

# 冠心病继发认知障碍的动物模型研究进展



王青<sup>1,2</sup>, 刘凤岚<sup>3</sup>, 徐仕晗<sup>1,2</sup>, 刘艳飞<sup>1,2</sup>, 刘玥<sup>2</sup>, 徐凤芹<sup>1,2</sup>

1. 中国中医科学院西苑医院老年二科 (北京 100091)
2. 中国中医科学院西苑医院国家中医心血管病临床医学研究中心 (北京 100091)
3. 广东药科大学研究生院 (广州 510006)

**【摘要】**冠心病和认知障碍严重危害人类健康,大量研究表明冠心病患者的认知功能障碍风险增加,探索多病共存的发生机制及防治措施具有重要的临床意义。目前冠心病继发认知障碍的发病机制及治疗方面已经成为研究热点,成功建立并选择合适的动物模型是开展相关实验研究的关键。本文就冠心病继发认知障碍动物模型的构建方法进行系统总结,并对常用的检测指标及评价方法进行了梳理,以期为冠心病继发认知障碍的实验研究提供参考。

**【关键词】**冠心病; 认知障碍; 动物模型

## Advances in animal models of cognitive impairment secondary to coronary heart disease

Qing WANG<sup>1,2</sup>, Feng-Lan LIU<sup>3</sup>, Shi-Han XU<sup>1,2</sup>, Yan-Fei LIU<sup>1,2</sup>, Yue LIU<sup>2</sup>, Feng-Qin XU<sup>1,2</sup>

1. The Second Department of Gerontology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

2. National Clinical Research Center for Cardiovascular Diseases of Traditional Chinese Medicine, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

3. Graduate School of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Corresponding author: Yue LIU, Email: liuyueheart@hotmail.com; Feng-Qin XU, Email: 18800021979@163.com

**【Abstract】** Coronary heart disease and cognitive impairment are both major diseases harmful to human health. A large number of studies have shown that coronary heart disease increases the risk of cognitive impairment in patients with the disease. It is of great clinical significance to explore the mechanism, prevention and treatment of such comorbidities. Research on the pathogenesis and treatment of cognitive impairment secondary to coronary heart disease has currently become a hot topic. It is critical to build and select an appropriate animal model to successfully carry out relevant experimental research. This paper systematically summarizes the methods of constructing animal models of cognitive impairment secondary to coronary heart disease. It also combs the commonly used detection indicators and evaluation

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202207016

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 (C12021A01406); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程岐黄学者项目 (02045006); 国家自然科学基金项目 (82022076)

通信作者: 刘玥, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, Email: liuyueheart@hotmail.com;

徐凤芹, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, Email: 18800021979@163.com

methods in order to provide a reference for the experimental study of cognitive impairment secondary to coronary heart disease.

**【Keywords】** Coronary heart disease; Cognitive impairment; Animal model

冠心病和认知障碍是老年人多发病、常见病,随着人口老龄化的加剧,其患病率呈持续增长趋势,对社会和公共卫生产生重大影响。认知功能障碍指患者的记忆、语言、视空间、执行、计算、理解判断等方面出现一项或多项受损。冠心病与认知障碍的发生密切相关<sup>[1]</sup>,冠心病患者认知损害或痴呆发生风险平均可增加 45%<sup>[2]</sup>。Greaves 等研究显示,约 40% 接受心脏搭桥手术的冠心病患者在术后 1 至 5 年内被诊断为认知障碍<sup>[3]</sup>。稳定性冠心病患者随访 4 年后,认知障碍发生率为 42.4%<sup>[4]</sup>。

冠心病患者认知功能障碍发病机制可能类似于血管认知功能障碍,主要有脑小血管病<sup>[5]</sup>、动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)<sup>[6]</sup>、血小板高度激活<sup>[7]</sup>、慢性炎症<sup>[8]</sup>等假说。冠心病继发认知障碍的潜在生物学机制尚不清楚,而构建合适的动物模型是揭示其发病机制的基础。本文对当前各类冠心病继发认知障碍实验动物模型的制备方法、相关评判指标作一总结,以期为深入研究冠心病继发认知障碍发病机制和评价相关治疗药物的作用提供动物模型参考。

## 1 实验对象的选择

疾病动物模型可在病理学研究、发病机制探讨、药效学及生物标志物的验证等方面发挥作用<sup>[9]</sup>。冠心病常用的实验动物有大鼠、小鼠、兔、小型猪、豚鼠、犬等,认知损伤建模目前涉及的动物有大鼠、小鼠、沙土鼠、斑马鱼、果蝇以及羊类、犬类、灵长类动物(狒狒、食蟹猴、恒河猴)等<sup>[10]</sup>。在众多动物中,啮齿类动物最为常用,其具有与人类基因水平高度同源、免疫力及对外界环境的适应力强、存活率高、繁殖快、易获得等特点<sup>[11]</sup>,故被更多研究者所选用。鉴于此,目前在冠心病继发认知障碍的动物模型制备时,最常选用的实验动物是大鼠和小鼠。

