性疲劳综合征脾肾阳虚证大鼠免疫调节作用研究 [J]. 世界中医药, 2024, 19(7): 969-974.
LU Q Y, LIU J H, BIN B, et al. Study on the immunoregulatory effect of Shenqi qiangjing granules on chronic fatigue syndrome with spleen-kidney Yang deficiency in rats [J]. World Chin Med, 2024, 19(7): 969-974.
- [62] 王宇航, 魏小丽, 宋石龙, 等. 机械推拿对慢性疲劳综合征肾虚型大鼠行为学及血清 IL-1 β 、IL-6 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5): 1235-1237.
WANG Y H, WEI X L, SONG S L, et al. Effects of mechanical massage on behavior and serum IL-1 β and IL-6 in rats with chronic fatigue syndrome of kidney deficiency [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(5): 1235-1237.
- [63] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020 年中国肠易激综合征专家共识意见 [J]. 中华消化杂志, 2020, 40

- (12): 803–818.
- Collaborative Group For Gastrointestinal Functional Diseases, Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association; Gastrointestinal Motility Group, Chinese Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association. Expert consensus on irritable bowel syndrome in China in 2020 [J]. *Chin J Dig*, 2020, 40(12): 803–818.
- [64] MUNJAL A, DEDANIA B, CASH B. Update on pharmacotherapy for irritable bowel syndrome [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2019, 21(6): 25.
- [65] 马晓玲, 夏提古丽·阿不利孜, 石磊岭, 等. 慢性束缚应激联合特殊饮食制备腹泻性肠易激综合征(IBS-D) 大鼠模型的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 12–17.
- MA X L, XIATIGULI A B L Z, SHI L L, et al. Establishment of diarrhea-predominant of irritable bowel syndrome (IBS-D) model rats by chronic restraint stress and a specialized diet [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(7): 12–17.
- [66] 赵迎盼, 唐旭东, 卞兆祥, 等. IBS-D 肝郁脾虚型病症结合大鼠模型的建立与评价的初步研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(11): 1507–1514.
- ZHAO Y P, TANG X D, BIAN Z X, et al. Preliminary study of establishing and assessing IBS-D model rats of Gan stagnation and pi deficiency syndrome [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2013, 33(11): 1507–1514.
- [67] 涂星, 柴玉娜, 唐洪梅, 等. 肝郁脾虚型肠易激综合征便秘大鼠模型的建立和评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 30–34.
- TU X, CHAI Y N, TANG H M, et al. Establishment and evaluation of a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome with liver-stagnation and spleen-deficiency [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(1): 30–34.
- [68] 张智铁. 痛泻要方治疗肝郁脾虚型 D-IBS 合并 T2DM 的作用研究及代谢分析 [D]. 镇江: 江苏大学; 2023.
- ZHANG Z Y. Effect and metabolic analysis of Tongxieyaofang in the treatment of T2DM and D-IBS of liver-depression and spleen-deficiency type [D]. Zhenjiang: Jiangsu University; 2023.
- [69] 何佳慧, 何杰滢, 张百荣, 等. 肝郁证便秘型肠易激综合征模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1555–1563.
- HE J H, HE J Y, ZHANG B R, et al. Establishment and evaluation of constipated irritable bowel syndrome model with liver depression syndrome [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(12): 1555–1563.
- [70] 徐秋颖, 韩佩玉. 肠易激综合征慢性轻度不可预见性应激联合脾胃湿热动物模型的建立及评价 [J]. *湖南中医杂志*, 2015, 31(6): 149–151.
- XU Q Y, HAN P Y. Establishment and evaluation of an animal model combining chronic unpredictable mild stress and spleen-stomach damp-heat of irritable bowel syndrome [J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2015, 31(6): 149–151.
- [71] 艾宜婧. 四神丸对腹泻型肠易激综合征脾肾阳虚证大鼠血清 VIP、MOT、SP、5-HT 水平影响的研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学; 2023.
- AI Y J. Research on the effects of Sishen Pills on the serum levels of VIP, MOT, SP and 5-HT in rats with spleen-kidney Yang deficiency syndrome of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [D]. Nanchang: Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 2023.
- [72] 陈冬雪, 钱占红, 夏聪媛, 等. 对 Ghrelin/GHSR-1a/GABA 通路关键因子在胃食管反流病肝郁证模型中表达水平的研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(6): 519–526.
- CHEN D X, QIAN Z H, XIA C Y, et al. Study on the expression levels of Ghrelin/GHSR-1a/GABA pathway key factors in models of gastroesophageal reflux disease with liver constraint pattern [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2021, 44(6): 519–526.
- [73] 姜珊, 罗卓, 梁磊, 等. 情志应激激活潜伏单纯疱疹病毒 1 型建立“肝郁化火”动物模型的研究 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(4): 466–471, 476.
- JIANG S, LUO Z, LIANG L, et al. Establishing an animal model of emotional stress activated latent HSV-1 for TCM theory “liver qi stagnation forming huo” [J]. *World Chin Med*, 2022, 17(4): 466–471, 476.
- [74] 阮璐薇, 张鹏横, 黄睿婷, 等. 去势法联合慢性不可预知性温和应激法建立围绝经期综合征肝郁证动物模型的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 394–397.
- RUAN L W, ZHANG P H, HUANG R T, et al. Castration combined with chronic unpredictable mild stress to establish animal model of liver depression pattern of perimenopausal syndrome [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(1): 394–397.
- [75] 陈帅, 陆登成, 石安华, 等. 高血压肝郁化火证病证结合动物模型的建立与评价 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(4): 1018–1021.
- CHEN S, LU D C, SHI A H, et al. Establishment and evaluation of animal model of hypertension with liver depression and fire syndrome combined with disease and syndrome [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(4): 1018–1021.
- [76] 刘涛, 王伟. 证候动物模型研究的思索 [J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(9): 550–551.
- LIU T, WANG W. Thoughts on the research of syndrome animal models [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2006, 21(9): 550–551.

[77] 郭淑贞, 王伟. 中医证候形成的“三因”理论 [J]. 中医杂志, 2020, 61(17): 1493–1497.
GUO S Z, WANG W. The “three causes” theory of traditional Chinese medicine syndrome formation [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(17): 1493–1497.

[78] 王竹风, 汪宝军, 岳广欣, 等. 中医药在应激研究中的近况 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(10): 1671–1673.

WANG Z F, WANG B J, YUE G X, et al. Recent developments of traditional Chinese medical science in stress study [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2009, 36(10): 1671–1673.

[收稿日期] 2024–11–20

富血小板血浆治疗和未治疗雄激素性脱发患者 相关微生物群的特征

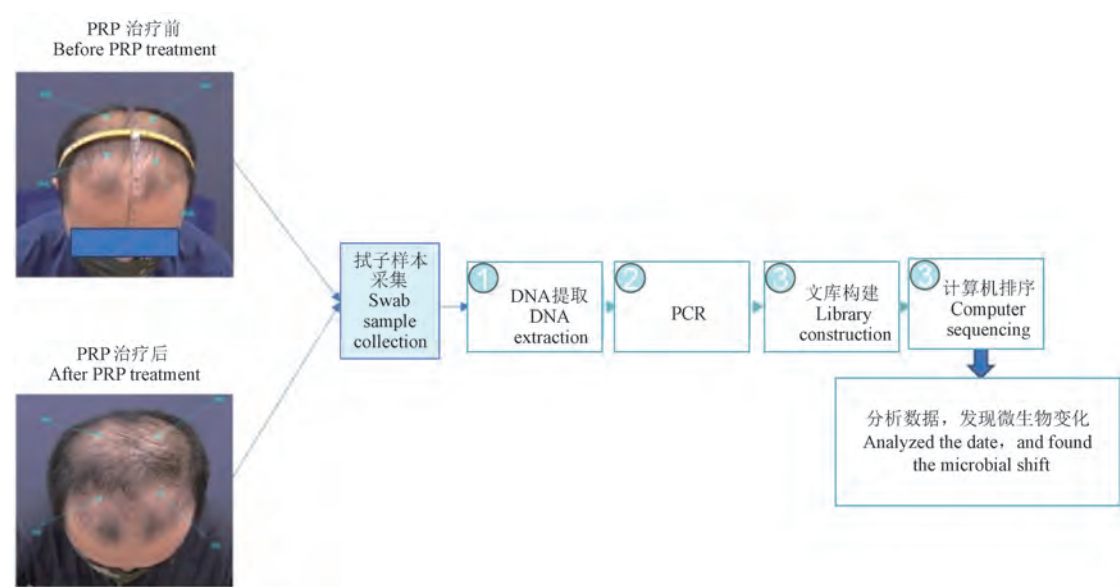
研究背景:雄激素性脱发(androgenetic alopecia, AGA)是男性最常见的脱发类型,关于富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)治疗脱发的研究很多。人体头皮中含有庞大的微生物群,但其在脱发过程中的作用仍不明确,PRP 与微生物群之间的关系也有待进一步研究。因此,本研究旨在探讨 PRP 治疗对头皮微生物群组成的影响。

研究方法:本研究对 14 名 AGA 患者进行了 PRP 治疗,观察了他们的临床疗效,并收集了治疗前后的头皮拭子样本。通过扩增 16s RNA 基因的 V3 ~ V4 区域并进行细菌鉴定测序,对治疗前后 AGA 患者的头皮微生物区系进行表征分析。

研究结果:结果表明,PRP 对 AGA 患者的治疗效果显著,毛发生长速度明显加快。微生物群相对丰度分析结果表明,治疗后,头皮微生物群中的金黄色葡萄球菌(*g_Cutibacterium*)增加,葡萄球菌(*g_Staphylococcus*)减少,在头皮微生物群中发挥稳定作用。此外,劳森氏菌(*g_Lawsonella*)减少,表明治疗后头皮油脂分泌减少。

研究结论:研究结果表明,PRP 可通过重新平衡头皮微生物群来治疗 AGA。

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):106–113. doi: 10.1002/ame2.12414)。



蔡威威,甘嘉颖,余靖斌,等. 先天性纯红细胞再生障碍性贫血实验模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33 (6): 905-913.

CAI W W, GAN J Y, YU J B, LI H L, et al. Research progress on experimental models of Diamond-Blackfan anemia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 905-913.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.012

先天性纯红细胞再生障碍性贫血 实验模型研究进展

蔡威威,甘嘉颖,余靖斌,李慧伶,吴佳卉,王雪,熊东花,王学耕,梁芳*

(华南师范大学生命科学学院,广州 510613)

【摘要】 先天性纯红细胞再生障碍性贫血(Diamond-Blackfan anemia, DBA)是一种罕见的遗传性疾病,其特征为骨髓衰竭、先天性畸形和严重的红细胞发育异常。鉴于 DBA 的发病率较低,患者群体有限,且缺乏足够的研究模型,对于基因突变如何导致 DBA 的具体病理机制仍存在许多未知,临床上针对 DBA 的治疗手段也相当有限。本文综述了在 DBA 研究中所开发的斑马鱼模型、小鼠模型和人类细胞模型进而阐明 DBA 的病理机制,并对进入临床试验的药物进行了追踪,为深入探究 DBA 的发病机制和药物开发提供了重要参考。

【关键词】 先天性纯红细胞再生障碍性贫血;细胞模型;斑马鱼模型;小鼠模型;药物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0905-09

Research progress on experimental models of Diamond-Blackfan anemia

CAI Weiwei, GAN Jiaying, YU Jingbin, LI Huiling, WU Jiahui, WANG Xue, XIONG Donghua,
WANG Xuegeng, LIANG Fang*

(School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510613, China)

Corresponding author: LIANG Fang. E-mail: rachel81@m.scnu.edu.cn

【Abstract】 Diamond-Blackfan anemia (DBA), also known as congenital pure red cell aplasia, is a rare genetic disorder characterized by bone marrow failure, congenital anomalies, and severe red blood cell abnormalities. The rarity of the condition, and consequently limited patient pool and scarcity of research models, means that the pathogenic mechanisms associated with genetic mutations in DBA remain uncertain, and the clinical treatment options are limited. This review synthesizes the findings from zebrafish, mouse, and human cellular models of DBA mutations. We clarify the pathogenic mechanisms and monitor the progression of drugs into clinical trials, thereby aiding further in-depth explorations into the etiology and therapeutic advancements for DBA.

【Keywords】 Diamond-Blackfan anemia; cell model; zebrafish model; mouse model; drug

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

【基金项目】 国家自然科学基金(32300692),中国博士后科学基金项目(2023M741235),华南师范大学课外科研金种子培育项目(24SKKB01)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (32300692), China Postdoctoral Science Foundation (2023M741235), Extracurricular Research Golden Seed Cultivation Project of South China Normal University (24SKKB01).

【作者简介】 蔡威威,男,在读本科生,研究方向:生物科学。Email:20221331029@m.scnu.edu.cn

【通信作者】 梁芳,女,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:疾病模型。Email:rachel81@m.scnu.edu.cn

先天性纯红细胞再生障碍性贫血 (Diamond-Blackfan anemia, DBA) 是一种罕见的先天性纯红细胞发育不全的疾病,以大细胞性贫血、骨髓衰竭为主要患病特征,并伴有生长迟缓、先天性畸形、罹患癌症的风险增高等临床症状^[1-3]。目前已知 *RPS19*、*RPL5*、*RPL11* 等 24 个核糖体蛋白 (ribosomal protein, RP) 基因以及 *GATA-1*、*EPO*、*P53* 等 6 个非核糖体基因的突变会导致 DBA 的发生^[2]。目前治疗策略主要包括以糖皮质激素为主的药物治疗、输血和造血干细胞移植。糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 长期使用时会出现耐药性以及一系列不良反应,包括骨质疏松症、皮肤萎缩、糖尿病等^[4],而长期输血会导致患者体内铁负荷过多,继发血色病^[5],唯一的永久性治疗方法是造血干细胞移植,因此基因治疗具有很大的开发潜力^[6]。

实验模型对于了解疾病的发生机制十分重要,并且还能治疗效果和安全性评估提供帮助。本文将探讨细胞、斑马鱼、小鼠的 DBA 模型的最新进展以及 DBA 治疗药物的最新研究,以期推动 DBA 治疗策略的发展。

1 DBA 细胞模型研究

1.1 RP 单倍体剂量不足的祖细胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC)/红系祖细胞-1 (human umbilical cord blood-derived erythroid progenitor-1, HUDEP-1) 细胞

BHOOPALAN 等^[7]利用 CRISPR/Cas9 在 CD34⁺造血干细胞和 HSPC 中构建了 *RPS19* 单倍体剂量不足的 DBA 模型,该模型表现出红系细胞选择性缺陷,这是由红细胞在红系爆式形成单位 (burst forming unit-erythroid, BFU-E) 到红系集落形成单位 (colony forming unit-erythroid, CFU-E) 的过渡过程中部分发育阻滞造成的, *P53* 的异常激活被认为是红系发育受损的原因,并且在 DBA 患者中能观察到类似现象^[8]。类似的,PIANTANIDA 等^[9]利用 RNA 干扰沉默人脐带血来源的 HUDEP-1 中 *RPS26* 的表达,以模拟 DBA 患者中观察到的 RP 单倍体功能不全,发现细胞凋亡增加,以及红系细胞分化受损。但 *RPS26* 的下调并没有改变 *P53* 的表达,说明在该模型中

P53 不是细胞凋亡增加的主要原因。除此之外,RP 单倍体不足可能通过羟腐胺赖氨酸作用影响红细胞分化。GONZALEZ-MENENDEZ 等^[10]发现 *RPL11* 单倍体不足的 DBA 患者的 CD34⁺祖细胞中,羟腐胺赖氨酸修饰水平和真核翻译起始因子 5A 水平比对照组低 6 倍多。

1.2 *RPS7* 杂合突变的 U2OS 骨肉瘤细胞系

KUBICKOVA 等^[11]利用 CRISPR/Cas9 介导的同源重组法在人 U2OS 骨肉瘤细胞系中建立了携带 DBA 新型杂合 *RPS7* 基因 (基因组坐标: hg38 chr2:g. 3, 580, 153 G > T p. V134F) 的细胞模型。*RPS7* p. V134F 导致核糖体功能障碍,因此 *RPS7*-mut 细胞系的整体蛋白合成与对照组相比显著减少。在失调的蛋白中,MDM2 水平显著下降,同时 *P21* 水平增加 68%,而 *P53* 水平保持不变,而 β -catenin 水平增加了 75%,表明 *RPS7*-mut 细胞系产生了一种新的核糖体应激补偿机制——典型 Wnt 通路。

1.3 氧化磷酸化通路被抑制的 HSPC

氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 通过线粒体电子传递链产生细胞所需的大部分能量。在许多 DBA 患者中,无论是否有 RP 突变,OXPHOS 通路都受到干扰。在已建立的 RP 基因突变的斑马鱼 DBA 模型中,OXPHOS 通路未受到干扰,提示 OXPHOS 并非 DBA RP 致病因子的下游途径,而是在 DBA 患者中存在的另一种致病途径^[12]。XIAO 等^[13]通过抑制 OXPHOS 建立的 DBA 细胞模型再现了 DBA 在红细胞祖细胞分化、核糖体生物起源和血红素生物合成方面的大多数缺陷,并证明 OXPHOS 激活剂 CoQ10 处理 DBA 细胞能起到拯救作用。被抑制的 OXPHOS 通路通过干扰红细胞分化过程中的能量转换而导致 DBA 患者的红细胞缺陷,通过抑制 RNA 运输途径破坏核糖体的生物发生,并且通过降低了核糖体的可用性,干扰血红素和核糖体之间的相互作用,导致血红素生物合成缺陷。

