

· 基础性疾病研究 ·

从HMGB1-BDNF互作轴所介导的肝-脑对话探讨 复方鳖甲软肝片干预酒精性肝病的作用机制

刘毓东¹, 闫向英¹, 李涛¹, 张楚², 蔡冰冰², 马兆臣¹, 林娜¹, 张彦琼^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 道地药材与品质保障全国重点实验室, 北京 100700;

2. 福建中医药大学 药学院, 福州 350122)

[摘要] 目的: 该研究旨在利用急、慢性酒精性肝病(ALD)小鼠模型, 系统且客观地表征复方鳖甲软肝片(FBRP)干预ALD的药效作用特点, 并揭示其分子机制。方法: 将50只SPF级雄性BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组、FBRP低、中、高剂量组(9.6、19.2、38.4 mg·kg⁻¹); 除正常组外, 其余各组给予56°白酒灌胃, 构建急性ALD模型, 4周后取材。将30只SPF级C57BL/6N性小鼠随机分为正常组、模型组、FBRP中剂量组(19.2 mg·kg⁻¹), 采用Lieber-DeCarli法, 构建慢性ALD小鼠模型, 持续10周。通过苏木素-伊红(HE)、天狼星红、油红O病理染色及酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测, 考察各组肝脏组织的炎症指标; 通过醒酒时间、抓网和爬杆时间, 客观评价各组小鼠的醉酒行为。进一步, 开展基于临床转录组学数据的生物信息学分析, 从肝-脑对话环节筛选FBRP缓解ALD的关键作用靶标及其相关分子机制, 并采用ELISA、蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫组织化学染色对其加以实验验证。结果: 与正常组比较, 急性和慢性ALD模型组小鼠肝脏组织天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)的水平均明显升高($P<0.05$); 与模型组比较, FBRP各剂量给药组小鼠肝脏组织AST、ALT的水平均明显下降($P<0.05$)。与正常组比较, 急性ALD模型组小鼠在4周内的抓网和爬杆时间均显著下降($P<0.01$); 与模型组比较, FBRP高剂量给药组在4周内的抓网和爬杆时间明显上升($P<0.05$)。与正常组比较, 慢性ALD模型组小鼠肝脏组织和大脑前额叶组织中高迁移率族蛋白B1(HMGB1)蛋白的表达量显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, FBRP中剂量组HMGB1蛋白的表达量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较, 模型组大脑前额叶组织中脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白的表达量及 γ 氨基丁酸(GABA)释放量均显著下降($P<0.01$); 与模型组比较, FBRP中剂量组BDNF蛋白的表达量及GABA释放量均明显升高($P<0.05$)。结论: 该研究揭示了FBRP可通过调节HMGB1-BDNF互作轴所介导的肝-脑对话而改善ALD的关键病理改变, 为该中成药品种临床用治ALD提供了实验证据, 也为开发ALD治疗新药提供新的研究思路。

[关键词] 酒精性肝病; 肝-脑轴; 复方鳖甲软肝片; γ 氨基丁酸

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R256.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)23-0214-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241638 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240926.1401.008>

[网络出版日期] 2024-09-26 15:36:31

Mechanisms of Fufang Biejia Ruangan Pills Against Alcoholic Liver Disease via Regulating Liver-brain Dialogue Mediated by HMGB1-BDNF Axis

LIU Yudong¹, YAN Xiangying¹, LI Tao¹, ZHANG Chu², CAI Bingbing², MA Zhaochen¹,

LIN Na¹, ZHANG Yanqiong^{1*}

(1. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[收稿日期] 2024-07-10

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所“使命导向改革”重点专项(CI2023E001TS02); 国家资助博士后研究人员计划C档项目(GZC20233130)

[第一作者] 刘毓东, 在读博士, 从事中医药系统生物学研究, E-mail: kabutoyun1@163.com

[通信作者] * 张彦琼, 博士, 研究员, 从事中医药系统生物学研究, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn

[Abstract] **Objective:** To systematically and objectively characterize the pharmacological effects of Fufang Biejia Ruangan pills (FBRP) in the intervention of alcoholic liver disease (ALD) using acute and chronic ALD mouse models and to elucidate its molecular mechanisms. **Method:** Fifty SPF-grade male BALB/c mice were randomly divided into the normal group, model group, and FBRP low-, medium-, and high-dose groups (9.6, 19.2, 38.4 mg·kg⁻¹). Except for the normal group, the remaining groups were given 56° white wine by gavage to establish the acute ALD model, with samples collected after 4 weeks. Thirty SPF-grade male C57BL/6N mice were randomly divided into the normal group, model group, and FBRP medium-dose group (19.2 mg·kg⁻¹). The chronic ALD mouse model was established using the Lieber-DeCarli method over a 10-week period. Inflammatory markers in liver tissues were assessed using hematoxylin-eosin (HE), Sirius Red, oil red O staining, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Intoxication behaviors of each group were objectively evaluated through sobering-up time, net-catching, and pole-climbing tests. Further bioinformatics analyses based on clinical transcriptomic data were conducted to identify key targets and molecular mechanisms of FBRP in alleviating ALD through liver-brain dialogue, with experimental validation by ELISA, Western blot, and immunohistochemical staining. **Result:** Compared with the normal group, the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in liver tissues of mice in the acute and chronic ALD model groups were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the levels of AST and ALT in liver tissue of mice in FBRP groups were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the normal group, the time of grasping the net and climbing the pole in the acute ALD model group was significantly decreased within 4 weeks ($P<0.01$). Compared with the model group, the grasping and climbing time of FBRP high dose groups increased significantly within 4 weeks ($P<0.05$). Compared with the normal group, the expression of high mobility group protein B1 (HMGB1) protein in liver tissue and prefrontal lobe tissue of mice in the chronic ALD model group was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression of HMGB1 protein in FBRP medium dose group was significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the normal group, the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and the release of γ -aminobutyric acid (GABA) in the prefrontal cortex of the model group were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression of BDNF protein and the release of GABA in the FBRP medium dose group were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** This study revealed that FBRP improved key pathological changes in ALD by modulating liver-brain dialogue mediated by the HMGB1-BDNF axis. These findings provide experimental evidence for the clinical use of FBRP in treating ALD and offer new insights for the development of ALD therapeutic agents.