应用大鼠进行冠脉疾病动物模型制备和研究的历史悠久,尤其是在建立心肌梗死模型方面,原因是大鼠冠脉系统稳定且侧支循环缺乏,发生

心梗时心肌坏死出现早,且与人类临床心肌梗死和充血性心力衰竭的病理生理过程较为相似<sup>[12]</sup>。Wistar 和 SD 大鼠是现今国内外应用最多的大鼠品系,其中 Wistar 大鼠被广泛应用于神经-内分泌实验研究;SD 大鼠的神经系统与人类相似,常被用于如奖励惩罚实验、迷宫实验等反映高级神经功能和学习记忆的研究中<sup>[13]</sup>。临床上由心脑血管疾病引起慢性缺血性脑灌注不足所致血管性认知障碍动物模型的建立常用手术结扎或阻塞损伤脑部供血的主要血管制备,选择大鼠模型更易操作,且术后出现的认知功能障碍比小鼠更加明显<sup>[14]</sup>。同样,在阿尔茨海默病等神经退行性疾病中也常用大鼠制备动物模型,此外,大鼠有更强的快速学习能力,能够更好地执行学习与认知研究相关任务,与人类疾病表现更为相似<sup>[15]</sup>。

小鼠与人类的血脂成分不同,具有心血管保护作用的高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-Ch)在其体内含量较高,而致冠状动脉粥样硬化作用的低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-Ch)含量偏低,因此不易形成 AS 斑块<sup>[16]</sup>。但随着基因敲除技术的发展,转基因小鼠模型被越来越多的研究者使用。如目前最常见的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE<sup>-/-</sup>小鼠),它是近交系鼠 C57BL/6 小鼠为背景的基因敲除鼠,相较于普通小鼠,其发生 AS、冠心病的可能性更高,经高脂喂养后更易成模<sup>[17]</sup>。载脂蛋白 E(ApoE)属于可交换载脂蛋白家族,具有基因多态性,可能通过调节脂质代谢和转运与冠心病相关,有研究表明携带 APOE $\epsilon$ 4 等位基因的急性冠脉综合征患者在出院后半年随访时有着较高的心血管终点事件发生率<sup>[18]</sup>。另外, APOE 也是主观认知功能下降、轻度认知障碍和阿尔茨海默病的易感基因,携带 APOE $\epsilon$ 4 等位基因、主观认知下降的患者脑淀粉样变性病变患病率是非携带者的 2~3 倍<sup>[19]</sup>。Tam 等研究了人类和 APOE 靶向替换转基因小鼠 APOE 基因与肠道微生物组成间的关系,研究发现通过调节肠道微生物群或许能够减轻 APOE $\epsilon$ 4

等位基因对认知功能下降的有害影响<sup>[20]</sup>。因此 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠不仅是目前冠心病、AS 研究的经典模型,在认知功能障碍等神经退化性疾病领域中也有所应用。Goodarzi 等对阿尔茨海默病再生医学动物模型的研究认为小鼠具有体积小、成本低、适合大样本研究的优势,并指出转基因小鼠模型有助于研究与阿尔茨海默病相关基因的功能机制<sup>[15]</sup>。

## 2 冠心病继发认知障碍动物模型的构建方法

目前,对于冠心病动物模型的制备方法较为成熟,但冠心病继发认知障碍的制模方法仍在探索中,对现有相关模型的制备方法进行归纳梳理后发现多是在成功复制冠心病模型的基础上再进行认知功能的评价,现将常用模型制备方法介绍如下。

### 2.1 高脂饲料诱导模型

AS 的发生发展与冠心病密切相关。有研究显示在 AS 状态下,体内存在微栓塞、脑心输出量减少、炎症因子释放等现象,它们可能与认知损伤有关<sup>[21]</sup>。通过高脂饲料诱导是目前复制冠状动脉粥样硬化实验动物模型的基础制备方法。高脂饲料通常是在常规饲料的基础上加入适量的胆固醇、猪油、豆油、蛋黄粉等,具体依据所选动物、造模方法及实验设计而定。研究表明单纯高脂饮食很难诱导出 AS 病变<sup>[17]</sup>,鉴于大鼠本身无胆囊且具有抗 AS 特性,故选用大鼠建模时,高脂饲料中需添加胆酸钠(促进胆固醇吸收)和丙基硫氧嘧啶(减少对胆固醇的代谢)<sup>[22]</sup>。

虽然高脂饲料诱导基本符合人类 AS 形成过程,但是其用时长,且难以造出晚期 AS 病变,因此更多以高脂喂养为基础,联合腹腔注射维生素 D3、基因改造、冠脉结扎、机械损伤、免疫炎症诱导等方法构建冠心病动物模型<sup>[23]</sup>。有研究显示,给予 Wistar 大鼠腹腔注射维生素 D3 (2 mL/kg,连续 3 d,分 3 次)后,联合高脂饲料喂养 12 周可成功建立冠状动脉粥样硬化大鼠模型<sup>[24]</sup>。因人类血管壁中钙含量与冠心病严重程度呈正相关,维生素 D3 可增加血钙浓度致使动脉血管壁被破坏,从而加速 AS 的发生<sup>[25]</sup>。卢令慧等研究采用左冠状动脉前降支结扎术结合高脂饮食喂养 SD 大鼠 28 d,通过检测心电图、血脂水平、超声心动图等成功复制了冠心病气虚血瘀痰浊的病证结合动

