

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.20.011

实验研究

阿尔茨海默病虚损瘀毒证小鼠模型的构建与评价

刘晶¹, 刘欣¹, 张哲祚¹, 于顾然¹✉, 李浩², 刘南阳³, 裴卉³

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中路155号, 210029; 2. 中国中医科学院望京医院; 3. 中国中医科学院西苑医院

[摘要] 目的 采用多因素联合诱导的方式构建阿尔茨海默病(AD)虚损瘀毒证病证结合动物模型, 并对其评价。方法 将24只2月龄SPF级C57BL/6J小鼠随机分为空白对照组和角叉菜胶低(0.02%)、中(0.04%)、高(0.06%)剂量组, 每组6只。采用角叉菜胶诱导血瘀模型, 筛选角叉菜胶造模浓度。将30只5月龄APP/PS1小鼠随机分为毒损组、气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组, 每组6只, 另以6只5月龄C57BL/6J小鼠作为同窝对照组。利用睡眠剥夺、角叉菜胶和氢化可的松进行多因素联合诱导实验。气虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠通过睡眠剥夺诱导气虚; 肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组通过氢化可的松溶液灌胃诱导肾虚; 虚损瘀毒组通过角叉菜胶溶液腹腔注射以诱导血瘀。造模期间, 每周观察并记录小鼠一般状态和体重; 造模结束次日, 利用抓力仪检测小鼠抓力指数, 水迷宫实验检测小鼠行为学指标; 行为学检测结束后处死、取材, 计算小鼠脾脏指数、肾脏指数、睾丸指数, 尼氏染色观察小鼠海马组织形态, HE染色观察主动脉形态, 免疫荧光法检测小鼠海马组织 β -淀粉样蛋白1-42($A\beta_{1-42}$)沉积情况, ELISA法检测小鼠血清血管黏附分子1(VCAM-1)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、皮质醇、促肾上腺皮质激素(ACTH)水平, Western Blot法检测海马组织淀粉样前体蛋白(APP)、早老蛋白1(PS1)、 β 位淀粉样蛋白前体蛋白切割酶1(BACE1)蛋白表达。结果 筛选出0.06%浓度的角叉菜胶进行后续实验。多因素联合诱导实验结果显示, 与同窝对照组比较, 虚损瘀毒组小鼠造模后体重、抓力指数下降, 平台停留时间缩短、穿越平台次数减少, 脾脏指数、肾脏指数、睾丸指数下降, 海马组织 $A\beta_{1-42}$ 荧光表达量升高, 血清VCAM-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、皮质醇水平升高, 海马组织APP、BACE1、PS1蛋白表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 海马区神经元出现损伤, 细胞核固缩, 尼氏体溶解甚至消失。与毒损组、气虚组、肾虚组、虚损组比较, 虚损瘀毒组更能全面反映阿尔茨海默病虚损瘀毒证的病理改变。结论 通过睡眠剥夺、角叉菜胶和氢化可的松联合诱导的方式构建了AD虚损瘀毒证小鼠病证结合模型, 该模型具有气虚、肾虚、血瘀的证候特征。

[关键词] 阿尔茨海默病; 虚损瘀毒证; 动物模型; 病证结合

随着我国人口老龄化加剧^[1], 阿尔茨海默病(AD)的患病率显著上升^[2]。该疾病的病因与发病机制尚未完全阐明, 当前临床上仍缺乏有效的治疗手段。AD可归属于中医学“健忘”“呆病”等范畴。王永炎院士创新性提出AD的“毒损脑络”病机假说, 指出本病的病机在于年高体虚、七情内伤、脏腑功能失调、气血亏虚、肾精衰枯等内在虚损, 导致痰浊、瘀血等病理产物内生, 蕴积日久,

化生毒邪, 形成痰毒、瘀毒等内生浊毒, 损伤脑络, 致神机失用, 渐为痴呆^[3]。另有研究^[4]亦揭示, 脏腑虚损是AD的病理基础, 虚损状态下易致瘀血内生、毒邪内蕴, 瘀毒互结进而蒙蔽清窍、损伤脑络, 推动AD疾病进展。 β -淀粉样蛋白($A\beta$)是AD的特征性病理产物。其中, β -淀粉样蛋白1-42($A\beta_{1-42}$)和 β -淀粉样蛋白25-35($A\beta_{25-35}$)等片段具有很强的神经毒性, 可归属为内生毒邪范畴^[5]。

中医病证结合模型融合了中医的“病”“证”两个核心概念。当前中医AD病证结合模型多采用单因素或双因素联合的造模方式, 如利用D-半

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项(2022YFC3501400)

✉ 通讯作者: dr.ygrdf@163.com

乳糖联合高脂饮食构建痰浊阻窍AD大鼠模型^[6],利用高脂饮食联合冰水浴构建痰瘀互结AD小鼠模型^[7],利用D-半乳糖联合海马注射A β_{25-35} 构建肾虚AD大鼠模型^[8]。然而,上述模型不能体现AD复杂的病理特征,难以精准反映虚损瘀毒的中医病机。有研究显示,睡眠剥夺会干扰小鼠的生理节律,进而诱导小鼠出现气虚表现^[9]。氢化可的松属于糖皮质激素,能够模拟肾虚状态下机体内激素水平失衡等病理变化,因此常被用于肾虚证模型构建^[10]。角叉菜胶具有独特的化学性质和生物学效应,在慢性血栓和血瘀造模方面应用广泛^[11-12]。鉴于此,本研究采用睡眠剥夺、氢化可的松和角叉菜胶联合造模的方法,以疾病指标、组织病理学指标、血清学指标进行模型评价,构建符合虚损瘀毒中医病机的AD动物模型,为虚损瘀毒病机相关的药物研发及药物作用机制研究提供可靠的实验载体。本实验经过南京中医药大学附属医院动物伦理委员会批准(伦理编号:2023DW-037-01)。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠24只,体质量22~28 g,鼠龄2个月;SPF级雄性APP/PS1小鼠30只及C57BL/6J小鼠6只,体质量25~35 g,鼠龄5个月,均由杭州子源实验动物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004,质量合格证号:20240414Abb0105000912。实验小鼠均饲养于中国药科大学动物实验中心SPF级动物房,温度22~25℃,相对湿度40%~60%,光照12 h,自由进食饮水。

