

李宏睿,张德琴,金晓蕾,等. 营养性肥胖大鼠模型肠道菌群的微生物多样性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 1-9.

Li HR, Zhang DQ, Jin XL, et al. Analysis of intestinal microbiota diversity in nutritional obesity rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.001

营养性肥胖大鼠模型肠道菌群的微生物多样性分析

李宏睿^{1#}, 张德琴^{2#}, 金晓蕾¹, 唐 骁¹, 王大文¹, 高 雪¹, 辛鹏飞¹, 何进程¹,
麻富斌¹, 周彩云¹, 孙晓玮^{1*}, 张建刚^{1*}

(1. 兰州大学基础医学院病理学研究所, 兰州 730000; 2. 山丹县人民医院内科, 甘肃 山丹 734100)

【摘要】 目的 肠道菌群与营养性肥胖关系密切,但多数研究集中在大肠粪菌,小肠作为吸收的主要场所,其菌群还缺乏研究,本文通过微生物多样性分析,探索回肠与结肠菌群差异及营养性肥胖相关菌群。**方法** 混合喂养法建立营养性肥胖 SD 大鼠模型,chow 继续喂养 60 d 消除 HFD 的影响,提取回肠、结肠内容物总 DNA,PCR 扩增 16S rRNA 基因 V3+V4 区并测序,建立 OTUs,通过 Silva 数据库进行注释和分类学分析。**结果** (1)alpha 分析显示回肠菌群数量高于结肠(chao1、ace),而多样性低于结肠(simpson、shannon)($P < 0.05$);(2)beta 分析显示回肠与结肠以及回肠样本间物种相似度较低;(3)OTUs 注释及聚类分析显示回肠与结肠优势菌(丰度排名 top 10)的类型和丰度分布重叠性较低(属水平);(4)HFD-OR 大鼠回肠 *Rothia* 丰度增加,而 *Romboutsia* 丰度降低。**结论** 回肠与结肠具有不同的菌群多样性;*Rothia* 菌和 *Romboutsia* 菌可能是参与肥胖发生的关键回肠菌群。

【关键词】 营养性肥胖大鼠模型;微生物多样性;肠道菌群;回肠;结肠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0001-09

Analysis of intestinal microbiota diversity in nutritional obesity rats

LI Hongrui^{1#}, ZHANG Deqin^{2#}, JIN Xiaolei¹, TANG Xiao¹, WANG Dawen¹, GAO Xue¹, XIN Pengfei¹,
HE Jincheng¹, MA Fubin¹, ZHOU Caiyun¹, SUN Xiaowei^{1*}, ZHANG Jiangan^{1*}

(1. Pathology Department, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China.

2. Department of Internal Medicine, Shandan County People's Hospital, Shandan 734100)

【Abstract】 Objective The intestinal flora is closely related to nutritional obesity. Most of the previous research has focused on the fecal flora of the large intestine, with very few studies on the flora of the small intestine, which is the main site of absorption. We aimed to investigate the differences in bacterial flora between the colon and the ileum in a rat model of nutritional obesity using microbial diversity analysis. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were fed with a high-fat diet (HFD) mixed with chow for 60 days to establish a nutritional obesity model, then fed with chow for another 60 days to eliminate the influence of the HFD. Total DNA was extracted from the contents of the ileum and colon and used as template for amplification of the V3 + V4 region of the 16S rRNA gene by PCR, then sequenced to establish operational taxonomic units (OTUs). Annotation and taxonomic analysis were performed against the Silva database. **Results** (1) Alpha

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81670776);国家级大学生创新创业训练计划项目(201910730204)。

【作者简介】 李宏睿(1997—),女,本科生,研究方向:肠道菌群及粪菌移植。E-mail: lhr106@icloud.com

张德琴(1973—),女,副主任医师,研究方向:代谢性疾病。E-mail: pathozjg@126.com #共同第一作者

【通信作者】 孙晓玮(1971—),女,副教授,博士,研究方向:分子遗传学。E-mail: sunxw@lzu.edu.cn

张建刚(1974—),男,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:营养性肥胖、代谢及肿瘤病理学。E-mail: zhjg@lzu.edu.cn

* 共同通信作者

analysis showed that the number of intestinal flora was higher than that of colon (chao1, abundance-based coverage estimator), but the diversity was lower than that of the colon (simpson's Index, shannon function) ($P < 0.05$); (2) Beta analysis showed that the species similarity between the ileum and colon + ileum samples was low; (3) OTU annotation and cluster analysis showed that there were obvious differences in the types and species abundance distributions of dominant bacteria (top 10 in abundance) in the ileum and colon, with low overlap at the genus level; (4) The abundance of *Rothia* in the ileum of HFD-obesity resistant rats increased significantly, while that of *Romboutsia* decreased. **Conclusions** The ileum and colon had different levels of diversity in intestinal flora in rats with nutritional obesity. *Rothia* and *Romboutsia* may be the key ileum flora involved in obesity.

【Keywords】 nutritional obesity rat model; diversity; intestinal microbiota; ileum; colon

随着生活水平的提高,超重和肥胖的人数迅速增加,肥胖症已成为健康的主要危险因素之一。能量摄入过多是肥胖发生的主要原因,作为能量物质最终进入机体内环境(吸收)的门户和屏障,小肠具有重要的研究价值^[1]。越来越多的证据表明肠道菌群参与营养性肥胖的发生^[2-5]。人的肠道内有大约 10 万亿个细菌,大多分布于结肠,由于样本主要从粪便中获得,目前大多数研究实际为结肠菌群研究^[6-8],然而结肠粪菌是否能够反映小肠的菌群特征,反映与吸收功能及营养性肥胖的确切关系,尚缺乏研究。结肠和小肠菌群差异是营养性肥胖发生的肠道菌群机制研究要解决的关键科学问题^[9]。

本文基于前期建立的营养性肥胖大鼠模型,通过 16S rRNA 测序,对高脂膳食性大鼠模型回肠和结肠内菌群的微生物多样性进行分析,以明确小肠和结肠菌群的分布特点及其与营养性肥胖发生的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 43 只,4~5 周龄,体重(52.32±8.48) g,购于兰州大学实验动物中心 [SCXK(甘)2018-0002]。按照实验要求,为模拟自然状态,所有动物在兰州大学病理学研究所动物实验室普通环境下单笼饲养 [SYXK(甘)2018-0002],自由进食水。动物实验符合国家实验动物福利相关规定,并获得兰州大学医学伦理委员会批准(jcyxy20190302),实验过程严格按照《实验动物管理与使用指南》进行,严格遵守动物使用的“3R”原则,实验过程给予大鼠以人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

高脂饲料按照猪油(lard):蛋黄粉(egg yolk powder):基础饲料(chow powder):蔗糖(sugar)=1:

1:1.5:0.4 配制^[10],能量 5.58 kcal/g。猪油从市场购买,新鲜炼制;蛋黄粉购自北京金健力蛋粉厂(蛋白质 31.6%,脂肪 55.1%,碳水化合物 5.3%,巴氏灭菌);SPF 级基础饲料(能量 3.16 kcal/g)购自北京科澳协力有限公司,⁶⁰Co 灭菌;蔗糖从市场购买。NucleoSpin 96 SoI DNA 提取试剂盒,德国 Macherey Nagel 公司;KOD FX Neo DNA 聚合酶,日本 Toyobo 公司;Phusion DNA 聚合酶,美国 NEB 公司;DNA 纯化柱,美国 Omega Biotek 公司;Monarch DNA 胶回收试剂盒,美国 NEB 公司。ZK-26/100 型真空泵,杭州米欧仪器有限公司;SynergyHTX 型酶标仪,美国 Gene 公司;高速离心机,美国 Eppendorf 公司;9902 型 PCR 仪,美国 Allen Bradley 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及营养性肥胖大鼠模型建立

动物按体重随机分为普通饲料组(chow group, $n=10$),高脂饲料组(high fat diet, HFD group, $n=33$),适应性喂养 10 d 后,进行混合喂养^[10],高脂饲料组同时饲喂高脂饲料和普通饲料,普通组单纯饲喂普通饲料,建立营养性肥胖模型。混合喂养 60 d,分别以各组前 15%为肥胖倾向(>对照组平均体重 20%, obese prone, HFD-OP, $n=5$),以后 15%为肥胖抵抗(obesity resistance, HFD-OR, $n=5$),再以普通饲料继续喂养 60 d,去除 HFD 食物本身诱导对肠道菌群的影响^[11-13]。

1.3.2 肠道内容物收集

动物麻醉后皮肤消毒,无菌条件下开腹,门静脉采血处死动物,提取回肠及结肠,分离内容物,并立即于冰上分装至 2 mL 无菌 EP 管中,每管样品量 0.5~2.0 g,液氮速冻,-80℃保存备检。

1.3.3 微生物多样性分析

利用 Illumina 测序平台(百迈客生物科技公司,北京),采用 Illumina HiSeq 2500 双末端测序(paired-end)检测微生物多样性,测序长度 350 bp~

450 bp。

PCR 扩增及测序文库构建:提取菌群总 DNA, 根据保守区设计细菌 16S rRNA 基因 V3+V4 区引物, 引物序列如下: 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCA-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。引物末端加 barcode, 对目标区域 PCR 扩增, 扩增程序如下: 95°C 5 min→95°C 30 s→50°C 30 s→72°C 40 s 25 cycles→72°C 7 min→4°C。扩增产物经纯化、定量和均一化, 形成测序文库。

测序: PCR 扩增产物质检后制备 flow cell 芯片, Illumina HiSeq 2500 双端测序, 得到原始图像数据文件, 经碱基识别 (base calling) 分析转化为原始测序序列 (sequenced reads)。

数据预处理: 根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将 Illumina 测序得到的双端序列数据拼接 (FLASH, v. 1. 2. 11, JHU Center for Computational Biology)^[14], 将拼接得到的序列进行质量过滤 (Trimmomatic, v. 0. 33, USADELLAB.org)^[15], 去除嵌合体 (UCHIME, v. 4. 2, USEARCH 11)^[16], 成一条序列 tags。

OTUs (operational taxonomic units) 分析: 对测序数据进行质量评估, 使用 Usearch 软件 (v. 10. 0)^[17] 对 tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类, 获得 OTU, 一个 OTU 代表一个物种。使用 Mothur 软件 (version v. 1. 30, <http://mothur.org/>), 对各个样品的 alpha 多样性指数进行评估, 使用 QIIME 软件 (v2. 2, SCIKIT-BIO, <http://qiime.org/>) 进行 beta 多样性分析, 比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度。

物种注释及分类学分析: 将 OTU 的代表序列与 Silva 微生物参考数据库 (v. 128, <http://www.arb-silva.de>)^[18] 进行比对, 得到每个 OTU 对应的物种分类信息, 应用 RDP Classifier (v2. 2, QIIME)^[19] 对 OTU 进行分类学注释。进而在门、纲、目、科、属、种 (phylum, class, order, family, genus, species) 各水

平统计各样品群落组成, 利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表, R 语言绘制群落结构图。

1.4 统计学方法

数据用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计分析采用 SPSS 19.0 (IBM, USA) 进行。两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间均数比较采用 One way-ANOVA, 回肠与结肠 OTU 数的比较采用配对样本 *T* 检验, alpha 多样性指数不同饲料、体重、部位之间的交互作用采用多元多因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 营养性肥胖模型

建模 60 d, 普通饲料组体重为 (326. 51±29. 29) g, 高脂饲料组体重为 (355. 99±36. 33) g ($P < 0.05$)。高脂饲料组 15% 个体体重 (HFD-OP) > 对照组平均体重 20% (5/33), 与普通饲料组及相应 15% 低体重 (HFD-OR) (5/33) 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), HFD-OR 与普通饲料组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

24 h 初始进食量普通饲料组为 (9. 23±2. 01) g, 高脂饲料组为 (9. 10±1. 71) g, 差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。建模期间, 普通饲料组进食量为 (980. 00±53. 43) g (普通饲料), 高脂饲料组进行混合喂养, 其中高脂饲料的进食量为 (630. 70±90. 61) g, 普通饲料的进食量为 (337. 88±82. 34) g, 高脂饲料与普通饲料的比值为 (2. 02±0. 72) : 1, 提示实验动物更偏好高脂饲料。

HFD-OP 大鼠在高脂饲料、普通饲料的进食量以及对食物的偏好与 HFD-OR 大鼠无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 低能量膳食对营养性肥胖的影响

经普通饲料继续喂养 60 d, OP 大鼠的体重仍然显著高于 OR 与普通饲料组, 其肾周及睾周脂肪质量也显著高于其它组, $P < 0.05$, 见表 2。

表 1 普通饲料组与高脂饲料组大鼠体重及摄食情况 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Body weight and food intake of rats in chow group and HFD group

组别 Groups	数量 Number	体重 (g) Body weight	高脂饲料 (g) HFD	普通饲料 (g) Chow	高脂饲料: 普通饲料 HFD: Chow
普通饲料组 Chow group	10	326. 51 ± 29. 29	\	980. 00 ± 53. 43 **	\
高脂饲料肥胖抵抗 HFD-OR group	5	302. 67 ± 24. 12	645. 20 ± 93. 94	294. 00 ± 39. 12	2. 23 ± 0. 49
高脂饲料肥胖倾向 HFD-OP group	5	411. 87 ± 30. 29 *	704. 40 ± 148. 82	340. 00 ± 123. 90	2. 37 ± 1. 08

注: 与普通饲料组及高脂饲料肥胖抵抗组比较, * $P < 0.05$; 与高脂饲料肥胖抵抗组及肥胖倾向组相比, ** $P < 0.05$ 。

Note. Compared with chow group and HFD-OR group, * $P < 0.05$. Compared with HFD-OR group and HFD-OP group, ** $P < 0.05$.

2.3 肠道菌群多样性分析

提取肠内容物总 DNA, 样品质量符合测序要求, 利用 Illumina 测序平台对样品 DNA 进行扩增、测序, 得到 2489179 个 PE reads, 经质量过滤后共得到 2208772 个 clean tags。各样品 GC 含量为 (54.21 ± 0.97)%, Q30 达到 (93.96 ± 1.61)%。测序长度在 406~420 bp 之间。

OTU 分析: OTU 数反映菌群的多样性。使用 Usearch 软件对 tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类、获得 OTU。经过 60 d 的饲料均一化干预, 高脂饲料组回肠 OTU 数与普通饲料组无明显差异, 但结肠 OTU 数显著降低, 表明高脂膳食引起大鼠结肠微生物丰度下降, 见表 3。

不同体重回肠与结肠 OTU 数无显著性差异, 见表 4。

Alpha 多样性分析回肠、结肠菌群的 OTU, 获得

ace、chao1、simpson、shannon 指数, 多元多因素方差分析显示, 体重、饲料、部位因素之间无交互作用 ($P > 0.05$, 数据未提供), 饲料与体重对 alpha 多样性指标无明显影响 ($P > 0.05$, 数据未提供), 但回肠与结肠间 alpha 多样性差异具有统计学意义, 回肠菌群的 chao1、ace 指数均显著高于结肠, 表明回肠菌群中细菌数量 (丰度) 远高于结肠, 而多样性低于结肠 (simpson、shannon) ($P < 0.05$) (表 5)。Venn 图显示, 除普通饲料回肠外, 其余组内各样品间 OTU 具有较大的重叠性, 图 1。

2.4 回肠与结肠菌群 beta 多样性分析

应用非加权 Binary_Jaccard 距离算法比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度, UPGMA 聚类树图显示样品间菌群结构相似, 但回肠与结肠样品间的相似度较低 (图 2)。

表 2 低能量膳食对营养性肥胖大鼠体重及内脏脂肪的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of low energy diet on body weight and visceral fat of nutritional obese rats

组别 Groups	数量 Number	体重 (g) Body weight	肾周脂肪 (g) Perinephric fat pad	睾周脂肪 (g) Epididymal fat pad
普通饲料组 Chow group	10	351.50 ± 42.05	7.85 ± 1.73	6.75 ± 0.76
高脂饲料肥胖抵抗 HFD-OR group	5	338.30 ± 24.49	10.14 ± 4.12	8.27 ± 1.83
高脂饲料肥胖倾向 HFD-OP group	5	400.50 ± 15.89*	14.69 ± 2.24*	9.16 ± 1.15*

注: 与普通饲料组及高脂饲料肥胖抵抗组比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with chow group and HFD-OR group, * $P < 0.05$.

表 3 普通饲料组及高脂饲料组回肠、结肠菌群 OTU 数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of OTUs in ileum and colon of chow group and HFD group

组别 Groups	数量 Number	回肠 Ileum	结肠 Colon	回肠/结肠 Ileum/Colon	相关性 Correlations
普通饲料组 Chow group	6	490.00 ± 268.20	430.50 ± 31.97	1.18 ± 0.73	-0.77
高脂饲料组 HFD group	10	641.50 ± 261.79	393.60 ± 31.46**	1.64 ± 0.68	0.07

注: 与普通饲料组比较, * $P < 0.05$; 与自身回肠配对比较, ** $P < 0.05$ 。

Note. Compared with chow group, * $P < 0.05$. Paired comparison with self ileum, ** $P < 0.05$.

表 4 不同体重大鼠回肠、结肠菌群 OTU 数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of OTUs in ileum and colon of rats with different weights

组别 Groups	数量 Number	回肠 Ileum	结肠 Colon	相关性 Correlations
普通饲料肥胖抵抗 Chow-OR	3	543.00 ± 303.76	410.00 ± 34.70	-1.00
普通饲料肥胖倾向 Chow-OP	3	437.00 ± 281.30	451.00 ± 9.54	-0.99
高脂饲料肥胖抵抗 HFD-OR	5	624.80 ± 251.97	403.40 ± 20.11*	0.28
高脂饲料肥胖倾向 HFD-OP	5	658.20 ± 300.03	383.80 ± 39.78*	0.02

注: 与普通饲料组肥胖倾向比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with chow-OP group, * $P < 0.05$.

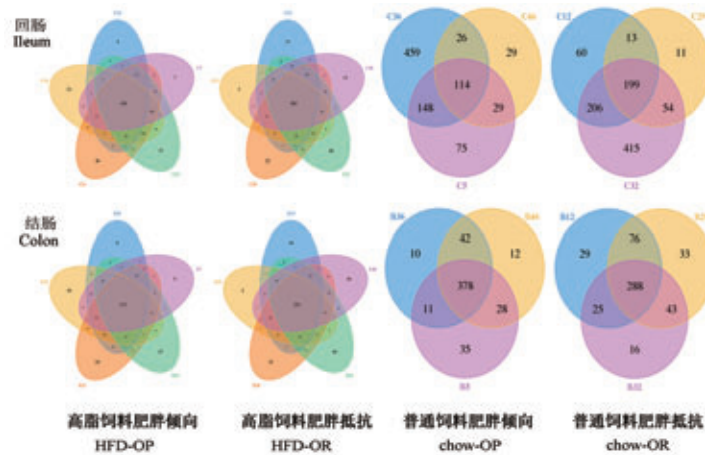
表 5 回肠、结肠菌群 alpha 多样性指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of alpha diversity index in ileum and colon microbiota

组别 Groups	数量 Number	OTU	Ace	Chao1	Simpson	Shannon
回肠 Ileum	16	584.69 ± 266.15	710.73 ± 205.64	675.51 ± 221.50	0.29 ± 0.26	2.88 ± 1.73
结肠 Colon	16	407.44 ± 35.71*	444.35 ± 29.52*	457.89 ± 35.93*	0.07 ± 0.05*	3.96 ± 0.39*

注: 与回肠比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with ileum, * $P < 0.05$.



注:除普通饲料回肠,各组个体间共有的 OTU 数显著高于个体特有的 OTU 数。

图 1 回肠、结肠细菌 OTU 的 Venn 图

Note. Except for chow-ileum, the number of Common OTUs in each group was significantly higher than that of individual's specific OTUs.

Figure 1 Venn diagram of OTU in ileum and colon

进一步采用非度量多维标度 (nonmetric multidimensional scaling, NMDS)、主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 和主成分分析 (principal component analysis, PCA), 对肠道微生物群落结构的变化进行分析, 如图 3 所示, 结肠样本间菌群组成显示出明显的相似性, 而回肠与结肠以及回肠样本间相似度较低。

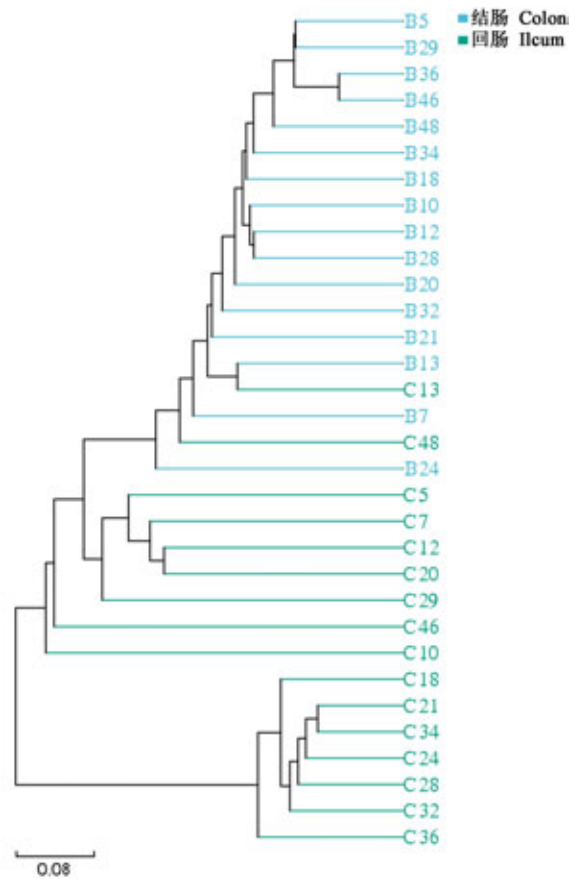
2.5 物种注释及分类学分析

将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库 Silva 进行比对, 得到每个 OTU 对应的物种分类信息。结果显示, 在属水平上, 回肠与结肠优势菌 (丰度排名 top 10) 存在比较大的差异, 回肠内的主要优势菌为 *Romboutsia*、*Turicibacter*、*Rothia*、*Lachnospiraceae*、*Streptococcus*、*Candidatus_Arthromitus*、*Helicobacter*、*Lactobacillus* 等, 而结肠的主要优势菌为 *Lachnospiraceae*、*Treponema*、*Akkermansia*、*Candidatus_Saccharimonas*、*Ruminococcaceae*、*Romboutsia* 等, 两者优势菌的重叠程度较低, 见图 4、图 5。

HFD 大鼠回肠 *Turicibacter* 低于普通饲料组, 而结肠内的 *Treponema*、*Candidatus_saccharimonas* 低于普通饲料组, 证明高脂膳食对回肠和结肠菌群的影响不同, 并且这种影响具有持久性。

回肠是营养物质吸收的主要部位, HFD-OR 大鼠回肠内 *Rothia* 菌丰度明显增加, 而 *Romboutsia* 菌丰度降低, 提示 *Rothia* 菌和 *Romboutsia* 菌可能参与回肠吸收的调节作用。此外, HFD-OR 结肠内 *Ruminococcaceae_UCG-005* 显著增加。

聚类分析热图显示 HFD-OP 大鼠回肠与结肠内



注: B: 结肠; C: 回肠。

图 2 UPGMA 聚类树图显示回肠、结肠细菌结构特征

Note. B, Colon. C, Ileum.

Figure 2 UPGMA cluster tree showed the structural characteristics of ileum and colon microbiota

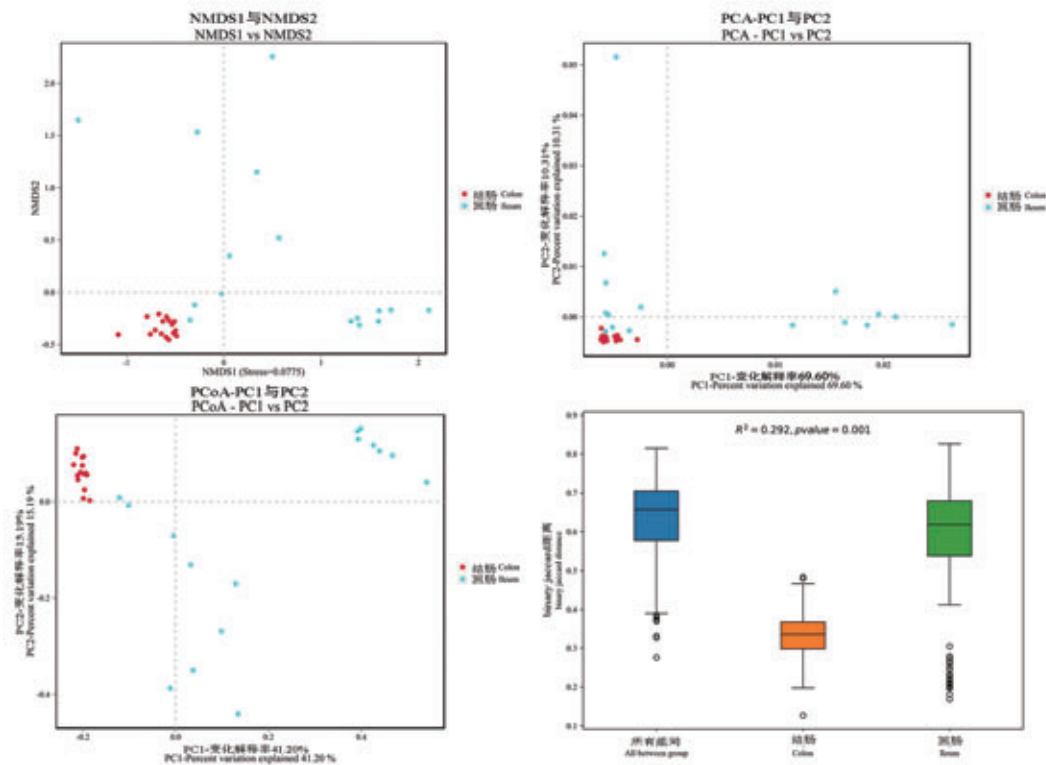


图 3 NMDS、PCA、PCoA 分析法显示回肠、结肠细菌结构特征

Figure 3 NMDS, PCA and PCoA analyses showed the structural characteristics of ileum and colon microbiota

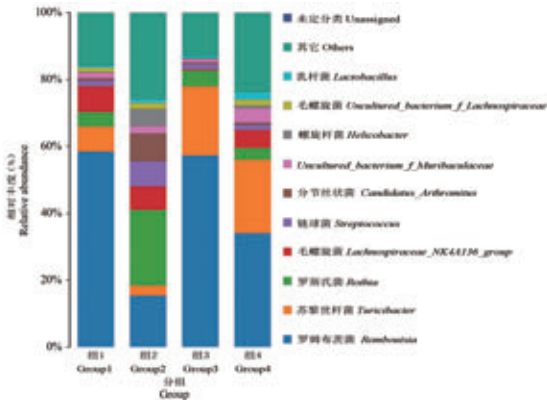


图 4 回肠内细菌相对丰度和物种注释(属水平)

Figure 4 Relative abundance and bacteria annotation in ileum (genus level)

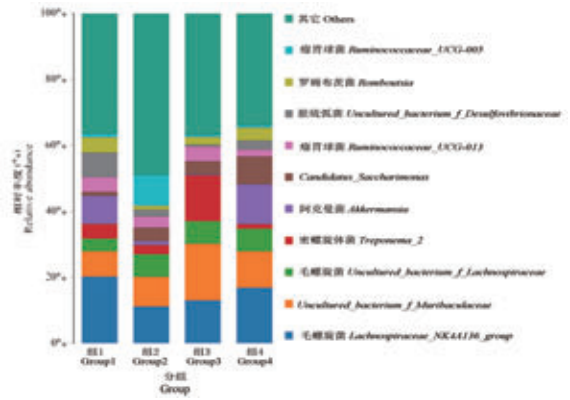


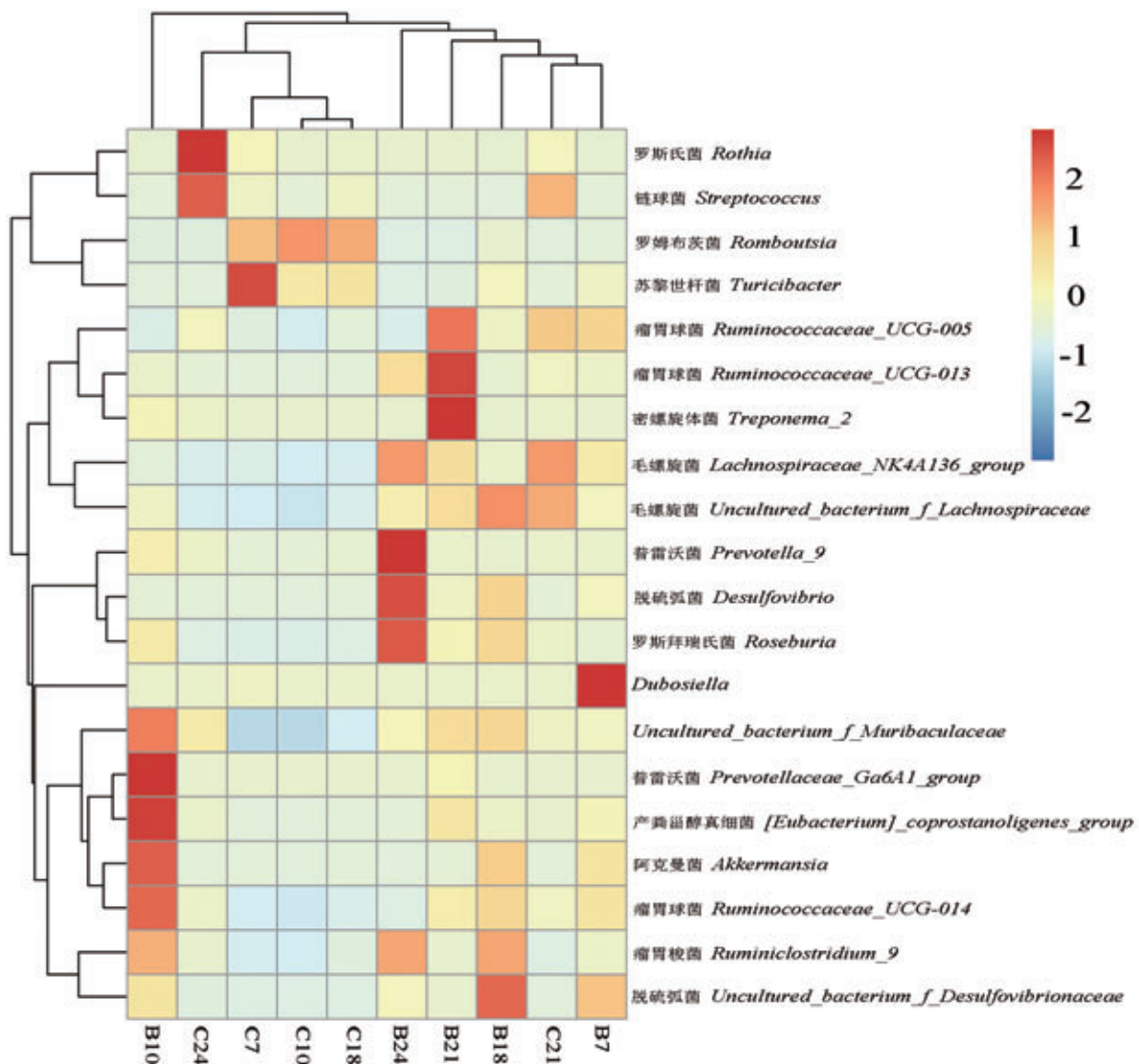
图 5 结肠内菌群相对丰度和物种注释(属水平)

Figure 5 Relative abundance and bacteria annotation in colon (genus level)

菌群类型的差异, HFD-OP 大鼠回肠内 *Lachnospiraceae*、*Candidatus_Arthromitus*、*Helicobacter*、*Lactobacillus* 较其它处理组丰度低, 而 *Turicibacter*、*Romboutsia*、*Streptococcus*、*Rothia* 的丰度较高。与其它各组相比, 结肠内菌群除与其它各组相同的优势菌群外, *Prevotella_9*、*Prevotellaceae_Ga6A1_group* 丰度较高, 而 *Candidatus_Saccharimonas*、*Lactobacillus*、*uncultured_bacterium_f_Ruminococcaceae* 丰度较低, 图 6。

3 讨论

营养性肥胖是一种严重威胁人类健康的全球公共卫生问题, 肠道作为能量物质最终进入机体内部环境的门户和屏障, 其内大量定居的菌群被认为在肥胖的发生中发挥着重要作用^[20]。肠道菌群作为机体重要的共生生命, 与食物成分及消化道的功能相互协同, 形成一个微生态系统, 在消化、营养、免疫等方面发挥重要生理功能, 若其构成改变也会导



注: B: 结肠; C: 回肠。

图 6 HFD-OP 回肠、结肠内细菌物种丰度聚类热图(属水平)

Note. B, Colon. C, Ileum.

Figure 6 The cluster heat map of bacterial species abundance in the ileum and colon of HFD-OP rats (genus level)

致心、脑等器官发生多种严重疾病^[21-23]。哺乳动物肠道微生物数量存在纵向变化,例如在人的消化道内,细菌数量呈指数级增长^[24],胃、小肠近端、回肠、结肠中每毫升内容物的细菌数量分别为 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^3 \sim 10^5$ 、 10^8 、 10^{11} 。结肠是机体最大的食物残渣分解场所,长期以来,肠道菌群的研究主要集中在结肠,那么结肠粪菌能否代表小肠菌群? 研究表明,尽管回肠与结肠之间菌落的 OTU 数差异不明显,并且多数菌群存在重叠(Venn 图),但 alpha 多样性分析显示回肠菌群的样品内物种丰度显著高

于结肠(chao1、ace),而多样性低于结肠(simpson、shannon);beta 多样性分析显示结肠样本间菌群组成具有明显的相似性,而回肠与结肠以及回肠样本间相似度较低;经注释分析,两者的优势菌群存在明显的不同,并且重叠程度较低;聚类分析热图也显示回肠与结肠内的菌群物种丰度分布不同,表明结肠内的粪菌并不能代表回肠内的菌群结构。因此,在肠道菌群研究中必须注意这一问题,这与 Leite 等^[25]对人、Grond 等^[26]对滨鸟、Su 等^[27]对蒙古马的研究结果相一致。

小肠是营养物质吸收的主要场所,研究结论显示,肠道菌群通过多种机制参与肥胖的发生,包括 LPS 诱导的肠渗漏和炎症^[28],慢性低度内毒素^[29]、肠源性肽激素^[30]、脂肪组织活性成分等的调节^[31],包括 GPCR、AMPK 信号途径影响能量平衡和饱食感,以及短链脂肪酸影响脂类和能量物质代谢^[32]等,但多数研究是基于结肠粪菌探讨与肥胖的关系,还不足以揭示小肠菌群调节吸收促进营养性肥胖发生的机制。我们的研究发现,回肠内的主要优势菌为 *Romboutsia*、*Turicibacter*、*Rothia*、*Lachnospiraceae*、*Streptococcus*、*Candidatus _ Arthromitus*、*Helicobacter*、*Lactobacillus* 等,而结肠的主要优势菌为 *Lachnospiraceae*、*Treponema*、*Akkermansia*、*Candidatus _ Saccharimonas*、*Ruminococcaceae*、*Romboutsia* 等,提示回肠与结肠菌群存在功能的差异,小肠菌群和粪菌可能具有不同的功能属性。

OTU 是一个相对稳定的指标,不容易受到营养程度的影响,但本研究表明,高脂膳食可能对结肠的 OTU 数存在比较持久的影响,物种注释显示高脂膳食对回肠、结肠内的优势菌也具有持久的影响。我们发现, *Turicibacter*、*Rothia*、*Romboutsia*、*Streptococcus* 可能参与回肠吸收的调节,在营养性肥胖的发生中发挥一定的作用,对于这一结果,还需要更多的动物实验研究支持。

肠道菌群研究是一个非常复杂的领域,一方面由于肠道微生物组成在个体间具有很大的差异,而且不同背景(饮食习惯和种族)的参与者构成及用于分析细菌的不同方法在很大程度上都会影响研究结果的统一;另一方面则因为疾病动物模型在肠道微生物群组成、发酵过程、进食习惯等方面存在差异^[33]。本文在营养性肥胖大鼠模型的基础上,研究肠道菌群与肥胖发生的关系,进一步证实结肠与回肠具有不同的菌群特征,对于探寻人类肠道菌群促进营养性肥胖发生的机制具有较好的借鉴价值。

综上所述,本研究通过对高脂膳食性营养性肥胖大鼠回肠和结肠菌群进行 16S rRNA 基因测序分析,证实回肠与结肠具有不同的肠道菌群,结肠菌群并不能代表回肠的菌群特征,肠道的部位是进行肠道菌群研究必须要考虑的因素;*Turicibacter* 菌、*Rothia* 菌、*Romboutsia* 菌、*Streptococcus* 菌可能是参与肥胖发生的关键回肠固有菌群。

参考文献:

[1] Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral

allies in the obesity wars [J]. *Science*, 2005, 307 (5717): 1909-1914.

- [2] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [3] Martinez-Guryn K, Hubert N, Frazier K, et al. Small intestine microbiota regulate host digestive and absorptive adaptive responses to dietary lipids [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23 (4): 458-469.
- [4] Escobedo G, López-Ortiz E, Torres-Castro I. Gut microbiota as a key player in triggering obesity, systemic inflammation and insulin resistance [J]. *Rev Invest Clin*, 2014, 66 (5): 450-459.
- [5] Cani PD, van Hul M. Gut microbiota and obesity: causally linked? [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 14(6): 401-403.
- [6] Tomas J, Mulet C, Saffarian A, et al. High-fat diet modifies the PPAR- γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(40): E5934-E5943.
- [7] Vuik F, Dicksveld J, Lam SY, et al. Composition of the mucosa-associated microbiota along the entire gastrointestinal tract of human individuals [J]. *United European Gastroenterol J*, 2019, 7(7): 897-907.
- [8] Schwensen HF, Kan C, Treasure J, et al. A systematic review of studies on the faecal microbiota in anorexia nervosa: future research may need to include microbiota from the small intestine [J]. *Eat Weight Disord*, 2018, 23(4): 399-418.
- [9] Moran C, Sheehan D, Shanahan F. The small bowel microbiota [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(2): 130-136.
- [10] 张建新, 米生权, 孙晓玮, 等. 混合喂养法建立营养性肥胖大鼠模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(9): 16-20, 插 4.
- [11] Wan Y, Li D. High-fat, low-carbohydrate diet was associated with unfavourable impact on colonic luminal microenvironment [J]. *Gut*, 2019, 69(9): 1.
- [12] Todorov H, Kollar B, Bayer F, et al. α -linolenic acid-rich diet influences microbiota composition and villus morphology of the mouse small intestine [J]. *Nutrients*, 2020, 12(3): 732.
- [13] Patterson E, O' Doherty RM, Murphy EF, et al. Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice [J]. *Br J Nutr*, 2014, 111(11): 1905-1917.
- [14] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [15] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [16] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.

- [17] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [18] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (Database issue): D590–D596.
- [19] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16): 5261–5267.
- [20] Cuevas-Sierra A, Ramos-Lopez O, Riezu-Boj JI, et al. Diet, gut microbiota, and obesity: links with host genetics and epigenetics and potential applications [J]. *Adv Nutr*, 2019, 10(1): S17–S30.
- [21] Perez-Pardo P, Hartog M, Garssen J, et al. Microbes tickling your tummy: the importance of the gut-brain axis in Parkinson's disease [J]. *Curr Behav Neurosci Rep*, 2017, 4(4): 361–368.
- [22] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57–63.
- [23] Kazemian N, Mahmoudi M, Halperin F, et al. Gut microbiota and cardiovascular disease: opportunities and challenges [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 36.
- [24] Reese AT, Carmody RN. Thinking outside the cereal box: noncarbohydrate routes for dietary manipulation of the gut microbiota [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(10): e02246–18.
- [25] Leite GGS, Weitsman S, Parodi G, et al. Mapping the segmental microbiomes in the human small bowel in comparison with stool: A REIMAGINE study [J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65(9): 2595–2604.
- [26] Grond K, Guilani H, Hird SM. Spatial heterogeneity of the shorebird gastrointestinal microbiome [J]. *R Soc Open Sci*, 2020, 7(1): 191609.
- [27] Su S, Zhao Y, Liu Z, et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments of Mongolian horses [J]. *Microbiologyopen*, 2020, 9(6): 1085–1101.
- [28] Zhao ZH, Xin FZ, Xue Y, et al. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(9): 1–14.
- [29] Fuke N, Nagata N, Suganuma H, et al. Regulation of gut microbiota and metabolic endotoxemia with dietary factors [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2277.
- [30] Lach G, Schellekens H, Dinan TG, et al. Anxiety, depression, and the microbiome: a role for gut peptides [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(1): 36–59.
- [31] Xiao H, Kang S. The role of the gut microbiome in energy balance with a focus on the gut-adipose tissue axis [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 297.
- [32] Heiss CN, Olofsson LE. Gut microbiota-dependent modulation of energy metabolism [J]. *J Innate Immun*, 2018, 10(3): 163–171.
- [33] Aguirre M, Venema K. Does the gut microbiota contribute to obesity? Going beyond the gut feeling [J]. *Microorganisms*, 2015, 3(2): 213–235.

[收稿日期]2020-05-07

李玉莹, 麦冬梅, 贾欢欢, 等. 血常规和血生化指标在患强直性脊柱炎食蟹猴中的临床价值 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (11): 10-15.

Li YY, Mai DH, Jia HH, et al. Clinical value of routine blood test and biochemical indexes in cynomolgus monkeys with ankylosing spondylitis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 10-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.002

血常规和血生化指标在患强直性脊柱炎食蟹猴中的临床价值

李玉莹¹, 麦冬梅², 贾欢欢², 吴志恒³, 何刚华³, 唐爽捷³, 马承红⁴, 卢丽^{1*}

(1. 广东药科大学, 广州 511400; 2. 广东省实验动物监测所(广东省实验动物重点实验室), 广州 510663;
3. 广州春盛生物研究院有限公司, 广州 510900; 4. 广东药科大学附属第一医院, 广州 510000)

【摘要】 目的 探讨部分血常规(WBC、PLT、MPV、NEUT、LYMPH、MONO、EO、BASO、NLR、MLR、ELR)和血生化指标(TP、ALB、A/G、GLOB、TG、CHO、HDL-C、LDL-C、ALP)对患有强直性脊柱炎的食蟹猴的临床价值。方法 随机选取40只患强直性脊柱炎的食蟹猴和40只正常食蟹猴,检测两组食蟹猴中部分血常规与血生化指标。分别用秩和检验和独立样本 t 检验对比分析两组间是否存在差异,并利用受试者工作特征曲线(ROC)计算各指标的灵敏度、特异度和AUC值。结果 在血常规指标中,除PLT外,强直性脊柱炎组中WBC、MPV、NEUT、LYMPH、MONO、EO、BASO、NLR、MLR、ELR均显著高于对照组,且各指标比值指标的AUC值均接近0.9;在血生化中,除TG无显著性差异外,强直性脊柱炎组中HDL-C、LDL-C、TP和ALB均显著低于对照组,GLOB、ALP和CHO显著高于对照组,ALP和GLOB的AUC值均大于0.9。结论 本研究筛查的各种血常规和血生化指标可作为强直性脊柱炎食蟹猴筛查及药物评价的关键指标,并对强直性脊柱炎的后续研究提供重要参考。

【关键词】 食蟹猴;强直性脊柱炎;血常规;血生化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0010-06

Clinical value of routine blood test and biochemical indexes in cynomolgus monkeys with ankylosing spondylitis

LI Yuying¹, MAI Dongmei², JIA Huanhuan², WU Zhiheng³, HE Ganghua³, TANG Shuangjie³,
MA Chenghong⁴, LU Li^{1*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511400, China. 2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute(Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals), Guangzhou 510663.

3. Guangzhou Blooming-Spring Biological Research Institute Co., LTD, Guangzhou 510900.

4. First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510000)

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical value of routine blood test indexes (WBC, PLT, MPV, NEUT, LYMPH, MONO, EO, BASO, NLR, MLR, and ELR) and blood biochemical indexes (TP, ALB, A/G, GLOB, TG, CHO, HDL-C, LDL-C, and ALP) in cynomolgus monkeys with ankylosing spondylitis. **Methods** Forty cynomolgus monkeys with ankylosing spondylitis and 80 normal cynomolgus monkeys were selected and measured for routine blood test

【基金项目】 广东省科技计划项目(2017A070701003);广东省科技计划项目(2019A030317009);国家自然科学基金项目(81941010)。

【作者简介】 李玉莹(1994—),女,硕士研究生,药学。E-mail:1510558736@qq.com

【通信作者】 卢丽(1980—),女,博士,副教授,生物医学。E-mail:541608180@qq.com

indicators and blood biochemical indicators. Comparisons between the two groups were performed using the rank sum test and *t* test method. In addition, the sensitivity, specificity, and area-under-the-curve (AUC) values of each index were calculated using receiver operator characteristic curve analysis. **Results** For routine blood indexes, with the exception of PLT, values of WBC, MPV, NEUT, LYMPH, MONO, EO, BASO, NLR, MLR, and ELR for the ankylosing spondylitis group were significantly higher than those of normal cynomolgus monkeys, and AUC values of the WBC ratio index were close to 0.9. Moreover, blood biochemistry indexes (with the exception of TG, HDL-C, LDL-C, TP, and ALB) in the ankylosing spondylitis group were significantly lower than those in control group. In addition, GLOB, CHO, and white ALP of the ankylosing spondylitis group were significantly higher compared with the control group. **Conclusions** Routine blood and blood biochemical indexes screened in this study can be used as screening and drug evaluation indexes of cynomolgus monkeys with ankylosing spondylitis, and provide important reference for clinical diagnosis of ankylosing spondylitis.

[Keywords] cynomolgus monkeys; ankylosing spondylitis; routine blood test; blood biochemistry

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种病因未明的自身免疫性疾病,主要累及骶髂及脊柱关节^[1],青少年多发,男性多于女性,随着病情的进展,AS患者的生活质量会受到极大的影响,目前尚无良好的治疗药物和干预措施。

疾病动物模型的构建是研究疾病发生机理和防治策略的基础^[2],随着对强直性脊柱炎病因病机的研究,国内外学者已构建了若干个强直性脊柱炎动物模型^[3],遗憾的是这些模型均为啮齿类动物模型,与AS患者临床表现存在较大差异。非人灵长类动物在遗传背景、生理结构等方面与人类高度相似^[4-5],课题组经过多年研究,建立了一种自发性AS食蟹猴动物模型,将为AS相关药物的安全性和有效性评价起到重要作用。动物外周血常规、血生化指标的检查,是药物安全性和有效性评价最常用的评价指标,本研究将对AS食蟹猴血常规和血生化指标进行检测和评价,以期寻找到适合AS食蟹猴评价的关键指标,为AS的后续研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

从约2000只食蟹猴群体中,筛选自发性AS食蟹猴40只,雌性27只,雄性13只,年龄:(10.22±3.00)岁,体重:(4.46±1.93)kg;筛选雌性25只,雄性15只,年龄:(11.00±3.19)岁,体重:(5.52±1.60)kg。已适应喂养2年。两组动物年龄性别等基本生理参数均衡可比。级别:普通级;动物由广东春盛生物科技发展有限公司提供[SCXK(粤)2019-0027]。已经通过广东省实验动物监测所IACUC的审查(IACUC2018002),符合“3R”原则。饲养条件:群居饲养于广东春盛生物研究院有限公司[SYXK(粤)2015-0152],环境温度18℃~26℃,

相对湿度40%~70%,自然采光。

1.2 主要试剂与仪器

血常规:血红细胞分析用稀释液(CELLPACK DFL)、Hb溶血剂(SULFOLYSER)、WNR溶血剂(Lysercell WNR)、WDF溶血剂(Lysercell WDF)、WDF染色液(Fluorocell WDF)、WNR染色液(Fluorocell WNR)、PLT荧光染色液(Fluorocell PLT)(批号分别为:A7010、A7014、A8006、A7019、A7062、A7047、A7094,日本Sysmex株式会社);血液分析仪XN-1000 V[B1]型(日本Sysmex株式会社)。

血生化:白蛋白试剂盒、总蛋白试剂盒、碱性磷酸酶测定试剂盒、总胆固醇试剂盒、甘油三酯试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒。试剂均为上海科华生物工程股份有限公司产品;仪器使用3100型全自动生化分析仪(日本日立公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 AS动物选择

通过对动物进行体格检查,并使用测角仪来评估脊柱的曲率和膝关节和髋关节的运动范围(ROM)进行自发性AS动物的初筛^[6],随后进行X线检查,判断标准与人类AS患者判断标准相同:0级:影像学检查未见病变,骨质结构完全正常;I级:骨关节疑似存在硬化、侵蚀现象;II级:可见明显硬化及侵蚀现象,并表现出轻度异常情况,但关节间隙不十分明显改变;III级:出现明显骨质硬化及侵袭现象,可见骨质重度异常,关节腔隙可见明显改变,见部分强直变化;IV级:大部分脊柱出现强直变化或完全强直,表现出严重骨关节结构异常^[7]。再配合细胞因子检查:C-反应蛋白(C-reaction protein, CRP)、含有瓜氨酸抗体的抗环肽(抗

CCP 抗体)、抗链球菌溶血素 O (anti-Streptolysin, ASO)、降钙素原 (procalcitonin, PCT) 和类风湿因子 (IgG-RF& IgM-RF)。并排除其他疾病,如(1)自身免疫性疾病(类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等);(2)合并感染性疾病或贫血;(3)患有血液学疾病;(4)肝、肾功能损害;(5)患有心脑血管疾病;(6)患有恶性肿瘤。

1.3.2 样本采集

(1) 血常规样本采集

动物禁食过夜后,非麻醉状态下使用 2 mL 含乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂) 真空采血管对实验动物采用前肢头静脉采血 2 mL,保存样本并于 1.5 h 内送检。

(2) 血生化样本采集

动物禁食过夜后,非麻醉状态下使用 3 mL 促凝真空管对实验动物采用前肢静脉采血 3 mL,样本于 1.5 h 内送检。血液样本室温下静置 3 h 后,3000 r/min,离心 10 min,取血清。

1.3.3 指标测定

(1) 血常规指标测定

使用 Sysmex XN-1000 V 全自动血液分析仪对动物抗凝血进行以下指标测定:白细胞计数 (WBC)、血小板计数 (PLT)、平均血小板体积 (MPV)、中性粒细胞 (NEUT)、淋巴细胞 (LYMPH)、单核细胞 (MONO)、嗜酸性粒细胞 (EO)、嗜碱性粒细胞 (BASO)。计算中性粒细胞与淋巴细胞比值 (NLR)、单核细胞与淋巴细胞比值 (MLR)、嗜酸性粒细胞与淋巴细胞比值 (ELR)、嗜碱性粒细胞与淋

巴细胞比值 (BLR)。

(2) 血生化指标测定

使用全自动生化分析仪检测本实验相关的生化指标,包括:碱性磷酸酶 (ALP)、甘油三酯 (TG)、白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、球蛋白 (GLOB)、总胆固醇 (CHO)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、白蛋白与球蛋白比值 (A/G)。

1.4 统计学方法

对各项指标数据,采用 SPSS 24.0 软件进行统计学处理。通过剔除异常值,符合正态性检验的数据按照正态分布计算其平均数与标准差 ($\bar{x} \pm s$),不符合正态分布的数据计算 $M(P25 \sim P75)$ 。正态分布采用独立样本 t 检验进行组间比较,显著性水平 $\alpha = 0.05$;非正态分布采用秩和检验进行比较^[8]。使用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 计算各研究指标的曲线下面积 (AUC) 值、灵敏度和特异性^[9],双侧 P 值小于 0.05 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 组食蟹猴与对照组食蟹猴的检测指标的比较

2.1.1 血常规指标的比较

与对照组相比,AS 组 WBC、NEUT、MONO、EO、BOSO、MPV、NLR、MLR、ELR 和 BLR 均显著升高,LYMPH 显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PLT 无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 AS 组与对照组的血常规指标的对比

Table 1 Comparison of complete blood count indexes between AS group and control group

检测项目 Test items	对照组 Control group	AS 组 AS group
动物数量 N	40	40
白细胞计数 ($10^9/L$) WBC count	12.52 (10.45~16.11)	19.72 (13.98~25.51) **
血小板计数 ($10^9/L$) PLT count	456.50 (405.75~538.75)	507.00 (411.50~594.50)
平均血小板体积 (fL) MPV	10.85 (10.13~11.78)	11.90 (11.23~13.00) **
中性粒细胞计数 ($10^9/L$) NEUT count	6.64 (4.85~9.53)	15.20 (9.03~21.12) **
淋巴细胞计数 ($10^9/L$) LYMPH count	4.27 (3.00~6.74)	2.48 (1.61~3.83) **
单核细胞计数 ($10^9/L$) MONO count	0.83 (0.62~1.04)	1.03 (0.80~1.36) **
嗜酸性粒细胞计数 ($10^9/L$) EO count	0.07 (0.03~0.15)	0.25 (0.16~0.35) **
嗜碱性粒细胞计数 ($10^9/L$) BASO count	0.02 (0.01~0.03)	0.03 (0.02~0.04) **
中性粒细胞/淋巴细胞 NLR	1.51 (0.65~2.26)	6.55 (2.85~12.21) **
单核细胞/淋巴细胞 MLR	0.19 (0.12~0.26)	0.40 (0.30~0.61) **
嗜酸性粒细胞/淋巴细胞 ELR	0.01 (0.01~0.03)	0.10 (0.04~0.17) **
嗜碱性粒细胞/淋巴细胞 BLR	0.004 (0.003~0.005)	0.009 (0.006~0.016) **

注:与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

2.1.2 血生化指标的比较

与对照组相比,AS 组 TP、GLOB、ALP、CHO 显著升高;ALB、A/G、HDL-C、LDL-C 显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);TG 无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 ROC 曲线评价研究指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

2.2.1 血常规指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

使用 ROC 来评价 MPV、WBC、BASO、EO、MONO、LYMPH、NEUT、NLR、MLR、ELR 和 BLR 对 AS 食蟹猴的诊断价值,结果显示它们的 AUC 值分别是: 0.736 (0.626 ~ 0.846)、0.788 (0.688 ~ 0.889)、0.683 (0.566 ~ 0.801)、0.815 (0.716 ~ 0.914)、0.681 (0.564 ~ 0.797)、0.215 (0.118 ~ 0.313)、0.85 (0.768 ~ 0.933)、0.894 (0.826 ~

0.961)、0.896 (0.828 ~ 0.963)、0.87 (0.789 ~ 0.951)、0.897 (0.832 ~ 0.963)。其中各白细胞比值 (NLR、MLR、BLR、ELR) 的 AUC 值均高于其他指标,BLR 的 AUC 值最高,灵敏度和特异度分别为 0.75 和 0.92。(图 1、表 3)

2.2.2 血生化指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

使用 ROC 来评价 TP、ALB、GLOB、A/G、CHO、HDL-C、LDL-C 和 ALP 对 AS 食蟹猴的诊断价值,结果显示它们的 AUC 值分别是:0.678 (0.562 ~ 0.795)、0.048 (0.007 ~ 0.09)、0.942 (0.889 ~ 0.995)、0.047 (0.002 ~ 0.091)、0.719 (0.606 ~ 0.831)、0.295 (0.182 ~ 0.408)、0.333 (0.211 ~ 0.455)、0.934 (0.880 ~ 0.987)。其中 GLOB 和 ALP 的 AUC 值均高于其他指标,GLOB 的 AUC 值最高,灵敏度和特异度分别为 0.878 和 0.975。(表 4、图 2)

表 2 AS 组与对照组的血生化指标的对比
Table 2 Comparison of blood biochemical indexes between AS group and control group

检测项目 Test items	对照组 Control group	AS 组 AS group
动物数量 N	40	40
总蛋白 (g/L) TP	76.08 ± 6.28	80.52 ± 7.34 **
白蛋白 (g/L) ALB	44.71 ± 5.28	30.34 ± 6.28 **
球蛋白 (g/L) GLOB	31.37 ± 5.66	50.18 ± 10.05 **
白蛋白比球蛋白 A/G	1.47 ± 0.35	0.65 ± 0.29 **
碱性磷酸酶 (U/L) ALP	158.28 ± 75.57	681.05 ± 417.14 **
甘油三酯 (mmol/L) TG	0.71 ± 0.70	0.62 ± 0.23
总胆固醇 (mmol/L) CHO	2.92 ± 0.74	3.49 ± 0.52 **
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) HDL-C	1.54 ± 0.41	1.24 ± 0.34 **
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) LDL-C	1.21 ± 0.47	0.96 ± 0.32 **

注:与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

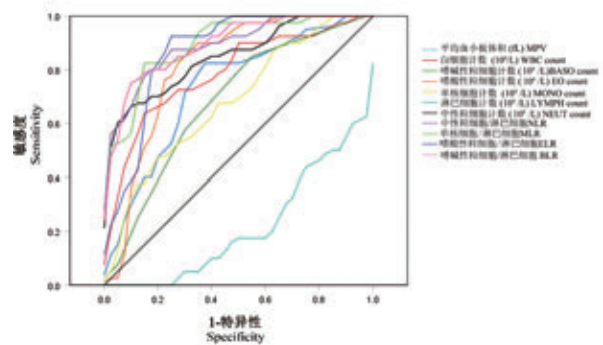


图 1 ROC 曲线评价研究血常规指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

Figure 1 The ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of the complete blood count index for AS cynomolgus monkeys

表 3 ROC 曲线评价血常规指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

Table 3 The ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of the complete blood count index for AS cynomolgus monkeys

检测项目 Test items	曲线下面积 AUC	95%的置信区间 CI95%	P	敏感度 Sensitivity	特异度 Specificity	约登指数 Youden index
平均血小板体积 (fL) MPV	0.736	0.626 ~ 0.846	<0.01	0.800	0.650	0.450
白细胞计数 (10 ⁹ /L) WBC count	0.788	0.688 ~ 0.889	<0.01	0.625	0.850	0.475
嗜碱性粒细胞计数 (10 ⁹ /L) BASO count	0.683	0.566 ~ 0.801	<0.01	0.575	0.700	0.275
嗜酸性粒细胞计数 (10 ⁹ /L) EO count	0.815	0.716 ~ 0.914	<0.05	0.775	0.775	0.550
单核细胞计数 (10 ⁹ /L) MONO count	0.681	0.564 ~ 0.797	<0.01	0.675	0.600	0.275
淋巴细胞计数 (10 ⁹ /L) LYMPH count	0.215	0.118 ~ 0.313	<0.01	0.425	0.275	-0.300
中性粒细胞计数 (10 ⁹ /L) NEUT count	0.850	0.768 ~ 0.933	<0.01	0.800	0.675	0.475
中性粒细胞/淋巴细胞 NLR	0.894	0.826 ~ 0.961	<0.01	0.800	0.850	0.650
单核细胞/淋巴细胞 MLR	0.896	0.828 ~ 0.963	<0.01	0.825	0.875	0.700
嗜酸性粒细胞/淋巴细胞 ELR	0.870	0.789 ~ 0.951	<0.01	0.925	0.775	0.700
嗜碱性粒细胞/淋巴细胞 BLR	0.897	0.832 ~ 0.963	<0.01	0.750	0.925	0.675

表 4 ROC 曲线评价血生化指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

Table 4 The ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of the complete blood count index for AS cynomolgus monkeys

检测项目 Test items	曲线下面积 AUC	95%的置信区间 CI95%	P	敏感度 Sensitivity	特异度 Specificity	约登指数 Youden index
总蛋白(g/L) TP	0.678	0.562~0.795	<0.01	0.854	0.425	0.279
白蛋白(g/L) ALB	0.048	0.007~0.090	<0.01	0.098	0.125	-0.777
球蛋白(g/L) GLOB	0.942	0.889~0.995	<0.01	0.878	0.975	0.853
白蛋白比球蛋白 A/G	0.047	0.002~0.091	<0.01	0.098	0.050	-0.852
总胆固醇(mmol/L) CHO	0.719	0.606~0.831	<0.01	0.780	0.625	0.405
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L) HDL-C	0.295	0.182~0.408	<0.01	0.366	0.275	-0.359
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L) LDL-C	0.333	0.211~0.455	<0.01	0.317	0.350	-0.333
碱性磷酸酶(U/L) ALP	0.934	0.880~0.987	<0.01	0.829	0.975	0.804

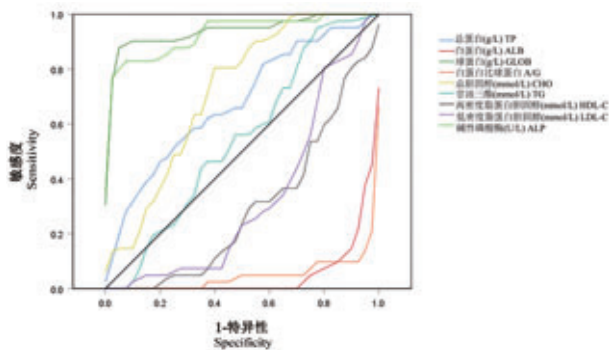


图 2 ROC 曲线评价研究血生化指标对 AS 食蟹猴的诊断价值

Figure 2 The ROC curve was used to evaluate the diagnostic value of the blood biochemical index for AS cynomolgus monkeys

3 讨论

强直性脊柱炎是以中轴和骶髂附着点炎症为主要症状的全身免疫性疾病,发病早、致残率高、病程长,目前尚无良好的治疗手段^[10]。目前,AS 的病情评估和诊断主要依靠临床表现、影像学及 ESR、CRP 等指标检查,但是影像学检查价格昂贵且不便,不适合 AS 食蟹猴较多数量的初筛。本研究通过对血常规、白细胞比值(NLR、MLR、ELR、BLR)和血生化部分指标的分析来探究各指标对 AS 食蟹猴的诊断价值。

NLR 和 MLR 作为炎症标志物在很多疾病中被关注,NLR 和 MLR 异常增加与一些疾病炎症活动或预后有关,如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、骨关节炎等^[11-12]。本研究结果显示与正常对照组的食蟹猴相比,AS 食蟹猴的 NLR 和 MLR 均显著升高。也有文献结果显示在 AS 中 NLR 与 ESR 和 CRP 呈正相关^[13],MLR 与 CRP 呈正相关^[14-15]。嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞都是一种免疫效应细

胞,通常占血液白细胞的 5% 和 1% 以下。本研究结果表明在 AS 食蟹猴中 EO 和 BASO 均显著增高,这可能与 AS 是一种慢性炎症为主的自身免疫性疾病有关。周振兴等^[16]研究表明由于大量炎症介质和细胞因子的异常分泌导致患者嗜酸性粒细胞显著增高;嗜碱性粒细胞除了在过敏反应和寄生虫感染中的活性外,Chirumbolo 等^[17]研究证明在固有免疫和免疫调节中具有重要作用发生炎症时血液中的血细胞比例发生变化。目前关于 ELR 和 BLR 的研究较少,但是在本研究结果中 AS 食蟹猴的 ELR 和 BLR 升高,并有统计学意义,这与 Yang 等^[13]的研究中关于 AS 病人的结果基本一致。MPV 是血小板活化的标志物,Kisacik 等^[18]研究发现 MPV 可能是诊断 AS 灵敏度更高的指标,并且发现 MPV 在 AS 的活动期呈较低水平,在非活动期 MPV 水平较高。在我们的研究结果中 AS 组的食蟹猴较正常对照组的食蟹猴的 MPV 显著升高,而 PLT 无显著性差异,与 Kisacik 等^[18]的研究结果中的 AS 病人非活动期指标变化相符。本研究探讨血常规和血生化指标的检测对自发性 AS 食蟹猴的诊断价值。ROC 曲线结果显示,在血常规指标中,白细胞比值的各指标(NLR、MLR、ELR、BLR)的灵敏性和特异性都均高于各类白细胞指标,与文献报道一致^[14]。

ALP 主要由肝和成骨细胞合成,是反映成骨活动的重要标志物,本研究结果显示 AS 食蟹猴 ALP 显著升高,这可能是随着疾病进程会出现脊柱及关节骨化导致。GLOB 是一个计算值,是血清中的“非白蛋白”蛋白的总量,免疫反应增强是 AS 重要的临床表现,GLOB 的升高可能是由于 AS 的炎症特征导致机体免疫蛋白升高。张晓刚等^[19]的研究结果表现为人类 AS 患者的 TG 和 CHO 显著升高,LDL-C 和 HDL-C 下降,与本研究结果中 AS 食蟹猴的指标大致相同。ALB 是主要用于反映机体营养状态和

慢性消耗性疾病的指标之一^[20-21], AS 食蟹猴由于疼痛和全身炎症会导致机体营养吸收和物质代谢能力降低,从而表现出 ALB 和 A/G 低于正常食蟹猴。在血生化指标中,GLOB 和 ALP 的 AUC 值均大于 0.9,证明它们对于 AS 食蟹猴的诊断灵敏度和特异度较好。

综合上述讨论,本研究发​​现血常规、血生化检查可作为一种快速、简便、可靠的手段,对自发 AS 食蟹猴模型进行筛查、诊断和相关药物的评价提供辅助诊断的手段。综合 ROC 曲线结果,指标 NLR、MLR、ELR、BLR、ALP 和 GLOB 是本研究指标中灵敏度和特异度最佳的六个指标,并且它们的变化可能与 AS 疾病活动度有关,对 AS 有重要的临床应用价值。但是,本研究样本量相对较小,还需后续进行纵向研究,包括较大量的数据分析来进一步探究这些指标与疾病活动度的相关情况。

参考文献:

- [1] Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis [J]. *Lancet*, 2007, 369(9570): 1379-1390.
- [2] 郑宏毅, 郑永唐. 非人灵长类动物:免疫学基础研究到临床应用的桥梁 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(8): 1121-1130.
- [3] 谭希, 徐永跃, 邱冬妮, 等. 强直性脊柱炎动物模型归类及其机制研究与进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(11): 1783-1789.
- [4] Hérodin F, Thullier P, Garin D, et al. Nonhuman primates are relevant models for research in hematology, immunology and virology [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2005, 16(2): 104-116.
- [5] Phillips KA, Bales KL, Capitanio JP, et al. Why primates models matter [J]. *Am J Primatol*, 2014, 76(9): 801-827.
- [6] Norkin C, White D. Measurement of joint motion: a guide to goniometry, 4th ed. [M]. Philadelphia; PA: F. A. Davis Company; 2009.
- [7] 杜琳, 高延征. 强直性脊柱炎诊断及治疗新进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(7): 629-631.
- [8] 方积乾. 卫生统计学 第七版 [M]. 北京:人民卫生出版社; 2012.
- [9] 赵晓利, 孙利, 黄喜英. ROC 曲线评价糖化血红蛋白在妊娠期糖尿病诊断中价值探讨 [J]. *河北医学*, 2016, 22(1): 99-102.
- [10] 胡燕, 刘晓明. 强直性脊柱炎患者康复护理分析 [J]. *中国医学创新*, 2018, 15(29): 76-79.
- [11] Fu H, Qin B, Hu Z, et al. Neutrophil- and platelet-to-lymphocyte ratios are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Lab*, 2015, 61(3-4): 269-273.
- [12] Wu Y, Chen Y, Yang X, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 94-99.
- [13] Yang Z, Zhang Z, Lin F, et al. Comparisons of neutrophil-, monocyte-, eosinophil-, and basophil- lymphocyte ratios among various systemic autoimmune rheumatic diseases [J]. *APMIS*, 2017, 125(10): 863-871.
- [14] 江佳伟. 血常规指数在类风湿关节炎及强直性脊柱炎中的临床意义分析 [D]. 广州:南方医科大学, 2019.
- [15] Mercan R, Bitik B, Tufan A, et al. The association between neutrophil/lymphocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(5): 597-601.
- [16] 周振兴. 银屑病血液学检验指标变化特点及其对临床诊治价值的研究 [D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
- [17] Chirumbolo S. State-of-the-art review about basophil research in immunology and allergy: Is the time right to treat these cells with the respect they deserve? [J]. *Blood Transfus*, 2012, 10(2): 148-164.
- [18] Kisacik B, Tufan A, Kalyoncu Ut, et al. Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75(3): 291-294.
- [19] 张晓刚, 李振彬, 马旭. 强直性脊柱炎患者炎性活动指标与血脂、D-二聚体相关性分析 [J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(9): 36-38, 57.
- [20] 刘人伟. 检验与临床: 现代实验诊断学 [M]. 北京:化学工业出版社; 2009.
- [21] 容莉莉, 黄钰君, 伍绍国, 等. 广州儿童血清总蛋白、白蛋白、球蛋白及 A/G 比值参考值调查 [J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 10(34): 8328-8330.

[收稿日期]2020-05-09

杨晓,陈冲. 小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 16-22.

Yang X, Chen C. Comparison of immune responses induced by poly(I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 16-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.003

小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较

杨 晓^{1*}, 陈 冲²

(1.西安交通大学第二附属医院科研中心实验室,西安 710004; 2.天津医科大学肿瘤医院检验科,天津 300060)

【摘要】 **目的** 探讨小鼠腹腔巨噬细胞亚群在病毒侵染早期免疫应答功能的差异与相关机制。**方法** 流式细胞术分选获得小鼠腹腔 F4/80^{hi}亚群和 F4/80^{lo}亚群巨噬细胞, Poly I:C 免疫刺激8 h 后采用实时定量 PCR 方法比较两群细胞促炎因子与相关转录因子基因表达的变化,进一步采用 Western blot 方法检测信号通路的变化,最后使用通路抑制剂实施阻断实验。**结果** 小鼠腹腔 F4/80^{hi}亚群巨噬细胞数量显著性高于 F4/80^{lo}亚群 ($P < 0.05$); Poly I:C 作用后, F4/80^{hi}亚群促炎因子 IL6、iNOS、IFN α 、IFN γ 基因的表达变化倍数显著性高于 F4/80^{lo}亚群 ($P < 0.05$), 转录因子 IRF3、IRF7 基因表达均显著性升高 ($P < 0.05$); 同时 F4/80^{hi}亚群 JNK 通路磷酸化水平显著上升 ($P < 0.05$); 采用 JNK 信号通路磷酸化抑制剂 SP600125 阻断后, 促炎因子 IL6 与 IFN α 基因表达显著下调 ($P < 0.05$)。**结论** F4/80^{hi}巨噬细胞亚群在病毒感染早期活化程度显著性高于 F4/80^{lo}亚群, 可能通过上调 IRF7 分子表达和 JNK 通路的活化水平参与巨噬细胞活化的调控。

【关键词】 巨噬细胞亚群; 病毒早期感染; 免疫应答; JNK 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0016-07

Comparison of immune responses induced by poly(I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets

YANG Xiao^{1*}, CHEN Chong²

(1. Core Research Laboratory, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China.
2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060)

【Abstract】 **Objective** To explore the function and mechanism of macrophage subsets in early immune responses to viral infection. **Methods** Fluorescence-assisted cell sorting was performed to acquire F4/80^{hi} and F4/80^{lo} subsets of mouse peritoneal macrophages, which were stimulated with poly(I:C) for 8 h. qRT-PCR was performed to compare gene expression levels of pro-inflammatory factors and transcription factors. Furthermore, Western blot was performed to identify the potential activated signaling pathway. Finally, an inhibitor block experiment was conducted. **Results** The percentage of F4/80^{hi} macrophages was significantly higher than the F4/80^{lo} subset ($P < 0.05$). After stimulation with poly(I:C), gene expression of pro-inflammatory factors interleukin 6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase iNOS, interferon alpha (IFN α), and IFN γ was significantly higher in the F4/80^{hi} subset compared with the F4/80^{lo} subset ($P < 0.05$), and

【基金项目】国家自然科学基金(81802862);陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-546);西安交通大学第二附属医院科研基金(YJ(QN)201716)。

【作者简介】杨晓(1989—),男,助理研究员,博士,研究方向:肿瘤免疫。E-mail: yang_x@xjtu.edu.cn

expression of transcription factors IRF3 and IRF7 was significantly increased ($P < 0.05$). Moreover, phosphorylation of the JNK pathway in the F4/80^{hi} subset was significantly increased ($P < 0.05$). Upregulated expression of IL-6 and IFN α were significantly attenuated by SP600125 ($P < 0.05$), a phosphorylation inhibitor of the JNK signaling pathway. **Conclusions** The F4/80^{hi} subset was more activated than the F4/80^{lo} subset during the early stage of viral infection, and may be modulated by IRF7 upregulation and JNK pathway activation.

【Keywords】 macrophage subsets; early stage of virus infection; immune response; JNK pathway

巨噬细胞是免疫系统中的重要组分,对机体稳态维持、病原清除起着至关重要的作用。巨噬细胞具有较强的可塑性,按其功能表型、驻留器官、来源发育等,可分为不同的细胞亚群。根据其释放促炎/抑炎细胞因子或趋化因子的功能行为,可分为经典活化(classically activated)的M1型巨噬细胞亚群和选择性活化(alternatively activated)的M2型巨噬细胞亚群^[1-3]。根据其各类驻留器官划分,可分为库佛细胞(肝组织)、朗格汉斯细胞(皮肤组织)、肺泡巨噬细胞(肺组织)、破骨细胞(骨组织)、小胶质细胞(脑组织)等巨噬细胞亚群^[4-5]。根据来源,可将其分为胎肝造血干细胞来源、胚胎造血干细胞来源和成体骨髓造血干细胞来源的巨噬细胞亚群^[6]。有研究报道表明,腹腔巨噬细胞具有一定的溯源异质性,其F4/80^{hi}巨噬细胞亚群来源于肝造血干细胞,在稳态环境下依赖于自我增殖维持细胞群体数量的恒定;F4/80^{lo}巨噬细胞亚群由骨髓造血干细胞来源的单核细胞发育而来,在机体遭受细菌感染或病毒侵扰的24~72 h,被大量募集并向F4/80^{hi}巨噬细胞亚群定向分化^[7]。然而在病毒侵染早期,腹腔巨噬细胞F4/80^{hi}亚群和F4/80^{lo}亚群是否具有免疫应答功能的异质性,仍未获曾阐明。

聚肌胞(Poly I:C)是一种天然双链RNA(dsRNA)的类似物,能够有效模拟病毒感染后所形成的dsRNA,刺激机体产生抗病毒免疫反应和炎症反应^[8]。已有报道表明,Poly I:C可与成熟巨噬细胞表面Toll受体3(TLR3)受体结合,通过活化下游髓样分化因子88(MyD88)蛋白或 β 干扰素TLR结构域衔接蛋白(TRIF)两种方式,诱导I型干扰素(IFN)产生,进而触发炎症反应^[9]。然而,目前对于异质性巨噬细胞抗病毒功能与机制的研究仍较少。因此,进一步深入研究巨噬细胞亚群感染早期病毒免疫应答作用与机制,对理解机体免疫系统早期病毒识别与应答调控具有重要意义。本实验通过研究Poly I:C免疫刺激对小鼠腹腔F4/80^{hi}和F4/80^{lo}巨噬细胞亚群各类促炎因子和转录因子基因表达水平的影响,并进一步探究信号通路相关机制,以

期为病毒感染的免疫应答调控研究提供理论依据和新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级C67BL/6J雄性小鼠,6~8周龄,20只,体重20~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],于西安交通大学医学部动物实验中心[SYXK(陕)2015-0002]SPF级环境繁育饲养。温度20℃~25℃,相对湿度40%~70%,每天12 h昼夜明暗交替。本研究所有动物实验依据优化、减少、替代的3R原则进行实验设计,并经过西安交通大学动物实验伦理委员会批准(XJTULAC2018-2225)。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠CD11b、F4/80流式抗体(1:200, Biolegend, 美国); RPMI-1640培养基、胎牛血清(Gibco, 美国); Poly I:C(Sigma, 美国); RNA提取试剂TRIzol(Invitrogen, 美国); cDNA合成试剂盒(Thermo, 美国); SYBR Green荧光定量盒(TaKaRa, 日本); BCA蛋白浓度定量试剂盒(Thermo, 美国); JNK抗体(1:500, CST, 美国); P-JNK抗体(1:500, CST, 美国); GAPDH抗体(1:500, CST, 美国); 羊抗兔HRP二抗(1:3000, 北京中杉金桥生物技术有限公司); JNK磷酸化抑制剂SP600125(MedChemExpress, 美国); 引物序列合成(北京六合华大基因科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 流式分析和分选小鼠腹腔巨噬细胞

选取6~8周龄C67BL/6J小鼠,脱颈处死,使用预冷的PBS缓冲液反复冲洗腹腔,离心后重悬,置于冰上裂解红细胞10 min。离心后重悬行细胞计数,取 5×10^6 细胞,同时加入5 μ L的CD11b-PE-Cy7和F4/80-APC抗体,避光冰上孵育30 min后,离心去上清。将细胞加入1 mL流式缓冲液重悬,过200目无菌滤网后上机进行流式细胞分选和分析,所用流式细胞仪为ARIA II(BD, 美国),具体步骤参

见文献^[10]。共分选 20 只小鼠腹腔巨噬细胞,获得的小鼠 CD11b⁺F4/80^{hi}巨噬细胞亚群和 CD11b⁺F4/80^{lo}巨噬细胞亚群,一部分(8 只小鼠样本)用于荧光定量 PCR 检测促炎因子和转录因子 mRNA 表达的检测,一部分(6 只小鼠样本)用于 JNK 通路拮抗实验,另一部分(6 只小鼠样本)用于 Western blot 检测信号通路磷酸化水平的检测,所有实验均至少开展三次独立重复实验。

1.3.2 Poly I:C 免疫刺激和 JNK 信号通路拮抗实验

将 Poly I:C 干粉溶于 PBS 中,调整为终浓度 2 mg/mL 的储液,冻存于 -80℃ 冰箱备用。本实验共设计两个 Poly I:C 浓度组,分别为对照组 (0 μg/mL),实验组 (50 μg/mL),将作用后的 F4/80^{hi}亚群和 F4/80^{lo}亚群置于 5% CO₂ 浓度和 37℃ 温度下培养 8 h。将 JNK 通路磷酸化抑制剂 SP600125 干粉溶于 DMSO 中,调整为终浓度 10 mmol/L 的储液,低温冻存备用。在实验组加入 Poly I:C 刺激的同时,设置加入 SP600125 (10 μmol/L) 处理组和同体积 DMSO 对照组 (每组 3 个样本,每个样本为分选的 6 只小鼠细胞两两合并),同上述条件培养 8 h。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测

收集处理后的巨噬细胞亚群提取总 RNA,采用 Nanodrop 微量分光光度计 (Thermo, 美国) 测定提取 RNA 含量与质量 (1.8 < OD 值 < 2.0),取 1 μg 左右的 RNA,利用 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。本研究采用 SYBRgreen 法对目的基因 mRNA 的表达水平进行检测,按照厂商说明书将反应体系设置为 20 μL,扩增程序设置为:95℃ 预变性

5 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 复性及延伸 1 min,40 个循环;每个样品均设置 3 个技术重复。采用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法进行目的基因相对表达量分析,加入无 Poly I:C 普通培养基的 F4/80^{hi} 亚群设置为对照组 (RQ=1)。共收集 8 只小鼠腹腔巨噬细胞样本,由于 CD11b⁺F4/80^{lo} 亚群占总细胞比例较低,为保证其细胞量不低于 5×10⁵,将收集的样本两两合并,分别进行了 4 次独立重复实验。本研究所涉及的引物信息详见表 1。

1.3.4 Western blot

提取处理后的巨噬细胞亚群蛋白,BCA 定量法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,半干转法电转至 PVDF 膜,10% BSA 封闭液室温封闭 1 h,加入比例稀释后的 JNK、p-JNK、GAPDH 抗体工作液,置于往复式摇床 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h。电化学发光显影,用 Image J 软件测定条带的灰度值,以磷酸化 JNK 灰度值与 JNK 总蛋白灰度值的比值作为蛋白的相对表达量。共收集 6 只小鼠腹腔巨噬细胞样本,由于 CD11b⁺F4/80^{lo} 亚群占总细胞比例较低,为保证其细胞量不低于 5×10⁵,将收集的样本两两合并,分别进行了 3 次独立重复实验。在结果部分对其中一次代表性实验结果进行阐述。

1.4 统计学方法

采用 FlowJo 软件对流式数据进行分析,使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析,实验数据采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 Levene 法行方差齐性检验,组间比较采用非配对 *t* 检验或 Mann-Whitney 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息
Table 1 Primers for qRT-PCR detection

基因名称 Gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	基因库序列号 Gene bank ID
白介素-6 IL6	Forward: CCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC Reverse: ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCC	NM_031168
诱导型一氧化氮合酶 NOS2	Forward: CAGCGGAGTGACGGCAAAC Reverse: AGACCAGAGGCAGCACATCAA	NM_010927.4
α 型干扰素 IFNα	Forward: GCCATCCCTGTCTGAGTGA Reverse: GCTGCTGGTGGAGGTCATTG	NM_010502.2
γ 型干扰素 IFNγ	Forward: CGAAGCAGCAGAACAGGAAGAAC Reverse: TGATAGCGGTGAGGCTACAAG	NM_010511.3
干扰素调节因子 3 IRF3	Forward: CACGCTACACTCTGTGGTTCTG Reverse: GGAGATAGGCTGGCTGTTGGA	NM_016849.4
干扰素调节因子 7 IRF7	Forward: GTCACCAGACTAGCCATCTACCT Reverse: TAGACAAGCACAAGCCGAGACT	NM_016850.3
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	Forward: TGAAGGTCGGTGTGAACGGATT Reverse: CTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	NM_008084.3

2 结果

2.1 腹腔 F4/80^{hi} 亚群和 F4/80^{lo} 亚群相对数量的比较

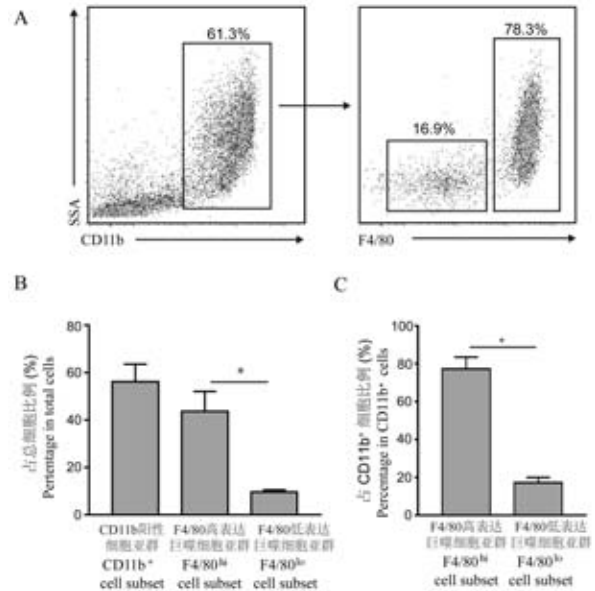
经 PBS 缓冲液灌注冲洗, 收集小鼠腹腔细胞。随后行 CD11b-PE-Cy7 和 F4/80-APC 抗体染色标记, 通过流式分选, 获得 F4/80^{hi} 亚群和 F4/80^{lo} 亚群细胞。其中 CD11b⁺ 细胞占总细胞比例为 (56.23 ± 3.71)%; CD11b⁺F4/80^{hi} 巨噬细胞亚群占总细胞比例为 (43.67 ± 4.20)%, 占 CD11b⁺ 细胞比例为 (77.23 ± 3.16)%; CD11b⁺F4/80^{lo} 巨噬细胞亚群分别为 (9.58 ± 0.48)% 和 (17.23 ± 1.39)%。F4/80^{hi} 亚群和 F4/80^{lo} 亚群数量比较, P < 0.05, 具体结果见图 1。

2.2 Poly I:C 免疫刺激下巨噬细胞亚群促炎因子和转录因子表达变化趋势

利用上述引物 (见表 1), 对 Poly I:C 作用后巨噬细胞促炎因子 IL6、iNOS、IFN α 、IFN γ 和信号通路相关转录因子 IRF3、IRF7 信使 RNA 的表达水平, 进行荧光定量 PCR 检测。加入无 Poly I:C 普通培养基的 F4/80^{hi} 亚群设置为对照组 (RQ = 1), 统计两个亚群巨噬细胞在 Poly I:C 刺激前、后促炎因子和转录因子相对表达量 (表 2), 并计算两个亚群巨噬细胞在 Poly I:C 刺激后促炎因子和信号通路相关转录因子表达倍数的变化, 具体结果见表 3。

巨噬细胞经典 M1 型极化指标 IL6 和 iNOS, 相较于对照组, F4/80^{hi} 亚群 IL6、iNOS 表达增高 (2.61 ± 0.32) 倍和 (2.05 ± 0.36) 倍, F4/80^{lo} 亚群为 (1.32 ± 0.10) 倍和 (1.02 ± 0.12) 倍; 同时 F4/80^{hi} 亚群对 Poly I:C 刺激的效应因子 IFN α 、IFN γ 表达增加 (3.90 ± 0.54) 倍和 (2.29 ± 0.29) 倍, F4/80^{lo} 亚群为 (1.37 ± 0.10) 倍和 (1.22 ± 0.10) 倍。在病毒感染过程中, 巨噬细胞通过胞膜模式受体识别病原, 经胞

内信号转导上调核内 IRF3 和 IRF7 转录, 从而激活干扰素刺激反应原件 (interferon stimulated response element, IRSE) 的活性以发挥抗病毒和病原清除效应^[11]。相较于对照组, F4/80^{hi} 亚群表达 IRF3、IRF7 表达增高 (2.66 ± 0.15) 倍和 (3.01 ± 0.17) 倍, F4/80^{lo} 亚群为 (1.21 ± 0.11) 倍和 (1.16 ± 0.07) 倍。综



注: A: 流式细胞术分选 F4/80^{hi} 亚群和 F4/80^{lo} 亚群划门策略; B: 目的细胞占总细胞数百分比 (左) 或占 CD11b⁺ 细胞数百分比 (右)。F4/80 高表达亚群与 F4/80 低表达亚群比较, *P < 0.05。

图 1 F4/80^{hi} 亚群和 F4/80^{lo} 亚群巨噬细胞相对数量
Note. A, Gating Strategy for sorting F4/80^{hi} subset and F4/80^{lo} subset by Flow cytometre. B, Percentage of target cells in total cells (left panel) or in CD11b⁺ cells (right panel). F4/80^{hi} subset Compared with F4/80^{lo} subset, *P < 0.05.

