

伍林泽, 胡旭红, 傅榕冰, 等. 清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 上下游细胞因子的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (9): 1-9.

Wu LZ, Hu XH, Fu RB, et al. Effect of Qingre Runzao oral liquid on chemokines and ILC2s and their upstream and downstream cytokines in asthmatic mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 001

清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 上下游细胞因子的影响

伍林泽¹, 胡旭红¹, 傅榕冰¹, 魏义杰², 虎敏¹, 孔令麒¹, 童晓云³, 吴向农³,
吴佳丽⁴, 聂坚¹, 张绍湘⁴, 虎春艳¹, 李宝晶¹, 魏丹霞^{4*}, 黄丰^{1*}

(1. 云南中医药大学, 昆明 650500; 2. 腾冲市中医医院, 云南 腾冲 679100; 3. 云南中医药大学第一附属医院, 昆明 650021;
4. 云南中医药大学第三附属医院, 昆明 650011)

【摘要】 目的 通过清热润燥口服液干预卵清蛋白(OVA)致敏的哮喘小鼠, 观察其对哮喘小鼠Ⅱ型固有淋巴细胞(ILC2s)数量及其上下游细胞因子的影响。**方法** 将 BALB/c 小鼠(雌性)分为空白对照组、模型对照组、阳性对照组(地塞米松组, 1 mg/(kg·d))、清热润燥口服液低、高(4.32、8.64 g/(kg·d))剂量组, 共 40 只。使用 OVA 为致敏剂诱导哮喘小鼠模型, HE 染色观察小鼠肺组织的病理改变; 酶联免疫吸附(ELISA)测定检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)中 ILC2s 上下游细胞因子 Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5 及 IL-6 含量; 免疫组化法检测肺组织 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 和 IL-5 的表达; 流式细胞术和免疫双荧光染色检测肺组织中 ILC2s 的数量及生成。**结果** 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠出现肺组织炎性细胞浸润和支气管壁增厚的病理变化, BALF 中 ILC2s 上下游细胞因子 Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5 及 IL-6 的含量升高($P<0.01$), 肺组织中 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 及 IL-5 的表达升高($P<0.01$)、ILC2s 的数量及生成增多($P<0.01$)。与模型对照组比较, 清热润燥口服液低高剂量明显改善哮喘小鼠肺组织病理损伤, 降低 BALF 中 ILC2s 上下游细胞因子表达($P<0.01$)、下调肺组织中 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 及 IL-5 的表达($P<0.05$, $P<0.01$)和减少 ILC2s 的数量及生成($P<0.01$)。**结论** 清热润燥口服液可以降低 OVA 诱导的哮喘小鼠 ILC2s 的数量及其上下游细胞因子和下调肺组织中 IL-33 及 IL-5 的表达, 进而起到防治哮喘的作用。

【关键词】 哮喘小鼠; 清热润燥口服液; OVA; ILC2s; 细胞因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0001-09

Effect of Qingre Runzao oral liquid on chemokines and ILC2s and their upstream and downstream cytokines in asthmatic mice

WU Linze¹, HU Xuhong¹, FU Rongbing¹, WEI Yijie², HU Min¹, KONG Lingqi¹, TONG Xiaoyun³, WU Xiangnong³,
WU Jiali⁴, NIE Jian¹, ZHANG Shaoxiang⁴, HU Chunyan¹, LI Baojing¹, WEI Danxia^{4*}, HUANG Feng^{1*}

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China. 2. Tengchong Hospital of Chinese Medicine, Tengchong 679100. 3. the First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021.
4. the Third Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650011)

【基金项目】 国家自然科学基金(82060751); 云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项资金面上项目[2019FF002(-033), 2017FF116(-018)]。

【作者简介】 伍林泽(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物作用及机制研究。E-mail: 2502531346@qq.com

【通信作者】 魏丹霞(1970—), 女, 主任医师, 研究方向: 中西医结合内科。E-mail: 1216508769@qq.com

黄丰(1971—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药免疫药理。E-mail: 14030@ynutcm.edu.cn

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To observe the effects of Qingre Runzao oral liquid on the numbers of type II intrinsic lymphocytes (ILC2s) and their upstream and downstream cytokines in asthmatic mice sensitized by ovalbumin. **Methods** Female BALB/c mice were divided into the blank control group, model control group, positive control group (dexamethasone group, 1 mg/(kg · d)) and low- and high-dose Qingre Runzao oral liquid groups (4.32 and 8.64 g/(kg · d)). The asthma mouse model was induced using ovalbumin as a sensitizer, and pathological changes in lung tissue were observed by hematoxylin and eosin staining. Levels of the upstream and downstream cytokines of ILC2s Eotaxin, interleukin (IL)-25, IL-33, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-4, IL-5 and IL-6 were detected in mouse bronchoalveolar lavage fluid (BALF) using enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of IL-33 and IL-5 in lung tissue was detected by immunohistochemical method. Flow cytometry and immunofluorescence staining were used to assess the number and production of ILC2s in lung tissue. **Results** Compared with the blank control group, the model control group showed pathological changes of inflammatory cell infiltration in the lung tissue and bronchial wall thickening. Furthermore, levels of the upstream and downstream cytokines Eotaxin, IL-25, IL-33, TSLP, IL-4, IL-5 and IL-6 were increased in BALF ($P < 0.01$). The expression of IL-33 and IL-5 was increased in lung tissue ($P < 0.01$), and the number and production of ILC2s was also increased ($P < 0.01$). Compared with the model control group, both the low and high doses of Qingre Runzao oral liquid significantly improved the pathological injury to lung tissue in asthmatic mice, decreased the expression of upstream and downstream cytokines of ILC2s in BALF ($P < 0.01$), downregulated the expression of IL-33 and IL-5 in lung tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and decreased the number and production of ILC2s ($P < 0.01$). **Conclusions** Qingre Runzao oral liquid can reduce the numbers of ILC2s and their upstream and downstream cytokines in ovalbumin-induced asthmatic mice. It can also downregulate the expression of IL-33 and IL-5 in lung tissue, thus playing a role in the prevention and treatment of asthma.

【Keywords】 asthmatic mice; Qingre Runzao oral liquid; OVA; ILC2s; cytokines

支气管哮喘简称哮喘 (asthma), 是一种临床上常见、多发和难愈的慢性呼吸系统疾病。近年来, 在基因、环境和过敏原等因素的相互作用下哮喘的发病率和死亡率逐年升高, 目前全球范围内有 3~4 亿哮喘患者, 我国成年人中哮喘患者已达到 4570 万人, 对人类健康构成巨大的威胁^[1]。哮喘的发病机制复杂, 且由多种炎性细胞和细胞因子参与, 其中嗜酸性粒细胞趋化因子 Eotaxin, 可以激活嗜酸性粒细胞并将其募集到肺中, 导致患者气道重塑和气道高反应性加重^[2]。此外, 最新研究表明先天性免疫细胞中的固有淋巴样细胞 (innate lymphoid cells, ILCs) 在哮喘的发病过程中也具有重要作用^[3]。来自于骨髓造血干细胞中淋巴样前体细胞的 ILCs 中的 II 型固有淋巴细胞 (type II innate lymphoid cells, ILC2s), 在过敏性鼻炎和哮喘等疾病中的表达水平显著升高。当肺部受到多种炎症因素的刺激时, 上皮源性细胞因子 IL-33 (interleukin-33)、IL-25 (interleukin-25)、胸腺基质淋巴细胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 大量分泌, 并且刺激 ILC2s 表达 2 型 T 辅助淋巴 (Th2) 细胞因子 IL-4 (interleukin-4) 和 IL-5 (interleukin-5) 及促炎因子 IL-6 (interleukin-6)^[4-5], 引起 Th2 型免疫反应, 加重哮喘的气道炎症, 从而促进哮喘的发生。

哮喘属于中医哮证范畴, 其发病机制在中医论述里分为夙根学说, 肺虚、脾虚、肾虚学说和外邪学说等^[6]。在夙根学说中宿痰伏于肺, 说明肺部是哮喘发病的主要部位, 痰是哮喘发病的主要病理因素。云南省荣誉名中医陆家龙认为治疗慢性气道炎症性疾病, 要“养润与通利”并行, 并根据此观点研制出清热润燥口服液。临床证明, 该方具有清肺养阴和润肺止咳等药效, 以及安全有效的特点, 用于治疗慢性支气管炎急性发作和咽炎等疾病, 已在临床上使用了 30 余年^[7-8]。本实验旨在通过清热润燥口服液对 OVA 致敏的哮喘小鼠的趋化因子和 ILC2s 数量及上下游细胞因子的影响, 探讨该方干预哮喘小鼠的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物采用健康的清洁级 BALB/c 雌性小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体重 (20±2) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [SCXK (辽) 2015-0001], 实验动物质量合格证号为 No. 211002300051473, 动物饲养于云南中医药大学实验动物中心 [SYXK (滇) K2017-0005], 实验经云南中医药大学实验动物伦

理审查委员会批准(R-06202035),并按照实验动物使用的3R原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

组成清热润燥口服液的桑叶、苦杏仁、浙贝母、南沙参、麦冬、芦根、薏苡仁、陈皮、茯苓、冬瓜仁、京半夏、炒谷和炒麦芽均购于云南白药集团,并委托云南中医药大学第三附属医院制剂室制备提供(4.1 g/mL原生药),药物保存于4℃备用;地塞米松和卵清蛋白(OVA)(美国Sigma公司,批号分别为:BCBV3214、9006-59-1);Al(OH)₃粉末(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:38701);小鼠Eotaxin、IL-4、IL-5、IL-6、IL-33和TSLP酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(联科生物技术有限公司,批号分别为:2213080441、2213080441、A20580821、A20680724、A23380314、A26580933);小鼠IL-25(IL-17E)ELISA试剂盒(欣博盛生物科技有限公司,批号:181225-007a);仓鼠抗小鼠CD3 ϵ 抗体、大鼠抗小鼠CD4抗体、仓鼠抗小鼠CD11c抗体、大鼠抗小鼠Ly-6G和Ly-6C(Gr-1)抗体、大鼠抗小鼠CD5抗体、大鼠抗小鼠CD19抗体、小鼠抗NK1.1抗体、大鼠抗小鼠CD8 α 抗体(美国BD Pharmingen公司,批号分别为:553060、553728、553800、553125、553019、553784、553163、553163);Biotin anti-mouse Fc ϵ RI α (美国BioLegend公司,批号:134304);Biotin rat anti-mouse TER119和Anti-mouse F4/80 antigen biotin(美国eBioscience公司,批号分别为:13-5921-81、13-5921-81);Liberase TM和DNase I(瑞士Roche公司,批号分别为:35537400、35027800);GATA3和IL-33抗体(武汉Proteintech公司,批号分别为:66400-1-Ig、12372-1-AP);IL-5抗体(美国Signalway公司,批号为:31306-1);KLRG1抗体(美国Fitzgerald公司,批号为:70R-18166)。超声雾化器(德国百瑞公司,型号:INQUA NEB plus);玻片扫描影像系统(深圳市生强科技有限公司,型号:Teksqray SQS-1000);酶标仪(美国美谷分子,型号:Spectra Max plus384);-80℃超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司,型号:8920);正置光学显微镜、成像系统(日本尼康公司,型号分别为:Nikon Eclipse E100、NIKON DS-U3);流式细胞检测仪(美国BD公司,型号:LSRF ortessa)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

实验将BALB/c小鼠(雌性)分为5组,每组8

只,空白对照组(C组)、模型对照组(M组)、阳性对照组(地塞米松,DEX组)、清热润燥口服液低剂量组(QRRZ-L组)、清热润燥口服液高剂量组(QRRZ-H组)。

1.3.2 哮喘模型建立及给药方法

于开始建立模型的第1、8、15天,采用腹腔注射的方式,C组每只注射生理盐水0.2 mL,其余各组每只注射OVA混悬液(OVA和Al(OH)₃配制,浓度分别为:1、5 mg/mL)0.2 mL致敏。第21天开始采用灌胃的方式给药7 d,每天1次,C组和M组为生理盐水(10 mL/kg),DEX组为地塞米松溶液(1 mg/(kg·d)),QRRZ-L和QRRZ-H组分别为低(4.32 g/(kg·d))、高(8.64 g/(kg·d))剂量的清热润燥口服液。给药1 h后进行雾化,除C组使用生理盐水雾化外,其余各组使用2% OVA雾化液雾化激发1周(每天每次30 min)。

1.3.3 收集肺泡灌洗液

第28天,1%的戊巴比妥(0.01 mL/g)麻醉小鼠,随后取血处死,开颈部暴露气管,并进行插管,打开胸腔,用动脉夹将右支气管夹闭,用0.3 mL PBS缓冲液抽吸灌洗右肺3遍,灌洗2次后收集。于1000 r/min,4℃离心10 min,取上清液严格按照试剂盒说明书操作步骤检测BALF中Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5和IL-6的含量。

1.3.4 采集肺组织

收集完肺泡灌洗液后,取右肺中叶用PBS漂洗血液后,于滤纸上吸干残留液体,浸泡于中性甲醛组织固定液中,浸泡36 h后将肺组织用石蜡包埋后切片,进行苏木精-伊红染色(HE染色)、免疫组化染色和免疫双荧光染色;取肺上下叶置入预冷的PBS中,剪碎成小于0.5 cm×0.5 cm的碎块后,加入Liberase TM和DNase I于37℃静置消化1 h后研磨,制成单细胞悬液后进行流式检测肺组织ILC2s的数目。

1.4 统计学方法

实验数据通过SPSS 20.0软件进行统计分析,采用单因素方差分析和t检验的方法进行多组间及组间差异比较,并以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示实验结果有显著性差异,数据分析结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并用GraphPad Prism 8软件进行作图。

2 结果

2.1 HE染色观察肺组织病理改变

HE染色结果显示:空白对照组肺组织支气管

结构清晰完整,黏膜上皮细胞完整无脱落且排列整齐,几乎没有炎性细胞浸润;模型对照组较空白对照组相比支气管壁增厚,支气管上皮破坏不完整且气管炎性细胞浸润严重;阳性对照组和清热润燥口服液低高剂量组较模型对照组相比气道周围的炎性细胞浸润和支气管壁增厚特征有所减轻,如图 1 所示。

2.2 ELISA 检测 BALF 中 Eotaxin、IL-25、IL-33、TSLP、IL-4、IL-5 及 IL-6 的含量

2.2.1 清热润燥口服液对哮喘小鼠 BALF 中 Eotaxin 含量的影响

如图 2 所示,模型对照组 BALF 中 Eotaxin 的含量与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可使 Eotaxin 的含量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.2.2 清热润燥口服液对哮喘小鼠 BALF 中 IL-25、IL-33、TSLP 含量的影响

如图 3 所示,模型对照组 BALF 中 IL-25、IL-33、TSLP 的含量与空白对照组相比,明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可使 IL-25、IL-33、TSLP 的含量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.2.3 清热润燥口服液对哮喘小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-6 含量的影响

如图 4 所示,模型对照组 BALF 中 IL-4、IL-5 和 IL-6 的含量与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可使 IL-4、IL-5 和 IL-6 的含量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.3 免疫组化法检测肺组织中 ILC2s 上下游细胞因子 IL-33 及 IL-5 的表达

2.3.1 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 上游细胞因子 IL-33 表达的影响

如图 5 所示,模型对照组肺组织中 IL-33 的表达与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均下调肺组织中 IL-33 的表达,具有显著性差异($P<0.05, P<0.01$)。

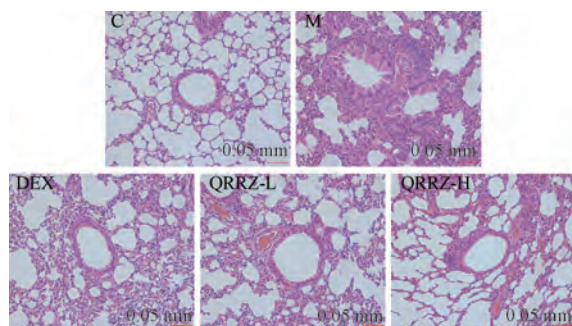
2.3.2 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 下游细胞因子 IL-5 表达的影响

如图 6 所示,模型对照组肺组织中 IL-5 的表达与空白对照组相比明显升高,具有显著性差异($P<$

0.01);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均下调肺组织中 IL-5 的表达,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.4 流式细胞术检测肺组织中 ILC2s 的数量变化

运用流式细胞术检测清热润燥口服液的高剂量对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 数量的影响。如图 7

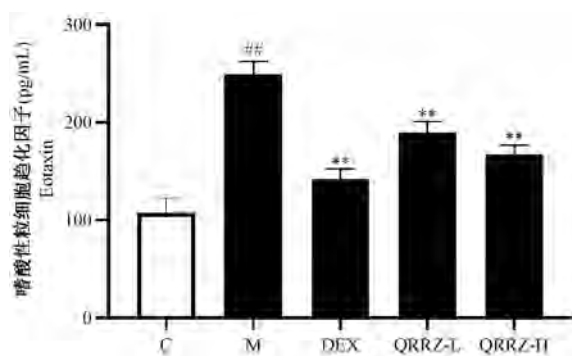


注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。

图 1 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织病理变化的影响(HE 染色)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid.

Figure 1 Effect of Qingre Runzao oral liquid on pathological changes of lung tissue in asthmatic mice(HE staining)



注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比,### $P<0.01$;与模型对照组相比,** $P<0.01$ 。

图 2 清热润燥口服液对哮喘小鼠 Eotaxin 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ### $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effect of Qingre Runzao oral liquid on Eotaxin in asthmatic mice

所示,模型对照组肺组织中 ILC2s 数量与空白对照组相比明显增高,具有显著性差异($P<0.01$);与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高剂量组可使肺组织中 ILC2s 数量降低,具有显著性差异($P<0.01$)。

2.5 免疫双荧光染色检测肺组织中 ILC2s 的生成

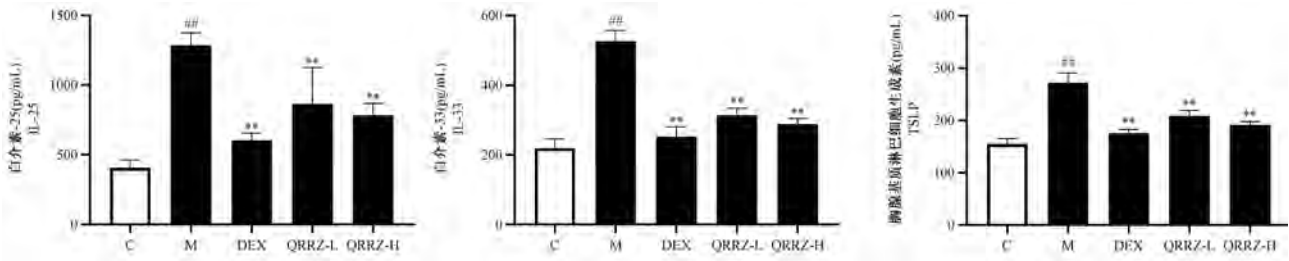
免疫双荧光染色法检测 GATA3(红)与 KLRG1(绿)的表达,确定 ILC2s 的生成。如图 8 所示,模型对照组肺组织中 ILC2s 与空白对照组相比明显增多;与模型对照组相比,阳性对照组和清热润燥口服液高低剂量组均可降低肺组织中 ILC2s 的生成。

3 讨论

清热润燥口服液经过现代工艺加工和临床疗效研究而成,是由桑叶、苦杏仁、陈皮、浙贝母、南沙参、麦冬、芦根、薏苡仁和茯苓等中药组成的复方制剂,其中桑叶归肺、肝经,清肺润燥;苦杏仁归肺经,化痰、止咳和平喘;陈皮归肺、脾经,理气化痰等,方中诸药配伍,共同发挥其药效。在动物实验的研究

中表明其具有抗炎、祛痰、止咳和平喘的作用^[7-9],利用高效液相色谱法和紫外分光光度法测定该方的橙皮苷、苦杏仁苷和总多糖的含量^[10-12],对本制剂进行有效的质量控制。本实验使用清热润燥口服液治疗 OVA 致敏的哮喘小鼠,探索其可能的作用机制,为哮喘疾病的中医药研究提供参考。

支气管哮喘是以气道高反应性、可逆性的气道阻塞和重塑、黏液高分泌和肺功能下降为主要特征的一种肺部炎症,由嗜酸性粒细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞和上皮细胞参与^[13]。哮喘的发病机制尚未完全阐明,其中 CD4⁺Thelper (Th) 细胞的 Th1/Th2 细胞比例失衡,导致 Th2 细胞优势应答,产生 IL-4、IL-5 等炎症因子,引起 Th2 型免疫反应,是哮喘重要的发病机制^[14]。哮喘 Th2 型免疫反应的主要特征之一是嗜酸性粒细胞增多、迁移和黏液增生^[13],还会产生趋化因子和多种细胞因子,其中趋化因子 Eotaxin 分子量为 $8\times10^3\sim10\times10^3$,由 73 个氨基酸组成,属于 CC 趋化因子亚家族,是嗜酸性粒细胞的特异性趋化因子,对嗜酸性粒细胞有强大

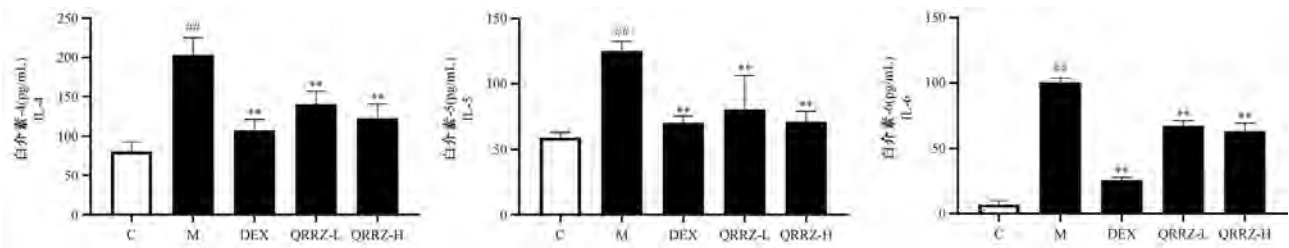


注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{###} $P<0.01$;与模型对照组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

图 3 清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 上游细胞因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{###} $P<0.01$. Compared with model group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 3 Effect of Qingre Runzao oral liquid on cytokines upstream of ILC2s in asthmatic mice

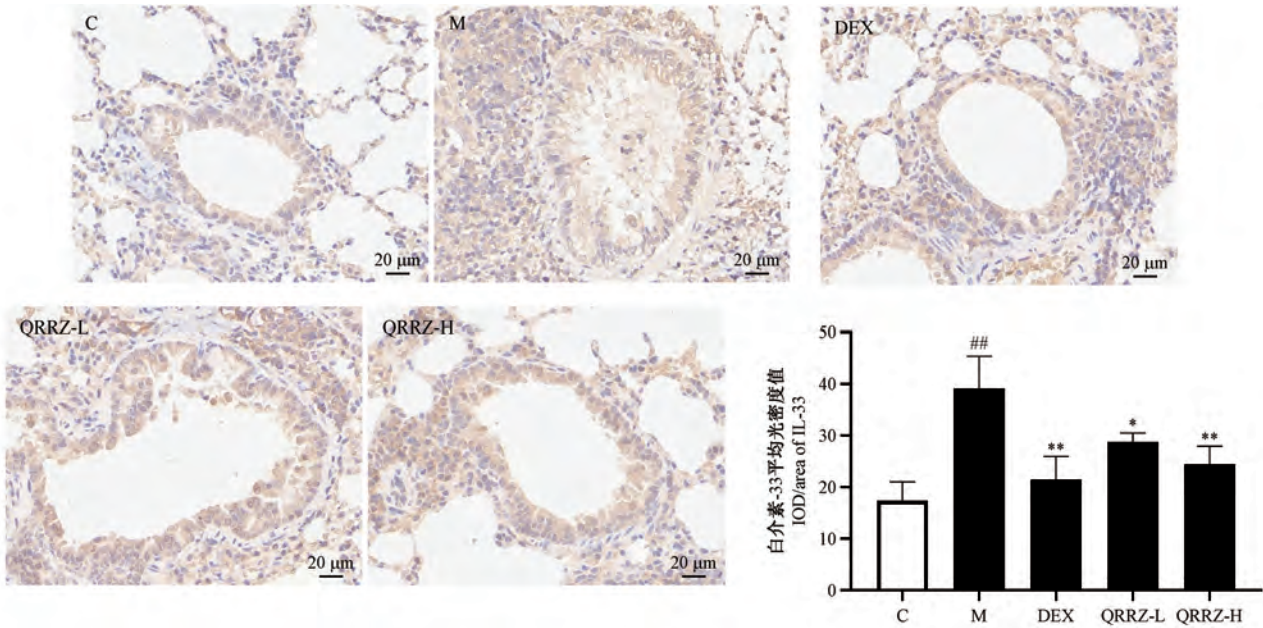


注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{###} $P<0.01$;与模型对照组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

图 4 清热润燥口服液对哮喘小鼠 ILC2s 下游细胞因子的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{###} $P<0.01$. Compared with model group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 4 Effect of Qingre Runzao oral liquid on cytokines downstream of ILC2s in asthmatic mice

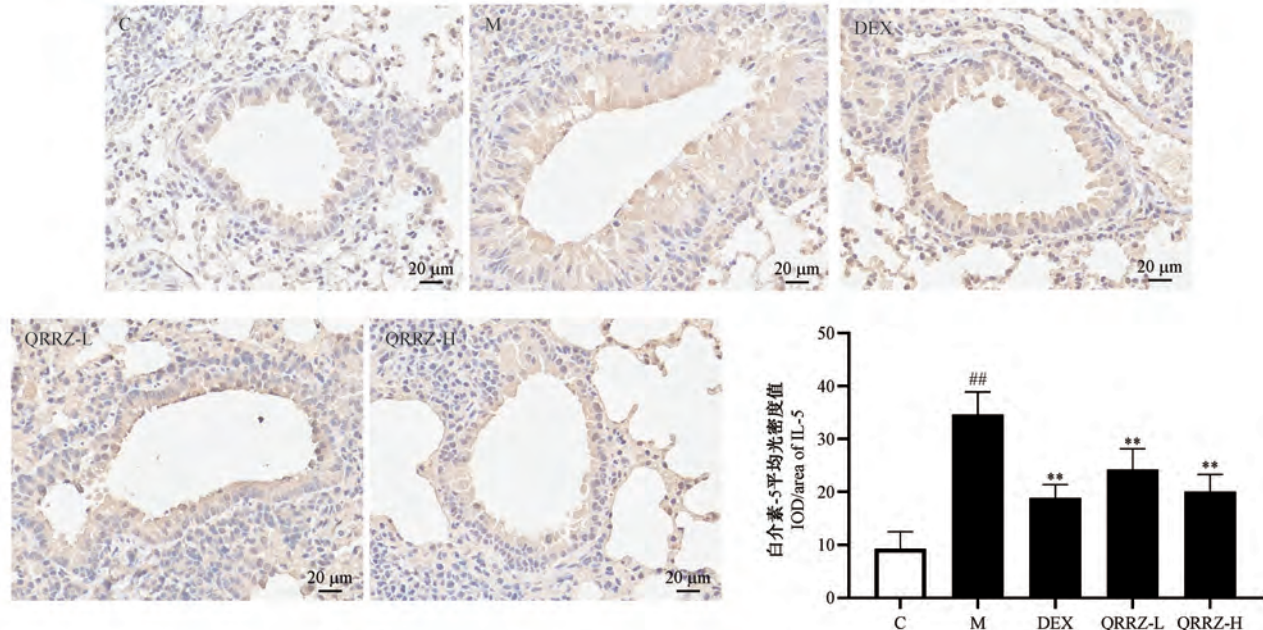


注: C:空白对照组; M:模型对照组; DEX:阳性对照组; QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{##} $P<0.01$; 与模型对照组相比, ^{*} $P<0.05$; ^{**} $P<0.01$ 。

图 5 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 上游细胞因子 IL-33 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 5 Effect of Qingre Runzao oral liquid on the expression of ILC2s upstream cytokine IL-33 in lung tissue of asthmatic mice

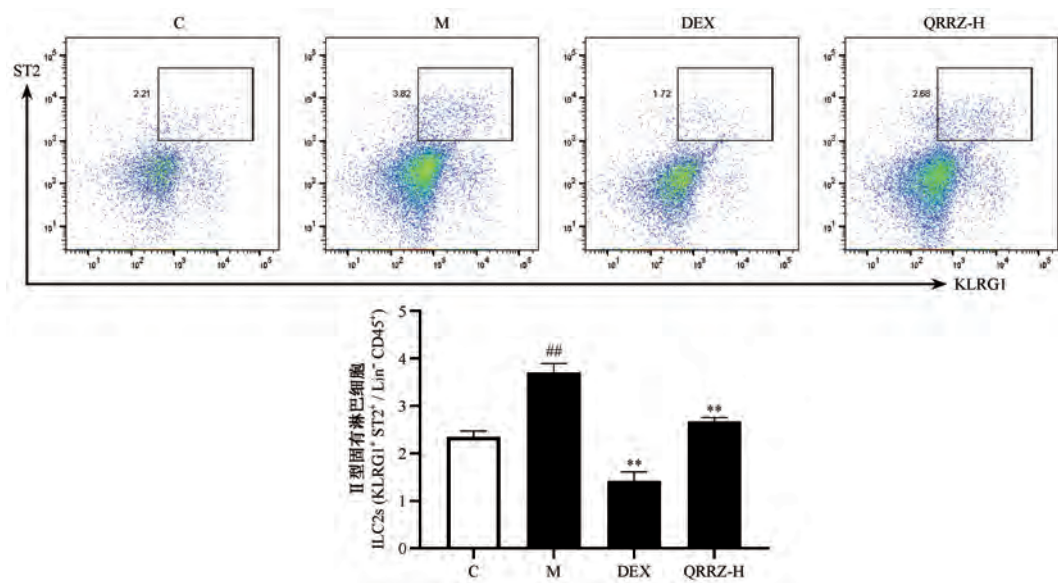


注: C:空白对照组; M:模型对照组; DEX:阳性对照组; QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组; QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{##} $P<0.01$; 与模型对照组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

图 6 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 下游细胞因子 IL-5 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with model group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 6 Effect of Qingre Runzao oral liquid on the expression of ILC2s downstream cytokine IL-5 in lung tissue of asthmatic mice

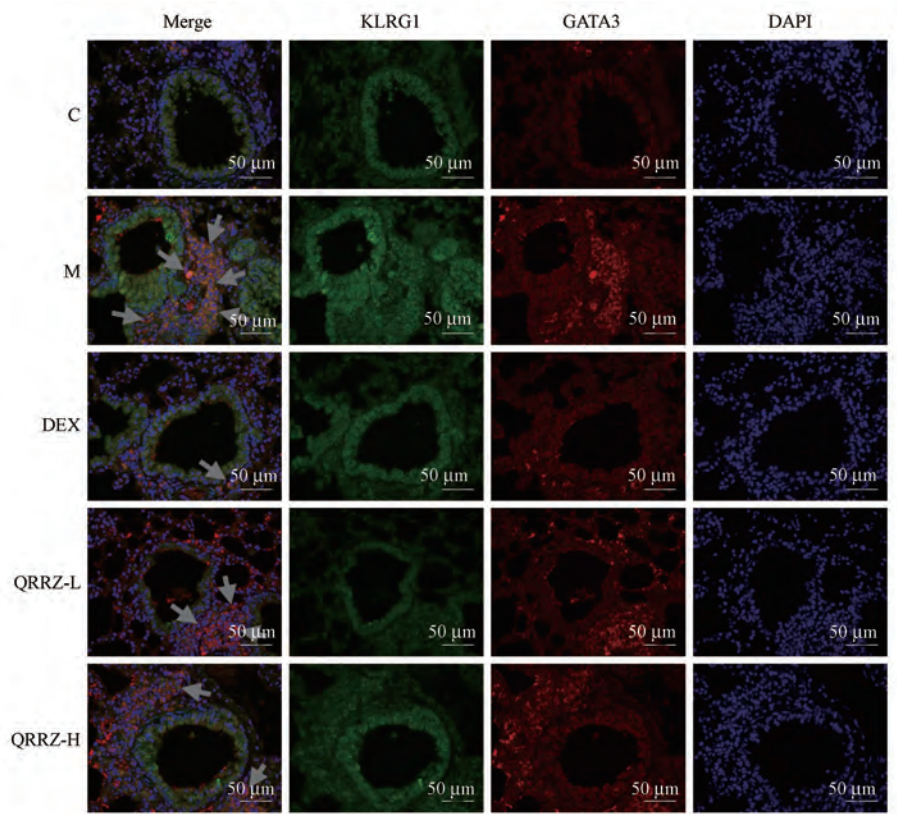


注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。与空白对照组相比, ^{##}*P*<0.01;与模型对照组相比, ^{**}*P*<0.01。

图 7 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 数量的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid. Compared with control group, ^{##}*P*<0.01. Compared with model group, ^{**}*P*<0.01.

Figure 7 Effect of Qingre Runzao oral liquid on the amount of ILC2s in the lung tissue of asthmatic mice



注:C:空白对照组;M:模型对照组;DEX:阳性对照组;QRRZ-L:清热润燥口服液低剂量组;QRRZ-H:清热润燥口服液高剂量组。

图 8 清热润燥口服液对哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 生成的影响

Note. C, Control group. M, Model group. DEX, Dexamethasone group. QRRZ-L, Low-dose group of Qingre Runzao oral liquid. QRRZ-H, High-dose group of Qingre Runzao oral liquid.

Figure 8 Effect of Qingre Runzao oral liquid on ILC2s production in lung tissue of asthmatic mice

的选择性激活作用。与趋化因子受体 CCR3 结合后,发挥活化和募集嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的功能,引起哮喘患者的支气管粘膜和肺泡周围的炎性细胞浸润,导致支气管上皮损伤。还能诱导白三烯、组胺的生成和肥大细胞的迁移分化,参与哮喘的炎症过程^[15]。实验中对各组小鼠肺切片进行 HE 染色,结果显示(图 1),模型对照组小鼠的支气管上皮粘膜破损不完整、支气管壁增厚及大量的炎性细胞浸润,而清热润燥口服液能减轻上述病理特征。

研究表明,先天性淋巴样细胞 ILCs(根据分泌的细胞因子不同,分为三类:ILC1s、ILC2s 和 ILC3s)中的 ILC2s 与哮喘密切相关。在反式 T 细胞特异性转录因子(GATA-3)及维甲酸受体相关的孤儿受体 α (ROR α)的共同调控下产生,分布在肺、血液、脾和骨髓中,并在哮喘患者的外周血和痰液中高表达,可以产生 TH2 型细胞因子和其他细胞因子,是 Th2 型免疫反应的主要驱动因素,参与过敏性哮喘和特应性皮炎等疾病过程,调节炎症过程和参与组织修复,在哮喘的发病过程中具有重要作用^[16-18]。

ILC2s 的表面表达 IL-17RB、ST2(也称 T1/ST2L)和 TSLPR 受体,当支气管或肺部受到过敏、病毒、寄生虫和炎症因子的刺激时,分泌 IL-25、IL-33 和 TSLP 细胞因子并与 ILC2s 表面受体结合,产生 Th2 型细胞因子^[16]。IL-1 细胞因子家族的 IL-33 可直接激活 ILC2s,是过敏性气道疾病的关键细胞因子,可驱动 Th2 免疫应答^[19]。袁琳洁等^[20]利用 IL-33 滴鼻诱导小鼠哮喘模型,并出现气道高反应性、炎性细胞浸润和肺组织中 ILC2s 细胞数量增多的现象。IL-33 还可通过 p38 MAPK 信号通路刺激肠系膜脂肪中分离的 ILC2s 细胞产生 IL-5、IL-9 等细胞因子,是 ILC2s 产生细胞因子最重要的激活剂之一^[21]。IL-17 细胞因子家族的 IL-25(也称 IL-17E)在哮喘患者的支气管和外周血中较正常人明显升高,临床研究发现,在哮喘患者支气管中随着 IL-25 的表达量升高,患者的嗜酸性粒细胞气道炎症和气道高反应性加重^[22]。IL-25 可刺激 Th2 型细胞因子的表达,还能经鼻腔激发健康小鼠的气道高反应性和气道重塑、杯状细胞和粘膜增生、加重肺支气管和血管周围的嗜酸性粒细胞浸润^[23]。IL-2 细胞因子家族的 TSLP 与 IL-25 和 IL-33 共同刺激 Th2 型细胞因子的产生,参与过敏性哮喘的发病过程和对过敏因子的免疫反应^[24]。在 TSLPR^{-/-}基因

缺陷小鼠诱导的哮喘小鼠中,肺中 ILC2s 的活化和先天性过敏气道炎症反应受到抑制。TSLP 和 IL-33 在体内和体外刺激肺部 ILC2s 产生彼此的受体,对刺激肺部 ILC2s 的产生具有协同作用^[25]。

在 ILC2s 的激活下产生 IL-4 和 IL-5 等 Th2 型细胞因子和具有强大促炎作用的 IL-6,IL-6 是 CD4⁺ T 细胞分化的重要调节因子,能促进 IL-4 产生和抑制 Th1 分化,并在哮喘患者血清中高表达^[26]。IL-4 和 IL-5 在支气管粘膜中高表达,其中 IL-5 可诱导嗜酸性粒细胞的分化与激活,并将其募集到肺中,在募集过程中与 Eotaxin 具有协同作用,然后分泌大量的炎症细胞因子和趋化因子等促炎介质,在嗜酸性炎症中起重要作用^[27]。用人源化抗 IL-5 抗体治疗嗜酸性哮喘患者后,可减少患者血液和痰中的嗜酸性粒细胞表达水平^[28]。IL-4 可刺激 Th2 细胞的分化,与 IL-13 一同促进 B 淋巴细胞向免疫球蛋白-e(IgE)转变,引起肥大细胞和嗜碱性细胞脱颗粒,释放组胺、白三烯、细胞因子和趋化因子等多种炎性介质,促进炎症和过敏疾病的发生^[13,29]。本实验通过检测 BALF 中 ILC2s 相关的细胞因子,发现清热润燥口服液高低剂量可降低趋化因子 Eotaxin 和促炎因子 IL-4、IL-5、IL-6、IL-25、IL-33 和 TSLP 在 BALF 中的含量($P<0.01$)。通过免疫组化染色、流式细胞术和免疫双荧光染色结果,发现清热润燥口服液高低剂量可下调肺组织中 IL-33 及 IL-5 的表达($P<0.05$, $P<0.01$),减少哮喘小鼠肺组织中 ILC2s 的数量及生成($P<0.01$)。提示该方对 OVA 致敏的哮喘小鼠的 ILC2s 数量和其相关细胞因子及 IL-33 和 IL-5 蛋白的表达有一定的调节作用。

综上所述,清热润燥口服液可能通过调节 ILC2s 细胞数量,及 BALF 中相关细胞因子的含量(趋化因子 Eotaxin;上游细胞因子:IL-25、IL-33、TSLP;下游细胞因子:IL-4、IL-5、IL-6)和肺组织中 IL-33 和 IL-5 的表达来干预哮喘;提示该药可能通过降低 ILC2s 的数量及其相关的细胞因子含量和肺组织中 IL-33 和 IL-5 的表达来缓解哮喘小鼠的症状,但清热润燥口服液具体通过 ILC2s 细胞方面对哮喘疾病的影响有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [2] Watanabe K, Suzukawa M, Arakawa S, et al. Leptin enhances

- cytokine/chemokine production by normal lung fibroblasts by binding to leptin receptor [J]. *Allergol Int*, 2019, 68S: S3-S8.
- [3] Toki S, Goleniewska K, Zhang J, et al. TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation [J]. *Allergy*, 2020, 75(7): 1606-1617.
- [4] Walker JA, McKenzie AN. Development and function of group 2 innate lymphoid cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(2): 148-155.
- [5] McKenzie AN. Type-2 innate lymphoid cells in asthma and allergy [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, 11(5): S263-S270.
- [6] 刘温丽, 史艳平, 张金虎. 支气管哮喘的中医研究进展 [J]. *陕西中医*, 2018, 39(6): 812-814.
- [7] 魏丹霞, 谭艳云, 徐静涛, 等. 清热润燥口服液抗炎、祛痰作用的实验研究 [J]. *云南中医中药杂志*, 2017, 38(5): 78-79.
- [8] 魏丹霞, 陈丽玲, 赵玉雪, 等. 清热润燥口服液止咳、平喘作用及急性毒性实验研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(5): 61-64.
- [9] 钟赣生. 中药学 新世纪第 4 版 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [10] 李月亭, 陈凌云, 余晓玲. HPLC 法测定清热润燥口服液中橙皮苷的含量 [J]. *云南中医中药杂志*, 2016, 37(2): 42-43.
- [11] 李月亭, 陈凌云, 魏丹霞, 等. HPLC 法测定清热润燥口服液中苦杏仁苷的含量 [J]. *中国医药科学*, 2015, 5(23): 69-71.
- [12] 袁小淋, 余晓玲, 魏丹霞, 等. 紫外分光光度法测定清热润燥口服液中总多糖的含量 [J]. *云南中医中药杂志*, 2017, 38(7): 63-65.
- [13] Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(1): 35-50.
- [14] 李俊玲. 三子养亲汤对哮喘模型大鼠 Th1/Th2 失衡的干预及相关调节机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [15] Ahmadi Z, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, et al. An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis [J]. *Inflammation*, 2016, 39(3): 1253-1267.
- [16] Aron JL, Akbari O. Regulatory T cells and type 2 innate lymphoid cell-dependent asthma [J]. *Allergy*, 2017, 72(8): 1148-1155.
- [17] van Rijt L, von Richthofen H, van Ree R. Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic asthma [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4): 483-496.
- [18] Yu QN, Guo YB, Li X, et al. ILC2 frequency and activity are inhibited by glucocorticoid treatment via STAT pathway in patients with asthma [J]. *Allergy*, 2018, 73(9): 1860-1870.
- [19] Cheon IS, Son YM, Jiang L, et al. Neonatal hyperoxia promotes asthma-like features through IL-33-dependent ILC2 responses [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(4): 1100-1112.
- [20] 袁琳洁, 陈诗皓, 安高, 等. IL-33 诱导的小鼠过敏原非依赖性哮喘样模型肺组织免疫细胞及亚群的变化 [J]. *首都医科大学学报*, 2016, 37(5): 561-567.
- [21] Petrova T, Pesic J, Pardali K, et al. p38 MAPK signalling regulates cytokine production in IL-33 stimulated Type 2 Innate Lymphoid cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3479.
- [22] Cheng D, Xue Z, Yi L, et al. Epithelial interleukin-25 is a key mediator in Th2-high, corticosteroid-responsive asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(6): 639-648.
- [23] Huang P, Li Y, Lv Z, et al. Comprehensive attenuation of IL-25-induced airway hyperresponsiveness, inflammation and remodelling by the PI3K inhibitor LY294002 [J]. *Respirology*, 2017, 22(1): 78-85.
- [24] Mitchell PD, O'Byrne PM. Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 169: 104-112.
- [25] Toki S, Goleniewska K, Zhang J, et al. TSLP and IL-33 reciprocally promote each other's lung protein expression and ILC2 receptor expression to enhance innate type-2 airway inflammation [J]. *Allergy*, 2020, 75(7): 1606-1617.
- [26] Naik SP, P A M, B S J, et al. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in asthma [J]. *J Asthma*, 2017, 54(6): 584-593.
- [27] Foster PS, Maltby S, Rosenberg HF, et al. Modeling T_H 2 responses and airway inflammation to understand fundamental mechanisms regulating the pathogenesis of asthma [J]. *Immunol Rev*, 2017, 278(1): 20-40.
- [28] Patel TR, Sur S. IgE and eosinophils as therapeutic targets in asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2017, 17(1): 42-49.
- [29] 湛孝东, 姜玉新, 李良烽, 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.

[收稿日期] 2020-09-29

孙赞, 陈桂芳, 高娟, 等. 氧化苦参碱对特应性皮炎模型小鼠的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 10–15.
Sun Y, Chen GF, Gao J, et al. Protective effects of oxymatrine on atopic dermatitis model mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 10–15.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 002

氧化苦参碱对特应性皮炎模型小鼠的保护作用

孙 赞^{1,2}, 陈桂芳^{1,2}, 高 娟^{1,2}, 张丽娟¹, 张 伟^{1,2*}, 王睿睿^{1,2*}

(1. 云南中医药大学, 昆明 650500; 2. 云南省民族特色养生理论与健康产品工程实验室, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨中药苦参中有效成分氧化苦参碱治疗特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)小鼠的药效作用和初步作用机制。**方法** (1)将 KM 小鼠随机分为 5 组:空白对照组、模型对照组、阳性对照组及氧化苦参碱低、高剂量(50、100 mg/kg)组,每日给药 2 次,连续给药 7 次,末次给药后 10 min,于小鼠左后足脚垫内皮下注射右旋糖酐每只 50 μL,观察并记录 15 min 内小鼠舔后足的次数。(2)将 BALB/c 小鼠随机分为 6 组:空白对照组、模型对照组、阳性对照组及氧化苦参碱低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组,除空白对照组外,其余 5 组小鼠均采用 2,4-二硝基氯苯(DNCB)多次反复刺激皮肤建立 AD 模型,实验第 1 天起各组灌胃给予相应溶媒或药物,连续干预 14 d。观察并记录 AD 模型小鼠的体重变化,测定脾及胸腺的脏器系数,ELISA 法测定外周血中总 IgE 及 Th2 型细胞因子的含量,HE 染色观察皮损组织病理学变化情况,甲苯胺蓝染色观察皮损组织中肥大细胞的浸润情况。**结果** 氧化苦参碱能显著抑制瘙痒模型小鼠的搔抓次数($P<0.01$);灌胃给予氧化苦参碱治疗 14 d 后,AD 模型小鼠湿疹样皮炎缓解;病理切片结果显示,小鼠真皮层增厚减轻、炎性细胞数目减少以及细胞间水肿减轻;真皮层中肥大细胞的浸润数目明显减少,外周血中总 IgE 和 Th 型细胞因子 IL-4、IL-13 的表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠有一定的治疗作用,其机制与抑制皮肤真皮层中肥大细胞的浸润、减少 Th2 型细胞因子的表达有关。

【关键词】 特应性皮炎;氧化苦参碱;肥大细胞;Th2 型细胞因子
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0010-06

Protective effects of oxymatrine on atopic dermatitis model mice

SUN Yun^{1,2}, CHEN Guifang^{1,2}, GAO Juan^{1,2}, ZHANG Lijuan¹, ZHANG Yi^{1,2*}, WANG Ruirui^{1,2*}

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China.
2. Yunnan Province Engineering Laboratory for National Healthcare Theories and Products, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To investigate the anti-atopic dermatitis (AD) effects of oxymatrine in a murine model of AD. **Methods** (1) Kunming mice were randomly divided into five groups: Blank Control group(BC), model control group(DEX), positive control group(DXM), OXY-L and OXY-H groups (50 and 100 mg/kg) oxymatrine groups. Vehicle or oxymatrine was orally administered twice daily for 7 times. Ten minutes after the last administration, 50 μL of dextran was injected subcutaneously into the left hind foot pad of each mouse. The number of times the mouse licked the hind foot within 15 min was observed and recorded. (2) BALB/c mice were randomly divided into 6 groups: blank control group(BC), model control group(DNCB), positive control group(DXM), OXY-L, OXY-M and OXY-H groups (25, 50 and 100 mg/kg)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81760741,81660737,81760775);云南省科技厅中医联合项目(2017FF117(-003),2017FF117(-025),2019FF002(-051),2018FF001(-050),2019FF002(-010));云南省教育厅科学研究基金项目(2020J0291)。
【作者简介】 孙赞(1982—),女,副教授,博士,研究方向:中药民族药及天然产物活性。Email: 41546147@qq.com
【通信作者】 张伟(1985—),女,副教授,博士,研究方向:中药民族药及天然产物活性及机制。Email: zy05041117@126.com
王睿睿(1980—),女,教授,博士,研究方向:中药抗感染与免疫。Email: wangruiyucm@126.com
* 共同通信作者

oxymatrine groups. Except for the blank control group, the other groups were treated with 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) solution repeatedly to establish the AD model. From the first day of the experiment, vehicle or drugs were orally administered once daily for 14 d. Changes in weight were observed and recorded, and the organ coefficients of the spleen and thymus were determined. The contents of total IgE and T helper 2 (Th2) cytokines in the peripheral blood were detected using enzyme-linked immunosorbent assay kits. In addition, hematoxylin and eosin staining was used to observe the pathological changes of skin lesions, and toluidine blue staining was used to evaluate the infiltration of mast cells in skin lesions. **Results** Oral administration of oxymatrine significantly decreased the number of scratches in the itching model mice ($P < 0.01$). After 14 d of treatment with oxymatrine by gavage, the eczema-like dermatitis of the AD model mice was relieved, and thickening of the dermis, infiltration of inflammatory and mast cells, and intercellular edema were reduced. The expression of total IgE and Th2-type cytokines, such as interleukin IL-4 and IL-13, was significantly lowered in the peripheral blood ($P < 0.05$). **Conclusions** Traditional Chinese medicine refers to the experience and knowledge summarized by Chinese people in the long-term practice of diagnosis and treatment of diseases. Oxymatrine, an effective component of the commonly used Chinese medicine *Sophora flavescens*, has a therapeutic effect on AD mice. Its mechanism is related to a reduction in the infiltration of mast cells in the skin dermis and the reduced expression of Th2-type cytokines.

[Keywords] atopic dermatitis; oxymatrine; mast cells; Th2-type cytokines

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种较为常见的慢性皮肤疾病, 容易复发, 常发病于婴儿和儿童, 少见发病于成年人。AD 是一种特殊类型的湿疹^[1-2], 其主要症状是皮肤瘙痒, 伴随不同程度的皮屑脱落和皮肤溃烂, 严重者甚至会产生睡眠障碍, 具有慢性迁延和反复发作的特征。近年来 AD 的发病是呈上升的趋势^[3], 目前发病机制尚未完全阐明, 其病因十分复杂, 可能与遗传、免疫、环境、感染、精神心理、皮肤屏障受损等多种因素有关^[4]。

中西医治疗 AD 的方法各有不同^[5]。现代医学从基因、免疫、皮肤屏障功能、感染等多种因素进行了深入的研究, 在诊断以及流行病学方面取得了一定成绩。对于 AD 的治疗, 常用方法是使用抗组胺药, 以及在局部使用润肤剂、皮质类固醇激素和免疫抑制剂等, 但使用时间过长会产生副作用, 患者耐受程度较低。中医对 AD 疾病的治疗药物较多, 有汤剂、散剂、油膏剂、外洗剂等, 包括了口服和外用等剂型, 在治疗和减少复发方面均有一定特色和优势^[6]。

氧化苦参碱具有广泛的药理作用, 如抗病毒、抗炎、抗心律失常、抗纤维化、免疫抑制及抗肿瘤等^[7-12], 研究标明, 氧化苦参碱可改善小鼠湿疹及慢性湿疹皮损, 显著减轻炎症反应^[13-16]。本文拟探讨氧化苦参碱治疗 AD 小鼠模型的药效作用和初步作用机制, 为 AD 治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠, 雌雄各半, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2) g; SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 (20 ± 2)

g, 均购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK (湘) 2016-0002]。小鼠饲养于云南中医药大学实验动物中心屏障环境中 [SYXK (滇) 2017-005], 温度: $22^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$, 湿度: $45\% \sim 55\%$, 光照 12 h 为一个循环。本实验经云南中医药大学实验动物伦理审查委员会审查 (R-0620160015), 符合国家实验动物福利相关规定。实验遵循实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氧化苦参碱, $\geq 98\%$ (HPLC), 上海源叶生物科技有限公司, 批号 Y30S6Y17043; 醋酸地塞米松, 浙江仙琚制药股份有限公司, 批号 170512; 右旋糖酐, Biotopped 公司, 批号 17-0270-01; 2,4-二硝基氯苯, 成都贝斯特试剂有限公司, 批号 Z0016B5; 丙酮, 云南杨林工业开发区油滇药业有限公司, 批号 20160325; 橄榄油, 山东鲁花集团有限公司, 批号 20180803; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 天津市光复精细化工研究所, 批号 50116; IgE ELISA 试剂盒, 联科生物, 批号 A27591234; IL-4 ELISA 试剂盒, 联科生物, 批号 A20481252; IL-13 ELISA 试剂盒, 联科生物, 批号 A21300855。全波长多功能酶标仪, 昆明倍捷科技有限公司, 型号: Plus384; -80°C 超低温冰箱, 美国 Thermo Forma 公司, 型号: Forma 902; 低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司, 型号: 5810R; 电子分析天平, 奥豪斯仪器有限公司, 型号: AR224CN。

1.3 实验方法

1.3.1 氧化苦参碱对右旋糖酐致小鼠瘙痒模型的影响

将 50 只 KM 小鼠按性别体重随机分为 5 组, 设空白对照组、模型对照组、阳性对照组 (醋酸地塞米

松 1.5 mg/kg) 以及氧化苦参碱高、低剂量 (100、50 mg/kg) 组, 每组 10 只; 地塞米松组、氧化苦参碱各剂量组分别灌胃给予相应药物, 每日 2 次, 连续 7 次。空白对照组、模型对照组灌胃等体积的 0.5% CMC-Na。末次给药后 10 min, 在每只小鼠左后足脚垫内注射右旋糖酐 50 μ L, 观察并记录 15 min 内小鼠舔后足的次数, 小鼠连续舔后足出现短暂停顿记为 1 次搔痒。

1.3.2 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠的影响

60 只 BALB/c 小鼠经适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组 (BC)、模型对照组 (DEX)、阳性对照组 (醋酸地塞米松 2 mg/kg) (OXM)、氧化苦参碱低、中、高剂量组 (25、50、100 mg/kg; OXY-L、OXY-M、OXY-H), 每组 8 只。实验前 1 d, 所有小鼠用电推剪加脱毛膏进行背部脱毛 (2 cm $\times$ 2 cm), 暴露皮肤; 实验第 1、2 天, 除空白对照组外, 其余小鼠在背部皮肤涂抹以丙酮-橄榄油混合溶液为溶媒配制的 3% 2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 溶液, 每次 100 μ L, 第 3~6 天不作任何处理, 第 7 天开始每隔 2 d 涂抹 1 次 1% DNCB 溶液, 每次 70 μ L, 共 3 次。空白对照组小鼠背部皮肤仅涂抹丙酮-橄榄油混合溶液, 涂抹时间和体积与造模组一致。自实验第 1 天开始各组分别灌胃给予相应药物, 每天 1 次, 连续给药 14 d, 每天称重。末次给药前禁食不禁水 12 h, 末次给药后 30 min 麻醉, 腹主动脉取血, 剖取脾和胸腺、称重, 计算脏器系数, 剪取背部造模处皮损组织切为两部分, 一部分置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 一部分置于 10% 中性福尔马林溶液中备用。

分离血清, 采用 ELISA 试剂盒测定血清中总 IgE 和 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-13 的含量; 10% 中性福尔马林固定的皮损组织经脱水、透蜡、包埋、切片等制备成病理切片, HE 染色观察一般组织病理学变化; 石蜡切片经脱蜡进行甲苯胺蓝 (TB) 染色以观察皮损组织真皮层中肥大细胞 (mast cell, MC) 的浸润情况, 每组随机选取 8 个视野, 拍照, 封片。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.0.2 软件对所得数据进行统计学分析, 以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 用单因素方差分析和 *t* 检验分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化苦参碱对瘙痒模型小鼠的影响

与模型对照组相比, 氧化苦参碱高低剂量可减

少小鼠的抓痒次数 ($P<0.01$), 对右旋糖酐所致瘙痒有一定程度的抑制, 以 50 mg/kg 效果较佳, 因此选择此剂量为受试剂量继续探究氧化苦参碱对特异性皮炎实验的干预效果及初步作用机制 (图 1)。

2.2 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠的影响

2.2.1 氧化苦参碱对 AD 小鼠一般情况的影响

与模型对照组相比, 阳性对照组小鼠体重偏低, 氧化苦参碱各剂量 12 d 后小鼠体重均呈现上升趋势 (图 2)。

2.2.2 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠脏器系数的影响

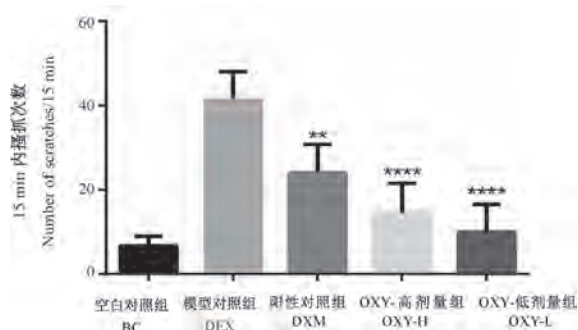
与模型对照组相比, 氧化苦参碱高剂量可降低 AD 模型小鼠的胸腺系数 ($P<0.01$) 表现出类似地塞米松样的免疫抑制作用; 氧化苦参碱高中剂量可降低小鼠脾系数 ($P<0.05$), 推测可能与抑制被过度激活的 B 淋巴细胞有关 (图 3)。

2.2.3 氧化苦参碱对血清总 IgE 含量的影响

与空白对照组相比, 模型对照组小鼠外周血总 IgE 含量增加, 差异无统计学意义; 与模型对照组比较相比, 阳性药和氧化苦参碱高剂量均能显著抑制 AD 模型小鼠外周血总 IgE 的表达 ($P<0.05$) (图 4)。

2.2.4 氧化苦参碱对外周血 Th2 型细胞因子含量的影响

与空白对照组相比, 模型对照组小鼠外周血 IL-4、IL-13 含量均有增加趋势, 但无统计学意义; 与模型对照组相比, 阳性药和氧化苦参碱均能显著抑制 AD 模型小鼠外周血 IL-4、IL-13 含量的表达 ($P<0.05$) (图 5)。



注: 与模型对照组相比, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

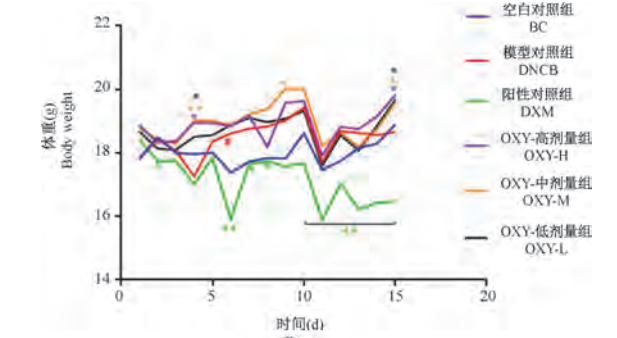
图 1 对右旋糖酐所致小鼠瘙痒的影响 ($n=10$)

Note. Compared with model control group, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 1 Effect of oxymatrine on itching mice model induced by dextran

2.2.5 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠皮损组织病理的影响

与空白对照组相比,模型对照组小鼠皮损处皮肤结构严重受损,角质过度,棘层肥厚明显伴灶性海绵水肿,真皮血管扩张充血并伴有大量炎症细胞浸润,

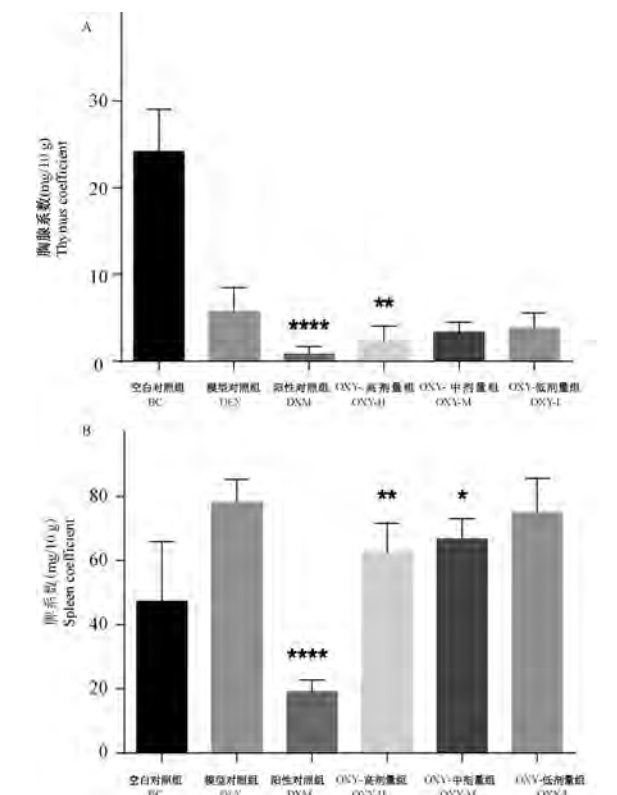


注:与空白对照组相比, #*P*<0.05;与模型对照组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01。

图 2 对 AD 小鼠体重的影响 (*n*=8)

Note. Compared with blank control group, #*P*<0.05. Compared with model control group, **P*<0.05, ***P*<0.01.

Figure 2 Effect of oxymatrine on the body weight of AD mice



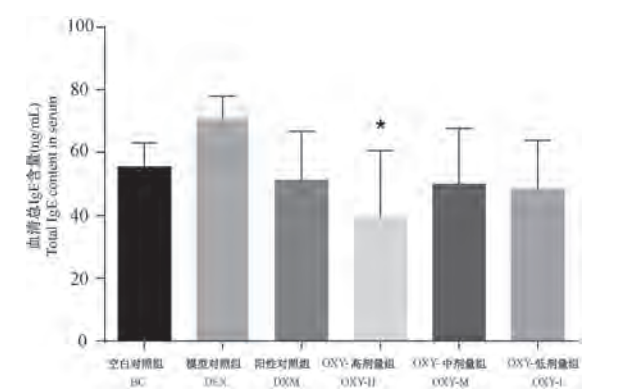
注:A:胸腺系数;B:脾脏系数。与模型对照组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001。

图 3 对 AD 模型小鼠脏器系数的影响 (*n*=8)

Note. A, Thymus coefficient. B, Spleen coefficient. Compared with model control group, **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001.

Figure 3 Effect of oxymatrine on organ coefficients of AD model mice

毛囊结构减少。与模型对照组相比,阳性对照组小鼠表皮各层结构较清晰,表皮增厚明显减轻,真皮未见血管扩张,炎性细胞较模型组明显减轻,毛囊结构明显增多;氧化苦参碱各剂量组小鼠皮肤炎性细胞浸润减少,角质层角质不全有所缓解(图6)。

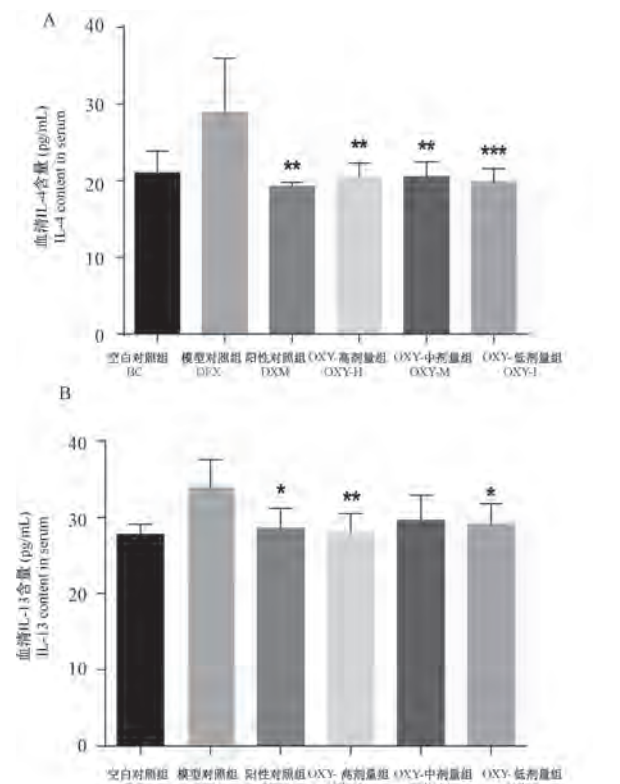


注:与模型对照组相比, **P*<0.05。

图 4 对 AD 小鼠外周血总 IgE 含量的影响 (*n*=8)

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

Figure 4 Effect of oxymatrine on the total IgE content of peripheral blood in AD mice



注:A:血清 IL-4 含量;B:血清 IL-13 含量。与模型对照组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001。

图 5 对小鼠血清 Th2 型细胞因子的影响 (*n*=8)

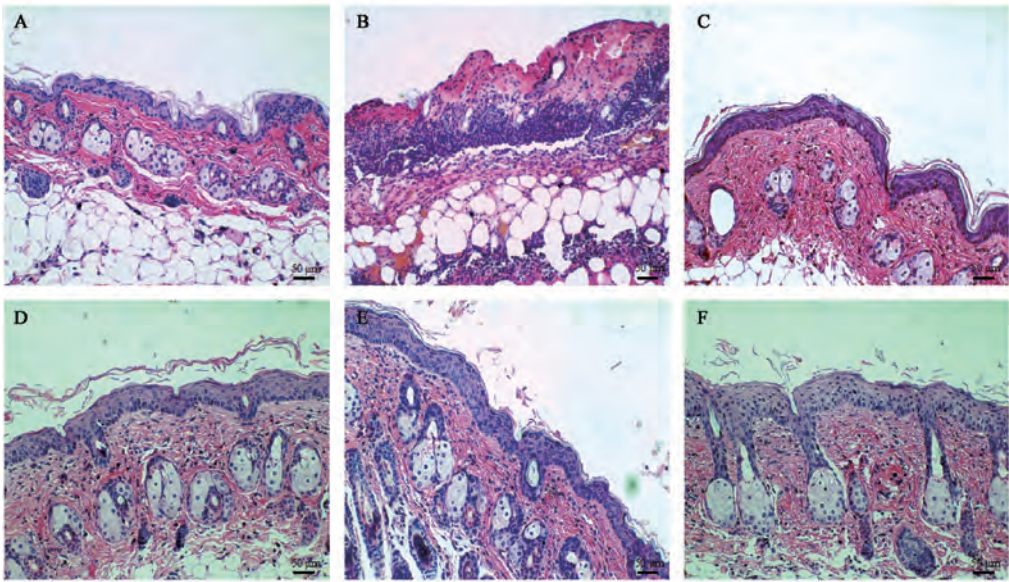
Note. A, IL-4. B, IL-13. Compared with model control group, **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

Figure 5 Effect of oxymatrine on the content of Th2 type cytokine in AD mice serum

2.2.6 氧化苦参碱对 AD 模型小鼠皮损肥大细胞浸润的影响

与空白对照组相比,模型对照组小鼠皮损处肥

大细胞浸润明显增多;与模型对照组相比,地塞米松和氧化苦参碱各剂量均能显著减少皮损处肥大细胞的浸润,具体结果见图 7。

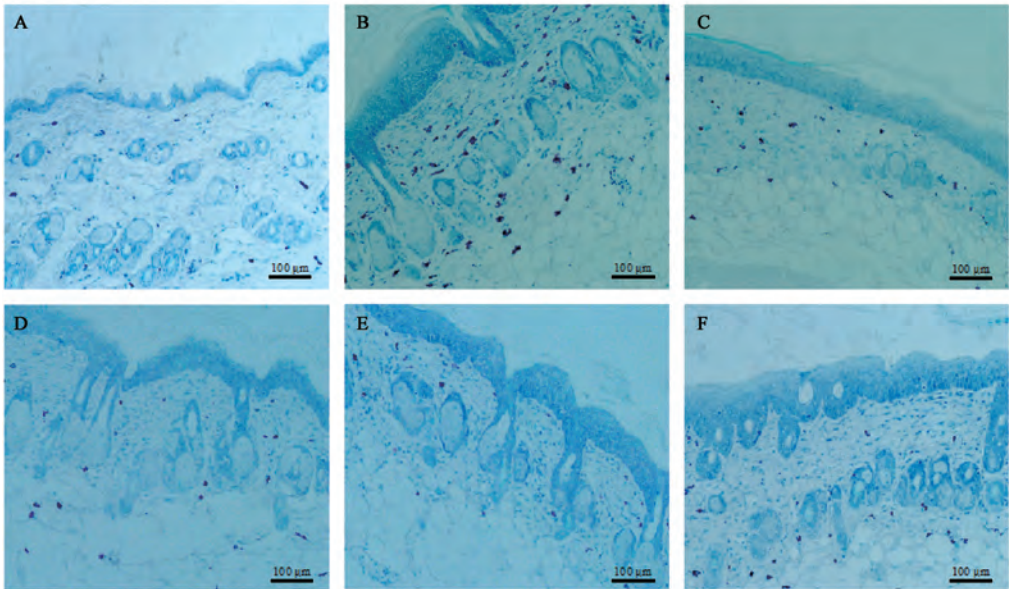


注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:阳性对照组;D:氧化苦参碱高剂量组(100 mg/kg);E:氧化苦参碱中剂量组(50 mg/kg);F:氧化苦参碱低剂量组(25 mg/kg)。

图 6 对小鼠皮损皮肤一般组织病理的影响(HE 染色)

Note. A, Blank control group. B, Model control group. C, Positive control group. D, OXY-H(100 mg/kg). E, OXY-M(50 mg/kg). F, OXY-L(25 mg/kg).

Figure 6 Effect of oxymatrine on the general histopathology of skin lesions in mice(HE staining)



注:A:空白对照组;B:模型对照组;C:阳性对照组;D:氧化苦参碱高剂量组(100 mg/kg);E:氧化苦参碱中剂量组(50 mg/kg);F:氧化苦参碱低剂量组(25 mg/kg)。

图 7 对小鼠皮损肥大细胞浸润的影响(TB 染色)

Note. A, Blank control group. B, Model control group. C, Positive control group. D, OXY-H(100 mg/kg). E, OXY-M(50 mg/kg). F, OXY-L(25 mg/kg).

Figure 7 Effect of oxymatrine on mast cell infiltration in the lesions of AD model mice(TB staining)

3 讨论

AD 是慢性易复发的皮肤炎症性疾病,发病机制复杂,其中免疫功能异常是发病的关键环节。细胞免疫中 T 淋巴细胞在 AD 中的作用已较为明确,在急性期 AD 病变主要由 Th2 细胞和 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子主导,慢性期以 Th1 型细胞反应为主^[17-19]。Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-5、IL-13 可诱导淋巴 B 细胞产生 IgE,间接活化肥大细胞。因此,在 AD 发病机制中,Th2 型细胞因子 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 即是调控 AD 的关键细胞因子,同时肥大细胞活化后会产生一系列炎症因子,并与 T 细胞、嗜酸性粒细胞等相互作用,共同参与 AD 的皮肤瘙痒和炎症反应过程,证明 Th 细胞、B 淋巴细胞及肥大细胞均在 AD 机制中扮演重要角色。因此,抑制 Th2 型细胞因子表达,调控肥大细胞应该能够有效抑制 AD。

本研究表明,中药苦参中有效成分氧化苦参碱能明显改善小鼠的皮肤病理症状、减轻皮肤增厚,减少肥大细胞的数目以及 Th2 型细胞因子等在皮肤组织的表达,对 AD 小鼠有治疗作用,并提示氧化苦参碱治疗 AD 小鼠的作用机制可能与减少皮肤真皮层中肥大细胞浸润、减轻 Th2 型细胞因子的表达有关,但氧化苦参碱如何通过下调 Th2 型细胞因子表达进而减少肥大细胞的募集和激活还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] 郝飞. 把握“特应性”涵义及其在皮炎湿疹诊断中的意义 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(1): 1-2, 56.
[2] 赵作涛. 湿疹? 还是特应性皮炎? [J]. 医学与哲学(B), 2014, 35(6): 22-23, 30.
[3] 孙彩虹, 顾恒. 特应性皮炎的流行病学特征 [J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2016, 33(2): 101-106.
[4] 李云珠, 李邻峰. 特应性皮炎动物模型研究进展 [J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2016, 33(2): 138-143.
[5] 王雄. 基于免疫调节机制探讨龙牡汤对特应性皮炎小鼠模型

的治疗作用 [D]. 北京:中国中医科学院, 2017.

[6] 钱佳丽, 刘久利, 何静岩, 等. 健脾益肠方对脾虚型特应性皮炎小鼠模型的免疫调节作用及其机制研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(2): 211-214.
[7] 豆玉凤, 史艳平, 李丹, 等. 氧化苦参碱对病毒性心肌炎小鼠巨噬细胞移动抑制因子的影响研究 [J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(8): 961-963.
[8] 史艳平, 汪琼, 李丹, 等. 氧化苦参碱对病毒性心肌炎小鼠的作用研究 [J]. 陕西中医, 2018, 39(1): 14-16.
[9] 兰露莎, 赵兵兵, 杨红宇, 等. 氧化苦参碱对小鼠哮喘模型保护作用的初步研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4): 320-323.
[10] 郭伟, 张杰. 支气管哮喘与免疫 [J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(2): 18-19.
[11] 李艳, 戚好文. 支气管哮喘与免疫调节 [J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(7): 400.
[12] Qiao M, Xiao DQ, Qian L, et al. The natural course of atopic dermatitis and the association with asthma [J]. Inflammation, 2017, 40(2): 546-554.
[13] 陈明亮, 伍斌, 谢红付, 等. 氧化苦参碱抑制二硝基氟苯所致小鼠接触性皮炎及淋巴细胞增殖(英文) [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(24): 3685-3689, 3693.
[14] 伍斌, 任学群, 谢红付, 等. 氧化苦参碱对小鼠接触性皮炎的抑制作用 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(4): 643-645.
[15] 伍斌, 蔡小嫦, 曾耀英, 等. 氧化苦参碱抑制二硝基氟苯所致小鼠接触性皮炎及淋巴细胞增殖 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(5): 931-935.
[16] 韩春雷, 陈学荣, 马俊江, 等. 氧化苦参碱对大鼠变应性接触性皮炎药效学作用 [J]. 北京医科大学学报, 1996, 28(1): 59-61.
[17] Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, et al. IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation [J]. Immunology, 2004, 172(10): 6158-6166.
[18] Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells [J]. Nat Immunol, 2013, 14(6): 536-542.
[19] 王珊, 刘玲玲. 肥大细胞在特应性皮炎发病机制中的作用 [J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2016, 33(2): 114-121.

[收稿日期] 2020-10-05

杨丹,姚衢,张晗,等.内脂素通过 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路对糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 16-23.

Yang D, Yao Q, Zhang H, et al. Effects of Visfatin on glycolipid metabolism and insulin resistance in the skeletal muscle of diabetic KKAy mice via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 16-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 003

内脂素通过 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路对糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响

杨 丹^{1,2},姚 衢¹,张 晗¹,张 琳¹,王 茜¹,廖 鑫¹,章 莹¹,
李思成¹,高 琳^{1*}

(1.遵义医科大学附属医院内分泌科,贵州 遵义 563003;2.川北医学院附属医院健康管理中心,四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨内脂素对糖尿病 KKAy 小鼠骨骼肌糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响,初步分析其通过 PI3K/Akt/FoxO1 途径对糖尿病小鼠骨骼肌组织可能的作用机制。**方法** 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为普食 (ND)组、普食+内脂素 (ND+V)组、高脂 (HFD)组和高脂+内脂素 (HFD+V)组,同周龄雄性 KKAy 小鼠成模后随机分为糖尿病 (DM)组和糖尿病+内脂素 (DM+V)组,其中 ND+V 组、HFD+V 组和 DM+V 组连续 3 d 腹腔注射内脂素重组蛋白。检测各组小鼠空腹血糖 (FBG)、餐后血糖 (PBG)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、游离脂肪酸 (FFA) 及空腹胰岛素 (FIns),并进行葡萄糖耐量实验 (GTT)、胰岛素耐量实验 (ITT),计算曲线下面积 (AUC) 及稳态模型评估的胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR);RT-qPCR 及 Western blot 检测磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、叉头框转录因子 1 (FoxO1)、丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4) 和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 等相关分子的表达水平。**结果** 分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组小鼠的体重、摄食、FBG、PBG、TC、TG、FFA、FIns、AUC_{GTT}、AUC_{ITT} 及 HOMA-IR 水平均显著增高 ($P<0.05$)。与 DM 组相比,DM+V 组 FBG、TC、TG、AUC_{GTT}、AUC_{ITT} 及 HOMA-IR 水平均显著降低 ($P<0.05$)。分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.001$),而 FoxO1 的 mRNA 表达水平显著增高 ($P<0.05$);与 DM 组比较,DM+V 组 PI3K 及 Akt 的 mRNA 表达均显著增高, FoxO1 的 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)。与 ND 组比较,DM 组 PI3K_{110α}、p-Akt 蛋白表达水平显著降低, FoxO1、p-FoxO1 和 PDK4 的蛋白表达水平均显著增高 ($P<0.05$);与 HFD 组相比,DM 组的 p-Akt、p-FoxO1 的蛋白表达水平均显著降低, FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著增高 ($P<0.05$);与 DM 组比较,DM+V 组中 PI3K_{110α}、p-Akt 及 p-FoxO1 的蛋白表达均显著增高,而 FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$)。**结论** 内脂素可能通过 PI3K/Akt/FoxO1 途径下调糖尿病小鼠骨骼肌 PDK4 的表达,发挥改善糖脂代谢和胰岛素抵抗的作用。

【关键词】 内脂素;PI3K/Akt/FoxO1;胰岛素抵抗;2 型糖尿病;KKAy 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0016-08

Effects of Visfatin on glycolipid metabolism and insulin resistance in the skeletal muscle of diabetic KKAy mice via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway

【基金项目】 国家自然科学基金 (81660142);贵州省社会发展攻关项目 (黔科合 SY 字 [2013]3033 号)。

【作者简介】 杨丹 (1993—),女,硕士研究生,研究方向:糖尿病与脂肪因子。E-mail:1318083212@qq.com

【通信作者】 高琳 (1961—),女,教授,主任医师,研究方向:糖尿病与脂肪因子。E-mail:lgzyinc@sina.com

YANG Dan^{1,2}, YAO Qu¹, ZHANG Han¹, ZHANG Lin¹, WANG Qian¹, LIAO Xin¹,

ZHANG Ying¹, LI Sicheng¹, GAO Lin^{1*}

(1. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China.

2. Health Management Center, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Visfatin on glycolipid metabolism and insulin resistance in the skeletal muscle of diabetic KKAY mice, preliminarily analyze the possible mechanism of action through the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. **Methods** Eight-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into a normal diet (ND) group, a normal diet+Visfatin (ND+V) group, a high-fat (HFD) group, and a high-fat+Visfatin (HFD+V) group. When the model was generated, male KKAY mice of the same age were randomly divided into a diabetes mellitus (DM) group and diabetes mellitus + Visfatin (DM+V) group. Among them, the ND+V, HFD+V and DM+V groups were intraperitoneally injected with recombinant Visfatin protein for 3 consecutive days. Fasting blood glucose (FBG), postprandial blood glucose (PBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), free fatty acids (FFA) and fasting insulin (FIns) were detected in each group of mice. The glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were measured; meanwhile, the area under curve (AUC) and homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) were calculated. At the same time, the expression levels of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), forkhead box transcription factor 1 (FoxO1), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and other related molecules were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** Compared with the ND group and the HFD group, the body weight, food intake, FBG, PBG, TC, TG, FFA, FIns, AUC_{GTT}, AUC_{ITT} and HOMA-IR levels in the DM group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with DM group, FBG, TC, TG, AUC_{GTT}, AUC_{ITT}, and HOMA-IR levels in DM+V group were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the ND group and the HFD group, the mRNA expression levels of PI3K and Akt in the DM group were significantly decreased ($P < 0.001$), but the mRNA expression levels of FoxO1 were increased ($P < 0.05$). Compared with the DM group, PI3K and Akt mRNA expression in the DM+V group was obviously increased, but the mRNA expression of FoxO1 was significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the ND group, PI3K_{10α} and p-Akt expression in the DM group was reduced, and the protein expression levels of FoxO1, p-FoxO1 and PDK4 were increased. Compared with the HFD group, p-Akt and p-FoxO1 expression was lower in the DM group, and the protein expression levels of FoxO1, PDK4 and PEPCK were increased ($P < 0.05$). While compared with the DM group, PI3K_{10α}, p-Akt and p-FoxO1 expression were increased in the DM+V group, but the protein expression levels of FoxO1, PDK4 and PEPCK were reduced ($P < 0.05$). **Conclusions** Visfatin may downregulate PDK4 expression in the skeletal muscle of diabetic mice through the PI3K/Akt/FoxO1 pathway and has a role in improving glucolipid metabolism and insulin resistance.

[Keywords] Visfatin; PI3K/Akt/FoxO1; insulin resistance; type 2 diabetes mellitus; KKAY mice

内脂素 (Visfatin) 是一种主要表达于内脏脂肪组织和 (或) 巨噬细胞的脂肪因子^[1], 可增加骨骼肌细胞中葡萄糖的转运, 促进葡萄糖摄取^[2]。研究表明 Visfatin 在葡萄糖代谢和胰岛素敏感性方面发挥作用, 可能参与了 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、肥胖、代谢综合征和多囊卵巢综合征等疾病的发生发展^[3-5]。叉头框转录因子 1 (forkhead box transcription factor 1, FoxO1) 在骨骼肌中高表达, 当蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 磷酸化后, FoxO1 的乙酰化以及泛素化等其他翻译后修饰与磷酸化相互作用, 从而影响其转录^[6]。丙酮酸脱氢酶激酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4) 是 FoxO1 的下游靶基因, 能够调控糖酵解和糖异生途

径。研究证实 Visfatin 可通过调控 PI3K/Akt 信号途径下游分子糖原合成酶激酶 3β 和葡萄糖转运体 4 的活性而促进细胞对葡萄糖的摄取, 改善糖脂代谢和 IR^[7-8], 但 Visfatin 是否能作用于 PI3K/Akt 下游 FoxO1/PDK4 通路而在糖脂代谢及 IR 中发挥作用, 目前鲜有报道。因此, 本研究拟探讨 Visfatin 在 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路中对糖脂代谢及胰岛素敏感性的影响, 旨在为防治糖尿病及 IR 相关疾病提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10 只 8 周龄 SPF 级雄性 KKAY 小鼠, 体重为 30.0 g 左右, 20 只同周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小

鼠,体重为 (20.0 ± 2.0) g,连同高脂饲料均购于北京华阜康有限公司[SCXK(京)2019-0008],普通饲料由重庆腾鑫公司提供,喂养于重庆医科大学实验动物中心[SYXK(渝)2018-0003],给予充足饲料和自由饮水,环境温度 $(23 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~60%,控制光照时间 8:00~20:00。动物实验经遵义医科大学附属医院动物实验伦理委员会审核批准(KLLY-2018-075),并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Visfatin 重组蛋白(以色列 PROSPEC 公司);蛋白浓度测定试剂盒、蛋白裂解液及磷酸酶抑制剂(美国 Thermo 公司);脱脂奶粉、兔抗 PI3K110 α 抗体、兔抗 Akt 抗体、兔抗 p-Akt(Ser473)抗体、兔抗 FoxO1 抗体、兔抗 p-FoxO1(Ser256)抗体及兔抗 GAPDH 抗体(美国 CST 公司);兔抗 PDK4 抗体、兔抗 G6Pase 抗体及兔抗 PEPCK 抗体(美国 abcam 公司);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$)及 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(江苏碧云天生物公司);诺和灵 R(丹麦诺和诺德);DEPC 水(生工生物工程(上海)股份有限公司);TRIzol 试剂(TaKaRa 公司);cDNA 逆转录试剂盒和 2 $\times$ SYBR Green qPCR master Mix(美国 Bimake 公司);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司)和胰岛素试剂盒(江苏博深生物科技有限公司);胶成像系统(德国 Analytik Jena 公司);电泳槽及转移槽(美国 BIO-RAD 公司);核酸蛋白浓度测定仪(杭州 ALLSHENG 公司);雅培血糖仪及配套试纸(英国 Abbott 公司);全自动生化仪(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及分组

C57BL/6J 小鼠按照随机数字表分为普通饲料组和高脂饲料组,喂养 8 周后,C57BL/6J 小鼠普通饲料组随机分为普食(ND)组和普食+内脂素(ND+V)组,高脂饲料组随机分为高脂(HFD)组和高脂+内脂素(HFD+V)组;KKAy 小鼠给予高脂饲料喂养 8 周后,连续 2 次空腹血糖(FBG) ≥ 13.9 mmol/L 定义为糖尿病模型^[9],成模后的 KKAy 小鼠随机分为糖尿病(DM)组和糖尿病+内脂素(DM+V)组;ND+V 组、HFD+V 组和 DM+V 组连续 3 d 腹腔注射重组内脂素蛋白(6 $\mu\text{g/kg}$)^[8],其余各组腹腔注射等量生理盐水,并于注射前后测定相关指标($n=5$)。

1.3.2 葡萄糖耐量实验(GTT)和胰岛素耐量实验(ITT)

GTT:将小鼠禁食 12 h,测定 FBG 后腹腔注射

2 g/kg 的 20% 葡萄糖溶液,于注射后 15、30、60、90、120 和 180 min 尾静脉取血测血糖,并计算 GTT 曲线下面积(AUC_{GTT})^[10]。GTT 实验结束间隔 1 周后行 ITT:将小鼠禁食 6 h,然后腹腔注射 0.75 U/kg 的 0.1 U/mL 胰岛素溶液后,测定 6 个时间点(0、15、30、60、90 和 120 min)血糖水平并计算 AUC_{ITT} ^[11]。

1.3.3 标本的采集

小鼠禁食后按 50 mg/kg 体重腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉,取血,室内静置 30 min,3000 r/min 离心 15 min,移液器吸取上清于 EP 管中, -80°C 超低温冰箱保存。打开胸腹腔,用预冷的生理盐水心脏灌注,直至肝变白为止,游离后肢骨骼肌组织,生理盐水洗净,滤纸吸干后存放于冻存管,于液氮中保存。

1.3.4 基础指标的测定

每周定期测定各组小鼠体重和摄食;采用血糖仪测定 FBG(禁食 6 h)和餐后血糖(PBG);采用全自动生化仪检测小鼠血清中的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)以及游离脂肪酸(FFA);采用酶联免疫吸附实验测定小鼠空腹血清胰岛素(FIns);并计算稳态模型评估胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),公式为 $(\text{FBG} \times \text{FIns})/22.5$ 。

1.3.5 RT-qPCR 反应

用 TRIzol 提取骨骼肌组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,SYBR-Green 荧光染料 RT-qPCR 检测骨骼肌组织的 mRNA 表达。PI3K 上游引物 5'-CCCATGGGACAACATTCCA-3',下游引物 5'-CATGG CGACAAGCTCGGTA-3';Akt 上游引物 5'-TCAGGATGTGGATCAGCGAGA-3',下游引物 5'-CTGCAGGCAGCGGATGATAA-3';FoxO1 上游引物 5'-AGAGTTAGTGAGCAGGCTACAT-3',下游引物 5'-CCGCTGTTGCCAAGTCTGA-3'; β -actin 上游引物 5'-GGTGGGAATGGGTCAGAAGG-3',下游引物 5'-AGGTCTCAAACATGATCTGGGT-3'。

1.3.6 Western blot 检测

各组取适量骨骼肌组织置于冰上的匀浆器中,加入蛋白裂解液和蛋白磷酸酶抑制剂(100:1)充分研磨,直至乳糜状后转移到 EP 管中,每隔 5 min 振荡 1 次,共 30 min, 4°C 离心 10 min,吸取上清测定总蛋白浓度。另取上清与 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合后沸水变性 5 min,按照每孔 40 μg 蛋白上样进行电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗(浓度为 1:1000~1:2000) 4°C 孵育摇床过夜,TBST 溶液

洗膜 3 次,加入二抗(浓度为1:10000)室温孵育1 h,洗膜后用 ECL 曝光显影,VisionWorks 软件进行分析条带的灰度值。

1.4 统计学方法

所有数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 25.0 软件进行分析,用 GraphPad Prism 7 和 Photoshop 软件进行作图。多组间比较用单因素方差分析,两组间比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 造模 8 周后各组小鼠的体重、摄食和血糖

在喂养 8 周后,与 ND 组比较,HFD 组和 DM 组小鼠体重显著增高,DM 组小鼠的摄食显著增高;与 HFD 组比较,DM 组小鼠体重和摄食均显著增高($P<0.01$)。与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组的 FBG 和 PBG 显著增高($P<0.001$)。见表 1。

2.2 干预后各组小鼠的相关指标

2.2.1 血清生化指标

与 ND 组比较,HFD 组小鼠 TC 和 FFA 水平显

表 1 喂养 8 周后三组小鼠的体重、摄食及血糖($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Body weight, food intake and blood glucose in the three groups of mice after 8 weeks of feeded

指标 Index	普食组 ND group	高脂组 HFD group	糖尿病组 DM group
体重(g) Body wight	24.90±0.87	30.57±1.11 ^a	41.12±1.58 ^{bc}
摄食(g/d) Food intake	2.51±0.27	2.22±0.17	7.05±0.36 ^{bc}
空腹血糖(mmol/L) FBG	5.76±0.92	7.60±1.03	25.68±6.41 ^{bc}
餐后血糖(mmol/L) PBG	7.60±0.88	9.02±0.73	31.16±4.28 ^{bc}

注:与 ND 组相比,^a $P<0.01$,^b $P<0.001$;与 HFD 组相比,^c $P<0.001$ 。
Note. Compared with ND group, ^a $P<0.01$,^b $P<0.001$. Compared with HFD group, ^c $P<0.001$.