1.2 主要试剂和仪器

BCA蛋白定量试剂盒(批号:091823240308),上海碧云天生物技术股份有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)、皮质醇、促肾上腺皮质激素(ACTH)ELISA试剂盒(批号均为:202405),上海酶免生物科技有限公司;A β_{1-42} 抗体(批号:14974S),美国CST公司;淀粉样前体蛋白(APP,批号:00132908)、早老蛋白1(PS1,批号:00123281)、 β -actin(批号:10038080)、山羊抗兔抗体(批号:20001011)、山羊抗小鼠抗体(批号:20001013),武汉三鹰生物技术有限公司; β 位淀粉样蛋白前体蛋白切割酶1(BACE1,批号:

20230302),湖南艾方生物科技有限公司;尼氏染色液、苏木素染液、伊红染液(批号分别为:CR2311045、CR2409053、CR2410143),武汉赛维尔生物科技有限公司。

XR-XS108型睡眠剥夺仪、XR501型大小鼠抓力测定仪,上海欣软信息科技有限公司;Morris水迷宫视频分析系统,北京众实迪科技发展有限公司;Donatello型脱水机,意大利DIAPATH公司;JB-P5型包埋机,武汉俊杰电子有限公司;RM2016型病理切片机,上海徕卡仪器有限公司;G6100型正置荧光显微镜,日本Nikon公司;Pan-noramic MID型扫描仪,匈牙利3DHISTECH公司;Tanon-4600型化学发光系统,上海天能生命科学有限公司;EL10A型自动酶标仪,山东博科控股集团有限公司。

1.3 药物

分别称取15 mg角叉菜胶(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:C16292122)溶于75、37.5、25 ml的0.9%氯化钠注射液中,制备成浓度0.02%、0.04%、0.06%的角叉菜胶溶液,保存于4℃冰箱,使用前摇匀。氢化可的松注射液(5 mg/ml,山东省芮城县红宝兽药有限责任公司,批号:2023090701)。

2 方法

2.1 角叉菜胶给药剂量的筛选

该造模方法中涉及多种因素,实验设计时采用控制变量的原则,对造模因素进行了逐一探索。结合角叉菜胶致慢性血瘀相关文献^[13],以C57BL/6J小鼠(APP/PS1转基因小鼠的背景鼠)作为研究对象,探索角叉菜胶的有效干预剂量。利用随机数字表将24只C57BL/6J小鼠随机分为空白对照组和角叉菜胶低、中、高剂量组,每组6只。角叉菜胶低、中、高剂量组小鼠分别予0.02%、0.04%、0.06%角叉菜胶溶液腹腔注射,空白对照组小鼠予0.9%氯化钠注射液腹腔注射,注射量均为0.1 ml/10 g,每天1次,连续28天。

造模期间,记录小鼠的精神状态、毛发及活动状态,每周记录小鼠体质量。造模结束次日,所有小鼠眼球取血后处死,剥离主动脉,将主动脉置于4%多聚甲醛中固定24 h后,进行组织包埋切片,用石蜡切片机将蜡块切成3~4 μ m的薄片,用于形态学检测;全血室温静置分层后,预冷离心机至4℃,3500 r/min离心10 min(离心半径为16 cm),取

血清, 置于 -20°C 冰箱保存, 用于血清 VCAM-1、ICAM-1、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 指标检测。依据上述结果确定角叉菜胶致慢性血瘀的最佳剂量。

2.2 多因素联合诱导 AD 模型

采用睡眠剥夺、氢化可的松和角叉菜胶联合造模的方法, 构建符合 AD 虚损瘀毒型小鼠模型。同时, 设立单一睡眠剥夺、单一氢化可的松灌胃以及睡眠剥夺联合氢化可的松干预组别, 以研究不同因素对动物模型构建的影响。利用随机数字表将 30 只 APP/PS1 小鼠随机分为毒损组、气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组, 每组 6 只。另选取 6 只 C57BL/6J 小鼠作为同窝对照组。适应性喂养 1 周后开始造模。其中, 气虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠进行睡眠剥夺, 每天 8~12 h, 持续 28 天, 以建立气虚模型^[14]; 肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠, 在造模后第 4 周开始予氢化可的松溶液灌胃, 浓度为 5 mg/kg, 灌胃剂量为 0.1 ml/10 g, 隔日 1 次, 共 4 次, 以建立肾虚模型^[15], 其余各组小鼠予等量 0.9% 氯化钠注射液灌胃; 虚损瘀毒组小鼠需在睡眠剥夺干预的同时依据角叉菜胶给药剂量筛选结果, 给予最佳剂量的角叉菜胶溶液腹腔注射, 其余各组小鼠予等量 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射, 注射剂量为 0.1 ml/10 g, 每天 1 次, 连续 28 天。

2.3 观察指标和方法

造模结束次日, 所有小鼠进行抓力指数和行为学检测; 行为学检测完成后, 眼球取血后脱颈椎处死。利用随机数字表, 从每组中选取 3 只小鼠, 冰上分离脑组织, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 进行石蜡包埋, 用石蜡切片机将蜡块切成 3~4 μm 的薄片, 用于形态学和免疫组化检测; 每组剩余 3 只小鼠分离脑组织, 剥离双侧海马, 液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱, 用于 Western Blot 检测。此外, 取所有小鼠的脾脏、肾脏和睾丸, 称取质量, 用于计算脏器指数; 全血室温静置 2 h 后, 预冷离心机至 4°C , 3500 r/min 离心 10 min (离心半径为 16 cm), 取血清, 置于 -20°C 冰箱保存, 用于血清指标检测。

根据病证结合模型的建立标准^[16], 以小鼠活动情况、抓力指数和脾脏指数作为气虚的评价指标, 以肾脏、睾丸指数及血清皮质醇、ACTH 水平作为肾虚的评价指标, 以主动脉形态、血清中的黏附分子 (VCAM-1、ICAM-1) 和炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 水平作为血瘀的评价指标, 以炎症因子水平、海马组织 $\text{A}\beta_{1-42}$ 沉积情况和 $\text{A}\beta$ 生成相关

蛋白 (APP、BACE1、PS1) 表达作为毒的评价指标, 以学习记忆能力检测和脑组织形态作为 AD 动物模型的一般评价指标, 评价 AD 虚损瘀毒证小鼠模型。

2.3.1 一般状态及体质量 实验过程中, 观察小鼠的精神状态、毛发及活动状态, 每周记录小鼠体质量。

2.3.2 抓力指数 将小鼠放在抓力测定仪上, 拉住鼠尾向后拉, 重复 3 次, 计算 3 次抓力指数的平均值。

2.3.3 行为学检测 利用水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力。检测前将小鼠提前放置于实验房间并让小鼠自由游泳, 以减少应激。水迷宫实验分为定位航行和空间探索两个阶段。定位航行阶段为期 5 天, 固定平台并将其隐藏于水下, 将小鼠从 4 个不同位置放入水中, 记录小鼠找到平台的时间; 定位航行实验结束次日, 进行空间探索实验, 撤去平台, 记录 1 min 内小鼠穿越平台次数和平台停留时间。