[Keywords] alcoholic liver disease; liver-brain axis; Fufang Biejia Ruangan pills; γ -aminobutyric acid

酒精性肝病(ALD)是由长期过量饮酒引起的一系列肝脏疾病,包括脂肪肝、酒精性肝炎和肝硬化^[1]。ALD在我国的发病率呈逐年递增趋势,目前约有640万ALD相关的肝硬化病例。统计数据显示,如维持现有饮酒率,预计到2040年,每10万人的ALD发病率将比2022年上升146.50%^[2]。然而,至今尚无美国食品药品监督管理局(FDA)批准用治ALD的药物^[3]。尽管激素、抗氧化和抗纤维化药物可以在一定程度上缓解症状或延缓疾病进展,但由于患者肝功能受损及其对治疗方案应答的个体化差异性,往往导致其疗效并不理想,且常伴有不良反应和安全隐患^[4-5]。因此,迫切需要开发安全有效

的创新药物,以满足ALD的治疗需求。

中医药在治疗ALD方面历史悠久^[6],其在缓解酒精中毒和减轻酒后不适症状方面具有独特优势,主要体现在改善肝脏功能、降低体内乙醇含量、调节神经系统等方面^[7]。中成药复方鳖甲软肝片(FBRP),临床用治慢性乙型肝炎肝纤维化和早期肝硬化,并具有抗肝癌潜能^[8]。近期的临床研究显示,该品种在ALD的治疗方面亦展现出了一定潜力^[9-10],但其药效作用特点和作用机制仍亟待阐明。

本研究建立了急、慢性ALD动物模型,通过动态组织病理学观察和生物分子指标检测,客观评估了FBRP缓解ALD病情进展的药效和作用特点。

进一步,通过整合临床层面的转录组学数据挖掘,识别ALD发生、发展相关基因,以及FBRP对其的潜在干预靶点,并开展系列实验加以验证。

1 材料

1.1 动物 急性ALD模型:SPF级雄性BALB/c小鼠50只,体质量(20 ± 2)g,6~7周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2021-0006,适应性饲养1周,饲养环境温度(24 ± 1)℃,光/暗循环各12 h,并予以标准的SPF级小鼠饲料进行喂养,自由饮水。慢性ALD模型:SPF级C57BL/6N性小鼠30只,雌雄各半,体质量(22 ± 2)g,10周龄,饲养环境同急性ALD模型。所有动物实验均符合中国中医科学院伦理委员会规定,伦理编号IBTCMCACMS21-2310-01。

1.2 药品 FBRP(内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司,批号XC0123001)。

1.3 试剂 Lieber-DeCarli饲料(北京小泰有泰生物科技有限公司);56°二锅头(北京红星股份有限公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、改良油红O染色试剂盒、改良天狼星红染色试剂盒、全蛋白提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120、G1261、G1472、BC3710);天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、乙醇脱氢酶(ADH)、乙醛脱氢酶(ALDH)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、 γ -氨基丁酸(GABA)测定试剂盒(自南京建成生物工程研究所,批号分别为C010-2-1、C009-2-1、A001-3-2、A005-1-2、A083-2-1、A075-1-1、A003-1-2、E004-1-1、A110-1-1、A111-1-1、H168-1-2);高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、脑源性神经营养因子(BDNF)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A19529、A18129); β -肌动蛋白(β -actin)、兔抗免疫球蛋白(Ig)G、鼠抗IgG(美国CST公司,批号分别为4967S、7074、7076)。

1.4 仪器 A51119700DPC型全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);3K15型低温离心机(默克德国西格玛公司);BX53M型光学显微镜(日本奥林巴斯公司);MiNiPRO型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司);Tissue-Tek®TEC®5型组织包埋机(日本樱花公司);HI1220型烘片机、RM2235型轮转式切片机、H1210型水浴摊片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 急性ALD模型:随机

将BALB/c小鼠分为5组,即正常组、模型组、FBRP低、中、高剂量组(9.6 、 19.2 、 38.4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别相当于0.5倍、1倍、2倍临床等效剂量)。每日上午9:00,对各给药组小鼠灌胃相应剂量FBRP溶液,模型组和正常组小鼠用等容蒸馏水代替;给药后0.5 h,模型组、各给药组给予56°白酒灌胃处理,白酒灌胃起始剂量为 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每间隔1周增加2 mL,正常组给予等体积蒸馏水灌胃;各组动物连续接受上述处理4周后被处死。慢性ALD模型:随机将C57BL/6N小鼠分为3组,即正常组、模型组、FBRP中剂量组(19.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,临床等效剂量,急性模型最佳药效剂量)。采用Lieber-DeCarli法造模,每日16:00更换饲料,6周后给药组小鼠灌胃相应剂量的FBRP,模型组和正常组小鼠用等体积蒸馏水代替,持续4周。

2.2 醉酒率及醒酒时间 急性ALD模型各组给予酒精灌胃后,测量翻正反射消失及恢复时间,评价醉酒率及醒酒时间。具体操作为将小鼠背部置于V型槽中呈仰卧位,30 s内未能翻转身体,即翻正反射消失,记为醉酒;60 s内能连续2次翻转身体,即翻正反射恢复,记为醒酒^[11]。

2.3 攀爬实验 该实验用于评估动物的肢体肌力与协调性。急性ALD模型各组给予白酒灌胃后,立即将其放置在水平悬空的金属网中央(孔 2 $\text{mm}\times 2$ mm ,丝粗 0.35 mm),然后迅速翻转金属网,使小鼠处于倒挂状态。观察小鼠的攀附行为,并记录每组小鼠的攀附时间。以掉落3次为终止标准,计算3次攀附时间的平均值作为最终实验结果。在正式实验前1 d需要进行预训练^[12]。