Figure 1 The percentage of F4/80^{hi} subset and F4/80^{lo} subset in total cells or CD11b⁺ cells

表 2 Poly I:C 免疫刺激 8 h 后巨噬细胞促炎因子和相关转录因子基因的相对表达量

Table 2 Relative expression value of pro-inflammatory factors and related transcription factor in macrophages with/without 8 h of Poly I:C stimulation

基因名称 Genes	F4/80 ^{lo} 亚群相关基因的 相对表达量 RQ value of F4/80 ^{lo} M ϕ		F4/80 ^{hi} 亚群相关基因的 相对表达量 RQ value of F4/80 ^{hi} M ϕ	
	Poly I:C (-)	Poly I:C (+)	Poly I:C (-)	Poly I:C (+)
白介素-6 IL6	0.39 ± 0.04	0.51 ± 0.04	1.00 ± 0.02	2.62 ± 0.32
诱导型一氧化氮合酶 NOS2	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.07	1.00 ± 0.04	2.05 ± 0.36
α 型干扰素 IFN α	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.01	1.00 ± 0.03	3.90 ± 0.54
γ 型干扰素 IFN γ	1.25 ± 0.17	1.53 ± 0.18	1.01 ± 0.07	2.29 ± 0.29
干扰素调节因子 3 IRF3	1.59 ± 0.10	1.91 ± 0.17	1.00 ± 0.05	2.66 ± 0.15
干扰素调节因子 7 IRF7	0.39 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.91 ± 0.06	3.01 ± 0.17

注: 未刺激的 F4/80^{hi} 亚群各基因相对表达量设为对照 (RQ = 1)。

Note. Set RQ value of F4/80^{hi} subset without stimulation as control.

上, F4/80^{lo}亚群相关因子增高倍数均未能大于 1.4 倍, 提示该亚群对 Poly I:C 刺激不敏感; 而 F4/80^{hi}亚群相关炎症因子和转录因子指标增高倍数均显著高于 F4/80^{lo}亚群, $P < 0.05$ 。

2.3 Poly I:C 免疫刺激下 F4/80^{hi}亚群和 F4/80^{lo}亚群信号通路的变化

前期研究发现, Poly I:C 可诱导巨噬细胞 IRF7 表达上调, 通过激活 JNK 信号通路以促进 M1 型极化反应^[12]。Poly I:C 作用 F4/80^{hi}亚群后, 其 JNK 通路磷酸化水平(相对表达量为 1.19)相较于对照组(相对表达量 0.29), 呈升高趋势。Poly I:C 作用 F4/80^{lo}亚群后, JNK 通路磷酸化水平(相对表达量为 0.064)相较于对照组磷酸化水平(相对表达量 0.075), 无明显变化趋势, 具体结果见图 2。

2.4 阻断 JNK 通路活化对 Poly I:C 作用后 F4/80^{hi}亚群和 F4/80^{lo}亚群促炎因子表达的影响

为进一步研究 JNK 信号通路在腹腔异质性巨

噬细胞亚群应答 Poly I:C 过程中的作用机制, 在 Poly I:C 作用的同时, 加入 JNK 通路磷酸化抑制剂 SP600125, 以观察阻断 JNK 通路磷酸化对 F4/80^{hi}亚群和 F4/80^{lo}亚群促炎因子 IL6 和 IFN α 表达的影响。以无 Poly I:C 和 SP600125 普通培养基的 F4/80^{hi}亚群为基线(RQ=1)。结果表明, 未加入 Poly I:C 刺激, F4/80^{hi}亚群巨噬细胞, IL6 相对表达量为 1.00 ± 0.02 , IFN α 相对表达量为 1.00 ± 0.03 ; Poly I:C 刺激后的 F4/80^{hi}亚群巨噬细胞, IL6 相对表达量(2.64 ± 0.05)和 IFN α 相对表达量(3.93 ± 0.18)均显著上调, $P < 0.05$; 加入 SP600125 作用后, F4/80^{hi}亚群巨噬细胞 IL6 相对表达量(1.25 ± 0.05)和 IFN α 相对表达量(0.93 ± 0.13)均显著下调, $P < 0.05$ 。未加入 Poly I:C 刺激, F4/80^{lo}亚群巨噬细胞, IL6 相对表达量为(0.32 ± 0.02), IFN α 相对表达量为(0.22 ± 0.02); Poly I:C 刺激后的 F4/80^{lo}亚群巨噬细胞, IL6 表达(0.37 ± 0.01)和 IFN α 表达

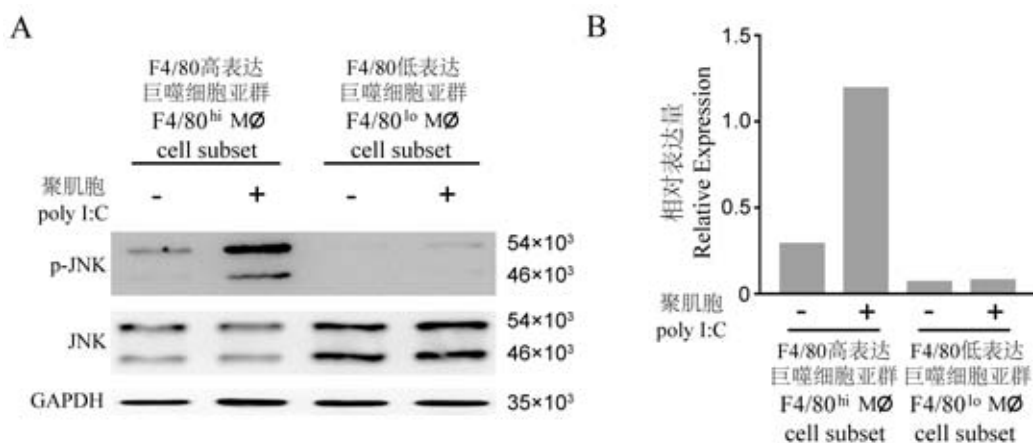
表 3 Poly I:C 免疫刺激 8 h 后巨噬细胞促炎因子和相关转录因子基因表达倍数的变化

Table 3 Fold changes of pro-inflammatory factors and related transcription factor in macrophages after 8 h of Poly I:C stimulation

基因名称 Genes	F4/80 ^{lo} 亚群基因表达变化倍数		F4/80 ^{hi} 亚群基因表达变化倍数	
	F4/80 ^{lo} M ϕ fold change		F4/80 ^{hi} M ϕ fold change	
白介素-6 IL6	1.32 \pm 0.10		2.61 \pm 0.30*	
诱导型一氧化氮合酶 NOS2	1.02 \pm 0.12		2.05 \pm 0.36*	
α 型干扰素 IFN α	1.37 \pm 0.10		3.90 \pm 0.54*	
γ 型干扰素 IFN γ	1.22 \pm 0.10		2.29 \pm 0.29*	
干扰素调节因子 3 IRF3	1.21 \pm 0.11		2.66 \pm 0.15*	
干扰素调节因子 7 IRF7	1.16 \pm 0.07		3.01 \pm 0.17*	

注: F4/80^{hi}亚群相关基因表达倍数与 F4/80^{lo}亚群相关基因表达倍数变化比较。F4/80 高表达亚群 Poly I:C 刺激前与刺激后比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Fold changes of F4/80^{hi} subset compared with F4/80^{lo} subset. F4/80^{hi} subset Poly I:C stimulation compared with before Poly I:C stimulation, * $P < 0.05$ 。



注: A: Western blot 检测 JNK 信号通路磷酸化与表达水平代表图, 采用 GAPDH 作为内参; B: Image J 软件对目的条带灰度值量化统计分析。

图 2 JNK 信号通路磷酸水平差异的检测

Note. A, Phosphorylation and expression level of JNK signal pathway was detected by Western blot, GAPDH was loaded as internal reference. B, Intensities of the Western blot bands were quantitated by ImageJ software.

Figure 2 Phosphorylation level of JNK signal pathway

(0.17 ± 0.02), 与未加入 Poly I:C 的 F4/80^{lo} 亚群巨噬细胞组相比均无显著差异; 加入 SP600125 作用后, F4/80^{lo} 亚群巨噬细胞 IL6 相对表达量 (0.34 ± 0.02) 和 IFN α 相对表达量 (0.11 ± 0.01), 与加入 Poly I:C 但未加入 SP600125 的 F4/80^{lo} 亚群巨噬细胞组相比均无显著差异, 具体结果见图 3。

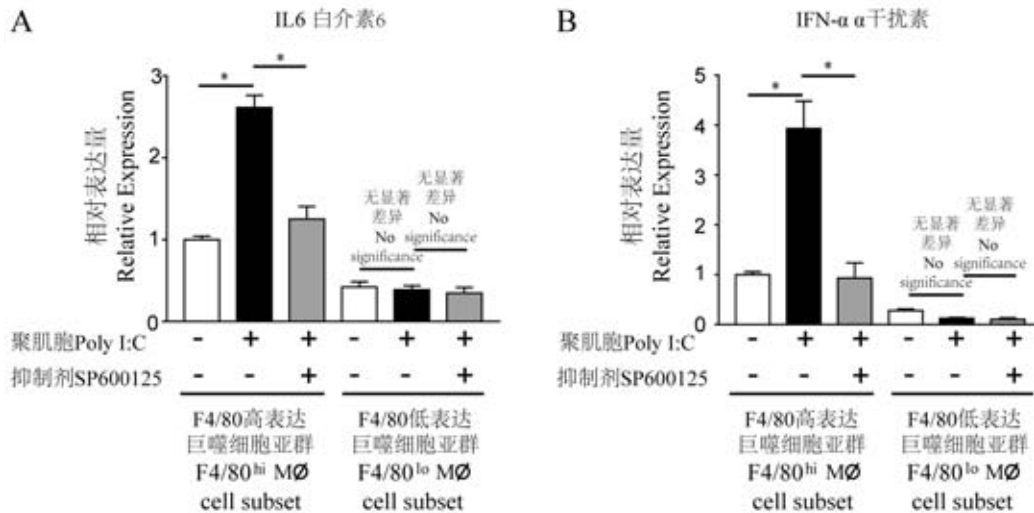
3 讨论

流行性感病毒(流感病毒)其感染的严重程度, 和病毒引起的以过度炎症反应为特征的细胞因子风暴呈正相关^[13]。部分宿主在感染 H1N1 流感病毒后, 免疫细胞过度激活进而释放大量促炎细胞因子, 引发细胞因子风暴, 可发展为急性肺损伤, 甚至可进展为急性呼吸窘迫综合征, 导致呼吸衰竭与多器官损伤^[14]。本研究通过研究异质性巨噬细胞亚群对早期病毒感染差异化应答及相关机制, 发现在 Poly I:C 诱导的病毒感染模型中, F4/80^{hi} 巨噬细胞亚群在病毒感染早期活化程度显著性高于 F4/80^{lo} 亚群。F4/80^{hi} 巨噬细胞亚群释放大量的促炎细胞因子 IL6, IFN α 、IFN γ , 同时转录因子 IRF3 和 IRF7 显著上调, 通过活化 JNK 信号通路推进其促炎表型的形成, 而抑制 JNK 通路磷酸化可显著抑制 F4/80^{hi} 亚群致敏性。该结果进一步提示我们, 定向干预 F4/80^{hi} 巨噬细胞亚群过度激活, 可能对抑制或延缓

细胞因子风暴的发生起着积极重要作用。

固有免疫系统是机体抵抗病毒侵染的第一道防线, 同时也是适应性免疫发展的基础。近年来, 固有免疫中树突状细胞(DC)和巨噬细胞在抗病毒中的作用备受关注。髓系 DC(mDC)可以主动摄取乙肝病毒抗原肽, 通过 MHC I 类分子途径提呈抗原肽至 CD8⁺T 细胞, 进而引发 Th1 型免疫反应^[15]。而在巨细胞病毒感染中, 浆细胞样 DC(pDC)可通过分泌干扰素诱导 Th2 型免疫反应^[16]。有报道表明, M1 型巨噬细胞过度活化可导致急性流感病毒感染患者细胞因子风暴的产生, 在感染早期介入抑制 M1 型巨噬细胞的过度激活, 可以有效改善预后^[17]。在本研究中我们发现, F4/80^{hi} 巨噬细胞亚群在早期病毒感染中促炎因子 IL6、iNOS、IFN α 、IFN γ 表达上调。已有报道表明^[18], F4/80^{hi} 巨噬细胞亚群成熟度和吞噬能力高于 F4/80^{lo} 亚群。提示我们在病毒感染早期, 可以通过氯磷酸盐脂质体类药物清除过度活化的 F4/80^{hi} 亚群, 以降低细胞因子风暴产生风险。然而随着病毒感染进程的推进, F4/80^{lo} 巨噬细胞亚群可能定向发育为 F4/80^{hi} 亚群, 此时采用氯磷酸盐脂质体清除巨噬细胞后是否能够抑制过度激活、能够真正利于机体病毒清除还有待进一步研究。

前期研究发现, 功能异质性巨噬细胞亚群和组织特异性巨噬细胞亚群在白血病微环境中起着迥



注: A: 促炎因子 IL-6 基因表达的变化; B: 促炎因子 IFN α 基因表达的变化。F4/80 高表达亚群 Poly I:C 刺激前与刺激后比较; F4/80 高表达亚群加入抑制剂与未加入抑制剂的比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 阻断 JNK 信号活化后促炎因子 IL-6 和 IFN α 基因表达变化

Note. A, Relative expression of IL-6. B, IFN α . F4/80^{hi} subset after Poly I:C stimulation compared with before Poly I:C stimulation, F4/80^{hi} subset with SP600/25 stimulation compared with without SP600/25 stimulation, * $P < 0.05$.

Figure 3 Relative expression level of pro-inflammatory factors IL-6 and IFN α when phosphorylation of JNK signal pathway was attenuated

然相异的作用,其激活信号通路途径也不尽相同^[19-21]。相较于脾巨噬细胞亚群,骨髓巨噬细胞亚群 IRF7 基因表达显著上调并活化 JNK 信号通路,诱导其促炎 M1 型表型与功能^[12]。本研究发现, F4/80^{hi}巨噬细胞亚群在病毒感染后 IRF7 基因高表达,且 JNK 磷酸化激活,提示我们 IRF7-JNK 通路可能在成熟巨噬细胞抗病毒早期免疫应答过程中起着重要作用。因此,采用 SP600125 等抑制 JNK 通路激活的化学类抑制剂,亦可作为阻断巨噬细胞过度激活的有效手段。

综上,研究异质性巨噬细胞在病毒感染免疫应答与活化中的作用与机制,进而探讨并开发新的免疫抑制剂与靶向小分子抑制剂,对防止或延缓病毒侵袭导致细胞因子风暴的发生具有重要意义,同时将为疾病的预防与治疗提供积极的帮助。

参考文献:

- [1] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization; *In vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795.
- [2] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [3] 王佳, 李丽, 黎冰林, 等. 抑制巨噬细胞 Act 1 表达对黑色素瘤肺转移的影响 [J]. *中国比较医学杂志*. 2019, 29(4): 1-6.
- [4] Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and tissue specialization [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 643-675.
- [5] 仰明明, 牛婷, 刘擎, 等. MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(3): 14-20.
- [6] Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment [J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1312-1326.
- [7] Yona S, Kim K, Wolf Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 79-91.
- [8] 陈瑶, 李云珠, 俞善昌, 等. Poly(I:C)模拟 RNA 病毒在气道炎症研究中的应用 [J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(8): 768-771.
- [9] 朱博, 冷静, 王坤. TLR 信号转导通路及其抗病毒感染机制的研究现状 [J]. *现代免疫学*, 2012, 32(4): 348-353.
- [10] 彭卓颖, 李想, 丛喆, 等. 流式细胞术分析 PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞的表型特征 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(10): 10-15, 22.
- [11] Siednienko J, Gajanayake T, Fitzgerald KA, et al. Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN-beta and RANTES production [J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 2514-2522.
- [12] Yang X, Feng W, Wang R, et al. Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 7(4): e1412910.
- [13] 张海祥, 谢鑫, 张科进, 等. 细胞因子风暴在流行性感病毒感冒病毒感染中的作用及防治研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(5): 556-559.
- [14] 王伟. 细胞因子风暴在流感病毒诱导的急性肺损伤中作用机制的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2015.
- [15] Lee YS, Yoon SJ, Kwon TK, et al. Immune response induced by immunization with Hepatitis B virus core DNA isolated from chronic active hepatitis patients [J]. *Immunol Lett*, 2001, 78(1): 13-20.
- [16] Munks MW, Pinto AK, Doom CM, et al. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection [J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7235-7241.
- [17] Cole SL, Dunning J, Kok WL, et al. M1-like monocytes are a major immunological determinant of severity in previously healthy adults with life-threatening influenza [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(7): e91868.
- [18] 陈冲, 冯文利, 王荣, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞的异质性观察 [J]. *山东医药*, 2016, 56(42): 40-42.
- [19] Yang X, Feng W, Wang R, et al. Hepatic leukemia-associated macrophages exhibit a pro-inflammatory phenotype in Notch1-induced acute T cell leukemia [J]. *Immunobiology*, 2018, 223(1): 73-80.
- [20] Chen S, Yang X, Feng W, et al. Characterization of peritoneal leukemia-associated macrophages in Notch1-induced mouse T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Mol Immunol*, 2017, 81: 35-41.
- [21] Chen SY, Yang X, Feng WL, et al. Organ-specific microenvironment modifies diverse functional and phenotypic characteristics of leukemia-associated macrophages in mouse T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Immunol*, 2015, 194(6): 2919-2929.

[收稿日期] 2020-04-01

董晓筱,李博野,张季瑶,等.五种植物粗多糖诱导小鼠骨髓来源树突状细胞成熟的体外筛选[J].中国比较医学杂志,2020,30(11):23-27.

Dong XX, Li BY, Zhang JY, et al. *In vitro* screening of mouse bone marrow-derived dendritic cells induced by five plant polysaccharides [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 23-27.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.004

五种植物粗多糖诱导小鼠骨髓来源树突状细胞成熟的体外筛选

董晓筱¹,李博野²,张季瑶¹,陈颖³,胡秦^{1*},彭博^{3*}

(1.北京工业大学生命科学与生物工程学院,北京 100124; 2.北京工业大学环境与能源工程学院,北京 100124; 3.中国中医科学院中药研究所,北京 100124)

【摘要】 目的 比较灵芝、枸杞、云芝、黄芪、香菇五种植物粗多糖对 C57BL/6 小鼠骨髓来源树突状细胞 (bone marrow-derived dendritic cells, BMDC) 的体外诱导功能。方法 采用 GM-CSF 体外诱导和培养 C57BL/6 小鼠 BMDC 细胞,体外培养 6 d 后,分别加入灵芝、枸杞、云芝、黄芪和香菇五种植物粗多糖进行培养,24 h 后,采用流式细胞术检测细胞表面 CD80、CD86 及 MHCII 分子的表达,采用 ELISA 检测 BMDC 细胞培养上清中细胞因子 IL-6、IL-12 和 TFN- α 的含量。结果 云芝多糖可显著诱导 BMDC 细胞表达的 CD80、CD86 和 MHCII 分子表达上调,并刺激 BMDC 细胞释放 IL-6、IL-12p40 和 TFN- α 。枸杞多糖、灵芝多糖和香菇多糖仅显著性的诱导 IL-6 释放增加。结论 云芝多糖对 BMDC 具有较强的诱导作用,具有潜在的疫苗佐剂活性。

【关键词】 多糖;树突状细胞;云芝多糖;佐剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0023-05

In vitro screening of mouse bone marrow-derived dendritic cells induced by five plant polysaccharides

DONG Xiaoxiao¹, LI Boye², ZHANG Jiyao¹, CHEN Yin³, HU Qin^{1*}, PENG Bo^{3*}

(1. College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China.

2. College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124.

3. Institute of Chinese Materia Medica; China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

【Abstract】 Objective To investigate the adjuvant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*, *Lycium barbaru*, *Versicolor*, *Astragalus* and *Lentinan* on bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) from C57BL/6 mice. **Methods** Bone marrow cells from C57BL/6 mice were cultured in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor GM-CSF. After 6 days, immature BMDCs were collected and co-cultured with the polysaccharides of *G. lucidum*, *L. barbaru*, *Versicolor*, *Astragalus* or *Lentinula*. CpG oligodeoxynucleotides were used as a positive control. The cell surface expression of CD80, CD86 and MHCII were detected by fluorescence-activated cell sorting analysis. The release

【基金项目】国家自然科学基金(81760783);北京市自然科学基金(7182012);“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101002-002-008)。

【作者简介】董晓筱(1995—),女,硕士研究生,研究方向:免疫佐剂。E-mail: DXX9501@163.com

【通信作者】胡秦(1983—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:免疫学。E-mail: hq07616@bjut.edu.cn

彭博(1979—),女,研究员,研究方向:肿瘤药理。E-mail: bpeng@icmm.ac.cn * 共同通信作者

of cytokines interleukin (IL)-6, IL-12 and tumor necrosis factor TFN- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Versicolor polysaccharides significantly upregulated the surface expression of CD80, CD86 and MHCII on BMDCs, as well as the release of the cytokines IL-6, IL-12 and TFN- α compared with the control group. **Conclusions** Versicolor polysaccharides promoted the maturation of BMDCs *in vitro* and may have potential as an adjuvant for vaccine preparations.

【Keywords】 polysaccharide; dendritic cells; Versicolor; adjuvant

树突状细胞(dendritic cells, DC)由造血干细胞分化,经历前体细胞、未成熟树突状细胞和成熟树突状细胞三个阶段。机体内的 DC 分布较为广泛,常定居于脾、淋巴结、表皮等部位^[1]。作为哺乳动物的一种抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),DC 不仅具有摄取、加工、处理及呈递抗原的能力,同时也可释放多种细胞因子,提呈抗原并激活初始 T 细胞,进一步启动 T 细胞免疫反应^[2],因而在机体固有免疫和适应性免疫应答中均起着重要的作用。近年来,人们已经可以通过使用多种细胞因子,如 GM-CSF、IL-4、Flt3 等^[3]方法来诱导骨髓细胞体外定向分化为骨髓来源的树突状细胞(BMDC),BMDC 的体外培养和成熟活化实验已被广泛应用于佐剂筛选、免疫激活等相关研究中。

多糖是植物体内的一类重要化学物质,不仅在植物体内含量较高,而且还具有丰富的生物学功能。目前,对于植物多糖的研究主要包括免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等方面^[4-5]。植物多糖具有安全性较高、天然可降解性、免疫原性低、毒副作用小等优点。本文选用了灵芝多糖、枸杞多糖、香菇多糖、黄芪多糖、云芝多糖五种粗多糖分别检测了它们对于 BMDC 的体外诱导成熟作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 21 只,6~8 周龄,20~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],实验动物饲养于中国中医科学院基础理论研究所[SYXK(京)2016-0021],严格按照中国中医科学院中国中医科学院中医基础理论研究所伦理要求进行动物实验(20190901058),在实验研究过程中遵守“3R”原则,并给予实验小鼠应有的人道关怀。

1.2 主要试剂

灵芝提取物(生产批号:BCSW20180228-8);香菇提取物(生产批号:BCSW20180228-8);枸杞提取物(生产批号:BCSW20180228-8);云芝提取

物(生产批号:BCSW20180228-8)购于西安天象生物工程有限公司,采用热水浸提、醇沉和酶解工艺进行粗多糖的提取,多糖含量均在 50% 以上;注射用黄芪多糖购自伯恩公司(生产批号:151101)。CpG 1668 ODN (5'-tccatgacgttctctgatgct-3')由生工生物工程公司合成;RPMI1640 细胞培养基、胎牛血清(FBS)均购自 Gibco 公司;GM-CSF、IL-4 购于 PeproTech 公司;流式抗体 APC anti-mouse CD80、PerCp/Cy 5.5 anti-mouse CD40、PE anti-mouse I-A/I-E、FITC anti-mouse CD11c、anti-mouse CD16/32、小鼠 IL-6、IL-12p40 和 TFN- α 试剂盒均购自 BioLegend 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 植物粗多糖溶液制备

使用无内毒素的水分别溶解枸杞、灵芝、香菇、黄芪和云芝的粗多糖粉末,并调整浓度为 10 mg/mL,通过内毒素清除柱(Thermo Scientific)处理后,经 ToxinSensor 终点显色法内毒素检测试剂盒(Genscript)检测,内毒素含量均在 0.05 EU/mL 以下。多糖溶液经 0.22 μ m 滤膜过滤后,保存于-20 $^{\circ}$ C 下备用。

1.3.2 小鼠 BMDC 细胞培养

取 C57BL/6 小鼠脱臼处死,无菌分离股骨,经 RPMI1640 培养基反复冲洗骨髓,1000 r/min 离心后重悬于 RPMI1640 培养基中。细胞悬液以 1×10^6 /mL 密度接种于 6 孔板中,加入含 GM-CSF (20 ng/mL)的完全培养基(RPMI1640 培养基含 10% 灭活胎牛血清,双抗及 50 μ mol/L β -巯基乙醇(SIGMA))。每 2 d 对细胞进行换液。培养 6 d 后,收集悬浮或松散贴壁细胞(未成熟 BMDC)用于后续实验。

1.3.3 流式细胞仪测定细胞表面 CD80, CD86 和 MHCII 的表达

未成熟 BMDC 细胞使用 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,接种于 24 孔板中,分别加入枸杞粗多糖、灵芝粗多糖、香菇粗多糖、黄芪粗多糖和云芝粗多糖,终浓度为 100 μ g/mL。阴性对照组

加入不含药物的 RPMI1640 培养基,阳性对照组加入终浓度为 $4 \mu\text{g/mL}$ 的 CpG 1668 ODN。37°C, 80% 湿度, 5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 1000 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 经 anti-mouse CD16/32 封闭抗体封闭, 冰浴 10 min 后, 加入 APC-CD80、Percp/cy 5.5-CD86、PE-MHC II、FITC-CD11c 四种抗体于 4°C 避光染色 30 ~ 40 min。收集细胞, 采用 BD FACSCalibur 流式细胞仪进行检测, 通过 Flowjo v10 软件分析细胞表面分子表达。

1.3.4 酶联免疫吸附法测定 IL-6, IL-12p40 和 TFN- α

未成熟 BMDC 细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板中, 采用不同的粗多糖刺激 24 h 后, 收集细胞培养上清, 分别采用小鼠 IL-12p40, IL-6 和 TFN- α 检测试剂盒进行检测。采用酶标仪 (PerkinElmer) 测定 450 nm 下的吸光值 (OD 值), 并根据标准曲线计算样品中的细胞因子含量。

1.4 统计学方法

所有实验数据均采用 SPSS 25 软件进行统计学分析, 并通过 GraphPad Prism 5 软件进行作图。采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析比较各组之间的差异, 最终数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 植物粗多糖对 BMDC 细胞表面分子标志表达的影响

采用流式细胞仪检测粗多糖对 BMDC 细胞表面 CD80 和 CD86 表达的影响, 结果发现与阴性对照组 (CC 组) 相比, 阳性对照 CpG ODN 显著提高 BMDC 细胞表面 CD80, CD86 和 MHCII (I-Ab) 表达。云芝粗多糖显著上调 CD86 和 MHCII (I-Ab) 表达, 对 CD80 有一定上调作用, 但无显著性差异。黄芪粗多糖, 枸杞粗多糖, 灵芝粗多糖和香菇粗多糖均无明显作用 (如图 1)。结果表明云芝粗多糖可显著上调 BMDC 细胞表面细胞成熟相关分子的表达, 具有诱导 BMDC 细胞成熟的作用。

2.2 植物粗多糖对 BMDC 细胞分泌细胞因子的影响

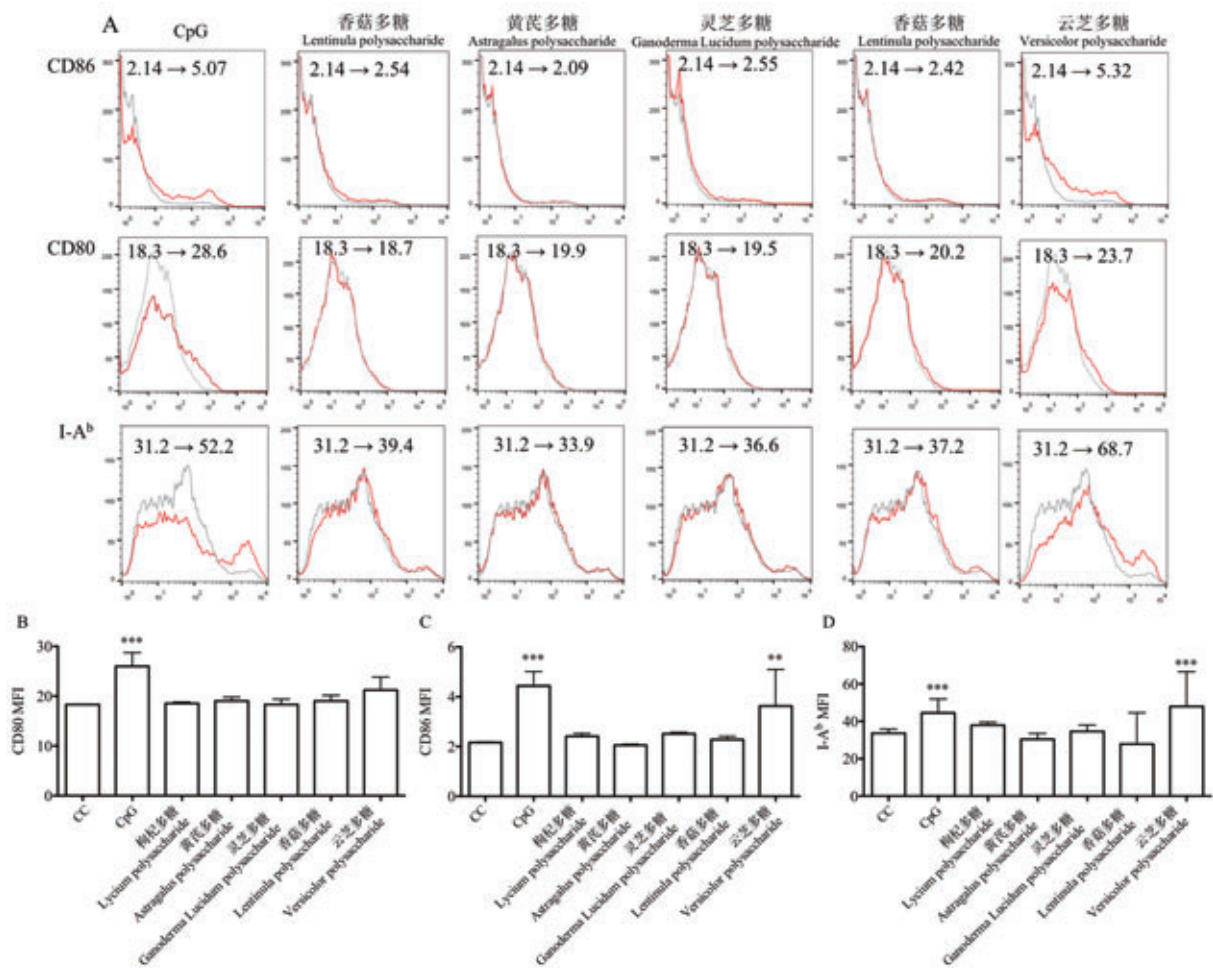
采用 ELISA 试剂盒检测五种植物粗多糖对 BMDC 细胞培养上清中 IL-6, IL-12p40 和 TFN- α 细胞因子的释放影响。结果发现, 与阴性对照组 (CC 组) 相比, 云芝粗多糖培养组和 CpG ODN 阳性对照

组均显著提升 BMDC 细胞培养上清中 IL-6 ($P < 0.001$), IL-12p40 ($P < 0.05$) 以及和 TFN- α ($P < 0.001$) 的含量。枸杞粗多糖 ($P < 0.05$), 灵芝粗多糖 ($P < 0.001$) 和香菇粗多糖 ($P < 0.05$) 组, BMDC 细胞培养上清中 IL-6 的释放显著性提高。其余组均可见不同程度的 IL-6, IL-12p40 和 TFN- α 表达上调, 但与对照组相比, 无显著性差异 (如图 2 所示)。因此, 云芝粗多糖可显著刺激 BMDC 细胞释放 IL-6, IL-12p40 和 TFN- α , 枸杞粗多糖, 灵芝粗多糖和香菇粗多糖可刺激 BMDC 细胞释放 IL-6。

3 讨论

近年来, 随着植物粗多糖药理学方面的研究应用逐渐深入, 植物多糖作为植物中极为重要的成分, 其预防或治疗疾病的功能也受到了重视, 主要活性包括抗肿瘤、抗病毒、降血脂血糖、抗氧化等^[6], 已有文献证明枸杞多糖、灵芝多糖、香菇多糖、黄芪多糖等都具有增强机体免疫能力, 促进炎症因子表达, 抗病毒、降血糖、诱导体液和细胞免疫应答等功能, 例如黄芪多糖已被用于口蹄疫疫苗、狂犬病疫苗、新城疫疫苗等疫苗佐剂^[7]; 云芝多糖可增强 NK 细胞的杀伤功能, 促进小鼠 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增值, 增强肿瘤坏死因子吞噬能力^[8-9]; 香菇多糖具有抗氧化作用, 可以抑制苯并芘诱导产生的氧化应激反应, 降低皮肤癌风险^[10], 可对糖尿病大鼠的脑组织起到保护作用^[11]; 灵芝多糖可激活 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及巨噬细胞等, 促进细胞因子分泌, 提高机体的免疫功能^[12]。本实验主要对比了灵芝、香菇、枸杞、黄芪、云芝几种粗多糖对于 BMDC 细胞的体外诱导成熟作用, 进一步研究其作为佐剂的潜力。

DC 作为机体内最为重要的一种 APC, 是机体固有免疫的参与者, 更是机体适应性免疫应答反应的启动者^[13]。未成熟的树突状细胞可以通过多种模式识别受体, 如 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLR) 感知抗原, 进一步成熟, 成熟 DC 的表面共刺激分子、分泌因子与趋化因子增多^[14-15], 除通过 MHC-II 类分子提成抗原激活 CD4^+ T 细胞外, DC 还可以通过 MHC-I 途径激活 CD8^+ T 细胞^[16], 更高效全面的发挥树突状细胞的免疫调节功能, 因此, DC 的活化及数量都关系着免疫系统的功能。随着对 DC 的研究发展, 发现其在过敏反应^[17]、感染性休克^[18]、抗肿瘤^[19]、疫苗佐剂研究等方面都起着至关

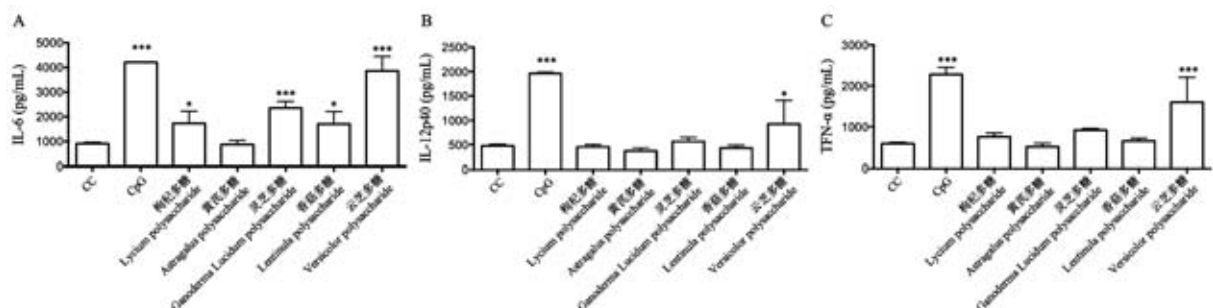


注:A: 五种粗多糖对 BMDC 细胞表面标志物表达的影响;B: CD80 的表达;C: CD86 的表达;D: I-A^b 的表达。与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 植物多糖对 BMDC 细胞表面标志分子表达的影响

Note. A, Effects of five polysaccharides on BMDC surface marker expression. B, CD80 expression on BMDCs. C, CD86 expression on BMDCs. D, I-A^b expression on BMDCs. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 1 Effects of plant polysaccharides on BMDC surface marker expression



注:A: IL-6 的释放情况;B: IL-12p40 的释放情况;C: TFN-α 的释放情况。与阴性对照组相比, * $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ 。

图 2 植物粗多糖对 BMDC 细胞释放细胞因子的影响

Note. A, Secretion of IL-6. B, Secretion of IL-12p40. C, Secretion of TFN-α. Compared with the CC group, * $P < 0.01$, *** $P < 0.01$.

Figure 2 Effects of plant polysaccharides on cytokines released by BMDC

重要的作用,已有文献证明,大多数肿瘤组织中的 DC 处于未成熟状态,肿瘤细胞诱导 DC 凋亡,并通过分泌细胞因子抑制 DC 的产生和成熟^[20],因此,DC 的成熟对机体的免疫反应起着重要的作用,对 DC 的诱导成熟也是研究疫苗佐剂的切入点。

本文中以 CpG ODN 做为阳性对照,使用五种不同的植物粗多糖对 BMDC 细胞进行体外培养,通过流式细胞术检测 BMDC 细胞表面标志分子 CD80, CD86 和 MHCII 的表达量的变化及 ELISA 检测 BMDC 细胞上清中 IL-6, IL-12p40 和 TFN- α 的含量。实验结果表明,云芝粗多糖与 BMDC 细胞共培养 24 h 后,细胞表面 CD80, CD86 和 MHCII 的表达量均有上调, BMDC 细胞分泌的 IL-6, IL-12p40 和 TFN- α 均有提升。综上所述,初步分析云芝粗多糖具有诱导 BMDC 细胞成熟的能力,因此也具有疫苗佐剂的潜在应用可能性,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 张兰兰, 闫军堂, 刘敏, 等. 小鼠骨髓源性树突细胞和脾源性树突细胞的形态及生物学性能对比 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(12): 1255-1259, 1297.
- [2] Sesti-Costa R, de Moraes-Vieira PMM, Cervantes-Barragan L. Dendritic cells: Immune response in infectious diseases and autoimmunity [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 2948525.
- [3] Roney Kelly. Bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1960: 57-62.
- [4] 朱喆, 蔡泓志, 李映波. 中草药提取物作为疫苗佐剂的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(5): 7-10.
- [5] 左博靖, 刘丽坤. 中药多糖对调节性 T 细胞在肿瘤免疫调节的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(2): 110-112.
- [6] 谢如欣, 季洁, 贺威. 多糖抗肿瘤免疫调节机制的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2019, 35(24): 3798-3801.
- [7] 孙永涛. 黄芪多糖对鸡新城疫疫苗免疫后 T 淋巴细胞的影响 [J]. 当代畜牧, 2018(8): 63-64.
- [8] 孙飞, 陶正中, 周忠海, 等. 云芝多糖增强人 NK 细胞杀伤功能的体外研究 [J]. 生物医学工程与临床, 2017, 21(2): 126-131.
- [9] Saleh MH, Rashedi I, Keating A. Immunomodulatory Properties of *Coriolus versicolor*: The role of polysaccharopeptide [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1087.
- [10] Zi Y, Jiang B, He C, et al. Lentian inhibits oxidative stress and inflammatory cytokine production induced by benzo(a) pyrene in human keratinocytes [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19(2): 502-507.
- [11] 吴步猛, 陈锡文, 李旭升, 等. 香菇多糖对糖尿病大鼠脑组织损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 12(3): 136-138, 插 3.
- [12] Wang X, Lin Z. Immunomodulating effect of ganoderma (Lingzhi) and possible mechanism [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1182: 1-37.
- [13] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18: 767-811.
- [14] Ayala-Cuellar AP, Cho J, Choi KC. Toll-like receptors: A pathway alluding to cancer control [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21707-21715.
- [15] Matsumoto M, Takeda Y, Seya T. Targeting toll-like receptor 3 in dendritic cells for cancer immunotherapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20(8): 937-946.
- [16] Colbert JD, Cruz FM, Rock KL. Cross-presentation of exogenous antigens on MHC I molecules [J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 64: 1-8.
- [17] 陈健, 柯逸晖, 陈彧, 等. 基于树突状细胞激活建立皮肤致敏的体外方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 114-118.
- [18] 李梦媛, 燕正强, 韦荣飞, 等. IL-37b 通过抑制树突状细胞相关的免疫应答缓解感染性休克 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 44-49.
- [19] Jiraviriyakul A, Songjang W, Kaewthet P, et al. Honokiol-enhanced cytotoxic T lymphocyte activity against cholangiocarcinoma cells mediated by dendritic cells pulsed with damage-associated molecular patterns [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(29): 3941-3955.
- [20] Bosch NC, Voll RE, Voskens CJ, et al. NF- κ B activation triggers NK-cell stimulation by monocyte-derived dendritic cells [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 1758835919891622.

[收稿日期] 2020-02-21

孙偲丰,王莹,杨彦琴,等. 姜黄素增强 PTEN 野生型三阴性乳腺癌细胞对 PARP1 抑制剂敏感性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 28-33.

Sun CF, Wang Y, Yang YQ, et al. Curcumin sensitizes wild-type PTEN breast cancer cells to PARP1 inhibitors [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 28-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.005

姜黄素增强 PTEN 野生型三阴性乳腺癌细胞对 PARP1 抑制剂敏感性的研究

孙偲丰¹, 王莹¹, 杨彦琴², 玄基泽³, 张斌⁴, 秦元华⁵, 茅卫锋^{1*}

(1.大连医科大学基础医学院生物技术系,辽宁大连 116044; 2.大连医科大学附属第二医院肿瘤放射治疗科,辽宁大连 116011; 3.大连医科大学附属第二医院病理科,辽宁大连 116011; 4.大连医科大学第一附属医院肿瘤科,辽宁大连 116011; 5.大连医科大学基础医学院寄生虫系,辽宁大连 116044)

【摘要】 目的 研究姜黄素增强 PTEN(磷酸酶和张力蛋白同系物)野生型三阴性乳腺癌细胞对于 PARP1 抑制剂奥拉帕尼(Olaparib)的敏感性及其潜在的作用机制,从而为 PTEN 野生型三阴性乳腺癌病人的临床治疗提供新方案。方法 使用 PTEN 缺陷三阴性乳腺癌细胞株 BT549 和 PTEN 野生型细胞株 BT549-PTEN 进行实验。MTT 实验检测两种细胞在奥拉帕尼作用下的存活率。蛋白质印迹实验检测 PTEN 缺陷型和野生型细胞中同源重组修复关键蛋白 RAD51 的表达。彗星实验检测姜黄素及姜黄素与奥拉帕尼联合使用后细胞 DNA 的损伤程度。蛋白质印迹检测姜黄素作用后 RAD51 变化。结果 PTEN 可通过增加 RAD51 的方式促进 DNA 损伤的修复。与 PTEN 缺陷型细胞相比,野生型细胞对于奥拉帕尼的作用较不敏感。姜黄素能够通过抑制 RAD51 的方式抑制 PTEN 介导的 DNA 修复,并增强 PTEN 野生型三阴性乳腺癌对奥拉帕尼的敏感性。结论 姜黄素通过抑制 PTEN 介导的 DNA 修复使 PTEN 野生型乳腺癌细胞对 PARP1 抑制剂奥拉帕尼敏感。

【关键词】 姜黄素;PTEN;三阴性乳腺癌;DNA 修复;奥拉帕尼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0028-06

Curcumin sensitizes wild-type PTEN breast cancer cells to PARP1 inhibitors

SUN Caifeng¹, WANG Ying¹, YANG Yanqin², XUAN Jize³, ZHANG Bin⁴, QING Yuanhua⁵, MAO Weifeng^{1*}

(1. Department of Biotechnology, School of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China.

2. Department of Radiation Oncology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011.

3. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011.

4. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011.

5. Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044)

【Abstract】 **Objective** This research aimed to: (1) investigate the effects of curcumin in phosphatase and tensin homolog (PTEN)-mediated DNA repair and in the sensitization of wild-type PTEN triple-negative breast cancer cells to Olaparib, a poly ADP ribose polymerase (PARP) 1 inhibitor; and (2) provide a new therapeutic strategy for patients with

【基金项目】 国家自然科学基金(31371254)。

【作者简介】 孙偲丰(1992—),女,硕士研究生,专业:生物技术。E-mail:1443447746@qq.com

【通信作者】 茅卫锋(1977—),男,副教授,研究方向:DNA 损伤修复和基因组稳定性。E-mail:maoweifeng@dmu.edu.cn

wild-type PTEN triple-negative breast cancer in the clinical setting. **Methods** Wild-type PTEN and PTEN-deficient variants of the triple-negative breast cancer cell line BT549 were used. MTT was used to assay the cell survival rate. Western blot was performed to detect the expression of RAD51 (a key protein in homologous recombination repair) in wild-type PTEN cells. The comet assay was used to measure the DNA damage caused by curcumin and olaparib. Western blot was used to detect RAD51 after curcumin treatment. **Results** Wild-type PTEN cells were less sensitive to olaparib than PTEN-deficient BT549 cells. PTEN promoted DNA repair by increasing the expression of RAD51. Curcumin inhibited PTEN-mediated DNA repair by inhibiting RAD51 and enhanced the sensitivity of wild-type PTEN triple-negative breast cancer cells to olaparib. **Conclusions** Curcumin inhibited PTEN-mediated DNA repair and sensitized wild-type PTEN breast cancer cells to olaparib.

[Keywords] curcumin; PTEN; triple negative breast cancer; DNA repair; Olaparib

乳腺癌是发生于女性中最恶性的肿瘤之一,每年约有 458,000 人死于乳腺癌^[1-2]。三阴性乳腺癌是雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和原癌基因 Her-2 都为阴性的一种乳腺癌。由于是三阴性,常规靶向药物无法对其产生作用,只能按照常规化疗治疗,但这种治疗效果较差,伴随低疗效、高复发的特性。PARP1 抑制剂作为一种新型的靶向 PARP1 的分子靶向药物,近年来在乳腺癌治疗中表现出较好的疗效。PARP1 是 PARP 家族的主要成员,其可将 ADP-核糖基团转移至靶蛋白^[3-5]。一旦 DNA 断裂发生,PARP1 作为单链断裂(SSB)修复中的关键因子可以感知损伤并快速结合到断裂位点并使自身核糖基化,并进一步催化靶蛋白的核糖基化,招募 DNA 修复蛋白进行 DNA 修复^[6]。因此 PARP1 抑制剂奥拉帕尼作为抗肿瘤药物具有良好效果,并已在临床上用于治疗乳腺癌和卵巢癌^[7-8]。据报道,奥拉帕尼可有效抑制 BRCA1 和 PTEN 缺陷肿瘤细胞的生长,显示出 PARP1 和 BRCA1/PTEN 的合成致死性。然而,野生型 PTEN 的肿瘤细胞表现出对 PARP1 抑制剂的不敏感性^[9],因此,急需寻找可以增加野生型 PTEN 肿瘤细胞对奥拉帕尼敏感性的协同剂。

磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)是位于人类基因组 10q23.3 上的抑癌基因表达的蛋白,PTEN 通过参与 PI3K 途径而在细胞增殖中起作用^[10-11]。PTEN 突变经常发生在各种类型的癌症中^[12-13]。PTEN 还促进 DNA 修复以维持染色体的稳定性^[14-15]。PTEN 能增强肿瘤细胞对化疗药物抗性^[16]。PTEN 与复制蛋白 A1 协同作用,可以保护 DNA 复制叉并增强 RAD51 介导的同源重组(HR)。然而,PTEN 在 DNA 修复中的具体作用仍未明确^[9,15]。

姜黄素是一种从姜黄根中分离出来的天然化合物,具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤活性^[17-22]。姜黄素易获得,价格便宜,常用作膳食调味品^[23-24]。据

报道,姜黄素可抑制不同类型肿瘤细胞的生长,并使癌细胞对阿霉素和 5-FU 敏感^[25]。本研究主要探讨了姜黄素对 PTEN 介导的 DNA 修复的作用及其潜在机制。这些结果可扩展姜黄素在 PTEN 野生型三阴性乳腺癌治疗中的应用,也可以为异常 PTEN 肿瘤细胞的个性化治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人乳腺癌细胞系 BT549 从美国组织培养物收集中心(ATCC,美国)购得,是 PTEN 缺陷的三阴性乳腺癌细胞系。细胞在含有 10% FBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, 以色列), 1% 青霉素和链霉素 (Gibico, 美国) 的 RPMI 1640 (Hyclone, 美国) 中培养。本实验室稳转 PTEN 基因到 BT549 中, 获得含 PTEN 基因的 BT549, 代表野生型 BT549。

1.2 主要试剂

PTEN 的抗体(sc-9145)购自 Santa Cruz (美国); β -肌动蛋白(66009-1-1g)、PARP1(13371-1-AP)、微管蛋白(11224-1AP)、RAD51(14961-1-AP)的抗体购自 Proteintech (美国)。PARP 抑制剂奥拉帕尼(S1060)、姜黄素(S1814)购自 Selleck (美国); 苯甲基磺酰氟(PMSF); 蛋白酶抑制剂(B14001, Selleck, 美国); 磷酸酶抑制剂(B15001, Selleck, 美国); Fluorometer Qubit 2.0 (Invitrogen, 美国); MTT、NaCl、EDTA、Tris、肌氨酸钠、Tripton X-100、DMSO、NaOH(生工, 中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白质印迹

用含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 1×蛋白酶抑制剂和 1×磷酸酶抑制剂的冰冷 RIPA 缓冲液裂解细胞; Fluorometer Qubit 2.0 测定总蛋白浓度; 使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离细胞裂解物; 将凝胶上

的蛋白转移至 PVDF 膜,使用各种抗体(稀释比 1:500)检测蛋白质。

1.3.2 MTT 检测

将细胞(4000 个细胞/孔)接种在 96 孔板中。待细胞贴壁后,加入药物,与细胞一起温育 48 h。取出药物,然后将 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)加入 96 孔板,与细胞一起温育 4 h。除去培养基后加入 150 μ L 的 DMSO,492 nm 处读取吸光度。

1.3.3 彗星实验

40 μ mol/L 姜黄素或 80 μ mol/L 奥拉帕尼处理细胞后,取 5000 个细胞包埋在低熔点琼脂糖的载玻片上。将载玻片浸入冰冷的裂解缓冲液(2.5 mol/L NaCl,100 mmol/L EDTA,10 mmol/L Tris,1%肌氨酸钠,1% Triton X-100,10% DMSO)裂解 40 min。然后将载玻片放入碱性缓冲液(1 mmol/L EDTA,300 mmol/L NaOH)中电泳。用溴化乙锭染色后,显微镜分析结果。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 6.0 软件完成数据分析。单因素方差分析和 *Turkey's* 检验用于确定其显著性。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义,其中*代表 $P < 0.05$,**代表 $P < 0.01$,***代表 $P < 0.001$ 。所有实验均重复三次,结果表示为平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)。

2 结果

2.1 PTEN 上调 RAD51 的表达增强 DNA 修复

如图 1 所示,野生型 BT549 与 BT549 的细胞存

活曲线(图 1A)显示两者间没有生长差异(图 1B)。

MTT 测定显示 EV 细胞对奥拉帕尼敏感,而 PTEN 细胞对奥拉帕尼耐药。这些结果表明野生型 PTEN 细胞对新型分子靶向药物奥拉帕尼耐受(图 2A)。随后,蛋白质印迹实验检测了两种细胞 RAD51 的水平(图 2B),显示 PTEN 野生型细胞的 RAD51 表达更高,表明 PTEN 增加 RAD51 介导的同源重组修复以促进 DNA 修复。

2.2 姜黄素增强奥拉帕尼诱导的 DNA 断裂

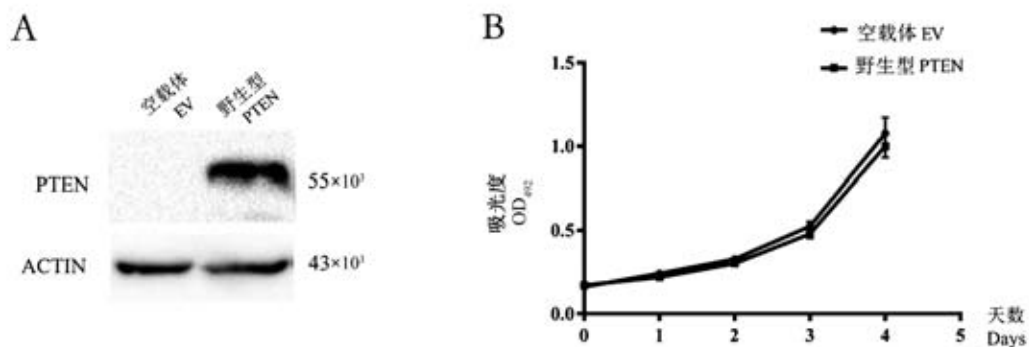
接下来分析了姜黄素对 PTEN 促进 DNA 修复的影响。用奥拉帕尼处理 PTEN 野生型细胞 24 h 后,通过彗星试验检测 DNA 断裂。图中显示姜黄素诱导 DNA 的断裂。更重要的是,与单种药物产生的彗尾相比,姜黄素与奥拉帕尼的联合使用明显增加了彗尾(图 3A、3B)。这些结果表明姜黄素促进 PTEN 野生型细胞中奥拉帕尼诱导的 DNA 断裂。

2.3 姜黄素降低 PTEN 乳腺癌细胞中 RAD51 的表达

随后分析了姜黄素增强 PTEN 野生型乳腺癌细胞对奥拉帕尼敏感性的潜在机制。用姜黄素处理后,RAD51 水平以剂量依赖性方式降低(图 4)。因此,姜黄素会降低 RAD51 的表达,从而减轻 PTEN 介导的 DNA 修复。此外,我们还发现姜黄素降低了 PARP1 的水平,这表明姜黄素可能同样影响 PARP1 参与的 DNA 修复(图 4)。

2.4 姜黄素使 PTEN 野生型细胞对奥拉帕尼敏感

我们用 MTT 实验检测了姜黄素和奥拉帕尼联合处理的 PTEN 野生型细胞的生长曲线,与单药奥

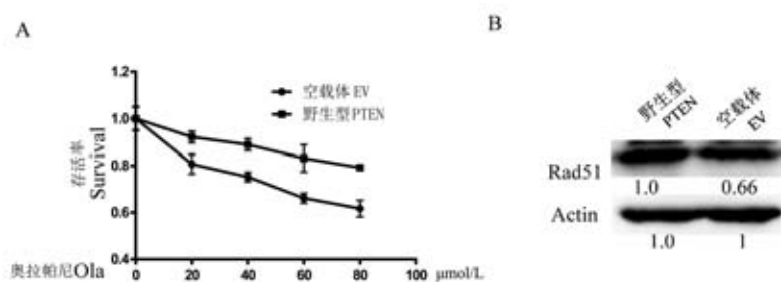


注:A:通过蛋白质印迹法分别检测转染 PTEN 基因、空载体的 BT549 细胞中 PTEN 的表达;B:PTEN 细胞和 EV(空载体)细胞通过 MTT 法测定的生长曲线。PTEN:稳定转染 PTEN 的 BT529 细胞,EV:转染空载体的 BT549 细胞。

图 1 PTEN 基因的 BT529 细胞和转染空载体(EV)的 BT549 细胞的生长曲线

Note. A, Expression of PTEN in BT549 cells transfected with PTEN gene and empty vector was detected by Western blot. B, Growth curves of PTEN cells and EV cells were tested by MTT assay. PTEN, BT529 cells stably transfected with PTEN. EV, BT549 cells transfected with empty vector.

Figure 1 Growth curves of PTEN-transfected BT529 cells and empty vector-transfected BT549 cells

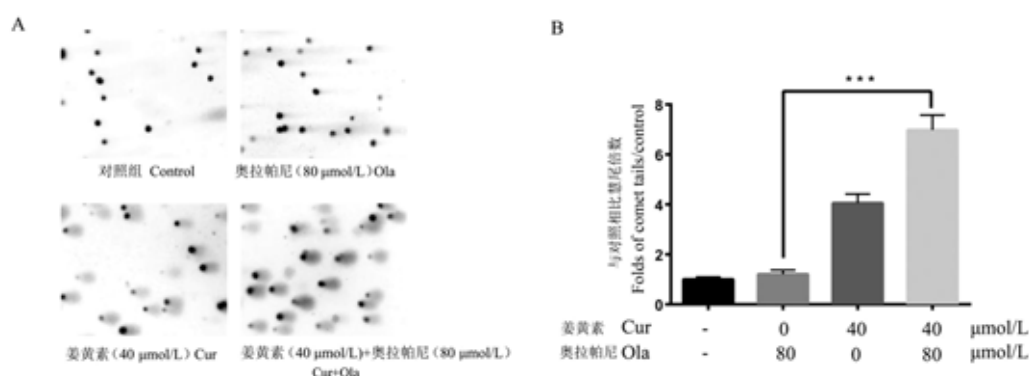


注:A:用不同剂量的奥拉帕尼处理 24 h 后,与转染空载体的 BT549 细胞相比,PTEN 细胞具有 olaparib 抗性;B:蛋白质印迹显示,与 EV 细胞中的 RAD51 水平相比,PTEN 上调 RAD51 的表达。

图 2 PTEN 上调 RAD51 表达,增强 PTEN 野生型 BT549 对 PARP1 抑制剂奥拉帕尼的耐受

Note. A, After treatment with different doses of Olaparib for 24 hours, PTEN cells were resistant to olaparib compared to BT549 cells transfected with an empty vector. B, Western blot shows that PTEN up-regulates RAD51 expression compared to RAD51 levels in EV cells.

Figure 2 PTEN upregulates RAD51-mediated resistance of PTEN wild-type BT549 to the PARP1 inhibitor, Olaparib



注:A:用奥拉帕尼或姜黄素处理转染 PTEN 的 BT549 细胞 12 h。彗星实验显示,40 μmol/L 姜黄素增加了彗尾,并促进了奥拉帕尼(80 μmol/L)诱导的 PTEN 细胞的彗尾;B:分析彗星实验中的 30 个彗尾。单因素方差分析和 Turkey's 检验,与奥拉帕尼治疗组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 姜黄素促进奥拉帕尼处理后的 PTEN 细胞中的 DNA 断裂

Note. A, BT549 cells transfected with PTEN were treated with Olaparib or curcumin for 12 hours. The comet assay showed that 40 μmol/L curcumin increased the comet tail and promoted the comet tail of PTEN cells induced by Olaparib (80 μmol/L). B, Analysis of 30 comet tails in comet experiments. One-way analysis of variance and Turkey's test, compared with the Olaparib treatment group, *** $P < 0.001$.

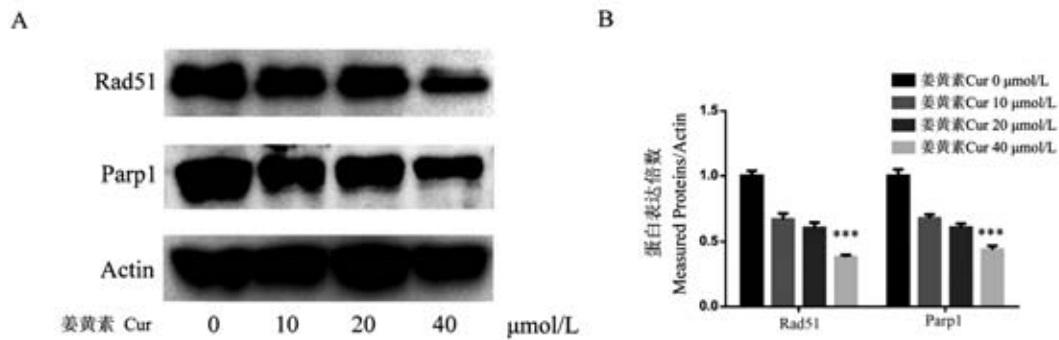
Figure 3 Curcumin promotes DNA breaks in PTEN cells treated with Olaparib

拉帕尼或姜黄素相比,显示出姜黄素以剂量依赖性方式使 PTEN 野生型细胞对奥拉帕尼敏感(图 5A、5B)。这些结果表明,姜黄素与奥拉帕尼联合使用时,PTEN 野生型癌细胞更加敏感。

3 讨论

PTEN 是癌细胞中高度突变的抑癌基因,是癌症治疗的潜在靶标靶标^[12]。最近的报道显示 PTEN 具有 DNA 修复能力,使得 PTEN 野生型肿瘤细胞具有 DNA 损伤药物抗性^[9,16],因此研究 PTEN 引起的肿瘤化疗耐药性具有重要意义。奥拉帕尼是 PARP1 抑制剂,通过抑制 PARP1 活性以抑制单链

断裂修复^[7]。PARP1 抑制剂不直接诱导 DNA 断裂,因此它具有低毒性并且是有前景的抗肿瘤药物。奥拉帕尼已被临床用于治疗卵巢癌和乳腺癌。然而,奥拉帕尼的作用依赖于肿瘤细胞的遗传背景。BRCA 异常癌细胞对奥拉帕尼敏感,而 BRCA 和 PTEN 野生型细胞对奥拉帕尼耐药^[7]。由于 PTEN 在 DNA 修复中的功能尚不清楚,因此很少报道能使 PTEN 野生型肿瘤细胞敏感的药物。据报道 RI-1 是一种 RAD51 抑制剂,可增加 PTEN 肿瘤细胞对顺铂的敏感性。然而,RI-1 也不是临床试剂。此外,抑制 RAD51 并不能完全降低 PTEN 的 DNA 修复能力。

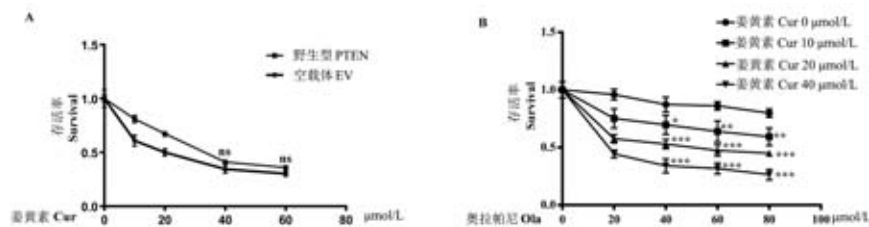


注:蛋白质印迹结果显示姜黄素降低了 PTEN 细胞中 Rad51 和 PARP1 的水平。每个 Western 数值均由三次实验完成,其中对照数值设定为 1。*Turkey's* 检验,*** $P < 0.001$ 。

图 4 姜黄素降低了 PTEN 细胞中 RAD51 的水平

Note. Western blot results showed that curcumin reduced the levels of RAD51 and PARP1 in PTEN cells. Each Western value was completed by three experiments. The control value was set 1. *Turkey's* test, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Curcumin decreases the levels of RAD51 which is up-regulated in PTEN cells



注: A:姜黄素单药处理 PTEN 细胞与 EV 细胞后的存活曲线; B:MTT 实验检测姜黄素与奥拉帕尼联合使用后,PTEN 细胞的存活曲线。单因素方差分析和 *Turkey's* 检验,与奥拉帕尼治疗组相比,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。

图 5 姜黄素使转染 PTEN 的 BT549 细胞对奥拉帕尼敏感

Note. A, Survival curves of curcumin monotherapy on PTEN cells and EV cells. B, MTT test to detect the survival curve of PTEN cells after curcumin was combined with Olaparib. One-way analysis of variance and *Turkey's* test, compared with Olaparib treatment group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Figure 5 Curcumin sensitizes PTEN-transfected BT549 cells to Olaparib

几个世纪以来,姜黄素一直被用作食用性香料,且在 I 期人体试验中,受试者每天使用量高达 8000 mg,持续 3 个月仍没有显示出毒性^[23]。据报道,姜黄素还具有抗肿瘤活性并可抑制多种 DNA 修复途径^[25],姜黄素干预 N-甲基亚硝基脲诱发膀胱癌^[26]。针对三阴性乳腺癌的耐化疗药物特性^[27],本研究分析了姜黄素对于 PTEN 的 DNA 修复能力的影响,同时分析了姜黄素对奥拉帕尼处理 PTEN 野生型三阴性乳腺癌细胞敏感性的影响。本研究发现 PTEN 促进奥拉帕尼诱导 DNA 损伤的修复,细胞生长曲线显示 PTEN 有助于肿瘤细胞抵抗奥拉帕尼。用姜黄素处理后,彗星实验显示 PTEN 野生型肿瘤细胞中的 DNA 断裂增加。MTT 实验显示姜黄素增加 PTEN 野生型肿瘤细胞对奥拉帕尼的敏感。我们的研究表明,姜黄素可以抑制 PTEN 促进的 DNA 修复。

RAD51 是 HR 中的关键因子,据报道,它在 PTEN 促进 DNA 的修复中起较为重要的作用^[9]。我们发现姜黄素明显降低了 RAD51 的水平。该结果表明姜黄素干扰 RAD51 介导的 HR 并且可以通过降低 RAD51 水平影响 PTEN 介导的 DNA 修复。另外我们还发现姜黄素明显降低了 PARP1 的水平。PARP1 是修饰蛋白质的聚-ADP-核糖基化 (PARylation) 的酶,可添加的多聚 ADP-核糖 (PAR) 至靶标蛋白进而改变蛋白的电荷从而影响它们与 DNA 的相互作用^[5]。许多 DNA 修复因子,如 XRCC1, Ku70 和 DNA-PKcs 均是 PARP1 的靶标。由于 PARP1 影响 DNA 修复因子和 DNA 断裂位点之间的相互作用,因此 PARP1 被认为参与多种 DNA 修复途径。姜黄素降低 PARP1 的水平,表明姜黄素除了对 RAD51 介导的 HR 有影响外还可以干扰其他 DNA 修复途径。总之,本文的研究表明姜

黄素可以抑制 PTEN 的 DNA 修复并使 PTEN 野生型癌细胞对奥拉帕尼敏感。

综上所述, 这些结果表明姜黄素通过抑制 RAD51 介导的同源重组达到抑制 PTEN 的 DNA 修复能力, 从而使 PTEN 野生型乳腺癌细胞对 PARP1 抑制剂敏感。这些发现将促进姜黄素在具有不同基因型 PTEN 肿瘤细胞的临床个体化治疗中的应用。

参考文献:

- [1] Bray F, Jemal A, Grey N, et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(8): 790–801.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359–E386.
- [3] El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, et al. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(19): 5526–5533.
- [4] Morrison C, Smith GC, Stingl L, et al. Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis [J]. *Nat Genet*, 1997, 17(4): 479–482.
- [5] Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(7): 411–424.
- [6] Heale JT, Ball AR Jr, Schmiesing JA, et al. Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(6): 837–848.
- [7] Livraghi L, Garber JE. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects [J]. *BMC Med*, 2015, 13: 188.
- [8] Lord CJ, Tutt AN, Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 455–470.
- [9] Guan J, Zhao Q, Mao W. Nuclear PTEN interferes with binding of Ku70 at double-strand breaks through post-translational poly(ADP-ribose)ylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(12): 3106–3115.
- [10] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, 275(5308): 1943–1947.
- [11] Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 219–225.
- [12] Guldberg P, Thor Straten P, Birck A, et al. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(17): 3660–3663.
- [13] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers [J]. *Nat Genet*, 1997, 15(4): 356–362.
- [14] Chen ZH, Zhu M, Yang J, et al. PTEN interacts with histone H1 and controls chromatin condensation [J]. *Cell Rep*, 2014, 8(6): 2003–2014.
- [15] Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity [J]. *Cell*, 2007, 128(1): 157–170.
- [16] Bassi C, Ho J, Srikumar T, et al. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress [J]. *Science*, 2013, 341(6144): 395–399.
- [17] Xu Y, Liu L. Curcumin alleviates macrophage activation and lung inflammation induced by influenza virus infection through inhibiting the NF- κ B signaling pathway [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2017, 11(5): 457–463.
- [18] Ahmed AY, Gad AM, El-Raouf OMA. Curcumin ameliorates diclofenac sodium-induced nephrotoxicity in male albino rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(10): 10.
- [19] Lee HY, Kim SW, Lee GH, et al. Curcumin and Curcuma longa L. extract ameliorate lipid accumulation through the regulation of the endoplasmic reticulum redox and ER stress [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6513.
- [20] Mohanty C, Sahoo SK. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(10): 1582–1592.
- [21] Li H, Krstin S, Wink M. Modulation of multidrug resistant in cancer cells by EGCG, tannic acid and curcumin [J]. *Phytomedicine*, 2018, 50: 213–222.
- [22] Eser A, Hizli D, Haltas H, et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model [J]. *Biomed Rep*, 2015, 3(6): 807–813.
- [23] Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curcumin”: from kitchen to clinic [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(4): 787–809.
- [24] Banik U, Parasuraman S, Adhikary AK, et al. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 98.
- [25] Fan YX, Abulimiti P, Zhang HL, et al. Mechanism of reversal of multidrug resistance by curcumin in human colorectal cancer cell line HCT-8/5-FU [J]. *Genet Mol Res*, 2017, 16(2): 10.4238/gmr16029414.
- [26] 吴金生, 王清明, 郑传秋, 等. 姜黄素对 N-甲基亚硝基脲诱发膀胱癌大鼠化学干预作用及机制分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(5): 567–571.
- [27] 李日飞, 袁娜, 冶冬阳, 等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(2): 113–118.

[收稿日期] 2020-03-11

于忠娟,柴峰,时宝林,等. 缬草酸对癫痫小鼠神经元保护及 P-糖蛋白表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 34-39.

Yu ZJ, Chai F, Shi BL, et al. Effect of valeric acid on neuronal protection and P-glycoprotein expression in epileptic mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 34-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.006

缬草酸对癫痫小鼠神经元保护及 P-糖蛋白表达的影响

于忠娟¹,柴峰¹,时宝林^{2*},张跃其²,吴春丽³

(1.山东省潍坊市第六人民医院内科,山东 潍坊 261000; 2.山东省潍坊市人民医院神经内科,山东 潍坊 261000;
3.山东省潍坊市人民医院产一科,山东 潍坊 261000)

【摘要】 目的 研究缬草酸联合丙戊酸钠(VPA)对戊四唑(PTZ)诱导癫痫小鼠的神经元保护作用及对 P-糖蛋白(P-GP)表达影响。方法 将小鼠分成 6 组:正常对照组、模型对照组、VPA 组、缬草酸组+VPA(低中高剂量各一组),记录各组癫痫发作潜伏期延长及持续时间;分析脑组织 P-GP 和 caspase-3 活性片段在脑组织中的表达及脑皮层神经元凋亡率。结果 与 VPA 组比较,不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短,中剂量缬草酸+VPA 组发作潜伏期延长。中剂量及高剂量缬草酸+VPA 组癫痫发作级别较 VPA 组下降。模型对照组大脑皮质 P-GP 明显高于正常对照组,VPA 组 P-GP 蛋白表达较模型对照组无明显改变,缬草酸+VPA 各组 P-GP 蛋白较 VPA 组下降,缬草酸中剂量组 Cleaved-caspase-3 表达较 VPA 组下降。缬草酸+VPA 各组凋亡率较 VPA 组下降。结论 缬草酸可能通过 P-GP 表达减少相关机制降低了戊四唑点燃/VPA 处理小鼠的癫痫发作严重程度。

【关键词】 缬草酸;癫痫;丙戊酸钠;P-糖蛋白;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0034-06

Effect of valeric acid on neuronal protection and P-glycoprotein expression in epileptic mice

YU Zhongjuan¹, CHAI Feng¹, SHI Baolin^{2*}, ZHANG Yueqi², WU Chunli³

(1. Department of Internal Medicine, Sixth People's Hospital of Weifang, Weifang 261000, China.

2. Department of Neurology, People's Hospital of Weifang, Weifang 261000.

3. First Department of Obstetrics, People's Hospital of Weifang, Weifang 261000)

【Abstract】 **Objective** To study the protective effect of valeric acid combined with sodium valproate (VPA) on pentylenetetrazole-induced epilepsy mice and P-glycoprotein (P-GP) expression. **Methods** Mice were divided into six groups: normal control group, model control group, VPA group, and valeric acid +VPA group (low, medium, and high doses). The expression of P-GP and caspase-3 active fragments in brain tissue and the rate of neuronal apoptosis in the cerebral cortex were analyzed. **Results** Compared with the VPA group, the seizure duration in all dose valeric acid + VPA groups was shortened, and the seizure latency in the middle-dose valeric acid group was prolonged. The seizure level in the middle-dose and high-dose valeric acid groups was lower than that in the VPA group. P-GP in the cerebral cortex of the model control group was significantly higher than that of the normal control group. The expression of P-GP protein in the VPA group was not significantly different compared with the model control group. Levels of P-GP protein were decreased in

【基金项目】潍坊市科技发展计划项目(2019YX072)。

【作者简介】于忠娟(1974—),女,副主任医师,研究方向:癫痫及脑血管病研究工作。E-mail:yuzhongjuanz@163.com

【通信作者】时宝林(1976—),男,教授,硕士生导师,研究方向:癫痫及脑血管病研究工作。E-mail:15965096500@163.com

all dose valeric acid + VPA groups compared with the VPA group. The expression of caspase-3 was decreased compared with the VPA group. The apoptosis rate in each dose valeric acid + VPA group was lower than that in the VPA group.

Conclusions Valeric acid may reduce the severity of seizures in pentylenetetrazol ignition/VPA-treated mice through a mechanism related to reduced P-GP expression.

【Keywords】 valeric acid; epilepsy; sodium valproate; P-glycoprotein; apoptosis

癫痫是一种常见的神经系统疾病,由神经元异常放电引起的大脑短暂功能障碍。全球约有 7000 万癫痫患者,我国的癫痫发病率约 30/10 万/年左右,患病率为 4%~7%^[1],并有 30% 的癫痫患者无法通过抗癫痫药物(anti-epileptic drug, AED)得到有效控制,进一步发展为难治性癫痫或者顽固性癫痫^[2],给家庭和社会带来了沉重的负担,迫切需要寻找到新的癫痫疗法和药物。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-GP)是一种跨膜蛋白,与药物的细胞内积累相关,研究表明其在癫痫患者大脑中过度表达并增加药物排出,介导机体对 AED 的耐药性^[3]。

最近研究发现缬草根提取物(主要为缬草酸)不仅有效治疗焦虑、失眠,还具有抗惊厥作用,增强了抗癫痫药物的作用效果^[4],服用缬草根的癫痫患者会出现更好的治疗效果,提示缬草酸具有潜在的神经元保护作用^[5]。目前少有关于缬草酸的基础研究,尚不明确缬草酸针对癫痫影响的作用机制。本研究拟明确缬草酸联合丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)对戊四唑(Pentylenetetrazole, PTZ)诱导癫痫小鼠的神经元保护作用及对 P-GP 表达影响,从而为难治性癫痫的治疗提供一种新有效手段。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SFP 级 6~8 周健康雄性 KM 小鼠,共 60 只,购自山东大学实验动物中心[SCXK(鲁)2019-0001],体重(19.5±2.4)g,小鼠饲养于潍坊医学院动物房中[SYXK(鲁)2019-0016],饲养温度为 18℃~20℃。环境安静、清洁,模拟自然昼夜。本实验经潍坊市第六人民医院实验动物伦理审查委员会审查(R0821050)。实验过程按照《实验动物管理与使用指南》进行,严格遵守动物使用 3R 原则,整个实验过程均给予实验小鼠以人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

缬草酸(加拿大 Chromadex 公司);戊四唑(美国 Sigma 公司);丙戊酸钠(美国 Sigma 公司);P-GP

及 Cleaved-caspase-3 小鼠一抗(美国 Princeton 公司); β -actin 一抗(美国 Abcam 公司);Western 超敏发光试剂盒(美国 Millipore 公司);DAPI 封固剂(江苏碧云天公司);TUNEL 原位凋亡检测试剂盒(南京凯基公司);化学发光成像分析系统(美国 UVP 公司),台式冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司),转膜电泳仪(北京六一仪器厂);石蜡切片机(德国 Leica 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

随机分为 6 组:正常对照组、模型对照组、VPA 组、缬草酸+VPA 组(低中高剂量各一组),每组 10 只。

1.3.2 给药

除正常对照组外,每组均于第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 8 天、第 10 天及第 12 天进行 1 次 PTZ 腹腔注射(30 mg/kg)制备癫痫模型^[6],第 12 天腹腔注射后 1 h 连续观察各组癫痫发作的等级、持续时间及潜伏时间。正常对照组按照 PTZ 给药时段给予生理盐水 1 mL 腹腔注射;VPA 组及缬草酸+VPA 组均灌胃给予 VPA(30 mg/kg),连续给药 12 d。在给药 VPA 灌胃的同时,低、中、高剂量缬草酸+VPA 组分别给予 60、120 和 180 mg/kg 缬草酸灌胃。

1.3.3 癫痫发作等级评分

以 Racine 评分评判小鼠癫痫发作等级^[7],标准如下:0 级:正常奔跑,无非应激性反应;1 级:面部肌肉抽搐、颤动;2 级:1 级发作伴节律性点头或前肢肌阵挛;3 级:2 级发作伴有前肢抽搐,无后肢痉挛、直立;4 级:3 级发作伴有后肢阵挛,或有摔倒、后肢直立;5 级:全身性强直、后肢强直性延伸、癫痫持续状态或死亡。

1.3.4 组织标本采集

在进行末次行为学评估 30 min 后将各组取脑组织标本,进行蛋白定量或甲醛组织固定。断头处死后,刨开颅脑,小心取出小鼠大脑,将其迅速放在冰上,眼科镊剥离一侧大脑半球皮层组织,放入液氮中保存,以备蛋白定量实验。同时将另一侧未分离大脑组织置于 4% 多聚甲醛固定,以备 Tunel

染色。

1.3.5 Western blot

为明确缬草酸是否能影响癫痫小鼠中 P-GP 及 caspase-3 活性片段,取新鲜皮层组织后进行 Western blot 检测。脑组织中加入裂解液(1 mL/mg),匀浆后在 4℃ 下离心 10 min。在样品中加入 2× 上样缓冲液,煮沸 5 min。每孔上样量 100 μg。十二烷基磺基聚丙烯酰胺钠凝胶电泳(30 mA)分离蛋白质,Marker 接近胶底板时停止电泳。转移至 PVDF 膜,持续 40 min,5% 脱脂牛奶封闭,室温匀摇 2 h,将膜于 P-GP 一抗(1:500)或 Cleaved-caspase-3(1:1000)4℃ 孵育过夜,37℃ 水浴中于 HRP 标记二抗(1:2000)孵育 1 h,漂洗后加如 ECL 发光试剂。使用化学发光分析仪拍照,用 Image-J 软件进行半定量分析。

1.3.6 Tunel 染色

将各组小鼠脑组织进行 Tunel 染色,以观察神经元凋亡率。将冷冻切片浸入盛有 4% 多聚甲醛固定液的染色缸,固定 20 min,浸入 1×PBS 漂洗三次(每次 5 min);样本片浸入通透液中,室温促渗 5 min,漂洗 3 次,每个样本上滴加 50 μL TdT 酶反应液,放入温盒中避光反应 60 min,漂洗 3 次,每个样本上滴加 50 μL Streptavidin-TRITC 标记液,37℃ 避光反应 30 min。漂洗后 DAPI 固封剂封片,室温避光反应 10 min,上共聚焦显微镜观察。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18 软件进行统计学分析,计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数的比较采用 *t* 检验,多样本均数的比较采用方差分析检验,事后多重比较采用 Tukey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组行为学表现

各组发作潜伏期及持续时间见表 1。相较模型对照组,VPA 组及不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短,潜伏时间延长(P 值均 < 0.001)。与 VPA 组比较,不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短(P 值均 < 0.001),中剂量缬草酸+VPA 组发作潜伏期延长($P = 0.029$)。进一步分析各组小鼠发作等级(图 1),VPA 组癫痫发作级别较模型对照组明显下降($P < 0.001$),而中剂量及高剂量缬草酸+VPA 组癫痫发作级别较 VPA 组下降(P 分别为 $<$

0.001 、 0.019)。以上结果表明,中剂量及高剂量缬草酸可降低癫痫模型小鼠的发展等级,且中剂量组改善更明显。

2.2 大脑皮质 P-GP 及 Cleaved-caspase-3 蛋白表达

癫痫发作 72 h 后,模型对照组大脑皮质 P-GP 明显高于正常对照组($P < 0.001$),VPA 组 P-GP 蛋白表达较模型对照组无明显改变($P > 0.05$),缬草酸低、中、高剂量组 P-GP 蛋白较 VPA 组下降(P 分别为 0.02 、 < 0.001 、 < 0.001),见图 2、3。Cleaved-caspase-3(17kD)是 caspase-3 剪切后的活化形式,我们检测了各组小鼠大脑皮质 cleaved-caspase-3 表达。模型对照组 Cleaved-caspase-3 明显高于正常对照组($P < 0.001$),VPA 组表达较模型对照组明显改变($P = 0.004$),缬草酸中剂量组表达较 VPA 组下降($P = 0.014$),见图 2、4。以上结果表明,相较于 VPA 治疗,VPA 联合不同剂量缬草酸能有效降低癫痫模型小鼠大脑皮质中 P-GP 蛋白表达,而 VPA 联合中剂量缬草酸能减少 Cleaved-caspase-3 表达。

2.3 大脑皮质细胞凋亡情况

本研究随后检测了各组小鼠大脑皮质神经元凋亡情况。模型对照组神经元凋亡较正常对照组明显升高($P < 0.001$),VPA 组凋亡率较模型对照组明显降低($P < 0.001$),缬草酸低、中、高剂量组凋亡率较 VPA 组下降(P 分别为 0.028 、 < 0.001 、 < 0.001),见图 5、6。以上结果表明,相较于 VPA 治疗,VPA 联合中剂量缬草酸能显著降低癫痫模型小鼠神经元凋亡率。

3 讨论

目前 AED 有 10 余种,有 1/3 的患者无法通过 AED 得到有效的治疗,进一步发展成为难治性癫痫或者顽固性癫痫^[8],AED 的耐药机制是癫痫治疗过程中的关键,耐药过程涉及多种不同的细胞机制^[9-10]。研究发现,AED 治疗可促进多药耐药相关蛋白 1 基因(MRP1)及其蛋白产物 P-GP 的过度表达^[11],P-GP 可以将抗癫痫药泵回外周循环,这种再循环可能会降低大脑药物浓度,从而导致耐药性难治性癫痫和抗癫痫药治疗效果降低^[12]。此外许多抗癫痫药是 P-GP 的底物,癫痫发作本身可能会增加 P-GP 的表达^[13]。已经有研究证实部分药物(如氟桂嗪、环氧合酶 2 等)能有效下调 P-GP 的表达,在难治性癫痫中具有潜在作用^[14-15]。

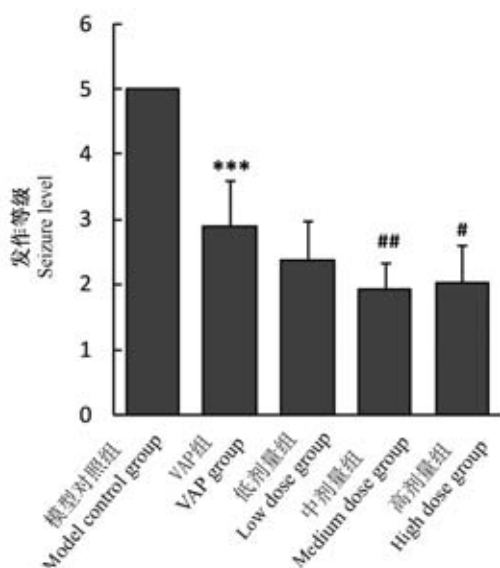
表 1 各组小鼠癫痫发作情况($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Seizures of mice in each group

组别 Groups	发作潜伏期(s) Seizure latency	$P^{\#}$	P^*	发作持续时间(s) Seizure duration	$P^{\#}$	P^*
正常对照组 Normal control group	-	-	-	-	-	-
模型对照组 Model control group	112.76±31.54	-	-	769.28±60.71	-	-
VPA 组 VPA group	265.96±71.18	<0.001	-	489.76±54.55	<0.001	-
缬草酸+VPA 组 Valeric acid and VPA group	-	-	-	-	-	-
低剂量组 Low dose group	304.17±85.54	<0.001	0.804	395.96±44.97	<0.001	<0.001
中剂量组 Medium dose group	371.87±90.97	<0.001	0.029	322.76±31.54	<0.001	<0.001
高剂量组 High dose group	357.71±91.32	<0.001	0.078	346.67±41.01	<0.001	<0.001

注:与模型对照组比较;VPA 组及不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短,潜伏时间延长(均 $P<0.001$);与 VPA 组比较;不同剂量缬草酸+VPA 组发作持续时间缩短(均 $P<0.001$),中剂量缬草酸+VPA 组发作潜伏期延长($P=0.029$)。

Note. Compared with the model control group, VPA group and different doses of valeric acid + VPA group have shorter onset duration and longer latency (all $P < 0.001$). Compared with the VPA group, the duration of onset was shortened in the different doses of valeric acid + VPA group (all $P < 0.001$), and the onset latency of the medium dose of valeric acid + VPA group was prolonged ($P=0.029$).