表 2 六组小鼠血清生化指标($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Serum biochemical parameters of mice in six groups

指标 Index	普食组 ND group	普食+内脂素组 ND+V group	高脂组 HFD group	高脂+内脂素组 HFD+V group	糖尿病组 DM group	糖尿病+内脂素组 DM+V group
空腹血糖(mmol/L)FBG	6.42±0.62	6.47±0.65	9.36±0.16	7.59±1.10	18.70±3.18 ^{ac}	12.63±7.06 ^d
总胆固醇(mmol/L)TC	1.63±0.45	1.41±0.08	3.29±0.51 ^b	3.20±0.36	7.19±0.47 ^{bc}	4.78±0.63 ^e
甘油三酯(mmol/L)TG	0.62±0.29	0.52±0.13	0.40±0.13	0.40±0.25	2.31±0.30 ^{bc}	1.65±0.31 ^e
游离脂肪酸(mmol/L)FFA	0.30±0.01	0.22±0.04	0.46±0.14 ^b	0.36±0.02	0.69±0.08 ^{bc}	0.61±0.02
空腹胰岛(mU/L)FIIns	7.68±1.42	7.17±0.24	9.29±0.48	10.60±0.62	15.38±0.74 ^{bc}	14.71±3.87
胰岛素抵抗指数 HOMA-IR	2.16±0.18	2.06±0.13	3.87±0.15	3.56±0.36	12.78±2.24 ^{bc}	7.47±1.95 ^e

注:与 ND 组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 HFD 组相比,^c $P<0.01$;与 DM 组相比,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。
Note. Compared with ND group, ^a $P<0.05$,^b $P<0.01$. Compared with HFD group, ^c $P<0.01$. Compared with DM group, ^d $P<0.05$,^e $P<0.01$.

著增高($P<0.01$),与 ND 组和 HFD 组比较,与 ND 组和 HFD 组比较,DM 小鼠 FBG、FIIns、TC、TG、FFA 和 HOMA-IR 水平均显著增高($P<0.05$)。与 DM 组相比,DM+V 组的 FBG、TC、TG 和 HOMA-IR 显著降低($P<0.05$)。见表 2。

2.2.2 葡萄糖耐量实验和胰岛素耐量实验

在 GTT 实验中,注射葡萄糖后 15 min 时,ND 组、ND+V 组、HFD 组和 HFD+V 组的血糖浓度均上升到最大值,之后开始下降直到 180 min 时血糖浓度恢复到注射前左右;而 DM 组小鼠在注射后 90 min 时血糖才达到峰值,之后开始下降;DM+V 组在 t=30 min 时血糖升高到峰值,在 t=180 min 血糖回归到 0 点左右。与 ND 组比较,HFD 组和 DM 组 AUC_{GTT} 显著增高($P<0.01$ 或 0.001);与 HFD 组比较,DM 组 AUC_{GTT} 显著增高($P<0.001$);与 DM 相比,DM+V 组 AUC_{GTT} 显著降低($P<0.01$)。见图 1。

ITT 实验中,ND 组、ND+V 组、HFD 组、HFD+V 组和 DM+V 组的血糖均在 15~60 min 时降至最低点,而 DM 组血糖先升高后下降,60 min 时降至最低。分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 AUC_{ITT} 均显著增高($P<0.001$);和 DM 组相比,DM+V 组 AUC_{ITT} 显著降低($P<0.01$)。见图 2。

2.2.3 RT-qPCR 检测 PI3K、Akt 及 FoxO1 的 mRNA 表达

分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.001$),而 FoxO1 的 mRNA 表达水平均显著增高($P<0.05$);与 ND 组相比,ND+V 组 FoxO1 的 mRNA 表达显著降低($P<0.05$);与 HFD 组比较,ND 组 Akt 的 mRNA 表达组显著增高($P<0.05$);与 DM 组比较,DM+V 组 PI3K 及 Akt 的 mRNA 表达均显著增高,FoxO1 的 mRNA 表达显著降低($P<0.01$)。见表 3。

2.2.4 Western blot 法检测 PI3K/Akt 信号通路及其下游相关分子的蛋白表达

与 ND 组比较,DM 组 PI3K_{110α}、p-Akt 蛋白表达水平显著降低,FoxO1、p-FoxO1 和 PDK4 的蛋白表达水平均显著增高($P<0.05$);与 ND 组比较,HFD 组 FoxO1 的蛋白表达显著降低,而 p-FoxO1 的蛋白表达显著增高($P<0.05$);ND+V 组 FoxO1 蛋白表达

水平较 ND 组显著降低($P<0.001$)。与 HFD 组相比,DM 组的 p-Akt、p-FoxO1 的蛋白表达水平均显著降低,FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著增高($P<0.05$)。与 DM 组比较,DM+V 组中 PI3K_{110α}、p-Akt 及 p-FoxO1 的蛋白表达均显著增高,而 FoxO1、PDK4 和 PEPCK 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。见图 3~6。

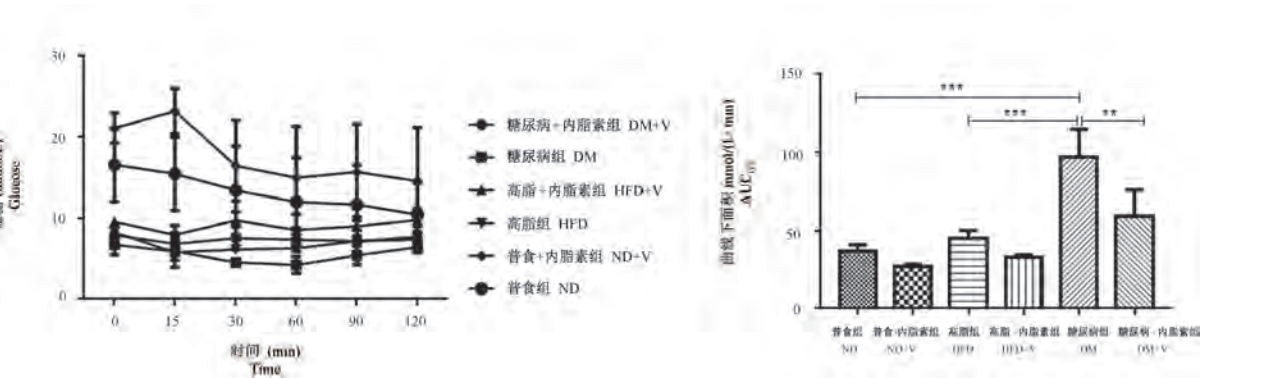


注:与 ND 组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 HFD 组相比, *** $P<0.001$;与 DM 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 1 葡萄糖耐量实验和曲线下面积

Note. Compared with ND group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with HFD group, *** $P<0.001$. Compared with DM group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Glucose tolerance test and area under curve



注:与 ND 组相比, *** $P<0.001$;与 HFD 组相比, *** $P<0.001$;与 DM 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 胰岛素耐量实验和曲线下面积

Note. Compared with ND group, *** $P<0.001$. Compared with HFD group, *** $P<0.001$. Compared with DM group, ** $P<0.01$.

Figure 2 Insulin tolerance test and area under curve

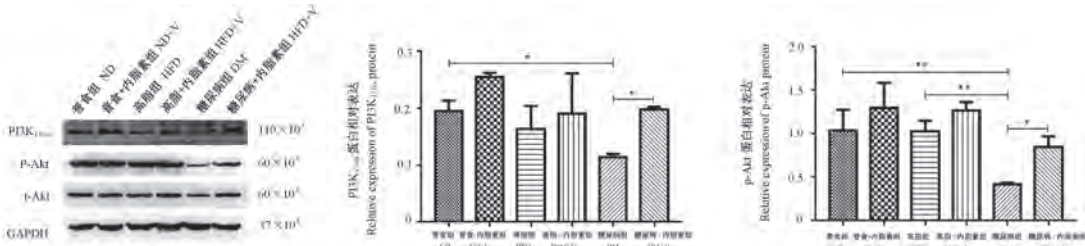
表 3 各组小鼠骨骼肌 PI3K、Akt 和 FoxO1 的 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Expressions level of PI3K, Akt and FoxO1 mRNA in skeletal muscle of mice among each group

基因 Genes	普食组 ND group	普食+内脂素组 ND+V group	高脂组 HFD group	高脂+内脂素组 HFD+V group	糖尿病组 DM group	糖尿病+内脂素组 DM+V group
PI3K	1.00±0.05	1.09±0.05	0.85±0.09	0.95±0.15	0.48±0.11 ^{bc}	0.81±0.04 ^f
Akt	1.00±0.11	1.16±0.14	0.82±0.08 ^a	0.92±0.07 ^c	0.33±0.10 ^{bc}	0.75±0.05 ^b
FoxO1	0.53±0.14	0.32±0.16 ^a	0.43±0.12	0.41±0.14	0.72±0.16 ^{ad}	0.26±0.10 ^b

注:与 ND 组相比, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.001$;与 HFD 组相比, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$, ^e $P<0.001$;与 DM 组相比, ^f $P<0.01$, ^h $P<0.001$ 。

Note. Compared with ND group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.001$. Compared with HFD group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$, ^e $P<0.001$. Compared with DM group, ^f $P<0.01$, ^h $P<0.001$.

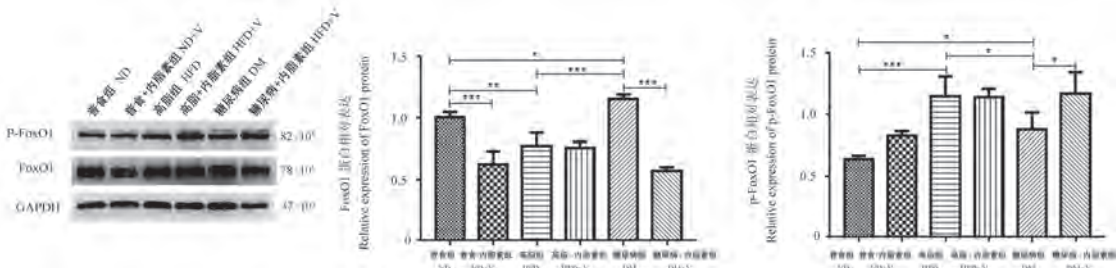


注:与 ND 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 HFD 组相比, ** $P<0.01$;与 DM 组相比, * $P<0.05$ 。

图 3 各组小鼠骨骼肌组织 PI3K 和 Akt 的活性蛋白表达

Note. Compared with ND group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with HFD group, ** $P<0.01$. Compared with DM group, * $P<0.05$.

Figure 3 Active pntein expression of PI3K and Akt in skeletal muscle tissues of mice in each group



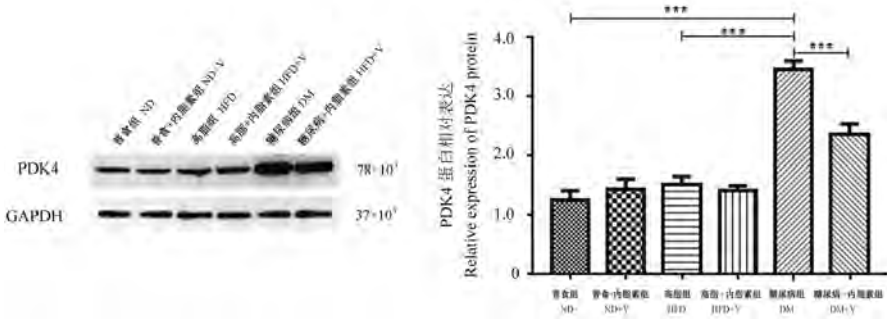
注:与 ND 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 HFD 组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与 DM 组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 4 各组小鼠骨骼肌组织 FoxO1 的蛋白表达

Note. Compared with ND group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with HFD group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with DM group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Protein expression of FoxO1 in skeletal muscle tissues of mice in each group

Figure 4 Protein expression of FoxO1 in skeletal muscle tissues of mice in each group



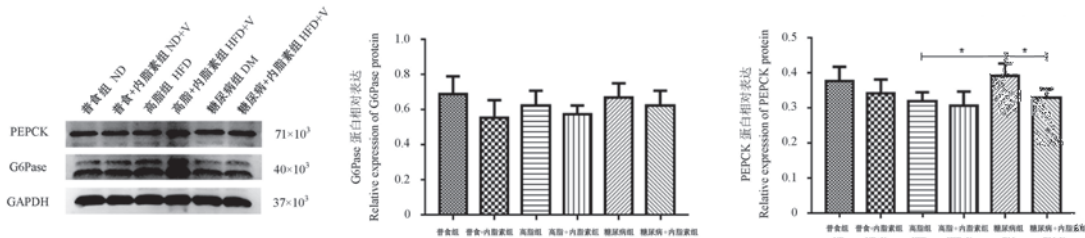
注:与 ND 组相比, *** $P<0.001$;与 HFD 组相比, *** $P<0.001$;与 DM 组相比, *** $P<0.001$ 。

图 5 各组小鼠骨骼肌组织 PDK4 的蛋白表达

Note. Compared with ND group, *** $P<0.001$. Compared with HFD group, *** $P<0.001$. Compared with DM group, *** $P<0.001$.

Figure 5 Protein expression of PDK4 in skeletal muscle tissues of mice in each group

Figure 5 Protein expression of PDK4 in skeletal muscle tissues of mice in each group



注:与 HFD 组相比, * $P<0.05$;与 DM 组相比, * $P<0.05$ 。

图 6 各组小鼠骨骼肌组织 G6Pase 和 PEPCK 的蛋白表达

Note. Compared with HFD group, * $P<0.05$. Compared with DM group, * $P<0.05$.

Figure 6 Protein expression of G6Pase and PEPCK in skeletal muscle tissues of mice in each group

3 讨论

T2DM 是一种多基因遗传的慢性代谢紊乱综合征,主要以糖脂代谢紊乱和胰岛素作用受损、同时靶细胞或靶器官对胰岛素刺激的反应能力减弱为特征^[12-13]。近年来研究发现 Visfatin 可作用于胰岛素受体,使胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化以激活下游 PI3K/Akt 等信号通路,具有与胰岛素类似的功能^[14]。前期研究也发现 Visfatin 可以通过 PI3K/Akt 信号途径上调其下游糖原合成酶激酶 3 β 和葡萄糖转运体 4 的活性,下调 FoxO1 的表达,增加 L6 骨骼肌细胞和 KKAY 小鼠骨骼肌组织对葡萄糖的摄取,改善 IR^[7-8,15],并且 FoxO1 与 FBG、TG 和 HOMA-IR 呈正性相关^[16]。

骨骼肌是调节糖脂代谢的关键外周组织,Visfatin 还可影响骨骼肌的胰岛素敏感性,维持葡萄糖稳态^[4]。临床研究表明 Visfatin 血浆浓度与人体内脏脂肪量密切相关,在肥胖和 T2DM 人群中 Visfatin 浓度明显升高,提示其可能参与肥胖相关的 IR 和糖尿病的发生^[17]。FoxO1 是能量稳态的关键转录因子,能直接上调骨骼肌组织 PDK4 的表达,减少葡萄糖的利用^[18-19],本实验中 KKAY 糖尿病小鼠的体重、摄食和血糖显著增高,出现典型的糖代谢紊乱特征^[20],分别与 ND 组和 HFD 组比较,DM 组 FBG、TC、TG、FFA、FIns、AUC_{GTT}、AUC_{ITT} 及 HOMA-IR 水平均显著增高,HFD 组小鼠 TC 和 FFA 水平较 ND 组均显著增高,而注射 Visfatin 重组蛋白后,DM+V 组的 FBG、TC、TG、HOMA-IR、AUC_{GTT} 和 AUC_{ITT} 水平显著降低,提示 Visfatin 可改善糖尿病小鼠的胰岛素敏感性及糖脂代谢。糖尿病小鼠骨骼肌 PI3K、Akt 的基因及蛋白活性表达较 ND 和 HFD 组显著降低,而 FoxO1 及 PDK4 的基因和蛋白表达水平较 ND 组和 HFD 组均明显增高;注射内脂素后 DM 组骨骼肌 PI3K、Akt 的基因和蛋白活性表达均显著增高,而 FoxO1 及 PDK4 基因和蛋白表达水平均显著降低。本实验证实 Visfatin 下调了骨骼肌 FoxO1 和 PDK4 的表达,但 HFD 组及 DM+V 组 FoxO1 与 p-FoxO1 蛋白水平表达结果不一致,我们推测:(1) FoxO1 不仅由磷酸化修饰,可能还与泛素化及乙酰化等其他蛋白翻译后修饰作用有关,从而影响 FoxO1 的表达;(2) FoxO1 包含三个由 Akt 控制的磷酸化位点,即 Thr24、Ser256 和 Ser319,而本实验中只检测了 FoxO1 蛋白磷酸化位点其中之一,不能完全代表

p-FoxO1 蛋白水平的表达。

FoxO1 可诱导其下游靶点 PDK4 的转录激活,同时,PDK4 可使丙酮酸脱氢酶复合物磷酸化失活,减少丙酮酸进入三羧酸循环,从而调节糖异生和糖酵解途径,而葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)是催化糖异生的关键酶^[19,21]。研究发现通过诱导 PDK 基因,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激活因子 1 α 将促进丙酮酸代谢为乙酰辅酶 A,进入糖异生途径;相反,抑制 PDK4 基因后,可降低血糖、改善 IR^[22]。在肥胖小鼠和 IR 的肝细胞中 PEPCK 和 G6Pase 表达明显增加,而抑制 PEPCK 和 G6Pase 的表达可通过减少肝糖异生从而逆转 IR^[23-24]。本实验中 DM+V 组小鼠骨骼肌中 PEPCK 蛋白表达明显低于 DM 组小鼠,与上述研究结果一致,但 G6Pase 蛋白表达无明显差异,可能是实验中注射 Visfatin 的时间较短所致。因此,进一步构建 Visfatin 过表达腺相关病毒载体,拟研究长时间持续作用的 Visfatin 对糖脂代谢相关分子基因和蛋白表达的影响,有待于更进一步证实 Visfatin 在糖尿病及 IR 中的作用。

总之,在 KKAY 糖尿病小鼠骨骼肌组织中,Visfatin 可能通过 PI3K/Akt 途径下调 FoxO1、PDK4 的表达,发挥改善糖脂代谢和 IR 的作用。本研究也存在一定的局限性,后续将继续完成过表达腺相关病毒实验,同时用腺相关病毒干扰 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路后观察 FoxO1 及其下游分子的表达变化,以期对糖尿病和 IR 防治提供潜在的视点。

参考文献:

- [1] Hognogi LD, Simiti LV. The cardiovascular impact of visfatin-an inflammation predictor biomarker in metabolic syndrome [J]. Clujul Med, 2016, 89(3): 322-326.
- [2] Lee JO, Kim N, Lee HJ, et al. Visfatin, a novel adipokine, stimulates glucose uptake through the Ca²⁺-dependent AMPK-p38 MAPK pathway in C2C12 skeletal muscle cells [J]. J Mol Endocrinol, 2015, 54(3): 251-262.
- [3] Li F, Li Y, Duan Y, et al. Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 33(3): 73-82.
- [4] Nicholson T, Church C, Baker DJ, et al. The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity [J]. J Inflamm (Lond), 2018, 15: 9.
- [5] Hetta HF, Ez-Eldeen ME, Mohamed GA, et al. Visfatin serum levels in obese type 2 diabetic patients: relation to proinflammatory cytokines and insulin resistance [J]. Egypt J Immunol, 2018, 25(2): 141-151.

- [6] Accili D, Arden KC. FoxOs at the Crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. Cell, 2004, 117(4): 421–426.
- [7] 廖鑫, 邓凡曲, 杨丹, 等. 内脂素对大鼠成肌细胞 PI3K/Akt 信号通路及胰岛素敏感性影响的研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(9): 677–681.
- [8] 陈其荣. 内脂素通过 PI3K/AKT/GSK 信号通路对 KKAy 糖尿病小鼠骨骼肌糖代谢的影响 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2015.
- [9] Liu Q, Liu S, Gao L, et al. Anti-diabetic effects and mechanisms of action of a Chinese herbal medicine preparation JQ-R *in vitro* and in diabetic KK^{AY} mice [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2017(4): 461–469.
- [10] Zhang J, Zhou J, Zhang T, et al. Facile fabrication of an amentoflavone-loaded micelle system for oral delivery to improve bioavailability and hypoglycemic effects in KKAy mice [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(13): 12904–12913.
- [11] Bone DBJ, Meister J, Knudsen JR, et al. Skeletal muscle-specific activation of G_q signaling maintains glucose homeostasis [J]. Diabetes, 2019, 68(6): 1341–1352.
- [12] Han MS, Jung DY, Morel C, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation [J]. Science, 2013, 339(6116): 218–222.
- [13] Åvall K, Ali Y, Leibiger IB, et al. Apolipoprotein CIII links islet insulin resistance to β -cell failure in diabetes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(20): E2611–E2619.
- [14] Wang Y, Gao C, Zhang Y, et al. Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways [J]. Gynecol Oncol, 2016, 143(1): 168–178.
- [15] 程玉华. 内脏脂肪素对胰岛素抵抗 L6 细胞叉头框蛋白 1 的影响 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2019.
- [16] 廖鑫, 陈其荣, 阳琰, 等. 糖尿病小鼠骨骼肌 FoxO1 及 PPAR γ 的表达及意义 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(23): 5759–5761.
- [17] Tabassum A, Mahboob T. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on visfatin, advanced glycation end products, and renal oxidative stress in obesity-induced type 2 diabetes mellitus [J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(11): 1187–1198.
- [18] Zhang D, Li Y, Yao X, et al. miR-182 regulates metabolic homeostasis by modulating glucose utilization in muscle [J]. Cell Rep, 2016, 16(3): 757–768.
- [19] Sanchez AMJ, Candau RB, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(9): 1657–1671.
- [20] 党女, 卢延华, 管博文, 等. 白消安对 2 型糖尿病 KKAy 小鼠外周血细胞及骨髓细胞的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 45–50.
- [21] Xiang J, Lv Q, Yi F, et al. Dietary supplementation of vine tea ameliorates glucose and lipid metabolic disorder via akt signaling pathway in diabetic rats [J]. Molecules, 2019, 24(10): 1866–1888.
- [22] 杨蕊, 朱奕, 王颖, 等. 丙酮酸脱氢酶激酶 PDK4 在临床中的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 101–105.
- [23] Xiao Q, Zhang S, Yang C, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates palmitic acid-induced hepatic steatosis and inflammation in HepG2 cells via the AMPK/NF- κ B pathway [J]. Int J Endocrinol, 2019, 2019: 7514802.
- [24] Fang P, Sun Y, Gu X, et al. Baicalin ameliorates hepatic insulin resistance and gluconeogenic activity through inhibition of p38 MAPK/PGC-1 α pathway [J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153074.

[收稿日期] 2020-08-14

齐伟, 李丽, 张岳, 等. 基于 NF- κ B/I κ B α 信号通路探讨“通经利浊”针法对急性痛风性关节炎大鼠保护作用的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 24-29.

Qi W, Li L, Zhang Y, et al. Protective mechanisms of “smoothen meridian and clear turbid dampness” acupuncture on rats with acute gouty arthritis through the NF- κ B/I κ B α signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 24-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 004

基于 NF- κ B/I κ B α 信号通路探讨“通经利浊”针法对急性痛风性关节炎大鼠保护作用的机制研究

齐伟^{1,2}, 李丽¹, 张岳³, 穆双双³, 胡德³, 王淑敏^{3*}, 王朝辉^{1*}

(1. 长春中医药大学针推学院, 长春 130117; 2. 深圳市宝安纯中医治疗医院骨伤科, 深圳 518101;
3. 长春中医药大学药学院, 长春 130117)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨“通经利浊”针法对急性痛风性关节炎大鼠潜在的保护机制。方法 模型组通过注射单钠尿酸盐(MSU)诱发大鼠急性痛风性关节炎。治疗组对大鼠进行“通经利浊”针法针刺治疗 7 d, 对照组口服秋水仙碱(1 mg/kg)给药 7 d。结果 实验结果表明, 注射 MSU 可显著提高血清促炎细胞因子白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平, 应用“通经利浊”针法针刺治疗效果显著逆转($P<0.05$); 通过组织病理学检查, 进一步明确了“通经利浊”针法的疗效, 并对其保护作用机制进行了研究, 结果表明“通经利浊”针法针刺抑制了 MSU 诱导的核因子 κ B(NF- κ B)通路的激活。MSU 诱发后, “通经利浊”针法针刺显著抑制了 NF- κ B p65 的活化和蛋白 κ B- α (I κ B α)的降解。结论 “通经利浊”针法针刺可能通过抑制 NF- κ B/I κ B α 信号通路的激活从而起到对 MSU 诱发的急性痛风性关节炎的保护作用。

【关键词】 “通经利浊”针法; 急性痛风性关节炎; 大鼠模型; NF- κ B/I κ B α

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0024-06

Protective mechanisms of “smoothen meridian and clear turbid dampness” acupuncture on rats with acute gouty arthritis through the NF- κ B/I κ B α signaling pathway

QI Wei^{1,2}, LI Li¹, ZHANG Yue³, MU Shuangshuang³, HU De³, WANG Shumin^{3*}, WANG Zhaohui^{1*}

(1. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China.
2. Orthopedics, Bao'an Authentic TCM Therapy Hospital, Shenzhen 518101. 3. School of Pharmacy and Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

【Abstract】 **Objective** The present study aimed to investigate the effects of “smoothen meridian and clear turbid dampness” (SMCTD) acupuncture on a model of acute gouty arthritis and explore its underlying mechanisms. **Methods** The model of acute gouty arthritis was induced in rats by monosodium urate (MSU) crystal injection. Next, the rats were treated with SMCTD acupuncture for 7 d or orally administered colchicine (1 mg/kg) for 7 d. **Results** MSU crystal

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074570, 81774393); 吉林省科技发展规划项目(20160101223JC); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20200876KJ)。

[作者简介] 齐伟(1974—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 颈肩腰腿痛的临床及机理研究。E-mail: qiwei0802@126.com

[通信作者] 王朝辉(1973—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 特定穴配伍规律研究。E-mail: wzhiqiwei@126.com

王淑敏(1965—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 微生物与生化药物的研究与开发。E-mail: wangsm@ccucm.edu.cn

* 共同通信作者

injection induced a significant elevation in the concentrations of the serum proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Treatment with SMCTD acupuncture significantly reversed these MSU crystal-induced alterations ($P<0.05$). The therapeutic effects of SMCTD acupuncture were further examined by histopathological examination. Exploration of the underlying mechanisms of its actions revealed that SMCTD acupuncture inhibited the activation of the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway, which was induced by MSU crystal injection. SMCTD acupuncture also significantly inhibited the activation of NF- κ B p65 and the degradation of protein κ B- α (I κ B α) after the MSU crystal challenge. **Conclusions** Taken together, our findings demonstrate that SMCTD acupuncture has beneficial effects on MSU crystal-induced acute gouty arthritis, probably by inhibiting activation of the NF- κ B/I κ B α signaling pathway.

[Keywords] “smoothen meridian and clear turbid dampness” acupuncture; acute gouty arthritis; rat model; NF- κ B/I κ B α

痛风是炎症性关节炎的一种形式,是由于单钠尿酸盐(monosodium urate, MSU)晶体在人体组织和体液中的沉积所致。由于饮食和生活习惯的改变,在工业化国家中至少有 4% 的成年人受到痛风的困扰^[1-2]。痛风的治疗通常需要联合使用抗炎药物和降尿酸药物,如非甾体抗炎药/环氧化酶抑制剂、秋水仙碱、糖皮质激素、丙磺舒和别嘌醇^[3]。尽管短期药物治疗对痛风有益,但痛风极易反复发作,同时长期药物治疗则会产生副作用^[4]。综上,临床上迫切需要疗效更好、安全性更高的抗痛风药物及疗法。

近期的研究多集中在寻找治疗痛风性关节炎而无明显不良反应的替代疗法上。针灸是替代医学的一种形式,因为它的不良反应发生率非常低,几乎无副作用,并且在治疗疼痛相关疾病中疗效确切^[5-6],因此针灸在患者中很受欢迎。同时,探索针灸发挥疗效的生化机制越来越受到重视。研究认为针刺刺激可以激活位于特定穴位深处的神经纤维和受体。皮肤和深部组织损伤可能伴随着局部炎症反应^[7]。

针灸参与调节炎症性疼痛已有文献报道^[8-10]。在弗氏佐剂诱导的炎症模型中,电针可减轻炎症剂引起的疼痛反应和脊髓中谷氨酸受体的表达^[9]。在角叉菜胶诱发的炎症模型中,针刺联合亚有效剂量的 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂可延长抗痛觉反应的时间,且无明显副作用^[10]。另有研究表明,电针可抑制大鼠的脊髓背角星形胶质细胞活性,并减少了炎性细胞因子 IL-6、IL-1 和 TNF- α 的释放^[11]。此外,针刺可明显抑制关节炎模型中 IL-1 β 的上调^[12]。鞘内注射 IL-1 受体拮抗剂可显著缓解癌症引起的痛觉反应,这表明针刺是通过抑制 IL-1 β 的表达来缓解骨癌引起的疼痛^[13]。

临床观察发现针刺对急性痛风性关节炎显示

出良好的治疗效果^[14],针刺对 MSU 诱导的大鼠急性痛风性关节炎同样有效^[15]。针刺“通经利浊”针法是治疗急性痛风性关节炎的有效临床方法^[16]。通经利浊针法取足阳明之足三里与足太阴之阴陵泉,均属合穴,此两穴相配有健脾、化湿通络之功。再选取三阴交以活血化瘀、宣壅通络、利尿通淋,促进湿浊邪气从小便排出。此三穴共用,共奏清热利湿,宣壅通络之效。

但是,“通经利浊”针法针刺对急性痛风性关节炎的保护作用机制尚不清楚。本研究的目的是探讨“通经利浊”针法针刺治疗保护 MSU 诱导的大鼠急性痛风性关节炎的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

从辽宁长生生物技术有限公司[SCXK(辽)2020-0001]购买了无特定病原级(specific pathogen free, SPF)雄性 SD 大鼠 40 只,6 周龄,体重(220 $\pm$ 20)g。大鼠自由获取食物和水,常规饲养 1 周。本研究经过长春中医药大学伦理委员会批准(IACUC-20190169),在长春中医药大学动物中心喂养[SYXK(吉)2018-0014],严格按照中国实验动物管理条例处理动物,遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

秋水仙碱片(C₂₂H₂₅NO₆,分子量:399.44)购自昆明制药;单钠尿酸盐(C₅H₃N₄O₃Na,分子量:190.09)购自 Sigma;IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 试剂盒均购自南京建成;抗-p-NF- κ Bp65、抗-NF- κ Bp65、抗-p-I κ B α 、抗-I κ B α 等所有抗体均购自 Cell Signaling Technology;小型动物麻醉机(VMR 型)购自 MATRX(美国);电针仪(SDZ-V 型)购自华佗。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组

将动物分为 4 组(每组 $n=10$):(1)空白组;

(2) 模型组; (3) “通经利浊” 针法组; (4) 秋水仙碱组。秋水仙碱组大鼠口服秋水仙碱 (1 mg/kg) 7 d, 而空白组和模型组则给予相同量的生理盐水灌胃。针刺治疗根据参考文献^[17]中的定位方法选择“后三里”、“阴陵泉”、“三阴交”。使用小型动物麻醉机麻醉后, 针刺“后三里”, 直刺 5 mm; “阴陵泉”, 直刺 5 mm; “三阴交”, 直刺 3 mm。针刺后用电针仪, 以一侧的后三里-三阴交为连续电针连接对穴, 取连续波 (2 Hz, 0.6 mA, 0.45 ms) 行电针刺激, 以大鼠的大腿轻轻抖动, 不影响麻醉效果为度。每日针刺 1 次, 每次 10 min, 7 次为 1 疗程, 共干预 1 疗程。针刺组和秋水仙碱组在急性痛风性关节炎模型建立前 7 d 接受治疗。

1.3.2 急性痛风性关节炎模型

参照 Shields 等^[18]研究方法制备得到了 MSU 晶体, 洗涤并风干。将 250 mg MSU 晶体溶于 10 mL 溶液 (生理盐水: 聚山梨酯-80=9:1) 中制得浓度为 25 mg/mL 的 MSU 溶液。第 7 天将此溶液注入右膝关节腔诱发急性痛风性关节炎模型后, 即从双眼眶后神经丛收集血液样品 1 mL, 2500 r/min 下离心 15 min, 将血清储存在 -20℃ 下保存直至使用。大鼠关节腔内注射 MSU 晶体后关节炎迅速出现, 关节炎发生率 100%^[19]。具体表现为大鼠活动明显减少, 关节周围局部出现红斑、肿胀伴功能障碍, 如行走迟缓、肢体不愿着力负重。显微镜下可见明显的关节炎病理改变, 确认造模成功^[20]。

1.3.3 促炎症细胞因子检测

酶联免疫吸附试验测定 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平: 分离血清 1 d 后, 根据生产商说明书进行操作, 检测血清中的促炎症细胞因子水平。

1.3.4 组织病理学检查

处死大鼠后, 将膝盖样品在关节线上方和下方分别切开 0.5 cm。然后将组织固定在 10% 中性福尔马林缓冲液中, 石蜡浸润, 包埋并制成 5 μ m 厚切片。用苏木精和伊红 (HE) 染色法将切片脱蜡并染色。在显微镜下以 200 倍的放大倍率观察切片。

1.3.5 Western blot 分析

将膝盖样品切成小块后在 RIPA 裂解缓冲液中混合, 在冰浴下匀浆。静置 30 min, 将样品在 4℃ 下 12000 r/min 离心 20 min。收集上清液, 使用 BCA 试剂盒, 以牛血清白蛋白作为标准品测定蛋白质浓度。将上清液加载到 12% 蛋白凝胶上, 并用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 (120 V, 200 mA, 60 W, 5 h), 蛋

白质被转移到 PVDF 膜上 (300 V, 200 mA, 60 W, 2 h)。用 5% 脱脂奶封闭 2 h。将膜与单独的一抗、抗-p-NF- κ Bp65、抗-NF- κ Bp65、抗-p-I κ B α 、抗-I κ B α 和抗 GAPDH 共同在 4℃ 下孵育过夜, 用 TBST 缓冲液洗涤后, 将膜与二抗在室温下孵育 2 h。使用 ECL 化学发光检测试剂盒对免疫反应性条带成像, 使用 Image Lab 4.1 (Bio-Rad) 进行信号收集和光密度图像分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析, 结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 “通经利浊” 针法针刺对促炎症细胞因子的影响

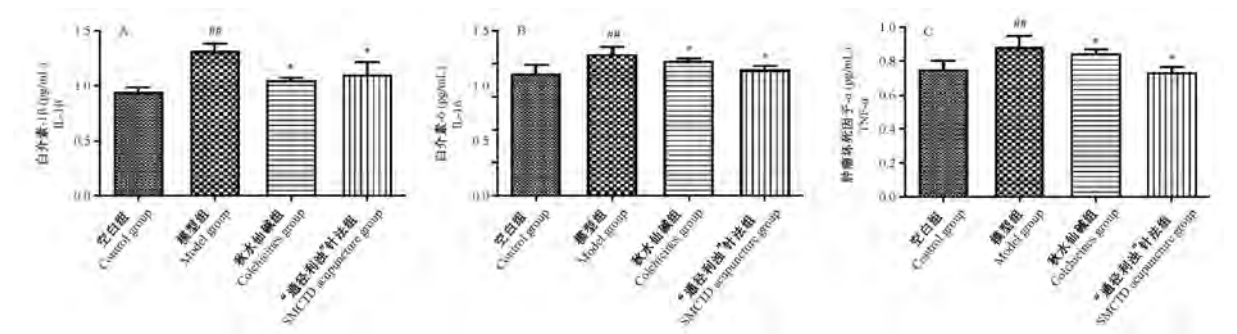
与空白组相比, 模型组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$)。通过“通经利浊” 针法针刺治疗可以显著逆转由 MSU 晶体引起的促炎症细胞因子升高。秋水仙碱组与针法组的疗效类似 (图 1)。

2.2 “通经利浊” 针法针刺对膝关节组织学变化的影响

在空白组动物的右膝关节病理切片中可观察到正常的关节结构和骨关节 (图 2A)。MSU 晶体诱发的急性痛风性关节炎大鼠 (模型组) 表现出轻度滑膜水肿, 关节间隙变小, 关节侵蚀明显 (图 2B)。与之相反, 秋水仙碱组 (图 2C) 和“通经利浊” 针法组 (图 2D) 抑制 MSU 晶体诱发的急性痛风性关节炎大鼠的关节侵蚀, 关节间隙增加。

2.3 “通经利浊” 针法针刺对 NF- κ B 信号通路的影响

本研究检测“通经利浊” 针法针刺或秋水仙碱预处理是否会影响 NF- κ B 通路的活化。结果表明, 通过 MSU 晶体处理可增加 NF- κ Bp65 含量, 而通过“通经利浊” 针法针刺或秋水仙碱预处理可有效降低其含量 ($P<0.01$, $P<0.01$) (图 3A)。此外, MSU 晶体激发导致了 I κ B α 磷酸化和随后的降解 (图 3B)。然而, 通过“通经利浊” 针法针刺或秋水仙碱预处理, MSU 晶体诱导的 I κ B α 磷酸化降低 ($P<0.01$) (图 3C)。上述结果均表明, “通经利浊” 针法针刺的治疗通过抑制 NF- κ B/I κ B α 信号通路的活化而发挥作用。

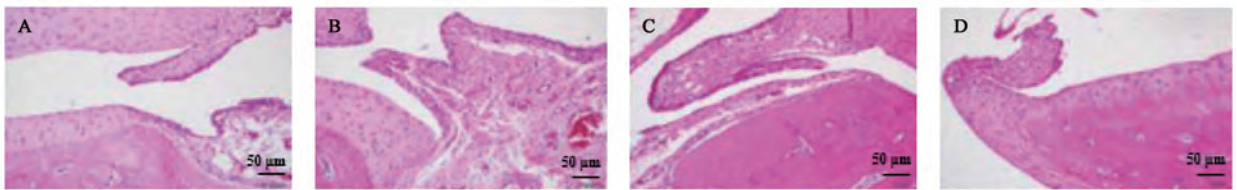


注:A:白介素-1β;B:白介素-6;C:肿瘤坏死因子-α。与空白组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,* $P<0.05$ 。

图1 “通经利浊”针法对促炎症细胞因子的影响

Note. A, IL-1β. B, IL-6. C, TNF-α. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$.

Figure 1 Effects of SMCTD acupuncture on serum proinflammatory cytokines.

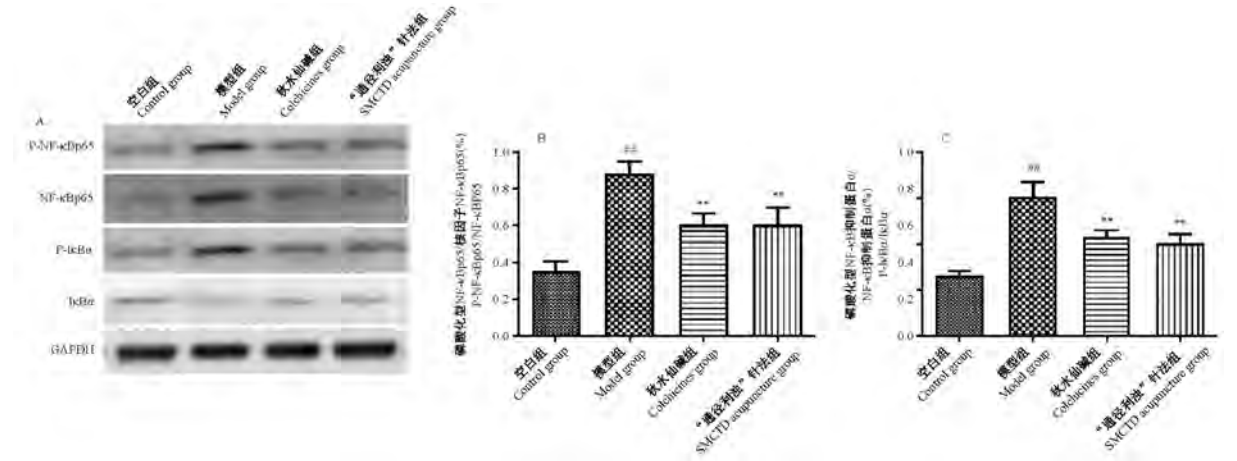


注:A:空白组;B:模型组;C:秋水仙碱组(1 mg/kg);D:“通经利浊”针法组。

图2 “通经利浊”针法对踝关节组织病理学检查的影响

Note. A, Control group. B, Model group. C, Colchicines group (1 mg/kg). D, SMCTD acupuncture group.

Figure 2 Effects of SMCTD acupuncture on myocardial histopathological examination



注:与空白组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 。

图3 “通经利浊”针法对 NF-κB 信号通路的影响

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

Figure 3 Effects of SMCTD acupuncture on NF-κB pathway

3 讨论

尿酸单钠晶体诱导的急性痛风性关节炎模型是由晶体沉积或急性结晶引起的。多项研究表明,MSU模型引起的症状与临床观察到的症状类似^[21],如水肿、红斑以及跛行。MSU引起短暂的炎

症反应,其特征为在关节中的晶体沉积,同时伴有大量多形核中性粒细胞吞噬、炎症性水肿和严重疼痛^[22]。从本研究的组织病理学检查结果来看,MSU可导致膝关节肿胀、跛行和伤害行为。“通经利浊”针法或秋水仙碱的预处理可显著缓解MSU引起的机械性异常性疼痛,并减少嗜中性粒细胞向关节间

隙的强烈浸润。

炎症是诱发急性痛风性关节炎的关键因素。在实验研究中,炎症过程是由 MSU 晶体在周围组织中沉积引起的。MSU 晶体与骨髓中的 T 淋巴细胞相互作用,活化炎症小体,从而促进 IL-6 和 IL-18 产生^[23]。活化的炎性细胞因子促进炎性介质的表达,这些介质负责 T 细胞的生长分化,是急性痛风性关节炎的主要病理特征^[24]。此外,当前研究表明,活化的炎症小体可触发炎症级联反应并将幼稚 T 细胞极化为促炎性 Th 亚群,进而增强炎症反应^[25]。本研究中,炎症应激与 MSU 引起的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 显著升高相关。“通经利浊”针法针刺或秋水仙碱治疗可明显降低血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的水平,这表明两者的治疗效果可能与抗炎特性有关。

促炎症细胞因子的分泌和成熟受到 NF- κ B 信号传导的严格调节。研究表明疾病发生后组织周围的吞噬细胞会被激活,分泌大量的促炎因子(如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等)直接对周围组织造成伤害,在细胞中,NF- κ B 通过与细胞质中的 I κ B 家族相互作用而失活。具体过程如下:促炎症因子激活 NF- κ B 抑制蛋白(I κ B)激酶复合体,使其磷酸化,经蛋白酶小体水解后,与 NF- κ B 发生解离,解除其对 NF- κ B 的抑制作用,进而暴露 NF- κ B 的 p50 亚基,使其移位细胞核与靶基因启动区或增强子的 NF- κ B 位点结合,启动促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等基因的表达,使得 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等合成和分泌增加,进一步加剧损伤;反过来,上述促炎因子又可以加速活化 NF- κ B 在组织间不断扩散及 NF- κ B 核移位,形成恶性循环^[26-27]。当用 MSU 晶体刺激时,I κ B α 被 I κ B 激酶复合物激活和降解,这使得 NF- κ B 易位进入细胞核并与靶基因结合^[28]。活化的 NF- κ B 增加了促炎症细胞因子、趋化因子等的基因表达,最终导致了严重的炎症反应^[29]。本实验结果表明,“通经利浊”针法针刺或秋水仙碱能抑制 I κ B α 磷酸化和降解。此外,“通经利浊”针法针刺或秋水仙碱给药,能减弱 MSU 晶体诱导引起的 NF- κ Bp65 核易位。

针灸是治疗与痛风相关疾病(包括痛风性关节炎)的主流替代疗法。其副作用小,很容易被患者接受。“通经利浊”针法是中医治疗痛风性关节炎的一种康复方法^[30]。在临床患者和实验动物中,将穴位足三里、阴陵泉和三阴交联合使用可有效治疗

痛风性关节炎^[31-32]。在本研究中,经“通经利浊”针法针刺治疗后显著减轻了 MSU 引起的大鼠急性痛风性关节炎,这为“通经利浊”针法治疗痛风性关节炎提供了进一步的实验支持。

综上,本研究表明“通经利浊”针法针刺对 MSU 晶体诱发的急性痛风性关节炎模型具有良好的疗效,其作用机制可能是通过介导 NF- κ B/I κ B α 信号通路抑制促炎症细胞因子。但仍存在不足,与 T 细胞亚群的关系仍需要进一步研究,相关实验正在进行中。

参考文献:

- [1] Cohen RE, Pillinger MH, Toprover M. Something old, something new: the ACR gout treatment guideline and its evolution from 2012 to 2020 [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2021, 23(1): 4.
- [2] Schlee S, Bollheimer LC, Bertsch T, et al. Crystal arthritides-gout and calcium pyrophosphate arthritis: part 1: epidemiology and pathophysiology [J]. *Z Gerontol Geriatr*, 2018, 51(4): 453-460.
- [3] Clebak KT, Morrison A, Croad JR. Gout: rapid evidence review [J]. *Am Fam Physician*, 2020, 102(9): 533-538.
- [4] Svärd A, Kapetanovic M, Bergsten U, et al. Large health benefits can be achieved by better treatment of gout [J]. *Lakartidningen*, 2020, 117: F3L7.
- [5] Urits I, Schwartz RH, Orhurhu V, et al. A comprehensive review of alternative therapies for the management of chronic pain patients: acupuncture, tai chi, osteopathic manipulative medicine, and chiropractic care [J]. *Adv Ther*, 2021, 38(1): 76-89.
- [6] Zhang YJ, Wang CC. Acupuncture and chronic musculoskeletal pain [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2020, 22(11): 80.
- [7] Gong YN, Li NC, Lv ZX, et al. The neuro-immune microenvironment of acupoints-initiation of acupuncture effectiveness [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(1): 189-198.
- [8] Huang HY, Liao HY, Lin YW. Effects and mechanisms of electroacupuncture on chronic inflammatory pain and depression comorbidity in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4951591.
- [9] Zhang RY, Zhu BF, Wang LK, et al. Electroacupuncture alleviates inflammatory pain via adenosine suppression and its mediated substance P expression [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2020, 78(10): 617-623.
- [10] Song MJ, Wang YQ, Wu GC. Additive anti-hyperalgesia of electroacupuncture and intrathecal antisense oligodeoxynucleotide to interleukin-1 receptor type I on carrageenan-induced inflammatory pain in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2009, 78(6): 335-341.
- [11] Zhao JM, Li H, Shi C, et al. Electroacupuncture inhibits the activity of astrocytes in spinal cord in rats with visceral

- hypersensitivity by inhibiting P2Y₁ receptor-mediated MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4956179.
- [12] Hisamitsu T. Inhibitory effect of electroacupuncture on murine collagen arthritis and its possible mechanisms [J]. *J Pharmacopuncture*, 2001, 4(1): 5-21.
- [13] Baamonde A, Curto-Reyes V, Juárez L, et al. Antihyperalgesic effects induced by the IL-1 receptor antagonist anakinra and increased IL-1 β levels in inflamed and osteosarcoma-bearing mice [J]. *Life Sci*, 2007, 81(8): 673-682.
- [14] 关凤媛, 纪维峰, 赵福义, 等. 自拟痛风散加针刺治疗急性痛风性关节炎临床观察 [J]. *风湿病与关节炎*, 2014, 3(10): 24-26, 36.
- [15] Chen Y, Wu LP, Liu YJ, et al. Urinary study on the biochemical effect of acupuncture on monosodium urate crystals-induced acute gouty arthritis in rats using 600MHz 1H NMR [J]. *J Bioequivalence Bioavailability*, 2012, 4(7): 106-111.
- [16] 李艳丽, 王悦, 许娜, 等. 针灸治疗急性痛风性关节炎选穴规律研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2015, 31(6): 1208-1209.
- [17] 郭义. 实验针灸学实验指导 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019.
- [18] Shiels RG, Hewage W, Pennell EN, et al. Biliverdin and bilirubin sulfonate inhibit monosodium urate induced sterile inflammation in the rat [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 155: 105546.
- [19] 钱伯初, 史红, 郑晓亮. 尿酸钠结晶诱导痛风性关节炎动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(6): 65-69.
- [20] 肖智勇, 张令令, 张小锐, 等. 小鼠胶原诱导性关节炎模型的建立及其免疫学变化研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(Z1): 136-140.
- [21] Yu Y, Wang D, Zhou Q, et al. Recommendations in clinical practice guidelines on gout: systematic review and consistency analysis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2020, 38(5): 964-972.
- [22] Rossato MF, Hoffmeister C, Trevisan G, et al. Monosodium urate crystal interleukin-1 β release is dependent on Toll-like receptor 4 and transient receptor potential V1 activation [J]. *Rheumatology*, 2020, 59(1): 233-242.
- [23] Cavalcanti NG, Marques CD, Lins E, et al. Cytokine profile in gout: inflammation driven by IL-6 and IL-18 [J]. *Immunol Invest*, 2016, 45(5): 383-395.
- [24] 丁子桐, 熊海霞, 高琴琴, 等. 胶原诱导性关节炎病/证模型大鼠血清细胞因子表达谱的初步研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 28-33.
- [25] Wang B, Chen SJ, Qian HY, et al. Role of T cells in the pathogenesis and treatment of gout [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106877.
- [26] 王先海, 李珍斌, 李小妹, 等. 通经定晕丸阻断颈椎病大鼠 NF- κ B 激活 MCP-1/CCR2 通路及 TNF- α 及 IL-1 β 、IL-6 表达的研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(4): 370-376.
- [27] 马毅超, 陈民利. NF- κ B 信号通路及胰岛素抵抗 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(8): 61-66.
- [28] Zheng CS, Zheng ZH, Zhang ZF, et al. IFIT5 positively regulates NF- κ B signaling through synergizing the recruitment of I κ B kinase (IKK) to TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(12): 2343-2354.
- [29] Ihn HJ, Kim K, Cho HS, et al. Pentamidine inhibits titanium particle-induced osteolysis *in vivo* and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-mediated osteoclast differentiation *in vitro* [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, 16(3): 265-273.
- [30] Lu WW, Zhang JM, Lv ZT, et al. Update on the clinical effect of acupuncture therapy in patients with gouty arthritis: systematic review and meta-analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 9451670.
- [31] 刘湘玲, 韩德军, 杨锡燕. 针灸治疗急性痛风性关节炎的选穴特点探析 [J]. *针刺研究*, 2017, 42(6): 557-561.
- [32] Baeumler PI, Fleckenstein J, Benedikt F, et al. Acupuncture-induced changes of pressure pain threshold are mediated by segmental inhibition-a randomized controlled trial [J]. *Pain*, 2015, 156(11): 2245-2255.

[收稿日期] 2020-12-22

祖珍玉, 罗敏, 申东翔, 等. 四种新西兰大白兔宫腔粘连模型的建立与评价及其对子宫内膜容受性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 30-38.

Zu ZY, Luo M, Shen DX, et al. Establishment and evaluation of four models of intrauterine adhesion and its effects on endometrial receptivity in New Zealand white rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 30-38.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 005

四种新西兰大白兔宫腔粘连模型的建立与评价及其对子宫内膜容受性的影响

祖珍玉^{1, 2}, 罗敏^{2*}, 申东翔², 张科², 李军鹏², 陈洁², 吴琳²

(1.广州中医药大学, 广州 510000; 2.中国人民解放军南部战区总医院, 广州 510000)

【摘要】 目的 探讨建立稳定有效且符合临床病理特征的宫腔粘连 (intrauterine adhesion, IUA) 实验动物模型及四种不同造模方法对子宫内膜容受性的影响。**方法** 将雌性普通级新西兰大白兔随机分为 5 组, 按照损伤方式的不同将其分为假手术组、机械损伤组、化学损伤组、热损伤组和机械损伤合并感染组, 在术后 4、7、14 和 28 d 收集兔双侧子宫组织, 观察两侧子宫内膜病理改变, 使用苏木精-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色和 Masson 染色分析两侧子宫内膜的厚度、腺体数目和纤维化面积比率, 以评估粘连的严重程度; 并通过生殖功能实验检测其妊娠率和子宫胚胎着床数目等生育功能方面的差异。**结果** 病理组织学观察显示, 造模后 7 和 14 d, 化学损伤组、机械感染双损伤组和热损伤组相比假手术组, 其子宫内膜厚度和腺体数目均有下降 ($P<0.05$), 子宫内膜纤维化面积比增高 ($P<0.05$), 而机械损伤组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。造模后 14 d, 相比假手术组, 化学损伤组妊娠率和子宫胚胎着床数目下降 ($P<0.05$), 热损伤组兔子子宫胚胎着床数目下降更加明显 ($P<0.001$)。造模后 28 d, 除热损伤组外其余三组基本恢复。**结论** 总体而言, 化学损伤造模法其雌兔子宫病理组织学变化与临床人类中重度 IUA 特征更为接近, 可以作为一种有效的模拟人类中重度 IUA 模型的方法, 进一步为深入研究 IUA 的发病机制及治疗提供基础。

【关键词】 宫腔粘连; 子宫内膜容受性; 纤维化; 新西兰大白兔

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0030-09

Establishment and evaluation of four models of intrauterine adhesion and its effects on endometrial receptivity in New Zealand white rabbits

ZU Zhenyu^{1,2}, LUO Min^{2*}, SHEN Dongxiang², ZHANG Ke², LI Junpeng², CHEN Jie², WU Lin²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China.

2. General Hospital of the PLA Southern Theater Command, Guangzhou 510000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of four different modeling method on endometrial receptivity, and establish a stable and effective experimental animal model of intrauterine adhesion (IUA) with clinicopathological characteristics. **Methods** New Zealand white rabbits were randomly divided into 5 groups, according to different method of damage: chemical, infection, mechanical, thermal, and sham-operated (control) groups. Rabbit bilateral uterine tissue was collected 4, 7, 14 and 28 d after treatment, and pathological changes were examined on both sides of the

【基金项目】 全军实验动物专项课题 (SYDW[2017]06); 全军计划生育专项课题 (18JS006)。

【作者简介】 祖珍玉 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 宫腔粘连及宫腔粘连引起的不孕不育的诊治。Email: 1356550189@qq.com

【通信作者】 罗敏 (1970—), 女, 主任医师, 博士, 研究方向: 宫腔粘连及宫腔粘连引起的不孕不育的诊治。Email: shendx1970@ 163.com

endometrium, using hematoxylin-eosin and Masson staining analysis. The thickness and number of endometrial glands and fibrosis area ratios were determined to evaluate the severity of adhesions. Pregnancy rates and the number of embryo implantations were used to examine reproductive function. **Results** Histopathological observations showed that both endometrial thickness and the number of glands decreased in the chemical-injured and heat-injured groups compared with the control group 7 and 14 d after treatment ($P<0.05$), whereas the endometrial fibrosis area ratio was increased ($P<0.05$). There were no significant differences between the mechanical damage and control groups. At 14 d after modeling, the pregnancy rate and number of uterine embryo implantations decreased in the chemical compared with the control group ($P<0.05$), and the number of rabbit embryo implantations was significantly reduced ($P<0.001$) in the heat-injured compared with control group. After 28 d of modeling, the chemical, infection and mechanical groups had basically recovered, but not the heat damage group. **Conclusions** In general, the histopathological changes observed in rabbit uteri after chemical injury modeling were more similar to the characteristics of moderate and severe IUA in humans, indicating this approach may be used as an effective model to investigate moderate and severe human IUA, and provide a basis for future in-depth study of the pathogenesis and treatment of IUA.

【**Keywords**】 intrauterine adhesion; endometrial receptivity; fibrosis; New Zealand white rabbit

宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 主要由外伤或手术引起的子宫内膜损伤, 导致宫腔部分或完全闭塞, 并伴有进行性纤维化严重的宫腔粘连, 可能导致不孕、反复流产、腹痛和其他不良妊娠结局^[1-3]。产后刮宫术最容易导致 IUA 的发生, 临床 90% 的 IUA 与其相关^[4]。宫腔粘连的形成涉及一系列复杂的机制。在激素刺激下, 正常子宫内膜在整个生殖周期中都表现出从基底层再生功能层的能力^[5]。一旦子宫内膜受损而无法修复, 子宫腔内形成纤维粘连, 粘连性结缔组织缺乏血液循环, 形成动脉纤维化伴血管闭塞性损伤, 导致局部缺氧坏死, 从而影响着床和妊娠^[6-9]。此外, 细胞外基质的内稳态被破坏将会产生异常的炎症反应, 也会降低子宫内膜容受性^[10-12]。IUA 治疗的主要目的是重建宫腔并恢复子宫内膜功能, 然而对于基底层严重受损和功能性子官内膜丧失的中重度 IUA, 由于当前研究缺乏高效稳定且符合临床病理特征的 IUA 动物模型, 子宫内膜再生仍然是一个巨大的挑战。

目前 IUA 建模方法包括各种自制刮匙和手术刀造成的机械损伤、电刀和双向电极造成的电烧伤、酒精造成的化学损伤和细菌脂多糖造成的感染损伤^[13-14]。这些造模方法的损伤部位不同, 损伤程度不一, 造模后的效果评价也无固定的标准。另外, 这些模型的建立涉及子宫外浆膜层和肌层的穿透, 可能会导致子宫全层损伤, 这与典型临床因素引起的 IUA 病理特征不同。在本研究中我们采用乙醇灌注、100℃ 沸水、机械损伤和机械损伤合并感染 (宫腔留置 LPS 棉线) 的方法建立新西兰大白兔 IUA 模型, 并从形态学和病理组织学方面对模型的有效性和行为表征进行了优化比较和评价, 同时检

测造模后其对子宫内膜容受性和生育力的影响, 旨在建立稳定高效符合临床 IUA 病理特征的 IUA 动物模型从而为探讨 IUA 的损伤修复及防治机制提供初步依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级健康成年未孕雌性新西兰大白兔 125 只, 普通级健康成年雄性新西兰大白兔 8 只, 兔龄 6~8 周, 体重 2.4~2.6 kg, 购自广东省医学实验动物中心 [SCXK (粤) 2019-0023]。分笼饲养, 使用标准颗粒饲料, 适应性喂养 7 d 后进行后续实验, 其间自由摄食和饮水, 室温 (22 ± 2)℃, 湿度 45%~65%, 通风良好, 定期进行 14 h:10 h 的光暗循环。兔子宫组织取材和相关实验于中国人民解放军南部战区总医院实验动物中心实验室内进行 [SYXK (粤) 2019-0100]。动物实验过程中, 严格按照 3R 原则给予人道主义关怀, 通过中国人民解放军南部战区总医院动物实验伦理审查 (2019102502)。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (LPS, Sigma, 美国); Masson 染色试剂盒 (Sigma, 美国); BX-51 显微镜系统及数字图像采集系统 (Olympus, 日本); 计算机图像分析系统 Image-ProPlus6.0 (SilverSpring, 美国) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 脂多糖手术缝线制备

称取 0.6 mg 细菌脂多糖溶于 100 mL 无菌生理盐水中, 配成浓度为 6 mg/L 的脂多糖溶液, 将其置于 4℃ 冰箱中保存, 将 0 号医用无菌手术缝线 (10 cm) 在使用前 1 d 浸泡在 LPS 生理盐水中 24 h。

1.3.2 实验分组及模型的制备

选用 100 只健康雌性普通级新西兰大白兔并将其随机分为假手术组(I 组)、机械损伤组(II 组)、热损伤组(III 组)、化学损伤组(IV 组)和机械感染双损伤组(V 组),每组 20 只;余 25 只雌兔随机分为假手术组(I 组)、机械损伤组(II 组)、热损伤组(III 组)、化学损伤组(IV 组)和机械感染双损伤组(V 组),每组 5 只。后续实验均在其发情期进行。成年雌性新西兰白兔耳缘静脉注射 20%乌拉坦,剂量为 5 mL/kg,所有手术都由同一个研究者在无菌条件下完成。为了最大限度地减少偏差,子宫角被随机分配进行处理。具体操作步骤如下:麻醉后置于仰卧位,下腹刮毛,用 1%碘酊消毒。确认充分麻醉后,在下腹正中纵切口 2 cm 进入腹腔,找到双侧子宫,根据分组给与相应处理后缝合子宫切口和腹部切口。假手术组:打开腹腔后不对子宫作任何处理,关腹。机械损伤组:首先在一侧子宫靠近卵巢端中下 1/3 处行 0.5 cm 纵切口手术,然后用 8 mm 的子宫内膜刮匙器从 4 个不同方向(前、后、左、右)搔刮子宫中上 2/3 处的子宫内膜,当宫腔内壁变得粗糙有颗粒感时,停止刮宫;机械损伤合并感染(双重损伤)双损伤 IUA 模型按 Xiao 等^[15]研究方法,机械损伤后兔子宫腔留置 LPS 棉线 2 d;热损伤组 IUA 模型按 Xu 等^[16]研究方法,采用 100℃热水损伤一侧宫腔 15 s 后,用生理盐水冲洗腹膜腔和宫腔;化学损伤组:将 95%的乙醇轻轻注入一侧子宫,损伤 30 s 后用生理盐水冲洗腹膜腔和宫腔;各造模组对侧子宫均不做任何处理。造模术后,给予每组每只新西兰白兔每日十万 IU 青霉素,连续腹腔注射 3 d。

1.3.3 观察指标

(1)病理组织大体形态观察及切片染色

各组新西兰大白兔在造模 4、7、14 和 28 d 后,开腹取出子宫并分离,首先观察其大体形态,是否有粗糙、肿胀、变窄、弹性丧失和充血等形态学改变。然后将分离出的子宫置于 4%多聚甲醛浸泡固定后标准石蜡包埋,切成 5 μ m 切片以备后续染色。

(2)子宫内膜腺体数量检测

兔子组织样本的石蜡切片行 HE 染色。将染色的切片在室温下风干并用中性树脂固定,用显微镜观察子宫形态,计算腺体数量,并在每张切片上随机选择至少 5 个高倍镜视野图像,计算平均值。

(3)子宫内膜纤维化程度检测

兔子组织样本的石蜡切片行 Masson 染色。

使用 Masson 染色试剂盒对石蜡包埋的载玻片进行染色。然后用显微镜观察纤维化,应用图像处理软件 Image-ProPlus 6.0 计算每个视野中子宫内膜间质纤维化(蓝色胶原纤维)面积与每个视野子宫内膜间质及腺体总面积的比值,并在每张切片上随机选择至少 5 个高倍镜视野图像,计算平均值。

(4)子宫内膜厚度检测

兔子组织样本的石蜡切片行 HE 染色和 Masson 染色。采用图像处理软件 Image-ProPlus 6.0 测量子宫内膜厚度,计算平均值。

(5)生殖功能检测

评价经过四种造模方法损伤过的兔子宫的生殖功能,通过检测各造模组在妊娠率和增加胚胎着床数方面的变化来评估受损雌兔子宫在接受受精卵和为发育中的胎儿提供足够的营养,并支持胚胎正常发育的功能。造模后第 14 天,将假手术组、机械损伤组、机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组每组各 5 只雌兔与雄兔合笼交配,在妊娠中期(7~9 d)处死雌兔,检查并记录各组子宫的妊娠率及胚胎着床数目。

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。所有的测量数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用双尾非配对和 *t* 检验进行配对比较,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Dunnett 检验。差异有统计学意义($P<0.05$),数据条形图采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行作图。

2 结果

2.1 子宫组织学损伤情况

观察各组子宫腔狭窄及出血水肿情况。假手术组兔子宫腔形态规则,子宫内膜结构完整。损伤 4 d 后,化学损伤和热损伤组兔子宫腔形态规则,间质出现出血、水肿,其余两组宫腔有未见明显肿胀或充血;损伤后 7 d,四组兔子宫壁均有粗糙和有粘连带出现,化学损伤和热损伤组兔部分宫腔缩小变窄;损伤后 14 d 后,机械损伤组兔子宫腔基本恢复正常形态,未见出血水肿,机械感染双损伤组兔子宫壁粗糙比较明显,化学损伤组部分宫腔水样扩张,宫腔形态改变;损伤 28 d 后,除热损伤组外,其余 3 组兔子宫外观基本恢复,子宫壁光滑无粗糙感,出血水肿基本消失,热损伤组兔部分子宫内膜组织出现坏死脱落(图 1)。

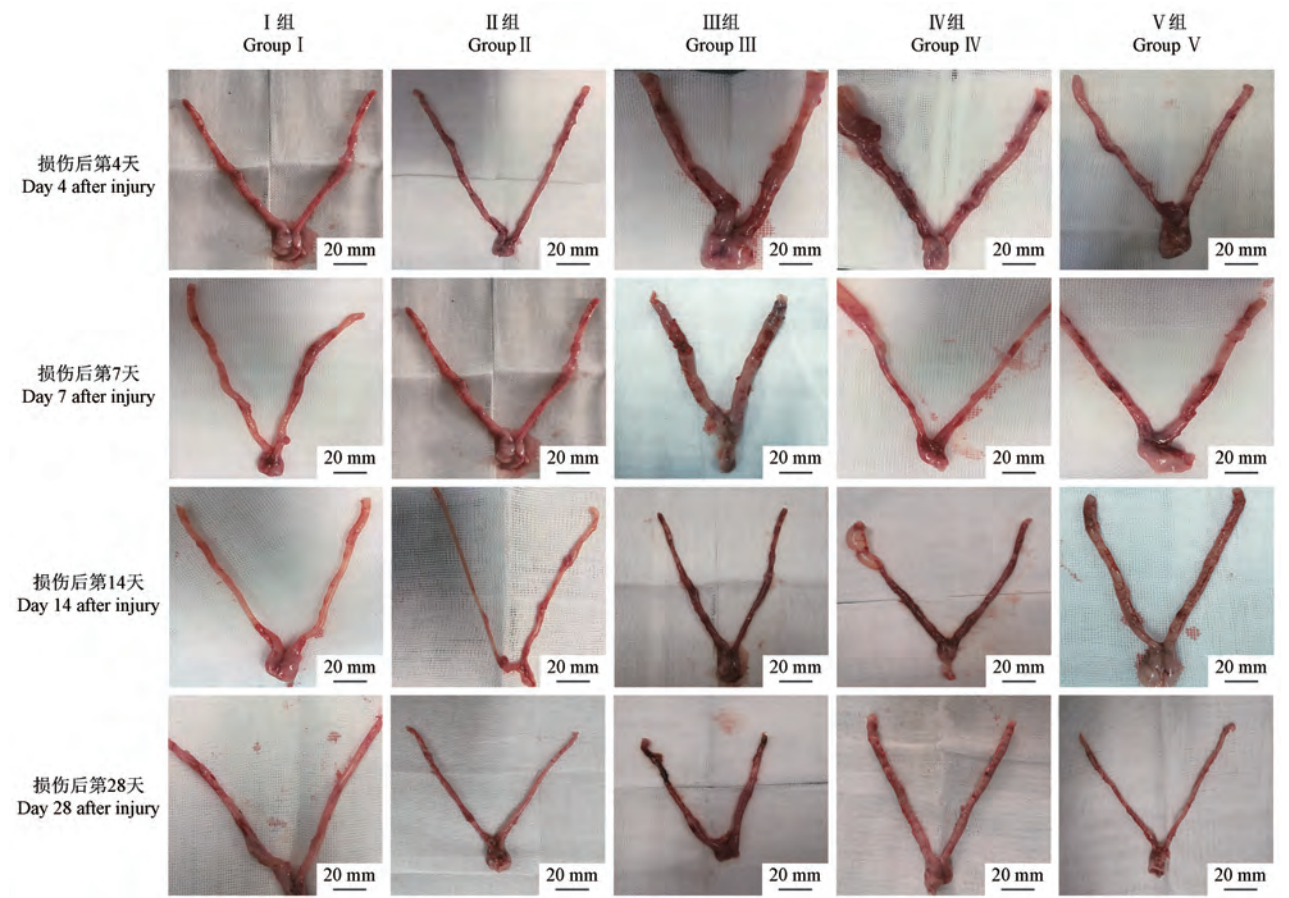
2.2 HE 染色评价损伤后子宫内膜腺体数目变化

HE 染色后,对照组子宫的浆膜、肌肉、子宫内膜和上皮层均正常,组织结构连续完整。上皮细胞多为单层柱状,子宫内膜层富含管状腺体,间质细胞均匀分布。四组模型子宫内膜间质结构疏松,粘膜下纤维化,可见散在的柱状细胞,腺体较少,部分间质有大量炎性细胞浸润,并伴有不同程度的充血和出血。机械损伤组和机械感染双损伤组子宫内膜功能层均有少量腺体再生,化学损伤组和热损伤组均未观察到这种现象(图 2)。在造模后 4、7、14 和 28 d 测定各组模型的子宫内膜腺体数目。术后 4、7 和 14 d,机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组均未观察到这种现象(图 2)。在造模后 4、7、14 和 28 d 测定各组模型的子宫内膜腺体数目。术后 4、7 和 14 d,机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组相对于假手术组的子宫内膜腺体数目逐渐减少,均具有显著性差异($P<0.05$);机械感染双损伤组、化学损伤组造模 28 d,相较于 14 d 的腺体数目增多($P<0.01$),而热损伤组子宫内膜腺体数目仍继续下降,均具有显著性差异($P<0.001$);与假手术组

相比,机械损伤组的腺体数目略有减少,无显著差异($P>0.05$)(图 3)。

2.3 Masson 染色评价损伤后纤维化增生的变化

正常子宫的上皮、血管、腺体和肌肉染成红色,而子宫内膜和子宫浆膜染成浅蓝色,表明胶原纤维水平较低。四组模型子宫内深蓝色染色面积均有扩大,表明胶原纤维增生。有部分子宫内碎片散落宫腔内,间质细胞排列紊乱,胶原纤维分布不均(图 4)。在造模后 4、7、14 和 28 d 测定各组模型的纤维化面积比率。术后 14 d,机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组子宫内膜纤维化面积比逐渐增高,均具有显著性差异($P<0.05$);机械感染双损伤组和化学损伤组在造模后 28 d,纤维化面积比率相较于 14 d 有所降低($P<0.01$),而热损伤组纤维化面积比仍继续增高,差异具有显著性($P<0.001$);与假手术组相比,机械损伤组的纤维化面积比略有增高,无显著差异($P>0.05$)(图 5)。



注:分离兔双侧子宫并观察其形态学变化。

图 1 各组造模后子宫大体形态学变化

Note. Bilateral uteruses were extracted and morphological changes were observed.

Figure 1 Gross morphological changes of the uterus after modeling in each group

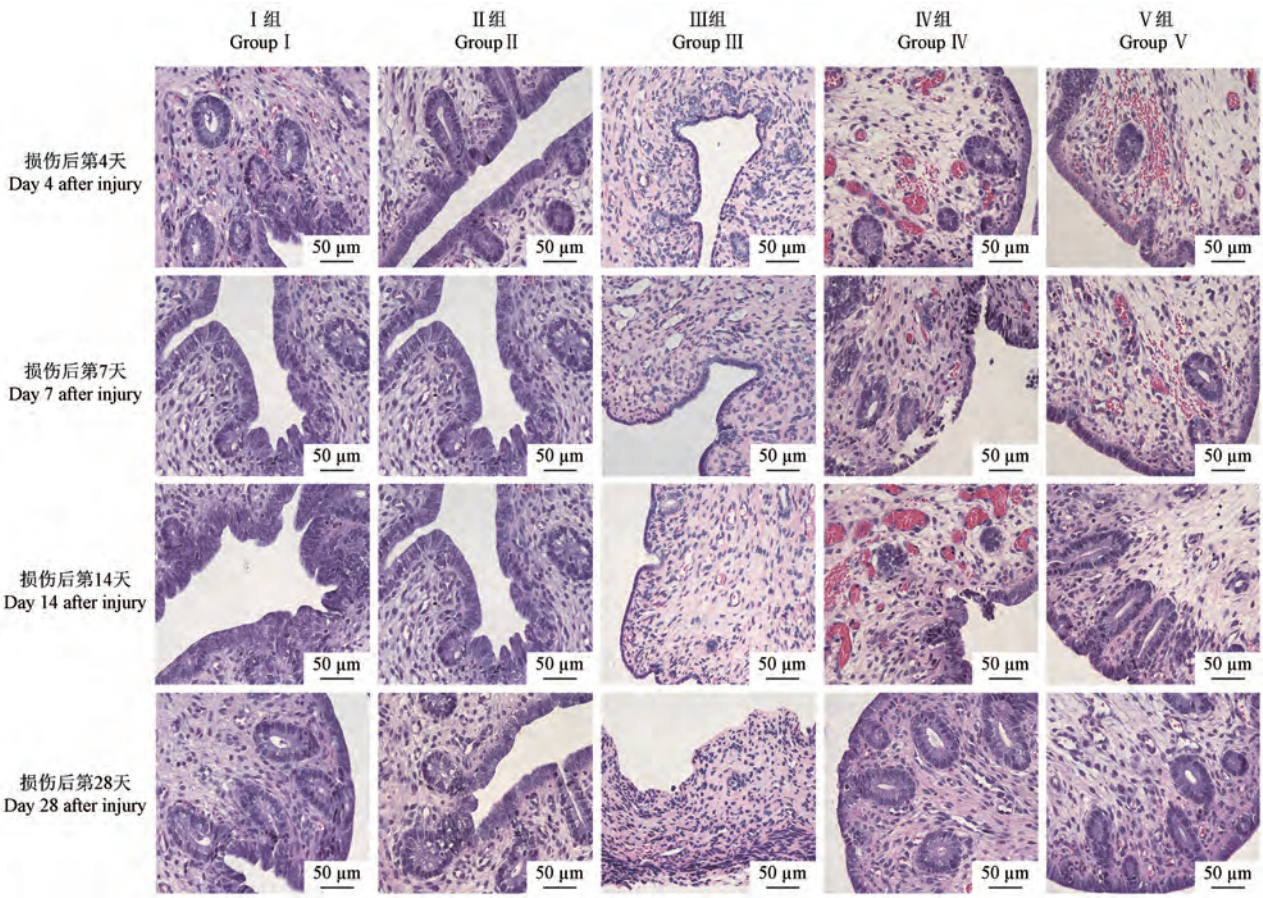
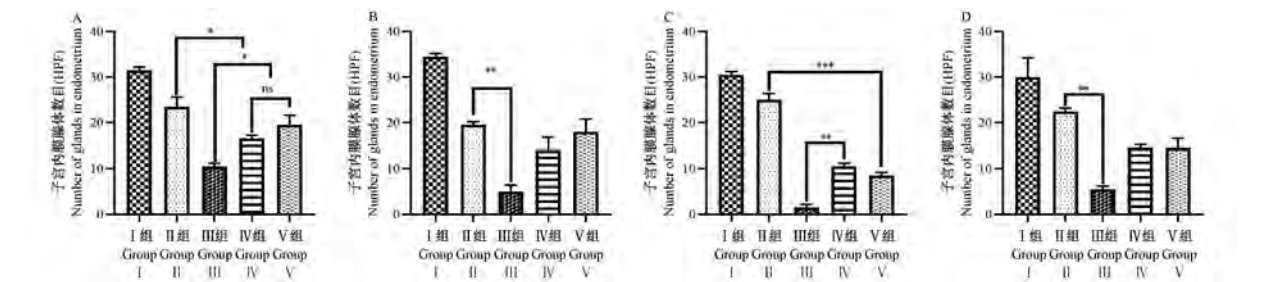


图 2 各造模组兔子子宫内膜腺体情况

Figure 2 Intrauterine gland conditions of rabbits in each model group



注:A、B、C、D:造模 4、7、14 和 28 d 兔子子宫内膜腺体数目的变化。与 II 组相比, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

图 3 各组造模后不同时间子宫内腺体数目分析比较

Note. A, B, C and D, Changes in the number of intrauterine glands of rabbits in each group after modeling 4, 7, 14 and 28 d. Compared with group II, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 3 Number of endometrial glands in each group at different time after modeling was analyzed and compared

2.4 HE 染色和 Masson 染色评价损伤后子宫内膜厚度变化

正常子宫内膜表面呈波浪形,子宫黏膜下层和基底层呈圆形或椭圆形。四组损伤模型兔子宫宫腔形态不规则,有扩张或萎缩,部分浅肌层缺失,腺体稀疏,部分损伤部位有脱落的内膜碎片(图 6)。在造模后 4、7、14 和 28 d 测定各组模型的子宫内膜

厚度。术后 14 d,机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组子宫内膜厚度均有变薄($P<0.05$);化学损伤组在造模后 28 d,内膜厚度相较于 14 d 有增厚($P<0.01$),而热损伤组内膜厚度仍继续下降,具有显著性差异($P<0.001$);与假手术组相比,机械感染双损伤组和机械损伤组的内膜厚度略有下降,无显著差异($P>0.05$)(图 7)。

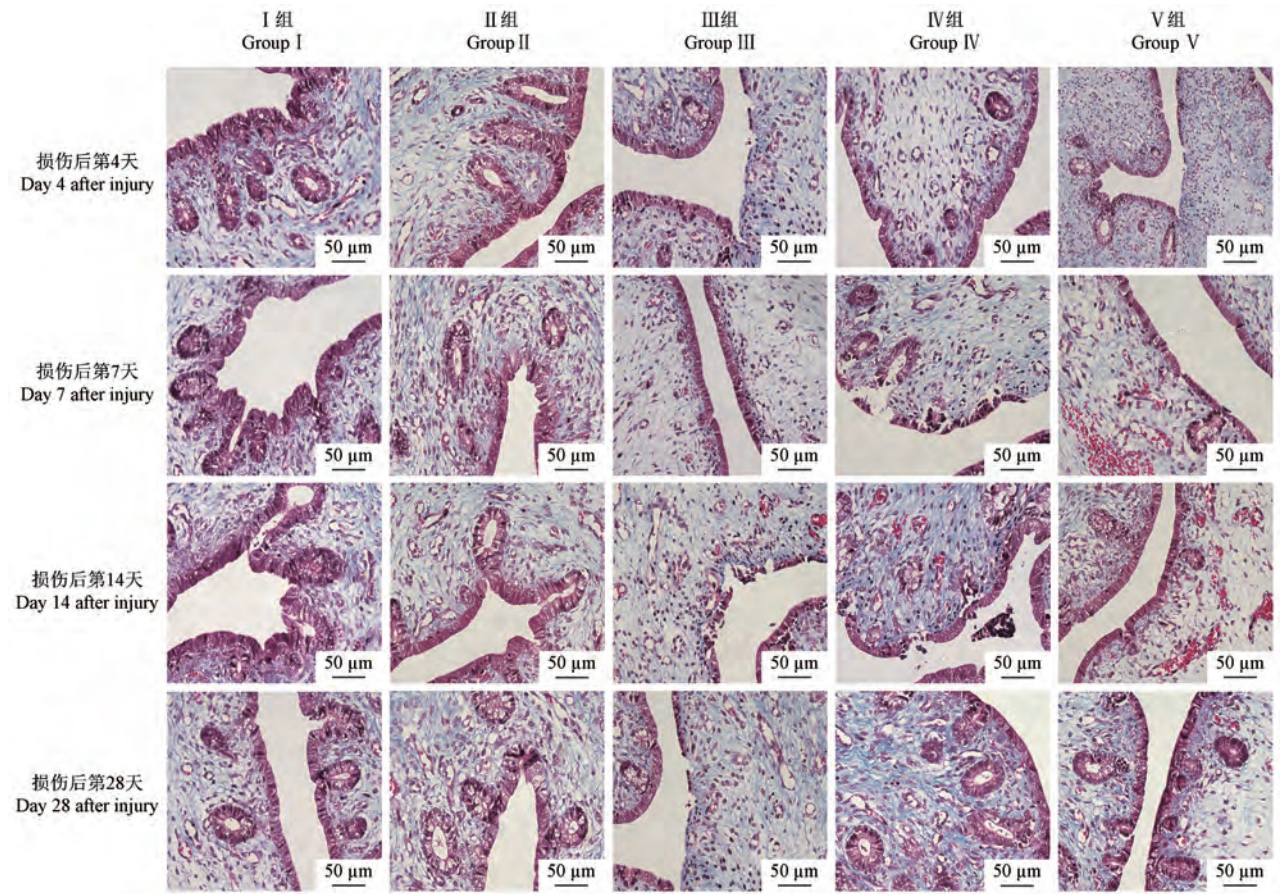
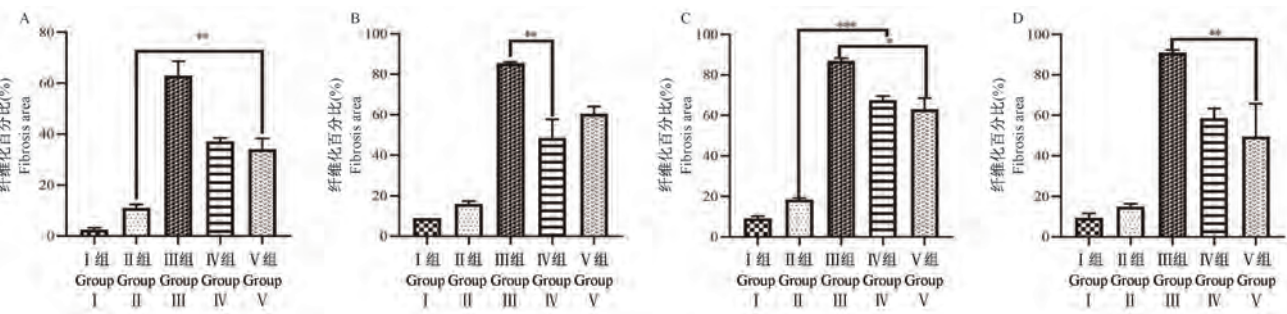


图 4 各造模组兔子宫内膜纤维化情况
Figure 4 Intrauterine membrane fibrosis of rabbits in each model group



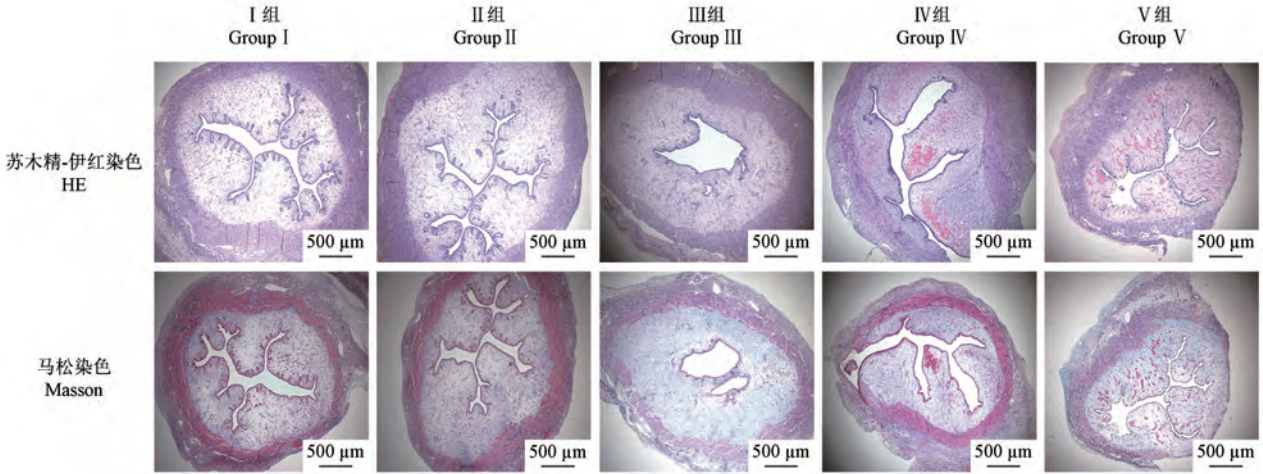
注:A、B、C、D:造模后4、7、14和28 d兔子宫内纤维化面积比的变化。与II组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。
图 5 各组造模后不同时间子宫内纤维化面积比分析比较
Note. A, B, C and D, Changes of area ratio of intrauterine fibrosis in rabbits in each group after modeling 4, 7, 14 and 28 d. Compared with group II, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Analysis and comparison of area ratio of endometrial fibrosis in different time after modeling in each group

2.5 生殖功能检测研究

评价假手术组、机械损伤组、机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组五组模型雌兔子宫内膜的生殖功能变化(图 8)。根据子宫大体形态学观察及 HE 和 Masson 染色实验结果,发现造模 14 d 后兔子宫内膜损伤程度较接近于中重度 IUA 病理特征,

为进一步验证,在造模 14 d 后,将雌兔、雄兔进行合笼交配,并计算妊娠率和子宫胚胎着床数目。结果显示与假手术组相比,化学损伤组和热损伤组兔子宫胚胎着床数目减少,妊娠率下降,均具有显著性差异($P < 0.05$);而机械感染双损伤组和机械损伤组兔子宫的胚胎着床数目和妊娠率相比于假手术组

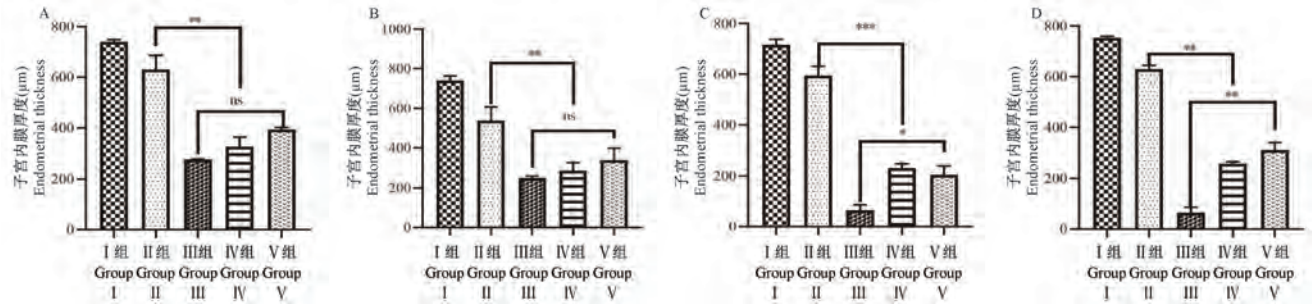


注:各组兔子子宫组织在造模后 14 d 行 HE 染色和 Masson 染色。

图 6 各造模组兔子子宫内膜厚度情况

Note. HE staining and Masson staining were performed on the rabbit uterus tissue of each group after modeling 14 d.