2.4 爬杆实验 小鼠的肢体协调能力通过爬杆实验进行评估。急性ALD模型各组给予白酒灌胃后,立即将其头朝下放置在木杆(直径为 15 mm 、长 50 cm)的顶部,记录其爬行总时长并观察爬行过程中的运动状态。实验重复3次,将3次爬杆时间的平均值作为该只小鼠的爬行时间。同时,小鼠的行为根据以下标准进行评分:四肢并用,一次顺利从杆上爬下为0分;一步一步螺旋向下爬行但兼有后肢滑行行为的为0.5分;上杆后间歇停顿数次后爬下,但可抱紧木杆为1分;滑行后掉落为1.5分;不能抓住木杆,直接掉落为2分。正式实验前需要训练小鼠爬杆,直至小鼠习惯利用后腿抱杆向下爬行^[12]。

2.5 HE染色 取急性及慢性ALD小鼠肝脏组包埋切片后进行HE染色,于显微镜下观察肝脏组织

病理变化。

2.6 油红O染色 取急性及慢性ALD小鼠肝脏组织冰冻切片后进行油红O染色,于显微镜下评价肝脏组织脂肪累积水平。

2.7 天狼星红染色 取慢性ALD小鼠肝脏组织包埋切片后进行天狼星红染色,于显微镜下观察肝脏组织纤维化情况。

2.8 生化指标检测 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)及生化分析法检测急性及慢性ALD小鼠血清中AST、ALT、SOD、TC、TG水平;检测急性ALD小鼠血清中GSH、ADH、ALDH、MDA水平;检测慢性ALD小鼠肝脏中ROS含量;前额叶中GABA含量。

2.9 FBRP干预ALD的潜能评估 从HIT 2.0数据库(hit2.badd-cao.net)收集FBRP的候选靶标集;从人类疾病数据库(MalaCards, www.malacards.org)收集ALD相关的疾病基因集,包含5个与ALD相关的疾病词条:酒精性肝炎、酒精使用障碍、酒精依赖症、酒精性肝硬化和肝硬化,及其对应的基因集;提取FBRP已知适应证——乙型肝炎相关基因集作为阳性对照数据集。通过网络接近距离和网络扩散度2种算法,计算FBRP候选靶标集与5个ALD相关疾病基因集之间的拓扑距离,以评估FBRP干预ALD的潜能。其中,网络接近距离基于最短路径原理用于衡量背景网络中两个节点集合之间的拓扑距离($Z\text{-score}>0$ 代表2个节点集拓扑分离, $Z\text{-score}<0$ 代表2个节点集拓扑结合);网络扩散度基于网络扩散距离衡量背景网络中若干节点集合之间的拓扑距离并进行排序^[13]。

2.10 临床与动物来源的转录组学数据收集与分析 收集GEO数据库来源临床ALD患者肝脏组织的转录组学数据集:GSE28619(包含22个样本,ALD组15例,健康组7例)和GSE142530(包含28个样本,ALD组16例,健康组12例)。同时,利用急性ALD小鼠动物实验来源的肝脏和大脑前额叶组织开展转录组学检测(Illumina HiSeq 4000,北京中康博生物科技有限公司);利用DESeq2进行差异表达基因分析(筛选标准: $|\log_2FC|>1$, $P<0.05$)。通过模型组与正常组比较,获得急性ALD发病相关基因集;通过FBRP中剂量干预组与模型组比较,获得该品种缓解急性ALD的效应靶标基因集。

2.11 FBRP干预ALD多维关联网络构建与分析 通过上述临床转录组学数据分析,获得ALD发生相关基因集;结合上述HIT 2.0数据库收集所得FBRP

候选靶标集,根据基因-基因相互作用信息,构建“方药候选靶标-疾病相关基因”相互作用网络,并利用CytoHubba计算网络拓扑特征值,筛选最大团中心性、度值、中介中心性、接近中心性均大于相应中位数的靶标作为FBRP干预ALD的核心网络靶标。

2.12 免疫组化检测小鼠肝脏组织HMGB1蛋白表达 慢性ALD模型小鼠肝脏组织经固定、脱水,包埋、切片后。用柠檬酸缓冲液加热修复抗原,过氧化氢反应10 min,封闭2 h,加入一抗HMGB1(1:50),4℃孵育过夜,PBS清洗3次,加二抗室温孵育30 min,再次清洗3次,固定封片,显微镜系统进行图像观察和成像分析。

2.13 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测慢性ALD小鼠大脑前额叶组织中HMGB1和BDNF蛋白表达 检测慢性ALD小鼠大脑前额叶组织中HMGB1(1:20 000)和BDNF(1:10 000)蛋白的表达量。取材后,按试剂盒说明,提取总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度。每孔20 μg蛋白样品,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转移至PVDF膜,封闭1 h,加入一抗,4℃孵育过夜,清洗3次后加二抗(1:2 000)室温孵育30 min,曝光、显影、成像, $\beta\text{-actin}$ 作为内参(1:1 000),蛋白相对表达量使用Image J软件分析。

2.14 统计学分析 使用GraphPad Prism(v8.0.2)进行数据分析。根据正态分布检验结果,采用参数或非参数统计分析;进一步采用单因素方差分析,并进行了Tukey事后检验或Kruskal-Wallis检验的Dunn事后检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对急性ALD小鼠体质量变化的影响 急性酒精灌胃后,与正常组比较,模型组小鼠的体质量在10 d内均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,FBRP高剂量给药组的体质量在10~28 d内均明显升高($P<0.05$)。见表1。