2 DBA 斑马鱼模型的研究

2.1 *rps19*

RPS19 突变是最先在 DBA 患者中发现的,ZHANG 等^[14]利用 TALEN 在斑马鱼中生成了 *rps19* 突变体。*rps19* 突变体在受精后 3 d (3 days

post fertilization, 3 dpf) 头部与眼睛发育不良, 出现水肿, 并在 5 dpf 后死亡。该突变导致红细胞的急剧减少一半以上, 血红蛋白(hemoglobin, Hb)合成减少, 细胞周期阻滞和细胞凋亡增加, 淋巴 T 细胞几乎缺失、珠蛋白基因的 RNA 和蛋白质水平不同、以及 p53 上调了 3 倍以上, 但其他髓系细胞不受影响^[15-17]。*rps19* 突变体可以通过注射野生型 *RPS19* mRNAs、L-亮氨酸、肿瘤坏死因子- α 抑制剂益赛普可以挽救红系细胞等发育缺陷^[18]。

2.2 *rpl11*

rpl11 参与调节斑马鱼胚胎中的多种生物过程, 特别是造血铁代谢相关途径。ZHANG 等^[14]利用吗啉(morpholino)技术建立了 *rpl11* 缺陷的斑马鱼模型。敲低 *rpl11* 会导致大脑较小、尾部畸形和造血缺陷以及心包水肿。与 *rps19* 类似, *rpl11* 突变体淋巴 T 细胞缺失、造血干细胞减少、p53 通路激活、珠蛋白基因的 RNA 和蛋白质水平不同^[14], 继而导致 *rpl11* 突变体中红细胞的蛋白质生成减少, 表现出贫血。此外, 与细胞周期阻滞和与铁代谢的基因表达如 *alas2*、*cp*、*fth1a/b*、*htt*、*aco2*、*slc25a37*、*sfxn1*、*tfa* 和 *tfr1b* 发生改变^[19], 表明斑马鱼的 *rpl11* 缺陷影响铁代谢的多个方面, 继而影响细胞造血^[20]。

2.3 *rps29*

TAYLOR 等^[21]通过吗啉技术建立了 *rps29* 缺陷的斑马鱼模型。*rps29* 突变会导致在早期发育过程中造血干细胞减少和头部区域细胞凋亡增加, 继而导致晚期红细胞生成缺陷。同时也有代谢途径的异常调节, 从糖酵解转变为有氧呼吸, 包括生物合成减少、参与葡萄糖生成的基因上调、分解代谢增加。*rps29* 敲低模型由于腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)和黄嘌呤脱氢酶/氧化酶的上调, 其核苷酸代谢也受到影响^[17, 22]。*rps29* 突变导致的造血缺陷同样依赖于 p53 的激活^[21-22]。

2.4 *rpl18*

CHEN 等^[23]使用 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼中建立了 *rpl18*^{-/-}突变体, 形态学上, 纯合子突变体在 24 hpf 时出现头部发育不全, 在 30 hpf 和 2 dpf 之间, 小眼、小头和后脑脑室膨胀, 3 dpf 时, 心包逐渐增大并出现水肿, 体长下降, 躯干出现发育不良, 至 4 dpf 左右突变致死。*rpl18* 突变体

不能被 *rpl18* mRNA (p. L51 S) 拯救, 同时发现 p53 激活和 Jak2-Stat3 信号通路激活导致红细胞成熟阻滞^[23]。

2.5 其他突变

rpl17 突变体模拟了 DBA 患者的贫血和颅面畸形的病症, 这可能是由核糖体生成速率降低和核糖体生物合成缺陷引发的应激反应所导致的^[24]。*epoa* 缺陷突变体表现出类 DBA 的表型, 粒细胞、巨噬细胞、血小板和淋巴细胞发育未受影响, 且红细胞生成刺激剂能显著改善突变体的贫血症状^[25]。

3 DBA 小鼠模型的研究

3.1 *Rps19*、*Rpl11* 和 *Rpl15*

Rps19、*Rpl5*、*Rpl11* 的小鼠模型在一定程度上都模拟了 DBA 患者的造血功能异常。不同的是, *Rps19* 模型是通过 RNA 干扰实现基因调控而得到的, *Rpl5* 和 *Rpl11* 模型则是通过诱导基因突变得到的。*Rpl5* 突变小鼠呈现出红细胞成熟延迟贫血表型的动态变化, *Rpl11* 突变小鼠除贫血外还表现出易患淋巴瘤, 并且涉及 cMYC 水平异常升高^[26-28]。

3.2 其他 RP 基因

Rps6 条件性敲除小鼠模型发生肢体发育缺陷, 包括桡骨发育不全和手指形成缺陷。*Rps6* 缺失后, 控制肢体发育的相关基因翻译显著减少, 可以通过敲低 p53 或翻译抑制因子 4E-BP1 来挽救, 说明 P53 至少部分地通过转录激活 4E-BP1 来调控蛋白质合成^[29]。*Rps12*^{KO/+} 的小鼠处于静止状态的 HSPC 明显减少, HSPC 中全局翻译水平提高, MEK/ERK 和 AKT/mTOR 通路过度激活说明 RPS12 在造血干细胞功能中具有重要的调节作用^[30]。

3.3 非 RP 基因

Gata1s 缺失突变小鼠有细胞自主性的贫血症状, 巨核细胞和红细胞前体异常, 以及随着年龄增长会出现骨髓和脾缺陷, 并且这种贫血表型是细胞自主性的^[31]。*Flvcr1* 缺失导致血红素无法正常排出细胞外, 从而在细胞内积累并产生毒性。这种积累会引发炎症反应、细胞凋亡以及铁死亡。铁螯合剂可以通过降低细胞内铁水平, 减少血红素的合成, 进而缓解细胞毒性。值得注意

的是,残留的突变型 DBA 红细胞可能抑制经过校正的 HSPC 的红细胞生成。这一现象对于开发 HSPC 基因疗法和 DBA 的非清髓性移植策略具有重要意义^[32]。

4 临床治疗中的 DBA 研究

4.1 致病机制

研究表明,DBA 的发病机制与 p53 的激活有关。*RPS19* 单倍体功能不全可导致造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)中的 P53 依赖性缺陷,进而引发造血异常^[7]。其机制可能是 *RPS19* 缺失破坏核仁核糖体组装,使其他 RP 积累如 *RPL5* 和 *RPL11* 在核质中积累,通过抑制 MDM2 间接激活 P53。此外,RP 的缺陷也可能诱导 PIM1 和 AKT 抑制激酶,导致 MDM2 抑制,并诱导 *RPL26* 和核仁素,从而激活 P53^[33-35]。

DBA 的致病机制不仅涉及 p53 通路,还可能与 mTOR 通路相关,激活 mTOR 通路可缓解贫血^[36],此外,*rpl18* 或核仁蛋白 *nop56* 缺陷可导致 p53 和 Jak2-Stat3 通路异常激活。Stat3 激活抑制 Gata1,进而沉默红系细胞中 γ -珠蛋白基因,导致红系细胞减少^[23,37]。EPO 突变可激活 STAT5,但减少 JAK2 介导的下游靶标磷酸化,这种偏倚信号传导也与 DBA 发病相关^[38]。

GATA1 缺乏也可能是 DBA 的成因之一。*RPL11* 突变体中 HSP70 蛋白表达降低,导致 GATA1 在红系分化过程中易被天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶-3 (cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase-3) 裂解,从而阻断红系祖细胞增殖并诱导细胞凋亡,最终减少 BFU-E 和 CFU-E 祖细胞^[39]。*TSR2* 突变体中 *TSR2* 的抑制会选择性降低 GATA1 蛋白水平,损害红系谱系的分化,或导致造血过程中核糖体生成功能丧失^[40]。

最近还有研究表明,活化的 Nemo 样激酶可能通过抑制早期红细胞生成过程中所需的线粒体生物生成的关键上调,参与 DBA 的发病机制^[41]。在正常红细胞生成过程中,mTORC1 会促进线粒体转录因子 A 和抑制素 2 的翻译上调,增加线粒体的生物生成。但在 DBA 患者细胞中,活性 Nemo 样激酶通过磷酸化 mTORC1 的调节成分,抑制其活性,进而阻止了 mTORC1 介导的线

粒体转录因子 A 和抑制素 2 上调以及线粒体生物生成,最终导致异常红细胞生成。

4.2 临床药物

目前 DBA 的临床治疗主要依赖糖皮质激素,其通过增加红系祖细胞中的 IFN 信号,重置细胞周期进程并中和核仁应激,从而改善贫血症状。这表明 IFN 干扰素可能成为 DBA 的潜在替代治疗策略^[42]。由于 GC 长期使用导致的耐药性和副作用,开发更高效、低毒的替代药物成为 DBA 治疗的重要方向。目前有多种潜在药物处于研究或临床试验阶段,包括比托派汀(bitopertin)、三氟拉嗪(trifluoperazine)、索他西普(sotatercept)、艾曲波帕(eltrombopag)、SMER28 和达那唑。

L-亮氨酸(L-leucine)是首个在 DBA 斑马鱼模型中被发现可改善贫血的分子,通过 mTOR 通路调节细胞蛋白合成^[43]。2007 年,POSPISILOVA 等^[36]首次报道其在 DBA 患者红细胞生成中的应用,6 个月治疗后患者 Hb 水平提升 55%。2020 年一项临床试验中,43 名依赖输血的 DBA 患者在每日服用 L-亮氨酸 9 个月后,4.7% 的患者 Hb > 9 g/dL 且不再依赖输血,11.6% 的患者 Hb < 9 g/dL 但网织红细胞计数增加,83.7% 的患者无明显反应。此外,36% 和 44% 的患者体重和线性生长速度分别增加^[44]。这表明 L-亮氨酸可改善贫血,并显著改善 DBA 患者的生长迟缓。

艾曲波帕是一种血小板生成素受体激动剂,兼具细胞内铁螯合活性,可限制血红素合成以改善红细胞缺陷^[32]。它在治疗中度再生障碍性贫血和单个 *RPS19* 突变的低增殖性非谱系 DBA 患者中表现出良好疗效,服药 6 个月后患者 Hb 可超过 10 g/dL^[32,45]。然而,在 2023 年一项针对难治性 DBA 的临床试验中,15 名患者中仅 1 名达到 Hb 持续改善和红细胞输注频率降低超 50% 的标准,且 41% 的患者因血小板增多症需调整剂量或停药^[46]。

索他西普(ACE-011)是一种重组融合蛋白,可抑制 TGF- β 超家族成员(如 GDF-11 和激活素 B)^[47]。EAR 等^[48]发现其小鼠同源物 RAP-011 在斑马鱼 DBA 模型(*rps19* 和 *rpl11* 敲低)中,通过阻断激活素/Lefty1 信号通路,可提高红细胞水平。但在 2023 年的临床试验中,13 名接受索他西普皮下注射的患者均未表现出疗效^[49]。

4.3 基因治疗

基因编辑 HSPC 用于造血干细胞移植可避免传统移植中供体稀缺、排斥反应及 DBA 突变携带者等风险,为 DBA 治疗提供潜在方案。基于慢病毒载体(lentivirus, LVs)或 CRISPR/Cas9 非整合慢病毒(non-integrating lentiviruses, NILVs)的基因转导是基因治疗的主要可能途径。LVs 能通过将病毒基因组整合到宿主基因组中确保目的基因的表达。GIMÉNEZ 等^[50]发现,经 PGK.CoRPS19 LV 慢病毒载体转导的 DBA 患者 CD34⁺细胞可恢复红细胞分化,并具有长期再生能力。VOIT 等^[51]提出一种通过慢病毒载体增加 GATA1 表达的策略,有望对多数 DBA 患者有效。NILVs 可使病毒基因组以片段形式在宿主细胞中长期存在。UCHIDA 等^[52]基于 NILVs 开发了用于纠正镰状细胞病突变的 Cas9 蛋白递送载体。尽管 NILVs 尚需进一步开发以用于 DBA 治疗,但 CRISPR/Cas9 在治疗 SCD 和 β -地中海贫血中的成功应用,展现了其纠正 DBA 突变的潜力^[53]。然而,基因治疗可能引发意外突变和激活致癌基因等风险不容忽视^[54]。此外,近期研究显示,CRISPR/Cas9 介导的同源定向修复技术可校正含 RPS19 杂合突变的诱导多能干细胞的体外分化和核型,为 DBA 的治疗和机制研究提供了新思路^[55]。

5 结论

DBA 模型是研究其致病机制的重要工具,不同模型各有优缺点。通过比较了不同的 DBA 模型(表 1),不难发现细胞模型有着培养快、微观研究精准等优势,从体内环境中独立出来,却无法模拟体内复杂的病理环境,例如 RPS7 杂合突变的 U2OS 骨肉瘤细胞模型由于排除了体内环境的影响,可精确验证突变对翻译活性、前体 rRNA 加工和 P53 信号通路的影响^[13]。与细胞模型相比,斑马鱼模型则具有完整的病理环境、繁殖快、胚胎透明等优点,适合用于药物高通量筛选和初步疗效验证,在临床实验中表现出疗效的 L-亮氨酸和艾曲波帕都是最先在斑马鱼的 DBA 模型中发现的。由于斑马鱼模型测试药物是溶解于水中进行全身被动扩散,因而其药物有效浓度可能远高于哺乳动物可耐受水平,例如 PANEY 等^[43]研究中使用的 L-亮氨酸剂量在毫摩尔范围内,需谨慎外推至临床应用。与前两者相比,小鼠模型繁殖周期较长,但病理环境和发育过程更接近人类,因此在验证药物有效性和安全性方面贡献显著。例如在 Rpl11 单倍体不足的小鼠模型和 Flvcr 缺失的小鼠模型中,验证了艾曲波帕通过螯合铁、限制血红素改善贫血的效果^[32],在 Rps19 缺陷小鼠模型中,验证了 L-亮氨酸的有效性^[56]。基

表 1 DBA 模型总结
Table 1 Summary of models of DBA

动物模型 Animal model	模型来源 Source	致病基因 Causative gene	典型表型和致病机制 Phenotype and pathogenesis	参考文献 References
人细胞系 Human cell line	造血干细胞 HSPCs	RPS19	红系细胞选择性缺陷;P53 通路异常激活 Erythroid cell selective deficiency; abnormal activation of P53 pathway	[7]
		RanGAP1	核糖体可用性下降、血红素合成受阻; 氧化磷酸化通路受阻 Decreased ribosome availability, blockage of heme synthesis; blockage of oxidative phosphorylation pathway	[59]
	人脐带血来源的 红细胞祖细胞-1 HUDEP-1	RPS26	红系细胞分化受损;P53 非依赖性机制 诱导细胞凋亡 Impaired erythroid cell differentiation; P53-independent mechanism induces apoptosis	[9]
		RPL11	红系细胞分化受损;羟腐胺赖氨酸作用 Impaired erythroid cell differentiation; hypusination	[10]
	人骨肉瘤细胞系 U2OS	RPS7	整体蛋白质合成显著降低;Wnt 通路激活 reduction of global protein synthesis; activation of Wnt pathway	[11]

续表 1

动物模型 Animal model	模型来源 Source	致病基因 Causative gene	典型表型和致病机制 Phenotype and pathogenesis	参考文献 References
斑马鱼 Zebrafish	—	<i>rps19</i>	畸形、红细胞分化受阻、淋巴细胞缺失; p53 和 mTOR 通路激活 Deformities, blocked red blood cell differentiation, lymphocyte deficiency; activation of p53 pathway and mTOR pathway	[14–18]
		<i>rpl11</i>	畸形、造血干细胞减少、淋巴细胞缺失;铁代谢受阻 Deformities, blocked red blood cell differentiation, and lymphocyte deficiency; impaired iron metabolism	[14, 19–20]
		<i>rps29</i>	红细胞生成缺陷、代谢异常;p53 通路激活 Defective erythropoiesis, metabolic abnormalities; activation of p53 pathway	[17, 21–22]
		<i>rpl18</i>	红细胞成熟受阻、畸形;p53 和 Jak2-Stat3 通路激活 Blockage of red blood cell maturation, deformities; activation of p53 pathway and Jak2-Stat3 pathway	[23]
		<i>rpl17</i>	贫血和颅面畸形;核糖体应激反应 Anemia and craniofacial abnormalities; ribosome stress response	[24–25]
		<i>Rps19</i>	巨细胞性贫血、生长迟缓;p53 通路过度激活 Macrocytic anemia, growth retardation; overactivation of p53 pathway	[26]
小鼠 Mouse	—	<i>Rpl11</i>	红细胞成熟受阻、贫血、癌症易感性;线粒体基因、 p53 和 Cdkn1 通路基因,以及 DNA 损伤检查点 基因的上调 Blockage of red blood cell maturation, anemia, cancer susceptibility; upregulation of mitochondrial genes, p53 and Cdkn1 pathway genes, and DNA damage checkpoint genes	[28]
		<i>Rpl5</i>	轻度贫血、网状红细胞和骨髓红细胞减少;未知 Mild anemia, reticulocytopenia and bone marrow erythrocyte decrease; unknown	[27]
		<i>Rps6</i>	肢体发育缺陷;P53 介导的翻译调控 通过诱导翻译抑制剂 4E-BP1 Limb development defects; P53-mediated translational regulation through induction of 4E-BP1, a translational repressor	[29]
		<i>Rps12</i>	造血干细胞明显减少;mTOR 通路过度激活 Reduction of HSPC; overactivation of mTOR pathway	[30]
		<i>Gata1s</i>	细胞自主性贫血、骨髓和脾缺陷;未知 Cell-autonomous anemia, bone marrow, and spleen defects; unknown	[31]
		<i>Fhcr1</i>	大红细胞性贫血、铁代谢异常;血红蛋白水平过高 Macrocytic anemia, abnormal iron metabolism; high hemoglobin levels	[32]

因突变在不同生物中可能表现出不同性状,因此在研究中需谨慎选择模型。例如,人类中致病的 *rps7* 和 *rps20* 突变在小鼠体内不会导致贫血症状^[57–58]。因此 DBA 模型的选择应根据研究目标