Figure 6 Intrauterine film thickness of rabbits in each model group

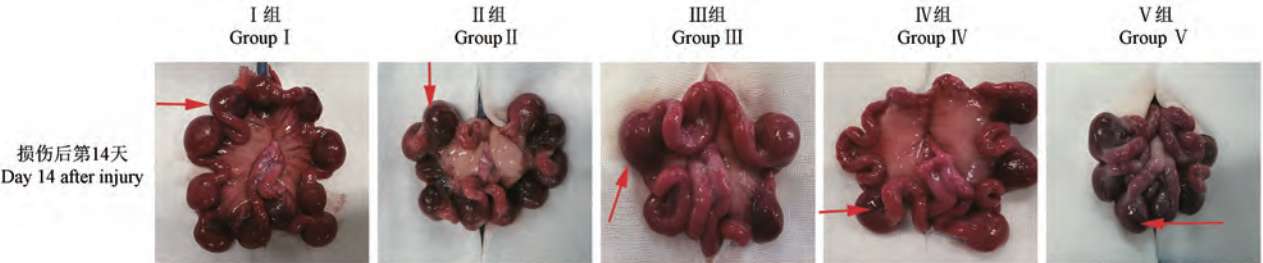


注:A、B、C、D:造模 4、7、14 和 28 d 后子宫内膜厚度的变化。与 II 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 7 各组造模后不同时间子宫内膜厚度分析比较

Note. A, B, C and D, Changes of intrauterine membrane thickness of rabbits after modeling 4, 7, 14 and 28 d. Compared with group II, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.01$.

Figure 7 Analysis and comparison of endometrial thickness of each group at different time after modeling



注:在造模后 14 d 进行生殖功能实验,统计分析雌兔子子宫胚胎着床数目及妊娠率(红色箭头标记区域为子宫植入胚胎)。

图 8 各组造模后 14 d 的兔子子宫胚胎植入情况

Note. Reproductive function experiment was carried out 14 days after modeling, the number of implantation and pregnancy rate of female rabbits were statistically analyzed (the area marked by red arrow is implanted embryo in uterus).

Figure 8 Implantation of rabbit uterine embryos with different modeling methods

略有下降,无显著差异($P>0.05$);热损伤组子宫胚胎植入数目和妊娠率相较于假手术组显著下降($P<0.01$)(图9)。

3 讨论

近年来,不孕不育的发病率逐年增高,在临床中因子宫内膜损伤引起的宫腔纤维化和粘连是引发不孕不育的主要原因,子宫内膜再生已成为妇科和生殖医学亟待解决的重要难题。当前很多研究在不同的子宫损伤模型中通过使用干细胞和药物治疗对其治疗效果进行了评估,然而由于缺乏标准化的模型导致疗效的客观评价和定量分析模式很难统一,因此建立稳定有效的子宫损伤 IUA 动物模型非常必要且迫切。

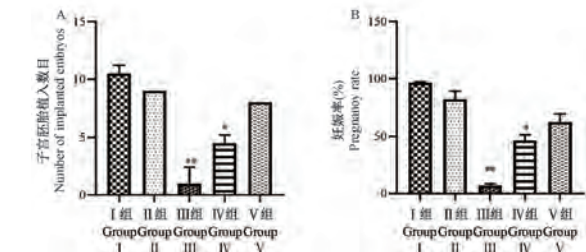
许多研究人员尝试使用各种方法构建 IUA 动物模型,有通过在宫腔内放置铜线的方法,也有通过细菌性脂多糖棉线宫腔感染的方法模拟建立子宫内膜损伤模型,但尚未找到最佳高效的方案建立符合临床 IUA 病理特征的动物模型^[17]。本研究通过优化比较新西兰大白兔不同宫腔粘连模型的相关病理指征,并从生殖功能方面评价其对子宫内膜容受性的影响,进一步验证其有效性和安全性,以探讨更符合人类 IUA 临床病理特征的稳定动物模型,为后续研究其发病机制及治疗策略提供参考。

IUA 是由于子宫内膜损伤导致子宫内膜变薄、纤维化和粘连形成而引起的。子宫内膜厚度是判断 IUA 最直观的方法^[18]。腺体细胞和间充质细胞在子宫内膜增殖期起着重要作用。正常子宫内膜受损或周期性脱落后,开始一系列自我修复过程,

这涉及子宫内膜干细胞的分化及纤维化因子和抗纤维化因子的平衡机制^[15]。因此子宫内膜厚度、腺体数目及纤维化比率是本研究主要观察的指标。另外,本研究中所用的新西兰大白兔子宫与一般家畜不同,两个子宫是完全独立的,无子宫角和子宫体之分,左右各一个子宫,各自有一个子宫颈,分别开口于阴道基部,两子宫颈间有间膜固定^[16]。由于是两个完全独立的子宫,而本研究目的是比较和评价经四种不同损伤方法处理的新西兰大白兔宫腔粘连 IUA 模型,并设置假手术组进行对照,所以在造模时选择雌兔的随机一侧子宫进行不同干预处理,对侧子宫仅作自身对照并未检测相关数据。

本研究从形态学、病理组织学方面对化学损伤、热损伤、机械损伤和机械损伤合并感染(双损伤)四种损伤方法诱导的兔 IUA 模型进行了比较和评价,结果显示,在术后 4、7 d,化学损伤组和热损伤组兔子子宫宫腔出现轻微出血水肿,机械损伤和感染双损伤组病理组织学形态方面基本无变化,术后 14 d,与假手术组对比,机械感染双损伤组、化学损伤组和热损伤组子宫内膜厚度均变薄($P<0.05$),化学损伤组和热损伤组纤维化率增高、腺体数目减少($P<0.05$),机械损伤和感染双损伤腺体数目及纤维化面积比变化不明显。为了进一步探讨四种造模方法对子宫内膜容受性的影响,本研究在造模后 14 d 进行了生殖功能实验研究,结果表明相对于假手术组,化学损伤组和热损伤组妊娠率和子宫胚胎着床数目均有降低($P<0.05$),其中热损伤组妊娠率和子宫胚胎着床数目急剧下降($P<0.001$)。机械损伤组和机械感染双损伤妊娠率及子宫胚胎着床数目与假手术组相比基本无差异,这说明机械损伤及感染双损伤程度较轻,并未严重损伤子宫内膜进而导致妊娠率及子宫胚胎着床数目的显著下降;而化学损伤和热损伤这两种造模方法都在不同程度上损伤了子宫内膜的生育功能。

LPS 经常用于肺炎、脓毒症等疾病的动物实验模型的构建,也被用于构建子宫内膜炎动物模型^[19]。本研究初步推测损伤和炎症是 IUA 最常见的病因,因此机械损伤和机械感染双损伤模型应该还是比较符合临床病理特征,然而在实验中却并未达到理想稳定的损伤效果。Kim 等^[19]对此有两种解释,首先是机械损伤稳定性低,实验操作人员选择刮宫的力度、时间和角度的不一致都可能会导致损伤造成的效果不同,通过这种方法建立的模型受到



注:A:子宫胚胎着床数目;B:妊娠率。与 II 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图9 各组造模 7 d 后兔子妊娠率及胚胎着床数目分析比较

Note. A, Number of embryo implantation. B, Pregnancy rate. Compared with group II, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 9 Analysis and comparison of pregnancy rate and number of embryo implantation in each group after modeling

操作者经验、手术器械和实验条件的限制。其次是机械损伤和 LPS 引起的炎症反应会刺激子宫内膜的自我修复机制,由于自身修复作用使模型的准确性受到一定的影响。

热损伤法引起的温度升高对子宫内膜的功能层和基底层均造成严重损伤,导致子宫内膜细胞蛋白的凝固,继而坏死、脱落和纤维化,最终导致子宫内膜的缺失,并可能损伤子宫内膜肌层,导致出血和周围坏死。这与 IUA 临床病理特征不符,因此不推荐推广应用。

化学损伤法中所有乙醇的浓度、用量和灌注的起止时间是固定的,这保证了模型的稳定性和可重复性。此外,化学损伤建立的 IUA 模型与在临床 IUA 中观察到的病理特征相似,包括子宫内膜变薄,腺体数量减少、纤维化。后续的生殖功能实验结果也显示其损伤子宫内膜的容受性而导致妊娠率和胚胎着床数目下降。虽然化学损伤诱导的 IUA 模型在临床上较少见,但从其与临床 IUA 病理特征的相似性、实验操作可控性、模型稳定性及可重复性考虑,可以作为一种稳定高效的 IUA 动物模型。

综上所述,化学损伤造模法对子宫内膜厚度、腺体数量和纤维化程度及妊娠率、子宫胚胎着床数均有一定的影响,同时可以保留子宫全层结构,这是判断中重度 IUA 模型成功与否的最基本的表型指标,是一种符合 IUA 临床病理特征的动物模型,可以为深入研究 IUA 的发病及治疗机制提供重要的模型参考。

参考文献:

[1] Chen GB, Liu LM, Sun J, et al. Foxf 2 and Smad 6 co-regulation of collagen 5A2 transcription is involved in the pathogenesis of intrauterine adhesion [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2802–2818.

[2] Li B, Zhang QW, Sun JY, et al. Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 2–14.

[3] 张玲玉, 刘颖蕾, 乔海风, 等. GnRH-a 反加雌激素对大鼠子宫内膜异位症模型的疗效及复发的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(11): 67–73.

[4] Feng Q, Gao BS, Zhao XP, et al. Establishment of an animal model of intrauterine adhesions after surgical abortion and curettage in pregnant rats [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(4): 1–8.

[5] Hou X, Liu Y, Streuli I, et al. Endometrial regeneration in asherman's syndrome: clinical and translational evidence of stem cell therapies [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(6): 454

–459.

[6] 丁桂清, 魏华芳, 王立群, 等. 复方阿胶浆对小鼠子宫内膜作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(9): 27–32.

[7] Liu YH, Cai J, Luo XQ, et al. Collagen scaffold with human umbilical cord mesenchymal stem cells remarkably improves intrauterine adhesions in a rat model [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2020, 5(3): 267–276.

[8] Wang LJ, Yu CH, Chang TL, et al. In situ repair abilities of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and autocrosslinked hyaluronic acid gel complex in rhesus monkeys with intrauterine adhesion [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(21): 1–11.

[9] Guo LP, Chen LM, Chen F, et al. Smad signaling coincides with epithelial-mesenchymal transition in a rat model of intrauterine adhesion [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4726–4737.

[10] Kumar V, Soni UK, Maurya VK, et al. Integrin beta8 (ITGB8) activates VAV-RAC1 signaling via FAK in the acquisition of endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1885–1992.

[11] Li BN, Zhang QW, Sun JY, et al. Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 1–12.

[12] Zhao XP, Liu YZ, Zhang AQ, et al. Logistic regression analyses of factors affecting fertility of intrauterine adhesions patients [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(4): 1–10.

[13] Zhao SD, Qi WB, Zheng JH, et al. Exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells restore functional endometrium in a rat model of intrauterine adhesions [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(6): 1266–1275.

[14] Zhang SS, Xu XX, Xiang WW, et al. Using 17 β -estradiol heparin-ploxamer thermosensitive hydrogel to enhance the endometrial regeneration and functional recovery of intrauterine adhesions in a rat model [J]. *FASEB J*, 2020, 34(1): 446–457.

[15] Xiao L, Song Y, Huang W, et al. Expression of SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute uterine injury and intrauterine adhesions [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1): 2–9.

[16] Xu XX, Cao LB, Wang Z, et al. Creation of a rabbit model for intrauterine adhesions using electrothermal injury [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19(5): 383–389.

[17] Chen LM, Guo LP, Chen F, et al. Transplantation of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MbMSCs) promotes the regeneration of mechanical injured endometrium [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 4941–4954.

[18] Hooker A, Fraenk D, Brölmann H, et al. Prevalence of intrauterine adhesions after termination of pregnancy: a systematic review [J]. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, 2016, 21(4): 329–335.

[19] Kim YY, Choi BB, Lim JW, et al. Efficient production of murine uterine damage model [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 16(2): 119–129.

魏杰, 王洪, 刘甦苏, 等. hACE2-KI/NIFDC 小鼠主要生物学特性指标测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 39–42.
Wei J, Wang H, Liu SS, et al. Determination of the main biological characteristic values in hACE2-KI/NIFDC mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 39–42.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 006

hACE2-KI/NIFDC 小鼠主要生物学特性指标测定

魏 杰[#], 王 洪[#], 刘甦苏, 光姣娜, 周佳琪, 冯育芳, 秦 骁, 王莎莎,
范昌发, 付 瑞, 岳秉飞^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 目的 测定自培育 hACE2-KI/NIFDC 转基因小鼠的生物学特性指标。方法 分别测定 4 周龄和 8 周龄各 10 只雌性 hACE2-KI/NIFDC 小鼠的 11 项脏器系数、22 项血液生理指标和 13 项血液生化指标, 利用统计学方法分析组间差异。结果 4 周龄组的 5 项脏器系数(脾、肺、胸腺、左肾、右肾, $P<0.01$) 和 3 项血液生理指标(MCV、MCH、EOS, $P<0.05$) 高于 8 周龄组, 5 项指标(MON%、ALP, $P<0.05$; 心脏脏器系数、AST、P, $P<0.01$) 低于 8 周龄组。结论 hACE2-KI/NIFDC 小鼠生物学特性指标的测定为其应用研究提供了基础数据。
【关键词】 血管紧张素转化酶 2; 转基因小鼠; 脏器系数; 血液生理; 生化指标
【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2021) 09-0039-04

Determination of the main biological characteristic values in hACE2-KI/NIFDC mice

WEI Jie[#], WANG Hong[#], LIU Susu, GUANG Jiaona, ZHOU Jiaqi, FENG Yufang, QIN Xiao,
WANG Shasha, FAN Changfa, FU Rui, YUE Bingfei^{*}
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 **Objective** To study the biological characteristic values of human angiotensin-converting enzyme II (hACE2)-KI/NIFDC mice. **Methods** Ten hACE2-KI/NIFDC female mice at 4 and 8 weeks of age were tested for 11 organ coefficients, 22 physiological values and 13 biochemical values. Statistical method were used for data analysis. **Results** The 4-week-old mice had higher values than the 8-week-old mice in five organ coefficients (spleen, lung, thymus, left kidney, right kidney, $P<0.01$) and three physiological values (mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, eosinophil granulocyte, $P<0.05$). However, in the 4-week-old mice, the other five values were below those of the 8-week-old mice (percentage of monocyte, alkaline phosphatase, $P<0.05$; heart organ coefficients, aspartate transaminase, phosphorus, $P<0.01$). **Conclusions** These findings may provide support for the application of hACE2-KI/NIFDC mice.
【Keywords】 ACE2; transgenic mice; organ coefficient; blood physiological values; biochemical values

[基金项目] 国家科技重大专项(2017ZX10304402)。
[作者简介] 魏杰(1982—), 女, 副研究员, 硕士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: jane3040320@163.com
王洪(1977—), 女, 研究员, 硕士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: littstar@163.com
[#]共同第一作者
[通信作者] 岳秉飞(1960—), 男, 研究员, 博士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: y6784@126.com

血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是一种在体内有广泛分布的锌离子依赖蛋白酶。通过负性调节肾素-血管紧张素-醛固酮系统,在体内广泛参与心脑血管、呼吸系统、泌尿系统、消化系统及肿瘤等生理和病理进程^[1-7]。

2018 年本单位以 C57BL/6 为背景鼠,通过将人源化的 ACE2 基因插入小鼠 ACE2 基因中构建了 hACE2 敲入小鼠,命名为 hACE2-KI/NIFDC。该小鼠能适用于 ACE2 相关病理生理研究,并在 2019-nCoV 疾病研究、疫苗研发中发挥了重要作用^[8-10]。

目前,尚没有关于该小鼠主要生物学特性指标的报道。本研究首次通过对不同周龄 hACE2-KI/NIFDC 小鼠的脏器系数、生理生化的生物学指标的测定,为该模式小鼠提供更广泛的应用基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 周龄和 8 周龄雌性 hACE2-KI/NIFDC 小鼠各 10 只,SPF 级,体重分别为 13.5~16.9 g 以及 18.9~21.9 g,来自本单位模式动物室[SCXK(京)2017-0005],饲养于 IVC 屏障环境[SYXK(京)2017-0013],福利伦理审查由中国食品药品检定研究院福利伦理审查委员会审批(中检动(福)第(B)021 号),实验遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Sartorius CPA 423 电子天平(德国);光电 Mek7222 血细胞分析仪(日本);日立 7080 全自动生化分析仪(日本)。

生理检测试剂(稀释液 DH640,分析清洗液 DH520、DH620,溶血剂 DH910、DH680)购自上海光电医用电子仪器有限公司;生化检测试剂购自中生北控生物科技股份有限公司,包含丙氨酸氨基转移酶试剂盒(底物法)、天冬氨酸氨基转移酶试剂盒(底物法)、总蛋白试剂盒(双缩脲法)、白蛋白试剂盒(溴甲酚绿法)、碱性磷酸酶试剂盒(NPP 底物-AMP 缓冲液法)、尿素氮试剂盒(尿素酶-谷氨酸脱氢酶法)、肌酐试剂盒(氧化酶法)、葡萄糖试剂盒(己糖激酶法)、钙(邻甲酚酞络合酮法)、无机磷试剂盒(磷钼酸盐法)、总胆固醇试剂盒(CHOD-PAP 法)、总胆红素试剂盒(钒酸盐氧化法)和甘油三酯试剂盒(GPO-PAP 法)。

1.3 实验方法

小鼠禁食 12 h,先编号称体重,后眼静脉采血术

取 20 μ L 抗凝血和 0.5 mL 全血并分离血清,分别用于生化指标测定。小鼠处死后解剖脏器称重,通过电子天平对各编号小鼠的心、肝、脾、肺、左右肾、左右肾上腺、左右卵巢进行称重,并计算对应的脏器系数。22 项血液生理指标和 13 项血液生化指标分别通过血细胞分析仪和生化分析仪测定。生理指标包括:白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血小板计数(PLT)、血红蛋白浓度(HGB)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞红细胞分布宽度(RDW)、白细胞五分类计数、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)和血小板分布宽度(PDW)。生化指标包括:丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素(BUN)、肌酐(CREA)、葡萄糖(GLU)、钙(CA)、磷(P)、总胆固醇(CHO)、总胆红素(Tbili)和甘油三酯(TG)。

1.4 统计学方法

按照周龄和测定项目分类整理数据,结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并用 SPSS 软件作独立样本 *t* 检验统计分析组间差异。

2 结果

2.1 脏器系数测定结果

11 项脏器系数指标中,8 周龄组的脾、肺、胸腺、左肾、右肾占体重百分比均低于 4 周龄组($P<0.01$)、心脏占体重百分比高于 4 周龄组($P<0.01$)。肝、左肾上腺、右肾上腺、左卵巢、右卵巢占体重百分比两组间无显著性差异(表 1)。

表 1 4 周龄和 8 周龄 hACE2-KI/NIFDC 的脏器系数比较
Table 1 Organ coefficient comparison of 4-week-old and 8-week old hACE2-KI/NIFDC mice

项目 Items	4 周龄 ($n=10$) 4-week-old	8 周龄 ($n=10$) 8-week-old
心脏 Heart	0.0052 $\pm$ 0.0005 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0064 $\pm$ 0.0006
肝 Liver	0.0046 $\pm$ 0.0006	0.0045 $\pm$ 0.0006
脾 Spleen	0.0040 $\pm$ 0.0005 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.0030 $\pm$ 0.0004
肺 Lung	0.0084 $\pm$ 0.0011 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.0063 $\pm$ 0.0009
胸腺 Thymus	0.0053 $\pm$ 0.0013 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.0035 $\pm$ 0.0009
左肾 Left kidney	0.0070 $\pm$ 0.0005 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.0061 $\pm$ 0.0005
右肾 Right kidney	0.0067 $\pm$ 0.0007 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	0.0064 $\pm$ 0.0012
左肾上腺 Left adrenal	0.0002 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001
右肾上腺 Right adrenal	0.0002 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001
左卵巢 Left ovary	0.0001 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001
右卵巢 Right ovary	0.0001 $\pm$ 0.0001	0.0002 $\pm$ 0.0001

注:与 8 周龄组相比, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ 。
Note. Compared to 8-week-old group, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$.

2.2 生理指标测定结果

4 周龄在 MCV、MCH、EOS 指标上高于与 8 周龄组($P<0.05$),在 MON% 指标上低于 8 周龄组。其余 18 项生理指标无显著性差异(表 2)。

表 2 4 周龄和 8 周龄 hACE2-KI/NIFDC 血液生理指标的比较

项目 Item	4 周龄 4-week-old	8 周龄 8-week-old
白细胞计数($10^9/L$) WBC	5.39±1.36	3.78±0.87
红细胞计数($10^{12}/L$) RBC	10.26±0.52	10.55±0.41
血红蛋白(g/L) HGB	159.80±8.08	159.60±7.63
红细胞压积(%) HCT	48.69±2.64	48.97±2.48
平均红细胞体积(fL) MCV	47.37±1.05▲	46.42±0.66
平均红细胞血红蛋白(pg) MCH	15.57±0.50▲	15.14±0.24
平均血红蛋白浓度(g/L) MCHC	328.40±9.41	325.90±6.12
红细胞分布宽度(%) RDW	14.52±0.99	14.09±0.80
血小板计数($10^9/L$) PLT	681.40±89.32	746.30±67.13
血小板压积(%) PCT	0.17±0.02	0.19±0.04
平均血小板体积(fL) MPV	2.41±0.19	2.49±0.36
血小板分布宽度(%) PDW	16.62±0.78	16.02±0.61
淋巴细胞计数($10^9/L$) LYM	5.03±1.25	3.52±0.89
单核细胞计数($10^9/L$) MON	0.00±0.00	0.00±0.00
中性粒细胞计数($10^9/L$) NEUT	0.35±0.15	0.26±0.15
嗜酸性粒细胞计数($10^9/L$) EOS	0.01±0.03▲	0.00±0.00
嗜碱性粒细胞计数($10^9/L$) BAS	0.00±0.00	0.00±0.00
淋巴细胞百分比(%) LYM%	93.05±1.90	92.45±4.03
单核细胞百分比(%) MON%	0.20±0.17▲	0.35±0.46
中性粒细胞百分比(%) NEUT%	6.35±1.95	7.03±3.99
嗜酸性粒细胞百分比(%) EOS%	0.37±0.65	0.07±0.06
嗜碱性粒细胞百分比(%) BAS%	0.03±0.07	0.03±0.05

注:与 8 周龄组相比,▲ $P<0.05$ 。
Note. Compared with 8-week-old mice group,▲ $P<0.05$.

2.3 生化指标测定结果

4 周龄在 AST、P 两项指标上显著低于 8 周龄组($P<0.01$),在 ALP 指标上也低于 8 周龄组($P<0.05$)。其余 10 项生化指标无显著性差异(表 3)。

3 讨论

依据《实验动物生物学数据采集技术规范》要求,测定小鼠的主要生物学特性通常选择 4 周和 8 周龄小鼠,4 周龄小鼠是免疫等常见应用初始周龄,8 周龄则代表了成年小鼠的普遍水平。这一规范同样适用于基因工程成小鼠。

hACE2-KI/NIFDC 小鼠是学界公认的新型冠状病毒肺炎疾病机理、药物、疫苗的模式动物之一^[11-14]。在研究评价中,通常需要测定实验动物的脏器重量、生理生化指标来评价疾病健康状态以及药物疫苗的毒副作用。因此,测定不同周龄小鼠的生物学特性指标能够为其应用建立基础数据。但由于在新冠肺炎疾病研究中,该模型鼠供应紧张,本次生物学数据仅测定了 4 周龄和 8 周龄雌性。

表 3 4 周龄和 8 周龄 hACE2-KI/NIFDC 血液生化指标的比较

项目 Item	hACE2-KI/NIFDC 4-week-old	hACE2-KI/NIFDC 8-week-old
丙氨酸氨基转移酶(U/L) ALT	22.66±3.77	3.77±1.19
天冬氨酸氨基转移酶(U/L) AST	106.09±27.83▲▲	154.09±25.35
总蛋白(g/L) TP	55.7±2.96	58.03±4.39
白蛋白(g/L) ALB	26.53±1.29	27.8±1.60
碱性磷酸酶(U/L) ALP	150.95±12.26▲	225.14±80.15
尿素氮(mmol/L) BUN	10.61±1.49	10.16±6.05
肌酐(μmol/L) CREA	21.88±16.7	39.92±24.01
葡萄糖(mmol/L) GLU	7.69±1.17	7.26±2.16
钙(mmol/L) CA	2.12±0.16	1.93±0.93
磷(mmol/L) P	2.62±0.25▲▲	4.14±0.61
总胆固醇(mmol/L) CHO	2.2±0.25	1.97±0.28
甘油三酯(mmol/L) TG	1.37±0.23	1.25±0.23
总胆红素(μmol/L) T.Bili	4.95±2.96	6.87±14.36

注:与 8 周龄组相比,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。
Note. Compared with 8-week-old mice group,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$.

脏器系数是反映动物内脏器官状态的生物学指标,在毒性试验和安全评价中经常通过脏器系数的变化来评价相关指标影响因素^[15-17]。本研究中,8 周龄组的脾、肺、胸腺、左肾、右肾占体重百分比均低于 4 周龄组($P<0.01$)、心脏占体重百分比高于 4 周龄组($P<0.01$)。随着周龄增加,脾、肺、胸腺、左肾、右肾并未出现与体重一致的正相关增长,反映出了不同年龄器官功能的分化成熟状态;只有心脏的脏器系数 8 周龄组高于 4 周龄组,反映出随着周龄增长 hACE2-KI/NIFDC 小鼠的心脏供血能力增强。

血液生理生化指标是反映机体是否正常的两类基础指标。本研究测定的 22 项血生理指标和 13 项血生化指标中,仅 MCV、MCH、EOS、MON% 四项生理指标和 AST、ALP、P 三项生化指标在 4 周龄和 8 周龄雌性组间存在差异,反映了离乳后和性状表达期两个阶段在造血、免疫和肝肾功能的差异 MCV、MCH 是反映红细胞体积和血红蛋白浓度指标,均存在 4 周龄高于 8 周龄的情况,这一结果也符合鼠成年后红细胞体积减小以及血红蛋白运氧功能成熟的情况。EOS 是过敏反应指标,4 周龄高于 8 周龄;MON% 是细胞免疫指标,8 周龄高于 4 周龄,这两个指标的变化反映出随着周龄增长,细胞免疫不断成熟的状态。其中 3 项生化指标均存在 8 周龄组高于 4 周龄组的情况。AST、ALP 是评价肝功能的两项指标,P 是评价肾功能的指标。在应用该小鼠进行肝肾功能评价时,需要排除性别和周龄差异带来的影响。较之常规品系,本研究中转基因小鼠不同周龄差异化生理生化指标相对较少,这可能也与基因敲入有关^[18]。在疫苗研发的动物实验中,经常选用 4~5 周的小鼠进行免疫并定期观察。对于雌性的该模型鼠,4 周龄和 8 周龄组 18 项指标和 10 项生化指标均没有统计学差异。但对于药物评价通常使用某体重组的小鼠研究来说,没有周龄界定,在评价生物学指标时也需要关注周龄变化可能带来的影响。

参考文献:

- [1] 王红,张帅,侯晓彤. 血管紧张素转化酶 2 在新型冠状病毒感染及心脏损伤中的作用 [J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39 (5): 492-495.
- [2] 宋丽妮,曹曦,刘薇,等. 血管紧张素转化酶 2 对肝细胞调

- 亡的影响 [J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(2): 223-229.
- [3] 齐明华,刘吉奎,叶静,等. 原发性肝癌患者血管紧张素转化酶与血管紧张素转化酶 2 基因转录水平变化趋势 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(4): 227-229.
- [4] 隋超,陈亚镇,赖盼旺. 血管紧张素转化酶抑制剂联合 SGLT-2 抑制剂治疗糖尿病肾病效果研究 [J]. 临床军医杂志, 2018, 46(12): 1437-1438.
- [5] 戴海龙,杨强凤,光雪峰,等. 先天性心脏病肺动脉高压介入封堵前后血清血管紧张素转化酶 2 水平研究 [J]. 中国心血管病研究, 2020, 18(2): 97-99.
- [6] 于诗然,杨旻,曹新冉,等. 关注 ACE2 的心血管保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(5): 433-437.
- [7] 王树越,吴娟,贾一扬,等. ACE 和 ACE2 基因多态性与冠心病的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(16): 3963-3965.
- [8] 白亮,刘宝宁,赵四海,等. 新型冠状病毒来源、传播途径及易感动物模型研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2020, 5 (S1): 1-2, 11.
- [9] 熊芮,吕建军,聂建辉,等. 冠状病毒动物模型研究进展及 2019-nCoV 可能的易感小动物模型 [J]. 传染病信息, 2020, 33(1): 61-64.
- [10] Sun SH, Chen Q, Gu HJ, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis [J]. Cell Host Microbe, 2020, 28 (1): 124-133.
- [11] Pujhari S, Rasgon JL. Mice with humanized-lungs and immune system-an idealized model for COVID-19 and other respiratory illness [J]. Virulence, 2020, 11(1): 486-488.
- [12] Yinda CK, Port JR, Bushmaker T, et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19 [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(1): e1009195.
- [13] Lutz C, Maher L, Lee C, et al. COVID-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice [J]. Hum Genomics, 2020, 14(1): 20.
- [14] Zheng J, Wong LR, Li K, et al. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice [J]. Nature, 2021, 589(7843): 603-607.
- [15] 李志春,陈赶林,郑凤锦,等. 甘蔗醋对高脂喂养小鼠体重、脏器系数和血清生化指标的影响 [J]. 中国酿造, 2020, 39(1): 50-54.
- [16] 王华民,马珍珍,郝少君,等. 骨刺散对大鼠佐剂关节炎模型继发性病变的影响 [J]. 西部中医药, 2020, 33(4): 45-48.
- [17] 蒋春飞,刘东文,郑芳昊. 伤科黄水经口给药的长期毒性研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(1): 16-19, 23.
- [18] 黎桂玲,刘科,黎雄才,等. 不同生理阶段及性别 SPF 级 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠血液生理生化指标测定与比较 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(12): 102-109.

王振华, 陈金亮, 邢媛媛, 等. 法尼醇受体通过下调 miR-21 水平抑制非小细胞肺癌细胞增殖及侵袭能力 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 43-50.

Wang ZH, Chen JL, Xing YY, et al. Farnesoid X receptor inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by downregulating miR-21 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 43-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 007

法尼醇受体通过下调 miR-21 水平抑制非小细胞肺癌细胞增殖及侵袭能力

王振华^{1*}, 陈金亮², 邢媛媛², 郭喜喜¹, 李东飞¹

(1. 新乡市中心医院胸瘤二科, 河南 新乡 453000; 2. 南通市第一医院呼吸科, 江苏 南通 226006)

【摘要】 目的 观察法尼醇受体(FXR)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织和细胞系中的表达水平,探讨了 FXR 在 NSCLC 细胞增殖和侵袭中的作用是否与调控 miR-21 水平相关。**方法** 在 2010 年至 2012 年间,取本院手术切除的 80 例 NSCLC 组织及配对的正常组织。通过免疫组化或 Western blot 分析 NSCLC 组织和细胞系中 FXR 表达。以 NSCLC 细胞 A549 为研究对象,通过 CCK-8 法、Transwell 法和 qRT-PCR 法评估不同浓度的 GW3965(1~5 μmol/L)对细胞活力、侵袭和 miR-21 水平影响。通过转染技术来过表达或敲低 miR-21 表达,并评估其对细胞活力、侵袭的影响。采用双荧光素酶报告分析 FXR 与 miR-21 之间的关系。**结果** 与邻近的非肿瘤正常组织相比,FXR 在 NSCLC 组织中的表达显著降低($P<0.001$)。Kaplan-Meier 分析显示 FXR 低表达预示 NSCLC 患者预后较差($\chi^2=4.496, P=0.033$)。FXR 高、低表达的 NSCLC 在临床分期、肿瘤大小、T 分期和淋巴结转移(N 分期)上有显著性差异($P<0.05$)。GW3965 以剂量依赖方式促进了 A549 细胞中 FXR 蛋白表达,抑制了细胞的增殖和侵袭,并降低了 miR-21 表达。miR-21 过表达显著逆转了 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用($P<0.05$),并且 miR-21 沉默显著增强 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用($P<0.05$)。双荧光素酶报告证实 FXR 通过靶向 miR-21 来抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭。Spearman 分析显示,NSCLC 标本中 FXR 与 miR-21 的表达呈强负相关($P<0.001$)。Kaplan-Meier 分析显示,“FXR 低表达”和“miR-21 高表达”共存模式预测了 NSCLC 患者最差的预后($\chi^2=8.201, P=0.004$)。**结论** FXR 通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞的生长,提示调控 FXR/miR-21 可能是治疗 NSCLC 的潜在策略。

【关键词】 法尼醇受体;miR-21;非小细胞肺癌;增殖;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0043-08

Farnesoid X receptor inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells by downregulating miR-21

WANG Zhenhua^{1*}, CHEN Jinliang², XING Yuanyuan², GUO Xixi¹, LI Dongfei¹

(1. the Second Department of Thoracic Oncology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China.
2. Department of Respiratory Medicine, Nantong First Hospital, Nantong 226006)

【Abstract】 Objective To observe the expression levels of Farnesoid X receptor (FXR) in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue and cell lines, and to explore whether the role of FXR in the proliferation and invasion of NSCLC cells is related to the regulation of miR-21. **Methods** From 2010 to 2012, 80 cases of NSCLC tissue and matched normal tissue were collected. The expression of FXR in the NSCLC tissue and cell lines was analyzed using immunohistochemistry

[基金项目] 江苏省科技项目(BK20191207)。

[作者简介] 王振华(1982—),男,硕士,研究方向:胸外科。E-mail: bxt4396@163.com

or Western blot. The effects of GW3965 ($1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$) on cell viability and invasion and miR-21 levels were evaluated using CCK-8, transwell and qRT-PCR. MiR-21 was overexpressed or knocked down using transfection technology, and the effects on cell viability and invasion were evaluated. Moreover, the relationship between FXR and miR-21 was analyzed by double luciferase assay. **Results** Compared with the adjacent non-tumor normal tissue, the expression of FXR was significantly lower in NSCLC tissue ($P < 0.001$). Kaplan-Meier analysis revealed that low FXR expression predicted a worse prognosis for NSCLC patients ($\chi^2 = 4.496$, $P = 0.033$). There were significant differences in clinical stage, tumor size, T stage and lymph node metastasis (N stage) between high- and low-FXR tumors ($P < 0.05$). GW3965 promoted FXR protein expression in A549 cells in a dose-dependent manner, inhibited cell proliferation and invasion and decreased miR-21 expression. Overexpression of miR-21 significantly reversed the inhibitory effects of FXR on the growth and invasion of NSCLC cells ($P < 0.05$), and miR-21 silencing significantly enhanced the inhibitory effects of FXR on the growth and invasion of NSCLC cells ($P < 0.05$). The double luciferase assay confirmed that FXR inhibited the proliferation and invasion of NSCLC cells by targeting miR-21. Spearman's test revealed a strong negative correlation between FXR and miR-21 expression in NSCLC specimens ($P < 0.001$). Furthermore, Kaplan-Meier analysis revealed that a coexistence pattern of "FXR low" and "miR-21 high" predicted the worst prognosis in NSCLC patients ($\chi^2 = 8.201$, $P = 0.004$). **Conclusions** FXR inhibits the growth of NSCLC cells by downregulating miR-21, suggesting that regulation of FXR/miR-21 may be a potential strategy for the treatment of NSCLC.

【Keywords】 FXR; miR-21; NSCLC; proliferation; invasion

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌的主要类型, 死亡率高^[1]。目前, NSCLC 根治性切除术后 5 年的总生存率仍低于 15%^[2]。因此, 有必要探索 NSCLC 的分子机制, 寻找新的治疗靶点。法尼醇受体 (Farnesoid X receptor, FXR) 是核受体超家族的成员, 能对管腔胆汁酸水平进行严格调控^[3]。由于大约 70% 的胆汁酸被人体重新吸收, FXR 可以在血浆中达到微摩尔浓度, 这可能是许多其他组织中表达 FXR 的基础^[4]。先前的研究显示, 与癌周非肿瘤组织相比, 人类结直肠癌组织中的 FXR 表达较低, 并且 FXR 低表达与不良预后之间存在关联^[5]。最近的研究报告了 FXR 可作为肿瘤抑制因子, 在体内、体外激活可抑制多种细胞生长^[4-5]。然而, 其潜在机制并不完全清楚。MicroRNAs (miRNAs) 是一种单链非编码 RNA 分子, 其通过调节癌基因或抑癌基因在抑制或促进肿瘤生长中发挥关键作用^[6]。研究发现, miR-21 在几种恶性肿瘤中加速癌症进展, 包括胃癌和结直肠癌^[7]。此外, miR-21 在肺癌中被观察到上调, 并与肺癌侵袭能力增加有关^[8]。先前的研究发现, FXR 激动剂可以通过抑制 miR-21 改善非酒精性脂肪性肝炎小鼠的脂肪变性、炎症、氧化应激和胆固醇积累^[9]。然而, 关于 FXR 激动剂能否通过下调 miR-21 水平抑制 NSCLC 细胞增殖及侵袭能力尚不清楚。因此, 本研究旨在观察 FXR 在 NSCLC 组织和细胞系中的表达水平, 探讨 FXR 在 NSCLC 细胞增殖和

侵袭中的作用是否与调控 miR-21 水平相关。

1 材料和方法

1.1 实验组织与细胞系

在 2010 年至 2012 年间, 取本院手术切除的 80 例 NSCLC 组织及配对的正常组织。所用患者经病理证实为 NSCLC。术前无局部或全身治疗。所有组织样本在液氮中新鲜冷冻, 然后转移到 -80°C 保存, 直到使用。所有患者至少持续随访 60 个月, 并收集相关临床病理特征和生存统计数据。

人 NSCLC 系 (A549、NCI-H1299、H460) 和正常细胞系 (16HBE) 购自美国 ATCC。细胞培养在含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中 (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 主要试剂与仪器

抗人 FXR 的初级抗体购自武汉 Proteintech 公司; TRIpure 试剂、Super M-MLV 逆转录酶、 $2\times$ Power Taq PCR MasterMix 购自北京 BioTeke 公司; SYBR green、RIPA 缓冲液购自北京 Solarbio 公司; GW3965 (FXR 激动剂) 购自美国 Sigma 公司 (批号: NP1524), 细胞计数试剂盒-8 购自日本 Dojindo 公司; PVDF 膜购自美国 Invitrogen 公司; PVDF 膜、lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; β -actin 一抗购自英国 Abcam 公司; 双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司; miR-21 过表达物或对照质粒 pcDNA3.1 和 miR-21 抑制剂或阴性对

照 siRNA 均购自上海吉玛制药技术有限公司。

Exicycler™96 荧光定量分析仪购自韩国 Bioneer 公司;BX51 显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肿瘤组织中 FXR 表达的免疫组化分析

手术标本(NSCLC 组织及配对的正常组织)用 10%福尔马林固定,石蜡包埋。将载玻片与抗人 FXR 的初级抗体在 4℃ 下孵育过夜,后在 25℃ 下与二级抗体孵育 1 h。根据染色强度和阳性细胞百分率对每个切片进行评分。染色强度评分如下:0(阴性)、1(弱染色)、2(中度染色)、3(强染色)。阳性细胞百分率评分如下:0(0%)、1(0%~10%)、2(10%~50%)、3(50%~80%)、4(>80%)。IHC 评分通过强度和百分率相乘得到。取 FXR 组织评分中位数作为低表达和高表达判断:<6,低表达;≥6,高表达。

1.3.2 qRT-PCR 分析

使用 TRIpure 试剂从组织或培养的细胞中提取总 RNA。使用 Super M-MLV 逆转录酶将总 RNA 逆转录为 cDNA。使用 2×Power Taq PCR MasterMix 和 SYBR green 在 Exicycler™96 荧光定量分析仪上进行 Quantitative Real-time PCR(qRT-PCR)。使用 U6 小核 RNA(U6 snRNA)作为内源性对照。依据 NCBI 上登录的靶基因序列并通过 primer 5.0 引物设计软件设计特异性引物序列如下:miR-21,正向 5'-GCGGCAGGGGAAAGTTCTA-3',反向 5'-GTG CAGGGTCCGAGGTATTC-3';U6,正向 5'-TGGAGT TGATCCTAGTCTGG-3',反向 5'-GTGCAGGGTCCG AGGTATTC-3'。经过 qRT-PCR 后,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的表达变化。

1.3.3 CCK-8 法

将 A549 细胞(5×10^3)接种到 96 孔板中,分为:对照组和不同浓度的 GW3965 处理组。不同浓度的 GW3965 组加入不同浓度的 GW3965($1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$)或对照组加入相同体积的二甲基亚砜处理 48 h。然后,使用细胞计数试剂盒-8 检测细胞增殖情况。

1.3.4 细胞侵袭试验

使用 Transwell 方法进行细胞侵袭分析。将 1.3.3 项下经不同分组处理的 A549 细胞以每孔 4×10^5 的密度接种到 24 孔 Transwell 小室中,并在上室中加入 200 μL 无 FBS 的培养基。使用 500 μL 含 30%胎牛血清培养基填充底部孔。培养 24 h 后,用 70%乙醇处理和 0.5%结晶紫染色。在 BX51 显

镜下量化侵袭细胞的数量。随机选择五个区域,并在每个区域中统计细胞数。

1.3.5 Western blot 分析

用 RIPA 缓冲液裂解细胞提取总蛋白。通过 BCA 试剂盒评估蛋白质含量。采用 10% SDS-PAGE 电泳将蛋白质转移到 PVDF 膜上。将膜用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,然后在 4℃ 下用以下一抗封闭过夜:FXR(1:1000)和 β -actin(1:1000)。将 PVDF 膜与二抗在室温下孵育 1 h。使用蛋白质印迹检测化学发光试剂盒观察目标条带。

1.3.6 细胞转染

取 A549 细胞,以每孔 5×10^4 个细胞接种于 24 孔板。然后用 lipofectamine 2000 转染试剂,分别将 miR-21 过表达物(pcDNA-miR-21, 50 nmol/L)或对照质粒 pcDNA3.1(pcDNA)和 miR-21 抑制剂(si-miR-21, 100 nmol/L)或阴性对照 siRNA(si-NC)转染入细胞。转染 24 h 后,收集细胞并分为 8 组:pcDNA+DMSO 组、pcDNA+GW3965 组、pcDNA-miR-21+DMSO 组、pcDNA-miR-21+GW3965 组、si-NC+DMSO 组、si-NC+GW3965 组、si-miR-21+DMSO 组、si-miR-21+GW3965 组。将细胞用 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 或 DMSO 处理 0、24、48 和 72 h,收集细胞进行 CCK-8 法、Transwell 法分析。

1.3.7 双荧光素酶报告分析

合成含有 miR-21 靶点的 FXR 野生型(WT)或突变型(MUT),然后克隆到 pmir-GLO 载体中。将 1.5 μg pmirGLO-FXR-WT 或 pmirGLO-FXR-MUT 分别与 pcDNA-miR-21 和/或 si-miR-21 共转染 A549 细胞,孵育 24 h 后,用双荧光素酶报告系统测定荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 软件 17.0 进行统计分析。结果表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。使用 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验评估组之间的差异。使用卡方检验、Fisher's 精确检验和 Kaplan-Meier 方法(对数秩检验)进行相关分析和生存数据分析。NSCLC 组织中 FXR 与 miR-21 表达之间相关性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 FXR 低表达与 NSCLC 患者预后不良相关

FXR 蛋白位于细胞膜上(图 1A)。与邻近的非肿瘤正常组织相比,FXR 在 NSCLC 组织中的表达显

著降低 ($P<0.001$, 图 1B)。80 例患者中, 有 27 例 FXR 高表达, 53 例 FXR 低表达。Kaplan-Meier 分析显示 FXR 低表达预示 NSCLC 患者预后较差 ($\chi^2=4.496, P=0.033$, 图 1C), 提示 FXR 可能作为一种致癌因子参与 NSCLC 的发生和发展。研究进一步分析了 FXR 的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的相关性。结果显示, FXR 高、低表达的 NSCLC 在临床分期、肿瘤大小、T 分期和淋巴结转移(N 分期)上有显著性差异 ($P<0.05$) (表 1)。

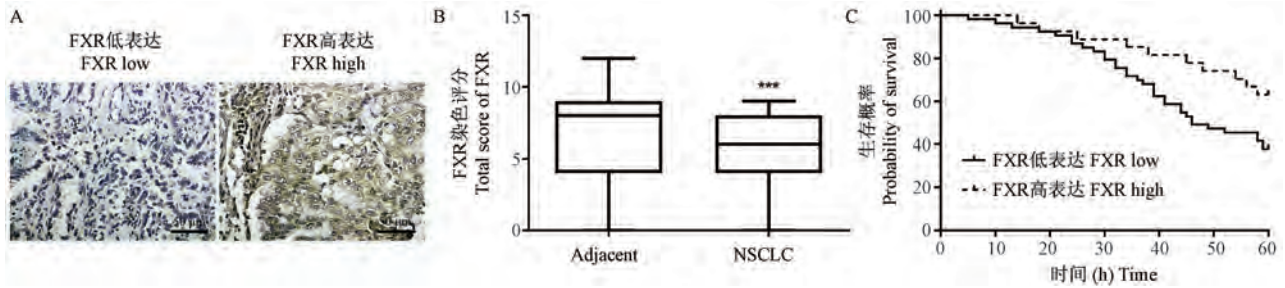
2.2 FXR 抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭

使用 Western blot 方法检测了 3 种 NSCLC 细胞系中的 FXR 蛋白, 发现 FXR 在 A549 细胞中的表达最低(图 2A), 因此, 研究选择 A549 细胞用于以下实验。Western blot 显示, GW3965 以剂量依赖方式促进了 A549 细胞中 FXR 的表达(图 2B)。功能实验表明, GW3965 以剂量依赖方式显著抑制了 A549

细胞的增殖和侵袭(图 2C、D)。所有这些结果表明 FXR 受体对细胞增殖和侵袭具有很强的抑制作用。

2.3 FXR 的激活通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭

使用 PCR 方法检测了 3 种 NSCLC 细胞系中的 miR-21, 发现 miR-21 在 A549 细胞中的表达最高(图 3A)。利用 GW3965 激活 FXR 可剂量依赖性地降低 miR-21(图 3B)。功能实验表明, miR-21 过表达显著逆转了 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$), 并且 miR-21 沉默显著增强 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用 ($P<0.05$) (图 3C~H)。为了证实 FXR 与 miR-21 之间的关系, 研究进行了双重荧光素酶报告基因检测。图 4A 显示了分别包含预测的 miR-21 野生型和突变体结合位点的 FXR mRNA 的 3'-UTR (FXR 3'-UTR WT 和 FXR 3'-UTR MUT) (带突变的碱基标有下划线)。



注:A:FXR 高表达和低表达的代表性 IHC 染色图像;B:80 例患者 NSCLC 组织中 FXR 的染色评分与配对相邻组织的比较;C:Kaplan-Meier 生存分析比较 FXR 高表达和低表达 5 年生存率。与邻近组织相比, *** $P<0.001$ 。

图 1 FXR 低表达与 NSCLC 患者预后不良相关

Note. A, Typical IHC staining images with high and low FXR expression. B, Staining score of FXR in 80 patients with NSCLC was compared with that of paired adjacent tissues. C, Kaplan Meier survival analysis was used to compare the 5-year survival rate between FXR overexpression and low FXR expression. Compared with adjacent tissues, *** $P<0.001$.

Figure 1 Low FXR expression is associated with poor prognosis in NSCLC patients

表 1 根据 NSCLC 中 FXR 蛋白表达的临床病理特征

Table 1 Clinicopathologic characteristics according to FXR protein expression in NSCLC

组别	性别 Gender		年龄(岁) Age		分期 Stage		大小(cm) Size		T 分期 T stage		N 分期 N stage		M 分期 M stage	
	男 Male	女 Female	≤60	>60	I-II a	II b-IV	≥3	<3	T1	T2-T4	N0	N1-N3	M0	M1
FXR 低表达														
FXR low	41(70.7)	12(54.5)	22(62.9)	31(68.9)	18(50.0)	35(79.5)	41(75.9)	12(46.2)	6(40.0)	47(72.3)	20(51.3)	33(80.5)	52(65.8)	1(100)
(n=53)														
FXR 高表达														
FXR high	17(29.3)	10(45.5)	13(37.1)	14(31.1)	18(50.0)	9(20.5)	13(24.1)	14(53.8)	9(60.0)	18(27.7)	19(48.7)	8(19.5)	27(34.2)	0
(n=27)														
统计值														
Statistical value	1.859		0.320		7.730		6.957		5.689		7.625		-	
P 值	0.173		0.571		0.005		0.008		0.017		0.006		0.538	
P value	0.173		0.571		0.005		0.008		0.017		0.006		0.538	

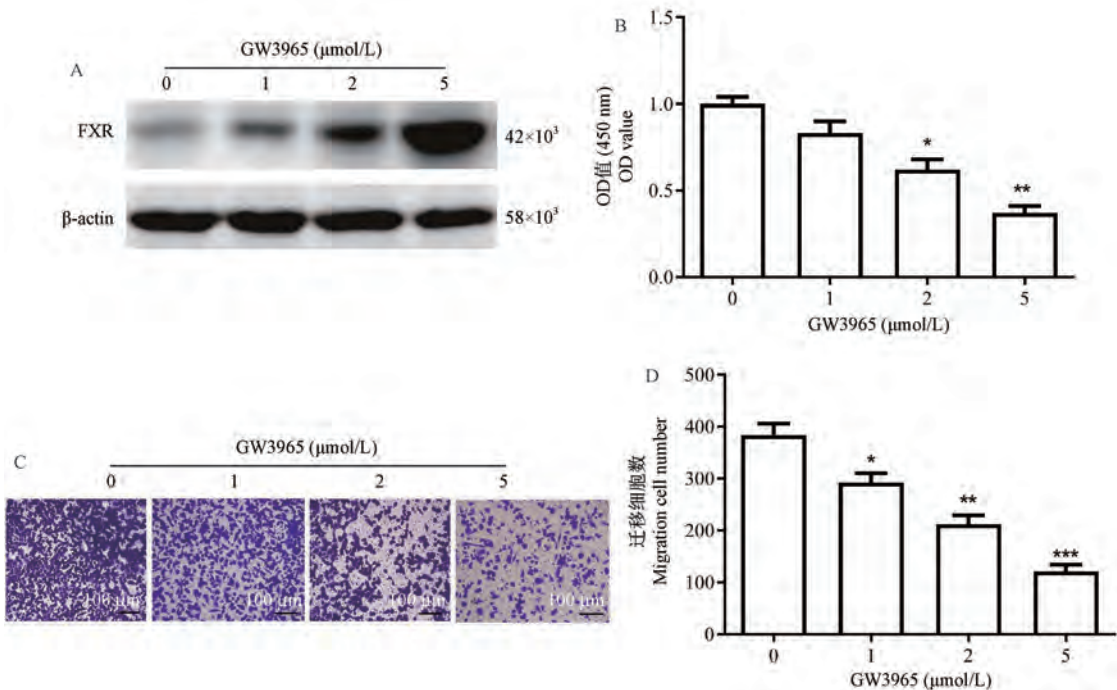
在 FXR 3' UTR WT 组中,与阴性对照转染细胞相比,pcDNA-miR-21 显著抑制 FXR 3' UTR WT 的荧光素酶活性($P<0.001$),si-miR-21 可显著减轻该抑制作用($P<0.01$)(图 4B)。这些结果表明,FXR 通过靶向 miR-21 来抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭。

2.4 FXR 过表达与 NSCLC 中 miR-21 呈反相关

研究进一步利用 qRTPCR 分析了 miR-21 在同一标本中的表达,以阐明 FXR 和 miR-21 在 NSCLC 中的关系。结果显示,NSCLC 组织中 miR-21 的水平显著高于邻近组织($P<0.01$,图 5)。将 80 例 NSCLC 组织分为两组:miR-21 高表达组(高于 miR-21 表达中位数, $n=40$)和低表达组(低于 miR-21 表达中位数, $n=40$)。Spearman 分析显示,NSCLC 标本中 FXR 与 miR-21 的表达呈强负相关($P<0.001$,表 2)。Kaplan-Meier 分析显示,“FXR 低表达”和“miR-21”高表达共存模式预测了 NSCLC 患者最差的预后($\chi^2=8.201$, $P=0.004$,图 6)。

3 讨论

NSCLC 约占肺癌的 85%,预后差,5 年总生存率低^[1]。因此,迫切需提高 NSCLC 的早期诊断水平。FXR 是核受体超家族的成员,在胆汁酸、胆固醇、脂质和葡萄糖代谢中起着关键作用^[10]。最近,人们发现 FXR 的功能超出了新陈代谢,包括炎症和致癌作用^[11];如 Hotta 等^[5]发现 FXR 在体外和体内对包括结直肠癌在内的多种癌症具有重要的抗癌作用;Alasmael 等^[4]发现 FXR 的激活会导致四种不同表型乳腺癌细胞系的细胞死亡:MCF-10A(正常)、MCF-7(受体阳性)、MDA-MB-231 和 MDA-MB-468(三重阴性)。本研究发现 FXR 在多个 NSCLC 细胞系中的表达低于 16HBE 正常细胞,在 NSCLC 组织中的表达较邻近组织下调,并且 FXR 低表达与 NSCLC 临床分期、肿瘤大小、T 分期和淋巴结转移(N 分期)显著相关。先前研究报道,FXR 激动剂

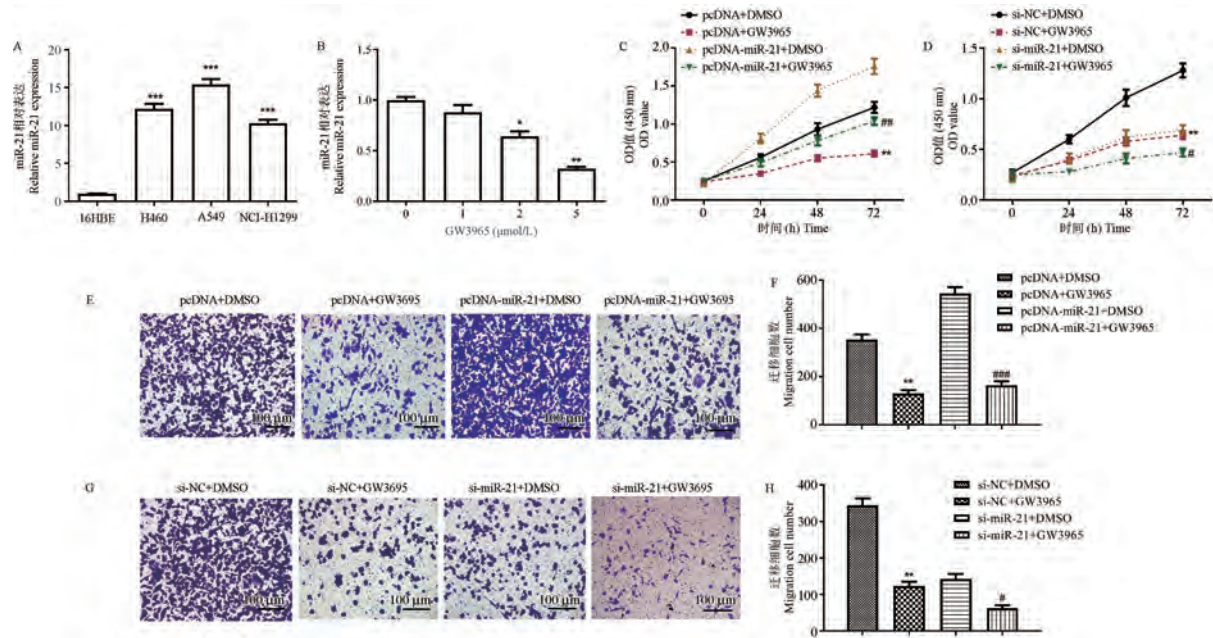


注:A:FXR 蛋白在不同类型 NSCLC 细胞系中的表达;B:不同浓度 GW3965 对 A549 细胞中 FXR 表达的影响;C:CCK-8 法检测不同浓度 GW3965 处理对 A549 细胞增殖的影响;D:Transwell 法检测不同浓度 GW3965 处理对 A549 细胞侵袭的影响。与 GW3965 0 μmol/L 相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 2 FXR 抑制 NSCLC 细胞体外增殖

Note. A, Expression of FXR protein in different types of NSCLC cell lines. B, Effects of different concentrations of GW3965 on FXR expression in A549 cells. C, Proliferation of A549 cells was detected by CCK-8 method. D, Transwell assay was used to detect the effect of GW3965 on the invasion of A549 cells. Compared with GW3965 0 μmol/L, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 FXR inhibited the proliferation of NSCLC cells in vitro

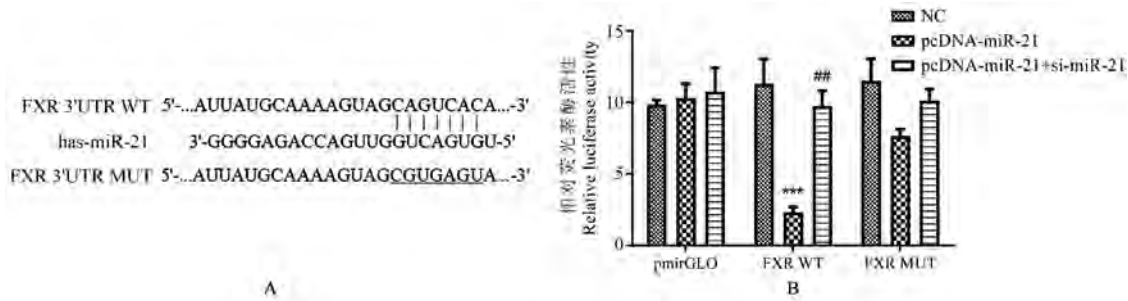


注:A:miR-21 在不同类型 NSCLC 细胞系中的表达;与 16HBE 相比,*** $P<0.001$;B:不同浓度 GW3965 对 A549 细胞中 miR-21 表达的影响;与 GW3965 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;C:转染对照质粒 pcDNA3.1 (pcDNA) 或 miR-21 表达质粒 (pcDNA-miR-21) 24 h 后,用 DMSO 或 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 处理 A549 细胞的存活率;D:转染 miR-21 siRNA (si-miR-21) 或阴性对照 siRNA (si-NC) 24 h 后,用 DMSO 或 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 处理 A549 细胞的存活率;E~F:Transwell 法检测 pcDNA-miR-21 转染对 GW3965 处理的 A549 细胞侵袭影响;G~H:Transwell 法检测 si-miR-21 转染对 GW3965 处理的 A549 细胞侵袭影响。与 pcDNA+DMSO 组或 si-NC+DMSO 组相比,** $P<0.01$;与 pcDNA-miR-21+DMSO 组或 si-miR-21+DMSO 组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 3 FXR 通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞的增殖和侵袭

Note. A, Expression of miR-21 in different types of NSCLC cell lines. Compared with 16HBE, *** $P<0.001$. B, Effect of different concentrations of GW3965 on the expression of miR-21 in A549 cells. Compared with GW3965 0 $\mu\text{mol/L}$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. C, Survival rate of A549 cells treated with DMSO or 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 after 24 h transfection of the control plasmid pcDNA3.1 (pcDNA) or miR-21 expression plasmid (pcDNA-miR-21). D, Survival rate of A549 cells treated with DMSO or 5 $\mu\text{mol/L}$ GW3965 after 24 h transfection with miR-21 siRNA (si-miR-21) or negative control siRNA (si-NC). E~F, Transwell method was used to detect the effect of pcDNA-miR-21 transfection on the invasion of A549 cells treated with GW3965. G~H, Transwell method was used to detect the effect of si-miR-21 transfection on the invasion of A549 cells treated with GW3965. Compared with pcDNA + DMSO group or si-NC + DMSO group, ** $P<0.01$. Compared with pcDNA + miR-21+DMSO group or si-miR-21+DMSO group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 3 FXR inhibits the proliferation and invasion of NSCLC cells by down-regulating miR-21

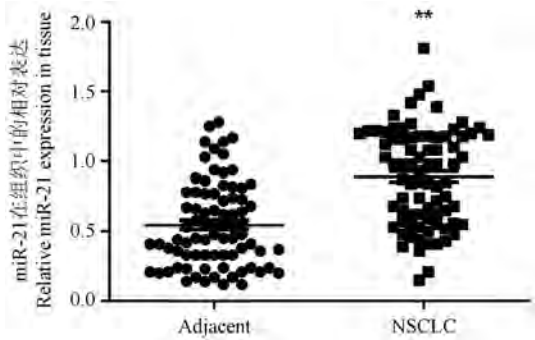


注:A:miR-21 在 FXR 的 WT 3' UTR 和 MUT 3' UTR 中的预测结合位点(突变碱基被划线);B:在 pcDNA-miR-21 和 si-miR-21 联合存在下,将荧光素酶报告质粒 pmirGLO-FXR-WT 或 pmirGLO-FXR-MUT 转染 A549 细胞 24 h,然后测定荧光素酶活性。与 NC 组相比,*** $P<0.001$;与 pcDNA+miR-21 相比,## $P<0.01$ 。

图 4 FXR 直接与 miR-21 相互作用

Note. A, Predicted binding sites of miR-21 in the WT 3' UTR and MUT 3' UTR of FXR (mutated bases were underlined). B, In the combined presence of pcDNA-miR-21 and si-miR-21, the luciferase reporter plasmid pmirGLO-FXR-WT or pmirGLO-FXR-MUT was transfected into A549 cells for 24 h, and then the luciferase activity was measured. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with pcDNA+miR-21, ## $P<0.01$.

Figure 4 FXR directly interacted with miR-21



注:与邻近组织相比,** $P<0.01$ 。

图5 80例患者NSCLC组织中miR-21表达与配对相邻组织的比较

Note. Compared with adjacent tissues, ** $P<0.01$.

Figure 5 Comparison of miR-21 expression in NSCLC tissues of 80 patients with paired adjacent tissues

表2 NSCLC中FXR与miR-21表达的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of FXR and miR-21 expression in NSCLC

NSCLC 组织 NSCLC tissue	miR-21		合计 Total	r	P
	低表达 Low	高表达 High			
	expression	expression			
FXR 高表达 FXR high	11	16	27	-0.454	<0.001
FXR 低表达 FXR low	29	24	53		
合计 Total	40	40	80		

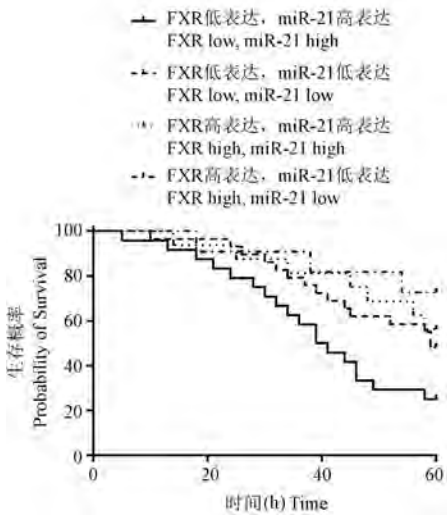


图6 Kaplan-Meier分析显示FXR低表达和miR-21高表达患者的预后最差

Figure 6 Kaplan Meier analysis showed that patients with low FXR expression and high miR-21 expression had the worst prognosis

GW3965 治疗通过激活不同荷瘤小鼠 MDSCs 表面的 ApoE-LRP8 受体引起 MDSCs 凋亡,从而降低 MDSCs 对 T 细胞的抑制作用,发挥抗肿瘤作用^[12]。本研究功能分析表明,利用 GW3965 上调 NSCLC 细胞中 FXR 的表达抑制了 A549 细胞的增殖和侵袭,提示 FXR 可能参与了 NSCLC 的发生发展,并可作为治疗 NSCLC 的一种新的临床分子标记物。

接下来,本研究试图揭示 FXR 在 NSCLC 发生发展中的调控机制。大量研究表明,miRNA 在癌症发展中起着关键作用^[2]。miRNA 作为小的非编码 RNA,可以通过靶向 mRNAs 来调节基因的表达^[13]。因此,miRNAs 通过参与多种与癌症相关的生物学过程,如细胞增殖和凋亡,被证明是肿瘤的癌基因和抑制因子^[14]。先前在 NSCLC 的 miRNA 研究表明,miRNA 具有独特的致癌作用,如 miRNA-615-3p 通过抑制 IGF2 抑制 NSCLC 的肿瘤生长和转移^[15]; miR-129 通过靶向 SOX4 抑制 A549 细胞的迁移和侵袭^[16]。最近,FXR 被报道通过与 3' UTR 结合来调节 miR-21 的表达^[9]。miR-21 在调节癌细胞行为和恶性肿瘤中起着重要作用,并且还可以促进肝癌细胞生长,诱导胶质母细胞瘤细胞抗凋亡特性^[17]。此外,miR-21 在 NSCLC 细胞的生长、侵袭和凋亡中起重要作用^[2]。为了解释 FXR 的异常表达,预测 miR-21 可能是 FXR 的候选调控因子。结果表明,miR-21 在人 NSCLC 中过度表达,而利用 GW3965 激活 FXR 可降低 miR-21,并且 miR-21 过表达逆转了 FXR 对 NSCLC 细胞生长和侵袭的抑制作用。进一步通过荧光素酶报告显示 miR-21 与 FXR 的 3' UTR 结合位点相结合,证实了本研究发现。以上证据表明,miR-21 是一种致癌的 miRNA,FXR 通过靶向 miR-21 来抑制 NSCLC 细胞增殖和侵袭。本研究还发现 NSCLC 标本中 FXR 和 miR-21 的表达呈强负相关,并且“FXR 低表达”和“miR-21 高表达”共存模式预测了 NSCLC 患者最差的预后。基于这些研究结果,FXR 激动剂 GW3965 在 miR-21 过度表达的 NSCLC 患者中具有潜在的临床应用价值,以减轻 miR-21 的有害影响。需要进一步的临床前和临床研究证实这一观点。

综上所述,本研究揭示了 FXR 通过下调 miR-21 抑制 NSCLC 细胞的生长,提示调控 FXR/miR-21 可能是治疗 NSCLC 的潜在策略。本研究为 FXR 参与 NSCLC 的发生发展提供了一个新的视角。

参考文献:

- [1] 李伟婷, 李永文, 张洪兵, 等. 基于 TCGA 数据库的中央型与周围型肺鳞癌基因表达差异性研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(5): 280-288.
- [2] 李军, 刘庆云, 辛江泽. miR-21 高表达对非小细胞肺癌患者整体生存率影响的 Meta 分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(11): 5193-5197.
- [3] 刘维伊, 孙建国, 曹伟灵, 等. 法尼醇 X 受体拮抗剂及药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(7): 764-774.
- [4] Alasmael N, Mohan R, Meira LB, et al. Activation of the Farnesoid X-receptor in breast cancer cell lines results in cytotoxicity but not increased migration potential [J]. Cancer Lett, 2016, 370(2): 250-259.
- [5] Hotta M, Sakatani T, Ishino K, et al. Farnesoid X receptor induces cell death and sensitizes to TRAIL-induced inhibition of growth in colorectal cancer cells through the up-regulation of death receptor 5 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(4): 824-831.
- [6] 林先勇. microRNAs 与肺癌患者放疗敏感性的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(5): 394-397.
- [7] Moller T, James JP, Holmström K, et al. Co-detection of miR-21 and TNF- α mRNA in budding cancer cells in colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8): 1907.
- [8] Bica-Pop C, Cojocneanu-Petric R, Magdo L, et al. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(19): 3539-3551.
- [9] Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, et al. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(4): e2748.
- [10] 曲超, 石岩, 杨宇峰. 基于知识图谱的法尼醇 X 受体在糖尿病领域国际研究现状分析 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2290-2294, 2320-2321.
- [11] 赵明亮, 赵爱华, 郑晓皎, 等. 肠道法尼醇 X 受体对糖脂代谢调节作用的研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(6): 672-677, 671.
- [12] Tavazoie MF, Pollack I, Tanqueco R, et al. LXR/ApoE activation restricts innate immune suppression in cancer [J]. Cell, 2018, 172(4): 825-840.
- [13] 朱登彦, 余畅, 杨洋, 等. 长链非编码 RNA 结直肠癌差异表达基因靶向微小 RNA-384 对肺癌 SPC-A1 细胞侵袭和迁移的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(7): 1221-1224.
- [14] 许有忠, 田作春, 李才. MicroRNA-204 在非小细胞肺癌患者组织中的表达及对癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(4): 57-61.
- [15] Liu J, Jia Y, Jia L, et al. MicroRNA 615-3p inhibits the tumor growth and metastasis of NSCLC via inhibiting IGF2 [J]. Oncol Res, 2019, 27(2): 269-279.
- [16] Cao B, He XF, Xu WZ, et al. The effect of microRNA-129 on the migration and invasion in NSCLC cells and its mechanism [J]. Exp Lung Res, 2018, 44(6): 280-287.
- [17] Liu H, Cheng L, Cao D, et al. Suppression of miR-21 expression inhibits cell proliferation and migration of liver cancer cells by targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN) [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3571-3577.

[收稿日期]2020-08-28

赵延辉, 解成霞. Exendin-4 对 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠的干预效果及作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (9): 51-58.

Zhao YH, Xie CX. Effects and mechanisms of Exendin-4 on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 51-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 008

Exendin-4 对 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠的 干预效果及作用机制研究

赵延辉, 解成霞*

(青海红十字医院, 西宁 810000)

【摘要】 目的 研究 Exendin-4 对链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病肾病大鼠的干预效果及可能的作用机制。**方法** 选取无特定病原体级 60 只 SD 健康大鼠, 将 45 只大鼠建立糖尿病肾病大鼠模型并随机分为模型组、贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组, 空白组为健康大鼠, 每组各 9 只。建模成功后, 贝那普利组灌胃 10 mg/kg 贝那普利片, Exendin-4 低、中和高剂量组分别皮下注射 Exendin-4 4、20、100 $\mu\text{g/kg}$, 正常组和模型组灌胃给予纯净水。给药 1 周后检测各组的总胆固醇 (total cholesterol, TG)、甘油三酯 (triglycerides, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL)、淀粉酶 (amylase, AMY)、血糖 (blood glucose, BG)、糖化血红蛋白 (hemoglobin, HbA1c)、空腹血清胰岛素 (fasting serum insulin, FINS)、体重、肾脏指数 (renal index, RI)、肾小球面积、肾小球直径以及肾组织的晚期糖基化终末产物 (glycation end products, AGEs)、PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量。**结果** Exendin-4 中、高剂量组大鼠 TG、TC、LDL、BG、HbA1c、FINS、AGEs、体重、RI、肾小球面积、肾小球直径、PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量均低于 Exendin-4 低剂量组, HDL 高于 Exendin-4 低剂量组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); Exendin-4 高剂量组大鼠 TG、TC、HDL、LDL、BG、HbA1c、FINS、AGEs、RI、肾小球面积、肾小球直径、PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量均低于 Exendin-4 中剂量组, HDL 高于 Exendin-4 中剂量组, 其中 TC、HDL、LDL、AMY、HDL、体重、RI、肾小球面积具有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论** Exendin-4 能够减轻 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠的炎症水平, 改善其 BG、血脂及胰腺功能, 其作用机制可能与 PDK1/Akt/mTOR 通路受到抑制有关。本研究为临床上治疗糖尿病肾病等其他炎症病症提供了新的方向。

【关键词】 Exendin-4; 糖尿病肾病; STZ 诱导

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0051-08

Effects and mechanisms of Exendin-4 on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats

ZHAO Yanhui, XIE Chengxia*

(Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810000, China)

【Abstract】 Objective To study the effects and mechanisms of Exendin-4 on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Methods** 60 SD healthy rats without specific pathogen level were selected. 45 rats were established to establish diabetic nephropathy model. They were randomly divided into model group, benazepril group, Exendin-4 low,

[基金项目] 青海省科技计划项目 (2014-NS-123)。

[作者简介] 赵延辉 (1982—), 男, 主治医师, 本科, 研究方向: 糖尿病。E-mail: 49673753@qq.com

[通信作者] 解成霞 (1983—), 女, 主治医师, 本科, 研究方向: 妇科肿瘤。E-mail: qhxchx@163.com

medium and high dose group, and the blank group was healthy rats with 9 rats in each group. After successful modeling, benazepril group was given 10 mg/kg benazepril tablets by gavage, exendin-4 low, medium and high dose groups were injected subcutaneously with Exendin-4 4, 20 and 100 g/kg respectively, and the normal group and model group were given purified water by gavage. One week after administration, total cholesterol (TG), triglycerides (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), amylase (AMY) and blood glucose (BG) were measured, hemoglobin (HbA1c), fasting serum insulin (FINS), body mass, renal index (RI), glomerular area, glomerular diameter and the expression of advanced glycation end products (AGEs), PDK1, p-Akt and p-mTOR proteins in renal tissue. **Results** The expression of TG, TC, LDL, BG, HbA1c, fins, ages, body mass, RI, glomerular area, glomerular diameter, PDK1, p-Akt, p-mTOR protein expression in the middle and high dose groups were lower than that in the low dose group ($P < 0.05$). The expressions of TG, TC, HDL, LDL, BG, HbA1c, FINS, AGEs, RI, glomerular area, glomerular diameter, PDK1, p-Akt and p-mTOR protein in Exendin-4 high dose group were lower than those in Exendin-4 medium dose group, and HDL was higher than that in Exendin-4 medium dose group. There were significant differences in TC, HDL, LDL, AMY, HDL, body mass, RI and glomerular area ($P < 0.05$). **Conclusion** Exendin-4 can reduce inflammation levels in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats and improve their BG, lipid levels, and pancreas function. The mechanisms underlying these effects may be related to inhibition of the PDK1/Akt/mTOR pathway. These findings provide a new direction for the clinical treatment of diabetic nephropathy and other inflammatory diseases.

【Keywords】 Exendin-4; diabetic nephropathy; STZ induction

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 严重的并发症之一, 可导致严重肾衰竭。糖尿病肾病一旦出现持续性蛋白尿病情将无法逆转, 直至终末期肾衰竭, 且糖尿病肾病的患病率逐年增加^[1-2]。糖尿病代谢异常会直接导致肾小球硬化, 进而导致肾功能损伤, 因此临床通过强化血糖控制来降低糖尿病肾病发生的风险。Exendin-4 是一种肠降糖素类似物, 由 39 个氨基酸组成的多肽, 主要产生于蜥蜴 (Gila monster lizard) 的唾液腺中, 能够减轻体重, 改善胰岛细胞功能, 呈剂量依赖性促进胰岛素分泌, 可发挥治疗糖尿病肾病的作用^[2-4], 但 Exendin-4 对于糖尿病所致肾病的作用研究较少。大量文献报道激活的 PDK1/Akt/mTOR 通路参与了糖尿病肾病的发病过程, 许多用于治疗糖尿病肾病的药物均与调控该通道相关^[5-6]。因此在本文拟采用 Exendin-4 对链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病肾病大鼠进行干预治疗, 为 Exendin-4 的临床应用提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

无特定病原体动物 (specific pathogen free animal, SPF) 级 SD 健康雄性大鼠 54 只, 体重 (219.7 ± 8.5) g, 鼠龄 (3.5 ± 0.2) 月; 均购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK (湘) 2019-0004]。在青海大学医学院动物实验室 [SYXK (青) 2019-0001] 中将 SD 大鼠均养殖在干净笼子里, 室温 (22.1 ± 1.8) °C, 相

对湿度 35%~40%, 每天光照 12 h, 自由饮用纯净水, 适应性饲养 1 周后开展实验。本文研究所做实验均获得青海红十字医院伦理委员会批准 (E20190015), 并满足动物实验学中的 3R 要求。

1.2 主要试剂与仪器

ME104E 型电子分析天平 (美国梅特勒-托利多公司); SZX12-3111 型显微镜 (日本奥林巴斯公司); DOTOP 型全自动生化仪 (广州东唐电子科技有限公司); Exendin-4 (浙江鸿拓生物技术有限公司); 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 美国 Sigma); 总胆固醇 (total cholesterol, TG)、甘油三酯 (triglycerides, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL)、低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL)、淀粉酶 (amylase, AMY) 试剂盒 (上海抚生实业有限公司); 血糖 (blood glucose, BG) 试剂盒 (上海钰博生物科技有限公司-仪器信息网); 糖化血红蛋白 (hemoglobin, HbA1c) 和空腹血清胰岛素 (fasting serum insulin, FINS) 试剂盒均购自南京基蛋生物科技有限公司; 兔抗鼠晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs, 艾美捷科技有限公司)、兔抗鼠 PDK1 抗体 (艾美捷科技有限公司); 兔抗鼠 p-Akt 抗体 (厦门研科生物技术有限公司); 兔抗鼠 p-mTOR 抗体 (上海安研商贸有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组、建模及给药

随机选取 60 只大鼠中 9 只作为正常组, 其余大

鼠参照邵晓丽等^[7]方法建立糖尿病肾病模型,对大鼠腹腔一次性注射 STZ 60 mg/kg,当 BG $\geq$ 16.7 mmol/L,尿糖为++++以上表明糖尿病肾病大鼠模型建立成功。将糖尿病肾病大鼠随机分为模型组、贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组,每组各 9 只。贝那普利组灌胃 10 mg/kg 贝那普利片,Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠分别皮下注射 Exendin-4 4、20、100 μ g/kg,正常组和模型组灌胃给予纯净水,灌胃或注射体积均为 20 μ L/g。所有大鼠均连续给药 1 周。

1.3.2 TG、TC、HDL、LDL 水平检测

给药结束后,给予全麻,抽取腹主动脉血 5 mL 置于抗凝管,5000 r/min 离心 10 min,取血浆,使用 DOTOP 型全自动生化仪检测 TG、TC、HDL、LDL 水平。

1.3.3 BG、HbA1c 和 FINS

抽取腹主动脉血 5 mL,5000 r/min 离心 10 min,取血清,采用葡萄糖氧化酶法检测 BG;采用酶法检测 HbA1c;采用放射免疫法检测 FINS。

1.3.4 体重和肾脏指数(renal index, RI)、肾小球面积及肾小球直径

给药前及给药结束称量体重。给药结束,取血结束,安乐处死大鼠,开腹取左肾和右肾,测重量,取左肾,采用 10% 的中性福尔马林溶液固定,常规制片,光镜下测量左肾和右肾的肾小球的直径和面积,计算 $RI = (\text{左肾重量} + \text{右肾重量}) / \text{体重} \times 100\%$ 。

1.3.5 切片及染色

取“1.3.4”项下切片,脱水透明,浸蜡包埋,脱蜡、HE 染色,镜下观察大鼠肾组织病理学表现。

1.3.6 AGEs 及 PDK1/Akt/mTOR 通路蛋白检测

取“1.3.4”项下右肾,使用 Western blot 检测 AGEs、PDK1、p-Akt、p-mTOR 通路蛋白,提取肾组织中的样品总蛋白,与上样缓冲液按比例混合,煮沸 5 min 后,进行电泳,并将蛋白电转至 PVDF 膜,使用 5% 的脱脂奶粉封闭 1~2 h,然后加入一抗溶液 TBST (AGEs、PDK1、p-Akt、p-mTOR 按照 1:1000 稀释),在 4℃ 条件下震荡过夜,再次洗涤,放入二抗,室内震荡 120 min 后,洗涤,显色成像,使用软件分析蛋白条带灰度值。内参蛋白是 GAPDH。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析处理。计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学观察

如图 1 所示,空白组肾小管结构正常,肾间质未见明显的炎性细胞增生,模型组肾小球上皮细胞变性,肾小管周围明显炎性细胞浸润,肾间质增宽,管腔内可见坏死脱落的上皮细胞,小管空泡变性萎缩;贝那普利组肾间质炎性细胞浸润减少,肾小管上皮细胞肿胀和坏死程度减轻;Exendin-4 各组的肾间质炎性细胞减少,管腔内坏死脱落的上皮细胞减少,小管变性萎缩空泡减少,其中 Exendin-4 中剂量组肾间质偶见炎性细胞,管腔内坏死脱落的上皮细胞明显减少,肾病变改善明显。

2.2 六组大鼠 TG、TC、HDL、LDL、AMY 水平比较

如表 1 所示,模型组、贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠血清 TG、TC、LDL、AMY 水平均高于空白组,HDL 均低于空白组,具有显著性差异($P < 0.05$);贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 TG、TC、LDL、AMY 水平均低于模型组,HDL 均高于模型组,具有显著性差异($P < 0.05$);Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 TG、TC、LDL、AMY 水平均低于贝那普利组,HDL 均高于贝那普利组,具有显著性差异($P < 0.05$);Exendin-4 中和高剂量组大鼠 TG、TC、LDL、AMY 水平均低于 Exendin-4 低剂量组,HDL 均高于 Exendin-4 低剂量组,具有显著性差异($P < 0.05$);Exendin-4 高剂量组大鼠 TG、TC、LDL、AMY 水平均低于 Exendin-4 中剂量组,HDL 均高于 Exendin-4 中剂量组,其中 TC、HDL、LDL、AMY、HDL 具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 六组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平比较

如表 2 所示,模型组、贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平均高于空白组,具有显著性差异($P < 0.05$);贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平均低于模型组,具有显著性差异($P < 0.05$);Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平均低于贝那普利组,具有显著性差异($P < 0.05$);Exendin-4 中和高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平均低于 Exendin-4 低剂量组,具有显著性差异($P < 0.05$);Exendin-4 高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平均低于 Exendin-4 中剂量组,但无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 六组大鼠体重、RI、AGEs、肾小球面积、肾小球直径比较

如表 3 和表 4 所示,模型组、贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组体重、RI、AGEs、肾小球面积、肾小球直径均高于空白组,具有显著性差异 ($P<0.05$);贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠体重、RI、AGEs、肾小球面积、肾小球直径低于模型组,具有显著性差异 ($P<0.05$);Exendin-4

低、中和高剂量组大鼠体重、RI、AGEs、肾小球面积、肾小球直径低于贝那普利组,具有显著性差异 ($P<0.05$);Exendin-4 中、高剂量组大鼠体重、RI、AGEs、肾小球面积、肾小球直径低于 Exendin-4 低剂量组,具有显著性差异 ($P<0.05$);Exendin-4 高剂量组大鼠体重、RI、AGEs、肾小球面积、肾小球直径低于 Exendin-4 中剂量组,其中体重、RI、肾小球面积具有显著性差异 ($P<0.05$)。

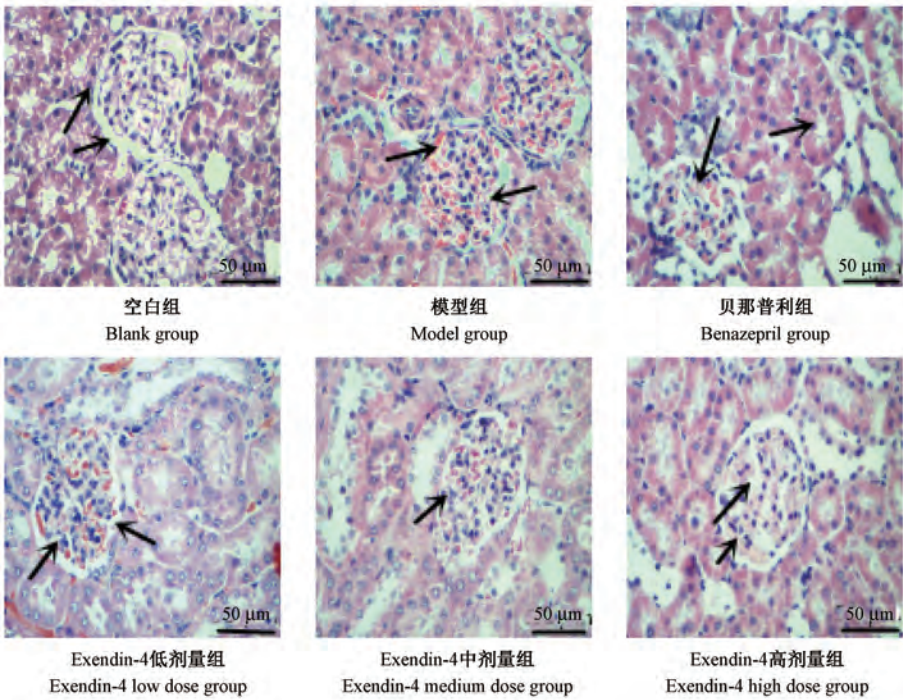


图 1 六组大鼠肾组织损伤情况 HE 染色图

Figure 1 HE staining of renal tissue injury in six groups of rats

表 1 六组大鼠 TG、TC、HDL、LDL、AMY 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 1 Comparison of TG, TC, HDL, LDL and AMY levels in six groups of rats

组别 Groups	总胆固醇 (mmol/L) TG	甘油三酯 (mmol/L) TC	高密度脂蛋白 (mmol/L) HDL	低密度脂蛋白 (mmol/L) LDL	淀粉酶 (U/L) AMY
空白组 Blank group	1.35±0.11	0.93±0.06	2.99±0.15	2.19±0.06	1035.26±536.24
模型组 Model group	19.56±2.56 ¹⁾	3.89±0.15 ¹⁾	1.78±0.12 ¹⁾	4.99±0.15 ¹⁾	5698.35±658.69 ¹⁾
贝那普利组 Benazepril group	18.11±2.33 ¹⁾²⁾	3.75±0.13 ¹⁾²⁾	1.98±0.11 ¹⁾²⁾	4.71±0.12 ¹⁾²⁾	3125.26±625.39 ¹⁾²⁾
Exendin-4 低剂量组 Exendin-4 low dose group	17.21±2.15 ¹⁾²⁾³⁾	3.21±0.11 ¹⁾²⁾³⁾	2.11±0.09 ¹⁾²⁾³⁾	3.86±0.11 ¹⁾²⁾³⁾	2435.26±513.24 ¹⁾²⁾³⁾
Exendin-4 中剂量组 Exendin-4 medium dose group	13.15±1.56 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	2.25±0.06 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	2.55±0.11 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	3.11±0.08 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1835.14±489.36 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
Exendin-4 高剂量组 Exendin-4 high dose group	12.89±1.46 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	2.01±0.08 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	2.89±0.11 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	2.98±0.07 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	1335.24±399.86 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
F	31.980	82.449	166.574	77.992	88.409
P	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000

注:与空白组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与贝那普利组相比,³⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 低剂量组相比,⁴⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 中剂量组相比,⁵⁾ $P<0.05$ 。
Note. Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with benazepril group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 low dose group, ⁴⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 medium dose group, ⁵⁾ $P<0.05$.

2.5 六组大鼠肾组织 PDK1/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达量比较

如表 5、图 2 所示,模型组、贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量均高于空白组,具有显著性差异 ($P<0.05$);贝那普利组、Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量低于模型

组,具有显著性差异 ($P<0.05$);Exendin-4 低、中和高剂量组大鼠 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量低于贝那普利组,具有显著性差异 ($P<0.05$);Exendin-4 中和高剂量组大鼠 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量低于 Exendin-4 低剂量组,具有显著性差异 ($P<0.05$);Exendin-4 高剂量组大鼠 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达量低于 Exendin-4 中剂量组,但差异无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 2 六组大鼠 BG、HbA1c、FINS 水平比较($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 2 Comparison of BG, HbA1c and FINS levels in six groups of rats

组别 Groups	血糖 (mmol/L) BG	糖化血红蛋白 (%) HbA1c	空腹血清胰岛 (μU/mL) FINS
空白组 Blank group	8.62±1.26	28.46±3.11	15.26±2.13
模型组 Model group	29.88±1.89 ¹⁾	37.89±3.26 ¹⁾	33.69±6.88 ¹⁾
贝那普利组 Benazepril group	21.56±3.11 ¹⁾²⁾	33.15±3.15 ¹⁾²⁾	29.88±4.15 ¹⁾²⁾
Exendin-4 低剂量组 Exendin-4 low dose group	19.88±2.15 ¹⁾²⁾³⁾	30.11±2.10 ¹⁾²⁾³⁾	26.15±3.12 ¹⁾²⁾³⁾
Exendin-4 中剂量组 Exendin-4 medium dose group	12.56±1.15 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	29.88±2.56 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	19.51±2.13 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
Exendin-4 高剂量组 Exendin-4 high dose group	12.11±1.21 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	29.16±2.11 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	19.01±1.89 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
<i>F</i>	42.118	9.418	11.515
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

注:与空白组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与贝那普利组相比,³⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 低剂量组相比,⁴⁾ $P<0.05$ 。
Note. Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with benazepril group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 low dose group, ⁴⁾ $P<0.05$.