物模型,成模率为 66.7%<sup>[26]</sup>。

### 2.2 转基因动物模型

目前大部分的转基因动物为不同品系小鼠,用其建模可以更好地理解疾病的生物学基本特性。ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠是冠心病基础研究中最为经典的一种转基因小鼠模型,由于其体内缺乏 ApoE,导致 LDL 代谢障碍,使得血浆胆固醇浓度显著升高,是非基因敲除鼠的 8 倍之多<sup>[27]</sup>。人和小鼠 ApoE 的同源性达 70%,即使是给予普通饮食也能诱发 AS,并易致易损斑块形成,而高脂饮食可加速上述进程<sup>[28-29]</sup>。Li 等对经高脂饲料喂养 12 周的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠取头臂动脉和冠状动脉行病理检测发现管腔内均有斑块形成,血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、LDL-C 水平显著升高,表明成功复制了冠心病模型<sup>[30]</sup>。microRNA 的主要功能是通过与其 mRNA 识别序列结合来调节靶蛋白转录后表达,有报道称 microRNA-1 在心脏中过度表达可导致神经元微管损伤<sup>[31]</sup>。Duan 等采用心脏特异性高表达的 microRNA-1 转基因小鼠进行实验,发现小鼠心脏和海马中的 microRNA-1 水平均升高,且伴随着突触小泡的重新分布和胞吐相关蛋白表达的降低<sup>[32]</sup>,这是对心血管疾病导致认知功能障碍在分子机制方面作出的探索。

### 2.3 冠状动脉结扎模型

目前经冠状动脉结扎法制作心肌缺血、心肌梗死模型已较为成熟<sup>[33]</sup>。通过结扎左冠状动脉前降支阻断冠脉供血,造成管腔狭窄或闭塞,进而致心肌缺血缺氧甚至坏死,该过程在血流动力学及心肌代谢方面的改变与临床上冠心病患者心肌缺血及心梗时的发病过程较为相似<sup>[34]</sup>。具体操作为:在呼吸机支持下将雄性成年 SD 大鼠麻醉后,于左侧第 3、4 肋间切口,打开胸腔并撕开心包,轻压两侧胸壁,将心脏挤出于胸腔外,用 6-0 号线于左心耳下 2 mm 处结扎左冠状动脉前降支,建立心肌梗死模型,造模成功率为 83%,术后 24 h 存活率为 77%<sup>[35]</sup>。结扎一段时间,使冠状动脉再通,即为心肌缺血再灌注模型。既往研究报道,C57BL/6J 小鼠结扎左冠状动脉 3 个月后(成活率 84%)出现了显著的认知障碍,并伴有  $\beta$ -淀粉样蛋白代谢、凋亡和炎症的改变,表明心肌梗死后痴呆的可能性增加<sup>[36]</sup>。

### 2.4 化学干预模型

冠脉供血不足会导致心肌缺血,是冠心病的



主要病变基础，短暂缺血会引起心绞痛，严重缺血可致心肌梗死<sup>[37]</sup>。心肌功能受损可通过缺氧或代谢底物耗竭引起的改变对脑、肾、肝等其他灌流器官产生不良影响，认知功能减退是心脏功能受损引起神经元组织低灌流所致的主要临床表现之一<sup>[38]</sup>。异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)是一种人工合成的β受体激动剂，可引起心肌过快收缩，冠脉发生痉挛，增加心肌耗氧，出现心肌缺血、坏死等现象，可用于心肌缺血、药物性心肌损伤、心肌梗死等疾病的模拟，更符合临床冠心病的病理过程<sup>[39]</sup>。常用10~120 mg·kg<sup>-1</sup>·bw<sup>-1</sup>剂量的ISO连续两次或多次对啮齿类动物进行皮下

注射制备心肌梗死模型<sup>[40]</sup>。据报道，给予Wistar或SD大鼠连续2 d(间隔24 h)皮下注射ISO 85 mg·kg<sup>-1</sup>·bw<sup>-1</sup><sup>[41]</sup>或100 mg·kg<sup>-1</sup>·bw<sup>-1</sup><sup>[42]</sup>后，均可见心功能显著下降、血清心肌损伤标志物升高、心肌组织水肿伴炎症及坏死，表示成功构建了心肌梗死模型。有研究者通过对SD大鼠皮下注射85 mg/kg ISO和慢性轻度应激刺激模拟了心肌梗死后抑郁状态的动物模型<sup>[43]</sup>。Tóth等利用ISO成功诱导了Wistar大鼠急性交感神经应激状态，并对大鼠的心脏损伤、神经炎症、脑功能和认知行为进行了观察与评估<sup>[44]</sup>。几种常用冠心病继发认知障碍动物模型比较见表1。

表1 几种常用冠心病继发认知障碍动物模型比较

Table 1. Comparison of several commonly used animal models of cognitive impairment secondary to coronary heart disease

模型	实验动物	干预方式	优点	缺点
高脂饲料诱导模型	大鼠或小鼠	高脂饲料喂养	较为符合人类AS形成过程、操作方便	用时周期长，往往需要结合其它方法
转基因动物模型	小鼠	采用特定的转基因干预	针对性强、可应用范围广	制备技术要求高、价格高昂、相对不易获取
冠状动脉结扎模型	大鼠或小鼠	手术结扎左冠状动脉前降支	操作方法成熟、结扎部位明确、造模准确度高	术后死亡率较高，对手术操作的均一性要求高
化学干预模型	大鼠或小鼠	注射异丙肾上腺素	模拟心肌缺血或梗死的病理过程、操作简单、死亡率低	较难对缺血的程度、部位、梗死范围作出定量和定性分析

### 3 常用检测指标及评价方法

#### 3.1 冠心病相关评估

对冠心病动物模型制备的评价方法已基本达成共识，如高脂饲料诱导所致的冠状动脉粥样硬化的评估主要集中在血脂水平和主动脉、心肌组织的病理染色上，也有对心肌损伤标志物及炎症因子的血清学检测。冠状动脉结扎法或ISO诱导法所致的心肌缺血、心肌梗死模型评价方法主要是心电图、定量组织学和血清酶学等综合指标的测定。