3.2 对急性ALD小鼠的醉酒行为的影响 急性乙醇灌胃后,小鼠表现出显著的兴奋性增加和身体控制能力下降。随着灌胃剂量的增加,与模型组比较,FBRP中、高剂量给药组在1、2周的醉酒率明显降低,醒酒时间减少($P<0.05$),见表2。抓网实验结果显示,与正常组比较,模型组小鼠在4周内的抓网时间均显著下降($P<0.01$),与模型组比较,FBRP高剂量给药组在4周内的抓网时间均明显上升($P<0.05$),见表3。爬杆实验结果显示,与正常组比较,模型组小鼠在4周内的爬杆时间均明显下降($P<$

表 1 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of FBRP on body weight of acute ALD mice in different groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	体质量/g							
		第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天	第 17 天	第 21 天	第 28 天
正常组		22.40±0.90	23.00±0.74	23.46±0.87	24.00±1.02	24.05±0.83	24.30±0.97	24.40±0.90	25.01±0.79
模型组		22.70±0.75	18.90±2.36 ²⁾	19.00±2.02 ²⁾	20.50±2.53 ²⁾	21.00±2.24 ²⁾	22.20±2.11 ¹⁾	22.40±2.20 ¹⁾	22.90±2.12 ¹⁾
FBRP 低剂量组	9.6	22.70±1.05	21.40±1.46 ³⁾	21.54±1.82 ⁴⁾	21.00±2.17	22.00±1.97	23.40±1.42	23.60±1.37	23.80±1.08
FBRP 中剂量组	19.2	22.80±0.89	21.00±1.93 ³⁾	20.85±2.34 ³⁾	21.90±1.88	22.20±1.79	23.20±1.27	23.10±1.29	23.00±1.88
FBRP 高剂量组	38.4	23.00±1.05	20.40±2.11	20.57±1.84	22.40±0.93 ³⁾	22.80±0.84 ³⁾	24.30±0.89 ³⁾	24.60±0.79 ³⁾	24.70±1.18 ³⁾

注:与正常组比较 ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与模型组比较 ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01(表 2-表 8 同)

0.05),爬杆积分上升($P<0.05$);与模型组比较, 升($P<0.05$),爬杆积分下降,差异具有统计学意义
FBRP 中剂量给药组在 4 周内的爬杆时间均明显上 ($P<0.05$),见表 4。

表 2 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠醉酒率和醒酒时间的影响 ($n=10$)

Table 2 Effect of FBRP on intoxication rates and wake-up time of acute ALD mice in different groups ($n=10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	醉酒率/%				醒酒时间 min/($\bar{x}\pm s$)			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
模型组		77	54	82	91	99±72	124±76	120±62	326±120
FBRP 低剂量组	9.6	50	60	67	100	50±56	39±55 ³⁾	57±50 ³⁾	273±25
FBRP 中剂量组	19.2	20 ³⁾	20 ³⁾	60	60 ³⁾	26±52 ³⁾	12±30 ⁴⁾	99±89	170±170 ³⁾
FBRP 高剂量组	38.4	10 ⁴⁾	0 ⁴⁾	78	89	13±36 ³⁾	0±0 ⁴⁾	107±59	265±133

表 3 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组的抓网时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of FBRP on grabbing time of acute ALD mice in different groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	抓网时间/min			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
正常组		25.27±4.64	22.14±5.23	24.35±6.07	21.79±6.32
模型组		6.92±3.45 ²⁾	6.83±3.33 ²⁾	5.92±1.06 ²⁾	5.94±1.54 ²⁾
FBRP 低剂量组	9.6	9.04±3.31	9.98±2.40	7.86±1.43 ³⁾	7.30±1.92 ³⁾
FBRP 中剂量组	19.2	10.05±4.82 ³⁾	9.54±2.66	9.24±3.18 ³⁾	7.51±0.94 ³⁾
FBRP 高剂量组	38.4	10.54±4.94 ³⁾	10.17±3.08 ³⁾	9.57±3.66 ³⁾	8.40±2.11 ³⁾

表 4 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠的爬杆时间和爬杆积分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of FBRP on pole-climbing time and scores of acute ALD mice in different groups ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	爬杆时间/min				爬杆积分/分			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
正常组		4.83±2.21	4.55±1.85	6.69±2.36	6.20±2.36	0.33±0.15	0.30±0.16	0.38±0.18	0.37±0.21
模型组		3.37±0.87 ¹⁾	2.32±0.80 ²⁾	1.94±0.68 ²⁾	1.96±0.29 ²⁾	0.57±0.31 ¹⁾	0.88±0.58 ¹⁾	0.99±0.34 ²⁾	0.94±0.24 ²⁾
FBRP 低剂量组	9.6	3.31±1.08	2.18±0.77	2.12±0.81	2.25±0.59	0.44±0.44	0.83±0.47	0.86±0.32	0.64±0.32
FBRP 中剂量组	19.2	3.21±1.06	3.26±0.84 ³⁾	2.34±0.92 ³⁾	2.60±0.52 ³⁾	0.25±0.34 ³⁾	0.50±0.00 ³⁾	0.61±0.39 ³⁾	0.56±0.21 ⁴⁾
FBRP 高剂量组	38.4	3.27±1.17	3.33±0.95 ³⁾	2.68±0.62 ³⁾	2.93±0.60 ³⁾	0.20±0.24 ⁴⁾	0.39±0.21	0.47±0.27 ⁴⁾	0.53±0.27 ⁴⁾

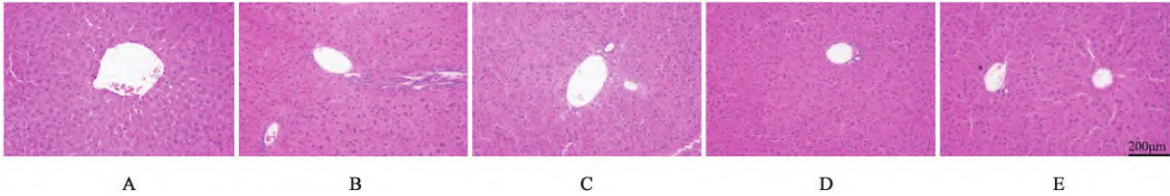
3.3 对急性 ALD 小鼠肝脏组织病理变化的影响

HE 染色结果显示,与正常组比较,正常组小鼠的肝小叶结构清晰,界板整齐,细胞核呈圆形,细胞索排列井然有序,细胞结构清晰,无泡沫状变性,肝窦

无充血现象,未见炎性细胞浸润;急性 ALD 模型组小鼠肝小叶的界线模糊,细胞索排列紊乱,出现泡沫或气球样变性且胞浆淡染,并伴有炎性细胞浸润和空泡现象,可见小泡性脂肪变性;与模型组比较,