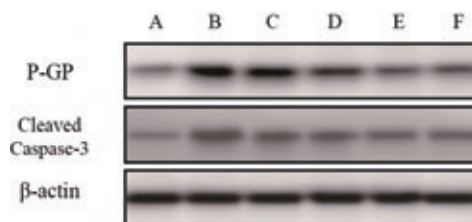
注:与模型对照组比较,*** $P<0.001$;与 VPA 组比较,## $P<0.001$;与 VPA 组比较, $P<0.05$ 。

图 1 各组癫痫发作等级

Note. Compared with model control group, *** $P<0.001$. Compared with VPA group, ## $P<0.001$. Compared with VPA group, $P<0.05$.

Figure 1 Seizure level of each group

本研究中,缬草酸联合 VPA 可降低癫痫小鼠发作等级,相较单用 VPA 效果好,提示缬草酸可增强 VPA 的抗惊厥作用。缬草酸为缬草提取物中的主要成分,含有不同比例的羟基缬氨酸和乙酰氧基缬氨酸。缬草提取物已用于治疗多种症状,如焦虑症和失眠症,已有超过 2000 年的历史^[17]。目前研究表明,缬草酸具有很强的抗惊厥作用, Torres-Hernández 等^[16]发现缬草酸与氯硝西洋及苯



注:A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA 组;D:低剂量缬草酸+VPA 组;E:中剂量缬草酸+VPA 组;F:高剂量缬草酸+VPA 组。

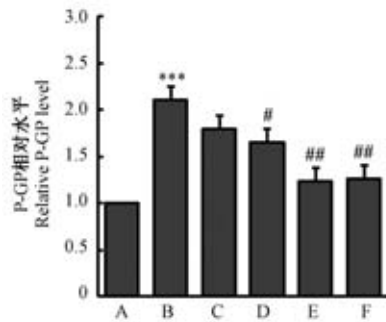
图 2 Western blot 检测各组小鼠 P-GP 及 Cleaved-caspase-3 蛋白表达

Note. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid +VAP group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid +VPA group.

Figure 2 Representative western blot of P-GP and Cleaved-caspase-3 protein in each group

妥英钠具有协同相互作用,增强了两者的抗惊厥作用,可延长成年斑马鱼癫痫发作的潜伏期^[16]。服用缬草的癫痫患者会有明显的镇静作用,并有更好的抗癫痫治疗效果^[4],而且由于其吸收快、不易蓄积的特性,具有较好的安全性。本研究结果进一步证实了缬草酸的抗惊厥作用,但目前尚无关于缬草酸抗癫痫机制的研究。

丙戊酸钠(VPA)是一种有效的 AED,成本相对较低,为癫痫治疗的重要药物。在本研究中,我们将缬草酸与 VPA 联合使用以观察对 PTZ 癫痫模型小鼠 P-GP 水平及癫痫发作的影响。结果表明,缬草酸和 VPA 共同给药可降低大脑皮层 P-GP 水平,癫痫发作严重程度显著降低,提示缬草酸可能通过调节 P-GP 表达而增强 VPA 的抗惊厥作用。



注:与正常对照组比较,*** $P < 0.001$;与VPA组比较,# $P < 0.001$,## $P < 0.001$ 。A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA组;D:低剂量缬草酸+VPA组;E:中剂量缬草酸+VPA组;F:高剂量缬草酸+VPA组。

图3 各组 P-GP 相对表达量分析

Note. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$. Compared with VPA group, # $P < 0.05$. ## $P < 0.001$. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid + VPA group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid + VPA group.

Figure 3 Analysis of relative expression of P-GP in each group

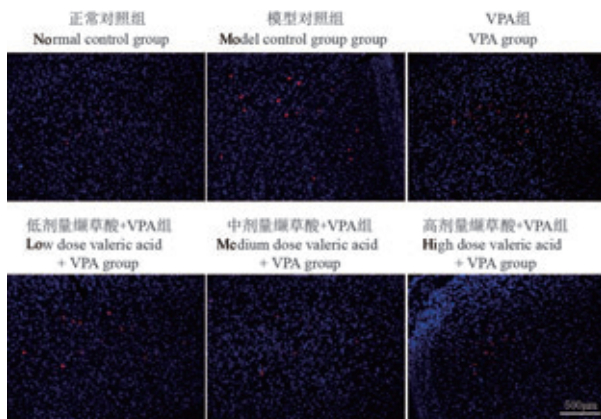
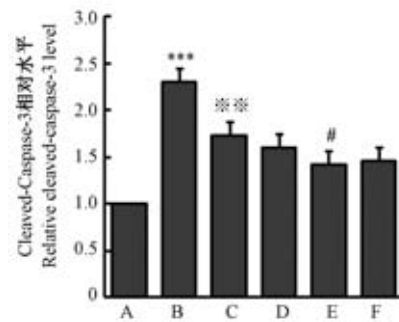


图5 TUNEL 检测各组小鼠神经元凋亡

Figure 5 Apoptosis examination was performed by TUNEL assay

癫痫发作可导致脑神经元损伤,进而出现神经元凋亡,并引起胶质细胞增生、突触重建等脑结构功能变化^[8],细胞凋亡是一个复杂的生物过程,涉及许多细胞信号通路。Caspase-3 是关键的细胞凋亡介体,剪切后的活化形式分子量为 17×10^3 的 Cleaved-caspase-3^[18],一般是用活性形式说明 caspase 途径的激活。我们检测了 Cleaved-caspase-3 的表达以明确缬草酸对脑组织的保护作用。结果表明,缬草酸显著降低了癫痫小鼠大脑中 Cleaved-caspase-3 的表达,同时,癫痫小鼠的神经元凋亡率也明显降低,提示缬草酸在减轻癫痫发作等级的同

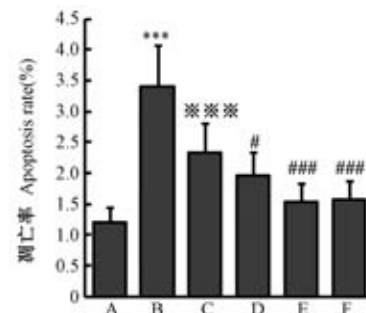


注:与正常对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$;与VPA组比较,# $P < 0.001$ 。A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA组;D:低剂量缬草酸+VPA组;E:中剂量缬草酸+VPA组;F:高剂量缬草酸+VPA组。

图4 各组 Cleaved-caspase-3 相对表达量分析

Note. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$. Compared with model control group group, ** $P < 0.05$. Compared with VPA group, # $P < 0.001$. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid + VPA group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid + VPA group.

Figure 4 Analysis of relative expression of Cleaved-caspase-3 in each group



注:与正常对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型对照组比较,*** $P < 0.05$;与VPA组比较,# $P < 0.001$,### $P < 0.001$ 。A:正常对照组;B:模型对照组;C:VPA组;D:低剂量缬草酸+VPA组;E:中剂量缬草酸+VPA组;F:高剂量缬草酸+VPA组。

图6 各组神经元凋亡率分析

Note. Compared with normal control group, *** $P < 0.001$. Compared with model control group group, *** $P < 0.05$. Compared with VPA group, # $P < 0.001$, ### $P < 0.001$. A, Normal control group. B, Model control group. C, VPA group. D, Low dose valeric acid + VPA group. E, Medium dose valeric acid + VPA group. F, High dose valeric acid + VPA group.

Figure 6 Analysis of neuronal apoptosis rate in each group

时,还存在神经元的保护作用。

总之,本研究表明,缬草酸联合VPA可降低PTZ诱导癫痫小鼠大脑中P-GP的表达并增强VPA的抗惊厥作用。此外,缬草酸还可降低caspase-3活

性片段的表达,在癫痫治疗过程中对大脑起到潜在保护作用。缬草酸与 VPA 联合治疗癫痫可能是一种有效且耐受性良好的治疗方案,而缬草酸如何调控 P-GP、凋亡因子及其信号通路机制尚未清楚,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 许向军,周志明. 癫痫的诊断和治疗 [J]. 中华全科医学, 2019, 17(10): 1619-1620.
- [2] Sander JW. The use of antiepileptic drugs-principles and practice [J]. *Epilepsia*, 2004, 45(6): 28-34.
- [3] Lubberink M. Kinetic models for measuring P-glycoprotein function at the blood-brain barrier with positron emission tomography [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(38): 5786-5792.
- [4] Spinella M. Herbal medicines and epilepsy: the potential for benefit and adverse effects [J]. *Epilepsy & Behavior*, 2002, 2(6): 524-532.
- [5] Fugh-Berman A. Herbal medicinals: selected clinical considerations, focusing on known or potential drug-herb interactions [J]. *Arch Intern Med*, 1999, 159(16): 1957-1958.
- [6] 王丽, Ono. J, Walson PD. 大鼠戊四唑点燃模型的建立 [J]. 药学学报, 1993, 28(7): 486-489.
- [7] Zhang C, Fan Q, Chen SL, et al. Reversal of P-glycoprotein overexpression by Ginkgo biloba extract in the brains of pentylenetetrazole-kindled and phenytoin-treated mice [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(8): 398-404.
- [8] 党翔吉, 王艺璇, 焦海胜. 全天麻及天麻素联合卡马西平对癫痫小鼠脑部海马体神经元及基因 *mrp1* 表达的影响 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1556-1561.
- [9] Zhang C, Kwan P, Zuo Z, et al. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(10): 930-942.
- [10] Stepień KM, Tomaszewski M, Tomaszewska J, et al. The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmacoresistance to antiepileptic drugs [J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(5): 1011-1019.
- [11] Wang X, Huang S, Jiang Y, et al. Reactive astrocytes increase the expression of P-gp and *Mrp1* via TNF- α and NF- κ B signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1198-1204.
- [12] Lai ML, Tien YE, Huang YS, et al. Studies on pharmacokinetic mechanism of phenytoin resistance in refractory epilepsy [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(9): 3189-3195.
- [13] Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(7): 1019-1032.
- [14] van Vliet EA, Zibell G, Pekcec A, et al. COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(2): 404-412.
- [15] Sulová Z, Seres M, Barancik M, et al. Does any relationship exist between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and intracellular calcium homeostasis [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2009, 28(Spec No Focus): F89-F95.
- [16] Torres-Hernández BA, Valle-Mojica LMD, Ortíz JG. Valerianic acid and *Valeriana officinalis* extracts delay onset of Pentylenetetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult *Danio rerio* (Zebrafish) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 228.
- [17] Tagarelli G, Tagarelli A, Liguori M, et al. Treating epilepsy in Italy between XIX and XX century [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(2): 608-613.
- [18] Jiang W, Chen Y, Li B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of *cyt-c* in rat hippocampus [J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(9): 1863-1873.

[收稿日期] 2020-04-21

邹亮,程辉,张婷,等. DIS3 对人骨髓瘤细胞周期及肿瘤相关蛋白表达的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 40-46.

Zou L, Cheng H, Zhang T, et al. Effects of DIS3 overexpression or interference on cell cycle and tumor-associated protein expression of three types of human myeloma cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 40-46.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.007

DIS3 对人骨髓瘤细胞周期及肿瘤相关蛋白表达的影响研究

邹亮,程辉*,张婷,周英,关军,程平,王兰兰

(武汉市第一医院血液内科,武汉 430022)

【摘要】 目的 探究 DIS3 对人骨髓瘤细胞周期及肿瘤相关蛋白表达的影响。方法 选取人骨髓瘤细胞株 NCI-H929、RPMI 8226 和 U266 为研究对象,分别设计并构建 DIS3 基因过表达载体和 DIS3-siRNA。PI 单染检测细胞周期变化,qRT-PCR 及 Western blot 检测周期相关蛋白 Cyclin B1、P21、CDK2 以及肿瘤相关蛋白 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 的表达。同时,采用 Western blot 检测 ERK1/2 信号通路激活水平。结果 与空载体组比较,DIS3 过表达组细胞存在明显的 G0/G1 期阻滞,周期相关蛋白 Cyclin B1、CDK2 以及肿瘤相关蛋白 MYC、RAS、TP53、BRAF 和 p-ERK1/2 的表达水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),P21 表达水平升高($P < 0.01$),siRNA 组各指标变化趋势与 DIS3 过表达组相反。结论 DIS3 过表达能使人骨髓瘤细胞发生明显的 G0/G1 期阻滞,降低肿瘤相关蛋白的表达,这可能与抑制 ERK1/2 信号通路的激活密切相关。

【关键词】 DIS3;人骨髓瘤细胞;细胞周期;肿瘤相关蛋白;细胞外信号调节激酶 1/2

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0040-07

Effects of DIS3 overexpression or interference on cell cycle and tumor-associated protein expression of three types of human myeloma cells

ZOU Liang, CHENG Hui*, ZHANG Ting, ZHOU Ying, GUAN Jun, CHENG Ping, WANG Lanlan

(Department of Hematology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 Objective To observe the effects of DIS3 overexpression or interference on expression of cell cycle and tumor-associated proteins in three types of human myeloma cells. **Methods** Human myeloma cell lines NCI-H929, RPMI 8226, and U266 were selected as study objects. A DIS3 gene overexpression vector and DIS3-siRNA were designed and constructed. Cell cycle was evaluated by propidium iodide single staining. qRT-PCR and western blotting were employed to detect expression of cyclin B1, P21, CDK2, and tumor-associated proteins MYC, RAS, TP53, and BRAF at mRNA and protein levels, respectively. In addition, activation of the ERK1/2 signaling pathway was detected by Western blot. **Results** Compared with the empty vector group, cells in the DIS3 overexpression group exhibited obvious G0/G1 phase arrest and decreased expression levels of cycle-related proteins cyclin B1 and CDK2, as well as tumor-related proteins MYC, RAS, TP53, BRAF, and p-ERK1/2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of P21 was increased ($P < 0.01$).

[基金项目] 武汉市卫计委基金(WX17C05)。

[作者简介] 邹亮(1981—),男,硕士,副主任医师,研究方向:骨髓瘤、淋巴瘤诊治及血液肿瘤分子靶向治疗。

E-mail: zouliang0127@163.com

[通信作者] 程辉(1970—),男,硕士,主任医师,研究方向:骨髓瘤、淋巴瘤诊治及血液肿瘤分子靶向治疗。

E-mail: hui_ch_ch_eng@163.com

01) in DIS3 overexpression group. In the siRNA group, trends for each index of mRNA expression or protein expression were opposite to those observed in the DIS3 overexpression group. **Conclusions** DIS3 overexpression can significantly block G0/G1 phase in human myeloma cells and reduce expression of tumor-associated proteins, which may be closely related to the inhibition of ERK1/2 signaling pathway activation.

【Keywords】 DIS3; human myeloma cells; cell cycle; tumor-associated proteins; extracellular signal-regulated kinase 1/2

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种浆细胞恶性增殖性疾病,以骨髓内恶性浆细胞的克隆增生为其主要特征^[1]。目前,针对多发性骨髓瘤的治疗手段虽多,且均能延长了患者的生存时间,但由于各种各样的并发症,导致患者的生存质量较差,因此,寻求新的治疗方法迫在眉睫^[2-3]。研究发现,几乎所有肿瘤细胞均存在细胞周期异常;因此,肿瘤也被称为细胞周期病。肿瘤细胞最明显的特征为不依赖于细胞外生长信号的刺激而能反复自发的进行细胞周期循环,细胞增殖增加、凋亡细胞减少,最终诱发细胞不可控的异常增殖而导致肿瘤形成^[4]。全基因组测序结果显示,DIS3 基因具有较强的突变特性,DIS3 基因突变是导致 MM 发生的原因之一^[5],但其对骨髓瘤细胞的周期变化及具体作用机制尚不明确。细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)ERK1/2,是将信号传导的关键因子,磷酸化的 ERK1/2 由胞质转位到核内,介导 ATF, Ap-1, c-fos 和 c-Jun 等因子的活化,参与细胞增殖、分化、凋亡,维持细胞稳态等多种生物学反应^[6-7]。

本实验中,我们通过构建 DIS3 过表达或干扰载体,观察过表达或干扰 DIS3 对细胞周期及肿瘤相关蛋白的表达影响,旨在为临床治疗 MM 提供潜在的策略。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人骨髓瘤细胞株 NCI-H929(货号:CRL-9068)、RPMI 8226(货号:CCL-155)和 U266(货号:TIB-196)购自 ATCC。

1.2 主要试剂与仪器

人 RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清、青-链霉素双抗及 Lipofectamine 2000 均购于美国 Invitrogen 生命技术公司;真核表达载体 PEGFP-N1 由武汉华联科生物技术有限公司分子实验室保存并提供;细胞 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司;SYBR Green 染料

购自 Lumiprobe Corporation 公司;Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit(细胞周期检测)购自 BD Biosciences;蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;一抗:Cyclin B1(货号:ab2949)、P21(货号:ab109199)、CDK2(货号:ab32147)、MYC(货号:ab32072)、RAS(货号:ab52939)、TP53(货号:ab131442)、BRAF(货号:ab167415)、p-ERK1/2(货号:ab201015)、GAPDH(货号:ab9485)以及山羊抗兔二抗 IgG(货号:ab6734)购自美国 Abcam 公司;主要仪器:CO2 培养箱(Thermo,美国);倒置显微镜(Nikon,日本);实时荧光定量 PCR 仪(Bio-RAD,美国);离心机(Eppendorf,德国);流式细胞仪(Beckman,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的复苏、培养及转染

人骨髓瘤细胞 NCI-H929、RPMI 8226 和 U266 分别培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,培养至对数期时,按照前期本课题组相应转染方案^[8]进行转染,转染 48 h 后收集细胞进行转染效率检测。

1.3.2 PI 单染法检测细胞周期变化

3 种细胞均分成 5 组:对照组、DIS3-siRNA 阴性对照(NC)组、DIS3-过表达空载体组、DIS3-过表达组、DIS3-siRNA 组。按每孔 10^4 个细胞进行接种,每孔加 100 μ L 细胞培养液后,置于 5% CO₂ 的恒温培养箱进行培养。48 h 后收集各组细胞,混匀后转移至流式专用管中;离心弃上清沉淀后,用无水乙醇于 -20℃ 冰箱内固定细胞 24 h,分别加入 RNase A 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)溶液,避光染核 10 min。用流式细胞仪进行检测。

1.3.3 qRT-PCR 检测各指标的 mRNA 表达水平

根据 NCBI 上公布的各基因序列分别设计 qRT-PCR 用引物(表 1),并由上海生工代为合成。48 h 后收集各组细胞,分别提取各组细胞样本 RNA,反转录,扩增后,以 GAPDH 为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各基因的相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物(5'→3') Primer
CyclinB1	Forward:GCACCAAATCAGACAGA Reverse:TTGAGAAGGAGGAAAGT
P21	Forward:GGGATGAGTTGGGAGGA Reverse:AGCGAGGCACAAGGGTA
CDK21	Forward:ACACTGAGACTGAGGGT Reverse:ATGAGGGGAAGAGGAAT
MYC	Forward:CTTCCCCTACCCTCTCA Reverse:CCTCATCTTCTTGTTC
RAS	Forward:TTCCTTTTACCTGCCA Reverse:CCACCAAGAACTTTTCGC
TP53	Forward:TCACTGAAGACCCAGGT Reverse:GGAAGGGACAGAAAGATG
BRAF	Forward:GGAACGGAAGTATTTTT Reverse:CATCTGTGGGATTTTGAA
GAPDH	Forward:GTCGGACTCAACGGATTTG Reverse:GAAGATGCTGATGGGATTTG

1.3.4 Western blot

48 h 后收集各组细胞,采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒对所提蛋白进行浓度检测;上样、电泳、封闭后,分别加入兔抗人一抗(Cyclin B1,1:500、P21,1:1000、CDK2,1:500、MYC,1:500、RAS,1:500、TP53,1:800、BRAF,1:1000、p-ERK1/2,1:1000 和 GAPDH,1:2000),4℃ 过夜;加入相应的二抗 IgG (羊抗兔,1:5000),室温孵育 30 min 后,以 GAPDH 为内参蛋白,采用 Quantity One 图像分析软件进行灰度比分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件。计量资料采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,采用 SNK-*q* 检验进行多组均数间的两两比较;相关检验采用 Pearson 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIS3 过表达或干扰对细胞周期的影响

3 种细胞的细胞周期变化检测结果显示(图 1),与空载体组比较,DIS3 过表达组细胞发生了明显 G0/G1 期阻滞现象,表现为 G0/G1 期细胞占比显著增加($P < 0.01$);与 NC 组比较,DIS3-siRNA 明显促进了细胞周期进程,表现为 G0/G1 期细胞占比的显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.2 DIS3 过表达或干扰对细胞周期相关指标 Cyclin B1、P21、CDK2 表达的影响

3 种细胞的细胞周期相关基因 Cyclin B1、P21、

CDK2 表达检测结果显示(图 2A),与空载体组比较,DIS3 过表达组 Cyclin B1、CDK2 表达水平显著降低($P < 0.05$),P21 表达水平显著升高($P < 0.01$);与 NC 组比较,DIS3-siRNA 明显促进了 Cyclin B1、CDK2 的表达而抑制了 P21 的表达($P < 0.01$)。而三指标在蛋白水平上的表达与 mRNA 水平表达趋势基本一致(图 2B)。

2.3 DIS3 过表达或干扰对肿瘤相关指标 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 表达的影响

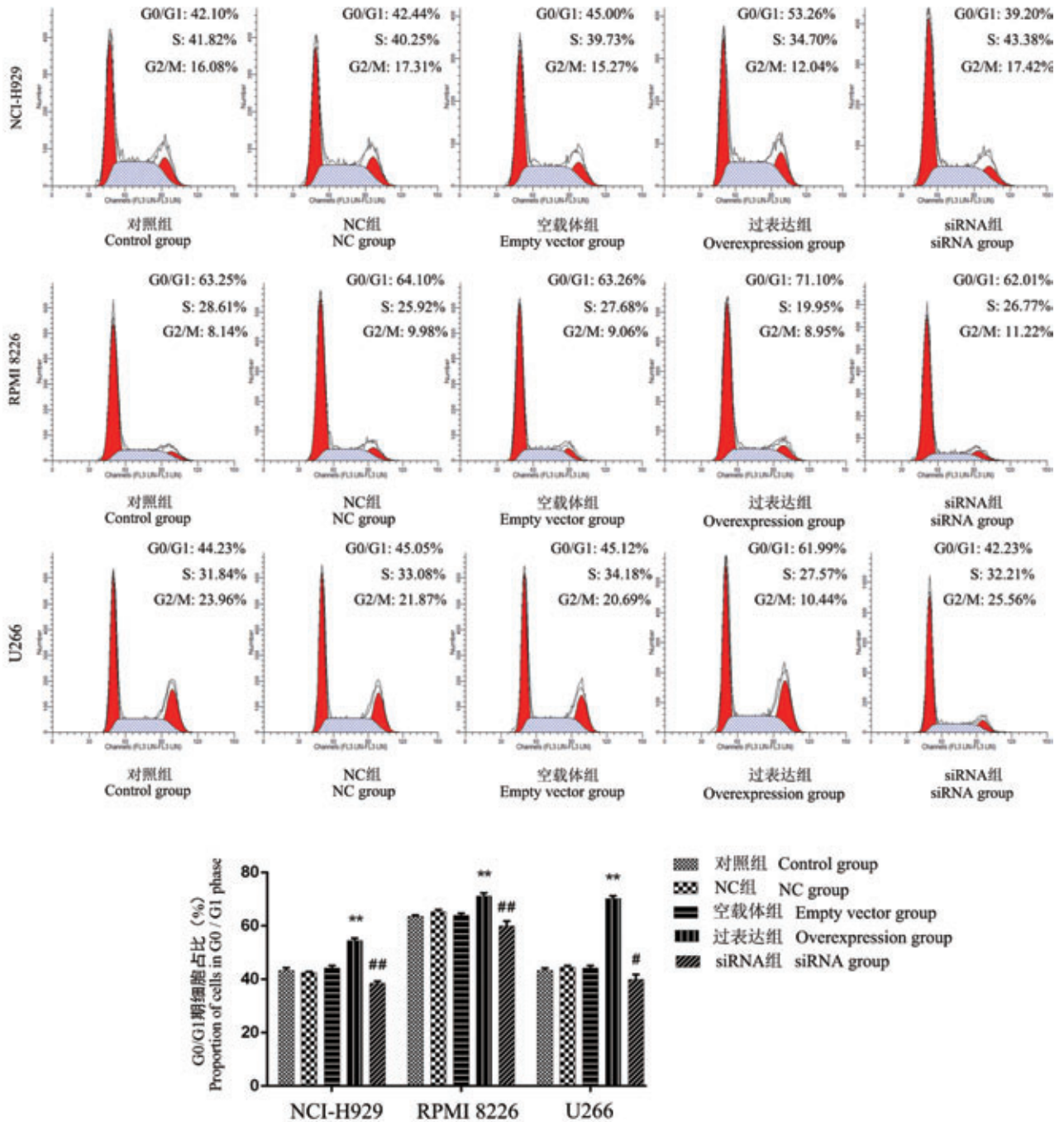
3 种细胞的肿瘤相关基因 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 表达检测结果显示(图 3A),与空载体组比较,DIS3 过表达组 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);与 NC 组比较,DIS3-siRNA 明显促进了 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 的表达($P < 0.01$)。MYC、RAS、TP53 及 BRAF 在蛋白水平上的表达与 mRNA 水平表达趋势基本一致(图 3B)。

2.4 DIS3 过表达或干扰对 ERK1/2 信号通路的影响

3 种细胞的 ERK1/2 信号通路活化检测结果显示(图 4),与空载体组比较,DIS3 过表达能显著抑制 ERK1/2 信号通路的激活,表现在 p-ERK1/2 的表达明显降低($P < 0.05$);与 NC 组相比,DIS3 沉默则显著增加了 ERK1/2 信号通路的活性,表现为 p-ERK1/2 的表达显著升高($P < 0.05$)。

3 讨论

生理条件下,细胞的增殖与凋亡处于动态平衡中,细胞周期的异常会导致细胞增殖与凋亡的失衡,是诱发肿瘤发生的关键环节^[9]。多发性骨髓瘤(MM)主要表现为恶性浆细胞无节制地增生、广泛浸润和大量单克隆免疫球蛋白的出现及沉积导致正常多克隆浆细胞增生和多克隆免疫球蛋白分泌受到抑制,从而出现临床上的异质性症状及相应并发症^[10]。DIS3 是一种新型的 MM 抑制基因,其编码蛋白 DIS3 能够对所有的 RNA 进行修饰^[11-12]。相关临床研究发现,DIS3 突变的 MM 患者总体中位生存期大大缩短^[12-13]。因此,研究 DIS3 的表达调控对 MM 细胞周期的影响具有重要的意义。在本实验中,DIS3 过表达能显著抑制 3 种人骨髓瘤细胞的周期进程,表现为显著的 G0/G1 期细胞阻滞、细胞周期调控蛋白 Cyclin B1、CDK2 的表达减少及 P21 的表达升高。反之,通过 siRNA 技术抑制 DIS3 的表

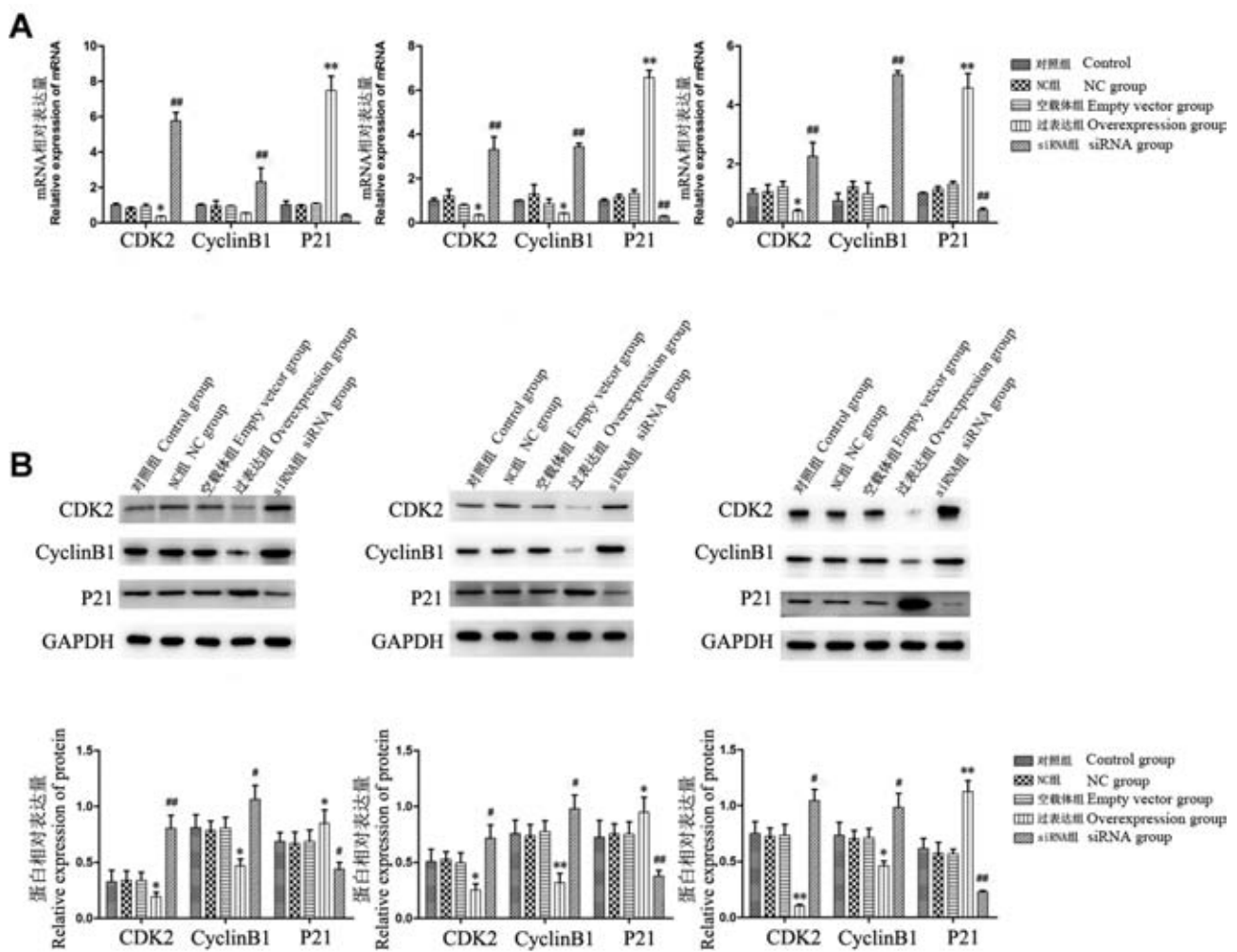


注:与空载体组比较, ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 流式细胞术检测细胞周期变化

Note. Compared with the empty vector group, ** $P < 0.01$. Compared with the NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Cell cycle changes were detected by flow cytometry



注:A:各指标 mRNA 水平的表达;B:各指标蛋白水平的表达;与空载体组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 NC 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

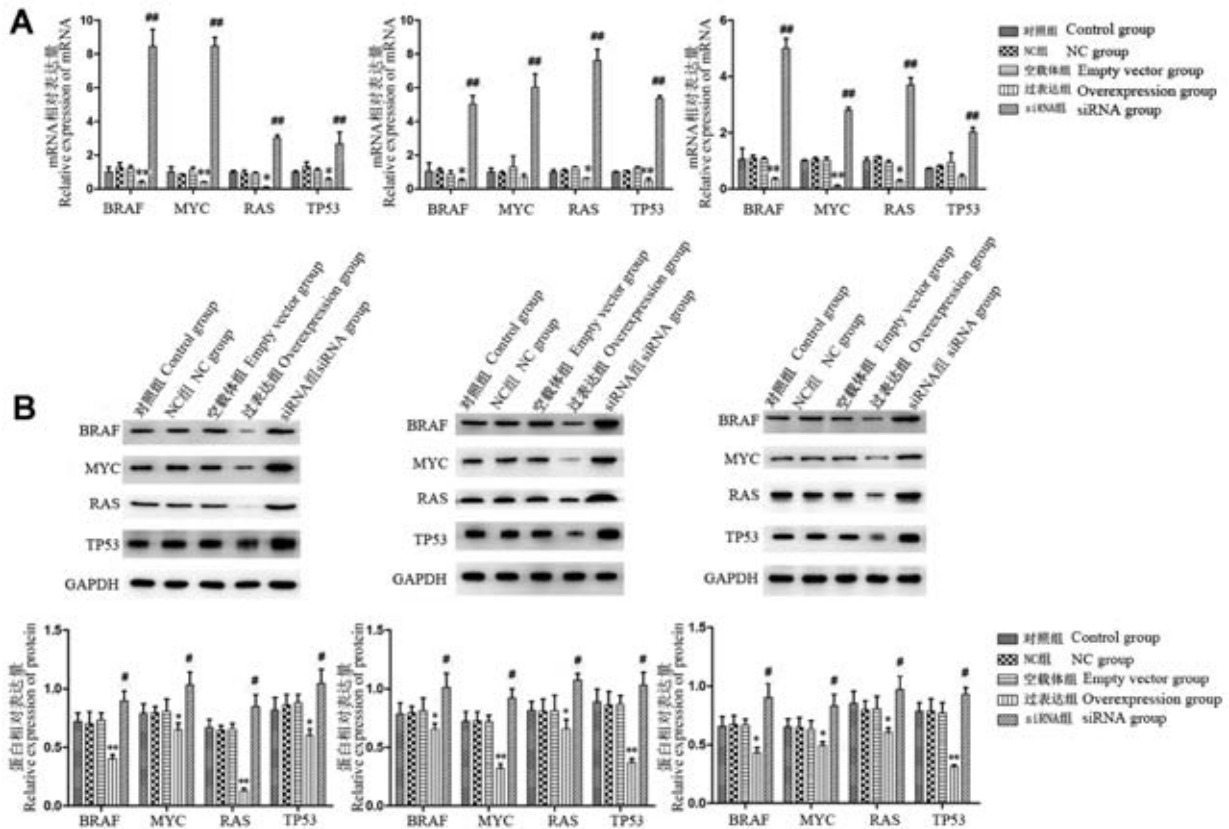
图 2 细胞周期相关指标 Cyclin B1、P21、CDK2 的表达变化

Note. A, mRNA expression. B, Protein expression. Compared with the empty vector group, ** $P < 0.01$. Compared with the NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Changes in the expression of cell cycle-related indicators Cyclin B1, P21 and CDK2

达则从一定程度上促进了癌细胞的周期进程,表现为 G0/G1 期细胞占比减少、细胞周期调控蛋白 Cyclin B1、CDK2 的表达增加、P21 表达减少,提示对 DIS3 进行表达调控能显著影响骨髓瘤细胞的细胞周期进程。在以果蝇为研究对象的实验中发现,DIS3 的缺失会抑制细胞的有丝分裂,进而导致幼虫的生长阻滞及某些组织器官的发育减缓,提示 DIS3 的外切酶功能对于细胞有丝分裂是不可或缺的,DIS3 的异常会导致细胞的有丝分裂的延迟,表现出非整倍性和过浓缩的染色体^[14]。DIS3 是结肠癌的新型候选癌基因,沉默 DIS3 可影响结肠癌细胞的生物学行为^[15]。因此,恢复 DIS3 的表达水平进而维持其功能的稳定性对骨髓瘤细胞的恶性增殖可能

具有抑制作用,在本实验中,我们发现 DIS3 的抑制作用可能与改变骨髓瘤细胞的细胞周期进程密切相关。此外,我们还发现 DIS3 过表达抑制了 3 种骨髓瘤细胞中癌基因 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 蛋白水平的表达,提示癌细胞潜在的恶性生物学特征得到了抑制。细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 信号转导通路是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 成员之一^[16]。在细胞增殖、分裂、凋亡及恶性转化等过程中均具有重要的作用,尤其在多种癌细胞中,ERK1/2 常处于异常高表达或激活状态,且被认为是多种药物的潜在作用靶点^[17-19]。例如,在胆囊癌细胞中,青蒿素抑制细胞增殖、抑制 CDK4 和 Cyclin D1 表达以及诱导 p16 表达所造成的细胞 G1 期阻滞被

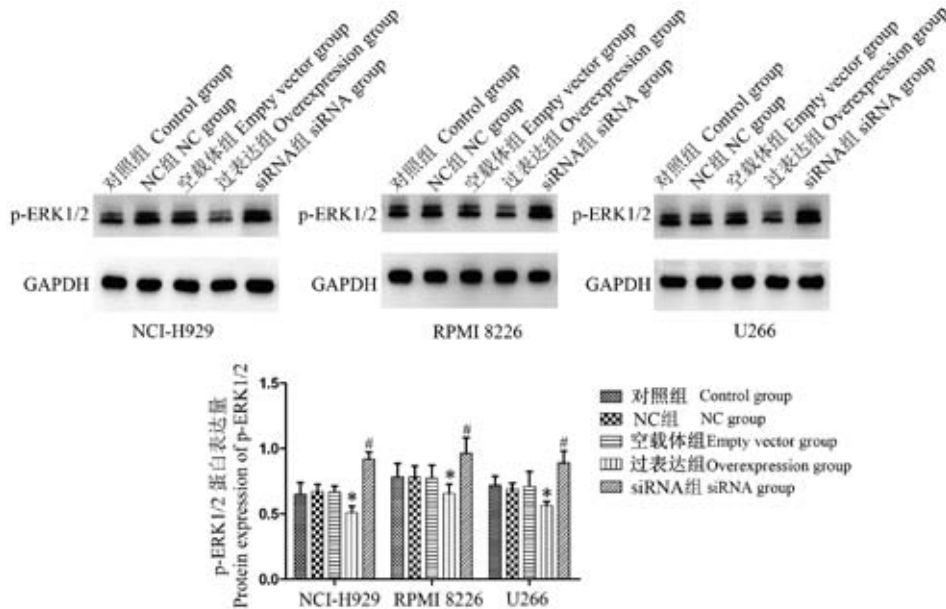


注: A:各指标 mRNA 水平的表达; B:各指标蛋白水平的表达;与空载组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 NC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 肿瘤相关指标 MYC、RAS、TP53 及 BRAF 的表达变化

Note. A, mRNA expression. B, Protein expression. Compared with the empty vector group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the NC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 3 Changes in the expression of tumor-related indicators MYC, RAS, TP53 and BRAF



注:与空载组比较, * $P < 0.05$;与 NC 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 p-ERK1/2 的表达变化

Note. Compared with the empty vector group, * $P < 0.05$. Compared with the NC group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Changes of p-ERK1/2 expression

认为与 ERK1/2 信号转导通路的抑制相关^[20]。在乳腺癌的体外实验中发现,厄贝沙坦影响 MCF-7 细胞的周期,使得细胞的 G0/G1 期细胞比例增多,而 S 期细胞比例下降,进而抑制细胞的生长,这一作用被证明与 p-ERK1/2 蛋白的表达下调有关^[21]。而作为抗肿瘤的化疗药物,卡铂主要通过诱导细胞周期阻滞抑制肿瘤细胞生长,其对卵巢癌 HO-8910 细胞作用研究表明,其通过抑制 ERK1/2 激活,诱导细胞 S 和 G1 期阻滞,进而抑制细胞生长^[22]。而本研究中,我们同样发现,DIS3 过表达同样抑制了 ERK1/2 的激活,而 DIS3 沉默促进了 ERK1/2 的活化。

综上所述,过表达 DIS3 能通过抑制 ERK1/2 通路的活性进而抑制骨髓瘤细胞的细胞周期,降低癌基因的表达水平。后期我们将在体内水平进行进一步研究,以期为临床治疗 MM 提供潜在的靶点。

参考文献:

- [1] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management [J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(7): 719-734.
- [2] Ludwig H, Sonneveld P, Davies F, et al. European perspective on multiple myeloma treatment strategies in 2014 [J]. *Oncologist*, 2014, 19(8): 829-844.
- [3] Naymagon L, Abdulhay M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 52.
- [4] 詹启敏, 陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学 [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 1: 1-7.
- [5] Lionetti M, Barbieri M, Todoerti K, et al. A compendium of DIS3 mutations and associated transcriptional signatures in plasma cell dyscrasias [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 26129-26141.
- [6] Jr RR. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105-143.
- [7] 张丽志, 瞿全新. ERK 信号转导通路对肿瘤细胞生物学行为的调控 [J]. *医学综述*, 2011, 17(6): 836-838.
- [8] 邹亮, 程亮, 张婷, 等. DIS3 表达调控对人骨髓瘤细胞集落形成及内皮细胞成管能力的影响 [J]. *中国病理学杂志*, 2019, 35(8): 1463-1469.
- [9] 郭云山. HAb18G/CD147 通过调节细胞内钙信号参与肝癌细胞周期调控的机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2011.
- [10] Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, et al. Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 81-90.
- [11] Robinson SR, Oliver AW, Chevassut TJ, et al. The 3' to 5' exoribonuclease DIS3: From structure and mechanisms to biological functions and role in human disease [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(3): 1515-1539.
- [12] 邹亮, 程辉, 张婷, 等. 有丝分裂调控蛋白 DIS3 的表达调控对 3 株人骨髓瘤细胞增殖能力的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(6): 1912-1918.
- [13] Weißbach S, Langer C, Puppe B, et al. The molecular spectrum and clinical impact of DIS3 mutations in multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(1): 57-70.
- [14] Snee MJ, Wilson WC, Zhu Y, et al. Collaborative control of cell cycle progression by the RNA exonuclease DIS3 and RAS is conserved across species [J]. *Genetics*, 2016, 203(2): 749-762.
- [15] de Groen FL, Krijgsman O, Tijssen M, et al. Gene-dosage dependent overexpression at the 13q amplicon identifies DIS3 as candidate oncogene in colorectal cancer progression [J]. *Genes Chromosome Canc*, 2014, 53(4): 339-348.
- [16] Balmanno K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(3): 368-377.
- [17] Xu K, Sha Y, Wang S, et al. Effects of Bakuchiol on chondrocyte proliferation via the PI3K-Akt and ERK1/2 pathways mediated by the estrogen receptor for promotion of the regeneration of knee articular cartilage defects [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(5): e12666.
- [18] Jin L, Cao Y, Zhang T, et al. Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2 phosphorylation and cell survival in glioma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1339-1348.
- [19] Jia Y, Qin Q, Fang CP, et al. UVB induces apoptosis via downregulation of CALML3-dependent JNK1/2 and ERK1/2 pathways in cataract [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 3041.
- [20] 贾建光, 张立功, 郭晨旭, 等. 青蒿素诱导胆囊癌细胞的细胞周期阻滞和抑制细胞凋亡的体外实验研究 [J]. *中华外科杂志*, 2016, 54(3): 222-227.
- [21] 胡丽娟, 杜宁, 孙欣, 等. 厄贝沙坦通过 MAPK-ERK1/2 信号通路影响乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(6): 607-608, 611.
- [22] 刘丹, 郑立红, 李兴媚. 卡铂通过抑制 ERK1/2 通路诱导人卵巢癌细胞 S 和 G1 期阻滞 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(8): 815-823.

[收稿日期] 2020-05-08

陶磊,李婷婷,马旖旎,等. 青蒿琥酯对阿霉素致大鼠肾损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 47-51.
Tao L, Li TT, Ma YN, et al. Protective effect and mechanisms of artesunate on adriamycin-induced kidney injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 47-51.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.008

青蒿琥酯对阿霉素致大鼠肾损伤的保护作用

陶磊*, 李婷婷, 马旖旎, 陈仁兵, 李雪芹, 王金娜

(山东省医学科学院附属医院, 山东第一医科大学, 济南 250031)

【摘要】 目的 观察青蒿琥酯(ART)对阿霉素致大鼠肾损伤的保护作用,并初步探讨其作用机制。方法 32只雄性Wistar大鼠,随机分为空白对照组(NC组)、阿霉素模型组(ADR组)、青蒿琥酯低剂量组(ART-L)、ART高剂量组(ART-H),每组8只。其中ADR组、ART-L组和ART-H组均给予大鼠单次注射阿霉素(7.5 mg/kg)构建阿霉素肾损伤模型。造模成功后,ART-L组和ART-H组分别给予25 mg/kg和50 mg/kg的ART,NC组给予等体积的生理盐水。连续灌胃3周后,全自动生化分析仪检测各组大鼠血清中白蛋白(ALB)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)和肾功能指标血尿素氮(BUN)和血肌酐(Scr)的含量;HE染色观察各组大鼠肾组织病理学改变;使用试剂盒检测各组大鼠肾组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及丙二醛(MDA)含量。结果 与NC组相比,ADR组大鼠肾功能指标血清BUN、血清Scr和肾组织MDA水平明显升高(均 $P<0.01$),血清ALB和肾组织SOD、GSH-Px活力下降(均 $P<0.01$)。与ADR组相比,ART-L组和ART-H组大鼠肾功能指标血清BUN、血清Scr和肾组织MDA水平明显降低(均 $P<0.01$),血清ALB和肾组织SOD、GSH-Px活力升高(均 $P<0.01$)。HE染色显示ART可减轻ADR致大鼠肾损伤程度。结论 ART灌胃可以降低ADR致肾损伤大鼠的蛋白尿,改善肾功能和肾组织病理损伤,这种作用可能是通过青蒿素抑制肾组织氧化应激实现的。

【关键词】 青蒿琥酯;阿霉素;肾损伤;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0047-05

Protective effect and mechanisms of artesunate on adriamycin-induced kidney injury in rats

TAO Lei*, LI Tingting, MA Yini, CHEN Renbing, LI Xueqin, WANG Jinna

(Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong First Medical University, Jinan 250031, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate and explore the potential mechanism of the protective effects of artesunate on adriamycin-induced kidney injury in rats. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into four groups of 8 rats each: negative control (NC), kidney injury model (ADR), low-dose artesunate (ART-L), and high-dose artesunate (ART-H). The model group, ART-L and ART-H treatment groups received a single tail vein injection of adriamycin (7.5 mg/kg body weight). After modeling, the rats in the treatment groups were given 25 mg/kg (ART-L) and 50 mg/kg (ART-H) artesunate, intragastrically for 3 consecutive weeks. The NC and ADR groups were injected with isotonic saline. Blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were measured by an automatic biochemical analyzer. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observed renal morphological changes. Kits were used to measure the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in

【基金项目】 山东省医药卫生科技发展计划项目(2019WS180)。

【作者简介】 陶磊(1984—),男,硕士,主治医师,研究方向:肾病与血液透析。E-mail:taoleiyisheng@163.com

renal tissues of rats in each group. **Results** Serum levels of BUN and Scr, and the content of MDA in renal tissues were significantly higher in the ADR group than the NC group ($P < 0.01$), while the serum levels of ALB and the activities of SOD and GSH-Px in renal tissues were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the ADR group, serum levels of BUN and Scr, and the content of MDA in renal tissues were significantly lower in the ART-L and ART-H groups, while the serum levels of ALB and the activities of SOD and GSH-Px in renal tissues were significantly higher ($P < 0.01$). HE staining revealed that artesunate reduced renal injury induced by adriamycin. **Conclusions** Artesunate reduced urine protein in rats with adriamycin-induced kidney injury, improving renal function and pathological tissue damage. The underlying mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress induced by adriamycin in renal tissue.

【Keywords】 artesunate; adriamycin; kidney injury; oxidative stress

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是临床最常见的急危重症之一,其发病率约为 30%,并且与患者的预后不良有关,主要表现为突然丧失肾排泄功能,肾功能急性恶化^[1]。全球每年约有 400 万例死于 AKI,且发病率和死亡率不断攀升,造成严重的健康和经济问题^[2]。目前认为 AKI 是由于肾素血管紧张素系抑制剂和非甾体抗炎药对肾进、出小动脉的收缩作用的干扰而导致的,而在加强利尿的情况下极易发生脱水,导致血流动力学改变,AKI 情况进一步恶化^[3]。临床上对于 AKI 提倡早发现、早治疗,研究报道,对 AKI 进行早期干预可以改善其预后,并降低肾功能进一步恶化的风险^[4-5]。国内外对 AKI 的干预研究还处于探索阶段^[6],因此,找到新的治疗靶点显得尤为重要。氧化应激被认为是细胞病理损伤的关键致病因素,其导致的病理损伤贯穿于多种肾病发生、发展的过程中。体内氧化物质增多、抗氧化物质减少加重了肾细胞内的炎症反应,最终成为了肾病的发展及恶化的重要原因之一^[7]。青蒿素的半合成衍生物青蒿琥酯(artesanate, ART)是治疗疟疾的标准药物,而且还具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节及抗氧化应激的作用^[8]。本研究中采用阿霉素(adriamycin, ADR)诱导大鼠肾损伤,观察青蒿琥酯对阿霉素肾大鼠肾损伤的治疗作用,并探讨其可能的作用机制,为临床治疗提供合理用药依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重 220~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。Wistar 大鼠饲养于河北医科大学第四医院实验动物中心[SYXK(冀)2018-001],屏障环境温度 18℃~24℃,湿度 40%~60%,饲料、饮水均经过高压灭菌处理。所有动物实

验通过河北医科大学第四医院实验动物伦理审查(IACUC-4th Hos Hebum-201968),并依据优化、减少、替代的 3R 原则进行实验设计。

1.2 主要试剂与仪器

青蒿琥酯(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:H32020967);盐酸阿霉素(美国 Med Chem Express 公司);组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(Maleic dialdehyde, MDA)以及谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒购自于南京建成生物工程研究所;10%多聚甲醛溶液(北京索莱宝科技有限公司)。

全自动生化分析仪 LX20PRO(美国 Beckman Coulter 公司);Synergy HT 型多功能微孔板检测仪(美国 Biotek 公司);防脱载玻片(北京索莱宝科技有限公司);Tissue-Tek TEC 全自动组织石蜡包埋机(日本樱花公司);IVS-410 自动石蜡切片机(日本大和光机工业株式会社);CS-V1 型摊片烤片机(孝感宏业医用仪器有限公司);303-4A 数显电热保温箱(上海阳光实验仪器有限公司);BX41 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Qcapture 图像采集系统(加拿大 QIMAGING 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 阿霉素肾病模型的制备及分组

全部大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为四组:空白对照组(NC 组)、阿霉素模型组(ADR 组)、青蒿琥酯低剂量组(ART-L)和 ART 高剂量组(ART-H),每组 8 只。ADR 组、ART-L 组和 ART-H 组均经大鼠尾静脉注射阿霉素(7.5 mg/kg)^[9]。造模第 2 天,ART-L 组和 ART-H 分别给予 25 mg/kg 和 50 mg/kg 的 ART 灌胃,连续灌胃 3 周,NC 组给予等体积的生理盐水。

1.3.2 一般情况

观察内容包括各组大鼠的饮食、饮水、体重、毛色、大小便、水肿、精神状态,以及死亡情况。

1.3.3 大鼠尿蛋白、血清生化指标的测定

分别于 ART 给药 1 周、2 周、3 周后,收集各组大鼠 24 h 尿液,检测尿总蛋白(UTP);ART 末次给药 24 h 后,大鼠麻醉后,采用真空促凝采血管经腹主动脉采血 3~5 mL,静置后 3 000 r/min 离心 10 min,分离上层血清,全自动生化分析仪检测血清中白蛋白(ALB)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)和肾功能指标血尿素氮(BUN)和血肌酐(Scr)的含量。

1.3.4 肾组织病理学分析

大鼠肾组织经 4%多聚甲醛固定,经脱水、组织包埋后制成 4 μm 厚石蜡切片,行 HE 染色,光镜下观察肾组织病理改变。

1.3.5 肾组织 SOD、GSH-Px 活力、MDA 含量的测定

取部分肾组织,使用预冷的生理盐水漂洗后,加入 9 倍体积的预冷生理盐水,冰水浴中匀浆,4℃、2500 r/min 离心 10 min,收集上清液,按照试剂盒说明书分别检测 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

NC 组大鼠无明显异常表现,皮毛顺滑,行动自如,眼、口、鼻无异常分泌物,尿便正常;阿霉素给药后,大鼠出现精神萎靡,尿量不同程度下降,四肢水肿,体重减轻,毛欠光泽,秃顶,活动力差,进而出现红色尿液、消瘦等症状;阿霉素给药初期出现轻度腹泻,1 周后转好;ART 组大鼠虽然也表现出体重下降,但毛色有光泽,活动力尚可整理表现要优于模型组,而 ART-L 组和 ART-H 组的大鼠体重相比无明显差别,大鼠体重变化见图 1。实验全程期间各组大鼠均无死亡情况。

2.2 ART 对大鼠 24 h 尿液中 UTP 含量的影响

ADR 模型组大鼠各时间点 24 h 尿总蛋白(UTP)含量均高于 NC 组。经 ART 干预后,大鼠尿液中 UTP 含量有一定水平改善。结果可见,ART-L 组及 ART-H 组较 ADR 组 UTP 含量明显降低,ART-

H 组较 ART-L 组进一步降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.3 ART 对大鼠肾功能指标的影响

表 2 分析结果可见,与 NC 组比较,ADR 模型组大鼠血清尿素氮(BUN)和血肌酐(Scr)明显升高。ART-L 组和 ART-H 组两指标较 ADR 组低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 NC 组比较,ADR 组大鼠血清白蛋白(ALB)降低,ART-H 组和 ART-L 组较 ADR 组升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。而各组大鼠血清胆固醇(CHOL)和甘油三酯(TG)无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明 ART 能改善 ADR 组大鼠的肾功能指标。

2.4 各组大鼠肾组织病理学变化比较

HE 染色结果显示(见图 2),NC 组大鼠肾小管排列紧密,肾小管上皮细胞无明显病变;与 NC 组相比,ADR 组大鼠肾小管上皮细胞空泡及颗粒变性,部分细胞崩解、细胞碎屑阻塞管腔、裸基底膜形成;ART 干预后,各病理症状明显好转,低剂量组大鼠可见部分肾小管上皮细胞空泡及颗粒变性,看见少

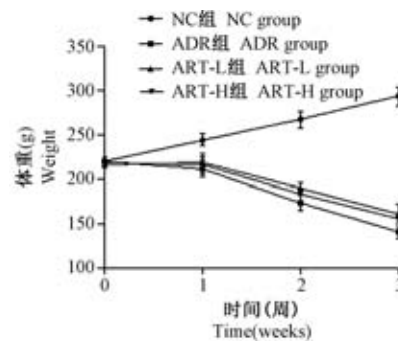


图 1 各组大鼠体重变化

Figure 1 Rat body weight changes in each group

表 1 各组大鼠不同时间点 24 h UTP 比较 ($\bar{x}\pm s, n=8, \text{mg}$)

Table 1 Comparison of 24 h UTP at different time points in each group

组别 Groups	1 周 1 Week	2 周 2 Weeks	3 周 3 Weeks
NC 组 NC group	11.52±1.68	10.77±1.12	11.38±2.28
ADR 组 ADR group	54.31±8.26*	139.53±23.49*	235.86±35.25*
ART-L 组 ART-L group	36.49±5.74#	76.32±10.36#	106.84±24.81#
ART-H 组 ART-H group	27.65±3.66# Δ	59.92±8.83# Δ	86.25±9.32# Δ

注:与 NC 组比较,* $P<0.05$;与 ADR 组比较,# $P<0.05$;与 ART-L 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

Note. Compared with the NC group,* $P<0.05$. Compared with the ADR group,# $P<0.05$. Compared with the ART-L group, $\Delta P<0.05$.

表 2 各组大鼠生化指标检测结果比较($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Comparison of the biochemical indexes of rats in each group

组别 Groups	BUN (mmol/L)	Scr (μ mol/L)	ALB (g/L)	CHOL (mmol/L)	TG (mmol/L)
NC 组 NC group	7.74 \pm 0.53	16.85 \pm 1.92	32.14 \pm 3.51	2.66 \pm 0.21	0.86 \pm 0.13
ADR 组 ADR group	13.86 \pm 1.27*	40.72 \pm 5.64*	18.63 \pm 1.45*	2.84 \pm 0.36	0.82 \pm 0.11
ART-L 组 ART-L group	10.45 \pm 1.38 [#]	30.46 \pm 3.87 [#]	24.81 \pm 3.19 [#]	2.75 \pm 0.24	0.75 \pm 0.09
ART-H 组 ART-H group	9.63 \pm 1.04 [#]	25.03 \pm 3.44 [#]	28.22 \pm 3.75 [#]	2.78 \pm 0.27	0.78 \pm 0.14

注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 ADR 组比较, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the NC group, * $P<0.05$. Compared with the ADR group, [#] $P<0.05$.

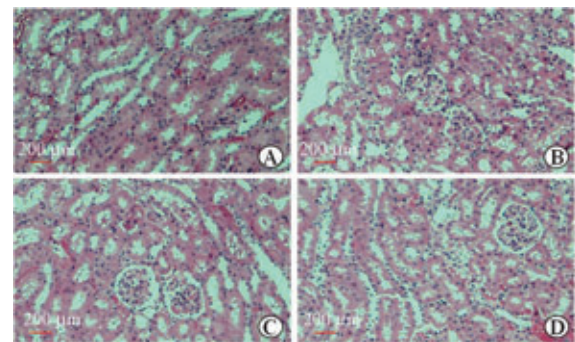
量细胞碎屑阻塞管腔、裸基底膜形成,可见再生;高剂量组可见部分肾小管上皮细胞空泡及颗粒变性,刷毛缘脱落,可见明显再生。以上病理结果表明 ART 能改善肾组织损伤程度,明确了 ART 对阿霉素致大鼠肾损伤的治疗效果。

2.4 ART 对大鼠肾组织 SOD、GSH-Px 活力、MDA 水平的影响

由表 3 可见,与 NC 组比较,ADR 组大鼠肾组织 SOD、GSH-Px 活力降低,而 MDA 含量升高(均 $P<0.05$);与 ADR 组比较,ART-L 组和 ART-H 组大鼠肾组织 SOD、GSH-Px 活力升高,MDA 含量降低(均 $P<0.05$)。

3 讨论

ADR 是一种常用的抗癌药物。然而,其在正常组织,包括心脏和肾中的副作用限制了其临床应用^[10]。ADR 引起的急性肾损伤模型是一个成熟的和高重复性的肾病模型。AKI 以管状细胞坏死为主要病理特征,所涉及的发病机制包括炎症、氧化应激和凋亡等^[11-12],其中,氧化应激是由促氧化水平和对抗抗氧化防御机制之间的失衡导致的。研究表明 ADR 诱导的 AKI 与抗氧化状态加剧有关,包括脂质过氧化最终产物丙二醛(MDA)含量升高和肾组织中抗氧化酶水平降低,从而导致了肾代谢途径的改变和肾血流动力学中断^[13]。ART 是经 FDA 批准的应用于抗疟疾治疗的一线药物,以往的研究表明,ART 还具有很好的抗炎、抗肿瘤以及抗病毒等疗效^[14],此外,ART 能够抑制抗氧化防御系统中非酶性和酶性成分活性,即 GSH 和 SOD 的水平降低,从而降低了细胞的氧化应激损伤^[15-16]。对于 ART 能否通过降低了细胞的氧化应激损伤来改善 ADR 所致的肾损伤,需要进一步研究探讨。



注: A:NC 组;B:ADR 组;C:ART-L 组;D:ART-H 组。

图 2 大鼠肾的病理学改变

Note. A, NC group. B, ADR group. C, ART-L group. D, ART-H group.

Figure 2 Pathological changes of the kidney tissues in rats

表 3 各组大鼠肾组织 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of the levels of SOD MDA and GSH-PX in kidney tissues of rats in each group

组别 Groups	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)	GSH-Px (U/mg protein)
NC 组 NC group	115.74 \pm 8.87	6.04 \pm 0.75	84.53 \pm 10.67
ADR 组 ADR group	72.35 \pm 5.42*	17.26 \pm 1.32*	49.51 \pm 6.82*
ART-L 组 ART-L group	96.28 \pm 17.66 [#]	11.68 \pm 1.01 [#]	62.74 \pm 8.89 [#]
ART-H 组 ART-H group	111.54 \pm 20.57 [#]	8.45 \pm 0.88 [#]	78.23 \pm 8.64 [#]

注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 ADR 组比较, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared to NC group, * $P<0.05$. Compared to ADR group, [#] $P<0.05$.

本研究利用 ADR 诱导的 AKI 大鼠模型探讨 ART 对 AKI 大鼠肾损伤的保护作用及机制研究。研究结果显示,与 NC 组相比,ADR 组大鼠 UTP 及血清 BUN、Scr 水平升高,同时 ADR 组肾病理结构严重损伤,肾小管上皮细胞空泡及颗粒变性,部分细胞崩解、细胞碎屑阻塞管腔、裸基底膜形成,符合急性肾损伤表现^[11,17]。与 ADR 组相比,ART-H 组和 ART-L 组血清 BUN、Scr 水平明显下降,受损的肾生理结构部分得到恢复,这表明 ART 能够改善肾功

能和肾组织的损伤。肾组织中 SOD、GSH-Px 活力和 MDA 水平可反映 ADR 处理后诱导的肾氧化和抗氧化状态。本研究结果显示模型组小鼠肾组织 GSH-Px 和 SOD 活力下降,MDA 水平升高,说明 ADR 可以造成肾组织的氧化和抗氧化状态的改变,抗氧化酶水平下降,而脂质过氧化物水平升高。与 ADR 组相比,ART-H 组和 ART-L 组的 SOD 和 GSH-Px 活力都明显升高,而 MDA 水平明显下降。结果提示,ART 可以促进细胞内抗氧化物质含量增加,提高细胞抗氧化应激能力,从而保护细胞免受氧化应激的损伤,这与文献中报道的一致^[18]。

综上所述,AKI 能明显改善 ADR 诱导的大鼠肾损伤,其作用机制可能与 AKI 对细胞氧化应激的调节有关,而在此过程中涉及一些信号通路的激活,在以往的文献中均有报道^[19-21],但还需要本研究进一步验证。本实验证实了 AKI 对 ADR 诱导的大鼠肾损伤的保护作用,从而为 ADR 肾损伤的临床预防及治疗提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(10): 607-625.
- [2] Srisawat N, Sileanu FE, Murugan R, et al. Variation in risk and mortality of acute kidney injury in critically ill patients: a multicenter study [J]. *Am J Nephrol*, 2015, 41: 81-88.
- [3] Prieto-García L, Pericacho M, Sancho-Martínez SM, et al. Mechanisms of triple whammy acute kidney injury [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 167: 132-145.
- [4] Meersch M, Schmidt C, Hoffmeier A, et al. Prevention of cardiac surgery associated AKI by implementing the KDIGO guidelines in high risk patients identified by biomarkers: the PrevAKI randomized controlled trial [J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(11): 1551-1561.
- [5] Balasubramanian G, Al-Aly Z, Moiz A, et al. Early nephrologist involvement in hospital-acquired acute kidney injury: a pilot study [J]. *Am J Kidney Dis*, 2011, 57(2): 228-234.
- [6] Sutherland SM, Kwiatkowski DM. Acute kidney injury in children [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2017, 24(6): 380-387.
- [7] Aghadavod E, Khodadadi S, Baradaran A, et al. Role of oxidative stress and inflammatory factors in diabetic kidney disease [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2016, 10(6): 337-343.
- [8] Zuo S, Li Q, Liu X, et al. The potential therapeutic effects of artesunate on stroke and other central nervous system diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1489050.
- [9] Dong M, Zhao M, Cui M, et al. Interleukin-18 binding protein attenuates renal injury of adriamycin-induced mouse nephropathy [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(8): 3005-3012.
- [10] Lin H, Hou CC, Cheng CF, et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha protects renal tubular cells from doxorubicin-induced apoptosis [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(5): 1238-1245.
- [11] 张勇, 张蓓, 宁华英, 等. 单次尾静脉注射法阿霉素大鼠肾病模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(1): 1-4, 封 2.
- [12] Ma ZN, Li YZ, Li W, et al. Nephroprotective effects of saponins from leaves of panax quinquefolius against cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1407.
- [13] Jha JC, Banal C, Chow BS, et al. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(12): 657-684.
- [14] Li S, Chaudhary SC, Zhao X, et al. Artemisinin protects human retinal pigmented epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by enhancing the activation of amp-activated protein kinase [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9): 2016-2028.
- [15] Chong CM, Zheng W. Artemisinin protects human retinal pigment epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage through activation of ERK/CREB signaling [J]. *Redox biology*, 2016, 9: 50-56.
- [16] Kumar VL, Verma S, Das P. Artesunate suppresses inflammation and oxidative stress in a rat model of colorectal cancer [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(8): 1089-1097.
- [17] Li XY, Chen HR, Zha XQ, et al. Prevention and possible mechanism of a purified Laminaria japonica polysaccharide on adriamycin-induced acute kidney injury in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 148: 591-600.
- [18] Verma S, Kumar VL. Artesunate affords protection against aspirin-induced gastric injury by targeting oxidative stress and proinflammatory signaling [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(2): 390-397.
- [19] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S, et al. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89-116.
- [20] Padiya R, Chowdhury D, Borkar R, et al. Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e94228.
- [21] Yokoyama Y, Maruyama K, Yamayoto K, et al. The role of calpain in an *in vivo* model of oxidative stress-induced retinal ganglion cell damage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(4): 510-515.

[收稿日期] 2020-09-02

皮婷,梁月琴,欧雯励蓉,等. 远志皂苷元对脂多糖诱发神经细胞炎症损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (11): 52-58.

Pi T, Liang YQ, Ou WLR, et al. Senegenin protects against lipopolysaccharide-induced neurite toxicity in a nerve cell model [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 52-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.009

远志皂苷元对脂多糖诱发神经细胞炎症损伤的保护作用

皮婷¹, 梁月琴¹, 欧雯励蓉², 朱晗³, 陶彦林³, 金醒昉^{1*}

(1.昆明医科大学附属延安医院,昆明 650051; 2.中南大学湘雅医学院,长沙 410013;
3.上海中医药大学中药研究所,上海 201203)

【摘要】 目的 研究具有神经营养作用的远志皂苷元对神经细胞炎症因子的影响,探讨远志皂苷元是否具有降低神经细胞炎症反应的作用,从而为缓解抗肿瘤药物的毒副作用寻找新的突破口。方法 体外培养小胶质细胞 BV2 细胞,采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 制备细胞炎症模型,观察不同浓度的远志皂苷元对 LPS 诱导的细胞炎症因子——一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的影响,从而发现较佳的远志皂苷元浓度;远志皂苷元 2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 及 3 $\mu\text{mol/L}$ 和阳性对照组地塞米松 10 $\mu\text{mol/L}$,主要通过 Griess Reagent 法检测炎症介质 NO 浓度;定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, QPCR) 法检测环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) mRNA 表达量;Western blot 法检测 COX-2 蛋白表达量;并用 LPS 诱导后的 BV2 炎症上清刺激 SH-SY5Y 细胞,再进行其细胞活力和 NO 浓度检测。结果 不同浓度远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响不同。与 LPS 组相比较, (5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$) 剂量组远志皂苷元抗炎作用不明显,且 50 $\mu\text{mol/L}$ 及 100 $\mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元可提高炎症介质 NO 的浓度,具有明显的促炎作用;而 (1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$) 剂量组中发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元具有明显抗炎作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 综上所述发现低剂量远志皂苷元具抗炎作用; (1.5 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$) 剂量组远志皂苷元均具有明显的降低 NO 浓度的作用,但以 2 $\mu\text{mol/L}$ 尤为显著 ($P < 0.001$), 据该结果后续实验中远志皂苷元分为低、中、高 (2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$) 剂量组;各组 COX-2 mRNA 表达情况对比发现,与 LPS 组相比,远志皂苷元 2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组中 COX-2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$), 仍稍弱于地塞米松组;另外相比 LPS 组,远志皂苷元 2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组均可降低 COX-2 蛋白表达水平,以 2 $\mu\text{mol/L}$ 效果最为显著 ($P < 0.05$)。结论 远志皂苷元可抑制 LPS 诱导的细胞炎症因子的释放及表达,表明具有神经营养作用的远志皂苷元可能还具有保护神经细胞炎症损伤的作用。

【关键词】 远志皂苷元;神经保护;炎症介质;肿瘤;化疗脑;神经营养

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0052-07

Senegenin protects against lipopolysaccharide-induced neurite toxicity in a nerve cell model

PI Ting¹, LIANG Yueqin¹, OU Wenlirong², ZHU Han³, TAO Yanlin³, JIN Xingfang^{1*}

(1.the Yan An Hospital Affiliated Kun Ming University, Kunming 650051, China.

【基金项目】 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目 (2018FE001(-271)); 云南省肿瘤免疫防治重点实验室开放课题 (2017DG004-01)。

【作者简介】 皮婷 (1986—), 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向: 中药药理学及个体化药学。E-mail: 308720051@qq.com。

【通信作者】 金醒昉 (1962—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 老年病医学 (心血管疾病方向)。E-mail: jinx177@126.com

2. Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013.

3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To study the neurotrophic and anti-inflammatory effects of senegenin on inflammatory factors in nerve cells to identify novel drugs that alleviate the toxic and side effects of anti-tumor drugs. **Methods** Microglial BV2 cells were cultured *in vitro*, and lipopolysaccharide (LPS) was used to prepare the cell inflammation model. The effects of different concentrations of senegenin (2, 2.5, 3 $\mu\text{mol/L}$) on the LPS-induced cellular inflammatory factor nitric oxide (NO) were observed to determine the optimal dose of senegenin compared with the positive control group (dexamethasone 10 $\mu\text{mol/L}$). The concentration of NO in inflammatory medium was detected by Griess Reagent. **Results** The effects of different concentrations of senegenin on the production of NO in LPS-induced BV2 cells were different. Compared with the LPS group, the anti-inflammatory effects of senegenin (5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) were not obvious. Moreover, the concentration of NO in the inflammatory medium was increased by 50 and 100, indicating a proinflammatory effect. In addition, in the senegenin 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ dose range, 1, 2, and 2 kept up with each other and had significant anti-inflammatory effects ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The low doses of senegenin had anti-inflammatory effects. All doses of senegenin, especially 2 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$), significantly reduced the concentration of NO. According to this result, senegenin was divided into low, medium and high dose groups in a follow-up test. CoX-2 mRNA expression in the senegenin 2 and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ groups was significantly decreased ($P < 0.001$) compared with the LPS group, but was slightly lower than that in the dexamethasone group. In addition, compared with the LPS group, 2, 2.5, and 3 $\mu\text{mol/L}$ senegenin reduced CoX-2 protein levels, with the most significant effect shown for 2 $\mu\text{mol/L}$ senegenin ($P < 0.05$). **Conclusions** Senegenin reduces the release and expression of inflammatory factors in microglia induced by LPS, suggesting senegenin has neurotrophic effects that might protect nerve cells from inflammatory injury.

【Keywords】 senegenin; neurotrophic T; inflammatory diators; tumor; chemo-brain; neuroprotection

据全国肿瘤登记中心,最新的肿瘤登记年报显示中国新发恶性肿瘤发病约 392.9 万人,死亡约 233.8 万人。平均每天超过 1 万人被确认为癌症,每分钟有 7.5 个人被确证为癌症。随着恶性肿瘤发病率的增高,化疗药物所扮演的角色也越来越重要,同时这些药物所引起的近期或远期的不良反应也日渐受到关注。最早是在接受化疗后的乳腺癌患者中发现,很多幸存者都出现记忆力下降等认知功能障碍,被称为“化疗脑”(chemo-brain)。近几年国内外大量研究表明,长期使用化疗药物后可导致患者出现“化疗脑”:即化疗相关性认知功能障碍,是癌症患者在化疗后出现的记忆力、学习力、注意力、推理能力、执行功能、信息加工速度和视觉空间功能等认知功能的损害^[1-4]。而有研究认为“化疗脑”主要是由于少量化疗药物或炎症反应细胞因子等透过血脑屏障,多因素作用后,造成中枢神经毒性,导致神经元损伤甚至神经再生障碍^[5-6]。由此可知,炎症因子在“化疗脑”的发生发展中起到了举足轻重的作用,且炎症细胞因子级联反应所引起的神经损伤是“化疗脑”发生的关键因素。

学者们发现神经营养因子或神经保护因子,如神经生长因子(neurogrowthfactor, NGF)^[7-8]、胰岛素

样生长因子-1 (insulin-like growth factor - 1, IGF1)^[9]、促红细胞生成素^[10-11]、白血病抑制因子(leukaemia factor, LIF)^[12]等,可一定程度的减缓神经病变,改善“化疗脑”。然而,由于它们的分子量难以透过血脑屏障、稳定性差、或对人体有害副作用等等,限制了其临床应用。

远志为常用药用植物,《神农本草经》记载:主咳逆伤中,补不足,除邪气,利九窍,益智慧,耳目聪明,不忘,强志倍力。富含皂苷类、寡聚糖类、口山酮类化合物,具有提高记忆、改善认知等药理作用^[13-15]。远志皂苷元为远志皂苷水解产物,为齐墩果烷型三萜,我们前期研究发现远志皂苷元可促进皮质神经元存活,促进神经元突起生长,具有类似神经营养因子作用^[16-18]。但远志皂苷元对神经细胞炎症损伤方面的影响研究较少。

为了探讨远志皂苷元对神经细胞的炎症损伤是否具有保护作用,本文以脂多糖作用小神经胶质细胞 BV2 诱导神经炎症损伤模型,通过观察炎症因子及炎症相关蛋白的表达,来探究具有神经营养作用的小分子中药单体—远志皂苷元对神经细胞炎症损伤的保护作用,为进一步研究“化疗脑”的防治提供新思路及新方向。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

本研究中涉及细胞人多巴胺能神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 由中科院细胞库提供;小鼠小胶质细胞 BV2 购自 ATCC。

1.2 主要试剂与仪器

远志皂苷元,购自北京索莱宝科技有限公司,含量 > 99.0%,实验时用二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)配置成相应浓度,4℃保存;地塞米松(dexamethasone, Dex)(M0606AS)购自大连美仑生物技术有限公司;胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);DMEM(美国 Gibco 公司);胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);磺胺(S9251),盐酸萘乙二胺(N9125)均购自美国 Sigma 公司;COX-2 引物(mus-cox2-F: CTGAGTGGGGT GATGAGCAA; mus-cox2-R: GAGGCAATGCGGT TCTGATAC)购自上海捷瑞生物工程有限公司;兔抗人 COX-2 单克隆抗体(12282)购自美国 CST 公司;GAPDH (GAPDH-F-5' ATGTGTCCGTCGTGGATC TGA3'; GAPDH-R-5' ATGCCTGCTTACCACCTTCT3')购自上海捷瑞生物工程有限公司;其余试剂均为国产分析纯。12 孔板、96 孔板(美国 Corning 公司产品);SW-CJ-1F 型超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);培养箱(英国 GalaxyS 公司);倒置显微镜(日本lympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经细胞的制备和培养

小胶质细胞 BV2 细胞用 DMEM/FBS+1% PS 的培养液,在 5% CO₂、37℃ 湿饱和条件下培养。细胞生长至 80% 融合度时,以 0.25% 的胰酶消化后按 1 瓶传至 3 瓶进行传代,取其的对数生长期细胞进行实验。

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 用 DMEM/FBS + 1% PS 的培养液,在 5% CO₂、37℃ 湿饱和条件下培养。细胞生长至 80% 融合度时,以 0.25% 的胰酶消化后按 1 瓶传至 4 瓶进行传代,取其的对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 炎症介质 NO 浓度检测

调整 BV2 细胞浓度为每毫升 1.5×10⁶ 个,种于 96 孔板中过夜,预给药远志皂苷元后 2 h,加入 LPS (终浓度 200 ng/mL),分为:空白对照组,LPS 组,地

塞米松组及远志皂苷元各浓度组。继续培养 22 h 后,利用 Griess Reagent 法检测炎症介质 NO 浓度。于超净台内分别每孔吸 80 μL 上清液到新的 96 孔板中,同时制作 NaNO₂ 标准曲线(200、100、50、25、12.5、0 μmol/L),每个浓度设置 2 个副孔,避光下加入 80 μL 预先配置好的 Griess 试剂(A 液:B 液=1:1),混匀后于培养箱中孵育 15 min,利用酶标仪在 540 nm 处测定吸光度值。绘制 NaNO₂ 标准曲线,将吸光度值带入标准曲线中计算 NO 含量。

调整 SH-SY5Y 细胞浓度为每毫升 1.6×10⁶ 个,种于 96 孔板中过夜,加入远志皂苷元作用于 LPS 诱发 BV2 细胞炎症的上清刺激细胞,培养 24 h。然后利用通过上述 Griess Reagent 法检测 NO 浓度。

1.3.3 兔抗人环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX2)表达水平检测

调整 BV2 细胞浓度为每毫升 1.5×10⁶ 个/mL,种于 12 孔板中过夜。分为:空白对照组,LPS 组,地塞米松组及远志皂苷元(2 μmol/L、2.5 μmol/L、3 μmol/L)低、中、高剂量组,预给药低、中、高剂量远志皂苷元后 2 h,加入 LPS(终浓度 200 ng/mL),再继续培养 22 h 后,1000 r/min 离心 5 min,收集细胞,QPCR 法检测 COX-2 mRNA(mus-cox2-F: CTGAGTGGGGT GATGAGCAA; mus-cox2-R: GAGGCAATGCGGT TCTGATAC)表达水平,Western blot 法检测 COX-2 蛋白表达水平。

1.3.4 QPCR 法检测 COX-2 mRNA 表达

实验分组如前所述,各组细胞均于药物干预 24 h 后提取 RNA。按试剂盒说明书进行总 RNA 的提取、逆转录成 cDNA,再进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 18 μL。反应条件如下:95℃ 预变性 5 min,继之 95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,95℃ 延 15 s,共 42 个循环。计算结果用 GAPDH 标化目的基因的相对表达,通过 2^{-ΔΔCt} 定量目的基因。

1.3.5 Western blot 印迹法检测 COX-2 蛋白表达

实验分组如前所述。各组细胞均于药物干预 24 h 后提取细胞蛋白。上样前先将制备好的蛋白样品 95℃ 煮 5 min,冷却后瞬时离心,待用。取变性后的各组细胞蛋白等量上样到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,电泳结束后将胶上的蛋白转移到 PVDF 膜,100 V 转膜 2 h 后用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1.5 h,孵育相应的一抗 4℃ 过夜,次日用 PBST 室温下洗涤 3 次,每次 10 min。然后据一抗的抗性选择相同抗性的二抗(稀释比例为 1:5000)进行室温下孵育 1

h,用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min。再据底物试剂盒要求显影、拍照,并保存图像。运用 TanonImage 软件进行目的蛋白灰度分析。

1.3.6 细胞活力检测

调整 SH-SY5Y 细胞浓度为每毫升 1.6×10^6 个,种于 96 孔板中过夜。分为:空白对照组(不做任何处理),对照组(除远志皂苷元外,其余均加入),LPS 组,地塞米松组及远志皂苷元低、中、高剂量组。SH-SY5Y 细胞贴壁后,弃上清换用 LPS 诱发小胶质细胞 BV2 炎症的上清 1 mL,并加入远志皂苷元($2 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $3 \mu\text{mol/L}$)继续培养 24 h 后,加入 CCK-8 孵育 0.5 h,采用波长 450 nm 测定吸光值。

1.4 统计学方法

实验结果数据以平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,应用 SPSS 22.0 软件作统计分析。先经方差齐性检验后,方差齐性采用 Tukey 法,方差不齐采用 Tamhane 法进行组间比较。显著性校检水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度的远志皂苷元对 LPS 诱发小胶质细胞 BV2 产生 NO 的影响

因前期研究发现^[16-18] $2 \mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元具有较好的神经营养作用,故在 BV2 细胞上摸索远志皂苷元的抗炎有效浓度时,设计了 1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 、5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 两个梯度。如图 1A-C 所示,图 1A 是从 1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元,结果显示 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度的远志皂苷元有抗炎作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);图 1B 是从 5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元,结果显示均无抗炎作用,还具有促炎作用,且呈浓度依赖性;根据以上结果缩窄远志皂苷元的浓度,图 1C 是 1.5、2、2.5、3、3.5 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元,结果显示这些浓度下

的远志皂苷元均有抗炎作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),且以 $2 \mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元抗炎作用最为明显。

2.2 远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 mRNA 表达的影响

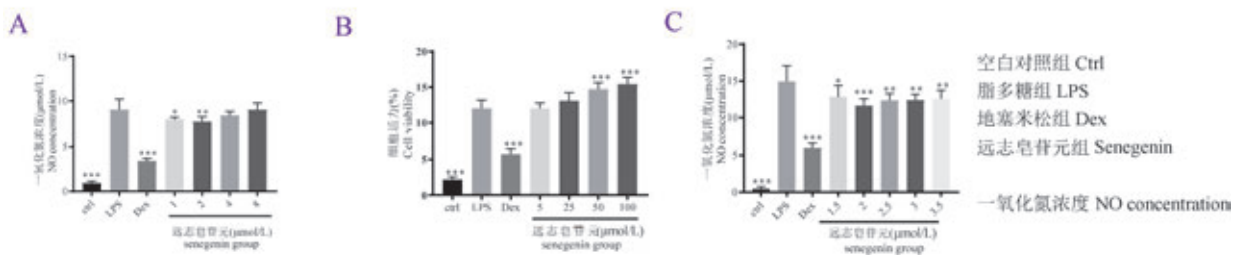
根据以上结果选取 2、2.5、3 $\mu\text{mol/L}$ (低、中、高)剂量远志皂苷元作用的细胞进行 COX-2 mRNA 表达的检测,结果如图 2 所示,LPS 作用后的 BV2 细胞 COX-2 mRNA 显著升高($P < 0.001$),阳性药地塞米松组和 LPS 组相比显著降低($P < 0.001$),2、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元组和 LPS 组相比也显著降低($P < 0.001$)。

2.3 远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

Western blot 检测低、中、高剂量组远志皂苷元 COX-2 蛋白的表达情况。结果如图 3 所示,LPS 作用后的 BV2 细胞中 COX-2 蛋白表达显著升高($P < 0.001$),与 LPS 组相比,阳性药地塞米松组 COX-2 蛋白表达显著降低($P < 0.001$),虽 $2 \mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元组 COX-2 蛋白表达量高于阳性对照组,但相比 LPS 组也有较明显的降低($P < 0.05$)。

2.4 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后的细胞活力影响

该部分实验主要是研究远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后的炎症影响,需加入前部分实验中 LPS 诱导 BV2 细胞炎症后的上清,所以该部分实验分了两个实验对照(Ctrl)组,一个对照组不加 BV2 细胞炎症上清,另一个对照加入该上清。这样更好的排除了其他因素对结果的影响,增加该实验结果的说服力,确保该部分实验中远志皂苷元为主要实验变量,明确远志皂苷元在该部分实验中的作用。



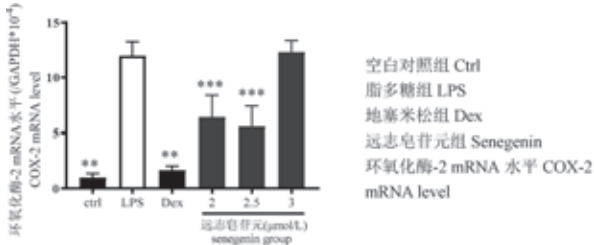
注:与 LPS 组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 不同浓度远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 释放量的影响

Note. Compared with the LPS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 1 Effects of different concentrations of senegenin on the release of NO in LPS-induced BV2 cells

如图 4 所示,SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后,LPS 刺激 BV2 上清组的细胞活力和对照组相比显著下降($P<0.05$),给 2.5、3 $\mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元 BV2 上清可以保护 SH-SY5Y 细胞活力免遭 LPS 的影响($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



注:与 LPS 组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 2 远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 mRNA 表达水平的影响

Note. Compared with the LPS group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

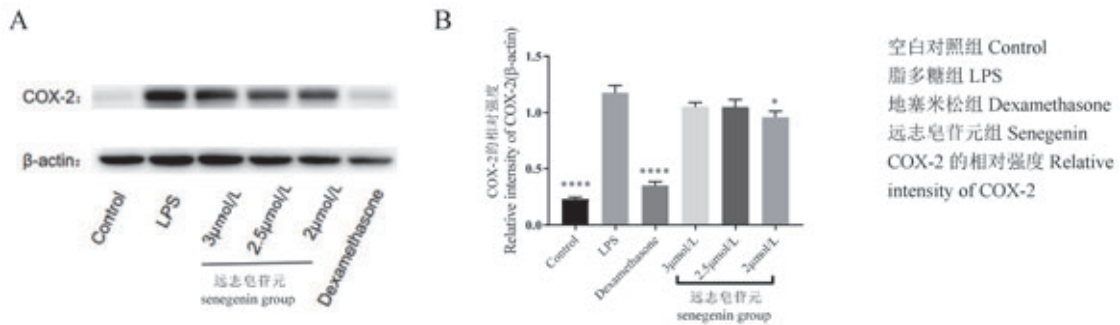
Table 2 Effect of senegenin on the expression level of coX-2 mRNA in LPS-induced BV2 cells

2.5 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后的细胞产生 NO 影响

如图 5 所示,实验分组与上述分组情况一样。SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后,LPS 刺激 BV2 上清组的 SH-SY5Y 细胞分泌 NO 和空白对照组相比显著上升($P<0.001$);相比 LPS 的 BV2 上清组,2、2.5、3 $\mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元 BV2 上清组均可较为显著地降低 SH-SY5Y 细胞 NO 释放量($P<0.001$)。

3 讨论

目前,因化疗药物所产生的不良反应,如:周围神经病变等神经毒性效应,在很大程度上影响了其临床使用。而对于某些高效抗肿瘤药,如铂类似物或紫杉烷家族成员而言尤为严重,由于这些药物一般需依赖剂量或治疗方案来发挥治疗效果。这种神经毒性效应将严重影响患者的生活质量^[19],即使在化疗停止很长一段时间仍存在。尽管可见一些神经再生,但其再生速度缓慢,且在很多情况下,神

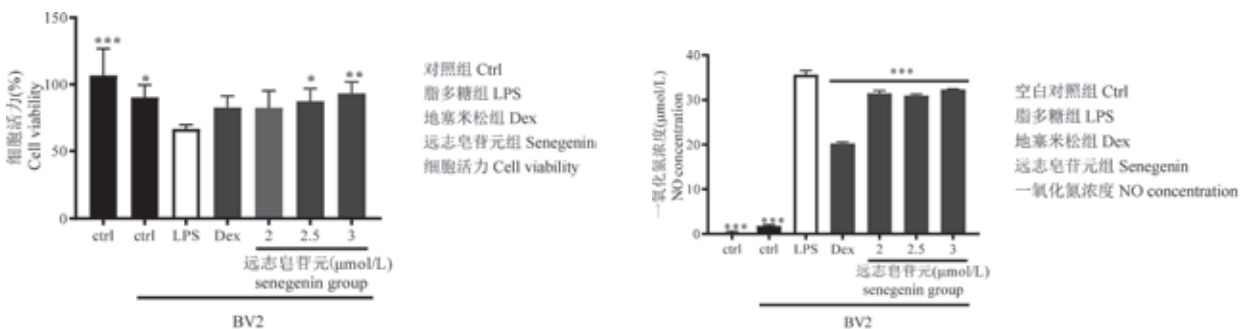


注:A: WB 条带;B:灰度值比较。与 LPS 组比较, * $P<0.01$, **** $P<0.001$ 。

图 3 远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞 COX-2 蛋白表达水平的影响

Note. A, WB strip. B, Gray value comparison. Compared with the LPS group, * $P<0.01$, **** $P<0.001$.