#### 3.2 认知功能评估

目前对动物认知功能的评估多采用行为学评价方法，也有研究根据实验目的结合组织病理学、影像学等进行判断。有报道指出，目前探究动物行为学实验的方法以Morris水迷宫为主，Y迷宫、八臂迷宫、主动/被动回避、跳台实验等

为辅，并且各种新型改良版放射迷宫也在不断出现，研究者可根据实验需要及实验动物进行合理选用<sup>[45]</sup>。

##### 3.2.1 Morris水迷宫实验

Morris水迷宫是一种研究啮齿类动物空间学习和记忆能力的测试装置，目前被广泛用于学习记忆能力、认知障碍、衰老等方面的研究，主要包括定位航行实验和空间探索实验两部分<sup>[46]</sup>。

王玉选取8周龄ApoE<sup>-/-</sup>小鼠予高脂饲料喂养12周后，检测血脂发现TC、TG、LDL含量明显增加、HDL明显减少，HE染色示主动脉有明显的斑块形成，说明AS建模成功；模型组小鼠的Morris水迷宫实验逃避潜伏期与游泳总路程明显增加、穿越平台次数显著减少，提示其出现认知功能障碍，且乙酰胆碱酯酶、β-淀粉样蛋白及相关炎症因子的表达显著增加，成功建立了因AS继发的轻度认知障碍小鼠模型<sup>[47]</sup>。Ravindran

等以 ISO 溶液 80 mg/kg 连续两次对 Wistar 大鼠行皮下注射, 给药第 2 d 见心电图 ST 段抬高, 血浆中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和缺血修饰白蛋白(IMA)水平显著升高, 第 8 d 取心组织行心肌梗死面积测定及 HE 染色观察发现肌原纤维排列严重紊乱、中性粒细胞大量浸润, 并伴有水肿, 说明心肌梗死建模成功; 在此期间采用 Morris 水迷宫和放射臂迷宫测试评估 ISO 诱导的心肌损伤对大鼠学习和记忆能力的影响, 结果显示与假手术组相比, 模型组大鼠需要更多的时间到达平台且参考记忆错误数量显著增加, 表明模型小鼠学习和记忆能力逐渐下降, 建立了心肌梗死后的认知障碍大鼠模型<sup>[48]</sup>。

### 3.2.2 Y 迷宫实验

Y 迷宫主要是利用啮齿类动物对新环境探索的天性来实施, 以测定它们的空间工作记忆能力, 被广泛用于认知功能减退、趋向性、空间学习记忆等领域<sup>[49]</sup>。

有研究对 SD 大鼠连续高脂饲料喂养 10 周, 期间分 3 次给予维生素 D3 腹腔注射(第 1 周 60 万 IU/kg、第 3 周 10 万 IU/kg、第 6 周 10 万 IU/kg), 第 10 周末取材检测发现大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、LDL 升高, 油红 O 和 HE 染色可见斑块形成、主动脉管壁增厚、平滑肌细胞排列紊乱、数量增加, 说明 AS 造模成功; 持续 4 周的有氧运动干预后行 Y 迷宫实验, 结果显示模型组大鼠空间识别能力和工作记忆能力受损, 与对照组相比, 在空间识别实验中进入新异臂次数减少、停留时间缩短, 同时取脑海马组织检测显示海马代谢异常以及突触可塑蛋白表达受损<sup>[50]</sup>。Koji Ito 等通过对 10 周龄的 ICR 小鼠行左冠状动脉结扎制备心肌梗死模型, 术后 1 周和 4 周行超声心动图示心肌梗死组小鼠的左心室内径明显小于假手术组, 并通过行 Y 迷宫测试评价其认知功能, 发现心肌梗死组小鼠的自发交替次数显著低于假手术组小鼠, 表明心肌梗死模型小鼠的空间工作记忆能力下降, 出现认知障碍, 并且下丘脑和海马区的脑 Sigma-1 受体(S1R)表达降低, 而 S1R 的减少在精神障碍的发病机制中起重要作用<sup>[51]</sup>。

### 3.2.3 主动/被动回避实验

回避实验是利用动物的喜暗恶光(明暗穿梭)、对厌恶刺激(如足电击)的恐惧和记忆而

建立起来的, 用来评估啮齿类动物的空间学习记忆能力, 主要是反应皮质功能<sup>[52]</sup>。主动位置回避是指动物在一个缓慢旋转的圆形舞台中有某一固定的电击区域, 若动物进入该区域则会受到轻微电击, 动物通过学习避免进入该区域, 研究者通过对电击次数、回避所需时间及运动路径等数据进行记录以评估认知功能情况<sup>[53]</sup>。被动回避测试中的避光实验是利用啮齿类动物喜暗特性, 实验时将动物放入一个由明、暗两室组成的装置中, 当其由明室进入暗室时即会遭受一次电刺激令其返回明处, 从而获得记忆的训练, 之后间隔 24 或 48 h 记录动物从明室进入暗室的间隔时间(即潜伏期)和电击次数, 潜伏期越长、受电击次数越少表示学习和记忆力越好<sup>[54]</sup>。