和具体需求进行权衡,综合考虑模型的优缺点以及其与人类病理的相关性,以确保研究结果的可靠性和临床转化潜力。

基因治疗(如病毒载体或基于多能干细胞的

策略)和以 L-亮氨酸为代表的替代疗法有望成为 DBA 治疗的新策略。基因治疗可通过纠正 DBA 突变或增加关键造血因子的表达来改善病情,但未来研究需着重降低潜在的未知突变风险。相比之下,替代疗法(如 L-亮氨酸)在不同患者中疗效存在差异,且可能伴随副作用,因此需要进一步优化以减轻相关不良反应。

参 考 文 献(References)

- [1] DA COSTA L, MOHANDAS N, DAVID-NGUYEN L, et al. Diamond-Blackfan anemia, the archetype of ribosomopathy: how distinct is it from the other constitutional ribosomopathies? [J]. Blood Cells Mol Dis, 2024, 106: 102838.
- [2] WLODARSKI M W, VLACHOS A, FARRAR J E, et al. Diagnosis, treatment, and surveillance of Diamond-Blackfan anaemia syndrome: international consensus statement [J]. Lancet Haematol, 2024, 11(5): e368-e382.
- [3] CHEN S, WARSZAWSKI J, BADER-MEUNIER B, et al. Diamond-blackfan anemia and growth status: the french registry [J]. J Pediatr, 2005, 147(5): 669-673.
- [4] MACEČKOVÁ Z, KUBÍČKOVÁ A, DE SANCTIS J B, et al. Effect of glucocorticosteroids in diamond-blackfan anaemia: maybe not as elusive as it seems [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1886.
- [5] VLACHOS A, MUIR E. How I treat Diamond-Blackfan anemia [J]. Blood, 2010, 116(19): 3715-3723.
- [6] VALE M, PROCHAZKA J, SEDLACEK R. Towards a cure for Diamond-Blackfan anemia: views on gene therapy [J]. Cells, 2024, 13(11): 920.
- [7] BHOOPALAN S V, YEN J S, MAYURANATHAN T, et al. An RPS19-edited model for Diamond-Blackfan anemia reveals TP53-dependent impairment of hematopoietic stem cell activity [J]. JCI Insight, 2023, 8(1): e161810.
- [8] ISKANDER D, WANG G, HEUSTON E F, et al. Single-cell profiling of human bone marrow progenitors reveals mechanisms of failing erythropoiesis in Diamond-Blackfan anemia [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(610): eabf0113.
- [9] PIANTANIDA N, VECCHIA M L, SCULCO M, et al. Deficiency of ribosomal protein S26, which is mutated in a subset of patients with Diamond Blackfan Anemia, impairs erythroid differentiation [J]. Front Genet, 2022, 13: 1045236.
- [10] GONZALEZ-MENENDEZ P, PHADKE I, OLIVE M E, et al. Arginine metabolism regulates human erythroid differentiation through hypusination of eIF5A [J]. Blood, 2023, 141(20): 2520-2536.
- [11] KUBICKOVA A, MACECKOVA Z, VOJTA P, et al. Missense mutation in RPS7 causes Diamond-Blackfan anemia via alteration of erythrocyte metabolism, protein translation and induction of ribosomal stress [J]. Blood Cells Mol Dis, 2022, 97: 102690.
- [12] WAN Y, ZHANG Q, ZHANG Z, et al. Transcriptome analysis reveals a ribosome constituents disorder involved in the RPL5 downregulated zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia [J]. BMC Med Genomics, 2016, 9: 13.
- [13] XIAO R, ZHANG L, XIN Z, et al. Oxidative phosphorylation pathway disruption is an alternative pathological mechanism leading to Diamond-Blackfan anemia [J]. bioRxiv, 2022, 3: 484221.
- [14] ZHANG Y, EAR J, YANG Z, et al. Defects of protein production in erythroid cells revealed in a zebrafish Diamond-Blackfan anemia model for mutation in RPS19 [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1352.
- [15] BIBIKOVA E, YOUN M Y, DANILOVA N, et al. TNF-mediated inflammation represses GATA1 and activates p38 MAP kinase in RPS19-deficient hematopoietic progenitors [J]. Blood, 2014, 124(25): 3791-3798.
- [16] DANILOVA N, BIBIKOVA E, COVEY T M, et al. The role of the DNA damage response in zebrafish and cellular models of Diamond Blackfan anemia [J]. Dis Model Mech, 2014, 7(7): 895-905.
- [17] UECHI T, NAKAJIMA Y, CHAKRABORTY A, et al. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia [J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(20): 3204-3211.
- [18] DANILOVA N, SAKAMOTO K M, LIN S. Ribosomal protein L11 mutation in zebrafish leads to hematopoietic and metabolic defects [J]. Br J Haematol, 2011, 152(2): 217-228.
- [19] AMSTERDAM A, NISSEN R M, SUN Z, et al. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(35): 12792-12797.
- [20] ZHANG Z, JIA H, ZHANG Q, et al. Assessment of hematopoietic failure due to Rpl11 deficiency in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia by deep sequencing [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 896.
- [21] TAYLOR A M, HUMPHRIES J M, WHITE R M, et al. Hematopoietic defects in rps29 mutant zebrafish depend upon p53 activation [J]. Exp Hematol, 2012, 40(3): 228-237.
- [22] YADAV G V, CHAKRABORTY A, UECHI T, et al. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 49: 1-7.

- [23] CHEN C, LU M, LIN S, et al. The nuclear gene *rpl18* regulates erythroid maturation via JAK2-STAT3 signaling in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 135.
- [24] FELLMANN F, SAUNDERS C, O'DONOHUE M F, et al. An atypical form of 60S ribosomal subunit in Diamond-Blackfan anemia linked to RPL17 variants [J]. *JCI Insight*, 2024, 9(17): e172475.
- [25] LING Y, WU J, LIU Y, et al. Establishment of a Diamond-Blackfan anemia like model in zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2024, 253(10): 906–921.
- [26] JAAKO P, FLYGARE J, OLSSON K, et al. Mice with ribosomal protein S19 deficiency develop bone marrow failure and symptoms like patients with Diamond-Blackfan anemia [J]. *Blood*, 2011, 118(23): 6087–6096.
- [27] YU L, LEMAY P, LUDLOW A, et al. A new murine *Rpl5* (*uL18*) mutation provides a unique model of variably penetrant Diamond-Blackfan anemia [J]. *Blood Adv*, 2021, 5(20): 4167–4178.
- [28] MORGADO-PALACIN L, VARETTI G, LLANOS S, et al. Partial loss of *Rpl11* in adult mice recapitulates Diamond-Blackfan anemia and promotes lymphomagenesis [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(4): 712–722.
- [29] TIU G C, KERR C H, FORESTER C M, et al. A p53-dependent translational program directs tissue-selective phenotypes in a model of ribosomopathies [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(14): 2089–2102.
- [30] FOLGADO-MARCO V, AMES K, CHUEN J, et al. Haploinsufficiency of the essential gene *Rps12* causes defects in erythropoiesis and hematopoietic stem cell maintenance [J]. *eLife*, 2023, 12: e69322.
- [31] LING T, ZHANG K, YANG J, et al. *Gata1s* mutant mice display persistent defects in the erythroid lineage [J]. *Blood Adv*, 2023, 7(13): 3253–3264.
- [32] DOTY R T, FAN X, YOUNG D J, et al. Studies of a mosaic patient with DBA and chimeric mice reveal erythroid cell-extrinsic contributions to erythropoiesis [J]. *Blood*, 2022, 139(23): 3439–3449.
- [33] ZHANG Y, WOLF G W, BHAT K, et al. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(23): 8902–8912.
- [34] SAGAR V, CALDAROLA S, ARIA V, et al. PIM1 destabilization activates a p53-dependent response to ribosomal stress in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 23837–23849.
- [35] CHEN J, GUO K, KASTAN M B. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (*RPL26*) in translational control of human p53 mRNA [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(20): 16467–16476.
- [36] POSPISILOVA D, CMEJLOVA J, HAK J, et al. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine [J]. *Haematologica*, 2007, 92(5): e66–367.
- [37] LIANG F, LU X, WU B, et al. Nucleolar protein 56 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and anemia via p53 and JAK2-STAT3 signaling [J]. *Biology (Basel)*, 2023, 12(4): 538.
- [38] KIM A R, ULIRSCH J C, WILMES S, et al. Functional selectivity in cytokine signaling revealed through a pathogenic EPO mutation [J]. *Cell*, 2017, 168(6): 1053–1064.
- [39] GASTOU M, RIO S, DUSSIOT M, et al. The severe phenotype of Diamond-Blackfan anemia is modulated by heat shock protein 70 [J]. *Blood Adv*, 2017, 1(22): 1959–1976.
- [40] KHAJURIA R K, MUNSCHAUER M, ULIRSCH J C, et al. Ribosome levels selectively regulate translation and lineage commitment in human hematopoiesis [J]. *Cell*, 2018, 173(1): 90–103.
- [41] WILKES M C, SHIBUYA A, LIU Y L, et al. Activation of Nemo-like kinase in Diamond Blackfan anemia suppresses early erythropoiesis by preventing mitochondrial biogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(8): 107542.
- [42] WANG B, WANG C, WAN Y, et al. Decoding the pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia using single-cell RNA-seq [J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 41.
- [43] PAYNE E M, VIRGILIO M, NARLA A, et al. L-Leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway [J]. *Blood*, 2012, 120(11): 2214–2224.
- [44] VLACHOS A, ATSIDAFTOS E, LABABIDI M L, et al. L-leucine improves anemia and growth in patients with transfusion-dependent Diamond-Blackfan anemia: results from a multicenter pilot phase I/II study from the Diamond-Blackfan anemia registry [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2020, 67(12): e28748.
- [45] FAN X, DESMOND R, WINKLER T, et al. Eltrombopag for patients with moderate aplastic anemia or uni-lineage cytopenias [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(8): 1700–1710.
- [46] NATIONAL HEART L, AND BLOOD INSTITUTE. Treatment of refractory Diamond-Blackfan anemia with eltrombopag [Z]. New York: ClinicalTrials.gov. 2023.
- [47] CARRANCIO S, MARKOVICS J, WONG P, et al. An activin receptor II A ligand trap promotes erythropoiesis resulting in a rapid induction of red blood cells and haemoglobin [J]. *Br J Haematol*, 2014, 165(6): 870–882.

- [48] EAR J, HUANG H, WILSON T, et al. RAP-011 improves erythropoiesis in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia through antagonizing lefty1 [J]. *Blood*, 2015, 126 (7): 880–890.
- [49] HEALTH N. Safety and efficacy study of sotatercept in adults with transfusion dependent Diamond Blackfan anemia (ACE-011-DBA) [Z]. New York: ClinicalTrials gov, 2023.
- [50] GIMÉNEZ Y, PALACIOS M, SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ R, et al. Lentivirus-mediated gene therapy corrects ribosomal biogenesis and shows promise for Diamond Blackfan anemia [J]. *JCI Insight*, 2024, 9(10): e171650.
- [51] VOIT R A, LIAO X, CAULIER A, et al. Regulated GATA1 expression as a universal gene therapy for Diamond-Blackfan anemia [J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(1): 38–52.
- [52] UCHIDA N, DRYSDALE C M, NASSEHI T, et al. Cas9 protein delivery non-integrating lentiviral vectors for gene correction in sickle cell disease [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 121–132.
- [53] INCORPORATED V P. Evaluation of efficacy and safety of a single dose of CTX001 in participants with transfusion-dependent β -Thalassemia and severe sickle cell disease [Z]. New York: ClinicalTrials gov; 2024.
- [54] WIENERT B, KYLE CROMER M. CRISPR nuclease off-target activity and mitigation strategies [J]. *Front Genome Ed*, 2022, 4: 1050507.
- [55] OSUNA M A L, HAN L, CONNELLY J P, et al. Generation of iPSC lines and isogenic gene-corrected lines from two individuals with RPS19-mutated Diamond-Blackfan anemia syndrome [J]. *Stem Cell Res*, 2024, 79: 103479.
- [56] JAAKO P, DEBNATH S, OLSSON K, et al. Dietary L-leucine improves the anemia in a mouse model for Diamond-Blackfan anemia [J]. *Blood*, 2012, 120 (11): 2225–2228.
- [57] MCGOWAN K A, LI J Z, PARK C Y, et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(8): 963–970.
- [58] WATKINS-CHOW D E, COOKE J, PIDSLEY R, et al. Mutation of the Diamond-Blackfan anemia gene Rps7 in mouse results in morphological and neuroanatomical phenotypes [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(1): e1003094.
- [59] ROWE R G, MANDELBAUM J, ZON LEONARD I, et al. Engineering hematopoietic stem cells: lessons from development [J]. *Cell stem cell*, 2016, 18(6): 707–20.

[收稿日期] 2024–12–03

《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://zgswdw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx>

期待您的来稿!

舒丽梅,王姝雯,白旭峰,等. 不同干预因素对动脉粥样硬化模型铁脂代谢的比较分析 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 914-924.

SHU L M, WANG S W, BAI X F, et al. Comparative analysis of different interventional factors on iron and lipid metabolism in an atherosclerosis model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 914-924.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.013

不同干预因素对动脉粥样硬化模型铁脂代谢 的比较分析

舒丽梅¹, 王姝雯¹, 白旭峰^{1,2}, 随伟红³, 陈兴光¹, 王城涵⁴, 胡慧明^{4,5*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 赣江中药创新中心, 南昌 330000; 3. 南昌大学, 南昌 330031;
4. 南昌医学院, 南昌 330052; 5. 江西省中医药管理局抗炎类中药药效与质量评价重点实验室, 南昌 330052)

【摘要】 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,其发生和发展涉及脂质代谢紊乱和铁代谢紊乱。建立理想的动物模型是研究 AS 病因、发病机制、预防及治疗措施的重要手段。AS 动物模型铁脂代谢紊乱的主要研究对象是小鼠和小型猪,其中主要是雄性 ApoE^{-/-}小鼠。单因素高脂饲料诱导 AS 铁脂代谢紊乱是 AS 铁脂代谢紊乱动物模型常用的建立方法,表现为脂质和铁代谢紊乱,具体表现为血脂水平升高、主动脉可见大量斑块与铁沉积、血清铁与肝铁增加明显,能更好地模拟人类因高脂饮食引发的动脉粥样硬化和铁脂紊乱。本文通过比较分析不同干预因素对 AS 动物模型铁脂代谢的影响,分析总结饮食诱导、化学物质干预、基因修饰等方式构建 AS 动物模型的方法,以期 AS 与代谢性疾病的研究及新药开发提供参考与借鉴。

【关键词】 动脉粥样硬化;脂质代谢;铁代谢;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0914-11

Comparative analysis of different interventional factors on iron and lipid metabolism in an atherosclerosis model

SHU Limei¹, WANG Shuwen¹, BAI Xufeng^{1,2}, SUI Weihong³, CHEN Xingguang¹,
WANG Chenghan⁴, HU Huiming^{4,5*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Ganjiang Chinese
Medicine Innovation Center, Nanchang 330000, China; 3. Nanchang University, Nanchang 330031, China;
4. Nanchang Medical College, Nanchang 330052, China; 5. Key Research Laboratory of Pharmacodynamics
and Quality Evaluation of Anti-inflammatory Chinese Medicines, Jiangxi Provincial Administration of
Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330052)

Corresponding author: HU Huiming. E-mail: huhm913@163.com

【Abstract】 Atherosclerosis (AS) is a chronic inflammatory disease involving disorders of lipid and iron metabolism. The establishment of suitable animal models is required to further the study of the etiology, pathogenesis,

【基金项目】 国家自然科学基金(82260794),江西省自然科学基金(20212BAB206013),江西省教育厅科技项目(GJJ2203502)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China (82260794), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212BAB206013), Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ2203502).

【作者简介】 舒丽梅,女,在读硕士研究生,研究方向:中药抗心血管与代谢性疾病。Email:shuguoguo241@163.com

【通信作者】 胡慧明,女,博士,副教授,研究方向:中药抗心血管与代谢性疾病。Email:huhm913@163.com

prevention, and therapeutic measures of AS. The main animal models of AS related to iron and lipid metabolism are mice and miniature piglets, especially male ApoE^{-/-} mice. Single-factor high-fat diet-induced iron and lipid metabolism disorders are a common type of AS model, manifesting as elevated blood lipid levels, large plaques and iron deposition in the aorta, and significant increases in serum and liver iron levels. This review compares the effects of different intervention factors on iron and lipid metabolism in AS animal models, and summarizes the method of establishing AS animal models using dietary induction, chemical intervention, and gene modification, to provide references and inspiration for future research into AS and metabolic diseases and the development of new drugs.