表 3 六组大鼠体重、RI 比较($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 3 Comparison of weight, RI in six groups of rats

组别 Groups	给药前体重 (g) Quality before administration	给药结束体重 (g) End body mass	肾脏指数 RI
空白组 Blank group	219.12±8.65	244.36±8.67	0.21±0.02
模型组 Model group	221.52±9.02	296.95±8.34 ¹⁾	0.59±0.11 ¹⁾
贝那普利组 Benazepril group	215.96±7.98	265.69±8.29 ¹⁾²⁾	0.42±0.09 ¹⁾²⁾
Exendin-4 低剂量组 Exendin-4 low dose group	221.09±7.46	284.36±7.36 ¹⁾²⁾³⁾	0.38±0.02 ¹⁾²⁾³⁾
Exendin-4 中剂量组 Exendin-4 medium dose group	221.09±7.36	276.34±8.15 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.25±0.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
Exendin-4 高剂量组 Exendin-4 high dose group	219.46±7.15	263.25±8.16 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	0.24±0.02 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
<i>F</i>	0.611	45.135	15.295
<i>P</i>	0.692	0.000	0.001

注:与空白组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与贝那普利组相比,³⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 低剂量组相比,⁴⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 中剂量相比,⁵⁾ $P<0.05$ 。
Note. Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with benazepril group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 low dose group, ⁴⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 medium dose group, ⁵⁾ $P<0.05$.

表 4 六组大鼠 AGEs、肾小球面积、肾小球直径比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 4 Comparison of AGEs, glomerular area and glomerular diameter among the six groups

组别 Groups	晚期糖基化终末产物 AGEs	肾小球面积(unit) Glomerular area	肾小球直径(μm) Renal didiameter
空白组 Blank group	0.68±0.21	74.15±9.89	91.26±5.46
模型组 Model group	1.87±0.48 ¹⁾	119.45±12.22 ¹⁾	121.56±11.22 ¹⁾
贝那普利组 Benazepril group	1.05±0.35 ¹⁾²⁾	101.01±10.21 ¹⁾²⁾	114.33±10.25 ¹⁾²⁾
Exendin-4 低剂量组 Exendin-4 low dose group	1.38±0.47 ¹⁾²⁾³⁾	98.02±9.88 ¹⁾²⁾³⁾	110.12±9.89 ¹⁾²⁾³⁾
Exendin-4 中剂量组 Exendin-4 medium dose group	0.95±0.41 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	81.25±7.89 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	95.21±8.11 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
Exendin-4 高剂量组 Exendin-4 high dose group	0.59±0.28 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	79.88±7.45 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	94.11±8.26 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
<i>F</i>	14.140	12.967	10.927
<i>P</i>	0.000	0.001	0.001

注:与空白组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与贝那普利组相比,³⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 低剂量组相比,⁴⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 中剂量相比,⁵⁾ $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with benazepril group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 low dose group, ⁴⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 medium dose group, ⁵⁾ $P<0.05$.

表 5 六组大鼠肾组织 PDK1/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 5 Comparison of PDK1/Akt/mTOR signal pathway protein expression in six groups of rats

组别 Groups	磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 PDK1	磷酸化 Akt p-Akt	磷酸化 mTOR p-mTOR
空白组 Blank group	1.01±0.03	0.98±0.03	1.05±0.02
模型组 Model group	2.89±0.02 ¹⁾	2.56±0.11 ¹⁾	2.45±0.10 ¹⁾
贝那普利组 Benazepril group	2.45±0.03 ¹⁾²⁾	2.31±0.03 ¹⁾²⁾	2.22±0.11 ¹⁾²⁾
Exendin-4 低剂量组 Exendin-4 low dose group	2.01±0.01 ¹⁾²⁾³⁾	1.56±0.01 ¹⁾²⁾³⁾	1.58±0.06 ¹⁾²⁾³⁾
Exendin-4 中剂量组 Exendin-4 medium dose group	1.25±0.02 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.12±0.05 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.22±0.01 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
Exendin-4 高剂量组 Exendin-4 high dose group	1.24±0.01 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.11±0.01 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.21±0.03 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾
<i>F</i>	234.638	62.359	61.777
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

注:与空白组相比,¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比,²⁾ $P<0.05$;与贝那普利组相比,³⁾ $P<0.05$;与 Exendin-4 低剂量组相比,⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note. Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with benazepril group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with Exendin-4 low dose group, ⁴⁾ $P<0.05$.

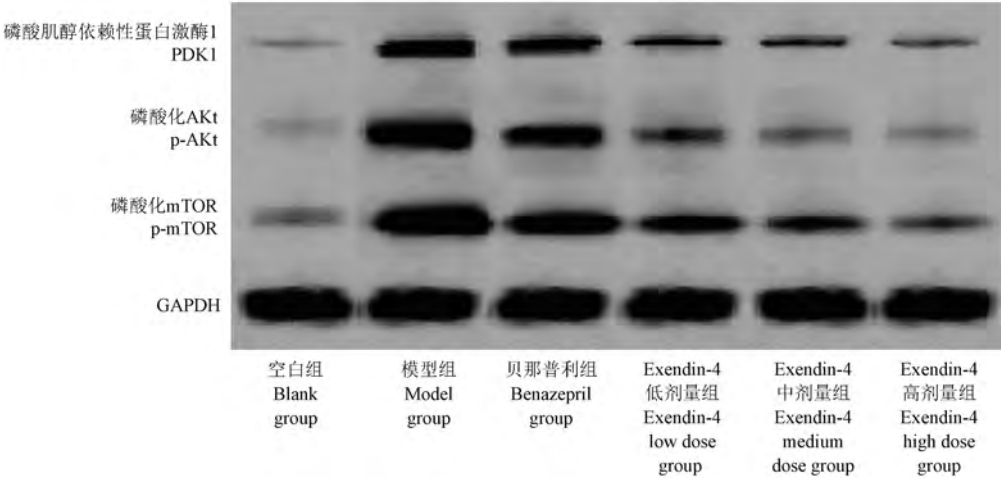


图 2 肾组织中 PDK1/Akt/mTOR 通路蛋白 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白 Western blot 图

Figure 2 Western blot of PDK1/Akt/mTOR pathway protein PDK1, p-Akt, p-mTOR protein in renal tissue

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病患者进行肾移植常见原因,其病理特点为肾小球大量堆积、肾小管底膜增厚,导致肾小球硬化、肾小管纤维化,直至肾功能衰竭^[8-10]。

Exendin-4 能够通过抑制胰高血糖素的分泌,延缓胃排空和食物的摄取量,进而减轻体重,本研究显示,与糖尿病肾病模型组相比,给予不同剂量的 Exendin-4 可明显减轻糖尿病肾病大鼠的体重,且呈 Exendin-4 剂量依赖性减低趋势,进一步佐证 Exendin-4 可减轻体重。研究表明,Exendin-4 可抑制 TNF- α 诱导的系膜细胞氧化应激和 TGF- β 1 表达^[11],另外,Exendin-4 能够激活 PPAR- α 受体,减少载脂蛋白的合成,进而增加血浆中的脂肪降解和清除力度来调节脂代谢紊乱^[12-13]。Exendin-4 能够通过增加胰岛 β 细胞对葡萄糖的敏感性,促进血糖胰岛素的分泌,改善糖代谢及脂代谢紊乱^[14-15]。本研究显示,Exendin-4 中、高剂量组大鼠 TG、TC、LDL、AMY 水平均低于 Exendin-4 低剂量组,且 Exendin-4 高剂量组大鼠 TG、TC、LDL 水平均低于 Exendin-4 中剂量组,HDL 的变化趋势相反,该结果表明,Exendin-4 可有效降低糖尿病肾病大鼠血液的 TG、TC、LDL、AMY 水平,提高 HDL,且呈 Exendin-4 剂量依赖性趋势,可见 Exendin-4 在改善脂代谢紊乱具有明确的效果。研究表明,Exendin-4 可明显抑制 TNF- α 诱导的系膜细胞 MCP-1 mRNA 的表达,并以剂量和时间依赖的方式抑制 TNF- α 诱导的系膜细胞培养上清内 MCP-1、FN 的含量,提示 Exendin-4 可能会对肾具有一定保护作用^[16]。本研究显示 Exendin-4 可显著降低糖尿病肾病大鼠 RI、肾小球面积、肾小球直径,提示 Exendin-4 可改善肾功能。HbA1c 能够衡量血糖控制情况的重要指标,其可作为临床评定糖尿病病情及治疗预后的重要诊断依据^[17]。本研究显示,Exendin-4 中、高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS、AGEs 水平均低于 Exendin-4 低剂量组,且 Exendin-4 高剂量组大鼠 BG、HbA1c、FINS、AGEs 水平均低于 Exendin-4 中剂量组,该结果表明,Exendin-4 能够有效改善各组大鼠的血糖水平,可用于改善糖尿病肾病的糖代谢紊乱。

PDK1 作为 PI3K 信号通路的重要传导分子,是

AGC 蛋白激酶家族的一个苏氨酸激酶,其与 PIP3 的结合能够激活 Akt 等激酶,并且能够通过调节 AGC 蛋白控制细胞的应答,在细胞的生长增殖和存活中发挥着重要作用^[18-19]。p-mTOR 属于 PIKK 家族中的一员,其对调节细胞周期、蛋白质的合成发挥着重要的作用,在糖尿病发生时,高血糖能够激活 Akt 而增加 mTOR 的活性,mTOR 活性增加会促进肾小球和肾小管肥大^[20-21]。本研究显示,不同剂量 Exendin-4 干预大鼠,大鼠的 PDK1、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达呈现与 Exendin-4 剂量负相关的趋势,可见 Exendin-4 可在一定程度上通过调节 PDK1、p-Akt、p-mTOR 表达达到治疗糖尿病肾病的目的。类似的报道,如 Vasu 等^[22]认为 Exendin-4 作为多肽,可通过调节 PDK1 蛋白表达来降低高脂饮食诱导的 β 细胞增殖和凋亡。Zhang 等^[23]通过免疫印迹方法显示,给衰老的成骨细胞 Exendin-4 干预,Exendin-4 通过调节 p-Akt 表达,促进衰老成骨细胞的增殖,进而可用于预防老年性骨质疏松症。Yu 等^[24]研究认为 Exendin-4 可通过调节 mTOR 表达来缓和葡萄糖对心肌细胞的毒性作用。

综上所述,Exendin-4 能够减轻 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠的炎症水平,改善其血糖、血脂水平,其作用机制可能与 PDK1/Akt/mTOR 通路受到抑制有关,为临床上治疗糖尿病肾病等其他炎症病症提供了新的方向。

参考文献:

- [1] 赵黎君. 代谢组学在糖尿病肾病研究中的应用进展 [J]. 重庆医学, 2019, 48(17): 2996-3000.
- [2] 蒋坚, 贾晓玲, 邓志丹, 等. 血清胎球蛋白 A 对糖尿病肾病早期诊断的临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(18): 4426-4429.
- [3] Wu X, Liang W, Guan H, et al. Exendin-4 promotes pancreatic β -cell proliferation via inhibiting the expression of Wnt5a [J]. Endocrine, 2017, 55(2): 398-409.
- [4] Rocha-Ferreira E, Poupon L, Zelco A, et al. Neuroprotective exendin-4 enhances hypothermia therapy in a model of hypoxic-ischaemic encephalopathy [J]. Brain, 2018, 141(10): 2925-2942.
- [5] Han F, Xue M, Chang Y, et al. Triptolide suppresses glomerular mesangial cell proliferation in diabetic nephropathy is associated with inhibition of PDK1/Akt/mTOR pathway [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(10): 1266-1275.

- [6] Xue R, Zhai R, Xie L, et al. Xuesaitong protects podocytes from apoptosis in diabetic rats through modulating PTEN-PDK1-Akt-mTOR pathway [J]. *J Diabetes Res*, 2020(1): 9309768.
- [7] 邵晓丽, 余江毅, 倪卫惠. 芪葵颗粒对 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用及机制研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(10): 2437-2440.
- [8] 王爱雪, 许珊珊, 张丽英. 2 型糖尿病肾病患者血清胎盘生长因子水平及其影响因素分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(18): 90-94.
- [9] 王蕴倩, 薛磊, 李慧聪, 等. miR-92a-3p 靶向 GPR124 调控糖尿病肾病足细胞损伤的机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(19): 4789-4793.
- [10] 陈慧, 华文进. 视黄醇结合蛋白和脂联素与老年糖尿病肾病患者肾损伤的关系 [J]. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(8): 861-863.
- [11] Kaeppli SAM, Schibli R, Mindt TL, Behe M. Comparison of desferrioxamine and NODAGA for the gallium-68 labeling of exendin-4 [J]. *EJNMMI Radiopharm Chem*, 2019, 4(1): 9.
- [12] Fudim M, White J, Pagidipati NJ, et al. Effect of once-weekly exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus with and without heart failure and heart failure-related outcomes: insights from the EXSCEL trial [J]. *Circulation*, 2019, 140(20): 1613-1622.
- [13] Gao M, Liu D. Controlling obesity and metabolic diseases by hydrodynamic delivery of a fusion gene of exendin-4 and $\alpha 1$ antitrypsin [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13427.
- [14] 陈思, 文进, 李方方, 等. Exendin-4 促进小鼠脂肪干细胞向成骨细胞分化 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(8): 1152-1156.
- [15] 张启财, 张赛, 王永阁, 等. Exendin-4 对颅脑创伤大鼠认知功能及 Nrf2 信号通路的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(1): 33-37.
- [16] 赵飞, 徐会友, 马柯, 等. Exendin-4 对成年小鼠脑室下区神经干细胞分化作用的体外研究 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(3): 262-267.
- [17] Yahagi N. Fingertip screen using POCT hbA1c analyzer at community pharmacies is effective for early recognition of diabetes [J]. *Rinsho Byori*, 2016, 64(5): 564-566.
- [18] 姚莎莎, 尚文雯, 徐睿, 等. 沉默 PDK1 基因抑制卵巢癌细胞系 SKOV3 的增殖及侵袭 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(10): 1381-1387.
- [19] 孙晓璐, 王乐, 袁卫平, 等. PDK1 在内皮细胞向造血细胞转换中的作用研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(9): 709-716.
- [20] 沈莹, 柳湘洁, 雷超, 等. 黄芪总苷通过介导 mTOR 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞自噬和凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(9): 1620-1624.
- [21] 庄欣琪, 蒋毅, 杨曼, 等. mTOR-自噬通路对脓毒症小鼠海马小胶质细胞表型的影响 [J]. *天津医药*, 2019, 47(7): 705-708.
- [22] Vasu S, Ojo OO, Moffett RC, et al. Anti-diabetic actions of esculentin-2Cha (1-30) and its stable analogues in a diet-induced model of obesity-diabetes [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(10): 1705-1717.
- [23] Zhang M, Xie Y, Zhou Y, et al. Exendin-4 enhances proliferation of senescent osteoblasts through activation of the IGF-1/IGF-1R signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 300-306.
- [24] Yu W, Zha W, Ren J. Exendin-4 and liraglutide attenuate glucose toxicity-induced cardiac injury through mTOR/ULK1-dependent autophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(4): 5396806.

[收稿日期] 2019-12-31

郑媛, 付鹤玲, 侯道荣, 等. 解偶联蛋白 1 敲除加剧异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (9): 59–63.

Zheng Y, Fu HL, Hou DR, et al. Uncoupling protein 1 knockout aggravates isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 59–63.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 009

解偶联蛋白 1 敲除加剧异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构

郑媛, 付鹤玲, 侯道荣, 尹媛, 鲍丹*

(南京医科大学医药实验动物中心, 南京 210000)

【摘要】目的 探究解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, *Ucp1*) 基因敲除对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构的长期影响。**方法** 分别对 2 月龄野生型大鼠和 *Ucp1* 基因敲除大鼠腹腔注射生理盐水或异丙肾上腺素 (30 mg/(kg · d), 连续 3 d) 建立大鼠心肌重构模型; 于注射后 1 个月, 分别对野生型大鼠和 *Ucp1* 基因敲除大鼠进行 M 型超声心动图、血清心肌损伤标志物乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和肌酸激酶同工酶 MB (creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB) 检测及病理组织学表型分析。**结果** 生理盐水组, *Ucp1* 基因敲除大鼠和野生型大鼠的心脏形态结构、功能和血清中 CK-MB 水平无明显差别。模型组, 与野生型大鼠相比, *Ucp1* 基因敲除大鼠心脏呈现显著的室壁变薄和心收缩功能减退的表型; 血清中 LDH 和 CK-MB 水平显著升高; 心肌细胞排列紊乱和间质纤维化程度更加严重。**结论** *Ucp1* 敲除加剧了异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构病理表型, *Ucp1* 可能是参与该病理进程的重要调控基因之一。

【关键词】 *Ucp1*; 心肌重构; 超声心动图

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0059-05

Uncoupling protein 1 knockout aggravates isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats

ZHENG Yuan, FU Heling, HOU Daorong, YIN Yuan, BAO Dan*
(Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China)

【Abstract】 Objective To explore the long-term effects of uncoupling protein 1 (*Ucp1*) knockout on isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats. **Methods** To establish the myocardial remodeling models, saline or isoproterenol was administered intraperitoneally at 30 mg/kg once per day for 3 consecutive days in wild-type (WT) and *Ucp1* knockout (*Ucp1*^{-/-}) rats at 2 months of age. The phenotype analysis of the WT and *Ucp1*^{-/-} rats was analyzed using M-mode echocardiography, the serum markers of myocardial injury lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), and histopathological examination at 1 month after the saline or isoproterenol administration. **Results** In the saline group, the echocardiographic parameters, serum marker of myocardial injury CK-MB, and fibrosis were comparable between the WT and *Ucp1*^{-/-} rats. In the model group, *Ucp1*^{-/-} rats had thin-walled ventricles and decreased cardiac

【基金项目】 江苏省自然科学基金 (青年基金项目) (BK20171046)。

【作者简介】 郑媛 (1983—), 女, 硕士。研究方向: 心血管动物模型的表型分析。Email: yuanzheng@njmu.edu.cn

【通信作者】 鲍丹 (1987—), 女, 博士。研究方向: 心血管相关动物模型的建立与相关调节基因功能分析及分子机制研究。
Email: jndwbaodan@njmu.edu.cn

function, and had higher serum LDH and CK-MB levels and more serious myocardial disarray and fibrosis in the heart tissue compared with WT rats. **Conclusions** *Ucp1* knockout aggravates isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats. *Ucp1* may be an important modifier gene of myocardial remodeling.

【Keywords】 *Ucp1*; myocardial remodeling; echocardiography

解偶联蛋白(uncoupling proteins, UCPs)是阴离子载体蛋白超家族的成员之一,位于线粒体内膜,参与线粒体膜电位的调控^[1]。UCPs 的发现,提出了质子泄漏学说^[2],即在正常情况下线粒体内膜存在一定程度的质子泄漏,使线粒体内膜的跨膜质子梯度减低,以致刺激线粒体呼吸的质子驱动力降低,使线粒体呼吸链氧化磷酸化解偶联,导致 ATP 数量减少,能量以热能的形式释放。研究发现,UCPs 可减少线粒体氧化磷酸化过程中 ROS 的产生^[3]。

UCP1,又称产热素,是第一个被发现的 UCPs,主要在哺乳动物棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)中表达^[4]。UCP1 和(或)BAT 被激活后,棕色脂肪细胞会消耗葡萄糖和脂质,将能量从葡萄糖和游离脂肪酸氧化转换成热量^[5]。这种独特的代谢产热方式,使 UCP1 和 BAT 成为肥胖和 2 型糖尿病治疗的研究热点^[6]。

本实验室的前期研究发现,UCP1 在大鼠心脏组织中表达,并在异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌重构模型^[7]大鼠心脏组织中表达显著升高;*Ucp1* 基因敲除导致心室壁和心收缩功能在 ISO 诱导的心肌重构急性期显著增加,但 *Ucp1* 基因敲除对心肌重构的长期影响仍未知。因此,本文旨在通过已建立的 *Ucp1* 基因敲除大鼠(*Ucp1*^{-/-})分析 *Ucp1* 基因敲除后对 ISO 诱导的心肌重构的长期影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用 *Ucp1*^{-/-} 大鼠由中国医学科学院医学实验动物研究所制作,同时敲除大鼠培育过程中使用的 SD 大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2019-0011],大鼠饲养于南京医科大学医药实验动物中心屏障设施的饲养间[SYXK(苏)2020-0022],饲养间温度(23±2)℃,12 h/12 h 明/暗灯照,动物自由饮水和摄食。实验中所使用的实验动物为野生型(雌雄各 6 只)和 *Ucp1*^{-/-}(雌雄各 6 只)清洁级 SD 大鼠,8 周龄,体重约 250 g。实验中涉及动物操作程序均遵循 3R 原

则并已取得南京医科大学实验动物福利伦理审查委员会的批准(IACUC-1704011)。

1.2 主要试剂与仪器

ISO(I6504)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)生化检测试剂(990-63193)购自日本和光纯药工业株式会社;肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)生化检测试剂(H007 T)购自中国美康生物科技股份有限公司;小动物超声(Vevo 2100)购自加拿大 VisualSonics 公司;全自动血生化分析仪(7100)购自日本日立公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ISO 诱导心肌重构大鼠模型

选用 2 月龄野生型(wild type, WT)大鼠和 *Ucp1*^{-/-} 大鼠腹腔注射生理盐水或 ISO(30 mg/(kg·d),连续 3 d)建立大鼠心肌重构模型。大鼠随机分成 4 组:WT 生理盐水组、*Ucp1*^{-/-} 生理盐水组、WT-ISO 组和 *Ucp1*^{-/-}-ISO 组(*n*=6)。

1.3.2 M 型超声心动图检测大鼠心脏的形态结构和功能

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行 M 型超声心动图检测。大鼠经 1.5% 异氟烷气体麻醉,脱胸前区被毛,仰卧固定于加热板上,以保持体温,四肢固定,选用 MS250 的探头,进行心脏超声影像分析^[8]。

1.3.3 大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 水平的检测

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,大鼠经 4% 异氟烷气体麻醉,打开腹腔,钝性分离暴露腹主动脉,从腹主动脉分别采集 4 组大鼠 3 mL 外周血,室温放置 1 h 后,3000 r/min,4℃ 离心 10 min,获取血清。利用全自动血生化分析仪测定 LDH 和 CK-MB 水平。

1.3.4 病理组织学观察大鼠的心肌细胞形态和间质纤维化

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,二氧化碳法处死大鼠,打开胸腔取出心脏,将心脏组织固定在中性福尔马林 24 h 后进行修块、脱水、包埋、切片、苏木素-伊红(haematoxylin-eosin, HE)染色和 Masson 染色,镜下观察。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据运用 SPSS 16.0 统计学软件处理分析。如果数据符合正态分布,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,若组间差异有统计学意义,进一步采用 Tukey's post-hoc 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 Ucp1 基因敲除加剧了 ISO 诱导的急性心肌缺血模型大鼠左心室的不利重构

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行 M 型超声心动图检测。结果显示,生理盐水组,与 WT 大鼠相比, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室收缩末期后壁厚度显著减小了 11.63% ($P<0.01$,图 1A),左心室内径呈增大且心收缩功能下降的趋势。ISO 组 WT 大鼠左心室收缩末期前壁厚度显著增加了 37.07% ($P<0.001$),说明 WT 大鼠仍处于 ISO 诱导的室壁肥厚代偿期;而 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室收缩末期前壁厚度未显著增加,且与 WT 大鼠相比, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室收缩末期前壁厚度显著减小了 14.10% ($P<0.05$,图 1B),说明 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠已由代偿期向失

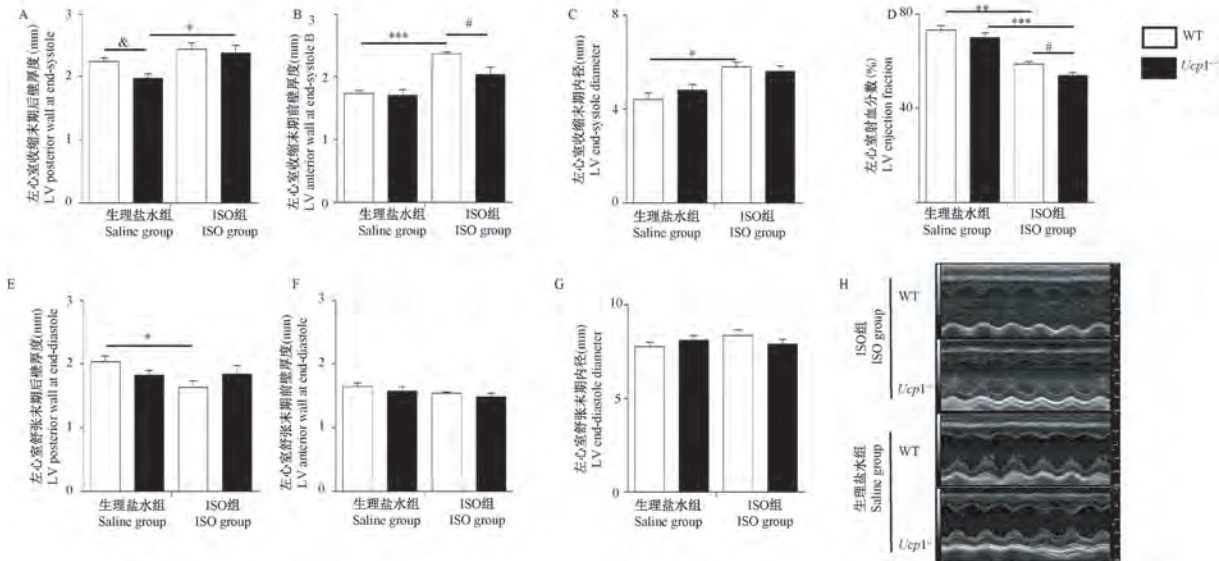
代偿期转换。再者,ISO 的诱导导致 WT 大鼠和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室射血分数均显著降低($P<0.01$, $P<0.001$),且 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠的左心室射血分数显著低于 WT 大鼠($P<0.05$),说明 $Ucp1$ 基因敲除显著加剧了 ISO 诱导的心收缩功能减退(图 1C~H)。

2.2 Ucp1 基因敲除升高了 ISO 诱导的急性心肌缺血模型大鼠血清中心肌损伤标志物水平

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行血清 LDH 和 CK-MB 水平的检测。结果显示,生理盐水组,与 WT 大鼠相比, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 LDH 水平显著升高($P<0.05$,图 2A)。ISO 组与生理盐水组相比,WT 和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 LDH 水平均显著升高($P<0.05$,图 2A); $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 CK-MB 水平显著升高($P<0.01$,图 2B)。此外,ISO 注射后 1 个月, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 LDH 和 CK-MB 水平均显著高于 WT 大鼠($P<0.01$, $P<0.05$,图 2B)。

2.3 Ucp1 基因敲除加剧了 ISO 诱导的急性心肌缺血模型大鼠的病理组织学表型

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行心脏病理组织学表型分析。结果显示,生理盐水组,WT 大鼠和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠心肌细胞排列和间质纤维化程度无显著差别。ISO 组与 WT 大鼠相



注:A:左心室收缩末期后壁厚度;B:左心室收缩末期前壁厚度;C:左心室收缩末期内径;D:左心室射血分数;E:左心室舒张末期后壁厚度;F:左心室舒张末期前壁厚度;G:左心室舒张末期内径;H:M型超声心动图图片。与WT大鼠相比,& $P<0.05$;与同一品系生理盐水组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与WT大鼠ISO组相比,# $P<0.05$ 。

图1 ISO 诱导后 1 个月 WT 和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠心脏 M 型超声心动图分析

Note. A, Echocardiographic parameters of left ventricular (LV) posterior wall at end-systole. B, LV anterior wall at end-systole. C, LV end-systole diameter. D, LV ejection fraction. E, LV posterior wall at end-diastole. F, LV anterior wall at end-diastole. G, LV end-diastole diameter. H, Image of M-type echocardiography. Compared with WT rats, & $P<0.05$. Compared with saline treatment of the same strain, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with ISO treatment in WT rats, # $P<0.05$.

Figure 1 M-mode echocardiography analysis of WT and $Ucp1^{-/-}$ rats at 1 month after ISO administration

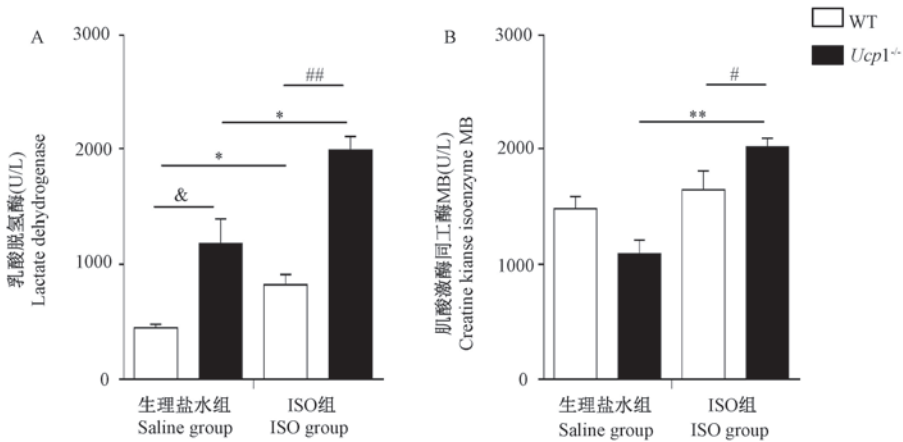
比, *Ucp1*^{-/-}大鼠心肌细胞排列紊乱(图 3A、B)和间质纤维化(图 3C)程度更加严重。

3 讨论

在对 ISO 诱导的大鼠心肌重构模型的长期观察过程中, 本研究发现, *Ucp1* 基因敲除显著加剧了 ISO 诱导的大鼠心脏的病理进程发展。具体表现为: ISO 诱导后 1 个月, 与 WT 大鼠相比, *Ucp1*^{-/-}大鼠左心室室壁厚度显著变薄、射血分数显著降低; 血清中心

肌损伤标志物 LDH 和 CK-MB 水平显著增高; 心肌细胞排列紊乱和间质纤维化程度更加严重。

UCP1 主要在哺乳动物 BAT 中表达。心肌细胞损伤发生后, 交感神经激活, 去甲肾上腺素释放^[9], 合并利尿肽释放^[10], 这些分子均是 BAT 生长和激活的重要影响因子。ISO 是 β 肾上腺素能受体的一种非选择性的激动剂, 被广泛地运用于心肌肥厚和心力衰竭的动物模型的构建^[11]。ISO 诱导的动物模型心脏组织的病理学和形态改变被认为是最接

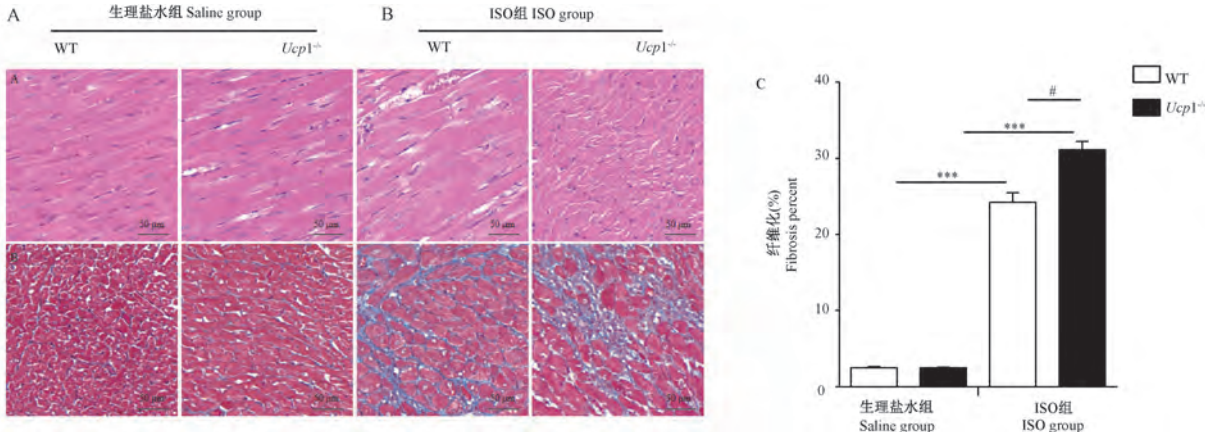


注: A: 血清乳酸脱氢酶; B: 肌酸激酶同工酶 MB。与 WT 大鼠相比, $\&P<0.05$; 与同一品系生理盐水组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与 WT 大鼠 ISO 组相比, $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$ 。

图 2 ISO 诱导后 1 个月 WT 和 *Ucp1*^{-/-}大鼠血清中心肌损伤标志物水平检测

Note. A, Serum marker of myocardial injury of lactate dehydrogenase (LDH). B, Creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB). Compared with WT rats, $\&P<0.05$. Compared with saline treatment of the same strain, $*P<0.05$, $**P<0.01$. Compared with ISO treatment in WT rats, $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$.

Figure 2 Serum marker of myocardial injury analysis of WT and *Ucp1*^{-/-} rats after ISO administration 1 month



注: A: 左心室 HE 染色观察; B: 左心室 Masson 染色观察; C: ImageJ 软件定量纤维化的相对水平。与同一品系生理盐水组相比, $***P<0.001$; 与 WT 大鼠 ISO 组相比, $\#P<0.05$ 。

图 3 ISO 诱导后 1 个月 WT 和 *Ucp1*^{-/-}大鼠病理组织学表型分析

Note. A, Magnification of HE-stained sections. B, Masson trichrome-stained sections of left ventricle. C, Quantitative analysis of the level of fibrosis using ImageJ software. Compared with WT rats, $\&P<0.05$. Compared with saline treatment of the same strain, $***P<0.001$. Compared with ISO treatment in WT rats, $\#P<0.05$.

Figure 3 Histopathological phenotyping analysis of WT and *Ucp1*^{-/-} rats after ISO administration 1 month

近临床上心脏病人的体征的。因此,本研究选用 ISO 构建大鼠心肌重构模型以及前期建立的 *Ucp1*^{-/-} 大鼠来明确 *Ucp1* 基因敲除对缺血性心脏疾病的长期影响是具有理论支撑和科学可行性的。

本研究发现,*Ucp1* 基因敲除后,生理盐水组,与 WT 大鼠相比,*Ucp1*^{-/-} 大鼠血清 LDH 水平显著升高,说明 *Ucp1* 基因敲除在生理状况下可能对心肌就存在一定的损伤刺激;此外,*Ucp1* 基因敲除后,ISO 诱导的大鼠心肌重构长期病理表型亦显著加剧,上述表型改变可能跟 *Ucp1* 基因敲除后 BAT 功能障碍相关。已有研究证实 BAT 的生物学功能受 *Ucp1* 的调控^[12],*Ucp1*^{-/-} 小鼠 BAT 激活能力受损^[13]。此外,现有研究发现,BAT 及其相关组织还具有调节多种心血管风险因子的功能。血管周周和心外膜脂肪组织(类似 BAT^[14])参与动脉粥样硬化和血压的调节^[15]。体外稳转 *Ucp1* 的 H9C2 细胞可抵抗缺氧/再氧化的损伤,提高心肌细胞的存活率,保留线粒体正常的结构和功能,减少缺氧后 ROS 的产生^[16];转基因过表达 *Ucp1* 的小鼠也可抵抗缺血/再灌注的损伤,显著改善再灌注阶段心功能的恢复^[17]。现有研究结果和本研究结果从正反两方面共同验证了 UCP1 的心脏保护性作用,但其潜在的分子机制仍需大量的后续研究证实。

综上所述,*Ucp1* 基因敲除会加剧 ISO 诱导的心肌重构的长期病理表型,增加 UCP1 的表达对缺血性心脏病具有保护作用,这为临床上防治药物的研发提供了理论和实验依据。

参考文献:

- [1] Laskowski KR, Russell RR. Uncoupling proteins in heart failure [J]. Curr Heart Fail Rep, 2008, 5(2): 75-79.
- [2] Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak [J]. Physiology (Bethesda), 2011, 26(3): 192-205.
- [3] Akhmedov AT, Rybin V, Marin-Garcia J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart [J]. Heart Fail Rev, 2015, 20(2): 227-249.
- [4] Porter C. Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue [J]. Adipocyte, 2017, 6(2): 167-174.
- [5] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance [J]. Physiol Rev, 2004, 84(1): 277

- 359.
- [6] Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond [J]. Cell Metab, 2019, 29(1): 27-37.
- [7] Li Y, Feng J, Mo Y, et al. Concordance between cardio-protective effect on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia and phenolic content of different extracts of Curcuma aromatica [J]. Pharm Biol, 2016, 54(12): 3226-3231.
- [8] Guan F, Yang X, Li J, et al. New molecular mechanism underlying myc-mediated cytochrome P450 2E1 upregulation in apoptosis and energy metabolism in the myocardium [J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(1): e009871.
- [9] Manfrini O, Morgagni G, Pizzi C, et al. Changes in autonomic nervous system activity: spontaneous versus balloon-induced myocardial ischaemia [J]. Eur Heart J, 2004, 25(17): 1502-1508.
- [10] Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, et al. Acute changes in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(10): 1988-1995.
- [11] Zuo Z, Ji MY, Zhao K, et al. CD47 deficiency attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling in mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7121763.
- [12] Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat [J]. Physiol Rev, 1984, 64(1): 1-64.
- [13] Meyer CW, Willershauser M, Jastroch M, et al. Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010, 299(5): R1396-R1406.
- [14] Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations [J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(2): e000582.
- [15] Chang L, Milton H, Eitzman DT, et al. Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension [J]. Circ J, 2013, 77(1): 11-18.
- [16] Bienengraeber M, Ozcan C, Terzic A. Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(7): 861-865.
- [17] Hoerter J, Gonzalez-Barroso MD, Couplan E, et al. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage [J]. Circulation, 2004, 110(5): 528-533.

[收稿日期] 2020-11-16

赵美英, 史文倩, 汪桂青. 长链非编码 RNA 生长抑制特异因子 5 调控微小 RNA-137 对 A β 诱导大鼠海马神经元损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 64–71.

Zhao MY, Shi WQ, Wang GQ. Effects of microRNA-137, regulated by long non-coding RNA growth arrest-specific 5, on A β -induced hippocampal neuronal damage in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 64–71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 010

长链非编码 RNA 生长抑制特异因子 5 调控微小 RNA-137 对 A β 诱导大鼠海马神经元损伤的影响

赵美英, 史文倩, 汪桂青*

(郑州大学附属郑州中心医院老年科, 郑州 450007)

【摘要】 目的 探究长链非编码 RNA(LncRNA)生长抑制特异因子 5(GAS5)调控微小 RNA(miR)-137 对淀粉样 β 蛋白(A β)诱导的大鼠海马神经元损伤的影响。**方法** 实验分为对照(control)组、A β 组、A β +si-NC 组、A β +si-GAS5 组、A β +si-GAS5+anti-miR-NC组、A β +si-GAS5+anti-miR-137 组, 每组 10 只。Y 迷宫法检测大鼠学习记忆力;实时荧光定量逆转录多聚酶链反应(RT-qPCR)检测海马 CA1 区 GAS5、miR-137 水平;蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测海马 CA1 区 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白(BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase3)蛋白水平;尼氏染色观察神经元形态;Tunel 染色观察大鼠神经元凋亡情况;双荧光素酶鉴定 miR-137 与 GAS5 的靶向关系。**结果** 与对照组相比,A β 组、A β +si-NC 组海马 CA1 区 GAS5 mRNA 水平,BAX、caspase3 蛋白水平,神经元死亡率、凋亡率升高($P<0.05$),正确反应次数比例、学会次数比例,miR-137 水平、Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与 A β 组、A β +si-NC 组相比,A β +si-GAS5 组、A β +si-GAS5+anti-miR-NC组海马 CA1 区 GAS5 mRNA 水平,BAX、caspase3 蛋白水平,神经元死亡率、凋亡率降低($P<0.05$),正确反应次数比例、学会次数比例,miR-137 水平、Bcl2 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 A β +si-GAS5 组、A β +si-GAS5+anti-miR-NC组相比,A β +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CA1 区 GAS5 mRNA 水平,BAX、caspase3 蛋白水平,神经元死亡率、凋亡率升高($P<0.05$),正确反应次数比例、学会次数比例,miR-137 水平、Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$)。经验证,miR-137 与 GAS5 之间存在靶位点。**结论** 干扰 GAS5 可上调 miR-137 从而保护 A β 诱导的大鼠海马神经元损伤,缓解神经元凋亡过程;而进一步下调 miR-137 可逆转上述过程。

【关键词】 长链非编码 RNA 生长抑制特异因子 5;微小 RNA-137;淀粉样 β 蛋白;大鼠;海马神经元损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0064-08

Effects of microRNA-137, regulated by long non-coding RNA growth arrest-specific 5, on A β -induced hippocampal neuronal damage in rats

ZHAO Meiyang, SHI Wenqian, WANG Guiqing*

(Department of Geriatrics, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microRNA (miR)-137, regulated by long non-coding RNA (LncRNA) growth arrest-specific 5 (GAS5), on amyloid- β (A β)-induced hippocampal neuronal damage in rats.

Methods Rats were divided into the control group, A β group, A β +Si-NC group, A β +si-GAS5 group, A β +si-GAS5+

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(2018020782, 201504078)。

[作者简介] 赵美英(1977—)女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 认知障碍、脑血管病。E-mail: zmy_work77@163.com

[通信作者] 汪桂青(1973—)女, 本科, 主任医师, 研究方向: 老年认知障碍、心脑血管病。E-mail: 964301668@qq.com

anti-miR-NC group and A β +si-GAS5+anti-miR-137 group ($n = 10$ rats per group). The Y maze was used to detect learning and memory in rats. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the levels of GAS5 and miR-137 in the hippocampal CA1 area. The protein levels of B-lymphoma-2 gene (Bcl2), Bcl2-related X protein (BAX), caspase-3 were detected by Western blot and neuronal morphology was observed using Nissl staining. In addition, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (Tunel) staining was used to observe neuronal apoptosis and the relationship between miR-137 and GAS5 was identified using double luciferase. **Results** Compared with the control group, the levels of GAS5 mRNA, BAX, caspase-3 protein, neuronal mortality, and neuronal apoptosis rate were higher in the A β and A β +Si-NC groups ($P < 0.05$), whereas the proportion of correct response times, the proportion of learning times, the levels of miR-137 and Bcl2 protein were lower ($P < 0.05$). Compared with the A β and A β +Si-NC groups, the levels of GAS5 mRNA, BAX, caspase-3 protein, neuronal mortality and neuronal apoptosis rate were lower in the A β +si-GAS5 and A β +si-GAS5+anti miR-NC groups ($P < 0.05$), whereas the proportion of correct response times, the proportion of learning times, the levels of miR-137 and Bcl2 protein were higher ($P < 0.05$). In addition, compared with the A β +si-GAS5 and A β +si-GAS5+anti-miR-NC groups, the levels of GAS5 mRNA, BAX, caspase-3 protein, neuronal mortality, and neuronal apoptosis rate were higher in the A β +si-GAS5+anti-miR-137 group ($P < 0.05$), whereas the proportion of correct response times, the proportion of learning times, the levels of miR-137 and Bcl2 protein were lower ($P < 0.05$). It was also confirmed that there was a target site between miR-137 and GAS5. **Conclusions** Interference of GAS5 can upregulate miR-137, thus protecting against A β -induced hippocampal neuronal damage and alleviating the process of neuronal apoptosis. In contrast, further downregulation of miR-137 can reverse this process.

【**Keywords**】 long non-coding RNA growth arrest-specific 5; microRNA-137; A β ; rat; hippocampal neuron damage

阿尔兹海默症(alzheimer's disease,AD)日益成为全球性疾病,影响患者个人健康,淀粉样蛋白假说是目前主流的 AD 发病理论,淀粉样 β 蛋白(amyloid- β protein,A β)聚集影响神经元功能,是导致认知功能障碍和痴呆的诱因,且临床上尚无根治药物^[1]。靶向分子治疗成为近年来研究热点,长链非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA)参与神经元发育、增殖、凋亡、神经可塑性、认知、运动等多种功能^[2];生长抑制特异因子 5(growth arrest-specific 5,GAS5)作为一种 LncRNA,最早在增殖抑制的细胞中被发现,且可促进多种细胞凋亡,在胶质瘤细胞中表达升高可促进胶质瘤细胞的凋亡,但其在 AD 中发挥何种作用,尚未发现研究^[3]。研究报道,GAS5 可以靶向微小 RNA(microRNA,miRNA)影响疾病^[4-5]。miR-137 可抑制细胞外 A β 沉积,从而调控下游靶基因,抑制神经元死亡、缓解凋亡过程,从而缓解 AD^[6]。且研究发现,GAS5 可靶向 miR-137 影响缺血再灌注损伤,但在神经元损伤中尚未发现相关研究^[7]。因此,本研究采用 A β 诱导大鼠构建 AD 模型,探讨 GAS5 调控 miR-137 对大鼠神经元损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

60 只 6 周龄 SPF 级雄性健康 SD 大鼠购自中科

院上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2017-0005],体重(160 ± 10)g。大鼠在温度(24 ± 1)℃、湿度(50 ± 5)%、12 h 昼夜节律。黑暗条件下自由摄食饮水,正常饲养,饲养于郑州大学(药物研究院)[SYXK(豫)2018-0004],1 周后开始实验。本研究经本院伦理协会审核并通过(IACUC-20190106),实验动物符合 3R 原则。

1.1.2 细胞

大鼠海马神经元购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器

A β 购自美国 Sigma 公司;si-NC、si-GAS5、anti-miR-NC、anti-miR-137、GAS5 MUT、GAS5 WT、miR-137 mimic、miR-137 mimic NC 均购自广州锐博生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;一抗 B 淋巴瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2,Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白(Bcl2 associated X protein,BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cystein-aspartate protease 3,caspase3)均购自英国 abcam 公司,货号 ab194583、ab32503、ab184787。7500 实时荧光定量逆转录多聚酶链反应(Real-time quantitative PCR,RT-qPCR)仪购自美国 ABI 公司;Tanon 4100 全自动凝胶成像分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理

实验分为对照 (control) 组、Aβ 组、Aβ+si-NC 组、Aβ+si-GAS5 组、Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组、Aβ+si-GAS5+anti-miR-137 组, 每组 10 只。对照组和 Aβ 组海马 CAI 区 (具体位置: Bregma 后 3 mm、中线旁开 2.2 mm、深度 2.5 mm) 注射 10 μL PBS 液, Aβ+si-NC 组注射 10 μL si-NC, Aβ+si-GAS5 组注射 10 μL si-GAS5, Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组注射 si-GAS5、anti-miR-NC 各 10 μL, Aβ+si-GAS5+anti-miR-137 组注射 si-GAS5、anti-miR-137 各 10 μL, 15 min 后除对照组外将 10 nmol/μL Aβ₃₁₋₃₅ 注入海马 CAI 区^[8], 对照组注射等量生理盐水。14 d 后进行研究。

1.3.2 Y 迷宫实验检测大鼠行为

14 d 实验结束后, Y 型迷宫刺激器检测大鼠学习能力。根据 Martyn 等^[9] 方法, 对大鼠重复测试, 大鼠连续 10 次测试中出现 9 次及以上做出正确反应即作为学会标准。实验结束后记录大鼠正确反应次数; 计算正确反应次数比例 (%) = (正确反应次数) / 总实验次数 × 100%, 重复 Y 迷宫实验, 20 次实验中达到正确反应次数作为记忆成绩, 学会次数比例 (%) = (达到正确反应次数的次数) / 总实验次数 × 100%。

1.3.3 样本收集

结束后立即收集海马 CAI 区组织, 部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 部分置于 -80℃ 冰箱保存待检。

1.3.4 RT-qPCR 法检测海马 CAI 区 GAS5、miR-137 水平

部分海马 CAI 区组织 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, cDNA 第一链合成试剂盒将其逆转录成第一链 cDNA。设计上下游引物, 引物序列见表 1。20 μL 反应体系: 2 × SYBR qPCR Mix 10 μL, cDNA (50 ng/μL) 1 μL, F/R (10 μmol/L) 0.5 μL/0.5 μL, ddH₂O 8 μL; 反应条件: 94℃、60 s; 95℃、30 s (GAS5: 61℃、40 s, miR-137: 59℃、35 s), 40 个循环。2^{-ΔΔCt} 法计算 GAS5、miR-137 相对表达水平。

1.3.5 尼氏染色观察神经元形态

4% 多聚甲醛中固定的海马 CAI 区组织经石蜡包埋后切片, 切片厚度 6 μm, 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇浸润, 切片进入 A 液 (Cresyl violet Stain) 56℃ 染色 60 min, PBS 漂洗, 置于 B 液 (Nissl Differentiation) 分色数秒至 2 min 直至背景色接近无

色, 显微镜下观察神经元形态、尼氏小体情况。

1.3.6 TUNEL 染色观察大鼠神经元凋亡的影响

切片脱蜡处理, 加 2% 蛋白酶 K 室温孵育 20 min, PBS 清洗后滴加 50 μL TUNEL 反应混合溶液, 湿盒孵育 60 min, 抗荧光猝灭液 (含 DAPI) 封片后荧光显微镜下观察, 其中绿色荧光显示凋亡阳性细胞。

1.3.7 Western blot 实验检测海马 CAI 区 Bcl2、BAX、caspase3 蛋白水平

-80℃ 取部分海马 CAI 区组织, 蛋白裂解液冰上裂解, 4℃ 10000 r/min 离心 20 min, 上清为总蛋白。凝胶电泳分离蛋白、NC 转膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭; 对应加入一抗 Bcl2、BAX、caspase3、GAPDH, 4℃ 孵育过夜; 加入对应二抗, 室温孵育 1 h; DAB 显色试剂盒避光显色, 全自动凝胶成像分析系统拍照和定量分析。

1.3.8 双荧光素酶鉴定 miR-137 与 GAS5 的靶向位点

Starbase 分析发现 miR-137 与 GAS5 存在互补的结合位点; 将 miR-137 与 GAS5 结合位点及突变位点的序列克隆重组至 pGL3-basic 荧光素酶报告载体上构建 GAS5 野生型 (GAS5 WT) 及突变型 (GAS5 MUT) 荧光素酶报告载体, 分别与 miR-137 mimic 或 miR-137 mimic NC 共转染海马神经元中, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组荧光素酶相对活性。

1.4 统计学方法

采用统计学软件 GraphPad Prism 8 进行数据分

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence
GAS5	上游引物 Forward primer GGATAACAGAGCGAGCGAGCGCAAT
	下游引物 Reverse primer CCAGCCAAATGAACAAGCATG
GAPDH	上游引物 Forward primer GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	下游引物 Reverse primer GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
miR-137	上游引物 Forward primer GCGCGCTTATTGCTTAAGAATAC
	下游引物 Reverse primer GTGCAGGCTCCGAGGT
U6	上游引物 Forward primer GCTTCGGCAGCACATATACTAA
	下游引物 Reverse primer AACGCTTCACGAATTTGCCT

析,计量数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步采用 *SNK-q* 法进行两两比较。 $P<0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Y 迷宫检测大鼠行为

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组、 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组大鼠正确反应次数比例、学会次数比例降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组大鼠正确反应次数比例、学会次数比例升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组大鼠正确反应次数比例、学会次数比例降低($P<0.05$)。见图 1。

2.2 RT-qPCR 检测海马 CAI 区 GAS5、miR-137 水平

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平升高($P<0.05$)、miR-137 水平降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平降低($P<0.05$)、miR-137 水平升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平升高($P<0.05$)、miR-137 水平降低($P<0.05$)。见图 2A、B。

2.3 尼氏染色观察海马 CAI 区神经元形态

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区神经元死亡率升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区神经元死亡率降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CAI 区神经元死亡率升高($P<0.05$)。见图 3A、B。

2.4 TUNEL 染色观察海马 CAI 区神经元凋亡情况

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区神经元凋亡率升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区神经元凋亡率降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海

马 CAI 区神经元凋亡率升高($P<0.05$)。见图 4A、B。

2.5 Western blot 实验检测海马 CAI 区 Bcl2、BAX、caspase3 蛋白表达情况

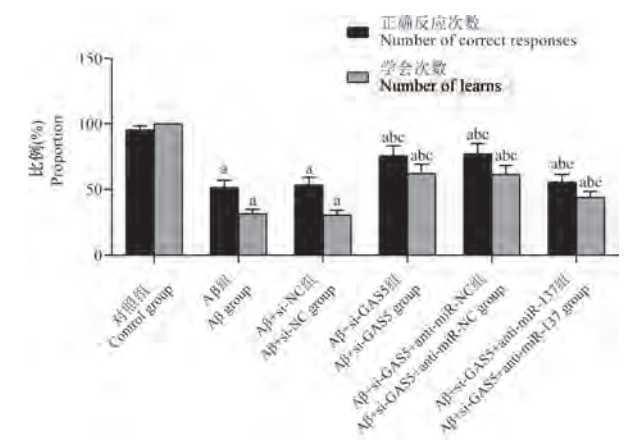
与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$), BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平升高($P<0.05$), BAX、caspase3 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$)、BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$)。见图 5A、B。

2.6 miR-137 与 GAS5 的靶向关系

miR-137 与 GAS5 之间存在靶位点。见图 6A。与 miR-137 NC+GAS5 WT 相比, miR-137 mimic+GAS5 WT 荧光素酶相对活性下降($P<0.05$);与 miR-137 NC+GAS5 MUT 相比 miR-137 mimic+GAS5 MUT 荧光素酶相对活性差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 6B。

3 讨论

AD 中 $A\beta$ 沉积是作用机制之一, $A\beta$ 沉积造成神经元损伤,可加速神经细胞凋亡,导致神经元损伤

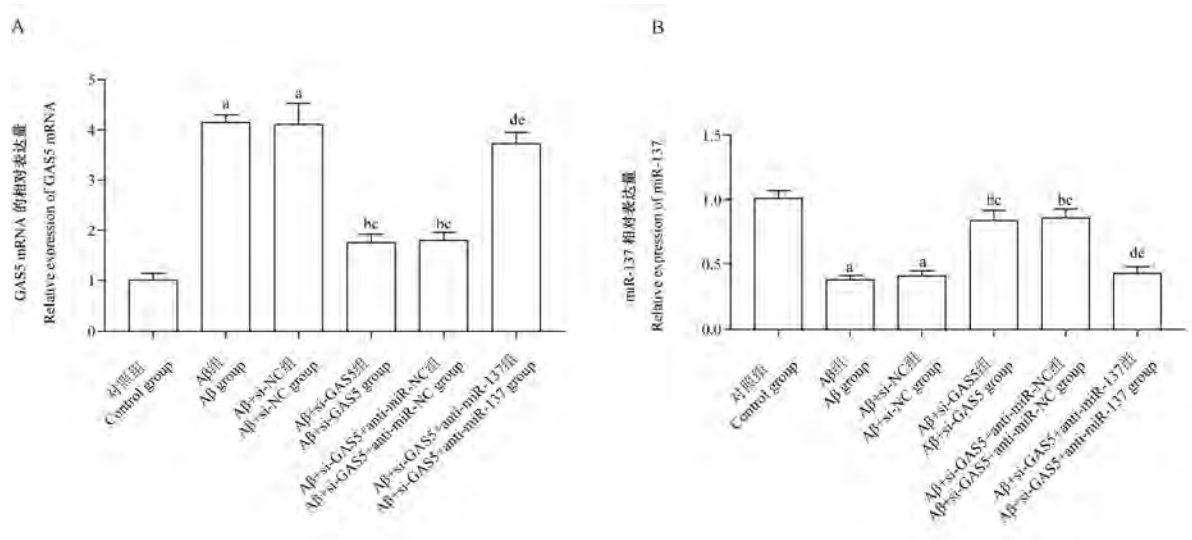


注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 $A\beta$ 组相比,^b $P<0.05$;与 $A\beta$ +si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比,^e $P<0.05$ 。

图 1 Y 迷宫检测大鼠行为

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with $A\beta$ group, ^b $P<0.05$. Compared with $A\beta$ +si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 1 Y maze to detect rat behavior

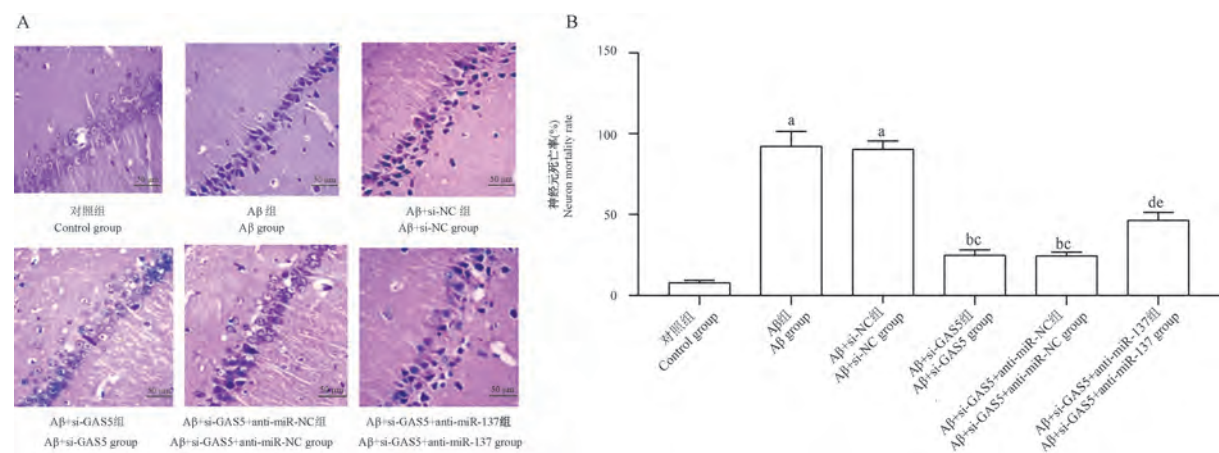


注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 Aβ 组相比,^b $P<0.05$;与 Aβ+si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5 组相比,^d $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组相比,^e $P<0.05$ 。

图 2 RT-qPCR 检测海马 CA1 区 GAS5、miR-137 表达水平

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with Aβ group, ^b $P<0.05$. Compared with Aβ+si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 2 Expression of GAS5 and miR-137 in hippocampal CA1 area by RT-qPCR



注:A:尼氏染色观察海马 CA1 区神经元情况;B:神经元死亡情况。与对照组相比,^a $P<0.05$;与 Aβ 组相比,^b $P<0.05$;与 Aβ+si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5 组相比,^d $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组相比,^e $P<0.05$ 。

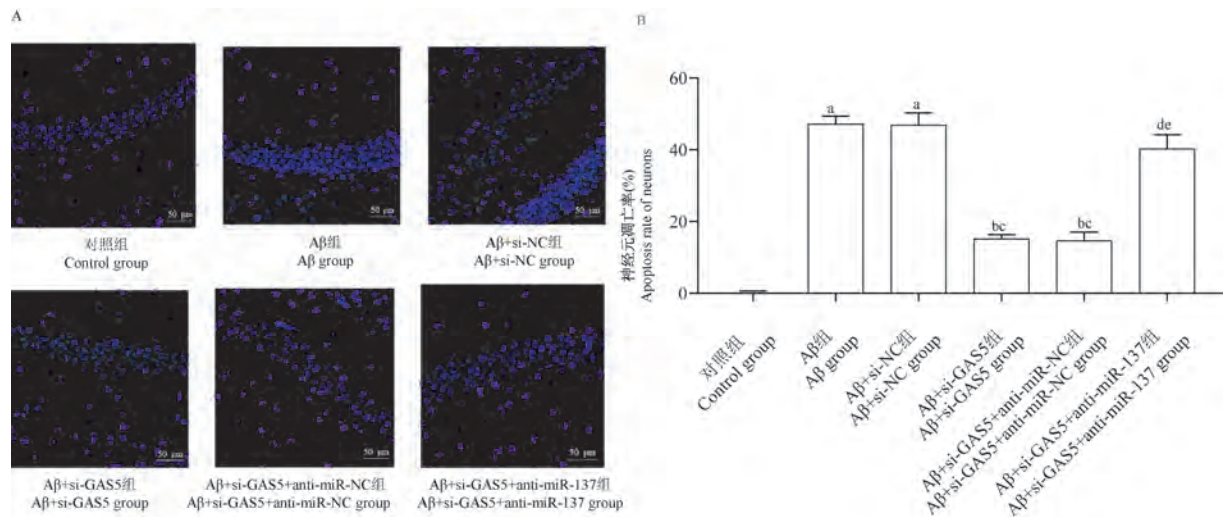
图 3 海马 CA1 区神经元情况

Note. A, Nissl staining was used to observe the neurons in hippocampus CA1 area. B, Neuronal death was observed. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with Aβ group, ^b $P<0.05$. Compared with Aβ+si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 3 Neurons in the hippocampal CA1 area

严重,对动物行为和认知功能产生影响^[10]。神经元病变与细胞凋亡关系异常密切,在 AD 发生发展过程中,Aβ 的诱导可导致神经凋亡,因此,抗神经元凋亡已经成为 AD 研究的重要方向^[11-12]。在公认的内源性凋亡通路中,Aβ 可诱导抗凋亡蛋白 Bcl2

蛋白水平降低,促凋亡蛋白 BAX、caspase3 蛋白水平升高,从而激活内源性凋亡途径^[13]。而在本研究中大鼠正确反应次数比例、学会次数比例降低,相比正常大鼠,Aβ 大鼠学习和记忆功能出现明显抑制,存在认知障碍。尼氏染色检测海马 CA1 区神经元

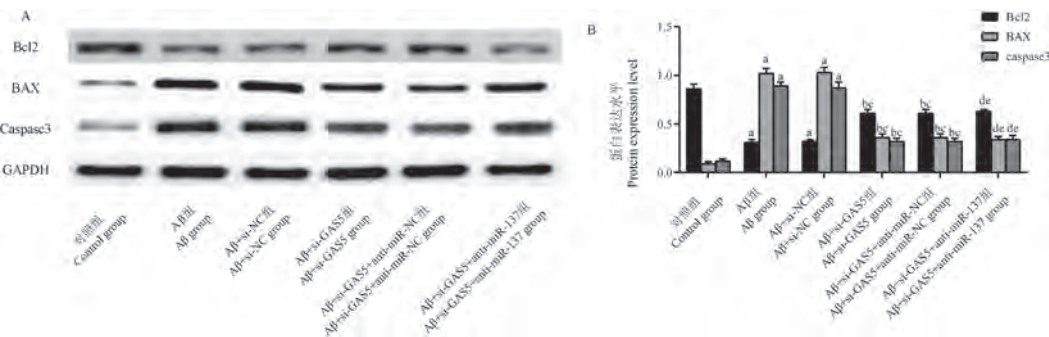


注:A;Tunel 染色观察海马 CA1 区神经元凋亡情况;B;神经元凋亡情况。与对照组相比,^a $P<0.05$;与 Aβ 组相比,^b $P<0.05$;与 Aβ+si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5 组相比,^d $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组相比,^e $P<0.05$ 。

图 4 海马 CA1 区神经元凋亡情况

Note. A, Tunel staining was used to observe the neuronal apoptosis in hippocampus CA1 area. B, Neuronal apoptosis. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with Aβ group, ^b $P<0.05$. Compared with Aβ+si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 4 Apoptosis of hippocampal CA1 Neurons

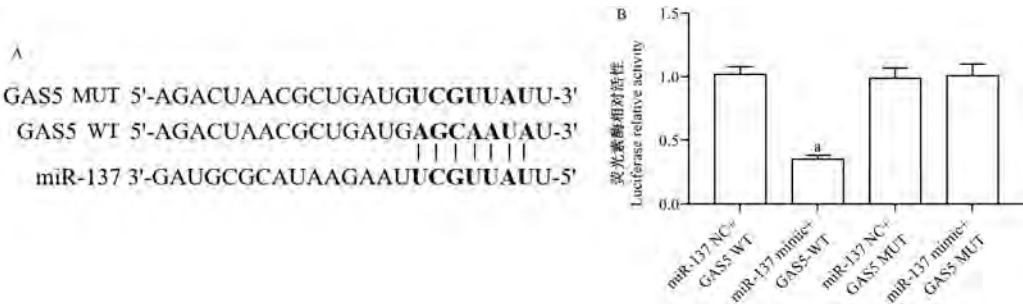


注:与 Aβ 组相比,^b $P<0.05$;与 Aβ+si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5 组相比,^d $P<0.05$;与 Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组相比,^e $P<0.05$ 。

图 5 Western blot 检测海马 CA1 区 Bcl2、BAX、caspase3 蛋白表达水平

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with Aβ group, ^b $P<0.05$. Compared with Aβ+si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 5 Expression of Bcl2, BAX, caspase3 protein in hippocampal CA1 area by Western blot



注:A;miR-137 与 GAS5 的结合位点;B;荧光素酶相对活性。与 miR-137 NC+GAS5 WT 组相比,^a $P<0.05$ 。

图 6 miR-137 与 GAS5 的靶向关系

Note. A, Binding site of miR-137 with GAS5. B, Relative activity of luciferase. Compared with miR-137 NC+GAS5 WT group, ^a $P<0.05$.

Figure 6 Targeting relationship between miR-137 and GAS5

形态时发现, A β 导致神经元死亡严重; Tunel 染色发现, A β 导致神经元凋亡严重, 蛋白检测发现海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平降低, BAX、caspase3 蛋白水平升高, 提示在大鼠脑组织中注射 A β 导致 A β 沉积, 从而促进神经元凋亡、死亡, 影响认知功能。

LncRNA 广泛存在于神经系统中, 在神经元损伤中可观察到 LncRNA 显著变化, 并参与转录、翻译过程从而调控基因组印迹、染色体修饰、mRNA 的翻译等过程, 从而影响神经损伤及修复过程^[14]。GAS5 在缺血性脑卒中中呈高表达, 具有神经毒性作用, 下调 GAS5 可以减轻神经元损伤, 从而实现对脑缺血性卒中的保护作用^[15]; 敲除 GAS5 可以抑制创伤性脑损伤导致的 Bax 升高从而发挥对神经元的保护, 因此有望成为治疗神经元损伤的治疗靶点^[16]。在本研究中, 发现添加 A β 后导致海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平均升高, 提示海马 CAI 区 GAS5 转录和翻译受 A β 沉积的影响均处于激活状态, 而高表达的 GAS5 具有神经毒性作用, 加重神经元损伤。与 A β 组相比, A β +si-GAS5 组正确反应次数比例、学会次数比例升高, 神经元死亡、神经元凋亡率均降低, 海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平升高, Bax、caspase3 蛋白水平降低, 提示干扰 GAS5 后可通过抑制神经元凋亡减少神经死亡, 实现对神经元损伤的保护, 学习和记忆功能有所缓解。

miRNA 作为非编码小 RNA, LncRNA 上存在 miRNA 结合位点, miRNA 又可沉默靶基因, 从而影响生物学功能^[17-18]。脑神经元中富含 miR-137, 特别是在皮层区和海马区, A β 经过淀粉样前体蛋白分解成蛋白质, 而 miR-137 可调控该类蛋白质从而降低 A β 水平, 且 miR-137 与 A β 在脑神经元中呈负相关关系^[19]。在 A β 积累和神经炎症导致的 AD 中 miR-137 水平降低, 可能是诱导蛋白 1 的水平从而诱导细胞毒性、凋亡, 促进 caspase3 活化^[20]。本研究发现, 添加 A β 可降低 miR-137 水平, 而 miR-137 水平降低对 A β 的降解作用减弱, 导致 A β 在神经元处积累, 诱发神经元损伤。而 GAS5 与 miR-137 关系密切, 且 GAS5 下调可明显增加 miR-137 表达^[21], 干扰 GAS5 后 miR-137 水平升高, 而升高后的 miR-137 实现对神经元的保护作用加强, 减缓神经元凋亡降低。添加 anti-miR-137 后可逆转干扰 GAS5 对神经元的保护作用。

综上所述, 干扰 GAS5 后可上调 miR-137 表达来降低 A β 诱导的神经元损伤, 实现对神经元的保护作用, 下调 miR-137 可逆转上述过程。本研究首

次验证了 GAS5 在 A β 诱导的神经元损伤中起促进作用, 且进一步发现高表达 GAS5 可下调 miR-137 促进神经元凋亡进而引发神经元损伤, 但 miR-137 靶基因较多, 通过哪些具体信号通路发挥作用尚需进一步验证。

参考文献:

- [1] Maia MA, Sousa E. Bace-1 and γ -secretase as therapeutic targets for alzheimer's disease [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2019, 12(1):41-79.
- [2] 张真, 包金凤. 长链非编码 RNA 在神经系统中的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(1):104-108.
- [3] Li G, Cai Y, Wang C, et al. LncRNA GAS5 regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of brain glioma cells through targeting GSTM3 expression. the effect of LncRNA GAS5 on glioma cells [J]. J Neurooncol, 2019, 143(3):525-536.
- [4] Dong Z, Li S, Wang X, et al. LncRNA GAS5 restrains CCl₄-induced hepatic fibrosis by targeting miR-23a through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 316(4): G539-G550.
- [5] Toraih EA, Alghamdi SA, El-Wazir A, et al. Dual biomarkers long non-coding RNA GAS5 and microRNA-34a co-expression signature in common solid tumors [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0198231-e0198252.
- [6] 姜扬, 徐冰, 隋轶, 等. miR-137 参与阿尔茨海默病分子机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(36): 100-102.
- [7] Liu Z, Hou L, Liu Y, et al. LncRNA GAS5 exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury through regulating serpin3 by targeting miR-137 [J]. Int J Cardiol, 2020, 306(1): 9-21.
- [8] 赵芳, 王昭君, 张升校, 等. 脑神经肽类似物 Rattin 对 β -淀粉样蛋白所致大鼠海马神经元损伤的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(4): 357-364.
- [9] Martyn AC, De Jaeger X, Magalhães AC, et al. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43): 17651-17656.
- [10] 杨依, 唐晓丽, 刘悦, 等. 细胞自噬在 A β ₂₅₋₃₅ 损伤 SH-SY5Y 细胞中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(11): 2028-2034.
- [11] 姚兵, 侯斌, 李文燕, 等. 四氢紫堇萨明对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导 AD 细胞模型凋亡的影响及其机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 49-54, 43.
- [12] Anthony Jalin AMA, Jin R, Wang M, et al. EPPS treatment attenuates traumatic brain injury in mice by reducing A β burden and ameliorating neuronal autophagic flux [J]. Exp Neurol, 2019, 314(4): 20-33.
- [13] Karimi-Sales R, Ashiri M, Hafizi M, et al. Neuroprotective effect of new nanochelating-based nano complex, ALZc3, against A β ₍₁₋₄₂₎-induced toxicity in rat: a comparison with memantine

[J]. Pharm Res, 2020, 37(3): 48-61.

[14] 罗选翔, 冯虎, 经历, 等. 非编码 RNA 在周围神经损伤修复中的重要角色和作用 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24 (14): 2271-2276.

[15] Deng Y, Chen D, Gao F, et al. Silencing of long non-coding RNA GAS5 suppresses neuron cell apoptosis and nerve injury in ischemic stroke through inhibiting dnmt3b-dependent map4k4 methylation [J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(5): 950-966.

[16] 陈旭, 张永安, 余斌, 等. 敲减 lncRNA GAS5 减轻小鼠脑外伤继发性脑水肿及神经元损伤 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(4): 331-338.

[17] Bouba I, Kang Q, Luan YS, et al. Predicting miRNA-lncRNA interactions and recognizing their regulatory roles in stress response of plants [J]. Math Biosci, 2019, 312(6): 67-76.

[18] Bai H, Guo J, Chang C, et al. Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA during proliferative phase of rat liver regeneration [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (10): 18897-18905.

[19] Jiang Y, Xu B, Chen J, et al. Micro-RNA-137 inhibits tau hyperphosphorylation in alzheimer's disease and targets the CACNA1C gene in transgenic mice and human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Med Sci Monit, 2018, 24(1): 5635-5644.

[20] He D, Tan J, Zhang J. miR-137 attenuates Aβ-induced neurotoxicity through inactivation of NF-κB pathway by targeting TNFAIP1 in Neuro2a cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(3): 941-947.

[21] 孙越晨, 许岚, 谈鹰. 长链非编码 RNA GAS5 通过调节 miR-137/IGFBP-5 促进 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34(10): 856-862.

[收稿日期] 2020-10-26

勘误声明

出版信息	2021 年 31 卷 7 期,页码为 106-111
论文标题	使用一次性硬膜外麻醉导管进行无创小鼠气管插管的方法建立
稿次	☐ 录用定稿 ☐ 排版定稿 ☐ 整期定稿 ☒ 印刷版 ☐ 其它
作者	赵聪慧,王妍,周禹,袁晓红
DOI	10. 3969 /j.issn.1671-7856. 2021. 07. 016
勘误内容	英文作者单位处 原为:(1. Department of Pathology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. 2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 2. Institute of Liver Diseases and Organ Transplantation, Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050) 更改为:(1. Department of Pathology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. 2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 3. Institute of Liver Diseases and Organ Transplantation, Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)
其他说明	

李晶铃, 阴赅宏. 内毒素血症对大鼠肾功能及肾素-血管紧张素系统的影响分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 72-77.

Li JL, Yin CH. Effects of endotoxemia on renal function and the renin-angiotensin system in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 72-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 011

内毒素血症对大鼠肾功能及肾素-血管紧张素系统的影响分析

李晶铃¹, 阴赅宏^{2*}

(1.清华大学医院内科,北京 100086;2.北京妇产医院,北京 100026)

【摘要】 目的 探讨内毒素血症大鼠不同阶段肾功能和肾素-血管紧张素(RAS)系统的变化,为完善其病理机制提供数据支持。**方法** 将90只大鼠随机分为9组:对照组($n=10$)和模型组的8个时间点(注射后2、4、8、12、24、48、72、168 h组, $n=10$)。模型组采用腹腔注射LPS的方式制备脓毒症模型,对照组注射等体积的无热源水。对照组于注射后8 h,模型组于各个时间点取心脏血,测定循环内毒素、一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、一氧化氮合酶(NOS)、肾素(PRA)、血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素(Ang)、血肌酐和尿素氮水平。取肾组织,测定血管紧张素1型受体(AT1R)和2型受体(AT2R)的蛋白表达。**结果** 在LPS注射后,模型组循环内毒素、ET、NO、NOS、PRA、ACE II、Ang I、Ang II、血肌酐、尿素氮,肾组织AT1R和AT2R表达均有不同程度的升高,其中肾脏系数、血清内毒素、血肌酐、尿素氮、肾组织AT1R和AT2R表达在注射后2~168 h的水平高于对照组,血清内皮素、NOS、Ang II在注射2~48 h高于对照组,NO在注射4~48 h高于对照组,ACE在2~24 h高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 内毒素血症所致肾损伤中可能有RAS的参与。

【关键词】 内毒素血症;肾素-血管紧张素系统;肾;氧化应激损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0072-06

Effects of endotoxemia on renal function and the renin-angiotensin system in rats

LI Jingling¹, YIN Chenghong^{2*}

(1. Department of Medicine, Tsinghua University Hospital, Beijing 100086, China.
2. Beijing Maternity Hospital, Beijing 100026)

【Abstract】 Objective To investigate the changes in renal functions and the renin-angiotensin system (RAS) at different stages in endotoxemia rats, to provide data to support its pathological mechanism. **Methods** Ninety rats were randomly divided into nine groups: the control group ($n=10$) and the model group at eight timepoints (2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 and 168 h, $n=10$). Rats in the model group were prepared for the sepsis model by a tail vein injection of lipopolysaccharides, while those in the control group were injected with an equal volume of pyrogen-free water. Samples were collected from the animals in the control group at 8 h after injection and from animals in the model group at each timepoint. The circulating endotoxin, nitric oxide (NO), endothelin (ET), nitric oxide synthase (NOS), angiotensin

[基金项目] 北京市自然科学基金(7032017)。

[作者简介] 李晶铃(1979—),女,主治医师,硕士,研究方向:内科病房的疾病管理与并发症防控。E-mail: pandia4153z@163.com

[通信作者] 阴赅宏(1965—),男,教授,主任医师,研究方向:优生优育的临床与基础研究。E-mail: waijjwaijjwaijj@163.com

converting enzyme (ACE), angiotensin (Ang), renin-angiotensin (PRA), serum creatinine and blood urea nitrogen levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, the protein expression of AngII type 1 receptor (AT1R) and Ang II type 2 receptor (AT2R) in the kidney was measured using Western blot assay. **Results** After lipopolysaccharide injection, the circulating endotoxin, endothelin, NO, NOS, ACE, Ang II, serum creatinine, blood urea nitrogen, AT1R and AT2R levels were all increased in the model group. The kidney coefficient, serum endotoxin, serum creatinine, blood urea nitrogen and kidney AT1R and AT2R were higher in the model group than in the control group at 2~168 h after injection. In addition, the serum levels of endothelin, NOS and Ang II were higher in the model group than in the control group at 2~48 h after injection and the NO level in the model group was higher than that in the control group at 4~48 h after injection. Moreover, the ACE level in the model group was higher than that in the control group at 2~24 h after injection. All differences were significant ($P<0.05$). **Conclusions** RAS may be involved in kidney injury caused by endotoxemia.

【Keywords】 endotoxemia; renin-angiotensin system; kidney; oxidative stress damage

多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 是严重感染、创伤、大手术等原发病发生后, 机体同时或序贯发生两个及以上器官或系统功能障碍的临床综合征, 病情凶险, 病死率高, 是 ICU 首位致死原因^[1-2]。在 MODS 的病理进程中, 各个器官和系统的损伤具有一定的规律性, 其中肾首当其冲, 往往先于其他器官出现功能异常^[3-5], 而心血管和神经系统则通常为疾病的终末期表现。作为体内最大的代谢器官, 肝是清除内毒素的主要工作站, 也是内毒素攻击的首要对象之一^[6-7]。肾素-血管紧张素系统 (RAS) 广泛存在于心、肝、肾、脑、肺等机体主器官中, 前期研究发现, 在这些器官受到损伤时, 肾素-血管紧张素系统 (RAS) 会激活, 表现为血管紧张素转换酶 (ACE)、血管紧张素 II (Ang II) 及其受体 AT1R、AT2R 表达升高。本研究重点分析内毒素血症大鼠疾病发展的不同阶段, 肾功能以及肾中 RAS 的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级 (SPF) 雄性 Wistar 大鼠 90 只, 6~8 周龄, 体重 250~270 g, 购自中国医学科学院实验动物中心 [SCXK (京) 2017-003], 饲养于友谊医院动物实验室 [SYXK (京) 2018-0025], 本研究严格遵守 3R 原则, 获得了友谊医院动物实验管理与动物福利伦理委员会的伦理审批 (CMU2016080135)。

1.2 主要试剂与仪器

NO 化学法试剂盒 (批号 201912046)、内皮素 (ET, 批号 202006157)、一氧化氮合酶 (NOS, 批号 202006151) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 血管紧张素转换酶 (ACE, 批号 20200715) 试剂盒购自海军总医院; 血管紧张素 II (Ang II, 批号

20200314) 试剂盒购自北京市福瑞生物工程公司; AT1R、AT2R 及内参引物 (批号 M12046, M12052) 购自美国 Santa Cruz 公司; 脂多糖 (LPS, 批号 20200715) 购自德国 Sigma 公司。智能放免测量仪 (SN-6958 型, 上海原子能研究所日环仪器厂); 内毒素测定仪 (BET-72 型, 上海精密仪器仪表有限公司); 小型垂直电泳与电转印装置 (美国 Bio-Rad 公司); 高速低温离心机 (3K-18 型, 德国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备与取样方法

所有大鼠, 适应性饲养 1 周, 剔除体重过小或过大者, 剩余 90 只。剩余大鼠随机分为 2 组, 对照组 10 只和模型组 80 只, 模型组腹腔注射 10 mg/kg LPS, 对照组注射等体积无热源水。分别于注射 2、4、8、12、24、48、72、168 h 随机选取 10 只, 1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉, 取心脏血, 室温静置 2 h, 离心取血清, 离心重力 2184 r/min, -20℃ 存储, 备用。之后摘取肺、肾、肝及心脏, 生理盐水冲洗干净血液, 分两份, 一份放入 4% 多聚甲醛液中固定备用, 一份放入冷冻管中, 于液氮中保存备用。

1.3.2 血清学指标检测

采用内毒素测定仪测定内毒素水平; 采用硝酸还原酶法测定一氧化氮 (NO) 水平; 智能放射免疫测量仪和 ELISA 试剂盒测定内皮素 (ET)、RAS 标志物血管紧张素转换酶 (ACE II)、肾素 (PRA)、血管紧张素 II (Ang II) 水平, 比色法测定一氧化氮合酶 (NOS) 水平, 全自动生化仪测定肾功能指标血肌酐、尿素氮水平。

1.3.3 HE 染色实验观察肾病理后特征

取对照组和模型组 LPS 注射 24 h 的多聚甲醛固定的肾组织, 采用常规石蜡包埋的方法制备病理切片, 切片厚度 5~7 μm, 留作 HE 染色实验, 1 周内检

测。主要步骤:二甲苯脱蜡,即将病理切片浸泡于二甲苯中 10 min,反复操作两次。梯度乙醇水化,依次采用无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇、蒸馏水浸泡 1~3 min。苏木素染色 10 min,流水冲洗干净染液,加入 1%的盐酸乙醇分化 3 s,流水冲洗,返蓝染色液返蓝。苏木素复染后,梯度乙醇脱水,75%乙醇、85%乙醇、95%乙醇依次浸泡 3~5 min,无水乙醇浸泡 2 次,每次 10 min。二甲苯透明,中性树胶封片,电子显微镜下观察肾小管和肾小球结构。

1.3.4 免疫蛋白印迹实验(Western blot)检测肾组织 AT1R 和 AT2R 的蛋白表达

液氮保存的肾组织,冰上自然解冻,采用蛋白质提取试剂盒提取蛋白质,BCA 法定量蛋白浓度,并采用 5 × buffer 缓冲液配置为 1 μg/μL 的溶液,采用 Western blot 测定 RAS 标志物 AT1R 和 AT2R 的表达水平。组装 Western blot 的电泳槽,配置浓缩胶、分离胶和电泳液,预备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。在点样前,先以 40 V 电泳 30 min,以排除胶体内的杂质,然后点样,每孔点样 10 μL,60 V 电泳 30 min 通过浓缩胶,80 V 电泳 60 min 通过分离胶。经电泳后,蛋白质按照分子量大小自分离胶中分离开来,形成蛋白条带,将此条带转印至羟甲基纤维素(NC)膜,转印条件,80 V×60 min。转印成功后,将 NC 膜封入 5%的脱脂牛奶,37℃ 震荡摇匀 90 min,封闭非特异性条带。PBST 液清洗 3 次,每次 5 min,一抗孵育,AT1R、AT2R 的一抗浓度均为 1:2000,内参 GAPDH 的浓度为 1:2500,4℃ 震荡摇匀过夜。PBST 液清洗 3 次,每次 5 min,二抗孵育,浓度均为 1:2500,37℃ 震荡摇匀 60 min。滴加 ECL 发光液,暗室显影。采用影像分析软件 Image J 分析灰度值,目的蛋白表达量 = 目的条带灰度值/内参条带灰度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件分析数据,本组均为计量资料,符合正态分布,方差齐,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差分析有统计学差异者进一步采用 LSD-*t* 检验分析两组间差异。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 内毒素和氧化应激标志物

模型组大鼠循环 LPS 在注射后迅速升高,2 h 达峰,168 h 降至正常水平,中间时间段均高于对照组($P < 0.05$)。内皮素、NO 与 NOS 在注射后逐渐升

高,12 h 达峰,NO 在 4~48 h 高于对照组,内皮素和 NOS 在 2~48 h 高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 肾病理

对照组大鼠的肾小管排列整齐,基本无炎性细胞浸润;肾小球形态完整,基底膜清晰。模型组大鼠肾小管结构萎缩,排列紊乱,可见大量红色的炎性细胞浸润;肾小球体积增大,基底膜不清,可见弥漫性系膜增生和红色的炎性细胞浸润,偶见新月体形成。见图 2。

2.3 肾脏指数和肾功能

模型组大鼠肾脏系数在 LPS 注射后逐渐升高,在 8~12 h 达峰,在 2~168 h 高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组血肌酐和尿素氮在 LPS 注射后逐渐升高,在 8~12 h 达峰,2~168 h 之间的水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 血清 RAS 标志物

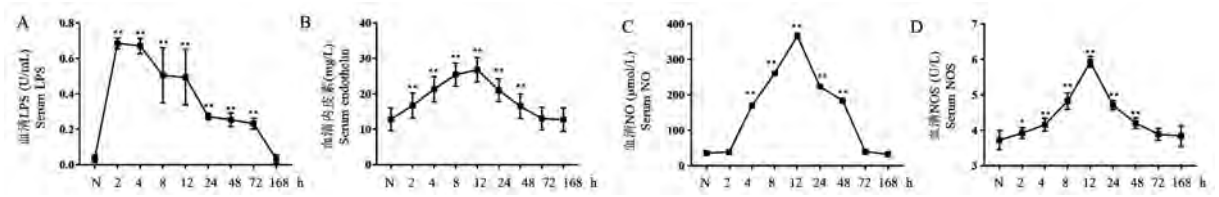
模型组大鼠循环 PRA 在注射后迅速升高,2 h 达峰,48 h 降至正常水平,中间时间段均高于对照组($P < 0.05$)。ACE 和 Ang II 在注射后逐渐升高,8 h 达峰,ACE 在 2~24 h 高于对照组,Ang II 在 2~48 h 高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 肾组织 AT1R 和 AT2R 的表达

对照组大鼠各个时间点肾 AT1R 和 AT2R 表达水平较为一致,无明显波动。模型组大鼠 AT1R 和 AT2R 在 LPS 注射后逐渐升高,肾组织 AT1R 和 AT2R 在 8 h 达到高峰,2~168 h 之间的水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

RAS 是人体内重要的体液调节系统,对人体的免疫、内分泌和代谢功能均有调节作用,在循环系统中的作用报道较多,其主要活性分子 Ang II 广泛分布于血管平滑肌细胞,可促进血管内皮细胞增殖、血管收缩和局部炎性反应^[8]。国内学者孙天孚^[9]检测颅内动脉瘤患者血液、脑脊液、动脉瘤壁上的 RAS 相关蛋白 ACE、Ang II、AT1R 的表达水平,证实颅内动脉瘤循环和脑组织的 RAS 均被激活,且其相关蛋白的表达水平与炎性因子呈正相关性。在脑梗死、慢性肾病及高血压疾病中,也有循环 RAS 被激活的相关报道^[10]。随着病理研究的深



注:N:对照组;2:模型组注射 LPS 2 h 时;4:模型组注射 LPS 4 h 时;8:模型组注射 LPS 8 h 时;12:模型组注射 LPS 12 h 时;24:模型组注射 LPS 24 h 时;48:模型组注射 LPS 48 h 时;72:模型组注射 LPS 72 h 时;168:模型组注射 LPS 168 h 时。与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01。

图 1 各组大鼠内毒素和氧化应激标志物水平变化

Note. N, Control group. 2, LPS was injected into the model group for 2 h. 4, LPS was injected into the model group for 4 h. 8, LPS was injected into the model group for 8 h. 12, LPS was injected into the model group for 12 h. 24, LPS was injected into the model group for 24 h. 48, LPS was injected into the model group for 48 h. 72, LPS was injected into the model group for 72 h. 168, LPS was injected into the model group for 168 h. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

Figure 1 Level changes of endotoxin and oxidative stress biomarkers between groups

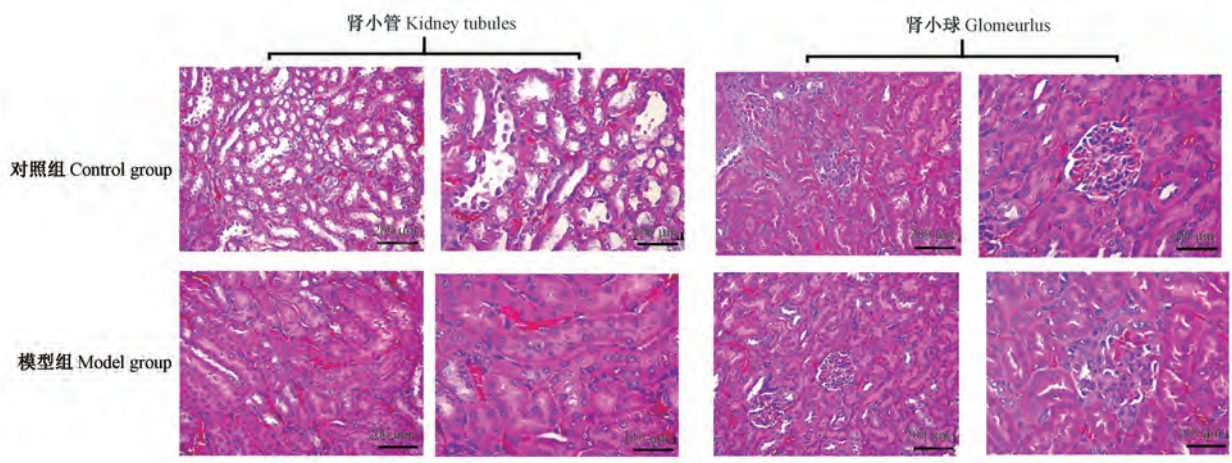
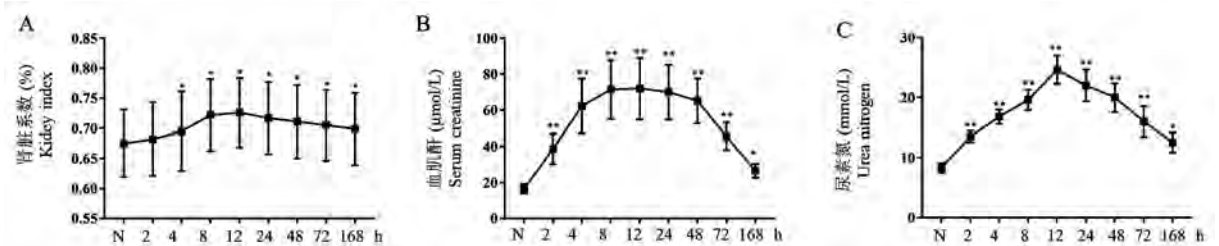


图 2 对照组与模型组大鼠肾病理特征比较

Figure 2 Comparison of renal pathological features between control group and model group



注:N:对照组;2:模型组注射 LPS 2 h 时;4:模型组注射 LPS 4 h 时;8:模型组注射 LPS 8 h 时;12:模型组注射 LPS 12 h 时;24:模型组注射 LPS 24 h 时;48:模型组注射 LPS 48 h 时;72:模型组注射 LPS 72 h 时;168:模型组注射 LPS 168 h 时。与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01。

图 3 各组大鼠肾系数和肾功能指标水平变化

Note. N, Control group. 2, LPS was injected into the model group for 2 h. 4, LPS was injected into the model group for 4 h. 8, LPS was injected into the model group for 8 h. 12, LPS was injected into the model group for 12 h. 24, LPS was injected into the model group for 24 h. 48, LPS was injected into the model group for 48 h. 72, LPS was injected into the model group for 72 h. 168, LPS was injected into the model group for 168 h. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

Figure 3 Level changes of renal coefficient and renal function index between groups

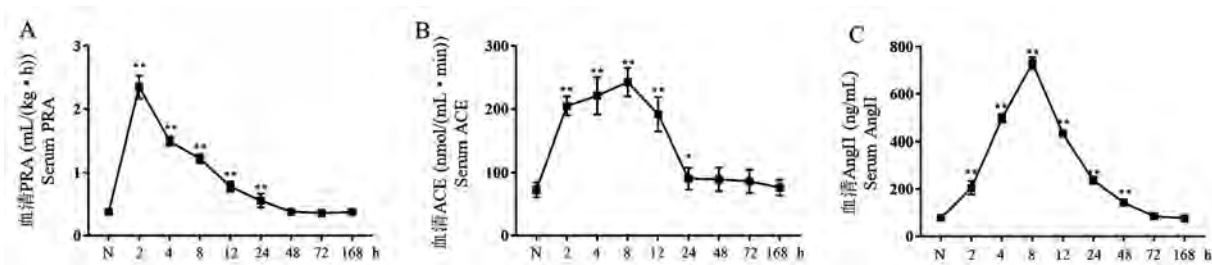
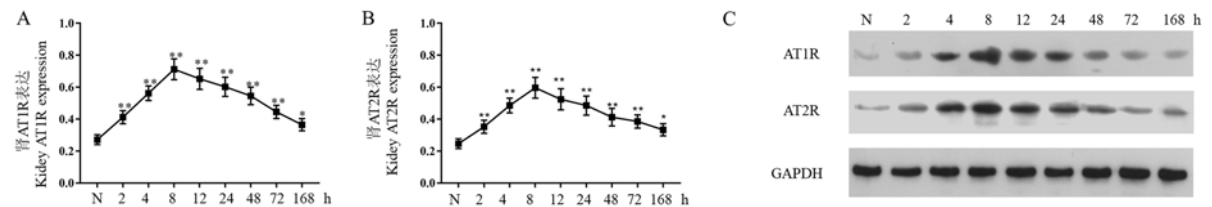


图 4 各组大鼠血清 RAS 标志物水平变化

Note. N, Control group. 2, LPS was injected into the model group for 2 h. 4, LPS was injected into the model group for 4 h. 8, LPS was injected into the model group for 8 h. 12, LPS was injected into the model group for 12 h. 24, LPS was injected into the model group for 24 h. 48, LPS was injected into the model group for 48 h. 72, LPS was injected into the model group for 72 h. 168, LPS was injected into the model group for 168 h. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

Figure 4 Changes of serum RAS markers of rats between groups



Note. N, Control group. 2, LPS was injected into the model group for 2 h. 4, LPS was injected into the model group for 4 h. 8, LPS was injected into the model group for 8 h. 12, LPS was injected into the model group for 12 h. 24, LPS was injected into the model group for 24 h. 48, LPS was injected into the model group for 48 h. 72, LPS was injected into the model group for 72 h. 168, LPS was injected into the model group for 168 h. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

图 5 各组大鼠肾 AT1R 和 AT2R 的表达变化

Note. N, Control group. 2, LPS was injected into the model group for 2 h. 4, LPS was injected into the model group for 4 h. 8, LPS was injected into the model group for 8 h. 12, LPS was injected into the model group for 12 h. 24, LPS was injected into the model group for 24 h. 48, LPS was injected into the model group for 48 h. 72, LPS was injected into the model group for 72 h. 168, LPS was injected into the model group for 168 h. Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01.