有研究为了探究心肌梗死与认知功能减退及血管性痴呆的关系, 对 5~6 月龄的雄性 C57BL/6 小鼠进行左冠状动脉结扎成功建立心肌梗死小鼠模型, 4 周后通过主/被动回避实验对小鼠进行学习和记忆能力评估, 结果发现与假手术组相比, 心肌梗死小鼠的被动回避潜伏期显著减少, 主动回避潜伏期增加, 说明心肌梗死后 C57BL/6 小鼠的记忆明显受损、认知功能减退<sup>[55]</sup>。

### 3.2.4 新物体识别实验

新物体识别实验是根据动物对熟悉物体和新异物体探索时间的长短来检测其识别记忆能力的方法。实验主要分为适应期、熟悉期和测试期三个阶段。适应期时将动物放入没有任何物体的实验装置中, 使其自由探索并适应实验环境; 熟悉期是将两个完全相同的物体放入, 记录动物与其接触的情况; 测试期是将其中一个熟悉物体换成新物体, 观察并记录动物对它们的探索时间, 把探索新物体和熟悉物体所用的时间分别记为 TN 和 TF, 并计算识别指数(recognition index, RI), 即  $RI = TN / (TN + TF) \times 100\%$ , 最后通过上述指标评估动物的认知记忆能力<sup>[56]</sup>, 当被测动物未遗忘环境中见过的熟悉物体, 便会用更多的时间探究未见过的的新物体, 在熟悉物体上的探索时间就越短。

Hovens 等用冠脉前降支结扎法制备心肌缺血再灌注模型, 术后 2 周(成活率 72%)对 Wistar 大鼠进行认知行为测试, 新物体识别实验及 Morris 水迷宫实验皆表明大鼠的空间记忆、学习能力下降<sup>[57]</sup>。

### 3.2.5 其它评估方法

认知障碍的病因相当复杂,其涵盖了认知功能下降、轻度认知功能障碍到痴呆的整个疾病过程,在动物模型的评价上,除上述认知行为学的测评外,部分病理学及影像学的改变亦可作为提示。阿尔茨海默病的病理表现主要有细胞外淀粉样蛋白沉积、神经纤维缠结以及神经元数目减少等<sup>[58]</sup>。Berezki 等实验研究显示 ApoB-100 转基因小鼠在高脂饮食喂养 18 周后主动脉血流量减少了 25%,并在其海马、大脑皮层和下丘脑中发现了广泛的神经元死亡和淀粉样斑块,磁共振成像显示小鼠第三脑室和侧脑室增大,提示 ApoB-100 的过表达与神经退行性病变有关<sup>[59]</sup>。Yuan 等制备 SD 大鼠急性心肌缺血再灌注模型,术后 3 d HE 病理染色可见大鼠海马 CA1 区神经元损伤严重、排列紊乱,表明神经细胞凋亡,免疫组化示小胶质细胞活化,八臂迷宫实验示工作记忆错误次数增加,说明心肌缺血再灌注大鼠存在认知功能障碍<sup>[60]</sup>。

## 4 结语

目前冠心病的模型制备方法较为成熟,如 AS、心肌缺血、心肌梗死等疾病状态的动物模型制备均有多种方法可供选择,但检索文献并归纳整理后发现冠心病继发认知障碍的动物模型尚无稳定或较为公认的制备方法。如今常用的构建方法是首先按照常用的、可靠的模型建立方法成功制作出冠心病的动物模型,然后通过啮齿类动物行为学检测方法筛选出所需的认知障碍模型,但这可能存在成功率偏低、评估方法不统一的问题。

在实验动物的选择上,从冠心病和认知障碍疾病领域来看,虽然非人灵长类动物是理想的动物来源,但是由于价格高昂、获取来源不便、实验条件较高,在实际操作中可行性并不高;而啮齿类动物因其操作方便、来源可靠、可大规模复制,故被广泛使用。在模型的制备上多根据研究目的及研究疾病的病理特征来选用,如由心肌梗死引起的认知障碍中,用冠状动脉结扎法在大鼠上建立模型已较为成熟,且可供使用的评估方法可行性强。

需要指出的是,目前对认知障碍的评判方法还多集中在动物行为学的测评方面,因此存在一定的局限性。因人类的认知功能本就复杂,单纯的行为学测试不足以完全表达,必要时应结合先

进的神经电生理技术、影像学、组织病理学等方法综合评估。此外,由于研究者关注的重点是冠心病继发认知障碍,因此并不能使用冠心病模型叠加认知障碍模型,即所谓的复合模型,这种先制备出冠心病模型,再用其他措施诱导出认知障碍的方法不符合研究目的,也无法展示疾病本身的病理过程。理想的动物模型应是与临床发病机制切合,且来源易获取、可操作性强、成本适宜的。因此探索开发稳定可靠、重复性好、成模率高的冠心病继发认知障碍的动物实验模型对该病的研究具有重要的意义。未来应加强基于临床特征的并病动物模型的研发,对于新药研发及深入认识疾病的病理生理机制非常重要。