【Keywords】 atherosclerosis; lipid metabolism; iron metabolism; animal model

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

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种以脂质代谢紊乱、血管炎症反应和内皮功能障碍为主要病理特征的心血管疾病,具有较高的致病率和致死率的特点^[1]。作为心血管疾病的重要病理基础,动脉粥样硬化性心血管疾病主要包括缺血性心脏病、缺血性中风和外周动脉疾病等临床表型^[2],可导致全球三分之二动脉硬化相关性死亡^[3]。据全球疾病负担研究数据统计,2019 年心血管疾病导致的死亡人数占全球死亡总数的三分之一,成为威胁人类健康的首要因素^[4]。

脂质代谢紊乱是 AS 发生和发展的独立危险因素。AS 的发病机制始于脂质代谢紊乱,引发血脂异常,如血浆高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)水平降低和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)的水平升高^[5]。当 LDL 在受损血管内皮下附着,经活性氧(reactive oxygen species, ROS)修饰成氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)。巨噬细胞吞噬过量 ox-LDL 形成泡沫细胞,这些泡沫细胞不断积聚在血管中逐渐衍化成斑块;此外,ox-LDL 亦能诱发炎症和血管平滑肌细胞凋亡导致纤维帽变薄,引发斑块破裂,最终形成血栓^[6]。因此,从源头开始改善血脂代谢紊乱是目前治疗 AS 的常用手段^[7]。

研究表明,铁代谢紊乱及其介导的铁死亡与 AS 的发生与发展密切相关^[8]。铁死亡是由于铁代谢紊乱引起细胞内铁过载和铁依赖性脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡^[9],伴有谷胱甘肽耗竭和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase 4, GPX4)活性降低^[8]。研究发现采用高脂饮食诱导载脂蛋白 E(apolipoprotein E, ApoE)基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠)动脉粥样硬化模型后,

ApoE^{-/-}小鼠能引起显著主动脉脂质和铁代谢紊乱^[10-11]。当内皮发生损伤时,LDL 能渗透到内皮下空间,而血管细胞(如内皮细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞)出现的铁过载可通过参与芬顿反应促进 ROS 的生成,ROS 加速了 LDL 的过氧化产生脂质过氧化物 ox-LDL 从而损伤细胞。巨噬细胞不仅能吞噬外来脂质过氧化物,还能通过铁死亡促进脂质过氧化物的生成,导致细胞内脂质过氧化物过载,加速其泡沫化和凋亡^[12]。因此,铁代谢紊乱可加剧血管细胞损伤和巨噬细胞泡沫化,表现出促进 AS 的发生与发展。目前,关于通过铁死亡治疗 AS 的中药有四君汤、清脂化痰颗粒、二陈汤和桃红四物汤等,然而这些研究尚未深入探讨分子机制和开展临床实验^[13]。

AS 动物模型铁脂代谢紊乱的研究对揭示 AS 的发病机制具有重要意义。AS 动物模型铁脂代谢紊乱常用的研究对象主要是小鼠和小型猪^[14]。本文通过介绍 AS 动物模型铁脂代谢紊乱的制备方法,分析总结其特点,以期为 AS 与代谢性疾病的基础研究提供参考。

1 不同干预因素建立 AS 铁脂代谢紊乱动物模型

1.1 高脂饲料诱导 AS 铁脂代谢紊乱动物模型

ApoE 参与循环系统中脂蛋白的清除,ApoE 基因敲除的小鼠长期食用高脂饲料能导致机体胆固醇紊乱,自发形成 AS 病变,与临床 AS 的血管病变机制相似,具有造模简单和周期短的特点^[15-16]。采用单因素高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠是建立 AS 铁脂代谢紊乱的造模方法之一,具有操作简单、成本低的特点^[17]。

采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠 16 周后,刘

洋等^[18]研究发现相比于正常对照组,高脂饮食组 ApoE^{-/-}小鼠血清胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)及低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平升高,主动脉形成大量斑块、管腔变窄,主动脉组织中铁死亡相关基因和蛋白如 GPX4 和抗氧化基因谷胱氨酸/胱氨酸反转运体系系统中的轻链亚基(solute carrier family 7 member 11 gene, SLC7A11)表达降低,p53 基因(tumor protein p53 gene, p53)表达升高;何信用等^[19]发现高脂饮食组 ApoE^{-/-}小鼠有较大斑块形成,主动脉 SLC7A11、铁储存相关蛋白(ferritin heavy chain 1, FTH1)的表达被抑制,且主动脉铁死亡相关蛋白 p53 增加,引起主动脉铁过载,通过芬顿反应诱导铁死亡的发生;张杰^[20]采用投射电镜观察到高脂饮食组 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块巨噬细胞线粒体出现铁死亡;此外,王莉莉^[21]研究发现高脂模型组 ApoE^{-/-}小鼠血脂和斑块增加,主动脉组织铁含量增加,采用增强型普鲁士蓝染色法观察到 ApoE^{-/-}小鼠主动脉出现大量铁沉积。以上研究结果说明采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠 16 周能建立 AS 铁脂代谢紊乱动物模型,引起 AS 模型动物主动脉斑块和铁沉积增加。

铁过载和脂质过氧化是促进铁死亡的关键因素^[22]。宋玮等^[15]采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠 24 周后发现,相比于正常对照组,高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠的主动脉斑块显著,血清铁水平升高,血清氧化应激相关蛋白 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)水平下降,丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加,铁死亡相关蛋白 p53、前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、NADPH 氧化酶 1(NADPH oxidase 1 gene, NOX1)升高,SLC7A11、GPX4 及 FTH1 降低,表明高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠可能通过调节 p53/SALC7A11 信号通路介导主动脉氧化损伤及铁死亡,从而促进 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的形成。秦合伟等^[22]采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠 12 周后发现,相比于正常对照组,高脂模型对照组 ApoE^{-/-}小鼠血清亚铁离子含量升高,投射电镜检测主动脉发现主动脉血管内皮细胞线粒体可见经典铁死亡,其中参与调控铁离子储存的 FTH1 和

(ferritin light chain gene, FTL)的表达抑制。因此,长期单因素高脂饮食能引起 ApoE^{-/-}小鼠血脂和血铁水平紊乱,导致铁死亡相关基因和蛋白表达出现异常,从而加重 AS 的铁过载和铁死亡。

CAI 等^[14]采用高脂肪、高胆固醇和高果糖饲料喂养小型猪 6 个月后,与正常对照组比较,模型对照组小猪血脂紊乱,主动脉斑块显著增加,腹主动脉组织铁沉积明显增加。此外,腹主动脉中参与铁摄取的转铁蛋白受体(transferrin receptor gene, TFRC or TFR1)、负责铁输出的铁转运蛋白(solute carrier family 40 member 1 gene, SLC40A1)及参与铁稳态的 FTL 及核受体共激活因子 4(nuclear receptor coactivator 4 gene, NCOA4)表达均上调。

1.2 右旋糖酐铁诱导 AS 铁脂代谢紊乱动物模型

5 月龄雌性 ApoE^{-/-}小鼠在正常饮食情况下能自发形成 AS。MARQUES 等^[23]对 5 月龄野生型雌性小鼠采用腹腔注射右旋糖酐铁(每只 10 mg)4 周后发现,与野生型小鼠比较,模型组野生型小鼠血清 TC 和铁水平升高,血管未见明显斑块,主动脉可见明显铁沉积;而 5 月龄 ApoE^{-/-}雌性小鼠采用相同腹腔注射右旋糖酐铁 4 周后发现,与空白组比较,模型组血清铁和 TC 升高,主动脉可见明显斑块,主动脉管壁和主动脉斑块可见明显铁沉积,血管内皮表面存在严重的铁诱导损伤,且主动脉环氧合酶 2(cyclooxygenase, COX-2)和 ROS 表达增加,一氧化氮(nitric oxide, NO)表达减少。因此,右旋糖酐铁能引起氧化应激,加重 5 月龄雌性 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块形成和主动脉铁沉积,损伤血管内皮细胞,促进 ApoE^{-/-}小鼠 AS 铁脂代谢紊乱的形成。

1.3 含铁饲料对 AS 动物模型铁脂代谢的影响

HU 等^[24]采用高脂高铁(25 g/kg 羰基铁)饲料喂养 ApoE^{-/-}雄性小鼠 1 周后,与高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠相比,发现高脂高铁喂养的 ApoE^{-/-}小鼠可见巨噬细胞数量增加和炎症的发生,表现出加剧 AS 的发展。XIAO 等^[25]采用高脂高铁(2%羰基铁)喂养 ApoE^{-/-}小鼠 16 周后,与高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠相比,发现高脂高铁(2%羰基铁)喂养的 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平和斑块减少,血清铁、铁调素、肝铁、FTH 及 FTL 表达

增加,主动脉铁沉积明显;通过 iTRAQ 蛋白质组学技术,发现 2% 羰基铁可能通过影响肝脂质代谢进而抑制高脂饮食诱导 AS 的形成。DEMETZ 等^[26]采用西方饮食饲料联合低铁(5 mg/kg 羰基铁)喂养 ApoE^{-/-}Hfe^{-/-}小鼠 20 周,可见斑块。与西方饮食饲料联合高铁(25 g/kg 羰基铁)小鼠相比,西方饮食饲料联合低铁(5 mg/kg 羰基铁)小鼠血脂水平升高,主动脉未见明显斑块;肝铁水平升高,肝铁储存蛋白 Ferritin 和铁输出蛋白 Ferroportin 表达增强。因此,在 ApoE 和 Hfe 双基因缺失的条件下,25 g/kg 羰基铁能抑制小鼠 AS 的发展。KIRK 等^[27]分别采用高铁饲料(2% 羰基铁)饲料与低铁(0.02% 羰基铁)饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠 22 周后发现,与低铁饲料喂养的小鼠比较,高铁饲料喂养的小鼠斑块形成较少,但是主动脉、肝、脾等组织铁沉积明显,提示高铁饲料比低铁饲料更能抑制 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的发展。LUO 等^[28]分别采用高脂饲料(含 200 mg FeSO₄)和高脂低铁饲料(含 < 20 mg FeSO₄)喂养 ApoE^{-/-}小鼠 16 周后,发现单纯高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉出现显著斑块和铁沉积,与之相比,高脂低铁饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠血脂四项有所改善,主动脉斑块形成显著减少;血清铁、铁调素及肝铁减少,血清铁结合力增加,主动脉管壁和斑块中未见铁沉积,表明铁含量过低能抑制高脂饲料诱导的 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的形成。

亦有研究发现,肾功能不全的 ApoE^{-/-}小鼠腹腔注射蔗糖铁(2 mg/25 g)12 周后,能促进 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的发展,增加主动脉铁沉积和脂质过氧化物的生成,表明 2 mg/25 g 蔗糖铁能促进肾功能不全 ApoE^{-/-}小鼠 AS 铁脂代谢紊乱的形成^[29]。因此,外界铁的摄入量对 ApoE^{-/-}小鼠 AS 铁脂代谢的影响具有不同效果。

1.4 高脂饲料联合铁死亡相关化学物质对 AS 动物模型铁脂代谢的影响

YUAN 等^[30]采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠 10 周,再腹腔注射铁储存蛋白 FTH(50 mg/kg)10 周后发现,与单纯高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠相比,高脂饲料联合 FTH 干预的 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平降低,动脉未见明显斑块,血清铁水平升高,铁代谢蛋白 FTH、FTL 及 TFR1 显著降低,铁死亡相关蛋白核因子-红细胞 2 相关因子 2(nuclear

factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)降低和 GPX4 升高,主动脉无铁沉积。

RSL3 是 GPX4 抑制剂,可引起 GPX4 的失活,促进 ROS 积累,诱导铁死亡^[26]。高脂饲料联合腹腔注射 RSL3 能促进 ApoE^{-/-}小鼠颈动脉脂质过氧化物的积累和斑块的形成,抑制巨噬细胞 GPX4 和 FTH1 的表达,引起巨噬细胞铁死亡^[31]。

BAI 等^[32]采用高脂饲料联合铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1)给予 ApoE^{-/-}小鼠 8 周后,发现 Fer-1 能降低小鼠血脂,减少 AS 斑块形成,降低血清铁水平和主动脉组织铁含量,抑制脂质过氧化物(lipide peroxidation, LPO)和 MDA 的产生,同时还能增强主动脉铁死亡相关蛋白 SLC7A11 和 GPX4 的表达。秦合伟等^[22]发现 Fer-1 不仅能降低高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠血清铁和 MDA 水平,亦能抑制主动脉血管内皮细胞铁死亡,增加铁死亡相关蛋白 Nrf2、血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1 gene, HO-1 or HMOX1)及 GPX4 的表达,同时上调 FTH1 与 FTL 的表达。PUYLAERT 等^[33]采用西方饮食饲料喂养 20 周联合皮下渗透第三代铁死亡抑制剂 UAMC-3203(12.35 mg/kg)给予 ApoE^{-/-}Fbn1^{C1039G + / -}雌性小鼠后,研究发现 UAMC-3203 可降低小鼠颈动脉斑块 FTH 与 HMOX1 水平,抑制晚期颈动脉斑块形成,表明铁死亡抑制剂 UAMC-3203 通过抑制颈动脉斑块 FTH 与 HMOX1 的表达,从而抑制斑块巨噬细胞对红细胞的吞噬作用,减少亚铁的生成,最终影响晚期斑块内血管生成和出血。可见,FTH、RSL3 与铁死亡抑制剂均能参与影响 AS 的铁脂代谢。

综上所述,高脂饲料或西方饮食饲料或正常饲料联合不同含量的铁,高脂饲料联合腹腔注射 FTH、Fer-1 与 UAMC-3203 对 AS 模型小鼠铁脂代谢的影响不同。

1.5 基因工程对 AS 动物模型铁脂代谢的影响

转基因或基因敲除技术也是铁脂代谢相关的 AS 动物模型的制备方式之一。CAI 等^[34]采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}Fpn1^{LysM/LysM}小鼠 16 周后,结果发现小鼠主动脉斑块显著增多、斑块稳定性下降、斑块巨噬细胞数量增多;同时小鼠主动脉氧化应激和炎症反应明显加剧,但铁调素表达不显著。之后又采用高脂饲料联合铁螯合剂

(deferiprone, DFP) 给予 ApoE^{-/-}Fpn1^{LysM/LysM} 小鼠 16 周, 结果发现与高脂饲料联合盐水组比较, 给予 DFP 组的小鼠血脂无显著异常, 主动脉斑块形成减少, 血清铁水平和转铁蛋白饱和度下降。可见 ApoE^{-/-}小鼠 Fpn1 蛋白的缺失, 能促进 ApoE^{-/-}小鼠 AS 铁脂代谢紊乱, 给予 DFP 后能改善 Fpn1 缺失引起的铁脂紊乱。

核苷酸结合寡聚结构域 1 (nucleotide binding oligomerization domain containing 1, NOD1) 是巨噬细胞表达模式受体中的一种, 在髓外造血方面起了关键作用。FERNÁNDEZ-GARCÍA 等^[35] 采用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}NOD1^{-/-}小鼠 4 周后, 与高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠比较, ApoE^{-/-}NOD1^{-/-}小鼠主动脉斑块形成增多, 脾、心脏及肝铁含量显著减少, 血清铁无显著性差异, 脾中参与铁代谢的 *Slc40a1*、*Spic*、*Slc7all* 及 I 型胶原 α 链 (collagen type I alpha 1 chain gene, *Col1a1*) 等相关基因表达增加, *Gpx4* 基因的表达减少, 促进脾铁死亡。然而, 在含 NOD1 的激动剂和富含铁培养基的 ApoE^{-/-}NOD1^{-/-}小鼠腹膜巨噬细胞与上述铁代谢相关基因的表达呈相反的趋势, 表明 NOD1 参与了巨噬细胞铁代谢, NOD1 的缺失可通过铁死亡诱导 AS。

信号转导和转录激活因子 6 (signal transducer and activator of transcription 6 gene, STAT6) 是铁下垂的关键调节因子, SHI 等^[36] 采用高脂饲料联合前蛋白转化酶枯草溶菌素转化酶 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, AAV-PCSK9) 注射给予 STAT6^{-/-}小鼠成功建立 AS 铁脂代谢紊乱

模型, 与高脂饲料喂养的野生型小鼠比较, STAT6^{-/-}小鼠主动脉斑块面积形成显著, *Scl7a11*、*Fth1*、*Gpx4* 等铁代谢相关基因表达减少, 主动脉斑块铁沉积增加, 表明 STAT6 敲除能促进 AS 和铁死亡。

铁调素是通过调节铁转运蛋白的降解进而参与维持铁稳态的激素, 由 *Hamp* 基因进行编码。MALHOTRA 等^[37] 采用高脂饲料喂养 *Hamp*^{-/-}/*Ldlr*^{-/-}小鼠 21 周后, 结果发现与 *Hamp*^{+/+}*Ldlr*^{-/-}小鼠比较, *Hamp*^{-/-}*Ldlr*^{-/-}小鼠 LDL 水平降低, 主动脉斑块形成减少, 动脉巨噬细胞活性降低; 血清铁水平升高, 肝铁储存增加, 脾巨噬细胞中无铁沉积, 可见铁调素的缺乏能影响血清铁水平、肝铁储存和脾巨噬细胞铁的积累, 从而改善 AS。

综上所述, ApoE^{-/-}Fpn1^{LysM/LysM} 小鼠、ApoE^{-/-}NOD1^{-/-}小鼠、STAT6^{-/-}小鼠及 *Hamp*^{-/-}/*Ldlr*^{-/-}等基因工程小鼠有望用于 AS 疾病的研究。

2 铁脂代谢相关的 AS 动物模型的分析

2.1 铁脂代谢相关的 AS 模型的动物种类及频次比较分析

如表 1, 图 1, 本研究通过系统分析 36 篇文献 (包括 17 篇英文文献和 19 篇中文文献), 对 AS 铁脂代谢紊乱动物模型进行探讨, 发现造模动物种类包括单基因敲除小鼠、双基因敲除小鼠、小型猪 3 大类。根据造模动物使用频次进行排序, ApoE^{-/-}小鼠是使用次数最多 (29 次, 80.55%); 在

表 1 铁脂代谢相关的 AS 模型动物种类及频次
Table 1 Animal species and frequency of AS model animals related to iron and lipid metabolism