Figure 5 Changes of AT1R and AT2R expression in the kidneys between groups

入进展,研究者们发现 RAS 广泛分布于机体的各个器官,并参与了各种原因导致的器官损伤,其中肾、心脏和脑最先受到重视。现有研究已证实高血压所致肾损伤、原发性肾、糖尿病肾病及免疫相关肾病中均存在 RAS 过度激活^[11-12],RAS 抑制剂和拮抗剂也已用于临床,在改善高血压所致肾功能损伤方面取得了积极作用^[13-14]。学者 Yang 等^[15]对比分析了 119 例合并心血管病变患者和 241 例无心血管病变患者的血液透析资料,发现合并心血管病者循环 ACE/ACE2 比值明显升高,暗示着心血管系统病变可加重全身 RAS 功能异常。后有学者指出心脏内部存在局部 RAS,其功能变化可预测慢性心力衰竭患者的预后^[16]。

内毒素血症是一种以 MODS 为主要病理表现的危重病,发病过程累及多个器官与系统,本研究

重点考察肾中 RAS 的变化。研究采用直接注射内毒素 LPS 的方式制备内毒素血症大鼠模型,注射后,大鼠循环系统内毒素水平可在 LPS 注射后 2 h 即可达到峰值,并持续保持在一个较高的水平,这与其他学者的既往报道结果基本一致。随后内皮素和氧化应激标志物 NO、NOS 水平也相继升高,在 12 h 达到高峰。氧化应激损伤以及内皮功能异常是内毒素血症引发血管和器官损害的重要机制,这几项指标跟随内毒素波动而波动是内毒素血症模型制备成功的侧面反映。

本研究发现在注射 LPS 以后肾脏系数、血肌酐和尿胆素逐渐升高,肾功能各个指标达到峰值的时间相差不大,均为 8~12 h,说明肾功能也受到了较大损害。大鼠血清 ACE II、PRA、Ang II 也在 LPS 注射后 12 h 内达到峰值,这说明 RAS 的发生与内毒素

血症所致的肾与肝损伤可能是同时发生的。为分析内毒素血症发病过程中肾 RAS 的变化,本研究对肾组织的 AT1R 和 AT2R 表达水平也做了检测。AT1R 和 AT2R 是 Ang II 的重要受体,Ang II 为 RAS 的两大主要活性分子之一,这一分子主要通过与其受体 AT1R 和 AT2R 结合而发挥作用。研究表明,AT1R 被激活可诱导炎症反应、细胞外基质合成和细胞增殖,参与炎症浸润、氧化应激损伤、组织器官纤维化损伤、肿瘤微血管生成和肿瘤细胞迁移等病理行为^[17-18]。AT2R 被激活可调节血管压力、内分泌与代谢功能^[19-20]。在内毒素血症中,AT1R 和 AT2R 共同参与了器官损伤机制。本研究结果显示,肾组织的 AT1R 和 AT2R 表达变化在 LPS 注射后 8 h 达到高峰,说明内毒素血症所致肾损伤中可能有 RAS 的参与。

综上所述,本研究分析了内毒素血症大鼠模型发病的不同时间点肾损伤及局部 RAS 的变化,发现肾损伤过程中伴随着组织 AT1R 和 AT2R 的表达异常,认为内毒素血症所致肾损伤中可能有 RAS 的参与。

参考文献:

- [1] Vallejos A, Olivares P, Gatica S, et al. Endotoxemia-induced endothelial fibrosis inhibition improves hypotension, tachycardia, multiple organ dysfunction syndrome, cytokine response, oxidative stress, and survival [J]. Lab Invest, 2019, 99(8): 1173-1192.
- [2] 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.
- [3] 余弘吉, 杨爱东, 李小茜, 等. 宣肺方对内毒素诱导大鼠急性肺损伤 mTOR/S6K1 信号通路的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 431-436.
- [4] 杜艳伟, 付双, 白金萍, 等. 人参二醇组皂苷对内毒素诱导急性肾损伤小鼠肾 UT-A2 和 UT-A3 表达的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(12): 90-95.
- [5] 冯莉芳, 王鲁文, 张海月, 等. 拮抗 Toll 样受体 4 的表达对内毒素血症小鼠肾损伤的保护作用 [J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(2): 204-208.
- [6] 向丽, 王沛明, 王平, 等. 大黄-黄芩配伍对内毒素血症模型大鼠肝炎症损伤的保护作用及其机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 105-108.
- [7] 丁仁彦, 肇冬梅, 胡紫薇, 等. 普通肝素通过抑制炎症反应和细胞凋亡缓解内毒素血症小鼠肝损伤 [J]. 解剖科学进

- 展, 2017, 23(5): 502-505.
- [8] Mascolo A, Urbanek K, De Angelis A, et al. Angiotensin II and angiotensin 1-7: which is their role in atrial fibrillation? [J]. Heart Fail Rev, 2020, 25(2): 367-380.
- [9] 孙天孚. RAS-炎症系统在颅内动脉瘤发生发展中的作用研究和 meta 分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [10] Farag E, Sessler DI, Ebrahim Z, et al. The renin angiotensin system and the brain: New developments [J]. J Clin Neurosci, 2017, 46: 1-8.
- [11] Mizuiri S, Ohashi Y. ACE and ACE2 in kidney disease [J]. World J Nephrol, 2015, 4(1): 74-82.
- [12] Wang Z, Wang S, Zhao J, et al. Naringenin ameliorates renovascular hypertensive renal damage by normalizing the balance of renin-angiotensin system components in rats [J]. Int J Med Sci, 2019, 16(5): 644-653.
- [13] 王丽妍, 刘文虎. 血管紧张素转换酶抑制剂联合血管紧张素 II 受体拮抗剂治疗慢性肾疾病的利弊 [J]. 中国实用内科杂志, 2014, 34(9): 880-883.
- [14] 刘菁, 曾筱茜, 程一鸣, 等. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂相关联合用药策略的降压疗效及肾保护作用 [J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(5): 470-473.
- [15] Yang CW, Lu LC, Chang CC, et al. Imbalanced plasma ACE and ACE2 level in the uremic patients with cardiovascular diseases and its change during a single hemodialysis session [J]. Ren Fail, 2017, 39(1): 719-728.
- [16] Binder C, Poglitsch M, Agibetov A, et al. Angs (Angiotensins) of the alternative renin-angiotensin system predict outcome in patients with heart failure and preserved ejection fraction [J]. Hypertension, 2019, 74(2): 285-294.
- [17] Zhang Y, Wang Y, Zhou D, et al. Angiotensin deteriorates advanced atherosclerosis by promoting MerTK cleavage and impairing efferocytosis through AT₁R/ROS/p38MAPK/ADAM17 pathway [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 317(4): C776-C787.
- [18] 帅波, 陈升浩, 沈霖, 等. 肾素-血管紧张素系统双轴对股骨头缺血性坏死的影响 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(29): 4-8, 24, 197.
- [19] Zhao Y, Zhu Q, Sun S, et al. Renal transplantation increases angiotensin II receptor-mediated vascular contractility associated with changes of epigenetic mechanisms [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2375-2388.
- [20] Liu M, Jing D, Wang Y, et al. Overexpression of angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and impairs insulin secretion in rat insulinoma cells [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400(1-2): 233-244.

[收稿日期] 2020-12-16

唐文诚, 何清, 宋大萍, 等. 败酱草对对乙酰氨基酚诱导的大鼠药物性肝损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (9): 78–83.

Tang WC, He Q, Song DP, et al. Herba Patriniae protects against paracetamol-induced liver injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 78–83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 012

败酱草对对乙酰氨基酚诱导的大鼠药物性肝损伤的保护作用

唐文诚^{1,2}, 何 清¹, 宋大萍², 沈政洪², 王继生^{1*}

(1.西南医科大学药学院,四川 泸州 646000;2.绵阳市第三人民医院·四川省精神卫生中心,四川 绵阳 621000)

【摘要】 目的 败酱草是败酱科多年生草本植物黄花败酱、白花败酱的带根全草,具有多种药理活性。本文旨在探究败酱草对对乙酰氨基酚诱导的大鼠药物性肝损伤的保护作用。**方法** 采用尾静脉注射对乙酰氨基酚将大鼠随机分为6组:对照组、模型组、败酱草低剂量组、败酱草中剂量组、败酱草高剂量组、联苯双脂组。造模同时败酱草低、中、高剂量组每日灌胃败酱草 4、8、16 g/kg,联苯双脂组每日灌胃联苯双脂 0.3 g/kg,对照组和模型组灌胃等量生理盐水,连续 30 d。计算肝脏指数;HE 染色检测肝组织病理损伤程度;试剂盒检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)水平;酶联免疫吸附实验检测白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β) 水平;通过试剂盒检测肝组织匀浆中总超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量。**结果** 与对照组相比较,模型组肝脏指数显著升高($P<0.05$),AST、ALT、ALP 水平显著升高($P<0.05$),TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高($P<0.05$),SOD、GSH-Px 含量显著降低($P<0.05$)、MDA 含量显著升高($P<0.05$)。与模型组相比较,败酱草中、高剂量组和联苯双酯组肝脏指数显著降低($P<0.05$),病理损伤程度明显改善,AST、ALT、ALP 水平显著降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低($P<0.05$),SOD、GSH-Px 含量显著升高($P<0.05$)、MDA 含量显著降低($P<0.05$)。**结论** 败酱草通过改善肝组织病理损伤、抑制炎症因子的释放、改善氧化应激对对乙酰氨基酚诱导的大鼠药物性肝损伤的具有保护作用。

【关键词】 药物性肝损伤;败酱草;对乙酰氨基酚;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0078-06

Herba Patriniae protects against paracetamol-induced liver injury in rats

TANG Wencheng^{1,2}, HE Qing¹, SONG Daping², SHEN Zhenghong², WANG Jisheng^{1*}

(1. School of pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. Mianyang Third People's Hospital, Sichuan mental health center, Mianyang 621000)

【Abstract】 Objective Herba Patriniae is a root grass of perennial herbaceous plants in the family *Caprifoliaceae*, with various pharmacological activities. This study was conducted to investigate the protective effect of Herba Patriniae on paracetamol-induced liver injury in rats. **Methods** Rats were intravenously injected with acetaminophen and then randomly divided into the control, model, low-dose Herba Patriniae, medium-dose Herba Patriniae, high-dose Herba Patriniae and

【基金项目】绵阳市科技局课题(2019YFZJ018)。

【作者简介】唐文诚(1984—),男,硕士,副主任药师,研究方向:天然药物化学及临床药学。E-mail:15881610506@163.com

【通信作者】王继生(1974—),男,博士,主任药师,研究方向:神经精神药理学及药物蛋白质组学。E-mail:24475434@qq.com

bifendatum groups. The low-, medium- and high-dose Herba Patriniae groups were gavaged with 4, 8 and 16 g/kg Herba Patriniae once per day, respectively. The bifendatum group received 0.3 g/kg bifendatum, and the control and model groups were given the same amount of normal saline for 30 consecutive days. The liver index was calculated. Hematoxylin and eosin staining was used to detect the degree of pathological injury to the liver tissue. Serum ALT, AST and ALP levels were detected using kits. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) were determined via enzyme-linked immunosorbent assay. Superoxide dismutase (SOD), MDA and GSH-Px contents in the liver homogenate were detected using kits. **Results** Compared with those of the control group, the liver index of the model group was significantly increased, the AST, ALT, ALP, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were significantly increased, the SOD and GSH-Px contents were significantly reduced, and the MDA content was significantly increased (all $P < 0.05$). Compared with those of the model group, the liver indexes of the Herba Patriniae and bifendatum groups were significantly reduced, the degree of pathological damage was significantly attenuated, the AST, ALT, ALP, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were significantly decreased, the SOD and GSH-Px contents were significantly increased, and the MDA content was significantly decreased (all $P < 0.05$). **Conclusions** Herba Patriniae protected rats from paracetamol-induced liver injury by alleviating pathological injury to the liver tissue, inhibiting the release of inflammatory factors and relieving oxidative stress.

【Keywords】 drug-induced liver injury; Herba Patriniae; paracetamol; oxidative stress

药物引起的肝损伤是急性肝衰竭的主要原因,这是由于人体中累积的药物代谢为有毒物质,并有助于产生严重的氧化应激,炎症和细胞凋亡,从而诱发肝细胞坏死最终损害肝^[1]。尽管药物性肝损伤临床发病率相对较低,但在发达国家,它仍然是急性肝衰竭的常见原因^[2]。对乙酰氨基酚(paracetamol, APAP)是世界上最受欢迎和最安全的止痛药之一,然而由于其广泛的可用性,它经常涉及有意或无意的过量使用,可导致严重的肝损伤,目前广泛用于临床建立药物性肝损伤动物模型^[3-4]。

近年来的研究表明,由于中草药具有治疗作用,被认为是改善肝和其他疾病的潜在药物^[5]。败酱草(herba patriniae)是多年生中草药,含有氨基酸、维生素、矿物质和生物碱等有益成分,具有抗氧化、抗菌、消除血瘀,促进肝细胞再生和减轻焦虑的作用^[6]。已有研究表明白花败酱草醇提物通过抗氧化及抑制肝细胞凋亡而改善四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤^[7],说明败酱草的肝保护作用。但败酱草对药物性肝损伤的具体作用机制尚未见报道,本文旨在探究败酱草对对乙酰氨基酚诱导的大鼠药物性肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 SD 清洁级大鼠,雄性,12 周龄,体重 280 ± 10 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011],动物合格证编号:

11400700183999,常规饲喂。所有大鼠均饲养于西南医科大学 SPF 动物房[SYXK(川)2018-065]。本研究经绵阳市第三人民医院伦理委员会批准(IACUC-2020D127-21),实验设计及实施过程中严格遵循动物实验的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

败酱草(121271-201201)、对乙酰氨基酚(100018-201610)购自中国食品药品检定研究院;联苯双酯(T3273)购自美国 Target Molecule Corp 公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(C0105M)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)测试盒(C009-2-1)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测试盒(C010-2-1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)测定试剂盒(A059-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(A003-1-2)、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(A001-3-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒(A005-1-2)购自南京建成生物工程研究所;TNF- α (JK-(a)-0016)、IL-6(JK-(a)-1498)、IL-1 β (JK-(a)-E06517)ELISA 测试盒购自上海晶抗生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组

将大鼠随机分为 6 组:对照组、模型组、败酱草低剂量组、败酱草中剂量组、败酱草高剂量组、联苯

双脂组,每组 10 只。除对照组外,其余各组参照王茜等^[8]方法每日灌胃对乙酰氨基酚 1000 mg/kg,每日 1 次,连续 30 d 复制肝损伤模型。造模同时,败酱草低剂量组、败酱草中剂量组和败酱草高剂量组每日灌胃败酱草 4、8、16 g/kg^[9],联苯双脂组每日灌胃联苯双脂 0.3 g/kg^[10],对照组和模型组灌胃等量生理盐水,连续 30 d。

1.3.2 肝脏指数

最后 1 次灌胃 12 h 后,测量各组大鼠重,处死所有大鼠,测量体重,计算肝脏指数。肝脏指数=肝重量(g)/体重(g)×100%。

1.3.3 HE 染色

将各组大鼠肝组织于 4%多聚甲醛中固定 72 h,随后对已固定的肝组织置于 20% 乙二胺四乙酸中进行脱钙处理,将样品在梯度浓度的乙醇中脱水并包埋在石蜡中。将石蜡包埋的组织切成 5 mm 切片,于室温下进行苏木精染色 10 min,伊红染色 2 min。使用光学显微镜观察肝组织病理学变化。

1.3.4 血清生化指标

按照试剂盒说明书,采用酶标仪测定血清中 ALT、AST 和 ALP 水平。ALT、AST 在 510 nm 处测 OD 值,AKP 在 520 nm 处测 OD 值。

1.3.5 ELISA

取各组大鼠肝组织,滴入含有蛋白酶抑制剂的冰缓冲液,制作成匀浆液,离心收集上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书测定肝组织上清液 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的水平。

1.3.6 氧化应激

按照试剂盒说明书,采用酶标仪测定肝组织匀浆中 SOD 含量,采用可见分光光度计测定丙二醛 MDA、GSH-Px 含量。SOD 在 450 nm 处测 OD 值,MDA 在 532 nm 处测 OD 值,GSH 在 412 nm 处测 OD 值。

1.4 统计学方法

用统计软件 SPSS 19.0 对所有实验数据进行统计分析,组间差异采用 *t* 检验或单因素方差分析进行检验。结果以平均数±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 败酱草降低对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠肝脏指数

与对照组相比较,模型组肝脏指数显著升高(*P*

<0.05)。与模型组相比较,败酱草中、高剂量组和联苯双酯组肝脏指数显著降低(*P* < 0.05)。见表 1。

2.2 败酱草改善对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠肝组织病理损伤

对照组肝细胞排列整齐,结构完整。模型组细胞排列紊乱,有明显出血,大量炎性细胞浸润。败酱草中、高剂量组和联苯双酯组细胞排列较整齐,出血明显减少,炎性细胞浸润减少。见图 1。

2.3 败酱草降低对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠 AST、ALT、ALP 水平

与对照组相比较,模型组 AST、ALT、ALP 水平显著升高(*P* < 0.05)。与模型组相比较,败酱草低、中、高剂量组和联苯双酯组 AST、ALT、ALP 水平显著降低(*P* < 0.05)。见表 2。

2.4 败酱草降低对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平

与对照组相比较,模型组 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平显著升高(*P* < 0.05)。与模型组相比较,败酱草低、中、高剂量组和联苯双酯组 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平显著降低(*P* < 0.05)。见表 3。

2.5 败酱草升高对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠 SOD、GSH-Px 含量,降低 MDA 含量

与对照组相比较,模型组 SOD、GSH-Px 含量显著降低(*P* < 0.05)、MDA 含量显著升高(*P* < 0.05)。与模型组相比较,败酱草低、中、高剂量组和联苯双酯组 SOD、GSH-Px 含量显著升高(*P* < 0.05)、MDA 含量显著降低(*P* < 0.05)。见表 4。

表 1 败酱草对对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of herba patriniae on hepatic index in rats with paracetamol-induced drug-induced liver injury		
组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	肝脏指数(%) Liver index
对照组 Control group	0	2.8±0.4
模型组 Model group	0	4.5±0.9*
败酱草低剂量组 Low dose herba patriniae group	4	3.2±0.2 [#]
败酱草中剂量组 Medium dose herba patriniae group	8	3.3±0.3 [#]
败酱草高剂量组 High dose herba patriniae group	16	3.1±0.3 [#]
联苯双酯组 Bifendatum group	0.3	3.2±0.3 [#]

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.

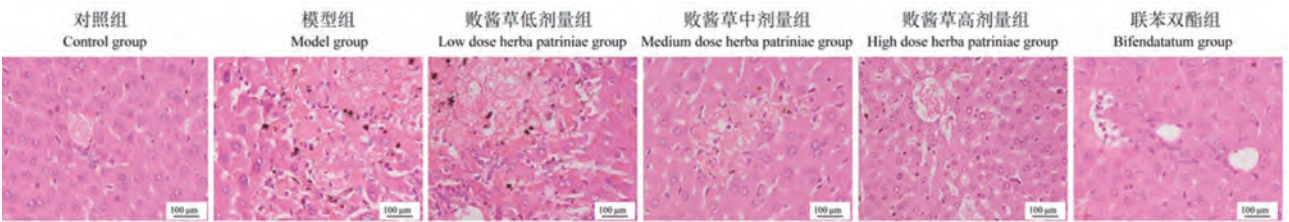


图 1 败酱草对对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠肝组织病理损伤的影响

Figure 1 Effect of herba patriniiae on pathological injury of rat liver tissue induced by paracetamol-induced drug-induced liver injury

表 2 败酱草对对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠 AST、ALT、ALP 水平的影响 (x̄±s, n=10)

Table 2 Effects of herba patriniiae on AST, ALT and ALP levels in rats with paracetamol-induced drug-induced liver injury				
组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	天门冬氨酸氨基转移酶 (U/L) AST	丙氨酸氨基转移酶 (U/L) ALT	碱性磷酸酶 (U/L) ALP
对照组 Control gourp	0	187. 34±27. 31	31. 80±5. 12	115. 74±8. 53
模型组 Model group	0	342. 66±15. 77 *	104. 67±18. 36 *	158. 47±14. 25 *
败酱草低剂量组 Low dose herba patriniiae group	4	310. 38±12. 03	94. 51±18. 79	145. 33±12. 86
败酱草中剂量组 Medium dose herba patriniiae group	8	287. 32±10. 58 [#]	77. 36±14. 07 [#]	132. 34±9. 85 [#]
败酱草高剂量组 High dose herba patriniiae group	16	230. 78±11. 57 [#]	68. 45±10. 75 [#]	112. 53±15. 31 [#]
联苯双酯组 Bifendatumum group	0. 3	227. 86±10. 91 [#]	65. 18±10. 17 [#]	110. 76±9. 34 [#]

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 3 败酱草对对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平的影响 (x̄±s, n=10)

Table 3 Effects of herba patriniiae on TNF-α, IL-6 and IL-1β levels in rats with paracetamol-induced drug-induced liver injury				
组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	肿瘤坏死因子 α (pg/mL) TNF-α	白介素 6 (pg/mL) IL-6	白介素 1β (pg/mL) IL-1β
对照组 Control gourp	0	141. 36±5. 37	49. 72±12. 51	24. 32±4. 33
模型组 Model group	0	357. 93±6. 57 *	193. 37±19. 44 *	159. 16±4. 52 *
败酱草低剂量组 Low dose herba patriniiae group	4	196. 86±5. 53 [#]	145. 44±13. 85 [#]	140. 97±5. 63 [#]
败酱草中剂量组 Medium dose herba patriniiae group	8	161. 85±6. 41 [#]	127. 61±15. 01 [#]	94. 85±5. 17 [#]
败酱草高剂量组 High dose herba patriniiae group	16	121. 74±6. 36 [#]	104. 95±15. 93 [#]	52. 60±4. 47 [#]
联苯双酯组 Bifendatumum group	0. 3	149. 19±6. 74 [#]	120. 9±10. 45 [#]	40. 27±3. 25 [#]

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 4 败酱草对对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤大鼠 SOD、MDA、GSH-Px 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effects of herba patriniae on SOD, MDA and GSH-Px levels in rats with paracetamol-induced drug-induced liver injury

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	总超氧化物歧化酶(U/mg Pro) SOD	丙二醛(nmol/mg Pro) MDA	谷胱甘肽过氧化物酶(U/mg Pro) GSH-Px
对照组 Control group	0	237.13±30.39	9.37±0.59	15.72±0.43
模型组 Model group	0	90.31±10.58 [*]	11.25±0.42 [*]	5.6±0.45 [*]
败酱草低剂量组 Low dose herba patriniae group	4	167.64±24.54 [#]	10.82±0.89 [#]	7.8±0.56 [#]
败酱草中剂量组 Medium dose herba patriniae group	8	189.92±16.41 [#]	10.17±0.62 [#]	9.3±0.81 [#]
败酱草高剂量组 High dose herba patriniae group	16	217.54±26.39 [#]	9.54±0.93 [#]	11.24±0.44 [#]
联苯双酯组 Bifendatum group	0.3	226.71±16.73 [#]	9.22±0.46 [#]	13.18±0.32 [#]

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

药物性肝损伤又称药物性肝病,由于化学药品数目增多及生物制剂和保健品的滥用,药物性肝损伤的发病率呈上升趋势^[11]。建立 APAP 诱导的药物性肝损伤模型是研究药物保肝护肝活性的经典方法,以期进一步研究药物性肝损伤的机制,为开发安全高效药的新奠定基础。本文研究发现,败酱草具有改善 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠病理损伤程度,降低肝脏指数的作用。

天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和碱性磷酸酶(ALP)是常见的反应肝损伤的生化标志物,当肝细胞受损时,细胞膜通透性改变,AST、ALT、ALP 释放进入血液,导致血清中 AST、ALT、ALP 水平升高^[12-13]。本文研究发现,败酱草具有降低 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠 AST、ALT、ALP 水平的作用,提示败酱草对 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠具有降酶保肝作用。

肝损伤严重程度取决于炎症因子的释放程度,由于炎症反应参与 APAP 诱导的药物性肝损伤的发生发展过程,抑制炎症因子的释放有助于治疗 APAP 诱导的药物性肝损伤^[14]。IL-6 属于参与机体免疫应答的炎症因子,其含量升高可引发内脏功能性损害,同时使 T 淋巴细胞增殖、分化,从而加剧机体炎症反应^[15]。TNF-α 是肝中重要的促炎、免疫调节因子,可引发肝组织炎细胞聚集,IL-1β 在多种脏器中起重要作用,其高表达预示着炎症的发生^[16]。韩亮等^[17]研究发现败酱草通过下调 TNF-α、IL-1β 水平减轻溃疡性结肠炎大鼠结肠的组织学

损伤程度。Seo 等^[18]研究发现黄花败酱提取物能抑制急性胰腺炎大鼠炎症细胞因子的表达。本文研究发现,败酱草具有降低 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平的作用。提示败酱草抑制 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠炎症因子的释放。

APAP 诱导药物性肝损伤的过程中,大量的氧自由基量生成和氧化应激次数的增多会加重肝损伤过程^[19]。MDA 是脂质发生过氧化反应的氧化终产物,测定 MDA 含量可反映机体脂质过氧化的程度,SOD 在人体中水平高低可间接反映机体清除自由基的能力。测定 MDA 及 SOD 含量,可有助于分析肝损伤程度和肝修复能力。GSH-Px 可衡量机体抗氧化能力强弱,测定肝组织中 GSH-Px 含量能较好的反映机体抗氧化的能力,间接反映肝细胞膜的修复程度^[20]。孟良玉等^[21]研究发现败酱草提取物可显著降低小鼠血清及组织 MDA 含量,提高 SOD、GSH-Px 和 CAT 活力。本文研究发现,败酱草具有升高 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠 SOD、GSH-Px 含量,降低 MDA 含量。提示败酱草通过抗氧化应激对 APAP 诱导的药物性肝损伤大鼠具有保护作用。

综上所述,败酱草通过改善肝组织病理损伤,降低血清生化酶水平,抑制炎症因子的释放,减轻氧化应激水平对 APAP 诱导的药物性肝损伤模型大鼠具有保护作用。为临床应用败酱草治疗药物性肝损伤提供了一定实验依据,但败酱草对 APAP 诱导的药物性肝损伤的具体分子作用机制还需进一步实验探讨。

参考文献:

- [1] Yan T, Huang J, Nisar MF, et al. The beneficial roles of sirt1 in drug-induced liver injury [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8506195.
- [2] Fu S, Wu D, Jiang W, et al. Molecular biomarkers in drug-induced liver injury: Challenges and future perspectives [J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1667.
- [3] Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen hepatotoxicity [J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(2): 221-234.
- [4] Pan Y, Cao M, You D, et al. Research progress on the animal models of drug-induced liver injury: Current status and further perspectives [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 1283824.
- [5] Yan T, Wang H, Zhao M, et al. Glycyrrhizin protects against acetaminophen-induced acute liver injury via alleviating tumor necrosis factor α -mediated apoptosis [J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(5): 720-731.
- [6] Fu B, Wu Q, Dang M, et al. Inhibition of pseudomonas aeruginosa biofilm formation by traditional chinese medicinal herb patriniae [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9584703.
- [7] 黄素华, 陈彤, 林芳, 等. 白花败酱草醇提物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2019, 47(7): 47-53, 61.
- [8] 王茜, 郝蕾, 韩雪, 等. 解毒护肝方对药物性肝损伤大鼠 jak2/stat3 通路的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6): 144-149.
- [9] 韩亮, 刘昌辉. 败酱草提取物对三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎的保护作用 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(1): 73-75.
- [10] 刘华, 薛娟, 唐振球, 等. 关黄柏对对乙酰氨基酚诱导大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中医药信息, 2017, 34(2): 1-4.
- [11] 余文豪, 刘汶. 药物性肝病研究进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2020, 28(5): 398-402.
- [12] Naguib YM, Azmy RM, Samaka RM, et al. Pleurotus ostreatus opposes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in acetaminophen-induced hepato-renal injury [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 494.
- [13] Haque T, Sasatomi E, Hayashi PH. Drug-induced liver injury: Pattern recognition and future directions [J]. Gut and liver, 2016, 10(1): 27-36.
- [14] Knockaert L, Descatoire V, Vadrot N, et al. Mitochondrial cyp2e1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(2): 475-484.
- [15] Chen Y, Guo J, Qian G, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2015, 30(9): 1429-1437.
- [16] 李峰, 包海鹰. 人参根总皂苷对 apap 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 上海医药, 2019, 40(3): 55-59.
- [17] 韩亮, 刘昌辉. 败酱草对溃疡性结肠炎大鼠结肠 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 表达的干预作用 [J]. 今日药学, 2013, 23(2): 78-80.
- [18] Seo SW, Park CS, Hong SH, et al. Inhibitory effect of patrinia scabiosaefolia on acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(7): 1110-1114.
- [19] He M, Zhang S, Jiao Y, et al. Effects and mechanisms of rifampin on hepatotoxicity of acetaminophen in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(9): 3142-3149.
- [20] Pal M, Li SH, Tewari SK, et al. Diterpenoid compounds from vitex agnus-castus [J]. Chem Nat Compd, 2013, 49(4): 635-638.
- [21] 孟良玉, 卢佳琨, 蔡文倩, 等. 败酱草提取物体内抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(22): 372-374.

[收稿日期] 2020-06-28

侯立亭, 郭洋, 胡红霞. VEGF 抑制剂对糖尿病性视网膜病变模型大鼠的干预效果及对 CRA 血流动力学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 84-89.

Hou LT, Guo Y, Hu HX. Intervention effect of VEGF inhibitor on diabetic retinopathy model rats and its influence on CRA hemodynamics [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 84-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 013

VEGF 抑制剂对糖尿病性视网膜病变模型大鼠的干预效果及对 CRA 血流动力学的影响

侯立亭, 郭 洋, 胡红霞*

(开封市中心医院眼科, 河南 开封 475000)

【摘要】 目的 研究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制剂对糖尿病性视网膜病变模型大鼠的干预效果及对视网膜中央动脉(central retinal artery, CRA)血流动力学的影响。**方法** 40 只 SPF 级、健康雄性大鼠, 随机选取 10 只为对照组, 建模成功 30 只大鼠随机分为模型组(生理盐水)、无菌柠檬酸组(无菌柠檬酸)、VEGF 抑制剂组(贝伐单抗)各 10 只。测定 CRA 血流舒张期最低流速(EDV)、收缩期峰值血流速度(PSV)、阻力指数(RI)、搏动指数(PI)及 Ras、Raf-1 及 ERK 表达。**结果** 与模型组相比, 无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 EDV (31.53±8.42/47.46±10.29/90.26±16.55 mm/s, $F/P=14.956/0.001$)、PSV (58.92±11.37/84.16±14.52/155.57±18.67 mm/s, $F/P=21.116/0.001$)、脂联素水平升高; RI (1.12±0.32/0.85±0.20/0.68±0.18, $F/P=7.046/0.001$)、PI (1.35±0.35/0.91±0.22/0.69±0.12, $F/P=8.861/0.001$)、血液流变学指标、空腹血糖、VEGF、ICAM-1、IL-1 β 水平, Ras、Raf-1 及 ERK 表达量降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。与无菌柠檬酸组相比, VEGF 抑制剂组 EDV (47.46±10.29/90.26±16.55 mm/s, $t/P=6.945/0.001$)、PSV (84.16±14.52/155.57±18.67 mm/s, $t/P=9.548/0.001$)、脂联素水平升高; RI (0.85±0.20/0.68±0.10, $t/P=2.404/0.027$)、PI (0.91±0.22/0.69±0.12, $t/P=2.776/0.012$)、血液流变学指标、空腹血糖、VEGF、ICAM-1、IL-1 β 水平, Ras、Raf-1 及 ERK 表达量降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** VEGF 抑制剂可改善糖尿病性视网膜病变模型大鼠 CRA 血流动力学与血液流变学指标, 降低 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平, 抑制血管新生。

【关键词】 糖尿病性视网膜病变; 血管内皮生长因子抑制剂; 视网膜中央动脉; 血液流变学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0084-06

Intervention effect of VEGF inhibitor on diabetic retinopathy model rats and its influence on CRA hemodynamics

HOU Liting, GUO Yang, HU Hongxia*
(Ophthalmology Department, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng 475000, China)

【Abstract】 Objective To study the intervention effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors on diabetic retinopathy model rats and the hemodynamics of central retinal artery (CRA). **Methods** Of 40 specific-pathogen-free healthy male rats, 10 were randomly selected as the control group. The remaining 30 rats were successfully modeled and randomly divided into the model group (normal saline), sterile citric acid group (sterile citric acid) and VEGF

[基金项目] 开封市科技发展计划项目(1603020)。

[作者简介] 侯立亭(1972—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 眼科、眼底病。E-mail: evze21@163.com

[通信作者] 胡红霞(1980—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 眼底病。E-mail: huhongxia1011@126.com

inhibitor group (bevacizumab) ($n = 10$). The minimum diastolic velocity (EDV) of the CRA was measured. **Results** Compared with the model group, the levels of EDV ($31.53 \pm 8.42/47.46 \pm 10.29/90.26 \pm 16.55$ mm/s, $F/P = 14.956/0.001$), peak systolic velocity (PSV; $58.92 \pm 11.37/84.16 \pm 14.52/155.57 \pm 18.67$ mm/s, $F/P = 21.116/0.001$) and adiponectin were increased in the aseptic citric acid and VEGF inhibitor groups. In addition, the resistivity index (RI; $1.12 \pm 0.32/0.85 \pm 0.20/0.68 \pm 0.18$, $F/P = 7.046/0.001$), pulsatility index (PI; $1.35 \pm 0.35/0.91 \pm 0.22/0.69 \pm 0.12$, $F/P = 8.861/0.001$), hemorheological indicators, fasting blood glucose, VEGF, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), interleukin-1 (IL-1) and expression levels of Ras, Raf and extracellular signal-regulated kinase (ERK) were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the aseptic citric acid group, the levels of EDV ($47.46 \pm 10.29/90.26 \pm 16.55$ mm/s, $T/P = 6.945/0.001$), PSV ($84.16 \pm 14.52/155.57 \pm 18.67$ mm/s, $T/P = 9.548/0.001$) and adiponectin were increased in the VEGF inhibitor group. Furthermore, the RI ($0.85 \pm 0.20/0.68 \pm 0.10$, $T/P = 2.404/0.027$), PI ($0.91 \pm 0.22/0.69 \pm 0.12$, $T/P = 2.776/0.012$), hemorheological indicators, fasting blood glucose, VEGF, ICAM-1, IL-1 and expression of Ras, Raf-1, and ERK were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** VEGF inhibitors can improve the CRA hemodynamics and hemorheology indices of diabetic retinopathy model rats, reduce the levels of VEGF, ICAM-1 and IL-1 β and inhibit angiogenesis.

[Keywords] diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor inhibitors; central retinal artery; hemorheology

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种糖尿病微血管并发症,是一种特异性眼底病变,其主要的病理改变为视网膜微血管变化^[1]。DR 患者的发病率主要与糖尿病病程相关,患者常出现的临床症状主要有硬性渗出、IRMA、出血斑点、微动脉瘤等,缺血广泛可降低患者视力,致视网膜脱离,严重情况下可致盲^[2]。DR 的发生机制尚未完全明确,较为复杂,目前相关研究主要表明其与高血糖引起的代谢紊乱有关,包括蛋白质非酶糖基化终末产物的形成和己糖胺途径的激活。蛋白激酶 C 激活,造成血管功能紊乱及氧化应激炎症反应,导致血管闭塞、局部缺血及血管渗透性增强^[3-4]。VEGF 抑制剂可阻止脉络膜新生血管形成,解除视网膜水肿,防治血管成分渗漏,改善视力,贝伐单抗属于一种典型的 VEGF 抑制剂,在治疗多种晚期肿瘤中效果明显,目前已经有研究显示通过玻璃体注射贝伐单抗,能治疗眼部新生血管性疾病,但是患者会出现并发症,其作用机制也尚不明确^[5]。本文将研究 VEGF 抑制剂对糖尿病性视网膜病变模型大鼠的干预效果及对 CRA 血流动力学的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 40 只 SPF 级、健康雄性大鼠,4~6 周龄,平均年龄 (4.8 ± 0.9) 周,体重为 170~190 g,平均体重 (171.0 ± 9.5) g,由广东斯嘉景达生物科技有限公司提供[SCXK(粤)2020-0052],经开封市中心医院伦理委员会审批批准(IACUC-201805-K1)。实验开始前,所有大鼠在我院动物研究实验中心[SYXK

(粤)2021-0251]适应性饲养 1 周,自由饮水,12 h 昼夜节律,温度为 20~25℃,湿度为 40%~50%。

1.2 主要试剂与仪器

贝伐单抗(上海麦克林生化科技有限公司,货号:B873505-1);无菌柠檬酸(中国药品生物制品检定所,批号:2003-10);LBY-HJ 四通道血小板聚集仪(上海寰熙医疗器械有限公司,货号:79028);Laser Doppler Flowmetry 激光血流仪(瑞典 perimed,型号:P457);血糖仪(美国强生);双抗体夹心酶联免疫法试剂盒(上海西唐生物公司,货号:F26260)。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病性视网膜病变大鼠模型建立

对照组大鼠 10 只给予标准饲料喂养,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组各 10 只大鼠给予高脂饲料喂养。在 8 周后,对照组给予生理盐水,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组大鼠给予腹腔注射 40 mg/kg 链脲佐菌素。3 d 后尿糖 3+,采集大鼠尾静脉血测血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L,糖尿病大鼠造模成功。各组大鼠饮食情况如前,继续喂养 4 周后,行眼底血管荧光造影检查,确立大鼠出现糖尿病视网膜病变,建模成功。

1.3.2 干预

无菌柠檬酸组给予 0.05 mL 的无菌柠檬酸腹腔干预;VEGF 抑制剂组大鼠给予玻璃体腔内注入 0.05 mL 贝伐单抗干预;对照组、模型组给予等体积的生理盐水干预,四组均连续给药每天 1 次,各组均连续干预 2 周。

1.3.3 CRA 血流参数检测

应用飞利浦 IU22 型彩色多普勒检查,探头频

率;10 MHz。腹腔注射麻醉,在获取连续 5 个以上稳定心动周期时,检测干预 2 周后大鼠右眼 CRA 各项血流参数。根据多普勒超声血流指标测定峰值血流速度;EDV、PSV、RI 及 PI。重复上述操作 3 次,取各项指标的平均值。

1.3.4 血液流变学指标检测

采用激光血流仪检测大鼠干预 2 周后全血粘度。大鼠心腔采血 2.5 mL,血小板聚集率检测用四通道血小板聚集仪。大鼠心腔采血 1.5 mL,血小板黏附率检测用体外血栓形成、血小板黏附两用仪。

1.3.5 脂联素、空腹血糖 (FBG)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、白介素-1 β (IL-1 β)水平检测

血糖测试前对动物禁食 12 h,使用血糖仪检测 FBG 水平。抽取大鼠尾部静脉血 2 mL,采用 PBS 缓冲液进行洗涤处理,转速为 2000 r/min 离心干预 10 min,摒弃上清液,采用双抗体夹心酶联免疫法试剂盒检测各组大鼠血浆中脂联素、ICAM-1、IL-1 β 水平。

1.3.6 病理学观察

采用 LDF 激光血流仪及眼球固定象限测定法检测干预 2 周后各组大鼠双眼血流。检查完成后将大鼠处死,摘取每只大鼠左侧眼球,10% 甲醛固定 24 h,经脱钙、脱水、透明以及包埋等处理制成石蜡块,保存待用。将组织进行切片,HE 染色,光镜下观察病理学变化。

1.3.7 Western blot 检测 Ras、Raf-1 及 ERK 表达量检测

将所采集到的大鼠左侧眼球组织标本,进行研磨,然后加入蛋白缓冲液,常规蛋白提取,BCA 法定量分析。50 μ g 蛋白样品上样后 SDS-PAGE 电泳,

电转到 PVDF 膜,在 TBST 中将 5%的脱脂奶粉避光封闭 1 h,洗涤后加入一抗稀释溶液 (Ras、Raf-1 及 ERK 按照 1:1000 比例进行稀释),在 4 $^{\circ}$ C 的环境中保存过夜,洗涤后加入二抗稀释溶液 (Ras、Raf-1 及 ERK 按照 1:5000 比例进行稀释),在温床中孵育 1 h后再次洗涤,加入发光液 ECL,使软件分析蛋白条带灰度值,内参蛋白是 GAPDH。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析处理。计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述,多组间比较采用齐性方差检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 CRA 血流参数比较

如表 1 所示,与正常大鼠相比,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 EDV、PSV 水平降低,RI 及 PI 水平升高,具有显著性差异 (*P*<0.05);与模型组相比,无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 EDV、PSV 水平升高,RI 及 PI 水平降低,具有显著性差异 (*P*<0.05);与无菌柠檬酸组相比,VEGF 抑制剂组 EDV、PSV 水平升高,RI 及 PI 水平降低,具有显著性差异 (*P*<0.05)。

2.2 病理学观察

如图 1 所示,对照组大鼠细胞内外节形态规整,视网膜各层细胞排列整齐。模型组大鼠视网膜内血管扩张,视网膜各层细胞结构排列紊乱,细胞间水肿。无菌柠檬酸组大鼠周细胞轻度水肿,各层细胞结构排列紊乱。VEGF 抑制剂组视网膜各层细胞排列较完整。

表 1 各组大鼠 CRA 血流参数比较 ($\bar{x}\pm s$, *n* = 10)
Table 1 Comparison of CRA blood flow parameters of rats in each group

组别 Groups	舒张期最低流速 (mm/s) EDV	收缩期峰值血流速度 (mm/s) PSV	阻力指数 RI	搏动指数 PI
对照组 Control group	108.12 $\pm$ 20.25	178.83 $\pm$ 25.14	0.41 $\pm$ 0.11	0.50 $\pm$ 0.13
模型组 Model group	31.53 $\pm$ 8.42 ^a	58.92 $\pm$ 11.37 ^a	1.12 $\pm$ 0.32 ^a	1.35 $\pm$ 0.35 ^a
无菌柠檬酸组 Sterile citric acid group	47.46 $\pm$ 10.29 ^{ab}	84.16 $\pm$ 14.52 ^{ab}	0.85 $\pm$ 0.20 ^{ab}	0.91 $\pm$ 0.22 ^{ab}
VEGF 抑制剂组 VEGF inhibitor group	90.26 $\pm$ 16.55 ^{abc}	155.57 $\pm$ 18.67 ^{abc}	0.68 $\pm$ 0.10 ^{abc}	0.69 $\pm$ 0.12 ^{abc}
<i>F</i>	16.566	20.614	9.953	10.799
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与对照组相比,^a*P*<0.05;与模型组相比,^b*P*<0.05;与无菌柠檬酸组相比,^c*P*<0.05。
Note. Compared with the control group, ^a*P*<0.05. Compared with the model group, ^b*P*<0.05. Compared with the sterile citric acid group, ^c*P*<0.05.

2.3 各组大鼠血液流变学指标比较

如表 2 所示,与正常大鼠相比,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组全血粘度、血小板聚集率及血小板黏附率水平升高,具有显著性差异 ($P<0.05$);与模型组相比,无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组全血粘度、血小板聚集率及血小板黏附率水平降低,具有显著性差异 ($P<0.05$);与无菌柠檬酸组相比,VEGF 抑制剂组全血粘度、血小板聚集率及血小板黏附率水平降低,具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠脂联素、空腹血糖水平比较

如表 3 所示,与正常大鼠相比,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组脂联素水平降低,FBG 水平升高,具有显著性差异 ($P<0.05$);与模型组相比,无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组脂联素水平升高,FBG 水平降低,具有显著性差异 ($P<0.05$);与无菌柠檬酸组相比,VEGF 抑制剂组脂联素水平升高,FBG 水平降低,具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.5 各组大鼠 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平比较

如表 4 所示,与正常大鼠相比,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平升高,具有显著性差异 ($P<0.05$);与模型组相比,无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平降低,具有显著性差异 ($P<0.05$);与无菌柠檬酸组相比,VEGF 抑制剂组 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平降低,具有显著性差异 ($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠血液流变学指标比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of hemorheological indexes of rats in each group

组别 Groups	全血粘度 (mPa/s) Whole blood viscosity	血小板聚集 (%) Platelet aggregation rate	血小板黏附 (%) Platelet adhesion rate
对照组 Control group	1.13±40.22	58.65±13.92	26.31±5.20
模型组 Model group	1.96±0.63 ^a	85.24±19.76 ^a	48.73±12.82 ^a
无菌柠檬酸组 Sterile citric acid group	1.75±0.45 ^{ab}	76.31±17.53 ^{ab}	39.18±10.35 ^{ab}
VEGF 抑制剂组 VEGF inhibitor group	1.40±0.35 ^{abc}	62.18±15.10 ^{abc}	33.30±8.22 ^{abc}
<i>F</i>	3.109	4.902	4.178
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与无菌柠檬酸组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the sterile citric acid group, ^c $P<0.05$.

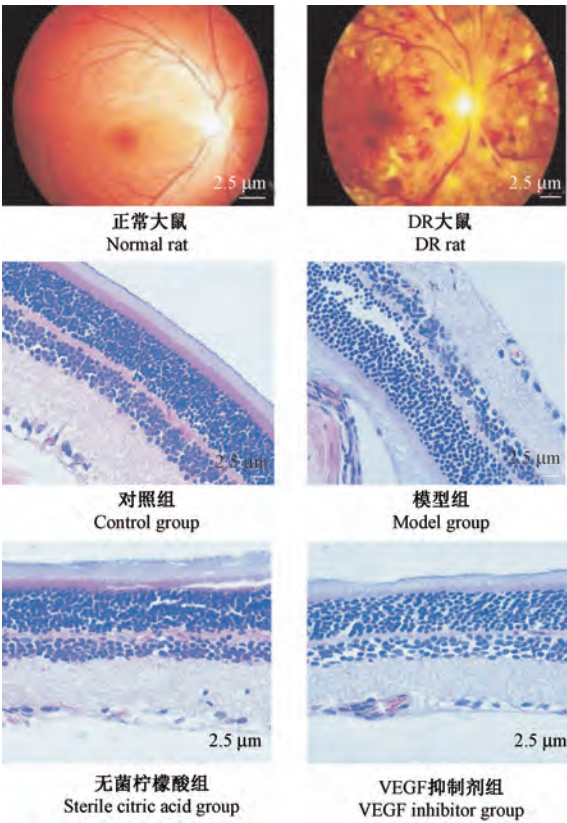


图 1 大鼠视网膜组织病理学观察(HE 染色)

Figure 1 Histopathological observation of retina in rats (HE staining)

表 3 各组大鼠脂联素、FBG 水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Comparison of adiponectin and FBG levels of rats in each group

组别 Groups	脂联素 (mg/L) Adiponectin	空腹血糖 (mmol/L) FBG
对照组 Control group	2.29±0.71	5.35±1.18
模型组 Model group	0.31±0.10 ^a	17.48±3.08 ^a
无菌柠檬酸组 Sterile citric acid group	0.58±0.25 ^{ab}	12.51±2.61 ^{ab}
VEGF 抑制剂组 VEGF inhibitor group	1.65±0.55 ^{abc}	8.91±1.70 ^{abc}
<i>F</i>	11.726	17.445
<i>P</i>	0.001	0.001

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与无菌柠檬酸组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the sterile citric acid group, ^c $P<0.05$.

2.6 各组大鼠 Ras、Raf-1 及 ERK 表达量比较

如表 5、图 2 所示,与正常大鼠相比,模型组、无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 Ras、Raf-1 及 ERK 表达量升高,具有显著性差异($P<0.05$);与模型组相比,无菌柠檬酸组、VEGF 抑制剂组 Ras、Raf-1 及 ERK 表达量降低,具有显著性差异($P<0.05$);与无菌柠檬酸组相比,VEGF 抑制剂组 Ras、Raf-1 及 ERK 表达量降低,具有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

在我国 DR 的发病率逐年上升,其主要是由多种因素共同作用导致的,是目前国内外导致低视力及致盲的重要疾病,不及时的有效治疗会随着病情发展导致失明,寻找有效的治疗方法尤为重要^[6]。随着病程的不断进展,DR 促使其局部缺血缺氧,促使毛细血管通透性增加,促使新生血管生成等,新生血管会导致结缔组织增生及玻璃体出血等,进一步增加视力丧失及视网膜脱离风险^[7]。较多学者为临床治疗提高新的靶点,发现血管生成抑制因子与血管生成刺激因子之间的动态平衡在其发展与发生过程中具有重要作用^[8]。VEGF 其生物活性可以被抑制剂阻断,是最重要的眼内新生血管生长因子,达到抑制新生血管生成的目的^[9-10]。

视网膜 CRA 是供应视网膜内参的主要血管,属于终末动脉,是眼动脉的分支,在维持视觉功能方面起重要的作用。视网膜动脉参数可用来反映视网膜的血液供应状况,与视网膜微循环的状态^[11]。本文研究显示,VEGF 抑制剂能提高大鼠 EDV、PSV 水平升高,降低 RI 及 PI 水平,从而改善视网膜 CRA 血流动力学状况。机体长时间处于高血糖状态易造成血-视网膜屏障受损,血小板聚集性增强,同时视网膜毛细血管闭塞,视网膜血管弹性下降,促进新生血管形成,引起视网膜毛细血管增生与微血管瘤^[12-13]。本文结果指出,VEGF 抑制剂能降低大鼠全血粘度、血小板聚集率及血小板黏附率水平。脂联素是脂肪细胞特异性分泌的一种蛋白质,在糖尿病合并症的发展中具有重要的作用,其水平增高可引起微循环障碍^[14]。本文中,与无菌柠檬酸组相比,VEGF 抑制剂组脂联素水平升高,FBG 水平降低。

VEGF 是血管内皮细胞特异的促有丝分裂素,过度表达会增加血管的渗透性,促进血管的异常增

表 4 各组大鼠 VEGF、ICAM-1 及 IL-1β 水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

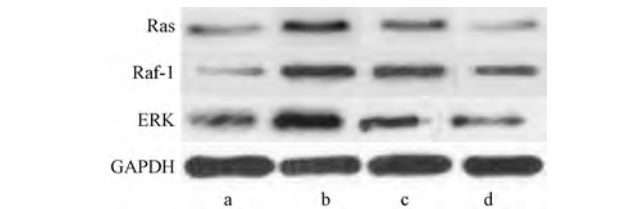
Table 4 Comparison of VEGF, ICAM-1 and IL-1β levels of rats in each group			
组别 Groups	血管内皮生长因子 (pg/mL) VEGF	细胞间黏附分子-1 (ng/L) ICAM-1	白介素-1β (pg/mL) IL-1β
对照组 Control group	40.76±9.53	58.08±8.22	6.38±1.15
模型组 Model group	91.19±19.48 ^a	89.65±19.71 ^a	18.15±4.26 ^a
无菌柠檬酸组 Sterile citric acid group	75.81±16.32 ^{ab}	78.84±18.39 ^{ab}	12.02±3.01 ^{ab}
VEGF 抑制剂组 VEGF inhibitor group	53.15±13.70 ^{abc}	67.39±11.55 ^{abc}	8.10±2.12 ^{abc}
<i>F</i>	9.509	4.008	6.914
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与无菌柠檬酸组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the sterile citric acid group, ^c $P<0.05$.

表 5 各组大鼠 Ras、Raf-1 及 ERK 表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 5 Comparison of the expression levels of Ras, Raf-1 and ERK in each group of rats			
组别 Groups	Ras	Raf-1	ERK
对照组 Control group	1.34±0.41	1.45±0.23	0.73±0.14
模型组 Model group	5.82±1.64 ^a	3.91±0.92 ^a	2.42±0.78 ^a
无菌柠檬酸组 Sterile citric acid group	3.67±1.13 ^{ab}	2.53±0.75 ^{ab}	1.59±0.40 ^{ab}
VEGF 抑制剂组 VEGF inhibitor group	1.98±0.62 ^{abc}	1.90±0.51 ^{abc}	1.05±0.21 ^{abc}
<i>F</i>	12.010	5.885	9.242
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与无菌柠檬酸组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the sterile citric acid group, ^c $P<0.05$.



注:a:对照组;b:模型组;c:无菌柠檬酸组;d:VEGF 抑制剂组。
图 2 Ras、Raf-1 及 ERK 蛋白表达 Western blot 图
Note. a, Control group. b, Model group. c, Sterile citric acid group. d, VEGF inhibitor group.

Figure 2 Western blot of Ras, Raf-1 and ERK protein expression

殖,其与组织中新血管数量具有密切联系,能特异性的作用于视网膜血管内皮细胞^[15]。炎性细胞黏附与血管内皮细胞是由 ICAM-1 介导的,损害局部血管,导致活化氧自由基、炎症递质等,引起血管通透性增加,加重视网膜的损伤^[16-17]。IL-1 β 在 DR 中加重视网膜病变,诱导 ICAM-1 等黏附因子,起关键作用的一种致炎因子^[18]。本文指出,VEGF 抑制剂通过能降低糖尿病性视网膜病变模型大鼠 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平,在抑制糖尿病性视网膜病变模型大鼠炎症方面作用显著。Ras/Raf-1/ERK 通路是调控细胞增殖、凋亡与分化的重要途径,是一个蛋白激酶级联反应,在 VEGF 介导的血管生成信号通路上起促进 VEGF 表达的作用^[19]。VEGF 抑制剂相对分子量小,能够穿透视网膜,与血管内皮生长因子特异性结合,加快缓解水肿,防治视网膜新生血管发生渗漏,阻止血管新生、再生,减轻炎症反应,改善视网膜功能^[20]。本文研究结果显示,VEGF 抑制剂对糖尿病性视网膜病变模型大鼠 Ras、Raf-1 及 ERK 蛋白表达有一定的调控作用,为其作用机制提供研究方向。本文研究的局限性主要体现在,本文研究实验仅做了一个时间点的视网膜病变的观察,在抑制糖尿病性视网膜病变发展这一结论研究方面,数据不充分,仍需要后续多试验点加以证实。

综上所述,VEGF 抑制剂可改善糖尿病性视网膜病变模型大鼠 CRA 血流动力学与血液流变学指标,降低 VEGF、ICAM-1 及 IL-1 β 水平,抑制血管新生。

参考文献:

- [1] Diallo JW, Dolo M, Sanou J, et al. What do we know about diabetic retinopathy at the Sourô Sanou university medical center in Bobo-Dioulasso (CHUSS)? [J]. J Fr Ophthalmol, 2019, 42 (4): 361-367.
- [2] Ghamdi AHA. Clinical predictors of diabetic retinopathy progression; A systematic review [J]. Curr Diabetes Rev, 2020, 16(3): 242-247.
- [3] 郭丹, 杜宇. 白皮杉醇对糖尿病视网膜病变模型大鼠的治疗效果及作用机制 [J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(12): 2026-2030.
- [4] Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri VV, et al. Current treatment strategies and nanocarrier based approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy [J]. J Drug Target, 2017, 25(5): 386-405.
- [5] 董冠中, 魏立, 务森, 等. 血管内皮生长因子抑制剂对小鼠

- 左肺全切手术后肺功能的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(11): 2061-2064.
- [6] Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(16): 5071-5076.
- [7] Zhu DD, Wang YZ, Zou C, et al. The role of uric acid in the pathogenesis of diabetic retinopathy based on Notch pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(2): 921-929.
- [8] Sun Y, Liu YX. LncRNA HOTTIP improves diabetic retinopathy by regulating the p38-MAPK pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(10): 2941-2948.
- [9] 符超君, 赵永旺, 凌艳君, 等. 双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜 Spred-1 和 VEGF 表达的影响 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(23): 2893-2898.
- [10] Chen B, He T, Xing Y, et al. Effects of quercetin on the expression of MCP-1, MMP-9 and VEGF in rats with diabetic retinopathy [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6): 6022-6026.
- [11] 金梅, 李晓凤. 糖尿病视网膜病变患者血清中细胞因子及视网膜中央动脉血流动力学的变化 [J]. 眼科新进展, 2019, 39(5): 453-455, 460.
- [12] 古爱平, 吴艺, 杨兵花. 大株红景天对糖尿病视网膜病变大鼠眼血流影响的实验研究 [J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(5): 791-795.
- [13] 刘学梅, 靳春杰, 周伟. 三七对糖尿病大鼠视网膜血流动力学影响的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(10): 2183-2186.
- [14] 刘颖, 张军, 戴金颖, 等. 益气养阴活血方对 2 型糖尿病大鼠脂肪组织及瘦素、脂联素的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(23): 2509-2513, 2520.
- [15] D'Amico AG, Maugeri G, Bucolo C, et al. Nap interferes with hypoxia-Inducible factors and VEGF expression in retina of diabetic rats [J]. J Mol Neurosci, 2017, 61(2): 256-266.
- [16] 王皎皎, 胡燃燃, 张丹, 等. 人参皂苷 Rg3 对糖尿病视网膜病变大鼠 PI3 K-Akt/PKB 通路和血管内皮生长因子、细胞间黏附分子-1 表达的影响 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(1): 20-25.
- [17] 李甜甜, 吕霄, 李伟. AM251 对糖尿病视网膜病变大鼠 ICAM-1 及 VEGF 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(14): 3816-3818.
- [18] 周玮琰, 王洪亚, 杜秀娟, 等. 甘糖酯对糖尿病大鼠视网膜病变中炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(8): 1444-1448.
- [19] 符超君, 凌艳君, 颜家朝, 等. 双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜 Ras-Raf-1-MEK-ERK 通路的调控作用 [J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(7): 728-731.
- [20] 刘德林, 梁红云, 陈文浩, 等. VEGF 抑制剂(贝伐单抗)治疗早产鼠视网膜病变的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2015, 17(6): 854-857, 861.

卢天宇, 高虹, 杨博超, 等. 基于微滴式数字 PCR 技术对猪内源逆转录病毒拷贝数的检测方法的建立及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 90-97.

Lu TY, Gao H, Yang BC, et al. Establishment and application of a droplet digital PCR-based method for measuring PERV copy number in the porcine genome [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 90-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 014

基于微滴式数字 PCR 技术对猪内源逆转录病毒拷贝数的检测方法的建立及应用

卢天宇, 高虹, 杨博超, 于佳楠, 徐亚新, 王若琳, 秦川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 利用微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 技术, 对猪基因组中猪内源逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 拷贝数测定方法进行优化, 建立 PERV 拷贝数的检测方法。**方法** 采用 TaqMan 探针双重 ddPCR 方法, 分别以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 和转铁蛋白受体 (transferrin receptor, *TFRC*) 为内参基因, 确定对 PERV 拷贝数检测反应最适合退火温度和反应循环数。另外, 通过对浓度梯度稀释的标准品质粒和猪细胞基因组进行检测, 以确定最适模板浓度。采用 ddPCR 和 qPCR 两种方法测定来自猪源细胞系和巴马小型猪组织中 PERV 的拷贝数, 比较两种检测方法的稳定性。**结果** 基于 ddPCR 技术检测 PERV 拷贝数的最适退火温度为 59.9℃, 最佳反应循环数为 50; 模板基因组的最适浓度在 1.25~7.5 ng; 检测同一样品来源基因组中 PERV 的拷贝数的变异系数在 0.44%~8.29%。**结论** 本研究建立了基于 ddPCR 技术的 PERV 拷贝数的检测方法并系统的探索了最佳实验条件, 与传统的 qPCR 相比, 该方法具有更高的准确性和可重复性, 为异种移植研究中供体动物基因组 PERV 拷贝数的测定提供了灵敏的方法和可靠依据。

【关键词】 微滴式数字 PCR; 猪内源逆转录病毒; 拷贝数; 绝对定量

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 09-0090-08

Establishment and application of a droplet digital PCR-based method for measuring PERV copy number in the porcine genome

LU Tianyu, GAO Hong, YANG Bochao, YU Jianan, XU Yaxin, WANG Ruolin, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To optimize the experimental conditions for the determination of porcine endogenous retrovirus (PERV) copy number in the porcine genome using a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) technique. **Methods** TaqMan probe duplex-ddPCR was used to determine the copy number of PERV, glyceraldehyde 3-

【基金项目】中国医学科学院医学创新工程重大协同创新项目 (2017-I2M-2-005)。

【作者简介】卢天宇 (1989—) 女, 助理研究员, 研究方向: 基因编辑动物模型的制备。E-mail: tianyu.lu890316@163.com

【通信作者】秦川 (1959—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com

phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and transferrin receptor protein 1 (*TFRC*) were adopted as the internal reference genes. To determine the optimal annealing temperature and PCR cycle number, we compared multiple conditions. In addition, the suitable range of template amount was estimated by examining the serially diluted plasmid and the pig cell genome. Genomic DNA isolated from pig cell lines or Bama minipig tissue was used to determine the copy number of PERV using ddPCR-and quantitative PCR-based method, which demonstrated the repeatability of different method. **Results** The optimal annealing temperature for the ddPCR-based method to measure PERV copy number was 59.9℃, and the optimal number of PCR cycles was 50. The suitable template genome concentration ranged from 1.25 to 7.5 ng. The variation of coefficients for PERV copy number in the porcine genome ranged from 0.44% to 8.29%. **Conclusions** A method for analyzing the PERV copy number based on the ddPCR technique was established, which improved the accuracy and repeatability compared with a traditional quantitative PCR-based detection approach. This method provides a sensitive approach and is a reliable basis for the determination of PERV copy number in donor animal genomes for xenotransplantation studies.

【**Keywords**】 droplet digital PCR; porcine endogenous retrovirus; copy number; absolute quantification

在临床实践中,可供移植用的人类组织器官目前仍面临严重的短缺问题,使用源自猪的细胞、组织或器官进行异种移植,是解决该问题的潜在途径之一^[1]。猪内源逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)是一种 C 型逆转录病毒,在进化过程中以前病毒 DNA 的形式被整合在猪基因组中^[2]。目前 PERV 对于体内人类细胞的感染风险尚不确定,而供体猪不能通过无特定病原体培育、早期断奶或胚胎移植等方式消除 PERV,从而造成了异种移植的潜在生物安全隐患^[3]。因此,精确的测定 PERV 在供体动物中的拷贝数,以预测 PERV 的感染风险,对于异种移植的临床研究及应用具有重要的意义。

传统检测 PERV 拷贝数通常使用 Southern blot^[4]、荧光原位杂交^[5]以及定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)^[6-7]等方法,不同的方法对 PERV 的拷贝数测定结果有所差异^[8]。其中,最常使用的 qPCR 方法在每次检测时都必须进行标准曲线的制备,而单次所能够检测样品数较少,加之 PERV 在不同来源的猪基因组中的拷贝数变化较大^[9],扩增效率很难保证一致,易造成检测结果的准确性低和重复性差。

数字 PCR 作为新兴的技术,越来越广泛的用于核酸样品的分析,例如基因表达的检测^[10]、病毒拷贝数的分析和绝对定量分析^[11-13]以及拷贝数变异分析^[14]等。相比于 qPCR 技术,使用数字 PCR 技术进行绝对定量分析不依赖于引物扩增效率,不需要使用标准品,可以直接测定出样品中目标基因的拷贝数,极大地减少了技术干扰,是真正意义上的绝对定量^[15]。而微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)则是通过微滴发生油将整个反应体

系分割成多个反应微滴,再在单个微滴内进行独立的 PCR 扩增,通过读取荧光信号确定阳性微滴和阴性微滴,根据泊松分布的原理推算目标基因的拷贝数^[16-17]。

本研究采用双重荧光 TaqMan 探针,分别以猪 *GAPDH* 和 *TFRC* 作为内参基因,通过对于退火温度、反应循环数以及检测样本量等参数进行了系统的优化,建立了基于 ddPCR 技术的 PERV 拷贝数检测方法。通过与基于 qPCR 检测方法的比较,我们展示了所建立的 PERV 拷贝数检测新方法具有更高的灵敏度和更好重复性,为异种移植研究中 PERV 拷贝数的检测提供更好的技术和参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒标准品

将猪 *GAPDH* 基因(3430~4294 bp)、*TFRC* 基因(1200~1947 bp)和 PERV 的 *pol* 基因(3344~4115 bp),长度分别为 730、665 和 748 bp 的 DNA 片段,克隆到 pEASY (3929 bp)载体上,获得 pEASY-*GAPDH*、pEASY-*TFRC* 和 pEASY-*pol* 质粒。紫外分光光度计测定标准品质粒的浓度而计算拷贝数,通过 10 倍梯度稀释,获得 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 和 1 copies/μL 的浓度梯度稀释的质粒标准品。

1.1.2 猪基因组 DNA

本研究中采用的猪基因组 DNA 样品,分别是来自 2 个猪胚胎成纤维细胞 (porcine embryonic fibroblasts, PEF)、猪的肾表皮细胞系 PK15 以及来自 3 个不同个体的巴马小型猪的肺部组织,按照基因组提取试剂盒说明书获得细胞和组织基因组。

1.2 主要试剂与仪器

基因组提取试剂盒(全式金,中国);用于 qPCR 的 TB Green Mix (TaKaRa 公司,中国);微滴生成油、微滴读取油、ddPCR 的反应液、微滴生成卡 (Bio-Rad, 美国); MseI 内切酶 (NEB, 中国); 96 孔板 (ABI, 美国); Nano Drop 紫外分光光度 (赛默飞, 美国); QX20TM Droplet Digital PCR 系统 (Bio-Rad, 美国, 包括微滴发生仪、微滴分析仪和热膜封口仪); CFX 定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); T100 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); 引物和探针均由北京六合华大合成, 具体信息见表 1。

1.3 实验方法

1.3.1 微滴数字 PCR

(1) 基因组酶切: 500 ng 基因组采用 5 U MseI 限制性内切酶, 37℃ 水浴 2 h。

(2) 微滴生成: 配制 20 μL 反应体系 (其中包含反应液 mix 10 μL, 引物各 900 nmol/L, 探针各 250 nmol/L, 标准质粒或 MseI 酶切后的基因组 1 μL, 补充水至 20 μL) 加入微滴反应卡中。在微滴反应卡加入 70 μL 微滴生成油, 发生卡胶垫盖好后, 将微滴发生卡放在微滴生成仪中生成微滴。

(3) PCR 扩增: 将生成的微滴转移到 96 孔板中, 用 PX1 进行膜热封后, 96 孔板放在 PCR 仪上进行扩增。反应参为 95℃ 10 min; 94℃ 30 s, 退火温度 1 min, 40~50 个循环; 98℃ 10 min, 所有步骤升温速度均为 2℃/s。

(4) 微滴读取: 扩增反应结束后, 将 96 孔板放入 QX200 微滴分析仪中, 采用 Quantsoft 软件进行微滴读取。

1.3.2 qPCR 反应体系和条件

本实验中 qPCR 的反应体系为 25 μL (TB Green mix 12.5 μL、10 μmol/L PCR 引物各 1 μL、模板 DNA 约 100 ng、补充水至 25 μL)。PCR 反应条件为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。

1.3.3 ddPCR 退火温度的优化

选择 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃、57.5℃ 6 个温度, 进行退火和延伸温度的优化。以 10⁴ copies/μL 的 3 个质粒标准品以及 1.25 ng 的 PEF 10# 基因组为模板, 确定最佳退火温度。

1.4 统计学方法

使用 Quantasoft 软件对 ddPCR 数据进行图像处理和结果分析, 本研究中所有涉及的 ddPCR 反应微滴生成数均在 10000~15000, 符合 ddPCR 泊松分布

的统计学原理, 保证了后续分析结果的准确性。采用 GraphPad 进行数据统计和差异分析, 结果用平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 三组间比较采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 微滴数字 PCR 退火温度的优化

以 10⁴ copies/μL 的标准品为模板, 分别在 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃、57.5℃ 6 个退火温度下进行 PCR 反应, 结果显示 pEASY-GAPDH、pEASY-TFRC 和 pEASY-pol 标准品在这 6 个温度条件下均能检测到荧光信号, 在不同退火温度下没有显著差别 (图 1A 和表 2)。

以 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃、57.5℃ 为退火和延伸温度, PEF 基因组作为模板, 分别以 GAPDH 和 TFRC 为内参基因进行 ddPCR 检测。如一维散点图所示, pol 基因、GAPDH 基因和 TFRC 基因分别在 59.9℃~61.9℃、57.5℃~63.0℃、57.5℃~60.9℃ 进行退火和延伸温度适合 (图 1B 和 1C)。综上, 本研究选用 59.9℃ 作为后续 ddPCR 反应的最佳退火和延伸温度。

表 1 检测 PERV 拷贝数所用的引物和探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes	
引物及探针 Primer and probe	序列 (5' - 3') Sequence
Primer Pol1-FW	CGACTGCCCAAGGGTTCAA
Primer Pol2-RV	TCTCTCTGCAAATCTGGGCC
Probe Pol ^[18]	/56FAM/CACGTACTGGAGGAGGGT CACCTG/BHQ1
Primer pig_GAPDH_FW	CCGCGATCTAATGTTCTCTTTC
Primer pig_GAPDH_RV	TTCACTCCGACCTTCACCAT
Probe pig_GAPDH	/5HEX/ CAGCCGCTCCCTGAGACAC/BHQ2
TFRC-Taqman-FW	TTCCCTCAAACACCTCGCTTA
TFRC-Taqman-RV	TGGTATCCAATCCCTTTGACAAC
pTFRC-probe1	/5HEX/TTTGGGCAGACCTCAAATA CTGTGTC/BHQ2

表 2 标准品质粒在不同退火温度下 ddPCR 检测的拷贝数
Table 2 Copy numbers of standard plasmids detected by ddPCR at different annealing temperatures

退火温度 (℃) Annealing temperature	拷贝数 (10 ³ copies/μL) Copy numbers		
	pol	GAPDH	TFRC
63.0	4.86	5.30	4.80
61.9	4.76	5.50	4.90
60.9	4.86	5.24	4.78
59.9	4.98	5.44	4.84
58.6	4.38	5.46	4.78
57.5	4.80	5.52	4.64

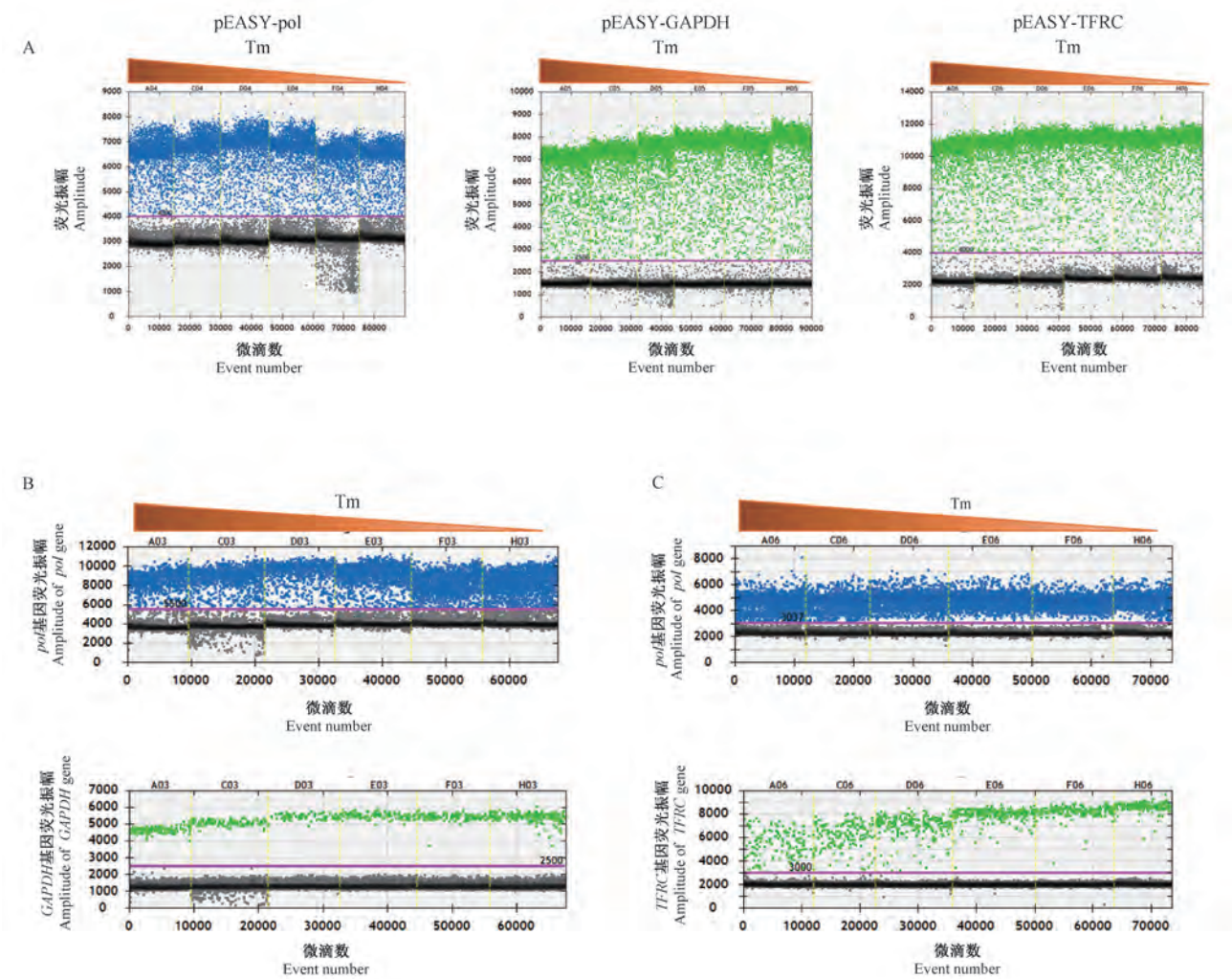
2.2 微滴数字 PCR 循环数的优化

根据 Bio-Rad 官方建议, ddPCR 反应扩增循环数应为 40 个,但在以基因组为模板对退火温度优化时,PERV *pol* 基因扩增后的阴、阳微滴较难分开(图 1B 和 1C),易造成结果分析的偏差。因此,本研究通过提高 PCR 扩增循环数来优化这一反应条件。实验分别采用 40、45 和 50 个扩增循环对 PEF 的基因组模板进行 PCR 扩增。结果显示,扩增循环数的提高对于微滴生成并没有显著影响(图 2A)。但是,随着扩增循环数的增加,*pol* 基因扩增微滴的阴、阳性信号逐渐分开(图 2B)。因此,本研究确定 50

个扩增循环作为后续 ddPCR 检测的反应条件。

2.3 ddPCR 检测范围的确定

本研究将 3 个基因的标准品质粒进行 10 倍浓度梯度稀释,对不同浓度的标准品分别进行 ddPCR 检测。结果显示,随着标准品浓度降低,阳性微滴数减少,3 个基因的标准品以 10^6 copies/ μ L 为模板进行 PCR 扩增产生的微滴全部为阳性微滴,超出了检测上限;以 1 copy/ μ L 的标准品为模板进行 PCR 扩增后,所产生的微滴中并未检测到阳性微滴(图 3A)。采用 ddPCR 检测标准品的拷贝数与紫外分光光度计测定的 DNA 拷贝数,在检测范围内具有良



注:A:质粒标准品为模板;B:PEF 基因组为模板 *GAPDH* 为内参基因;C:PEF 基因组为模板 *TFRC* 为内参基因在不同退火温度下进行 ddPCR 检测。Tm 从左至右依次为 63.0℃、61.9℃、60.9℃、59.9℃、58.6℃和 57.5℃。

图 1 不同退火温度下 ddPCR 扩增一维散点图

Note. A, Standard plasmids as template. B, DNA isolated from PEF as template and *GAPDH* as reference gene. C, DNA isolated from PEF as template and *TFRC* as reference gene were measured by ddPCR at different annealing temperatures at different annealing temperatures. Tm is 63.0℃, 61.9℃, 60.9℃, 59.9℃, 58.6℃ and 57.5℃ from left to right.

Figure 1 One-dimensional scatter plot of ddPCR at different annealing temperatures

好的相关性, *pol* 基因 $r^2 = 0.992$, $P < 0.001$ 、*GAPDH* 基因 $r^2 = 0.9976$, $P < 0.0001$ 、*TFRC* 基因 $r^2 = 0.996$, $P < 0.001$ (图 3B)。

本研究将 PEF 基因组按照 107.5、5、2.5、1.25 和 0.625 ng 为模板进行 ddPCR。样本以 10 ng 基因组为模板, 阳性微滴数超过了总微滴数的 90% (图 3C)。随着基因组模板浓度的降低, 检测结果的变异系数提高 (图 3D)。因此在满足 ddPCR 反应不超过检测上限的基础上, 提高模板量能够提高结果的准确性。检测 PERV 拷贝数时, 采用基因组模板在 1.25~7.5 ng 进行 PERV 拷贝数的检测为宜。

2.4 样本检测

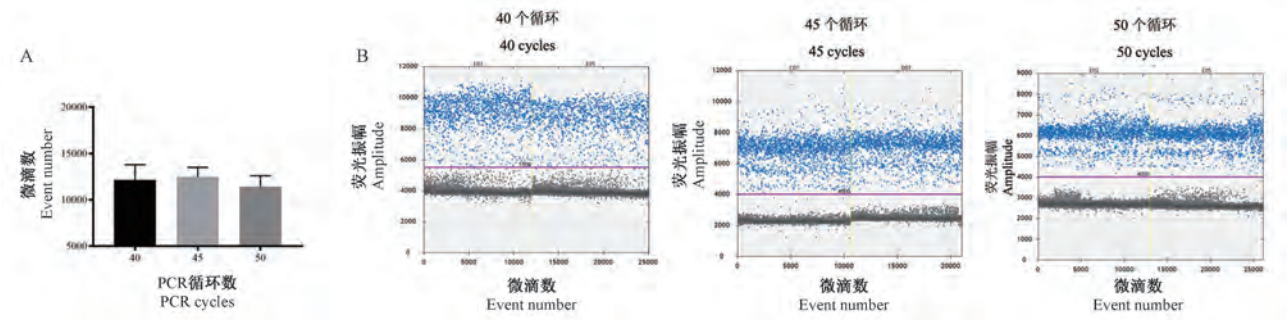
对来自 3 个细胞和 3 个肺组织的基因组样本, 采用 ddPCR 和 qPCR 两种方法进行 PERV 拷贝数的检测。结果显示, ddPCR 检测 PERV 拷贝数结果的变异系数在 0.44%~8.29% 之间, 显著低于同一样本 qPCR 检测结果的变异系数, 显示了 ddPCR 检

测结果具有良好的稳定性 (表 3)。

3 讨论

随着免疫抑制药物研究和基因修饰供体动物的快速发展, 将猪源器官异种移植到非人灵长类动物模型后, 移植物可以存活数月甚至数年^[19-21], 异种移植是否可应用于临床也被不断的讨论。但是, 体外研究发现 PERV 可以感染人源细胞^[22-23], 因此猪源组织器官异种移植到人体存在生物安全风险。从当前猪到非人灵长类模型的的研究结果, 对供体猪体内 PERV 活性进行实时监测可以提前预测并防范该风险^[24]。因此, 对 PERV 拷贝的精确检测对于异种移植的临床应用具有重要的意义。

本研究采用 ddPCR 技术对猪基因组中 PERV 拷贝数的进行检测。与传统的 qPCR 方法相比, 检测结果具有更好的稳定性和重复性, 所需的被检测样本量也仅是 qPCR 方法所需的 1/10~1/20, 更适



注: A: 不同 PCR 循环数下 ddPCR 产生的总液滴数; B: 不同扩增循环数下 *pol* 基因扩增的一维散点图。

图 2 ddPCR 反应循环数优化

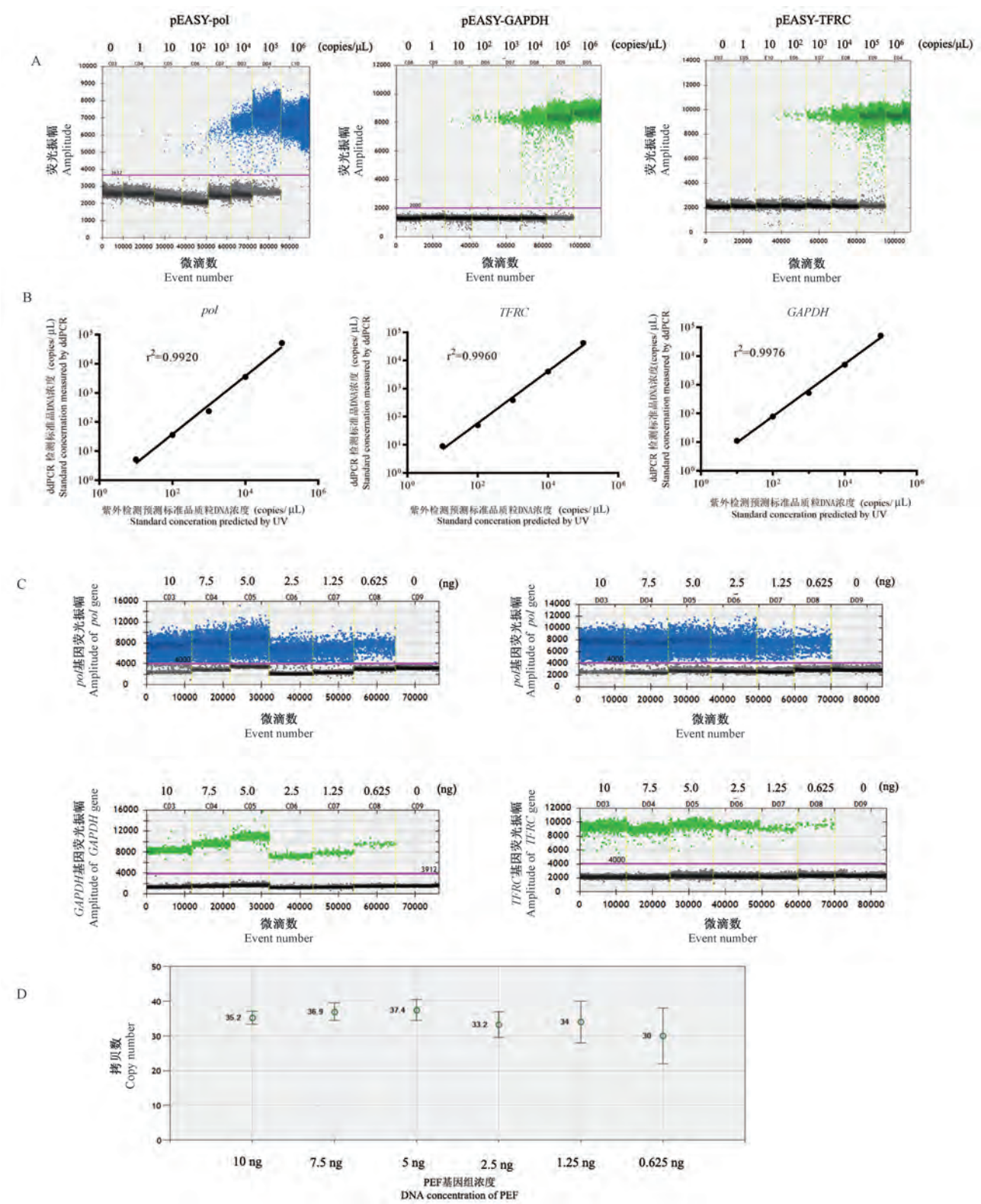
Note. A, Events produced at different PCR cycle number. B, One-dimensional scatter plot of *pol* gene at different PCR cycle number.