## 参考文献

- 1 Kasprzak D, Rzezniczak J, Ganowicz T, et al. A review of acute coronary syndrome and its potential impact on cognitive function[J]. *Glob Heart*, 2021, 16(1): 53. DOI: [10.5334/gh.934](https://doi.org/10.5334/gh.934).
- 2 Deckers K, Schievink SHJ, Rodriquez MMF, et al. Coronary heart disease and risk for cognitive impairment or dementia: systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184244. DOI: [10.1371/journal.pone.0184244](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184244).
- 3 Greaves D, Psaltis PJ, Ross TJ, et al. Cognitive outcomes following coronary artery bypass grafting: a systematic review and meta-analysis of 91,829 patients[J]. *Int J Cardiol*, 2019, 289: 43-49. DOI: [10.1016/j.ijcard.2019.04.065](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.04.065).
- 4 Stewart RAH, Held C, Krug-Gourley S, et al. Cardiovascular and lifestyle risk factors and cognitive function in patients with stable coronary heart disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(7): e010641. DOI: [10.1161/JAHA.118.010641](https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010641).
- 5 Kovacic JC, Moreno P, Nabel EG, et al. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly[J]. *Circulation*, 2011, 123(17): 1900-1910. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009118](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009118).
- 6 Shabir O, Berwick J, Francis SE. Neurovascular dysfunction in vascular dementia, Alzheimer's and atherosclerosis[J]. *BMC Neurosci*, 2018, 19(1): 62. DOI: [10.1186/s12868-018-0465-5](https://doi.org/10.1186/s12868-018-0465-5).



- 7 Stellos K, Katsiki N, Tatsidou P, et al. Association of platelet activation with vascular cognitive impairment: implications in dementia development?[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014, 12(1): 152–154. DOI: [10.2174/157016111201140327164641](https://doi.org/10.2174/157016111201140327164641).
- 8 Lathe R, Saprova A, Kotelevtsev Y. Atherosclerosis and Alzheimer–diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature[J]. *BMC Geriatr*, 2014, 14: 36. DOI: [10.1186/1471-2318-14-36](https://doi.org/10.1186/1471-2318-14-36).
- 9 Hainsworth AH, Allan SM, Boltze J, et al. Translational models for vascular cognitive impairment: a review including larger species[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 16. DOI: [10.1186/s12916-017-0793-9](https://doi.org/10.1186/s12916-017-0793-9).
- 10 闻荻豪, 李昱, 孙羽东, 等. 认知功能障碍动物模型造模方法的进展 [J]. 中国血管外科杂志 (电子版), 2021, 13(3): 260–263. [Wen DH, Li Y, Sun YD, et al. Progress in modeling methods of animal models with cognitive impairment[J]. *Chinese Journal of Vascular Surgery (Electronic Version)*, 2021, 13(3): 260–263.] DOI: [10.3969/j.issn.1674-7429.2021.03.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-7429.2021.03.019).
- 11 Refinetti R, Kenagy GJ. Diurnally active rodents for laboratory research[J]. *Lab Anim*, 2018, 52(6): 577–587. DOI: [10.1177/0023677218771720](https://doi.org/10.1177/0023677218771720).
- 12 许官学, 石蓓, 盛瑾, 等. 改良大鼠急性心肌梗死模型的制备方法 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(14): 3367–3370. [Xu GX, Shi B, Sheng J, et al. Preparation method of modified acute myocardial infarction model in rats[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2013, 33(14): 3367–3370.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-9202.2013.14.041](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9202.2013.14.041).
- 13 王克柱, 徐攀, 卢聪, 等. 两品系大鼠在经典条件反射和操作式条件反射中的行为学表现 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 65–71. [Wang KZ, Xu P, Lu Cong, et al. Behavioral differences of the Sprague–Dawley and Wistar rats in Pavlovian conditioning and reward operant conditioning [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2016, 24(1): 65–71.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.012).
- 14 侯外方, 张茂森, 张琳, 等. 血管性认知障碍动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 542–552. [Hou WF, Zhang MS, Zhang L, et al. Research progress using animal models of vascular cognitive impairment[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2021, 29(4): 542–552.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-4847.2021.04.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-4847.2021.04.017).
- 15 Goodarzi P, Payab M, Alavi–Moghadam S, et al. Development and validation of alzheimer's disease animal model for the purpose of regenerative medicine[J]. *Cell Tissue Bank*, 2019, 20(2): 141–151. DOI: [10.1007/s10561-019-09773-8](https://doi.org/10.1007/s10561-019-09773-8).
- 16 王雪羽, 田进伟. 易损斑块动物模型研究进展 [J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(6): 575–578. [Wang XY, Tian JW. Research progress in animal models of vulnerable plaque[J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Medicine*, 2019, 24(6): 575–578.] DOI: [10.3969/j.issn.1007-5410.2019.06.020](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-5410.2019.06.020).
- 17 Zhao Y, Qu H, Wang Y, et al. Small rodent models of atherosclerosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110426. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110426](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110426).
- 18 Long Y, Zhao XT, Liu C, et al. A case–control study of the association of the polymorphisms of MTHFR and APOE with risk factors and the severity of coronary artery disease[J]. *Cardiology*, 2019, 142(3): 149–157. DOI: [10.1159/000499866](https://doi.org/10.1159/000499866).
- 19 Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, et al. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta–analysis[J]. *JAMA*, 2015, 313(19): 1924–1938. DOI: [10.1001/jama.2015.4668](https://doi.org/10.1001/jama.2015.4668).
- 20 Tran T, Corsini S, Kellingray L, et al. APOE genotype influences the gut microbiome structure and function in humans and mice: relevance for Alzheimer's disease pathophysiology[J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 8221–8231. DOI: [10.1096/fj.201900071R](https://doi.org/10.1096/fj.201900071R).
- 21 Abete P, Della–Morte D, Gargiulo G, et al. Cognitive impairment and cardiovascular diseases in the elderly. A heart–brain continuum hypothesis[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 18: 41–52. DOI: [10.1016/j.arr.2014.07.003](https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.07.003).
- 22 Priyadharsini RP. Animal models to evaluate anti–atherosclerotic drugs[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2015, 29(4): 329–340. DOI: [10.1111/fcp.12130](https://doi.org/10.1111/fcp.12130).
- 23 杨定法, 赵庆宇婧, 颜红娇, 等. 动脉粥样硬化实验动物模型及方法研究进展 [J/OL]. 重庆医学, 2022. (2022–03–31) [2022–08–12]. [Yang DF, Zhao QYJ, Yan HJ, et al. Comparative study on experimental animal models and methods of atherosclerosis[J/OL]. *Chongqing Medicine*, 2022.] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220330.1648.006.html>.