动物 Animal	类别 Classification	频数/次 Frequency/times	百分比/% Percentage/%	年龄/周 Age/week	体质量/g Body mass/g
单基因敲除小鼠 Single knockout mice	ApoE ^{-/-}	29	80.55	6 ~ 8、4、21	18 ~ 25
	STAT6 ^{-/-}	1	2.77	8	-
	ApoE ^{-/-} Fbn1 ^{C1039G + /-}	1	2.77	8	-
	ApoE ^{-/-} Fpn1 ^{LysM/LysM}	1	2.77	-	-
双基因敲除小鼠 Double knockout mice	ApoE ^{-/-} Nod1 ^{-/-}	1	2.77	-	-
	ApoE ^{-/-} Hfe ^{-/-}	1	2.77	-	-
	<i>Hamp</i> ^{-/-} <i>Ldlr</i> ^{-/-}	1	2.77	6	-
猪 Pig	小型猪 Miniature piglets	1	2.77	25 ~ 29	-

动物年龄上, ApoE^{-/-}小鼠主要选择 6 ~ 8 周龄; 在动物性别上, 绝大多数文献选择雄性动物 (25 次, 69.44%); 其次是雌性动物 (6 次, 16.66%); 雌雄不限 (1 次, 2.77%)。

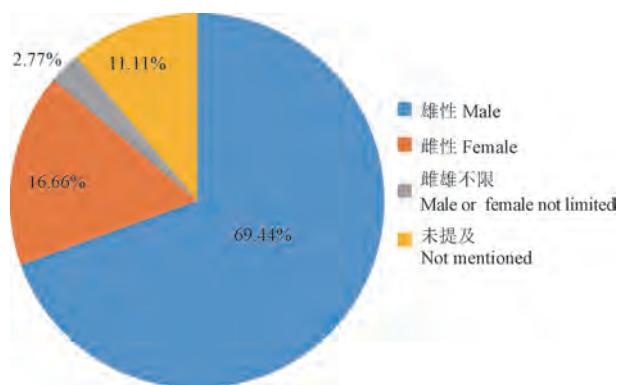


图 1 铁脂代谢相关的 AS 动物模型性别分布比例

Figure 1 Proportion of gender distribution in animal models of AS related to iron and lipid metabolism

2.1.1 ApoE^{-/-}小鼠

ApoE^{-/-}小鼠是 ApoE 基因敲除小鼠, 是 AS 铁脂代谢紊乱的常用研究对象。长期高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}雄性小鼠, 其血脂水平显著升高, 同时主动脉铁沉积增加, LDL 在主动脉损伤血管壁下积聚, 尤其在主动脉根部等区域自发形成斑块。其主动脉斑块胶原蛋白含量较少, 易于破裂, 因此该模型被广泛应用于血脂异常和动脉粥样硬化研究, 具有操作简便、成模时间短、病理及组织特征与人类高度相似的特点^[10]。在长期单纯高脂饮食的干预下, ApoE^{-/-}雄性小鼠常被用于研究主动脉脂质紊乱和铁沉积现象, 或通过调控外源性铁的摄入量来观察主动脉铁脂积累的变化。这一模型的优势在于能够全面评估高脂饮食和外源性铁对主动脉粥样硬化中铁脂代谢的综合影响, 但其局限性在于小鼠的脂蛋白谱特征与人类相比依旧存在差异^[38]。

2.1.2 ApoE^{-/-} Fpn1^{LysM/LysM} 小鼠

ApoE^{-/-} Fpn1^{LysM/LysM} 小鼠是 ApoE 敲除和 Fpn1 缺陷小鼠, 作为一种巨噬细胞特异性铁转运蛋白 (Fpn1) 缺陷小鼠模型。与高脂饮食的 ApoE^{-/-}小鼠相比, ApoE^{-/-} Fpn1^{LysM/LysM} 小鼠巨噬细胞 Fpn1 缺失虽未影响血脂水平, 但显著加剧了主动脉铁积累, 导致斑块进展至更晚期且稳定性降低, 同时氧化应激和炎症反应增强。该动物模

型的优点在于, 巨噬细胞 Fpn1 的特异性缺陷能够直接证明巨噬细胞铁积累对动脉粥样硬化的局部作用, 且不影响血浆铁调素的稳态; 其缺点是可导致小鼠出现轻度贫血。

2.1.3 ApoE^{-/-} NOD1^{-/-} 小鼠

ApoE^{-/-} NOD1^{-/-} 小鼠是一种 ApoE 和 NOD1 双敲除模型, 与 ApoE^{-/-}小鼠相比, 脾 NOD1 缺失虽未显著影响血清铁水平, 但减少了心脏和脾的铁沉积, 同时增加了血液中巨噬细胞的数量, 并促进了斑块形成。该动物模型的优点在于可用于研究脾铁代谢的调控机制及其在动脉粥样硬化治疗中的潜在应用价值。

2.1.4 STAT6^{-/-} 小鼠

STAT6^{-/-}小鼠是 STAT6 基因敲除小鼠, 在高脂饮食和 AAV-PCSK9 的联合作用下, 易于形成 AS 斑块, 伴有主动脉铁沉积。该模型适用于研究药物对铁凋亡和 AS 治疗的潜在靶点, 但其缺点是可能导致肝脂滴蓄积^[39]。

2.1.5 Hamp^{-/-} Ldlr^{-/-} 小鼠

Hamp^{-/-} Ldlr^{-/-}小鼠是 Hamp 和 Ldlr 双敲除小鼠, 在高脂饮食干预后, 表现为体质量下降、血清铁水平升高以及空腹 LDL 水平降低, 同时主动脉巨噬细胞数量减少、促炎表型减弱以及巨噬细胞铁沉积显著减少。该动物模型适用于研究靶向铁调素和铁转运蛋白对 AS 铁脂代谢的影响。

2.1.6 ApoE^{-/-} Fbn1^{C1039 G +/-} 小鼠

ApoE^{-/-} Fbn1^{C1039 G +/-}小鼠是 ApoE 基因敲除和 Fbn1 基因突变小鼠, 常用于模拟晚期动脉粥样硬化斑块内血管生成和出血的模型, 其造模周期需长达 20 周才能在颈动脉中观察到晚期斑块内的血管生成和出血现象, 而在胸主动脉和腹主动脉中未见类似变化。该动物模型适用于研究晚期动脉粥样硬化中与血管生成和出血相关的斑块铁死亡机制。

2.1.7 小型猪

小型猪因其心血管解剖结构、脂蛋白组成以及主动脉斑块脂质变化与人类高度相似, 相较于小鼠, 更适合用于 AS 铁脂代谢紊乱的研究。在高脂肪、高胆固醇、高果糖饮食喂养 6 个月后, 小型猪的 TG 水平未显著升高, 但斑块中可见巨噬细胞浸润和大面积坏死核心, 同时主动脉出现铁过载现象。然而, 该模型存在饲养成本高、实验

周期长、猪特异性抗体和试剂缺乏等局限性,限制了其在 AS 研究中的广泛应用。

总之,不同动物模型在铁脂代谢相关的动脉粥样硬化研究中各有优劣,因此需要根据研究目的和不同动物模型特点选择合适的动物模型。

2.2 铁脂代谢相关的 AS 动物模型造模方法

如表 2,表 3 为提高成模率和满足研究需要,

常在饲料中掺入铁(如碳基铁、FeSO₄),或者在饲料喂养的基础上联合应用右旋糖酐铁和蔗糖铁等其他因素。西方饮食饲料中主要含有脂肪、胆固醇等原料,小鼠长期食用西方饮食饲料能促进 AS 的发展,36 例动物模型案例中有 5 例提及西方饮食饲料。36 例动物模型实验研究中共包括了 5 种造模方法,干预因素主要是采用单因素高

表 2 铁脂代谢相关的 AS 动物模型西方饮食饲料配比

Table 2 Western feed ratios for AS animal models related to iron and lipid metabolism

西方饮食饲料配比 Western feed ratio	频次/次 Frequency/times	百分比/% Percentage/%	参考文献 References
40%脂肪、0.21%胆固醇、20%酪蛋白 40% fat, 0.21% cholesterol, 20% casein	1	20.00	[37]
21%脂肪、0.15%胆固醇 21% fat, 0.15% cholesterol	1	20.00	[40]
每千克 C1000 饮食补充 20%乳脂和 0.15%胆固醇和 50 mg 维生素 E C1000 diet supplemented with 20% milk fat, 0.15% cholesterol, and 50 mg of vitamin E per kilogram of diet	1	20.00	[41]
TD.88137 补充 21%脂肪和 0.2%胆固醇 TD.88137 supplements 21% fat and 0.2% cholesterol	1	20.00	[33]
未提及 Not mentioned	1	20.00	[26,42]

表 3 铁脂代谢相关的 AS 动物模型造模方法概括

Table 3 Summary of modeling methods in animal models of AS related to iron and lipid metabolism

造模分类 Molding Classification	造模原理 Molding principle	造模方式 Molding method	频次/次 Frequency/ times	百分比/% Percentage/%	造模周期/周 Molding cycle/week
单一造模 Single molding	高脂/西方饮食饲料 High fat/western feed	喂养高脂、西方饮食 Feeding a high fat, western diet	23	63.88	8、12、16
	高脂饲料/西方饮食 饲料联合铁 High fat feed/western feed combined iron	喂养高脂/西方联合羰基铁、 FeSO ₄ 饮食 Feeding a high fat, western combined carbonyl iron/FeSO ₄ diet	5	13.88	16、20
复合造模 Composite molding	正常饲料联合右葡聚糖铁 High-fat feed combined with iron dextrose	喂养正常饮食联合腹腔内注射 葡聚糖铁 10 mg 每小鼠 Feeding normal diet combined with intraperitoneal injection of iron dextran 10 mg for each mouse	1	2.77	20、21
	高脂饲料/西方饮食饲料联 合调节铁代谢的物质 Combined high-fat feeds/ western feeds regulating iron metabolism	喂养高脂饮食、西方饮食联合 注射 Fer-1/FTH/UAMC-3203/RSL3/DFC Feeding high-fat diet, western diet combined with Fer-1/FTH/UAMC-3203/ RSL3/DFC	5	13.88	12、16、20
	高脂饲料联合其他 High-fat feeds in combination with others	喂养高脂饮食联合 SESN1 质粒、 单次注射 AAV-PCSK9 Feeding a high-fat diet combined with EV/SESN1 plasmid, single injection of AAV-PCSK9	2	5.55	6、8、12

脂饲料/西方饮食饲料造模方法(23次, 63.88%),其次是采用高脂/西方饮食联合含铁饲料造模方法(5次,13.88%),及采用高脂饲料联合腹腔注射调节铁代谢的物质的造模方法(4次, 11.11%)。研究铁脂代谢相关的 AS 模型以采用单因素高脂饮食/西方饮食造模为主,造模周期分别有3种,其中研究频次最多的是16周和8周(共21次,58.33%),其次是12周(5次,13.88%)。

2.3 不同铁含量对 AS 模型动物铁脂代谢的比较分析

如表4大量研究表明,单一高脂饮食能促进 ApoE^{-/-}小鼠 AS 的发展和铁脂代谢紊乱。HU 等^[24]与 DEMETZ 等^[26]采用 25 g/kg 羰基铁高脂饲料分别喂养 ApoE^{-/-}小鼠和 ApoE^{-/-}Hfe^{-/-}小鼠,但对 AS 的形成起相反的作用,推测其可能与造模周期或动物品种相关。2%羰基铁能改善高脂

表 4 摄入不同含量铁对 AS 模型小鼠的铁脂代谢比较分析

Table 4 Comparative analysis of iron lipid metabolism in AS model mouse with different levels of iron intake

给铁造模原理 Feed iron molding principle	类别 Classification	造模周期/周 Molding cycle/ week	结果 Result
25 g/kg 羰基铁高脂饲料 25 g/kg carbonyl iron high fat feed	ApoE ^{-/-}	1	相比于正常对照组,25 g/kg 羰基铁高脂饮食小鼠动脉粥样硬化斑块形成增多,促进 AS 发展 Increased atherosclerotic plaque formation and promotion of AS development in mice on a 25 g/kg carbonyl iron high-fat diet compared with normal controls
25 g/kg 羰基铁西方 饮食饲料 25 g/kg carbonyl iron western diet	ApoE ^{-/-} Hfe ^{-/-}	20	与西方饮食饲料联合低铁(5 mg/kg 羰基铁)小鼠相比,西方饮食饲料联合高铁(25 g/kg 羰基铁)小鼠血脂降低,肝铁水平升高,肝铁储存蛋白 ferritin 和铁输出蛋白 ferroportin 表达增加,抑制 AS 发展 Compared with mice fed with western diet and low iron (5 mg/kg carbonyl iron), mice fed with western diet and high iron (25 g/kg carbonyl iron) had lower blood lipids, higher liver iron levels, increased expression of liver iron storage protein ferritin and iron export protein ferroportin, and inhibited the development of atherosclerosis
2%羰基铁高脂饲料 2% carbonyl iron high fat feed	ApoE ^{-/-}	16	与正常对照组相比,小鼠血清血脂降低,主动脉粥样硬化斑块减少,血清铁与铁调素、肝铁、FTH 及 FTL 表达增加,主动脉铁沉积明显,抑制 AS 的发展 Compared with the normal control group, mice showed decreased serum lipids, reduced aortic atherosclerotic plaques, increased expression of serum iron and ferredoxin, hepatic iron, FTH and FTL, and significant aortic iron deposition, which inhibited the development of AS
2%羰基铁高脂饲料 2% carbonyl iron high fat feed	ApoE ^{-/-}	22	相比于(0.02%羰基铁)低铁饮食小鼠,(2%羰基铁)高铁饮食小鼠,组织如主动脉、肝、脾铁沉积明显,抑制 AS 发展 Compared to (0.02% carbonyl iron) mice on a low iron diet, (2% carbonyl iron) mice on a high iron diet had significant iron deposition in tissues such as the aorta, liver, and spleen, which inhibited the development of AS
< 20 mg FeSO ₄ 铁 高脂饲料 < 20 mg FeSO ₄ iron high fat feed	ApoE ^{-/-}	16	与高脂饮食小鼠相比,高脂低铁饮食小鼠血脂四项有所改善,主动脉斑块形成减少,血清铁、肝铁、血清铁调素减少,血清铁结合力增加,主动脉管壁和斑块中未见铁沉积主动脉斑块形成,抑制 AS 的发展 Compared with mice on a high-fat diet, mice on a high-fat, low-iron diet had improved lipid profiles, decreased aortic plaque formation, decreased serum iron, hepatic iron, and serum iron modulators, increased serum iron binding, and no iron deposition in the aortic wall or plaque aortic plaque formation, and inhibited the development of AS
正常饲料联合腹腔注射 10 mg 右旋糖酐铁 Normal feed combined with intraperitoneal injection of 10 mg iron dextrose	ApoE ^{-/-}	4	相比于未腹腔注射右旋糖酐铁的 ApoE ^{-/-} 小鼠,采用正常饲料联合腹腔注射(每只 10 mg)右旋糖酐铁给予 5 月龄 ApoE ^{-/-} 雌性小鼠 4 周后,其血清铁和 TC 升高,主动脉可见明显斑块,皮肤和内脏器官出现色素沉着,主动脉管壁和主动脉斑块可见明显铁沉积,促进 AS 的发展 Compared with ApoE ^{-/-} mice without intraperitoneal injection of iron dextrose, ApoE ^{-/-} female mice of 5 months of age given 4 weeks of normal chow in combination with intraperitoneal injection (10 mg/each) of iron dextrose showed elevated serum iron and TC, visible visible plaques in the aorta, hyperpigmentation of the skin and internal organs, and visible iron deposition on the wall of the aorta tubes and in the aortic plaques, which promotes the development of AS

饲料诱导的 ApoE^{-/-}小鼠脂代谢紊乱,但能加重主动脉铁沉积;而低于 20 mg FeSO₄ 不仅能改善高脂饲料诱导的 ApoE^{-/-}小鼠脂代谢紊乱,还能减少主动脉铁沉积,整体表现出抗 AS 铁脂代谢紊乱的作用。给予 ApoE^{-/-}小鼠腹腔注射 10 mg 右旋糖酐铁,亦能促进 ApoE^{-/-}小鼠 AS 铁脂代谢紊乱的形成。由此可见,外源性膳食摄入或者腹腔注射不同含量的铁对 AS 铁脂代谢的影响有差异,有待进一步深入研究。

3 总结与展望

AS 是一种严重威胁人类健康的心血管疾病,其发病机制复杂,与铁脂代谢紊乱密切相关。文献研究表明,单因素高脂饮食能诱导 ApoE^{-/-}小鼠和小型猪血脂异常,促进斑块形成和铁沉积增加,引起铁代谢相关指标(如 GPX4、SLC7A11、p53、PTGS2、FTH1、FTL、NOX1 等)发生改变;高脂饲料联合腹腔注射铁死亡相关化学物质(如 FTH、RSL3、Fer-1 和 UAMC-3203)能影响 AS 动物铁脂代谢紊乱,可为通过调节铁脂代谢改善动脉粥样硬化研究提供新的靶点和策略,而高脂饲料联合不同含量的铁对小鼠 AS 形成及铁脂代谢的影响则不同,揭示了铁代谢对动脉粥样硬化和脂代谢的重要影响。动脉粥样硬化铁脂代谢相关动物模型通常选择小鼠,尤其是 ApoE^{-/-}小鼠,随着转基因和基因敲除技术的发展, ApoE^{-/-} Fpn1^{LysM/LysM}、ApoE^{-/-} NOD1^{-/-} 等基因工程小鼠也有望成为 AS 铁脂代谢紊乱的动物研究模型。小鼠虽广泛用于 AS 研究,但其脂质代谢与人类存在差异。另外,小型猪虽在心血管解剖结构与人类相似,但存在饲养成本高、难以大规模饲养等问题。目前,亦有关于高脂联合高铁饲料喂养大鼠的 AS 脂质代谢紊乱的研究,然而针对大鼠 AS 铁代谢紊乱研究仍显不足,因此,未来有待进一步拓展 AS 铁脂代谢紊乱动物模型的研究对象。

参 考 文 献(References)