FBRP 各剂量组均能有效改善 ALD 小鼠的肝脏组织损伤,其中,中、高剂量组小鼠的肝细胞形态结构未见明显损伤,细胞核呈圆形且排列整齐,整体染色均匀,间隙清晰,未见炎性细胞浸润,见图 1。油红

O 染色结果显示,与正常组比较,急性 ALD 模型组小鼠肝细胞内出现明显脂质沉积;与模型组比较, FBRP 各剂量组的病理改变呈剂量依赖性减轻, 见图 2。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. FBRP 低剂量组; D. FBRP 中剂量组; E. FBRP 高剂量组 (图 2 同)
图 1 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠肝脏组织病理形态学的影响 (HE, ×100)
Fig. 1 Effect of FBRP on histopathological morphology of liver tissues in acute ALD mice of different groups (HE, ×100)

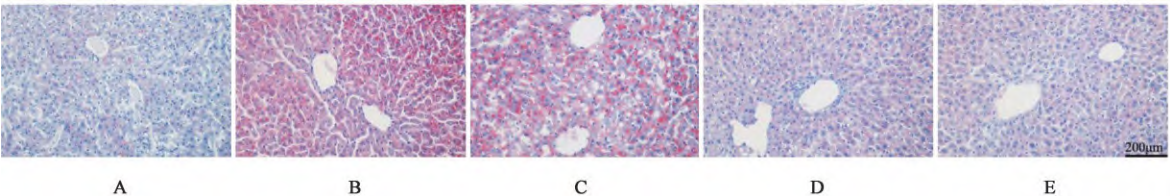


图 2 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠肝脏组织脂肪化的影响 (油红 O, ×100)
Fig. 2 Effect of FBRP on steatosis of liver tissues in acute ALD mice of different groups (oil red O, ×100)

3.4 对急性 ALD 小鼠肝脏组织炎症水平的影响
生化指标测定结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清的 TG、TC 水平均显著升高 ($P<0.01$), ADH 和 ALDH 水平均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, FBRP 各剂量给药组小鼠血清的 TG、TC 水平均显著下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$), ADH 和 ALDH 水平均明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。提示 FBRP 可以降低血脂水平, 加速乙醇代谢, 见

表 5。进一步,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织 AST、ALT、MDA 水平显著升高 ($P<0.01$), SOD、GSH 的水平显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, FBRP 中、高剂量组小鼠肝脏组织 AST、ALT、MDA 水平明显下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$), SOD、GSH 水平显著升高 ($P<0.01$)。提示 FBRP 可以减轻肝脏组织炎症, 缓解肝脏组织的氧化应激状态, 见表 6。

表 5 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠的血清 TC、TG、ADH、ALDH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

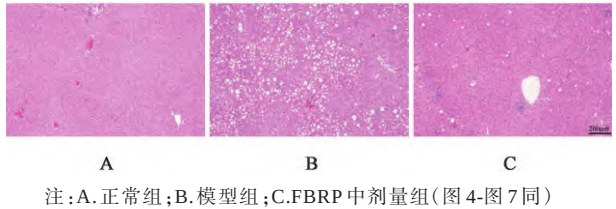
组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	ADH/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ALDH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		3.78±0.04	0.78±0.04	9.47±0.34	10.50±1.22
模型组		7.34±0.85 ²⁾	1.64±0.15 ²⁾	6.80±0.79 ²⁾	4.53±1.23 ²⁾
FBRP 低剂量组	9.6	6.12±0.60 ³⁾	1.22±0.08 ⁴⁾	7.12±0.54	8.10±1.45 ⁴⁾
FBRP 中剂量组	19.2	4.83±0.63 ⁴⁾	1.27±0.12 ⁴⁾	9.48±0.28 ⁴⁾	8.35±1.51 ⁴⁾
FBRP 高剂量组	38.4	4.29±0.24 ⁴⁾	1.19±0.21 ⁴⁾	9.51±0.59 ⁴⁾	7.00±0.62 ³⁾

表 6 FBRP 对急性 ALD 动物实验各组小鼠的肝脏组织 AST、ALT、MDA、SOD、GSH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		11.43±1.01	5.69±0.77	20.15±0.18	89.45±7.10	153.90±8.30
模型组		19.20±0.86 ²⁾	10.35±0.29 ²⁾	25.37±1.29 ²⁾	53.42±6.39 ²⁾	76.19±7.01 ²⁾
FBRP 低剂量组	9.6	15.43±0.87 ⁴⁾	8.46±0.19 ⁴⁾	23.20±2.31	81.23±3.09 ⁴⁾	110.96±15.85 ⁴⁾
FBRP 中剂量组	19.2	15.71±1.76 ⁴⁾	6.16±0.19 ⁴⁾	21.19±1.94 ³⁾	81.91±8.77 ⁴⁾	114.01±14.92 ⁴⁾
FBRP 高剂量组	38.4	15.49±1.37 ⁴⁾	6.25±0.18 ⁴⁾	19.96±0.39 ⁴⁾	81.84±9.61 ⁴⁾	141.56±12.64 ⁴⁾