- 24 药红梅, 吕吉元. 几种冠状动脉粥样硬化大鼠模型建立方法比较[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(4): 450-451. [Yao HM, Lyu JY. Comparison of several methods for establishing rat models of coronary atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease, 2011, 9(4): 450-451.] DOI: [10.3969/j.issn.1672-1349.2011.04.039](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-1349.2011.04.039).
- 25 Smith DA. In adults without CVD, the MESA score, including coronary artery calcium, predicted 10-y risk for CHD events[J]. Ann Intern Med, 2016, 164(6): JC35. DOI: [10.7326/ACPJC-2016-164-6-035](https://doi.org/10.7326/ACPJC-2016-164-6-035).
- 26 卢令慧, 王景, 曹愿, 等. 冠心病复合高血脂状态病证结合动物模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1816-1821. [Lu LH, Wang J, Cao Y, et al. Establishment and evaluation of disease and syndrome integrated animal model on coronary heart disease complicated with hyperlipemia[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2016, 31(5): 1816-1821.] DOI: [CNKI:SUN:BXYY.0.2016-05-063](https://doi.org/CNKI:SUN:BXYY.0.2016-05-063).
- 27 Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, et al. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond[J]. J Lipid Res, 2009, 50 Suppl: S178-S182. DOI: [10.1194/jlr.R800070-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R800070-JLR200).
- 28 Getz GS, Reardon CA. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis[J]. J Lipid Res, 2016, 57(5): 758-766. DOI: [10.1194/jlr.R067249](https://doi.org/10.1194/jlr.R067249).
- 29 Poznyak AV, Silaeva YY, Orekhov AN, et al. Animal models of human atherosclerosis: current progress[J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(6): e9557. DOI: [10.1590/1414-431x20209557](https://doi.org/10.1590/1414-431x20209557).
- 30 Li Y, G Zhang C, Wang XH, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(18): 3863-3867. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27735029/>.
- 31 Sun LL, Duan MJ, Ma JC, et al. Myocardial infarction-induced hippocampal microtubule damage by cardiac originating microRNA-1 in mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 120: 12-27. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2018.05.009](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.05.009).
- 32 Ma JC, Duan MJ, Li KX, et al. Knockdown of microRNA-1 in the hippocampus ameliorates myocardial infarction induced impairment of long-term potentiation[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(4): 1601-1616. DOI: [10.1159/000494657](https://doi.org/10.1159/000494657).
- 33 Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, et al. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction[J]. Circulation, 2013, 127(2): 213-223. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.112.131110](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.131110).
- 34 李贻奎, 赵乐, 何萍, 等. 提高结扎冠状动脉在体大鼠心肌梗死模型制作速度和质量的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 948-950. [Li YK, Zhao L, He P, et al. Study on improving the speed and quality of making rat myocardial infarction model by coronary artery ligation[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2012, 32(7): 948-950.] DOI: [10.7661/CJIM.2012.7.948](https://doi.org/10.7661/CJIM.2012.7.948).
- 35 张凯, 谢世阳, 王幼平, 等. 冠脉结扎法建立大鼠急性心肌梗死模型方法的探讨[J]. 中国中医急症, 2014, 24(8): 1397-1399. [Zhang K, Xie SY, Wang YP, et al. Evaluation of rat model of myocardial infarction induced by ligation of coronary artery[J]. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine, 2014, 24(8): 1397-1399.] DOI: [10.3969/j.issn.1004-745X.2014.08.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-745X.2014.08.001).
- 36 Hong X, Bu L, Wang Y, et al. Increases in the risk of cognitive impairment and alterations of cerebral beta-amyloid metabolism in mouse model of heart failure[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63829. DOI: [10.1371/journal.pone.0063829](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063829).
- 37 田欢, 支文冰, 李晔, 等. 三益丹对大鼠心肌缺血的改善作用[J]. 中成药, 2020, 42(3): 598-603. [Tian H, Zhi WB, Li Y, et al. Effects of Sanyidan on myocardial ischemia in rats[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(3): 598-603.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.010](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1528.2020.03.010).
- 38 Harjola VP, Mullens W, Banaszewski M, et al. Organ dysfunction, injury and failure in acute heart failure: from pathophysiology to diagnosis and management. A review on behalf of the Acute Heart Failure Committee of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. Eur J Heart Fail, 2017, 19(7): 821-836. DOI: [10.1002/ejhf.872](https://doi.org/10.1002/ejhf.872).
- 39 Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental



- myocardial injury induced by isoproterenol[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(2): 141–151. DOI: [10.4149/gpb\\_2012\\_015](https://doi.org/10.4149/gpb_2012_015).
- 40 梁娟, 刘越, 尹新华. 异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 110–114. [Liang J, Liu Y, Yin XH. Research progress of animal models of myocardial injury induced by isoproterenol[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2019, 27(1): 110–114.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-4847.2019.01.018).
- 41 Meeran M, Azimullah S, Adeghate E, et al. Nootkatone attenuates myocardial oxidative damage, inflammation, and apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153405. DOI: [10.1016/j.phymed.2020.153405](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153405).
- 42 Chen Y, Peng L, Shi S, et al. Boeravinone B alleviates gut dysbiosis during myocardial infarction-induced cardiotoxicity in rats[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(13): 6403–6416. DOI: [10.1111/jcmm.16620](https://doi.org/10.1111/jcmm.16620).
- 43 Hu Y, Liu X, Zhang T, et al. Behavioral and biochemical effects of KXS on postmyocardial infarction depression[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 561817. DOI: [10.3389/fphar.2020.561817](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.561817).
- 44 Tóth K, Oroszi T, van der Zee EA, et al. Effects of exercise training on behavior and brain function after high dose isoproterenol-induced cardiac damage[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23576. DOI: [10.1038/s41598-021-03107-z](https://doi.org/10.1038/s41598-021-03107-z).
- 45 Cleal M, Fontana BD, Ranson DC, et al. The Free-movement pattern Y-maze: a cross-species measure of working memory and executive function[J]. *Behav Res Methods*, 2021, 53(2): 536–557. DOI: [10.3758/s13428-020-01452-x](https://doi.org/10.3758/s13428-020-01452-x).
- 46 Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice[J]. *J Vis Exp*, 2011, (53): 2920. DOI: [10.3791/2920](https://doi.org/10.3791/2920).
- 47 王玉. 针灸并举对因动脉硬化引发轻度认知障碍小鼠模型的作用机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019. [Wang Y. Study on the mechanism of acupuncture combined with medicine on mice model of mild cognitive impairment caused by atherosclerosis[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019.]
- 48 Ravindran S, Gopalakrishnan S, Kurian GA. Beneficial effect of sodium thiosulfate extends beyond myocardial tissue in isoproterenol model of infarction: Implication for nootropic effects[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(12): e22606. DOI: [10.1002/jbt.22606](https://doi.org/10.1002/jbt.22606).
- 49 Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105–111. DOI: [10.1007/978-1-4939-8994-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10).
- 50 刘蓓蓓. 动脉粥样硬化诱发的海马代谢异常影响突触可塑相关蛋白表达的机制及运动的调节作用[D]. 上海: 上海体育学院, 2021. [Liu BB. The mechanisms of metabolic changes in the hippocampus of atherosclerotic rat affecting synaptic plasticity associated proteins expression and regulation of running exercise[D]. Shanghai: Shanghai University of Sport, 2021.]
- 51 Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Brain sigma-1 receptor stimulation improves mental disorder and cardiac function in mice with myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(2): 222–228. DOI: [10.1097/FJC.0b013e3182970b15](https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182970b15).
- 52 Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, et al. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory[J]. *Brain Struct Funct*, 2012, 217(1): 93–106. DOI: [10.1007/s00429-011-0332-y](https://doi.org/10.1007/s00429-011-0332-y).
- 53 Bahník Š, Stuchlík A. Temporal and spatial strategies in an active place avoidance task on carousel: a study of effects of stability of arena rotation speed in rats[J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1257. DOI: [10.7717/peerj.1257](https://doi.org/10.7717/peerj.1257).
- 54 Atucha E, Roozendaal B. The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory[J]. *Front Behav Neurosci*, 2015, 9: 60. DOI: [10.3389/fnbeh.2015.00060](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00060).
- 55 Ma JC, Duan MJ, Li KX, et al. Knockdown of MicroRNA-1 in the hippocampus ameliorates myocardial infarction induced impairment of long-term potentiation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4): 1601–1616. DOI: [10.1159/000494657](https://doi.org/10.1159/000494657).
- 56 Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications[J]. *Cogn Process*, 2012, 13(2): 93–110. DOI: [10.1007/s10339-011-0430-z](https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z).
- 57 Hovens IB, van Leeuwen BL, Mariani MA, et al.

- Postoperative cognitive dysfunction and neuroinflammation; Cardiac surgery and abdominal surgery are not the same[J]. Brain Behav Immun, 2016, 54: 178–193. DOI: [10.1016/j.bbi.2016.02.003](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.003).
- 58 Kalaria RN. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for alzheimer's disease[J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(5): 659–685. DOI: [10.1007/s00401-016-1571-z](https://doi.org/10.1007/s00401-016-1571-z).
- 59 Berezcki E, Bernat G, Csont T, et al. Overexpression of human apolipoprotein B-100 induces severe neurodegeneration in transgenic mice[J]. J Proteome Res, 2008, 7(6): 2246–2252. DOI: [10.1021/pr7006329](https://doi.org/10.1021/pr7006329).
- 60 Yuan S, Zhang X, Bo Y, et al. The effects of electroacupuncture treatment on the postoperative cognitive function in aged rats with acute myocardial ischemia-reperfusion[J]. Brain Res, 2014, 1593: 19–29. DOI: [10.1016/j.brainres.2014.10.005](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.005).

收稿日期: 2022 年 07 月 06 日 修回日期: 2022 年 08 月 04 日  
本文编辑: 桂裕亮 黄 笛

引用本文: 王青, 刘凤岚, 徐仕晗, 等. 冠心病继发认知障碍的动物模型研究进展 [J]. 医学新知, 2022, 32(4): 260–269. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202207016](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202207016)  
Wang Q, Liu FL, Xu SH, et al. Advances in animal models of cognitive impairment secondary to coronary heart disease[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2022, 32(4): 260–269. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202207016](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202207016)