2.3.4 脏器指数 分别称取脾脏、双侧肾脏、双侧睾丸的湿重及小鼠体质量, 计算脾脏指数、肾脏指数、睾丸指数。脾脏 (肾脏或睾丸) 指数 (%) = 脾脏 (双侧肾脏或双侧睾丸) 质量 (g) $\div$ 小鼠体质量 (g) $\times 100\%$ 。

2.3.5 尼氏染色观察海马组织形态 取出制备好的脑组织石蜡切片, 依次进行脱蜡、水化等步骤, 用尼氏染色液进行染色。染色完成后, 对切片进行脱水、透明处理、封片固定后, 置于显微镜下观察脑组织形态。

2.3.6 HE 染色观察主动脉形态 取出制备好的主动脉石蜡切片, 依次进行脱蜡、水化等步骤, 依次用苏木素染色液、伊红染色液进行染色。染色完成后, 对切片进行脱水、透明处理、封片固定后, 置于显微镜下观察主动脉形态。

2.3.7 免疫荧光法检测海马组织 $\text{A}\beta_{1-42}$ 沉积情况

取出制备好的脑组织石蜡切片, 依次进行抗原修复、细胞膜通透处理、封闭非特异性结合位点、一抗孵育 ($\text{A}\beta_{1-42}$, 按 1:200 稀释)、二抗孵育 (按 1:1000 稀释)、细胞核染色、封片。最后在荧光显微镜下观察海马组织 $\text{A}\beta_{1-42}$ 沉积情况, 利用 Image J 1.53 对图像进行平均荧光强度分析。

2.3.8 ELISA 法检测血清 VCAM-1、ICAM-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、皮质醇、ACTH 水平 根据 ELISA 试剂盒说明书步骤进行, 通过酶标仪检测吸光度, 根据对应标准曲线, 计算出小鼠血清 VCAM-1、

ICAM-1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、皮质醇、ACTH水平。

2.3.9 Western Blot 法检测海马组织 APP、BACE1、PS1 蛋白水平 从-80℃冰箱取出海马组织，每0.2 g 组织中加入1 ml组织裂解液研磨、4℃、12 000 pm 离心20 min（离心半径为10.8 cm），收集上清，加入适量的蛋白上样缓冲液，置于95℃煮蛋白10 min 使蛋白变性。将煮好的蛋白加入凝胶电泳，依次进行电泳、转膜、封闭、一抗孵育（APP、BACE1、PS1均按1：1000稀释）、二抗孵育（按1：8000稀释）和曝光，最后利用Image J 1.53t对曝光后的图像进行灰度值分析。

2.4 统计学方法

使用SPSS 26.0和Graph Pad Prism 8.4.3软件进行统计分析。符合正态分布的数据采用均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，不符合正态分布的数据以中位数（四分位数）[$M(P_{25}, P_{75})$]表示。符合正态分布且方差齐的数据多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD检验，符合正态分布，方差不齐时用Dunnett's t 检验；不符合正态分布的多组间比较采用Kruskal-Wallis 检验，两两比较采用Mann-Whitney U 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 角叉菜胶干预剂量筛选结果

3.1.1 各组小鼠一般状况和体质量比较 空白对照组小鼠活动正常，精神状态良好；与空白对照组比较，角叉菜胶低、中、高剂量组小鼠活动尚可，精神一般。表1示，与本组造模前比较，空白对照组小鼠造模后体质量升高，角叉菜胶高剂量组小鼠造模后体质量降低（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）；与空白对照组造模后比较，角叉菜胶中、高剂量组小鼠造模后体质量降低（ $P<0.01$ ）。

表1 各组小鼠造模前后体质量比较

Table 1 Comparison of body weight in mice from each group at different time points [g, $\bar{x}\pm s/M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	造模前	造模后
空白对照组	6	24.00 $\pm$ 0.89	26.67 $\pm$ 1.21 ^{a)}
角叉菜胶低剂量组	6	24.50 (24.00, 25.00)	25.67 $\pm$ 1.21
角叉菜胶中剂量组	6	24.29 $\pm$ 0.95	23.00 $\pm$ 0.82 ^{b)}
角叉菜胶高剂量组	6	25.00 (23.75, 25.00)	21.43 $\pm$ 1.51 ^{b) c)}

注：a) 与本组造模前比较， $P<0.05$ ；b) 与空白对照组造模后比较， $P<0.01$ ；c) 与本组造模前比较， $P<0.01$ 。

3.1.2 各组小鼠主动脉形态比较 图1示，空白对照组小鼠主动脉内皮细胞排列整齐，细胞核呈圆形或卵圆形，染色质着色均匀；与空白对照组比较，角叉菜胶低、中剂量组小鼠主动脉形态未见明显差异，角叉菜胶高剂量组小鼠主动脉可见轻微的血管内皮细胞排列紊乱，细胞核变形，部分可见血管壁增厚，有轻微损伤。

3.1.3 各组小鼠血清 VCAM-1、ICAM-1 水平比较 表2示，与空白对照组比较，角叉菜胶低、中、高剂量组小鼠血清 VCAM-1 水平升高，角叉菜胶高剂量组小鼠血清 ICAM-1 水平升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。角叉菜胶低、中、高剂量组小鼠血清 VCAM-1、ICAM-1 水平比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

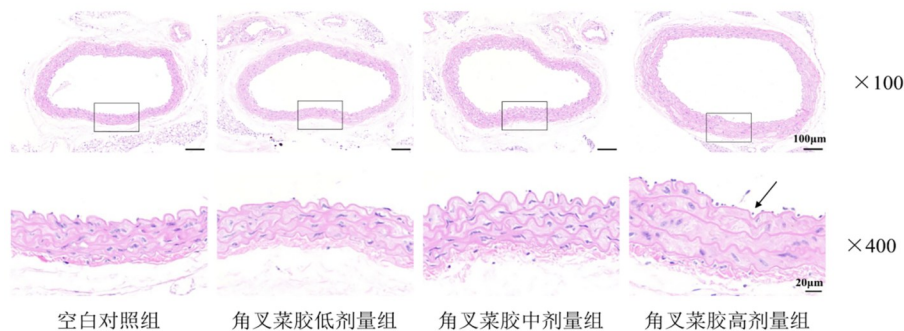
表2 各组小鼠血清 VCAM-1、ICAM-1 水平比较

Table 2 Comparison of serum VCAM-1, ICAM-1 levels in mice from each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	VCAM-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ICAM-1/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
空白对照组	6	67.70 $\pm$ 13.89	95.21 $\pm$ 6.40
角叉菜胶低剂量组	6	108.44 $\pm$ 25.41 ^{a)}	104.07 $\pm$ 11.23
角叉菜胶中剂量组	6	108.32 $\pm$ 22.70 ^{a)}	113.29 $\pm$ 19.14
角叉菜胶高剂量组	6	124.21 $\pm$ 11.80 ^{b)}	123.68 $\pm$ 14.98 ^{a)}