Table 3 Effect of senegenin on the expression level of COX-2 protein in LPS-induced BV2 cells



注:与 LPS 组比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

图 4 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后细胞活力的影响

Note. Compared with the LPS group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Table 4 Effects of senegenin on cell viability of SH-SY5Y after BV2 supernatant stimulation

注:与 LPS 组比较, *** $P<0.001$ 。

图 5 远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后 NO 释放量的影响

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

Table 5 Effects of senegenin on the release of NO after SH-SY5Y received BV2 supernatant stimulation

经病变的逆转也并不完全,甚至还可能影响生活质量及正常功能长达多年。

“化疗脑”作为一种神经系统的疾病,主要是癌症患者化疗后的认知功能的受损^[20],但其诱因较为复杂,发生机制仍未明确。有猜测“化疗脑”是异常大脑重构、延缓的损伤修复系列活动后,为神经-内分泌-免疫学改变所导致的结果^[21]。有研究报道化疗可引起促炎细胞因子水平的升高,引起炎症反应,可能是周围组织中产生的炎症因子,穿过血脑屏障影响大脑功能,也可能是化疗后直接导致大脑内部产生炎症反应,这点尚未明确^[22-23]。但有研究明确炎症因子与化疗后认知障碍的发生密切相关,且化疗后大量炎症因子的产生又促进了患者“化疗脑”的发展^[24]。体外实验中发现 5-FU 等可显著地促进促炎因子的产生^[25]。有学者发现在恶性肿瘤如乳腺癌、霍奇金病等患者体内炎症因子水平显著升高^[26-27]、神经元凋亡,猜测这一改变与“化疗脑”的发生密切相关。可肯定的是炎症反应及其相关细胞因子可致神经元受损并降低海马神经元再生功能,导致认知障碍^[28]。因此,抑制炎症因子的释放,可能对改善神经损伤及延缓“化疗脑”具有重要的意义。

本研究中不同浓度远志皂苷元对 LPS 诱导的 BV2 细胞产生 NO 的影响的浓度筛选结果显示,5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元均无抗炎症反应作用,且与 LPS 组相比,5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元反而有明显地促炎作用,以 100 $\mu\text{mol/L}$ 效果最显著($P < 0.001$);而 1.5、2、2.5、3、3.5 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元均可显著地降低 NO 释放,尤以 2 $\mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元降低作用较为显著($P < 0.001$)。表明低浓度远志皂苷元可降低 NO 释放,可能具有抗炎症作用。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸代谢前列腺素过程的主要限速酶,COX 同工酶一 COX-2 是一种重要的炎症介质,炎症反应伴随 COX-2 表达增加与许多神经疾病的病理过程中神经元的变性和凋亡有关。Yang 等^[29]发现经甲氨蝶呤治疗乳腺癌小鼠后其海马功能障碍,与其前列腺素合成酶、COX-2 及 NO 合成酶 iNOS 表达上调密切相关。在认知障碍患者或动物模型的研究中发现,氟西汀可通过提高海马神经的再生及可塑性,增加脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,来改善其认知功能^[30-31]。仝太山等^[32]研究发现乳腺癌患者化疗后

的认知功能障碍与其自身 BDNF 水平下降具有显著相关。茅东升等^[33]报道 NGF 可减少 LPS 引起的 PC12 细胞的坏死和凋亡,对 LPS 损伤具有保护作用。还有研究报道 NGF 可抑制 LPS 诱导的成骨细胞产生 NO,同时抑制 COX-2 mRNA 的表达,具有抗炎作用^[34]。前期研究中,我们发现远志皂苷元可促进神经突起生长、促进细胞存活,具有类似神经营养因子作用,且还发现远志皂苷元可提高 BDNF mRNA 表达水平^[16-18]。本研究选取 2、2.5、3 $\mu\text{mol/L}$ 的远志皂苷元作用于 LPS 诱导的 BV2 细胞,观察炎症因子 COX-2 的表达情况。结果显示,远志皂苷元可不同程度地抑制炎症相关蛋白 COX-2 的表达,以 2 $\mu\text{mol/L}$ 远志皂苷元抑制作用较为明显($P < 0.05$)(图 2、3)。表明远志皂苷元可抑制神经炎症因子释放,具有改善神经损伤的作用。

本研究还观察了远志皂苷元对 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后是否具有保护作用,发现远志皂苷元不仅可促进 BV2 炎症上清刺激后的 SH-SY5Y 细胞的存活,且呈剂量依赖性;还可显著地降低 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后 NO 的释放,这表明远志皂苷元可能具有降低炎症反应的作用,具有神经保护作用。

综上所述,远志皂苷元不仅可降低 LPS 诱导后炎症介质 NO 的释放,抑制炎症介质 COX-2 的表达;也能促进 SH-SY5Y 接受 BV2 炎症上清刺激后细胞存活的同时抑制 NO 的释放量,表明远志皂苷元具有类似神经营养因子作用,改善神经炎症病变,具有潜在的缓解“化疗脑”的作用。在下一步实验中,将建立不同的细胞及动物模型,如化疗药物损伤模型等,进一步观察远志皂苷元的神经保护作用,为“化疗脑”的治疗提供新方向、新思路。

参考文献:

- [1] Lange M, Rigal O, Clarisse B, et al. Cognitive dysfunctions in elderly cancer patients: A new challenge for oncologists [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(6): 810-817.
- [2] Ren X, St Clair DK, Butterfield DA. Dysregulation of cytokine mediated chemotherapy induced cognitive impairment [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 117: 267-273.
- [3] Lyons L, Bennett G, Wignmore P. Animal models of cognitive impairment induced by methotrexate. In: Castillo V, moyano L (eds) *methotrexate: pharmacology, clinical uses and adverse effects* [J]. *Nova Sci Pub*, 2012, 11: 181-198.
- [4] Kanaskie ML, Loeb SJ. Erratum to: the experience of cognitive change in women with breast cancer following chemotherapy [J].

- J Cancer Surviv, 2015, 9(2): 373.
- [5] Wang XM, Walitt B, Saligan L, et al. Chemobrain: A critical review and causal hypothesis of link between cytokines and epigenetic reprogramming associated with chemotherapy [J]. Cytokine, 2015, 72(1): 86-96.
- [6] Ren X, St Clair DK, Butterfield DA. Dysregulation of cytokine mediated chemotherapy-induced cognitive impairment [J]. Pharmacol Res, 2017, 117: 267 - 273.
- [7] Apfel SC, Arezzo JC, Lipson L, et al. Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy [J]. Ann Neurol, 1992, 31(1): 76-80.
- [8] Hayakawa K, Itoh T, Niwa H, et al. NGF prevention of neurotoxicity induced by cisplatin, vincristine and taxol depends on toxicity of each drug and NGF treatment schedule; *in vitro* study of adult rat sympathetic ganglion explants [J]. Brain Res, 1998, 794(2): 313-319.
- [9] Contreras PC, Vaught JL, Gruner JA, et al. Insulin-like growth factor-I prevents development of a vincristine neuropathy in mice [J]. Brain Res, 1997, 774(1-2): 20-26.
- [10] Bianchi R, Brines M, Lauria G, et al. Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental Cisplatin peripheral neurotoxicity [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(8): 2607-2612.
- [11] Orhan B, Yalcin S, Nurlu G, et al. Erythropoietin against cisplatin-induced peripheral neurotoxicity in rats [J]. Med Oncol, 2004, 21(2): 197-203.
- [12] Oztürk G, Erdoğan E, Anlar O, et al. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice [J]. Cytokine, 2005, 29(1): 31-41.
- [13] 马洪伟, 付文亮, 钟美蓉, 等. 远志药理活性研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2010, 27(2): 196-198.
- [14] 杨贤志, 陈勤, 陈庆林, 等. 远志皂苷元对 β 淀粉样蛋白片段 1-40 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 379-384.
- [15] 别曼, 徐颖, 胡慧玲, 等. 远志皂苷元对氧化应激损伤的视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. 中国病理生理学杂志, 2012, 28(6): 1091-1096.
- [16] 皮婷, 薛小燕, 林炼峰, 等. 远志皂苷元对新生大鼠皮质神经元的营养作用 [J]. 中国药理学与毒理学, 2011, 25(1): 40-44.
- [17] 皮婷, 薛晓燕, 罗焕敏. 远志皂苷元神经营养作用研究 [J]. 中药材, 2012, 36(9): 1477-1480.
- [18] Pi T, Zhou XW, Cai L, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation by senegenin is required for survival and neurite outgrowth of cortical neurons [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1257-1262.
- [19] Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. J Neurol, 2002, 249(1): 9-17.
- [20] Field TM, Shin M, Stucky CS, et al. Electrochemical measurement of dopamine release and uptake in zebrafish following treatment with carboplatin [J]. Chemphyschem, 2018, 19(10): 1192-1196.
- [21] Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 192 - 201.
- [22] Wu MD, Hein AM, Moravan MJ, et al. Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1beta and not rescued by voluntary running [J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(2): 292-300.
- [23] Bastos GN, Moriya T, Inui F, et al. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus [J]. Neuroscience, 2008, 155(2): 454 - 462.
- [24] 李帅, 谢长生. 化疗脑发病机制及治疗的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(4): 355-358.
- [25] Elsea CR, Roberts DA, Druker BJ, et al. Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity [J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2355.
- [26] Janelins MC, Mustian KM, Palesh OG, et al. Differential expression of cytokines in breast cancer patients receiving different chemotherapies: implications for cognitive impairment research [J]. Support Care Cancer, 2012, 20(4): 831-839.
- [27] Kesler S, Michelle J, Della K, et al. Reduced hippocampal volume and verbal memory performance associated with interleukin - 6 and tumor necrosis factor-alpha levels in chemotherapy-treated breast cancer survivors [J]. Brain Behav Immun, 2013, 30(Suppl0): S109-S116.
- [28] Wigmore P. The effect of systemic chemotherapy on neurogenesis, plasticity and memory [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2013, 15: 211-240.
- [29] Yang M, Kim JS, Kim J, et al. Acute treatment with methotrexate induces hippocampal dysfunction in a mouse model of breast cancer [J]. Brain Res Bull, 2012, 89(1-2): 50-56.
- [30] Castrén E, Rantamäki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity [J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 289-297.
- [31] Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, et al. Antidepressants stimulate hippocampal neurogenesis by inhibiting p21 expression in the subgranular zone of the hippocampus [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27290.
- [32] 全太山, 叶智存, 宗剑, 等. 乳腺癌“化疗脑”与脑源性神经营养因子的相关性 [J]. 西南医科大学学报, 2017, 40(5): 472-474.
- [33] 茅东升, 宋必卫, 朱旭红, 等. 神经生长因子对 PC12 细胞脂多糖损伤的保护作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(1): 93-98, 后插 10.
- [34] 汪琼, 路晓森, 张红园, 等. 神经生长因子对脂多糖诱导的成骨细胞炎症反应的影响 [J]. 现代口腔医学杂志, 2011, 25(4): 290-293.

[收稿日期] 2020-04-07

修磊,常娜,姜涛. 磷酸鞘胺醇参与 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺纤维化发病机制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 59-64.

Xiu L, Chang N, Jiang T. Sphingosine phosphate participates in the pathogenesis of pancreatic fibrosis in *KkAy* type 2 diabetic mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 59-64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.010

磷酸鞘胺醇参与 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺纤维化发病机制探讨

修磊¹,常娜²,姜涛^{1*}

(1.首都医科大学附属北京世纪坛医院内分泌科,北京 100038;

2.首都医科大学基础医学院细胞生物学系,北京 100069)

【摘要】 目的 探讨磷酸鞘胺醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)是否参与 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺纤维化的发生,这一过程是否和转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)相关。方法 应用 Real-time RT-PCR 的方法检测 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠及 C57 小鼠胰腺中鞘胺醇激酶 1(SphK1)的 mRNA 水平,并检测反映胰腺星状细胞活化的指标平滑肌肌动蛋白 α (α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β 1 以及细胞外基质的主要成分 I 型胶原 [collagen α 1(I), Col α 1(I)] 和 III 型胶原 [collagen α 1(III), Col α 1(III)] 的水平。结果 与对照组 C57 小鼠相比,*KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺高表达 SphK1、TGF- β 1、 α -SMA、Col α 1(I) 及 Col α 1(III),并且 SphK1 与 TGF- β 1 存在明显正相关。结论 磷酸鞘胺醇可能参与了 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺纤维化的发生,并且这一过程可能与 TGF- β 1 相关。

【关键词】 糖尿病;胰腺纤维化;磷酸鞘胺醇;鞘胺醇激酶;转化生长因子- β 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0059-06

Sphingosine phosphate participates in the pathogenesis of pancreatic fibrosis in *KkAy* type 2 diabetic mice

XIU Lei¹, CHANG Na², JIANG Tao^{1*}

(1. Department of Endocrinology, Beijing Shijitan Hospital of the Capital Medical University, Beijing 100038, China.

2. Department of Cell Biology, Municipal Laboratory for Liver Protection and Regulation of Regeneration, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】 Objective To explore whether sphingosine 1-phosphate (S1P) is involved in pancreatic fibrosis in *KkAy* type 2 diabetic mice, and whether this process is related to transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). **Methods** Real-time (RT)-PCR was used to detect the level of sphingosine kinase 1 (SphK1), TGF- β 1 and smooth muscle actin α (α -SMA), which were measured as an index that reflects the activation of pancreatic stellate cells in the pancreas in *KkAy* type 2 diabetic mice and C57 mice. The main components of the extracellular matrix, collagen α 1(I) [Col α 1(I)] and collagen α 1(III) [Col α 1(III)], were also measured by Real-time RT-PCR. **Results** SphK1, TGF- β 1, α -SMA, Col α 1(I) and Col α 1(III) were overexpressed in the pancreas in *KkAy* type 2 diabetic mice. There was a significant positive

【基金项目】 中国铁路总公司科技研究开发计划课题(J2016Z029)。

【作者简介】 修磊(1981—),女,主治医师,博士,研究方向:糖尿病及相关并发症。E-mail: leixiu30899@sina.com

【通信作者】 姜涛(1964—),女,主任医师,硕士,研究方向:糖尿病、甲状腺疾病及甲状旁腺等内分泌及代谢疾病。

E-mail: jiangtao30899@126.com

correlation between SphK1 and TGF- β 1 in pancreatic tissue of *KkAy* type 2 diabetic mice. **Conclusions** S1P may be involved in the development of pancreatic fibrosis in *KkAy* type 2 diabetic mice, and this process may be related to TGF- β 1.

[Keywords] diabetes; pancreatic fibrosis; sphingosine 1-phosphate; sphingosine kinase; transforming growth factor- β 1

磷酸鞘胺醇 (sphingosine 1-phosphate, S1P) 是一种具有生物活性的分子, 其对很多生理功能及病理过程都发挥着调控作用。鞘胺醇激酶 (sphingosine kinase, SphK) 是控制 S1P 合成的限速酶。大量的研究证据表明 S1P 参与多种疾病各种器官的纤维化发生, 如肾纤维化, 肝纤维化, 心肌纤维化, 肺纤维化及胰腺纤维化^[1-4]。胰腺纤维化发生的特点为胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 活化成为肌成纤维细胞 (myofibroblasts, MFs), 从而形成大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在胰腺内沉积, 表现为平滑肌肌动蛋白 α (α -smooth muscle actin, α -SMA) 以及细胞外基质的主要成分 I 型胶原 [collagen α 1 (I), Col α 1 (I)] 和 III 型胶原 [collagen α 1 (III), Col α 1 (III)] 产生增加^[5]。肌成纤维细胞来源广泛, 多种因素导致胰腺损伤, 胰腺星状细胞被激活, 转化为肌成纤维细胞, 表达平滑肌肌动蛋白 α , 并在胰腺内产生胶原促进胰腺纤维化的发生^[6]。在纤维化过程中, 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 也发挥了很重要的作用, TGF- β 1 是胶原产生过程中一种重要的介质, 同时能够诱导多种细胞向肌成纤维细胞的分化^[7-8]。

本研究试图探讨 SphK/S1P 及 TGF- β 1 在 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺星状细胞活化并产生胶原过程中的作用。这方面的研究将有助于我们更深入地了解糖尿病相关胰腺纤维化的发生机制, 可能对糖尿病相关胰腺纤维化的预防及治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验中使用了 SPF 级雄性 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠和 C57BL/6J 对照小鼠各 7 只, 日龄 49~56 d, 均体重 18~22 g, 均来源于中国医学科学院实验动物研究所 [SCXK (京) 2015-0004]。饲养于首都医科大学实验动物部 SPF 级动物房 [SYXK (京) 2015-0022], 单笼饲养。*KkAy* 2 型糖尿病小鼠给予高脂饮食 (购自于中国医学科学院实验动物研究所); C57BL/6J 小鼠给予普通饲料。所有小鼠均自由进食、进水。实验动物质量符合实验要求, 实验方案

经首都医科大学实验动物管理和使用委员会审批, 动物实验经过福利伦理审查 (AEEI-2017-090)。上述动物的取材于首都医科大学实验动物科学部屏障动物实验设施进行。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验中采集小鼠胰腺组织用于实时 RT-PCR 检测。

1.2 主要试剂与仪器

PCR 试剂购买自加利福尼亚应用生物系统公司; 其他常用试剂购买自美国西格玛奥德里奇公司。

1.3 实验方法

1.3.1 Real-time PCR

从新鲜的胰腺标本中提取总 RNA 使用的试剂盒购自德国 Qiagen 公司。我们的实验使用美国 ABI Prism 7300 序列检测系统进行实时 RT-PCR 检测。PCR 相关试剂购自美国 Applied Biosystems。引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

所有实验数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 25 统计软件对实验结果进行分析, 两组间比较采用 Student's *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。各项指标间的相关性分析采用 Person 相关分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺星状细胞活化增加

既往的研究表明, 胰腺星状细胞的活化在胰腺

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence list

基因类型 Gene type	序列 (5' -3') Sequence
18S rRNA	F: GTAACCCGTTGAACCCATT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCC
I 型胶原 Col α 1 (I)	F: AGGCGAGTGCTGTGCTT R: CCCTCGACTCCTACATCTTCTGA
III 型胶原 Col α 1 (III)	F: TGAAACCCAGCAAAACAAAA R: TCACTTGCAGCTGTTGATAAGATTAA
平滑肌肌动蛋白 α α -SMA	F: ATGCTCCCAGGGCTGTTTT R: TTCCAACCACTTACTCCCTGATGT
鞘胺醇激酶 1 SphK1	F: TGTACCCATGAACCTGCTGTCCCTGCACA R: AGAAGGCACTGGCTCCAGGAACAAG
转化生长因子- β 1 TGF- β 1	F: TGGCTTGACAGATTAAAA R: TCACTGGAGTTGTACGGCAG

纤维化的发生发展中起着非常重要的作用^[9]。本研究应用 Real-time RT-PCR 的方法检测 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠和 *C57* 对照小鼠胰腺中反映胰腺星状细胞活化的指标 α -SMA 的水平。结果显示:与对照组 *C57* 小鼠相比,*KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺高表达 α -SMA 达 5.3 倍(表 2、图 1),这一结果表明与正常对照组小鼠相比,*KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺星状细胞活化增加。

2.2 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺胶原表达增加

胰腺星状细胞活化后可产生大量细胞外基质在胰腺内沉积从而促进纤维化的发生,主要表现为细胞外基质的主要成分 Col α 1(I) 和 Col α 1(III) 产生增加。本研究应用 Real-time RT-PCR 的方法检测 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠和 *C57* 对照小鼠胰腺中细胞外基质的主要成分 Col α 1(I) 和 Col α 1(III) 的水平。结果表明与 *C57* 对照组相比,*KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 Col α 1(I) 和 Col α 1(III) 的水平都明显增加,分别为对照组的 7 倍(图 2A)和 3 倍(图 2B),这提示糖尿病会增加小鼠胰腺纤维化的发生。

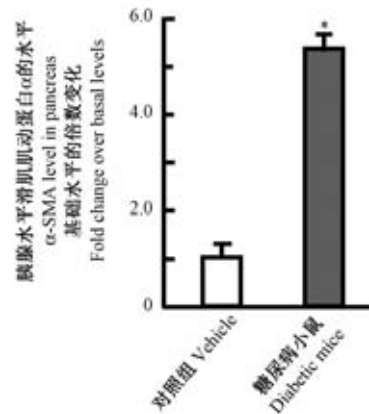
表 2 *C57* 对照小鼠与 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺 α -SMA 表达

Table 2 α -SMA mRNA expression in pancreas of *C57* mice and *KkAy* type 2 diabetic mice

组别 Groups	平滑肌肌动蛋白 α -SMA
对照组 Vehicle	0.495±0.162
糖尿病小鼠 Diabetic mice	2.613±0.216
<i>P</i>	< 0.001

2.3 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 及 TGF- β 1 含量增加

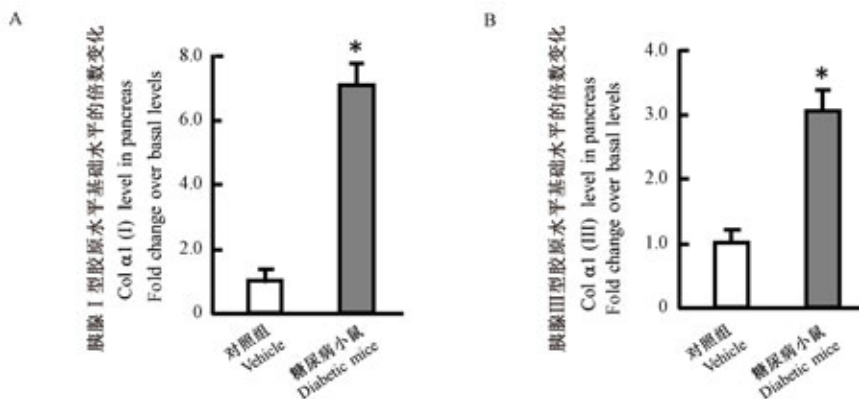
有研究表明 S1P 参与了多种组织纤维化时肌成纤维细胞活化过程^[10]。既往的研究表明,TGF- β 1 是胰腺星状细胞活化成为肌成纤维细胞的主要



注:*C57* 对照小鼠和 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 α -SMA 的 mRNA 表达水平对比。所有结果均在三个独立的实验中得到证实。与对照组相比, **P* < 0.05。

图 1 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺高表达 α -SMA
Note. mRNA expression of α -SMA in pancreas of *C57* mice and *KkAy* type 2 diabetic mice. All results were confirmed in three independent experiments. **P* < 0.05.

Figure 1 α -SMA mRNA expression was up-regulated in pancreas of *KkAy* type 2 diabetic mice



注:*C57* 对照小鼠和 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 Col α 1(I) (图 2A) 和 Col α 1(III) (图 2B) 的 mRNA 表达水平比较。所有结果均在三个独立的实验中得到证实。与对照组相比, **P* < 0.05。

图 2 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中胶原表达水平明显高于对照组

Note. mRNA expression of Col α 1(I) (2A) and Col α 1(III) (2B) in *C57* mice and *KkAy* type 2 diabetic mice. All results were confirmed in three independent experiments. Compared with vehicle, **P* < 0.05.

Figure 2 Collagen mRNA expression was up-regulated in *KkAy* type 2 diabetic mice

刺激因素之一^[11]。研究证实, TGF- β 1 能促进多种细胞, 包括肝星状细胞、肺成纤维细胞、小鼠的骨髓间充质干细胞以及胰腺星状细胞向肌成纤维细胞分化^[7]。本研究应用 Real-time RT-PCR 的方法检测 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠和 *C57* 对照小鼠胰腺中 SphK1 及 TGF- β 1 的 mRNA 水平。结果表明, *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 及 TGF- β 1 含量分别为 *C57* 对照小鼠的 2.6 倍(图 3A)及 15 倍(图 3B), 这提示, SphK1 及 TGF- β 1 可能参与了糖尿病相关胰腺纤维化的发生。

2.4 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 与 TGF- β 1 水平呈明显正相关

我们之前的研究表明 TGF- β 1 通过上调人肝肌成纤维细胞内 SphK1 的表达和活化, 从而诱导胶原表达^[12]。为了探讨 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺纤维

化是否与 TGF- β 1 诱导 SphK1 活化相关, 我们对 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 与 TGF- β 1 等指标的 mRNA 水平进行相关性分析。结果表明, *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 与 TGF- β 1、 α -SMA、Col α 1(I) 及 Col α 1(III) 水平均呈明显正相关, 结果有统计学意义(表 5), 这提示, TGF- β 1 与 SphK1 参与糖尿病相关胰腺纤维化的发生存在相关性。

3 讨论

胰腺纤维化常常是与慢性胰腺炎和胰腺癌相伴随的一种病理变化, 可导致胰腺功能丧失。胰腺纤维化是胰腺癌的发病基础, 胰腺癌由于其不易早期发现及无有效治疗方法成为恶性程度最高的肿瘤之一^[13]。目前有大量的研究在寻找潜在有应用价值的胰腺纤维化标志物, 但其敏感性和特异性并

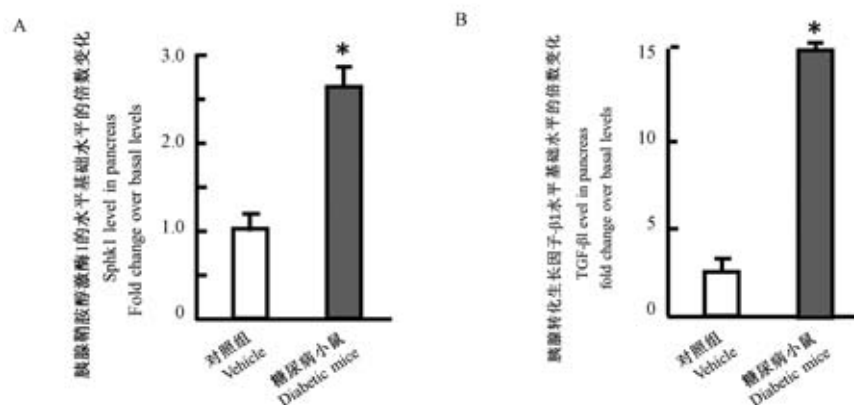
表 3 *C57* 对照小鼠与 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺胶原表达
Table 3 Collagen mRNA expression in pancreas of *C57* mice and *KkAy* type 2 diabetic mice

组别 Groups	I 型胶原 Col α 1(I)	III 型胶原 Col α 1(III)
对照组 Vehicle	7.130 \pm 2.621	6.630 \pm 1.218
糖尿病小鼠 Diabetic mice	49.315 \pm 4.549	18.915 \pm 2.035
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

表 4 *C57* 对照小鼠与 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺 SphK1 及 TGF- β 1 表达

Table 4 SphK1 and TGF- β 1 mRNA expression in pancreas of *C57* mice and *KkAy* type 2 diabetic mice

组别 Groups	鞘氨醇激酶 1 SphK1	转化生长因子- β 1 TGF- β 1
对照组 Vehicle	1.263 \pm 0.243	0.697 \pm 0.230
糖尿病小鼠 Diabetic mice	3.290 \pm 0.265	10.853 \pm 0.199
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001



注: *C57* 对照小鼠和 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1(图 3A)及 TGF- β 1(图 3B)的 mRNA 表达水平比较。所有结果均在三个独立的实验中得到证实。与对照组相比, * P <0.05。

图 3 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 及 TGF- β 1 表达水平明显高于 *C57* 小鼠对照组

Note. mRNA expression of SphK1 (3A) and TGF- β 1 (3B) in *C57* mice and *KkAy* type 2 diabetic mice. All results were confirmed in three independent experiments. Compared with vehicle, * P <0.05.

Figure 3 SphK1 and TGF- β 1 mRNA expression were up-regulated in *KkAy* type 2 diabetic mice

表 5 SphK1 与 TGF- β 1 等指标 mRNA 水平相关性分析
Table 5 Correlation analysis between mRNA levels of SphK1 and TGF- β 1

项目 Items	转化生长因子- β 1 TGF- β 1	平滑肌肌动蛋白 α α -SMA	I 型胶原 Col α 1 (I)	III 型胶原 Col α 1 (III)
鞘氨醇激酶 1 皮尔逊相关系数 SphK1 pearson correlation	0.993 **	0.985 **	0.981 **	0.824 *
显著性 Sig.	0.000	0.002	0.000	0.023
例数 N	7	7	7	7

注: *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 与 TGF- β 1 mRNA 表达的相关性分析表明小鼠胰腺中 SphK1 及 TGF- β 1 mRNA 表达呈明显正相关 ($r=0.993, P<0.0001$), 结果有统计学意义。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 均具有统计学意义。

Note. Correlation analysis of SphK1 and TGF- β 1 mRNA expression in the pancreas of *KkAy* type 2 diabetic mice ($r=0.993, P<0.0001$). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ are statistically significant.

不理想,因此研究胰腺纤维化发生的机制并寻找靶点能够早期阻止或逆转胰腺纤维化甚至是胰腺癌的发生有着重要的价值和意义^[13-15]。目前关于胰腺纤维化有大量的研究,但其发病机制尚不明确,有研究表明胰腺星状细胞的活化在胰腺纤维化的发生发展中起着非常重要的作用,活化的胰腺星状细胞可以通过 Wnt/ β -catenin 信号通路以及 Hedgehog 信号通路介导胰腺癌的发生和发展^[5]。胰腺星状细胞活化为肌成纤维细胞后表现为平滑肌肌动蛋白 α 以及 I 型胶原和 III 型胶原水平增加^[16-17]。我们的研究表明与正常对照组 C57 小鼠相比, *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中 α -SMA、Col α 1 (I) 及 Col α 1 (III) 水平明显增加,这表明糖尿病小鼠胰腺星状细胞活化成为肌成纤维细胞,并产生大量的细胞外基质,从而促进胰腺纤维化的发生。与正常小鼠相比,糖尿病小鼠胰腺纤维化发生明显增加。为了探讨 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺中胰腺星状细胞活化的机制,我们检测了胰腺中 SphK1 与 TGF- β 1 的水平,结果表明糖尿病小鼠胰腺中 SphK1 与 TGF- β 1 的水平均明显增加,并且二者呈明显正相关。上述结果提示 SphK1 与 TGF- β 1 参与了胰腺星状细胞的活化及胰腺纤维化的发生。为了进一步明确 S1P 在糖尿病小鼠胰腺纤维化发生过程中的作用,我们接下来的研究会在体外培养小鼠胰腺星状细胞,通过给予 SphK 的药理学抑制剂 DMS 或者用 RNA 干扰的方法特异性沉默胰腺星状细胞中 SphK1 的表达,从而检测高糖诱导下胰腺星状细胞的活化及胶原水平的变化。此外,我们的实验发现 *KkAy* 2 型糖尿病小鼠胰腺组织中 TGF- β 水平明显高于对照组,并且 SphK1 与 TGF- β 水平呈明显正相关,那么在糖尿病小鼠中是否因 TGF- β 水平升高进而诱导 SphK1 激活胰腺星状细胞进而促进胰腺纤维化的发生呢,这将在我们之后的实验进一步明确。

S1P 可以在细胞内作为第二信使直接发挥作

用,也可通过 ATP 结合转运蛋白分泌到细胞外,与细胞膜上的 S1P 受体(S1P receptors, S1PRs)结合后激活不同的下游信号通路并诱导不同的生理及病理过程。有研究表明 S1P 参与了多种器官纤维化的发生发展过程,但其参与胰腺纤维化发生的机制目前仍不明确。胰腺纤维化发病的高危因素包括家族史、吸烟、肥胖、慢性胰腺炎以及糖尿病等^[18-20]。目前有研究认为胰腺纤维化甚至是胰腺癌的高发与糖尿病发病率的增加呈相关性^[21-23]。大约 85% 的胰腺纤维化患者患有糖耐量异常或糖尿病^[24]。有学者认为糖尿病导致胰腺纤维化发生率增高与高血糖、高胰岛素血症及胰岛素抵抗相关^[20, 24-25],然而其机制目前仍不明确,需要进一步的研究。我们的研究已经证实,糖尿病小鼠胰腺中高表达 SphK1,这提示 S1P 可能参与了糖尿病相关胰腺纤维化的发生,接下来的实验我们还将探讨 S1P 是通过与 S1PRs 结合参与胰腺纤维化的发生还是作为第二信使直接在细胞内发挥作用的。我们的实验已经表明,在糖尿病小鼠胰腺中 SphK1、TGF- β 1、胰腺星状细胞活化的标志物 α -SMA 以及反映细胞外基质水平的 Col α 1 (I) 及 Col α 1 (III) 水平都明显增加, S1P 参与这一过程是否通过其受体发挥作用呢? 是否为 TGF- β 1 诱导 SphK1 激活从而促进胰腺星状细胞活化促进胶原产生呢? 此外,在胰腺星状细胞活化过程中,是否还有其他调控因子参与了高糖诱导 SphK1 表达的过程? 这些问题尚需进一步深入研究。

目前,仍然缺乏有效的治疗纤维化的方法。纤维组织一旦形成,很难修复成正常组织。因此,越来越多的研究致力于如何预防或减慢纤维化疾病发展及阻断纤维化之前上游生物学过程。大量的体外和体内实验表明, S1P 及其信号通路参与了多种组织纤维化的发展。此外, S1P 和相关的信号通路构成了复杂的信号网络,并具有许多信号通路,

例如炎症,凋亡和自噬,并调节纤维化的发展^[4]。但是,目前的研究尚未完全阐明 S1P 作用的机制和相关的纤维化信号传导途径,它们在不同器官和物种中的作用不同,需要进一步研究。此外,S1P 的干预和相关的信号通路是与纤维化有关的疾病的潜在治疗方法,S1P 也有望在将来成为纤维化疾病严重程度度的有效生物标志物。

参考文献:

- [1] Rodriguez YI, Campos LE, Castro MG, et al. Sphingosine-1 phosphate: a new modulator of immune plasticity in the tumor microenvironment [J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 218.
- [2] Uranbileg B, Ikeda H, Kurano M, et al. Increased mRNA levels of sphingosine kinases and S1P lyase and reduced levels of S1P were observed in hepatocellular carcinoma in association with poorer differentiation and earlier recurrence [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149462.
- [3] Li J, Wu H, Li W, et al. Downregulated miR-506 expression facilitates pancreatic cancer progression and chemoresistance via SPHK1/Akt/NF- κ B signaling [J]. *Oncogene*, 2016, 35(42): 5501-5514.
- [4] Wang E, He X, Zeng M. The role of S1P and the related signaling pathway in the development of tissue fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 9: 1504.
- [5] Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, et al. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(3): 382-405.
- [6] Apte M, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(5): 416-423.
- [7] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325-338.
- [8] Ricard-Blum S, Baffet G, Théret N. Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 122-149.
- [9] Sherman MH. Stellate cells in tissue repair, inflammation, and cancer [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2018, 34: 333-355.
- [10] Pyne NJ, Dubois G, Pyne S. Role of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid in fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(1): 228-238.
- [11] Jin G, Hong W, Guo Y, et al. Molecular mechanism of pancreatic stellate cells activation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. *J Cancer*, 2020, 11(6): 1505-1515.
- [12] Xiu L, Chang N, Yang L, et al. Intracellular sphingosine 1-phosphate contributes to collagen expression of hepatic myofibroblasts in human liver fibrosis independent of its receptors [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(2): 387-398.
- [13] Fogel EL, Shahda S, Sandrasegaran K, et al. A multidisciplinary approach to pancreas cancer in 2016: a review [J]. *Am J Gastroenterol*, 2017, 112(4): 537-554.
- [14] Halbrook CJ, Lyssiotis CA. Employing metabolism to improve the diagnosis and treatment of pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(1): 5-19.
- [15] Zhang B, Dong Y, Liu J, et al. Immunotherapy for patients with advanced pancreatic carcinoma: A promising treatment [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5703-5716.
- [16] Masamune A, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells: A dynamic player of the intercellular communication in pancreatic cancer [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39(1): S98-S103.
- [17] Moir JA, Mann J, White SA. The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer [J]. *Surg Oncol*, 2015, 24(3): 232-238.
- [18] Cui Y, Andersen DK. Diabetes and pancreatic cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(5): F9-F26.
- [19] Peto R. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010 [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(2): S1.
- [20] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(44): 9694-9705.
- [21] Polvani S, Tarocchi M, Tempesti S, et al. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(8): 2441-2459.
- [22] Szablewski L. Diabetes mellitus: influences on cancer risk [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2014, 30(7): 543-553.
- [23] Meier JJ, Giese A. Diabetes associated with pancreatic diseases [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(5): 400-406.
- [24] Biadgo B, Abebe M. Type 2 diabetes mellitus and its association with the risk of pancreatic carcinogenesis: a review [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2016, 67(4): 168-177.
- [25] Ng ML, Wadham C, Sukocheva OA. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(2): 243-252.

[收稿日期]2020-03-27

赵军,褚亚君,梁晋裕,等. 跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 65-71.

Zhao J, Chu YJ, Liang JY, et al. Effects of treadmill exercise on learning, memory, inflammation, and NGF expression in the hippocampus of diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 65-71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.011

跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响

赵 军¹, 褚亚君¹, 梁晋裕¹, 付 芳^{2*}

(1. 晋中学院体育系, 山西 晋中 030619; 2. 中北大学体育学院, 太原 030051)

【摘要】 目的 探讨 8 周跑台运动对 1 型糖尿病模型大鼠学习记忆能力、海马炎症因子白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平及神经生长因子(NGF)表达的影响。方法 44 只成年雄性 SD 大鼠随机分成对照组、运动组、STZ 组和 STZ 运动组,采用腹腔注射 STZ 诱导大鼠 1 型糖尿病模型,然后运动组及 STZ 运动组大鼠进行 8 周跑台运动。运动结束后采用 Y 迷宫实验评估大鼠学习记忆能力,ELISA 法进行海马炎症因子 IL-6 及 TNF- α 水平的测定,免疫组化法检测海马 NGF 的表达。结果 与对照组比较,Y 迷宫实验中,STZ 组大鼠达到学会标准训练次数及 30 次错误次数均显著增多($P < 0.01$),海马 IL-6、TNF- α 水平显著增加,海马 CA1、CA3 及 DG 区 NGF 个数及面积均显著下降($P < 0.01$);而 8 周跑台运动可改善 STZ 诱导的糖尿病大鼠学习记忆能力,海马 TNF- α 水平显著下降($P < 0.05$),而 IL-6 水平无显著改变($P > 0.05$),海马 CA1、CA3 及 DG 区 NGF 表达显著增强($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 跑台运动可通过增强海马 NGF 表达及抗炎能力改善 1 型糖尿病大鼠的学习记忆能力。

【关键词】 1 型糖尿病大鼠;跑台运动;学习记忆;炎症因子;NGF 表达;海马

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0065-07

Effects of treadmill exercise on learning, memory, inflammation, and NGF expression in the hippocampus of diabetic rats

ZHAO Jun¹, CHU Yajun¹, LIANG Jinyu¹, FU Fang^{2*}

(1. Physical Education Department, Jinzhong College, Jinzhong 030619, China.

2. Physical Education Institute, North University of China, Taiyuan 030051)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of treadmill exercise on learning, memory, and expression levels of inflammatory cytokine interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and nerve growth factor (NGF) in the hippocampus of type 1 diabetic rats. **Methods** Forty-four adult male Sprague - Dawley rats were randomly divided into control, exercise, STZ, and STZ exercise (STZ+E) groups ($n = 11$). A rat model of type 1 diabetes was established by STZ intraperitoneal injection. Exercise and STZ+E groups were subjected to 8 weeks of treadmill exercise. Subsequently, learning and memory were evaluated by Y maze test, IL-6 and TNF- α levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and NGF expression was detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with the control group, STZ group rats exhibited significantly increased standard training times and error times in 30 trials ($P <$

[基金项目] 山西省体育局课题(18TY131)。

[作者简介] 赵军(1979—),男,副教授,硕士,主要研究方向:体育教育与训练。E-mail:22854725@qq.com

[通信作者] 付芳(1979—),女,副教授,硕士,主要研究方向:运动与健康。E-mail:109494114@qq.com

0.01), IL-6 and TNF- α were levels significantly increased and the number and area of NGF expression in hippocampal CA1, CA3, and dentate gyrus was decreased ($P < 0.01$). Treatment of STZ-induced diabetic rats with exercise improved STZ-induced declines in learning and memory and significantly decreased TNF- α expression ($P < 0.05$). However, hippocampal IL-6 expression in STZ+E group rats was not significantly different ($P > 0.05$), and NGF expression in the hippocampus CA1, CA3, and dentate gyrus was significantly upregulated ($P < 0.05$). **Conclusions** Treadmill exercise can improve the learning and memory ability of type I diabetic rats by enhancing NGF expression and anti-inflammatory abilities in the hippocampus.

【Keywords】 type 1 diabetic rats; treadmill exercise; learning and memory; inflammatory cytokine; NGF expression; hippocampus

糖尿病是一种以慢性高血糖和胰岛素分泌缺陷为主要症状的最常见的代谢性疾病之一,其发病率呈上升趋势,到 2030 年,全球约有 3.66 亿人将受到影响^[1]。认知功能障碍是糖尿病最常见的并发症之一。Rama 等^[2]研究发现,1 型糖尿病患者的学习能力和记忆巩固处理能力减弱,抽象判断能力不足,导致患痴呆的风险增大。动物实验表明 STZ 可引起大鼠认知障碍和记忆丧失^[3]。然而,1 型糖尿病认知功能下降的病理生理机制尚不清楚。

有学者研究认为,高血糖可导致机体免疫系统功能紊乱、增加促炎症介质如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和 c 反应蛋白 (CRP) 的过度释放,与高血糖引起的认知功能下降有关^[4]。海马体是学习和记忆的关键脑区,对高血糖及炎症细胞因子非常敏感。神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 在神经元存活、轴突的生长和突触的形成方面发挥关键作用,被视为认知障碍的治疗靶点^[5]。Cai 等^[6]研究发现,促炎因子活性增加可能会通过降低大鼠海马 NGF 及脑源性神经营养因子 (BDNF) 水平,与异氟醚麻醉后大鼠认知功能障碍有关,而脑室注射 NGF 可通过增强大脑抗炎因子活性改善与年龄相关的空间学习能力的缺失^[7]。

有氧运动被认为是缓解糖尿病症状和改善认知功能的良好策略。研究表明,有氧运动可降低海马炎症细胞因子如 IL-6 和 TNF- α 水平^[8]。运动可通过不同机制影响大脑,而运动对神经营养因子包括 NGF 的影响是最重要的机制之一^[9]。本研究通过测量跑台运动 8 周对 STZ 诱导 1 型糖尿病大鼠学习记忆的影响,检测大鼠海马炎症因子 (TNF- α 及 IL-6) 及 NGF 表达的变化,探讨长期跑台运动是否可改善 1 型糖尿病大鼠学习记忆能力并分析其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄 SPF 级雄性健康成年 SD 大鼠 44 只,购于山西医科大学实验动物中心 [SCXK (晋) 2019-0004], 体重 200~220 g, 室温 22~24 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 55~65%, 所有动物均在山西医科大学动物房饲养 [SYXK (晋) 2019-0007]。本实验中涉及动物的使用及操作按 3R 原则给与动物人道关怀,并经学校实验动物管理伦理委员会批准 (1401086000735), 符合国家实验动物福利相关规定。

1.2 主要试剂与仪器

STZ (链脲佐菌素, 美国 Sigma 公司提供); TNF- α 、IL-6 试剂盒、兔抗 NGF 多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、SABC 及 DAB 显色试剂盒均由武汉博士德生物有限公司提供。血糖测量仪和试纸均购自美国强生公司; 恒温培养箱 (YLA-2000 型, 上海阳光实验仪器有限公司); 光学显微镜 (CX31 型, 日本 Olympus 公司); 形态学图像分析软件 (型号: JD-801), 江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠 1 型糖尿病模型建立

所有大鼠适应环境 1 周后, 随机抽取 22 只大鼠为对照组 (control group, CG; $n = 11$) 及运动组 (exercise group, EG; $n = 11$), 其余 22 只大鼠一次性腹腔注射 STZ (溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液, pH = 4.5) 65 mg/kg, 注射 STZ 后 3 d, 使用血糖仪从大鼠尾静脉取血测量血糖水平, 血糖超过 16.7 mmol/L 的大鼠为糖尿病大鼠。将 22 只糖尿病大鼠随机分为 STZ 组 ($n = 11$) 及 STZ 运动组 (STZ + exercise group, STZ+E; $n = 11$), 随后运动组及 STZ 运动组大鼠进行 8 周跑台运动, 实验期间每天观察大鼠的精神状态、进食、饮水及尿便情况, 跑台运动结束后第 2 天测量大鼠血糖水平, 以血糖升高较对照组明显

升高为判断模型成功标准。

1.3.2 跑台运动方案

根据 Reisi 等^[10] 描述的方法,造模成功后第 2 天,运动组及 STZ+E 组大鼠进行为期 8 周(5 天/周,0 坡度)的跑台运动。跑台训练前 5 d 跑台速度逐渐从 5 m/min 增加到 15 m/min;第 2 周,跑台速度从 16 m/min 增加到 22 m/min,以后每周跑速增加 2 m/min,每次运动时间持续 40 min,连续 8 周。与此同时,对照组及 STZ 组不运动,正常实验室环境饲养 8 周。

1.3.3 电 Y 迷宫实验程序

跑台运动结束后第 2 天所有大鼠进行电 Y 迷宫实验。

电 Y 迷宫实验由相同的三个臂组成(均装有 15 W 灯泡和电网)。实验时,先将大鼠放入迷宫适应 3~5 min,然后训练大鼠电刺激还未开始时,只要安全区灯亮,大鼠就会立即逃往安全区的反应能力;动物受电击逃到安全区后,刺激信号灯继续作用 10~15 s,灯熄后结束一次测试,大鼠所在支臂作为下一次测试的起点,依次重复。两次测试时间间隔为 30 s,每次训练 20 次休息 5 min,连续测试直到学会为止(学会标准:连续 20 次测试中有 18 次正确),记录每只大鼠达到学会标准前所需的训练次数为大鼠的空间学习记忆成绩;学习测试结束后 24 h,再用同样方法测试大鼠的记忆能力,记录大鼠 30 次电击过程中出现的错误次数,错误次数越少,说明记忆力越好。

观察指标如下:(1)达到标准所需的训练次数;(2)30 次电击过程中出现的错误次数。

1.3.4 海马炎症细胞因子水平测量

Y 迷宫测试结束后即刻将每组 6 只大鼠断头取脑,冰生理盐水冲洗干净后迅速分离海马称重,并用生理盐水按(1:9)的比例制成 10% 的组织匀浆,离心(12000 r/min,10 min)后取上清液,采用 ELISA 法,参照试剂盒说明进行海马炎症因子 IL-6 及 TNF- α 水平的测定。

1.2.5 海马 NGF 免疫组化检测

Y 迷宫测试结束后即刻,每组剩余 5 只大鼠经麻醉后,4%多聚甲醛溶液心脏灌注取脑,石蜡包埋脑组织,海马经石蜡切片连续冠状切片(片厚 5 μ m),切片依次经梯度乙醇脱蜡、脱水后滴加 30% H_2O_2 室温孵育 30 min,PBS 液漂洗 3 次后滴加兔抗大鼠 NGF(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 液漂洗 3 次后滴加生物素化羊抗兔 NGF 二抗孵育(37 $^{\circ}$ C、30 min),PBS 液清洗后 DAB 室温显色 10 min,苏木素复染 2~3 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

每组海马每个区选取 10 张切片,每张切片取 5 个视野采集图像,计数海马 CA1、CA2、CA3 及 DG 区 NGF 阳性细胞数(number)及面积(μ m²),取其平均值作为最后结果。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件包进行数据统计,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 法检验组间差异,方差不齐采用 Dunnetts 法检验组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Y 迷宫结果

与对照组比较,STZ 组大鼠达到学会标准训练次数显著增加($P < 0.01$),运动组大鼠训练次数显著减少($P < 0.05$),而 STZ 运动组大鼠与对照组比较,训练次数无显著差异($P < 0.05$);与 STZ 组大鼠比较,STZ 运动组大鼠达到学会标准训练次数显著下降($P < 0.05$)。见表 1。

与对照组比较,STZ 组及 STZ 运动组大鼠 30 次错误次数均显著增加($P < 0.01$),而运动组大鼠与对照组比较,30 次错误次数无显著差异($P > 0.05$);与 STZ 组比较,STZ 运动组大鼠 30 次错误次数显著下降($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 Y 迷宫测试结果($\bar{x} \pm s, n = 11$)
Table 1 Results of Y-maze test in every group rats

组别 Groups	对照组 Control group	运动组 Exercise group	STZ 组 STZ group	STZ 运动组 STZ+exercise group
训练次数(次) Training numbers(time)	28.36 \pm 4.08	23.45 \pm 3.67 [#]	33.72 \pm 5.16 ^{##}	30.55 \pm 4.59 [*]
30 次错误次数(次) Error times in 30 times(time)	7.09 \pm 1.58	7.00 \pm 1.18	9.18 \pm 1.73 ^{##}	7.98 \pm 1.88 ^{##}

注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;STZ 运动组与 STZ 组比较,^{*} $P < 0.05$ 。下同。

Note. Compared with the control group,^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$. STZ+E group compared with the STZ group,^{*} $P < 0.05$. The same as below.

2.2 海马炎症因子结果

与对照组比较,STZ 组大鼠海马炎症因子 IL-6 及 TNF- α 水平均明显增加 ($P < 0.01$); 而经过 8 周跑台运动,与 STZ 组大鼠比较,STZ 运动组大鼠海马促炎因子 TNF- α 水平显著减少 ($P < 0.05$), 而 IL-6 水平无显著改变 ($P > 0.05$); 与对照组比较,运动组大鼠海马促炎因子 IL-6 及 TNF- α 水平均无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 海马 NGF 表达结果

与对照组比较,STZ 组大鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 NGF 个数和面积均明显下降 ($P < 0.01$)。经过 8 周跑台运动,与 STZ 组大鼠比较,STZ 运动组大鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 NGF 个数和面积均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$); 而 STZ 组大鼠海马 CA2 区 NGF 个数和面积与对照组及 STZ 运动组大鼠比较均无显著差异 ($P > 0.05$)。与对照组比较,运动组大鼠除海马 DG 区 NGF 面积显著高于对照组外 ($P <$

0.05), 海马 DG 区 NGF 个数及海马其他 3 区 NGF 个数和面积与对照组比较均无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 3、表 4、图 1。

3 讨论

糖尿病被认为是认知功能障碍发展的一个独立危险因素^[11]。研究发现,与非糖尿病患者相比,糖尿病患者认知功能障碍的风险增加 1.5 倍,痴呆风险增加 1.6 倍^[12]。Liu 等^[13]通过认知量表研究发现,糖尿病患者空腹血糖水平升高与认知功能下降有关。Li 等^[14]通过 Y 迷宫的自发性交替反应证实,高脂饮食及 STZ 诱导的糖尿病大鼠存在学习记忆障碍。Oliveira 等^[15]通过 T 迷宫实验也观察到了连续 2 d 腹腔注射 STZ (90 mg/kg) 诱导的糖尿病小鼠出现记忆缺陷。本研究使用 Y 迷宫试验证实,STZ 诱导的糖尿病大鼠在 Y 迷宫中表现出空间学习及记忆缺陷,具体表现为与对照组比较,STZ 组大鼠

表 2 各组大鼠海马炎症因子 IL-6 及 TNF- α 水平结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Results of the hippocampus inflammatory biomarkers in every group rats

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组 Control group	37.16 \pm 6.05	57.81 \pm 6.60
运动组 Exercise group	35.50 \pm 5.94	56.57 \pm 5.36
STZ 组 STZ group	49.60 \pm 4.07 ^{##}	70.67 \pm 6.37 ^{##}
STZ 运动组 STZ+exercise group	44.86 \pm 2.74 [*]	64.01 \pm 3.89 ^{#*}

表 3 各组大鼠海马 CA1、CA2 区 NGF 表达结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

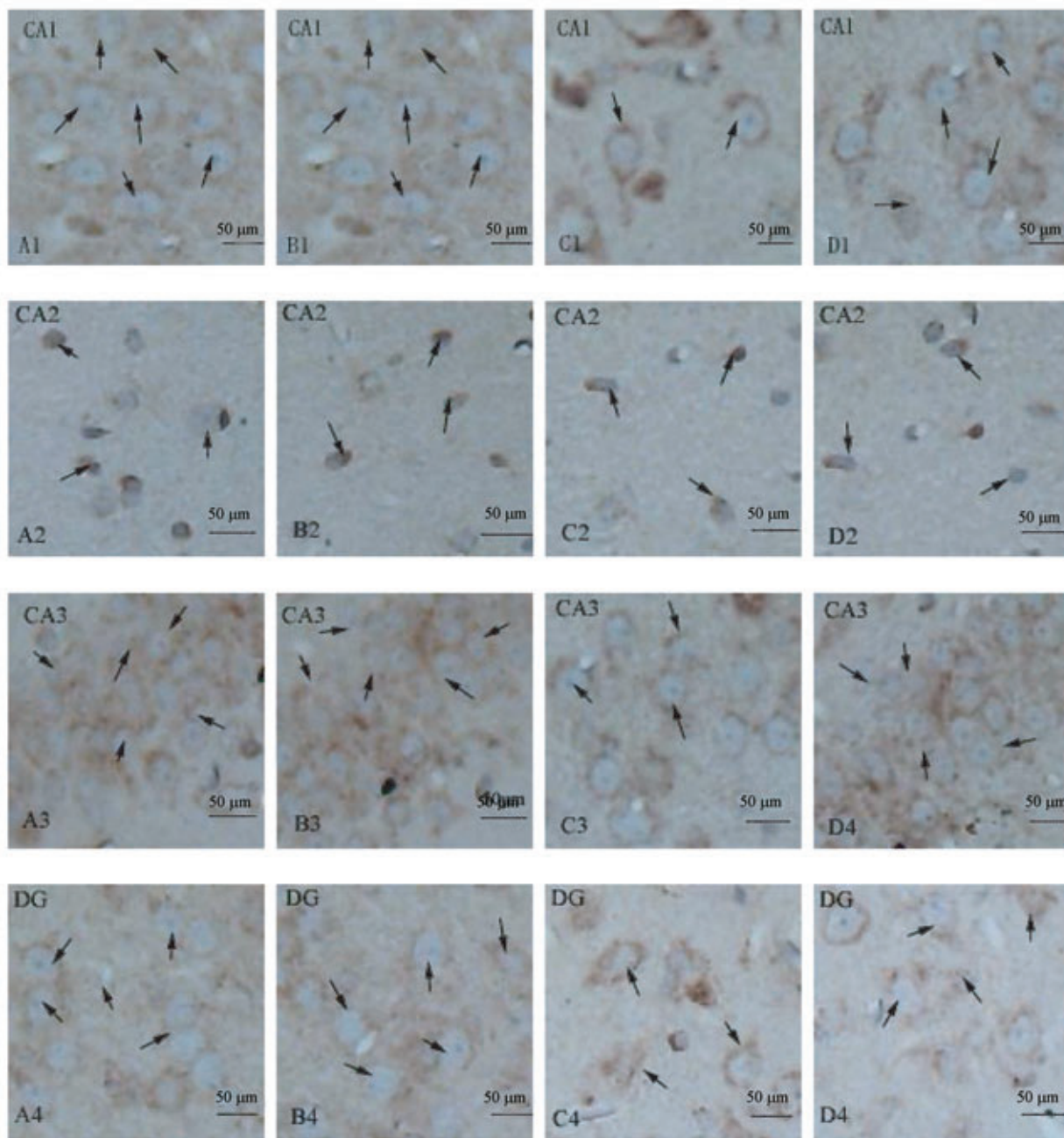
Table 3 Results of NGF expression in the hippocampus CA1 and CA2 of rats

组别 Groups	CA1		CA2	
	细胞个数 Cell number	面积 (μm^2) Area	细胞个数 Cell number	面积 (μm^2) Area
对照组 Control group	11.23 \pm 1.49	1008.49 \pm 135.69	8.32 \pm 1.12	656.58 \pm 89.56
运动组 Exercise group	12.63 \pm 1.51	1128.98 \pm 147.88	8.68 \pm 1.26	694.32 \pm 93.25
STZ 组 STZ group	7.02 \pm 0.82 ^{##}	698.74 \pm 100.25 ^{##}	8.02 \pm 0.96	612.78 \pm 59.43
STZ 运动组 STZ+exercise group	8.39 \pm 1.76 ^{###}	826.91 \pm 186.78 ^{###}	8.21 \pm 1.01	634.47 \pm 79.45

表 4 各组大鼠海马 CA3、DG 区 NGF 表达结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Results of NGF expression in the hippocampus CA3 and DG of rats

组别 Groups	CA3		DG	
	细胞个数 Cell number	面积 (μm^2) Area	细胞个数 Cell number	面积 (μm^2) Area
对照组 Control group	19.26 \pm 3.08	1348.90 \pm 218.34	12.37 \pm 2.08	987.45 \pm 171.52
运动组 Exercise group	20.89 \pm 3.88	1406.54 \pm 278.84	12.98 \pm 2.89	1102.85 \pm 234.55 [#]
STZ 组 STZ group	12.56 \pm 1.76 ^{##}	934.76 \pm 140.76 ^{##}	7.54 \pm 0.98 ^{##}	679.67 \pm 57.67 ^{##}
STZ 运动组 STZ+exercise group	16.48 \pm 2.89 ^{###}	1186.91 \pm 192.43 ^{###}	9.22 \pm 1.46 ^{##}	786.86 \pm 118.96 ^{#*}



注:A1-D4: 冠状切面显示大鼠海马 CA1、CA2、CA3 及 DG 区 NGF 表达(箭头所指)。

图 1 NGF 免疫组化检测结果

Note. A1-D4, Coronal sections showing the NGF expression (arrows) in the hippocampus CA1, CA2, CA3 and DG of the rats.

Figure 1 Results of NGF immunohistochemical staining

达到学会标准的训练次数及 30 次电击过程中出现的错误次数均显著增多。研究认为,运动可以减轻糖尿病引起的并发症,并对认知功能产生有益的影响,在预防神经退行性疾病中发挥重要作用^[16]。Kim 等^[17]对出生后 4 周的糖尿病幼鼠进行 2 周跑台运动(5 次/周,30 分/次)干预,结果发现跑台运动可通过增加海马齿状回细胞增殖和抑制凋亡减

轻 STZ 对幼鼠短期记忆的损伤。本研究得到相同结果,与 STZ 组大鼠比较,STZ 运动组大鼠达到标准的训练次数及 30 次错误次数均显著下降,提示,长期跑台运动可改善糖尿病大鼠的学习记忆能力。

神经炎症被认为是认知能力下降、痴呆等神经退行性疾病发生发展的公认因素^[18]。研究表明,1 型和 2 型糖尿病患者 CRP、TNF- α 及 IL-6 水平均

显著上调,与糖尿病患者认知能力下降和痴呆的发展有关^[19]。Yaffe 等^[20]人报道,血清 CRP 和 IL-6 水平升高的糖尿病患者存在认知功能受损,而血清 CRP 和 IL-6 水平正常的糖尿病患者认知功能正常,说明糖尿病患者促炎因子水平升高与认知功能受损密切相关。本研究结果发现,与对照组比较,STZ 可致大鼠海马促炎因子 IL-6 和 TNF- α 水平显著增加,与 Liu 等^[21]研究结果一致。越来越多的证据表明,运动可以通过调节神经炎症减轻神经退行性病变,增强大脑功能,发挥神经保护作用^[22]。Chennaoui 等^[23]研究发现,7 周递增负荷跑台运动(18~25 m/min,60~120 分/次)可增强正常大鼠海马 TNF- α 及 IL-6 蛋白含量。但本研究发现,8 周跑台运动(16 m/min 到 22 m/min,持续时间 40 min)对正常大鼠海马 TNF- α 和 IL-6 水平无显著影响,这种差异可能与运动强度及持续时间有关。Wannamethee 等^[24]对 4252 名受试者(60~79 岁)研究发现,体育锻炼水平与促炎因子(CRP 及 TNF- α 等)呈显著负相关。Andrade 等^[25]研究发现,8 周游泳运动(60 min/d,5 次/周)可使高脂肪饮食和 STZ 诱导的糖尿病大鼠 TNF- α 水平及 IL-6 水平下降、抗炎因子 IL-10 水平增加。此外,Jahangiri 等^[26]发现,9 周跑台运动(15 m/min,30 min/d)可通过下调海马 TNF- α 、IL-1 β 及 CRP 水平,从而起到保护神经、促进大脑修复的作用,改善脂多糖诱导的大鼠学习和记忆障碍。本研究结果发现,经过 8 周递增负荷跑台运动,与 STZ 组比较,STZ 运动组大鼠海马促炎因子 TNF- α 水平显著下降,但对促炎因子 IL-6 水平无显著影响,说明此运动具有一定的抗神经炎症作用。因此本研究 8 周跑台运动改善 STZ 大鼠的学习记忆能力,可能与此运动抑制 STZ 导致的海马神经促炎因子的释放有关,具体机制需进一步研究。

NGF 是一种重要的神经营养因子,广泛分布于中枢神经系统,可调节中枢和外周神经系统神经元的生长、发育、存活和分化,并参与突触可塑性。NGF 是胰腺细胞合成和分泌胰岛素的重要调节因子,在调节 STZ 导致的大鼠学习记忆下降中起着关键作用^[27]。STZ 对糖尿病大鼠海马 NGF 水平变化的研究存在争议。Gürbüz 等^[28]采用 ELISA 法测定海马组织匀浆 NGF 的水平,结果发现与对照组比较,STZ 诱导的青春期 1 型糖尿病幼鼠(出生后 28 d)海马 NGF 水平无显著改变。而 Zhang 等^[29]通过 Western blot 法测定海马 NGF 的水平,结果发现 STZ

诱导的糖尿病大鼠海马 NGF 水平显著下降。研究发现,海马是由相互联系的 CA1、CA2、CA3 及 DG 区等多个区域组成,且海马 CA1、CA3 和 DG 区在学习记忆中担负着尤其重要的作用^[30]。本研究通过免疫组织化学方法发现,与对照组比较,STZ 诱导的糖尿病大鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 NGF 表达均显著下降,但是海马 CA2 区 NGF 表达无显著变化,经过 8 周跑台运动,与糖尿病大鼠比较,糖尿病运动组大鼠海马 NGF 表达显著增加。最近研究报道,NGF 与其受体(TrkA)结合可激活抗炎信号通路,增强抗炎物质 IL-10 等的释放降低炎症反应^[31]。因此,本实验中跑台运动改善 STZ 大鼠学习记忆能力可能与此运动增加海马 CA1、CA3 及 DG 区 NGF 水平,增强海马抗炎能力,从而纠正 STZ 诱导的海马功能紊乱起到脑保护作用有关。但是,跑台运动导致 STZ 大鼠海马抗炎能力增强是否与 NGF 的增加有关,仍需要进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Lefèbvre P. Diabetes yesterday, today and tomorrow. The action of the international diabetes federation [J]. Rev Med Liege, 2005, 60(5-6): 273-277.
- [2] Rama Chandran S, Jacob P, Choudhary P. A systematic review of the effect of prior hypoglycaemia on cognitive function in type 1 diabetes [J]. Ther Adv Endocrinol Metab, 2020, 11: 2042018820906017.
- [3] Liu P, Cui L, Liu B, et al. Silibinin ameliorates STZ-induced impairment of memory and learning by up-regulating insulin signaling pathway and attenuating apoptosis [J]. Physiol Behav, 2020, 213: 112689.
- [4] Gomaa AA, Makboul RM, Al-Mokhtar MA, et al. Polyphenol-rich Boswellia serrata gum prevents cognitive impairment and insulin resistance of diabetic rats through inhibition of GSK3 β activity, oxidative stress and pro-inflammatory cytokines [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 281-292.
- [5] Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, et al. Nerve growth factor: A focus on neuroscience and therapy [J]. Curr Neuropharmacol, 2015, 13(3): 294-303.
- [6] Cai Y, Huang P, Xie Y. Effects of huperzine A on hippocampal inflammatory response and neurotrophic factors in aged rats after anesthesia [J]. Acta Cir Bras, 2020, 34(12): e201901205.
- [7] Terry AV Jr, Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats [J]. Physiol Behav, 2011, 102(2): 149-157.
- [8] Zhang X, He Q, Huang T, et al. Treadmill exercise decreases A β deposition and counteracts cognitive decline in APP/PS1 mice, possibly via hippocampal microglia modifications [J].

- Front Aging Neurosci, 2019, 11: 78.
- [9] Hall JM, Gomez-Pinilla F, Savage LM. Nerve growth factor is responsible for exercise-induced recovery of septohippocampal cholinergic structure and function [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 773.
- [10] Reisi P, Babri S, Alaei H, et al. Effects of treadmill running on short-term pre-synaptic plasticity at dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Brain Res, 2008, 1211: 30-36.
- [11] Gu HF, Li N, Tang YL, et al. Nicotinate-curcumin ameliorates cognitive impairment in diabetic rats by rescuing autophagic flux in CA1 hippocampus [J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(4): 430-441.
- [12] Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes -- systematic overview of prospective observational studies [J]. Diabetologia, 2005, 48(12): 2460-2469.
- [13] Liu Z, Zaid M, Hisamatsu T, et al. Elevated fasting blood glucose levels are associated with lower cognitive function, with a threshold in non-diabetic individuals; a population-based study [J]. J Epidemiol, 2020, 30(3): 121-127.
- [14] Li J, Liu Y, Liu B, et al. Mechanisms of aerobic exercise upregulating the expression of hippocampal synaptic plasticity-associated proteins in diabetic rats [J]. Neural Plast, 2019, 2019: 7920540.
- [15] Oliveira WH, Nunes AK, França ME, et al. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Brain Res, 2016, 1644: 149-160.
- [16] Ostman C, Jewiss D, King N, et al. Clinical outcomes to exercise training in type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 139: 380-391.
- [17] Kim YH, Sung YH, Lee HH, et al. Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats [J]. J Exerc Rehabil, 2014, 10(4): 209-217.
- [18] Shen XN, Niu LD, Wang YJ, et al. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019, 90(5): 590-598.
- [19] Zheng M, Chang B, Tian L, et al. Relationship between inflammatory markers and mild cognitive impairment in Chinese patients with type 2 diabetes; a case-control study [J]. BMC Endocr Disord, 2019, 19(1): 73.
- [20] Yaffe K, Blackwell T, Whitmer RA, et al. Glycosylated hemoglobin level and development of mild cognitive impairment or dementia in older women [J]. J Nutr Health Aging, 2006, 10(4): 293-295.
- [21] Liu C, Zhang C, Du H, et al. Remote ischemic preconditioning protects against ischemic stroke in streptozotocin-induced diabetic mice via anti-inflammatory response and anti-apoptosis [J]. Brain Res, 2019, 1724: 146429.
- [22] Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM. Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation [J]. Cells, 2019, 8(7): 691.
- [23] Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, et al. Effects of exercise on brain and peripheral inflammatory biomarkers induced by total sleep deprivation in rats [J]. J Inflamm (Lond), 2015, 12(9): 56.
- [24] Wannamethee SG, Lowe GD, Whincup PH, et al. Physical activity and hemostatic and inflammatory variables in elderly men [J]. Circulation, 2002, 105(15): 1785-1790.
- [25] Andrade EF, Silva VO, Moura NO, et al. Physical exercise improves glycemic and inflammatory profile and attenuates progression of periodontitis in diabetic rats (HFD/STZ) [J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1702.
- [26] Jahangiri Z, Gholamnezhad Z, Hosseini M. The effects of exercise on hippocampal inflammatory cytokine levels, brain oxidative stress markers and memory impairments induced by lipopolysaccharide in rats [J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(4): 1157-1169.
- [27] 赵竞, 金可可, 吴亮, 等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠学习记忆能力及海马神经元 NGF、NT-3 表达的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(5): 467-471, 491.
- [28] Gürbüz P, Düzova H, Yildiz A, et al. Effects of noopept on cognitive functions and pubertal process in rats with diabetes [J]. Life Sci, 2019, 233: 116698.
- [29] Zhang DD, Shi N, Fang H, et al. Vildagliptin, a DPP4 inhibitor, alleviates diabetes-associated cognitive deficits by decreasing the levels of apoptosis-related proteins in the rat hippocampus [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(6): 5100-5106.
- [30] Morris AM, Churchwell JC, Kesner RP, et al. Selective lesions of the dentate gyms produce disruptions in place learning for adjacent spatial locations [J]. Neurobiol Learn Mem, 2012, 97(3): 326-331.
- [31] Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1028.

[收稿日期] 2020-05-11

黄敏,彭月享,高卫元,等. 高强度聚焦超声对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (11): 72-77.

Huang M, Peng YX, Gao WY, et al. Effects of high-intensity focused ultrasound on immune function and survival time in rats with cervical cancer [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 72-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.012

高强度聚焦超声对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响

黄敏¹, 彭月享¹, 高卫元¹, 黄红丽^{2*}

(1.武汉市第三医院光谷院区 超声科, 武汉 430000; 2.武汉市第三医院光谷院区 妇产科, 武汉 430000)

【摘要】 目的 高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响。方法 将60只Wistar雌性大鼠随机分为对照组、模型组和HIFU组各20只。模型组和HIFU组左侧腋窝处皮下注射人宫颈癌HeLa细胞,建立宫颈癌移植瘤模型。造模后,HIFU组进行局部HIFU治疗,单点单次治疗时间为10s,共250s。治疗后,各组随机选取10只大鼠用于观察造模后9周内的生存时间和体重变化;剩余10只大鼠于治疗后14d处死,检测各组移植瘤的体积和重量,MTT检测脾淋巴细胞的活力,流式细胞仪分析外周血T淋巴细胞亚群和T淋巴细胞凋亡,HE染色观察移植瘤组织病理变化。**结果** 与对照组相比,模型组和HIFU组大鼠造模3周、5周和7周时大鼠体重均明显下降($P<0.05$),脾淋巴细胞活力、外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞和CD4⁺/CD8⁺T细胞比值均明显下降($P<0.05$),T淋巴细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与模型组相比,HIFU组的中位生存时间明显延长[(54.51±3.16) vs (48.03±1.05),Log Rank $\chi^2=7.504, P=0.006$],造模3周、5周和7周时大鼠体重均明显升高($P<0.05$),肿瘤体积和重量明显降低($P<0.05$),脾淋巴细胞活力、外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞和CD4⁺/CD8⁺T细胞比值均明显升高($P<0.05$),T淋巴细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。**结论** HIFU可以改善大鼠降低的免疫功能,延长宫颈癌大鼠的生存时间。

【关键词】 高强度聚焦超声;宫颈癌;免疫功能;生存时间;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0072-06

Effects of high-intensity focused ultrasound on immune function and survival time in rats with cervical cancer

HUANG Min¹, PENG Yuexiang¹, GAO Weiyuan¹, HUANG Hongli^{2*}

(1.Department of Ultrasound, Wuhan Third Hospital-Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, China.

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Third Hospital-Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000)

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of high-intensity focused ultrasound (HIFU) on immune function and survival time in rats with cervical cancer. **Methods** Sixty female Wistar rats were randomly divided into control, model, and HIFU groups, with 20 rats per group. In the model and HIFU groups, human cervical cancer HeLa cells were subcutaneously injected into the left axilla to establish cervical cancer xenograft models. After modeling, the HIFU group underwent local HIFU treatment. The single-point and single treatment time was 10 s for 250 s. After treatment, 10 rats

[作者简介]黄敏(1982—),女,主治医师,本科,从事心脏超声、妇科超声的研究。E-mail: hnlctlm@163.com

[通信作者]黄红丽(1983—),女,主治医师,硕士研究生,从事妇科肿瘤研究。E-mail: hhhhhmmmm@yeah.net

were randomly selected from each group to observe changes in survival time and weight within 9 weeks after model induction. The remaining 10 rats in each group were sacrificed 14 d after treatment. The volume and weight of xenografts in each group were calculated. MTT was applied to detect the vitality of spleen lymphocytes. The apoptosis of peripheral blood T lymphocyte subsets and T lymphocytes was analyzed by flow cytometry. The histopathological changes of xenografts tissues were observed by HE staining. **Results** Compared with the control group, at 3, 5, and 7 weeks after modeling, rat body weight was significantly decreased in the model and HIFU groups ($P < 0.05$); the vitality of spleen lymphocytes, peripheral blood $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, and $CD4^+/CD8^+$ T cells was significantly decreased ($P < 0.05$); and the apoptosis rate of T lymphocytes was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the median survival time in the HIFU group was significantly prolonged [(54.51 ± 3.16) vs (48.03 ± 1.05) , log rank (χ^2) = 7.504, $P = 0.006$]. At 3, 5, and 7 weeks after model induction, the weight of rats was significantly increased ($P < 0.05$); tumor volume and mass were significantly decreased ($P < 0.05$); vitality of spleen lymphocytes, peripheral blood $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, and $CD4^+/CD8^+$ T cells were significantly increased ($P < 0.05$); and the apoptosis rate of T lymphocyte was significantly reduced compared with ($P < 0.05$). **Conclusions** HIFU can improve the immune function of rats and prolong the survival time of rats with cervical cancer.

【Keywords】 high intensity focused ultrasound; cervical cancer; immune function; survival time; rat

宫颈癌早期常无明显症状和体征,主要采用外科手术治疗,中晚期主要表现为不规则阴道流血、阴道排液等,严重者可表现为贫血、恶病质等全身衰竭症状,主要采用放射治疗或化疗,但其治疗效果并不十分令人满意^[1]。高强度聚焦超声治疗(high intensity focused ultrasound, HIFU)是近年来发现的一种新型的肿瘤治疗方法,利用高强度超声波聚焦后,穿透到人体内,杀灭靶区内的肿瘤细胞,还可能激活机体的免疫系统,提高患者的免疫功能,从而达到治疗肿瘤的目的^[2]。已有研究显示,HIFU可以用于临床晚期胰腺癌^[3]、子宫肌瘤^[4]、宫颈癌^[5]等的治疗,延长患者的生存期,且毒副反应小。但HIFU治疗宫颈癌研究报道较少,杀灭肿瘤细胞的机理尚不明确,对宫颈癌患者免疫功能的影响亦尚不清楚。因此,本研究探索了HIFU对宫颈癌大鼠免疫功能和生存时间的影响,旨在为HIFU在宫颈癌治疗中的应用提供一定的理论支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60只6~8周龄Wistar大鼠,清洁级雌性,体重均为160~200g,由湖北省实验动物研究中心提供[SCXK(鄂)2015-0018],经武汉市第三医院伦理委员会批准(20170119-03),饲养于本院动物中心实验室[SYXK(鄂)2019-0080],保持室温恒定 25°C ,模拟昼夜光照,自由摄食与饮水,严格按实验动物3R原则给予实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

FACSCanto II流式细胞仪购自美国BD公司;全自动酶标仪购自Thermo Scientific公司;人宫颈癌HeLa细胞由上海钰博生物科技有限公司提供,接种于含有100 U/mL青链霉素和10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。MTT检测试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海一研生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模与给药

大鼠预饲养7d后,随机分为对照组、模型组和HIFU组,每组20只,每组随机选取10只用于观察大鼠的生存时间和体重变化,剩余10只用于病理、免疫相关指标的检测。模型组和HIFU组采用左侧腋窝处皮下注射人宫颈癌HeLa细胞建立宫颈癌大鼠模型^[6],均经左侧腋窝处皮下注射接种人宫颈癌HeLa细胞(0.5 mL, $1 \times 10^7/\text{mL}$),密切观察,肉眼可见大鼠左腋窝处有明显肿瘤结节生长即为造模成功,对照组于左侧腋窝处皮下注射等体积生理盐水。造模后第7天,HIFU组进行局部HIFU治疗,辐照强度为2.3 MPa,单点单次治疗时间为10 s,共250 s,对照组和模型组治疗程序与HIFU治疗相同,但功率源开关关闭。对照组、模型组和HIFU组20只大鼠中,10只用于观察大鼠的生存时间和体重变化,于造模之日开始观察,观察时间共9周;剩余10只大鼠于治疗后14 d立即处死,分离大鼠的血液,无菌剥离移植瘤组织,分离大鼠脾,用于病理及免疫相关指标的检测。

1.3.2 观察各组大鼠的生存时间

于造模之日开始观察大鼠的生存状态,记录各组大鼠 9 周内的生存状态(生存或死亡),分别于造模前、造模后 1 周给药即刻、造模 3 周、造模 5 周和造模 7 周称取大鼠的体重。

1.3.3 观察各组大鼠的移植瘤体积和重量

处死大鼠后,剥离大鼠移植瘤组织,测移植瘤长径、短径,计算其肿瘤体积= $(\text{长径} \times \text{短径}^2)/2$,同时称取移植瘤重量,计算 HIFU 的抑瘤率= $(1 - \text{实验组肿瘤组织重量}/\text{对照组肿瘤组织重量}) \times 100\%$ 。

1.3.4 HE 染色观察大鼠移植瘤组织病理变化

采集大鼠移植瘤组织,进行常规切片制作和 HE 染色,显微镜下观察移植瘤组织的病理变化。

1.3.5 MTT 检测脾淋巴细胞活力

取各组大鼠脾组织,剪碎研磨,过滤,离心(1500 r/min, 10 min),弃上清,加入 10 mL 氯化铵 37°C 水浴 10 min,加入 2 mL 的 RPMI 1640 培养液中进行培养,采用台盼蓝染色,计数活细胞在 95% 以上,制备成脾淋巴细胞液。将脾淋巴细胞悬液以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔培养板,在 37°C、5% CO₂ 条件下培养,分别于 0 h、24 h、48 h、72 h,进行 MTT 检测,酶标仪测定波长为 570 nm 处的吸光度值(OD570),绘制细胞生长曲线,严格按照试剂盒说明操作。

1.3.6 流式细胞仪分析外周血 T 淋巴细胞亚群

分离腹主动脉血液,抗凝离心(3000 r/min, 5 min),弃上清,室温避光孵育 30 min,加红细胞裂解液作用 15 min,加 70% 乙醇混合,4°C 静置 48 h,弃上清,采用 1 mL PBS 重悬,加入 5 μ L 浓度为 10 mg/mL 的 RNase,37°C 下孵育 1 h,分别加入相应的流式抗体(CD4-APC, CD8-PE),室温避光孵育 30 min,上机流式细胞仪检测 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞比例。

1.3.7 流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞凋亡

分离腹主动脉血液,抗凝离心(3000 r/min, 5 min),采用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,PBS 重悬后,收集各组细胞,采用不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化,离心(3000 r/min, 5min),用冷 PBS 洗涤,以每毫升 1×10^5 个接种于 6 孔板,采用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒染色,上机流式细胞仪检测细胞凋亡,严格按照试剂盒说明操作。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析,符合正态分布的计量资料均以平均数 \pm 标准差

($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异采用 *t* 检验分析,三组间差异采用单因素方差分析,采用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线,以 9 周内的总生存状态作为观察终点,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIFU 对各组大鼠生存时间的影响

生存分析结果显示,模型组大鼠于造模后 43 d 开始出现死亡,HIFU 组大鼠于造模后 46 d 开始出现死亡;与模型组相比,HIFU 组的中位生存时间明显延长[(54.51 \pm 3.16) vs (48.03 \pm 1.05)],Log Rank $\chi^2 = 7.504, P = 0.006$],见图 1。

2.2 HIFU 对各组大鼠体重的影响

造模前各组大鼠的体重均无明显差异($P > 0.05$);与对照组相比,模型组和 HIFU 组大鼠造模 3 周、5 周和 7 周时大鼠体重均明显下降($P < 0.05$);与模型组相比,HIFU 组大鼠造模 3 周、5 周和 7 周时大鼠体重均明显升高($P < 0.05$),见表 1。

2.3 HIFU 对各组大鼠移植瘤体积和重量的影响

与模型组相比,HIFU 组的肿瘤体积和重量明显降低($P < 0.05$),HIFU 的抑瘤率为 35.25%,见表 2。

2.4 各组大鼠移植瘤组织的病理变化

HE 染色结果显示,模型组大鼠移植瘤组织细胞呈椭圆形,胞核呈两个或多个,结构和细胞形态未见异常;HIFU 组大鼠移植瘤组织细胞皱缩、核染色质固缩,出现片状坏死区,见图 2。

2.5 HIFU 对各组大鼠脾淋巴细胞活力的影响

MTT 实验结果显示,与对照组相比,模型组和 HIFU 组脾淋巴细胞活力明显下降($P < 0.05$);与模

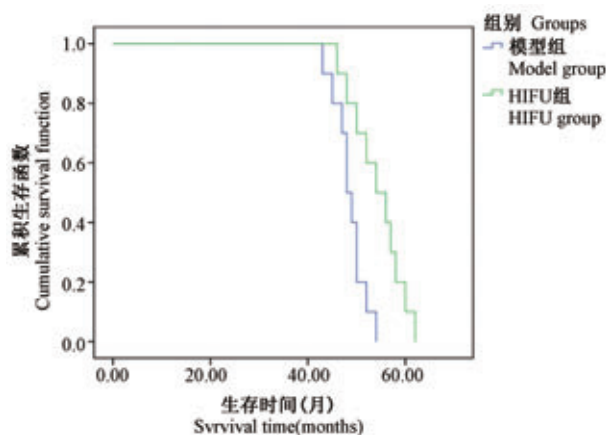


图 1 各组大鼠的生存曲线比较

Figure 1 Comparison of survival curves of rats in each group

型组相比, HIFU 组脾淋巴细胞活力明显升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.6 HIFU 对各组大鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞水平的影响

流式细胞分析结果显示, 与对照组相比, 模型组和 HIFU 组外周血 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组相比, HIFU 组外周血 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细

胞和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均明显升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.7 HIFU 对各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞凋亡的影响

流式细胞分析结果显示, 与对照组相比, 模型组和 HIFU 组 T 淋巴细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, HIFU 组 T 淋巴细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$), 见图 4、表 4。

表 1 HIFU 对各组大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of HIFU on body weight of rats in each group

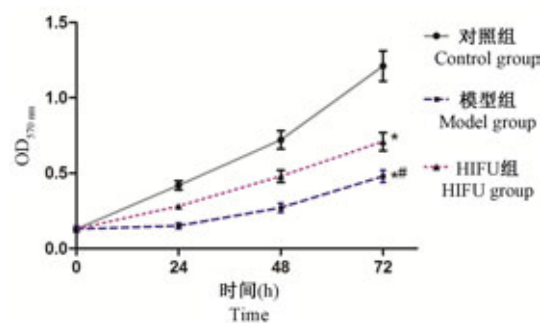
组别 Groups	造模前 Before modeling	造模 1 周 Modeling for 1 week	造模 3 周 Modeling for 3 week	造模 5 周 Modeling for 5 week	造模 7 周 Modeling for 7 week
对照组 Control group	214.74±9.25	231.64±7.69	245.62±7.83	259.72±7.85	274.38±8.21
模型组 Model group	215.03±7.81	218.03±8.25*	206.73±7.96*	182.83±7.73*	168.59±7.36*
HIFU 组 HIFU group	213.94±8.25	224.51±8.46#	215.92±8.44*#	204.54±8.61*#	187.92±7.95*#
<i>F</i>	0.045	6.994	63.340	241.122	515.232
<i>P</i>	0.956	0.006	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠移植瘤的体积和重量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Volume and weight of transplanted tumor in each group

组别 Groups	肿瘤体积 (mm ³) Tumor volume	肿瘤重量 (g) Tumor mass
对照组 Control group	-	-
模型组 Model group	243.67±32.87	7.32±1.16
HIFU 组 HIFU group	174.58±21.69	4.74±0.73
<i>t</i>	5.548	5.953
<i>P</i>	<0.001	<0.001



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。
图 3 HIFU 对各组大鼠脾淋巴细胞活力的影响
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of HIFU on spleen lymphocyte activity in each group

表 3 各组大鼠外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Levels of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood of rats in each group

组别 Groups	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组 Control group	58.18±6.52	27.65±3.26	2.10±0.20
模型组 Model group	30.29±3.84*	19.57±2.43*	1.55±0.13*
HIFU 组 HIFU group	43.26±5.57*#	23.76±2.78*#	1.82±0.17*#
<i>F</i>	66.191	20.192	24.663
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

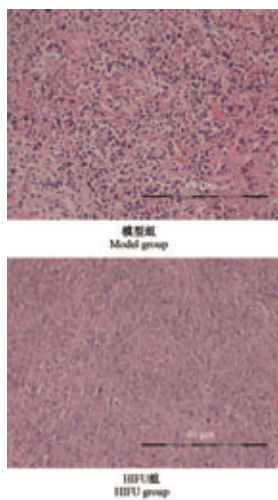


图 2 各组大鼠移植瘤组织的病理变化 (HE 染色)
Figure 2 Pathological changes of transplanted tumor tissues in each group of rats (HE staining)

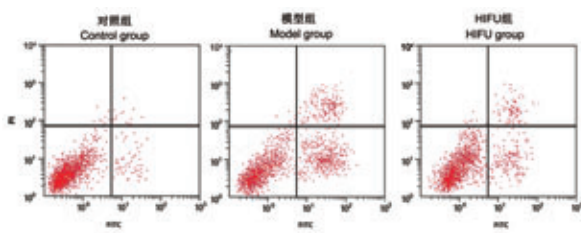


图 4 HIFU 对各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of HIFU on T lymphocyte apoptosis in peripheral blood of rats in each group

表 4 HIFU 对各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of HIFU on apoptosis of T lymphocytes in peripheral blood of rats in each group

组别 Groups	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
对照组 Control group	8.26±1.14
模型组 Model group	21.75±4.15*
HIFU 组 HIFU group	16.29±3.24*#
F	47.601
P	<0.001

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group,* $P < 0.05$. Compared with model group,# $P < 0.05$.