Figure 2 Optimization of ddPCR cycle number

表 3 ddPCR 和 qPCR 测定不同来源猪基因组中 PERV 的拷贝数($\bar{x} \pm s$)
Table 3 PERV copy numbers in pig genome detected by ddPCR and qPCR

样品 Samples	微滴式数字 PCR (copies/ μ L) ddPCR				荧光定量 PCR (copies/ μ L) qPCR			
	<i>GAPDH</i> 为内参 <i>GAPDH</i> as reference gene		<i>TFRC</i> 为内参 <i>TFRC</i> as reference gene		<i>GAPDH</i> 为内参 <i>GAPDH</i> as reference gene		<i>TFRC</i> 为内参 <i>TFRC</i> as reference gene	
	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation	拷贝数 Copy number	变异系数 Coefficient of variation
PEF 6#	32.50 $\pm$ 0.14	0.44%	33.25 $\pm$ 2.76	8.29%	67.53 $\pm$ 13.43	19.89%	24.38 $\pm$ 4.06	16.66%
PEF 10#	33.17 $\pm$ 1.42	4.27%	32.87 $\pm$ 1.03	3.12%	210.44 $\pm$ 63.70	30.27%	52.00 $\pm$ 12.67	24.37%
PK15	59.10 $\pm$ 3.87	6.65%	57.60 $\pm$ 0.66	1.14%	175.75 $\pm$ 32.26	18.41%	78.70 $\pm$ 2.65	3.37%
肺 1# Lung 1#	41.07 $\pm$ 0.93	2.26%	28.83 $\pm$ 0.71	2.46%	49.52 $\pm$ 5.92	11.95%	32.58 $\pm$ 3.76	11.54%
肺 2# Lung 2#	40.37 $\pm$ 0.31	0.76%	32.60 $\pm$ 0.56	1.71%	69.10 $\pm$ 7.76	11.24%	42.33 $\pm$ 3.11	7.35%
肺 3# Lung 3#	39.50 $\pm$ 2.02	5.12%	32.40 $\pm$ 1.18	3.64%	64.68 $\pm$ 9.23	14.27%	40.88 $\pm$ 2.65	6.63%

注: 数据来自 3 次独立重复试验。
Note. Data came from three independent replicates.



注:A:浓度梯度稀释的标准品为模板扩增一维散点图;B:质粒标准品进行 ddPCR 检测的线相关性;C:浓度梯度稀释 PEF 基因组为模板扩增一维散点图;D:不同基因组浓度下 PERV 检测拷贝数。

图 3 ddPCR 对于 PERV 拷贝数的检测范围

Note. A, One-dimensional scatter plot of standard plasmids at different template concentration. B, Liner correlation analysis of ddPCR and standard plasmids concentration measured by UV measurement. C, One-dimensional scatter plot of PEF genome at different template concentration. D, PERV copy numbers of PEF detected by ddPCR at different template concentration.

Figure 3 Range of template for PERV copy number detected by ddPCR

操作中,微滴生成后,需将微滴转移到其他模块中进行扩增和检测。在转移过程中可能造成液体的损失,从而导致目标分子定量的低估^[25]。因此,本研究中我们采用 TaqMan 荧光探针双重微滴的方法,在同一微滴内对内参基因和目标基因进行绝对定量,从而规避了 ddPCR 的这一缺点。其次,ddPCR 结果分析时确保阴性和阳性微滴的划分对于结果的准确性也非常重要,保证引物及探针的序列特异性和控制模板检测范围是控制这一因素的重要条件^[26]。但是,PERV 是作为前病毒被插入在猪基因组中,即使是高度保守的 *pol* 基因也含有点突变,且基因组中 PERV 的拷贝数较高,因此在 ddPCR 结果分析过程中微滴出现了“下雨”现象。为了解决这一问题,本研究中在选择特异性较好的引物和探针的条件下,还提高了 PCR 的循环数,从而提高了阳性微滴荧光的振幅,解决了阳性微滴的识别,提高了结果的准确性。这一结果也为采用 ddPCR 技术进行拷贝数变异分析时,优化检测条件提供了可行的方向。

在 ddPCR 中选择适合的内参基因,对于检测结果的准确性和稳定性具有重要的影响。*GAPDH* 和 *TFRC* 基因是猪基因组中的单拷贝基因^[27],在本研究中被选做内参基因。结果显示,在 3 个细胞来源的样品中,分别采用两个不同的内参基因,PERV 拷贝数检测显示了良好的一致性,在后续的研究中可以作为 PERV 拷贝数检测的候选内参基因。但是在组织样品检测中,*GAPDH* 和 *TFRC* 分别作为内参基因后所得到的结果略有差异。我们推测可能是由于组织样本中含有多种类型的细胞,尤其是存在大量血细胞,而造成了这一差异^[8]。因此,在后续研究中,从组织样本分离单一类型的细胞进行 PERV 拷贝数的检测有可能提高检测结果的准确性。

综上所述,本研究建立了基于 ddPCR 技术对 PERV 拷贝数的检测方法,为异种移植供体动物中 PERV 的监测提供了可靠的方法,对于异种移植的临床研究具有重要的意义。

参考文献:

[1] Lu T, Yang B, Wang R, et al. Xenotransplantation: current status in preclinical research [J]. Front Immunol, 2019, 10: 3060.

[2] 张芸飞, 李鹏, 黄利华, 等. PERV 病毒在异种移植中的感染风险及预防对策 [J]. 生命科学研究, 2019, 23(2): 162-167.

[3] Fishman JA, Scobie L, Takeuchi Y. Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation [J]. Xenotransplantation, 2012, 19(2): 72-81.

[4] Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, et al. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species [J]. J Virol, 2001, 75(6): 2771-2775.

[5] Lee JH, Webb GC, Allen RD, et al. Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs [J]. J Virol, 2002, 76(11): 5548-5556.

[6] Garkavenko O, Wynyard S, Nathu D, et al. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics from a designated pathogen-free herd [J]. Transplant Proc, 2008, 40(2): 590-593.

[7] Mang R, Maas J, Chen X, et al. Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding [J]. J Gen Virol, 2001, 82(8): 1829-1834.

[8] Denner J. How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? [J]. Viruses, 2016, 8(8): 215.

[9] Fiebig U, Fischer K, Bahr A, et al. Porcine endogenous retroviruses: Quantification of the copy number in cell lines, pig breeds, and organs [J]. Xenotransplantation, 2018, 25(4): e12445.

[10] Takahashi K, Yan IK, Kim C, et al. Analysis of extracellular RNA by digital PCR [J]. Front Oncol, 2014, 4: 129.

[11] Strain MC, Lada SM, Luong T, et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e55943.

[12] Huang JT, Liu YJ, Wang J, et al. Next generation digital PCR measurement of hepatitis B virus copy number in formalin-fixed paraffin-embedded hepatocellular carcinoma tissue [J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 290-296.

[13] 张丽丽, 陆佳涵, 薛婧, 等. 艾滋病模型中关键指标 SIV DNA 绝对定量微滴式数字 PCR 技术的创新应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 27-30, 53.

[14] Abyzov A, Mariani J, Palejev D, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells [J]. Nature, 2012, 492(7429): 438-442.

[15] Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances [J]. Clin Chem, 2013, 59(11): 1670-1672.

[16] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal Chem, 2011, 83(22): 8604-8610.

[17] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 1003-1005.

[18] Yang L, Güell M, Niu D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) [J]. Science, 2015, 350(6264): 1101-1104.

[19] Längin M, Mayr T, Reichart B, et al. Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation [J]. Nature, 2018, 564(7736): 430-433.

- [20] Watanabe H, Ariyoshi Y, Pomposelli T, et al. Intra-bone bone marrow transplantation from hCD47 transgenic pigs to baboons prolongs chimerism to >60 days and promotes increased porcine lung transplant survival [J]. *Xenotransplantation*, 2020, 27 (1): e12552.
- [21] Kim SC, Mathews DV, Breeden CP, et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion [J]. *Am J Transplant*, 2019, 19 (8): 2174–2185.
- [22] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs [J]. *Nat Med*, 1997, 3 (3): 282–286.
- [23] Specke V, Rubant S, Denner J. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses [J]. *Virology*, 2001, 285 (2): 177–180.
- [24] Łopata K, Wojdas E, Nowak R, et al. Porcine endogenous retrovirus (PERV)-molecular structure and replication strategy in the context of retroviral infection risk of human cells [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 730.
- [25] 李慧调, 潘建章, 方群. 数字 PCR 技术的发展及应用 [J]. *化学进展*, 2020, 32 (5): 581–593.
- [26] Bell AD, Usher CL, McCarroll SA. Analyzing copy number variation with droplet digital PCR [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1768: 143–160.
- [27] 房国锋, 王守栋, 曾勇庆, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测转基因猪外源基因整合拷贝数 [J]. *中国兽医学报*, 2016, 36 (1): 90–94, 107.

[收稿日期]2020-12-01

阿尔茨海默病 5XFAD 小鼠模型尿液中外泌体 microRNA 的表达谱分析

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种难治且不可逆的神经退行性疾病,发病机制尚不明确。因此,在淀粉样蛋白- β 斑块 ($A\beta$ 斑块) 沉积之前识别候选生物标志物对于早期干预 AD 具有重要意义。中国医学科学院医学实验动物研究所病理平台课题组的研究人员,通过测定早期 AD 小鼠模型尿液外泌体中 microRNA (miRNA),寻找可以早期诊断 AD 的标志物。

本文选用 $A\beta$ 斑块形成前期的 1 月龄 5XFAD 小鼠模型及其同窝对照组,采用生物信息学的方法,对小鼠尿液中外泌体的 miRNA 进行差异表达分析。同时,对筛选出的差异表达基因进行了 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路分析、GO (Gene Ontology) 富集分析。差异基因分析结果显示存在 48 个差异表达 miRNA (18 个上调、30 个下调),包括: mmu-miR-27b、mmu-miR-150、mmu-miR-34a-5p、mmu-miR-221、mmu-miR-336b-3p、mmu-miR-196b-5p、mmu-miR-339-3p 和 mmu-miR-721 等; GO 功能富集分析表明,差异表达的 miRNA 主要与负调控神经元投射和突触后模相关的细胞内过程相关,并可能与调控阿尔茨海默病进展的特定 DNA 相结合影响生理功能,上述结论通过 ddPCR (droplet digital PCR) 实验进行验证。

作者对筛选出的 miRNA 与进行相关功能蛋白的网络分析,发现线粒体氧化链相关蛋白 (细胞色素 c)、凋亡调节蛋白 (Bcl-2)、自噬和代谢相关蛋白 (Sirt1)、转化生长因子 (Tgfb) 等功能蛋白与候选 miRNA 相关,其中 Tgfb 蛋白与 $A\beta$ 的生成相关。

综上:5XFAD 小鼠模型尿液中外泌体 miRNA 在 $A\beta$ 斑块沉积前存在表达差异,是潜在的诊断早期 AD 的非侵袭性生物标志物,对于早期干预 AD 具有重要意义。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 3: 233–242; <https://doi.org/10.1002/ame2.12175>)。

梁会娟, 任志芳, 刘伟, 等. 冬凌草甲素通过调控 UBC9 表达对肝星状细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 98-104.

Liang HJ, Ren ZF, Liu W, et al. Effects of Oridonin on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells by regulating UBC9 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 98-104.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 015

冬凌草甲素通过调控 UBC9 表达对肝星状细胞增殖、凋亡的影响

梁会娟^{1*}, 任志芳², 刘伟³, 张彦忠³

(1. 新乡医学院第三附属医院临床药学办公室, 河南 新乡 453003; 2. 濮阳医学高等专科学校, 河南 濮阳 457000; 3. 新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 探讨冬凌草甲素对肝星状细胞增殖、凋亡的影响和分子机制。**方法** 采用不同浓度的冬凌草甲素干预肝星状细胞(HSC-T6)48 h。分别采用噻唑蓝(MTT)实验、流式细胞术检测 HSC-T6 细胞增殖和凋亡变化。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白质印记(Western blot)检测泛素结合酶 9(UBC9)表达变化。转染 UBC9 小干扰 RNA(si-UBC9)下调 HSC-T6 细胞中 UBC9 表达水平,采用上述方法检测细胞增殖、凋亡变化。**结果** 冬凌草甲素干预后,HSC-T6 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高,UBC9 表达显著降低,并具有显著的剂量依赖关系($P<0.05$)。干扰 UBC9 表达后 HSC-T6 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高,UBC9 表达显著降低($P<0.05$)。过表达 UBC9 能够逆转冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞的增殖、凋亡的影响($P<0.05$)。**结论** 冬凌草甲素能够抑制肝星状细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制与下调 UBC9 表达有关。

【关键词】 冬凌草甲素;泛素结合酶 9;肝星状细胞;增殖;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0098-07

Effects of Oridonin on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells by regulating UBC9

LIANG Huijuan^{1*}, REN Zhifang², LIU Wei³, ZHANG Yanzhong³

(1. Clinical Pharmacy Office of the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China. 2. Puyang Medical College, Puyang 457000. 3. the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003)

【Abstract】 Objective To explore the effects of Oridonin on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells and their molecular mechanism. **Methods** Different concentrations of Oridonin were used to intervene in hepatic stellate cells (HSC-T6) for 48 h. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and flow cytometry were used to detect proliferation and apoptosis in HSC-T6 cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression changes of ubiquitin-conjugating enzyme 9 (UBC9). The transfection of UBC9 small interfering RNA (si-UBC9) downregulated the expression level of UBC9 in HSC-T6 cells. Changes in cell proliferation and apoptosis were also evaluated using the aforementioned method. **Results** After Oridonin intervention, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HSC-T6 cells were significantly increased, the expression of UBC9 was significantly decreased and there was a significant dose-dependent relationship ($P<0.05$). After downregulating UBC9 expression, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HSC-T6 cells were significantly increased and UBC9 expression was

[作者简介] 梁会娟(1983—),女,硕士,主管药师,研究方向:临床药学和中药药理学研究。E-mail: xyxf4g@163.com

significantly decreased ($P < 0.05$). The overexpression of UBC9 was able to reverse the effects of Oridonin on the proliferation and apoptosis of HSC-T6 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Oridonin can inhibit proliferation and induce apoptosis in hepatic stellate cells. The underlying mechanism is related to the downregulation of UBC9 expression.

[Keywords] Oridonin; ubiquitin-conjugating enzyme 9; hepatic stellate cells; proliferation; apoptosis

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是一种常见的慢性肝损伤的伤口愈合反应,是慢性肝病最终发展为肝硬化或肝细胞癌的重要病理过程。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 是肝纤维化的关键细胞,正常肝中 HSC 处于静止状态,当肝受到异常刺激时, HSC 活化、增殖并分泌大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 导致肝 ECM 合成和降解失衡,促进 HF 形成^[1]。因此,如何有效的抑制 HSC 增殖,诱导其凋亡是防治 HF 的重要措施。冬凌草甲素是从冬凌草中分离得到的二萜类化合物,具有抗炎、抗癌、神经保护等多种生物学功能^[2-3]。有文献报道冬凌草甲素可诱导 HSC 凋亡和周期阻滞,抑制内源性和转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 诱导的 ECM 合成,是一种潜在的预防 HF 药物^[4]。然而,冬凌草甲素抗 HF 的潜在分子机制并未完全阐明。泛素结合酶 9 (ubiquitin Conjugating Enzyme 9, UBC9) 是小泛素样分子相关修饰物 (small ubiquitin-like molecular related modifiers, SUMO) 泛素化过程的唯一接合酶,研究显示 UBC9 参与 HSC 凋亡过程,下调 UBC9 可抑制 HF 进程^[5]。但冬凌草甲素能否调控 UBC9 影响 HF 进程尚未可知。本研究以 UBC9 为切入点,探讨冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖、凋亡的影响和分子机制,以期冬凌草甲素用于临床防治 HF 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 购于美国模式生物保藏中心。

1.2 主要试剂与仪器

杜尔伯格伊戈尔培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;冬凌草甲素 (批号 111721-201704, 纯度 $\geq 99.7\%$) 购于中国食品药品检定研究院;UBC9 小干扰 RNA (UBC9 small interfering RNA, si-UBC9) 及其阴性对照 (small interfering RNA negative control, si-NC)、UBC9 过表达载体 (UBC9 overexpression vector, pcDNA-UBC9)、空载体 (Empty vector

plasmid, pcDNA) 由上海吉玛制药公司提供;凋亡试剂盒、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂盒购于上海碧云天公司;山羊抗兔二抗、兔源 UBC9 抗体、细胞周期素 D1 (CyclinD1)、p21、B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl 相关 X 蛋白 (Bcl associated x protein, Bax) 抗体购于上海赛信通生物技术公司;逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购于大连 TaKaRa 生化科技公司;TRIzol 试剂、Lipofectamine™ 2000 购于美国 Invitrogen 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和实验分组

复苏 HSC-T6 细胞后,用含 1% 青链霉素双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37℃、CO₂ 体积分数 5%、湿度为 70%~80% 的培养箱中培养。每隔 1 d 换液 1 次,当细胞密度到 80% 时,即可进行传代培养。分别采用冬凌草甲素浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞培养液培养 HSC-T6 细胞 48 h,依次记为冬凌草甲素-低组、冬凌草甲素-中组、冬凌草甲素-高组^[6]。同时设置对照组即正常培养的 HSC-T6 细胞。按照下述方法检测 HSC-T6 细胞增殖、凋亡、增殖凋亡相关蛋白、UBC9 的表达水平。

为证实冬凌草甲素对肝星状细胞增殖、凋亡的影响与调控 UBC9 表达有关,将 HSC-T6 细胞分为 si-NC 组 (转染 si-NC)、si-UBC9 组 (转染 si-UBC9)、冬凌草甲素 + pcDNA 组 (转染 pcDNA 后用含 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素的细胞培养液孵育 48 h)、冬凌草甲素 + pcDNA-UBC9 组 (转染 pcDNA-UBC9 后用含 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素的细胞培养液孵育 48 h)。细胞转染参照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行。

1.3.2 MTT 实验检测细胞增殖

取 5×10^3 个对数期 HSC-T6 细胞接种 96 孔板,当细胞贴壁后,按照上述实验分组进行干预处理后,加入 20 μL MTT 试剂,反应 4 h,吸取孔内培养液,再加入 150 μL 二甲基亚砷,低速振荡 10 min,当结晶溶解后用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞增殖抑制率 = $[(A_{\text{对照孔}} - A_{\text{实验孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡

用适量结合缓冲液重悬各组 HSC-T6 细胞,向

500 μL 细胞悬液中添加 5 μL 的 Annexin V-FITC、5 μL 的 PI 溶液,混合均匀后,室温避光条件下反应 15 min,上机检测细胞凋亡率。

1.3.4 蛋白质印记 (Western blot) 检测蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解液对各组 HSC-T6 细胞进行裂解。制备十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶。将蛋白样品与适量上样缓冲液混匀,沸水浴加热 3 min 变性蛋白。取 30 μg 蛋白样品上样后 100 V 电泳 90 min 分离蛋白样品,湿法转膜至硝酸纤维素膜后,置于 5% 脱脂牛奶中 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。置于稀释的一抗溶液中室温反应 2 h;置于二抗稀释液中孵育 1 h。显影后用凝胶成像系统分析目的蛋白(内参为 GAPDH)的相对表达水平。

1.3.5 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测 UBC9 mRNA 表达水平

TRIzol 试剂提取各组 HSC-76 细胞总 RNA,以逆转合成的 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 UBC9 mRNA 相对表达水平。引物序列(5'-3'): UBC9 上游 GGAAGTCCCGAGACAAAGGG,下游 CAGCCACGAAACCAAATGGG, GAPDH 上游 TGGACCAAGTACATGAACCACC,下游 CTGGTGATTGGACACGGTGA。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析。实验独立重复 3 次,计量资料符合正态分布以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间统计分析采用独立样本 t 检验,多组间统计分析采用单因素方差分析和 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响

与对照组比较,冬凌草甲素-低、-中、-高剂量组 HSC-T6 细胞 CyclinD1 蛋白表达显著降低,细胞抑制率、p21 蛋白表达显著升高($P<0.05$),且冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞增殖和相关蛋白表达的影响具有剂量依赖性。见表 1 和图 1。

2.2 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响

与对照组比较,冬凌草甲素-低、-中、-高剂量组 HSC-T6 细胞 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 蛋白表

达、凋亡率显著升高($P<0.05$),且冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞凋亡和相关蛋白表达的影响具有剂量依赖性。见表 2 和图 2。

2.3 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 中 UBC9 表达的影响

与对照组比较,冬凌草甲素-低、-中、-高剂量组 HSC-T6 细胞 UBC9 mRNA 和 UBC9 蛋白表达显著降低($P<0.05$),冬凌草甲素对 UBC9 mRNA 和 UBC9 蛋白表达的影响具有依赖性。见表 3 和图 3。

2.4 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响

与 si-NC 组比较,si-UBC9 组 HSC-T6 细胞 UBC9 蛋白表达显著降低,表明 HSC-T6 细胞中 UBC9 表达受到抑制。抑制 UBC9 表达后,HSC-T6 细胞 CyclinD1 蛋白表达显著降低,增殖抑制率、p21 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。见表 4 和图 4。

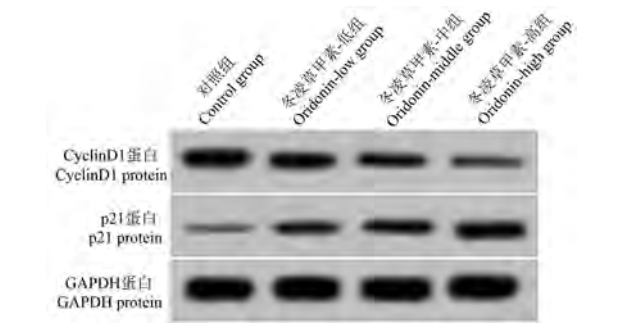


图 1 增殖相关蛋白表达

Figure 1 Expression of proliferation-related proteins

表 1 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of Oridonin on the proliferation of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	抑制率 (%) Inhibition ratio	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21 蛋白 p21 protein
对照组 Control group	0.00 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.02
冬凌草甲素-低组 Oridonin-low group	11.25 $\pm$ 1.17 *	0.52 $\pm$ 0.05 *	0.33 $\pm$ 0.03 *
冬凌草甲素-中组 Oridonin-medium group	28.36 $\pm$ 2.74 **	0.39 $\pm$ 0.04 **	0.46 $\pm$ 0.04 **
冬凌草甲素-高组 Oridonin-high group	49.68 $\pm$ 4.33 **&	0.24 $\pm$ 0.03 **&	0.59 $\pm$ 0.05 **&
F	203.542	41.244	62.593
P	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与冬凌草甲素-低组相比,# $P<0.05$;与冬凌草甲素-中组相比,& $P<0.05$ 。

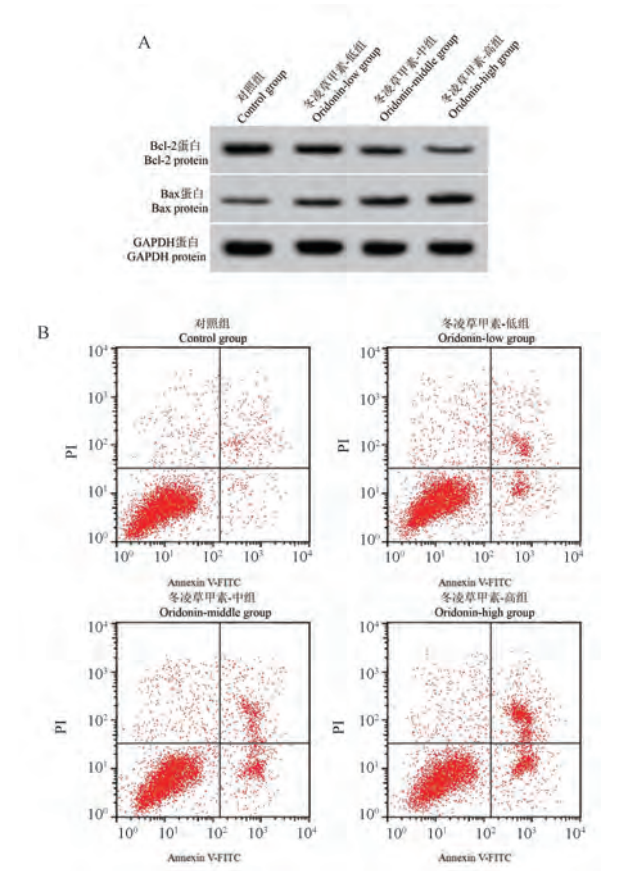
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the Oridonin-low group, # $P<0.05$. Compared with the Oridonin-medium group, & $P<0.05$.

表 2 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响 (x̄±s, n=3)

Table 2 Effect of Oridonin on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	凋亡率 (%) Apoptosis rate	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax 蛋白 Bax protein
对照组 Control group	7.32±0.71	0.77±0.07	0.29±0.03
冬凌草甲素-低组 Oridonin-low group	11.65±1.23 *	0.64±0.06 *	0.44±0.04 *
冬凌草甲素-中组 Oridonin-medium group	17.32±1.65 **	0.52±0.04 **	0.56±0.05 **
冬凌草甲素-高组 Oridonin-high group	22.14±2.19 **&	0.36±0.03 **&	0.68±0.06 **&
F	52.834	33.264	38.826
P	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比, *P<0.05;与冬凌草甲素-低组相比, #P<0.05;与冬凌草甲素-中组相比, &P<0.05。
Note. Compared with the control group, *P<0.05. Compared with the Oridonin-low group, #P<0.05. Compared with the Oridonin-medium group, &P<0.05.



注:A:凋亡相关蛋白表达;B:细胞凋亡流式图。
图 2 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响
Note. A, Apoptosis-related protein expression. B, Flow diagram of apoptosis.
Figure 2 Effect of Oridonin on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

表 3 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 中 UBC9 表达的影响 (x̄±s, n=3)

Table 3 Effects of Oridonin on UBC9 expression in rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	UBC9 mRNA	UBC9 蛋白 UBC9 protein
对照组 Control group	1.00±0.05	0.84±0.08
冬凌草甲素-低组 Oridonin-low group	0.75±0.07 *	0.71±0.06 *
冬凌草甲素-中组 Oridonin-medium group	0.63±0.06 **	0.56±0.04 **
冬凌草甲素-高组 Oridonin-high group	0.49±0.04 **&	0.41±0.03 **&
F	44.532	33.216
P	0.000	0.000

注:与对照组相比, *P<0.05;与冬凌草甲素-低组相比, #P<0.05;与冬凌草甲素-中组相比, &P<0.05。
Note. Compared with the control group, *P<0.05. Compared with the Oridonin-low group, #P<0.05. Compared with the Oridonin-medium group, &P<0.05.

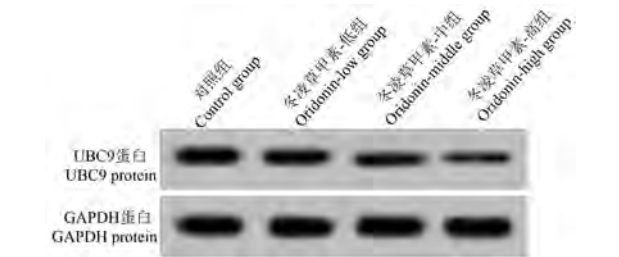


图 3 UBC9 蛋白表达
Figure 3 Expression of UBC9 protein

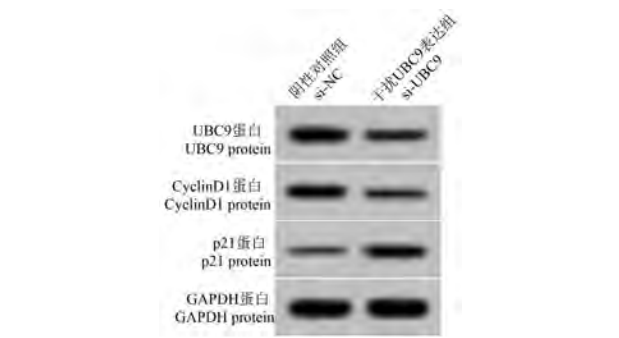


图 4 UBC9 和增殖相关蛋白表达
Figure 4 Expression of UBC9 protein

2.5 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响

抑制 UBC9 表达后,HSC-T6 细胞 Bcl-2 蛋白表达降低,凋亡率、Bax 蛋白表达显著升高 (P<0.05)。见表 5 和图 5。

2.6 过表达 UBC9 逆转冬凌草甲素 (40 μmol/L) 对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖和凋亡的作用

与对照组比较,冬凌草甲素组 HSC-T6 细胞

CyclinD1、Bcl-2 和 UBC9 蛋白表达显著降低,p21 和 Bax 蛋白表达、增殖抑制率、凋亡率显著升高;与冬凌草甲素 + pcDNA 组比较,冬凌草甲素 + pcDNA-UBC9 组 HSC-T6 细胞 CyclinD1、Bcl-2 和 UBC9 蛋白表达显著升高,p21 和 Bax 蛋白表达、增殖抑制率、凋亡率显著降低($P<0.05$)。见表 6 和图 6。

3 讨论

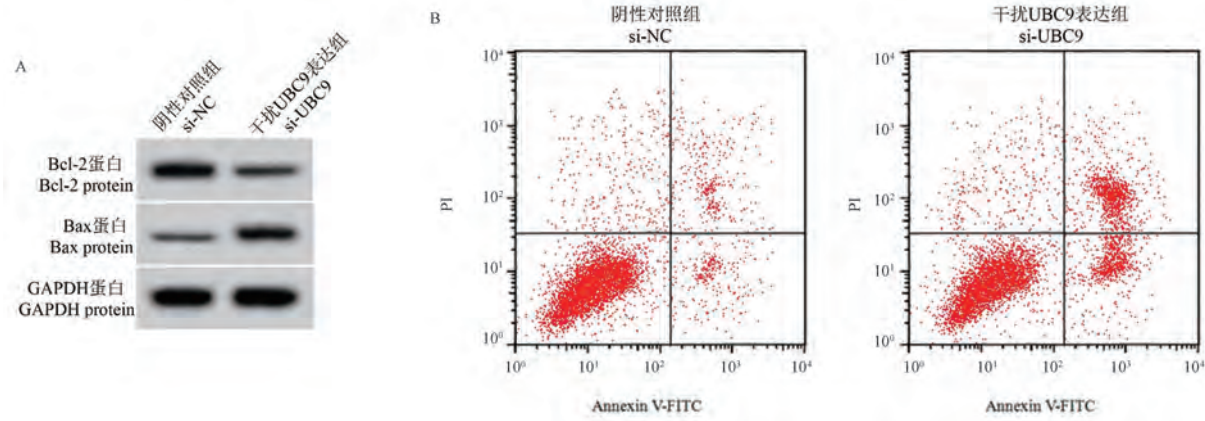
冬凌草甲素是东亚地区常用中草药冬凌草的天然活性成分,近年来因其广泛的生物活性和治疗多种疾病的潜力而受到越来越多的关注。研究显示,冬凌草甲素通过调节相关信号通路抑制细胞增殖、触发自

噬、诱导凋亡、阻滞细胞周期进展等机制对肝癌^[7]、胆管癌^[8]、神经母细胞瘤^[9]等多种类型恶性肿瘤表现出抗肿瘤作用,是潜在的癌症候选治疗药物。冬凌草甲素还可抑制博莱霉素诱导的小鼠肺组织中平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原蛋白表达,减轻肺泡空间塌陷、肺气肿和炎症细胞浸润,防治肺纤维化病变^[10]。此外,冬凌草甲素还可通过促进 P21 相关的自噬来预防心肌肥大^[11]。本研究探讨冬凌草甲素的抗 HF 作用发现,冬凌草甲素可显著抑制 HSC-T6 细胞增殖,诱导细胞凋亡,并呈显著的量效依赖关系,与 Bohanon 等^[4]研究结果相吻合。CyclinD1 和 P21 细胞增殖过程中的关键调控蛋白,P21 通过抑制周期

表 4 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 4 Effects of inference with UBC9 expression on proliferation of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	UBC9 蛋白 UBC9 protein	抑制率(%) Inhibition ratio	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21 蛋白 p21 protein
阴性对照 si-NC	0.83±0.07	6.33±0.61	0.62±0.06	0.22±0.02
干扰 UBC9 表达组 si-UBC9	0.39±0.04*	41.58±4.22*	0.28±0.03*	0.55±0.05*
<i>t</i>	9.453	14.319	8.779	10.614
<i>P</i>	0.001	0.000	0.001	0.000

注:与 si-NC 组相比,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with si-NC group, * $P<0.05$.



注:A:凋亡相关蛋白表达;B:细胞凋亡流式图。
图 5 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响

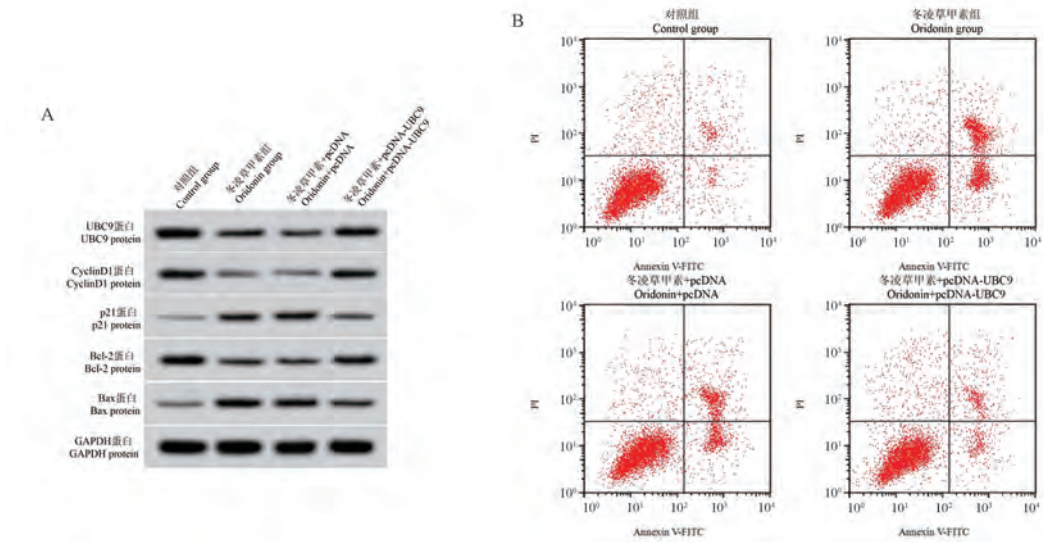
Note. A, Expression of apoptosis-related proteins. B, Flow diagram of apoptosis.

Figure 5 Effects of interference with UBC9 expression on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

表 5 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 5 Effects of interference with UBC9 expression on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax 蛋白 Bax protein
阴性对照组 si-NC	7.12±0.71	0.79±0.07	0.28±0.03
干扰 UBC9 表达组 si-UBC9	18.63±1.54*	0.39±0.04*	0.63±0.06*
<i>t</i>	11.756	8.593	9.037
<i>P</i>	0.000	0.001	0.001

注:与 si-NC 组相比,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with si-NC group, * $P<0.05$.



注:A;UBC9 和凋亡相关蛋白表达;B:细胞凋亡流式图。

图 6 UBC9 过表达逆转了冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖和凋亡的作用

Note. A, Expression of UBC9 and apoptosis-related proteins. B, Flow diagram of apoptosis.

Figure 6 UBC9 overexpression reversed the effect of Rubescensine A on the proliferation and apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

表 6 UBC9 过表达逆转了冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖和凋亡的作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 UBC9 overexpression reversed the effect of Rubescensine A on the proliferation and apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	UBC9 蛋白 UBC9 protein	抑制率(%) Inhibition ratio	凋亡率(%) Apoptosis rate	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21 蛋白 p21 protein	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax 蛋白 Bax protein
对照组 Control group	0.82±0.07	0.00±0.02	6.32±0.63	0.63±0.06	0.21±0.02	0.78±0.07	0.27±0.03
冬凌草甲素 Oridonin	0.41±0.04*	47.21±4.33*	21.62±2.13*	0.23±0.03*	0.57±0.05*	0.35±0.03*	0.67±0.06*
冬凌草甲素+pcDNA Oridonin+pcDNA	0.38±0.03	48.65±4.72	23.58±2.36	0.22±0.02	0.58±0.06	0.34±0.03	0.69±0.07
冬凌草甲素+pcDNA-UBC9 Oridonin+pcDNA-UBC9	0.71±0.07 [#]	20.11±2.03 [#]	11.28±1.14 [#]	0.52±0.05 [#]	0.33±0.03 [#]	0.67±0.06 [#]	0.39±0.04 [#]
F	46.634	145.099	69.359	69.514	54.203	58.447	47.236
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与冬凌草甲素+pcDNA 组相比,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the Oridonin+pcDNA group, [#] $P<0.05$.

素依赖激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)/CyclinD1 复合物活性,抑制 G1-S 期相变发挥抗增殖作用^[12]。Bcl-2 和 Bax 是细胞凋亡调控中重要的蛋白,Bax 表达增加、Bcl-2 表达降低可促进线粒体膜通透性改变,抑制孔道开放以及抑制细胞色素 C 从线粒体释放,抑制 Caspases 活化进而抑制细胞凋亡发生^[13]。本研究显示,冬凌草甲素呈剂量依赖性抑制 CyclinD1、Bcl-2 表达,促进 P21、Bax 表达,这提示冬凌草甲素可能通过调控 CyclinD1、P21、Bax、Bcl-2 蛋白抑制 HSC-T6 增殖并诱导其凋亡。

UBC9 是 UBC 家族的重要成员,其通过促使活

化的 SUMO 与目标蛋白接合,进而介导 SUMO 发挥蛋白调节作用,是纤维化的关键调节因子^[14]。研究显示,在肾脏纤维化过程中 UBC9 表达上调^[15]。沉默 UBC9 通过抑制早幼粒细胞白血病蛋白类泛素化可降低主动脉缩窄小鼠心肌纤维化的发展,并部分改善其心功能^[16]。在活化的人 HSC 细胞 LX-2 中 UBC9 表达显著上调,沉默 UBC9 可明显抑制 HSC 增殖,降低平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原的表达水平,进而阻止 HF^[17]。此外,多种肝癌细胞中 UBC9 亦呈高表达,干扰 UBC9 表达可明显降低肝癌细胞的增殖、迁移能力,提高其凋亡水平^[18-19]。为探讨

UBC9 在冬凌草甲素抗 HF 中的作用,本研究检测冬凌草甲素干预后 HSC-T6 细胞中 UBC9 表达水平,结果显示冬凌草甲素呈剂量依赖性抑制 UBC9 表达水平,提示 UBC9 表达下调可能与冬凌草甲素的抗 HF 作用有关。进一步研究显示,转染 si-UBC9 干扰 UBC9 表达对 HSC-T6 细胞亦具有显著的增殖抑制和凋亡作用。此外,本研究显示过表达还能够逆转冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞的增殖、凋亡以及其相关蛋白表达的影响,提示冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞的增殖抑制和凋亡促进作用抑制 UBC9 表达有关。

综上所述,冬凌草甲素可抑制 HSC-T6 细胞增殖,促进细胞凋亡,进而具有预防 HF 的潜在价值,其机制与抑制 UBC9 表达有关,这为开发冬凌草甲素用于临床防治 HF 奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Huang Y, Deng X, Liang J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(2): 420-426.
- [2] Xu J, Wold EA, Ding Y, et al. Therapeutic potential of oridonin and its analogs: from anticancer and antiinflammation to neuroprotection [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 474-490.
- [3] 丁明勇, 王卫星. 冬凌草甲素对胆管癌 QBC939 细胞增殖、凋亡及端粒酶活性的影响 [J]. *广西医学*, 2016, 38(3): 308-312.
- [4] Bohanon FJ, Wang X, Ding C, et al. Oridonin inhibits hepatic stellate cell proliferation and fibrogenesis [J]. *J Surg Res*, 2014, 190(1): 55-63.
- [5] 袁金华. 下调 ubc9 对人肝星状细胞增殖的影响及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [6] 刘俊保, 岳静宇, 唐引引. 冬凌草甲素对 EC9706 细胞增殖、凋亡的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2014, 11(1): 8-11.
- [7] Ren DL, Ghoorun RA, Wu XH, et al. Oridonin induces apoptosis in HGC-27 cells by activating the JNK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 255-260.
- [8] Chen K, Ye J, Qi L, et al. Oridonin inhibits hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and cell migration by the hypoxia-inducible factor-1 α /matrix metalloproteinase-9 signal pathway in gallbladder cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2019, 30(9): 925-932.
- [9] Zhu HQ, Zhang C, Guo ZY, et al. Oridonin induces Mdm2-p60 to promote p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(11): 5313-5326.
- [10] Fu Y, Zhao P, Xie Z, et al. Oridonin inhibits myofibroblast differentiation and bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating transforming growth factor β (TGF β)/smad pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(1): 7548-7555.
- [11] Xu M, Wan CX, Huang SH, et al. Oridonin protects against cardiac hypertrophy by promoting P21-related autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 403-413.
- [12] Wu W, Liu Q, Liu Y, et al. Dixdc1 targets CyclinD1 and p21 via PI3K pathway activation to promote schwann cell proliferation after sciatic nerve crush [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 956-963.
- [13] Ye Z, Duan J, Wang L, et al. LncRNA-LET inhibits cell growth of clear cell renal cell carcinoma by regulating miR-373-3p [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 311-325.
- [14] 方素芬, 郭武华. 类泛素缀和酶 9 在肝纤维化中的作用及机制 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(13): 2079-2082.
- [15] Arvaniti E, Vakrakou A, Kaltezioti V, et al. Nuclear receptor NR5A2 is involved in the calreticulin gene regulation during renal fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(9): 1774-1785.
- [16] Liu Y, Zhao D, Qiu F, et al. Manipulating PML SUMOylation via silencing UBC9 and RNF4 regulates cardiac fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(3): 666-678.
- [17] Fang S, Yuan J, Shi Q, et al. Downregulation of UBC9 promotes apoptosis of activated human LX-2 hepatic stellate cells by suppressing the canonical NF- κ B signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174374-e0174387.
- [18] 邱君瑶. 沉默 UBC9 对人肝癌 HepG2 细胞增殖与凋亡的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [19] 盛凤, 沈依萌, 万乔浩, 等. 蛋白激酶 B1 去类泛素化修饰抑制肝癌的增殖和转移 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(11): 814-820.

[收稿日期] 2020-10-26

王瑞青, 郑彩虹, 朱巍, 等. 血小板微粒介导 miR-4306 调控糖尿病大鼠主动脉血管内皮细胞损伤的作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 105-112.

Wang RQ, Zheng CH, Zhu W, et al. Effects and mechanisms of miR-4306, mediated by platelet microparticles, on vascular endothelial cell injury in the aorta of diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 105-112.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 016

血小板微粒介导 miR-4306 调控糖尿病大鼠主动脉血管内皮细胞损伤的作用及机制研究

王瑞青¹, 郑彩虹², 朱巍¹, 郭彩虹¹

(1.北京航天总医院内分泌科, 北京 100076; 2.山西白求恩医院内分泌科, 太原 030000)

【摘要】 目的 探讨分析糖尿病大鼠血小板微颗粒(platelet microparticles, PMPs)在主动脉血管内皮损伤的作用及机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为对照组(NC 组)和糖尿病组(DM 组),分离纯化血小板微颗粒,原代培养内皮细胞,免疫荧光激光共聚焦检测内皮型一氧化氮合酶、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3),流式细胞术检测内皮细胞凋亡情况,qRT-PCR 检测 miR-4306 表达,蛋白免疫印迹法检测 VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路相关蛋白。**结果** DM 组 eNOS、Caspase-3 阳性表达率及细胞凋亡率,与 NC 组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。mimic-M 组、inhibitor-M 组 miR-4306 相对表达量与 miR-M 组比较,差异有统计学意义($t=3.821/4.597, P<0.05$ 或 $P<0.01$)。mimic-M 组 miR-4306 相对表达量与 inhibitor-M 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。M 组 miR-4306 相对表达量与 Ctrl 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。mimic-M 组、inhibitor-M 组 VEGFA、NF-κBp65、p-IκBα 及 p-ERK 相对表达量与 M 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),M 组 VEGFA、NF-κBp65、p-IκBα 及 p-ERK 相对表达量与 Ctrl 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 糖尿病大鼠分泌 PMPs 导致主动脉血管内皮细胞损伤,其作用机制可能与激活 miR-4306/VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路有关。

【关键词】 糖尿病;动脉粥样硬化;血小板微颗粒;血管内皮细胞;miR-4306

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0105-08

Effects and mechanisms of miR-4306, mediated by platelet microparticles, on vascular endothelial cell injury in the aorta of diabetic rats

WANG Ruiqing¹, ZHENG Caihong², ZHU Wei¹, GUO Caihong¹

(1. Department of Endocrinology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China.
2. Department of Endocrinology, Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan 03000)

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanisms of platelet microparticles (PMP) sin vascular endothelial injury of the diabetic aorta. **Methods** SD rats were randomly divided into the normal (NC) and diabetic (DM) groups. PMPs were isolated and purified. Next, primary cultured endothelial cells were transfected with microRNA (miR) -4306 to detect PMPs in vascular endothelial cells. The effects of activity and the effects on the miR-4306/vascular endothelial growth factor A (VEGFA)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2/nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway were evaluated. **Results** The positive expression and apoptosis rates of endothelial nitric oxide synthase

[作者简介]王瑞青(1980—),女,硕士主治医师,研究方向:内分泌。E-mail: wangrq11@163.com

(eNOS) and caspase-3 in the DM group were significantly different from those in the NC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The relative expression of miR-4306 in the mimic-M group and inhibitor-M group was significantly different from that in the miR-M group ($t = 3.821, 4.597, P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, the relative expression of miR-4306 in the mimic-M group was significantly different from that in the inhibitor-M group ($P < 0.01$). The relative expression of miR-4306 in M group was significantly different from that in Ctrl group ($P < 0.01$). In addition, the relative expression of VEGFA, NF- κ Bp65, p-I κ B α and p-ERK in the mimic-M group and inhibitor-M group was significantly different from that in M group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The relative expression of VEGFA, NF- κ Bp65, p-I κ B α and p-ERK in the M group was significantly different from that of Ctrl group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** PMPs may cause endothelial damage in the diabetic aorta, the underlying mechanism may be related to the activation of miR-4306/VEGFA/ERK1/2/NF- κ B signaling.

[Keywords] diabetes mellitus; atherosclerosis; platelet microparticles; vascular endothelial cells; miR-4306

糖尿病患者所引起的心血管疾病风险大约是正常人群的 3 倍,动脉粥样硬化是糖尿病性心血管疾病的主要病理疾病,其中主动脉血管内皮功能损伤在糖尿病所致的早期动脉粥样硬化中起关键作用^[1],一氧化氮 (notric oxide, NO) 水平降低及内皮通透性增加等是糖尿病致心血管病变的重要原因。以往研究糖尿病与内皮功能损伤之间机制多集中于炎症、氧化应激、高血糖及胰岛素抵抗等。近年来,研究发现糖尿病 (diabetic metillus, DM)、冠心病等疾病血小板激活明显增强,激活的血小板具有促凝作用,导致血管内皮损伤;血小板激活后能够产生血小板微颗粒 (platelet microparticles, PMPs), PMPs 黏附到血管壁释放花生四烯酸,介导炎症因子和黏附分子附着于内皮细胞,减少一氧化氮的合成和一氧化氮合酶的活性,损伤内皮功能,此外 PMPs 与低密度脂蛋白、脂肪酸相关,加重对内皮损伤,加速动脉粥样硬化的进展^[2-3]。DM 患者血浆中 PMPs 表达量明显升高,但 DM 合并早期动脉粥样硬化患者血浆中 PMPs 是否参与 DM 主动脉血管内皮损伤,其具体的作用机制是什么尚不清楚。本研究通过探讨分析 PMPs 在 DM 主动脉血管内皮损伤的作用及机制研究,以期为临床治疗糖尿病大血管并发症提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 8~12 周龄健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 (200 $\pm$ 20) g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2015-0123],所有实验动物均饲养于中国医学科学院实验动物研究所屏障动物房 SYXK 号 (京) 2019-0023],饲养环境为:温度 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C,内外环境气压差 ≥ 10 Pa,相对湿度在 40% ~ 70%,照明强度在 15~20 lx,动物自由取食饮水。本

实验经过北京航天总医院 IACUC 的批准 (MAM17039);本研究依照 3R 原则 (the rules of 3R) 实施。

1.2 主要试剂与仪器

CD61 流式抗体 (美国 BD 公司);凝血酶、阿司匹林、Hepes (美国 Sigma 公司);RNA 提取试剂盒 Biozol、脱氧核糖核酸 (dNTP)、VEGFA、ERK、p-ERK、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65 及 GAPDH 鼠抗人单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司);鼠抗人单克隆抗体 eNOS、兔抗人多克隆抗体 Caspase-3 (Cell Signaling technology 公司)。FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司);HT7700 透射电镜 (日本 Hitachi 公司);实时定量 PCR 仪 (德国 eppendorf 公司);LKB-Bromma 2197 型电泳仪 (瑞典 LKB 公司);microlab 300 半自动化分析仪 (荷兰威图公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物造模及分组

60 只大鼠随机分为对照组 (NC 组, $n = 30$) 和 DM 组 (DM 组, $n = 30$)。其中 NC 组、DM 组均给予等体积的生理盐水。DM 组大鼠造模:高脂高糖饲料 (普通饲料中加入 10% 蔗糖、5% 蛋黄及 10% 炼猪油) 喂养,4 周后禁食 12 h,按照 45 mg/kg 经腹腔注射 STZ (溶于 pH = 4.4、浓度为 0.1 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中),NC 组腹腔注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。于注射第 3 天通过尾静脉取血测定各组随机血糖。注射 STZ 后随机血糖仍高于 16.7 mmol/L 表明造模成功^[4]。所有动物待造模成功后,继续饲养 8 周。

1.3.2 PMPs 分离提取及鉴定

造模成功 8 周后,禁食 12 h,于第 2 天按照 50 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉处理,将收集的血液置于含有柠檬酸盐的 BD 管中,采用渐进性离心法制备无血小板血浆,以缺乏血小板血浆校准富

血小板血浆,调整血小板计数在 $10.0 \times 10^{10}/L$ 。采用 ADP ($10 \mu\text{mol}/L$) $20 \mu\text{L}$ 刺激富血小板血浆 15 min , $3700 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min 。弃去上清液,加入 PBS $80 \mu\text{L}$ 后将 PMPs 进行重悬,制得 PMPs 悬液。取 $20 \mu\text{L}$ PMPs 液和 $20 \mu\text{L}$ 富血小板血浆液于 2 个流式管中,分别加入 $5 \mu\text{L}$ APC-FITC-CD61 鼠抗人抗体。震荡摇匀后,室温避光孵育 30 min ,采用 1% 多聚甲醛进行固定。流式细胞术检测之前加入 $0.82 \mu\text{m}$ 标准微球 $5 \mu\text{L}$ 进行定位。每组 PMPs 通过分光光度计法测定 PMPs 中蛋白含量,调整每组 PMPs 蛋白含量在 $0.25 \text{ mg}/L$,用于后续各项实验。

1.3.3 大鼠主动脉 VECs 培养、鉴定

选取正常 SD 大鼠 3 只,无菌条件下打开胸腔,取胸主动脉置于无菌 D-Hanks 液中,取出外周结缔组织、残留血液。制备 VECs,将获得主动脉组织置于含有 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,培养 6 d 左右,弃去主动脉并换液。细胞原代培养至融合 80%,即传代,每隔 1 d 换液 1 次。细胞传第 2 代后,待细胞爬片生长融合至 70% 左右,用 4% 多聚甲醛固定,加入 3% 过氧化氢室温孵育, PBS 冲洗后加入非免疫山羊血清封闭 1 h,滴加 VIII 因子抗体 (1:100 稀释), 4°C 过夜。冲洗掉一抗后加入辣根过氧化物标记的兔抗鼠 IgG (1:500 稀释),经乙醇梯度洗脱,二甲苯透明后,中性树脂封片,采用 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张盖玻片随机选择 5 个视野计数细胞。

1.3.4 VECs 与 PMPs 共培养

在 12 孔板中培养 VECs 至细胞融合 80% 左右,经 PBS 冲洗后,每孔加入 1 mL 不含抗生素的高糖 DMEM/F12,将不同组别的 PMPs 加入到细胞中,摇匀后放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中,分别共培养 2、4、8、12 h 后收集细胞。采用 CCK-8 法检测不同时间 VECs 细胞增殖活性,以细胞活性抑制率达到 50% 左右 [(某一作用时间点-刚加药后)/刚加药后] 为最佳作用时间。

1.3.5 免疫荧光激光共聚焦检测内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 表达

取对数生长的 VECs,调整细胞数 $5 \times 10^4/L$ 并接种于置有盖玻片的 12 孔培养板中,待细胞贴壁以后按照各组别分别给予 PMPs 预处理,根据 1.3.4 项所确定的最佳作用时间孵育细胞后,经 3.5% 的多聚甲醛固定 10 min, 0.2% Triton X-100 冰上破膜 15 min,采用 3.0% 牛血清蛋白封闭抗原封闭 30 min,冲

洗后加入鼠抗人单克隆抗体 eNOS、兔抗人多克隆抗体 Caspase-3 后 4°C 孵育过夜,次日采用 FITC 二抗孵育 1 h,再经 DAPI 染核后在激光共聚焦显微镜下随机选取视野进行拍照,实验重复 3 次。

1.3.6 流式细胞术检测 VECs 凋亡情况

取对数生长的 VECs,调整细胞数为 $5 \times 10^4/L$ 并接种于置有盖玻片的 6 孔培养板中,待细胞贴壁以后按照各组别分别给予 PMPs 预处理,根据 1.3.4 项确定的最佳作用时间孵育细胞,培养结束后消化细胞,将细胞转移至 EP 管中离心 ($12000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min), PBS 冲洗后加入 binding buffer,调整细胞为每 mL 10^6 个,从中吸取 $500 \mu\text{L}$ 并加入 $2.5 \mu\text{L}$ AnnexinV 和 $5.0 \mu\text{L}$ PI,孵育 5 min 后,过 300 目筛上机检测。

1.3.7 qRT-PCR 检测 miR-4306 表达情况

将 $0.5 \mu\text{L}$ Has-micro-4306-mimics、microRNA-inhibitor-NC 以及 Has-micro-4306-inhibitor 分别与 $100 \mu\text{L}$ DMEM/F12 以及 $2 \mu\text{L}$ Lipofectamine 混合,将混合液按照每孔 $15 \mu\text{L}$ 接种于培养有 VECs 的 12 孔板上,培养 6 h 后更换培养基。加入不同组别 PMPs 后,后续按照 1.3.4 项中最佳最用时间继续培养细胞。按照处理方式不同分为正常 PMPs 组 (Ctrl 组)、正常 PMPs+MicroRNA-inhibitor-NC 组 (miR-NC 组)、正常 PMPs+Has-micro-4306-mimics 组 (mimic-NC 组)、正常 PMPs+Has-micro-4306-inhibitor 组 (inhibitor-NC 组)、模型 PMPs 组 (M 组)、模型 PMPs+MicroRNA-inhibitor-NC 组 (miR-M 组)、模型 PMPs+Has-micro-4306-mimics 组 (mimic-M 组)、模型 PMPs+Has-micro-4306-inhibitor 组 (inhibitor-M 组)。培养结束后,收集细胞。按照试剂盒要求提取各组细胞中总 RNA,严格按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit 逆转录 cDNA。反应体系: SYBR Premix Ex TaqTM II $10 \mu\text{L}$, PCR 引物 $2 \mu\text{L}$, DNA 模板 $2 \mu\text{L}$, DEPC 水 $6 \mu\text{L}$,总反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。每个样本设置 3 个复孔,PCR 反应条件: 95°C 预变性 20 s , 94°C 变性 5 s , 55°C 退火 45 s ,共进行 40 个循环。以 U6 作为内参,反应结束后计算每个基因的循环阈值 (Ct),同时与内参基因 U6 比较,确定各组基因表达水平。miR-4306 上游引物序列: 5'-GCTAACCCGCCGACACTTTTCACCTTA-3'; 下游引物序列: 5'-CGGTTTCGACAACCTATTTAGCTACA-3', 基因片段大小 212 bp。内参 U6 上游引物序列: 5'-GTCGCATCAGCTAGCTTTTCAGGCTA-3'; 下游引物

序列: 5'-GCCTATACGCTCGTCATCGGTAGT-3', 基因片段大小 124 bp。

1.3.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 VEGFA/ERK1/2/NF- κ B 信号通路相关蛋白

取各组细胞悬液经离心沉淀后, 收集细胞后加入 200 μ L 细胞裂解液 (含有蛋白酶抑制剂) 至冰上裂解 45 min, 再以 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 采用考马斯亮蓝进行总蛋白质定量。上清液中加入 1/4 倍量 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合, 煮沸 7~8 min, 以 10% SDS-PAGE 胶体, 在 120 V 电压, 200 mA 恒定电流下电泳 2 h, 湿转至硝酸纤维素膜上。采用 5% 的脱脂奶粉 TBST 缓冲液封闭 (4 $^{\circ}$ C 过夜), 洗去封闭液, 加入鼠抗人 VEGFA、ERK、p-ERK、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65, TBST 洗膜 3 次后, 加入标记有辣根过氧化物酶二抗 (山羊抗小鼠 IgG) 室温孵育 1 h, 经 TBS 洗膜 3 次后, 将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面, 置于曝光试剂盒中曝光, 显影、定影等, 采用凝胶图像处理系统分析条带灰度值。扫描目标蛋白灰度值与 GAPDH 比较所得的灰度值比进行定量分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行分析处理。正态分布资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 Bonferroni's post t 检验, 基因检测结果 Δ Ct 值作图, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 行非参数检验, $\Delta\Delta Ct$ 值 = $Ct_{(miR-4306 \text{ 均值})} - Ct_{(U6 \text{ 均值})}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 中的 $\Delta\Delta Ct$ = $[Ct_{(实验样本 miR-4306 \text{ 均值})} - Ct_{(实验样本 U6 \text{ 均值})}] - [Ct_{(对照样本 miR-4306 \text{ 均值})} - Ct_{(对照样本 U6 \text{ 均值})}]$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMPs 与 VECs 分离、鉴定

采用 Western blot 及流式细胞检测法分析鉴定, 结果显示, 与富血小板血浆比, PMPs 中 CD61 表达明显升高 ($P < 0.05$), 见图 1A、1B。原代培养 VECs 结果显示, 细胞为“铺路石”样结构, 细胞经免疫组化染色后, 细胞质颜色明显加深, VIII 因子呈高表达, 因此鉴定细胞为 VECs, 见图 1C。

2.2 CCK-8 法检测 PMPs 对 VECs 细胞增殖活性的影响

研究结果显示, DM 组在 PMPs 作用 2 h 后, 与 0 h 比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), VECs 与 PMPs

共培养 4 h 后, 细胞出现明显的固缩变形, 细胞形态不完整, 有内陷, 结构破坏严重。当作用 4、8、12 h, 细胞抑制率分别为 48.44% (40.27% ~ 54.37%)、63.41% (57.69% ~ 72.33%)、66.26% (58.60% ~ 74.24%), 与 0 h 比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 因此选择作用 4 h 为最佳作用时间, 见图 2。

2.3 细胞凋亡情况分析

研究结果显示, DM 组细胞凋亡率 (51.23 $\pm$ 12.14)%, 与 NC 组 (9.27 $\pm$ 3.04)% 比差异有统计学意义 ($t = 12.547, P < 0.01$), 见图 3。

2.4 免疫荧光激光共聚焦检测 eNOS、Caspase-3 表达

免疫荧光激光共聚焦结果显示, DM 组 eNOS 阳性表达率 (82.54 $\pm$ 19.58)%, 与 NC 组 (42.55 $\pm$ 19.58)% 比差异有统计学意义 ($t = 12.336, P < 0.01$)。DM 组 Caspase-3 阳性表达率 (26.39 $\pm$ 7.91)%, 与 NC 组 (54.32 $\pm$ 11.07)% 比差异有统计学意义 ($t = 8.034, P < 0.01$), 见图 4。

2.5 Western blot 检测 VEGFA/ERK1/2/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

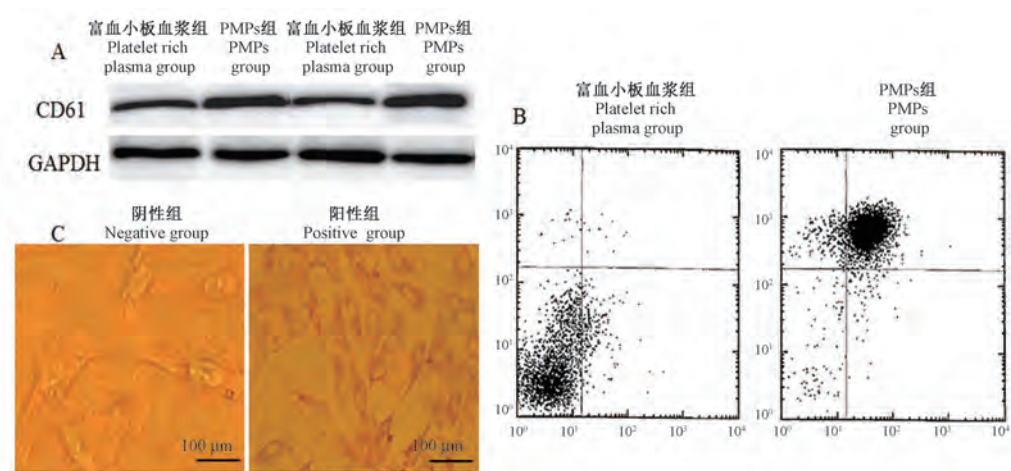
研究结果显示, mimic-NC 组、inhibitor-NC 组、M 组、miR-M 组、mimic-M 组 VEGFA、NF- κ Bp65、p-I κ B α 及 p-ERK 相对表达量与 Ctrl 组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。mimic-M 组、inhibitor-M 组 VEGFA、NF- κ Bp65、p-I κ B α 及 p-ERK 相对表达量与 M 组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 5。

2.6 qRT-PCR 检测 miR-4306 转染率情况

研究结果显示, mimic-NC 组、inhibitor-NC 组 miR-4306 相对表达量与 miR-NC 组比, 差异有统计学意义 ($t = 3.792, 4.496, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); mimic-M 组、inhibitor-M 组 miR-4306 相对表达量与 miR-M 组比, 差异有统计学意义 ($t = 3.821, 4.597, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。mimic-NC 组 miR-4306 相对表达量与 inhibitor-NC 组比, 差异有统计学意义 ($t = 6.794, P < 0.01$); mimic-M 组 miR-4306 相对表达量与 inhibitor-M 组比, 差异有统计学意义 ($t = 8.115, P < 0.01$)。M 组 miR-4306 相对表达量与 Ctrl 组比, 差异有统计学意义 ($t = 5.032, P < 0.01$), 见图 6。

3 讨论

DM 及其血管并发症的发病率逐年上升, 已成

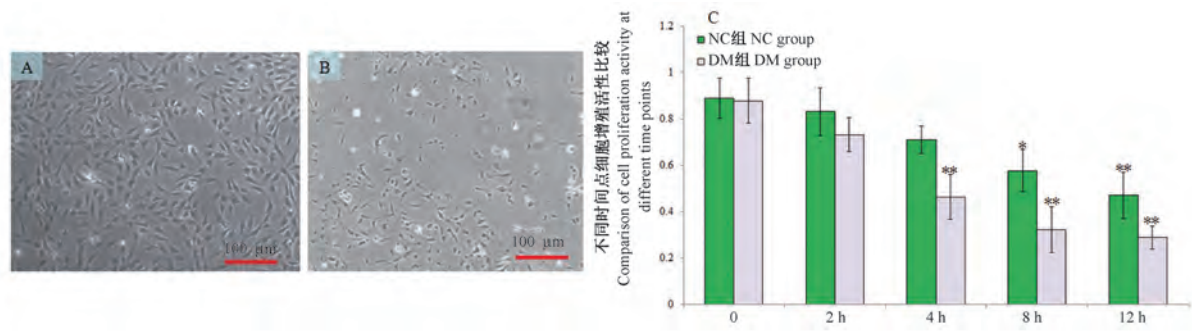


注:A:Western blot 检测 CD61 表达;B:流式细胞术检测 CD61 表达情况;C:免疫组化检测Ⅷ因子表达。

图 1 PMPs 及 VECs 的鉴定结果

Note. A, Western blot to detect CD61 expression. B, CD61 expression detected by flow cytometry. C, Immunohistochemical detection of factor Ⅷ expression.

Figure 1 Identification results of PMPs and VECs



注:A:NC 作用 4 h;B:DM 作用 4 h;C:不同作用时间的直方图。与作用 0 h 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 CCK-8 法检测不同时间各组 PMPs 对 VECs 细胞增殖活性的影响

Note. A, NC action for 4 h. B, DM action for 4 h. C, Histogram of different action time. Compared with the effect 0 h, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 CCK-8 method to detect the effect of PMPs in each group on the proliferation activity of VECs at different times

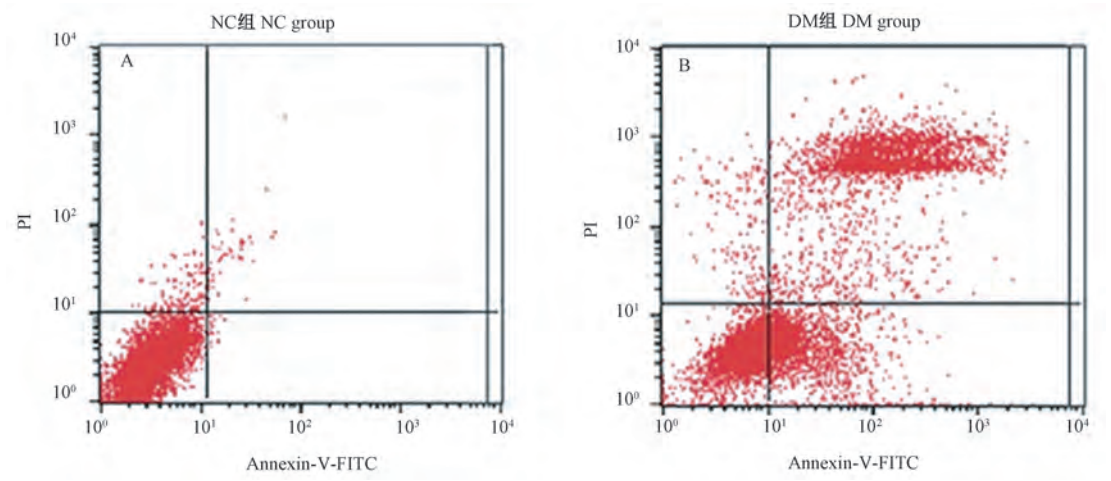


图 3 流式细胞术检测不同组别细胞凋亡情况

Figure 3 Flow cytometry to detect cell apoptosis in different groups

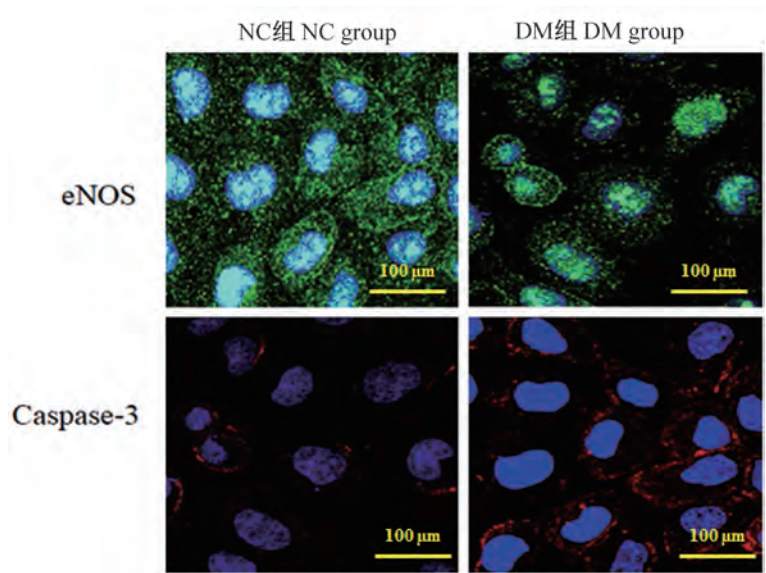
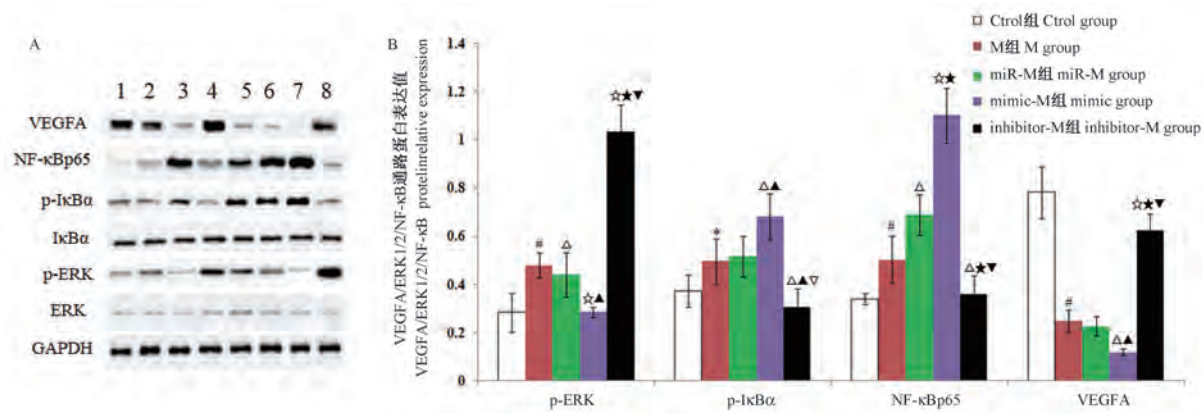


图 4 免疫荧光激光共聚焦显微镜检测 eNOS、Caspase-3 表达情况
Figure 4 Expression of eNOS and Caspase-3 detected by immunofluorescence laser confocal microscope



注:A:蛋白表达电泳图(1:Ctrl 组;2:miR-NC 组;3:mimic-NC 组;4:inhibitor-NC 组;5:M 组;6:miR-M 组;7:mimic-M 组;8:inhibitor-M 组);B:不同组别 p-ERK、p-IkBα、NF-κBp65、VEGFA 表达结果相比。与 Ctrl 组相比,* $P<0.05$,# $P<0.01$;与 M 组相比,Δ $P<0.05$,☆ $P<0.01$;与 miR-M 相比,▲ $P<0.05$,★ $P<0.01$;与 mimic-M 组相比,▽ $P<0.05$,▼ $P<0.01$ 。

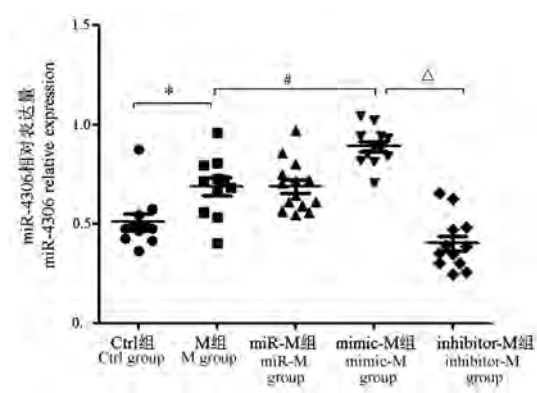
图 5 Western blot 检测 VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路相关蛋白表达

Note. A, Electrophoresis diagram (1, Ctrl group. 2, miR-NC group. 3, mimic-NC group. 4, inhibitor-NC group. 5, M group. 6, miR-M group. 7, mimic-M group. 8, inhibitor-M group.). B, Comparison of the expression results of p-ERK, p-IkBα, NF-κBp65 and VEGFA in different groups. Compared with Ctrl group, * $P<0.05$, # $P<0.01$. Compared with M group, Δ $P<0.05$, ☆ $P<0.01$. Compared with miR-M group, ▲ $P<0.05$, ★ $P<0.01$. Compared with mimic-M group, ▽ $P<0.05$, ▼ $P<0.01$.

Figure 5 Western blot detects the related proteins expression of VEGFA/ERK1/2/NF-κB signaling pathway

为全球亟待解决的热点课题。研究显示,DM 患者心血管死亡风险发生率较一般人员高三倍^[5]。动脉粥样硬化是糖尿病心血管疾病的病理生理障碍基础,内皮功能损伤在早期动脉粥样硬化中起关键作用^[6]。血小板活化后导致血小板收缩、变形以及形成伪足,变形后的一些细胞膜会以出芽的方式形

成小泡且脱落形成 PMPs^[7]。PMPs 水平异常与冠心病、DM、类风湿性关节炎、肿瘤等多种疾病的发生发展密切相关^[8]。研究显示,PMPs 主要通过 PMPs 携带的 RNA 和膜蛋白发挥免疫调节和生物信息传递作用,降低内皮的增殖、分化及迁移,已证实与动脉粥样硬化有关^[9-10]。DM 模型 PMPs 对血管内皮



注:与 Ctrl 组相比, * $P < 0.05$;与 M 组相比, # $P < 0.05$;与 mimic-M 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 6 qRT-PCR 检测不同组别 miR-4306 相对表达情况分析

Note. Compared with Ctrl group, * $P < 0.05$. Compared with M group, # $P < 0.05$. Compared with mimic-M group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 6 Relative expression of miR-4306 in different groups detected by qRT-PCR

细胞增殖的影响及其作用机制如何值得研究。通过本研究发现,DM 模型 PMPs 与内皮细胞共孵育后,增殖活性随着时间明显降低,且在培养 4 h 后出现明显的细胞凋亡,细胞出现固缩边缘,细胞完整性明显被破坏,提示 DM 血浆中 PMPs 可能造成内皮细胞损伤。

研究发现,PMPs 能够降低细胞内一氧化氮表达从而介导炎症因子的表达,而这一作用与 eNOS 表达量显著相关^[11]。为了探讨 DM 模型血浆中 PMPs 造成血管内皮细胞损伤的原因是否与 eNOS 表达量有关,本研究采用激光共聚焦技术显示,经 DM 患者血浆 PMPs 处理的内皮细胞(DM 组)中 eNOS 阳性表达率显著低于正常大鼠血浆 PMPs 处理组(NC 组),提示 DM 模型血浆中 PMPs 可能通过降低主动脉血管内皮细胞中 eNOS 表达量,导致 NO 水平降低,诱发细胞凋亡。已有研究显示,PMPs 能够诱导血管内中性粒细胞活化,而中性粒细胞中释放多种因子引起内皮细胞损伤,进而导致血管内皮通透性升高以及 Caspase-3 高表达,内皮细胞凋亡率则明显升高^[12],Caspase-3 的升高能激活核酸内切酶切割 DNA 并最终诱发细胞死亡。本研究发现,经 DM 患者血浆 PMPs 处理的内皮细胞(DM 组)Caspase-3 阳性率显著高于正常大鼠血浆 PMPs 处理组(NC 组),这一结果提示 DM 模型中 PMPs 参与了 DM 动脉血管内皮损伤,其主要原因可能与内皮细胞凋亡因子 Caspase-3 高表达及血管内皮细胞生

长因子低表达存在明显关系。

微小 RNA(miRNAs)在多种疾病的发生发展中起着重要作用^[13]。miR-4306 是近年来新发现的一种 miRNAs,有研究发现,在冠状动脉疾病中人单核细胞衍生的巨噬细胞中 miR-4306 显著上调,而 miR-4306 表达上调可以通过 Akt/NF- κ B 信号通路导致血管内皮损伤^[14-15]。NF- κ B 是已经被证实为炎症诱发的关键因子,其调控信号通路被激活后将促进炎症因子等的高表达;VEGFA 是一种具有促进血管内皮细胞增殖作用的细胞因子,其能够激活 ERK 信号通路,促进血管细胞的生长、增殖。为了探讨 DM 模型中 PMPs 引血管内皮细胞凋亡原因是否与 miR-4306 表达有关,本研究采用 RT-PCR 技术检测不同组别中 miR-4306 表达情况。本研究加入了 miR-4306 模型剂和抑制剂,结果显示加入 mimic-4306 后,通过分析研究显示,经 DM 患者血浆 PMPs 处理的内皮细胞(DM 组)中 miR-4306 相对表达量显著升高,而 Has-micro-4306-mimics 和 Has-micro-4306-inhibitor 具有促进和抑制 miR-4306 表达的作用,提示 DM 模型血浆 PMPs 可能作用于 miR-4306,且该 miRNAs 对内皮细胞生长、凋亡产生作用。

为了进一步分析 PMPs 介导的 miR-4306 是否对下游 VEGFA/ERK1/2/NF- κ B 信号通路中相关蛋白产生作用,本研究通过 Western blot 检测分析显示,与正常 PMPs 组(Ctrl 组)比较,DM 组(M 组)中 p-I κ B α 、NF- κ Bp65 表达量显著升高,而 p-ERK 及 VEGFA 则显著降低,加入 mimic-micro-4306 后,无论是正常 PMPs 组还是 DM 中 PMPs 组 p-I κ B α 、NF- κ Bp65 升高量更高,而加入 inhibitor-micro-4306 后 p-I κ B α 、NF- κ Bp65 降低明显、p-ERK 及 VEGFA 升高显著,同时 inhibitor-M 组与 inhibitor-NC 组具有统计学差异,提示 DM 血浆中 PMPs 能够通过 miR-4306 诱导 p-I κ B α 、NF- κ Bp65 升高,而降低 p-ERK 及 VEGFA 的作用,进而引起内皮细胞凋亡损伤,诱发动脉粥样硬化的发生发展,以上提示 DM 模型血浆 PMPs 可能一方面引起 miR-4306 高表达,进而促进 p-I κ B α 、NF- κ Bp65 水平升高,诱导炎症反应、引起细胞凋亡,另一方面降低促进血管内皮细胞生长因子表达量的降低,进而导致细胞生长受阻,引起细胞凋亡。

综上,DM 模型血浆中 PMPs 具有引起动脉血管内皮损伤的作用,其作用机制可能为 PMPs 作用于 miR-4306,进而激活 VEGFA/ERK1/2/NF- κ B 信

号,从而诱导细胞凋亡、引起内皮细胞生长因子表达下降。

参考文献:

- [1] Zeinalova NV, Kurbanov YZ, Mirzazade VA, et al. The risk of cardiovascular death in type 2 diabetes [J]. *Klin Med (Mosk)*, 2017, 95(1):57-59.
- [2] Kyselova A, Hinrichsmeyer H, Zukunft S, et al. Association between arginase-containing platelet-derived microparticles and altered plasma arginine metabolism in polycystic ovary syndrome [J]. *Metabolism*, 2019, 90: 16-19.
- [3] Abbasian N, Herbert KE, Pawluczyk I, et al. Vesicles bearing gifts: the functional importance of micro-RNA transfer in extracellular vesicles in chronic kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(5): F1430-F1443.
- [4] 宋军营, 贾亚泉, 吕靖, 等. 糖尿病对大鼠脑组织超微结构及微血管内皮相关因子表达的影响 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(10): 940-944.
- [5] 张健. 2 型糖尿病心血管疾病风险管理及利拉鲁肽的潜在优势 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(12): 1145-1148.
- [6] 洪天配, 母义明, 纪立农, 等. 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化性心血管疾病患者降糖药物应用专家共识 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 2(6): 481-502.
- [7] Chen F, Liao Z, Peng D, et al. Role of platelet microparticles in blood diseases: future clinical perspectives [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2019, 49(2): 161-170.
- [8] Chen X. Rac1 regulates platelet microparticles formation and rheumatoid arthritis deterioration [J]. *Platelets*, 2019, 31(1): 112-119.
- [9] Bao H, Chen YX, Huang K, et al. Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p [J]. *FASEB J*, 2018, 32(7): 3912-3923.
- [10] Christersson C, Thulin A, Siegbahn A. Microparticles during long-term follow-up after acute myocardial infarction. Association to atherosclerotic burden and risk of cardiovascular events [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(8): 1571-1581.
- [11] Ye S, Shan XF, Han WQ, et al. Microparticles from patients undergoing percutaneous coronary intervention impair vasodilatation by uncoupling endothelial nitric oxide synthase [J]. *Shock*, 2017, 48(2): 201-208.
- [12] Wang GH, Ma KL, Zhang Y, et al. Caspase 3/ROCK1 pathway mediates high glucose-induced platelet microparticles shedding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(2): 596-602.
- [13] Chang W, Wang J. Exosomes and their noncoding RNA cargo are emerging as new modulators for diabetes mellitus [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 853.
- [14] Yang Y, Luo H, Liu S, et al. Platelet microparticles-containing miR-4306 inhibits human monocyte-derived macrophages migration through VEGFA/ERK1/2/NF- κ B signaling pathways [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(5):481-491.
- [15] 赵永波, 岳月红, 王彦芝, 等. miR-4306 通过 MAPK/ERK 信号通路抑制血管紧张素 II 诱导的主动脉夹层的形成 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(4): 405-410.

[收稿日期] 2020-10-22

冷昌龙, 皮明山, 龚晓康. 单次大剂量对比多次小剂量 STZ 诱导 C57BL/6J 小鼠糖尿病肾病模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 113-118.

Leng CL, Pi MS, Gong XK. Single high-dose versus multiple low-dose streptozotocin for inducing diabetic nephropathy in C57BL/6J mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 113-118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 017

单次大剂量对比多次小剂量 STZ 诱导 C57BL/6J 小鼠糖尿病肾病模型的研究

冷昌龙, 皮明山, 龚晓康*

(江汉大学武汉生物医学研究院, 武汉 430000)

【摘要】 目的 对比研究不同剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 联合高糖高脂饮食诱导 C57BL/6J 小鼠糖尿病肾病模型的稳定性。**方法** 48 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为: 对照组 (注射等体积柠檬酸缓冲液, 12 只), 单次大剂量 (150 mg/kg STZ, 单次腹腔注射联合高脂高糖, 18 只), 多次小剂量 (50 mg/kg STZ, 连续注射 4 d 联合高脂高糖, 18 只)。检测两种造模方法在空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、饮水量、血脂、24 h 尿蛋白、肾功能及肾病理等方面的改变。**结果** 注射 STZ 后, 单次大剂量组小鼠体重缓慢增加, 而多次小剂量组小鼠体重出现负增长; 单次大剂量小鼠 FBG、饮水量在注射 STZ 4 周后达到峰值, 24 h 尿蛋白在注射 STZ 6 周后达到峰值, 随后逐渐降低; 多次小剂量组 FBG、24 h 尿蛋白及饮水量一直稳定上升并维持在较高水平; 实验结束时多次小剂量组小鼠 FBG、24 h 尿蛋白、血清甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肾脏指数 (kidney index, KI) 及肾小球还原糖水平均显著高于单次大剂量组 ($P < 0.05$), 且肾病理改变更为明显。**结论** 多次小剂量注射 STZ 联合高糖高脂饮食建立小鼠糖尿病肾病成模率高、死亡率低、稳定性好, 具有人类糖尿病肾病相似的发病过程和病理特征, 是理想的糖尿病肾病造模方法。

【关键词】 糖尿病肾病; 链脲佐菌素; 高糖高脂饮食; C57BL/6J 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0113-06

Single high-dose versus multiple low-dose streptozotocin for inducing diabetic nephropathy in C57BL/6J mice

LENG Changlong, PI Mingshan, GONG Xiaokang*

(Wuhan Institute of Biomedical Sciences, Jiangnan University, Wuhan 430000, China)

【Abstract】 Objective To explore the optimal method of producing a streptozotocin-induced diabetic nephropathy C57BL/6 mice model by investigating a molded rate of single high-dose and multiple low-dose streptozotocin injections. **Methods** Male C57BL/6J mice ($n = 48$) were randomly divided into three groups: the normal group and two diabetic nephropathy groups. Mice in one model group (the single high-dose group) were intraperitoneally administered 150 mg/kg streptozotocin after having a high fat/high sucrose diet. The other model group (the multiple low-dose group) was intraperitoneally administered 50 mg/kg streptozotocin for 4 consecutive days after having a high fat/high sucrose diet. The

[作者简介] 冷昌龙 (1988—), 男, 硕士, 实验师, 研究方向: 糖尿病及其并发症机制研究。E-mail: lengcl.whibs@aliyun.com

[通信作者] 龚晓康 (1990—), 男, 硕士, 实验师, 研究方向: 糖尿病及其并发症机制研究。E-mail: gongxk.whibs@aliyun.com

fasting blood glucose levels, body weight, water intake, 24 h urine protein, renal function and renal pathological changes of the three groups were measured. **Results** The body weight of the single high-dose group increased stably after streptozotocin injection, while the body weight of the multiple low-dose group decreased by inches after streptozotocin injection. Moreover, the fasting blood glucose levels, water intake and 24 h urine protein increased stably in the multiple low-dose group from week 2 to week 10. The levels of fasting blood glucose, 24 h urine protein, total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein, serum creatinine, blood urea nitrogen and kidney/body weight ratio were significantly higher in the multiple low-dose group than in the single high-dose group ($P < 0.05$) and the change in pathology was apparent. **Conclusions** The multiple low-dose streptozotocin injection protocol is a reasonable method for inducing mouse diabetic nephropathy.