注：VCAM-1，血管细胞黏附分子1；ICAM-1，细胞间黏附分子1。

a) 与空白对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与空白对照组比较， $P<0.01$ 。



注：黑色箭头示血管壁增厚、内皮细胞排列紊乱。

图1 各组小鼠主动脉形态比较（HE 染色）

Figure 1 Comparison of aortic pathology in mice from each group (HE staining)

表3 各组小鼠血清炎症因子水平比较

Table 3 Comparison of serum inflammatory factor levels in mice from each group [ng/L, $\bar{x}\pm s/M(P_{25}, P_{75})$]				
组别	鼠数	TNF- α	IL-6	IL-1 β
空白对照组	6	542.80 $\pm$ 47.13	49.28 (47.33, 52.27)	42.64 $\pm$ 1.41
角叉菜胶低剂量组	6	569.67 $\pm$ 64.44	49.45 $\pm$ 1.85	45.41 $\pm$ 2.37
角叉菜胶中剂量组	6	609.75 $\pm$ 66.93	51.82 $\pm$ 5.67	43.68 $\pm$ 2.62
角叉菜胶高剂量组	6	618.41 $\pm$ 88.57	57.39 $\pm$ 3.39 ^{a)}	48.41 $\pm$ 1.23 ^{a) b)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-6, 白细胞介素6; IL-1 β , 白细胞介素1 β 。

a) 与空白对照组比较, $P<0.01$; b) 与角叉菜胶中剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.1.4 各组小鼠血清炎症因子水平比较 表3示, 各组间TNF- α 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与空白对照组比较, 角叉菜胶高剂量组血清IL-6和IL-1 β 水平升高($P<0.01$); 与角叉菜胶中剂量组相比, 角叉菜胶高剂量组血清IL-1 β 水平升高($P<0.05$)。角叉菜胶各剂量组之间IL-6水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

上述研究观察了不同浓度的角叉菜胶对小鼠体质量、主动脉形态、血清黏附因子以及炎症因子的影响, 结果显示, 与空白对照组比较, 角叉菜胶低剂量组和角叉菜胶中剂量组主动脉形态未见明显差异, 血清ICAM-1、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平差异无统计学意义($P>0.05$); 角叉菜胶高剂量组主动脉出现血管内皮细胞排列紊乱、细胞核变形、血管壁增厚等病理表现, 体质量降低、血清VCAM-1、ICAM-1、IL-6和IL-1 β 水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。因此, 后续实验选择角叉菜胶高剂量作为干预剂量进行血瘀诱导。

3.2 多因素联合诱导AD模型的造模结果

3.2.1 各组小鼠一般状态及体质量比较 同窝对照组和毒损组小鼠精神状态良好, 毛发光泽, 活动正常; 气虚组、肾虚组、虚损组小鼠精神一般, 活动减少, 毛发欠光泽; 虚损瘀毒组小鼠精神欠佳, 活动减少, 毛发杂乱。表4示, 与本组造模前、同窝对照组造模后比较, 虚损瘀毒组小鼠造模后体质量

表4 各组小鼠造模前后体质量比较

Table 4 Comparison of body weight in mice from each group (g, $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	造模前	造模后	
同窝对照组	6	34.33 $\pm$ 1.63	32.17 $\pm$ 2.40	
毒损组	6	32.17 $\pm$ 3.76	30.33 $\pm$ 2.58	
气虚组	6	30.67 $\pm$ 2.80	32.00 $\pm$ 2.28	
肾虚组	6	33.17 $\pm$ 3.37	28.50 $\pm$ 1.52	
虚损组	6	34.00 $\pm$ 2.19	31.17 $\pm$ 2.64	
虚损瘀毒组	6	32.00 $\pm$ 1.26	27.83 $\pm$ 1.47 ^{a) b)}	

注: a) 与本组造模前比较, $P<0.01$; b) 与同窝对照组造模后比较, $P<0.05$ 。

量均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2.2 各组小鼠抓力指数比较 表5示, 与同窝对照组和毒损组比较, 气虚组、肾虚组、虚损组、虚损瘀毒组小鼠抓力指数均降低($P<0.01$)。

表5 各组小鼠抓力指数比较

Table 5 Comparison of grip index in mice from each group (gf, $\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	抓力指数
同窝对照组	6	290.20 $\pm$ 14.18
毒损组	6	271.00 $\pm$ 7.58
气虚组	6	232.47 $\pm$ 14.11 ^{a) b)}
肾虚组	6	196.64 $\pm$ 6.01 ^{a) b)}
虚损组	6	218.31 $\pm$ 12.57 ^{a) b)}
虚损瘀毒组	6	199.36 $\pm$ 17.44 ^{a) b)}

注: a) 与同窝对照组比较, $P<0.01$; b) 与毒损组比较, $P<0.01$ 。

3.2.3 各组小鼠学习记忆能力比较 表6示, 各组小鼠逃避潜伏期比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与同窝对照组比较, 气虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠平台停留时间缩短, 气虚组、肾虚组和虚损瘀毒组小鼠穿越平台次数减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与毒损组比较, 虚损瘀毒组小鼠平台停留时间缩短、穿越平台次数减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2.4 各组小鼠脏器指数比较 表7示, 与同窝对照组比较, 气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠脾脏指数、肾脏指数降低, 肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠睾丸指数降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与毒损组比较, 肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠脾脏指数降低, 气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠肾脏指数降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.2.5 各组小鼠海马组织A β_{1-42} 沉积比较 表8示, 与同窝对照组和毒损组比较, 肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠海马组织A β_{1-42} 荧光表达量升高($P<0.01$)。各组小鼠海马组织A β_{1-42} 蛋白荧光图见图2。

表 6 各组小鼠学习记忆能力比较

Table 6 Comparison of learning memory ability in mice from each group [$\bar{x}\pm s/M(P_{25}, P_{75})$]