3 讨论

宫颈癌是常见的女性三大恶性肿瘤之一,临床主要采用外科手术联合放化疗,预后较差^[7]。HIFU 是一种新型的非侵入性治疗手段,可以将超声波进行聚焦后,安全地将能量密度较低的超声波汇聚至靶区,利用焦点处超声波的热效应,使靶区组织细胞发生不可逆的损伤,达到抗肿瘤的作用^[8]。目前,HIFU 已被用于前列腺癌、乳腺癌、软组织肿瘤以及子宫肌瘤等多种疾病的治疗^[9],但对宫颈癌的作用研究报道较少。因此,本研究分析了 HIFU 对宫颈癌大鼠生存时间的影响。本研究中,HIFU 作用后可明显延长宫颈癌大鼠的生存时间,提示 HIFU 可能通过抗肿瘤作用,延长大鼠的生存时间。许涛等^[10]的研究显示,HIFU 可用于晚期宫颈癌患者的治疗,减少局部复发,提示 HIFU 对宫颈癌具有的一定的抗肿瘤作用,有望应用于临床。本研究中,HIFU 作用后可明显改善宫颈癌大鼠的体重,诱导肿

瘤组织坏死,减少移植瘤体积和重量。Hectors 等^[11]的研究显示,HIFU 可以将超声波能量汇聚于肿瘤组织,通过热效应,使肿瘤细胞发生凝固性坏死,提示 HIFU 可能通过破坏宫颈癌肿瘤细胞,诱导肿瘤细胞坏死,发挥其抗肿瘤作用,延长大鼠的生存时间。

细胞免疫是机体抗肿瘤的主要机制,肿瘤细胞可通过改变细胞表面抗原、降低或不表达组织相容性抗原 I (major histocompatibility complex, MHC- I) 和 MHC- II、分泌多种免疫抑制因子等多种途径,发生免疫逃避或免疫抑制,发生恶性增殖^[12]。本研究中,宫颈癌大鼠的脾淋巴细胞活力明显下降,HIFU 作用后可明显提高大鼠的脾淋巴细胞活力。脾是机体最大免疫系统的最主要的免疫器官之一,含有大量淋巴细胞和巨噬细胞,可以清除血细胞抗原和异物,是机体免疫系统的中心,脾淋巴细胞增殖活性可以反应机体淋巴细胞的功能^[13]。许涛等^[14]的研究显示,HIFU 可以改善原发性肝癌的免疫功能,延长患者的生存时间,提示 HIFU 可能通过诱导肿瘤细胞坏死,抑制肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子,提高脾淋巴细胞活力,提高机体的细胞免疫功能和抗肿瘤能力,从而延长宫颈癌大鼠的生存时间。

本研究中,宫颈癌大鼠的外周血 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值均明显下降,HIFU 作用后可明显提高大鼠外周血。T 淋巴细胞亚群是机体抗肿瘤免疫的主要免疫细胞,按功能可分为辅助 T 细胞(T helper cells, Th)、记忆 T 细胞、细胞毒性 T 细胞(Cytotoxic T cells, Tc)、调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)和抑制性 T 细胞(suppressor T cell, Ts)^[15]。CD4⁺T 细胞主要为 Th 细胞,CD4 分子主要与 MHC- II 分子相结合,CD8 分布于 Tc 细胞及 Ts 细胞表面,可以与 MHC- I 分子结合,共同调节细胞的免疫功能^[16]。Th 细胞可以分泌多种细胞因子,促进其他 T 细胞的分化成熟,在协助诱导细胞免疫中具有重要作用,还可以辅助 B 细胞分化为抗体分泌细胞,协助 B 细胞产生抗体,Tc 细胞主要通过分泌各种细胞因子参与免疫作用,清除病毒、肿瘤等靶细胞,Ts 细胞则能抑制 Th 细胞,负向调节细胞的免疫功能^[17-18]。已有研究显示^[19],CD4⁺T/CD8⁺T 细胞比值可反映机体的整体免疫功能,提示 HIFU 作用后,可明显改善宫颈癌大鼠降低的免疫功能。本研究中,宫颈癌大鼠的外周

血 T 淋巴细胞凋亡率明显升高, HIFU 作用后可明显降低 T 淋巴细胞凋亡率。已有研究显示^[20], 肿瘤细胞可通过诱导 T 淋巴细胞凋亡, 发生免疫逃避或免疫抑制, 进行恶性增殖, 提示 HIFU 作用可能通过破坏宫颈癌肿瘤细胞, 抑制肿瘤细胞诱导的 T 淋巴细胞凋亡, 改善机体的免疫功能, 抑制肿瘤细胞的免疫逃避或免疫抑制, 提高其抗肿瘤作用。

综上所述, HIFU 可以明显升高大鼠的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 的数量以及 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值, 提高脾淋巴细胞活力, 改善大鼠降低的免疫功能, 延长宫颈癌大鼠的生存时间, 但 HIFU 调节机体免疫功能的具体机制尚不明确, 需进一步深入研究探索。

参考文献:

- [1] Cui RR, Chen L, Tergas A, et al. Trends in use and survival associated with fertility-sparing trachelectomy for young women with early-stage cervical cancer [J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 131(6): 1085-1094.
- [2] Marinova M, Huxold H, Henseler J, et al. Clinical effectiveness and potential survival benefit of us-guided high-intensity focused ultrasound therapy in patients with advanced-stage pancreatic cancer [J]. *Ultraschall Med*, 2019, 40(5): 625-637.
- [3] 朱衍菲, 赵洪, 张宇, 等. 高强度聚焦超声治疗晚期胰腺癌: 疗效及预后相关因素分析 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(4): 430-435.
- [4] 金琳, 王迎春, 封岚, 等. 超微血流成像技术评估高强度聚焦超声治疗子宫肌瘤疗效的应用价值 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2018, 27(4): 334-337.
- [5] 武佳薇, 张新玲, 尹庭辉, 等. 高强度聚焦超声联合液态氟碳纳米颗粒消融治疗宫颈癌移植瘤的实验研究 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2016, 25(3): 248-251.
- [6] 崔开颖, 赵素芬, 朱根海. 姜黄素对宫颈癌大鼠的影响及作用机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(11): 1142-1145.
- [7] Hu G, Zhang J, Xu F, et al. SLP-2 inhibits cisplatin-induced apoptosis through MEK/ERK signaling and mitochondrial apoptosis pathway in cervical cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1357-1368.
- [8] Peek MC, Ahmed M, Scudder J, et al. High intensity focused ultrasound in the treatment of breast fibroadenomata: Results of the HIFU-F feasibility trial [J]. *Int J Hyperthermia*, 2016, 32(8): 881-888.
- [9] Federau C, Goubran M, Rosenberg J, et al. Transcranial MRI-guided high-intensity focused ultrasound for treatment of essential tremor: A pilot study on the correlation between lesion size, lesion location, thermal dose, and clinical outcome: Transcranial MRgFUS [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2018, 48(1): 58-65.
- [10] 许涛, 景红霞, 李林均, 等. 介入栓塞化疗联合 HIFU 治疗晚期宫颈癌同步放疗后局部复发的疗效观察 [J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(2): 116-119.
- [11] Hectors S, Jacobs I, Moonen C, et al. MRI methods for the evaluation of high intensity focused ultrasound tumor treatment: Current status and future needs [J]. *Magn Reson Med*, 2016, 75(1): 302-317.
- [12] Gruber IV, Hartkopf AD, Hahn M, et al. Relationship between hematogenous tumor cell dissemination and cellular immunity in dcis patients [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(5): 2345-2351.
- [13] Lindemann DM, Carpenter JW, Almes KM, et al. Solitary T-cell hepatic lymphoma with large granular lymphocyte morphology in a captive cheetah (*Acinonyx jubatus*) [J]. *J Zoo Wildl Med*, 2015, 46(2): 400-404.
- [14] 许涛, 景红霞, 李林均, 等. TACE、IMRT、HIFU 联合 DC-CIK 治疗局部晚期原发性肝癌的效果 [J]. *广东医学*, 2016, 37(12): 1846-1849.
- [15] Deng CY, Wang XF, Qi H, et al. Effects of Anti-CD45RB monoclonal antibody for T lymphocyte subsets in mice heart transplantation model [J]. *Scand J Immunol*, 2016, 84(2): 86-94.
- [16] Capetti A, Orofino G, Paladini L, et al. Does simplification to dolutegravir-based dual regimens impact on the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio [J]. *AIDS*, 2018, 32(8): 1083-1084.
- [17] Pedrotti LP, Barrios BE, Maccio-Maretto L, et al. Systemic IL-12 burst expands intestinal T lymphocyte subsets bearing the $\alpha 4 \beta 7$ integrin in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(1): 70-80.
- [18] Chen LY, Tsang JY, Ni YB, et al. Lymphocyte subsets contribute to the degree of lobulitis and ductitis in sclerosing lymphocytic lobulitis of the breast [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(6): 527-532.
- [19] Overgaard N, Jung J, Steptoe R, et al. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(1): 31-38.
- [20] Ng S, Deng J, Chinnadurai R, et al. Stimulation of natural killer cell-mediated tumor immunity by an IL15/TGF- β -neutralizing fusion protein [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(19): 5683-5695.

[收稿日期] 2020-04-17

韩金霞,朱亚南,王金文,等. 辛伐他汀纳米粒的构建及对动脉粥样硬化模型大鼠作用的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 78-83.

Han JX, Zhu YN, Wang JW, et al. Construction of simvastatin nanoparticles and their effect in atherosclerosis model rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 78-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.013

辛伐他汀纳米粒的构建及对动脉粥样硬化模型大鼠作用的研究

韩金霞*, 朱亚南, 王金文, 王吉佳, 李迪, 杨静波

(大庆油田总医院心内科, 黑龙江 大庆 163000)

【摘要】 目的 构建辛伐他汀纳米给药系统并探讨其对动脉粥样硬化模型大鼠的作用。方法 制备辛伐他汀纳米粒并通过透射电镜对其进行形态表征;激光共聚焦显微镜检测辛伐他汀纳米粒的细胞摄取能力;构建动脉粥样硬化大鼠模型,随机分为模型组(Model)、辛伐他汀组(Sim)、辛伐他汀纳米粒组(Sim-LPNs),同时以正常大鼠设立对照组(Control),每组10只动物;生化仪检测TG、TC、LDL-C、HDL-C水平;HE染色检测动脉血管病理变化;Western blot检测p-AMPK和p-ACC蛋白表达变化。结果 Sim-LPNs的形态较为圆整,外观呈均一的球形,平均动力学直径为(180±23) nm。与COU-6处理相比,COU-6-LPNs处理的Caco-2细胞绿色荧光强度显著增强($P < 0.01$)。与Control组相比,Model组大鼠TC、TG、LDL-C均显著升高,HDL-C明显降低($P < 0.01$);相较于Model组,Sim组TC和LDL-C显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);与Model组相比,Sim-LPNs组TC、TG、LDL-C均显著降低,HDL-C明显升高($P < 0.01$);与Sim相比,Sim-LPNs大鼠TC和LDL-C显著降低($P < 0.01$)。Model组大鼠动脉血管壁粘膜变性和水肿,在血管壁中出现典型的动脉粥样硬化斑块,并且脂质核心较厚,泡沫明显;Sim组出现一定改善,但Sim-LPNs组改善更为明显。与Control组相比,Model组动脉血管壁相对斑块面积和相对斑块面积/总面积均显著增加($P < 0.01$);Sim-LPNs组相较于Model组动脉血管壁相对斑块面积和相对斑块面积/总面积明显减小($P < 0.01$)。相较于Control组,Model组大鼠肝组织p-AMPK和p-ACC蛋白表达均显著下调($P < 0.01$);与模型组相比,Sim组p-AMPK蛋白表达显著上调($P < 0.05$),Sim-LPNs组p-AMPK和p-ACC蛋白表达显著上调($P < 0.01, P < 0.05$);与Sim组相比,Sim-LPNs组p-AMPK蛋白表达上调更明显($P < 0.01$)。结论 辛伐他汀纳米粒具有较好的抗动脉粥样硬化效果,该作用可能与其增强小肠细胞吸收和激活肝细胞AMPK-ACC信号通路调节血脂水平有关。

【关键词】 辛伐他汀;纳米粒;动脉粥样硬化;血脂;腺苷酸激活蛋白激酶;乙酰辅酶A羧化酶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0078-06

Construction of simvastatin nanoparticles and their effect in atherosclerosis model rats

HAN Jinxia*, ZHU Yanan, WANG Jinwen, WANG Jijia, LI Di, YANG Jingbo
(Department of Cardiology, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163000, China)

【Abstract】 **Objective** To construct a simvastatin nano drug delivery system and explore its effect on atherosclerosis model rats. **Methods** Laser confocal microscopy was used to detect the cell uptake capacity of simvastatin nanoparticles. Rats were randomly divided into a model group (Model), simvastatin group (Sim), simvastatin nanoparticle group (Sim-LPNs), and control group (Control, normal rats), with 10 animals per group. A biochemical analyzer was

[作者简介] 韩金霞(1979—), 硕士, 副主任医师, 从事心血管疾病的基础和临床研究。E-mail: hanjinxia616@sina.com

used to detect TG, TC, LDL-C, and HDL-C levels. HE staining was used to detect pathological changes in arteries and vessels. Western blot was used to detect changes in p-AMPK and p-ACC protein levels. **Results** Sim-LPNs had a uniform spherical appearance with a mean dynamic diameter of 180 ± 23 nm. Compared with COU-6 treatment, the green fluorescence intensity of Caco-2 cells treated with COU-6-LPNs was significantly enhanced ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the TC, TG and LDL-C levels in the Model group were significantly increased, and HDL-C was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the Model group, the Sim group had significantly lower TC and LDL-C levels ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with the Model group, the Sim-LPNs group had significantly reduced TC, TG, and LDL-C levels, as well as significantly increased HDL-C levels ($P < 0.01$). Compared with the Sim group, TC and LDL-C levels in Sim-LPNs rats were significantly reduced ($P < 0.01$). In the Model group, mucosal degeneration, edema, and typical atherosclerotic plaques with a thick lipid core and foam cells were observed in the arterial blood vessel walls. The Sim group showed some improvement, but the Sim-LPNs group had a more obvious improvement. Compared with the Control group, the relative plaque area and relative plaque area/total surface of the arterial blood vessel wall of the Model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the Model group, the relative plaque area and the relative plaque area/total surface of the arterial wall of the Sim-LPNs groups were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the expressions of p-AMPK and p-ACC proteins in the liver tissues of the Model group were significantly downregulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of p-AMPK protein in the Sim group was significantly increased ($P < 0.05$), and the expressions of p-AMPK and p-ACC proteins in the Sim-LPNs groups were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the Sim group, p-AMPK protein expression in the Sim-LPNs groups was significantly upregulated ($P < 0.01$). **Conclusions** Simvastatin nanoparticles have a good anti-atherosclerotic effect, which may be related to the enhanced absorption of small intestinal cells and activation of the liver cell AMPK-ACC signaling pathway to regulate blood lipid levels.

【Keywords】 simvastatin; nanoparticles; atherosclerosis; blood lipids; adenylate-activated protein kinase; acetyl-CoA carboxylase

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)指血液内脂质物未及时排出沉积在动脉内膜,久而久之所形成的粥样样坏死病灶^[1-3]。AS是冠心病、脑梗死及外周血管病的早期征兆和病理基础,因而有效预防和治疗AS具有重要的临床意义^[4-5]。他汀类药物,是目前临床应用的有效降脂药物,主要用于治疗高脂血症。他汀类药物不仅能强效地降低总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL),而且能一定程度上降低三酰甘油(TG),还能升高高密度脂蛋白(HDL),所以被公认为较全面的调脂药^[6-7]。同时,对于治疗动脉粥样硬化和预防冠心病他汀类药物也能发挥一定疗效^[6-7]。辛伐他汀(Simvastatin, Sim)为他汀类药物,是临床上治疗高脂血症的一线用药。Sim作为羟甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂,在体内主要抑制机体内源性胆固醇的合成以及血液中胆固醇的含量^[8]。但由于Sim水溶性较差,口服生物利用度有限,因此其临床应用受到一定限制^[9]。脂质聚合物纳米粒(lipid-polymer hybrid nanoparticles, LPNs),简称纳米粒,是近几年研究较热的一种新型纳米给药系统,与传统的脂质体和纳米粒给药载体相比,其具有更优良的生物相容性,较高的载药量,生物可降解等优势,是一种极具发

展前景和应用前景的一种新型纳米给药载体^[10]。本研究通过构建辛伐他汀纳米粒,主要观察其对大鼠动脉粥样硬化的治疗效果,并对其作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

6~7周龄健康SD大鼠40只,清洁级,雄性,体重180~200g,采购于北京维通利华实验动物有限公司提供[SCXK(京)2016-0001],本研究获得大庆油田总医院伦理委员会批准(20191012)。大鼠以每笼3~4只饲养于排风通气笼具内,自由饮水、摄食,饲养场所为黑龙江中医药大学屏障环境中[SYXK(黑)2018-007],动物实验严格按实验动物3R原则给予实验动物人道主义关怀。

1.1.2 实验细胞

Caco-2细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,细胞以含20%胎牛血清、1%青-链霉素的MEM培养基培养于37℃、5%CO₂、95%空气的细胞培养箱中。

1.2 主要试剂与仪器

辛伐他汀(货号 S6196)和 COU-6(货号 442631)购自美国 Sigma 公司;总胆固醇(TC)试剂盒(批号 20180105)、甘油三酯(TG)试剂盒(批号 20180917)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号 20190106)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(批号 20181224)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;HE 染色试剂盒购自北京索莱宝公司;GAPDH 抗体购自武汉博士德公司;AMPK 抗体、p-AMPK 抗体、Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) 抗体和 p-ACC 抗体购自美国 CST 公司。高速剪切机(德国艾卡公司);电子天平(德国赛多利斯公司);JEOL JEM-2100F 场发射透射电子显微镜(日本日本电子株式会社公司);高压均质机(德国 APV 公司);CX31 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);64R 高速低温离心机(美国 Beckman 公司);NanoSight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪(英国马尔文公司);SpectraMax 190 酶标仪(美国美谷分子仪器公司);AI600 凝胶成像仪(美国通用电气公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 辛伐他汀纳米粒的构建

制备辛伐他汀纳米粒,将 10 mg 辛伐他汀和 50 mg 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)溶解在 10 mL 乙腈中作为有机相,磷脂 25 mg 溶解在 0.5 mg 无水乙醇中,然后加入到 20 mL 60℃ 预热的超纯水中分散均匀作为水相。将油相在 300 r/min 搅拌条件下倒入到水相中,继续室温下搅拌 2 h,旋转蒸发除去乙腈。经 0.8 μm 的滤膜滤过,备用。取制备的辛伐他汀纳米粒子,超纯水稀释 50 倍,取 5 μL 纳米粒溶液滴加到铜网上,自然晾干,透射电镜下观察辛伐他汀纳米粒的形态,同时利用纳米颗粒分析仪测定其粒径分布。

1.3.2 纳米粒载药系统细胞摄取研究

香豆素 6(COU-6)作为有机荧光染料可模拟细胞对药物的摄取行为。取对数期 Caco-2 细胞接种于两个 13 mm 无菌玻璃底细胞培养皿中,培养过夜,次日取制备好的 COU-6 和 COU-6 纳米粒(COU-6-LPNs)溶液各 100 μL 加入 1.5 mL 培养基中混匀备用,取出细胞,PBS 洗 2 遍,各加入配备好的培养基,于培养箱中继续孵育 0.5 h,后弃去细胞上层液体,用 PBS 轻柔洗细胞 3 遍,4% 多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗 3 遍,加入浸没细胞量的 DAPI 荧光染料(10 μg/mL)染色 20 min,PBS 洗 3 遍,封片,铝箔纸避光 4℃ 保存。荧光显微镜拍照,记录荧光强度。

1.3.3 动脉粥样硬化模型构建、分组及给药

构建动脉粥样硬化大鼠模型,设立模型组(Model)、辛伐他汀组(Sim)、辛伐他汀纳米粒组(Sim-LPNs)和对照组(Control)。Model 组、Sim 组和 Sim-LPNs 组大鼠腹腔注射 60 万 IU/kg 维生素 D3,后以高脂饲料饲养 8 周建立动脉粥样硬化模型;Control 组腹腔注射等体积生理盐水,以正常饲料饲养 8 周。造模完成后 Control 组和 Model 组每天灌胃给予生理盐水,Sim 组给予 Sim 8 mg/(kg·d),Sim-LPNs 组给与 Sim-LPNs 8 mg/(kg·d),连续给药 3 周。

1.3.4 大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 检测

给药最后 1 d,动物禁食过夜,各组大鼠以异氟烷持续麻醉,开腹后于腹主动脉取血约 3 mL,室温下静置至凝固,3000 r/min 离心 10 min,上清液即为血清,将血清转移至新的 EP 管中,参照 TC、TG、LDL-C、HDL-C 检测试剂盒说明书进行检测。

1.3.5 HE 染色和动脉粥样硬化斑块面积统计

取血后迅速处死大鼠,并进行解剖,取出肝样本,将样本左中叶剪下,置入 10% 甲醛溶液中固定。组织样本在固定 18 h 后,流水冲洗 12 h,常规梯度乙醇脱水,石蜡浸泡,包埋,制成 4 mm 石蜡切片。经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水后,进行苏木素-伊红(HE)染色,梯度乙醇脱水,二甲苯脱乙醇,最后中性树胶封片,显微镜下观察肝组织切片的病理变化并拍照。采用 Photoshop(软件)计算动脉粥样硬化斑块面积。

1.3.6 蛋白印记实验检测肝组织 p-AMPK 和 p-ACC 蛋白表达变化

解剖各组大鼠,各取肝组织 0.5 g 左右,眼科剪剪碎后置于管中,加入 1 mL 细胞组织裂解液,均质仪研碎并于冰上静置 5 min,参考文献^[1]方法提取蛋白,按每孔 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜上,封闭。按需求加入 AMPK 抗体(1:2000)、p-AMPK 抗体(1:500)、ACC 抗体(1:2000)、p-ACC 抗体(1:1000)或 GAPDH 抗体(1:5000)4℃ 孵育过夜。次日,TBST 洗膜后加入相应的抗兔 IgG-HRP 二抗(1:2000),室温孵育 1 h,PVDF 膜以 ECL 发光试剂盒进行显色并于 AI600 凝胶成像仪中成像,对蛋白印迹条带进行处理和分析。磷酸化蛋白相对蛋白表达量 = 磷酸化蛋白灰度值/(总蛋白灰度值/GAPDH 灰度值)。

1.4 统计学方法

统计学分析方法采用 SPSS 17.0 软件,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据经正态性检验符合正态分布,两组间比较采用 *t* 检验,多组间

比较采用单因素方差分析,两两多重比较方法用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sim-LPNs 的体外表征

Sim-LPNs 粒径分布如图 1A 所示, Sim-LPNs 的平均动力学直径为 (180 ± 23) nm。如图 1B 所示,在透射电镜下, Sim-LPNs 形态较为圆整,外观呈均一的球形。

2.2 纳米粒载药系统细胞摄取水平

COU-6 为绿色荧光染料,如图 2 所示,荧光显微镜下观察发现, COU-6 和 COU-6-LPNs 处理后的 Caco-2 细胞均可发出绿色荧光,但与 COU-6 相比, COU-6-LPNs 呈现高荧光水平。结果如图 3 所示, COU-6 和 COU-6-LPNs 细胞的平均荧光强度值分别为 (221.3 ± 34.5) 和 (756.8 ± 78.4) , 后者荧光强度显著增强 ($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平比较

检测各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平,结果显示,与对照组 (Control) 相比,模型组 (Model) 大鼠 TC、TG、LDL-C 均显著升高, HDL-C 明显降低 ($P < 0.01$); 相较于 Model, 辛伐他汀组 (Sim) TG 和 HDL-C 变化不明显, TC 和 LDL-C 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 Model 相比, 辛伐他汀纳米粒组 (Sim-LPNs) TC、TG、LDL-C 均显著降低, HDL-C 明显升高 ($P < 0.01$); 与 Sim 相比, Sim-LPNs 大鼠 TC 和 LDL-C 显著降低 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.4 各组大鼠主动脉 HE 染色和粥样硬化斑块面积

如图 4 所示, HE 染色结果发现, Model 组大鼠动脉血管壁粘膜变性和水肿,在血管壁中出现典型的动脉粥样硬化斑块,并且脂质核心较厚,泡沫明显; Sim 组出现一定改善,但 Sim-LPNs 组改善更为明显。计算各组斑块面积,结果如表 2 所示,与

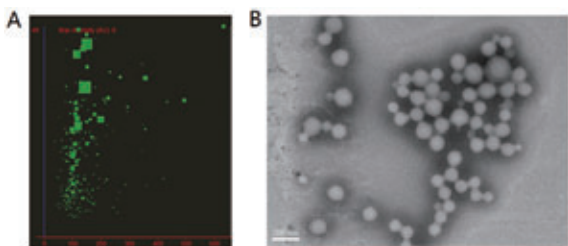
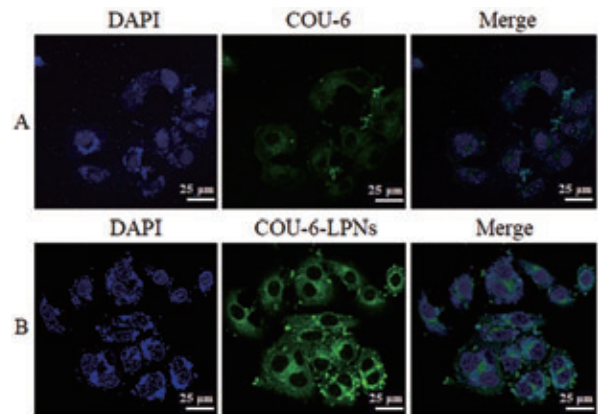


图 1 辛伐他汀纳米粒径分布和透射电镜图
Figure 1 The size distribution and transmission electron micrograph of S-LPNs

Control 组相比, Model 组动脉血管壁相对斑块面积和相对斑块面积/总面均显著增加 ($P < 0.01$); Control 组和 Sim 组未见明显差异; Sim-LPNs 组相较于 Model 组动脉血管壁相对斑块面积和相对斑块面积/总面明显减小 ($P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠肝组织中 p-AMPK 和 p-ACC 蛋白表达变化

Western blot 结果显示,相较于 Control 组, Model 组大鼠肝组织 p-AMPK 和 p-ACC 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Sim 组 p-AMPK 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$), Sim-LPNs 组 p-AMPK 和 p-ACC 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 Sim 组相比, Sim-LPNs 组 p-AMPK 蛋白表达上调更明显 ($P < 0.01$), 见表 3 和图 5。



注: A: Caco-2 细胞对 COU-6 的摄取; B: Caco-2 细胞对 COU-6-LPNs 的摄取。

图 2 Caco-2 细胞对 COU-6 和 COU-6-LPNs 的摄取
Note. A, Caco-2 fine intake of COU-6. B, Caco-2 fine intake of COU-6-LPNs.

Figure 2 Absorption capacity of Caco-2 to COU-6 and COU-6-LPNs

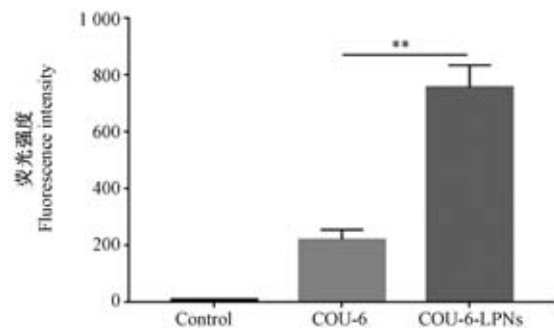


图 3 Caco-2 细胞摄取 COU-6 和 COU-6-LPNs 后的荧光强度

Figure 3 Fluorescence intensity of Caco-2 after fine uptake of COU-6 and COU-6-LPNs

3 讨论

LPNs 作为近几年大家比较关注的新型给药系统,兼具传统脂质体和聚合物纳米粒两种纳米药物载体的优点,在增加水不溶性药物生物利用度和控制药物释放等方面显示出了独特的优势^[11]。PLGA 是一种生物可降解的材料、磷脂层为纳米载体的外壳,对于疏水性药物有更好的包载,而磷脂层外壳与细胞膜的表面具有类似的生理功能,因此可增加纳米粒子的生物相容性,同时也能够减缓药物的释放^[12-14]。此外,纳米粒子表面也可以进行功能基团的修饰,可进一步促进细胞的摄取,增强药效^[15-16]。

表 1 各组大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Serum TC, TG, LDL-C, HDL-C levels of rats in each group

组别 Groups	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
对照组 Control group	1.54±0.23	0.51±0.14	0.39±0.05	3.23±0.12
模型组 Model group	4.53±0.36**	1.16±0.18**	9.84±0.11**	2.46±0.28**
辛伐他汀组 Sim group	3.85±0.31 [#]	0.86±0.09	6.62±0.107 ^{##}	2.49±0.19
辛伐他汀纳米粒组 Sim-LPNs group	2.56±0.20 ^{###△△}	0.63±0.07 ^{##}	4.02±0.387 ^{###△△}	3.09±0.22 [#]

注:与 Control 组相比,** $P<0.01$;与 Model 组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与 Sim 组相比,^{△△} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the Control group,** $P<0.01$. Compared with the model group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$. Compared with the Sim group,^{△△} $P<0.01$.

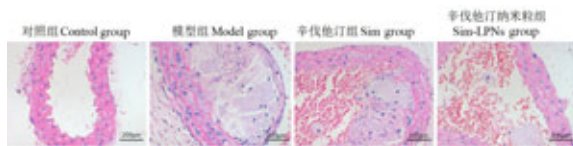


图 4 各组主动脉 HE 染色

Figure 4 HE staining of aorta in each group

表 2 各组大鼠动脉血管壁相对斑块面积 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Relative plaque area of arterial wall of rats in each group

组别 Groups	相对斑块面积 (mm ²) Relative plaque area	相对斑块面积 /总面积 (%) Relative plaque area/total surface
对照组 Control group	0	0
模型组 Model group	0.67±0.12**	65.65±8.33**
辛伐他汀组 Sim group	0.50±0.07	53.24±5.96
辛伐他汀纳米粒组 Sim-LPNs group	0.28±0.03 ^{##}	33.51±5.17 ^{##}

注:与 Control 组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,^{##} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the Control group,** $P<0.01$. Compared with the model group,^{##} $P<0.01$.

本研究制备辛伐他汀纳米粒,验证发现其形态圆整,外观呈均一的球形,更有利于增加对生物膜的穿透性及增强细胞内的药效发挥。本研究发现 LPNs 可增强 Caco-2 细胞对 COU-6 的摄取。研究显示,Caco-2 细胞可形成与小肠上皮细胞相同的细胞极性和致密的单细胞层结构,分化出绒毛面 A 和基底面 B,可作为研究药物吸收和转运的有效工具^[17-18]。提示,LPNs 能提高药物的小肠吸收。观察血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平发现,实验终点时,Sim 可显著降低 TC 和 LDL-C 水平;而 Sim-LPNs 不仅可更为显著的降低 TC 和 LDL-C 水平,还能显著降低 TG 水平和升高 HDL-C 水平。提示,LPNs 可

表 3 各组大鼠肝组织中 p-AMPK 和 p-ACC 相对蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Relative protein expression of p-AMPK and p-ACC in liver tissues of rats in each group

组别 Groups	p-AMPK	p-ACC
对照组 Control group	0.66±0.05	1.79±0.19
模型组 Model group	0.13±0.02**	0.32±0.02**
辛伐他汀组 Sim group	0.27±0.04 [#]	0.37±0.03
辛伐他汀纳米粒组 Sim-LPNs group	0.71±0.08 ^{###△△}	0.67±0.08 [#]

注:与 Control 组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与 Sim 组相比,^{△△} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the Control group,** $P<0.01$. Compared with the model group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$. Compared with the Sim-LPNs group,^{△△} $P<0.01$.

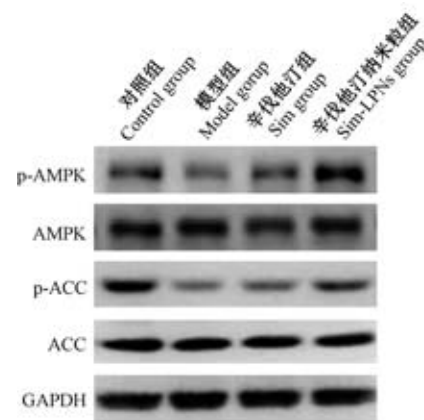


图 5 各组大鼠肝组织中 p-AMPK 和 p-ACC 蛋白表达水平

Figure 5 Expression levels of p-AMPK and p-ACC protein in liver tissues of rats in each group

增强 Sim 的降脂效果。观察各组大鼠主动脉粥样硬化程度发现,模型组大鼠动脉血管壁粘膜变性和水肿,在血管壁中出现典型的动脉粥样硬化斑块,并且脂质核心较厚,泡沫明显。Sim 治疗后病理变化得到一定改善,而 Sim-LPNs 治疗后的改善效果更为明显。计算各组粥样硬化斑块面积发现,Sim-LPNs 治疗后模型大鼠动脉血管壁相对斑块面积和相对斑块面积/总面积均明显减小。这些提示,LPNs 可显著增强 Sim 对大鼠动脉粥样硬化的治疗效果。

业已证明,AMPK-ACC 信号通路在参与机体能量代谢和脂肪合成中发挥重要生理作用。文献报道,AMPK 可通过直接磷酸化脂质代谢相关的酶类,从而改变脂质的代谢方向。ACC 是 AMPK 的下游靶点之一,由于 ACC 是脂肪酸代谢的限速酶,当机体处于应激状态时,组织细胞内 AMPK 被激活,而活化的 AMPK 可磷酸化 ACC 的 79 位点苏氨酸位点而使后者失活^[19-20]。ACC 失活后,脂肪酸氧化加剧,血清游离脂肪酸水平降低,脂肪在组织中的沉积减少^[19-21]。肝是人体重要的代谢器官,参与糖类、脂类和蛋白质的代谢。本研究观察了肝 AMPK 和 ACC 蛋白表达变化,结果发现,动脉粥样硬化模型大鼠 AMPK 和 ACC 磷酸化蛋白均显著下调,Sim 治疗后模型大鼠肝 p-AMPK 明显上调,但 ACC 变化不明显。而 Sim-LPNs 治疗后模型大鼠肝 p-AMPK 和 p-ACC 均显著上调。这些提示,相较于 Sim,Sim-LPNs 可明显激活肝细胞 AMPK-ACC 信号通路,从而参与促进脂质代谢调节。

综上所述,相较于 Sim,Sim-LPNs 对动脉粥样硬化大鼠具有较好的治疗作用,而该作用可能与增强小肠对药物的吸收和激活肝细胞 AMPK-ACC 信号通路增强脂质代谢有关。

参考文献:

- [1] Li Q, Wang H, Zhang C, et al. Ethyl acetate extract of sappanwood alleviates experimental atherosclerosis in rats through changes in FGF21 and SREBP-2 expression [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(2): 220-229.
- [2] 刘军平, 潘永明, 陈民利, 等. 白毛黑眼兔与日本大耳白兔胰岛素抵抗动脉粥样硬化模型的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 339-346.
- [3] 董鹏, 李小红, 王俊红, 等. 利拉鲁肽对动脉粥样硬化过程中糖尿病大鼠血管平滑肌 KCa3.1 表达的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(4): 353-357.
- [4] Boudoulas KD, Triposciadis F, Geleris P, et al. Coronary atherosclerosis: pathophysiologic basis for diagnosis and management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2016, 58(6): 676-692.
- [5] Xia WQ, Niu GZ, Yin CG, et al. Effects of lncRNA gm4419 on rats

- with hypertensive cerebral atherosclerosis through NF- κ B pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10976-10981.
- [6] Nakamura M, Fukukawa T, Kitagawa K, et al. Ten-year standardization of lipids and high-sensitivity C-reactive protein in a randomized controlled trial to assess the effects of statins on secondary stroke prevention: Japan statin treatment against recurrent stroke [J]. *Ann Clin Biochem*, 2018, 55(1): 128-135.
- [7] Jose MA, Anandkumar S, Narmadha MP, et al. A comparative effect of atorvastatin with other statins in patients of hyperlipidemia [J]. *Indian J Pharmacol*, 2012, 44(2): 261-263.
- [8] 汪宝军, 张莉蓉, 付润芳. 高脂血症患者细胞色素 P450A4 * 18B 基因多态性对辛伐他汀稳态血药浓度及其对降脂疗效的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(3): 269-271.
- [9] Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update [J]. *Fundam Clin pharmacol*, 2005, 19(1): 117-125.
- [10] 孙钰, 许焕, 卫一丹, 等. 表面疏水性可调控型载药聚合物-脂质纳米粒的制备与表征 [J]. *药学报*, 2019, 54(8): 1509-1514.
- [11] Zhang L, Chan JM, Gu FX, et al. Self-assembled lipid polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform [J]. *ACS Nano*, 2008, 2(8): 1696-1702.
- [12] Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, et al. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform [J]. *Nanomedicine*, 2013, 9(4): 474-491.
- [13] Chan JM, Zhang L, Yuet KP, et al. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(8): 1627-1634.
- [14] Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 85(2): 214-220.
- [15] Liu Y, Zhao YQ, Liu JG, et al. Wheat germ agglutinin modification of lipid-polymer hybrid nanoparticles: enhanced cellular uptake and bioadhesion [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(42): 36125-36135.
- [16] Yuan BO, Zhao Y, Dong S, et al. Cell-penetrating peptide-coated liposomes for drug delivery across the blood-brain barrier [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(1): 237-243.
- [17] 马雁, 徐绍辉, 于坤宏, 等. 利用 Caco-2 细胞模型研究新型 Pim-1 激酶抑制剂 KY-C002 的表观渗透系数 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(2): 236-240.
- [18] 欧静, 徐珍妮, 刘登群, 等. 3D 培养体系中不同肠上皮细胞株形成肠类器官潜能的比较及应用 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(1): 31-38.
- [19] Zhang YP, Deng YJ, Tang KR, et al. Berberine ameliorates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats via activation of SIRT3/AMPK/ACC pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(1): 37-43.
- [20] Yang H, Feng A, Lin S, et al. Fibroblast growth factor-21 prevents diabetic cardiomyopathy via AMPK-mediated antioxidation and lipid-lowering effects in the heart [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 227.
- [21] 吴宁, 罗杰, 孙见飞, 等. 青苹果对高脂模型雄性大鼠 AMPK-ACC 信号通路的作用 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(7): 3177-3183.

[收稿日期]2020-05-07

谢翼,王凯,牛敏. 七氟醚预处理对老年大鼠认知功能障碍的影响及海马区自噬在其中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (11): 84-90.

Xie Y, Wang K, Niu M. Effects of sevoflurane preconditioning on cognitive dysfunction in aged rats and the role of autophagy in the hippocampus [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 84-90.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.014

七氟醚预处理对老年大鼠认知功能障碍的影响 及海马区自噬在其中的作用研究

谢翼^{1*}, 王凯², 牛敏¹

(1.山东省淄博市中心医院, 山东 淄博 255034; 2.山东省日照市人民医院, 山东 日照 276800)

【摘要】 目的 探讨海马区自噬对七氟醚诱导老年大鼠认知功能障碍的影响及可能机制。方法 72只SD大鼠随机分为对照组(CON)、自噬诱导剂雷帕霉素组(RAP)、自噬抑制剂氯喹组(CQ)、七氟醚组(SEV)、七氟醚+雷帕霉素组(SEV+RAP)、七氟醚+氯喹组(SEV+CQ), 每组12只。各组大鼠进行血气指标检测; Morris水迷宫测试大鼠学习记忆能力; 透射电子显微镜观察海马区神经元的超微结构的改变; TUNEL法染色观察海马CA1区神经元凋亡情况; RT-qPCR检测大鼠LC3 mRNA的表达; Western blot检测海马组织中p-S6K1、Cl-Caspase3、p62、p-mTOR、Bax、Bcl-2蛋白表达。结果 与对照组比较, 各组大鼠血气分析无显著性差异($P>0.05$); 与CON组比较, SEV组逃避潜伏期延长($P<0.01$), 目标象限时间百分比缩短($P<0.05$), 穿越平台次数减少($P<0.01$), 海马组织中p62、cl-caspase3和Bax蛋白表达升高($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达降低($P<0.01$), 海马CA1区中自噬泡数量和细胞凋亡率增加($P<0.01$); 与SEV组比较, SEV+RAP组目标象限时间百分比延长($P<0.05$), 逃避潜伏期缩短($P<0.05$), 穿越平台次数增加($P<0.05$), 海马组织中p62、p-mTOR、p-S6K1、Cl-caspase3和Bax蛋白表达降低($P<0.05$), 海马组织中LC3 mRNA及Bcl-2蛋白表达升高($P<0.01$), 海马自噬泡数量和细胞凋亡率增加($P<0.01$)。结论 七氟醚麻醉导致老年大鼠认知功能障碍可能与海马神经元的自噬受损有关。

【关键词】 七氟醚; 自噬; 认知功能障碍; 雷帕霉素; 老年大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0084-07

Effects of sevoflurane preconditioning on cognitive dysfunction in aged rats and the role of autophagy in the hippocampus

XIE Yi^{1*}, WANG Kai², NIU Min¹

(1. Zibo Central Hospital of Shandong Province, Zibo 255034, China. 2. Rizhao People's Hospital of Shandong Province, Rizhao 276800)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hippocampal autophagy on sevoflurane-induced cognitive impairment in aged rats and its possible mechanism. **Methods** Seventy-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups: CON, RAP, CQ, SEV, SEV+RAP, and SEV+CQ. The following method were used to collect data from each group: blood gas indexes; learning and memory ability testing by Morris water maze; ultrastructural changes of hippocampal neurons under transmission electron microscopy; apoptosis of hippocampal CA1 neurons observed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; quantification of LC3 mRNA expression by reverse transcription-quantitative PCR; and protein expression of p62, LC3, Caspase3, Bax and Bcl-2 in the hippocampus detected by Western blot. **Results** There were no significant differences in arterial blood gas result in the 6 groups of rats ($P>0.05$).

Compared with the CON group, in the SEV group the escape latency was prolonged ($P < 0.01$), the percentage of target quadrant time was shortened ($P < 0.05$), and the number of crossing platforms was reduced ($P < 0.01$), while the expression of p62, cleaved caspase-3 and Bax protein increased in the hippocampus ($P < 0.05$), Bcl-2 decreased ($P < 0.01$), and the number of autophagic vesicles and the rate of apoptosis were increased in the hippocampus ($P < 0.01$). Compared with the SEV group, the escape latency of the SEV+RAP group was decreased ($P < 0.01$). Additionally, the expression of p62, p-mTOR, p-s6k1, cl-caspase-3 and Bax protein were all decreased in the hippocampus ($P < 0.05$), while the expression of LC3 mRNA and bcl-2 protein increased ($P < 0.01$), and the number of autophagic vesicles and the rate of apoptosis increased ($P < 0.01$) in the hippocampus. **Conclusions** Cognitive dysfunction caused by sevoflurane anesthesia in elderly rats may be related to impaired autophagy in hippocampal neurons.

【Keywords】 sevoflurane; autophagy; cognitive dysfunction; rapamycin; aged rats

术后认知功能障碍 (postoperative cognitive dysfunction, POCD) 是老年病人手术后出现中枢神经系统并发症, 表现为精神错乱、焦虑、人格的改变以及记忆受损。目前 POCD 机制尚未明了, 研究方向主要集中在中枢胆碱能系统功能障碍、炎症反应、神经细胞凋亡等领域^[1-2]。

自噬 (autophagy) 是细胞内容物分解代谢的过程, 作为一种高度调节的细胞机制, 与多种疾病的生理病理情况有关^[3]。近年来研究表明^[4-5], 上调自噬水平可能保护神经退行性变, 调节自噬可能成为治疗阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病等神经退行性疾病的新策略。还有研究表明, 麻醉诱导应激可能导致海马水平的改变和认知障碍^[6]。本实验将老年大鼠暴露于七氟醚后, 采用 Morris 水迷宫, Western blot 检测自噬及凋亡相关蛋白表达等方法, 证实了海马区自噬在七氟醚麻醉诱导的神经退行性变中起作用, 为 POCD 的治疗提供了一个新的潜在靶点及理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

72 只 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 20 月龄, 体重 550~750 g, 购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司 [SCXK (鲁) 2019-0011]。实验前适应性饲养在淄博市中心医院 [SYXK (鲁) 2017-0023] 一周, 室温 (22±2) °C, 所有大鼠均自由摄食、饮用蒸馏水, 维持 12 h 光照和 12 h 黑暗交替循环的环境。本研究获得本院动物伦理委员会批准 (20190623), 依据 3R 原则进行实验。

1.2 主要试剂与仪器

七氟醚 (山东, 鲁南贝特制药有限公司); 雷帕霉素、氯喹 (美国, Sigma 公司); p-mTOR、mTOR、Bcl-2、Cl-Caspase3、p-S6K1、S6K1 抗体 (美国, Novus

Biologicals 公司); Bax、p62 抗体 (美国, Abcam 公司); TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒 (南京, 凯基生物工程公司); Maxima SYBR Green 及 cDNA 合成试剂盒 (美国, Thermo 公司); 透射电子显微镜 (日本, HT7800); 电泳仪 (北京六一, DYCZ-24DN); 血气分析仪 (丹麦, ABL80); 大鼠 Morris 水迷宫 (上海欣软, water Maze)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及模型建立

大鼠随机分为 6 组 (每组 12 只): 对照组 (CON)、雷帕霉素组 (RAP)、氯喹组 (CQ)、七氟醚组 (SEV)、七氟醚+雷帕霉素组 (SEV+RAP)、七氟醚+氯喹组 (SEV+CQ)。雷帕霉素和氯喹分别用二甲基亚砜溶解并稀释制成 25 mg/mL 的溶液, 再用 5% 的聚乙二醇 400 和 5% 吐温 80 溶液进一步稀释成 10 mg/mL 的溶液。RAP 与 SEV+RAP 组于麻醉前静脉注射 20 mg/(kg·d) 的雷帕霉素, CQ 和 SEV+CQ 组于麻醉前静脉注射 20 mg/(kg·d) 氯喹, 均连续 7 d。CON 和 SEV 组静脉注射等体积的空白溶剂。大鼠放入麻醉箱后, SEV、SEV+RAP 与 SEV+CQ 组开启 2% 七氟醚和 30% O₂ 混合气, 连续麻醉 5 h; CON、RAP 与 CQ 组大鼠开启 30% O₂ 连续 5 h。

1.3.2 生理指标分析

实验结束后, 每组随机选 3 只大鼠抽取 1 mL 动脉血, 使用血气分析仪观察 pH 值、PaCO₂、PaO₂、SaO₂ 及血糖指标变化。

1.3.3 行为学测试

七氟醚暴露 24 h 后, 采用 Morris 水迷宫测试大鼠的空间记忆能力, 平台 (直径 10 cm) 固定在游泳池的四个象限之一。连续训练 5 d, 每天 4 次。将平台被淹没在水下 1 cm 处, 每一次实验时, 观察大鼠在水中找到平台并爬上平台的时间, 记为逃避潜伏期; 如果在 120 s 内不能找到平台, 则人为将其引导

到平台,并停留 10 s,将逃避潜伏期记为 120 s;当老鼠到达平台时,他们被允许在上面休息 30 s;记录找到隐藏平台所需的时间(逃避潜伏期)。四次的平均时间为大鼠当日的结果。每次实验后,老鼠被擦干,然后放回笼子。第 5 天,在去除平台后进行空间探索实验,记录 120 s 内老鼠穿过原平台位置的次数和在目标象限的停留时间。

1.3.4 取材

Morris 水迷宫测试结束后,将所有大鼠麻醉处死,每组将 3 只大鼠取出全脑,切除脑海马组织,左侧用于 TEM 观察,右侧用于 TUNEL 分析。其它 9 只大鼠快速剥离海马,切除双侧海马组织,迅速置于液氮冷冻,用于 Western blot 和 RT-qPCR 分析。

1.3.5 TEM 观察海马神经元自噬

取左侧海马组织,置于 2.5%戊二醛中,4℃固定过夜,磷酸缓冲盐冲洗三次,1%锇酸固定 2 h,水冲洗,常规脱水,包埋,切片,经 4%乙酸铀染色 20 min、0.5%柠檬酸铅染色 5 min,镜下观察海马神经元自噬体。

1.3.6 TUNEL 法检测海马细胞凋亡

按 TUNEL 试剂盒使用说明书进行操作,于显微镜下观察,计数海马 CA1 区的凋亡细胞(凋亡细胞细胞核呈棕色)及细胞总数,其比值即为相对细胞凋亡率^[7]。

1.3.7 RT-qPCR 检测海马组织中 LC3 mRNA 表达

取海马组织^[8],加入 TRIzol 试剂提取待测组织总 RNA,以提取的总 RNA 为模板按逆转录试剂盒说明合成 cDNA,取 2 μL cDNA 用于 RT-qPCR 反应。β-actin 上游引物:5'-AGCACAGAGCCTCGCCTTT-3';下游引物:5'-AGGGTGAGGATGCCTCTCTT-3';LC3 上游引物 5'-AGCAGCATCCAACCAAAATC-3';下游引物:5'-CTGTGTCCGTTCAACCAACAG-3'),以 β-actin 作为内参,根据公式

$mRNA = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算分析海马组织中基因的相对表达水平。

1.3.8 Western blot 法检测海马组织中 p-S6K1、Cl-Caspase3、p62、p-mTOR、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平

取 50 mg 海马组织加入适量的 RIPA 裂解液,匀浆后,离心 10 min,收集上清液,BCA 试剂盒检测总蛋白浓度。然后上样、电泳、转膜,含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,加一抗 4℃孵育过夜,加二抗 37℃孵育 2 h,TBST 漂洗,ECL 显色。采用 Image 图像软件对蛋白质条带进行分析,目的蛋白与 β-actin 密度的比值作为目的蛋白的相对含量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,结果采用单因素方差分析和 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组生理指标分析结果

在七氟醚麻醉或假暴露结束时,对每组 3 只大鼠的动脉血样进行血气及血糖分析。与对照组比较,其余实验组血样中 pH、PaCO₂、PaO₂、葡萄糖、SaO₂ 值无显著性差异($P > 0.05$),见表 1。

2.2 Morris 水迷宫测试各组大鼠行为学结果

与 CON 组比较,SEV 组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.01$),目标象限时间百分比下降($P < 0.05$),穿越平台次数减少($P < 0.01$);与 SEV 组比较,SEV+RAP 组逃避潜伏期缩短,目标象限时间百分比增加、穿越平台次数增加($P < 0.05$);而 SEV+CQ 组逃避潜伏期延长,目标象限时间百分比下降、穿越平台次数减少($P < 0.05$);CON 和 RAP 组、CON 和 CQ 组大鼠逃避潜伏期、目标象限时间百分比、穿越平台次数无显著性差异($P > 0.05$),见图 1A、1B、1C。

表 1 各组老年大鼠动脉血气比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Comparison of arterial blood gas of aged rats in each group

组别 Groups	pH	二氧化碳分压(mmHg) PaCO ₂	氧分压(mmHg) PaO ₂	葡萄糖(mmol/L) Glucose	血氧饱和度(%) SaO ₂
对照组 CON	7.32±0.04	42.1±2.9	108±18	4.1±0.6	98.3±0.6
雷帕霉素组 RAP	7.36±0.03	43.4±3.2	110±17	4.4±0.2	99.0±0.9
氯喹组 CQ	7.34±0.05	42.9±3.4	112±19	4.2±0.4	98.7±0.7
七氟醚组 SEV	7.33±0.06	40.7±3.3	108±17	4.5±0.3	99.0±1.0
七氟醚组+雷帕霉素组 SEV+RAP	7.35±0.04	41.5±3.0	109±18	4.5±0.5	98.8±0.5
七氟醚组+氯喹组 SEV+CQ	7.33±0.03	42.4±3.7	113±17	4.4±0.7	99.0±0.6

2.3 TEM 观察大鼠海马神经元自噬变化

与 CON 组比较, RAP、CQ 及 SEV 组的海马神经元自噬泡数量增加 ($P < 0.05$); 与 SEV 组比较, SEV+RAP 和 SEV+CQ 组自噬泡数量也增加 ($P < 0.05$), CQ 和 SEV+CQ 两组间自噬泡数量无显著性差异 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.4 TUNEL 法染色观察神经元凋亡情况

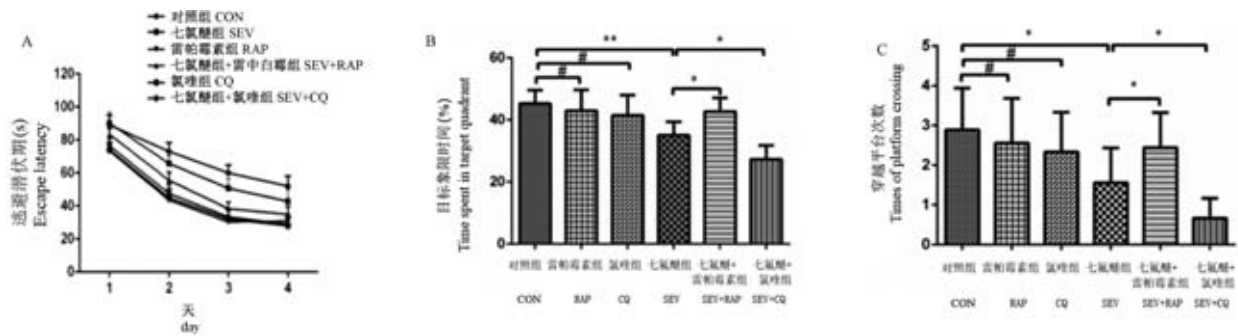
与 CON 比较, SEV 组细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$), RAP、CQ 组无显著差异 ($P > 0.05$); 与 SEV 比较, SEV+CQ 组的细胞凋亡率增加, SEV+RAP 组降低 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.5 RT-qPCR 检测大鼠 LC3 mRNA 的表达

与 CON 组比较, RAP 组 LC3 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$); 与 SEV 组比较, SEV+RAP 组 LC3 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), 见图 4。

2.6 Western blot 检测海马 p62、Bcl-2、Cl-caspase-3、Bax、p-mTOR、p-S6K1 蛋白表达

与 CON 组比较, SEV 组的 p62、Cl-caspase-3 和 Bax 表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达降低 ($P < 0.01$)。与 SEV 组比较, SEV+RAP 组 p62、Cl-caspase-3 和 Bax 表达降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达升高 ($P < 0.01$), p-mTOR、p-S6K1 表达下降 ($P < 0.01$), 而 SEV+CQ 组 p62、Cl-caspase-3 和 Bax 表达升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达降低 ($P > 0.05$), 见图 5。



注: 与七氟醚组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P > 0.05$ 。下同。

图 1 各组大鼠行为学结果 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Note. Compared with SEV group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Compared with CON group, # $P > 0.05$. The same as below.

Figure 1 Behavioral results of rats in each group

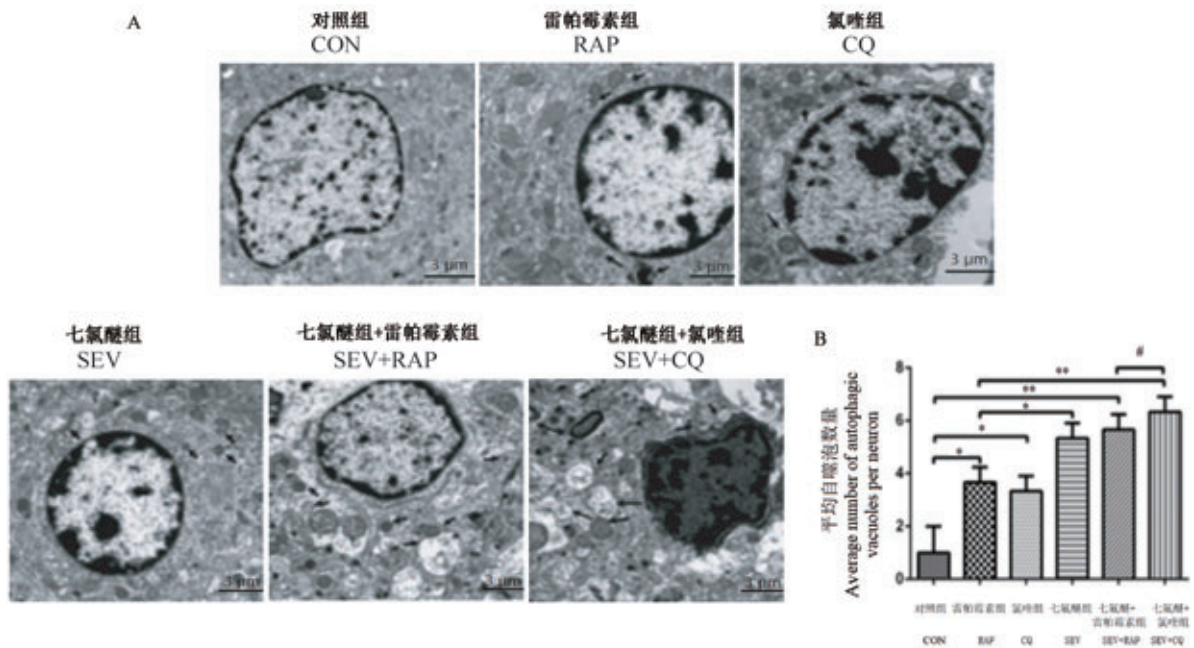


图 2 各组大鼠海马神经元自噬泡数量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 2 Comparison of autophagy of hippocampal neurons in each group

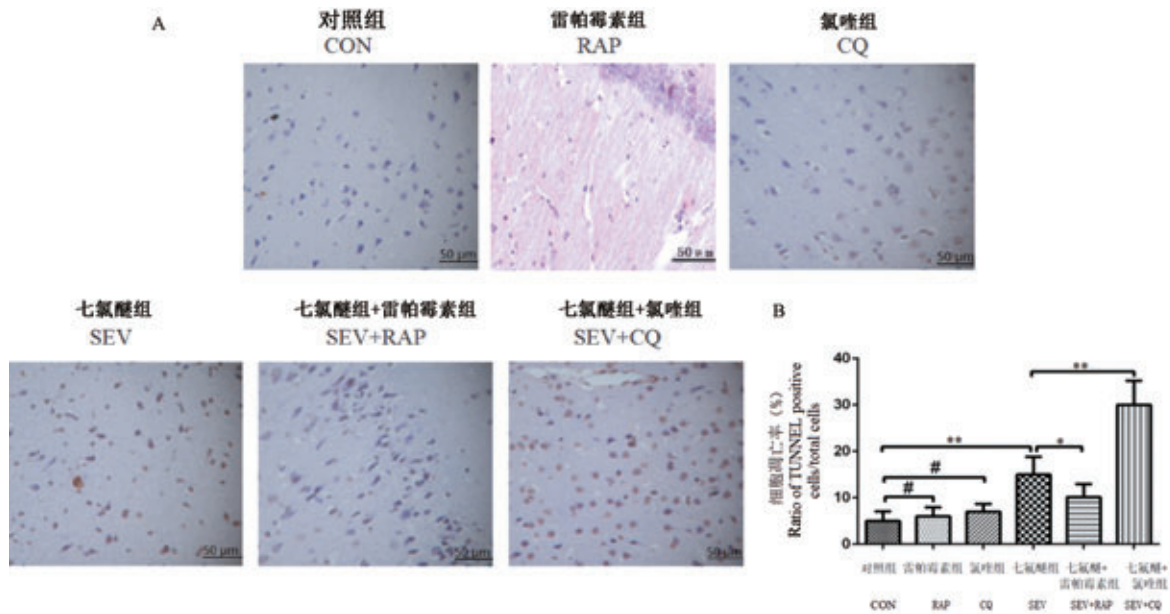


图 3 各组大鼠海马细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Figure 3 Apoptosis ratio of cells in the hippocampus of rats in each group

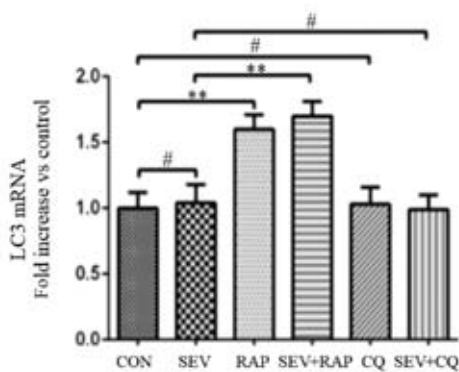


图 4 七氟醚麻醉后大鼠海马 LC3 mRNA 表达情况($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Figure 4 Effect of sevoflurane anesthesia on LC3 mRNA expression in rats

3 讨论

POCD 是术后出现的一种中枢神经系统并发症,尽管人们已经普遍认识到 POCD 的危害性,但其具体的发病机制、病理生理还未被阐明。七氟醚是临床常用的吸入性麻醉药,对术后认知功能有影响,但发生机制尚不明确。研究表明,七氟醚吸入麻醉引起老年患者 POCD 发生率高于静脉注射异丙酚的老年患者^[8]。本实验对大鼠生理指标检测发现,与对照组相比,各实验组生理指标值均无显著性差异($P>0.05$),这说明七氟醚预处理对大鼠生理改变无明显影响。

由于雄性大鼠比较强壮,雌性体质相对比较弱,容易有别的因素(吃的食物,生活环境等)干扰实验效果,因此选择雄性大鼠进行实验。海马组织主要负责存储信息,是人学习和记忆的关键功能区认知区域之一。病理研究表明,当发生轻度认知功能障碍时,海马具有神经可塑性^[9]。Morris 水迷宫是研究海马空间学习记忆的重要评估工具^[10]。本实验水迷宫结果显示,七氟醚麻醉后老年大鼠出现了认知障碍,而 RAP、CQ 组大鼠空间学习记忆能力无明显差别,提示 RAP、CQ 分别单独给药对老年大鼠认知功能无影响。与 SEV 组比较,SEV+RAP 组大鼠认知障碍明显改善,说明雷帕霉素治疗可以改善七氟醚引起的认知障碍。而 SEV+CQ 组则进一步加剧了七氟醚诱导引起的认知功能障碍,提示七氟醚麻醉导致大鼠空间记忆的损害可能与海马自噬有关。

自噬是细胞在应激状态下再利用的重要分解代谢过程,在维持细胞稳态和应激状态下保留细胞生存能力方面发挥重要作用^[11]。微管相关蛋白轻链 3(LC3)是存在于哺乳动物体内的自噬基因,其表达水平在某种程度上反映了细胞的自噬活性^[12]; p62 包含多种蛋白作用域,可结合聚泛素化蛋白并将其进一步降解,通常细胞内 P62 蛋白的水平与自噬活性的强弱呈负相关性^[13-14]。Western blot 结果显示,与 CON 组相比,SEV 组 p62 蛋白表达上升($P<0.05$),而 SEV+RAP 组 p62 表达低于 SEV 组($P<$

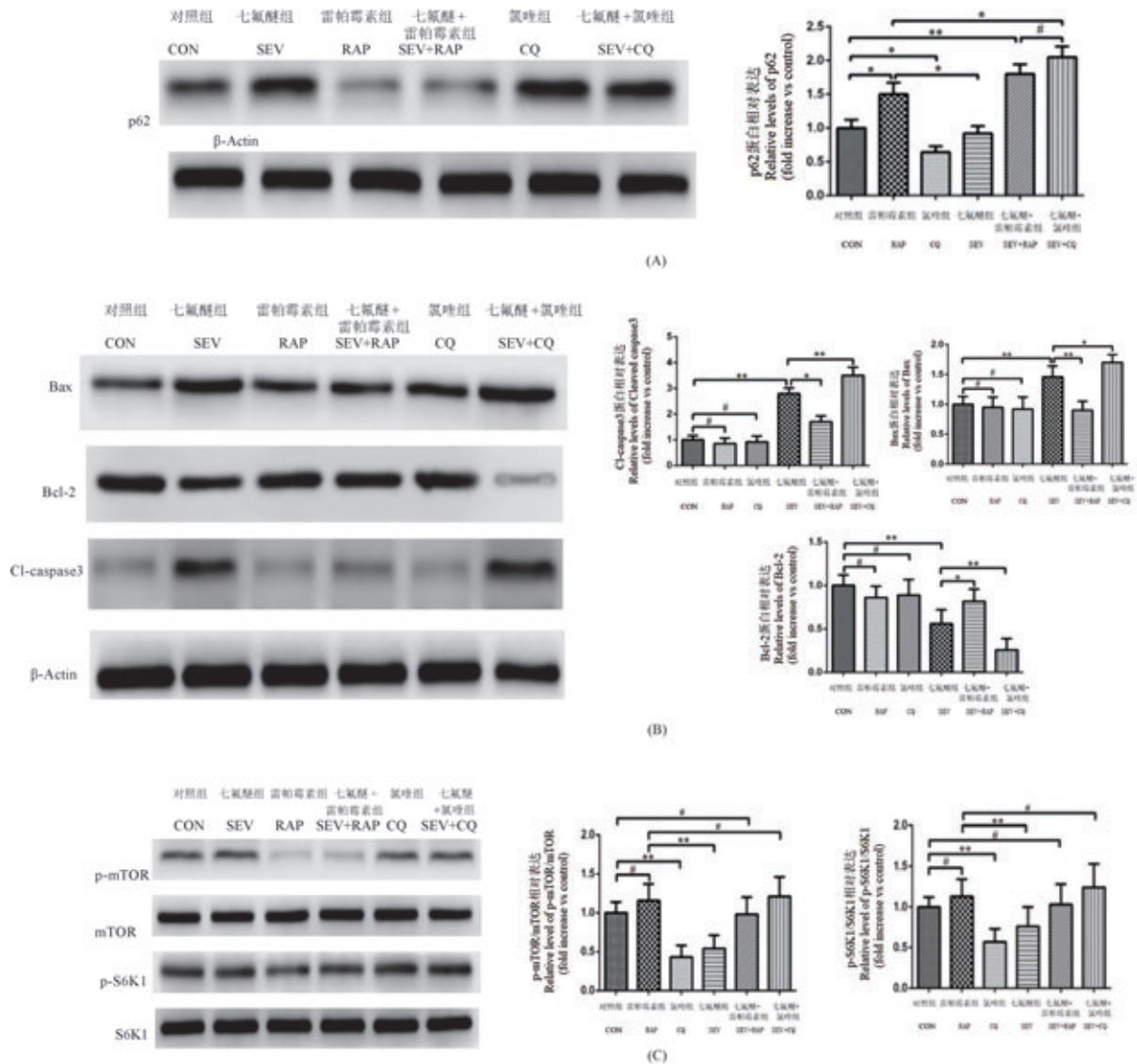


图 5 七氟醚麻醉后对大鼠海马区相关因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Figure 5 Effects of sevoflurane anesthesia on the expression of related factors in hippocampus of rats

0.05), 这说明七氟醚能抑制老年大鼠自噬通道。同时 TEM 观察显示, SEV+CQ、SEV+RAP 组的自噬泡数量高于 SEV 组, 而 CQ 和 SEV+CQ 组的自噬泡数量则无显著性差异, 这些证据进一步表明七氟醚诱导老年大鼠海马自噬受损。RT-qPCR 结果显示, CQ 组及 SEV+CQ 组对 LC3 mRNA 影响不大, 但雷帕霉素 (RAP) 提高了 LC3 mRNA 水平, 且 TUNEL 法观察发现 SEV+RAP 组海马神经元凋亡率较 SEV 组下降 ($P < 0.05$), 这说明雷帕霉素上调 LC3 mRNA 表达从而增加自噬活性, 维持细胞内稳态, 阻止细胞凋亡。mTOR 是一个重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在进化上非常保守, 它对细胞自噬起着负调控作用, 而 S6K1 是 mTOR 下游效应分子之一。

Western blot 结果显示, 与 CON 组相比, RAP 显著抑制 p-mTOR 及其下游 p-S6K1 表达 ($P < 0.01$), 而 SEV+RAP 组 p-mTOR 和 p-S6K1 表达较 SEV 组表达下调, 我们推测雷帕霉素可能通过抑制 mTOR 途径减少 p-S6K1 的积累, 增强了自噬, 而 SEV 可能通过激活 mTOR 通路, 起到抑制自噬的作用。

研究指出, 七氟醚麻醉可以引起老年大鼠内质网应激反应, 内质网中未折叠蛋白的过度积累会引起内质网应激, 损伤细胞器, 诱导细胞进入凋亡程序^[15]。Bcl 2 蛋白家族和胱天蛋白酶 (Caspase) 家族在细胞凋亡过程中起着关键性作用, 其中 Bcl 2 抑制细胞凋亡, 而 Bax 为促凋亡因子, Caspase-3 是凋亡级联反应中处于核心地位的蛋白, 通过三者表

达的变化可判断细胞凋亡^[16]。Western blot 结果显示,七氟醚麻醉后大鼠 Bcl-2 水平显著降低,Caspase-3 和 Bax 水平显著升高,TUNEL 法染色观察到七氟醚麻醉后海马相对细胞凋亡率明显增加,验证了七氟醚麻醉能诱导细胞凋亡;而雷帕霉素预给药后,与 SEV 组大鼠比较,Bcl-2 水平显著升高,Caspase-3、Bax 水平及细胞凋亡率均明显降低,提示自噬可能通过阻断凋亡,从而促进细胞存活。

综上所述,七氟醚麻醉后可显著损害老年大鼠记忆能力,诱导海马神经元凋亡,而联合雷帕霉素治疗则可以改善七氟醚诱导的自噬通道受损。这些发现表明,七氟醚麻醉导致老年大鼠认知功能障碍与海马神经元的自噬受损有关。

参考文献:

- [1] Shoair OA, Grasso Li MP, Lahaye LA, et al. Incidence and risk factors for postoperative cognitive dysfunction in older adults undergoing major noncardiac surgery: A prospective study [J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2015, 31(1): 30-36.
- [2] Vutskits L, Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(11): 705-717.
- [3] 陈昌明, 方三高. 自噬是间质-上皮转化重建上皮表型的关键过程 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018(5): 475.
- [4] Kiriya Y, Nochi H. The function of autophagy in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26797-26812.
- [5] Nah J, Yuan J, Jung YK. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(5): 381-389.
- [6] Liu Y, Pan N, Ma Y, et al. Inhaled sevoflurane may promote progression of amnesic mild cognitive impairment: a prospective, randomized parallel-group study [J]. *Am J Med Sci*, 2013, 345(5): 355-360.
- [7] 王玲, 张盼盼, 韩晓庆, 等. 细胞外信号调节激酶抑制剂对间歇低氧早期大鼠神经元凋亡及 P53 表达的影响 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(7): 754-758.
- [8] 高友光, 林献忠, 林财珠, 等. 不同麻醉方法下老年患者术后认知功能障碍发生的比较 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(11): 1337-1340.
- [9] Li M, Zhang X, Wu A, et al. Propofol-induced age-different hippocampal long-term potentiation is associated with F-actin polymerization in rats [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 1059-1066.
- [10] Li ZQ, Rong XY, Liu YJ, et al. Activation of the canonical nuclear factor- κ B pathway is involved in isoflurane-induced hippocampal interleukin-1 β elevation and the resultant cognitive deficits in aged rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 438(4): 628-634.
- [11] Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, et al. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 549-555.
- [12] 张晓慧, 郭乐乐, 刘贞利, 等. GLT25D2 基因在对乙酰氨基酚诱导肝毒性损伤中对自噬的调控作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(9): 882-887.
- [13] Galindo-Moreno M, Giráldez S, Sáez C, et al. Both p62/SQSTM1-HDAC6-dependent autophagy and the aggresome pathway mediate CDK1 degradation in human breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10078.
- [14] Niklaus M, Adams O, Berezowska S, et al. Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 54604-54615.
- [15] Chen G, Gong M, Yan M, et al. Sevoflurane induces endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in hippocampal neurons of aging rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57870.
- [16] Al-Qathama A, Gibbons S, Prieto JM. Differential modulation of Bax/Bcl-2 ratio and onset of caspase-3/7 activation induced by derivatives of Justicidin B in human melanoma cells A375 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95999-96012.

[收稿日期]2020-3-30

江婷婷,马兴华. 咪唑安定通过上调 miR-290-5p 调节 PI3K/AKT 信号通路抑制缺氧诱导心肌细胞损伤的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 91-96.

Jiang TT, Ma XH. Midazolam inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte damage by up-regulating miR-290-5p to regulate the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 91-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.015

咪唑安定通过上调 miR-290-5p 调节 PI3K/AKT 信号通路抑制缺氧诱导心肌细胞损伤的机制研究

江婷婷,马兴华*

(西安交通大学医学院附属三二〇一医院麻醉科,陕西 汉中 723000)

【摘要】 目的 探讨咪唑安定(MID)对缺氧诱导心肌细胞损伤的影响和分子机制。方法 采用不同浓度的MID预处理H9C2细胞24 h,缺氧诱导后,细胞计数试剂盒(CCK-8)检测H9C2细胞存活率,确定MID最佳浓度。将H9C2细胞分为正常(NC)组、缺氧(hypoxia)组、MID+hypoxia组、miR-NC+hypoxia组、miR-290-5p+hypoxia组、anti-miR-NC+MID+hypoxia组、anti-miR-290-5p+MID+hypoxia组。CCK-8法检测细胞存活;流式细胞术检测细胞凋亡;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-290-5p的表达;蛋白质印记(Western blot)检测磷脂酰肌醇-3-羟激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路相关蛋白的表达。结果 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的MID预处理H9C2细胞缺氧后细胞存活率显著升高($P<0.05$),16 $\mu\text{mol/L}$ 为MID的最佳浓度。与NC组比较,hypoxia组H9C2细胞凋亡率显著升高,miR-290-5p的表达和PI3K通路活性显著降低($P<0.05$)。与hypoxia组比较,MID+hypoxia组H9C2细胞凋亡率显著降低,miR-290-5p的表达显著升高,PI3K通路活性显著升高($P<0.05$)。与MID+hypoxia组比较,miR-290-5p+hypoxia组H9C2细胞存活率显著升高,凋亡率显著降低($P<0.05$)。与anti-miR-NC+MID+hypoxia组比较,anti-miR-290-5p+MID+hypoxia组H9C2细胞存活率显著降低,凋亡率显著升高,PI3K通路活性显著降低($P<0.05$)。结论 咪唑安定通过上调miR-290-5p激活PI3K/AKT信号通路有关进而对缺氧诱导的心肌细胞损伤具有保护作用。

【关键词】 咪唑安定;心肌细胞损伤;miR-290-5p;PI3K/AKT信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0091-06

Midazolam inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte damage by up-regulating miR-290-5p to regulate the PI3K/AKT signaling pathway

JIANG Tingting, MA Xinghua*

(Department of Anesthesiology, 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University Medical College, Hanzhong 723000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects and molecular mechanisms of midazolam (MID) on myocardial cell injury induced by hypoxia. **Methods** To determine the optimal MID concentration, H9C2 cells were pretreated with different concentrations of MID for 24 h, induced with hypoxia, and the survival rate was assayed using the cell counting kit (CCK-8). H9C2 cells were divided into seven groups: normal control (NC); hypoxia; MID + hypoxia; microRNA (miRNA) negative control (NC) + hypoxia; miR-290-5p + hypoxia; anti-miR-NC + MID + hypoxia; and anti-miR-290-5p + MID + hypoxia. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect miR-290-5p expression. Western blot was used to detect phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway-related protein expression. **Results** The cell survival rate of H9C2 cells pretreated with MID at

[作者简介] 江婷婷(1982—)女,硕士,研究方向:心血管麻醉及脑保护。E-mail: gemyw62@163.com

[通信作者] 马兴华(1982—)男,本科,研究方向:医疗设备全生命周期监管。E-mail: mxh3203@163.com

8, 16 and 32 $\mu\text{mol/L}$ was significantly increased after hypoxia ($P < 0.05$); 16 $\mu\text{mol/L}$ was the optimal concentration. Compared with the NC group, the apoptosis rate of H9C2 cells in the hypoxia group was significantly increased, while the expression of miR-290-5p and the PI3K pathway activity were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the hypoxia group, the apoptosis rate of H9C2 cells in the MID + hypoxia group was significantly reduced, and the expression of miR-290-5p and the activity of the PI3K pathway were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the MID + hypoxia group, the survival rate of H9C2 cells in the miR-290-5p + hypoxia group was significantly increased, and the apoptosis rate was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the anti-miR-NC + MID + hypoxia group, the survival rate of H9C2 cells in the anti-miR-290-5p + MID + hypoxia group was significantly reduced, the apoptosis rate was significantly increased, and PI3K pathway activity was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusions** Midazolam protected hypoxia-induced cardiomyocyte damage by upregulating miR-290-5p to activate PI3K/AKT signaling pathway.

【Keywords】 midazolam; cardiomyocyte injury; miR-290-5p; PI3K/AKT signaling pathway

大量研究证实,缺氧是心肌缺血的潜在致病因素,急性或持续性缺氧可引起心肌细胞凋亡,造成心肌细胞损伤,从而导致心肌梗死发生^[1]。目前,保护缺氧诱导的心肌细胞损伤被认为是一种潜在的心肌梗死治疗策略^[2]。咪唑安定(midazolam, MID)别名咪达唑仑、速眠安,具有典型的苯二氮䓬类药活性。长期以来,MID被认为是一种快速短效的镇静药,广泛应用于临床麻醉术前给药、重症监护室镇静、诊断检查操作、新生儿难治性癫痫控制等多个领域^[3-4]。资料显示,MID可减轻缺氧复氧引起的心肌细胞凋亡,且舒芬太尼预处理联合MID后处理可明显减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤^[5-6]。然而,MID对缺氧诱导心肌细胞损伤的保护作用机制并不明确。miR-290-5p是近年来发现的微小RNA,研究显示在脓毒症诱导的肾损伤中miR-290-5p表达下调,异丙酚通过上调miR-290-5p减轻脓毒症引起的肾损伤^[7]。然而,miR-290-5p在心肌细胞缺氧损伤中的作用、MID是否通过调控miR-290-5p表达发挥保护作用尚不清楚。因此,本研究通过观察MID对缺氧条件下心肌细胞存活、凋亡以及miR-290-5p表达的影响,初步揭示其保护作用机制,以期MID用于预防缺氧诱导的心肌细胞损伤奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

大鼠心肌细胞H9C2购自中田科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素混合液购于武汉普诺赛生命科技有限公司;咪唑安定(批号:20111005)购于徐州恩华药业集团有限责任公司;

细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit 8, CCK-8)购于北京百奥莱博科技有限公司;膜联蛋白V异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购于大连宝生物工程公司;miR-290-5p模拟物(miR-290-5p mimics)及其阴性对照(miR-NC)、miR-290-5p抑制物(anti-miR-290-5p)及其阴性对照(anti-miR-NC)、PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司提供;兔源细胞周期素D1(cyclinD1)抗体、兔源活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved caspase 3, C-caspase-3)抗体、兔源 β -肌动蛋白(β -actin)、兔源磷酸化的磷脂酰肌醇-3-羟激酶(p-PI3K)抗体和兔源磷酸化的蛋白激酶B(p-AKT)抗体购于美国CST公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和模型构建

H9C2细胞采用DMEM培养基(含10%胎牛血清和1%青链霉素溶液)培养,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 缺氧培养箱(含1% O_2 、5% CO_2 、94% N_2)内培养48 h构建心肌细胞缺氧损伤模型^[8]。

1.3.2 MID对缺氧诱导的心肌细胞存活、凋亡以及miR-290-5p表达的影响

(1) CCK-8法检测细胞存活

将H9C2细胞(每孔 5×10^3 cells)接种到96孔板并分为正常(NC)组、缺氧(hypoxia)组、MID + hypoxia组(分别采用终浓度为8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的MID处理心肌细胞后进行缺氧处理)。各组细胞进行相应处理后,每孔加入10 μL 的CCK-8试剂,培养箱孵育4 h,酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值。确定用药浓度为16 $\mu\text{mol/L}$ 。

(2) 流式细胞术检测细胞凋亡

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 采用结合缓冲液调整为单细胞悬液。取 100 μ L 细胞悬液(1×10^5 cells/mL) 加入流式管, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书检测细胞凋亡情况。

(3) RT-qPCR 检测 miR-290-5p 的表达水平

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA, 随后进行逆转录反应和 RT-qPCR 反应。miR-290-5p 的表达以 U6 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其表达水平。引物序列如下(5' - 3') : miR-290-5p 上游引物: GCTGGGTTTCACGGGGTATCAA, 下游引物: TCAACTGAGTCCCGTAGGGTCCG; U6 上游引物: CTCGCTTCGGCAGCACATATACT, 下游引物: ACGC TTCACGAATTTGCGTGTC。

(4) Western blot 检测 Cleaved-caspase-3 的表达水平

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, 采用 RIPA 裂解液获得各组细胞蛋白。将细胞蛋白与适量上样缓冲液混合煮沸变性后, 取适量样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。随后利用湿法转膜装置将分离的细胞蛋白转移至硝酸纤维素膜。5% 的脱脂牛奶封闭膜后, 采用 PBS 液洗膜 3 次, 将膜置于稀释的一抗溶液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 液洗膜 3 次, 将膜置于稀释的二抗溶液中室温孵育 1 h, PBS 液洗膜 3 次, 进行化学发光显色。以目标蛋白与内参 β -actin 蛋白灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。

1.3.3 过表达 miR-290-5p 对心肌细胞存活和凋亡的影响

将 H9C2 细胞分为 miR-NC+hypoxia 组(转染 miR-NC 48 h 后进行缺氧诱导)、miR-290-5p+hypoxia 组(转染 miR-290-5p mimics 48 h 后进行缺氧诱导)。按照上述步骤检测各组细胞的存活、凋亡以及 CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达情况。

1.3.4 MID 调控 miR-290-5p 表达对缺氧诱导心肌细胞损伤的影响

将 H9C2 细胞分为 anti-miR-NC+MID+hypoxia 组(转染 anti-miR-NC 48 h 后, 进行 MID 干预和缺氧处理)、anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组(转染 anti-miR-290-5p 48 h 后, 进行 MID 干预和缺氧处理), 按照上述步骤检测各组细胞的存活、凋亡以及

CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达情况。

1.3.5 MID 调控 miR-290-5p 表达对缺氧诱导心肌细胞损伤 PI3K/AKT 信号通路的影响

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组、anti-miR-NC+MID+hypoxia 组、anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, 按照上述 Western blot 步骤检测各组细胞 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平。

1.4 统计学方法

各组数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有统计分析均采用 SPSS 20.0 进行。两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 采用 SNK-*q* 检验进行进一步组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖的影响

CCK-8 实验结果表明, 见表 1, 与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞存活率显著降低; 与 hypoxia 组比较, 8 μ mol/L MID+hypoxia 组、16 μ mol/L MID+hypoxia 组、32 μ mol/L MID+hypoxia 组细胞存活率显著升高($P < 0.05$)。随着 MID 浓度增加, H9C2 细胞存活率呈先升高再降低趋势, 选择 16 μ mol/L 的 MID 进行后续实验。

2.2 MID 对心肌细胞 H9C2 凋亡的影响

流式细胞术和 Western blot 实验结果表明, 见图 1 和表 2, 与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞凋亡率、Cleaved-caspase-3 蛋白表达显著升高; 与 hypoxia 组比较, MID+hypoxia 组细胞凋亡率、Cleaved-

表 1 不同浓度 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different concentrations of MID on the proliferation of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	细胞存活率(%) Cell survival rate
对照 NC	100.86 \pm 10.09
缺氧 Hypoxia	42.53 \pm 4.26*
8 μ mol/L 咪唑安定+缺氧	52.25 \pm 5.22#
8 μ mol/L MID+hypoxia	
16 μ mol/L 咪唑安定+缺氧	73.11 \pm 7.31#
16 μ mol/L MID+hypoxia	
32 μ mol/L 咪唑安定+缺氧	70.46 \pm 7.05#
32 μ mol/L MID+hypoxi	
<i>F</i>	30.088
<i>P</i>	0.000

注: 与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, # $P < 0.05$.