[Keywords] diabetic nephropathy; streptozotocin; high fat/high sucrose diets; C57BL/6J mice

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是以蛋白尿、水肿、高血压和肾功能不全为主要临床表现的糖尿病并发症,也是引起终末期肾病,导致糖尿病患者死亡的主要病因之一^[1]。DN 在我国的发病率呈逐年上升趋势,20%~30%的糖尿病患者会并发糖尿病肾病,严重影响了患者的生活质量^[2]。目前对 DN 的研究虽然很多,但其具体的发病机制仍未完全阐明。因此,建立一种简单、经济、稳定可靠,同时病理表现与人类糖尿病肾病类似的动物模型对于深入研究 DN 的发病机制及新药开发有着非常重要的意义。DN 动物模型主要分为诱发型和自发型^[3-4]。自发型模型大小鼠价格昂贵,对环境要求高,严重限制了相关研究的开展。诱发型模型常用 STZ 进行诱导,造模过程中 STZ 的注射剂量直接影响动物模型成模率及成模稳定性,但国内外 STZ 造模法中 STZ 剂量选用报道众多,尚存有争议^[5-6]。本研究选取单次大剂量单次注射和多次小剂量连续注射 STZ 联合高糖高脂饮食建立 DN 模型,对比观察造模过程中模型的稳定性,旨在探索更为合理的糖尿病肾病的造模方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠(18~20)g,共 48 只,购于北京维通利华公司[SCXK(京)2016-0006]。饲养于江汉大学医学院动物实验中心[SYXK(鄂)2018-0042],恒温恒湿(温度:(23±2)℃,相对湿度:60%~70%),12 h 明暗交替,动物自由进食饮水。本实验通过江汉大学医学院实验动物伦理审查(IACUC20191210),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

链脲佐菌素(美国 Sigma 公司),用 pH=4.2 的

0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液在冰浴中配制,现配现用;安准血糖仪及血糖试纸(瑞士罗氏公司);尿蛋白检测试剂盒、血清肌酐检测试剂盒、血清尿素氮检测试剂盒、总胆固醇检测试剂盒、甘油三酯检测试剂盒、低密度脂蛋白检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;PAS 染色试剂盒(上海源叶生物);高糖高脂饲料(10%猪油、20%蔗糖、2.5%胆固醇、1.0%胆酸盐、66.5%普通饲料,江苏美迪森生物医药有限公司)。小鼠代谢笼(上海玉研生物);AU5800 全自动生化分析仪(美国 Beckman);MULTISKAN GO 酶标仪(美国 Thermo);EC 350-1 石蜡包埋机(美国 Thermo);MICROM HM 340E 石蜡切片机(美国 Thermo);BX 51 显微镜(日本 OLYMPUS)。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病肾病模型小鼠制备及分组

小鼠适应性喂养 7 d 后随机分为 3 组,即普通饲料喂养组(对照组)12 只,高脂高糖饲料喂养+STZ 单次大剂量组 18 只,高脂高糖饲料喂养+STZ 多次小剂量组 18 只。STZ 造模组喂养高脂饲料 4 周后,小鼠禁食不禁水 12 h,随后对照组小鼠腹腔注射等体积柠檬酸缓冲液;多次小剂量组连续 4 d 腹腔注射 STZ 50 mg/kg,单次大剂量组腹腔注射 STZ 150 mg/kg 一次,STZ 注射 2 h 后给小鼠进食以防止低血糖。整个实验期间,STZ 造模组小鼠均采用高脂高糖饲料喂养。实验期间,按照动物实验的 3R 原则给予实验动物人道主义关怀。

1.3.2 标本采集及检测

注射 STZ 前及注射 STZ 后 2、4、6、8、10 周测量并记录小鼠体重及饮水量;注射 STZ 前及注射 STZ 后 2、4、6、8、10 周各组小鼠禁食 12 h 后采取剪尾法测量空腹血糖;注射 STZ 后 2、6、10 周各组小鼠入代谢笼收集 24 h 尿液,采用考马斯亮蓝法测定 24 h 尿

蛋白含量;注射 STZ 后第 10 周各组小鼠眼眶取血,2000 r/min 离心取上清,用全自动生化分析仪检测血清 TC、TG、LDL、Scr 及 BUN,其中 Scr 采用苦味酸法,BUN 采用脲酶法;小鼠处死后迅速剥离双肾,生理盐水清洗,滤纸吸干,剥离外包膜后称双肾重量,采用公式:肾脏指数 = $m_1/m_2 \times 100\%$ (m_1 为小鼠双肾总重量; m_2 为小鼠的体重);将肾置于 10% 中性福尔马林中固定 24 h,常规脱水、石蜡包埋并切片,石蜡切片梯度脱蜡至水,蒸馏水洗 2 min,过碘酸溶液氧化 10 min,流水洗 10 min,希夫(Schiff)试剂染色 10 min,流水洗 5 min,苏木精染核 2 min,流水冲洗 10 min,常规脱水、透明、封片、拍照。

1.4 统计学方法

各组数据均采用平均数±标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,采用 Graph Pad Prism 5.0 软件进行数据分析,组间比较采用 one-way ANOVA 和 Duncantest 检验方法,其中 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 状态观察

注射 STZ 后,给予小鼠充足饲料及饮水,隔天更换垫料以保持环境清洁。STZ 注射 72 h 后,单次大剂量注射组及多次小剂量注射组小鼠均出现多饮、多食、多尿情况。STZ 注射后第 4 周和第 5 周,单次大剂量组小鼠均死亡 1 只。到实验结束时,单次大剂量组共死亡小鼠 2 只,而对照组和多次小剂量组无小鼠死亡。

2.2 小鼠体重变化

实验期间,单次大剂量组小鼠体重缓慢增加,而多次小剂量组小鼠体重出现负增长,注射 STZ 10 周后多次小剂量组小鼠体重显著低于对照组和单次大剂量组($P < 0.05$),见图 1。

2.3 小鼠空腹血糖变化

注射 STZ 后,单次大剂量组空腹血糖迅速升高,在第 4 周达到峰值,且显著高于阴对照组及多次小剂量组($P < 0.001, P < 0.05$),但此后呈逐渐降低的趋势;多次小剂量组空腹血糖持续升高并保持稳定在较高水平至实验结束,在注射 STZ 后的第 8~10 周,多次小剂量组空腹血糖显著高于单次大剂量组($P < 0.01$),见图 2。

2.4 小鼠饮水量变化

注射 STZ 后,单次大剂量组小鼠饮水量迅速增加,在第 4 周后达到峰值,且显著高于对照组及多次

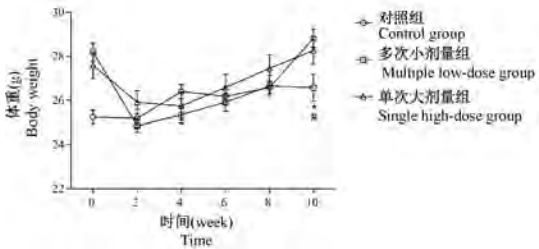
小剂量组($P < 0.001, P < 0.05$),随后有所降低,但仍显著高于正常对照($P < 0.001$)。注射 STZ 后多次小剂量组饮水量持续升高并保持稳定至实验结束,在第 8~10 周时,显著高于单次大剂量组($P < 0.01$),见图 3。

2.5 小鼠 24 h 尿蛋白变化

STZ 注射后的第 2、6 周,与对照组相比,单次大剂量组和多次小剂量组的 24 h 尿蛋白含量显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.001$),但造模组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。第 10 周时,单次大剂量组 24 h 尿蛋白有所降低,且显著低于多次小剂量组($P < 0.001$),见图 4。

2.6 各组小鼠血清 TC、TG 及 LDL 比较

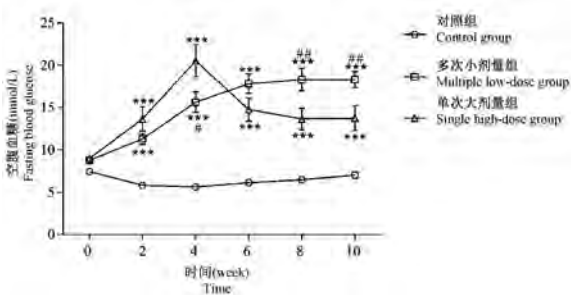
STZ 注射 10 周后,与正常对照组比较,多次小剂量组血清 TC、TG 及 LDL 水平均显著升高,差异



注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与单次大剂量组相比,# $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠建模前后体重的变化($\bar{x} \pm s\bar{x}$)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the single high-dose group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Change of body weight in each group before and after modeling



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$;与单次大剂量组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠建模前后空腹血糖的变化($\bar{x} \pm s\bar{x}$)
Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. Compared with the single high-dose group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Change of fasting blood glucose in each group before and after modeling

有统计学意义($P<0.001$)。相较于对照组,单次大剂量组血清 TC 及 LDL 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.001$),两组间 TG 水平无显著性差异($P>0.05$)。多次小剂量组血清 TG 水平显著高于单次大剂量组($P<0.001$),见表 1。

2.7 各组小鼠血清肾功能及肾脏指数比较

STZ 注射 10 周后,与正常对照组相比,多次小剂量组血清尿素氮、血清肌酐及肾脏指数显著升高($P<0.001$)。与正常对照组相比,单次大剂量组血清尿素氮及肾脏指数显著升高($P<0.001$, $P<0.05$),血清肌酐无显著性差异($P>0.05$)。多次小剂量组血清肌酐及肾脏指数显著高于单次大剂量组($P<0.001$, $P<0.01$),见表 2。

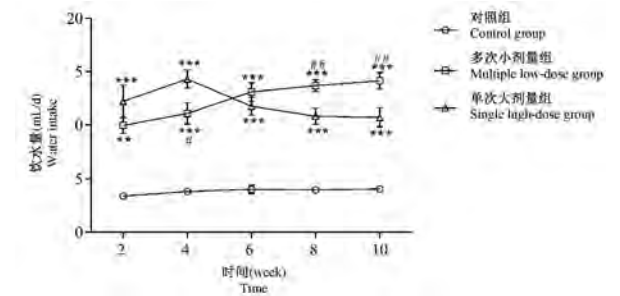
2.8 各组小鼠肾病理的变化

为检测小鼠肾中的还原糖水平,对各组小鼠的肾进行 PAS 染色。与对照组相比,两种剂量组小鼠

肾小球系膜细胞增生,系膜基质增多,且肾小球着色明显增多,还原糖水平显著高于对照组($P<0.001$)。两种剂量组比较,发现多次小剂量组还原糖的累积显著高于单次大剂量组($P<0.001$),表明多次小剂量组肾小球损伤更为显著,见图 5。

3 讨论

目前 DN 动物模型的建立方法主要分为自发性模型^[7]和诱发性模型^[8]。自发性 DN 模型由于其存在遗传因素作用,糖尿病肾病的产生与临床患者更为相似,但是相较于普通诱导鼠类模型的获得渠道更为狭窄,价格较高,制约了其在 DN 研究中的广泛使用。诱发性 DN 模型采用腹腔或尾静脉注射一定剂量 STZ,从而特异性损伤胰岛 β 细胞^[9],使胰岛素分泌不足,模拟糖尿病的发生,在此基础上继续喂养 4~8 周,可出现 DN 早期症状。脂代谢紊乱是



注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与单次大剂量组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

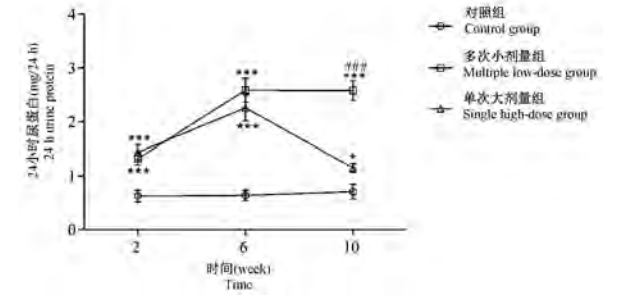
图 3 各组小鼠 24 h 饮水量的变化($\bar{x}\pm s\bar{x}$)
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with the single high-dose group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Change of water intake in each group

表 1 各组小鼠血清 TC、TG 及 LDL 水平比较($\bar{x}\pm s\bar{x}$)
Table 1 Comparison of serum TC, TG and LDL in each group

组别 Groups	<i>n</i>	甘油三酯 (mmol/L) TG	胆固醇 (mmol/L) TC	低密度脂蛋白 (mmol/L) LDL
对照组 Control	12	3.54±0.08	1.12±0.06	1.25±0.04
多次小剂量组 Multiple low-dose	18	6.86±0.38 ***	2.04±0.25 ***##	2.63±0.14 ***
单次大剂量组 Single high-dose	16	6.25±0.43 ***	1.29±0.15	2.29±0.15 ***

注:与对照组相比, *** $P<0.001$;与单次大剂量组相比, ### $P<0.001$ 。
Note. Compared with the control group, *** $P<0.001$. Compared with the single high-dose group, ### $P<0.001$.



注:与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与单次大剂量组相比, ### $P<0.001$ 。

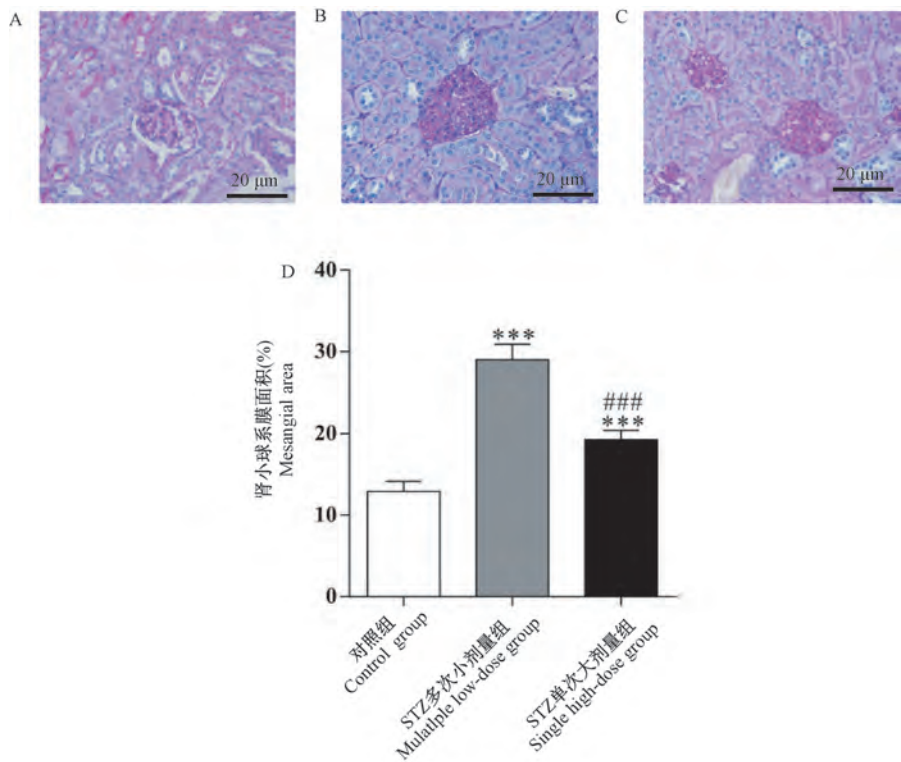
图 4 各组小鼠 24 h 尿蛋白的变化($\bar{x}\pm s\bar{x}$)
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with the single high-dose group, ### $P<0.001$.

Figure 4 Change of 24 h urine protein in each group

表 2 各组小鼠肾功能及肾脏指数比较($\bar{x}\pm s\bar{x}$)
Table 2 Comparison of kidney function and kidney index in each group

组别 Groups	<i>n</i>	血清尿素氮 (mmol/L) BUN	血清肌酐 (mmol/L) Scr	肾脏指数 (%) KI
对照组 Control	12	21.19±0.85	19.95±3.01	1.20±0.04
多次小剂量组 Multiple low-dose	18	29.43±0.91 ***	77.51±13.84 ***##	1.69±0.18 ***##
单次大剂量组 Single high-dose	16	27.37±1.30 ***	31.80±6.25	1.42±0.04 *

注:与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与单次大剂量组相比, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with the single high-dose group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.



注:A:对照组;B:STZ 多次小剂量组;C:STZ 单次大剂量组;D:肾小球胶原面积百分比统计。与对照组相比,*** $P<0.001$;与单次大剂量组相比,### $P<0.001$ 。

图5 各组小鼠肾形态变化(PAS)

Note. A, Control group. B, Multiple low dose group. C, single high-dose group. D, Statistical results of the PAS staining. Compared with the control group, *** $P<0.001$. Compared with the single high-dose group, ### $P<0.001$.

Figure 5 Histological observation of kidney tissues in each group

DN 重要危险因素之一,芝敏等^[10]比较不同饮食结构建立 2 型糖尿病肾病大鼠模型时发现,高糖高脂可导致糖尿病肾病大鼠更为明显的高血压和更加严重的微量白蛋白尿,且易导致肾小球硬化,病理损害相对较重。C57BL/6J 小鼠是有腹部肥胖和 2 型糖尿病基因倾向的近交系小鼠,具有 ob/ob 遗传背景,对脂肪诱导血糖升高较敏感^[11-12]。因此,本研究以 C57BL/6J 小鼠作为研究对象,首先利用高糖高脂饮食诱导出胰岛素抵抗,然后注射 STZ 引起 β 细胞受损并诱发形成糖尿病模型,在此基础上继续喂养高脂高糖饲料,大大缩短了 DN 的造模时间。已有研究表明 STZ 的剂量与胰岛的损伤程度呈明显的正相关^[13-14],STZ 剂量过大则小鼠易死亡^[15],剂量过小则成模率低^[16]。本研究选择 150 mg/kg、50 mg/kg STZ 分别进行单次大剂量腹腔注射及多次连续小剂量腹腔注射建立 DN 模型。结果显示两种处理方式均能使模型组小鼠出现尿量增多、饮水量增多,体重下降等糖尿病症状。单次大剂量组和多次小剂量组在 STZ 注射后的第 4 周空腹血糖分别

为 20.54 mmol/L 和 15.64 mmol/L,10 周时血糖分别为 13.75 mmol/L 和 18.30 mmol/L。这些结果说明单次大剂量 STZ 注射可使小鼠的血糖水平快速升高,但稳定性较差,随着实验的进行,血糖水平会有所恢复;而多次小剂量 STZ 注射组小鼠的血糖水平升高缓慢,但持续上升,并一直维持在较高水平。蛋白尿的出现是肾受累的明显特征,表明了糖尿病的并发症—糖尿病肾病的产生^[17]。实验中,对小鼠 24 h 尿蛋白量进行动态监测发现,注射 STZ 后,单次大剂量组 24 h 尿蛋白持续上升至第 6 周后开始下降,而多次小剂量组小鼠尿蛋白持续升高,在第 10 周多次小剂量组 24 h 尿蛋白显著高于单次大剂量组。造模 10 周后,多次小剂量组血清肌酐水平及肾脏指数均高于单次大剂量组,表明多次小剂量组小鼠肾功能损伤更为显著。基质增生和间质纤维化是糖尿病肾病进展的主要病理特征^[18]。肾 PAS 染色显示,单次大剂量组肾小球系膜轻度增生,细胞外基质增多,改变不够典型,而多次小剂量组组肾已出现典型病理改变:系膜区明显扩张甚至

弥漫性系膜硬化、系膜细胞增生及细胞外基质显著增多,肾小球、肾小管基底膜增厚。根据 Mogensen 对 DN 分期标准^[19],单次大剂量组小鼠至少到达 DN 的Ⅱ期,多次小剂量组小鼠达 DN 的Ⅲ期。上述结果表明,相比于单次大剂量注射 STZ,多次小剂量注射 STZ 对 C57BL/6J 小鼠造成的肾损伤更为明显。

综上所述,实验结果表明单次大剂量和多次小剂量注射 STZ 的方法均能诱发 C57BL/6J 小鼠 DN。单次大剂量注射与多次小剂量注射方法相比,操作简单,用药量小,但对小鼠的毒性较大,死亡率较高,成模率较低,血糖水平波动幅度大,有些小鼠可逐渐恢复至正常血糖水平。多次小剂量连续注射 STZ 联合高糖高脂饮食,小鼠死亡率低,血糖稳定,肾病理改变典型,是理想的 DN 造模方法。

参考文献:

- [1] Sun H, Yuan Y, Sun ZL. Cholesterol contributes to diabetic nephropathy through SCAP-SREBP-2 pathway [J]. *Int J Endocrinol*, 2013, 2013: 592-576.
- [2] 张丽芬, 吕仁和, 黄文政. 链脲佐菌素糖尿病肾病大鼠模型的建立及稳定性评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24 (4): 8-12.
- [3] 张浩军, 赵静波, 李平. 糖尿病肾病动物模型研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24 (7): 845-848.
- [4] 金勇, 朱勇, 吴南翔. 实验性链脲佐菌素诱导的大、小鼠糖尿病动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19 (3): 80-82.
- [5] Ryu HH, Kim HL. Therapeutic effects of epigallocatechin gallate on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice [J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2012, 31(2): A45.
- [6] 姜骊, 陈辉, 何勇, 等. 高脂饮食加低剂量链脲毒素建立小鼠 2 型糖尿病模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(3): 35-38.
- [7] Jiang T, Huang Z, Lin Y, et al. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 850-860.
- [8] 蒋朝晖, 吕玉晶, 赵芳, 等. 高脂高糖饮食结合链脲佐菌素

建立 2 型糖尿病大鼠模型的改良 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(1): 80-82.

- [9] Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin [J]. *Diabetologia*, 2000, 43(12): 1528-1533.
- [10] 芝敏, 梁新华, 徐佩茹. 不同饮食结构建立的 2 型糖尿病肾病大鼠模型比较 [J]. *中国老年学*, 2013, 34 (8): 2179-2181.
- [11] Lillioja S, Mott DM, Spraul M, et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus; Prospective studies of Pima Indians [J]. *N Engl J Med*, 2013, 329(27): 1988-1992.
- [12] Rebuffé-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, et al. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Metabolism*, 1993, 42(11): 1405-1409.
- [13] 孙晨靓, 朱铭岩, 王张伟, 等. 链脲菌素剂量对 C57BL/6J 小鼠糖尿病诱导效应的影响 [J]. *中华胰腺病杂志*, 2009, 9 (1): 24-26.
- [14] Inada A, Kanamori H, Arai H, et al. A model for diabetic nephropathy: advantages of the inducible cAMP early repressor transgenic mouse over the streptozotocin-induced diabetic mouse [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 215(2): 383-391.
- [15] Lv Z, Hu M, Fan M, et al. Podocyte-specific Rac1 deficiency ameliorates podocyte damage and proteinuria in STZ-induced diabetic nephropathy in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (3): 342.
- [16] 田河林, 韦立顺, 许忠新, 等. 糖尿病小鼠肾小球微血管密度与 VEGF 表达的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28 (2): 358-361.
- [17] Vogt L, Roelofs JJ. Introduction to pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy: pathophysiology and clinical aspects [M]. USA: *Diabetic Nephropathy*, 2019.
- [18] Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14 (5): 1358-1373.
- [19] Mogensen CE, Schmitz A, Christensen CK. Comparative renal pathophysiology relevant to IDDM and NIDDM patients [J]. *Diabetes Metab Rev*, 1988, 4(5): 453-483.

[收稿日期] 2020-10-05

汪家琪, 刘延峥, 刘雅琪, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间医院人力资源应急管理策略 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 119-123, 129.

Wang JQ, Liu YZ, Liu YQ, et al. The emergency management strategies of hospital human resources during the outbreak of Corona Virus Disease 2019 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 119-123, 129.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 018

新型冠状病毒肺炎疫情期间医院人力资源 应急管理策略

汪家琪¹, 刘延峥², 刘雅琪³, 连雪洪^{1*}

(1. 山东大学齐鲁医院院长办公室, 济南 250012; 2. 山东大学齐鲁医院科研处, 济南 250012;
3. 山东大学齐鲁医院急诊综合楼建设办公室, 济南 250012)

【摘要】 新型冠状病毒肺炎疫情期间, 医疗卫生机构卫生人力资源调配面临重大考验。医院一方面要承担突发事件导致的病人医疗救治和现场救援, 另一方面还要筑起严密防线, 确保病毒不在医疗机构内传播, 实现“零感染”, 同时安全有序开展好日常医疗服务工作。医院人力资源是疫情防控和医疗服务的主力军。本研究旨在总结综合性公立医院在新型冠状病毒肺炎疫情流行期间采取的人力资源应急管理策略和成效, 以为其他医院应对突发公共卫生事件提供借鉴。

【关键词】 新型冠状病毒肺炎; 突发公共卫生事件; 卫生应急; 医院管理; 卫生人力资源
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0119-05

The emergency management strategies of hospital human resources during the outbreak of Corona Virus Disease 2019

WANG Jiaqi¹, LIU Yanzheng², LIU Yaqi³, LIAN Xuehong^{1*}

(1. Office of the Director, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China. 2. Department of Research, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012. 3. Department of Emergency Multi-Functional Building Construction Office, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012)

【Abstract】 The outbreak of Corona Virus Disease 2019 brought great challenges to the allocation of health human resources in medical and health institutions. Not only should the hospitals undertake the medical treatment and on-site rescue of patients caused by emergencies, but also compact defenses to minimize the spread of virus in medical institutions, avoid cross infection, and take daily medical services into account. This study aims to summarize the hospital's human resources emergency management strategies in a comprehensive public hospital during Corona Virus Disease 2019, in order to provide reference for other hospitals to deal with public health emergencies.

【Keywords】 Corona Virus Disease 2019; emergent public health event; health emergency; hospital management; health human resources

[作者简介] 汪家琪 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 医院管理、德育。E-mail: wjq19920321@163.com

[通信作者] 连雪洪 (1976—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 医院管理。E-mail: 306459648@qq.com

突如其来的新型冠状病毒肺炎疫情 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) (以下简称新冠肺炎), 让医疗卫生机构卫生人力资源调配面临重大考验。医疗卫生机构不仅要应对突发公共卫生事件中的人员提供医疗救护和现场救援, 还要加强院内感染防控, 防止病毒传播, 同时兼顾急危重症患者就诊需求。人力资源是医院的第一资源和战略性资源, 如何最大限度地发挥人力资源价值, 确保支援救治和院内防控同时进行, 是打赢疫情防控阻击战的重要前提。因此, 建立医院应急响应机制, 合理配置卫生人力资源, 同时加强医务人员防护, 避免病毒在院内传播, 对战胜疫情具有重要意义。作为国家医疗服务的主体, 公立医院既要全力做好医疗救治支援工作, 又要守好医院感染防控的关口, 同时安全有序做好医疗服务工作。本研究以某大型三甲公立医院为例, 总结医院在疫情防控期间采取的卫生人力资源应急管理措施和成效, 以期为其其他综合性医院管理层部署可及的人力资源, 充分应对严峻复杂的突发公共卫生事件提供借鉴, 具体如下。

1 人力资源应急管理策略

疫情发生后, 医院成立防控指挥部, 全面加强疫情防控的集中统一领导。经过前期人员摸排整合, 统筹全院人力资源, 打破部门(科室)界限和壁垒, 坚持全院一盘棋, 根据工作需要和形势变化调整人力配置, 全院统筹、分类使用、灵活机动、适时调整, 从人员排查、组派援鄂医疗队、专家指导、防护知识培训和后勤保障等方面确保疫情防控和医疗服务工作顺利进行, 实现人力资源最优配置和效用最大化。

1.1 建立分工明确, 责任到人的联防联控工作体系

1.1.1 组建疫情防控管理团队, 分工定责

医院第一时间成立全方位、立体化联防联控体系。首先成立疫情防控工作领导小组, 为加大组织力度, 成立党政主要负责人为总指挥、其他班子成员为副总指挥的新冠肺炎防控指挥部, 负责部署医院的疫情防控和医疗救治工作, 根据需要随时召开工作会议。建立医院应急指挥系统可以有效降低低效决策风险, 提高高效决策收益^[1], 并在 2003 年防治严重急性呼吸综合征 (SARS) 实践中证明有效^[2]。根据院区布局划分督查片区, 由指挥部成员组成片区督查组, 视疫情形势定期或不定期现场检

查疫情防控和医疗服务情况, 及时发现、解决相关问题; 按照疫情防控需要及工作职责设置综合协调、医疗护理、物资供应、后勤保障、宣传报道、安全保卫、督查督办等工作组, 及时处理疫情防控相关工作。片区督查组和工作组形成每日处理、定期汇报工作机制。指挥部下设办公室, 抽调医院感染管理处、医务处、党委办公室、院长办公室、宣传部等部门人员组成, 负责疫情防控工作动态发布, 医院人员及亲属情况(体温、行程动态等)收集上报, 统筹向各片区和工作组传达部署并督导落实指挥部有关工作要求。由此形成横向到边、纵向到底、全面覆盖、不留死角的联防联控工作机制^[3]。通过推进实施“责任片区+工作小组”全方位立体化联防联控体系, 医院实现了院区防控“零疏漏”、医务人员“零感染”。

1.1.2 “三道防线”人员各司其职, 层层筛查入院人群

整合多部门力量形成专班, 对院外院内人员进行地毯式排查, 动态掌握相关人员情况变化。与“三圈层”管控模式相似^[4], 医院设置预检分诊“三道防线”, 每道防线均安排人员负责筛查。第一道防线为门急诊预检分诊、各楼宇入口监测点和发热门诊由“预检分诊护士+保安+行政支援人员”组成的工作组, 负责指导患者及其家属填写新冠肺炎防控告知书、核验身份和体温检测; 第二道防线为各诊室(区)设置的护士站分诊台, 再次测量体温和询问流行病学史, 若发现患者需要去发热门诊, 护士做好相关信息登记, 送至发热门诊就诊; 第三道防线为诊室的接诊医师, 第三次询问患者的流行病学史, 如果有异常要求患者返回护士站分诊台, 若患者需要去发热门诊就诊, 安排护士站人员送至发热门诊就诊。各防线工作人员均严格执行手卫生, 穿戴相应级别的防护设备。督导落实疫情防控科主任负责制, 制定执行《新冠肺炎疫情期间入院患者审核书》, 关口前移、层层审核, 严把患者及其家属、陪护人员、护工健康监测和排查关。

在院区入口处和楼宇加强门岗和值班管理, 逐一对来院人员核对身份、测量体温、信息登记, 监督佩戴口罩。保卫部门禁止体温超过 37℃ 者、未佩戴口罩者、快递员、外卖员进入各楼宇。同时, 成立疫情排查专班每日对院内职工等进行排查。“三道防线”有效实现了医院统筹做好疫情防控和医疗服务工作, 在省内医疗机构中率先实现“复工复产”, 开

创了疫情防控常态化下医院发展新局面。

1.1.3 实施全院动员,统筹省外支援和省内帮扶两个“战场”

(1) 组建援鄂抗疫医护预备队,加强援鄂一线救治工作

坚持全院一盘棋,联防联控、人人参与。加强疫情防控工作动员,营造全员参与、群防群治的浓厚氛围。医院从数千份集体和个人请战书中遴选出专业技术过硬、身心素质强的医护人员组建预备队,随时做好奔赴一线参与救治或轮替的准备。医疗队应在研判疫情可能扩大前组建,做到“宁可备而不用,不可用而不备”^[5]。医院坚决贯彻落实习近平总书记“生命重于泰山、疫情就是命令、防控就是责任”重要指示批示精神,先后派出四批 150 名援鄂医疗队队员(医师 34 名,护理人员 116 名)逆行出征、驰援湖北。援鄂医疗队全力开展危重症患者救治工作,充分利用医疗队多学科协作优势(涉及肝病科、感染性疾病科、呼吸与危重症医学科、急诊科、麻醉科、全科医学科、中医科、重症医学科、护理等),综合运用气管插管、俯卧位通气、营养支持、心理疗法等治疗方法,对危重症患者实行“一对一医生责任制”,指导诊治高龄、合并多种慢性病患者取得良好效果。共救治患者 751 人(其中重症、危重症患者共计 164 人),治愈率、好转率等医疗指标均达到预期效果,实现了感染率为零的目标。为充分了解医院支援湖北医疗队医护人员情况,做好后勤保障,医院设置一名熟悉临床业务、工作经验丰富、办事能力强、身体健康的援鄂医疗队专职联络员,负责与医疗队沟通联络,及时了解医疗队的工作情况,如工作量、困难和需求、人员健康状况等,及时向指挥部报告;配合医务处、供应处做好医疗队的防护和生活物资配备情况等。制定联络员制度有利于共享前方信息,切实做好后方保障作用。

(2) 调集多学科专家,指导帮扶新冠肺炎患者抢救

专家在疫情防控中具有关键性的支撑作用^[6]。疫情防控期间,充分发挥专家对地方和定点救治医院的专业支撑和智力支持作用,提升各地疫情防控和诊治能力水平。医院成立救治专家组,由呼吸科、重症医学科、感染性疾病科、急诊科等重点科室副高及以上职称医师组成,呼吸科主任任组长,在医疗组领导下负责诊疗指南解读培训、制定诊疗方案、疑似患者诊治等。同时,医院继续开展对全省

和各地市的技术指导和医疗救治工作,派出重症医学科、呼吸内科等专家,或联合其他医疗机构的专家组成专家督导组,赴省内多家集中救治定点医院开展新冠肺炎患者救治工作,负责综合查房、组织会诊、诊疗指导等。现场会诊治疗新冠肺炎确诊、疑似患者 70 余人次,开展远程会诊 50 余次。

1.2 基于全院工作量,集中调配人力

1.2.1 组建应急管理梯队,保障一线人力资源充足

疫情期间,防控是医院第一要务。医院坚持疫情防控全院一盘棋,行政职能部门围绕临床一线主动跟进服务,协调联动,密切联系。在保证完成本部门日常工作前提下,行政职能部门选派本部门符合条件人员组建支援临床一线工作队,协同保卫处、相关诊室(区)形成“预检分诊护士+保安+行政协调人员”工作组,人事部门负责明确工作职责,制定排班表,统筹安排出勤时间和地点。工作队对医院各监测点进入人员做到体温必测、流行病史必问、身份证件必查。随着医院逐步有序恢复医疗服务,面对可能出现的就诊高峰,避免支援预备队队员过度劳累,医院迅速整合工作队,分批分组轮换值守,直至疫情结束。

1.2.2 依托健全的基层党组织,建立人员排查专班

疫情之初,医院迅速成立人员排查专班,对全院人员实行网格化、全覆盖管理。在“防控指挥部(人员排查专班)—党总支—党支部(部门、科室)”三级防控体系下,加强对本院职工及家属、规培人员、外协服务人员、进修人员、学生等的筛查和动态监测,信息每日逐级上报,责任层层压实,专班负责汇总各类人群排查信息,提交医院指挥部审阅。

1.2.3 保证科室人员正常运转,提前谋划恢复医疗后的工作

坚持主动报名和统一调度相结合,发挥医生的自主性和团队精神,调集内科及相关科室医生至呼吸内科、重症医学科等协助开展工作。根据不同地区疫情风险等级情况,安排低风险地区的进修医生分批次、有序返回科室。调配住院医师规培学员援助承担援鄂任务的科室,援助时间计为有效轮转时间,既能保证科室人力资源的充足,又能达到规培学员的轮转要求。疫情期间,发热门诊等科室就诊量较大,可借鉴急诊医学专业模式,即急诊医生经过临床专业培训,可以接诊各专科的急危重症病

人^[7]。合理的护理人员配置是做好疫情防控工作的重要前提^[8]。援鄂期间,医院重症医学科等科室派出支援一线的医护人员较多,造成科室护士短缺,为缓解科室人力资源不足,及时协调相关科室人员支援,保证科室工作正常运行。精准测算恢复正常收治病人后各护理单元人力资源情况,并做好应急预案。

1.3 全方位多层次培训,增强防护意识

1.3.1 多措并举,开展基于岗位特点的分类培训

以疫情防控为目标导向,制定人力资源基础培训和差异化培训方案,切实提高培训质量。编写新冠肺炎防控应知应会学习材料供全员进行基础培训,内容涵盖组织架构、工作流程、人员排查、院感防控等,明确医院疫情防控工作要求与路径。根据岗位职责,医院人员进行差异化培训:针对管理人员,重点培训传染病防治法等法律法规、技术指南及各项管理制度等^[9];针对医务人员,重点讲解开展职业防护、清洁消毒、疑似患者处置和接诊就诊等;针对后勤保障、外协服务等人员,重点讲解清洁消毒、医疗废物和织物管理等;针对核酸检测实验室人员,进行专门的院感防控、生物安全防护培训,其中生物安全防护措施尤其关键^[10];针对医疗废物转运人员,培训疑似新冠肺炎患者医疗废物处置流程;对呼吸科等重点科室和重点人群开展专项培训,及时掌握新冠肺炎的防控知识和技能。未来应重点加强对呼吸科、发热门诊、传染病科等之外科室人员的院内感染防护培训^[11]。

1.3.2 分级培训,培训内容及时更新

为把好疫情防控的第一道关口,医院对医院感染专职人员(科主任、院感医生、院感护士)首先进行新冠病毒肺炎防控知识小班培训。行政后勤部门和临床医技科室以本部门、科室为单位,采取分组式、分批次集中学习和自主学习。培训后,对全员进行线上考核,做到全员知晓、全员执行。随着新型冠状病毒肺炎诊疗方案版本的更新,指挥部办公室与时俱进,及时组织专家和成员培训学习,并再要求各部门、科室自学。为减少人员聚集,医院将培训内容制作成短视频、口诀、幻灯片、指南、流程图等形式发布在医院内网,通过微信公众号、短信平台、官网发布手卫生、防护用品选择等防护知识。通过线上线下相结合形式,在全院范围内组织培训上百场,累计培训达 10 万人次。通过全覆盖、高频率、抓重点的培训,医院各级各类人员有效掌

握疫情防控相关知识和技能,并能有效运用于各自岗位,为医院筑牢疫情防控战线打下坚实基础。

1.3.3 统筹加强前方医疗队和后方预备队防护知识培训

SARS 期间,病房护理人员的心理压力主要来自对特殊工作环境的不熟悉、特殊防护的不适和不便、与家人长期分离、对因密切接触而被感染的恐惧、长期面对重症患者等的焦虑、恐惧等^[12]。针对援鄂医护人员穿着防护装备后出现不适的问题,整理应对方法并推送给前方人员,并将其纳入援鄂预备队员培训内容。援鄂医疗队在正式进驻病区救治病人前,对所有护理人员进行多轮系统化护理岗前培训,确保真正掌握新冠肺炎临床护理的要点。可以为医疗队配备一名精神心理科医师^[13],建立“医护人员身体不适上报就医流程”^[14],帮助开展医护人员的心理危机干预,减轻疫情所致的心理伤害。

医院积极组建援鄂医疗预备队,围绕重症新冠肺炎诊治要点、防护用品穿脱、院感防控知识、消毒剂正确使用、心理危机干预方法和入住酒店时注意事项等内容,分批进行集中专题培训。医疗队驻地的感染防控既是避免交叉感染的重要措施之一,也是确保医疗队队员平安凯旋的重要保障^[15]。另外,护理部分批次组织护理预备队员在重症医学科进行为期一周的临床实践技能培训,在带教老师指导下,学习呼吸机使用、高流量吸氧机的使用、气道管理等重症患者监护及相关设备操作使用,同时学习援鄂人员的工作经验和建议。研究表明增加医护人员模拟训练考核有助于其尽快掌握防护用品使用技能,降低感染风险^[16]。根据前线医疗队工作情况及时更新培训内容,总结出一套实用有效的新冠肺炎防控和诊治经验,形成疫情防控整体方案、援鄂医疗队医护工作手册等资料,分享交流后在省内产生一定影响力。

1.3.4 加强个人防护,避免交叉感染

医务人员按照标准预防和额外预防的原则,正确选择和使用防护用品。世界卫生组织建议所有医护人员在治疗、护理 COVID-19 疑似和确诊患者时应始终采取标准预防措施,同时还要采取接触预防和飞沫预防措施^[17]。根据工作场所和工作内容不同,采取不同的分级防护措施^[18]。发布不同岗位医务人员个人防护用品选用和穿戴顺序图表,医用外科口罩、医用防护口罩、护目镜和防护面屏使用

范围,制定全院人员上下班途中、入室办公、参加会议和急诊科、感染性疾病科、医技科室及普通病区医务人员院感防护措施,隔离区防护用品穿脱流程。医院定期现场督导医务人员个人防护用品配备和使用情况,全面落实防护用品管理规定。

1.4 全方位做好后勤保障工作,提供充足的社会支持

1.4.1 关心援鄂医护人员,加强心理疏导和物资保障

援鄂医疗队救治任务繁重,使得护理人员往往存在焦虑、恐惧等心理应激反应^[19],尤其是已生育的、非感染专业的心理压力更大^[20]。同时长期穿戴防护服等用品,出现器械相关压力性损伤^[21]。高度重视援鄂人员心理健康,重点关注女性和缺乏应急救援经历的护理人员^[22],要求护士长每日与前线护士保持沟通;护理心理学术组成员建立了心理咨询热线,与前线及时对接。多方筹措防控物资,严格落实防护物资统一调配,重点保障前线医疗队需求。

1.4.2 建立后勤保障机制,解除后顾之忧

为使前线医护人员安心投入工作,解除后顾之忧,坚持“动作快、方法准、多层次、多维度”总方针,建立健全医疗队员家属“点对点、一对一”联络服务机制,从防护用品、生活用品、心理辅导、人文关怀等方面有针对性地做好援鄂家庭的后勤保障工作。自医疗队派出后,医院党委、工会和各基层组织第一时间视频连线慰问抗疫医疗队,通过走访慰问、电话联系、邮寄慰问品、发信函等方式,解决前线医疗队员家庭的困难,提供包括子女学习、送货上门、照顾老人、疾病咨询等全方位服务。积极落实发放援鄂医疗队员临时性工作补助等措施,加强先进人物和典型事迹的发掘宣传,营造尊医重卫的良好氛围^[23]。提前联系医院附近酒店,作为医疗队返回后休息隔离点使用。同时,多次慰问医院防控一线的发热门诊、门急诊预检分诊、行政部门支援临床一线等职工,加强人文关怀,保障全身心投入战“疫”。医院和社会的全力支持为抗疫医务人员解除后顾之忧,为圆满完成援鄂医疗救治任务、做好疫情防控和医疗服务工作提供有力保障。此外,医院在后勤保障工作方面多措并举,有效把好院感防控关,筑牢疫情防控堡垒。食堂把好职工及患者“入口关”,保障一日三餐供应,要求分散就餐,必要时取消堂食。提供营养膳食,增加平价干净蔬菜专区。高度重视医院卫生和病毒消杀工作^[24],每日对

全院范围进行消杀,发热门诊、食堂、电梯、各出入口门帘和空调进出风口等重点区域加强消杀频次,最大限度降低接触性传染的风险。

2 小结

疫情期间,医院以功能定位和卫生服务需求为导向,采取科学研判、提前谋划、全员参与、动态调整的人力资源应急管理措施,优化各类人力资源配置,激发人力资源潜能,建立实施全方位立体化联防联控体系,有效地应对新冠肺炎疫情,实现了院区“零感染”,保障了患者和医务人员安全;提前组建援鄂医疗预备队,第一时间派出医疗队奔赴一线,圆满完成援鄂医疗救治任务;动态调整调度人力资源,逐步恢复日常医疗服务,在省内医疗机构中率先实现“复工复产”。总之,疫情期间,医院采取人力资源应急管理策略,在属地防控、援鄂救治和医疗服务方面均取得良好效果。可以说,通过建立突发公共卫生事件应急时期的人力资源管理模式,对新冠肺炎防控工作顺利进行和有序开展医疗服务已经起到并将持续发挥重要作用。

目前国内国外防控形势依然复杂严峻,境外输入病例数量明显增加,医院疫情防控压力仍然较大,疫情防控的重点是防止周边及疫情风险区病例输入,同时做好院区感染防控工作,在此过程中,人力资源应急管理仍将发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 李舍予,黄文治,廖雪莲,等. 新型冠状病毒感染医院内防控的华西紧急推荐[J]. 中国循证医学杂志, 2020, 20(2): 125-133.
- [2] 伍冀湘,吕鹏,黄卫祖. 应急指挥系统在 SARS 定点医院中的实践[J]. 中华医院管理杂志, 2003, 19(10): 583-586.
- [3] 山东大学齐鲁医院新型冠状病毒肺炎防控工作组,韩辉,连雪洪,等. 山东大学齐鲁医院新型冠状病毒肺炎防控策略与实践[J]. 山东大学学报(医学版), 2020, 58(3): 8-18.
- [4] 辜玉刚,王莉. 基于“三圈层”管控模式的新型冠状病毒肺炎医院防控管理[J]. 中国医院管理, 2020, 40(3): 22-24.
- [5] 赵鹏,贾志龙,戴卫民. 应对新型冠状病毒肺炎医疗队的组队管理模式探讨[J]. 武警医学, 2020, 31(3): 261-262.
- [6] 赵路. 加强我国公共卫生管理的若干建议[J]. 中国科学院院刊, 2020, 35(2): 190-194.
- [7] 潘华明,黄翼,王媛媛. 急诊医学专业模式及其在应对新型冠状病毒肺炎疫情中的作用探讨[J]. 中国医院管理, 2020, 40(3): 50-52.

厉颖, 李灿委, 范孟然, 等. 微生物-肠-脑轴与酒精诱导脑损伤的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 124-129.
Li Y, Li CW, Fan MR, et al. Research progress of the microbiota-gut-brain axis and alcohol-induced brain injury [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 124-129.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 019

微生物-肠-脑轴与酒精诱导脑损伤的研究进展

厉颖¹, 李灿委², 范孟然¹, 尹爱武³, 刘卫红⁴, 高鹏飞^{1,5*}

(1.大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2.大理大学公共卫生学院, 云南 大理 671000; 3.湘潭医卫职业技术学院, 湖南 湘潭 411104; 4.大理大学 农学与生物科学学院, 云南 大理 671000; 5.云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000)

【摘要】 酒精可诱发大脑功能障碍, 肠道微生物可通过肠-脑轴介导酒精对脑损伤的影响。目前, 酒精通过微生物-肠-脑轴介导脑损伤的机制研究主要包括炎症、内毒素、色氨酸代谢等。探索酒精与微生物-肠-脑轴间的相互作用, 有助于深入了解酒精对脑部的影响, 为探索酒精诱导脑损伤的发病机制提供新思路。

【关键词】 酒精; 脑损伤; 微生物-肠-脑轴; 肠道微生物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0124-06

Research progress of the microbiota-gut-brain axis and alcohol-induced brain injury

LI Ying¹, LI Canwei², FAN Mengran¹, YIN Aiwu³, LIU Weihong⁴, GAO Pengfei^{1,5*}

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China. 2. College of Public Health, Dali University, Dali 671000. 3. Xiangtan Medicine and Health Vocational College, Xiangtan 411104. 4. Department of Agriculture and biological Science, Dali University, Dali 671000. 5. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali University, Dali 671000)

【Abstract】 Alcohol can induce brain dysfunction, and gut microbiota can mediate the effects of alcohol on brain injury through the gut-brain axis. At present, the mechanisms of alcohol-mediated brain injury through the microbiota-gut-brain axis mainly include inflammation, endotoxins and tryptophan metabolism. Exploring the interactions between alcohol and the microbiota-gut-brain axis will be helpful for understanding the effects of alcohol on the brain, and will provide a new way to explore the pathogenesis of alcohol-induced brain injury.

【Keywords】 alcohol; brain injury; microbiota-gut-brain axis; gut microbiota

酒精是一种精神活性物质, 具有多种行为和神经生物学效应, 过度饮酒不仅对大脑有直接影响, 还与外伤、癫痫和中风等风险的增加有关^[1]。研究发现, 低剂量的酒精也会导致运动控制、判断和反应时间受损^[2-3]。酒精暴露不仅破坏大脑的表观遗传和转录过程, 也损害神经再生, 诱发神经炎症, 例

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81260676, 81960712); 中国国家留学基金 (201708535007); 云南省教育厅科学研究基金重点项目 (2013Z154); 云南省 2019 年中药饮片产业发展专项资金 (2019-YG-067); 本科高校 (部分) 基础研究联合专项项目 (2018FH001-097)。

【作者简介】 厉颖 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 代谢组学、肠道菌群。E-mail: gaodaluan@126.com

【通信作者】 高鹏飞 (1971—), 男, 副教授, 研究方向: 代谢组学、肠道菌群。E-mail: liyingdali@163.com

如,酒精可调节小胶质细胞信号转导,诱导其增生、活化、产生促炎性细胞因子^[4-5]。肠道微生物、肠道和大脑三者间有着密切的信息交流,由此诞生微生物-肠-脑轴的概念^[6]。肠道微生物可通过肠-脑轴影响大脑的行为和功能^[7]。有报道称,酒精中毒与肠道微生物失调有关,肠道微生物代谢物,如胃肠激素、短链脂肪酸、神经活性化合物前体和神经递质等,均可影响生理和身体的正常功能^[8]。本文通过查阅中国知网、Pubmed 等数据库,总结近年来微生物-肠-脑轴在酒精诱导脑损伤中的研究进展,为相关研究提供参考。

1 微生物-肠-脑轴

人类肠道微生物群主要由细菌组成,其他包括古菌、真菌、寄生虫和病毒等,其中 90% 为厚壁菌门和拟杆菌门,另有放线菌门、变形菌门和疣微菌门等^[9-10]。微生物-肠-脑轴是肠道菌群与大脑之间的双向通讯通道,一方面,神经信号可影响肠道功能,改变肠道菌群的组成;另一方面,肠道微生物群可通过不同途径向大脑发出信号,包括免疫和迷走神经的激活、产生微生物代谢物、多肽、神经递质和神经调节剂^[11-12]。该轴的功能障碍可导致许多神经精神类疾病,如肠易激综合征、自闭症和帕金森病等^[13-15]。微生物群对自闭症、焦虑、抑郁、帕金森病和精神分裂症的影响已在临床前和临床工作中得到验证,成为各种脑部疾病的潜在诊断和治疗靶点^[16]。有研究表明,肠道微生物群组成的改变可能导致神经免疫过程和周围炎症^[17-18]。酒精暴露可增加肠道通透性,改变肠道微生物群的组成,使肠道内的微生物进入体循环,被血液中循环的免疫细胞或存在于靶器官的免疫细胞识别,合成促炎细胞因子。促炎细胞因子是肠脑交流的重要介质,可以到达中枢神经系统,诱发与情绪、认知和饮酒行为变化相关的神经炎症^[19]。

2 酒精对脑影响的肠道微生物特征

酒精摄入可使肠道微生物的组成和功能发生变化^[20]。有报道称,在酗酒者和慢性酒精暴露的小鼠模型中,促炎肠道微生物丰度增加,如变形杆菌;正常共生细菌丰度减少,如拟杆菌门^[21-22]。Xu 等^[23]研究了酒精摄入诱导肠道细菌的变化及其与神经心理行为的相关性,发现酒精摄入可使肠道菌群发生明显的变化,在门水平上放线菌和蓝藻菌增

加;在属水平上,安德克氏菌属(*Adlercreutzia* spp.)和苏黎世杆菌属(*Turicibacter* spp.)增加;进一步分析表明,*Adlercreutzia* spp.与酒精偏好呈正相关,与焦虑样行为和前额叶皮质中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)/ γ -氨基丁酸 A 受体 $\alpha 1$ (GABAA $\alpha 1$) 的变化呈负相关。BDNF 能促进运动神经元和多巴胺能神经元等的存活,增加神经递质的合成,改变细胞膜上离子通道活性,在学习记忆、认知功能和情绪障碍的调节中发挥重要作用^[24]。 γ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统重要的抑制性神经递质,通过与 GABAA $\alpha 1$ 受体结合,发挥突触后抑制作用^[25]。以上研究提示,慢性酒精暴露过程中的肠道菌群失调与酒精诱导的神经心理行为和脑部 BDNF/GABAA $\alpha 1$ 的表达密切相关。

Wang 等^[26]通过研究肠道微生物在酒精成瘾中的作用机制,发现酒精成瘾小鼠的肠道微生物多样性发生显著变化,厚壁菌门及其梭菌纲丰度升高,拟杆菌门降低;胆汁酸和次级胆汁酸水平均升高,厚壁菌门可产生次级胆汁酸,结果提示,肠道微生物组成的变化可能影响机体代谢,是酒精成瘾的作用机制之一;此外,强迫饮酒组小鼠的 5-羟色胺(5-HT)水平升高,90% 的 5-HT 由肠嗜铬细胞、肌肠神经元和粘膜肥大细胞在肠道中合成,是一种调节胃肠道和其他器官系统的脑神经递质^[27],提示肠道微生物的改变可能调控 5-HT 水平;本研究显示,积极饮酒组小鼠牛磺酸水平升高,强迫饮酒组牛磺酸水平降低,牛磺酸能改善某些神经病理形态,缺乏牛磺酸会减缓小脑、锥体细胞和视觉皮层的细胞分化和迁移^[28],这间接阐释了适度饮酒对大脑有积极的作用、过量饮酒对大脑有明显的负面影响^[29]。

Jadhav 等^[30]研究发现,在酒精成瘾大鼠模型中,肠道微生物的变化可影响脑纹状体多巴胺受体的表达;梭菌目、瘤胃菌科、毛螺菌科等细菌与酒精使用障碍严重程度呈正相关;毛螺菌科 UCG-006、嗜酸球菌、沙特尔沃思菌属、球菌属,以及噬糖厌氧产氢杆菌的丰度变化与多巴胺 2 受体 mRNA 的表达降低有关。有研究报道,瘤胃菌科、毛螺菌科和 α 多样性与酒精损伤的严重程度和肠道通透性改变相关^[31]。以上研究提示,肠道菌群的组成变化与酒精成瘾大脑回路中的神经密切相关。此外, Peterson 等^[32]研究乙醇蒸汽对小鼠肠道微生物群的影响,发现另枝菌属显著增加,梭菌属 IV 和 XIVb、多尔氏菌属、粪球菌属明显降低。

3 酒精通过微生物-肠-脑轴对脑损伤影响的机制研究进展

3.1 免疫

越来越多的证据显示,免疫系统对大脑的发育和功能有重要影响,神经免疫反应的改变可能导致神经病理变化^[33]。据报道,神经免疫系统的激活参与酒精诱导的脑损伤过程,肠道微生物在这一过程中发挥着关键作用,其与大脑之间交流的中断或改变可能是许多精神障碍的重要因素^[34-35]。炎症反应是人体免疫系统中保护机体的重要防线,肠道微生物代谢物内毒素(LPS)可激活巨噬细胞、单核细胞、白细胞等,释放肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、血小板活化因子等促炎性介质,产生炎症级联反应^[36]。肠道微生物及其代谢物的改变可诱发炎症反应,并促进 LPS 向体循环的转移,加强脑部炎症的发展进程。

3.1.1 炎症

酒精诱导的神经炎症在酒精依赖、抑郁症和其他精神疾病的病理生理学中发挥重要作用^[37]。酒精成瘾或戒断可能会导致肠道保护性菌落减少或致病性菌落增加,进而诱导炎症信号和细胞因子释放的改变,促使迷走神经收缩或改变其神经保护传入信号^[20]。Lowe 等^[38]发现,酒精的摄入改变了肠道微生物的组成,增加了肠道通透性,促进微生物成分进入体循环,诱发神经炎症和小肠促炎细胞因子的表达;口服抗生素通过减少肠道细菌负荷,降低肠道和脑部炎症小体的表达,保护机体免受酒精引起的神经炎症反应。Jiang 等^[39]研究发现,酒精可诱导肠道菌群多样性和结构的变化,其影响机制包括小胶质细胞的激活、炎性细胞因子释放、BDNF 蛋白表达抑制和 AKT/GSK3 β / β -catenin 信号通路的调控等。Monnig 等^[40]发现,在艾滋病和慢性酗酒的情况下,肠-脑轴的促炎紊乱可能导致神经认知障碍,减少饮酒对降低炎症相关认知障碍和死亡率至关重要。

3.1.2 内毒素

正常情况下活菌和细菌衍生的代谢物不会进入血液,酒精的摄入可破坏肠屏障的完整性,使肠道细菌及细菌产物进入血液,如 LPS,其是 toll 样受体 4(TLR4)的配体,TLR4 是单核细胞和巨噬细胞上表达的先天免疫受体,LPS 与 TLR4 受体复合物结合,可激活单核细胞,产生促炎细胞因子和趋化因子^[41-42]。LPS 通过 TLR4 依赖机制调控脑内免疫功能、髓鞘和突触形成的基因表达^[38-43]。酒精的摄入增加了 LPS 从胃肠道到血液的转移,进

而引发小胶质细胞的免疫激活导致神经退行性变^[44]。小胶质细胞是中枢神经系统内固有的免疫效应细胞,在中枢神经系统的生理过程中发挥着重要作用^[45]。此外,Shukla 等^[46]发现酒精诱导 LPS 从母体肠道的吸收,参与了胎儿脑内基因表达的变化,可能涉及自闭症基因的表达改变。研究发现,妊娠期间外源性 LPS 给药会导致子辈发生类似自闭症的行为,而且在自闭症患者中,血清 LPS 水平显著升高^[47-48]。

3.2 色氨酸代谢

肠道微生物可通过多种机制调节色氨酸代谢通路,色氨酸是一种必须氨基酸,经肠胃吸收后进入大脑,代谢产生神经活性化合物,如犬尿酸和喹啉酸,前者可阻断 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的甘氨酸位点,后者可刺激 NMDA 受体^[49]。肠道微生物对色氨酸代谢的调节主要通过犬尿酸途径,其是色氨酸代谢的主要途径,占色氨酸代谢的 95%,色氨酸代谢参与肠-脑轴的调控,肠道菌群可通过直接和间接机制介导色氨酸对犬尿酸途径的调控^[50]。Giménez-Gómez 等^[51]研究发现肠道微生物参与了酒精引起脑部色氨酸代谢的改变,在吡哆胺 2,3-双加氧酶(IDO)和色氨酸 2,3-双加氧酶(TDO)的作用下,色氨酸转化为犬尿酸,这两种酶在大脑中均表现出较低的基础活性,长期过量饮酒导致免疫系统激活,产生神经炎症反应,诱导 IDO 的活性,导致大脑犬尿酸水平的增加。有研究报道,外源性注射犬尿酸及其代谢物犬尿酸,可减少啮齿动物的酒精消耗^[52]。

3.3 其他

有研究报道,从慢性不可预测的应激小鼠到无菌小鼠的粪便微生物移植会导致受体小鼠出现类似抑郁的行为^[53-54]。Zhao 等^[55]将酒精中毒患者的粪便菌群移植到健康小鼠体内,发现接受酒精中毒患者粪便微生物群的小鼠表现出类似焦虑和抑郁的行为,有自发的酒精偏好,而且内侧前额叶皮质中 BDNF、GABAA α 1 亚基减少,伏隔核中代谢型谷氨酸受体 1、蛋白激酶 C 减少。提示肠道菌群可能对酒精偏好有重要影响。Xiao 等^[56]采用慢性酒精中毒和戒断小鼠模型,研究酒精戒断引起的焦虑和行为变化,并将酒精喂养小鼠的肠道微生物移植到正常小鼠中,发现酒精戒断可引发焦虑行为迹象。进一步研究显示,酒精暴露供体的肠道微生物移植会影响 BDNF、促肾上腺皮质激素释放激素 I 型受体和 μ 阿片受体编码基因的表达变化,可能导致酒精戒断引发的焦虑。

4 益生菌介导酒精对脑部的影响

益生菌是一种对宿主有益的活性微生物,主要有酵母菌、益生芽孢菌、丁酸梭菌、乳杆菌、双歧杆菌、放线菌等,摄入益生菌可改善肠道菌群的组成和功能,提高机体免疫力^[57-58]。有研究报道,益生菌在治疗神经紊乱方面有一定的效果,如乳酸菌和双歧杆菌等益生菌可降低海马区 GABAA 受体的表达^[59],增加 NMDA 受体的表达^[60],并将 GABA 转化为谷氨酸^[61],具有潜在的改善焦虑、抑郁的作用。Hadidi Zavareh 等^[62]研究发现,益生菌摄入对酒精暴露动物的行为和电生理方面有不同的影响,可以改善酒精暴露大鼠的记忆。

5 研究与展望

肠道微生物可通过炎症、内毒素以及色氨酸代谢等途径影响酒精诱导脑损伤的发展。基于“微生物-肠-脑轴”理论,加强酒精诱导脑损伤的机制研究,是今后相关研究的重要方向之一。

但肠道微生物种类繁多,从众多差异微生物中筛选出与酒精诱导脑损伤的关键菌株仍面临众多挑战;其次,微生物的组成和功能易受遗传、饮食、年龄、性别和疾病等因素的影响;而且,以动物为研究对象的实验结果对人类的适用性有待探讨;此外,“微生物-肠-脑轴”是肠道菌群通过大脑调控人体机能的主要方式,但有研究显示,肠道微生物也可以通过肠道的相关神经元,独立于中枢神经对人体机能进行调控,提示其作用方式的多样性^[63]。

今后应加强对肠道菌群分类及功能分析的研究,强化对关键细菌及其代谢产物的深入分析,使其更高效的用于酒精相关脑病的机制研究;其次,应注意建立统一的实验标准,降低相关影响因素对肠道微生物特征的影响。例如, Dubinkina 等^[64]通过研究酒精依赖患者肠道微生物群组成与酒精依赖综合征和酒精性肝病的关系,并对肠道菌群的分类和功能组成进行多因素分析,发现酒精依赖和肝功能障碍两个主要临床因素,对酒精依赖患者肠道微生物群落及功能有不同的影响;此外,应加强微生物-肠-脑轴研究从实验到临床的转化。

参考文献:

[1] Loheswaran G, Barr MS, Rajji TK, et al. Brain stimulation in alcohol use disorders: investigational and therapeutic tools [J]. Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging, 2016, 1(1): 5-13.

[2] Boschen KE, Klintsova AY. Neurotrophins in the brain: interaction with alcohol exposure during development [J]. Vitam Horm, 2017, 104: 197-242.

[3] Zahr NM, Pfefferbaum A. Alcohol's effects on the brain: neuroimaging results in humans and animal models [J]. Alcohol Res, 2017, 38(2): 183-206.

[4] 李锦程, 赵海苹, 罗玉敏. 小胶质细胞在酒精性脑损伤中的作用 [J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(3): 320-323.

[5] Mews P, Egervari G, Nativio R, et al. Alcohol metabolism contributes to brain histone acetylation [J]. Nature, 2019, 574(7780): 717-721.

[6] Leclercq S, Stärkel P, Delzenne NM, et al. The gut microbiota: a new target in the management of alcohol dependence? [J]. Alcohol, 2019, 74: 105-111.

[7] Temko JE, Bouhlal S, Farokhnia M, et al. The microbiota, the gut and the brain in eating and alcohol use disorders: a 'ménage à trois' [J]. Alcohol Alcohol, 2017, 52(4): 403-413.

[8] Qamar N, Castano D, Patt C, et al. Meta-analysis of alcohol induced gut dysbiosis and the resulting behavioral impact [J]. Behav Brain Res, 2019, 376: 112196.

[9] 余强, 刘月环, 王志远, 等. 高通量测序法研究不同 pH 的饮用水对 SPF 小鼠肠道微生物的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 40-47.

[10] Iannone LF, Preda A, Blottière HM, et al. Microbiota-gut brain axis involvement in neuropsychiatric disorders [J]. Expert Rev Neurother, 2019, 19(10): 1037-1050.

[11] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders [J]. Cell, 2013, 155(7): 1451-1463.

[12] Sherwin E, Bordenstein SR, Quinn JL, et al. Microbiota and the social brain [J]. Science, 2019, 366(6465): eaar2016.

[13] Stern EK, Brenner DM. Gut microbiota-based therapies for irritable bowel syndrome [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2018, 9(2): e134.

[14] Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, et al. Gut microbiota in autism and mood disorders [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1): 361-368.

[15] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease [J]. Cell, 2016, 167(6): 1469-1480.

[16] Burokas A, Moloney RD, Dinan TG, et al. Microbiota regulation of the mammalian gut-brain axis [J]. Adv Appl Microbiol, 2015, 91: 1-62.

[17] Crews FT, Lawrimore CJ, Walter TJ, et al. The role of neuroimmune signaling in alcoholism [J]. Neuropharmacology, 2017, 122: 56-73.

[18] Crews FT, Walter TJ, Coleman LG, et al. Toll-like receptor signaling and stages of addiction [J]. Psychopharmacology (Berl), 2017, 234(9-10): 1483-1498.

[19] Leclercq S, de Timary P, Delzenne NM, et al. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence [J]. Transl Psychiatry, 2017, 7(2): e1048.

- [20] Gorky J, Schwaber J. The role of the gut-brain axis in alcohol use disorders [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, 65: 234–241.
- [21] Bull-Ottersson L, Feng W, Kirpich I, et al. Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of lactobacillus rhamnosus GG treatment [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53028.
- [22] Malaguarnera G, Giordano M, Nunnari G, et al. Gut microbiota in alcoholic liver disease: pathogenetic role and therapeutic perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(44): 16639–16648.
- [23] Xu Z, Wang C, Dong X, et al. Chronic alcohol exposure induced gut microbiota dysbiosis and its correlations with neuropsychic behaviors and brain BDNF/Gabra1 changes in mice [J]. *Biofactors*, 2019, 45(2): 187–199.
- [24] Björkholm C, Monteggia LM. BDNF—a key transducer of antidepressant effects [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 102: 72–79.
- [25] 杜孙兵, 杨文秋, 吴倩, 等. 钠钾 ATP 酶活性与癫痫发作的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 108–113.
- [26] Wang G, Liu Q, Guo L, et al. Gut microbiota and relevant metabolites analysis in alcohol dependent mice [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1874.
- [27] Côté F, Fligny C, Bayard E, et al. From the cover: maternal serotonin is crucial for murine embryonic development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(1): 329–334.
- [28] Maar T, Morán J, Schousboe A, et al. Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration [J]. *Int J Dev Neurosci*, 1995, 13(5): 491–502.
- [29] Cheng Y, Liu X, Ma X, et al. Alcohol promotes waste clearance in the CNS via brain vascular reactivity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 143: 115–126.
- [30] Jadhav KS, Peterson VL, Halfon O, et al. Gut microbiome correlates with altered striatal dopamine receptor expression in a model of compulsive alcohol seeking [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 141: 249–259.
- [31] Llopis M, Cassard AM, Wrzosek L, et al. Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease [J]. *Gut*, 2016, 65(5): 830–839.
- [32] Peterson VL, Jury NJ, Cabrera-Rubio R, et al. Drunk bugs: chronic vapour alcohol exposure induces marked changes in the gut microbiome in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 323: 172–176.
- [33] Depino AM. Perinatal inflammation and adult psychopathology: from preclinical models to humans [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 77: 104–114.
- [34] Montesinos J, Alfonso-Loeches S, Guerri C. Impact of the innate immune response in the actions of ethanol on the central nervous system [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2016, 40(11): 2260–2270.
- [35] Crews FT, Sarkar DK, Qin L, et al. Neuroimmune function and the consequences of alcohol exposure [J]. *Alcohol Res*, 2015, 37(2): 331–351.
- [36] 郭玉倩, 陆姜利, 角建林, 等. D-半乳糖增加树鼩肠道 IL-18 的表达及肠道菌群失调 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(3): 50–55.
- [37] Hillemecher T, Bachmann O, Kahl KG, et al. Alcohol, microbiome, and their effect on psychiatric disorders [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 85: 105–115.
- [38] Lowe PP, Gyongyosi B, Satishchandran A, et al. Reduced gut microbiome protects from alcohol-induced neuroinflammation and alters intestinal and brain inflammasome expression [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 298.
- [39] Jiang Y, Liu Y, Gao M, et al. Nicotinamide riboside alleviates alcohol-induced depression-like behaviours in C57BL/6J mice by altering the intestinal microbiota associated with microglial activation and BDNF expression [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 378–391.
- [40] Monnig MA, Kahler CW, Cioe PA, et al. Markers of microbial translocation and immune activation predict cognitive processing speed in heavy-drinking men living with HIV [J]. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 64.
- [41] Iyer N, Vaishnav S. Alcohol lowers your (intestinal) inhibitions [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(2): 131–133.
- [42] Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes [J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45(12): e66.
- [43] Pascual M, Montesinos J, Montagud-Romero S, et al. TLR4 response mediates ethanol-induced neurodevelopment alterations in a model of fetal alcohol spectrum disorders [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 145.
- [44] de Timary P, Stärkel P, Delzenne NM, et al. A role for the peripheral immune system in the development of alcohol use disorders [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 122: 148–160.
- [45] Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 619–643.
- [46] Shukla PK, Meena AS, Rao R, et al. Deletion of TLR4 attenuates fetal alcohol exposure-induced gene expression and social interaction deficits [J]. *Alcohol*, 2018, 73: 73–78.
- [47] Kirsten TB, Queiroz-Hazarbassanov N, Bernardi MM, et al. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure [J]. *Life Sci*, 2015, 130: 12–17.
- [48] Emanuele E, Orsi P, Boso M, et al. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 471(3): 162–165.
- [49] Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, et al. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis [J]. *Nutrients*, 2016, 8(1): 56.
- [50] Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, et al. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112: 399–412.
- [51] Giménez-Gómez P, Pérez-Hernández M, O’Shea E, et al. Changes in brain kynurenine levels via gut microbiota and gut - barrier disruption induced by chronic ethanol exposure in mice [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12900–12914.
- [52] Gimenez-Gómez P, Pérez-Hernández M, Gutiérrez-López MD, et al. Increasing kynurenine brain levels reduces ethanol

- consumption in mice by inhibiting dopamine release in nucleus accumbens [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135: 581–591.
- [53] Li N, Wang Q, Wang Y, et al. Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis [J]. *Stress*, 2019, 22 (5): 592–602.
- [54] 叶飞, 郑鹏, 谢鹏. 抑郁症肠道微生物组紊乱假说的现状与展望 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 654–657.
- [55] Zhao WB, Hu Y, Li CG, et al. Transplantation of fecal microbiota from patients with alcoholism induces anxiety/depression behaviors and decreases brain mGluR1/PKC ϵ levels in mouse [J]. *Biofactors*, 2020, 46(1): 38–54.
- [56] Xiao HW, Ge C, Feng GX, et al. Gut microbiota modulates alcohol withdrawal-induced anxiety in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 287: 23–30.
- [57] 吕建敏, 刘月环. 乳清粉对断奶实验兔肠道微生物区系和益生菌的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(8): 12–17.
- [58] 林惠武, 林燕琼, 林志辉. 双歧杆菌对慢性酒精性肝损伤大鼠肝功能保护作用的探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(6): 760–765.
- [59] Davis D J, Doerr HM, Grzelak AK, et al. *Lactobacillus plantarum* attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33726.
- [60] Maqsood R, Stone TW. The gut-brain axis, BDNF, NMDA and CNS disorders [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41 (11): 2819–2835.
- [61] Soeiro-de-Souza MG, Henning A, Machado-Vieira R, et al. Anterior cingulate glutamate-glutamine cycle metabolites are altered in euthymic bipolar I disorder [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(12): 2221–2229.
- [62] Hadidi Zavareh AH, Haji Khani R, Pakpour B, et al. Probiotic treatment differentially affects the behavioral and electrophysiological aspects in ethanol exposed animals [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(6): 776–780.
- [63] Muller PA, Matheis F, Schneeberger M, et al. Microbiota-modulated CART⁺ enteric neurons autonomously regulate blood glucose [J]. *Science*, 2020, 370(6514): 314–321.
- [64] Dubinkina VB, Tyakht AV, Odintsova VY, et al. Links of gut microbiota composition with alcohol dependence syndrome and alcoholic liver disease [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 141.

[收稿日期]2020-11-06

(上接第 123 页)

- [8] 刘静, 陆小英, 张玲, 等. 新冠肺炎疫情应急响应医院护理管理体系的建立和运行 [J]. *解放军护理杂志*, 2020, 37(2): 4–7.
- [9] 陈竹, 庄英杰, 李进, 等. 新型冠状病毒肺炎患者定点收治医院的医疗管理 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(6): 821–825.
- [10] 钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验 [J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(5): 523–526.
- [11] 中华预防医学会新型冠状病毒肺炎防控专家组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征的最新认识 [J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(2): 139–144.
- [12] 柴洁. 减缓 SARS 病房护士心理压力的对策 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2003, 35(S1): 156.
- [13] 郑小燕, 郑丽花, 杨璇, 等. 组建援鄂医疗队护理人员配置与工作模式的探讨 [J]. *广东医学*, 2020, 41(4): 329–331.
- [14] 刘俊雅, 胡露红, 黄丽红, 等. 新冠肺炎危重症患者收治医院护理人力资源应急管理策略 [J]. *中国医院管理*, 2020, 40(3): 37–38, 52.
- [15] 朱仕超, 乔甫, 罗凤鸣, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间四川大学华西医院援鄂医疗队驻地感染防控推荐 [J]. *华西医学*, 2020, 35(3): 255–260.
- [16] 南玲, 陈萍, 刘莎, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间个人防护用品穿脱技能培训学习曲线分析 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(3): 271–273.
- [17] 谭彩霞, 吴安华. WHO 关于新型冠状病毒 (2019-nCoV) 感染预防与控制十问十答 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(3): 286–287.
- [18] 山东大学齐鲁医院新型冠状病毒肺炎诊治专家组. 新型冠状病毒肺炎疑似病例诊断及管理专家共识·齐鲁医院标准 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(3): 1–7.
- [19] 马翠, 严兴科. 新型冠状病毒肺炎疫情的心理应激反应和防控策略研究进展 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2020, 46(3): 649–654.
- [20] 邓蓉, 陈芳, 刘珊珊, 等. 新型冠状病毒肺炎隔离病房医护人员心理压力的影响因素 [J]. *中国感染控制杂志*, 2020, 19(3): 256–261.
- [21] 黄文, 周晓丹, 王健, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间医护人员器械相关压力性损伤的防范策略 [J]. *温州医科大学学报*, 2020, 50(3): 195–198.
- [22] 张源慧, 唐龙, 蒋倩, 等. 紧急异地救援抗击新型冠状病毒肺炎的护士早期心理困扰调查 [J]. *护理学杂志*, 2020, 35(5): 5–8.
- [23] 姚宏武, 索继江, 杜明梅, 等. 新型冠状病毒肺炎流行期间医院感染防控难点与对策 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(6): 806–810.
- [24] 张龙浩, 李柏宏, 贾鹏, 等. 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 全球研究现状分析 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2020, 37(2): 236–245.

[收稿日期]2021-01-29

李裕珍, 冯丽娟, 潘益巧, 等. 骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 130-135.
Li YZ, Feng LJ, Pan YQ, et al. Recent progress in the induction of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 130-135.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 020

骨髓间充质干细胞诱导分化为肝细胞的研究进展

李裕珍¹, 冯丽娟¹, 潘益巧¹, 阮博文¹, 周晓玲^{2*}

(1.广西中医药大学, 南宁 53000; 2.广西中医药大学第三附属医院, 广西 柳州 545000)

【摘要】 骨髓间充质干细胞(BMSCs)是骨髓内的非造血干细胞,具有多向分化、低免疫源性等优势。肝移植是目前终末期肝病的有效治疗方法,但因肝源短缺及免疫排斥等缺陷,其临床运用严重受限。BMSCs经过不同的诱导方法可以在体外分化为肝细胞,应用于晚期肝病的治疗,是目前治疗肝损伤的一种新兴治疗手段。本文主要将近年来BMSCs的分离培养及鉴定方案、诱导BMSCs向肝细胞分化的常用方法及分化机制进行综述,以期在今后临床运用BMSCs治疗终末期肝病提供更加充分的理论依据。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;诱导分化;肝细胞;终末期肝病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0130-06

Recent progress in the induction of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes

LI Yuzhen¹, FENG Lijuan¹, PAN Yiqiao¹, RUAN Bowen¹, ZHOU Xiaoling^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 53000, China.

2. the Third Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Liuzhou 545000)

【Abstract】 Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are non-hematopoietic stem cells in the bone marrow that have the advantages of multidirectional differentiation and low immunogenicity. Although liver transplantation is an effective treatment for end-stage liver disease, its clinical application is severely limited by the shortage of donor liver sources and rate of immune rejection. The differentiation of BMSCs into hepatocytes in vitro using different induction method is applied in the treatment of advanced liver disease, and represents a new treatment method for liver injury. This article summarizes the isolation culture, and the common method and mechanisms for inducing BMSC differentiation into hepatocytes that have been described in the literature in recent years. A clear understanding of these processes will provide a strong theoretical basis for future clinical applications of BMSCs in the treatment of end-stage liver disease.

【Keywords】 bone marrow mesenchymal stem cells; induced differentiation; hepatocytes; end-stage liver disease

骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)是属于中胚层的一类多能干细胞,存在于骨髓中的基质干细胞,为最早发现的多向分化潜能干细胞,具有自我增殖、多向分化、免疫调节、促进造血及修复损伤器官的作用^[1-2],且在不同诱导条件下可以向肝细胞、心肌细胞、神经细胞、成骨细胞等分化^[3-4]。由于BMSCs多向分化功能,且容易获

取、体外增殖快、传代基因稳定性良好、移植免疫排斥少等优点使其成为近年诱导分化研究的热点^[5]。大量动物研究表明,通过细胞移植技术将BMSCs移植进入受损肝中,对损伤的肝具有一定的修复作用,其主要是通过不同的诱导条件使BMSCs定向分化为有功能的肝细胞^[6-7];临床研究也发现,自体移植BMSCs可以改善肝病患者各项生化指标,减少晚

【基金项目】 国家自然科学基金(81760855);柳州市应用技术与开放计划项目(2018AF10503);广西中医药大学校级一般硕士研究生科研创新项目(YCSY2020057)。
【作者简介】 李裕珍(1993—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病。E-mail: 1058537615@qq.com
【通信作者】 周晓玲(1977—),女,主任医师,博士,研究方向:中医药防治肝病。E-mail: zxl_lz@163.com

期肝病患者不良反应,有效提高其生活质量^[8-9]。然而,对于 BMSCs 的常用分离培养和鉴定方法,以及其向肝细胞分化的诱导方法及分化机制尚缺乏系统整理及总结。因此本文主要对此进行综述,为更好发挥 BMSCs 在肝损伤性疾病治疗中的应用提供思路。

1 BMSCs 的常用分离培养和鉴定方法

1.1 BMSCs 的常用分离培养方法

目前常用的 BMSCs 分离培养方法有全骨髓贴壁分离培养法、骨组织消化分离法、离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠分选法等^[10-12],其中后两者因操作复杂、分离成本高且分离后细胞转化效果差等使其运用受限,目前大多数研究中使用的是操作更为方便且获得细胞数量较多、增殖能力较强的全骨髓贴壁分离法和密度梯度离心法^[13],但因其分离纯度欠佳,因此有学者在全骨髓贴壁分离法基础上进行创新优化,其中徐丽娟等^[14]创新性地使用小鼠 3 d 乳鼠骨片法,将乳鼠骨片直接进行培养,当梭形细胞在骨片周围密度大于 50% 时,按比例进行三次传代,此法获得了纯度较高的 BMSCs;向俊西等^[15]则在接种一定时间后将接种不满意的细胞进行重新接种,并按 12、24 h 更换一次培养液,经优化后的诱导方法更简便、快捷地获得了满意的大鼠 BMSCs;两者改良后的培养方法最后均可得到纯度较高的 BMSCs,有效解决因细胞分离纯度不佳影响实验结果的问题,更有利于实验的研究。

1.2 BMSCs 常用鉴定方法

在 BMSCs 鉴定方面,文献多报道 BMSCs 在形态上表现为纤维状或长梭形^[16-17],未发现其特异性的表面标志物,但因其不表达造血干细胞表面标志物,故常用阴性和阳性选择相结合的方法进行鉴定。现认为成熟且合格的 BMSCs 多表达阳性或强阳性的 CD29、CD90、CD73、CD105、CD49,不表达或弱表达 CD11、CD31、CD34、CD44、CD45 等^[18-20]。

2 BMSCs 诱导向肝细胞分化的常用方法

BMSCs 具有多向分化性,但其向肝细胞分化需要严格的分化条件及多种细胞因子的参与,因此如何提高及保证 BMSCs 向肝细胞分化的有效率并将其应用于临床治疗是目前研究的重点和难点。研究发现通过相应的物质诱导,如中药含药血清、细胞因子、模拟肝样微环境或其他物理干预等诱导的

方式,可促使 BMSCs 不同程度地向肝细胞分化。

2.1 中药含药血清诱导

目前中药被广泛应用于肝病的临床治疗中,特别是对于中晚期肝病,中药有明显改善患者临床症状且毒副作用小、不良反应少等特点,为中药方剂联合 BMSCs 移植治疗终末期肝病提供新思路,但由于中药复方成分多样且复杂,作用靶点广泛,同时也限制了对其机制的研究。因此探索利用中药含药血清促使 BMSCs 向肝细胞分化也是现今热点。

活血化瘀类中药复方是治疗气滞血瘀型肝硬化的经典方剂。研究表明鳖甲煎丸含药血清对 BMSCs 向肝细胞转化有促进作用,且有改善肝纤维化及调节免疫等作用,肯定了中药对 BMSCs 诱导分化的作用,但具体的作用机制尚未明确^[21]。韩海啸等^[22]研究发现,调肝益气通络汤药物血清不仅可以有效诱导 BMSCs 定向分化为肝细胞,且对 BMSCs 具有增殖作用,并随着药物浓度的增加及培养时间的延长,细胞数量就不断增多。另外,基于“肾主骨髓”理论,Zhou 等^[23]通过评估不同干预办法移植 BMSCs 治疗肝硬化大鼠的疗效,选用 BMSCs 联合中药济生肾气汤(JSSQ 组)进行干预,结果证实了中药济生肾气汤联合 BMSCs 移植对改善肝硬化大鼠的治疗作用,其机制可能 JSSQ 具有滋补肝肾,促进骨髓再生的功能,其在体内发挥了类似于细胞归巢诱导剂的作用,促进了 BMSCs 的诱导分化及迁移,从而参与肝细胞的再生修复。瘀血阻络、肝肾阴虚型均是终末期肝病患者的主要证型之一^[24],在诱导 BMSCs 向肝细胞分化过程中,多数学者^[21-22]以活血化瘀、调肝通络功效的方药为主,诱导分化结果良好,而部分学者^[23,25]以补肾生髓、滋阴养血法也明显改善大鼠肝纤维化程度,详见表 1。因此活血化瘀法中药血清诱导是否适应于所有终末期肝病尚待进一步研究,针对不同证型的肝病所采用中药含药血清的可进行不断地探索。

2.2 细胞因子诱导

细胞因子是一类由免疫细胞和某些非免疫细胞经刺激而合成、分泌的具有广泛生物活性的小分子蛋白质,现多被应用于诱导 BMSCs 向肝细胞分化。潘兴南等^[26]研究发现肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)体外诱导 BMSCs 向肝细胞分化以质量浓度 $\geq 20 \mu\text{g/L}$ 且诱导时间 $\geq 6 \text{ h/d}$ 为宜,诱导效果与 HGF 浓度及每日诱导时间呈正相关性。Putra 等^[27]发现在血管内皮生长因子

表 1 常用中药含药血清分类及代表

Table 1 Classification and representation of commonly used Chinese medicine sera containing drugs				
类别 Category	作者 Author	活血化瘀类 Invigorate the circulation of blood		补肾生髓类 Nourishing kidney to produce marrow
		温智稀 ^[21] Wen Zhixi	韩海啸 ^[22] Han Haixiao	周晓玲 ^[23] Zhou Xiaoling
				平键 ^[25] Ping jian
题目 Title	鳖甲煎丸含药血清诱导大鼠骨髓间充质干细胞转化为肝细胞的实验研究 Research on the transformation of hepatocyte from bone marrow mesenchymal stem cells by biejiajianwan (鳖甲煎丸) drug serum)			
中药复方 Chinese herbal compound	鳖甲煎丸 Biejiajianwan	调肝益气通络汤 Tiaogan yiqi tongluo formula	济生肾气汤 Jisheng Shenqi decoction	一贯煎 Yiguan decoction
	调肝益气通络方药物血清对骨髓间充质干细胞体外增殖的影响 Influence of Tiaogan Yiqi Tongluo formula serum on bone marrow mesenchymal stem cells proliferation in vitro			
	不同干预方法对肝硬化大鼠骨髓间充质干细胞移植效果的观察 Observation of the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation by different interventions on cirrhotic rats			
	一贯煎诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的实验研究 Effect of yiguan decoction on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytelike cells; an experimental research			

(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的刺激下, BMSCs 可向损伤肝组织迁移并可进一步转化为原代肝细胞, 且发现静脉内给药途径是 BMSCs 移植的最佳途径。吴增城等^[28] 探讨半乳糖凝集素-3 (Gal-3) 联合 HGF 诱导大鼠 BMSCs 向肝细胞转化的可行性及最佳诱导剂量, 观察记录不同浓度及不同时间下 BMSCs 的细胞形态学改变, 结果发现各组 BMSCs 形态逐渐向肝细胞分化, 与阳性对照组细胞相似, 其中浓度 0.5 μg/mL 的组别在第 28 天时间段与对照组 IAR20 细胞最为相似, 且甲胎蛋白、清蛋白荧光染色阳性率最高, mRNA 表达较其它各组明显增高。谭铭辉等^[29] 发现使用 galectin-3 诱导 BMSCs 分化为肝细胞会出现白蛋白 (albumin, ALB) mRNA 及角蛋白 18 (cytokeratin 18, CK-18) mRNA 及 AFP 蛋白表达增加, 与 HGF 联合进行诱导时可提高 BMSCs 向肝细胞诱导分化的效率。

2.3 中药含药血清联合细胞因子诱导

Fu 等^[30] 采用中药一贯煎含药血清联合 HGF 和基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 在体外诱导 BMSCs 向肝细胞分化, 结果表明含中药血清组 (YGJ 组) 经过一定的时间诱导后, BMSCs 的形态逐渐向肝细胞样转化, 其所含 ALB 和 CK-18 阳性细胞的比例均比其它组升高。由此说明一贯煎含药血清联合与 HGF 和 SDF-1 诱导小鼠 BMSCs 可以促进其定向分化为肝细胞, 较单纯的细胞因子诱导转化率高。陈艳等^[31] 从中药姜黄中提取姜黄素联合成纤维细胞生长因子-4, FGF-4) 诱导 BMSCs 定向分化发现, 发现适当剂量的姜黄素可单独有效诱导 BMSCs 分化为肝细胞, 但联合 FGF-4 的时候可降低姜黄素的浓度, 且安全可靠, 值得进

一步研究其具体作用机制。

2.4 模拟肝微环境

微环境在 BMSCs 向肝细胞定向分化过程中有至关重要的作用, 通过模拟肝脏微环境可诱导干细胞向肝细胞分化, 但具体的机制尚待研究。彭琴等^[32] 发现肝衰竭组及中药含药组中的甲胎蛋白、肝组织蛋白、吡啶胺 2, 3—双加氧酶表达均高于正常组, 且中药含药组的蛋白表达量高于肝衰竭组, 证明了中药含药血清能增强 BMSCs 在肝衰竭微环境下的肝细胞分化趋势及免疫调节活性, 提高肝细胞分化率。Razban 等^[33] 选用硫酸乙酰肝素和 IV 型胶原模拟肝微环境对 BMSCs 进行诱导分化, 结果表明 CYP3A4 酶活性, AFP, ALB 和 c-MET 蛋白水平升高, 证明力 BMSCs 具有分化为肝样细胞、改善肝功能的功效。李伟等^[34] 认为胆汁淤积的病理状态下, 可以为 BMSCs 向肝细胞的分化提供良好的细胞微环境, 因此探讨瘀胆血清对大鼠 BMSCs 向肝细胞分化的影响, 结果证明瘀胆血清可诱导 BMSCs 向肝细胞的定向分化, 促进肝细胞的生长。

大量研究表明肝细胞和非肝实质细胞在体外共培养可通过异质细胞间的相互作用充分模拟肝细胞在体内的生存环境, 促进肝细胞增殖与分化, 并保持肝细胞特有的生物学功能。因此, 共培养是肝细胞大规模、高活性培养并最终推广运用的理想培养方式。Zhang 等^[35] 研究证明在共培养系统中, BMSCs 保持正常增殖和活力的同时, 强烈表达 ALB、AFP 和 cytokeratin-18 的 mRNA 蛋白水平, 对 BMSCs 分化为肝细胞起了决定性的作用。另外, 与传统的 2 D 培养基相比, 3 D 系统可高度模拟天然器官环境, 既保持 BMSCs 的分化能力, 也有利于维持

肝细胞的高复制能力。Liu 等^[36]利用 poly (lactic acid-glycolic acid) (PLGA) 支架模拟 3 D 系统,将 BMSCs 和肝细胞进行共培养,结果证明了 PLGA 支架中 BMSCs 诱导分化为肝细胞的能力,而且表明 1:5 (BMSCs: hepatocyte-like cells) 的比例最适合 BMSCs 支持 PLGA 支架中的肝细胞代谢和稳定。

2.5 其它诱导方法

此外,张玮等^[37]采用物理性的办法研究在针刺对治疗肝纤维化的体外作用机制,发现损伤及治疗均等物理刺激疗法可诱导 BMSCs 向肝细胞转化,提高大鼠血清中细胞因子水平和改善肝纤维化程度,其机制可能与自身修复代偿机制相关。孙婷^[38]基于无创的超声靶向微泡破坏技术探讨诱导 BMSCs 靶向归巢及分化为肝细胞的可行性,发现该技术可改善受损肝组织功能及抑制细胞凋亡,促进肝细胞的生长。Li 等^[39]研究发现超声辐照结合 HGF 可加速人骨髓间充质干细胞的肝分化。选择物理性干预方法进行诱导 BMSCs 分化为肝细胞具有创伤小,副作用少的特点,对于实验的研究可控及可操作性强。

随着肝疾病进展至终末期肝病,门脉阻塞及门脉高压情况越来越严重,进一步导致的血流动力学改变造成肝组织严重缺血缺氧,因此学者 Rehn 等^[40]探讨缺氧环境下 BMSCs 与肝细胞再生的关系,发现缺氧预处理可增强 BMSCs 和肝匀浆中的中 VEGF 的表达,提高细胞周期蛋白 D1 的表达并伴随血清白蛋白水平的提高,证明了缺氧情况下 BMSCs 可促进肝细胞的生长及转化,改善肝纤维化程度。许欣婷等^[41]也证明了低氧环境下可促进 BMSCs 的增殖,利用细胞的转化。

3 BMSCs 的体内诱导分化为肝细胞的途径

BMSCs 不仅能在体外诱导分化为肝细胞,在体内也具有分化为肝样细胞的途径。Hwang 等^[42]将 BMSCs 植入肝硬化大鼠中,发现归巢至肝组织中的 BMSCs,可经诱导分化为肝细胞样细胞,改善肝硬化的纤维化程度。Jang 等^[43]也证实了证实了 BMSCs 在体内被诱导分化为肝细胞,并发现 TGF- β 1 信号通路的下游效应子 P-Smad3/Smad3,且 BMSCs 移植抑制了 Smad3 的磷酸化。

4 BMSCs 分化为肝细胞的相关机制

已有的研究表明,运用不同的诱导方法无论是在体内还是体外均可诱导 BMSCs 成功定向分化为

肝细胞,但具体的分子机制尚未明确^[44-45]。目前大部分学者认为,BMSCs 定向分化为肝细胞是基于部分基因被选择性激活或出现差异性表达,从而使某些特异性蛋白合成及其空间分布。

4.1 Notch 信号通路

Notch 信号影响细胞正常形态发生的多个过程,包括细胞的分化、凋亡、增殖及细胞边界的形成。柳柯等^[46]发现 BMSCs 向肝细胞定向分化过程中其关键基因 mRNA 表达也会下降,在第 11 天的时候以 Jagged-2、Delta-1、Delta-3、Notch-1、Notch-2、Notch-3 和 Presenilin-1 的 mRNA 下降最为明显;利用 Jagged 与 BMSCs 共同培养上调 Notch 信号通路其发现至 21 d BMSCs 才表达其表面标志物 M2-PK 和 GST-P,明显晚于对照组,且分化至 26 d 时仍未见白蛋白表达,证明了下调 Notch 信号通路有助于 BMSCs 定向分化为肝细胞。徐洪雨等^[47]在研究者发现随着细胞生长因子诱导 BMSCs 分化为肝细胞的分化率的增高,Notch-1 蛋白表达及 Notch-1 mRNA 呈逐渐下降趋势。

4.2 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 信号通路是控制许多细胞类型中细胞增殖,分化和凋亡的主要因素。Yang 等^[48]研究表明当阻断了 NF- κ B 信号后 HGF 诱导 BMSCs 分化为肝细胞效果下降,表明了 HGF 通过 NF- κ B 信号传导诱导 BMSC 向肝样细胞的分化,其中机制可能与 NF- κ B 信号的激活对于肝细胞的增殖和微管形成相关。王怡等^[49]探讨 NF- κ B 在 HGF 和肝组织液 (LTF) 诱导 BMSCs 分化为肝细胞的影响中发现,经两种细胞因子诱导下,细胞内 NF- κ B 蛋白及 AAT 蛋白表达量显著增加,但予 NF- κ B 抑制剂干预后,两者蛋白表达量随时间延长而明显下降。表明了 NF- κ B 信号通路对定向分化诱导的积极作用。

4.3 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路是 Wnt 途径中的经典信号通路之一,在 BMSCs 分化为肝细胞中发挥重要的作用。Xiang 等^[50]在研究中发现使用中药一贯煎可促进 BMSCs 向肝细胞分化,在机制方面,当下调 Wnt 信号通路的同时会抑制干细胞的增殖转而分化为有功能的肝细胞。吉杨丹等^[51]发现 miR-26b 可通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 BMSCs 向肝样细胞分化;曾令锋等^[52]发现 17 β -E2 作用于 BMSCs 时,除影响其生长激素的分泌量,还降低在氧化应激时的凋亡率,最后证明 17 β -E2 对 BMSCs 分化为肝样细胞的促进作用,其机制可能与 17 β -E2 下调 Wnt/ β -catenin 信号蛋白 Wnt3a 和 β -Catenin 有关。

4.4 钙离子对诱导分化的影响

钙离子是机体各项生理活动不可缺少的离子,在细胞的发生、生长及凋亡过程有着重要作用。焦淑贤等^[53]发现钙离子参与了 BMSCs 分化为肝细胞的过程,当加入钙拮抗剂后 BMSCs 分化率明显降低,但是具体的作用机制及过程仍待进一步研究。

5 总结

运用 BMSCs 移植诱导分化为肝细胞技术治疗终末期肝病在动物实验方面取得了广泛的认可,通过中药含药血清、细胞生长因子和物理刺激等诱导方法均使 BMSCs 定向诱导分化肝细胞,都不同程度地改善了大鼠肝纤维化情况,为在临床上运用 BMSCs 移植治疗终末期肝病提供了重要的借鉴意义,也为重症肝病患者带来希望的曙光。但是即使 BMSCs 移植技术在动物实验方面取得了一定的疗效,而真正将该技术运用于临床仍是困难重重。首先从取材上来讲,20 岁以后,人体 BMSCs 的分化能力明显下降,并且随着年龄的增长 BMSCs 的增殖能力也会逐渐下降,极有可能限制由 BMSCs 所分化得到的肝细胞的临床应用;其次对于 BMSCs 鉴定仍未能确定其特异性的表面标志物,最后 BMSCs 分化为肝细胞的调控机制尚未明确,对移植后会出现的不良反应及是否会进一步加重肝纤维化或加速疾病的进展尚待研究等。但 BMSCs 是具有巨大分化潜能及广阔临床应用前景的多功能干细胞之一,积极探索最佳的、能够定向诱导 BMSCs 向肝细胞分化的诱导方法或诱导剂、移植途径等,促进 BMSCs 的增值分化,发挥 BMSCs 对肝疾病的积极作用,提高 BMSCs 移植的临床运用率仍然是现今肝病领域研究的重点内容。

参考文献:

[1] Srijaya TC, Ramasamy TS, Kasim NH. Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies [J]. J Transl Med, 2014, 12(1): 243-260.