组别	鼠数	逃避潜伏期/s	平台停留时间/s	穿越平台次数/次
同窝对照组	6	21.99±6.81	27.47±5.11	5.00±2.00
毒损组	6	19.20 (15.55, 25.64)	20.42±6.02	3.83±1.17
气虚组	6	35.01±14.38	18.00±4.45 ^{a)}	2.00±1.67 ^{a)}
肾虚组	6	33.54±14.11	18.77±7.19	2.00±1.41 ^{a)}
虚损组	6	35.76±18.59	13.72±1.98 ^{b)}	0.50 (0.00, 5.00)
虚损瘀毒组	6	45.34±14.78	9.13±4.87 ^{b) c)}	0.00 (0.00, 0.50) ^{b) d)}

注: a) 与同窝对照组比较, $P<0.05$; b) 与同窝对照组比较, $P<0.01$; c) 与毒损组比较, $P<0.01$; d) 与毒损组比较, $P<0.05$ 。

表 7 各组小鼠脏器指数比较

Table 7 Comparison of organ indices in mice from each group

(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾脏指数	肾脏指数	睾丸指数
同窝对照组	6	0.46±0.04	2.00±0.09	0.77±0.03
毒损组	6	0.42±0.02	1.93±0.09	0.74±0.06
气虚组	6	0.36±0.02 ^{a)}	1.63±0.16 ^{a) b)}	0.69±0.02
肾虚组	6	0.31±0.06 ^{a) b)}	1.57±0.14 ^{a) b)}	0.70±0.03 ^{c)}
虚损组	6	0.31±0.06 ^{a) b)}	1.71±0.03 ^{a) d)}	0.69±0.05 ^{c)}
虚损瘀毒组	6	0.24±0.03 ^{a) b)}	1.63±0.12 ^{a) b)}	0.70±0.04 ^{a)}

注: a) 与同窝对照组比较, $P<0.01$; b) 与毒损组比较, $P<0.01$; c) 与同窝对照组比较, $P<0.05$; d) 与毒损组比较, $P<0.05$ 。

表 8 各组小鼠海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 平均荧光强度比较

Table 8 Comparison of fluorescence expression of $A\beta_{1-42}$ in hippocampus of mice from each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	平均荧光强度
同窝对照组	3	0.69±0.12
毒损组	3	0.96±0.39
气虚组	3	1.29±0.04
肾虚组	3	5.73±1.14 ^{a) b)}
虚损组	3	12.95±2.69 ^{a) b)}
虚损瘀毒组	3	12.64±1.27 ^{a) b)}

注: $A\beta_{1-42}$, β -淀粉样蛋白 1-42。

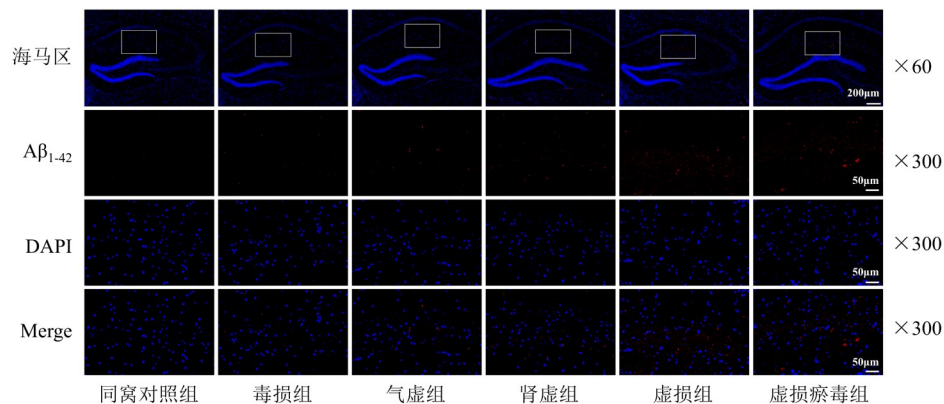
a) 与同窝对照组比较, $P<0.01$; b) 与毒损组比较, $P<0.01$ 。

3.2.6 各组小鼠海马组织形态尼氏染色结果比较 图 3 示, 同窝对照组和毒损组小鼠海马区神经元排列紧密, 形态完整, 尼氏体染色清晰。与同窝对照组和毒损组比较, 气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组海马区神经元出现损伤, 排列疏松, 形态欠规则, 细胞核固缩, 尼氏体溶解甚至消失。

3.2.7 各组小鼠血清 VCAM-1、ICAM-1 水平比较 表 9 示, 与同窝对照组和毒损组比较, 虚损组和虚损瘀毒组小鼠血清 VCAM-1 水平升高 ($P<0.01$), 各组 ICAM-1 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.2.8 各组小鼠血清皮质醇、ACTH 水平比较 表 10 示, 与同窝对照组和毒损组比较, 虚损组和虚损瘀毒组小鼠血清皮质醇水平升高 ($P<0.01$)。各组间血清 ACTH 水平比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

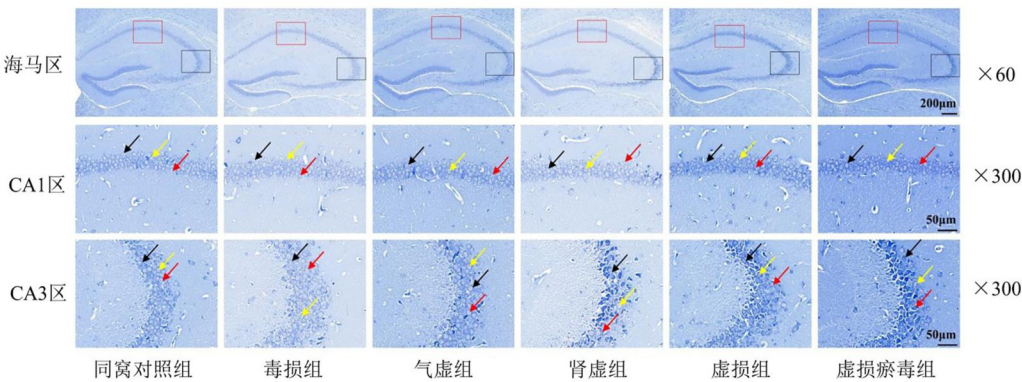
3.2.9 各组小鼠血清炎症因子水平比较 表 11 示, 与同窝对照组比较, 虚损组、虚损瘀毒组小鼠血清 TNF- α 水平升高, 毒损组、气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠血清 IL-6 和 IL-1 β 水平升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与毒损组比较, 虚损组