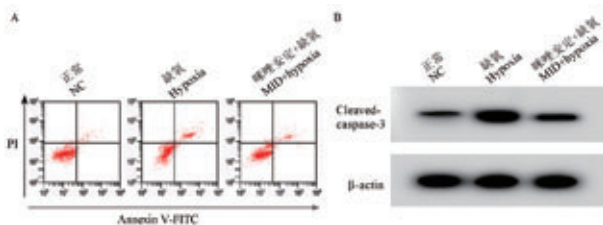
caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 MID 对 miR-290-5p 表达的影响

RT-qPCR 实验结果表明,见表 3,与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞 miR-290-5p 的表达显著降低;与 hypoxia 组比较, MID+hypoxia 组 H9C2 细胞中 miR-290-5p 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。

2.4 高表达 miR-290-5p 对心肌细胞 H9C2 增殖、凋亡的影响

结果见表 4 和图 2,与 miR-NC+hypoxia 组比较, miR-290-5p+hypoxia 组 H9C2 细胞 miR-290-5p 和 CyclinD1 蛋白的表达水平、细胞存活率显著升高, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平和细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。



注:A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Western blot 检测 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达。

图 1 MID 对心肌细胞 H9C2 凋亡的影响

Note. A, Flow cytometry to detect apoptosis. B, Western blot detection of Cleaved-caspase-3 protein expression.

Figure 1 Effect of MID on apoptosis of cardiomyocyte H9C2

表 2 MID 对心肌细胞 H9C2 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of MID on apoptosis of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	Cleaved-caspase-3	凋亡率 (%) Apoptosis rate
NC 对照	0.30±0.03	6.99±0.70
Hypoxia 缺氧	0.92±0.09*	20.35±2.04*
咪唑安定缺氧 MID+hypoxia	0.45±0.05#	10.38±1.04#
<i>F</i>	81.887	75.712
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, # $P < 0.05$.

表 4 高表达 miR-290-5p 对心肌细胞 H9C2 增殖、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of high expression of miR-290-5p on proliferation and apoptosis of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	miR-290-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率 (%) Cell survival rate	凋亡率 (%) Apoptosis rate
空载体+缺氧 miR-NC+hypoxia	1.00±0.11	0.40±0.04	0.90±0.09	43.02±4.31	20.88±2.09
miR-290-5p+缺氧 miR-290-5p+hypoxia	2.36±0.24*	1.02±0.10*	0.42±0.04*	90.21±9.02*	9.69±0.97*
<i>t</i>	8.922	9.971	8.441	8.176	8.412
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$.

2.5 低表达 miR-290-5p 可以部分逆转 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖和凋亡的影响

见图 3 和表 5,与 anti-miR-NC+MID+hypoxia 组比较, anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组 H9C2 细胞 miR-290-5p 和 CyclinD1 蛋白的表达水平、细胞存活率显著降低, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平和细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

2.6 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达

见图 4 和表 6,与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著降低;与 hypoxia 组比较, MID+hypoxia 组 H9C2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著升高;与 anti-miR-NC+MID+hypoxia 组比较, anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组 H9C2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

缺氧是心肌梗死的主要危险之一。缺氧状态下,心肌细胞线粒体功能异常,能量代谢紊乱,同时引起大量的生理和病理反应,引起心肌细胞损伤和凋亡^[9]。因此,如何减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤和凋亡对防治心肌梗死具有重要意义。

表 3 MID 对 miR-290-5p 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of MID on miR-290-5p expression

组别 Groups	miR-290-5p
NC 对照	1.00±0.12
Hypoxia 缺氧	0.35±0.04*
咪唑安定+缺氧 MID+hypoxia	0.86±0.09#
<i>F</i>	43.705
<i>P</i>	0.000

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, # $P < 0.05$.

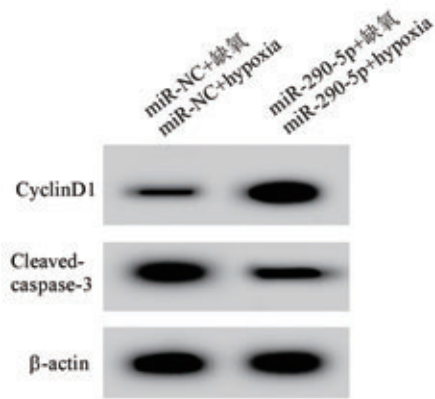


图 2 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达

Figure 2 Western blot detects expression of CyclinD1, Cleaved-caspase-3 protein

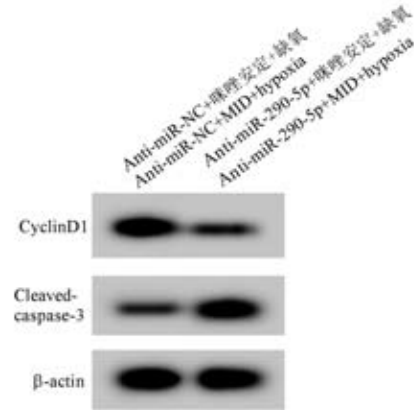


图 3 低表达 miR-290-5p 可以部分逆转 MID 对 H9C2 心肌细胞 CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白表达的影响

Figure 3 Low expression of miR-290-5p can partially reverse the effect of MID on the expression of CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 in cardiomyocytes H9C2

表 5 低表达 miR-290-5p 可以部分逆转 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖、凋亡的影响 (x̄ ± s, n = 3)

Table 5 Low expression of miR-290-5p can partially reverse the effect of MID on the proliferation and apoptosis of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	miR-290-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率 (%) Cell survival rate	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
空载体+咪唑安定+缺氧 anti-miR-NC+MID+hypoxia	1.00±0.11	0.88±0.09	0.42±0.04	72.69±7.27	10.66±1.07
anti-miR-290-5p+咪唑安定+缺氧 anti-miR-290-5p+MID+hypoxia	0.33±0.04*	0.45±0.05*	0.80±0.08*	50.36±5.04*	17.89±1.79*
<i>t</i>	9.915	7.234	7.359	4.372	6.005
<i>P</i>	0.001	0.002	0.002	0.012	0.004

注:与 anti-miR-NC+MID+hypoxia 比较, * *P* < 0.05。
Note. Compared with anti-miR-NC + MID + hypoxia, * *P* < 0.05.

表 6 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达 (x̄ ± s, n = 3)

Table 6 Expression of PI3K/AKT signaling pathway related proteins

组别 Groups	p-PI3K	p-AKT
对照 NC	0.70±0.07	0.62±0.06
缺氧 Hypoxia	0.32±0.03*	0.20±0.02*
咪唑安定+缺氧 MID+hypoxia	0.62±0.06 [#]	0.50±0.05 [#]
空载体+咪唑安定+缺氧 Anti-miR-NC+MID+hypoxia	0.60±0.07	0.52±0.06
Anti-miR-290-5p+咪唑安定+缺氧 Anti-miR-290-5p+MID+hypoxia	0.40±0.04 ^{&}	0.33±0.03 ^{&}
<i>F</i>	24.264	38.155
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 NC 比较, * *P* < 0.05; 与 hypoxia 比较, [#]*P* < 0.05; 与 anti-miR-NC + hypoxia+MID 比较, [&]*P* < 0.05。
Note. Compared with NC, * *P* < 0.05. Compared with hypoxia, [#]*P* < 0.05. Compared with anti-miR-NC + hypoxia + MID, [&]*P* < 0.05.

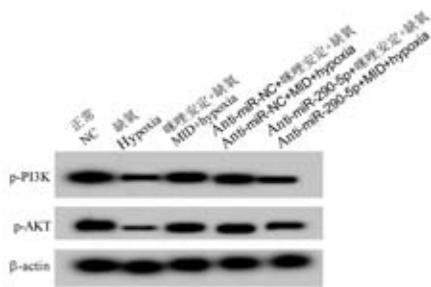


图 4 Western blot 检测 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达

Figure 4 Western blot detects p-PI3K, p-AKT protein expression

长期以来, MID 被认为对心肌细胞损伤具有保护作用。刘保江等^[10]研究发现 MID 预处理可改善心脏收缩和舒张功能,减轻再灌注心律失常发生频率,提高心肌细胞抗氧化能力,降低脂质过氧化反应,减轻心肌细胞损伤程度。覃军等^[11]指出 MID 缺氧前预处理可明显增高心肌组织及血浆中血管

内皮生长因子的表达量,对改善缺血心肌功能具有积极作用。本研究发现缺氧诱导后心肌细胞存活率显著降低,细胞凋亡率和促凋亡蛋白表达水平均

显著升高,说明缺氧诱导的心肌细胞损伤模型建立成功。进一步研究发现一定浓度的 MID 预处理可改善缺氧诱导对心肌细胞的存活抑制作用,并减轻缺氧诱导的心肌细胞凋亡,与前人研究结论相吻合^[5, 10-11]。以上研究说明, MID 预处理通过抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡,提高心肌细胞存活率,对缺氧诱导的心肌细胞损伤发挥保护作用。

miR-290-5p 是 miR-290-295 簇的成员之一,研究显示 miR-290-295 在小鼠胚胎干细胞中具有潜在的促生存功能,其表达缺失可导致小鼠部分胚胎致死和生殖细胞缺陷^[12]。此外, miR-290-295 簇还可促进细胞 G1 期向 S 转换,加速细胞增殖,在防止小鼠胚胎干细胞凋亡中发挥保护作用^[13]。然而, miR-290-5p 在缺氧诱导的心肌细胞损伤中的作用尚未可知。本研究显示缺氧诱导后心肌细胞 miR-290-5p 的表达显著降低,而咪唑安定预处理可提高缺氧诱导下心肌细胞 miR-290-5p 表达水平。进一步功能分析显示,过表达 miR-290-5p 可提高缺氧诱导下心肌细胞存活率,降低缺氧诱导的心肌细胞凋亡,并升高促增殖蛋白 CyclinD1、降低促凋亡蛋白 Cleaved-caspase-3 的表达水平,与 MID 预处理对缺氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用相同。此外,本研究发现抑制 miR-290-5p 表达还可部分逆转 MID 对缺氧诱导的心肌细胞和存活抑制的影响。以上研究说明上调 miR-290-5p 是 MID 对缺氧诱导的心肌细胞损伤发挥保护作用的重要机制。

PI3K/AKT 信号通路的激活在缺氧缺血损伤后心脏保护中起着关键作用^[14-15]。研究发现, miR-181c、miR-335 等多种 miRNA 通过调控 PI3K/AKT 信号通路改善心肌缺血复氧损伤^[16-17]。本研究显示 MID 预处理可减轻缺氧诱导对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用,而抑制 miR-290-5p 表达则部分逆转 MID 对缺氧诱导的心肌细胞 PI3K/AKT 信号通路活化的影响。提示 MID 通过上调 miR-290-5p 激活 PI3K/AKT 信号通路进而对缺氧诱导的心肌细胞损伤具有保护作用。

综上所述,本研究证实 MID 通过上调 miR-290-5p 可减轻缺氧诱导的心肌细胞凋亡,促进心肌细胞存活,对缺氧诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,其机制与激活 PI3K/AKT 信号通路有关,这为 MID 在临床预防缺氧诱导的心肌细胞损伤中应用奠定理论基础。

参考文献:

[1] Lu L, Liu M, Sun R, et al. Myocardial infarction symptoms and

- treatments [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(3) : 865-867.
- [2] Guo ZX, Zhou FZ, Song W, et al. Suppression of microRNA-101 attenuates hypoxia-induced myocardial H9C2 cell injury by targeting DIMT1-Sp1/survivin pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(20) : 6965-6976.
- [3] Dao K, Giannoni E, Diezi M, et al. Midazolam as a first-line treatment for neonatal seizures: Retrospective study [J]. *Pediatr Int*, 2018, 60(5) : 498-500.
- [4] 延柏文. 探讨小剂量咪唑安定辅助腰硬联合麻醉在妇科腹腔镜手术中的可行性 [J]. *临床医学研究与实践*, 2018, 3(3) : 58-59.
- [5] 刁玉刚, 祖剑宇, 刘海梅, 等. 咪唑安定对缺氧复氧损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(4) : 410-411, 417.
- [6] 巩固, 陈亮, 代雪梅, 等. 舒芬太尼预处理联合咪唑安定后处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(10) : 995-1000.
- [7] Zheng G, Qu H, Li F, et al. Propofol attenuates sepsis-induced acute kidney injury by regulating miR-290-5p/CCL-2 signaling pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(11) : e7655.
- [8] 舒璇, 戴波, 肖定璋, 等. 过表达 miR-29b1 在缺氧诱导的心肌细胞凋亡中的作用 [J]. *广州医科大学学报*, 2018, 46(3) : 1-5.
- [9] Guo ZX, Zhou FZ, Song W, et al. Suppression of microRNA-101 attenuates hypoxia-induced myocardial H9C2 cell injury by targeting DIMT1-Sp1/survivin pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(20) : 6965-6976.
- [10] 刘保江, 郭志佳. 麻醉药物对心肌缺血再灌注损伤的保护研究进展 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2008, 29(2) : 189-192.
- [11] 覃军, 周美容, 徐道妙, 等. 咪唑安定预处理对急性缺氧大鼠心肌细胞血管内皮生长因子的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2010, 27(2) : 200-202.
- [12] Zheng GX, Ravi A, Calabrese JM, et al. A latent pro-survival function for the mir-290-295 cluster in mouse embryonic stem cells [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(5) : e1002054.
- [13] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12) : 1478-1483.
- [14] Jiang YQ, Chang GL, Wang Y, et al. Geniposide prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9C2 cells: Improvement of mitochondrial dysfunction and activation of GLP-1R and the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1) : 407-421.
- [15] Qin L, Fan S, Jia R, et al. Ginsenoside Rg1 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced injury through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(6) : 349-355.
- [16] Li X, Zhong J, Zeng Z, et al. miR-181c protects cardiomyocyte injury by preventing cell apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(4) : 849-858.
- [17] Wu N, Zhang X, Bao Y, et al. Down-regulation of GAS5 ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury via the miR-335/ROCK1/AKT/GSK-3 β axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12) : 8420-8431.

[收稿日期] 2020-03-27

李泳兴,钟鸣,王勇,等. 常用哮喘动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 97-101.

Li YX, Zhong M, Wang Y, et al. Establishment of common animal models of asthma [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 97-101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.016

常用哮喘动物模型的建立

李泳兴,钟 鸣,王 勇,马武华*

(广州中医药大学第一附属医院麻醉科,广州 510405)

【摘要】 哮喘是一种常见的慢性呼吸系统炎症性疾病。与哮喘相关的病理生理学或者新药物试验需要建立相对应的哮喘动物模型。然而,到目前为止还没有一个理想的模型能够代表人类哮喘这种复杂疾病的所有特征。因此,本综述提供了目前用来制作哮喘模型的常用动物的特点、不同的造模方法和所选试剂以及造模所需的时间,有助于研究者根据研究设计选择合适的动物、方法和试剂。

【关键词】 哮喘;动物模型;造模时间

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0097-05

Establishment of common animal models of asthma

LI Yongxing, ZHONG Ming, WANG Yong, MA Wuhua*

(Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

【Abstract】 Asthma is a common chronic respiratory inflammatory disease. Additional asthma-related pathophysiology research and new drug trials are needed. This would be greatly expedited using corresponding animal asthma models. However, to date, there is no ideal model that can represent all the characteristics of the complex disease of human asthma. Therefore, this review provides the characteristics of commonly used animals currently used to make asthma models, different modeling method, different selected reagents, and the time required for modeling, which should help researchers in choosing appropriate animals, methods and allergens.

【Keywords】 asthma; animal model; modeling time

哮喘是一种以气道炎症、气道高反应和气道重塑为主要特征的慢性呼吸系统疾病。已有大量研究证明了各种动物模型可以反映人类哮喘反应的各个具体方面。一个理想的动物模型应该尽量能体现人类哮喘病理生理的主要方面,包括 IgE 介导的抗原敏感性、急性支气管收缩、气道阻力增加、气道慢性炎症、辅助型 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2) 细胞因子产生、嗜酸性粒细胞增多、晚期气道阻塞、

粘液分泌增强、粘液纤毛清除率降低、气道壁重塑与平滑肌增生^[1-2]。哮喘动物模型的建立是研究哮喘发病机制和发展的基础。不同动物哮喘模型种类繁多,研究方法也多种多样。哮喘动物模型是了解疾病病理生理学和测试潜在药物治疗的实用工具。当选择了合适的动物种类和疾病的诱导方法时,这些模型的结果可以应用于哮喘患者。本文综述了建立哮喘动物模型时不同动物的特点、使用的

【基金项目】 国家自然科学基金(81704167,81673922,81503663)。

【作者简介】 李泳兴(1993—),男,硕士研究生,研究方向:针刺治疗哮喘的机制。E-mail:13729053630@163.com

【通信作者】 马武华(1967—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:针刺治疗哮喘的机制。E-mail:gzmwh@aliyun.com

试剂及造模时间的研究进展,以期帮助研究者根据研究设计选用合适的动物、试剂和合适的实验周期。

1 常用哮喘动物模型的特点

哮喘主要是一种人类疾病,动物中只有猫和马才能自发地产生类似的疾病^[3]。大约只有 1% 的猫和特定喂养下的马能产生类似于过敏性哮喘的过敏性气道反应,但在实验室环境中很难复制出理想动物哮喘模型,而且这两种动物模型不容易用于探索疾病机制或测试新疗法。鉴于自发性哮喘动物模型的限制,因此实验室常用造模方法主要采取特定试剂诱导产生人类哮喘模型,常用动物哮喘模型主要包括小鼠、大鼠、豚鼠、兔等,狗、羊和灵长类动物由于价格昂贵等原因较为少用。

1.1 小鼠

小鼠由于其遗传背景明确、品系多、价格便宜以及容易诱发出气道高反应性,产生气道炎症以及黏液增多等症状。因此是最常使用的哮喘模型。常用品系包括 BALB/c、C57BL/6 和 KM 小鼠^[4-5]等。其中由于 BALB/c 小鼠比其他小鼠造模成功率高而最常使用^[6-8],但近年来由于基因敲除技术的发展,C57BL/6 敲基因小鼠也越来越多地用于哮喘相关研究^[9-10]。目前普遍采用的标准模型是由卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱发。OVA 诱发的小鼠模型完全由 Th2 型嗜酸性粒细胞驱动,并主要为 Th2 高表达^[3]。小鼠的气道和肺与人类有许多解剖和生理上的差异。小鼠的远端气道是非肺泡化支气管,而在人类中它是呼吸性支气管。此外,细胞的类型和位置可能有所不同。例如,基底细胞存在于人的气管支气管内,但仅存在于小鼠的气管中。另外小鼠气道平滑肌明显较少,对影响支气管张力的药物不易作出反应。小鼠模型的一个主要缺点是在致敏后缺乏对过敏原的慢性反应,在建立慢性哮喘模型时成功率较低。

1.2 大鼠

大鼠也是实验室常用的哮喘模型^[11]。它们相对便宜,与小鼠相似,具有来源广,价格低廉,易繁殖和饲养等特点,因此大鼠也是一种常用的哮喘动物模型。麻醉后的大鼠由于其体积大和稳定性高,有利于在吸入过敏原发生急性哮喘后各种生理指标的测量^[12]。另外,因其体积大,麻醉后操作或取材等相对容易,而且实验中各项指标的检测相对误差小。因此,大鼠模型在支气管哮喘和其他肺部疾病的研究中仍具有重要作用。在新药的药物研究中,大鼠模型仍然是必不可少的。与其他物种相

比,大鼠具有特有的支气管循环的解剖学特征,以及在遗传学、蛋白质组学、肺功能及价格等方面它具有更多优势^[13]。目前常用品系大多选择 SD、Wistar 或 Brown-Norway 大鼠作为实验对象^[14-15]。

1.3 豚鼠

豚鼠是最古老的过敏性气道高反应动物模型之一。豚鼠容易被致敏,发生哮喘的生理、气道解剖和对炎症介质的反应等与人类更相似,可产生 IgE 依赖性的哮喘模型^[16],因此是最早选用的哮喘动物模型。与啮齿动物哮喘模型相比,豚鼠对 OVA 较敏感,并且很容易产生类似哮喘症状和气道阻力增加反应。豚鼠非常适合用作研究化学刺激因子过敏反应的模型。豚鼠也经常用作药物治疗的筛选模型,可用于开发 β 受体激动剂和皮质类固醇等药物^[12]。

1.4 家兔

家兔是研究哮喘肺生理和病理生理的有效模型。与老鼠等较小的物种相比,其独特的优势在于家兔可用于自身对照来研究慢性哮喘。此外,家兔从出生到成年都表现出对过敏原的敏感性,为研究过敏性疾病的危险因素提供了条件。由于兔模型与人类哮喘的相似性,因此为研究新型哮喘治疗药物的疗效提供了理想的依据^[1]。

2 常用哮喘动物的造模时间

2.1 BALB/c 小鼠

BALB/c 小鼠哮喘造模时间多种多样,最常使用的是 23 d OVA 造模法^[17],5~6 周龄大的小鼠,以混合 1% 氢氧化铝($Al(OH)_3$)的 OVA 第 1 天和第 14 天腹腔注射诱发致敏。在第 21、22 和 23 天,以 1 mg/mL 浓度的 OVA 的滴鼻激发。高琴琴等^[18]采用第 1、8、15 天腹腔注射致敏,第 22~28 天雾化激发的方法对 BALB/c 小鼠造模,总用时 28 d,也可成功造模。Debeuf 等^[19]采用 OVA+ $Al(OH)_3$ 16 d 造模法,第 1 天和第 7 天腹腔注射 OVA 致敏,第 14~16 天吸入 1% 的 OVA 激发,总用时短,肺组织切片和气道阻力等检测显示也可成功造模。

同时,Debeuf 等^[19]也采用屋尘螨(house dust mite, HDM) 14 d 造模法,第 1 天在 BALB/c 小鼠气管内吸入 1 μ g 的 HDM 致敏,第 6~10 天鼻腔滴注 10 μ g HDM 溶液激发,第 14 天处死小鼠取材,此方法用时最短。或者小鼠在第 1、3 和 5 天每天接受 30 μ L 的 HDM 致敏,在第 12、13 和 14 天接受激发,也可成功造模。

Bao 等^[20]使用 HDM 总共 41 d 制作哮喘复发模型,在第 0、7 和 14 天,雄性 BALB/c 小鼠腹腔注射 50 mg HDM(0.5 mg/mL)致敏,第 21~23 天经鼻腔滴入 25 mg HDM(2.5 mg/mL)激发,并在在第 38~40 天滴入 25 mg HDM(2.5 mg/mL)进行再次激发,即哮喘复发模型。

2.2 C57BL/6 小鼠

C57BL/6 小鼠哮喘模型制作时间与 BALB/c 小鼠差别不大,但造模试剂稍有不同,除了 OVA 以外^[9],直径小于 2.5 μm 的细颗粒物(particulate matter $\leq 2.5 \mu\text{m}$, PM2.5)和蟑螂过敏原等也常用于哮喘的造模。Zheng 等^[21]在第 0 天和第 14 天腹腔注射 0.2 mL 0.4% OVA 致敏,然后在第 17 天和第 20 天吸入 PM2.5(3 mg/mL)再次致敏,在第 21 天~28 天进行雾化吸入 2% 的 OVA 溶液激发。Li 等^[5]联合使用蟑螂过敏原和 PM2.5,可以把造模时间缩短到 14 d。

2.3 大鼠

Dong 等^[22]使用 Wistar 大鼠 21 d 造模方法,在第 0、7 和 14 天用 1 mg OVA+20 mg Al(OH)₃ 腹腔注射致敏。第 21 天气管内滴注 1.1% OVA 于 200 μL 生理盐水激发,即可成功造模。

2.4 豚鼠

豚鼠可建立急性和慢性哮喘模型,急性哮喘模型建立总天数为 15 d,慢性模型建立总天数为 29 d。豚鼠先在第 1 天和第 5 天腹腔注射 OVA+Al(OH)₃ 致敏,然后急性哮喘模型在第 15 天吸入 1 h 0.01% OVA 激发,慢性哮喘模型在第 17~29 天每隔 48 h 先腹腔注射 mepyramine 30 mg/kg 然后吸入 0.1% OVA,均可成功建立哮喘模型^[23]。

2.5 家兔

家兔常用于造慢性哮喘模型,在新生兔出生后 24 h 内,将可溶性牛血清白蛋白(BSA)与小棒状杆菌佐剂一起注射给新生兔。接下来的两周每周注射一次,接下来的两个月每两周注射一次,总共造模时间为两个月^[1]。

3 造模试剂

3.1 卵清蛋白(ovalbumin, OVA)

最常使用的过敏原为卵清蛋白,来源于蛋清,价格便宜,有很强的免疫原性,是一种良好的过敏原^[24-25]。国内外研究的致敏剂量多选用 20、50、100 μg 浓度的 OVA 进行致敏^[7,26]。杨素明、高琴琴等^[4,18]研究认为剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时效果最佳。三种剂量 OVA 诱发的哮喘模型均获成功,但综合而

言 50 μg OVA 所诱发的 BALB/c 小鼠哮喘模型血清 IgE、IL-4、IFN- γ 含量以及肺组织病理改变更为明显。OVA 不仅对造模小鼠产生影响,还可对致敏后的小鼠下一代产生持续影响^[27]。

OVA 常与 Al(OH)₃ 联合用于小鼠哮喘造模^[28],Al(OH)₃ 作为佐剂能够提高免疫系统抗原特异性 Th2 的免疫应答反应。因此急性哮喘致敏时通常需要多次给予加入佐剂的过敏原。Al(OH)₃ 是动物接触抗原后产生 Th2 免疫反应的最佳选择之一^[12]。

3.2 屋尘螨(house dust mite, HDM)

HDM 是一种与人类相关的无处不在的过敏原,是人类和动物过敏性哮喘的最常见诱因之一^[29-30]。HDM 代谢产生的蛋白质,如粉尘螨蛋白酶(Derf)1 起到过敏原的作用。此外,HDM 含有内毒素的革兰氏阴性细菌,在自然肠道菌群中内毒素会引起强烈的炎症反应,被认为是一种佐剂^[31]。黄超文等^[32]研究发现 HDM 和 OVA 所诱导的哮喘小鼠产生的气道炎症以及肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞为主,气道平滑肌增生明显,Th2 炎症因子表达增高。

3.3 血小板活性因子(platelet activating factor, PAF)

血小板活性因子(PAF)是一种脂质介体,参与多种过敏反应。它从多种免疫细胞(如嗜酸性粒细胞,嗜中性粒细胞和肥大细胞)释放,并且在特异性结合其受体后也对大多数细胞产生作用,成为多效介体。在炎症介质中只有 PAF 可引起气道高反应。PAF 由于其独有的特性,在激发豚鼠哮喘发作时可直接激发出气道高反应而不需要致敏过程,它可引发支气管收缩、嗜酸性粒细胞和分泌物增加以及气道微血管渗漏等变化^[33]。

3.4 交链孢霉

交链孢霉是真菌来源的过敏原,它在真菌类的过敏原中比例最高,它由于破坏气道上皮屏障功能而使哮喘患者的病情加重。在动物实验中,交链孢霉可引起小鼠气道阻力增加、顺应性降低、血清总 IGE 水平明显升高、BALF 中 IL-4 水平明显升高以及 IFN- γ 水平明显下降^[34]。

3.5 臭氧 O₃

臭氧(O₃)可用于哮喘小鼠激发过程中,雌性 BALB/c 小鼠在第 23、25 和 27 天 OVA 激发 30 min 后再暴露于 1.0 ppm O₃ 3 h。OVA 激发过程中的 O₃ 暴露促进了哮喘的恶化。p38 MAPK 和氧化应激在臭氧加剧哮喘过程中起着关键作用,同时抑制这两

条途径可显著降低 O₃ 对哮喘发作的不利影响^[35]。

3.6 呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)

呼吸道病毒感染与哮喘恶化密切相关。但是大多数人类呼吸道病毒不是小鼠的天然病原体,因此需要大剂量地接种,但 RSV 导致的小鼠模型在病理学、免疫学和疫苗生物学等机制研究中有其独特的优势^[36]。

在过敏性哮喘中,RSV 作为引发感染的诱因,暴露于高水平的致敏过敏原可能会导致病情恶化。慢性哮喘模型中,接种大剂量的呼吸道合胞病毒确实会引起过度的炎症反应,并增强中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的聚集^[37]。李海霞等^[38]研究发现 RSA 联合 OVA 可诱发幼年大鼠哮喘发生,肺泡灌洗液中白细胞计数明显升高,以嗜酸性粒细胞为主,肺组织病理显示支气管结构紊乱,支气管壁增厚,炎性细胞浸润。袁丽粉等^[39]通过 OVA 致敏并予以 RSV 激发建立哮喘小鼠模型研究发现:与单独 OVA 激发相比,加入 RSV 后在动物模型中的病理过程与患者更相似、气道炎症及气道高反应更为明显、病理切片中肺组织损伤加重,而且造模成功率,方法简单容易操作。

3.7 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)

在哮喘模型中,小鼠经 LPS 致敏后,肺组织中内质网应激标志物的表达水平显著增加^[40]。Liu 等^[11]通过腹腔注射 LPS 和吸入 OVA 激发建立哮喘大鼠模型。LPS 常与 OVA 联用作为哮喘造模的致敏或激发,可提高造模成功率。

3.8 直径小于 2.5 μm 的细颗粒物 (particulate matter ≤2.5 μm, PM2.5)

近年来,越来越多文献常用 PM2.5 对 C57BL/6 小鼠进行造模,PM2.5 可通过抑制调节性 T 细胞 (Regulatory T cells, Treg) 的分化和促进辅助型 T 细胞 17 (T helper 17 cell, Th17) 的分化从而干扰 Th17/Treg 的平衡加重小鼠的哮喘^[5]。另外,PM2.5 还可导致小鼠肺嗜酸性粒细胞增多,加重过敏性哮喘和炎症性肺病^[21]。

4 结语

哮喘动物模型可以为哮喘的发病机制和治疗提供有价值的信息,建立合适哮喘动物模型是了解哮喘病理生理学和试验新疗法的必要前提。在设计哮喘动物模型时,重要的是要了解各种哮喘动物模型的特点、造模方法和独特表现,以及了解所选动物模型哪些方面的肺组织结构或功能与人类哮

喘相似。开发一个具有代表性的模型必须考虑到动物生物学知识、哮喘的诱导方法、模型评估的结果是否与人类哮喘特征相对应等。然而,到目前为止还没有一个理想的模型能够代表人类哮喘这种复杂疾病的所有特征。因此,本综述提供了目前用来制作哮喘模型的常用动物的特点、不同的造模方法及所选试剂以及造模所需的时间,有助于研究者根据研究设计选择合适的动物、方法和试剂,更有助于实验的顺利开展。

参考文献:

- [1] Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2008, 21(5): 721-730.
- [2] Ren X, Dong F, Zhuang Y, et al. Effect of neuromedin U on allergic airway inflammation in an asthma model [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(2): 809-816.
- [3] Mullane K, Williams M. Animal models of asthma: Reprise or reboot? [J]. *Biochemical Pharmacol*, 2014, 87(1): 131-139.
- [4] 杨素明, 张帷政, 周旸哲, 等. 不同浓度 OVA 溶液对小鼠 OVA 致敏性支气管哮喘模型的影响 [J]. *环球市场*, 2019(2): 198.
- [5] Li CS, Fu JR, Lin SH, et al. Particulate matter of 2.5 μm or less in diameter disturbs the balance of T17/regulatory T cells by targeting glutamate oxaloacetate transaminase 1 and hypoxia-inducible factor 1α in an asthma model [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(1): 402-414.
- [6] 赵新风, 曾本华, 谭毅, 等. 两品系小鼠食物过敏模型的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(3): 35-39.
- [7] Gregorczyk I, Maślanka T. Blockade of RANKL/RANK and NF-κB signalling pathways as novel therapeutic strategies for allergic asthma: A comparative study in a mouse model of allergic airway inflammation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 879: 173129.
- [8] Brandt EB, Bolcas PE, Ruff BP, et al. IL33 contributes to diesel pollution-mediated increase in experimental asthma severity [J]. *Allergy*, 2020, 75(9): 2254-2266.
- [9] Asayama K, Kobayashi T, D' Alessandro-Gabazza CN, et al. Protein S protects against allergic bronchial asthma by modulating Th1/Th2 balance [J]. *Allergy*, 2020, 75(9): 2267-2278.
- [10] Park SC, Kim H, Bak Y, et al. An alternative dendritic cell-induced murine model of asthma exhibiting a robust Th2/Th17-skewed response [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2020, 12(3): 537-555.
- [11] Liu J, Liu L, Sun J, et al. Icaritin protects hippocampal neurons from endoplasmic reticulum stress and NF-κB mediated apoptosis in fetal rat hippocampal neurons and asthma rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10: 1660.
- [12] Kianmehr M, Ghorani V, Boskabady MH. Animal model of asthma, various methods and measured parameters: A methodological review [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2016, 15(6): 445-465.

- [13] Tschernig T, Neumann D, Pich A, et al. Experimental bronchial asthma - the strength of the species rat [J]. *Curr Drug Targets*, 2008, 9(6): 466-469.
- [14] Eftekhar N, Moghimi A, Mohammadian Roshan N, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of hydro-ethanolic extract of *Ocimum basilicum* leaves and its effect on lung pathological changes in an ovalbumin-induced rat model of asthma [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 349.
- [15] 楚慧伦, 孔德明, 丁子桐, 等. Brown-Norway 大鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 63-66.
- [16] Bonvini SJ, Birrell MA, Dubuis E, et al. Novel airway smooth muscle-mast cell interactions and a role for the TRPV4-ATP axis in non-atopic asthma [J]. *Eur Respir J*, 2020, 56(1): 1901458.
- [17] Park HJ, Oh EY, Park YH, et al. Potential of serum soluble CD93 as a biomarker for asthma in an ovalbumin-induced asthma murine model [J]. *Biomarkers*, 2018, 23(5): 446-452.
- [18] 高琴琴, 丁子桐, 李友林, 等. 不同剂量卵蛋白诱发 BALB/c 小鼠支气管哮喘模型的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 52-57.
- [19] Debeuf N, Haspelslagh E, Helden M, et al. Mouse models of asthma [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2016, 6(2): 169-184.
- [20] Bao K, Yuan W, Zhou Y, et al. A Chinese prescription Yu-Ping-Feng-San administered in remission restores bronchial epithelial barrier to inhibit house dust mite-induced asthma recurrence [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10: 1698.
- [21] Zheng XY, Tong L, Shen D, et al. Airborne bacteria enriched PM2.5 enhances the inflammation in an allergic adolescent mouse model induced by ovalbumin [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 32-43.
- [22] Dong F, Wang C, Duan J, et al. Puerarin attenuates ovalbumin-induced lung inflammation and hemostatic unbalance in rat asthma model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 726740.
- [23] Evans RL, Nials AT, Knowles RG, et al. A comparison of antiasthma drugs between acute and chronic ovalbumin-challenged guinea-pig models of asthma [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(6): 453-464.
- [24] 费巧玲, 齐睿娟, 张小雨, 等. 经皮致敏小鼠肠道过敏模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 619-625.
- [25] Khumalo J, Kirstein F, Scibiorek M, et al. Therapeutic and prophylactic deletion of IL-4R α signaling ameliorates established ovalbumin-induced allergic asthma [J]. *Allergy*, 2020, 75(6): 1347-1360.
- [26] 湛孝东, 姜玉新, 李良怿, 等. 不同浓度卵蛋白变应原对小鼠哮喘模型建立的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(4): 16-20, 后插 4.
- [27] Zazara DE, Wegmann M, Giannou AD, et al. A prenatally disrupted airway epithelium orchestrates the fetal origin of asthma in mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2020, 145(6): 1641-1654.
- [28] 刘家齐, 赵正晓, 魏颖, 等. 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体的干预作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5): 460-464.
- [29] 王思齐, 包凯帆, 王晓钰, 等. 抗生素呼吸道给药加重小鼠过敏性哮喘模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 37-43.
- [30] Jia Z, Bao K, Wei P, et al. EGFR activation-induced decreases in claudin1 promote MUC5AC expression and exacerbate asthma in mice [J/OL]. *Mucosal Immunol*, (2020-03-04)[2020-03-13], doi:10.1038/s41385-020-0272-z.
- [31] Mack S, Shin J, Ahn Y, et al. Age-dependent pulmonary reactivity to house dust mite allergen; a model of adult-onset asthma? [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(5): L757-L763.
- [32] 黄超文, 赵强, 钟莲娣, 等. 三种哮喘小鼠动物模型的对比研究 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2019, 40(11): 1321-1323.
- [33] Muñoz-Cano RM, Casas-Saucedo R, Valero Santiago A, et al. Platelet-Activating Factor (PAF) in allergic rhinitis: Clinical and therapeutic implications [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(9): 1338.
- [34] 李杰, 王静茹, 陈浩, 等. 使用交链孢霉建立小鼠过敏性哮喘模型 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2017, 11(4): 344-350.
- [35] Bao A, Yang H, Ji J, et al. Involvements of p38 MAPK and oxidative stress in the ozone-induced enhancement of AHR and pulmonary inflammation in an allergic asthma model [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 212-216.
- [36] Han M, Rajput C, Ishikawa T, et al. Small animal models of respiratory viral infection related to asthma [J]. *Viruses*, 2018, 10(12): 682.
- [37] Mori H, Parker NS, Rodrigues D, et al. Differences in respiratory syncytial virus and influenza infection in a house-dust-mite-induced asthma mouse model: consequences for steroid sensitivity [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 125(12): 565-574.
- [38] 李海霞, 张勇华, 任晓丹, 等. 建立 RSV 联合 OVA 诱发幼年大鼠哮喘模型的方法 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(12): 1371-1373.
- [39] 袁丽粉, 乔建瓯, 王健. 建立小鼠哮喘模型两种不同方法的比较 [J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(8): 132-134, 138.
- [40] Kim SR, Kim DI, Kang MR, et al. Endoplasmic reticulum stress influences bronchial asthma pathogenesis by modulating nuclear factor kappa B activation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(6): 1397-1408.

周丽桂,张永斌,师长宏. 类器官模型在前列腺癌异质性研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 102-106, 127.
Zhou LG, Zhang YB, Shi CH. Application of an organoid model for prostate cancer heterogeneity research [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 102-106, 127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 11. 017

类器官模型在前列腺癌异质性研究中的应用

周丽桂^{1,2}, 张永斌^{1*}, 师长宏^{2*}

(1. 广州中医药大学实验动物中心, 广州 510000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 异质性是前列腺癌的主要临床特征, 不仅表现在不同患者之间肿瘤组织学特征差异, 还表现在同一患者不同肿瘤的细胞生长和转移速度的差异, 因此建立相应的个体化模型对前列腺癌临床治疗的研究具有重要作用。类器官模型, 可以准确地概括体内组织结构、功能和遗传特征, 较好体现临床组织的异质性, 将其应用于前列腺癌的研究具有独特的优势和应用前景。本文就前列腺癌类器官模型培养条件进行总结, 综述该模型在前列腺癌发病机制、药物筛选、个体化治疗以及耐药机制方面的应用, 以期前列腺癌的异质性研究提供良好的体外模型。

【关键词】 前列腺癌; 类器官模型; 异质性; 发病机制; 药物筛选; 个性化治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0102-05

Application of an organoid model for prostate cancer heterogeneity research

ZHOU Ligui^{1,2}, ZHANG Yongbin^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China. 2. Air Force Medical University, Xi'an 710000)

【Abstract】 Heterogeneity is the main clinical feature of prostate cancer and is manifest in the tumor histological characteristics between different patients as well as tumor cell growth and metastasis speed in the same patient. Thus, it is very important to establish corresponding individualized animal models to develop clinical treatments for prostate cancer. Patient-derived organoid (PDO) models accurately display the tissue structure, function, and genetic characteristics of prostate cancer *in vivo*, which reflect the heterogeneity of clinical tissues. PDO models have unique advantages when applied to prostate cancer research. We summarize the culture conditions of prostate cancer PDO models, and review the application of these *in vitro* models for research related to the pathogenesis, drug screening, individualized treatment, and drug resistance mechanisms of prostate cancer to provide a perfect model for heterogeneity research in prostate cancer.

【Keywords】 prostate cancer (PCa); organoid model; heterogeneity; pathogenesis; drug screening; individualized treatment

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是全球第二大最常见的男性癌症, 在 2018 年全球癌症统计^[1] 中报告了 127 万多新病例和将近 36 万死亡病例。高度异质性是其主要特征, 目前 PCa 临床上的常规治疗

方案仍然是雄激素剥夺疗法 (androgen deprivation therapy, ADT)。然而, 大部分原发性 PCa 患者经过一段时期的 ADT 治疗后, 会逐渐对 ADT 产生耐药性进而从激素依赖性前列腺癌 (hormone naïve

【基金项目】 国家自然科学基金 (32070532)。

【作者简介】 周丽桂 (1994—), 女, 硕士, 专业: 中西医结合基础。E-mail: 739283058@qq.com

【通信作者】 师长宏 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 肿瘤模型的制备与评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

张永斌 (1973—), 男, 副研究员, 研究方向: 动物模型研究。E-mail: yongbinzhang@gzuem.edu.cn * 共同通信作者

prostate cancer, HNPC) 转化为去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC)^[2]。由于 CRPC 具有侵袭性和高度异质性, 致使不同 PCa 患者对同一治疗药物常表现出不同的反应, 导致药物临床试验的成功率大大下降。因此, 尽管已经开发出许多 PCa 细胞系和动物模型, 但均未能充分体现 PCa 的异质转化特征, 导致对其病因和发病机制的了解仍然相当有限, 迫切需要异质性模型来概括 PCa 独特的临床表型和基因型。

人源性类器官 (patient-derived organoids, PDOs) 是指来源于多能干细胞或分离的器官祖细胞在体外通过三维 (3D) 培养技术分化出具有多种细胞类型, 并形成与体内器官相似的器官样结构^[3]。2014 年, Gao 等^[4] 成功利用活检组织标本和循环肿瘤细胞培养出体现 PCa 特异性改变的类器官模型, 推动了类器官参与 PCa 相关医学研究的进展。与人源化异种移植 (patient-derived xenograft, PDX)、2D 细胞系培养等模型相比, PDOs 这种体外培养的三维微器官模型不但简化了动物实验的繁杂性, 还在一定程度上还原了细胞或组织在体内的转化过程。同时它在培养过程中能较好的维持遗传稳定性, 反映亲代肿瘤的特征。类器官可再现肿瘤的异质性并与患者原发瘤对药物的反应具有较高相关性的特点, 可用于模拟并间接观察处于不同临床阶段且具有不同特异性突变的 PCa 患者对各种抗肿瘤药物的反应, 并评价其敏感性。同时, PDOs 模型便于体外进行大规模高通量药物筛选, 在 PCa 异质性研究中显示出独特的优势。

1 前列腺癌类器官的培养

1.1 前列腺癌类器官培养条件探索

传统的 PDX 模型是将从病人身上得到的新鲜肿瘤组织注射到免疫缺陷小鼠体内进行培养, 而 PDOs 模型则是将分离出的多能干细胞或器官祖细胞置于基质胶中进行三维培养。与 2D 细胞系培养相比, PDOs 的培养方式不仅可以为肿瘤细胞或组织提供类似在肿瘤患者体内生长、发育的环境, 还可通过调整培养基配方中的生长因子、激素等筛选不同特异性改变的肿瘤细胞并培育为类器官。Sato 等^[5] 首个开发出类器官通用培养基“ENR”: 即 Advanced DMEM/F12 培养基中加入表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、Noggin 及 Wnt 激动剂 R-spondin1。在此基础上, Karthaus 等^[6] 额外添

加了 Alk3/4/5 抑制剂 A83-01、二氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT)、成纤维细胞生长因子 10 (fibroblast growth factor-10, FGF10)、FGF2、前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、烟酰胺及 p38 抑制剂 SB202190 用于人前列腺类器官的培养。其中 R-spondin1、Noggin 分别通过促进 Wnt 信号传导^[7] 和调节 BMP 信号通路^[8] 进而促进类器官细胞增生, 且去除 R-spondin1 或 Noggin 会导致雄激素受体 (androgen receptor, AR) 表达消失^[6]。EGF 是前列腺类器官增殖和分化所必需的生长因子, FGF2、FGF10 和 PGE2 有助于促进前列腺细胞的增殖^[6,9]。A83-01 可通过抑制 TGF- β 信号通路促进细胞持续增殖, 与 SB202190 协同作用有助于延长类器官的培养时间, 烟酰胺的加入也有助于提高类器官的培养效率, 有趣的是, A83-01、SB202190、烟酰胺均具有相同的抑制细胞分化作用^[5-6], DHT 为类器官生长的非必需因子, 但其有明显提高类器官形成效率的作用且能保持前列腺类器官 AR 信号的完整性^[6]。这些生长因子、激素等构成了支持前列腺 (癌) 细胞在 3D 培养系统中生存和长期培养的基本条件。由于不同亚型的 PCa 突变背景不同, 所需要的添加物组合也相应有所不同。有研究发现 B27、Rho 激酶抑制剂 Y-27632 和 N-乙酰半胱氨酸可为人前列腺 (癌) 类器官的培养提供一定的支持^[10]。目前前列腺 (癌) 类器官的培养条件还在不断探索和改进中, 如 Richards 等^[11] 最新发现在前列腺上皮细胞中加入原发性前列腺基质细胞共培养不仅可通过维持 PCa 的特异性分子标记物 AMCAR (α -methylacyl-CoA racemase, α -甲基乙酰基-辅酶 A 旋酶) 的表达, 提高肿瘤类器官的生存率和形成效率, 还能引导上皮类器官分支的形成并表达调控分支的因子, 如骨形成蛋白、FGF 等, 促进类器官表达出与原组织相似的表型, 提高了类器官对组织特征的概括能力并保持了 PCa 患者间的异质性。这些研究表明前列腺 (癌) 类器官是在培养基中添加前列腺特异性生长因子培养出来的, 可通过调整培养基修饰进一步优化类器官培养条件, 构建不同亚型的 PCa 类器官。

1.2 前列腺癌类器官模型的建立

前列腺癌类器官来源广泛, 目前已成功利用正常组织、肿瘤活检样本、循环肿瘤细胞、PCa 细胞系、前列腺癌 PDXs 模型等分别建立相应的类器官模型。Karthaus 等^[6] 利用小鼠前列腺上皮细胞和人正

常前列腺标本培育出由完全分化的 CK5⁺基底细胞和 CK8⁺管腔细胞组成的前列腺类器官,发现该类器官保留了完整的 AR 信号、前列腺特异性转录因子 Nkx3.1、基底细胞标记物 p63 和 CK5、管腔细胞标记物 CK8 的表达,同时将构建的 Pten 敲除、TMPRSS2-ERG 融合基因等小鼠的原组织进行类器官培养后,其表型与原组织的表型一致。同时,Gao 等^[4]将来自转移性 PCa 患者的活检组织标本、循环肿瘤细胞成功培育出 7 个概括了 PCa 亚型的分子多样性的类器官,充分体现了 PCa 的临床异质性,包括 TMPRSS2-ERG 融合、ETS 易位、SPOP 突变、SPINK1 过表达、FOXA1 和 PIK3R1 突变、CHD1 缺失、Pten 缺失和 AR 表达等,较好保留了原发瘤的基因组特征。这表明 PCa 类器官能很好地重现 PCa 原发瘤组织的异质性,为 PCa 研究提供了一种体现肿瘤患者表观遗传性和异质性的体外模型。人前列腺癌细胞系 LNCaP、C4-2B 细胞及单腔上皮祖细胞也能通过类器官培养技术产生 PCa 类器官^[12-13],前者为雄激素依赖模型,后者为非依赖模型,分别代表了不同的临床特征。此外,最近报道了一种结合类器官和 PDXs 优点的新型体外建模系统,这种 PDX-类器官模型比单独的 PDXs 模型更节省时间和成本,为类器官的建立提供了充足的组织来源。LuCaP 系列是来自 PCa 转移灶的外科手术标本,包括了 21 种前列腺癌的 PDX 模型。Beshiri 等^[14]将来自 LuCaP 系列具有转移性 CRPC (metastatic CRPC, mCRPC) 特征的 PDX 模型组织样本进行类器官培养,发现其相应的类器官模型保留了 mCRPC 的基因组异质性和对 AR 信号的依赖性,成功建立了一个具有代表性的、临床前 PDX 衍生类器官平台,与激素依赖型 PCa 和非转移性 CRPC 形成鲜明的对比,为 mCRPC 的发病机制、药物筛选和个性化治疗方案的研究提供了一个良好的遗传学平台。

2 前列腺癌类器官模型的应用

2.1 前列腺癌发病机制研究

驱动前列腺癌发病和一系列临床异质性转化的机制并不是很清楚,其相应的类器官与原发组织相似度较高,并保持基因组表达的稳定性 and 原代肿瘤组织的异质性,为 PCa 发病机制及不同阶段的临床特征研究提供了良好模型。有研究已通过动物模型和 PDX 模型实验^[15-16]证实了新生儿期暴露于双酚 A (bisphenol A, BPA) 会增加成年后前列腺癌

的易感性。为了检测人胎儿前列腺是否同样受到类似的影响,Calderon-Gierszal 等^[17]将人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 定向分化为前列腺类器官,并在整个分化培养过程中暴露于低剂量 BPA。期间对该类器官进行前列腺上皮基因和多种前列腺标志物检测以验证前列腺的性质,发现其表达 CK8/18、AR、p63、TMPRSS2 蛋白、PSA、NKX3.1、层粘连蛋白和波形蛋白,证实了 hESC 可分化为具有与人类前列腺相似的结构和功能特性的前列腺类器官,而 BPA 显著提高该类器官波形蛋白、NANOG、CD49f、TROP2 的表达和减少其分支的形成,证明低水平的 BPA 可以靶向 hESC,干扰人前列腺形态,特别是前列腺干细胞稳态,这表明发育中的人前列腺可能易受子宫内 BPA 的干扰,由此提出暴露于低剂量 BPA 可能会增加人胎儿前列腺在以后生活中癌变的几率。另外 McCray 等^[18]利用单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 技术对人原发性前列腺类器官模型进行分析,发现与单层细胞培养相比,类器官培养含有更多不同中间类型的前列腺上皮细胞,并鉴定出 10 个细胞群,有效展现前列腺癌的异质性,其中包括一种罕见的以角蛋白 13 (Keratin 13, KRT13)、淋巴细胞抗原 6D (Lymphocyte Antigen 6D, LY6D)、LYPD3 (Ly6/PLAUR domain containing3) 和前列腺干细胞抗原 (prostate stem cell antigen, PSCA) 高表达为特征的前列腺干细胞群。这表明了 scRNA-seq 分析和 PCa 类器官培养技术的结合可更深入地了解存在于 PCa 模型系统中不同的细胞群种类,创建 PCa 细胞群图集。此外,PCa 类器官体外培养的易操作性也为利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统等对特定基因进行编辑提供便利性,通过基因编辑可观察不同基因突变对 PCa 发生、发展和异质性转化的影响。

2.2 药物筛选和个体化治疗

由于 PCa 类器官在保持遗传稳定性的同时还保持着异质性,已成为肿瘤药物毒性筛选、药效评价研究和个体化治疗研究的理想模型。Gao 等^[4]为探索 CRPC 衍生的类器官是否适合药物测试,用培育出的 PCa 类器官对恩杂鲁胺、依维莫和 BKM-120 进行药物敏感性测试,发现 AR 扩增的 MSK-PCa2 细胞系对恩杂鲁胺敏感而对其他药物耐药,同时存在 PTEN 缺失和 PIK3R1 突变的 MSK-PCa2 对依维莫和 BKM-120 均敏感,这与体内实验结果一致,证明其对药物敏感性的效果与临床试验结果相似。

另外 Beshiri 等^[14]发现, BRCA2 突变的 PCa 类器官对奥拉帕尼敏感, 该结果与在 BRCA2 突变的 CRPC 患者临床治疗观察到的反应一致。这些实验结果提示运用类器官进行药物筛选和个体化治疗具有一定的可操作性。同时 PDXs-类器官平台结合了 PDXs 模型优点(展现疾病遗传和表型多样性)和类器官(易于体外大规模培养)的特点, 可用于扩大体外 CRPC 模型的数量和多样性, 同时, 还为运用高通量筛选技术在体外大规模筛选用于 mCRPC 的治疗药物和相应的个体化治疗方案提供可能。值得注意的是, 2018 年发表的一项关于类器官模拟转移性胃肠道癌症的治疗反应的研究中^[19], 运用高通量药物筛选技术测试了类器官对靶向药物和化疗药物的敏感性, 结果表明类器官对抗肿瘤药物具有高度敏感性和特异性, 这表明 PDOs 模型可以高效预测个别患者的药物反应, 针对不同的病人实现个体化治疗。因此将不同 PCa 患者的新鲜肿瘤样品制备成 PCa 类器官培养物并进行个体化建模, 通过靶向或高通量的单药和组合药物筛选, 可进一步指导精准个体化治疗和促进新的抗肿瘤药物的研发。

2.3 耐药机制

大部分 PCa 患者会对药物的治疗出现不同程度的耐药进而发展为 CRPC, 导致治疗难度增加, 理想的 PDOs 模型可以动态展示 CRPC 的转化。基因组学和转录组学分析显示, mCRPC 可能存在三种耐药机制^[20]: 一是基因突变(如 AR、ETS、TP53 和 PTEN 基因等突变)导致 AR 信号通路的激活^[21]; 二是旁路信号 GR(glucocorticoid receptor, 糖皮质激素受体)通路的激活促进 GR 的表达^[22]; 三是在治疗过程中, 肿瘤细胞从依赖于药物靶标转换为不依赖于药物靶标, 从而获得耐药性^[23-24]。上述耐药机制需要在模拟 PCa 表型和基因型的模型系统中进行验证, 相应的异质性 PDOs 模型需要展示各自的耐药机制。目前雄激素敏感的 PCa 和 CRPC 类器官模型均已建立, 也有通过诱导产生 CRPC 转化的模型, 同时利用 CRISPR/Cas9 或慢病毒转染技术对 PCa 类器官的特定基因进行基因编辑操作, 可使 PCa 类器官成为快速检测不同特异性突变对抗肿瘤药物影响的平台, 为研究 PCa 耐药的分子机制提供支持。Pappas 等^[20]利用前列腺癌类器官模型发现 p53 基因的缺失不会引起对雄激素分子的抵抗, Pten 基因的缺失则增加了对抗雄激素药物的抗性, 而 p53 和 Pten 的双重缺失导致了对第二代抗雄激

素的完全抵抗。另外, 还发现了前列腺类器官培养基组成会影响药物反应, 如 EGF 是小鼠和人类前列腺类器官培养基的组成部分, 但它可以降低对抗雄激素的敏感性, 影响 PCa 耐药机制的研究。因此, 类器官培养有助于在体外通过构建异质性 PCa 模型, 并借助基因编辑技术研究特定基因对 PCa 耐药的影响, 从而促进一线治疗药物的改进, 或是寻找出新的治疗靶点提高新药研发效率。

3 展望

PCa 类器官作为一种新型的体外临床前疾病模型, 具有广阔的应用前景。从疾病模型的角度看, PCa 类器官模型不仅便于体外操作, 还具有遗传稳定性和异质性, 可结合 PDX 动物模型对 PCa 的发病机理、药物筛选等研究进行多模型验证^[25-27]。从疾病研究角度来看, PCa 类器官可以在体外直观观察肿瘤细胞或组织的生长、发育变化以及不同突变背景对疾病发生、发展的影响, 为研究 PCa 的异质性转化机制提供有效的指导, 比如, 深入了解雄激素抵抗产生的分子机制, 发现潜在的治疗靶点。从药物筛选和个体化治疗的角度看, 利用不同来源的 PCa 样本建立不同的原发性或转移性 PCa 类器官, 并通过结合高通量筛选技术可批量获得抗 PCa 药物和高效预测 PCa 病人对不同药物的反应, 有助于加速推动开发针对 PCa 异质性特征的治疗方案。从研究耐药机制的角度看, 利用 CRISPR/Cas9 和 shRNA 技术对 PCa 类器官进行表达干扰操作, 可以分析耐药性基因的功能, 有针对性改进一线治疗药物或研发新的个体化药物。

虽然 PCa 类器官建模已取得较多进展, 上皮性和神经内分泌性 PCa 类器官模型已被建立, 但目前为止, 神经内分泌细胞的类器官培养方法尚未成熟, 还有许多问题需要进一步探讨。为了更好的体现 PCa 的临床异质性, 未来还需要不断改进培养条件以更好地支持不同类型前列腺癌细胞的生长, 进一步研究肿瘤微环境和成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞等的作用, 使 PCa 类器官组织结构更好地代表体内 PCa 的组成。

同时, PCa 类器官依旧存在一些缺点。(1) 总体培养成功率较低, 限制了临床多样性前列腺癌模型的广泛开发。如 Gao 等^[3]利用转移性前列腺癌活检标本培养连续传代的类器官, 总体成功率仅有 15%~20%。(2) 缺乏从雄激素依赖性到 CRPC 的

模型, mCRPC 的模型就更少。目前 PCa 患者材料来源有限, 特别是很难获得 mCRPC 患者的临床样本, 因此建立 PCa 类器官生物资源库的困难较多, 造成目前可用的 CRPC 类器官数量很少, 不能完全代表临床疾病的异质性, 这使得类器官在 PCa 研究中的应用受到限制。(3) PCa 类器官建模还受到一些培养条件的限制, 如培养出的 PCa 类器官只含有上皮细胞和(或)基质细胞, 还缺乏某些肿瘤组分, 如免疫细胞、血管成分等等。目前具有免疫兼容性微环境的 PCa 类器官模型尚未开发, 无法进行免疫治疗方面的研究。另外 PCa 类器官的某些培养基成分会影响药理反应, 如 EGF 可能会影响 PCa 类器官对药物的敏感性。总之, 还需要对 PCa 类器官的培养条件不断优化, 构建更加适应 PCa 不同突变背景的肿瘤微环境, 进一步提高 PCa 类器官培养的成功率, 以期获得更多不同表型和基因型的 PCa 类器官, 特别是构建从 HNPC 到 CRPC 直至 mCRPC 发生的模型, 充分展示 PCa 临床异质性, 构建相应的类器官库。

综上所述, 类器官在 PCa 异质性研究方面虽然已取得一定的进展, 但仍存在许多挑战, 还需要不断进行探索。相信随着相关技术的发展, PCa 类器官的建模体系会不断完善, 逐步形成 PCa 生物资源库, 最大限度展示其临床特征, 成为 PCa 首选的临床前疾病模型。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent [J]. Eur Urol, 2017, 71(4): 618-629.
- [3] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. Science, 2014, 345(6194): 1247125.
- [4] Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer [J]. Cell, 2014, 159(1): 176-187.
- [5] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche [J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-265.
- [6] Karthaus WR, Iaquinata PJ, Drost J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures [J]. Cell, 2014, 159(1): 163-175.
- [7] Carmon KS, Gong X, Lin Q, et al. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(28): 11452-11457.
- [8] Cook C, Vezina CM, Allgeier SH, et al. Noggin is required for normal lobe patterning and ductal budding in the mouse prostate [J]. Dev Biol, 2007, 312(1): 217-230.
- [9] Sato T, Stange DE, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1762-1772.
- [10] Drost J, Karthaus WR, Gao D, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue [J]. Nat Protoc, 2016, 11(2): 347-358.
- [11] Richards Z, McCray T, Marsili J, et al. Prostate stroma increases the viability and maintains the branching phenotype of human prostate organoids [J]. iScience, 2019, 12: 304-317.
- [12] Ma L, Li J, Nie Q, et al. Organoid culture of human prostate cancer cell lines LNCaP and C4-2B [J]. Am J Clin Exp Urol, 2017, 5(3): 25-33.
- [13] Chua CW, Shibata M, Lei M, et al. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(10): 951-954.
- [14] Beshiri ML, Tice CM, Tran C, et al. A PDX/organoid biobank of advanced prostate cancers captures genomic and phenotypic heterogeneity for disease modeling and therapeutic screening [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(17): 4332-4345.
- [15] Prins GS, Ye SH, Birch L, et al. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats [J]. Reprod Toxicol, 2011, 31(1): 1-9.
- [16] Prins GS, Hu WY, Shi GB, et al. Bisphenol A promotes human prostate stem-progenitor cell self-renewal and increases in vivo carcinogenesis in human prostate epithelium [J]. Endocrinology, 2014, 155(3): 805-817.
- [17] Calderon-Gierszal EL, Prins GS. Directed differentiation of human embryonic stem cells into prostate organoids *in vitro* and its perturbation by low-dose bisphenol a exposure [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133238.
- [18] McCray T, Moline D, Baumann B, et al. Single-cell RNA-Seq analysis identifies a putative epithelial stem cell population in human primary prostate cells in monolayer and organoid culture conditions [J]. Am J Clin Exp Urol, 2019, 7(3): 123-138.
- [19] Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. Science, 2018, 359(6378): 920-926.
- [20] Pappas KJ, Choi D, Sawyers CL, et al. Prostate organoid cultures as tools to translate genotypes and mutational profiles to pharmacological responses [J]. J Vis Exp, 2019, (152): 10.3791/60346.

(下转第 127 页)

夏晴,纪羽婷,刘海亮,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 107-113.
Xia Q, Ji YT, Liu HL, et al. Research progress on animal models of rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 107-113.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 11. 018

类风湿关节炎动物模型研究进展

夏 晴,纪羽婷,刘海亮,宋武琦*

(哈尔滨医科大学微生物学教研室,伍连德研究所,黑龙江省免疫与感染重点实验室,
黑龙江省普通高校病原生物学重点实验室,哈尔滨 150081)

【摘要】 类风湿关节炎是一种多发性自身免疫性疾病,多累及关节,最终会导致关节的畸形,在自然病程中,10年致残率可超过60%,严重影响生活质量。类风湿关节炎的动物模型在其发病机制、治疗方法、治疗靶点等方面的研究中发挥重要作用。本综述主要介绍几种常见类风湿关节炎动物模型的构建方法、发病机制及其应用,以便在今后的疾病研究中选择合适的动物模型。

【关键词】 类风湿关节炎;动物模型;佐剂诱导;胶原诱导;降植烷诱导;软骨寡聚基质蛋白诱导;基因工程
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0107-07

Research progress on animal models of rheumatoid arthritis

XIA Qing, JI Yuting, LIU Hailiang, SONG Wuqi*

(Department of Microbiology, Harbin Medical University, Wu Lien-Teh Institute, the Heilongjiang Key Laboratory of Immunity and Infection, the Key Laboratory of Pathogenic Biology, Heilongjiang Higher Education Institutions, Harbin 150081, China)

【Abstract】 Rheumatoid arthritis (RA), an autoimmune disease, affects the joints and eventually leads to joint deformity. Without intervention, the disability rate can exceed 60% over 10 years, which seriously affects the quality of life of patients. Animal models of RA have played an important role in the study of the pathogenesis, treatment, and identification of therapeutic targets of RA. In this review, the construction method, pathogenesis, and applications of several common animal models of RA are introduced to aid researchers in selecting appropriate animal models for future disease research.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; animal model; adjuvant-induced; collagen-induced; pristane-induced; cartilage oligomeric matrix protein-induced; gene engineering

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性炎症性关节疾病,表现为持续性滑膜炎、全身性炎症,伴有骨骼和软骨侵蚀,最终可导致关节强直和畸形^[1]。我国RA患病率约为0.32%~0.36%,在自然病程中,10年致残率可超过60%^[2]。类风湿关节炎动物模型被广泛用于发病机制和治

疗方法的研究。目前已经建立多种动物模型用于研究RA的病因、发病机制、影响因素以及新的治疗靶点的研究和新疗法的评估,包括佐剂诱导关节炎模型(adjuvant induced arthritis, AA)、II型胶原诱导的关节炎模型(collagen induced arthritis, CIA)、链球菌细胞壁诱导的关节炎模型、软骨寡聚基质蛋白

【基金项目】 国家重点研发项目(2017YFB0403805)。

【作者简介】 夏晴(1996—),女,硕士,主要从事自身免疫病相关研究。E-mail: xiaqing96123@163.com

【通信作者】 宋武琦(1979—),男,博士,副教授,硕士生导师,从事感染与免疫相关研究。E-mail: songwuqi@hrbmu.edu.cn

(cartilage oligomeric matrix proteins, COMP) 诱导关节炎、降植烷诱导关节炎 (pristane induced arthritis, PIA) 以及转基因动物的关节炎模型。这些模型各有优缺点,但 CIA 一直是 RA 研究最广泛的模型。将上述中因诱导产生的模型称为诱导型关节炎模型,另一类为基因工程型动物模型,按照这两大类来进行介绍。

1 诱导型关节炎模型

佐剂诱导的关节炎动物模型最初由细菌学家 Freund 于五十年代创立,又称弗氏佐剂性关节炎。使用弗氏佐剂单次皮下注射可诱导 Wistar 大鼠发生关节炎,并且多次注射发病率高于单次注射^[3]。发病快,在很短的时间内就可观察到病变,可观察到脚踝、爪子、尾巴的肿胀,累及单个或多个关节;组织学可观察到血管翳的形成、中性粒细胞和单核细胞浸润,有软骨和软骨下骨侵蚀,随后伴有关节强直,病变多持续 14~45 d,观察不到慢性活动期。随后, Trentham 等^[4]在 1977 年提出,通过背部皮下注射 II 型胶原与完全或不完全弗氏佐剂混合物,可诱导 10~24 周龄大的远系杂交 Wistar 雌鼠、SD 大鼠、近交系 Wistar-Lewis 大鼠发生关节炎。病变主要累及远端踝关节、跗关节和趾间关节;严重程度峰值出现在发病后 4 d 内,肿胀维持 5~8 周,最终导致关节变形。无论是异源或同源型 II 型胶原作为免疫原,还是采用完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 或不完全弗氏佐剂 (incomplete freund's adjuvant, ICFA) 作为免疫原,胶原诱导的关节炎的临床特征是相似的,大鼠对同源或异源的 II 型胶原具有同样的易感性^[4]。1980 年 Courtenay 等^[5]提出使用 II 型胶原诱导小鼠关节炎模型。通过背部皮下注射牛 II 型胶原在近交系 8~15 周龄 DBA/1 小鼠中诱导关节炎,多在免疫后 23 d 后发病,早期观察到滑膜及其周围组织水肿,接着伴随滑膜增生,单核细胞浸润;病变后期,细胞浸润和水肿减轻,有关节强直,可见滑膜和关节软骨破坏,椎体很少受累,少数动物的耳朵或尾巴偶见小的炎性病灶^[5]。在刺激前后给予小鼠脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 可诱导疾病发生得更快,起病变异异性更小^[6]。II 型胶原诱导的大小鼠关节炎的主要病变相似,且均与人类 RA 有许多相似之处。但二者免疫不同, DBA/1 小鼠初次免疫必须使用完全弗氏佐剂而不是不完全弗氏佐剂, CIA 诱导小鼠

关节炎起病慢,病程长^[7]。近年来, CIA 模型在基于生物学的新疗法的测试和开发中发挥了重要作用,如针对 TNF- α 的治疗^[8]。

胶原诱导关节炎动物模型的易感性与主要组织相容复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 的特定 II 类分子如 H-2r 和 H-2q 有关,同样,人 RA 的易感性也与 MHC II 类分子 H-2r 和 H-2q 相关。在这两种疾病中,都有针对 CII 和类风湿的自身抗体产生的因素,有证据表明, RA 患者的抗体针对的是与 CIA 相同的 CII 分子区域^[9-10]。

大鼠对佐剂诱导关节炎异常敏感,除了使用弗氏佐剂以外,非免疫原性佐剂如降植烷、角鲨烯均可以在大鼠品系中诱发严重的关节炎,且符合 RA 的标准^[11]。大鼠单次皮下注射降植烷可以诱导 PIA,小鼠需要注射两次降植烷,时间间隔为 50 d,然后是慢性复发期,该炎症为 T 细胞依赖型,表现为关节炎的一个延长、延迟的临床时间过程;组织学变现为滑膜增生、软骨和骨糜烂、炎性细胞浸润、血管翳形成;可以检测到类风湿因子,热休克蛋白和 I、II 型胶原抗体也被检测到。非免疫原性佐剂关节炎表明,非特异性的免疫系统刺激可以引发关节炎。DA 系大鼠对 PIA 最敏感,发病率可达 100%, E3 系最不敏感,发病率为 0^[12]。降植烷诱导的关节炎模型对 TNF- α 抑制剂疗法不敏感,因此该模型可用于研究除 TNF- α 抑制剂疗法以外的新方法,对于研究对 TNF- α 抑制剂疗法无效的患者的相关治疗方法是有重要意义的^[13]。

COMP 是一种软骨特异性分子,可在几种大鼠以及小鼠品系中诱发急性和自限性关节炎^[14-15],天然和变性 COMP 均可在大鼠中诱发严重关节炎,病变变现为滑膜中度增生、肥大,伴血管翳形成。虽然骨和软骨的破坏是明显存在的,但它们仅限于边缘区,而整个关节结构只是偶尔被重塑。多数情况下,关节炎是逐渐愈合的,免疫后 43 d 没有炎症或畸形的迹象。疾病具有自限性,很容易在对 CIA 以及佐剂模型具有抗性的 E3 品系中诱导,这种差异不仅与 RT1u 单倍型有关,也与非 MHC 基因有关,表明, COMP 依赖于独特的疾病途径。与天然 COMP 免疫诱导的关节炎类似,变性 COMP 免疫诱导的关节炎,但它往往更持久,特别是在 E3 品系。

研究发现^[16], II 型胶原诱导大鼠关节炎,其血清经 50% 硫酸铵分级浓缩后,转移至正常受体内,在 18~72 h 后可诱发关节炎,并且可以表现出早

期炎症病变的所有病理组织学特征,如巨噬细胞和中性粒细胞浸润,但是炎症短暂、不严重。转移的血清中含有活性的 IgG 抗胶原蛋白抗体。该方法所致关节炎为快速发病,疾病高峰期在 8 d 以内,而且具有高度的同步性,而 CIA,在疾病的发生率、同步性和分布方面存在很大的个体差异。该方法还适用于免疫一些不适合进行 CIA 免疫的小鼠品系。

在诱导型关节炎模型的多种方法中(见图 1),AA 操作方法简单,但是缺乏慢性病过程,病变具有一定的自限性,在病理生理学特点上存在较大差距;CIA 诱导的关节炎发病时间与临床表现不一,虽然与人类 RA 有很多相似之处,但是无病情波动和复发情况,没有类风湿因子及抗核抗体,但它已经是目前公认的研究 RA 最佳模型,特别是在治疗机制及免疫反应有关的研究中;降植烷诱导的关节炎模型耗时久,该模型主要依赖 T 细胞激活,主要用来药物验证;COMP 诱导的关节炎发病较 AA 要快,起病急,病程短,虽然其外周关节病变在临床上与 RA 相似,但不产生永久的关节破坏^[17]。

重点介绍 AA、CIA、PIA 以及 COMP 诱导的关节炎其发病机制和主要病变可见表 1^[18-29]。

2 基因工程型关节炎模型

小鼠在经过一定的基因修饰后可以自发形成关节炎,与依赖多基因性状相比,靶向基因工程使自发性疾病模型的定义更狭窄,更简单,也可进一步了解细胞因子在 RA 发展中的作用,下面介绍几种基因修饰后的自发关节炎动物模型,如表 2 所示。

通过 RA 患者分离的滑膜细胞进行体外研究,发现单核细胞/巨噬细胞产物肿瘤坏死因子(TNF- α)通过诱导促炎细胞因子级联,在关节炎中起中心作用^[30-32]。1991 年构建人类 TNF 转基因小鼠^[33],表现出人类 TNF 基因表达的失调模式,可发展为慢性炎性多关节炎,并且观察到与人类 RA 相一致的组织学特征,滑膜增生,炎性细胞浸润在不同的发育阶段都很明显;血管翳形成,关节软骨破坏和大量纤维组织产生,与人类 RA 相一致的组织学特征,在疾病晚期被观察到。该研究也证明了在转基因小鼠中可以建立正确的、内毒素应答的和巨噬细胞特异性的人类 TNF 基因表达,并证明了人类 TNF 基因的 3'-区域可能参与了巨噬细胞特异性的

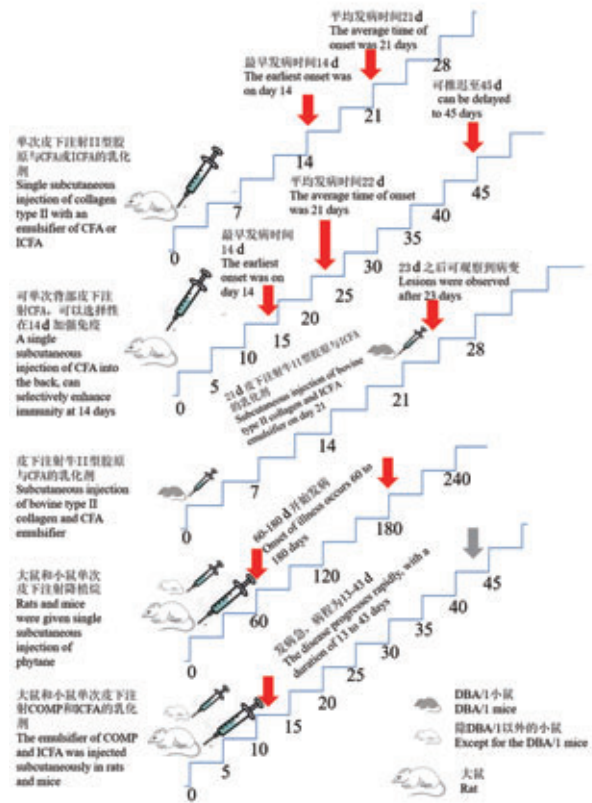


图 1 关节炎诱导流程图

Figure 1 Arthritis induction flow chart

转录。随后研究发现^[34],在 C57Bl/6 CBA 小鼠的背景下,与 BDA/1 反向杂交产生一种 TNF 过表达的小鼠,其关节炎发病比前者要严重,可导致关节炎的发病加速,且持续几代,就是说第一代发病在 8~9 周,意味着第 11 代可能是在第三周或者出生后 11 d 就发病。这些小鼠关节中淋巴细胞和巨噬细胞浸润可表明,细胞因子的产生和随后的关节损伤至少部分是通过成纤维细胞的 TNF- α 的异常表达产生的。通过体内注射人类 TNF 抗体可以预防小鼠中关节炎的发生并治疗已发生的关节炎,这些结果为 TNF 在炎症性关节炎发病机制中的作用提供了直接证据。抑制 TNF 可能被证明在设计这类疾病的治疗方案中是有用的。

白介素-1(interleukin 1, IL-1)作为一种促炎因子,也参与人类 RA 的疾病进展,IL-1 似乎特别重要,因为将 IL-1 注入正常兔关节会引起严重的关节炎^[35],并且将抗 IL-1 抗体或 IL-1 受体拮抗剂(ra)注入受影响的关节会改善疾病^[36-38]。IL-1 受体拮抗剂(ra)是其内源性抑制剂,为了阐明 IL-1ra 的作用,通过基因靶向构建 IL-1ra 缺陷型小鼠,IL-1ra 缺陷小鼠是通过将分泌型的整个外显子与 neo 基因进

表 1 诱导型类风湿关节炎动物
Table 1 Induced rheumatoid arthritis animals

模型名称 Model name	动物品系 Animal strains	造模方法 Methods	主要机制 Main mechanism	发病周期 Disease cycle	用途 Uses	参考文献 References
佐剂诱导关节炎模型 Adjuvant induced arthritis model	大鼠 Rat	皮下注射完全弗氏佐剂诱导关节炎模型,可在第 14 天进行二次注射 Subcutaneous injection of CFA induced arthritis model, can be given a second injection on the 14th day	65KD 热休克蛋白、T 细胞相关 65KD heat shock protein, T cell related	初次免疫后 14 d,可推迟至 45 d,平均发病时间为 22 d 14 days after the initial immunization, it can be postponed to 45 days, the average onset time is 22 days	常规 RA 药物疗效检测,特别是非甾体类抗炎药的临床前测试;光动力疗法的研究 Conventional RA drug efficacy testing, especially preclinical testing of non-steroidal anti-inflammatory drugs; research on photodynamic therapy	[3, 16, 18-19]
II 型胶原诱导关节炎模型 Type II collagen induced arthritis model	大鼠 Rat	背部皮下注射同源或异源 II 胶原与 CFA 或 ICFA Subcutaneous injection of homologous or heterologous collagen II with CFA or ICFA in the back	T 细胞和 B 细胞对 CII 的特异性应答; MHC II 类分子相关 Specific response of T cells and B cells to CII; MHC II molecules are related	免疫后 14~60 d 会观察到病变,平均发病时间为 21 d Lesions will be observed 14~60 days after immunization, with an average onset time of 21 days	大鼠中发病率的性别差异与 RA 一致,可用于分析其性别差异性的原因;基因微阵列 Gender differences in incidence rates in rats are consistent with RA, which can be used to analyze the causes of gender differences; gene microarray	[4, 20-22]
II 型胶原诱导关节炎模型 Type II collagen induced arthritis model	小鼠 Mice	尾部皮下注射牛 II 型胶原与 CFA,第 21 天加强免疫 Subcutaneous injection of bovine type II collagen and CFA in tail, boost immunity in 21 days	T 细胞和 B 细胞对 CII 的特异性应答; MHC II 类分子相关 Specific response of T cells and B cells to CII; MHC II molecules are related	初次免疫后 23 d 可观察到病变 Lesions were observed 23 days after the initial immunization	RA 新药物治疗和预防作用检测和细胞因子等治疗靶点的检测;基因微阵列 Detection of new drug treatment and prevention effects of RA and detection of therapeutic targets such as cytokines; gene microarray	[5, 8, 22-24]
降植烷诱导关节炎模型 Pristane induced arthritis model	大鼠、小鼠 Rat, mice	大鼠中单次皮内注射降植烷;小鼠中间隔 50 d,分两次注射降植烷 Single intradermal injection of pristane in rat; two injection of pristane at an interval of 50 days in mice	与 MHC 有关,并依赖于 T 细胞活化 Related to MHC and dependent on T cell activation	发病时间较长,可在降植烷给药后 60~180 d 内 The onset time is longer, which can be within 60~180 days after the administration of phytan	了解炎症性关节疾病机制,验证新型抗关节炎药物的疗效;特别是在 T 细胞相关途径 Understand the mechanism of inflammatory joint diseases and verify the efficacy of new anti-arthritis drugs; especially in T cell related pathways	[25 - 29]
COMP 诱导关节炎模型 COMP induced arthritis model	大鼠、小鼠 Rat, mice	尾部皮下注射 COMP 与 ICFA 的乳化剂 Subcutaneous injection of COMP and ICFA emulsifier in tail	RT1u MHC 单倍型;对 COMP 的免疫反应 It is related to RT1u MHC haplotype and the immune response to COMP	起病急,病程为急性期,病程范围为 13~43 d The onset is acute and the course is acute, with a course ranging from 13 to 43 days	该模型可作为研究关节炎发病机制的合适模型和替代模型 This model can be used as a suitable model and an alternative model for studying the pathogenesis of arthritis	[14 - 15]

行同源重组而产生的^[39]。在这些突变小鼠中, IL-1ra 的四种亚型均被破坏。这些小鼠与 BALB/cA 或 C57BL/6J 品系小鼠回交 5~8 代, 与 BALB/cA 小鼠回交 5 代后, IL-1ra^{-/-} 小鼠自发发展为慢性炎症性关节炎, 后肢的踝关节处的肿胀和发红最为明显, 前肢的关节也发展为关节炎, 发生率和严重性较低; 组织学分析显示滑膜和关节周围炎症; 可看到包括淋巴细胞和嗜中性粒细胞在内的炎性细胞的入侵形成了血管翳, 骨侵蚀也很明显^[40]。研究表明 IL-1ra 基因的缺乏会引起自身免疫性疾病和关节炎, 强调 IL-1/IL-1ra 平衡在维持关节正常生理和免疫系统稳态方面的重要性。除此之外, 发现 C57BL/6J 背景下的 IL-1ra^{-/-} 小鼠在 II 型胶原免疫时发生关节炎的几率很高, 这表明 IL-1ra^{-/-} 小鼠的免疫系统具有高反应性, 我们还观察到该疾病在 DBA/1 背景下的早期发病和更严重的表型^[40]。

研究发现^[41], 编码 T 细胞中一个关键的信号转导分子, ZAP-70 SH2 结构域的基因发生了自发的点突变, 导致 BALB/c 小鼠的慢性自身免疫性关节炎, 称为 SKG 关节炎模型。小鼠在 2 个月大时开始发病, X 线检查显示, 在 8~12 个月大时, 软骨下骨破坏和融合、关节脱位和骨质疏松症。

除此之外还包括 K/BxN 模型^[42]、Human/SCID 嵌合体小鼠模型^[42] 和 Human DR4-CD4 小鼠模型^[43] 等。K/BxN 模型小鼠关节炎属于慢性进行性疾病, 首先表现为关节肿胀, 并发展到多个关节畸形严重损害活动能力的程度, 关节受累明显对称, 并显示出明显的远端突出; 组织学分析揭示了大量白细胞浸润, 滑膜炎, 血管翳形成, 软骨破坏, 骨质侵蚀继而重塑和纤维化^[42]。基因工程型关节炎模型更有助于研究某一特定因子或者基因在关节炎疾病中的作用, 模型具有遗传性, 可以在后代中持续表达。

表 2 基因工程型类风湿关节炎模型

Table 2 Genetically engineered rheumatoid arthritis model

模型名称 Model name	动物品系 Animal strains	处理方式 Methods	主要机制 Main mechanism	发病周期 Disease cycle	用途 Use	参考文献 References
TNF 转基因关节炎模型 TNF transgenic arthritis model	小鼠 Mice	将含有 3'-修饰后的完整人类 TNF 基因的片段注入到 CBA 与 C57BL/6 杂交第二代小鼠受精卵内, 获得转基因小鼠 Inject the 3'-modified human TNF gene-containing fragment into the fertilized eggs of CBA and C57BL/6 hybrid second-generation mice to obtain transgenic mice	TNF 过表达 TNF overexpression	3~4 周龄可观察到踝关节肿胀; 9~10 周腿部运动障碍发展为完全丧失后腿的运动能力 Swelling of the ankle joint can be observed at 3~4 weeks of age; dyskinesia of the legs at 9~10 weeks develops a complete loss of hind leg exercise capacity	用于研究 TNF 关节炎中相关细胞因子的作用, 如核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) Used to study the role of related cytokines in TNF arthritis, such as nuclear factor κB receptor activating factor ligand (RANKL)	[33-34, 44]
IL-1ra ^{-/-} 关节炎模型 IL-1ra ^{-/-} arthritis model	小鼠 Mice	构建 IL-1ra 表达载体, 将其注入小鼠受精卵内, 通过繁殖产生突变小鼠 Construct IL-1ra expression vector, inject it into mouse fertilized eggs, and generate mutant mice through reproduction	IL-1 和 IL-1ra 平衡失调; T 细胞 IL-1 and IL-1ra are out of balance; T cells	BALB/cA 背景的 IL-1ra ^{-/-} 小鼠最早 5 周龄时就可发病, 大于 80% 的小鼠在 8 周龄之前变成关节炎; 13 周龄所有小鼠都发病 IL-1ra ^{-/-} mice with BALB/cA background can develop disease at the earliest 5 weeks of age, and more than 80% of the mice become arthritis before 8 weeks of age; all mice at 13 weeks of age	可用于研究细胞因子在 RA 发病中的作用, 如 IL-17 在 RA 中的作用 Can be used to study the role of cytokines in the pathogenesis of RA, such as the role of IL-17 in RA	[39-40, 45-46]
K/BxN 关节炎模型 K/B × N arthritis model	小鼠 Mice	Aβ ⁶⁷ 转基因的 BABL/c 与同品系 B6.H2 ⁶⁷ 杂交 Crossing of Aβ ⁶⁷ transgenic BABL/c with the same strain B6.H2 ⁶⁷	T 细胞受体与 MHC II 类分子的免疫反应相关 Related to the immune response of T cell receptors and MHC class II molecules	25~35 d 可观察到病变 The lesion can be observed in 25~35 days	研究 IFN 对 RA 治疗的相关机制 To study the mechanism of IFN treatment for RA	[42-43, 47]

3 结语

近年来,人们对于关节炎动物模型的研究逐渐增多,模型构建方法也从诱导型发展至基因工程修饰的小鼠动物品系。对动物模型的不断深入研究,对于 RA 的发病机制、影响因素以及治疗方法等多方面都发挥了至关重要的作用。多种类的动物模型,也使得研究更加精准,尤其新的基因工程模型,为一些靶点药物研究提供了新思路。虽然目前对 RA 动物模型的研究较为广泛,但模型都是在特定的条件下诱导产生,不能完全反应 RA 疾病过程中的所有影响因素,而且动物模型侧重于啮齿类动物,与人类还存在较大的种属差异。所以研究出一种种属与人类更贴近,操作更为便捷、经济,更加全面反应人类 RA 疾病进展的动物模型是今后研究 RA 动物模型的重要内容之一。

参考文献:

- [1] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2010, 376(9746): 1094-1108.
- [2] 李芬. 类风湿关节炎的精准医学研究:任重道远 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2016, 20(9): 577-579.
- [3] Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956, 91(1): 95-101.
- [4] Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis [J]. *J Exp Med*, 1977, 146(3): 857-868.
- [5] Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, et al. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice [J]. *Nature*, 283(5748): 666-668.
- [6] Kang I, Lee WW, Lee Y. Modulation of collagen-induced arthritis by IL-4 and dexamethasone; the synergistic effect of IL-4 and dexamethasone on the resolution of CIA [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49(3): 317-324.
- [7] Cannon GW, McCall S, Cole BC, et al. Effects of indomethacin, cyclosporin, cyclophosphamide, and placebo on collagen-induced arthritis of mice [J]. *Agents Actions*, 1990, 29(3-4): 315-323.
- [8] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis [J]. *Int Rev Immunol*, 2007, 2(5): 1269-1275.
- [9] Holmdahl R, Andersson ME, Goldschmidt TJ, et al. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis [J]. *APMIS*, 1989, 97(7): 575-584.
- [10] Burkhardt H, Koller T, Engström A, et al. Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(9): 2339-2348.
- [11] Holmdahl R. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2001, 184: 184-202.
- [12] Bäckdahl L, Ribbhammar U, Lorentzen JC. Mapping and functional characterization of rat chromosome 4 regions that regulate arthritis models and phenotypes in congenic strains [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(2): 551-559.
- [13] Patten C, Bush K, Rioja I, et al. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: Response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(10): 3334-3345.
- [14] Carlsén S, Hansson AS, Olsson H, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114(3): 477-484.
- [15] Carlsen S, Nandakumar KS, Bäcklund J, et al. Cartilage oligomeric matrix protein induction of chronic arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(7): 2000-2011.
- [16] Stuart JM. Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis [J]. *J Exp Med*, 1982, 155(1): 1-16.
- [17] 刘晓飞, 方勇飞. 类风湿关节炎动物模型研究进展 [C]//全国中西医结合风湿病学术会议. 2012.
- [18] Yan F, Li H, Zhong Z, et al. Co-delivery of prednisolone and curcumin by human serum albumin nanoparticles for effective treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 9113-9125.
- [19] Kumar A, Dhaliwal N, Dhaliwal J, et al. Astaxanthin attenuates oxidative stress and inflammatory responses in complete Freund-adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(1): 104-114.
- [20] Dimitrijević M, Arsenović-Ranin N, Kosec D, et al. Sex differences in Th1 cell help to B cells contribute to sexual dimorphism in severity of rat collagen-induced arthritis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1214.
- [21] Dimitrijević M, Arsenović-Ranin N, Kosec D, et al. Sexual dimorphism in Th17/Treg axis in lymph nodes draining inflamed joints in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76: 198-214.
- [22] 王芳, 谈文峰, 宋蕾. 基因微阵列对类风湿关节炎动物模型的应用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(3): 188-190.
- [23] Kim KE, Jeon S, Song J, et al. The novel synthetic peptide AESIS-1 exerts a preventive effect on collagen-induced arthritis mouse model via STAT3 suppression [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 378.
- [24] Kwon JE, Lee SY, Seo HB, et al. YinYang1 deficiency ameliorates joint inflammation in a murine model of rheumatoid arthritis by modulating Th17 cell activation [J]. *Immunol Lett*, 2018, 197: 63-69.
- [25] Potter M, Wax JS. Genetics of susceptibility to pristane-induced

- plasmacytomas in BALB/cAn; reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis [J]. *J Immunol*, 1981, 127(4): 1591-1595.
- [26] Wooley PH, Seibold JR, Whalen JD, et al. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease [J]. *Arthritis Rheum*, 1989, 32(8): 1022-1030.
- [27] Bedwell AE, Elson CJ, Hinton CE. Immunological Involvement in the Pathogenesis of Pristane-Induced Arthritis [J]. *Scand J Immunol*, 1987, 25(4): 393-398.
- [28] Hopkins SJ, Freemont AJ, Jayson MI. Pristane-induced arthritis in BALB/c mice [J]. *Rheumatol Int*, 1985, 122: 213-220.
- [29] Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(8): 1357-1362.
- [30] Brennan FM, Chantry D, Jackson A, et al. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 1989, 334(8657): 244-247.
- [31] Feldmann M, Brennan FM, Chantry D, et al. Cytokine production in the rheumatoid joint: Implications for treatment [J]. *Ann Rheum Dis*, 1990, 49(1): 480-486.
- [32] Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. TNF- α —a pivotal role in rheumatoid arthritis? [J]. *Br J Rheumatol*, 1992, 31(5): 293-298.
- [33] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis [J]. *EMBO J*, 1991, 10(13): 4025-4031.
- [34] Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, et al. DBA/1 mice expressing the human TNF- α transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition [J]. *J Immunol*, 1997, 159(6): 2867-2876.
- [35] Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(22): 8749-8753.
- [36] van den Berg WB, Joosten LA, Helsen M, et al. Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment [J]. *Clin Exp Immunol*, 1994, 95(2): 237-243.
- [37] Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, et al. Anticytokine treatment of established type II collagen - induced arthritis in DBA/1 mice: A comparative study using anti-TNF- α , anti-IL-1 α/β , and IL-1Ra [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(2): S110-S122.
- [38] Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, et al. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(1): 402-406.
- [39] Horai R, Asano M, Sudo K, et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1 α/β , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 β is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(9): 1463-1475.
- [40] Horai R, Saijo S, Tanioka H, et al. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist - deficient mice [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(2): 313-320.
- [41] Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice [J]. *Nature*, 2003, 426(6965): 454-460.
- [42] Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity [J]. *Cell*, 1996, 87(5): 811-822.
- [43] Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, et al. Animal models of rheumatoid arthritis [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(8): 2040-2044.
- [44] Papadaki M, Rintotas V, Violitzi F, et al. New insights for RANKL as a proinflammatory modulator in modeled inflammatory arthritis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 97.
- [45] Park JS, Kim NR, Lim MA, et al. Deficiency of IL-1 receptor antagonist suppresses IL-10-producing B cells in autoimmune arthritis in an IL-17/Th17-dependent manner [J]. *Immunol Lett*, 2018, 199: 44-52.
- [46] Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2018, 40(3): 193-200.
- [47] Corr M, Boyle DL, Ronacher LM, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the beneficial effects of systemic interferon beta in mice: implications for rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(5): 858-863.