3.5 对慢性ALD小鼠肝脏组织病理变化的影响

HE染色结果显示,在慢性ALD动物实验中,与正常组比较,正常组小鼠的肝组织形态正常,肝小叶结构完整,肝细胞索围绕静脉呈放射状排列,肝细胞大小均一,且有少量脂肪空泡;模型组小鼠的肝脏表现出细胞核深染,核质比增大,肝细胞大小不一致,排列紊乱,伴有大量的大脂滴和小脂滴,以及炎性细胞浸润,纤维化样变,成纤维细胞和纤维细胞增多,气球样变性和部分Mallory小体的出现。与模型组比较,经FBRP中剂量干预可显著减轻上述病理改变,见图3。天狼星红染色结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏窦周和中央静脉出现广泛纤维化;与模型组比较,经FBRP中剂量干预后,肝窦周纤维化显著减少,但中央静脉周围仍存在纤维化,见图4。油红O染色结果显示,与正常组比较,模型小鼠肝组织中有大量密集红色脂肪滴聚集,包括小脂滴和大脂滴,表现出严重的脂质沉积,大量脂质充满细胞质。与模型组比较,经FBRP中剂量干预后,红色脂滴和脂肪空泡明显减少,见图5。



注:A.正常组;B.模型组;C.FBRP中剂量组(图4-图7同)
图3 FBRP对慢性ALD动物实验各组小鼠肝脏组织病理形态学的影响(HE,×100)
Fig. 3 Effect of FBRP on histopathological morphology of liver tissues in chronic ALD mice of different groups (HE, ×100)

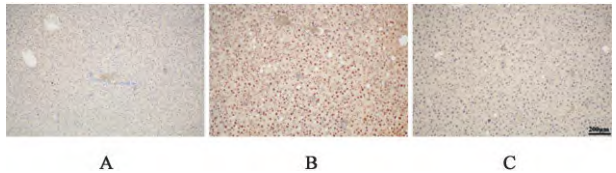


图4 FBRP对慢性ALD动物实验各组小鼠肝脏组织纤维化的影响(天狼星红,×100)
Fig. 4 Effect of FBRP on fibrosis of liver tissues in chronic ALD mice of different groups (siriusred, ×100)

表7 FBRP对慢性ALD动物实验各组小鼠的肝脏组织AST、ALT、SOD、ROS水平的影响(±s,n=5)

Table 7 Effect of FBRP on levels of AST, ALT, SOD, and ROS in liver tissues of chronic ALD mice in different groups (±s,n=5)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	ROS/U·mL ⁻¹
正常组		11.42±2.13	1.13±0.50	0.63±0.05	95.64±6.52
模型组		16.15±1.38 ¹⁾	2.80±0.81 ²⁾	0.66±0.06	112.86±7.87 ¹⁾
FBRP中剂量组	19.2	11.39±2.37 ³⁾	1.41±0.55 ³⁾	0.63±0.06	90.78±12.17 ³⁾

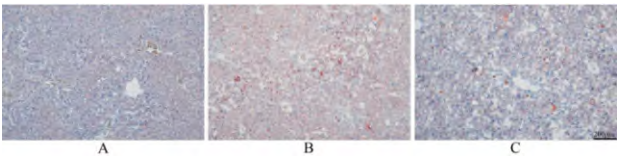


图5 FBRP对慢性ALD动物实验各组小鼠肝脏组织脂肪化的影响(油红O,×100)
Fig. 5 Effect of FBRP on steatosis of liver tissues in chronic ALD mice of different groups (oil red O, ×100)

3.6 对慢性ALD小鼠肝脏组织炎症水平的影响
生化指标检测结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织AST、ALT、ROS的水平均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,FBRP中剂量给药组小鼠肝脏组织AST、ALT、ROS的水平均明显下降($P<0.05$)。见表7。

3.7 HMGB1-BDNF 交互轴介导的肝-脑对话紊乱是FBRP缓解ALD的关键作用靶点之一 从HIT 2.0收集得到1 635个FBRP候选靶标基因;从MalaCards数据库分别收集得到38、69、61、82、34和146个酒精性肝炎、乙型肝炎、酒精使用障碍、肝硬化、酒精性肝硬化、酒精依赖症相关基因。将上述方药候选靶标基因与疾病/表型相关基因集分别映射到人类蛋白质互作网络中,并计算二者之间的网络拓扑距离。结果显示,FBRP候选靶标基因集与ALD相关症状表型(酒精性肝炎、酒精使用障碍、酒精依赖症、酒精性肝硬化和肝硬化)基因均呈现拓扑结合性(Z-score均 <0);网络扩散度计算结果显示,FBRP候选靶标基因集与酒精性肝炎相关基因集的网络扩散度最小,其与酒精使用障碍相关基因集的网络扩散度次之;提示FBRP具有干预ALD的潜能。FBRP干预ALD的潜能评估总结见增强出版附加材料。

进一步,临床转录组数据分析得到780个在ALD肝脏组织中具有差异表达特征的基因,其中,402个为上调表达基因、378个为下调表达基因。根据基因-基因间相互作用信息,构建FBRP候选靶标集-ALD差异表达基因集的相互作用网络;通过网络拓扑特征值计算,筛选出643个核心靶标。功能富集分析结果显示,其主要参与维持机体免疫-炎症

系统平衡、调节脂质代谢、内分泌及神经功能等,并显著富集于酗酒和 ALD 等疾病相关通路($P<0.05$)。ALD 会诱发严重的肝脏炎症并诱导细胞死亡,该过程与损伤相关的分子模式(DAMPs)释放有关^[14],其中 HMGB1 在此病理过程中发挥着重要作用。相应地,根据网络最短路径值计算结果可知, HMGB1 与 29 个酗酒、ALD 通路成员分子的互作路径最短(均=1)。BDNF 在神经系统中起到支持神经元存活、促进神经元生长的作用。神经元功能障碍是酗酒行为的神经生物学基础。酗酒行为与 GABA 能活性功能减退有关, GABA 是中枢神经系统中主要的抑制性神经递质^[15], BDNF 可调节 GABA 能神经元的发育、功能和突触传递,从而维持神经网络的兴奋性和抑制性平衡^[16]。HMGB1 作为炎症介质,可能通过引发炎症反应而影响 BDNF 表达和神经元功能^[17]。因此, HMGB1-BDNF 可能是 FBRP 干预 ALD 及其醉酒行为的关键分子信号轴之一。FBRP 候选靶标-ALD 相关基因的相互作用网络图见增强出版附加材料。