- [1] MA Y, HAN J, WANG K, et al. Research progress of Ganoderma lucidum polysaccharide in prevention and treatment of Atherosclerosis [J]. Heliyon, 2024, 10(12): e33307.
- [2] GAO T, GAO S, WANG H, et al. Garlic ameliorates atherosclerosis by regulating ferroptosis pathway: an integrated strategy of network pharmacology, bioinformatic and experimental verification [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1388540.
- [3] FEI S F, HOU C, JIA F. Effects of salidroside on atherosclerosis: potential contribution of gut microbiota [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1400981.
- [4] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982–3021.
- [5] CHEN L, CHEN H, GUO S, et al. Psoriasis comorbid with atherosclerosis meets in lipid metabolism [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1308965.
- [6] DUAN H, SONG P, LI R, et al. Attenuating lipid metabolism in atherosclerosis: the potential role of anti-oxidative effects on low-density lipoprotein of herbal medicines [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1161657.
- [7] JIANG H, LIAO Y, ZHU M, et al. Innovative atherosclerosis models: advancing pathophysiology and translational research [J]. Research (Wash D C), 2025, 8: 0617.
- [8] CHEN Y, LI X, WANG S, et al. Targeting iron metabolism and ferroptosis as novel therapeutic approaches in cardiovascular diseases [J]. Nutrients, 2023, 15(3): 591.
- [9] XU Y, CAI F, ZHOU Y, et al. Magnetically attracting hydrogel reshapes iron metabolism for tissue repair [J]. Sci Adv, 2024, 10(33): eado7249.
- [10] 高迪, 田腾辉, 于克英, 等. 豁痰解毒通络饮调控 Nrf2/GPX4 通路抑制铁死亡改善 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(7): 1908–1919.
- [11] GAO D, TIAN T H, YU K Y, et al. Huotan Jiedu Tongluo Decoction inhibits ferroptosis by regulating Nrf2/GPX4 pathway to ameliorate atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice [J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, 50(7): 1908–1919.
- [12] ZHANG J, WANG X, GUAN B, et al. Qing-Xin-Jie-Yu Granule inhibits ferroptosis and stabilizes atherosclerotic plaques by regulating the GPX4/xCT signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115852.
- [13] ZHANG M, LI J, HU W. The complex interplay between ferroptosis and atherosclerosis [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 178: 117183.
- [14] 孟徐兵, 麻京豫, 赵凤婷, 等. 铁死亡与动脉粥样硬化关系及中药治疗的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2025, 23(2): 228–232.
- [15] MENG X B, MA J Y, ZHAO F T, et al. Research progress of the relationship between ferroptosis and atherosclerosis and treatment by traditional Chinese medicine [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2025, 23(2): 228–232.
- [16] CAI Z, DENG L, FAN Y, et al. Dysregulation of ceramide

- metabolism is linked to iron deposition and activation of related pathways in the aorta of atherosclerotic miniature pigs [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 13(1): 4.
- [15] 宋玮, 张钟艺, 张小波, 等. 茺蔚丸调控 p53/SLC7A11 信号通路介导氧化损伤及铁死亡减轻动脉粥样硬化 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(15): 4118–4127.
- SONG W, ZHANG Z Y, ZHANG X B, et al. Zhuyi Pills regulate p53/SLC7A11 signaling pathway-mediated oxidative damage and ferroptosis to treat atherosclerosis [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2024, 49(15): 4118–4127.
- [16] MEYRELLES S S, PEOTTA V A, PEREIRA T M C, et al. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 211.
- [17] 王淑琪, 李慧, 杨晓强, 等. 建立大鼠动脉粥样硬化模型的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(12): 45–48, 68.
- WANG S Q, LI H, YANG X Q, et al. Progress in the establishment of atherosclerosis models in rats [J]. *China Med Her*, 2020, 17(12): 45–48, 68.
- [18] 刘洋, 孙岳, 杨安宁, 等. 铁死亡参与高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化及 ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成过程 [J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(5): 585–590.
- LIU Y, SUN Y, YANG A N, et al. Involvement of ferroptosis in atherosclerosis induced by high-fat diet in ApoE^{-/-} mouse and formation of ox-LDL-induced foam cell [J]. *J Pract Med*, 2021, 37(5): 585–590.
- [19] 何信用, 王俊岩, 宋囡, 等. 二陈汤合桃红四物汤调控 p53/SLC7A11 介导的氧化损伤及铁死亡抗动脉粥样硬化的作用及机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2344–2348.
- HE X Y, WANG J Y, SONG N, et al. Effects and mechanism of Erchen decoction and Taohong Siwu decoction on the regulation of p53/SLC7A11 mediated oxidative damage and ferroptosis on atherosclerosis [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(5): 2344–2348.
- [20] 张杰. 清心解瘀方调控巨噬细胞铁死亡稳定动脉粥样硬化斑块的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2023.
- ZHANG J. Study on the mechanism of regulating macrophage ferroptosis and stabilizing atherosclerotic plaque [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2023.
- [21] 王莉莉. 动脉粥样硬化斑块泡沫细胞铁死亡对胞葬的影响及槲皮素的改善机制 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2022.
- WANG L L. Effect of atherosclerotic plaque foam cell ferroptosis on cell burial and the improvement mechanism of quercetin [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology; 2022.
- [22] 秦合伟, 孙孟艳, 王梦楠, 等. 黄芩甲苷控 Nrf2/HO-1/GPX4 通路抑制铁死亡改善 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(13): 3619–3626.
- QIN H W, SUN M Y, WANG M N, et al. Mechanism of astragaloside IV modulation of Nrf2/HO-1/GPX4 pathway to inhibit ferroptosis and ameliorate atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2024, 49(13): 3619–3626.
- [23] MARQUES V B, LEAL M A S, MAGESKI J C A, et al. Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction [J]. *Life Sci*, 2019, 233: 116702.
- [24] HU X, CAI X, MA R, et al. Iron-load exacerbates the severity of atherosclerosis via inducing inflammation and enhancing the glycolysis in macrophages [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18792–18800.
- [25] XIAO L, LUO G, LI H, et al. Dietary iron overload mitigates atherosclerosis in high-fat diet-fed apolipoprotein E knockout mice: role of dysregulated hepatic fatty acid metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(10): 159004.
- [26] DEMETZ E, TYMOSZUK P, HILBE R, et al. The haemochromatosis gene Hfe and Kupffer cells control LDL cholesterol homeostasis and impact on atherosclerosis development [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(40): 3949–3959.
- [27] KIRK E A, HEINECKE J W, LEBOEUF R C. Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(12): 1545–1553.
- [28] LUO G, XIANG L, XIAO L. Iron restriction alleviates atherosclerosis in ApoE KO mice: an iTRAQ proteomic analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15915.
- [29] KUO K L, HUNG S C, LEE T S, et al. Iron sucrose accelerates early atherogenesis by increasing superoxide production and upregulating adhesion molecules in CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(11): 2596–2606.
- [30] YUAN W, ZHANG J, HUO R, et al. Intraperitoneal injection of human ferritin heavy chain attenuates the atherosclerotic process in APOE-knockout mice [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2023, 10(7): 309.
- [31] 李昱. RSL3 干预 GPX4 促进巨噬细胞铁死亡对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的影响 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学; 2023.
- LI Y. Effect of RSL3 on the stability of carotid atherosclerosis plaque by GPX4 promoting macrophage iron death [D]. Shanghai: Naval Medical University; 2023.
- [32] BAI T, LI M, LIU Y, et al. Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid

- peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 92–102.
- [33] PUYLAERT P, ROTH L, VAN PRAET M, et al. Effect of erythrophagocytosis-induced ferroptosis during angiogenesis in atherosclerotic plaques [J]. *Angiogenesis*, 2023, 26(4): 505–522.
- [34] CAI J, ZHANG M, LIU Y, et al. Iron accumulation in macrophages promotes the formation of foam cells and development of atherosclerosis [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10(1): 137.
- [35] FERNÁNDEZ-GARCÍA V, GONZÁLEZ-RAMOS S, AVENDAÑO-ORTIZ J, et al. NOD1 splenic activation confers ferroptosis protection and reduces macrophage recruitment under pro-atherogenic conditions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112769.
- [36] SHI J, YANG M M, YANG S, et al. MaiJiTong granule attenuates atherosclerosis by reducing ferroptosis via activating STAT6-mediated inhibition of DMT1 and SOCS1/p53 pathways in LDLR^{-/-} mice [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155489.
- [37] MALHOTRA R, WUNDERER F, BARNES H J, et al. Hepcidin deficiency protects against atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(2): 178–187.
- [38] 王丽, 高金宁, 陈湘云, 等. STZ 诱导联合高脂喂养 LDLR^{-/-} 小鼠糖尿病动脉粥样硬化模型的构建及评价 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(11): 985–993.
- WANG L, GAO J N, CHEN X Y, et al. Construction and evaluation of diabetic atherosclerosis model in LDLR^{-/-} mice induced by STZ and fed with high-fat diet [J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(11): 985–993.
- [39] IFF J, WANG W, SAJIC T, et al. Differential proteomic analysis of STAT6 knockout mice reveals new regulatory function in liver lipid homeostasis [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(10): 4511–4524.
- [40] 马贵萍, 陈冉, 肖稳康, 等. 基于 DJ-1/GPX4 通路探讨加味二至丸对动脉粥样硬化巨噬细胞铁死亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(4): 627–636.
- MA G P, CHEN R, XIAO W K, et al. Modified Erzhi pill inhibits ferroptosis of macrophages in atherosclerosis via DJ-1/GPX4 pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2024, 40(4): 627–636.
- [41] COORNAERT I, BREYNAERT A, HERMANS N, et al. GPX4 overexpression does not alter atherosclerotic plaque development in ApoE knock-out mice [J]. *Vasc Biol*, 2024, 6(1): e230020.
- [42] CHEN S, GAO J J, LIU Y J, et al. The oxidized phospholipid PGPC impairs endothelial function by promoting endothelial cell ferroptosis via FABP3 [J]. *J Lipid Res*, 2024, 65(2): 100499.

[收稿日期] 2024-10-10

张俊,田丽娅,黄琴,等. 骨癌痛动物模型及中医药相关镇痛机制研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 925-934.

ZHANG J, TIAN L Y, HUANG Q, et al. Research progress on animal models of cancer-induced bone pain and mechanisms of traditional Chinese medicines [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 925-934.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.014

骨癌痛动物模型及中医药相关镇痛机制研究进展

张俊¹, 田丽娅¹, 黄琴², 李枋霏¹, 曹杰¹, 王维^{1*}

(1. 重庆大学附属肿瘤医院, 重庆 400030; 2. 成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075)

【摘要】 骨癌痛(cancer-induced bone pain, CIBP)不仅给癌症患者带来巨大痛苦,也降低其生活质量和自信心。导致 CIBP 的机制是复杂的,并随着癌症的进展而发生演变。目前治疗手段效果有限且存在不良反应。中医药在治疗 CIBP 方面具有一定优势,但相关镇痛机制有待深入探讨。建立典型、稳定、易重复的动物模型是进一步研究疾病发病机制和验证干预措施有效性的前提和基础。本文总结近 3 年常用的 CIBP 动物模型造模方法,并总结 CIBP 动物模型在中医药相关镇痛机制研究的应用,以期今后的 CIBP 研究提供方向。

【关键词】 骨癌痛;动物模型;中医药;镇痛机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 06-0925-10

Research progress on animal models of cancer-induced bone pain and mechanisms of traditional Chinese medicines

ZHANG Jun¹, TIAN Liya¹, HUANG Qin², LI Fangfei¹, CAO Jie¹, WANG Wei^{1*}

(1. Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China; 2. College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Corresponding author: WANG Wei. E-mail: abbystina98@163.com

【Abstract】 Cancer-induced bone pain (CIBP) causes substantial suffering for cancer patients and also diminishes their quality of life and self-esteem. The mechanisms underlying CIBP are complex and evolve progressively with cancer advancement. Current treatment options show limited efficacy and are often accompanied by adverse effects. Traditional Chinese medicine demonstrates potential advantages in managing CIBP; however, the mechanisms of action remain poorly understood and require further investigation. The development of a standardized, stable, and reproducible animal model is crucial to advancing research on disease pathogenesis and verifying the effectiveness of therapeutic interventions. This review considers recent method for modeling CIBP in animals and summarizes the application of these models in studies of traditional Chinese medicine mechanisms, with the aim of guiding future research directions in CIBP.

【Keywords】 cancer-induced bone pain; animal models; traditional Chinese medicine; mechanisms

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

【基金项目】 重庆市科卫联合中医药科研项目资助项目(2024ZYDB002), 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0501)。

Funded by Chongqing Science and Technology Bureau Joint Health Commission of Chinese Medicine Research Project Funded Project (2024ZYDB002), Chongqing Natural Science Foundation General Project(cstc2021jcyj-msxmX0501).

【作者简介】 张俊,男,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合防治肿瘤常见病及并发症。Email:963496414@qq.com

【通信作者】 王维,女,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治恶性肿瘤。Email:abbystina98@163.com

骨癌痛(cancer-induced bone pain, CIBP)是指骨转移或原发性骨肿瘤引起的疼痛,超过 80%的癌痛患者伴有极度痛苦的 CIBP^[1],严重影响生活质量和治疗信心,它通常是持续的、突然的、自发的^[2]。目前阿片类药物仍然是 CIBP 主要的药物治疗方式,但仅近一半患者能获得暂时的疼痛缓解^[3]。而阿片类药物还存在呼吸抑制、成瘾性、痛觉过敏和神经毒性等不良反应^[4],这就迫切需要新的、更好的治疗手段。研究表明中药、针灸等中医药治疗方法可有效减轻 CIBP^[5],如一项 Meta 分析证实中医外治法对改善 CIBP 有一定疗效^[6]。另有 Meta 分析指出,针灸可减轻 CIBP 疼痛强度并提高生活质量、降低阿片类药物副作用

的发生率^[7]。然而,导致 CIBP 的机制是复杂的,并随着癌症的进展而发生演变,涉及肿瘤细胞、骨细胞、活化的炎症细胞和骨支配神经元之间的各种相互作用,最终导致骨破坏、病理性骨折和难治性疼痛^[8]。对 CIBP 发生发展机制的研究有助于指导临床针对性、高效性治疗,故亟需深入其机制研究。动物模型是医学实验研究的一种重要载体,建立典型、稳定、易重复的动物疾病模型是研究疾病发病机制和验证干预措施有效性的前提和基础^[9]。故笔者总结近 3 年常用的 CIBP 动物模型造模方法(见表 1),并总结其在中医药相关镇痛机制研究的应用,以期今后的 CIBP 研究提供方向。

表 1 近 3 年 CIBP 动物模型造模研究特点
Table 1 Characteristics of CIBP animal models modeling studies in the past 3 years

肿瘤细胞来源 Tumor cell source	动物模型品系 Animal models strains	接种手术部位及方法 Site and method of inoculation	疼痛行为 测试方法 Pain behavior test methods	测试的止痛剂 Test for analgesics	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Walker 256 乳腺癌细胞 Walker 256 breast cancer cells	成年雌性 SD 大鼠 Adult female SD rat	癌细胞注射到 左胫骨髓腔 Cancer cells were injected into the left tibial medullary cavity	机械痛敏法 Mechanical pain sensitization	SFN 和/或 吗啡 ^[15] SFN and/or morphine ^[15]	疼痛持续久 Prolonged pain	诱导时间较长、行为测试方法单一 Long induction time, single behavior testing method
	成年雌性 Wistar 大鼠 Adult female Wistar rat	癌细胞注射到 左胫骨下 1/3 骨髓腔 Cancer cells were injected into the bone marrow cavity of the lower 1/3 of the left tibia	热痛敏法 Thermal pain sensitization	吗啡和/或地 佐辛 ^[16] Morphine and/ or dezocine ^[16]	诱导时间 较短 Short induction time	行为测试方法单一、疼痛随访时间较短,对药物干预远期效果不详 Single behavior testing method, the follow-up time of pain is short, and the long-term effect of drug intervention is unknown
E0771 乳腺癌 细胞 E0771 breast cancer cells	成年雌性 C57BL/6J 或 BALB/c3H 小鼠 Adult female C57BL/6J or BALB/c3H mice	癌细胞注射到 右侧股骨髓腔 Cancer cells were injected into the bone marrow cavity of the right femur	NSF	吗啡 ^[18] Morphine ^[18]	使用了两种 癌细胞系及 小鼠品系, 提高实验可 重复性 Two types of cancer cell lines and mouse strains were used to improve the reproducibility of the experiment	疼痛行为测试方法较 单一、诱导时间较长 Single behavior testing method, long induction time