殷贤青,刘容容. 铁死亡的发生机制及其在血液系统肿瘤中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 114-119.
Yin XQ, Liu RR. The mechanism of ferroptosis and research progress on its involvement in hematological malignant tumors [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 114-119.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 11. 019

铁死亡的发生机制及其在血液系统肿瘤中的研究进展

殷贤青,刘容容*

(广西医科大学第一附属医院血液内科,南宁 530000)

【摘要】 铁死亡为近年来发现的一种非凋亡细胞死亡模式,其发生通路对肿瘤的发生发展起着重要的影响。许多研究表明,白血病和淋巴瘤等血液系统肿瘤的肿瘤细胞对铁死亡敏感,调节铁死亡通路中的调控因子可以加速或抑制肿瘤的疾病进展。本文综述了铁死亡的发生机制和目前在血液系统肿瘤中的研究,为后续将铁死亡应用于血液系统肿瘤的研究和治疗提供参考。

【关键词】 铁死亡;ROS;GPX4;白血病;淋巴瘤;铁代谢

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0114-06

The mechanism of ferroptosis and research progress on its involvement in hematological malignant tumors

YIN Xianqing, LIU Rongrong*

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China)

【Abstract】 Ferroptosis, a type of non-apoptotic cell death discovered in recent years, plays an important role in the development of tumors. Many studies have shown that hematological malignant tumors, such as leukemia and lymphoma, are sensitive to ferroptosis. Moreover, regulation of the ferroptosis pathway can accelerate or inhibit the disease progression of tumors. Herein, the mechanism of ferroptosis and current research examining its involvement in hematological malignant tumors are reviewed to provide a reference for future research and treatment of ferroptosis in hematological tumors.

【Keywords】 ferroptosis; ROS; GPX4; leukemia; lymphoma; iron metabolism

细胞死亡是维持个体正常生长发育及内环境稳态的重要环节之一,经典的细胞死亡模式为凋亡、自噬和坏死。铁死亡是一种新的细胞死亡调控形式,其形态学特点是细胞体积缩小,线粒体膜密度增加,嵴减少,它在机制上不同于细胞坏死和凋亡,主要特点是活性氧(ROS)的生成、脂质过氧化和铁的积累。随着近年来铁死亡机制研究的深入,许多研究表明铁死亡与肿瘤的发生发展密切相关。白血病和淋巴瘤是血液系统恶性肿瘤,其现有的治

疗方案治疗有效率低,仍需探索新的治疗模式,而铁死亡的研究进展也为血液系统肿瘤的治疗提供了新的思路。

1 概述

铁死亡是 Dixon 等^[1]在 2012 年提出的由 erastin 和 RSL3 等小分子诱导的依赖铁的一种新的死亡模式,主要特点是活性氧(ROS)的生成、脂质过氧化和铁的积累。特定的小分子化合物作用于

【基金项目】 国家自然科学基金(81960028)。

【作者简介】 殷贤青(1996—),女,硕士研究生,专业:内科学。E-mail: yin_xianqing@sina.cn

【通信作者】 刘容容(1979—),女,博士,副主任医师,硕士生导师,主要研究方向:血液学。E-mail: rong2liu@hotmail.com

细胞内特异性靶点,引起抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)或谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)减少,导致细胞内ROS堆积,细胞发生脂质过氧化,在铁协同作用下诱发细胞铁死亡^[2-3]。游离胱氨酸经胱氨酸谷氨酸转运受体(systemX_c⁻)转运进细胞内,为合成GSH的底物,谷胱甘肽是一种主要的氧化还原分子,其功能是通过将一个电子提供给谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)来防止铁中毒^[4],而GPX4是唯一能减少磷脂过氧化氢的酶^[5](图1)。但上述通路引起的脂质过氧化水平增高通过什么机制引起铁死亡仍是一个未解之谜。

白血病和淋巴瘤是最常见的血液系统恶性肿瘤,主要治疗方法是化疗和干细胞移植,虽然干细胞移植治疗水平在近年来有较大提升,但其应用具有一定的限制性。而化疗方案的缓解率不高,且近年来并没有实质性的进展。因此仍需探究对患者受益较大的治疗方案。铁死亡作为细胞死亡模式之一,是肿瘤研究和治疗中的热门研究方向^[6-7]。目前铁死亡在血液系统肿瘤中研究较多的为通过调节铁死亡的调节因子,影响细胞对铁死亡的敏感性,从而调节肿瘤细胞的铁死亡水平。

2 铁死亡机制及在血液系统肿瘤中的研究

2.1 脂质过氧化与血液系统肿瘤

活性氧(ROS)由正常生理过程产生的,在细胞信号转导和组织稳态中起重要作用。然而,过量的活性氧自由基对细胞成分产生不利的修饰,如脂质、蛋白质和DNA损伤^[8-9]。由于生物细胞膜或细胞器膜富含高多不饱和脂肪酸(PUFAs),特别容易受到ROS损伤,这被称为“脂质过氧化”,ROS诱导的脂质过氧化在细胞死亡中起着重要的作用。脂质过氧化直接损伤磷脂,也可作为诱导细胞程序性死亡的细胞死亡信号^[10-11]。在erastin和RSL3诱导的铁死亡中,均伴有ROS的累积,通过高通量筛选发现ferrostatin-1(Fer-1)和liproxstatin-1(Lip-1)可阻止erastin诱导的ROS累积,从而特异性的抑制RSL3诱导的铁死亡,这也验证了ROS累积对促进铁死亡的重要作用^[1,12]。

GPX4是一种抗氧化酶,GPXs家族成员之一,也是人类基因组17中含有硒半胱氨酸的25种蛋白质之一,它以谷胱甘肽为辅助因子,将脂质过氧化物还原为脂质醇,这一过程阻止了活性氧ROS的合成^[13-14]。GPX4是RSL3的蛋白靶点,RSL3能特异

性抑制GPX4活性,导致细胞内ROS堆积,从而诱导细胞的铁死亡^[15],而过表达的GPX4可降低铁死亡水平^[16]。Pedro等^[17]人证明敲除GPX4基因会导致细胞发生铁死亡。硒可以通过转录因子TFAP2c和Sp1的协同激活来增强GPX4和这个转录程序中的其他基因,有效地抑制GPX4依赖的铁死亡,而硒的缺失会使GPX4失去活性,使细胞对氧化损伤的敏感性增高^[18-19]。此外,Fino2和FIN56可通过间接抑制GPX4的水平和活性来诱导铁死亡,而不影响谷胱甘肽的水平^[20-21]。

胱氨酸谷氨酸转运受体(systemX_c⁻)是细胞膜转运体的一个组成部分,由SLC7A11和SLC3A2组成的异质二聚体,负责胞外胱氨酸和胞内谷氨酸的交换^[22]。在生理状态下,细胞外的胱氨酸通过systemX_c⁻转运进细胞内,为合成抗氧化剂谷胱甘肽的底物,而谷胱甘肽是清除活性氧的主要成分^[23]。阻断systemX_c⁻会抑制半胱氨酸依赖的谷胱甘肽(GSH)合成,进而损害细胞的抗氧化防御能力,从而促进ROS的积累,诱导细胞发生铁死亡。Wang等^[24]人发现敲除Slc7a11基因小鼠体内胱氨酸/半胱氨酸的来源降低,从而限制了随后的GSH合成,增加了细胞对铁超载诱导的铁死亡的敏感性。而b-巯基乙醇(b-ME)可以通过另一种途径促进胱氨酸的摄取,从而绕过对systemX_c⁻的抑制,它可以强烈地抑制由谷氨酸诱导的HT-1080细胞的死亡^[1]。

综上,铁死亡过程中伴随着ROS的积累和脂质过氧化水平的增高,而GPX4通过抗氧化减少细胞内ROS累积来减轻细胞对铁死亡的敏感性,GPX4的水平和活性能影响铁死亡水平。此外,systemX_c⁻通过影响GSH的代谢调节ROS的平衡,为参与铁死亡的重要一环。

Probst等^[25]人使用急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞系为细胞模型,RSL3处理后该细胞系细胞死亡,这种死亡过程伴随着脂质过氧化增加水平的增高,加入脂质过氧化抑制剂Fer-1或脂氧合酶(LOX)后可抑制这种细胞死亡,且铁螯合剂DFO可逆转RSL3触发的细胞死亡,这些结果表明ALL细胞对RSL3诱导的铁死亡敏感。此外,Yang等^[13]人通过检测117个来自不同组织的癌细胞系对erastin敏感性,数据分析结果显示弥漫性大B淋巴瘤(DLBCLs)特别敏感,且在经erastin处理后的DLBCL细胞系中产生了脂质过氧化物,而使用亲脂性抗氧化剂可以挽救细胞死亡,表明在此细胞系

中发生的细胞死亡具有铁死亡的特征。进一步分析了 DLBCL 细胞系和其他造血细胞系对 203 种不同致死化合物的敏感性,发现 DLBCL 细胞系对所有化合物的平均耐药能力较弱,表明 DLBCLs 对 erastin 诱导的 ferroptosis 的敏感性增强并不是由于对所有化合物都具有普遍的敏感性。上述研究表明,白血病和淋巴瘤细胞对铁死亡敏感性高,且伴随 ROS 堆积过多、脂质过氧化水平增高的现象,与目前所知的铁死亡经典通路相符合。

近年来有学者发现急性髓系白血病(AML)和 Burkitt 淋巴瘤对可促进铁死亡的化合物敏感。酪啡肽(Typhaneoside, TYP)是蒲黄花粉提取物中的主要黄酮类化合物,处理 AML 细胞后通过促进 AMP 激活蛋白激酶(AMPK)信号的激活,显著地触发 AML 细胞的自噬,最终导致铁蛋白降解、ROS 积累,同时伴有线粒体功能障碍,最终导致细胞铁死亡^[26]。此外,Wang 等^[27]人研究了青蒿琥酯对 Burkitt 淋巴瘤细胞基因表达及细胞抑制的影响,结果显示青蒿琥酯可诱导 Burkitt 淋巴瘤细胞的铁死亡,从而导致内质网应激反应,激活 ATF4-CHOP-CHAC1 通路,并降解了细胞内的 GSH,从而削弱了淋巴瘤细胞对铁死亡的抵抗能力,增强了 Burkitt 淋巴瘤细胞的铁死亡,这可由 Lip-1、Fer-1 和 DFO 对细胞的保护作用得到证明。这些研究为促铁死亡化合物在血液肿瘤治疗领域的应用提供了新思路。

人淋巴瘤细胞和白血病细胞不能将蛋氨酸转化成胱氨酸,因此,细胞外胱氨酸摄取是其生长和进展所必需的。有趣的是,与其他系统实体瘤中高表达的 SLC7A11 水平相比,在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中 SLC7A11 表达下调,systemX_c⁻转运胱氨酸能力下降,可促进细胞内 ROS 增加,这表明了 CLL 与铁死亡密切相关^[28]。

除了体外研究外,有临床研究结果显示^[29],在 DLBCLs 患者中,GPX4 的表达率为 35.5%(33/93),GPX4 阳性组的总生存期和疾病无进展生存期较 GPX4 阴性组差,这可能与 GPX4 能减少细胞内脂质过氧化水平而降低细胞对铁死亡的敏感性的有关。

综上,细胞发生铁死亡过程中伴随着 ROS 的积累和脂质过氧化为铁死亡发生机制的重要环节,对 GPX4 和 systemX_c⁻等通路的调节最终均通过影响细胞内 ROS 的稳态来改变细胞对铁死亡的敏感性。研究表明,通过多通路调节增加细胞内 ROS 的堆积

可增加白血病及淋巴瘤细胞对铁死亡的敏感性,从而为临床上治疗血液系统肿瘤的药物选择提供了新的研究方向。

2.2 p53 与血液系统肿瘤

人们普遍认为 p53 介导的细胞周期阻滞、凋亡和衰老是抑制肿瘤的主要机制。Jiang 等^[30]人报道,p53 通过抑制 SLC7A11 的转录降低了胱氨酸的摄取,减少细胞内 GSH,增加细胞内 ROS 堆积,从而增加细胞铁死亡的易感性。他们使用了 p53 的一种不能诱导其它形式的细胞凋亡,但保留了调节 SLC7A11 表达的能力的乙酰化缺陷突变体 p53^{3KR},发现 SLC7A11 在许多类型的人类癌症中过表达,而高水平的 SLC7A11 表达可以显著消除 p53^{3KR}诱导的肿瘤生长抑制活性,表明这种抑制活性与细胞周期阻滞、凋亡和衰老无关。同时,他们发现高水平的活性氧可以触发 p53 介导的铁死亡。而 p53 对细胞 ROS 水平的调节作用是一个有趣的过程。在细胞内为低水平或基础 ROS 水平时,p53 可以阻止细胞积累致命水平的 ROS,然而,当 ROS 水平异常升高时,p53 可能会通过铁死亡来促进细胞的清除。由此可知,p53 可以通过影响细胞内 ROS 水平来调节细胞铁死亡水平。

ALOX12 基因位于人类染色体 17p13.1 上,位置非常接近 TP53 位点,部分学者认为许多人类肿瘤已经丢失了一个 ALOX12 等位基因^[31]。Chu 等^[32]人采用分别缺失脂氧合酶六种亚型的 p53^{3KR} H1299 细胞,经过氧化叔丁醇(TBH)处理后检测 ROS 诱导的铁死亡水平,发现 ALOX12 的功能缺失特异阻断了 p53 介导铁死亡,且 SLC7A11 通过特异性结合 ALOX12 来抑制其酶活性,从而证实 p53 可以通过抑制 SLC7A11 的转录从而抑制 systemX_c⁻系统,间接激活 ALOX12 脂氧合酶活性,导致 ROS 诱导下 ALOX12 依赖性的铁死亡,而这条诱导铁死亡的途径独立于 GPX4 途径。因此,p53 可以通过调节 SLC7A11 的转录水平和活性来调控铁死亡水平。进一步研究发现,ALOX12 缺失可抑制 p53 介导的 p53 型铁死亡并加速 myc 诱导的肿瘤发生,在 E μ -Myc 小鼠模型中,损失一个 Trp53 等位基因时会显著加速 Myc 诱发的经典 E μ -Myc 淋巴瘤模型的形成,而丢失一个 ALOX12 等位基因会缩短这类小鼠的中位生存期。

综上,p53 通过调节 ROS 水平增加细胞随铁死亡的敏感性,而 p53 功能性缺失对 E μ -Myc 淋巴瘤

的发生和预后有重要作用。

2.3 铁代谢与血液系统肿瘤

铁是人体内参与多种代谢的重要金属离子之一,对促进铁死亡的发生起着重要作用。铁离子参与铁死亡的具体机制尚不明确,研究表明,在生理条件下,循环游离铁与转铁蛋白结合,体内铁代谢维持稳态,当体内出现铁超载时,血清转铁蛋白结合接近饱和,循环中存在非转铁蛋白结合铁(NTBI)^[4,33-34],而过量的铁可通过 Fenton 反应使细胞内 ROS 含量升高,从而促进铁死亡^[35]。使用枸橼酸铁(FAC)在体外处理小鼠原代肝细胞和骨髓来源巨噬细胞(BMDMs)显著增加了细胞的脂质过氧化水平,降低了 NADPH 含量和细胞生存能力,而铁死亡抑制剂和铁螯合剂可逆转上述改变^[24]。此外该团队还发现,Slc7a11^{-/-}小鼠模型在基础铁条件下不发生铁死亡,高铁饮食引起小鼠体内非转铁蛋白结合铁增高,GSH 水平降低,ROS 水平升高,表明,铁诱导的铁死亡是一个不同于 erastin 诱导的铁死亡的过程。

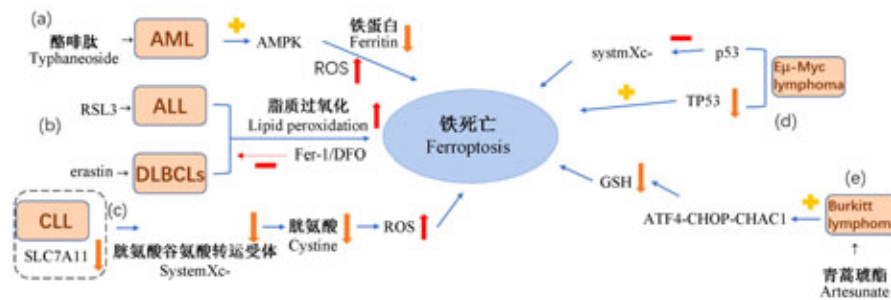
此外还有许多研究结果与其相一致。核受体辅激活因子 4(NCOA4)是铁蛋白在铁死亡中的选择性自噬翻转的选择性受体,Hou 等^[36]人在 PANC1 细胞中敲除 NCOA4,细胞内二价铁水平减低,减少了 erastin 诱导的铁死亡,而通过转染过表达 NCOA4

的细胞中二价铁水平增高,且铁死亡水平增高,因此,NCOA4 介导的铁蛋白降解导致的细胞内铁离子增加参与了铁死亡。GPX4 抑制剂处理的细胞分泌的大量外泌体中含有铁蛋白,在发生铁死亡时,prominin 2 水平与细胞内游离铁水平呈负相关,表明外泌体将细胞内铁排出细胞能保护细胞免于发生铁死亡^[37]。

近年来有学者发现急性髓系白血病(AML)和 Burkitt 淋巴瘤对可促进铁死亡的化合物敏感。双氢青蒿素(DHA)在 G0/G1 期强烈抑制 AML 细胞系的活力并阻滞细胞周期,进一步研究发现,DHA 通过调控 AMPK/mTOR/p70S6k 信号通路的活性诱导自噬,加速铁蛋白的降解,增加不稳定的铁池,促进细胞 ROS 的积累,并伴有线粒体功能障碍,最终导致细胞发生铁死亡^[38]。

此外,与其他系统的恶性肿瘤不同的是,血液系统恶性肿瘤患者由于正常红细胞生成障碍及化疗而需要反复输血治疗,导致体内铁负荷加重。而过量的铁和 ROS 催化产生会通过烟 NADPH 氧化酶(NOX)和 GSH 消耗促进造血干细胞的恶性转化^[39],且在骨髓增生异常综合征中,ROS 诱导的 DNA 损伤可能增加患者进展为白血病的风险^[40]。

上述研究结果表明,过量的铁通过 ROS 途径促进细胞铁死亡的发生,铁蛋白代谢相关途径介导的



注:(a):酪啡肽处理 AML 细胞后可通过激活 AMPK 信号导致 AML 细胞铁死亡,并伴随铁蛋白降解及 ROS 累积;(b):RSL3、erastin 处理 ALL 细胞、DLBCLs 后致细胞发生铁死亡,伴随脂质过氧化水平增高,而抗氧化剂及 DFO 可抑制其发生;(c):CLL 细胞中 SLC7A11 表达下调,systemXc⁻ 转运胱氨酸能力下降,致细胞内 ROS 增加,促进细胞铁死亡;(d):p53 可抑制 systemXc⁻ 而促进 Eμ-Myc 淋巴瘤细胞发生铁死亡,而缺失 TP53 基因会加速 Eμ-Myc 淋巴瘤模型形成;(e):青蒿琥酯可通过激活 ATF4-CHOP-CHAC1 通路并降解 GSH 诱导 Burkitt 淋巴瘤细胞铁死亡。

图 1 铁死亡与血液系统肿瘤

Note. (a), Typhaneoside treatment of AML cells resulted in ferroptosis in AML cells by activating AMPK signaling, accompanied by ferritin degradation and ROS accumulation. (b), RSL3 and erastin treatment of ALL and DLBCLs resulted in ferroptosis, accompanied by increased lipid peroxidation, which was inhibited by antioxidant and DFO. (c), Expression of SLC7A11 in CLL cells was down-regulated, and the systemXc⁻ transporter cystine ability was decreased, leading to the increase of intracellular ROS and the promotion of cell ferroptosis. (d), p53 inhibits systemXc⁻ and promotes ferroptosis in Eμ-Myc lymphoma cells, while the deletion of TP53 gene accelerates the formation of Eμ-Myc lymphoma model. (e), Artesunate can induce ferroptosis in Burkitt lymphoma cells by activating ATF4-CHOP-CHAC1 pathway and degrading GSH.

Figure 1 Ferroptosis and hematological malignant tumor

细胞内铁离子水平变化也与铁死亡密切相关,调节铁的代谢稳态可影响 AML 细胞对铁死亡的敏感性,而白血病的疾病进展也会增加患者体内铁的蓄积。

3 总结与展望

铁死亡是由 Erastin、RSL3 等小分子诱导的一种细胞死亡模式,由 GPX4、GSH 代谢、铁代谢等多通路调控,其发生发展伴随着 ROS 的堆积,导致细胞膜发生脂质过氧化,其具体发生机制还需进一步研究。细胞死亡模式的研究仍是攻克治疗肿瘤难题的重要环节之一,近年来铁死亡在肿瘤领域的研究中较为热门,许多研究表明,通过调节铁死亡诱导因子水平、细胞内 ROS 产生和消亡的平衡以及调控铁代谢稳态能增加部分白血病及淋巴瘤细胞对铁死亡的敏感性,从而达到杀死肿瘤细胞的作用,也发现了多种化合物与肿瘤细胞发生铁死亡密切相关,且铁死亡诱导因子水平与疾病的预后相关。而血液系统肿瘤疾病进展及治疗带来的变化也会对铁死亡过程产生影响。但现有的铁死亡在血液肿瘤中的研究仍处于起步阶段,尚不成熟,需要进一步的体外实验验证铁死亡对血液肿瘤细胞的作用及机制,期望将来能有更多相关研究,为白血病及淋巴瘤的治疗方案提供新的思路。

参考文献:

- [1] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [2] Gao M, Monian P, Pan Q, et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1021–1032.
- [3] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369–379.
- [4] Gao M, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298–308.
- [5] Zou Y, Palte MJ, Deik AA, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1617.
- [6] Friedmann Angeli JP, Krysko DV, Conrad M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(7): 405–414.
- [7] Shen Z, Song J, Yung BC, et al. Emerging strategies of cancer therapy based on ferroptosis [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(12): e1704007.
- [8] Su LJ, Zhang JH, Gomez H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5080843.
- [9] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273–285.
- [10] Lundgren CAK, Sjöstrand D, Biner O, et al. Scavenging of superoxide by a membrane-bound superoxide oxidase [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(8): 788–793.
- [11] Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway [J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 453–457.
- [12] Zilka O, Shah R, Li B, et al. On the mechanism of cytoprotection by ferrostatin-1 and liproxstatin-1 and the role of lipid peroxidation in ferroptotic cell death [J]. *ACS Cent Sci*, 2017, 3(3): 232–243.
- [13] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1–2): 317–331.
- [14] Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133(3): 144–152.
- [15] Sui X, Zhang R, Liu S, et al. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ros production in colorectal cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1371.
- [16] Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165–176.
- [17] Pedro FAJ, Manuela S, Bettina P, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator GPX4 triggers acute renal failure in mice [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180–1191.
- [18] Alim I, Caulfield JT, Chen Y, et al. Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke [J]. *Cell*, 2019, 177(5): 1262–1279.
- [19] Ingold I, Berndt C, Schmitt S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 409–422.
- [20] Gaschler MM, Andia AA, Liu H, et al. FINO₂ initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(5): 507–515.
- [21] Shimada K, Skouta R, Kaplan A, et al. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(7): 497–503.
- [22] Koppula P, Zhang Y, Zhuang L, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 12.
- [23] Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, et al. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress [J]. *Neuron*, 1989, 2(6): 1547–1558.
- [24] Wang H, An P, Xie E, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis [J]. *Hepatology*, 2017, 66(2): 449–465.
- [25] Probst L, Dächert J, Schenk B, et al. Lipoxygenase inhibitors protect acute lymphoblastic leukemia cells from ferroptotic cell death [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 140: 41–52.

- [26] Zhu HY, Huang ZX, Chen GQ, et al. Typhaneoside prevents acute myeloid leukemia (AML) through suppressing proliferation and inducing ferroptosis associated with autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(4): 1265–1271.
- [27] Wang N, Zeng GZ, Yin JL, et al. Artesunate activates the ATF4-CHOP-CHAC1 pathway and affects ferroptosis in Burkitt's Lymphoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(3): 533–539.
- [28] Chen RS, Song YM, Zhou ZY, et al. Disruption of xCT inhibits cancer cell metastasis via the caveolin-1/beta-catenin pathway [J]. *Oncogene*, 2009, 28(4): 599–609.
- [29] Kinowaki Y, Kurata M, Ishibashi S, et al. Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(5): 609–619.
- [30] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57–62.
- [31] Liu Y, Chen C, Xu Z, et al. Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms [J]. *Nature*, 2016, 531(7595): 471–475.
- [32] Chu B, Kon N, Chen D, et al. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5): 579–591.
- [33] Song H, Her AS, Raso F, et al. Cysteine oxidation reactions catalyzed by a mononuclear non-heme iron enzyme (OvoA) in ovothiol biosynthesis [J]. *Org Lett*, 2014, 16(8): 2122–2125.
- [34] Masaldan S, Clatworthy SAS, Gamell C, et al. Iron accumulation in senescent cells is coupled with impaired ferritinophagy and inhibition of ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 100–115.
- [35] Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(1): 9–17.
- [36] Hou W, Xie Y, Song X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. *Autophagy*, 2016, 12(8): 1425–1428.
- [37] Strzyz P. Iron expulsion by exosomes drives ferroptosis resistance [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 4–5.
- [38] Du J, Wang T, Li Y, et al. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131(1): 356–369.
- [39] Rassool FV, Gaymes TJ, Omidvar N, et al. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? [J]. *2007*, 67(18): 8762–8771.
- [40] Hole PS, Zabkiewicz J, Munje C, et al. Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling [J]. *Blood*, 2013, 122(19): 3322–3330.

〔收稿日期〕2020-04-09

陈研色,潘庆军,刘华锋,等. Rab7介导线粒体和溶酶体互作机制新进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 120-127.
Chen YS, Pan QJ, Liu HF, et al. Research progress on mechanisms of Rab7-mediated mitochondria-lysosome crosstalk [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 120-127.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.020

Rab7介导线粒体和溶酶体互作机制新进展

陈研色,潘庆军,刘华锋,王淑君*

(湛江市慢性肾脏病防控重点实验室,广东医科大学附属第一医院肾脏疾病研究所,广东 湛江 524001)

【摘要】 溶酶体不仅是细胞中物质的降解中心,更是许多物质代谢过程和细胞生长的重要代谢传感器,类似的,线粒体也是决定细胞命运的主要代谢中心,两者通过相互作用对细胞代谢进行共同调节,溶酶体与线粒体功能障碍或相互作用异常,与代谢性疾病、神经退行性病变和溶酶体贮积症等疾病存在密切关系。目前我们认识到线粒体与溶酶体通过线粒体自噬、线粒体衍生的囊泡和线粒体-溶酶体膜接触位点等途径进行相互作用。然而,调控这些途径的机制尚未明确,近年,研究表明,Rab7蛋白参与了线粒体和溶酶体相互交谈过程中的关键环节,包括线粒体自噬体形成、线粒体自噬体与溶酶体融合以及线粒体-溶酶体接触与解离的过程等等。因此,本文对Rab7在线粒体与溶酶体相互交谈中的调节作用进行综述,这将为线粒体与溶酶体功能障碍性疾病的发生提供新的理论依据。

【关键词】 线粒体;溶酶体;线粒体-溶酶体互作;Rab7

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0120-08

Research progress on mechanisms of Rab7-mediated mitochondria-lysosome crosstalk

CHEN Yanse, PAN Qingjun, LIU Huafeng, WANG Shujun*

(Key Laboratory of Prevention and Management of Chronic Kidney Disease of Zhanjiang City, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

【Abstract】 Lysosomes are not only the degradation center for substances in cells, but also an important metabolic sensor for many substances, metabolic processes, and cell growth. Similarly, mitochondria are the main metabolic centers that determine the fate of cells. Together, these two organelles jointly regulate cell metabolism through interactions with each other, and their dysfunction is closely related to metabolic diseases, neurodegenerative diseases, and lysosomal storage diseases. At present, we recognize that mitochondria interact with lysosomes through mitophagy, mitochondrial-derived vesicles, and mitochondrial-lysosomal membrane contact sites. However, the mechanisms regulating these pathways remains unclear. In recent years, Rab7 protein has been implicated in processes of mitochondria-lysosome crosstalk, including the formation of mitochondrial autophagosomes, fusion of mitochondrial autophagosomes with lysosomes, and mitochondrial-lysosome contact and dissociation. In this article, we review the role of Rab7 in crosstalk between mitochondria and lysosomes, which provides a new theoretical basis for disease involving mitochondrial and lysosomal dysfunction.

【Keywords】 mitochondria; lysosome; mitochondrial-lysosomal crosstalk; Rab7

【基金项目】 国家自然科学基金(81670654);广东省中医药局科研项目(20202096);广东省青年创新人才类项目(2018KQNCX092);广东省医学科学技术研究基金项目(A2020404)。

【作者简介】 陈研色(1993—),女,硕士研究生,研究方向:肾小管疾病。E-mail:237206919@qq.com

【通信作者】 王淑君(1984—),女,博士,研究方向:肾小管间质损伤及防治研究。E-mail:wangshujun117@126.com

近年,细胞器在物理和功能层面相互作用成为新的研究领域,随之,线粒体与溶酶体的相互作用也被科学家逐渐认识。溶酶体不仅是细胞中物质的降解中心,更是许多物质代谢过程和细胞生长的重要代谢传感器^[1],类似的,线粒体也作为决定细胞的命运的主要的代谢中心被科学家重新认识^[2]。两者通过细胞器间的相互作用,在维持正常细胞代谢起重要作用。溶酶体与线粒体功能障碍或相互作用异常与多种疾病相关,包括 2 型腓骨肌萎缩症^[3]、溶酶体贮积症^[4]和多种神经退行性病变^[5]。

目前,溶酶体与线粒体也被认识到对细胞代谢具有共同的调节作用,并且两者可通过以下方式发生相互作用,例如:细胞通过选择性自噬机制清除受损伤或不需要的线粒体的过程^[6],即线粒体自噬,在此过程中,损伤的线粒体通过与溶酶体融合并被溶酶体降解;在线粒体应激时,线粒体包裹线粒体外膜、内膜或者基质的蛋白载体以发芽的方式形成囊泡,其最终与溶酶体结合,使传递至溶酶体的氧化产物得到清除而维持了线粒体以及细胞的稳态^[7];通过形成线粒体-溶酶体的膜接触点维持两者的动态平衡^[8]。

Rab7 是调控早期内体向晚期内体的成熟、晚期内体向溶酶体的转运与融合进程中重要的分子^[9]。目前,发现 Rab7 通过参与线粒体自噬体的形成^[10]、线粒体自噬体与溶酶体的融合^[10]和调节线粒体-溶酶体的接触与解离^[11]等过程进而在调节两者相互作用起重要作用,因此,本文综述了 Rab7 在线粒体与溶酶体相互交谈中的作用(见图 1),为线粒体与溶酶体功能障碍性疾病发生以及防治提供理论依据。

1 Rab7 的主要作用和功能

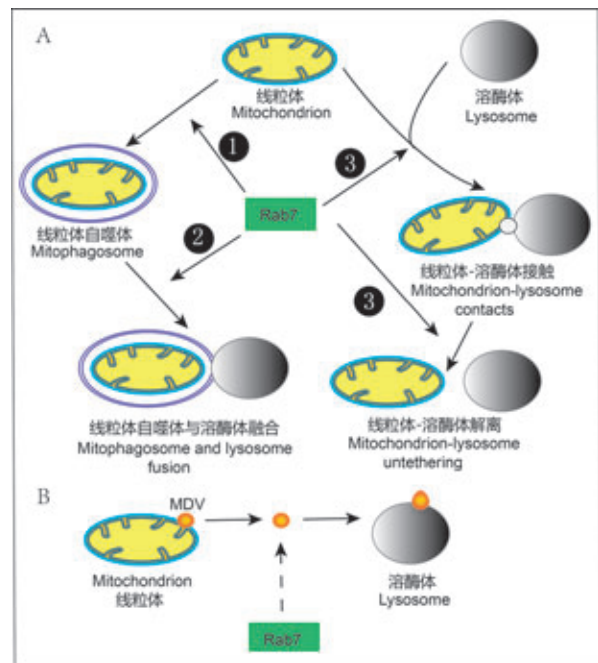
Rab 蛋白属于 GTP 酶家族,主要参与膜的转运过程^[9]。Rab7 是 Rab 家族中的一种小 G 蛋白,哺乳动物有两种 Rab7,分别是 Rab7a 和 Rab7b,两者有 50%的同源性,在膜转运的不同的阶段起作用,Rab7a(NCBI 核酸序列号 NM-004637;酵母 ypt7p 的同源基因)主要位于晚期核内体,调节早期核内体向晚期核内体以及晚期核内体向溶酶体的转运,Rab7b 则主要负责核内体向高尔基体的转运^[9]。本文重点介绍 Rab7a 亚型,以下简称 Rab7。

目前对 Rab7 在内吞途径的作用研究较为具体^[12],Rab7 通过替换 Rab 家族的另一个成员

Rab5,参与晚期内体的成熟过程,Rab7 与下游效应因子 Rab7-溶酶体相互作用蛋白(Rab7-interacting lysosomal protein, RILP)及同型融合及液泡蛋白分选复合物(homotypic fusion and vacuole protein sorting complex, HPOS)相互作用调节内体和溶酶体融合过程。Rab7 通过与 RILP 或 FYVE 与卷曲螺旋结构域蛋白 1(Fab1-YotB-Vac1P-EEA1 and coiled-coil domain containing 1, FYCO1)分别参与内体在微管上的负向和正向运输。显然,Rab7 是调控早期内体向晚期内体的成熟、晚期内体向溶酶体的转运与融合进程中重要的分子。

2 线粒体-溶酶体互作

线粒体是细胞进行有氧呼吸与能量代谢的主



注:A: Rab7 蛋白参与了线粒体和溶酶体相互调节过程中的关键环节,包括 调控线粒体自噬体形成, 促进线粒体自噬体与溶酶体融合以及 促进线粒体-溶酶体接触与解离的过程。B: Rab7 调节 MDV(线粒体衍生的囊泡)的过程有待进一步明确。

图 1 Rab7 在线粒体与溶酶体交互调节中的作用示意图

Note. A, Rab7 is involved in a key link in the mutual regulation of mitochondria and lysosomes, including regulating the formation of mitophagosomes, promoting the fusion of mitophagosomes and lysosomes and promoting the process of mitochondria-lysosomes contacts and dissociation. B, The process by which Rab7 regulates MDV (mitochondrial - derived vesicles) needs to be further clarified.

Figure 1 Schematic diagram of the role of Rab7 in the interactive regulation of mitochondria and lysosomes

要场所,通过合成 ATP 为细胞提供能量,除此以外,也是钙、铁、脂质等物质的储存场所,并且参与细胞信号传导与程序性细胞凋亡的过程^[2]。另一方面,溶酶体是真核细胞重要降解与回收的中心,具有单层膜结构并富含 60 多种酸性水解酶^[1]。溶酶体通过降解而回收外源性和细胞内异常的大分子物质,为细胞提供氨基酸、脂质等营养物质,可以存储钙和铁离子,并且参与细胞凋亡,分泌,免疫防御,质膜修复,细胞信号传导和能量代谢等细胞过程^[1]。因此,线粒体与溶酶体在维持细胞稳态起重要的作用。

近年来,研究发现在帕金森、阿尔茨海默病和肌萎缩性脊髓侧索硬化症等神经退行性病变中同时出现溶酶体和线粒体功能异常^[5],而线粒体功能受损时可促发溶酶体损伤^[13],溶酶体功能受损时也可反过来促发线粒体功能异常^[14]。这些证据,均提示溶酶体与线粒体可能存在相互作用,事实上,已有研究证实溶酶体与线粒体可通过以下几种方式相互发生交谈。

2.1 线粒体自噬

有核细胞在饥饿及应激状态下,通过双层膜结构包裹待降解物质形成自噬体,并最终与溶酶体结合形成自噬溶酶体,其包裹的内容物在溶酶体酶的作用下被降解的过程,称为自噬^[15]。而在细胞应激时,细胞通过选择性自噬机制清除受损伤或不需要的线粒体,这一过程称为线粒体自噬^[6]。各种病理因素作用下,线粒体受损出现内膜持续去极化,从而使 PTEN 诱导的 PINK1 在线粒体外膜稳定表达。PINK1 磷酸化线粒体外膜蛋白 Mfn2,反过来可招募 Parkin 至线粒体外膜并使相关的蛋白发生泛素化,后被泛素化结合蛋白 p62 标记后形成自噬体,最后与溶酶体结合清除损伤线粒体,这是 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬途径^[6]。除此以外,线粒体相关受体,包括 AMBRA1^[16],FUNDCl^[17]和 Nix/BNIP3L 也相继被发现,这些线粒体相关受体通过与 LC3 的相互作用区域(LC3 interacting region, LIR)发生相互作用,使得线粒体逐渐被自噬小泡包裹。而在线粒体自噬终末端,溶酶体与以上途径形成的自噬小体融合,在此过程中溶酶体与线粒体相互作用是保证受损线粒体被降解与清除最关键步骤。

2.2 线粒体衍生的囊泡 (mitochondrial-derived vesicles, MDVs)

MDVs 是实现线粒体与溶酶体之间进行分子转

移及相互作用的另一种非依赖经典自噬通路途径^[7]。线粒体应激时,线粒体选择性包裹线粒体外膜、内膜或者基质的蛋白载体以发芽的方式形成囊泡的过程称为 MDVs。MDVs 的形成与线粒体自噬有相似之处,同样需要 PINK1 募集并活化线粒体外膜的 Parkin^[18],但沉默自噬的主要元素 Atg5, Beclin-1 或 Rab9,线粒体仍可形成 MDVs,并且 MDVs 与 LC3 不发生共定位,说明 MDVs 的产生不依赖于经典自噬途径^[18-19]。MDVs 形成后最终通过与溶酶体结合,使传递至溶酶体的氧化产物得到清除而维持了线粒体以及细胞的稳态。

2.3 mTOR/TFEB 调控体系

转录因子 EB(transcription factor EB, TFEB)与溶酶体基因启动子区域 CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation)网络相连,可使溶酶体相关基因表达增高,从而增强溶酶体的生物合成及功能^[20]。近年来研究发现,TFEB 也可调控线粒体的生成,过表达 TFEB 可促进调节线粒体生成的转录因子 PGC1- α (peroxisome proliferative activated receptor- γ (PPAR γ) co-activator 1 α)的 mRNA 水平与蛋白的表达,沉默 TFEB 抑制了 PGC1- α 的表达与线粒体蛋白的生成,说明 TFEB 可通过 PGC1- α 依赖的途径促进线粒体生成^[21]。除此以外,研究发过表达 TFEB 的小鼠线粒体生成相关基因 NRF1, NRF2 和 TFAM 的表达增加,并且,沉默 PGC1- α 不影响 NRF1, NRF2 和 TFAM 的表达,说明 TFEB 还可通过非依赖 PGC1- α 的途径促进线粒体生成与功能^[22]。

此外,TFEB 主要受哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 磷酸化调节,在细胞营养缺乏时,溶酶体信号复合物 Rag GTPase(Rags)失活,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 C1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)从溶酶体上解离,从而导致 TFEB/14-3-3 分离及去磷酸化入核结合 CLEAR 网络,进而启动溶酶体生成^[23]。研究发现,在神经细胞,抑制 mTORC1 可促进线粒体应激与调节线粒体活性^[24]。说明,线粒体与溶酶体有共同的调控体系。

2.4 线粒体-溶酶体接触点

细胞器间的膜接触点是指两个不同的细胞器的膜之间形成的紧密接触,使它们能够在细胞内进行互相交流^[25]。内质网与其它细胞器包括:质膜、高尔基体、线粒体、过氧化物酶体、脂滴以及核内体

的相互作用早见报道^[25],但近年研究发现除外内质网的其它细胞器间,如溶酶体、脂滴和过氧化物酶体等细胞器间也存在接触^[26]。

线粒体-溶酶体的膜接触点即是线粒体与溶酶体的膜之间形成的紧密接触,使两者能在细胞内进行信息交流^[8]。目前,多项研究利用电子成像技术证实了在健康状态下多种细胞类型线粒体和溶酶体之间形成接触点^[11, 27-28],线粒体-溶酶体接触点在线粒体与溶酶体膜之间平均距离约为 10 nm^[11],大约 15%的溶酶体在任意时间可与线粒体形成接触点,两者稳定的平均接触时间约 60 s^[11],甚至可延长到 13 min^[29]。在线粒体-溶酶体膜接触点之间,未观察到溶酶体内容物、线粒体基质蛋白或跨膜蛋白转移,并且自噬或线粒体自噬发生的生物标记物 ULK1、Atg5、Atg12、LC3 不表达^[11],沉默自噬相关受体(NDP52、OPTN、NBR1、TAX1BP1 和 p62)不影响线粒体-溶酶体膜接触点形成^[30],显然,线粒体-溶酶体膜接触点形成是区别于线粒体自噬的独立事件。

线粒体-溶酶体的相互作用既确保两者动态平衡,也在维持细胞稳态中具有重要的意义。然而,线粒体-溶酶体的相互作用的机制尚未明确。近年来,研究发现 Rab7 也在上述线粒体-溶酶体相互作用进程中起关键的作用,Rab7 是调节线粒体自噬体与线粒体-溶酶体接触位点形成的重要分子之一。

3 Rab7 参与线粒体自噬体的形成

学者们最初在 A 群链球菌的感染中发现 Rab7 在早期阶段自噬溶酶体样空泡形成起重要作用^[31],A 型链球菌通过内吞途径进入细胞,正常状态下,从内体逃逸出来的链球菌被自噬体捕获后与溶酶体融合形成自噬溶酶体^[31],沉默 Rab7 抑制了 A 型链球菌感染过程中自噬溶酶体空泡形成^[32],这提示 Rab7 参与了自噬体的形成。

线粒体自噬是一种通过选择性地清除受损伤或不需要线粒体的自噬途径。PINK1/Parkin 线粒体自噬的主要途径,PINK1 和 Parkin 蛋白是在哺乳动物的线粒体自噬过程中两个重要蛋白,当线粒体损伤,线粒体膜电位下降而引起 PINK1 蛋白在损伤线粒体积累,进而招募 Parkin 蛋白使线粒体外膜蛋白发生泛素化,从而介导线粒体自噬的发生^[6]。那么,Rab7 是否参与 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬过程呢?首先,有学者发现沉默 Rab7a 可显著的

影响线粒体的清除,而表达 Rab7a 可恢复对线粒体的清除。继之,Yamano 等^[33]发现 Rab7 在线粒体自噬体的早期形成阶段起调节作用。TBC1D15 和 TBC1D17 均为 Rab7 的 GTP 酶活化蛋白(Rab-GAP),TBC1D15 既可通过与线粒体分裂蛋白 Fis1 结合与线粒体相关联,并可与 LC3/GABARAP/Atg8 家族蛋白相互作用而与自噬体相关联^[34-35]。有趣的是,研究发现在 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬途径中,沉默 TBC1D15 或 Fis1 细胞中大量的自噬泡包绕着损伤的线粒体但是并未与线粒体结合^[33],提示 Rab7 失活可能参与了早期线粒体自噬体形成。而 Parkin 活化后反作用于下游效应因子 TBC1D15,后者通过与线粒体外膜蛋白 fission1 (FIS1) 及 Atg8 家族成员 GABARAP 相互作用抑制 Rab7a 活性,从而调控线粒体自噬过程中自噬泡的生成与线粒体形态^[33]。同时,TBC1D15 的同源蛋白 TBC1D17,也同样被证实通过与 TBC1D15 形成同源二聚体,进一步与 FIS1 蛋白结合而参与线粒体自噬过程^[33],说明,Rab7a 调控了线粒体自噬体生成。

此外,在缬氨霉素诱导的线粒体自噬中发现^[36],损伤的线粒体可招募 Rab7a 与 MON1/CCZ1 而形成 MON1/CCZ1Rab7a GEF 复合体,不仅如此,Rab7a 上游的两个 Rab 家族成员 Rab5 和其鸟嘌呤核苷酸交换分子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)RabX-5 也被同时招募至损伤的线粒体。其中,RabX-5 的线粒体招募依赖于 Parkin 活化。RabX-5 活化 Rab5 后进而作用于其效应因子 MON1/CCZ1,反过来可使 Rab7a 被招募至损伤线粒体。还有研究表明,Rab7 也可通过 Rab7 的效应器异源五聚体运输复合物(retromer trafficking complex, Retromer)和 Rab7a 的下游 GTP 活化蛋白 TBC1D5 相互作用调控线粒体自噬^[37]。针对 Retromer 和 TBC1D5 如何调控线粒体自噬,学者在线粒体自噬进程^[38],观察到 Rab7a 包绕 Parkin 或线粒体外膜蛋白(translocase of outer membrane 20, TOM20)标记的损伤线粒体结构,而当沉默 Retromer 的亚基 VPS29 或 VPS35,则未能观察到此现象,说明 TBC1D5 与 Retromer 的亚基 VPS29 或 VPS35 结合从而反过来抑制 Retromer 活性而发挥相互作用。说明,Rab7 在线粒体自噬体早期形成的阶段具有重要的意义,此过程需要 PINK1、Parkin、TBC1D15、TBC1D17 和 Retromer 等蛋白的协同。

4 Rab7 参与线粒体自噬体与溶酶体的融合过程

受 Rab7 在内体转运与融合作用的启发, Rab7 调节自噬体与溶酶体的融合也被学者广泛研究。首先, 学者们在沉默 Rab7 的真核细胞中发现自噬泡与溶酶体融合受阻导致出现大量自噬泡堆积^[39], 随后, Rab7 参与自噬体与溶酶体融合的机制也被深入研究。有学者发现, 自噬体形成后通过与溶酶体的融合降解其内容物, 可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感的融合蛋白 (N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein, NSF) 附着蛋白 (soluble NSF attachment protein, SNAP) 受体 (SNAP receptors, SNARE) 可创建膜的开口, 并通过与同源融合和蛋白分选 (homotypic fusion and protein sorting, HOPS) 复合体及 Rab7 集合, 这确保了相邻的自噬体与溶酶体有效的融合^[40]。有研究表明, Rab7/Ypt7 还可通过 Vps41 和 Vps39 与 HOPS 形成的 Rab7/Ypt7-HOPX 复合体桥接 2 个融合膜, 促进启动阶段自噬体与溶酶体的融合^[41]。此外, Rab7 通过与 EPG5 和 R-SNARE VAMP7-VAMP8 蛋白相互作用形成 STX17-SNAP29 复合体而促使自噬体与溶酶体的粘附融合^[42]。因此, Rab7 参与自噬体与溶酶体融合。

线粒体自噬体-溶酶体的融合进程与自噬体-溶酶体并非完全相同, 最早, Yamano 等^[33,36]学者在线粒体自噬过程中观察到沉默 Rab7 可使损伤的线粒体不能被自噬体包裹。ATG9A 通常存在于细胞浆的囊泡结构中, 而我们知道, 这些含有 ATG9A 的囊泡或膜状结构是自噬溶酶体膜形成的主要来源, 在线粒体自噬被诱导的过程中, ATG9A 会被大量的募集到线粒体^[43], 然而, 有研究发现, 沉默 Rab7 损害了 ATG9A 在线粒体膜上的组装过程^[44]。实际上, Rab7 与 ATG9a 存在一定程度的相互作用, 此过程主要受 Retromer VPS35 的调节。这些研究结果, 均提示 Rab7 活性可能参与线粒体自噬体与溶酶体融合过程。近年还有学者进一步发现 PINK1/Parkin 依赖的线粒体自噬过程中, Rab7 同样介导线粒体自噬体与溶酶体融合, 在此过程中 TBC1D15 即 GTPase 活性起主要的调节作用^[45-46]。因此, Rab7 通过促进线粒体自噬体与溶酶体融合而参与线粒体溶酶体相互作用过程。

5 Rab7 磷酸化与线粒体自噬的调节

Rab7 的活性主要受翻译后修饰调节, 例如 S72

位点丝氨酸-苏氨酸磷酸化修饰, 与 Y183 位点酪氨酸磷酸化修饰^[47]。有趣的是, 学者们发现, Rab7 S72 位点可被 PTEN (phosphatase and tensin homolog) 去磷酸化, 而 PTEN 对线粒体自噬具有调节作用^[48]。相似的, Rab7 受 TBK1 (TRAF family-associated NF- κ B activator binding kinase 1) 磷酸化调节而促进 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬途径也被报道^[49]。

Rab7 S72 位点磷酸化减弱其与 GDI 以及 GGT 酶复合物的相互作用, 另一方面, 增强与 FLCN-FNP1 (folliculin and the folliculin-interacting protein 1) 蛋白的关联性。我们知道, FLCN-FNP1 蛋白可被损伤的线粒体招募并促进 PINK1/Parkin 依赖的线粒体自噬过程^[50-51], 当在细胞中敲进 Rab7 S72 A 使 Rab7 发生突变不能磷酸化这一过程受到抑制。实际上, Rab7 S72 A 不仅影响有效的线粒体自噬, 也被证实影响 ATG9 阳性的自噬体包裹损伤线粒体, 这说明了 Rab7 磷酸化也调节了线粒体自噬体的早期形成过程。

6 Rab7 调节线粒体-溶酶体的接触与解离

近年, 美国西北大学费恩伯格医学院的研究首次在形态学上发现线粒体与溶酶体存在直接的物理接触, 为线粒体-溶酶体的相互交谈提出了新的见解, 线粒体与溶酶体接触的形成可调节线粒体的分裂与溶酶体动态平衡, 并且与两者间的物质转运有关^[11]。此过程涉及多个线粒体与溶酶体膜蛋白的相互作用, 而 Rab7 蛋白在调节线粒体溶酶体接触与解离过程中的作用尤其重要。首先, 在线粒体-溶酶体接触阶段, Rab7 在调节线粒体与溶酶体的接触与解离中起重要作用, Rab7 通过与溶酶体的 GTP 结合活化促进了其与线粒体接触, 并且, 当通过高表达 Rab7 Q67 L 持续活化 Rab7 GTP 时, 可延长线粒体与溶酶体接触。反之, 当 Rab7 与 GDP 结合处于非活化状态则线粒体与溶酶体解离^[11]。

随后出现的线粒体-溶酶体解离过程也受 Rab7 调节, 线粒体外膜蛋白 Fis1 通过招募胞浆 TBC1D15 (Rab7 GAP) 至线粒体, TBC1D15 通过与溶酶体接触点处的 Rab7 结合并水解 GTP 转换为 GDP, Rab7-GDP 从溶酶体释放出来, 从而促使线粒体-溶酶体解离^[35, 52]。学者们进一步发现当基因突变或者沉默 Fis1 和 TBC1D15 蛋白, 可使已形成的线粒体-溶酶体接触位点则不能发生解离或者接触时间延长,

然而,这并不影响线粒体-溶酶体接触的形成^[35],说明 Fis1 和 TBC1D15 蛋白主要通过与 Rab7 相互作用影响线粒体-溶酶体接触后解离的过程。因此,Rab7 对线粒体与溶酶体的接触形成和解离具有重要的作用,此过程涉及 Rab7 的活化、转换、运输与定位并需要 TBC1D15 和 Fis1 的协同作用。

除此以外,Rab7 还可以通过线粒体-溶酶体膜接触点对两者进行双向的调控。首先,线粒体-溶酶体接触点为线粒体相关蛋白通过调控 Rab7 GTP 结合进而调节溶酶体提供了一个平台,学者发现当 TBC1D15 与线粒体外膜结合使 Rab7 GTP 酶水解促进线粒体溶酶体解离的同时,也促使了溶酶体膜的 Rab7 效应蛋白释放,进而调节了溶酶体动态,而 TBC1D15 突变使 GAP 活性受抑制则导致溶酶体体积增大^[11],说明 Rab7 不仅通过在调节线粒体-溶酶体接触过程中也调控了溶酶体动态。其次,Rab7 通过线粒体-溶酶体接触点而调控线粒体也得到证实,当抑制 Rab7 GTP 酶水解而破坏线粒体-溶酶体接触点解离时,线粒体分裂减少,线粒体网状结构被破坏^[11]。

7 其它

正如前面所述,Rab7 参与线粒体自噬与线粒体溶酶体接触形成,鉴于其在膜结构的形成过程中的重要作用,Rab7 即使调节线粒体衍生的囊泡的过程也是不足为奇的,然而,这有待进一步明确。mTOR/TFEB 信号通路是调节线粒体与溶酶体的共同通路,Rab7 GAP TBC1D5 也被发现可通过与 Retromer 相互作用在调节 mTOR 活性的过程起重要的作用^[53]。

8 结语

线粒体和溶酶体对细胞的正常代谢都是至关重要的,线粒体为细胞产生能量,溶酶体则主要回收细胞的废弃物。线粒体和溶酶体存在相互交谈,两者的功能也存在关联,两者发生功能障碍与 2 型腓骨肌萎缩症、溶酶体贮积症和多种神经退行性疾病等疾病存在密切关系。线粒体和溶酶体拥有共同的 mTOR/TFEB 调控体系,并可能通过线粒体自噬、线粒体衍生的囊泡和线粒体-溶酶体接触位点等途径发生相互作用。Rab7 蛋白参与了线粒体和溶酶体相互作用过程中的关键环节,包括早期驱动富含 Atg9A 的膜结构形成吞噬泡包裹损伤的线粒

体,介导 PINK1/Parkin 依赖的线粒体自噬体形成;线粒体自噬体与溶酶体融合;介导线粒体-溶酶体接触与解离的过程,进而双向调控线粒体与溶酶体等等。因此,特异性靶向 Rab7 的治疗策略为今后有效控制线粒体与溶酶体功能障碍性疾病开辟了新的研究方向。但 Rab7 与线粒体溶酶体互作之间的关系错综复杂,线粒体溶酶体互作受到多个分子、多种通路的调控,目前尚未完全研究明确。如何特异性靶向 Rab7 并减少不良反应,无疑是个极大挑战。因此,调控 Rab7 以维持线粒体溶酶体互作的稳态,在治疗线粒体与溶酶体功能障碍性疾病中具有广阔的应用前景,但仍需大量研究工作。

参考文献:

- [1] Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9): 623-635.
- [2] Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 335-343.
- [3] Wong YC, Peng W, Krainc D. Lysosomal regulation of inter-mitochondrial contact fate and motility in charcot-marie-tooth type 2 [J]. *Dev Cell*, 2019, 50(3): 339-354.
- [4] Lim JA, Li L, Kakhlon O, et al. Defects in calcium homeostasis and mitochondria can be reversed in Pompe disease [J]. *Autophagy*, 2015, 11(2): 385-402.
- [5] Audano M, Schneider A, Mitro N. Mitochondria, lysosomes, and dysfunction: their meaning in neurodegeneration [J]. *J Neurochem*, 2018, 147(3): 291-309.
- [6] Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42.
- [7] Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, et al. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles [J]. *EMBO J*, 2014, 33(19): 2142-2156.
- [8] Wong YC, Kim S, Peng W, et al. Regulation and function of mitochondria-lysosome membrane contact sites in cellular homeostasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(6): 500-513.
- [9] Progida C, Cogli L, Piro F, et al. Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(9): 1480-1491.
- [10] Tan EHN, Tang BL. Rab7a and mitophagosome formation [J]. *Cells*, 2019, 8(3): 224.
- [11] Wong YC, Ysselstein D, Krainc D. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis [J]. *Nature*, 2018, 554(7692): 382-386.
- [12] Guerra F, Bucci C. Multiple roles of the small GTPase Rab7 [J]. *Cells*, 2016, 5(3): 34.
- [13] Baixauli F, Acín-Pérez R, Villarroya-Beltrí C, et al. Mitochondrial respiration controls lysosomal function during

- inflammatory T cell responses [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(3): 485–948.
- [14] Demers-Lamarche J, Guillebaud G, Tlili M, et al. Loss of mitochondrial function impairs lysosomes [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(19): 10263–10276.
- [15] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460–473.
- [16] Van Humberck C, Cornelissen T, Vandenberghe W. Ambra1: a Parkin-binding protein involved in mitophagy [J]. *Autophagy*, 2011, 7(12): 1555–1556.
- [17] Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(2): 177–185.
- [18] McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, et al. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control [J]. *EMBO J*, 2014, 33(4): 282–295.
- [19] Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, et al. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(2): 135–141.
- [20] Palmieri M, Impey S, Kang H, et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(19): 3852–3866.
- [21] Evans TD, Zhang X, Jeong SJ, et al. TFEB drives PGC-1 α expression in adipocytes to protect against diet-induced metabolic dysfunction [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(606): eaau2281.
- [22] Kim HJ, Joe Y, Rah SY, et al. Carbon monoxide-induced TFEB nuclear translocation enhances mitophagy/mitochondrial biogenesis in hepatocytes and ameliorates inflammatory liver injury [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1060.
- [23] Napolitano G, Ballabio A. TFEB at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(13): 2475–2481.
- [24] Khan NA, Nikkanen J, Yatsuga S, et al. mTORC1 regulates mitochondrial integrated stress response and mitochondrial myopathy progression [J]. *Cell Metab*, 2017, 26(2): 419–428.
- [25] Gatta AT, Levine TP. Piecing together the patchwork of contact sites [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(3): 214–229.
- [26] Ushigome M. Re-evaluation of routine care. 34. Rest (2): nurses' responsibility in releasing patients from the forced rest [J]. *Kangogaku Zasshi*, 1984, 48(10): 1092–1095.
- [27] Valm AM, Cohen S, Legant WR, et al. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome [J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 162–167.
- [28] Aston D, Capel RA, Ford KL, et al. High resolution structural evidence suggests the Sarcoplasmic Reticulum forms microdomains with Acidic Stores (lysosomes) in the heart [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40620.
- [29] Han Y, Li M, Qiu F, et al. Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1307.
- [30] Chen Q, Jin C, Shao X, et al. Super-resolution tracking of mitochondrial dynamics with an iridium(III) luminophore [J]. *Small*, 2018, 14(41): e1802166.
- [31] Yamaguchi H, Nakagawa I, Yamamoto A, et al. An initial step of GAS-containing autophagosome-like vacuoles formation requires Rab7 [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(11): e1000670.
- [32] Noda T, Yoshimori T. Between canonical and antibacterial autophagy: Rab7 is required for GAS-containing autophagosome-like vacuole formation [J]. *Autophagy*, 2010, 6(3): 419–420.
- [33] Yamano K, Fogel AI, Wang C, et al. Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy [J]. *Elife*, 2014, 3: e01612.
- [34] Shen Q, Yamano K, Head BP, et al. Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(1): 145–159.
- [35] Onoue K, Jofuku A, Ban-Ishihara R, et al. Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(1): 176–185.
- [36] Yamano K, Wang C, Sarraf SA, et al. Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy [J]. *Elife*, 2018, 7: e31326.
- [37] Jimenez-Orgaz A, Kvainickas A, Nägele H, et al. Control of RAB7 activity and localization through the retromer-TBC1D5 complex enables RAB7-dependent mitophagy [J]. *EMBO J*, 2018, 37(2): 235–254.
- [38] Seaman MN, Harbour ME, Tattersall D, et al. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5 [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(14): 2371–2382.
- [39] Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W, et al. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(13): 2687–2697.
- [40] Takáts S, Pircs K, Nagy P, et al. Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila* [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(8): 1338–1354.
- [41] Wurmser AE, Sato TK, Emr SD. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(3): 551–562.
- [42] Wang Z, Miao G, Xue X, et al. The vici syndrome protein EPG5 is a Rab7 effector that determines the fusion specificity of autophagosomes with late endosomes/lysosomes [J]. *Mol Cell*, 2016, 63(5): 781–795.
- [43] Mattera R, Park SY, De Pace R, et al. AP-4 mediates export of ATG9A from the trans-Golgi network to promote autophagosome formation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(50): E10697–E10706.
- [44] Kakuta S, Yamaguchi J, Suzuki C, et al. Small GTPase Rab1B is associated with ATG9A vesicles and regulates autophagosome formation [J]. *FASEB J*, 2017, 31(9): 3757–3773.
- [45] Xian H, Yang Q, Xiao L, et al. STX17 dynamically regulated by

- Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2059.
- [46] Zhou J, Li G, Zheng Y, et al. A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission [J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1259–1279.
- [47] Lin X, Zhang J, Chen L, et al. Tyrosine phosphorylation of Rab7 by Src kinase [J]. *Cell Signal*, 2017, 35: 84–94.
- [48] Wang L, Cho YL, Tang Y, et al. PTEN-L is a novel protein phosphatase for ubiquitin dephosphorylation to inhibit PINK1-Parkin-mediated mitophagy [J]. *Cell Res*, 2018, 28(8): 787–802.
- [49] Heo JM, Ordureau A, Swarup S, et al. RAB7A phosphorylation by TBK1 promotes mitophagy via the PINK-PARKIN pathway [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(11): eaav0443.
- [50] Nookala RK, Langemeyer L, Pacitto A, et al. Crystal structure of folliculin reveals a hidDenn function in genetically inherited renal cancer [J]. *Open Biol*, 2012, 2(8): 120071.
- [51] Tsun ZY, Bar-Peled L, Chantranupong L, et al. The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1 [J]. *Mol Cell*, 2013, 52(4): 495–505.
- [52] Zhang XM, Walsh B, Mitchell CA, et al. TBC domain family, member 15 is a novel mammalian Rab GTPase-activating protein with substrate preference for Rab7 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(1): 154–161.
- [53] Kvainickas A, Nägele H, Qi W, et al. Retromer and TBC1D5 maintain late endosomal RAB7 domains to enable amino acid-induced mTORC1 signaling [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(9): 3019–3038.

[收稿日期]2020-04-16

(上接第 106 页)

- [21] Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer [J]. *Cell*, 2015, 161(5): 1215–1228.
- [22] Arora VK, Schenkein E, Murali R, et al. Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade [J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1309–1322.
- [23] Ku SY, Rosario S, Wang Y, et al. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance [J]. *Science*, 2017, 355(6320): 78–83.
- [24] Mu P, Zhang Z, Benelli M, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer [J]. *Science*, 2017, 355(6320): 84–88.
- [25] Pietrzak K, Kuzyakiv R, Simon R, et al. TIP5 primes prostate luminal cells for the oncogenic transformation mediated by PTEN-loss [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(7): 3637–3647.
- [26] Wang F, Liu L, Tong Y, et al. Proscillaridin A slows the prostate cancer progression through triggering the activation of endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(5): 541–550.
- [27] Wang X, Xu H, Cheng C, et al. Identification of a Zeb1 expressing basal stem cell subpopulation in the prostate [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 706.

[收稿日期]2020-10-21

谈勇, 占贞贞. 炎症反应在心肌再生中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 128-132.

Tan Y, Zhan ZZ. The roles of inflammation in myocardial regeneration [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 128-132.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.021

炎症反应在心肌再生中的作用

谈 勇, 占贞贞*

(同济大学附属东方医院, 上海 200120)

【摘要】 目前因为心血管疾病而死的人数占有患病死亡人数的30%以上。在这些患者中, 急性心肌梗死通常是第一表现, 可能进一步发展为心力衰竭。而人的心脏表现出低再生能力, 导致了心肌细胞的不可逆损失和持久性的组织瘢痕, 这必然带来严重的病理后遗症, 我们迫切需要新的治疗方法, 实现心肌再生。该文主要概述心肌再生这十几年的研究情况及炎症反应在其中的作用, 为实现人体心肌再生提供方向。

【关键词】 心肌再生; 炎症反应; 巨噬细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0128-05

The roles of inflammation in myocardial regeneration

TAN Yong, ZHAN Zhenzhen*

(Dongfang Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

【 Abstract 】 Cardiovascular disease currently accounts for more than 30% of all deaths. In patients with cardiovascular disease, acute myocardial infarction is usually the first manifestation and may progress to heart failure. In addition, the human heart has low regeneration ability, which causes the irreversible loss of myocardial cells and persistent tissue scars. This inevitably causes serious pathological sequelae. New treatments for myocardial regeneration are urgently required. This article summarizes recent research, including the role of inflammatory responses, in myocardial regeneration and provides direction towards the realization of human myocardial regeneration.

【 Keywords 】 myocardial regeneration; inflammation; macrophage

心肌再生是心肌受到不可逆损伤时, 以心脏中已存在的心肌细胞大量增殖和冠状血管重建为主要特征, 心脏自主神经^[1]以及细胞外基质共同辅助协调, 使得心脏结构与功能恢复正常的再生过程(自发的心肌再生仅限于心肌细胞仍处于分裂周期的情况下)。而急性炎症是心肌受损时的重要生理病理反应, 对促进心肌再生具有重要作用。

1 哺乳动物心肌再生面临巨大挑战

1.1 某些鱼类与两栖动物心脏可以再生

研究者们从低等动物出发, 由硬骨鱼类(如斑

马鱼)中脊髓、视网膜和鱼鳍可以再生, 思索到心肌是否也可以同样再生, 于是利用斑马鱼制作心尖切除模型, 结果显示, 术后约两个月, 心室切除约20%的斑马鱼心脏完全再生, 其心脏形态和功能与sham组斑马鱼对比无明显差别^[2]。通过此次研究, 研究者将目光移到两栖动物, 发现某些两栖动物心脏受损后, 也可以进行心肌的完全再生^[3]。

某些鱼类和两栖动物(如蝾螈)在整个一生中都具有着强大的心脏再生潜能, 但成年哺乳动物却并非如此, 许多研究表明, 成年哺乳动物心脏也具有一定的可测量的心肌细胞更新能力, 但是并不足

[基金项目] 国家重点研发计划(2019YFA0801502)。

[作者简介] 谈勇(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 炎症免疫。E-mail: 17318531850@163.com

[通信作者] 占贞贞(1980—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 炎症免疫。E-mail: zhanzz@tongji.edu.cn

以使得心脏严重损伤时恢复其收缩功能^[4]。由于成年斑马鱼心脏与未成熟哺乳动物有着许多相似性,研究者们做出大胆的假设,即新生的哺乳动物心脏可能具有心肌再生的潜能,他们对一日龄小鼠制作心尖切除模型,切除了小鼠的左心尖(约占心室心肌的 15%),发现手术后约三周其心脏正常形态恢复,术后两个月进行超声心动检查,确认新形成的的心尖具有正常的心肌收缩能力,与 sham 组比较,无明显差别,说明可以完全再生^[5]。而 7 日龄小鼠心尖切除后无法再生,转为纤维化,形成瘢痕。研究者们对这种情况进一步进行了研究。

1.2 新生小鼠心肌细胞可以增殖,实现心肌再生

为了确定再生的心尖是否含有新形成的的心肌细胞,研究者们使用了 5-溴-2-脱氧尿苷(BrdU)进行检测,发现再生的心尖中存在 BrdU 阳性心肌细胞,而相比于 sham 组,BrdU 阳性心肌细胞在再生区域先端和边缘区数量较多,这充分说明了新生小鼠心肌再生过程伴随着心肌细胞的增殖。心肌细胞增殖的来源众说纷纭,并没有一个成熟的结论,之前研究者一直认为心肌再生主要与心脏常驻干细胞分化增殖有关,有证据表明哺乳动物心肌中存在特定数量的干细胞或祖细胞^[6],定位于特定的微环境,这些心肌干细胞被认为具有自我更新的潜能和免疫调节的关键特性,并且它们被假定在正常条件下以及在病理状态下有助于心肌细胞的复制和替换^[7]。Porrello 他们利用遗传命运映射方法来追踪再生心尖心肌细胞起源的谱系,发现 sham 组和实验组的心肌细胞都来源于同一个心脏谱系,这说明再生过程中增殖的心肌细胞主要来源于先前已存在的细胞。同时也发现 7 d 大的小鼠不再具备再生能力是因为心肌细胞一周内会变成双核并且退出细胞周期,这与之前的研究结果相一致^[8]。此外,在哺乳动物中,心脏神经支配也被证明对新生儿心肌再生至关重要,新生儿心肌细胞对损伤的反应性增殖可通过对心肌的自主神经(如迷走神经和交感神经)来介导。不仅如此,许多细胞外基质蛋白也可以促进心肌细胞的增殖,诱导心肌再生^[9]。

这些研究发现了新生小鼠心脏与鱼类和两栖动物一样,具有再生潜能但一周内会丧失这种再生潜力,而失去这种能力的原因主要与心肌细胞不再具有增殖潜力有关。因此自发心肌再生是先前已存在的心肌细胞的补偿性增殖介导的,而不是内源性的的心脏干细胞,且心脏神经与细胞外基质也对心

肌再生发挥作用。

2 炎症反应在心肌再生领域具有重要作用

2.1 炎症反应参与心肌损伤后心肌再生

对非再生模型与再生模型进行比较,研究者发现巨噬细胞和嗜中性粒细胞数量存在差异^[10],再生动物模型募集到受损心肌中的嗜中性粒细胞数量较少,这可能导致促炎性细胞因子产生减少,以及降低因为嗜中性粒细胞活性引起的组织损伤^[11]。非再生动物模型中巨噬细胞募集较少,可能会导致嗜中性粒细胞清除不充分从而导致基质降解增强,胶原蛋白沉积延迟以及对心脏破裂的敏感性增加^[12],而且嗜中性粒细胞保留与过度的纤维化反应有关^[13]。

2.2 心脏受损后急性炎症反应可以促进心肌再生

研究者对损伤后急性炎症反应的作用进行了研究。通过对斑马鱼尾鳍再生的观察,发现在损伤后炎症阶段免疫细胞发挥着重要作用,可以清除凋亡小体和小细胞碎片,有效解决炎症并促进组织重塑和再生长^[14]。之后对成年斑马鱼制作心肌受损模型,发现在抑制炎症反应之后,会严重损害心肌细胞的分裂活性和再生过程^[15],这说明炎症反应是斑马鱼受损心肌再生过程中所必需的。而成年哺乳动物中,急性炎症反应通常被认为会促进心脏瘢痕的形成而对心肌再生产生负面影响,新生哺乳动物中产生的现象却并非如此^[5]。通过对 1 日龄小鼠的实验,单独进行急性炎症刺激后,会促进心肌细胞增殖,并且乳鼠心脏损伤后进行免疫抑制,其心肌再生过程被终止。这说明急性炎症刺激了乳鼠心脏的再生反应^[16]。

2.3 心肌再生模型中的急性炎症反应过程

研究者大致厘清了心脏损伤后免疫反应作用过程,在时间上大致分为促炎期和消炎/修复期^[10]。

促炎期:坏死细胞会释放相关成分,触发无菌炎症,这些成分包括损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)、蛋白酶、水解酶和线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)。DAMP 可以直接激活监视细胞(组织巨噬细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞)以及常驻细胞(内皮细胞、成纤维细胞和心肌细胞)上的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)^[16-19]。蛋白酶,水解酶和活性氧激活补体系统以及炎症小体,并降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[16-19],从而进一步

传播炎症反应^[20]。组织巨噬细胞被 DAMP 活化,通过分泌细胞因子来募集单核细胞和嗜中性粒细胞,浸润的单核细胞和嗜中性粒细胞通过吞噬作用清除细胞碎片,这有助于终止最初的损伤;内皮细胞被 DAMP 活化以促进细胞粘附和通透性,并重塑 ECM。

消炎/修复期:伤口清除后,成纤维细胞会分泌 ECM,防止损伤的心脏破裂。T 细胞会分化为调节性 T 细胞(regulatory cells, Tregs),分泌抗炎性细胞因子(线粒体蛋白等),而 M2 巨噬细胞会扩张并占据受损区域,逐渐清除嗜中性粒细胞,这些都降低了炎症反应^[21]。

2.4 免疫细胞在心肌再生中的作用

心脏损伤后的炎症主要由坏死细胞释放的分子触发,并且被编程为在清除细胞碎片后得以解决。此过程在再生模型和非再生模型中均发生,但是可以观察到其中存在的深刻差异,前者导致疤痕消退和组织补充,后者导致疤痕成熟和组织重构。这些差异至少部分归因于再生和非再生模型中心脏驻留细胞和募集的免疫细胞的差异反应。因此有必要深入讨论研究免疫细胞在心肌再生中的作用。

巨噬细胞分泌多种细胞因子和营养介质,例如白细胞介素 10,成纤维细胞生长因子 1 和胰岛素样生长因子 1^[22]。而巨噬细胞吞噬凋亡细胞,有利于炎症的解决。摄入凋亡细胞后,巨噬细胞分泌抗炎性细胞因子,从而减弱组织的炎性损伤^[23]。此外,巨噬细胞也介导细胞外基质,促进成纤维细胞活化、细胞外基质降解和基质金属蛋白酶活性的改变。巨噬细胞还与骨骼肌再生有关,其机制较为复杂,包括清除死亡细胞,分泌修复细胞因子(如胰岛素样生长因子 1),以及与骨骼干细胞的相互作用^[24]。研究者发现乳鼠心脏损伤后的心肌再生和心血管生成与巨噬细胞有关,巨噬细胞耗尽之后,乳鼠无法再生心肌并形成纤维化瘢痕,导致心脏功能下降^[25]。因此,巨噬细胞在组织再生中起着关键作用。目前,巨噬细胞被认为促进心肌再生的一大机制是促进心血管生成(通过旁分泌作用分泌一系列细胞因子促进血管生成^[26]),其次,据报道巨噬细胞可以转分化为内皮样细胞或内皮祖细胞,这可能也是巨噬细胞促进血管生成的关键^[27]。巨噬细胞种类不同,也决定了是否能够促进心肌再生。新生儿心脏对损伤的反应为扩大其常驻的修复性心脏

巨噬细胞群,而成人心脏募集 CCR2⁺ 促炎性单核细胞和单核细胞衍生的巨噬细胞,这种差异的后果是再生与修复^[11]。近来发现,信号传导及转录激活蛋白 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)/白介素 6(interleukin-6, IL-6)通路在成年斑马鱼^[28]和乳鼠心脏^[29]中介导损伤诱导的心肌细胞增殖和心肌再生,而单核细胞和巨噬细胞是 IL-6 及其生物体的丰富来源^[30],这也侧面证明了巨噬细胞在心肌再生过程中的重要作用。最新的报道证明,巨噬细胞可通过分泌抑癌蛋白 M(OSM, oncostatin M)直接促进心肌细胞的增殖^[31]。

嗜中性粒细胞在心肌再生过程中也存在着相当大的影响。心肌受损后,会导致嗜中性粒细胞迅速向损伤区域募集,并在损伤区释放特定的警告素--S100A8 和 S100A9。这些物质会与 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)结合,引发炎症小体并促进白介素 1(interleukin-1, IL-1)分泌。释放的 IL1 与其在骨髓中的造血干或祖细胞上的受体相互作用,能够刺激粒细胞形成。通过遗传或药理学措施破坏 S100A8/A9 及其下游信号级联能够抑制诱导的粒细胞生成,进而改善心脏功能^[32]。由此看来,嗜中性粒细胞在心肌再生过程中主要起着负面的影响,但嗜中性粒细胞也有有益的一面,它可以通过分泌过氧化物酶抑制损伤过程中的过氧化氢的爆发,在炎症消退中起到积极作用^[33]。因此,我们要充分考虑嗜中性粒细胞在心肌再生中的作用。据报道,T 细胞也在心肌再生中发挥作用。调节性 T 细胞(Treg)可直接促进损伤后血管^[34]和心肌^[35]的增殖与再生。特异性耗竭 CD4⁺T 细胞也可以促进心肌再生^[36]。

2.5 心脏疾病的干细胞治疗

近几十年来,干细胞技术的出现给几乎所有人类疾病带来了巨大的希望,最重要的是非传染性疾病,这种疾病的特征就是器官功能障碍和退化。而在非传染性疾病中,心血管疾病无疑是干细胞的治疗方法最有吸引力的目标,从仅仅改善心脏微环境,到部分再生和补偿失去的功能性组织,以及完全制造出替代心脏,这三大阶段,是我们对新技术的期许。

由于骨骼肌和心肌组织在胚胎和形态学上的共性,骨骼肌成肌细胞成为心肌再生早期有吸引力的研究目标之一。人们开始了几项临床试验来验证它们的功效,尽管最初报道移植有骨骼肌成肌细

胞的患者的心脏参数有所改善,但之后许多患者发生了室性心律失常^[37],因此骨骼肌成肌细胞在干细胞治疗方面的应用被人们放弃。表达 c-kit 的心脏祖细胞也被研究,因为它们发育、新生期甚至在成人心脏中具有心肌分化潜能,但它们在心肌再生中所发挥的作用存在很大争议。近来有研究者提出,即使在新生儿时期,c-kit 阳性细胞也不能促进心肌生成^[38]。目前的共识是,心脏祖细胞在成人心脏中的作用(如果有的话)仅限于维持心脏组织内环境稳定,其在损伤情况下的心肌生成潜能并不存在^[39-40]。相比而言,多能干细胞治疗具有更广泛的治疗潜力,且在临床试验也有一定的成效^[41],但需要更详细的了解其潜能和风险。所以,目前而言,干细胞治疗方面仍有许多的未知,c-kit 阳性细胞是否还有潜在的作用?是否存在真正的心脏干细胞?多能干细胞衍生的心脏祖细胞在临床治疗方面如何有效规避掉移植引起的免疫抑制以及相关的并发症的风险?