3.8 对慢性 ALD 小鼠肝脏及大脑前额叶组织中 HMGB1 和 BDNF 蛋白表达的影响 为验证上述科学假说,本研究利用来自 ALD 小鼠大脑前额叶和肝脏组织的转录组学数据进行目标基因表达量的统计分析。结果显示,与正常组比较,模型组小鼠大脑前额叶与肝脏组织中 BDNF mRNA 表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较, FBRP 干预则可显著回升 BDNF mRNA 的表达量($P<0.01$)。本研究同时检测了慢性 ALD 肝脏组织中 HMGB1 蛋白的表达量。免疫组化结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脏组织中 HMGB1 蛋白的表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较, FBRP 中剂量组 HMGB1 蛋白表达量明显降低($P<0.05$), 见图 6、表 8。

表 8 FBRP 对慢性 ALD 小鼠肝脏及大脑前额叶组织中 HMGB1、BDNF、GABA 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 8 Effect of FBRP on HMGB1, BDNF and GABA in liver and prefrontal cortex tissue tissues of chronic ALD mice in different groups ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肝脏组织 BDNF mRNA	大脑前额叶 BDNF mRNA	肝脏组织 HMGB1	大脑前额叶 BDNF/ β -actin	大脑前额叶 HMGB1/ β -actin	大脑前额叶 GABA/nmol·L ⁻¹
正常组		3 438.75±326.49	113.60±27.49	0.63±0.47	0.92±0.02	0.31±0.03	763.80±39.39
模型组		2 303.00±177.46 ²⁾	63.20±16.33 ²⁾	5.43±0.19 ²⁾	0.17±0.03 ²⁾	1.15±0.06 ²⁾	685.55±40.66 ¹⁾
FBRP 中剂量组	19.2	2 841.67±198.15 ⁴⁾	190.60±45.55 ⁴⁾	2.20±0.70 ³⁾	0.85±0.07 ⁴⁾	0.87±0.02 ³⁾	845.97±43.94 ⁴⁾

4 讨论

ALD 通过引起肝脏炎症、肝细胞坏死、肝纤维化和肝硬化,而增加肝癌和代谢紊乱的风险,目前

Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组小鼠大脑前额叶中 HMGB1 蛋白表达量明显升高($P<0.05$), BDNF 蛋白表达量明显降低($P<0.05$);与模型组比较, FBRP 中剂量组 HMGB1 蛋白表达量明显降低($P<0.05$), BDNF 蛋白表达量明显升高($P<0.05$), 见图 7、表 8。进一步,通过检测慢性 ALD 大鼠大脑前额叶的 GABA 含量显示,与正常组比较,模型组大鼠前额叶组织中 GABA 释放量明显下降($P<0.05$);与模型组比较, FBRP 中剂量组 GABA 释放量明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 8。

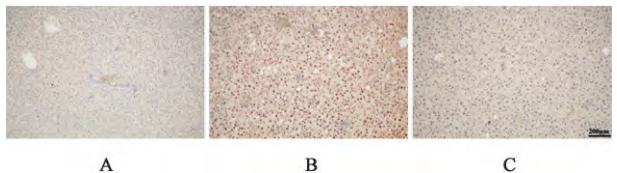


图 6 FBRP 对慢性 ALD 小鼠肝脏组织中 HMGB1 蛋白表达量的影响 (倒置显微镜, ×200)

Fig. 6 Effect of FBRP on HMGB1 protein expression in liver tissues of chronic ALD mice in different groups (inverted microscope, ×200)

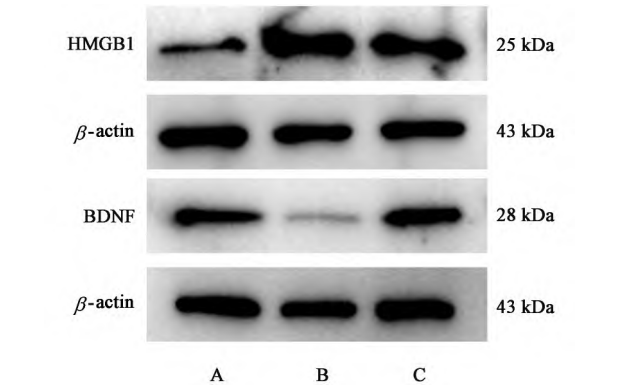


图 7 小鼠大脑前额叶组织中 HMGB1 和 BDNF 蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of FBRP on HMGB1 and BDNF protein expression in prefrontal lobe tissues of mice

食品药品监督管理局(FDA)尚无针对 ALD 治疗的特效药物^[18]。因此,开发针对 ALD 的新型治疗药物具有重要的临床意义。中成药 FBRP 由鳖甲(制)、

莪术、赤芍、当归、三七、党参、黄芪、紫河车、冬虫夏草、板蓝根、连翘组成,具有软坚散结,化瘀解毒,益气养血等功效,并在ALD的临床用治中展现出一定潜力^[9-10]。本研究利用急、慢性ALD小鼠模型,通过系统且客观的药效学表征,证实了FBRP可以显著缓解急、慢性ALD小鼠的醉酒行为,并有效减轻其肝脏组织的损伤程度、炎症水平和脂质变性;进一步,通过临床层面转录组学检测、关联网络挖掘和实验验证,明确了HMGB1-BDNF信号轴所介导的肝-脑对话紊乱是FBRP干预ALD的关键网络靶标之一,即FBRP可通过抑制HMGB1介导的肝脏与大脑炎症反应,增加大脑前额叶中BDNF的表达,促进GABA的释放,从而缓解ALD的病情进展和醉酒行为。