注: 海马区白色框为各组下图对应放大区域; 图中红色荧光为 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达; $A\beta_{1-42}$, β -淀粉样蛋白 1-42; DAPI 蓝色荧光为细胞核表达; Merge 为合成图。

图 2 各组小鼠海马组织 $A\beta_{1-42}$ 蛋白荧光表达情况

Figure 2 Fluorescence expression of $A\beta_{1-42}$ protein in hippocampal tissues of mice from each group



注：海马区神经元细胞核密集排列，其形态类似两个嵌合的“C”形，大的“C”为海马，小的“C”为齿状回；海马“C”形细胞带的背侧起始的一段称为CA1区，即红色框所示区域，向腹外侧延伸的部分为CA3区，即黑色框所示区域；黑色箭头示神经元，黄色箭头示细胞核，红色箭头示尼氏体。

图3 各组小鼠海马组织形态尼氏染色结果

Figure 3 Nissl staining results of hippocampal tissue morphology in mice from each group

表9 各组小鼠血清VCAM-1、ICAM-1水平比较

Table 9 Comparison of serum VCAM-1, ICAM-1 levels in mice from each group [$\bar{x}\pm s/M$ (P_{25} , P_{75})]

组别	鼠数	VCAM-1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ICAM-1/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
同窝对照组	6	68.08 $\pm$ 7.15	95.43 $\pm$ 9.00
毒损组	6	62.25 $\pm$ 6.81	100.43(93.37,110.10)
气虚组	6	66.24 $\pm$ 16.43	98.15 $\pm$ 8.12
肾虚组	6	83.58(57.80,88.03)	97.17 $\pm$ 6.52
虚损组	6	107.37 $\pm$ 17.45 ^{a) b)}	100.10 $\pm$ 8.15
虚损瘀毒组	6	125.93 $\pm$ 8.19 ^{a) b)}	105.10 $\pm$ 3.96

注：VCAM-1，血管细胞黏附分子1；ICAM-1，细胞间黏附分子1。

a) 与同窝对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与毒损组比较， $P<0.01$ 。

表10 各组小鼠血清皮质醇、ACTH水平比较

Table 10 Comparison of serum cortisol and ACTH levels in mice from each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	皮质醇/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ACTH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
同窝对照组	6	93.39 $\pm$ 9.64	70.26 $\pm$ 2.14
毒损组	6	93.09 $\pm$ 6.51	70.26 $\pm$ 2.57
气虚组	6	103.82 $\pm$ 14.02	73.37 $\pm$ 5.44
肾虚组	6	109.43 $\pm$ 8.33	78.68 $\pm$ 5.57
虚损组	6	121.86 $\pm$ 7.87 ^{a) b)}	69.02 $\pm$ 6.35
虚损瘀毒组	6	143.61 $\pm$ 4.17 ^{a) b)}	79.70 $\pm$ 2.69

注：ACTH，促肾上腺皮质激素。

a) 与同窝对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与毒损组比较， $P<0.01$ 。

表11 各组小鼠血清炎症因子水平比较

Table 11 Comparison of serum inflammatory factor levels in mice from each group [ng/L , $\bar{x}\pm s/M$ (P_{25} , P_{75})]

组别	鼠数	TNF- α	IL-6	IL-1 β
同窝对照组	6	469.59 $\pm$ 14.67	30.88 $\pm$ 8.52	39.62 (38.52, 42.38)
毒损组	6	463.17 $\pm$ 9.92	45.97 $\pm$ 3.39 ^{a)}	43.86 $\pm$ 1.58 ^{a)}
气虚组	6	486.04 $\pm$ 7.47	43.89 $\pm$ 1.97 ^{a)}	45.83 $\pm$ 4.47 ^{a)}
肾虚组	6	500.48 $\pm$ 24.87	52.27 $\pm$ 2.92 ^{a)}	44.97 $\pm$ 2.87 ^{a)}
虚损组	6	536.18 $\pm$ 20.89 ^{a) b)}	48.45 $\pm$ 3.00 ^{a)}	45.48 $\pm$ 3.49 ^{a)}
虚损瘀毒组	6	619.61 $\pm$ 36.76 ^{a) b)}	49.45 $\pm$ 3.95 ^{a)}	39.73 $\pm$ 1.18 ^{c)}

注：TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；IL-6，白细胞介素6；IL-1 β ，白细胞介素1 β 。

a) 与同窝对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与毒损组比较， $P<0.01$ ；c) 与同窝对照组比较， $P<0.05$ 。

和虚损瘀毒组小鼠血清TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)。

3.2.10 各组小鼠海马组织APP、BACE1、PS1蛋白水平比较 表12示，与同窝对照组比较，气虚组、肾虚组、虚损组和虚损瘀毒组小鼠海马组织APP蛋白水平升高，虚损组和虚损瘀毒组小鼠海马

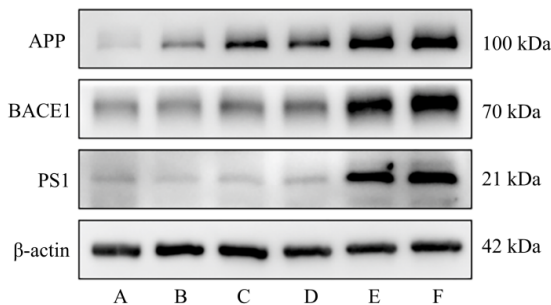
组织BACE1蛋白水平升高，虚损瘀毒组小鼠海马组织PS1蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与毒损组比较，虚损组和虚损瘀毒组小鼠海马组织APP、BACE1和PS1蛋白水平升高 ($P<0.01$)。各组小鼠海马组织APP、BACE1、PS1蛋白电泳图见图4。

表 12 各组小鼠海马组织 APP、BACE1、PS1 蛋白表达比较
Table 12 Comparison of APP, BACE1 and PS1 protein expression in hippocampal tissues of mice from each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	APP	BACE1	PS1
同窝对照组	3	0.16±0.03	0.70±0.18	0.35±0.24
毒损组	3	0.39±0.11	0.62±0.14	0.15±0.10
气虚组	3	0.69±0.12 ^{a)}	0.70±0.21	0.18±0.09
肾虚组	3	0.66±0.12 ^{a)}	0.88±0.24	0.20±0.01
虚损组	3	1.00±0.25 ^{b) c)}	1.53±0.37 ^{a) c)}	0.65±0.09 ^{c)}
虚损瘀毒组	3	0.98±0.19 ^{b) c)}	1.73±0.24 ^{b) c)}	0.69±0.05 ^{a) c)}