续表 1

肿瘤细胞来源 Tumor cell source	动物模型品系 Animal models strains	接种手术部 位及方法 Site and method of inoculation	疼痛行为 测试方法 Pain behavior test methods	测试的止 痛剂 Test for analgesics	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
MRMT-1 乳腺癌 细胞 MRMT-1 breast cancer cells	成年雌性 SD 大鼠 Adult female SD rat	癌细胞注射到 左胫骨髓腔 Cancer cells were injected into the left tibial medullary cavity	SFL、机械 痛敏法、热 痛敏法 SFL, mechanical pain sensitization, thermal pain sensitization	慢病毒表 达 TRESK ^[20] lentivirus expressing- TRESK, LV-TRESK ^[20]	行为测试方 法多样 Behavioral testing methods vary	自发性疼痛行为可 能混合了皮肤疼 痛影响实验分析 Spontaneous pain behavior may be mixed with the skin pain, thus affecting the experimental analysis
	成年雄性 C3H/HeN 小鼠 Adult male C3H/HeN mice	癌细胞注射到 左股骨远端骨 髓腔 Cancer cells were injected into the bone marrow cavity of the left distal femur	热痛敏法 Thermal pain sensitization	纳布啡联合 吗啡 ^[21] Nalbuphine combined with morphine ^[21]	疼痛持续久 Prolonged pain	行为测试方法单一、 诱导时间较长 Single behavior testing method, long induction time
NCTC 2472 纤维 肉瘤细胞 NCTC 2472 fibrosarcoma cells	成年雄性 C3H/HeJ 小鼠 Adult male C3H/HeJ mice	癌细胞注射到 左侧股骨骨 髓腔 Cancer cells injected into the left femoral medullary cavity	机械痛敏法、 NSF、热痛敏法 Mechanical pain sensitization, NSF, thermal pain sensitization	microRNA- 199a-3p 激 动剂 ^[22] MicroRNA- 199a-3p agonist ^[22]	疼痛持续 久、行为测 试方法多样 Prolonged pain, behavioral testing methods vary	诱导时间较长 Long induction time
	成年雌性 C57BL/6J 或 SCID 小鼠 Adult female C57BL/6J or SCID mice	癌细胞注射到 右侧胫骨骨 髓腔 Cancer cells injected into the bone marrow cavity of the right tibia	机械痛敏法 Mechanical pain sensitization	卡洛芬或丁丙 诺啡 ^[24] Carprofen or buprenorphine ^[24]	疼痛持续 久、行为测 试方法多样 Good repeatability of the experiment, short induction time, good safety	疼痛行为测试方法较 单一 Single behavior testing method
RM-1 前列腺 癌细胞 RM-1 prostate cancer cells	成年雄性 C57BL/6 小鼠 Adult male C57BL/6 mice	癌细胞注射到 右侧股骨骨 髓腔 Cancer cells injected into the bone marrow cavity of the right femur	自发性疼痛行 为、肢体使用 评分 Spontaneous pain behavior, limb use score	无 ^[26] Nothing ^[26]	行为测试方 法可能更接 近临床 Behavioral testing methods may be closer to the clinic	诱导时间较长 Long induction time
	成年雄性和雌 性 C57BL/6J 小鼠 Adult male and female C57BL/6J mice	癌细胞注射到 左股骨骨髓腔 Cancer cells were injected into the bone marrow cavity of the left femur	机械痛敏法 及冷痛敏法 Mechanical pain sensitization and cold pain sensitization	STING 激 动剂 ^[29] STING agonist ^[29]	实验方案相 对安全,没有 全身胃肠 道毒性 Experimental protocol was relatively safe with no systemic gastrointestinal toxicity	止痛药物早期 干预效果不详 Early intervention effect of painkillers is unknown

1 CIBP 动物模型研究进展

1.1 CIBP 动物模型建立的历史沿革

早期 CIBP 造模方法是依赖于将癌细胞给药到小鼠的左心室中,随后癌细胞在全身循环中迁移到包括骨髓在内的不同组织部位形成转移。这种模型的显著缺点包括转移部位和大小的可预测性差,导致其重复性较差^[10]。此后,实验者开始将癌细胞注射到啮齿类动物骨髓腔中,克服了上述方法的缺点。通过骨髓腔注射构建 CIBP 动物模型的首次建立则是在 1999 年, SCHIWEI 等^[11]将 NCTC 2472 纤维肉瘤细胞注射到 B6C3-Fe-a/ α 野生型和 C3H/HeJ 小鼠股骨制备了世界上第一个小鼠 CIBP 动物模型,通过检测 CIBP 小鼠模型中脊髓和相关背根神经节中发生的神经化学变化,发现背角深层的神经元中表达强啡肽和 c-Fos 蛋白,这与癌症导致骨破坏的程度密切相关。第一个已知的大鼠 CIBP 模型是在 2002 年, MEDHURST 等^[12]通过对 SD 大鼠胫骨内注射 MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞后成功诱导,该模型在接种后 20 d 内对其健康没有任何严重影响,并因其动物模型较稳定性好逐渐得推广及应用。从 1999 年至近年来建立的 CIBP 动物模型已有 10 多种^[13],这可以在一定程度上再现 CIBP 的症状并帮助了解 CIBP 的分子机制及开发新药等。

1.2 常用 CIBP 动物模型近 3 年研究进展

1.2.1 Walker 256 乳腺癌细胞诱导的 CIBP 动物模型

乳腺癌细胞是诱导 CIBP 动物模型常见的细胞类型,有研究发现 Walker 256 乳腺癌细胞植入的动物在整个实验期间保持良好的健康状况且该模型与乳腺癌诱导的人类 CIBP 病理生理学非常相似^[14],故广泛用于 CIBP 造模中。FU 等^[15]为研究萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是否能干预 CIBP 相关疼痛行为并增强吗啡镇痛作用,将 Walker 256 乳腺癌细胞注射到成年雌性 SD 大鼠左胫骨髓腔以制备 CIBP 动物模型,在术前 3 d 及术后第 3、6、9、12、15、18 天通过机械痛敏法进行行为测试,第 6 天成功建立 CIBP 动物模型后,在治疗组中持续注射 SFN 和/或吗啡。实验结果表明,CIBP 组缩爪阈值(paw withdrawal threshold, PWT)在第 6 天显著降低并持续到第 18 天,而持

续注射 SFN 可减轻 CIBP。进一步分析证明,SFN 可增强吗啡对 CIBP 大鼠的镇痛作用,这可能与通过重建 CIBP 大鼠脊髓中 μ -阿片受体(μ opioid receptor, MOR)表达的下调相关,这可能是 CIBP 治疗的潜在靶点。吗啡耐药性是制约治疗 CIBP 疗效的重要因素,为了观察地佐辛对吗啡耐药性的影响,有研究人员将 Walker 256 大鼠乳腺癌细胞注射到成年雌性 Wistar 大鼠左胫骨下 1/3 骨髓腔,实验第 5 天即成功完成 CIBP 造模,随机分组后治疗组单独吗啡注射或联合地佐辛连续治疗 7 d,并通过在每天给药后 30 min 通过热痛敏法进行行为测试。实验结果表明,吗啡给药 4 d 后镇痛效果显著降低,而低剂量地佐辛与吗啡的组合可以预防或延缓 CIBP 大鼠模型中吗啡耐药性的发展,这可能与中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)和脊髓中阿片受体表达的调节相关^[16]。

1.2.2 E0771 乳腺癌细胞诱导的 CIBP 动物模型

E0771 乳腺癌细胞系是来源于 C57BL/6 小鼠的自发性乳腺癌,而且是非常接近人类乳腺癌的常用实验性乳腺肿瘤模型^[17]。THOMPSON 等^[18]进一步研究阿片药物表达的 toll 样受体-4(toll-like receptor-4, TLR4)对阿片药物耐药及骨质流失的影响,使用了 E0771 乳腺癌细胞系注射到成年雌性 C57BL/6J 小鼠的右侧股骨骨髓腔,形成 CIBP 小鼠模型,在第 0、7、10、14 天对动物进行称量体质量,并进行疼痛行为测试,计算自发退缩次数(number of spontaneous flinches, NSF)。在第 7 天与假手术组相比,CIBP 组 NSF 显著增加。在术后第 7 天获得 CIBP 组疼痛基线后,治疗组及对照组再分别植入含适量吗啡或生理盐水的皮下微型泵。在第 10 天与对照组相比,治疗组小鼠 NSF 显著减少。而在第 14 天,治疗组小鼠对吗啡不再具有抗伤害性,NSF 增加。进一步实验分析证实,持续吗啡给药通过激活 TLR4 诱导同侧股骨内骨质溶解和超敏反应显著增加,这表明长期吗啡给药可增强肿瘤诱导的骨质流失并加剧疼痛行为,这在一定程度上是通过 TLR4 受体机制介导的。为了提高可重复性,使用另一种同基因乳腺癌细胞系(66.1)及替代小鼠品系(BALB/c3H)进行了相同的实验,并获得以上相同实验结果。

1.2.3 MRMT-1 乳腺癌细胞诱导的 CIBP 动物模型

MRMT-1 乳腺癌细胞较早用于 CIBP 造模中^[14],因其浸润和降解骨基质方面的侵袭性较好^[19],目前仍有研究者使用其建立 CIBP 动物模型。近年来有学者将 MRMT-1 乳腺癌细胞注射到成年雌性 SD 大鼠左侧胫骨建立 CIBP 模型以研究双孔钾离子通道(TWIK-related spinal cord potassium channels, TRESK)在 CIBP 发生的相关作用,在第 0、7、14 和 18 天,进行自发性抬脚行为(spontaneous foot lift, SFL)、机械痛敏法以及热痛敏法行为学测试^[20]。实验通过免疫荧光染色及 Western Blot 分析等方法证实了 CIBP 大鼠的后爪皮肤、胫骨骨膜和背根神经节神经元内的相应神经纤维中, TRESK 的表达显著降低,这可能导致其自发性疼痛及诱发性疼痛^[20]。

1.2.4 NCTC 2472 纤维肉瘤细胞诱导的 CIBP 动物模型

NCTC 2472 纤维肉瘤细胞是最早用于制备小鼠股骨 CIBP 模型的肿瘤系^[11],至今在 C3H/He 小鼠中广泛使用^[10]。例如,一项实验将 NCTC 2472 纤维肉瘤细胞注射到成年雄性 C3H/HeN 小鼠左股骨远端的骨髓腔,在第 0、4、7、14、21 天,应用热痛敏法进行行为分析^[21]。CIBP 组缩爪潜伏期值(paw withdrawal latency, PWL)在第 4 天明显下降,而在第 14 天成功诱导 24 只 CIBP 小鼠,治疗组此时连续 7 d 注射吗啡和/或纳布啡。实验结果表明,纳布啡联合吗啡给药较单独吗啡给药延缓了 PWL 值的降低,这可能与低剂量纳布啡与吗啡联合给药导致吗啡耐受延迟出现有关,而该机制的一部分也可能是由于脊髓阿片受体表达的调节。同样有研究者使用 NCTC 2472 纤维肉瘤细胞注射到成年雄性 C3H/HeJ 小鼠左侧股骨以诱导 CIBP 模型,以明确星形胶质细胞中一种重要的抑癌基因(microRNA-199a-3p)减轻 CIBP 的相关机制^[22]。实验在手术后第 0 ~ 24 天,每 4 d 评估其机械缩足反射阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)、热痛敏缩足潜伏时(paw withdrawal thermal latency, PWTL)和 NSF 来评估疼痛行为。第 12 天时, CIBP 小鼠的 PWTL 和 PWMT 开始降低, NSF 持续上升至第 24 天,故成功构建 CIBP 模型。进一步行定量逆转录聚合

酶链反应检测和微小核糖核酸测序证实, CIBP 小鼠的 microRNA-199a-3p 表达降低。而注射 microRNA-199a-3p 激动剂后, CIBP 小鼠组 PWMT 和 PWTL 升高、NSF 降低,验证其减轻了 CIBP,进一步研究发现这可能与抑制神经炎症和髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response protein 88, MyD88)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路相关^[22]。

1.2.5 RM-1 前列腺癌细胞诱导的 CIBP 动物模型

骨活检(一种类似于上述胫骨或股骨内注射的过程)被认为是十分痛苦的,学者建议在手术期间或手术后使用局部和全身镇痛药^[23]。基于伦理, CIBP 造模中也应镇痛,但镇痛又可能会干扰肿瘤模型的建立。一项研究为了观察镇痛药对骨转移小鼠模型肿瘤生长的影响,使用成年雄性 C57BL/6J 或 SCID 小鼠右侧胫骨骨髓腔分别注射前列腺癌 RM-1 细胞或 PC3 细胞以造模,并同时皮下注射止痛药卡洛芬或丁丙诺啡。在术前、术后 24 h 以及术后第 7、14 天进行机械痛敏法行为测试^[24],实验结果表明,与对照组相比, CIBP 组的 PWMT 从第 2 天显著下降直到第 14 天。而镇痛组与 CIBP 组,在疼痛行为测试、运动、体质量及肿瘤测量方面,两组小鼠各组间存在零星差异,均未发现显著性差异。这也说明卡洛芬或丁丙诺啡给药均未始终影响肿瘤生长或动物痛觉、运动、体质量,这也否认了镇痛对肿瘤模型建立的影响。在上述实验及既往使用 RM-1 前列腺癌细胞的实验中^[25],疼痛行为测试主要集中在涉及植入肿瘤肢体的痛敏反应上,而不是自发性或运动诱发的疼痛。而近期有实验采用了自发性或运动诱发的疼痛行为测试方法,弥补上述缺点^[26]。该实验使用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和荧光素酶报告基因转染 RM-1 前列腺癌细胞注射到成年雄性 C57BL/6 小鼠右股骨中以建立具有免疫活性 CIBP 小鼠模型,实验在第 0、5、7、9、12、14、16 和 20 天使用自发性疼痛行为以及跑轮训练(一种新的肢体使用评分方法)进行疼痛行为测试。结果提示,与假手术组相比, CIBP 组在第 12 ~ 20 天期间表现出自发且逐渐更严重的同侧肢体保护行为,并且患肢运动时疼痛和功能能力下降,这代表成功制备

了 CIBP 模型。实验进一步利用组织学、放射学和 μ CT 分析来检查肿瘤诱导的骨重塑,观察到溶骨病变以及荷瘤股骨中骨膜外异常骨形成,这与骨转移性前列腺癌患者的临床表现十分相似,且还通过免疫组化观察到同侧脊髓浅层(I ~ II)但未深层(III ~ V)中对蛋白激酶 R 样内质网激酶免疫反应的细胞谱显著增加。这种贴近人类还兼具较高免疫活性的 CIBP 模型对评估免疫调节疗法治疗 CIBP 至关重要。

1.2.6 Lewis 肺癌细胞诱导的 CIBP 动物模型

Lewis 肺癌细胞是来源于 C57BL/6 小鼠中自发产生的肺腺癌,其特点是在体外和体内繁殖倍增时间短,具有侵袭性生物学行为且重复性较好^[27]。虽然肺癌骨转移发病率较高,但 Lewis 肺癌细胞在 CIBP 造模中应用相对较少。有研究指出干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)是治疗慢性疼痛的有前途的新靶点^[28]。但其对 CIBP 疗效不确切。WANG 等^[29]为了明确其是否对 CIBP 有效,通过对成年 C57BL/6J 雄性及雌性小鼠注射 Lewis 肺癌细胞到小鼠左侧股骨,建立了小鼠 CIBP 模型。在肿瘤植入后的第 3、7 天对这些小鼠腹膜内注射两次载体或 STING 激动剂。在接种后的第 0、7、10、14 天对荷瘤腿的后爪进行疼痛行为测试,包括机械痛敏法与冷痛敏法。实验结果证实,STING 激动剂给药后显著降低了 7、10 和 14 天的机械痛敏阈值和第 10 及 14 天的冷痛敏阈值,未观察到明显的性别差异。且观察到载体组和 STING 组的体质量没有差异,表明实验方案相对安全,无全身胃肠道毒性。

2 中医药干预 CIBP 模型的相关镇痛机制研究

2.1 针灸干预 CIBP 模型的相关镇痛机制研究

针灸广泛用于 CIBP 的治疗中,一项通过磷酸化蛋白质组学分析电针治疗 CIBP 相关机制的研究中,通过选取已制备好 CIBP 大鼠模型的双侧足三里及昆仑穴进行电针治疗 7 次^[30]。后对大鼠 DRG 的磷酸化蛋白质组学谱显示,CIBP 造模或电针治疗后蛋白质磷酸化发生显著变化,而抑制雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of

rapamycin, mTOR)信号减轻了 CIBP 大鼠的 PWT,这表明 mTOR 磷酸化和 mTOR 通路可能是电针缓解 CIBP 的潜在机制。腕踝针广泛用于镇痛治疗中,有临床研究指出腕踝针联合阿片类药物可提高顽固性癌性疼痛的疗效并减少阿片类药物的不良反应,但该研究未深入探索其机制^[31]。ZHANG 等^[3]进一步研究腕踝针对 CIBP 的影响并探索腕踝针和电针对 CIBP 的镇痛机制,将 32 只 Wistar 大鼠分为假手术、CIBP、电针、腕踝针 4 组,CIBP 在后 3 组的大鼠中被诱导,并进行疼痛行为测试以及 Western Blot、免疫组化等实验方法。实验结果表明,二者均通过抑制 5-羟色胺和 5-羟色胺 3A 受体的表达并增加 MOR 及其配体内啡肽-1 在延髓头侧腹内侧-脊髓通路中的表达来缓解 CIBP。艾灸具有热效应、药理效应和辐射效应的综合作用,同样广泛用于止痛,其镇痛机制可能与艾灸在调节疼痛相关信号通路、减少神经炎症和抑制促炎细胞因子等有关^[32]。然而,目前艾灸治疗癌痛大部分为临床研究,缺乏艾灸治疗癌痛相关机制的动物实验研究^[33]。

2.2 中药外治干预 CIBP 模型的相关镇痛机制研究

中药外治是外用中药本草通过皮肤及腔道黏膜进入机体,从而来预防、治疗疾病,包括局部涂擦、贴敷、熏洗等,在 CIBP 患者中有着广泛的应用^[6]。“固痛方”是由附子、姜黄、肉桂、全蝎等九种中药配制而成用于治疗 CIBP 的中药方剂,CHANG 等^[34]为了研究其治疗 CIBP 的分子机制,将制备的“固痛方”提取物通过透皮给药施用于已制备的 CIBP 小鼠模型的剃光荷瘤胫骨上,并测定其血清白细胞介素 6 和转化生长因子- β 1 的水平,进一步分析表明“固痛方”可以降低血清白细胞介素 6 和转化生长因子- β 1 的水平,从而限制骨皮质损伤的范围以起到治疗 CIBP 的作用。既往药理学及临床研究表明,中药复方制剂“癌痛平”具有明确的镇痛作用,几乎无副作用^[35-36]。近期该团队进一步深入探索“癌痛平”中药贴干预 CIBP 的机制,将造模成功后的 CIBP 小鼠随机分为治疗组和对照组,分别予“癌痛平”中药贴及空白对照贴片于小鼠背部贴敷^[37]。实验结果提示,与对照组相比,治疗组可显著提高小鼠 PWT 和 PWL,进一步分析提示这可能与通过抑制小