目前 Vagnozzi 等^[42]指出,急性炎症反应是心脏干细胞治疗的基础,它可以改变心脏成纤维细胞的活性,减少边界区 ECM 的含量,并增强受伤部位的机械性能。因此,心脏干细胞治疗的优势是基于急性炎症的伤口愈合反应,可以使心脏受损区域恢复活力,但还是无法促进心肌细胞生成。

3 未来的方向

为什么出生后的小鼠很快失去心肌再生能力?心肌细胞增殖的潜力因为什么机制的消失而消失?通过低氧^[43]和降低负荷^[44]等以模拟胎儿时期的环境是否有效促进心肌再生?小鼠与人体心脏心肌细胞的数量级不同是否也成为了阻碍人体心肌再生的关键?何种炎症反应机制能有益于心肌细胞的再生?嗜中性粒细胞与巨噬细胞又在心肌再生中扮演了什么样的角色?至今为止,尚无明确研究说明心肌再生过程中心肌细胞如何增殖以及瘢痕如何消退。而且,急性炎症对于心肌再生过程是起促进作用的,但是演变为炎症微环境就会使得心肌细胞丢失增加,形成大范围的纤维化,这种再生过程中及时解决和抑制炎症的能力至关重要。但是目前对于这种无瘢痕再生炎症反应的精确的时空调节仍旧不清楚。

通过增强心肌细胞的增殖来促进心肌更新以及干细胞治疗是目前实现人体心肌再生的可行的

策略,而炎症反应对二者均具有相当重要的作用,我们有理由相信,当彻底厘清炎症反应一系列的机制时,将会在实现人体心肌再生领域迈出关键的一步。

参考文献:

- [1] White IA, Gordon J, Balkan W, et al. Sympathetic reinnervation is required for mammalian cardiac regeneration [J]. *Circ Res*, 2015, 117(12): 990-994.
- [2] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-2190.
- [3] Oberpriller JO, Oberpriller JC, Matz DG, et al. Stimulation of proliferative events in the adult amphibian cardiac myocyte [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 752: 30-46.
- [4] Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of cell generation and turnover in the human heart [J]. *Cell*, 2015, 161(7): 1566-1575.
- [5] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-1080.
- [6] Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population [J]. *FEBS Lett*, 2002, 530(1-3): 239-243.
- [7] Buja LM. Cardiac repair and the putative role of stem cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 128: 96-104.
- [8] Li F, Wang X, Capasso JM, et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28(8): 1737-1746.
- [9] Sadek H, Olson EN. Toward the goal of human heart regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 7-16.
- [10] Lai SL, Marín-Juez R, Stainier DYR. Immune responses in cardiac repair and regeneration: a comparative point of view [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(7): 1365-1380.
- [11] Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(45): 16029-16034.
- [12] Lörchner H, Pöling J, Gajawada P, et al. Myocardial healing requires Reg3β-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart [J]. *Nat Med*, 2015, 21(4): 353-362.
- [13] Lai SL, Marín-Juez R, Moura PL, et al. Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration [J]. *Elife*, 2017, 6: e25605.
- [14] Li L, Yan B, Shi YQ, et al. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30): 25353-25360.
- [15] de Preux Charles AS, Bise T, et al. Distinct effects of inflammation on preconditioning and regeneration of the adult zebrafish heart [J]. *Open Biol*, 2016, 6(7): 160102.
- [16] Han C, Nie Y, Lian H, et al. Acute inflammation stimulates a

- regenerative response in the neonatal mouse heart [J]. *Cell Res*, 2015, 25(10): 1137-1151.
- [17] Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1): 1-5.
- [18] Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, et al. The innate immune response in reperfused myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 276-283.
- [19] Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2711-2729.
- [20] Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(4): 279-289.
- [21] Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [22] Trial J, Rossen RD, Rubio J, et al. Inflammation and ischemia: macrophages activated by fibronectin fragments enhance the survival of injured cardiac myocytes [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004, 229(6): 538-545.
- [23] Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(10): 2596-2606.
- [24] Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 786-794.
- [25] Aurora AB, Porrello ER, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3): 1382-1392.
- [26] Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, et al. Macrophages and angiogenesis [J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 55(3): 410-422.
- [27] Zordan P, Rigamonti E, Freudenberg K, et al. Macrophages commit postnatal endothelium-derived progenitors to angiogenesis and restrict endothelial to mesenchymal transition during muscle regeneration [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(1): e1031.
- [28] Huang WC, Yang CC, Chen IH, et al. Treatment of glucocorticoids inhibited early immune responses and impaired cardiac repair in adult zebrafish [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66613.
- [29] Konfino T, Landa N, Ben-Mordechai T, et al. The type of injury dictates the mode of repair in neonatal and adult heart [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(1): e001320.
- [30] Adutler-Lieber S, Ben-Mordechai T, Naftali-Shani N, et al. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013, 18(1): 78-86.
- [31] Li Y, Feng J, Song S, Li H, et al. gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Circulation*, 2020, 142(10): 967-982.
- [32] Leung OM, Li J, Li X, et al. Regulatory T cells promote apelin-mediated sprouting angiogenesis in type 2 diabetes [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(6): 1610-1626.
- [33] Li J, Yang KY, Tam RCY, et al. Regulatory T-cells regulate neonatal heart regeneration by potentiating cardiomyocyte proliferation in a paracrine manner [J]. *Theranostics*, 2019, 9(15): 4324-4341.
- [34] Li J, Liang C, Yang KY, et al. Specific ablation of CD4⁺ T cells promotes heart regeneration in juvenile mice [J]. *Theranostics*, 2020, 10(18): 8018-8035.
- [35] 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.
- [36] Pase L, Layton JE, Wittmann C, et al. Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(19): 1818-1824.
- [37] Ince H, Petzsch M, Rehders TC, et al. Transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in postinfarction patients with severe left ventricular dysfunction [J]. *J Endovasc Ther*, 2004, 11(6): 695-704.
- [38] Elhelaly WM, Cardoso AC, Pereira AHM, et al. c-kit cells do not significantly contribute to cardiomyogenesis during neonatal heart regeneration [J]. *Circulation*, 2019, 139(4): 559-561.
- [39] van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 337-341.
- [40] Tzahor E, Poss KD. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart [J]. *Science*, 2017, 356(6342): 1035-1039.
- [41] Menasché P, Vanneaux V, Haggège A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(30): 2011-2017.
- [42] Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, et al. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy [J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 405-409.
- [43] Nakada Y, Canseco DC, Thet S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 222-227.
- [44] Canseco DC, Kimura W, Garg S, et al. Human ventricular unloading induces cardiomyocyte proliferation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(9): 892-900.

[收稿日期]2020-04-02

宗永辉,刘新灿. 钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 133-139,145.
Zong YH, Liu XC. Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 133-139,145.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.022

钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展

宗永辉¹,刘新灿^{2*}

(1.河南中医药大学,郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000)

【摘要】 钙化性主动脉瓣膜病是一种以炎症,纤维化和钙化为特征的主动进展性疾病,但具体发病机制尚未明确。现阶段对其机制的研究主要来自动物模型的应用,能够模拟疾病进程的动物模型将有助于我们对疾病发生发展机制的明确和寻找有效的临床治疗途径。本文就钙化性主动脉瓣狭窄的小鼠造模方法进行综述,并对其模型做出评价,为钙化性瓣膜病相关研究时模型选择提供参考。

【关键词】 钙化性主动脉瓣膜病;主动脉瓣狭窄;动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0133-07

Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease

ZONG Yonghui¹, LIU Xincan^{2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 45000, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 45000)

【Abstract】 Calcific aortic valve disease is an active progressive disease characterized by inflammation, fibrosis and calcification, but the exact pathologic mechanism is unclear. At present, research is mainly conducted in animal models. Those animal models that best simulate the disease process help to clarify the mechanisms of the occurrence and development of the disease, and may lead to the identification of effective clinical treatments. In this paper, we reviewed and evaluated the mouse model of calcific aortic stenosis to provide a reference for the selection of other animal models of calcified valvular disease

【Keywords】 calcific valve disease, CAVD; aortic valve stenosis; animal

钙化性主动脉瓣膜病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是指由早期未发生血液动力学影响的瓣膜硬化逐渐发展到需要瓣膜置换术的严重钙化性主动脉瓣狭窄 (aortic valve stenosis, AS) 的进展性疾病^[1], 其主要特征为炎症, 纤维化和钙化^[2]。在发达国家, 钙化主动脉瓣疾病是成年人主动脉瓣狭窄最常见的病因, 并且患病率随着年龄的增加呈

非线性增长^[3]。我国一项针对老年瓣膜性心脏病住院患者诊疗状况的研究结果显示, 钙化性主动脉瓣狭窄患者占比 18.99%^[4]。随着医疗卫生条件的提升以及人口老龄化的显著, 钙化性主动脉瓣膜病的发病率将逐年上升。目前对钙化性主动脉瓣狭窄的药物疗法未显示出可减轻进行性瓣膜钙化或改善生存率, 症状严重者主要通过外科手术和内科介

【基金项目】 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研重点专项(2018JDZX008)。

【作者简介】 宗永辉(1992—), 男, 硕士, 主要从事心血管疾病防治及介入医学研究。E-mail: zongyonghui101@163.com

【通信作者】 刘新灿(1965—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 主要从事心血管疾病防治及介入医学研究。

E-mail: liuxincan103@163.com

入干预^[5]。所以明确钙化性瓣膜病的发病机制,进行早期干预,延缓发病进程,是现在社会面临的重大课题。

对瓣膜病的发病机制的认识从以往的随着年龄增长的被动性退化现象转变为主动性的类似“动脉粥样硬化”病变^[2],这一里程碑式的研究重新引起了对钙化性瓣膜病研究的热潮。根据临床上对疾病发病机制的认识,再转移到动物实验给与验证,是我们研究钙化性瓣膜病的主要方法。在实验研究中,虽然体外实验可以观察到对细胞因子的影响,但无法观察到病理生理学的代偿反应;并且瓣膜所处解剖位置和环境特殊性和复杂性,因此整体动物实验更能合适对瓣膜病机制的研究^[6]。目前动物造模方法较多^[7-8],使用的动物也不相同,如小鼠、兔、猪等。其中最常用的是小鼠模型,首先是它们的体型小,便于饲养和管理,并且具有经济成本低等优势;其次是较短的繁殖周期、遗传操作的简便性以及基因图谱的全面性使得对 CAVD 的关键分子介体的具体研究成为可能。本文主要针对钙化性主动脉瓣狭窄的模型优缺点及进展进行综述,总结见表 1。

1 饮食诱导模型

1.1 高胆固醇饮食法

临床证据表明,冠状动脉粥样硬化和主动脉瓣狭窄具有相似的流行病学危险因素,例如年龄,性别,高胆固醇血症和高血压^[9-11]。对人类狭窄主动脉瓣的临床病理研究发现,病变与包含炎性细胞和钙化沉积物的动脉粥样硬化斑块相似^[12-13]。临床前研究进一步证实了在兔和小鼠动脉粥样硬化模型中主动脉瓣小叶中的动脉粥样硬化样病变^[14-15]。因此,动脉粥样硬化模型常被借鉴到主动脉瓣狭窄的实验研究。

标准饮食条件下野生型小鼠(WT)不会自发主动脉瓣钙化,因此需要高脂饮食或者基因敲除等方式干预。低密度脂蛋白受体(LDLR)是肝细胞膜上一种镶嵌式蛋白,能介导 LDL 和 VLDL 的胞吞作用,低密度脂蛋白受体缺陷(LDLr^{-/-})小鼠可引起内源性胆固醇升高常被应用于钙化性瓣膜病模型的建立。C57BL/6J 背景的低密度脂蛋白受体缺陷(LDLr^{-/-})雌性小鼠常规饮食 17~22 个月时,会自发出现轻度高胆固醇血症、瓣口直径急剧缩小、跨瓣膜收缩压梯度升高以及左心室肥厚等早期瓣膜

硬化表现^[16]。Towler 等^[17]应用特制饮食中脂肪含量为总热量的 42%并含有 0.15%胆固醇和 0.5%的胆酸盐的饲料喂食 17 周后,出现严重的胆固醇血症(1040±37),高血糖和瓣膜矿物质沉积以及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达。

载脂蛋白 E(ApoE)是 VLDL 受体的配体,也是肝细胞 CM 残粒受体的配体,载脂蛋白 E 缺陷(apoE^{-/-})同样引起内源性胆固醇升高。在没有饮食干预条件下,半数以上的 apoE^{-/-}小鼠在超过 43 周龄时主动脉流速快于 150 cm/s,最高可达 427 cm/s,其中伴有少数主动脉反流,并且与性别无相关性;Von Kossa 染色在 97 周龄主动脉瓣中显示出异位钙化^[15],这与人主动脉瓣狭窄病程相似。在 apoE^{-/-}小鼠 10 周龄时给予脂肪含量为总热量的 42%并含有 0.2%胆固醇的饮食,30 周龄时血清胆固醇明显增加至 588 mg/dL,小叶增厚,内皮细胞活化,以及富含巨噬细胞的内皮下病变;在病变区域能够检测到组织蛋白酶 B, α 平滑肌肌动蛋白(α SMA),碱性磷酸酶, Runx2 和 OPN mRNA 表达^[18],虽然没有 von Kossa 染色的证据表明有钙盐沉积,但通过双磷酸盐结合的成像颗粒显示出早期微钙化的迹象,表明该饮食模式可导致加速早期疾病形成。

模型评价:该模型优点是操作简单,明显的缺陷是在单纯饮食干预下造模周期较长,模型成功率低;联合基因敲除虽然能够明显缩短主动脉狭窄模型的建立时间,但不可避免的出现严重的高胆固醇血症,导致小鼠过早死亡,并且这与人瓣膜病发病时轻度高胆固醇血症不符。以往临床研究表明他汀类药物对主动脉瓣狭窄没有明显的疗效^[19-22],动物实验研究表明在早期进行他汀药物的干预可延缓疾病的进展^[14,23]。因此,该模型可适用于明确高胆固醇血症在主动脉瓣膜狭窄进展中的作用以及他汀类药物对瓣膜病的影响研究。

1.2 高脂饮食法

许多研究表明以胰岛素抵抗/2 型糖尿病(T2D)为特征的代谢异常状态在 CAVD 的发生和进展中起重要作用^[24-25]。Towler 等^[17]在一项关于糖尿病对血管钙化的研究中,低密度脂蛋白受体缺陷(LDLr^{-/-})小鼠给予总热量的 58%来自脂肪而没有添加胆固醇的食物,喂食 2 周后胆固醇出现明显变化,17 周后血清胆固醇水平较正常饮食组升高 62%,并出现高血糖,高胰岛素血症和肥胖症, von

Kossa 染色发现主动脉瓣小叶上矿物质沉积。Drolet 等^[26]采用同样的喂养模式喂食 C57BL/6J 背景的雄性小鼠,4 个月后发现轻度高胆固醇血症,肥胖和高血糖症;超声心动图检测主动脉瓣面积(aortic valve area,AVA)减小,跨瓣速度增加,瓣膜小叶增厚;免疫组化检测证实巨噬细胞(CD68 阳性细胞),泡沫细胞等炎性细胞以及骨桥蛋白的合成;组织染色发现瓣膜小叶区域有结节性钙沉积,再次证实了 CAVD 的病因是多因素的。

模型评价:高脂饮食模型明显的优点是避免了高胆固醇饮食引起的高胆固醇毒症,同时引起的体重增加和血糖的升高近似模拟了人类真实生活环境中,这与钙化性瓣膜病流行病学危险因素^[27]相一致。Le 等^[28]利用合并血脂异常和 2 型糖尿病的 LDLr^{-/-}/ApoB^{100/100}/IGF-II 小鼠模型,观察到高胆固醇血症和高血糖症对 CAVD 早期病变的累积效应,证实了 T2D 是 CAVD 发生发展的独立危险因素,可能成为未来潜在的治疗靶点。因此,该模型可应用于研究血糖对瓣膜病钙化形成的影响以及降糖药物延缓病情进展的效果观察。

1.3 其他饮食诱导模型

Huk 等^[29]给野生型 C57BL/6J 小鼠喂食含有 200 IU/g 视黄醇棕榈酸酯过量维生素 A 的食物(Harlan,TD.110146)持续 12 个月,检测到主动脉瓣的峰值压力梯度和速度显著增加,小叶明显钙化结节。该模型主要通过视黄酸(retinoic acid,RA)介导的钙化信号导致转录因子 Sox9 抑制及其靶基因失调,成骨基因 Runx2 和骨钙蛋白(bone Gla protein, BGLAP)表达增强,这与先前研究结果一致^[30-31],提示过量膳食维生素 A 是 CAVD 发病的危险因素。

模型评价:该模型的优点与其他饮食诱导模型一样,操作简便。但缺点也比较明显,由于造模周期较长,对后续开展相关研究不利,并且对研究人员精力和经济上都是一种挑战。利用此模型可以研究成人过量膳食维生素 A 对促进 CAVD 进展的影响,给予 CAVD 患者在膳食习惯上的指导。

2 基因修饰模型

2.1 基因敲除模型

弹性纤维作为主动脉瓣细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的重要组成部分,在结构和功能上具有重要作用^[32]。弹性纤维由弹性蛋白

(核心蛋白)和微纤维(原纤维蛋白及相关蛋白),以及各种糖蛋白,如 emilins 和 fibulins 组成^[33]。Fibulin4^{-/-}小鼠可导致 TGF- β 信号通路激活,引起主动脉瓣成纤维细胞激活,小叶增厚,骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)激活和营养不良性钙化^[34]。同样 Emilin1^{-/-}小鼠也能导致瓣膜组织内 TGF- β 因子失调,引起经典通路 Smad2/3 和非经典途径细胞外信号调节激酶 1 和 2(Erk1/2)激活,17 月龄时主动脉瓣增厚,峰值速度和相应的压力梯度显著增加,组织内血管生成,巨噬细胞浸润, α SMA 表达以及纤维化^[35];值得注意的是此模型未检测到钙盐沉积的迹象,但它提供了 ECM 病理结构的变化,与人瓣膜病的早期病理改变是一致的。Angel 等^[36]利用此模型证实了主动脉瓣膜病发病前后蛋白组变化与生物力学存在明显的相关性,ECM 中蛋白质的变化早于血流动力学的变化。

以往研究证实炎症与钙化性主动脉瓣膜病存在联系,并且白介素(IL)-1 β 参与了 CAVD 的发病机制^[37-38]。Isoda 等^[39]发现 BALB/c 背景白介素-1 受体拮抗剂缺陷(IL-1Ra^{-/-})雄性小鼠在标准饮食条件下,16 周龄时出现主动脉瓣叶增厚,巨噬细胞浸润并含有分化的肌成纤维细胞,43 周龄时检测到钙化病变。

模型评价:基因敲除小鼠模型在众多疾病发病机制研究中常用的方法,其优点是小鼠往往是近交品系,同源性好,便于基因编辑操作,能够明确某种特定因素缺失对疾病造成的影响。缺点是基因敲除仅对单一位点实施干预,会影响与钙化性主动脉瓣膜病其他危险因素的相互促进作用,有时还会造成动物模型典型表现(钙化)欠缺。

2.2 基因过表达模型

Cadherin-11(Cad-11)是一种细胞间粘附蛋白,可介导细胞迁移并促进间充质细胞分化为骨和软骨^[40]。先前研究表明,在人和动物的钙化性主动脉瓣 VIC 中发现 Cad-11 表达明显增加^[41-42];Cad-11 缺乏可导致 GTP-RhoA 和 Sox9 失活,影响胚胎瓣膜的形成和重塑,进而阻止了成年小鼠的钙化^[43]。Sung 等^[44]运用转基因技术创建了 Nfatc1^{Cre};R26-Cad11^{Tg/Tg}小鼠模型,小鼠在一个月时主动脉瓣厚度或横截面积没有显著差异和其他身体缺陷,10 个月时出现主动脉钙化和狭窄伴反流,瓣膜明显增厚(>70%),横截面积增加(>46%),射血速度增快,存在成骨细胞标志物肌纤维母细胞(α SMA)和成骨细胞

(Runx2, 骨钙素) 以及阳性的 Von Kossa 和茜素红染色。该模型小鼠病理学及生物分子学与人钙化性主动脉瓣膜病表现出一致性, 作为一种新的模型证

实了 Cadherin-11 过表达通过体内 GTP-RhoA 介导的成骨和营养不良性钙化以及 Sox9 介导的细胞外基质重塑诱导主动脉狭窄。

表 1 钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型
Table 1 Mouse models of calcified aortic valve disease

模型 Model	动物 Animals	造模方法 Model method	特点 Characteristics	
高胆固醇饮食法 High cholesterol diet	C57BL/6J、 Ldlr ^{-/-} 、 Apoe ^{-/-}	喂食脂肪含量为总热量的 42% 并含有 0.2% 胆固醇的饮食持续 20 周 A diet with 42% fat and 0.2% cholesterol was fed for 20 weeks	操作简单, 模型成功率低, 易引起高胆固醇血症 The operation is simple, the success rate of the model is low, and it is easy to cause hypercholesterolemia	
饮食诱导模型 Diet induction model	高脂饮食法 High fat diet	C57BL/6J、Ldlr ^{-/-}	喂食脂肪含量为总热量的 58% 并且不添加胆固醇的食物持续 4 个月 The diet containing 58% fat and no cholesterol was fed for 4 months	避免了高胆固醇饮食引起的高胆固醇血症, 但模型成功率低 High cholesterol toxicity caused by high cholesterol diet was avoided, but the success rate of the model was low
	其他饮食诱导模型 Other dietary induction models	C57BL/6J	喂食含有 200 IU/g 视黄醇棕榈酸酯维生素 A 持续 12 个月 The diet contained 200 IU/g retinol palmitate vitamin A for 12 months	操作简单, 但造模周期较长, 模型成功率低 The model is simple and easy to operate, but the modeling period is long and the success rate of the model is low
基因修饰模型 Gene modification model	基因敲除模型 Gene knockout model	Fibulin4 ^{-/-} 、 Emilin1 ^{-/-} 、 IL-1Ra ^{-/-}	利用基因敲除技术针对主动脉瓣膜病危险因素靶点进行干预 Gene knockout technique was used to intervene the target of risk factors of aortic valvular disease	能够明确研究靶点在疾病发生中的作用 It can clearly study the role of target in the occurrence of disease
	基因过表达模型 Gene overexpression model	Nfatc1 ^{Cre} 、 R26- Cad11 ^{Tg/Tg} 、 REN ⁺ AGT ⁺	利用转基因技术对疾病发生相关危险因素进行过表达 Overexpression of risk factors related to disease occurrence by transgenic technology	操作复杂, 模型成功率低, 实验成本高 The operation is complex, the success rate of model is low and the cost of experiment is high
先天发育异常模型 Congenital dysplasia model		Notch1 ^{+/-} 、 Postn ^{-/-} 、 Egfr ^{Vel/+}	干预瓣膜发育成熟关键位点造成瓣膜缺陷 Valve defects caused by intervention at key sites of valvular development and maturation	提供先天型瓣膜病模型, 但模型成功率低, 耗时长, 并且在复制模型时操作复杂 The model of congenital valvular disease is provided, but the success rate of the model is low, it takes a long time, and the operation is complicated when copying the model
手术诱导模型 Surgical induction model		C57BL/6J	利用导丝损伤瓣膜 Use the guide wire to damage the valve surface	操作简单, 造模周期短, 模型成功率高 The operation is simple, the modeling period is short, and the success rate of the model is high

注: C57BL/6J: 野生型小鼠亚种; Ldlr: 低密度脂蛋白受体; Apoe: 载脂蛋白 E; Fibulin/Emilin: 糖蛋白; IL-1Ra: 白介素-1 受体拮抗剂; Nfatc1: 活化 T 细胞的核因子 1; Cre: 重组酶; R26; Rosa26, 启动子 26; Cad-11: 细胞间粘附蛋白; REN: 肾素; AGT: 血管紧张素; Notch1: 转录调节因子; Postn: 骨膜素; Egfr: 上皮生长因子受体。

Note. C57BL/6J, Wild type mouse subspecies. Ldlr, Low density lipoprotein receptor. Apoe, Apolipoprotein E. Fibulin/Emilin, glycoprotein. IL-1Ra, Interleukin-1 receptor antagonist. Nfatc1, Nuclear factor of activated T cell1. Cre, Recombinase. Cad-11, Cadherin-11, Intercellular adhesion protein. REN, renin. AGT, Angiotensin. Notch1, transcriptional regulatory factor. Postn, Periostein. Egfr, Epithelial growth factor receptor.

Chu 等^[45]综合考虑高胆固醇血症和高血压与主动脉瓣膜病的相关性,首次在 APOE^{-/-}小鼠基础上利用转基因技术建立了肾素(REN⁺)、血管紧张素(AGT⁺)为一体的纤维化性主动脉瓣狭窄(fibrotic aortic valve stenosis, FAVS)模型。标准饮食 12 个月表现出严重的主动脉瓣狭窄,相邻瓣膜吻合线明显增长,瓣膜基底部胶原蛋白网状化,伴有轻度钙化。虽然瓣膜钙化不明显,但类似于儿童和一些成年人的主动脉瓣狭窄^[46-47]。

模型评价:该模型优点是可以针对特定的主动脉狭窄发病危险因素利用转基因技术检测该基因过表达对机体的影响。缺点是实验成本较高。虽然转基因技术比较成熟,但操作复杂,实验者需要到专业机构购买特定小鼠,并且价格昂贵。

3 先天发育异常模型

流行病学显示先天异常主动脉瓣患者主动脉瓣狭窄的发病率明显高于三尖瓣,并且发病时间会提前 10-20 年^[48-50]。此外钙化性主动脉瓣狭窄的地理分布是异质的,并且显示出聚类效应,表明遗传因素与瓣膜病之间的相关性^[51]。

Garg 等^[52]在同一个家族的五代人的先天性心脏病研究中,首次发现了转录调节因子 NOTCH1 突变是主动脉瓣钙化的遗传基础,并且通过突变基因的转基因小鼠中证实能够引起心脏瓣膜缺陷。Notch1 杂合子(Notch1^{+/-})雄性小鼠喂食含 0.2% 胆固醇的高胆固醇饮食 10 个月后,与 WT 对照组相比主动脉瓣钙化程度增加 5 倍,小叶中 Bmp2 表达增加了 3 倍以上,虽然小鼠均为没有表现出二尖瓣,但是在三尖瓣中存在钙化,证明 Notch1 在发育过程中和在抑制出生后的钙化中具有独立的功能^[53]。

骨膜素(periostin, POSTN)基因编码的蛋白骨膜素在胚胎发育的心脏流出道(OFT)心内膜垫中高度表达,诱导心脏形成主动脉瓣等多种结构^[54]。POSTN 基因缺失(postn^{-/-})小鼠通过诱导 Notch1 负调控因子 δ 样同系物(DLK1)的过度表达,主动脉瓣严重变形,并呈双尖瓣样形态,标准饮食 6 月龄时,von Kossa 染色主动脉瓣小叶上有大量钙沉积物,并伴有转录因子 Runx2、OPN 和骨钙素的表达^[55]。

上皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)信号传导通路在调节小鼠主动脉瓣的胚胎发育过程中起关键性作用,其主要功能受体缺陷可导致主动脉瓣异常和功能障碍^[56]。Weiss

等^[57]研究表明上皮生长因子受体突变(Egfr^{Vel/+})小鼠瓣膜发育异常发生率约 75%,形态类似于人的单尖瓣主动脉瓣;8 个月时主要表现为狭窄伴或不伴关闭不全,并且瓣膜功能障碍随年龄增长更加明显;虽然该模型小鼠未表现明显的出间质细胞分化以及钙化迹象,但这与儿童和年轻成人的先天型单尖瓣主动脉瓣临床表现相似^[58],因此可以作为一种先天型单尖瓣瓣膜病动物模型。

模型评价:先天发育异常诱导模型的建立为 CAVD 遗传因素的研究提供了新的途径,通过对先天发育异常小鼠的观察进一步认识调控瓣膜胚胎发育的信号通路在 CAVD 发生发展的作用,也可以研究先天型瓣膜病(单尖瓣、二尖瓣)在生物力学方面的作用。缺点是模型成功率低,耗时长,并且在复制模型时操作复杂。

4 手术诱导模型

由于血液动力应力引起的机械损伤被认为是 AS 的重要危险因素^[59],一种导丝损伤瓣膜的 AS 模型被建立。Honda 等^[60]最早通过将超声导丝在超声心动图引导下通过右颈总动脉插入并移动到雄性 C57/BL6 小鼠的左心室中,导丝的尖端位于瓣膜的左心室侧前后移动 20 次并旋转 50 次,从而造成主动脉瓣损伤。大部分小鼠损伤 1 周后主动脉速度持续性增加,损伤后 4 周,瓣膜小叶明显增生,射血分数降低,增生瓣膜显示出活性氧的产生增加以及炎性细胞因子和骨软骨形成因子的表达,12 周后表现出明显主动脉瓣狭窄,茜素红染色显示瓣膜钙化。但是该方法在操作过程中无法控制对瓣膜造成的损伤程度,导致瓣膜狭窄伴反流的混合型瓣膜病模型和死亡率增加。后来,Niepmann 等^[61]在此基础上改用多种类型的导丝进行分级损伤瓣膜,对于轻度和中度损伤,使用尖端缩短并焊接的直导丝(雅培 HI-TORQUE 0.014''),前后移动 20 次后再分别以 2 次/秒的速度旋转 50 次和 100 次;对于严重损伤,使用尖端附带 15°角度的传统导丝(Asahi INTECC MIRACLEbros6),旋转 200 次,以此控制瓣膜的轻、中、重损伤程度。该方法能明显控制不同程度狭窄中主动脉反流的发生率,并且术后 24 h 死亡率从 20%降到 4.4%。

模型评价:该模型优点是操作简单,造模周期短,模型成功率较其他模型高,其缺陷是造成瓣膜的急性损伤,病理周期短,与人主动脉瓣狭窄漫长

的病程不一致。但在病理组织学是相似的,能够形成主动脉狭窄以及钙化,并且具有易操作性,可以作为一种新兴动物实验模型。模型可应用于炎症机制的研究和抑制炎症反应对 CAVD 进程的影响。

5 展望

动物模型是研究 CAVD 的病理生物学机制和潜在的治疗干预的重要工具。目前大多数 CAVD 小鼠模型的建立集中在炎症机制和加快疾病进程的合并症,如高胆固醇血症、糖尿病、高血压等,但仍存在不足之处,未来理想模型应该能够精确测量主动脉瓣所处的高度动态的生物力学效应。由于主动脉瓣独特的解剖位置,使其暴露于血流诱导的剪应力、压力负荷、弯曲变形和 ECM 的机械阻力下,这些机械刺激中的每一个都调节瓣膜细胞的生物学,因此可能对体内平衡和疾病都有贡献。小鼠模型由于受物种的限制,首先在组织结构上缺乏与人主动脉瓣的三层结构,其次是体型小不利于力学方面的精确测量。我们应该看到在其他动物模型的优势,如猪在组织结构和形态大小与人瓣膜是相似的,可能成为研究生物力学的绝佳模型。然而小鼠模型在基因修饰上的便利性,为生物力学相关信号通路研究提供了可行性。不同物种的 CAVD 模型都有其局限性和优势,我们利用其优势上的互补,帮助我们对疾病机制更深入的认识。

参考文献:

- [1] Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis — from patients at risk to severe valve obstruction [J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 744–756.
- [2] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies [J]. *Circulation*, 1994, 90(2): 844–853.
- [3] Evehorn GW, Schirmer H, Heggelund G, et al. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. The Tromsø study [J]. *Heart*, 2013, 99(6): 396–400.
- [4] 齐喜玲, 许海燕, 刘庆荣, 等. 中国老年退行性心脏瓣膜病住院患者诊疗现状分析 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(8): 771–776.
- [5] Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 63(22): e57–e185.
- [6] Weiss RM, Miller JD, Heistad DD. Fibrocalcific aortic valve disease: opportunity to understand disease mechanisms using mouse models [J]. *Circ Res*, 2013, 113(2): 209–222.
- [7] Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease [J]. *Int J Inflam*, 2011, 2011: 364310.
- [8] Guerraty M, Mohler Iii ER. Models of aortic valve calcification [J]. *J Investig Med*, 2007, 55(6): 278–283.
- [9] Mohler ER 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification [J]. *Am J Cardiol*, 2004, 94(11): 1396–1402, A6.
- [10] Allison MA, Cheung P, Criqui MH, et al. Mitral and aortic annular calcification are highly associated with systemic calcified atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 861–866.
- [11] Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 29(3): 630–634.
- [12] Otto CM, Kuusisto JK, Reichenbach DD. Characterization of the early lesion of ‘degenerative’ valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies [J]. *Circulation*, 1994, 90(2): 844–853.
- [13] Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(5): 1218–1222.
- [14] Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve [J]. *Circulation*, 2002, 105(22): 2660–2665.
- [15] Tanaka K, Sata M, Fukuda D, et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(1): 134–141.
- [16] Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, et al. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice [J]. *Circulation*, 2006, 114(19): 2065–2069.
- [17] Towler DA, Bidder M, Latifi T, et al. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30427–30434.
- [18] Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease [J]. *Circulation*, 2007, 115(3): 377–386.
- [19] Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis; results of the aortic stenosis progression observation; measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial [J]. *Circulation*, 2010, 121(2): 306–314.
- [20] Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(1): 33–41.
- [21] Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(5): 554–561.
- [22] Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1343–1356.
- [23] Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, et al. Atorvastatin

- inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve [J]. *Heart*, 2005, 91(6): 806-810.
- [24] Katz R, Wong ND, Kronmal R, et al. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2113-2119.
- [25] Capoulade R, Clavel MA, Dumesnil JG, et al. Insulin resistance and LVH progression in patients with calcific aortic stenosis: a substudy of the ASTRONOMER trial [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2013, 6(2): 165-174.
- [26] Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, et al. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(4): 850-855.
- [27] Yan AT, Koh M, Chan KK, et al. Association between cardiovascular risk factors and aortic stenosis: the canheart aortic stenosis study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(12): 1523-1532.
- [28] Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D, et al. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10): 2283-2291.
- [29] Huk DJ, Hammond HL, Kegechika H, et al. Increased dietary intake of vitamin A promotes aortic valve calcification *in vivo* [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): 285-293.
- [30] Wrigg EE, Hinton RB, Yutzey KE. Differential expression of cartilage and bone-related proteins in pediatric and adult diseased aortic valves [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 561-569.
- [31] Yang X, Meng X, Su X, et al. Bone morphogenic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(4): 1008-1015.
- [32] Schoen FJ. Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination [J]. *J Heart Valve Dis*, 1997, 6(1): 1-6.
- [33] Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(14): 2817-2828.
- [34] Hanada K, Vermeij M, Garinis GA, et al. Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice [J]. *Circ Res*, 2007, 100(5): 738-746.
- [35] Munjal C, Opoka AM, Osinska H, et al. TGF- β mediates early angiogenesis and latent fibrosis in an Emilin1-deficient mouse model of aortic valve disease [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(8): 987-996.
- [36] Angel PM, Narmoneva DA, Sewell-Loftin MK, et al. Proteomic alterations associated with biomechanical dysfunction are early processes in the emilin1 deficient mouse model of aortic valve disease [J]. *Ann Biomed Eng*, 2017, 45(11): 2548-2562.
- [37] Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2007, 18(5): 483-491.
- [38] Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. Interleukin-1 β promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 170(2): 205-211.
- [39] Isoda K, Matsuki T, Kondo H, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4): 708-715.
- [40] Kii I, Amizuka N, Shimomura J, et al. Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(11): 1840-1849.
- [41] Zhou J, Bowen C, Lu G, et al. Cadherin-11 expression patterns in heart valves associate with key functions during embryonic cushion formation, valve maturation and calcification [J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 198(4): 300-310.
- [42] Hutcheson JD, Chen J, Sewell-Loftin MK, et al. Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(1): 114-120.
- [43] Bowen CJ, Zhou J, Sung DC, et al. Cadherin-11 coordinates cellular migration and extracellular matrix remodeling during aortic valve maturation [J]. *Dev Biol*, 2015, 407(1): 145-157.
- [44] Sung DC, Bowen CJ, Vaidya KA, et al. Cadherin-11 overexpression induces extracellular matrix remodeling and calcification in mature aortic valves [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(8): 1627-1637.
- [45] Chu Y, Lund DD, Doshi H, et al. Fibrotic aortic valve stenosis in hypercholesterolemic/hypertensive mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(3): 466-474.
- [46] Mohler ER 3rd, Medenilla E, Wang H, et al. Aortic valve calcium content does not predict aortic valve area [J]. *J Heart Valve Dis*, 2006, 15(3): 322-328.
- [47] Hinton RB Jr, Lincoln J, Deutsch GH, et al. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves [J]. *Circ Res*, 2006, 98(11): 1431-1438.
- [48] Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, et al. Calcific aortic stenosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16006.
- [49] Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation [J]. *Circulation*, 2005, 111(7): 920-925.
- [50] Michelena HI, Prakash SK, Della Corte A, et al. Bicuspid aortic valve: identifying knowledge gaps and rising to the challenge from the International Bicuspid Aortic Valve Consortium (BAVCon) [J]. *Circulation*, 2014, 129(25): 2691-2704.

曾贵荣,杨柳,罗桂芳,等. 间充质干细胞治疗的生物安全研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 140-145.
Zeng GR, Yang L, Luo GF, et al. Research progress on the biosafety of mesenchymal stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 140-145.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.023

间充质干细胞治疗的生物安全研究进展

曾贵荣, 杨 柳, 罗桂芳, 姜德建*

(湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331)

【摘要】 间充质干细胞是一群自我复制能力强、具有高度分化潜能的细胞,来源广泛,是细胞治疗的首要来源。在组织修复、自身免疫疾病和退行性疾病治疗中具有较高的价值。生物安全是间充质干细胞临床转化的主要障碍之一,但目前缺乏足够的认识,本文从间充质干细胞的遗传稳定性、致肿瘤发生、免疫原性方面阐述间充质干细胞的生物安全研究进展,以期提高间充质干细胞治疗的生物安全意识,为其间充质干细胞安全评价和临床转化提供参考。

【关键词】 间充质干细胞; 遗传稳定性; 致癌性; 免疫原性; 生物安全

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0140-06

Research progress on the biosafety of mesenchymal stem cells

ZENG Guirong, YANG Liu, LUO Guifang, JIANG Dejian*

(Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331)

【Abstract】 Mesenchymal stem cells (MSCs) possess the ability to self-renew and give rise to highly differentiated cell types, and can be isolated from a wide range of sources, making them the first choice for cell therapy. MSCs are widely used in tissue repair, autoimmune diseases and degenerative diseases, and have high value. Currently, biosafety is one of the most challenging problems in the clinical translation of MSCs. Previous research on the biosafety of MSCs has been largely unclear. Therefore, we reviewed the research progress on several aspects of MSC biosafety, including genetic stability, tumorigenicity and immunogenicity. This review may provide a reference for the safety evaluation and clinical transformation of MSCs.

【Keywords】 mesenchymal stem cells; genetic stability; tumorigenicity; immunogenicity; biosafety

近年来,随着老龄化社会的加快,骨质疏松症、神经退行性疾病、糖尿病等与年龄相关的疾病发病率逐年攀升,给医学和生命科学带来了巨大挑战,目前以化学药物和手术治疗为支柱的传统西医治疗逐渐遭遇瓶颈,而以干细胞技术为核心的再生医学快速发展并走上临床应用,为人类衰老性疾病治

疗注入了新的希望和活力^[1-7]。据 ClinicalTrials.gov 统计,全球 210 多项间充质干细胞处于临床研究^[8], 主要集中于伤口愈合,骨骼肌、心血管、肝肾疾病、肿瘤、神经退行性疾病和自身免疫性疾病以及器官移植等。然而间充质干细胞的生物安全限制了其临床的应用,主要表现在人体内的间充质干细胞较

[基金项目]湖南省科技计划(2016TP1026)。

[作者简介]曾贵荣(1978—),男,博士,副研究员,研究方向:新药药理毒理学。E-mail: zengguirong@hnse.org

[通信作者]姜德建(1979—),男,博士,研究员,研究方向:新药药理毒理学。E-mail: jiangdejian@hnse.org

少,无法分离后直接输入体内用于细胞治疗^[9],且临床治疗需要满足以下条件^[10]:充足的细胞量,分化成特定的细胞,输注后受体中细胞存活且有效,移植后对受体安全。相应地,细胞治疗包括供体选择、间充质干细胞分离、培养扩增、临床前、临床疗效和安全性评价、移植等过程^[11],其中任何一个环节存在问题都将影响治疗的安全和疗效。作为一种新的治疗形式,间充质干细胞生物安全是细胞治疗能否进入临床应用,保障患者生活质量的关键问题。因此系统的综述目前间充质干细胞生物安全有助于促进间充质干细胞治疗的发展与应用。本综述从间充质干细胞遗传稳定性、致癌性、免疫原性等方面阐述间充质干细胞治疗的生物安全研究进展,为降低间充质干细胞治疗风险提供参考。

1 干细胞及间充质干细胞概述

干细胞是一种未完全分化的、具有自我增殖和高度分化潜能的细胞。根据来源和分化增殖能力不同,将干细胞分成多能胚胎干细胞、人诱导多能干细胞和多能成体干细胞等三大主要细胞类型^[1]。干细胞具有非常强的分化能力,在特定条件下可被分化成神经元、心肌细胞、肝细胞、成骨细胞等多种细胞,移植进入机体可替换损伤组织或产生修复因子促进组织再生^[2],干细胞的分化能力极大地推动了再生医学的发展和退行性疾病的治疗,具有传统化学药物、生物药物不具备的优势。

间充质干细胞是一种来源于中胚层具有自我复制更新和多向分化的多能干细胞,具有独特的免疫表型和免疫调节能力,属于多能成体干细胞。相对于多能胚胎干细胞、人诱导性多能干细胞,它的分化和增殖能力较弱^[3]。自上世纪六七十年代,Friedenstein 研究组首次发现一群位于动物骨髓细胞中的边缘细胞群具有成骨能力,起初被定义为贴壁集落形成单元成纤维细胞^[4]。因这群细胞可生成骨骼组织相关的细胞,被认为是干细胞,也有称为造血干细胞或间质细胞体外培养的饲养细胞。基于细胞的功能演化成成骨干细胞或骨髓间质细胞。此外,这一细胞在包括人类在内的其他物种中得以证实。随后,为适应起源于胚胎中胚层细胞的概念,Caplan 等^[5]首次提出“成年间充质干细胞”这一概念,并被科学家和临床医生广泛应用。

间充质干细胞来源于多种人体组织,最主要的来源为骨髓和脂肪组织^[1]。也可从脐带血、胎盘、

羊膜、牙髓、脑、子宫内膜、皮肤、鼻粘膜等组织分离获得间充质干细胞。它不仅可直接分化成组织特异性细胞修复伤口而且可通过释放抗炎细胞因子、抗凋亡和生长因子的旁分泌的形式刺激组织修复,被认为是组织工程和再生医学的强有力工具^[6-7]。此外,间充质干细胞可在炎症、肿瘤和损伤部位归巢替代或修复损伤的组织^[1]。基于其独特优势,间充质干细胞是细胞治疗的理想候选物,在组织再生、癌症、骨关节病等方面具有广阔的前景。

2 遗传稳定性及其影响因素

欧洲药品监督管理局出台的《关于干细胞的医疗产品的反思报告》对细胞治疗产品无污染、活力、生长曲线、细胞鉴定、纯度、效力和遗传稳定性做了详细的管理规定,特别强调遗传稳定性是主要的安全担忧^[12]。遗传稳定性指标表现为染色体畸变、微核异常、DNA 损伤、端粒缩短、表观遗传失调等。遗传不稳定与癌变密切相关,染色体核型分析是评价细胞染色体结构和数量的金标准^[13]。干细胞扩增可降低 DNA 聚合酶和 DNA 修复效能进而导致细胞遗传突变、表观遗传学改变、DNA 双链断裂^[14-15]。而 DNA 损伤阻滞转录和复制驱动细胞衰老及转分化失常,进一步加剧组织老化和年龄相关的癌变^[16-17]。

遗传稳定性受供体、组织来源、扩增过程培养条件、储存条件、传代次数等影响^[18]。Stultz 等^[19]对不同供体和代数的骨髓源性人间充质干细胞的染色体稳定性分析显示,相比于第 5、7 代,第 3 代异常核型更多,且随着代数增加,异常核型逐渐降低。根据供体年龄不同分成老年组(39~41 岁)和年轻组(22~31 岁),发现老年组供体主要为染色体易位,而年轻组为非整倍体,但老年组与年轻组的染色体并无显著差异,提示间充质干细胞染色体异常主要发生在早期代数,随着传代次数越多,染色体越趋于成熟稳定。Duarte 等^[20]比较了低温保存前后对人脐静脉间充质干细胞的染色体状态的影响,发现液氮冻存后检测到非克隆型染色体畸变,17 个细胞中期中 12 个细胞显示单体性(2 个标记染色体,其他为染色体断裂),5 个细胞染色体的结构发生改变。冻存 2 个月的细胞染色体 3 短臂臂内发生倒位。Sharma 等^[21]评价了高糖、缺血、缺氧、饥饿等不同培养条件下人脐带和胎盘来源的间充质干细胞遗传稳定性,发现突然降低氧浓度可增加核泡

数量,减少细胞增殖,但未诱导衰老;而在高糖、缺血以及低氧血清饥饿下间充质干细胞遗传保持稳定。Vinogradov 等^[22]采用热休克模拟高温环境下人子宫内膜间充质干细胞的分子遗传特征,G 带显示染色体随机断裂和非整倍体;染色体核型分析观察到细胞无基因组不平衡现象;mRNA 测序数据显示,与对照组相比,热休克诱导错配,破坏 DNA 修复。人间充质干细胞暴露在 20% O₂ 下培养显著增加氧化应激水平,诱导 DNA 双链断裂、染色体畸变、非整倍体以及端粒缩短;而 3% O₂ 的条件下培养干细胞的寿命延长,遗传稳定性显著增加;利用原位杂交分析人脂肪组织来源间充质干细胞的染色体 8、11、17,发现低氧降低非整倍体发生率;表明低氧条件有助于增强人间充质干细胞治疗的安全性^[23]。

综上所述,间充质干细胞遗传稳定性直接影响细胞的衰老、转分化进而可引起衰老和癌变,是干细胞治疗中的主要安全问题。其遗传稳定性主要受到扩增传代次数、培养条件、保存环境的影响,深入研究影响间充质干细胞的遗传稳定性机制,调整细胞培养条件并建立细胞产品制备的标准操作规程,有利于提高细胞遗传稳定性,保障细胞治疗安全。

3 致癌特性及其影响因素

致肿瘤发生是间充质干细胞临床治疗最重要风险之一。由于间充质干细胞本身的自我更新和分化潜能,长期培养能自发性转化成其他细胞,大多数可分化成成骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、脂肪细胞等无害细胞,也可能分化成恶性细胞^[24-25],这是间充质干细胞的固有特性。前期研究显示,癌症细胞的起源和恶变与间充质干细胞特征相似,如长期的增殖、生长调控机制^[26]。事实上,在一项将大量未分化的人胚胎干细胞移植到免疫缺陷小鼠观察到畸胎瘤生长的研究报道后^[27],干细胞的致癌风险被推向了风口浪尖,给干细胞快速发展浇上了一盆冷水,警醒企业、临床和科学界关注干细胞治疗的生物安全问题。尽管迄今未见间充质干细胞形成畸胎瘤的报道,但由于它具有自我增殖、分化等与干细胞相同的特性,其致癌发生风险仍不能忽视。

干细胞的致肿瘤发生受到环境因素影响,如遗传操作和体外培养。文献报道,长时间培养的间充质干细胞具有致瘤发生的潜能,转化成为高核质比、高端粒活性和高增值能力的上皮样细胞^[28-29]。

此外,遗传不稳定性与肿瘤发生密切相关^[30],如在高氧可诱导染色体畸变、DNA 损伤。Conforti 等研究^[31]了电离辐射和饥饿应激下骨髓间充质干细胞的恶变情况,发现辐射和饥饿的间充质干细胞失去了典型的纺锤形形态、生长速率降低,但保持了正常的免疫和分化功能,更为重要的是未表现出恶性癌变倾向。Yong 等^[32]评估了长期保存人脂肪来源的间充质干细胞的致瘤发生变化,发现利用低温细胞保护剂冷冻保存 3 个月细胞的肿瘤抑制因子 p53、p21、p16、pRb、hTERT、端粒酶活性和端粒长度未见明显变化,DNA 损伤和 p53 突变无显著影响,表明长期保存脂肪来源的间充质干细胞发生肿瘤风险较低。给小鼠注射脂肪组织间充质干细胞 1 年后显示,移植细胞被完全清除,未见肿瘤发生^[33]。然而,研究发现将间充质干细胞移植到 SCID 小鼠中,观察到肿瘤的生长现象^[29]。椎管内嗅粘液细胞自体移植 8 年后,一位年轻的脊髓损伤患者出现自体移植植物来源的脊髓肿块,肿块组织学与嗅黏膜相似^[34]。2009 年,文献报道一例胎儿神经干细胞移植治疗共济失调毛细管扩张 4 年后发生胶质神经脑瘤,基因分析显示肿瘤细胞来源于供体^[35]。

综上所述,间充质干细胞自身固有特性和培养环境是致瘤性的决定因素。肿瘤发生与免疫缺陷相关,由于间充质干细胞具有免疫抑制的作用,故间充质干细胞可能调控免疫促进肿瘤发生。尽管现有研究提示间充质干细胞移植的致瘤风险较低,但在间充质干细胞临床应用前,仍需严格评估其致瘤发生潜在影响。

4 免疫原性及其影响因素

干细胞从健康志愿者分离获得(同种异体),也可从患者自身分选制备。在同种异体干细胞移植面临伦理问题和免疫排异反应^[36]。人间充质干细胞具有免疫调节作用^[37],当机体免疫过低时,间充质干细胞能促进炎症。相反,免疫过度激活时,间充质干细胞抑制炎症进而避免自身攻击。因此,有观点认为间充质干细胞具有免疫特权,移植时可能不会诱发免疫反应^[38]。

间充质干细胞通过以下途径发挥免疫调控作用:通过抑制分裂素、异种抗原的 T 淋巴细胞增殖反应,诱导初始 T 细胞无能,抑制调节性 T 细胞扩增,抑制对同种异体细胞的 T 淋巴细胞毒性从而抑制 T 淋巴细胞功能;它还可通过抑制自然杀伤细胞

对病毒感染细胞的杀伤作用,抑制 IL-2 驱动 NK 细胞增殖和 INF- γ 释放;此外,间充质干细胞也可下调树突细胞共刺激分子表达,抑制单核细胞和 CD34⁺ 祖细胞分化成树突细胞,降低促炎细胞因子 IL-12、INF- γ 、TNF- α 的释放而增加 IL-10 分泌。间充质干细胞可作为抗原呈递细胞将 HLA-I 限制性病毒或肿瘤抗原加工呈递给 CD4⁺T 细胞,释放少量的 INF- γ 和颗粒酶 B,但其 T 淋巴细胞杀伤毒性效果非常有限^[39]。Klyushnenkova 等^[40]评估了骨髓间充质干细胞激活同种异体 T 细胞能力,发现异体骨髓间充质干细胞无法促进外周血 T 淋巴细胞增殖,但可释放 INF- γ 。将间充质干细胞加入初始混合淋巴细胞共同培养观察到间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖,且抑制效果呈现剂量依赖性,其发生与是否进行 INF- γ 预处理无关,表明间充质干细胞开始可激活异体 T 细胞,但由于其免疫抑制作用无法引起 T 细胞增殖反应。以上均提示同种异体间充质干细胞具有免疫抑制作用且较低的免疫原性。

Deuse 等^[41]比较了人脐带间充质干细胞和成年骨髓间充质干细胞的免疫原性,结果显示人脐带间充质干细胞 HLA-I 表达更低,TGF- β 和 IL-10 生成更多,增殖更快。骨髓间充质干细胞对异体淋巴细胞激活和体内免疫活化能力更强,而人脐带间充质干细胞免疫识别能力更弱。骨髓间充质干细胞在完全免疫小鼠显示更快的排异反应。最近的一项研究发现同种异体间充质干细胞移植后产生了抗体和显著的免疫排异反应^[42]。体外研究显示,大鼠间充质干细胞对异体 T 细胞无法激活,而 INF- γ 和 IL-1 β 处理后,间充质干细胞上调 MHC I、II 和血管粘附分子-1,增加 T 淋巴细胞毒性反应。接受间充质干细胞异体移植的大鼠的免疫活化标志物 CD25、CD71 显著上调,生成同种抗体促进补体介导的细胞裂解作用^[43]。Huang 等^[44]研究了间充质干细胞分化对细胞免疫的影响,发现间充质干细胞分化成的肌原性细胞、内皮细胞和平滑肌细胞组织相容性复合体 I a、II 表达增加, I b 则降低。这些细胞与异体白血球共培养后细胞毒性显著增加。采用分化的细胞处理心肌梗死大鼠,检测心肌功能 6 个月,发现移植 3 个月后,间充质干细胞显著改善心室功能。而异体分化的细胞在移植后 5 周被完全清除,移植 5 个月后其疗效丧失,表明间充质干细胞分化后免疫激活排斥功能增加。Liu 等^[45]将骨髓间充质干细胞分化的成骨细胞与异体淋巴细胞共培养

显示淋巴增殖反应,接受成骨细胞移植的新西兰白兔表现出明显的皮肤排异反应,该研究同样证实了间充质干细胞分化成特定细胞可产生显著的免疫排斥反应。

综上,间充质干细胞具有免疫抑制作用,但不具有免疫特权。间充质干细胞异体移植需注意免疫排异反应,且其免疫排斥反应与其组织来源、分化状态密切相关。

5 结语

间充质干细胞具有自我增殖、分化潜能、免疫调控功能,是细胞治疗的理想材料,在发育和再生医学中表现光明的前景。在间充质干细胞治疗的发展过程中,其生物安全(遗传不稳定、致肿瘤发生、免疫排异反应等)会直接影响其临床转化和应用,已成为制约其产业发展的主要障碍。为了推动干细胞产业迅速发展,国内外相关部门做出了许多努力,但目前对间充质干细胞的制备及其生物安全的研究国内外尚未形成统一的标准和体系,国家知识产权局甚至将干细胞与再生医学、免疫治疗等明确列为急需知识产权支持和国家重点发展的产业之一。在间充质干细胞应用前,需根据《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》的质量控制标准、《中华人民共和国药典》、ISCT-间充质干细胞鉴定标准(2006),对生物安全风险因素,如微生物、内毒素、致瘤性、异常毒性、残留性、核型异常率进行检测,且国际细胞治疗协会也制定了间充质干细胞应用于临床试验的放行标准,根据以上原则来降低干细胞应用的生物安全风险。未来需要深入研究间充质干细胞遗传不稳定、致癌、免疫排异的发生机制,对间充质干细胞产品制备和临床治疗进行严格规范和标准化,建立质量控制和安全评估标准体系,和准则,消除存在的安全隐患,保障人类安全。

参考文献:

- [1] Neri S. Genetic stability of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: A fundamental biosafety aspect [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2406.
- [2] Cortesini R. Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation [J]. Transpl Immunol, 2005, 15(2): 81-89.
- [3] Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells [J]. Stem cells, 2014, 32(6): 1408-1419.
- [4] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of

- guinea-pig bone marrow and spleen cells [J]. Cell Tissue Kinet, 1970, 3(4): 393-403.
- [5] Caplan AI. Mesenchymal stem cells [J]. J Orthop Res, 1991, 9(5): 641-650.
- [6] von Bahr L, Batsis I, Moll G, et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation [J]. Stem cells, 2012, 30(7): 1575-1578.
- [7] Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 11(6): 221.
- [8] Singh RK, Occelli LM, Binette F, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in the subretinal space of the cat eye [J]. Stem Cells, 2019, 28(17): 1151-1166.
- [9] Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, et al. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art [J]. Cell Regen, 2015, 4: 7.
- [10] Gimble JM, Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics [J]. Expert Opin Biol Ther, 2003, 3(5): 705-713.
- [11] Yong KW, Choi JR, Dolbashid AS. Biosafety and bioefficacy assessment of human mesenchymal stem cells: what do we know so far? [J]. Regen Med, 2018, 13(2): 219-232.
- [12] EMEA, Committee for Advanced Therapies (CAT). Reflection paper on stem cell-based medicinal products [S]. London: EMA, 2011: 1-4.
- [13] Dittmar KE, Simann M, Zghoul N, et al. Quality of cell products: Authenticity, identity, genomic stability and status of differentiation [J]. Transfus Med Hemother, 2010, 37(2): 57-64.
- [14] Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during *in vitro* expansion [J]. Stem cells, 2007, 25(9): 2371-2382.
- [15] Neri S, Pawelec G, Facchini A, et al. Microsatellite instability and compromised mismatch repair gene expression during *in vitro* passaging of monoclonal human T lymphocytes [J]. Rejuvenation Res, 2007, 10(2): 145-156.
- [16] Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(9): 579-590.
- [17] Ou HL, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process [J]. Blood, 2018, 131(5): 488-495.
- [18] Sensebe L, Tarte K, Galipeau J, et al. Therapy MSCotISfC Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells [J]. Cell stem cell, 2012, 10(1): 9-10.
- [19] Stultz BG, McGinnis K, Thompson EE, et al. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during *in vitro* culture [J]. Cytotherapy, 2016, 18(3): 336-343.
- [20] Duarte DM, Cornelio DA, Corado C, et al. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein [J]. Regen Med, 2012, 7(2): 147-157.
- [21] Sharma S, Bhonde R. Mesenchymal stromal cells are genetically stable under a hostile *in vivo*-like scenario as revealed by *in vitro* micronucleus test [J]. Cytotherapy, 2015, 17(10): 1384-1395.
- [22] Vinogradov AE, Shilina MA, Anatskaya OV, et al. Molecular Genetic analysis of human endometrial mesenchymal stem cells that survived sublethal heat shock [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 2362630.
- [23] Estrada JC, Albo C, Benguria A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(5): 743-755.
- [24] Lowe T, Bhatia S, Somlo G. Second malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(10): 1121-1134.
- [25] Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track-letter [J]. Cancer Res, 2010, 70(15): 6393-6396.
- [26] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 3035-3039.
- [27] Gropp M, Shilo V, Vainer G, et al. Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny [J]. PloS One, 2012, 7(9): e45532.
- [28] Pan Q, Fouraschen SM, Ruitter PE, et al. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(1): 105-115.
- [29] Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation [J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5331-5339.
- [30] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [31] Conforti A, Stare N, Biagini S, et al. Resistance to neoplastic transformation of ex-vivo expanded human mesenchymal stromal cells after exposure to supramaximal physical and chemical stress [J]. Oncotarget, 2016, 7(47): 77416-77429.
- [32] Yong KW, Safwani W, Xu F, et al. Assessment of tumorigenic potential in long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(8): 2217-2226.
- [33] MacIsaac ZM, Shang H, Agrawal H, et al. Long-term *in vivo* tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(4): 416-423.
- [34] Dlouhy BJ, Awe O, Rao RC, et al. Autograft-derived spinal

- cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient: Case report [J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21(4): 618-622.
- [35] Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient [J]. *PLoS Med*, 2009, 6(2): e1000029.
- [36] Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(1): 1-15.
- [37] Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2019, 53(1): e12712.
- [38] Xian B, Huang B. The immune response of stem cells in subretinal transplantation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 161.
- [39] Morandi F, Raffaghella L, Bianchi G, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens [J]. *Stem cells*, 2008, 26(5): 1275-1287.
- [40] Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells; immunogenicity, tolerance, and suppression [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 12(1): 47-57.
- [41] Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, et al. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(5): 655-667.
- [42] Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells; immune evasive, not immune privileged [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(3): 252-260.
- [43] Schu S, Nosov M, O' Flynn L, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8): 2094-2103.
- [44] Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair [J]. *Circulation*, 2010, 122(23): 2419-2429.
- [45] Liu H, Kemeny DM, Heng BC, et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2864-2871.

〔收稿日期〕2020-03-15

(上接第 139 页)

- [51] Probst V, Le Scouarnec S, Legendre A, et al. Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 856-860.
- [52] Garg V, Muth AN, Ransom JF, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease [J]. *Nature*, 2005, 437(7056): 270-274.
- [53] Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(6): 828-834.
- [54] Kruzynska-Frejtag A, Machnicki M, Rogers R, et al. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation [J]. *Mech Dev*, 2001, 103(1-2): 183-188.
- [55] Tkatchenko TV, Moreno-Rodriguez RA, Conway SJ, et al. Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease [J]. *Physiol Genomics*, 2009, 39(3): 160-168.
- [56] Chen B, Bronson RT, Klamann LD, et al. Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3): 296-299.
- [57] Weiss RM, Chu Y, Brooks RM, et al. Discovery of an experimental model of unicuspid aortic valve [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(13): e006908.
- [58] Fealey ME, Edwards WD, Miller DV, et al. Unicommisural aortic valves: gross, histological, and immunohistochemical analysis of 52 cases (1978-2008) [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21(4): 324-333.
- [59] Li C, Xu S, Gotlieb AI. The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(3): 183-190.
- [60] Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(2): 270-278.
- [61] Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847-856.

〔收稿日期〕2020-03-30

刘正泉,赵自刚. 防治内毒素休克凝血功能紊乱的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 146-150.
Liu ZQ, Zhao ZG. Advances in prevention and treatment drug therapy for coagulation disorders during endotoxin shock [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 146-150.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.024

防治内毒素休克凝血功能紊乱的研究进展

刘正泉,赵自刚*

(河北北方学院 微循环研究所,河北 张家口 075000)

【摘要】 凝血功能紊乱是内毒素休克发生微循环障碍、发展至脓毒症的一个关键环节,与患者的器官损伤、死亡率密切相关。针对“降低血液高凝、补充凝血因子、抑制纤溶系统亢进”三个层面,探索有利于恢复机体凝血稳态的相应防治措施,从而改善内毒素休克或脓毒症的预后、降低病死率。

【关键词】 内毒素休克;凝血功能紊乱

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0146-05

Advances in prevention and treatment drug therapy for coagulation disorders during endotoxin shock

LIU Zhengquan, ZHAO Zigang*

(Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

【Abstract】 Coagulation disorders are a key link in the process of endotoxin shock-induced microcirculation dysfunction and sepsis, which is closely related to organ injury and mortality of patients. Based on the three aspects of “reducing blood hypercoagulability, supplementing coagulation factors, and inhibiting fibrinolytic hyperactivity”, this paper reviews the beneficial effects of preventive and therapeutic measures to restore coagulation homeostasis and improve the prognosis and reduce the mortality of endotoxin shock or sepsis.

【Keywords】 endotoxin shock; coagulation disorders

内毒素休克这一临床常见的急危重症,由多种严重感染因素引起,以凝血功能紊乱、微循环障碍为特征,以细胞损害与器官结构损伤、功能障碍或衰竭为严重后果,进一步发展为脓毒症,病死率高达70%,是目前危重病医学领域的研究重点^[1]。其中,致病因素引起的凝血功能紊乱是内毒素休克发生微循环障碍、发展至脓毒症的一个关键环节,是临床防治内毒素休克的一个关键切入点^[2]。在内毒素休克凝血功能紊乱的发病过程中,既有致病因素引起血液高凝、凝血物质消耗带来的血液低凝,

又存在纤溶系统亢进引起的凝血与纤溶失衡,为此,众多学者从降低血液高凝、补充凝血因子、抑制纤溶系统亢进等多个角度防治内毒素休克引起的凝血功能紊乱,以期改善内毒素休克的预后,降低病死率。

1 降低血液高凝防治内毒素休克引起的凝血功能紊乱

一般来说,致病因素,特别是G⁻菌细胞壁的主要成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)以不同方式

【基金项目】河北省中医药管理局科研计划(2017213)。

【作者简介】刘正泉(1966—),男,硕士,高级实验师,主要从事微循环与休克研究。E-mail:lzq05000@126.com

【通信作者】赵自刚(1974—),男,博士,教授,硕士生导师,主要从事微循环与休克研究。E-mail:zzghyl@126.com

进入循环系统后,可直接引起血管内皮细胞(vascular endothelial cell,VEC)损伤,释放组织因子(tissue factor,TF),启动外源性凝血系统;暴露胶原,活化XII因子,启动内源性凝血系统;LPS刺激白细胞高表达TF,启动外源性凝血系统;LPS刺激可活化血小板,增强其黏附、聚集功能,释放血小板磷脂,形成凝血酶原激活物;破坏红细胞膜,释放大膜磷脂,形成凝血酶;红细胞破坏释放的大量二磷酸腺苷,也促进了血小板聚集,引起血液高凝。更为重要的是,VEC损伤增加了白细胞选择素(L-selectin)、内皮细胞选择素(E-selectin)、血小板选择素(P-selectin)等黏附分子的表达,促进了白细胞与VEC黏附、血小板黏附,发生血液高凝。这些因素互相作用,形成血液高凝的瀑布效应,形成大量微血栓,引起凝血因子与血小板消耗,成为进一步发生消耗性低凝的基础。在一项由志愿者参与、由LPS注射引起内毒素血症的研究中^[3],发现LPS引起了志愿者白细胞数目增多、C反应蛋白增高、血小板消耗。为此,以防止VEC损伤、减少白细胞与血小板活化、降低红细胞损伤、降低黏附分子表达为目的的一系列措施成为防治内毒素休克血液高凝的主要手段。

研究发现^[4],中药复方香芹汤(Xiang-Qi-Tang,XQT)及其有效成分香附酮 α (Alpha-Cyperone,CYP)、黄芪甲苷IV、穿心莲内酯均能够显著抑制LPS刺激引起大鼠心肌微血管内皮细胞的炎症反应,降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha,TNF- α)、细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1,ICAM-1)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)的生成,XQT与CYP抑制了TF的分泌,且XQT及其有效成分显著抑制了心肌微血管内皮细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)的主要信号分子p38MAPK、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)、c-jun氨基末端激酶(c-jun NH2-terminal kinase,JNK)以及核因子 κ B(nuclear factor κ B,NF- κ B)p65的磷酸化蛋白水平有关。这一研究结果表明,XQT及其有效成分改善凝血功能的作用是通过抑制心肌微血管内皮细胞的MAPKs与NF- κ B信号通路实现的,也提示减少内皮细胞损伤是降低LPS引起血液高凝状态的有效途径之一。

Kim等^[5]在一个体外猪肺灌注模型上,发现抑制血管假性血友病因子(von Willebrand factor,vWF)与血小板糖蛋白Ib结合从而抑制血小板黏附

的金精三羧酸(aurintricarboxylic acid,ATA),能剂量依赖性地抑制了人血清诱导的E-selectin表达以及人单核细胞与猪肺血管内皮细胞的黏附,抑制了凝血酶诱导的vWF分泌、补体活化、TF表达与血小板活化,改善了肺功能与白细胞在肺组织的聚集,与重组水蛭素联合应用更有利于改善凝血功能。进一步的研究^[6]显示,ATA能显著抑制LPS诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)ICAM-1和E-selectin蛋白与mRNA的高表达,从而抑制了白细胞与HUVECs的黏附,同时发现这种作用与抑制HUVECs的NF- κ B转位与I κ B降解有关。这些研究表明,抑制白细胞与内皮细胞黏附对于改善凝血功能具有一定的积极作用。

临床研究显示,急诊感染患者发生脓毒症的患者出现了血小板显著降低,血小板的降低程度且与患者病情的严重程度和预后相关^[7];血必净注射液辅助治疗在改善严重脓症患者凝血功能及预后的同时,提高了血小板数量以及纤维蛋白原含量,降低了弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation,DIC)的发生率^[8];乌司他丁、血必净联合治疗亦显著提高了烧伤后脓症患者血小板的数量,降低炎症因子水平,从而改善凝血功能^[9],也减轻了LPS处理后绵羊肺、肝、肾等脏器的损伤程度,降低了死亡率^[10];在常规治疗基础上,辅助小剂量肝素钠与低分子肝素钙治疗,在降低炎症因子水平、改善凝血功能的同时,均显著提高了脓症患者血小板数量^[11]。动物实验发现,盲肠结扎穿孔(cecal ligation-perforation,CLP)在引起动物器官损伤与失控炎症反应^[12]的同时,也引起凝血功能障碍,表现为凝血时间延长、凝血因子活性抑制、血小板数量减少、D-二聚体增多^[13];血必净注射液在有效改善盲肠结扎穿孔(cecal ligation-perforation,CLP)动物的凝血功能、提高纤维蛋白原含量的基础上,降低LPS静脉注射引起的炎症反应^[14];白藜芦醇治疗可显著改善内毒素休克后的微循环灌注状态,同时可显著提高LPS腹腔攻击大鼠的血小板数量^[15]。研究显示,LPS体外刺激血小板,可剂量依赖性地引起血小板凋亡^[16],这可能是内毒素休克后血小板功能降低的又一个因素。这些研究结果说明,抑制血小板消耗、提高血小板数量对改善脓毒症凝血功能可发挥积极的有益作用。

此外,包括血栓调节蛋白、抗凝血酶III(antithrombin III,AT-III)、蛋白C等在内的机体抗凝系统,对于维持凝血稳态也发挥着积极作用。临

床研究显示^[17],加味四妙勇安汤辅助治疗显著提高了脓毒症患者血清 AT-III 水平,从而改善了凝血功能。Iba 等^[18]在静脉注射 LPS 建立内毒素血症大鼠模型上,活体肠系膜微循环观察发现 AT(125 IU/kg)、重组血栓调节蛋白联合注射显著降低了白细胞与内皮的黏附和血栓形成、改善了小静脉的微血流,单独或联合治疗显著抑制了凝血系统的活化,反映器官损伤的血清标志物未发生明显变化,也降低了血中晚期炎症介质高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 的水平。一项全国性的临床研究表明,分别或联合应用重组血栓调节蛋白或 AT-III,均显著改善了脓毒症患者的凝血功能,降低了 DIC 的发生率以及住院死亡率^[19]。研究发现^[20],来自细菌的外膜小泡 (outer membrane vesicles, OMVs) 启动了感染因素引起脓毒症的炎症反应,同样 OMVs 与 HUVECs 共同孵育后,在明显提高 TF、P-selectin、E-selectin 表达的同时,也显著提高了血栓调节蛋白表达;同时 OMVs 处理 HUVECs 后的上清液作用于全血标本,也显著提高了单核细胞与血小板的聚集,可见 OMVs 促进了内毒素休克或脓毒症后血液高黏状态的形成。研究也发现^[21],LPS 持续静脉注射 6 h 引起了家兔凝血功能障碍,丹酚酸 B 静脉注射提高了纤维蛋白原、血小板、蛋白 C 以及 AT-III 水平,从而改善了家兔的凝血功能;丹参酮 IIA 也发挥了与丹酚酸 B 相同的作用,降低了家兔的死亡率(从 80%降低至 26.7%)^[22]。蛋白 C 活性也成为监测脓毒症患者器官与凝血状态的一个重要标志物^[23]。这些研究均表明,提高机体抗凝系统的功能,有利于对抗 LPS 攻击或脓毒症引起的血液高凝状态。

针对细胞黏附分子介导的白细胞黏附或血小板黏附在内毒素休克或脓毒症凝血功能紊乱发展中的作用,研究发现 L-selectin 抗体可抑制 LPS 攻击后白细胞黏附,E-selectin 的单克隆抗体也可降低 LPS 攻击小鼠白细胞滚动及其与内皮细胞的黏附,从而降低 LPS 引起的炎症反应^[24]。但是,目前还没有这些黏附分子抗体使用后,通过抑制炎症反应改善凝血功能的直接报道,还需要进一步关注。

此外,激肽释放酶(kallikrein, KLK)-激肽系统参与了凝血的调节,KLK 通过激活 X II 因子,引起凝血。Kolté 等^[25]在 LPS 攻击大鼠前,应用 KLK 抑制剂 PF-04886847 进行前处理,阻断了 LPS 引起的循环血中的粒细胞数量增多以及血浆 6-keto PGF_{1α} 水平增高,降低了球囊损伤家兔的血栓形成、延长了 APTT 与 TT,但对 LPS 引起的血小板数量减少、

血浆纤维蛋白原降低、D-二聚体水平增高以及肝、肾损伤没有明显的作用。结果表明,PF-04886847 具有一定的抗血栓形成的作用,也说明抑制 KLK 可调节 LPS 后的凝血稳态。

上述研究表明,针对引起血液高凝的诸多因素进行治疗,对于内毒素休克或脓毒症后的血液凝固稳态发挥着积极有效的作用。但这些动物实验研究多集中于某一因素的观察,缺少整体治疗效果的评价;一些临床试验研究也多集中在小样本的现象描述,还缺乏大样本的综合性观察。因此,对内毒素休克后血液高凝的防治研究,还需要基础与临床联合研究的深入。

2 补充凝血因子防治内毒素休克引起的凝血功能紊乱

由于内毒素休克导致的血液高凝引起了凝血因子消耗,因此及时有效地补充凝血因子成为防治内毒素休克凝血功能紊乱的重要举措。新鲜冷冻血浆(fresh frozen plasma, FFP)富含大量的凝血因子,对于多种原因导致的凝血功能障碍治疗效果很好。Letourneau 等^[26]的一项体外研究显示,解冻后储存在 1℃~6℃ 冰箱 0 d 或 5 d 中的 FFP,均显著提高了 LPS 处理的人肺内皮细胞的 ICAM、VCAM、P-selectin、E-selectin 的表达,提示输入 FFP 可能提高了白细胞与内皮细胞的黏附。Shamsudin 等^[27]检测了 FFP 中凝血因子含量随着储存时间延长的变化情况,发现活化的 VII 因子(activated factor VII, FVIIa)自解冻后即刻以及储存在 4℃ 冰箱 6 h、3 d、5 d 等四个时间点的活性依次保持原有的 73.43%、73.73%、71%、69.8%,FVIII 活性依次为 177.63%、144.37%、80.8%、70.97%,纤维蛋白原含量依次为 3.24 g/L、3.24 g/L、3.21 g/L、3.20 g/L,说明 FFP 储存后凝血物质的有效性。但 FFP 对内毒素休克后凝血功能紊乱中的作用还需进一步观察。

研究发现,活化的 VII 因子(activated factor VII, FVIIa)能降低 LPS 诱导肺、肾组织的血管渗漏,该作用在内皮细胞蛋白 C 受体(endothelial cell protein C receptor, EPCR)缺陷鼠上没有表现出来,应用 EPCR 单克隆抗体则完全抑制了 FVIIa 对血管屏障的保护作用,结果表明 FVIIa 保护血管屏障的作用是通过 EPCR 实现的^[28]。同样,FXa 通过形成凝血酶参与了凝血的瀑布效应,在 LPS 刺激的 HUVECs 模型以及 CLP 导致的脓毒症模型上,FXa 后处理降低了 HUVECs 产生 HMGB1、TNF α 、IL-1 β 的能力,降低了脓毒症小鼠 HMGB1 释放及其介导的血管高通透性

与白细胞迁移,下调了 IL-6 产生,降低死亡率^[29]。Ku 等^[30]的研究也表现,FXa 前处理通过其受体——有效的细胞蛋白酶受体抑制了 LPS 引起的分泌型磷脂酶 A2 IIA 高表达与活性,该作用是通过抑制 LPS 诱导的胞浆磷脂酶 A2 及 ERK1/2 活化实现的。但这些研究均没有观察活化的凝血因子在消耗性凝血功能障碍中的作用,因此,今后应进一步研究。

3 抑制纤溶系统亢进防治内毒素休克引起的凝血功能紊乱

一般认为,致病因素作用于机体引起大量微血栓形成后,激活纤溶系统,有利于降解聚集的纤维蛋白,防止微血管阻塞。但是,过度的纤溶系统激活,形成的大量纤维蛋白降解产物会进一步加重微血管损害,引起微循环障碍与出血,导致病情恶化。为此,抑制纤溶系统亢进对于防治内毒素休克引起的凝血功能紊乱具有积极的作用。

静脉注射纤溶酶抑制剂凝血酸 (tranexamic acid, TA) 可有效抑制静脉快速注射 LPS 提高大鼠血浆 D-二聚体、纤溶酶 α 2-抗纤溶酶复合物水平的作用,但并没有影响 LPS 引起凝血活化、粒细胞增多、中性粒细胞活化或脱颗粒、内皮细胞活化、炎症因子释放。红花黄色素降低了 CLP 大鼠血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的同时,降低了血清 TF 水平、提高了组织因子途径抑制物水平,从而改善了大鼠的凝血功能^[31]。植物成分 Ankaferd 不会影响凝血因子的含量,但能够双向调节 LPS 诱导 EPCR 与 PAI-1 表达,表现在早期 (LPS 作用 1 h) 抑制 EPCR 与 PAI-1 表达,晚期 (LPS 作用 6 h 后) 上调 EPCR 与 PAI-1 表达,从而发挥良好的抗出血作用^[32]。针对 LPS 诱导家兔 DIC 模型的研究^[33]发现,来自蝮蛇的纤维蛋白原溶解酶 (fibrinogenase, 又称为 FIIa) 降低了 LPS 引起肝、肾损伤,提高了纤维蛋白原浓度、蛋白 C 活性、血小板数量、AT-III 和组织纤溶酶原激活物 (tissue type plasminogen activator, t-PA) 含量,降低了 PAI-1 水平,延长了凝血时间,从而提高了存活率。体外实验^[33]发现, FIIa 上调了 HUVECs 的 t-PA 和尿激酶型纤溶酶原激活剂的表达、下调了 PAI-1 表达,直接活化蛋白 C。这些研究结果表明,TA、红花黄色素、Ankaferd、FIIa 从调节纤溶系统活性的角度干预了 LPS 诱导的凝血功能异常。

可见,以纠正纤溶系统活性为切入点,探寻相关治疗策略,对于改善内毒素休克或脓毒症后凝血稳态具有积极的作用。

4 小结

总之,凝血功能紊乱贯穿了多种致病因素导致内毒素休克或脓毒症的整个发病过程,与患者的器官损伤、死亡率密切相关^[34],从早期对抗血液高凝以减少微血栓形成与凝血物质消耗、微血栓发生后补充凝血物质以纠正低凝、晚期抑制纤溶系统亢进以避免纤溶产物对微血管的损害等多角度、全方位纠正凝血功能紊乱,对于改善内毒素休克预后具有积极意义。新冠肺炎疫情发生以来,针对发展为脓毒症的重症患者的临床研究显示,以抗凝为治疗靶向恢复患者凝血功能的治疗措施可有效改善患者的预后^[35],进一步提示改善患者机体凝血稳态的重要性。从目前的研究结果来看,中药复方如血必净注射液,可能多靶点地调节内毒素休克或脓毒症后的凝血稳态,以中药治疗为临床策略防治内毒素休克,可能是今后的一个方向。但是,内毒素休克或脓毒症后凝血功能紊乱的发病机制复杂,病情变化多端。这也提示我们,在重视凝血功能的同时,要密切关注其变化规律,选择有针对性的药物与治疗时机。一些具有调节机体凝血功能但尚未应用于内毒素休克或脓毒症治疗的药物,也是今后关注的热点。同时,也要探索新的治疗措施与方法,以期对内毒素休克的防治提供新思路。

参考文献:

- [1] Legrand M, De Backer D, Dépret F, et al. Recruiting the microcirculation in septic shock [J]. *Ann Intensive Care*, 2019, 9(1): 102.
- [2] Ito T, Thachil J, Asakura H, et al. Thrombomodulin in disseminated intravascular coagulation and other critical conditions—a multi-faceted anticoagulant protein with therapeutic potential [J]. *Crit Care*, 2019, 23(1): 280.
- [3] Ostrowski SR, Berg RM, Windeløv NA, et al. Coagulopathy, catecholamines, and biomarkers of endothelial damage in experimental human endotoxemia and in patients with severe sepsis: a prospective study [J]. *J Crit Care*, 2013, 28(5): 586–596.
- [4] He CL, Yi PF, Fan QJ, et al. Xiang-Qi-Tang and its active components exhibit anti-inflammatory and anticoagulant properties by inhibiting MAPK and NF- κ B signaling pathways in LPS-treated rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(2): 215–224.
- [5] Kim HK, Kim JE, Wi HC, et al. Aurintricarboxylic acid inhibits endothelial activation, complement activation, and von Willebrand factor secretion *in vitro* and attenuates hyperacute rejection in an ex vivo model of pig-to-human pulmonary xenotransplantation [J]. *Xenotransplantation*, 2008, 15(4):

- 246–256.
- [6] Kim JE, Lee S, Han KS, et al. Aurintricarboxylic acid inhibits the nuclear factor- κ B-dependent expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and endothelial cell selectin on activated human endothelial cells [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2011, 22(2): 132–139.
- [7] 孟醒. 急诊感染患者凝血障碍和患者脓毒症的关系及其参考价值 [J]. *中外医疗*, 2016, 35(4): 48–50.
- [8] 张荣, 张高峰, 陈洁. 血必净注射液对严重脓毒症患者凝血功能及预后的影响 [J]. *成都医学院学报*, 2016, 11(1): 48–51.
- [9] 唐虹. 乌司他丁、血必净联合治疗对烧伤后脓毒症凝血功能及全身炎症反应影响的临床研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(12): 1132–1136.
- [10] 牛廷献, 万东君, 王春雨, 等. 乌司他丁联合血必净对内毒素致绵羊多脏器功能障碍综合征的防治研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 23–27, 31.
- [11] 吴志雄, 冯坤好, 谭家余, 等. 小剂量肝素钠与低分子肝素钙对脓毒症治疗作用的对比研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(4): 359–361.
- [12] 荆喜中, 贾欢欢, 罗挺, 等. 小鼠脓毒症模型的建立和评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2): 158–163.
- [13] 李锦灵, 黄树武, 李舸, 等. 大鼠脓毒症模型的凝血功能研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 224–229.
- [14] 陆璐, 冯小明, 王红义, 等. 血必净对大鼠多脏器功能障碍综合征炎症因子的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 26–30.
- [15] Wang Y, Cui H, Niu F, et al. Effect of resveratrol on blood rheological properties in LPS-challenged rats [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1202.
- [16] 吉祥, 姚芳超, 王兵, 等. 大肠杆菌脂多糖体外诱导小鼠血小板凋亡的研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(8): 677–681.
- [17] 李淑芳, 闫国良, 陈织耕. 加味四妙勇安汤对脓毒症患者凝血功能紊乱的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30(1): 23–26.
- [18] Iba T, Miki T, Hashiguchi N, et al. Combination of antithrombin and recombinant thrombomodulin attenuates leukocyte-endothelial interaction and suppresses the increase of intrinsic damage-associated molecular patterns in endotoxemic rats [J]. *J Surg Res*, 2014, 187(2): 581–586.
- [19] Tanaka K, Takeba J, Matsumoto H, et al. Anticoagulation therapy using rh-thrombomodulin and/or antithrombin III agent is associated with reduction in in-hospital mortality in septic disseminated intravascular coagulation: A nationwide registry study [J]. *Shock*, 2019, 51(6): 713–717.
- [20] Soult MC, Dobryднеva Y, Wahab KH, et al. Outer membrane vesicles alter inflammation and coagulation mediators [J]. *J Surg Res*, 2014, 192(1): 134–142.
- [21] Wu Z, Li JN, Bai ZQ, et al. Antagonism by salvianolic acid B of lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(7): 502–508.
- [22] Wu LC, Lin X, Sun H. Tanshinone IIA protects rabbits against LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(10): 1254–1259.
- [23] Katayama S, Koyama K, Shima J, et al. Thrombomodulin, plasminogen activator inhibitor-1 and protein C Levels, and organ dysfunction in sepsis [J]. *Crit Care Explor*, 2019, 1(5): e0013.
- [24] Leone M, Boutière-Albanèse B, Valette S, et al. Cell adhesion molecules as a marker reflecting the reduction of endothelial activation induced by glucocorticoids [J]. *Shock*, 2004, 21(4): 311–314.
- [25] Kolte D, Bryant JW, Gibson GW, et al. PF-04886847 (an inhibitor of plasma kallikrein) attenuates inflammatory mediators and activation of blood coagulation in rat model of lipopolysaccharide (LPS)-induced sepsis [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2012, 10(2): 154–166.
- [26] Letourneau PA, Pati S, Gerber MH, et al. Fresh frozen plasma increases adhesion molecule expression on human pulmonary endothelial cells [J]. *J Surg Res*, 2010, 163(2): 317–322.
- [27] Shamsudin S, Yousuf R, Tang YL, et al. Evaluation of coagulation factor activity and sterility of thawed fresh frozen plasma during storage up to 5 days at 4°C [J]. *Malays J Pathol*, 2020, 42(1): 59–64.
- [28] Sundaram J, Keshava S, Gopalakrishnan R, et al. Factor VIIa binding to endothelial cell protein C receptor protects vascular barrier integrity *in vivo* [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(5): 690–700.
- [29] Lee W, Ku SK, Bae JS. Factor Xa inhibits HMGB1-induced septic responses in human umbilical vein endothelial cells and in mice [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(4): 757–769.
- [30] Ku SK, Bae JS. Inhibitory Effect of FXa on Secretory Group IIA Phospholipase A2 [J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 987–994.
- [31] 李秋宇, 金醒昉. 红花黄色素 A 对脓毒症大鼠血清 TNF- α 、TF 及 TFPI 的调控和凝血机能的影响 [J]. *包头医学院学报*, 2016, 32(2): 3–4.
- [32] Karabıyık A, Yılmaz E, Güleç S, et al. The dual diverse dynamic reversible effects of ankaferd blood stopper on EPCR and PAI-1 inside vascular endothelial cells with and without LPS challenge [J]. *Turk J Haematol*, 2012, 29(4): 361–366.
- [33] Qi JZ, Lin X, Chen JS, et al. A novel fibrinogenase from *Agkistrodon acutus* venom protects against DIC via direct degradation of thrombosis and activation of protein C [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(7): 1705.
- [34] Gando S, Shiraishi A, Yamakawa K, et al. Role of disseminated intravascular coagulation in severe sepsis [J]. *Thromb Res*, 2019, 178: 182–188.
- [35] Tang N, Bai H, Chen X, et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(5): 1094–1099.

[收稿日期] 2020-04-23