注：APP，淀粉样前体蛋白；BACE1，β 位淀粉样蛋白前体蛋白切割酶 1；PS1，早老蛋白 1。

a) 与同窝对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与同窝对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与毒损组比较， $P<0.01$ 。



注：APP，淀粉样前体蛋白；BACE1，β 位淀粉样蛋白前体蛋白切割酶 1；PS1，早老蛋白 1；A，同窝对照组；B，毒损组；C，气虚组；D，肾虚组；E，虚损组；F，虚损瘀毒组。

图 4 各组小鼠海马组织 APP、BACE1、PS1 蛋白电泳图
Figure 4 Electrophoresis images of APP, BACE1 and PS1 proteins in hippocampal tissues of mice from each group

4 讨论

目前，AD 疾病模型构建主要基于 Aβ 级联假说、Tau 蛋白过度磷酸化假说、神经炎症假说、胆碱能假说等^[17]。转基因小鼠（如 APP/PS1、5x3AD 品系）因其稳定的表型重现能力，是模拟人类疾病研究的首选模型^[18]。因此，本研究以 APP/PS1 小鼠为基础，结合角叉菜胶、氢化可的松以及睡眠剥夺方法共同模拟 AD 虚损瘀毒证的中医病机，是切实可行的。

《素问·举痛论篇》云：“百病生于气”，《灵枢·本神》曰：“气虚则五脏不安”，充分说明了气虚是导致脏腑功能失调的病理基础。现代研究^[19-20]表明，睡眠剥夺会影响小鼠脑内 Aβ 的清除率，导致学习记忆能力降低，并伴随精神萎靡、毛发欠光泽、前肢抓力减弱等一系列气虚表现。本研究结果提示，与同窝对照组比较，气虚组、虚损组、虚损瘀毒组小鼠经睡眠剥夺干预后，出现活动减少，毛

发欠光泽，抓力和脾脏指数下降等气虚特征。

肾为先天之本，具有藏精生髓的功能，脑髓的充养依赖于肾精的滋养。肾虚与 AD 的发生发展密切相关，临床肾虚型患者中，相较于肾阳虚证，肾阴虚证更为多见^[21]。现代研究常采用甲状腺片、氢化可的松等药物诱导构建肾阴虚型动物模型^[22]。临床研究^[23]显示，AD 患者血浆甲状腺素水平呈低表达状态，且皮质醇通路上调，推测此现象可能与患者认知能力下降有关。动物实验^[24-25]进一步表明，各年龄段 APP/PS1 转基因小鼠血清促甲状腺激素水平较野生型小鼠降低，血清 ACTH 水平则升高。此外，在肾虚相关研究^[26]中，多借助肾脏指数、睾丸指数等脏器指数，对肾虚动物模型的造模效果进行评估。基于此，本研究以睾丸指数、肾脏指数和血清皮质醇水平等作为肾虚评价指标。研究结果表明，与同窝对照组比较，虚损组和虚损瘀毒组在氢化可的松干预后，小鼠睾丸指数、肾脏指数降低，血清皮质醇水平升高，呈现出肾虚证相关表现。

本研究采用睡眠剥夺和氢化可的松分别诱导气虚、肾虚状态。在气虚和肾虚状态形成后，我们试图构建虚损病理模型，促使机体产生瘀毒。研究结果提示，与同窝对照组比较，经睡眠剥夺和氢化可的松联合诱导的虚损组小鼠，血清中的 VCAM-1 和炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平均有所升高，在一定程度上可以反映“虚损致瘀”的中医病机理念。

为更精准地模拟瘀毒对 AD 模型小鼠的影响，本研究以 C57BL/6J 小鼠为研究对象，开展了角叉菜胶致瘀剂量的筛选实验。相关研究^[27]显示，角叉菜胶可诱导组织产生炎症反应，炎症因子入血后，会导致血管内皮细胞功能受损、血液黏稠度增加，进而形成瘀血；此外，在血瘀形成过程中，血管细胞黏附因子表达出现异常，会促进炎症细胞的黏附、迁移，加剧局部炎症反应，影响血液流动，加重血瘀。基于此，本研究采用角叉菜胶进行血瘀诱导，选取血管细胞黏附分子、炎症因子作为血瘀评价指标。结果提示，与空白对照组比较，角叉菜胶高剂量组小鼠血清炎症指标和血管细胞黏附分子水平升高，同时伴随着主动脉血管增厚等病理改变。此外，与同窝对照组比较，进行单纯睡眠剥夺的气虚组和单纯氢化可的松干预的肾虚组小鼠血清中的 VCAM-1、TNF-α 表达升高，但差异未见统计学意义。而经睡眠剥夺、氢化可的松和角叉菜胶联合干预的虚损瘀毒组小鼠血清中的 VCAM-1 和血清炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 表达水平升高，且均