胶质细胞的激活来缓解 CIBP 有关。

2.3 中药内服干预 CIBP 模型的相关镇痛机制研究

乌头是中药里一种常用于治疗寒冷疼痛的药物,而乌头碱是其主要活性成分。一项探索乌头碱治疗 CIBP 效果以及可能机制的研究中,将乌头碱腹腔注射到制备好的 CIBP 动物模型中^[38]。实验结果表明,其能减轻冷痛敏及机械痛敏,而实验分析得出这与乌头碱通过抑制瞬时受体电位锚蛋白 1 (transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1) 表达来抑制脊髓神经元的兴奋性有关。故乌头碱是治疗 CIBP 的可能药物之一。TRPA1 受体是开发治疗 CIBP 新型止痛药的潜在靶点之一^[39],另有研究表明 TRPA1 在乳腺癌诱导 CIBP 小鼠模型中,对痛觉过敏产生起到重要作用^[40]。GONG 等^[41]为了明确中药方剂阳和汤是否可以通过抑制 TRPA1 来减轻 CIBP,通过大鼠胫骨注射乳腺癌细胞及含阳和汤溶剂进行 CIBP 造模以及治疗给药。实验结果证实,阳和汤治疗组可阻止大鼠 PWMT 和 PWTL 的降低,且水平接近假手术组。进一步分析证实,阳和汤给药后通过调节神经元上 TRPA1 的表达,减轻了大鼠的伤害感受和疼痛感。

2.4 其他中医药治疗手段干预 CIBP 模型的相关镇痛机制研究

气功是中华民族一项历史悠久的健身养生术,广泛应用于癌症治疗,如改善癌症患者生活质量、疲劳、免疫功能等^[42]。一项 Meta 分析指出,气功可能对成人癌痛产生有益影响^[43],并且一项研究气功镇痛机制的动物实验指出:气功镇痛机制可能是胆碱能神经的激活引起的轴突反射,抑制胆碱酯酶和躯体自主反射^[44]。有系统评价表明,推拿、太极等中医药干预措施可能减轻乳腺癌患者的癌痛症状^[45]。但至今仍尚缺乏针对这些治疗手段干预 CIBP 相关机制的动物实验研究。

3 小结

目前对于 CIBP 的治疗手段仍存在疗效欠佳及不良反应等缺点,学者们运用动物模型围绕 CIBP 的发病及干预手段的作用机制进行了深入研究。笔者总结了近 3 年常用的 CIBP 动物模型

的构建方法及优缺点,发现接种肿瘤细胞系的选择较多是 Walker256 乳腺癌细胞、NCTC 2472 纤维肉瘤细胞以及 RM-1 前列腺癌细胞等,其他肿瘤细胞系还有 MRMT-1 乳腺癌细胞、E0771 乳腺癌细胞、Lewis 肺癌细胞、PC3 前列腺癌细胞等。而这与以上相关肿瘤易发生骨转移有关,如高达 70% 的前列腺癌和乳腺癌患者存在骨转移^[46],而甲状腺癌、妇科恶性肿瘤等常见引起骨转移的瘤种未见相关 CIBP 动物模型的研究,未来可对此类肿瘤诱发的 CIBP 进行相关研究。另外,以上造模方法中动物来源主要选择为 C57BL/6 小鼠、C3H/He 小鼠以及 SD 大鼠,其次有 BALB/c 小鼠、Wistar 大鼠等,手术接种部位主要是小鼠股骨、大鼠胫骨,其他较少见为小鼠胫骨等。选择上述啮齿动物类型及接种部位的优势除了其广泛地应用于肿瘤学、生长快、抵抗力强、操作简易等外,还有上述方法是将癌细胞注射到骨骼中的部位被密封,以限制肿瘤在髓内腔的生长。这与癌细胞的全身给药相比,在骨骼中直接注射癌细胞的 CIBP 模型更有助于评估肿瘤随时间的生长、放射成像、骨退化观察、组织病理学变化检查、特定部位行为测试以及评估发生在肿瘤部位的神经化学变化等^[47]。而上述 CIBP 动物模型疼痛行为测试方法有单一或多样,主要采用机械痛敏法、冷痛敏法、热痛敏法等诱发性痛觉行为观察,少部分实验采用自发性痛觉行为观察。具体来说,机械痛敏法通过手动或电子 Von Frey 纤维细丝刺激缩足反应测定 PWMT 来判断 CIBP 动物模型机械痛觉行为异常。冷痛敏法通过冷板、丙酮蒸发、冷足底实验等测定冷痛敏阈值来判断 CIBP 动物模型冷痛觉行为异常。热痛敏法通过甩尾、热板、热探针等实验测定 PWTL 来判断 CIBP 动物模型热痛觉行为异常^[48]。自发性痛觉行为观察通过观察自发性的退缩或抬脚行为等行为测定 NSF、SFL 来判断 CIBP 动物模型自发性痛觉行为异常。但是这些方法都缺乏明确统一的依据和标准,并且对于自发痛行为的评价容易被忽视,对于疼痛的临床表现分析存在不足。最后,分析上述动物模型的共性优点有:疼痛诱导时间短、持续久以及安全性较高、可重复性好、行为测试方法多样使得数据更综合、准确等。但部分实验也存在着行为测试方法单一、疼痛诱导时

间较长、疼痛随访时间较短以及疼痛行为测试可能混杂干扰因素等缺点,这需要在今后的实验中持续改进。

通过总结近年来 CIBP 动物模型在中医药相关镇痛机制研究的应用,发现中医药镇痛机制可能与抑制破骨细胞活化、抑制脊髓神经元的兴奋性、抑制小胶质细胞的激活以及调节疼痛介质和 mTOR 等相关信号通路等有关。而研究指出, CIBP 产生机制在于当骨肿瘤产生或当骨骼破坏发生时,感觉神经元会表现得像萌芽一样产生有毒的刺激物^[2]。此外, DRG 活化、小胶质细胞活化、酸性环境产生、炎症因子表达、离子通道变化等诸多因素也参与 CIBP 的产生和维持。这与上述中医药干预 CIBP 的镇痛机制部分重合,也验证了中医药干预 CIBP 的有效性,但今后中医药干预 CIBP 还可从酸性环境产生、炎症因子表达等机制深入地进一步探索。另外,中医药干预 CIBP 的动物实验多从某一治疗手段以及某一单一机制研究,尚未对综合治疗干预方法以及多机制之间的联系进行相关研究。并且中医药的关键在于“辨证论治”,这在以往的 CIBP 动物模型未得到体现,如何制备常见中医辨证类型的 CIBP 动物模型亟待解决。此外,目前还缺乏艾灸、气功、推拿等中医药治疗方法对于 CIBP 的相关镇痛机制研究,应对上述问题进行深入探讨。针对目前研究的短板,未来应加快建立科学、合理、规范并符合中医药“辨证论治”特点的建立标准化的 CIBP 动物模型,可分别应用中医药综合治疗方法以及尚未明确有效机制的治疗方法进行干预,并采用可重复性好、安全性高的多种测试方法来进一步准确观察模型动物的行为学表现。同时,可采用现代前沿生物科学技术,如单细胞多组学联合测序、空间转录组测序等,全面分析中医药干预 CIBP 的多机制镇痛作用。研究人员期待通过不断探索、总结,进一步完善 CIBP 动物模型,帮助中医药从基础研究到临床实践应用,使更多且更有效的治疗 CIBP 的中医药手段得到推广和应用。

参 考 文 献 (References)

- [1] FLIPPEN A, KHASABOVA I A, SIMONE D A, et al. Systemic administration of Resolvin D1 reduces cancer-induced bone pain in mice: lack of sex dependency in pain development and analgesia [J]. *Cancer Med*, 2024, 13 (15): e70077.
- [2] ZHENG X Q, WU Y H, HUANG J F, et al. Neurophysiological mechanisms of cancer-induced bone pain [J]. *J Adv Res*, 2021, 35: 117-127.
- [3] ZHANG C, XIA C, ZHANG X, et al. Wrist-ankle acupuncture attenuates cancer-induced bone pain by regulating descending pain-modulating system in a rat model [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 13.
- [4] LÓPEZ-CANO M, FONT J, ASO E, et al. Remote local photoactivation of morphine produces analgesia without opioid-related adverse effects [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(7): 958-974.
- [5] ZHANG X, QIU H, LI C, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. *Biosci Trends*, 2021, 15(5): 283-298.
- [6] YAN X, YAN Z, LIU W, et al. External application of traditional Chinese medicine in the treatment of bone cancer pain: a meta-analysis [J]. *Support Care Cancer*, 2016, 24 (1): 11-17.
- [7] YAN Z, MURONG Z, HUO B, et al. Acupuncture as a complementary therapy for cancer-induced bone pain: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pain Res (Lausanne)*, 2022, 3: 925013.
- [8] ZAJĄCZKOWSKA R, KOCOT-KEPSKA M, LEPPERT W, et al. Bone pain in cancer patients: mechanisms and current treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 6047.
- [9] 羊璞, 栗胜勇, 李羚, 等. 疼痛抑郁共病动物模型及针刺作用机制研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43 (11): 1401-1408.
- YANG P, SU S Y, LI L, et al. Research progress on animal models of pain-depression dyad and mechanism of acupuncture [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2023, 43 (11): 1401-1408.
- [10] HAROUN R, WOOD J N, SIKANDAR S. Mechanisms of cancer pain [J]. *Front Pain Res (Lausanne)*, 2022, 3: 1030899.
- [11] SCHWEI M J, HONORE P, ROGERS S D, et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(24): 10886-10897.
- [12] MEDHURST S J, WALKER K, BOWES M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. *Pain*, 2002, 96(1/2): 129-140.
- [13] PINEDA-FARIAS J B, SALOMAN J L, SCHEFF N N. Animal models of cancer-related pain: current perspectives in translation [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 610894.
- [14] SHENOY P A, KUO A, VETTER I, et al. The walker 256 breast cancer cell-induced bone pain model in rats [J].

- Front Pharmacol, 2016, 7: 286.
- [15] FU J, XU M, XU L, et al. Sulforaphane alleviates hyperalgesia and enhances analgesic potency of morphine in rats with cancer-induced bone pain [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 909: 174412.
 - [16] WU L X, DONG Y P, ZHU Q M, et al. Effects of dezocine on morphine tolerance and opioid receptor expression in a rat model of bone cancer pain [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1128.
 - [17] LE NAOUR A, ROSSARY A, VASSON M P. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty [J]. Cancer Med, 2020, 9(21): 8074–8085.
 - [18] THOMPSON A L, GRENALD S A, CICCONE H A, et al. Morphine-induced osteolysis and hypersensitivity is mediated through toll-like receptor-4 in a murine model of metastatic breast cancer [J]. Pain, 2023, 164(11): 2463–2476.
 - [19] DORÉ-SAVARD L, OTIS V, BELLEVILLE K, et al. Behavioral, medical imaging and histopathological features of a new rat model of bone cancer pain [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13774.
 - [20] LIU J P, JING H B, XI K, et al. Contribution of TRESK two-pore domain potassium channel to bone cancer-induced spontaneous pain and evoked cutaneous pain in rats [J]. Mol Pain, 2021, 17: 17448069211023230.
 - [21] REN B, ZHANG J, YANG X, et al. Co-Administration of nalbuphine to improve morphine tolerance in mice with bone cancer pain [J]. Mol Pain, 2023, 19: 17448069231178741.
 - [22] SAADH M J, RASHED A B, JAMAL A, et al. miR-199a-3p suppresses neuroinflammation by directly targeting MyD88 in a mouse model of bone cancer pain [J]. Life Sci, 2023, 333: 122139.
 - [23] BARRETO F C, COSTA C R V D, REIS L M D, et al. Bone biopsy in nephrology practice [J]. J Bras Nefrol, 2018, 40(4): 366–374.
 - [24] XU J J, THURSTON S E, ROBINSON T J, et al. Effects of analgesics on tumor growth in mouse models of prostate cancer bone metastasis [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2021, 60(3): 341–348.
 - [25] LLORIÁN-SALVADOR M, PEVIDA M, FERNÁNDEZ-GARCÍA M T, et al. Hypernociceptive responses following the intratibial inoculation of RM1 prostate cancer cells in mice [J]. Prostate, 2015, 75(1): 70–83.
 - [26] JIMENEZ-ANDRADE J M, RAMÍREZ-ROSAS M B, HEE PARK S, et al. Evaluation of pain related behaviors and disease related outcomes in an immunocompetent mouse model of prostate cancer induced bone pain [J]. J Bone Oncol, 2023, 43: 100510.
 - [27] ACENCIO M M P, PUKA J, MARCHI E, et al. A modified experimental model of malignant pleural disease induced by lung Lewis carcinoma (LLC) cells [J]. J Transl Med, 2015, 13: 302.
 - [28] DONNELLY C R, JIANG C, ANDRIESEN A S, et al. STING controls nociception via type I interferon signalling in sensory neurons [J]. Nature, 2021, 591(7849): 275–280.
 - [29] WANG K, DONNELLY C R, JIANG C, et al. STING suppresses bone cancer pain via immune and neuronal modulation [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4558.
 - [30] WANG W, ZHOU Y, CAI Y, et al. Phosphoproteomic profiling of rat's dorsal root Ganglia reveals mTOR as a potential target in bone cancer pain and electro-acupuncture's analgesia [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 593043.
 - [31] 吴秋兰, 曹雯, 王伟, 等. 腕踝针配合阿片类药物治疗难治性癌痛: 随机对照研究 [J]. 中国针灸, 2019, 39(10): 1051–1054.
 - WU Q L, CAO W, WANG W, et al. Wrist-ankle needle combined with opioid drugs on refractory cancer pain: a randomized controlled trial [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2019, 39(10): 1051–1054.
 - [32] LI Y, HONG E, YE W, et al. Moxibustion as an adjuvant therapy for cancer pain: a systematic review and meta-analysis [J]. J Pain Res, 2023, 16: 515–525.
 - [33] LU S, WANG B, WANG J, et al. Moxibustion for the treatment of cancer and its complications: efficacies and mechanisms [J]. Integr Cancer Ther, 2023, 22: 15347354231198089.
 - [34] CHANG J, JIANG Z, JIN W, et al. The molecular mechanism of traditional Chinese medicine prescription: gu-Tong formula in relieving osteolytic bone destruction [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 4931368.
 - [35] 吴勉华, 尚文斌, 尹标, 等. 癌痛平镇痛作用的实验研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(4): 28.
 - WU M H, SHANG W B, YIN B, et al. Experimental study on analgesic effect of aitingping [J]. Chin J Inf TCM, 1999, 6(4): 28.
 - [36] 吴勉华, 周学平, 程海波, 等. 癌痛平胶囊治疗癌性疼痛的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3): 218–221.
 - WU M H, ZHOU X P, CHENG H B, et al. Clinical study on aitingping capsule in treating cancerous pain [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2005, 25(3): 218–221.
 - [37] CHEN Y, WU M. Aitingping patch could alleviate cancer pain via suppressing microglia activation and modulating the miR-150-5p/CXCL12 signaling [J]. Postgrad Med J, 2024, 100(1180): 96–105.
 - [38] JIN X, CHENG J, ZHANG Q, et al. Aconitine-A promising

- candidate for treating cold and mechanical allodynia in cancer induced bone pain [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114284.
- [39] DE ALMEIDA A S, PEREIRA G C, BRUM E D S, et al. Role of TRPA1 expressed in bone tissue and the antinociceptive effect of the TRPA1 antagonist repeated administration in a breast cancer pain model [J]. *Life Sci*, 2021, 276: 119469.
- [40] ZHAO D, HAN D F, WANG S S, et al. Roles of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in regulating bone cancer pain via TRPA1 signal pathway and beneficial effects of inhibition of neuro-inflammation and TRPA1 [J]. *Mol Pain*, 2019, 15: 1744806919857981.
- [41] GONG H, YANG L I, FENG L, et al. Yanghe decoction attenuated pain hypersensitivity induced by Michigan cancer foundation-7 injection in rats with bone metastases from breast cancer by inhibiting transient receptor potential ankyrin 1 [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(6): 948–955.
- [42] ZENG Y, LUO T, XIE H, et al. Health benefits of Qigong or Tai Chi for cancer patients; a systematic review and meta-analyses [J]. *Complement Ther Med*, 2014, 22(1): 173–186.
- [43] BAO Y, KONG X, YANG L, et al. Complementary and alternative medicine for cancer pain; an overview of systematic reviews [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 170396.
- [44] TAKESHIGE C, SATO M. Comparisons of pain relief mechanisms between needling to the muscle, static magnetic field, external Qigong and needling to the acupuncture point [J]. *Acupunct Electrother Res*, 1996, 21(2): 119–131.
- [45] BEHZADMEHR R, DASTYAR N, MOGHADAM M P, et al. Effect of complementary and alternative medicine interventions on cancer related pain among breast cancer patients; a systematic review [J]. *Complement Ther Med*, 2020, 49: 102318.
- [46] STOPPA I, DIANZANI C, CLEMENTE N, et al. Alendronate-grafted nanoemulsions for bone-targeted vincristine delivery; preliminary studies on cell and animal models [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(2): 238.
- [47] BROWN D C, IADAROLA M J, PERKOWSKI S Z, et al. Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model [J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(5): 1052–1059.
- [48] DEUIS J R, DVORAKOVA L S, VETTER I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 284.

[收稿日期] 2024-10-16