ALD患者通常表现出全身性炎症反应,肝脏和肠道的炎症反应亦可能引发脑部小胶质细胞和星形胶质细胞等脑细胞的炎症反应,进而影响神经递质的释放^[19-20],即炎症介导的神经递质释放紊乱可能会诱发酒精依赖。作为一种炎症介质,HMGB1在ALD患者的肝脏组织中显著升高,是肝脏和肠道炎症的核心诱导因子之一^[21]。该分子能够穿过血脑屏障,激活小胶质细胞和星形胶质细胞,进而加剧神经炎症反应,影响GABA和多巴胺等神经递质的释放。健康个体饮酒时,乙醇通过刺激多巴胺的释放产生愉悦感。然而,随着乙醇摄入的增加,多巴胺活动在脑边缘系统中逐渐下调,这一变化增加了乙醇依赖的风险^[22]。长期饮酒会导致GABA受体的脱敏,使得患者对乙醇的耐受性增加,从而需要摄入更多的乙醇来获得相同的效果^[23]。这种耐受性的增加主要通过影响脑边缘系统中的神经递质介导,大脑前额叶皮层在这一过程中发挥着关键作用。作为调控认知行为的重要区域,长期饮酒会导致大脑前额叶皮层的功能异常,影响决策能力和自我控制能力,增加对乙醇的依赖。此外,大脑前额叶皮层的神经适应性变化会加剧乙醇依赖和戒断症状,患者往往需要进一步摄入乙醇来缓解不适^[18]。

综上所述,本研究明确了FBRP可通过调节HMGB1-BDNF互作轴所介导的肝-脑对话紊乱而缓解ALD的关键病理环节,为该中成药品种临床用治ALD提供了初步的实验证据,也为开发ALD治疗新药提供新的研究思路。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

[1] 亓照耀,许源慧,刘金存,等.肉苁蓉苯乙醇苷对ALD

小鼠肠道黏膜屏障和肠道菌群的影响[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(9):65-73.

[2] WU M, QIN S, TAN C, et al. Estimated projection of incidence and mortality of alcohol-related liver disease in China from 2022 to 2040: A modeling study [J]. BMC Med, 2023, 21(1):277.

[3] MACKOWIAK B, FU Y, MACCIONI L, et al. Alcohol-associated liver disease [J]. J Clin Invest, 2024, 134(3):e176345.

[4] SINGAL A K, LOUVET A, SHAH V H, et al. Grand rounds: Alcoholic hepatitis [J]. J Hepatol, 2018, 69(2):534-543.

[5] SINGAL A K, BATALLER R, AHN J, et al. ACG clinical guideline: Alcoholic liver disease [J]. Am J Gastroenterol, 2018, 113(2):175-194.

[6] 唐银佩,朱正望,王兵,等.中医药调控肠道菌群治疗代谢相关脂肪性肝病的机制[J].中国实验方剂学杂志,2024,doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240826.

[7] 伏秀,马佳怡,朱思婷,等.中药解酒机制研究进展[J].吉林医药学院学报,2023,44(6):458-461.

[8] LIU Y, MAO X, MA Z, et al. Aberrant regulation of lncRNA TUG1-microRNA-328-3p-SRSF9 mRNA axis in hepatocellular carcinoma: A promising target for prognosis and therapy [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1):36.

[9] 李丰衣,孙劲晖,田德禄,等.复方鳖甲软肝片抑制大鼠酒精性肝纤维化作用机制研究[J].中国中医药信息杂志,2009,16(5):26-28.

[10] 阚兴.培土益肝汤联合复方鳖甲软肝片与水飞蓟宾治疗肝郁脾虚型代偿期酒精性肝硬化随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2016,30(7):47-49.

[11] 卢中明,许欣,杜礼泉,等.白酒醉酒度实验动物评价方法优化的研究[J].酿酒,2021,48(1):32-36.

[12] 罗丹,李媛媛,秦雪梅,等.黄芩叶总提取物对急性醉酒小鼠的解酒护肝作用[J].山西医科大学学报,2022,53(2):182-191.

[13] MORSELLI GYSI D, DO V Í, ZITNIK M, et al. Network medicine framework for identifying drug-repurposing opportunities for COVID-19 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(19):e2025581118.

[14] GAO B, AHMAD M F, NAGY L E, et al. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis [J]. J Hepatol, 2019, 70(2):249-259.

[15] SHERIF F M, TAWATI A M, AHMED S S, et al. Basic aspects of GABA-transmission in alcoholism, with particular reference to GABA-transaminase [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 1997, 7(1):1-7.

[16] TOMODA T, SUMITOMO A, SHUKLA R, et al.

- BDNF controls GABA_AR trafficking and related cognitive processes via autophagic regulation of p62 [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2022, 47 (2) : 553-563.
- [17] FRANK M G, WEBER M D, WATKINS L R, et al. Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48:1-7.
- [18] DOYLE M A, TAYLOR A, WINDER D G. Neural circuitries and alcohol use disorder: Cutting corners in the cycle [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2023, doi: 10.1007/7854_2023_454.
- [19] CRABB D W, IM G Y, SZABO G, et al. Diagnosis and treatment of alcohol-associated liver diseases: 2019 practice guidance from the American association for the study of liver diseases [J]. *Hepatology*, 2020, 71 (1):306-333.
- [20] SEITZ H K, STICKEL F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress [J]. *Biol Chem*, 2006, 387 (4):349-360.
- [21] LI J, WANG Z, LI J, et al. HMGB1: A new target for ischemic stroke and hemorrhagic transformation [J]. *Transl Stroke Res*, 2024, doi: 10.1007/s12975-024-01258-5.
- [22] HILLMER A T, MASON G F, FUCITO L M, et al. How imaging glutamate, γ -aminobutyric acid, and dopamine can inform the clinical treatment of alcohol dependence and withdrawal [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2015, 39(12):2268-2282.
- [23] OLSEN RW, LIANG J. Role of GABA_A receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1):45.

[责任编辑 孙丛丛]