具有统计学意义。可见, 叠加角叉菜胶干预后, 血管细胞黏附分子、炎症因子等血瘀评价指标的差异更加显著。

本研究所构建的虚损瘀毒的 AD 模型具有以下优势: 1) 采用睡眠剥夺、氢化可的松联合角叉菜胶的复合造模方式, 有效保障了多因素造模过程中动物的造模成功率; 2) 通过多维度指标进行系统性评价, 精准模拟了“虚损瘀毒”的中医病机特点, 使模型更贴近中医理论体系下 AD 的复杂病理状态; 3) 该造模方法具有造模时间较短、对小鼠损害较小的优势, 充分符合动物伦理要求, 体现了研究的人道性和科学性。然而, 本研究仍存在一定局限性: 一方面, 未引入具有中医特色的方药干预进行药效学验证, 限制了对模型有效性的多维度阐释, 无法全面评估模型在中医药干预下的变化; 另一方面, 该模型的作用靶点和分子机制尚不明确, 有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 原新, 陈功, 王金营, 等. “守住人口安全底线, 实现人口高质量发展”学术笔谈[J]. 人口与社会, 2025, 41(1): 1-22.
- [2] 王刚, 齐金蕾, 刘馨雅, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2024 [J]. 诊断学理论与实践, 2024, 23(3): 219-256.
- [3] 张锦, 张允岭, 郭蓉娟, 等. 从“毒损脑络”到“毒损络脉”的理论探讨[J]. 北京中医药, 2013, 32(7): 483-486.
- [4] 黄巧艺, 马丽娜, 吴素素, 等. 基于“虚损瘀毒”探讨阿尔茨海默病的病机与治疗[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 461-466.
- [5] 苏芮, 韩振蕴, 范吉平, 等. “毒损脑络”理论在阿尔茨海默病中医研究领域中的意义[J]. 中医杂志, 2011, 52(16): 1370-1371.
- [6] 侯江洪. 阿尔茨海默病同病异证 tau 蛋白异常磷酸化机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2017.
- [7] 谭爱华, 冉思邈, 石和元, 等. 阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 39-46.
- [8] 成金枝, 张俊龙, 郭蕾, 等. 阿尔茨海默病肾虚证病证结合动物模型的制备及验证[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1063-1066.
- [9] 姜晓西, 王凤, 张会永, 等. 气虚血瘀证动物模型研究现状[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(11): 68-74.
- [10] 刘桂敏, 孙建辉, 李建良, 等. 肾虚证临床与动物实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(23): 269-280.
- [11] 刘悦, 姚明江, 付国静, 等. 角叉菜胶诱导大鼠血瘀证模型再评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(12): 2005-2009.
- [12] 刘蕾, 丁世兰, 陈影, 等. 注射用血栓通抑制血栓形成及其对血流状态影响的研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2446-2453.
- [13] 韩子逸, 沈诗怡, 张金鑫, 等. 角叉菜胶诱导的慢性血栓小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 78-84.
- [14] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177-2183.
- [15] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [16] 赵慧辉, 郭书文, 王伟. 病证结合动物模型判定标准的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(6): 365-367, 373.
- [17] 李丽, 严兴科, 魏玉婷, 等. 阿尔茨海默病病证结合动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 296-310.
- [18] WASEN C, BEAUCHAMP LC, VIENTINI J, et al. Bacteroidota inhibit microglia clearance of amyloid-beta and promote plaque deposition in Alzheimer's disease mouse models[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3872.
- [19] PARHIZKAR S, GENT G, CHEN Y, et al. Sleep deprivation exacerbates microglial reactivity and A β deposition in a TREM2-dependent manner in mice [J]. Sci Transl Med, 2023, 15(693): eade6285.
- [20] 杨鞠祥, 贺文彬, 楚世峰, 等. 小鼠慢性脑缺血气虚血瘀模型制备及评价[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(11): 76-82.
- [21] 李强, 崔远武, 张连城, 等. 肾虚型老年性痴呆中医证候特征分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2436-2438.
- [22] 李国辉, 黄晓巍, 王雨辰, 等. 肾虚证动物模型研究进展[J]. 人参研究, 2022, 34(3): 45-49.
- [23] DROMARD Y, ARANGO-LIEVANO M, BORIE A, et al. Loss of glucocorticoid receptor phosphorylation contributes to cognitive and neurocentric damages of the amyloid- β pathway[J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1): 91.
- [24] 颜培培, 赵晓娟, 王铜浩. APP/PS1 转基因小鼠的甲状腺功能变化 [J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(8): 703-705.
- [25] 陈嘉媛, 高莉, 罗嘉楠等. 类叶升麻苷对 APP/PS1 双转基因小鼠行为学和激素变化的影响[J]. 中国医药导报, 2020, 17(8): 9-12.
- [26] 祁晓鸣, 刘晓琴, 苏晓娟, 等. 基于肾脑相关的龟鹿二

仙膏抗阿尔茨海默病作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 158-167.

[27]周继栋,李红华,李翔子,等. 基于 ERK/p38 MAPK 信

号通路探讨荆防颗粒对角叉菜胶所致小鼠尾部血栓的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2195-2199.

Construction and Evaluation of Alzheimer's Disease Mouse Models with Deficiency-Impairment-Stasis-Toxin Syndrome

LIU Jing¹, LIU Xin¹, ZHANG Zhezuo¹, YU Guran¹, LI Hao², LIU Nanyang³, PEI Hui³

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT **Objective** To construct and evaluate the animal model of Alzheimer's disease (AD) with deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome using a multifactorial combined induction approach. **Methods** Twenty-four 2-month-old SPF C57BL/6J mice were randomly divided into a blank control group and low- (0.02%), medium- (0.04%), and high (0.06%)-dose carrageenan groups (n=6 per group). A carrageenan-induced blood stasis model was established to screen for optimal carrageenan intervention concentrations. Thirty 5-month-old APP/PS1 mice were randomly divided into toxin-impairment group, *qi*-deficiency group, kidney-deficiency group, deficiency-impairment syndrome group, and deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome group, with 6 mice per group. Additionally, six 5-month-old C57BL/6J mice from the same litter served as the litter-matched control group. A multifactorial combined induction experiment was conducted using sleep deprivation, carrageenan, and hydrocortisone. Specifically, sleep deprivation induced *qi* deficiency for mice in *qi*-deficiency group, deficiency-impairment syndrome group, and deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome group; hydrocortisone solution gavage induced kidney deficiency for mice in kidney-deficiency group, deficiency-impairment syndrome group, and deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome group; carrageenan solution intraperitoneal injection induced blood stasis for mice in deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome group. Throughout the modeling period, general status and body weight were observed and recorded weekly. On the day after modeling concluded, grip index was detected by grip meter; learning and memory ability was detected by water maze; organ indexes were calculated by combining the weights of spleen, kidney, testis and body weight; hippocampal histopathology was detected by Nissl staining; aortic pathology was analyzed by HE staining; A β_{1-42} deposition in the hippocampus was detected by immunofluorescence; The expression levels of vascular adhesion molecule (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), cortisol, and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the expression levels of amyloid precursor protein (APP), progeroid protein-1 (PS1) and β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) were detected by Western blot. **Results** The 0.06% concentration of carrageenan was selected for subsequent experiments. Multifactorial combined induction experiment: compared with the same-litter control group, mice in deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome group exhibited reduced body weight and grip index after modeling, shorter platform stay time, fewer platform crossings, decreased spleen index, kidney index, and testis index, elevated hippocampal tissue A β_{1-42} fluorescence expression, and increased serum VCAM-1, TNF- α , IL-6, IL-1 β , and cortisol levels in serum increased, while hippocampal tissue expression of APP, BACE1, and PS1 proteins elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Neuronal damage was observed in the hippocampal region, characterized by nuclear condensation and dissolution or disappearance of Nissl bodies. **Conclusion** The mouse models of AD with deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome were established through combined induction by sleep deprivation, carrageenan, and hydrocortisone, which exhibits the syndrome characteristics of *qi* deficiency, kidney deficiency, and blood stasis.

Keywords Alzheimer's disease; deficiency-impairment-stasis-toxin syndrome; animal model; disease syndrome combination

(收稿日期: 2025-04-08; 修回日期: 2025-06-11)

[编辑: 金超]