[2] Alfaiifi M, Eom YW, Newsome PN, et al. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases [J]. J Hepatol, 2018, 68(6): 1272-1285.

[3] 张齐好, 郑炜炜, 高丽莲, 等. 悬滴培养诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(11): 2207-2211.

[4] 杨莉, 王冬梅, 洪欣, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外扩增和定向诱导分化为骨和软骨细胞的研究 [J]. 自然科学进展, 2001, 11(10): 1062-1067.

[5] 于海生, 王宁. 促进骨髓间充质干细胞增殖方法的研究进展 [J]. 中国药房, 2014, 25(37): 3532-3534.

[6] 郑雪, 李静, 黄俊凯, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗四氯化碳大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2019, 37(5): 636-641.

[7] 袁淑芳, 刘志英, 阿依夏木古丽, 等. 骨髓间充质干细胞移植对急性肝衰竭大鼠基质细胞衍化生长因子-1 α 、血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(10): 750-755.

[8] Yan L, Sha L, Feng Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell treatment for end stage liver disease: a case report [J]. Asian J Surg, 2020, 43(2): 454-455.

[9] Zhang D. A clinical study of bone mesenchymal stem cells for the treatment of hepatic fibrosis induced by hepatolenticular degeneration [J]. Genet Mol Res, 2017, 16(1): gmr16019352.

[10] 杨雷, 朱烁基, 刘健, 等. 两种骨髓间充质干细胞分离方法的对比研究 [J]. 岭南心血管病杂志, 2020, 26(2): 225-229.

[11] 罗靖莹, 贺宏丽, 郭阳, 等. 差速离心、密度梯度离心、超速离心技术在骨髓间充质干细胞外泌体提取中的应用对比观察 [J]. 山东医药, 2019, 59(12): 48-52.

[12] 王珊珊, 徐国兴. 骨髓间充质干细胞治疗视网膜疾病的实验进展 [J]. 海峡科学, 2010, 5: 60-62.

[13] 栾海燕, 李广文, 李卉, 等. SD 大鼠骨髓间充质干细胞培养、纯化与鉴定 [J]. 西南国防医药, 2016, 26(2): 117-120.

[14] 徐丽娟, 张云巍, 王淑芳, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养新方法 [J]. 肝脏, 2017, 22(3): 252-255.

[15] 向俊西, 郑幸龙, 祝旭龙, 等. 骨髓间充质干细胞体外培养及肝向分化方案的优化 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8): 1090-1096.

[16] 李小云, 杨丽, 张荣华. 雌激素受体信号通路介导的槲皮素调控骨髓间充质干细胞成骨及成脂分化研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 6011-6014.

[17] 张飞, 党源, 薛来恩, 等. 过表达骨形态发生蛋白 4 对兔骨髓间充质干细胞增殖与成软骨的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 87-94.

[18] 沈序, 陆英杰, 路冬冬, 等. 大鼠关节软骨来源祖细胞的分离鉴定及成软骨分化 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(21): 3364-3370.

[19] 谢晶晶, 李博, 姚兵, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、鉴定与冻存及对细胞活性的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(5): 1-4.

[20] Kumar B, Madabushi SS. Identification and isolation of mice and human hematopoietic stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1842: 55-68.

[21] 温智稀, 黄晶晶, 王振常. 鳖甲煎丸含药血清诱导大鼠骨髓间充质干细胞转化为肝细胞的实验研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25(1): 35-38.

[22] 韩海啸, 李军祥, 孟捷, 等. 调肝益气通络方药物血清对骨髓间充质干细胞体外增殖的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(1): 172-173.

[23] Zhou XL, Yang JQ, Liu Y, et al. Observation of the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation by different interventions on cirrhotic rats [J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 52(3): e7879.

- [24] 张寅,王新月,江宇泳.乙肝后肝硬化中医证型与终末期肝病模型评分及肝功能 Child-Turcotte-Pugh 分级的相关性探讨[J].国际中医中药杂志,2013,35(4):292-294.
- [25] 平键,陈红云,周扬,等.一贯煎诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞样细胞的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2014,34(3):348-354.
- [26] 潘兴南,魏开鹏.肝细胞生长因子的浓度和诱导时间对人骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的影响[J].肝脏,2013,18(6):382-385.
- [27] Putra A, Rosdiana I, Darlan DM, et al. Intravenous administration is the best route of Mesenchymal Stem Cells Migration in improving liver function enzyme of acute liver failure[J]. Folia Med (Plovdiv), 2020, 62(1): 52-58.
- [28] 吴增城,康利民,李阳,等.半乳糖凝集素-3 联合 HGF 诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞[J].重庆医学,2016,45(15):2043-2047.
- [29] 谭锦辉,梁宇灵,黄文斌,等. Galectin-3 诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞[J].南方医科大学学报,2018,38(9):1076-1082.
- [30] Fu LL, Pang BY, Zhu Y, et al. *Ex vivo* stromal cell-derived factor 1-mediated differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes is enhanced by chinese medicine yiguanjian drug-containing serum [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 7380439.
- [31] 陈艳,邹文静,王盛丰,等.姜黄素诱导骨髓间充质干细胞分化成肝细胞[J].中成药,2014,36(6):1124-1128.
- [32] 彭琴,赵丹,马浩轩,等.茵陈四苓颗粒对肝衰竭环境下骨髓间充质干细胞分化及 IDO 蛋白表达的影响[J].现代生物医学进展,2019,19(8):1455-1458,1493.
- [33] Razban, Vahid, Khajeh, et al. Engineered heparan sulfate-collagen IV surfaces improve Human Mesenchymal Stem Cells differentiation to functional hepatocyte-like cells [J]. J Biomater Tissue Eng, 2014, 4(10): 811-822.
- [34] 李伟,汪林,曾杰,等.瘀胆血清诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的分化[J].中国组织工程研究,2016,20(6):771-776.
- [35] Zhang QH, Chen XG, Cui GH, et al. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells [J]. DNA Cell Biol, 2007, 26(7): 497-503.
- [36] Liu MY, Yang JC, Hu WJ, et al. Superior performance of co-cultured mesenchymal stem cells and hepatocytes in poly(lactic acid-glycolic acid) scaffolds for the treatment of acute liver failure [J]. Biomed Mater, 2016, 11(1): 15008.
- [37] 张玮,郑志忠,赵福建,等.针刺穴位与筋膜对骨髓间充质干细胞定向分化的体外机制研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(11):2400-2405.
- [38] 孙婷.超声靶向微泡破坏介导 BMSCs 修复大鼠急性肝损伤的实验研究[D].上海:上海交通大学,2019.
- [39] Li F, Liu Y, Cai YY, et al. Ultrasound irradiation combined with hepatocyte growth factor accelerate the hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(5): 1044-1052.
- [40] Rehn M, Kertész Z, Cammenga J. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates erythropoiesis but not hematopoietic stem cell function in the fetal liver [J]. Exp Hematol, 2014, 42(11): 941-944.
- [41] 许欣婷,吴昌归.骨髓间充质干细胞的培养及低氧条件对其影响[J].国际呼吸杂志,2017,37(15):1132-1136.
- [42] Hwang S, Hong HN, Kim HS, et al. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis [J]. Cell Biol Int, 2012, 36(3): 279-288.
- [43] Jang YO, Kim MY, Cho MY, et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model [J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14(1): 198-210.
- [44] 杨超,李卓,康炜,等.曲古霉素 A 促进 ICR 小鼠骨髓间充质干细胞体外分化为肝细胞[J].华中科技大学学报(医学版),2017,46(2):139-144.
- [45] Zhang GZ, Sun HC, Zheng LB, et al. *In vivo* hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(46): 8152-8168.
- [46] 柳柯,刘桂英,杨洋,等. Notch 信号通路在骨髓间充质干细胞向肝细胞分化过程中的动态表达特征[J].中国临床解剖学杂志,2013,31(3):308-313.
- [47] 徐洪雨,王瑞峰,李宝杰. Notch-1 蛋白在诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化中的表达[J].哈尔滨医科大学学报,2009,43(2):122-125.
- [48] Yang TX, Wang Y, Jiang SS, et al. Hepatocyte growth factor-induced differentiation of bone mesenchymal stem cells toward hepatocyte-like cells occurs through nuclear factor-kappa B signaling *in vitro* [J]. Cell Biol Int, 2016, 9(40): 1017-1023.
- [49] 王怡,姜莎莎,杨童茜,等. NF- κ B 和 P38MAPK 在 BMSCs 肝向分化中的作用[J].青岛大学医学院学报,2017,53(2):181-185.
- [50] Xiang Y, Pang BY, Zhang Y, et al. Effect of Yi Guan Jian decoction on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in mice [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(2): 613-626.
- [51] 吉杨丹,罗红阳,王丹,等. miR-26b 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进成肝样分化 MSCs 迁移研究[J].安徽医科大学学报,2020,55(12):1850-1857.
- [52] 曾令锋,黄俊宇,熊瑶,等. 17 β -雌二醇对 rBMSCs 肝祖细胞定向分化及 Wnt 信号通路的调控作用[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(4):459-463,482.
- [53] 焦淑贤,胡彬,赵林,等. Ca²⁺ 参与骨髓间充质干细胞存活增殖及向肝细胞的诱导分化[J].中国组织工程研究,2013,17(40):7028-7033.

邓艳, 刘洪, 吴新玉, 等. 虎杖苷的保肝作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 136-140.
Deng Y, Liu H, Wu XY, et al. Research progress on the hepatoprotective effects of polydatin [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 136-140.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 021

虎杖苷的保肝作用研究进展

邓 艳, 刘 洪, 吴新玉, 成 蕾, 贺 梅, 王婷婷, 叶林虎*

(毕节市第一人民医院, 贵州 毕节 551700)

【摘要】 虎杖苷是从蓼科植物虎杖中分离的一种单体化合物, 现代药理研究表明, 其具有多方面的药理活性, 如抗血栓、抗动脉硬化、改善心肌损伤、抗休克以及调节糖脂代谢等。近年来研究发现虎杖苷还具有保护肝细胞、抗肝纤维化、改善肝细胞脂肪变性及抗肝癌等作用。本文综述了虎杖苷在肝疾病方面的药理作用及机制, 以期为其后续研究及开发利用提供参考。

【关键词】 虎杖苷; 肝; 药理作用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0136-05

Research progress on the hepatoprotective effects of polydatin

DENG Yan, LIU Hong, WU Xinyu, CHENG Lei, HE Mei, WANG Tingting, YE Linhu*
(The First People's Hospital of Bijie, Bijie 551700, China)

【Abstract】 Polydatin is a monocrystalline compound isolated from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. (Polygonaceae). Modern pharmacological studies have indicated that polydatin has a variety of pharmacological activities, such as anti-thrombosis, anti-arteriosclerosis, improvement of myocardial damage, anti-shock and regulation of glucose and lipid metabolism. In recent years, studies have reported that polydatin also has anti-liver cancer and anti-liver fibrosis effects and protects hepatocytes and improves hepatocyte steatosis. This article reviews the pharmacological effects and mechanisms of polydatin in liver disease to provide a reference for its follow-up research, development and use.

【Keywords】 polydatin; liver; pharmacological effects

肝是人体最大的腺体和实质性器官, 承担着代谢、解毒、生物转化、造血和免疫等多种生理功能; 同时肝也容易受到毒物、药物及有毒代谢产物等各种内外源性物质的损伤。肝损伤是多种肝疾病共有的一种病理状态。肝疾病是临床常见病、多发病, 特别是在我国病毒性肝炎、肝硬化及肝癌的发病率较高, 严重危害人民群众身体健康, 因此肝损伤的防治尤为重要。目前临床用于肝损伤治疗的药物主要有还原型谷胱甘肽、复方甘草酸苷、甘草

酸二铵、双环醇、联苯双酯以及多烯磷脂酰胆碱、水飞蓟素、硫普罗宁等, 其中水飞蓟素、多烯磷脂酰胆碱是从植物中提取得到的, 由此可见从植物中寻找用于治疗肝损伤的药物是可行的。

虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 为蓼科虎杖属植物, 是一种传统中药, 长期以来一直在临床实践中用作止痛、退热、利尿和祛痰药。虎杖苷 (polydatin, PD), 也称白藜芦醇苷, 是从虎杖中分离得到的一种多酚类单体化合物, 其化学名为

【基金项目】毕节市科技局重点实验室项目 (毕科合字 [2019] 1 号); 毕节市科技局应急计划 (毕科合字 [2020] 01); 贵州省毕节市第一人民医院院士工作站项目 (黔科合平台人才 [2018] 55621)。

【作者简介】邓艳 (1994—), 女, 硕士, 药师, 研究方向: 临床药学基础研究。E-mail: 1016656289@qq.com

【通信作者】叶林虎 (1984—), 男, 博士, 硕士生导师, 主任药师, 研究方向: 药物相互作用研究。E-mail: yelinhu@126.com

3,4',5-三羟基二苯乙烯-3-β-D-葡萄糖苷,广泛存在于植物及许多日常饮食中^[1]。现代药理学研究表明,PD 具有多种药理活性,包括保护血管、防治脑缺血、抗血栓、抗动脉硬化、改善心肌损伤、抗休克以及调节糖脂代谢等^[2-3]。近年来研究发现虎杖苷具有保护肝细胞、抗肝纤维化、改善肝细胞脂肪变性及抗肝癌等作用。本文综述了其在肝疾病方面的药理作用及机制,以期为其后续的深入研究及开发利用提供参考。

1 结构与药动学特点

PD 为白藜芦醇与葡萄糖结合的产物,是一种非黄酮类天然多酚化合物,化学名为 3,4',5-三羟基二苯乙烯-3-β-D-葡萄糖苷(图 1),分子式为 C₂₀H₂₂O₈,相对分子量为 390.40。研究报道 PD 在大鼠体内的药动学过程符合二室模型,口服吸收较快,t_{max} 为 20.80 min,C_{max} 为 1.44 μg/mL,t_{1/2β} 为 89.84 min,可快速分布到各组织,给药后 10~30 min 各组织中 PD 浓度即达峰值,其中脾、心、肺、胃分布较高,肝、脑、肾次之,小肠、睾丸组织中分布再次之,消除快,清除率为 0.42 L/(kg·min),不易蓄积中毒^[4-5]。

PD 可通过两种途径去糖基化生成反式白藜芦醇:第一种是通过钠依赖性葡萄糖转运体(SGLT1)通过刷状缘后,被 β-葡糖苷酶水解;第二种是通过膜结合酶根皮苷水解酶在上皮腔侧进行去糖基化,然后释放的白藜芦醇苷元通过被动扩散进入细胞,再被代谢成葡萄糖醛酸结合物^[6]。与白藜芦醇相比,PD 具有更强的水溶性及抗氧化作用,可通过两种不同的转运方式被吸收,即被动扩散和主动转运(通过主要存在于胃和肠中的 SGLT1 进行主动转运)^[7-8];具有更高的生物利用度,在胃肠道生理条件下,PD 具有较好的溶解度,更容易被吸收^[9]。

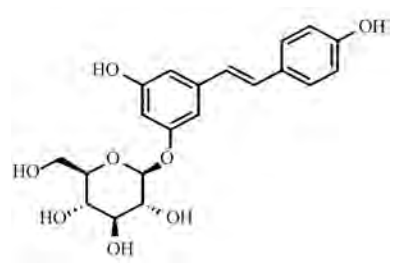


图 1 虎杖苷的化学结构

Figure 1 Chemical structure of polydatin.

2 药理作用

2.1 保护肝细胞

PD 具有保护肝细胞的作用。研究报道,PD 在 1×10⁻⁷~1×10⁻⁴ mol/L 浓度范围内可不同程度地减少 CCl₄ 诱导的原代培养大鼠肝细胞 ALT 及丙二醛(MDA)生成,增加还原型谷胱甘肽(GSH)活性,提高细胞存活率^[10]。在大鼠失血性休克模型中发现 PD 可抑制大鼠肝细胞线粒体膜电位改变和线粒体通透性转换孔(mPTP)开放、维持肝细胞溶酶体稳定、抑制休克诱导的氧化应激,减轻肝细胞线粒体损伤,从而保护肝细胞^[11]。

2.2 抗肝纤维化

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展以及原发性肝癌进一步发展、恶化的关键步骤,表现为肝内纤维组织异常增生、细胞外基质弥漫性大量产生和沉积、合成和降解失衡、继发肝自我修复的动态可逆性病理过程^[12]。肝星状细胞被激活后转化为肌成纤维细胞被认为是肝纤维化形成的关键环节^[13]。体外培养大鼠肝星状细胞 HSC-T6,给予 PD (125、250、500 μmol/L) 处理,发现 PD 可降低肝星状细胞活力、减少 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和 Collagen I 蛋白表达,且浓度增加,抑制作用增强,呈一定的剂量依赖性^[14];在转化生长因子-β1(TGF-β1)刺激人肝星状细胞株(LX-2)诱导肝纤维化细胞模型中发现,PD 能显著抑制 α-SMA 表达,抑制肝星状细胞活化,减少肝纤维化^[15]。体内研究发现腹腔注射 PD(5 mg/kg)4 周可减少甲硫氨酸-胆碱缺乏(MCD)饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和肝纤维化小鼠血清 AST 和 ALT 生成、改善 NASH 和肝纤维化^[16]。此外 PD 可减少 CCl₄ 诱导的 α-SMA 及 TGF-β1 表达、胶原蛋白沉积、巨噬细胞浸润,改善肝纤维化和炎症^[13,17]。这些研究表明 PD 可通过减少 NASH 和肝纤维化来改善肝功能。

2.3 改善肝细胞脂肪变性

脂肪肝又称脂肪性肝病或肝内脂肪变性,是指各种原因引起的以肝细胞脂肪变性为主的临床病理综合征^[18]。肝细胞脂肪变性发展为脂肪性肝炎是单纯性肝脂肪变向肝硬化甚至肝癌进展的重要阶段。研究报道,PD 可减轻高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝模型动物肝细胞脂肪变性,降低血清 AST、ALT、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)以及游离脂肪酸(FFA)等

的浓度^[19-21]。此外在斑马鱼幼鱼急性酒精性脂肪肝模型中发现,模型组斑马鱼幼鱼肝脂肪发生沉积、变性,而 PD 可明显减少肝脂肪沉积,改善肝组织病理改变,起到保护肝的作用^[22]。

2.4 抗肝癌

肝细胞癌是常见的肝原发性恶性肿瘤,主要发生在慢性肝病和肝硬化患者中,是全球第三大与癌症相关的死亡原因。研究报道,在体外用 PD 处理正常肝细胞系 HL-7702 以及肝癌细胞系 HepG2 和 SMMC-7721 后发现,PD 可浓度依赖性和时间依赖性地抑制肝癌细胞增殖;还可浓度依赖性地诱导肝癌细胞凋亡(可能是通过增加 Caspase-3 活性,上调 Caspase-3、Caspase-9、Bax 的蛋白表达以及下调 Bcl-2 的蛋白表达来实现的);此外,PD 还可抑制肝癌细胞的增殖、侵袭以及迁移。体内研究发现,将 HepG2 细胞接种于裸鼠,PD 处理能显著抑制裸鼠种植瘤的生长,并增加了 Caspase-3 的表达和肝癌细胞凋亡^[23]。

2.5 调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗

研究报道,胰岛素抵抗、肝脂质沉积等与非酒精性脂肪肝(NAFLD)的发病密切相关,因此,调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗可能是治疗 NAFLD 的重要手段^[24]。在高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠模型中发现,模型组的大鼠出现脂质大量沉积、高胰岛素血症、胰岛素抵抗以及 TC、TG、LDL-C 升高,而 HDL-C 降低,通过 PD 治疗后,发现 PD 可降低 TC、TG、LDL-C,升高 HDL-C,有效改善胰岛素抵抗、降低空腹胰岛素及血糖水平,提高胰岛素敏感指数^[21,25-26]。此外,还发现 PD 可降低脂质合成关键酶固醇调控元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)、肝 X 受体 α (LXR- α)蛋白以及硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)的表达,减少脂质合成;增加肝脂质代谢关键酶过氧化物酶体增殖剂激活受体- α (PPAR- α)合成以及脂肪酸代谢关键酶肉碱棕榈酰转移酶-1(CPT1)蛋白水平,改善脂质代谢障碍,减少脂质沉积^[27-28]。以上研究说明,PD 可调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗。

3 作用机制

3.1 抗氧化应激

氧化应激是机体或细胞内氧化和抗氧化系统之间的平衡被破坏而造成的应激状态,发生在多种疾病过程中。PD 是一种天然多酚化合物,具有很

好的自由基清除能力和抗氧化活性^[29-30]。一项临床研究显示,PD 可显著降低慢性酒精中毒患者血浆 AST、ALT 水平及脂质过氧化水平,改善酒精中毒患者的肝损伤^[31]。PD 可提高重金属镉处理后小鼠肝组织 SOD 及 GSH-Px 活性,抑制镉诱导的自由基对肝细胞的攻击,降低 MDA 含量,减轻镉诱导的肝组织细胞氧化应激引起的肝损伤^[32]。同样,在非酒精性脂肪肝模型中也发现 PD 能升高 SOD 及 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,提高肝抗氧化能力^[33]。在对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝毒性模型中发现,PD 通过降低氧化型谷胱甘肽(GSSG)、活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)和丙二醛(MDA)的含量,增加 GSH、GSH-Px 活性以及 GSH/GSSG 比值,减少氧化应激。同时,PD 显著抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、NADPH 氧化酶 2(NOX2)的水平和 mRNA 表达^[34]。在芥子气诱导肝损伤研究中发现,PD 显著增加了 Sirt1、HO-1 和 NQO1 的表达以及 Nrf2 核易位,提高小鼠存活率,而敲除 Sirt1 或 Nrf2 均取消了 PD 的保护作用,这说明 PD 对抗芥子气中毒所致肝损伤与 Sirt1/Nrf2 通路有关^[35]。在高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎和纤维化小鼠模型中发现,PD 可通过下调 NOX4 酶来降低氧化应激^[16]。此外,PD 还可通过增加 miR-200a 来调节 Keap1/Nrf2 信号通路防止果糖诱导的肝炎症和脂质沉积^[27]。

3.2 抗炎

研究报道,PD 具有较好的抗炎作用。在 LPS/D-GaIN 诱导的小鼠暴发性肝衰竭模型中,PD 预处理可剂量依赖性地抑制了肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生,抑制髓过氧化物酶(MPO)活性以及细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、内皮细胞粘附分子-1(ECAM-1)的表达,并抑制 Caspase-3 激活以及转录因子核因子- κ B(NF- κ B)的活性,从而抵抗 LPS/D-GaIN 诱导的暴发性肝衰竭^[36]。在酒精性肝病模型中发现,PD 预处理可通过下调 Toll 样受体 4(TLR4)和 NF- κ B-p65 抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的释放,抑制炎症,预防乙醇诱发的肝损伤^[37]。在 CCl₄ 引起的肝损伤模型中,TNF- α 、IL-1 β 、环氧合酶 2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)以及 NF- κ B 的表达增加,而 PD 可逆转它们的表达,保护小鼠免受 CCl₄ 诱导的肝损伤^[38]。

3.3 调节细胞凋亡

研究报道,PD 对细胞凋亡具有双重调节作用。在 D-半乳糖诱导的肝损伤模型中,PD 能够上调调

亡抑制蛋白 Bcl-2 表达,下调促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达,减轻肝组织病理变化^[30]。在重金属镉处理后的小鼠中,PD 可提高肝组织 SOD 及 GSH-Px 活性,下调 Bax、Caspase-3 蛋白表达,减少细胞凋亡^[32]。在对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝毒性模型中,PD 通过降低细胞色素 C、活化的 Caspase-9、凋亡酶激活因子 1 (Apaf-1)、活化的 Caspase-3 以及 Bax 水平和表达,增加 Bcl-2 水平和表达,抑制细胞凋亡^[34]。而在肝癌细胞中,PD 浓度依赖性地增加 Caspase-3 活性,上调 Caspase-3、Caspase-9、Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,诱导细胞凋亡^[23]。

3.4 防止线粒体损伤

线粒体是物质代谢和能量代谢的重要场所,在细胞分化、增殖和死亡中起着重要作用。研究发现,在肝疾病的发生发展过程肝细胞表现出线粒体功能受损,能量代谢异常,其特征为线粒体通透性转换孔 (mPTP) 开放、线粒体肿胀、膜电位降低和 ATP 水平降低^[39-40]。Li 等^[11]研究发现,急性缺血性休克引起肝细胞线粒体功能障碍,而 PD 可减轻肝细胞线粒体损伤,抑制线粒体膜电位崩溃和 mPTP 开放,改善肝细胞线粒体功能。此外,PD 可抑制严重休克诱导的肝细胞氧化应激,维持肝细胞溶酶体的稳定性,其作用机制与 PD 激活 SIRT1-SOD2 途径有关。

3.5 调节自噬

自噬是细胞通过溶酶体将细胞内受损的细胞器、错误折叠的蛋白及多余的脂质降解来维持细胞稳态和器官完整性的重要过程。研究表明,自噬在多种肝疾病中起重要作用^[41]。细胞内脂质的自噬降解障碍是 NASH 发展的原因之一。体内外研究表明,PD 可抑制 mTOR 信号传导并上调转录因子 EB (TFEB) 的表达和活性,促进溶酶体生物发生,恢复溶酶体功能和自噬通量,减少 NASH 模型小鼠 NAFLD 活动评分、降低血清 TC 和 ALT 水平,预防 NASH 模型小鼠肝脂质蓄积、减轻炎症和肝细胞损伤^[42]。

4 结语与展望

肝损伤是多种肝疾病共有的一种病理状态,因此肝损伤的防治尤为重要。目前,临床用于治疗肝损伤的药物主要通过抗氧化应激、抗炎、保护肝组织及细胞、改善肝功能等起到治疗肝损伤的作用。PD 是一种从虎杖中分离出来的多酚类单体化合

物,其具有较好的抗氧化作用。研究报道,其在肝方面具有保护肝细胞、抗肝纤维化、改善肝细胞脂肪变性、抗肝癌等作用,其作用机制可能与其抗炎、抗氧化应激、调节自噬及细胞凋亡、防止线粒体损伤等有关。综上所述,虎杖苷具有发展成为保肝药物的潜在可能。然而,目前关于 PD 在肝方面的药理作用机制以及作用靶蛋白仍不清楚,且缺乏相关的毒理学研究,因此,为了能更好地将 PD 开发利用,还需对其进行更多更深入的研究。

参考文献:

- [1] Du QH, Peng C, Zhang H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics [J]. Pharm Biol, 2013, 51(11): 1347-1354.
- [2] 王亚运, 张琪. 虎杖苷的药理作用研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(5): 989-991, 996.
- [3] 杨博, 李蕾, 韩彬. 虎杖中虎杖苷的药理研究新进展 [J]. 广东化工, 2017, 44(4): 58-60.
- [4] 吕春艳, 张兰桐, 袁志芳, 等. 虎杖苷在大鼠体内的药动学特点和组织分布研究 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 235-238.
- [5] 梁竹, 梁爱君. 大鼠灌胃给予维生宁颗粒后虎杖苷血药浓度测定及药动学研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(43): 4047-4049.
- [6] Henry-Vitrac C, Desmoulière A, Girard D, et al. Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells [J]. Eur J Nutr, 2006, 45(7): 376-382.
- [7] Wu M, Li XY, Wang SZ, et al. Polydatin for treating atherosclerotic diseases: a functional and mechanistic overview [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 1-10.
- [8] 欧水平, 任丽, 王玉和, 等. 虎杖提取物中虎杖苷及白藜芦醇在大鼠胃肠道吸收的动力学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 30-35.
- [9] 严建业, 王元清, 黄丹, 等. HPLC-DAD 测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素的平衡溶解度及表观油水分配系数 [J]. 中成药, 2015, 37(12): 2628-2632.
- [10] Huang ZH, Wang ZW, Liu MP, et al. Protective effects of polydatin against CCl₄-induced injury to primarily cultured rat hepatocytes [J]. World J Gastroenterol, 1999, 5(1): 41-44.
- [11] Li PY, Wang XM, Zhao M, et al. Polydatin protects hepatocytes against mitochondrial injury in acute severe hemorrhagic shock via SIRT1-SOD2 pathway [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(7): 997-1010.
- [12] 樊晓明, 俞富军. 肝纤维化研究前沿 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2015.
- [13] 杨桂智, 赵心怡, 黄敏霞, 等. 虎杖苷对肝纤维化治疗作用实验研究 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(16): 14-16.
- [14] 兰天, 勾红菊, 吴腾, 等. 虎杖苷抑制肝星状细胞活化研究 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(8): 39-40.
- [15] 张丽, 方步武. 虎杖苷抑制肝星状细胞增殖活化的作用和机

- 制研究 [J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(4): 309-312.
- [16] Li R, Li JZ, Huang YJ, et al. Polydatin attenuates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1411-1425.
- [17] Zhao XY, Li R, Liu Y, et al. Polydatin protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 629: 1-7.
- [18] 郭力, 李延俊. 脂肪肝预防与调养 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1900.
- [19] Zhang JM, Tan YY, Yao FR, et al. Polydatin alleviates non-alcoholic fatty liver disease in rats by inhibiting the expression of TNF- α and SREBP-1c [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(4): 815-820.
- [20] 陈剑明, 张声生, 吴震宇, 等. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝保护作用的实验研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(5): 1188-1191, 1294-1295.
- [21] 周风华, 温子云, 向泽淮, 等. 虎杖苷对 ApoE $\sim$ (-/-) 小鼠肝脏 miR-214 表达水平及肝功能的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(16): 763-767.
- [22] 赖裕玲. 虎杖苷对斑马鱼幼鱼酒精性脂肪肝的治疗作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [23] Jiao Y, Wu Y, Du D. Polydatin inhibits cell proliferation, invasion and migration, and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(4): 1-9.
- [24] 李锐. 肝特异敲除 SphK2 调控 NAFLD 的分子机制及虎杖苷的干预研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [25] 刘皎皎, 戴玲, 董璐, 等. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝的影响及相关分子机制探究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(10): 1188-1192.
- [26] 陈剑明, 张声生, 郭前坤, 等. 虎杖苷对非酒精性脂肪性肝病胰岛素抵抗及氧化应激影响的实验研究 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2013, 21(12): 617-620.
- [27] Zhao XJ, Yu HW, Yang YZ, et al. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 124-137.
- [28] 陈剑明, 张声生, 李琳, 等. 虎杖苷治疗非酒精性脂肪肝的肝病理评价及对脂代谢酶 SERP-1c 和 PPAR- α 的调节作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(7): 1701-1706.
- [29] Jin J, Li Y, Zhang XL, et al. Evaluation of both free radical scavenging capacity and antioxidative damage effect of polydatin [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 923: 57-62.
- [30] 许烈强. 虎杖苷对 D-半乳糖和酒精致肝损伤的保护作用及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [31] Pace MC, Passavanti MB, Aurilio C, et al. Polydatin administration improves serum biochemical parameters and oxidative stress markers during chronic alcoholism: a pilot study [J]. *In Vivo*, 2015, 29(3): 405-408.
- [32] 林霖, 张才, 汪纪仓, 等. 虎杖苷对镉诱导小鼠肝氧化应激及内质网应激蛋白 GRP78 表达的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(9): 1558-1563.
- [33] 张霖. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝保护作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [34] Liu YH, Huang QH, Wu X, et al. Polydatin protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via anti-oxidative and anti-apoptotic activities [J]. *Food Funct*, 2018, 9(11): 5891-5902.
- [35] Zhang H, Chen YC, Pei ZP, et al. Protective effects of polydatin against sulfur mustard-induced hepatic injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 367: 1-11.
- [36] Wu MJ, Gong X, Jiang R, et al. Polydatin protects against lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in D-galactosamine-sensitized mice [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25(4): 923-934.
- [37] Huang QH, Xu LQ, Liu YH, et al. Polydatin protects rat liver against ethanol-induced injury: involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF- κ B p65 pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017(1): 1-14.
- [38] Zhang H, Yu CH, Jiang YP, et al. Protective effects of polydatin from polygonum cuspidatum against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46574.
- [39] 张靛睿, 王诗琪, 王红韵, 等. 大鼠慢性肝损伤的线粒体功能障碍及其影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2020, 49(8): 747-751.
- [40] Jin TQ, Wang C, Tian Y, et al. Mitochondrial metabolic reprogramming: an important player in liver cancer progression [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 197-203.
- [41] 覃小宾, 张荣臻, 曾胜澜, 等. 自噬在肝脏疾病发生发展中的作用研究 [EB/OL]. [2020-09-04]. <http://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20200903.001>.
- [42] Chen XT, Chan H, Zhang L, et al. The phytochemical polydatin ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by restoring lysosomal function and autophagic flux [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 4290-4300.

[收稿日期] 2020-11-10

王莉, 谷秀娟. 支气管肺泡灌洗液肿瘤标志物检测用于肺癌早期诊断的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 141-145.

Wang L, Gu XJ. Research progress of tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid for the early diagnosis of lung cancer [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 141-145.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 022

支气管肺泡灌洗液肿瘤标志物检测用于肺癌 早期诊断的研究进展

王莉¹, 谷秀娟^{2*}

(1.延安大学医学院,陕西 延安 716000;2.延安大学附属医院东关分院检验科,陕西 延安 716000)

【摘要】 肺癌作为人类最常见的恶性肿瘤之一,是导致人类因癌症死亡的主要原因。早期诊断是提升肺癌患者生活质量,改善预后的关键,而肿瘤标志物检测是肺癌早期诊断的重要途径。支气管肺泡灌洗液中肿瘤标志物出现早、浓度高,有助于肺癌早期诊断。本文对近年来支气管肺泡灌洗液中肿瘤标志物的研究现状进行综述,以期对肺癌的早期诊断提供参考。

【关键词】 肺癌;支气管肺泡灌洗液;肿瘤标志物;早期诊断

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0141-05

Research progress of tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid for the early diagnosis of lung cancer

WANG Li¹, GU Xiujuan^{2*}

(1. Medical School of Yan'an University, Yan'an 716000, China.
2. Dongguan Branch laboratory, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000)

【Abstract】 As one of the most common malignant tumors, lung cancer is the main cause of cancer death. Early diagnosis is the key to improving the quality of life and prognosis of patients with lung cancer and the detection of tumor markers is important for the early diagnosis of lung cancer. The early appearance and high concentrations of tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid are helpful for the early diagnosis of lung cancer. This article reviews the research status of tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid in recent years and provides a reference for the early diagnosis of lung cancer.

【Keywords】 lung cancer; bronchoalveolar lavage fluid; tumor markers; early diagnosis

近年来,肺癌的发病率和病死率呈迅速增长趋势^[1],大多数患者确诊的时候一般都是晚期,预后差,五年生存率为 10%~20%^[2],给社会和家庭带来巨大的经济和社会负担。早诊断、早治疗可明显改变肺癌患者的生存率。肺癌的确诊主要依靠组织病理学及病理细胞学检查,但组织标本的获取存在一定的难度^[3],特别是对起源于支气管远端的肺癌,想要获取其病理组织更难。检测肺癌肿瘤标志物是实现肺癌早期诊断的重要途径,利用血液、尿液和唾液等体液进行生物标志物检测已成为一种重要的癌症诊断方法^[4]。支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)是通过电子支

[基金项目] 延安大学研究生教育创新计划项目(YCX2020018)。

[作者简介] 王莉(1994—),女,研究生在读,研究方向:临床检验诊断研究。Email: 384022499@qq.com

[通信作者] 谷秀娟(1973—),女,主任检验师,硕士生导师,研究方向:肿瘤临床病理诊断研究。Email: guxiujuan001@126.com

气管镜向支气管肺泡内反复以无菌 0.9% 氯化钠注射液灌洗收集的肺表面衬液,生化成分主要由磷脂和蛋白质组成,核酸(DNA、miRNA、mRNA)较少,这些成分的变化反映了机体的病理生理状态,可能含有更高浓度的肺癌分泌蛋白,因此被视为肿瘤标志物的丰富来源^[5]。由于肿瘤细胞合成和分泌的物质首先释放到病灶处的支气管肺泡内,所以通过检测 BALF 中特异性的肿瘤标志物对于肺癌的早期诊断、疾病进展监测、预后等有重要意义。

1 常见的支气管肺泡灌洗液肿瘤标志物

1.1 癌胚抗原

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是 Gold 等^[6]在 1965 年从结肠癌中提取的一种细胞膜表面的酸性糖蛋白,分子量为 $(180 \sim 200) \times 10^3$,BALF 中正常范围是 $0 \sim 5 \text{ ng/mL}$,通常在胎儿发育过程中产生,在出生前即停止分泌。CEA 可介导细胞与细胞外基质间的黏附反应,在肿瘤的发生和侵袭转移过程中起关键作用。作为一种具有人类胚胎抗原决定簇的多糖蛋白复合物,CEA 常被用于检测结直肠癌,但是随着浓度的升高,也可以预测小细胞肺癌和非小细胞肺癌^[7],也是最早在临床上应用于诊断肺癌的标志物。肺癌患者 BALF 中的 CEA 水平明显高于良性病变者,103 例肺癌及非肺癌患者支气管肺泡灌洗液、胸水、血清的 CEA 测定结果呈支气管肺泡灌洗液 CEA>胸水 CEA>血清 CEA 的趋势,提示用支气管肺泡灌洗液检测 CEA 浓度比通常用胸水及血清测定 CEA 浓度鉴别诊断肺部疾病更为敏感^[8]。有报道称肺癌患者 BALF 中 CEA 水平比血清中高出 30 多倍,这可能由于循环中的 CEA 经肝脏降解,导致其在 BALF 中浓度聚集^[9]。事实上对于无法经支气管镜确诊的肿瘤患者,测定 BALF 中的 CEA 是一种有效的辅助诊断方法^[10]。而肺腺癌细胞能直接产生 CEA 的研究结果,进一步突出了 CEA 是腺癌的特异性肿瘤标志物^[11]。

不同病理类型肿瘤中的 CEA 水平会有不同,表达水平由高到低依次是:腺癌>小细胞癌>鳞癌。丁娜等^[12]检测了 3 种不同病理分型肺癌 BALF 中 CEA 的浓度,结果显示腺癌中的浓度远高于小细胞肺癌和鳞癌中的浓度,提示可将 CEA 作为肺腺癌病情进展及判定临床分期的指标。丁慧强^[13]的研究认为,肺癌组支气管肺泡液中 CEA 的诊断临界点为 7.9 ng/mL ,此时的敏感性和特异性能达到 90% 和 86.7%。但是需要注意的是,CEA 在多种肿瘤组织

中如宫颈癌、乳腺癌、卵巢癌等均会出现异常升高,所以其对肺癌诊断的特异性较低,实际应用中需和其他指标联合检测。

1.2 糖类抗原 125

糖类抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125)也被称为粘蛋白 16 或 MUC16,在人中由 MUC16 基因编码,最早是 Bast 等^[14]通过浆液上皮性卵巢癌细胞系 OVCA433 生产出单克隆抗体 OC125,该抗体所特异识别的抗原即是 CA125。CA125 是在胚胎发育期由体腔上皮细胞产生的一类高分子糖蛋白抗原,与许多肿瘤的发生发展密切相关,属于混合型肿瘤标志物。CA125 在细胞内合成并储存,因被细胞间连接和基底膜阻挡而无法入血,故正常人血清中浓度很低,健康人群的含量 $\leq 35 \text{ U/mL}$,当组织发生病变时释放入血而升高^[15]。

由于 CA125 在体液中的半衰期仅为 4.8 d 左右,且代谢快。因此,其水平的变化可以很好的反应肿瘤组织的近期状态。Li 等^[16]研究表明肺癌组织中有 CA125 的表达,以肺腺癌中最高,其表达水平与肿瘤的分化程度密切相关。Cedr s 等^[17]研究发现,在 277 例Ⅲ~Ⅳ期 NSCLC 患者中有 46.6% 的患者血清 CA-125 水平升高,且其无进展生存期(PFS)更差(4.6 月 vs 7.5 月, $P < 0.05$; 8.7 月 vs 14.0 月, $P < 0.05$),多因素分析也显示 CA125 水平升高与预后差有明确相关性。但是对于女性肺癌患者而言,在评估 CA125 的临床意义时要考虑其激素状况,因为正常的卵巢活动会影响 CA125 的水平。此外,子宫内膜异位症和妊娠也会提升 CA125 的水平。Ghosh 等^[18]研究认为,支气管肺泡灌洗液中 CA125 的诊断临界点为 36.5 U/mL ,此时的灵敏度为 89.13%,特异性为 75%,阳性预测值为 80.39%,阴性预测值为 85.71%。

1.3 神经元特异性烯醇化酶

神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)是一种糖酵解烯醇酶,分子量为 78×10^3 ,催化 2-磷酸甘油酸裂解生成烯醇式丙酮酸,由 α 、 β 、 γ 三种亚基以二聚体的形式组成 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\beta\gamma$ 五种形式的同工酶,是糖酵解途径中甘油分解的最后环节的酶,优先表达于神经和内分泌组织。因此,NSE 可以作为神经元发育成熟的标志,其含量能反映神经元分化的程度^[19]。小细胞肺癌属于神经内分泌起源肿瘤,具有神经内分泌细胞和 APUD(amine precursor uptake and decarboxylation)细胞的特征。因此 NSE 是小细胞肺癌最敏感、最特

异的肿瘤标志物^[20],其对小细胞肺癌的诊断特异性为 40%~70%^[21],对于明确小细胞肺癌的临床分期、鉴别诊断和疾病进展有指导作用。

Carney 等^[22]首次报道了 94 例新诊断的和未经治疗的 SCLC 患者血清 NSE 水平会升高,且 NSE 水平与化疗的临床反应之间有很好的相关性。NSE 水平高的小细胞肺癌患者术后的生存率低,复发风险也较高。研究表明,NSE 是预测小细胞肺癌患者预后的最有效因子,其敏感性优于肿瘤分期、患者临床表现、年龄、性别、CEA 和碱性磷酸酶^[23]。有研究表明 NSE 的诊断阈值为 2.06 ng/mL,其敏感性和特异性分别为 72.0%和 69.2%,提示 NSE 可以作为肺癌恶性程度的指示指标^[24]。

1.4 鳞状上皮细胞癌抗原

鳞状上皮细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen, SCC-Ag)是一种细胞骨架蛋白,分子量为 48×10^3 ,由 1170 个核苷酸组成,编码 390 个氨基酸,属于丝氨酸蛋白酶抑制物家族。BALF 中正常范围是 0.8 ng/mL,由于 SCC-Ag 最初是在子宫癌中发现的,所以早期的研究主要集中于子宫鳞状细胞癌。

SCC 作为鳞癌细胞的一种特殊蛋白质,在肺癌患者中 SCC-Ag 的阳性率依次为鳞癌、腺癌、SCLC,并且假阳性率低^[25]。罗玲等^[26]的检测结果显示肺癌组的 SCC-Ag 水平明显高于肺部良性病变组,在肺癌Ⅲ~Ⅳ均高于Ⅰ~Ⅱ期,差异有统计学意义,提示 SCC-Ag 有助于肺癌病理类型的判断,并能间接反映患者的病情进展情况。王磊^[27]的研究表明,BALF 中 SCC-Ag 水平高于血清,提示 BALF 中 SCC-Ag 对诊断肺鳞状细胞癌参考价值优于血清,且随着 BALF 中 SCC-Ag 的水平升高,临床分期越高。有研究显示肺癌组 BALF 中 SCC 的总阳性率可达到 95.8%,敏感性为 95.8%,特异性为 54.3%^[28]。

1.5 细胞角蛋白 19 片段

细胞角蛋白 19(cytokeratin, CK19)为主要表达于单层上皮细胞的 I 型角蛋白,细胞角蛋白 19 片段(cytokeratin-19-fragment antigen 21-1, CYFRA21-1)是水溶性 CK19 片段,广泛分布于正常组织表面如复层上皮和鳞状上皮。CK19 是一种结构蛋白,属于酸性多肽之一,肿瘤细胞凋亡引起蛋白酶大量激活,导致角蛋白 19 的某些片段降解并被识别,该片段即为可溶性细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)^[29]。CYFRA21-1 的分子量为 $(40 \sim 68) \times 10^3$,主要存在于肺癌、食道癌等上皮起源的肿瘤细胞的胞浆中,其诊断肺癌的灵敏度随着疾病的不同发展阶

段而不同,最高可达到 69.6%^[30]。

BALF 中 CYFRA21-1 的正常范围是 0~2.08 ng/mL,Pujol 等^[31]首次在 165 名肺癌患者中检测了 CYFRA21-1 的水平,发现灵敏度和特异度分别是 52%和 87%,敏感性在鳞状细胞癌中最高,在 SCLC 中最低。CYFRA21-1 的水平变化能反映非小细胞肺癌的病情波动,当肺部存在不清晰圆形焦点,而 CYFRA21-1 水平又大于 30 ng/mL 时,提示很可能是原发性支气管肺癌^[32]。杨国彪等^[33]人的检测结果表明肺癌组患者血清和 BLAF 中 CYFRA21-1 水平平均高于肺良性病变组($P < 0.05$),表明 CYFRA21-1 水平的变化与肺癌的发生发展有一定的关系。也有研究称 CYFRA21-1 在鳞状细胞癌患者中的表达高于腺癌和 SCLC 患者,提示 CYFRA21-1 可以作为诊断鳞状细胞癌的有效标志物^[16]。邬勇坚等^[28]测定 BALF 中 CYFRA21-1 阳性率为 83.3%,敏感性为 38.3%,特异度为 51.4%。

1.6 胃泌素释放肽前体

胃泌素释放肽(pro-gastrin-releasing peptide, GRP)最初是从猪胃黏膜中分离的,属于胃肠激素,广泛分布于哺乳动物的神经系统、胃肠道和呼吸道。GRP 是参与肿瘤细胞生长的重要因子,其通过肿瘤细胞的自分泌或细胞间的旁分泌发挥作用^[34]。但 GRP 的半衰期很短,只有 2 min,不稳定,难以检测。而其前体 pro-GRP 的水平比 GRP 高 400 倍,因此通常检测 GRP 的前体 pro-GRP 来反映其水平。pro-GRP 在肺部良性病变和上皮来源的肿瘤中呈低水平表达,在 BALF 中的正常范围是 28.30~74.40 pg/mL,但在 SCLC 细胞系和 SCLC 组织中均高表达^[35],有助于 SCLC 的诊断。王艳海等^[36]研究表明 pro-GRP 对 SCLC 的灵敏度和特异度可达到 77.2%和 91.1%,优于 NSE 和 CYFRA21-1,但是 pro-GRP 的表达水平与肿瘤的临床分期无明显相关性。

2 BALF 肿瘤标志物的临床应用

尽管已经发现了很多与肺癌密切相关的标志物,但是还没有一种标志物是肺癌的特异性抗原。由于肺癌的多态性及复杂性,肿瘤细胞组织来源不同,各项肿瘤标志物单独检测具有一定的局限性,单一指标检测往往难有理想的灵敏度和特异度。高浓度标志物往往预示着患者很可能是肺癌,而不是肺部良性病变,容易导致误诊或漏诊的发生,因此在实际临床应用中多开展联合检测。

一种是多项指标联合检测。有研究者回顾分析了 655 例肺癌患者和 237 例肺良性疾病患者 CEA

和 CYFRA21-1 浓度对区分原发性肺癌和肺良性疾病的诊断价值,结果显示单用两个指标诊断肺癌的敏感性和特异性分别是 69% 和 68%、43% 和 89%,而两个指标联合诊断的是 95% 和 33%,特异性大大提高^[37]。CEA、CA199 与 CA125 联合检测肺癌的灵敏度与特异度能达到 72% 和 83.5%,均高于单一检测,可使早期肺癌检出率得到明显提高^[38]。

另一种是将 BALF 和血清两种组织联合检测。Cremades 等^[39]将 BALF 和血清 CYFRA21-1 水平联合检测可使肺癌诊断的灵敏度由 36% 提高到 69%。邓丽平等^[40]研究发现,单一检测 BLAF 或血清中的 CEA、CYFRA21-1、NSE 对肺癌的特异性尚可,但敏感性均偏低,假阴性较多,易造成漏诊,若联合 BALF 和血清可使诊断肺癌的敏感性和准确率提高,优于单独进行 BALF 或血清的肿瘤标志物检测。

3 展望

支气管肺泡灌洗术 (bronchoalveolar Lavage, BAL) 作为依托纤维支气管镜而发展起来的新技术,是诊断间质性肺疾病的基础技术,也是临床上被逐渐广泛应用的新方法。通过 BAL 可取得 BALF,在某种程度上被喻为“液相活检”^[41]。肺癌的早发现、早诊断、早治疗是改善肺癌患者预后、延缓病死率的有效手段^[42]。肿瘤标志物是癌细胞在肿瘤发生、发展、侵袭和转移过程中分泌的一些活性物质,存在于血液、痰液等体液中^[43]。肿瘤标志物在疾病的筛查、诊断、监测进展、复发和预后方面都有重要作用。有研究认为,从肿瘤所在位置获取检测肿瘤标志物的标本优于血液标本,肺癌作为生长在支气管粘膜或肺泡组织上的恶性肿瘤,脱落的肿瘤细胞及其代谢产物可直接进入肺泡腔内,对 BALF 中的肿瘤标志物进行检测较其它标本更有特异性。在肿瘤早期血清中标志物含量较低,不易检测,而 BALF 是取自病变部位的支气管肺泡内,浓度较高,能提前预警异常指标,更有助于肺癌的早期诊断,并且对患者机体的损伤也较小。因此,通过对电子纤维支气管镜获取的肺泡灌洗液进行肿瘤标志物的检测,有望成为临床上肺癌早期诊断的重要途径。同时,检测 BALF 中的肿瘤标志物水平对预测肿瘤患者有无转移、肺部疾病的良恶性鉴别也具有较高的临床价值^[44]。但也有研究指出通过检测 BALF 中肿瘤标志物来进行肺癌诊断的特异或敏感性很低,无法区分良、恶性病变^[45]。BALF 中肿瘤标志物浓度会受到肿瘤细胞的大小和数目、肿瘤细胞自身产生肿瘤标志物的速度、肿瘤标志物在体内降

解和排泄的速度及体液稀释等因素影响。因此,如何规范支气管肺泡灌洗液的取材和处理流程,提升支气管肺泡灌洗液肿瘤标志物检测的诊断价值,同时,在不同组合检测方案中,如何确保既能提高灵敏度又能提升特异度,是今后一个重要的研究方向。

参考文献:

- [1] 张玉娟,崔巍. 人 SHOX2 基因的生物学作用及与疾病关系的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(9): 2212-2214.
- [2] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. Lancet, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [3] 任芳萍,蒋延文. 支气管肺泡灌洗液中肿瘤标记物检测对肺癌诊断的应用价值 [J]. 诊断病理学杂志, 2017, 24(10): 774-777.
- [4] Hofman P. Liquid biopsy and therapeutic targets: present and future issues in thoracic oncology [J]. Cancers (Basel), 2017, 9(11): 154.
- [5] Matthiesen R. MS-based biomarker discovery in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer [J]. Proteomics Clin Appl, 2020, 14(1): e1900077.
- [6] Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigen in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques [J]. J Exp Med, 1965, 121(3): 439-462.
- [7] Holdenrieder S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer [J]. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2016, 245: S40-S45.
- [8] 王睿. 对肺癌及非肺癌患者进行支气管肺泡灌洗液、胸水、血清的癌胚抗原联合测定结果的观察 [J]. 沈阳医学院学报, 2004, 6(4): 223-224.
- [9] Zaleska J, Pirozyński M, Kwiek S, et al. Value of determining the concentration of carcinoembryonic antigen in bronchial lavage for diagnosis of lung cancer [J]. Pneumonol Alergol Pol, 1995, 63(5-6): 286-292.
- [10] Dabrowska M, Grubek-Jaworska H, Domagala-Kulawik J, et al. Diagnostic usefulness of selected tumor markers (CA125, CEA, CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with non-small cell lung cancer [J]. Pol Arch Med Wewn, 2004, 111(6): 659-665.
- [11] Mitsuhashi N, Takahashi T, Sakurai H, et al. Establishment and characterization of a new human lung poorly differentiated adenocarcinoma cell line, GLL-1, producing carcinoembryonic antigen (CEA) and CA19-9 [J]. Lung Cancer, 1995, 12(1-2): 13-24.
- [12] 丁娜,李树花. 支气管肺泡灌洗液肿瘤标志物检测对肺癌诊断的价值 [J]. 天津医药, 2007, 35(1): 30-32.
- [13] 丁慧强. 支气管肺泡灌洗液 CEA、VEGF 测定在肺癌诊断中的应用价值 [D]. 芜湖:皖南医学院, 2015.
- [14] Bast RC Jr, Berek JS, Obrist R, et al. Intraperitoneal

- immunotherapy of human ovarian carcinoma with *Corynebacterium parvum* [J]. Cancer Res, 1983, 43(3): 1395-1401.
- [15] 林敏, 农天雷. 肺泡灌洗液中 CEA、CA125、CA15-3、CYFRA21-1 检测的临床价值 [J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(5): 328-330.
- [16] Li X, Asmitananda T, Gao L, et al. Biomarkers in the lung cancer diagnosis: a clinical perspective [J]. Neoplasma, 2012, 59(5): 500-507.
- [17] Cedrés S, Nuñez I, Longo M, et al. Serum tumor markers CEA, CYFRA21-1, and CA-125 are associated with worse prognosis in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. Clin Lung Cancer, 2011, 12(3): 172-179.
- [18] Ghosh I, Bhattacharjee D, Das AK, et al. Diagnostic role of tumour markers CEA, CA15-3, CA19-9 and CA125 in lung cancer [J]. Indian J Clin Biochem, 2013, 28(1): 24-29.
- [19] 王俊艳, 刘皓, 刘金宝, 等. 碘过量对后代鼠脑 NSE 和 GFAP 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1): 18-21.
- [20] Bonner JA, Sloan JA, Rowland KM Jr, et al. Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(2): 597-601.
- [21] Pina TC, Zapata IT, Hernández FC, et al. Tumour markers in serum, bronchoalveolar lavage and biopsy cytosol in lung carcinoma: what environment lends the optimum diagnostic yield? [J]. Clin Chim Acta, 2001, 305(1-2): 27-34.
- [22] Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC, et al. Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer [J]. Lancet, 1982, 1(8272): 583-585.
- [23] Jørgensen LG, Osterlind K, Genollá J, et al. Serum neuron-specific enolase (S-NSE) and the prognosis in small-cell lung cancer (SCLC): a combined multivariable analysis on data from nine centres [J]. Br J Cancer, 1996, 74(3): 463-467.
- [24] Cao C, Chen ZB, Sun SF, et al. Evaluation of VEGF-C and tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis [J]. Sci Rep, 2013, 3(1): 137-158.
- [25] 鞠方鹤, 肖祖克. 肺癌肿瘤标志物的研究近况 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2010, 50(2): 134-136.
- [26] 罗玲, 王江红. 支气管肺泡灌洗液 SCCA、CYFRA21-1、CEA 联合检测在肺癌诊断中的价值 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(11): 1716-1718.
- [27] 王磊. 不同临床分期肺鳞状细胞癌患者血清及 BALF 中肿瘤标志物水平变化及动态检测的意义 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2019, 29(22): 77-78.
- [28] 郭勇坚, 于宪, 陈飞鹏, 等. 支气管灌洗液 SCC、CEA、CYFRA21-1、NSE、CA50 检测对肺癌的诊断价值 [J]. 中国内镜杂志, 2002, 8(9): 14-15.
- [29] Dohmoto K, Hojo S, Fujita J, et al. The role of caspase 3 in producing cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) in human lung cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 2001, 91(4): 468-473.
- [30] Toubimis M, Rasidakis A, Passalidou E, et al. Evaluation of CYFRA 21-1 in malignant and benign pleural effusions [J]. Anticancer Res, 1996, 16(4A): 2101-2104.
- [31] Pujol JL, Grenier J, Daurès JP, et al. Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer [J]. Cancer Res, 1993, 53(1): 61-66.
- [32] 吴佳玲, 罗丹. 5 项血清肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(14): 1885-1886.
- [33] 杨国彪, 徐萌敏, 徐亮, 等. 肺泡灌洗液 LDH、CYFRA21-1、PCT 水平联合检测诊断肺癌临床价值探讨 [J]. 中国现代医生, 2020, 58(9): 111-114.
- [34] 赵宝祥, 李华, 张亚君, 等. 胃泌素释放前体、神经元特异性烯醇化酶和癌胚抗原在小细胞肺癌中的诊断价值 [J]. 癌症进展, 2020, 18(10): 1012-1014.
- [35] Cuttitta F, Fedorko J, Gu JA, et al. Gastrin-releasing peptide gene-associated peptides are expressed in normal human fetal lung and small cell lung cancer: a novel peptide family found in man [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 67(3): 576-583.
- [36] 王艳海, 赵娜, 杨树帆. 4 项肿瘤标志物在肺癌诊断中的应用价值 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(9): 1180-1182.
- [37] Okamura K, Takayama K, Izumi M, et al. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer [J]. Lung Cancer, 2013, 80(1): 45-49.
- [38] 汤海波, 鲁菲. CEA、糖类抗原 199、糖类抗原 125 联合检测在肺癌诊断中的价值 [J]. 医学理论与实践, 2020, 33(14): 2374-2375.
- [39] Cremades MJ, Menéndez R, Pastor A, et al. Diagnostic value of cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1) in bronchoalveolar lavage fluid in lung cancer [J]. Respir Med, 1998, 92(5): 766-771.
- [40] 邓丽平, 董文, 杜艳萍, 等. 支气管肺泡灌洗液和血清肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的价值 [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 78-80.
- [41] 陈锐, 胡华成, 胡筠殊, 等. 支气管肺泡灌洗液中 3 种肿瘤标志物检测的临床价值 [J]. 苏州大学学报(医学版), 2003, 23(3): 336-338.
- [42] 罗世林, 吴龙飞, 李杰, 等. 肺泡灌洗液中葡萄糖、腺苷脱氨酶、癌胚抗原检测在肺癌中的诊断价值 [J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(10): 1772-1775.
- [43] Zhang S, Zhao YF, Zhang MZ, et al. The diagnostic value of tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid for the peripheral pulmonary carcinoma [J]. Clin Respir J, 2017, 11(4): 481-488.
- [44] Tomita M, Shimizu T, Ayabe T, et al. Prognostic significance of tumour marker index based on preoperative CEA and CYFRA 21-1 in non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2010, 30(7): 3099-3102.
- [45] Li J, Chen P, Mao CM, et al. Evaluation of diagnostic value of four tumor markers in bronchoalveolar lavage fluid of peripheral lung cancer [J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2014, 10(2): 141-148.

栗燕云,赵卫华. 紫杉醇在白血病治疗中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 146-150.
Su YY, Zhao WH. Research progress of paclitaxel in the treatment of leukemia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 146-150.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 023

紫杉醇在白血病治疗中的研究进展

栗燕云,赵卫华*

(广西医科大学第一附属医院血液内科,南宁 530000)

【摘要】 白血病是一类典型的、以白血病细胞无限增殖为主要特征的血液系统恶性肿瘤,具有较高的致死率。紫杉醇是一种天然抗癌药物,因其具有独特的抗癌效应已被广泛用于多种恶性肿瘤的化疗。但是,有关紫杉醇在白血病中应用的实验研究相对较少。本文现就紫杉醇治疗白血病的实验研究展开综述。
【关键词】 紫杉醇;白血病;治疗
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0146-05

Research progress of paclitaxel in the treatment of leukemia

SU Yanyun, ZHAO Weihua*

(Department of hematology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China)

【Abstract】 Leukemia is a kind of hematological malignance characterized by the clonal expansion of leukemic cells and has a high lethality. Paclitaxel is a natural anticancer drug that has been widely used in chemotherapy against multiple malignancies because of its unique anticancer effects. However, there are relatively few studies of paclitaxel use in the treatment of leukemia. This paper reviewed the researchs of paclitaxel in the treatment of leukemia.
【Keywords】 paclitaxel; leukemia; treatment

白血病(leukemia, AL)是一类起源于造血系统、具有高度异质性的恶性克隆性疾病,其主要特点为原始白细胞在骨髓、外周血及其他器官组织中的克隆性增殖,严重影响人体的骨髓及淋巴系统导致高致死率。白血病的发病率在全国肿瘤中位列前十,是0~14岁儿童最为常见的恶性肿瘤之一,约占28%^[1]。据统计,2015年白血病在我国肿瘤新发病例数中占1.75%,死亡率占1.89%,在0~35岁成年男性与女性恶性肿瘤中均占首位^[2]。目前对于白血病的治疗主要包括传统的化疗以及造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT),此外还有放疗、分子靶向治疗等。众所周

知,紫杉醇是一种具有独特抗癌特性的化疗药物,被认为是目前最成功的天然抗癌药物之一^[3]。紫杉醇属于微管蛋白聚合剂,不仅能稳定微管阻止癌细胞生长,抑制细胞有丝分裂将细胞长期阻滞在G2/M期,还能调控Bcl-2、caspase-3等凋亡相关因子诱导癌细胞凋亡,而且还可作用于多种免疫细胞直接杀死癌细胞,如自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞^[4]等。早在1971年,Wani等^[5]就利用白血病移植瘤小鼠模型,初步验证紫杉醇具有抑制白血病效应。随后,更多国内外学者开展了关于紫杉醇抗白血病的研究并取得了杰出成果。本文将对紫杉醇在白血病治疗中的应用及其作用机制做一综述。

[作者简介] 栗燕云(1993—),女,硕士研究生,研究方向:内科学。Email: 1394400362@qq.com
[通信作者] 赵卫华(1973—),女,博士,主任医师,教授,研究方向:急性白血病。Email: zhaowh21@163.com

1 紫杉醇的抗白血病作用机制

紫杉醇对白血病具有一定的抑制作用,对不同的白血病细胞类型,其作用机制有所不同,包括阻滞细胞周期、促进细胞凋亡以及诱导细胞坏死^[6]等,其中又以诱导细胞凋亡研究地较为深入。目前认为,紫杉醇主要通过以下几种途径促进白血病细胞凋亡进而达到其抗癌效果:(1)抑制死亡结构域沉默子(SODD)及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,激活凋亡相关蛋白 caspase-3^[7]。此外,利用 RNA 干扰技术下调 SODD 基因的表达还可提高白血病细胞对紫杉醇的敏感性^[7]。除了 Bcl-2,紫杉醇诱导白血病细胞凋亡还与 Bcl-2 家族的新成员 Bcl-2l12 的表达下调有关^[8]。(2)诱导细胞产生活性氧(ROS)激活 JNK 信号通路,活化的 JNK 信号通路既可促进 Bcl-2 的磷酸化,增强 caspase-3、caspase-9 的活性,又可促进细胞色素 C 的释放以及 caspase-3 酶原和 PARP 的裂解^[9-11]。而另一项研究报道称,紫杉醇诱导白血病细胞凋亡与 JNK 信号通路的激活无关^[12]。研究表明,紫杉醇对 JNK 信号通路的活化具有细胞特异性。(3)抑制核转录因子 NF- κ B 的激活,一方面可以减少 γ -GCS 的表达,降低细胞内 GSH 的水平,据报道,耐药相关蛋白如 MRP1、MRP2 只有在 GSH 存在的情况下才能将化疗药物泵出细胞外。另一方面还可改变 Bax/Bcl-2 的比值,激活 caspase-3、caspase-9^[13-14]。(4)促进微管不稳定蛋白 Stathmin1 发生磷酸化失活,抑制其与微管的结合,促进微管稳定从而诱导凋亡^[15]。值得一提的是,紫杉醇和 Stathmin1 对微管的作用是相互拮抗的,所以白血病细胞中 Stathmin1 的异常高表达会在一定程度上影响细胞对紫杉醇的敏感性,甚至产生耐药^[16]。鉴于此,可考虑采用靶向干扰 Stathmin1 的表达与紫杉醇联合方案以提高其化疗敏感性,该联合方案已在肺癌等多种癌细胞系中开展,结果令人满意^[17]。除了上述机制,Perkins 等^[18]研究表明,Apaf-1 过表达可增强紫杉醇诱导白血病细胞凋亡的作用,Apaf-1 可通过促进细胞色素 c 释放、降低线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$),增加活性氧(OS)的产量进而激活 caspase-3、caspase-9 诱导凋亡,是紫杉醇诱导凋亡作用强弱的重要决定分子。综上所述,紫杉醇诱导白血病细胞凋亡与抗凋亡蛋白 Bcl-2、凋亡相关蛋白 caspase,尤其是 caspase-3 密不可分。

2 紫杉醇与其他药物协同抗癌

由于紫杉醇具有较强的联合效应,常将紫杉醇与其他药物联合使用以克服其单独用药时出现的耐药问题,增强紫杉醇的抗肿瘤作用^[19]。(1)紫杉醇联合姜黄素类似物:姜黄素(Curcumin)及其类似物被认为是一种化疗增敏剂及放疗增敏剂,既可抑制 NF- κ B、STAT3、COX、Akt 等基因的表达发挥其抗肿瘤活性^[20],又可通过抑制 P-gp 的表达或 P-gp 的功能显著增强 K562/Adr 细胞对紫杉醇的敏感性,逆转细胞的多重耐药^[21]。(2)紫杉醇联合 AG1024:AG1024 是一种酪氨酸激酶抑制剂,紫杉醇与 AG1024 联合使用既可抑制癌基因 Bcr-Abl 的表达,还可抑制 PI3K/AKT 信号通路进而增强紫杉醇的抗白血病作用,逆转细胞耐药^[22]。(3)紫杉醇联合 ABT-737:ABT-737 是一种 BH3 模拟物,后者通过模拟 BH3-only 蛋白上重要的氨基酸残基,占据 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的功能区—BH3 沟槽,直接抑制 Bcl-2、Bcl-xL 等的活性,将促凋亡蛋白 t-Bid、Bad 及 Bim 释放出来,从而发挥其抗癌活性。ABT-737 与紫杉醇联合使用不仅能抑制抗凋亡蛋白 MCL-1 的活性,促进 Bim 释放,还能通过 JNK/Bim 信号通路最大程度的提高细胞内 Bim 的水平增强紫杉醇的抗白血病效应^[23]。然而,最新的一项研究发现,BH3 的另一模拟物 ABT-199 与紫杉醇联合作用于白血病细胞呈现出的是拮抗效应而非协同效应,可能是由于紫杉醇诱导的 Bcl-2 磷酸化阻碍了 ABT-199 将 Bax 及 Bim 从磷酸化的 Bcl-2 中释放出来^[24]。值得一提的是,Bcl-2 磷酸化与慢性髓系白血病细胞对 BH3 模拟物产生耐药密切相关^[25]。(4)紫杉醇联合 Thiamet-G:Thiamet-G 是一种 OGA 糖苷酶抑制剂,它能够通过扰乱微管的动态平衡,与紫杉醇产生协同作用,增强白血病细胞对紫杉醇的敏感性,两者联合使用能够发挥更大的细胞毒性^[26]。(5)紫杉醇联合二甲双胍:二甲双胍是一种被广泛用于治疗 2 型糖尿病的口服降糖药^[27]。近年来,大量的流行病学及临床研究表明,二甲双胍可通过抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡等途径抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖与生长,包括白血病^[28-29],具有明显的抗肿瘤效应^[30-32]。此外,二甲双胍还能增强耐药细胞的化疗敏感性。例如,二甲双胍与传统化疗药物阿糖胞苷联合能够显著抑制白血病细胞的增殖并诱导其凋亡,增强耐药细胞对

阿糖胞苷的敏感性,其机制可能与 mTORC1/P70S6K 信号通路受抑以及细胞周期阻滞有关^[33]。紫杉醇与二甲双胍亦具有较强的协同效应,两者联合调控多种信号转导通路相关分子的表达,如细胞周期、细胞凋亡相关分子以及 NF- κ B、MAP/ MAPK 通路相关分子等,从而促进白血病细胞凋亡,并诱导细胞分化^[34]。(6)其他:苔藓抑素 1 (bryostatin 1) 可通过上调肿瘤坏死因子 TNF- α 的表达增强紫杉醇诱导凋亡的作用,两者联合能够显著促进细胞色素 c 及 Smac/DIABLO 从线粒体释放,促进与凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶 caspase 的激活、促凋亡蛋白 Bid 的裂解以及诱导白血病细胞凋亡^[35];三氧化二砷是治疗急性早幼粒细胞白血病的一线临床用药,与紫杉醇一样,三氧化二砷的作用靶点也是微管蛋白,故可增强白血病细胞对紫杉醇的敏感性。两者联合能够激活 CDK1,增强纺锤体检查点,明显阻滞细胞周期,抑制细胞活性及诱导细胞凋亡^[36]。此外,国内学者赖洵等^[37]研究发现,紫杉醇与 INF α -2b 联合对 K562 细胞的诱导凋亡作用明显增强,可能与 INF α -2b 明显抑制细胞中 Bcr-Abl 的表达有关。去甲斑蝥素(NCTD)是提取自斑蝥属昆虫的抗肿瘤药物,主要通过诱导 G2/M 期阻滞以及细胞凋亡发挥其抗肿瘤效应。潘敏等^[38]报道称,NCTD 可通过线粒体途径凋亡信号,即上调促凋亡分子 Bax、Bim 的表达并抑制 Bcl-2 的表达,增强紫杉醇诱导 K562 细胞凋亡的效应。

3 紫杉醇联合物理因素及其制剂类型

除了与其他药物联合使用,将紫杉醇与电磁辐射线、低能离子束、超声波等物理因素结合也能增强其抗肿瘤活性。据报道,8.8 mT 静磁场(SMF)结合紫杉醇对 K562 细胞的细胞毒性效应显著大于单独使用静磁场或紫杉醇的细胞毒性效应,其机制可能与 DNA 损伤及其导致的细胞周期阻滞有关^[39]。而低水平超声能够增加细胞膜的通透性,提高细胞内紫杉醇的水平从而增强紫杉醇对慢性粒细胞性白血病细胞的抗肿瘤效应^[40]。基于紫杉醇的溶解度低、组织选择性较差以至于毒副作用也较大等特点,改变紫杉醇的制剂类型也能在一定程度上增强其抗肿瘤作用。例如,紫杉醇纳米胶束显著提高促凋亡蛋白 Bax、caspase-3、caspase-9、PARP 的表达水平,增强其对白血病细胞的促凋亡作用的同时,还能减少临床用药量、减轻或消除毒副作用^[41]。但

是,纳米胶束或纳米颗粒的肿瘤靶向特异性较差,而转铁蛋白修饰的携载紫杉醇脂质纳米颗粒(TPLN)则可靶向性地将紫杉醇递送到白血病细胞中,提高细胞内的药物浓度,与非靶向性的紫杉醇纳米颗粒(PLN)相比,TPLN 呈现更强的细胞毒性,并能显著提高细胞凋亡的水平,其毒副作用也相对减轻^[42]。

4 紫杉醇治疗白血病的局限性

尽管已有诸多的实验研究证明紫杉醇具有一定的、明确的抗白血病效应,但是将紫杉醇用于治疗白血病患者的 I、II 期临床试验结果却发现,与其他抗白血病药物相比,紫杉醇的抗白血病作用较弱^[43]。Colburn 等^[44]开展的临床试验研究也表明,紫杉醇对于难治/复发的急性淋巴细胞性白血病患者(ALL)的作用是有限的。限制紫杉醇对白血病治疗效果及其临床应用的可能原因有:(1)多药耐药蛋白—P-糖蛋白仅在 CD34⁺ 的 AML 细胞中异常表达,故与 CD34⁻ 的 AML 细胞相比,紫杉醇对 CD34⁺ 的 AML 细胞的抑制作用较弱^[43];(2) CML 中的 Bcr-Abl 融合基因突变可激活其下游因子 PKC ϵ ,后者诱导紫杉醇反式激活转录因子 NF- κ B,而 NF- κ B 可激活多种抗凋亡蛋白如 Bcl-XL、IEX-1 L 等基因的转录,最终导致白血病细胞对紫杉醇产生耐药^[45];(3)对健康组织的剂量限制性毒副作用,尤其是骨髓抑制。临床研究显示紫杉醇的抗白血病有效剂量为 250~290 mg/m²,然而在此剂量范围内,骨髓抑制表现明显,限制了加大紫杉醇剂量治疗白血病的应用^[37]。此外,多项研究表明^[46-48],继发性白血病与紫杉醇治疗两者间存在一定关系,这可能也是限制紫杉醇应用于白血病治疗的原因之一。

5 结语

白血病是一组具有高度异质性的血液系统恶性肿瘤,传统的标准化疗仍是目前白血病治疗的主要方法。而紫杉醇作为一种抗肿瘤药物,已被广泛用于肺癌、乳腺癌等实体瘤的常规化疗。目前,国内外关于将紫杉醇用于白血病治疗的研究相对较少,且多数实验研究仅局限于细胞水平,相关机制研究也主要集中于诱导细胞凋亡,而早期少有的临床试验结果也不甚令人满意。但是开发一种新药并将之用于临床并非易事,即使应用于临床价格往往较为昂贵且可能供不应求,而紫杉醇价格便宜,

也能满足普通病人的需求。此外,近年来,分子靶向药物与紫杉醇等化疗药物联合使用以克服耐药问题,增强药物抗肿瘤性的治疗策略备受青睐,仅从这一角度上讲,将紫杉醇用于白血病的治疗仍有很大的研究空间,可进行更为深入广泛的体外、体内实验,寻找更优的治疗方案,克服紫杉醇治疗白血病的局限性。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Zhu L, Chen L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy [J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24: 40.
- [4] Vassileva V, Allen CJ, Piquette-Miller M. Effects of sustained and intermittent paclitaxel therapy on tumor repopulation in ovarian cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(3): 630-637.
- [5] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. J Am Chem Soc, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [6] Xia RL, Lu Y, Zhu LN, et al. Different regulatory pathways are involved in the proliferative inhibition of two types of leukemia cell lines induced by paclitaxel [J]. Oncol Rep, 2013, 30(4): 1853-1859.
- [7] 陶红芳, 方建林, 刘元生, 等. 紫杉醇下调死亡结构域沉默子表达促进白血病细胞凋亡新机制研究 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(11): 862-865.
- [8] Thomadaki H, Floros KV, Scorilas A. Molecular response of HL-60 cells to mitotic inhibitors vincristine and taxol visualized with apoptosis-related gene expressions, including the new member BCL2L12 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171(1): 276-283.
- [9] Shiah SG, Chuang SE, Kuo ML. Involvement of Asp-Glu-Val-Asp-directed, caspase-mediated mitogen-activated protein kinase kinase 1 Cleavage, c-Jun N-terminal kinase activation, and subsequent Bcl-2 phosphorylation for paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells [J]. Mol Pharmacol, 2001, 59(2): 254-262.
- [10] Meshkini A, Yazdanparast R. Involvement of oxidative stress in taxol-induced apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(4): 357-365.
- [11] Peng ZG, Liu DC, Yao YB, et al. Paclitaxel induces apoptosis in leukemia cells through a JNK activation-dependent pathway [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(1): 15013904.
- [12] Stadheim TA, Xiao H, Eastman A. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK) mediates cell cycle phase independent apoptosis in vinblastine-treated ML-1 cells [J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1533-1540.
- [13] Santos-Silva MC, Freitas MS, Assreuy J. Involvement of NF-kappaB and glutathione in cytotoxic effects of nitric oxide and

- taxol on human leukemia cells [J]. Leuk Res, 2006, 30(2): 145-152.
- [14] Borst P, Evers R, Kool M, et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(16): 1295-1302.
- [15] Machado-Neto JA, Rodrigues Alves APN, Fernandes JC, et al. Paclitaxel induces Stathmin 1 phosphorylation, microtubule stability and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells [J]. Heliyon, 2017, 3(9): e00405.
- [16] Bai T, Yokobori T, Altan B, et al. High STMN1 level is associated with chemo-resistance and poor prognosis in gastric cancer patients [J]. Br J Cancer, 2017, 116(9): 1177-1185.
- [17] Long D, Yu T, Chen X, et al. RNAi targeting STMN alleviates the resistance to taxol and collectively contributes to down regulate the malignancy of NSCLC cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Biol Toxicol, 2018, 34(1): 7-21.
- [18] Perkins C, Kim CN, Fang G, et al. Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel-or etoposide-treated HL-60 cells [J]. Cancer Res, 1998, 58(20): 4561-4566.
- [19] Li F, Zhao C, Wang L. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials [J]. Int J Cancer, 2014, 134(6): 1257-1269.
- [20] Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs [J]. Nutr Cancer, 2010, 62(7): 919-930.
- [21] Mapoung S, Pitchakarn P, Yodkeeree S, et al. Chemosensitizing effects of synthetic curcumin analogs on human multi-drug resistance leukemic cells [J]. Chem Biol Interact, 2016, 244: 140-148.
- [22] Cheng HY, Ko FH. Studying the enhancement of programmed cell death by combined AG1024 and paclitaxel in a model of chronic myelogenous leukemia [J]. Life Sci, 2014, 102(2): 118-126.
- [23] Song T, Chai G, Liu Y, et al. Mechanism of synergy of BH3 mimetics and paclitaxel in chronic myeloid leukemia cells: Mcl-1 inhibition [J]. Eur J Pharm Sci, 2015, 70: 64-71.
- [24] Song T, Zhang M, Liu P, et al. Identification of JNK1 as a predicting biomarker for ABT-199 and paclitaxel combination treatment [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 155: 102-109.
- [25] Song T, Chai G, Liu Y, et al. Bcl-2 phosphorylation confers resistance on chronic lymphocytic leukaemia cells to the BH3 mimetics ABT-737, ABT-263 and ABT-199 by impeding direct binding [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(3): 471-483.
- [26] Ding N, Ping L, Shi Y, et al. Thiamet-G-mediated inhibition of O-GlcNAcase sensitizes human leukemia cells to microtubule-stabilizing agent paclitaxel [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(3): 392-397.
- [27] Ferrannini E. The Target of metformin in type 2 diabetes [J]. New England Journal of Medicine, 2014, 371(16): 1547-1548.
- [28] Ikhlas S, Ahmad M. Metformin: Insights into its anticancer

- potential with special reference to AMPK dependent and independent pathways [J]. *Life Sci*, 2017, 185: 53–62.
- [29] Rosilio C, Ben-Sahra I, Bost F, et al. Metformin: a metabolic disruptor and anti-diabetic drug to target human leukemia [J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(2): 188–196.
- [30] He K, Hu H, Ye S, et al. The effect of metformin therapy on incidence and prognosis in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2218.
- [31] Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(9): 778–790.
- [32] Deng J, Peng M, Wang Z, et al. Novel application of metformin combined with targeted drugs on anticancer treatment [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 23–30.
- [33] Yuan F, Cheng C, Xiao F, et al. Inhibition of mTORC1/P70S6K pathway by Metformin synergistically sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Ara-C [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117276.
- [34] Asik A, Kayabasi C, Ozmen Yelken B, et al. Antileukemic effect of paclitaxel in combination with metformin in HL-60 cell line [J]. *Gene*, 2018, 647: 213–220.
- [35] Wang S, Wang Z, Dent P, et al. Induction of tumor necrosis factor by bryostatin 1 is involved in synergistic interactions with paclitaxel in human myeloid leukemia cells [J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3648–3657.
- [36] Duan XF, Wu YL, Xu HZ, et al. Synergistic mitosis-arresting effects of arsenic trioxide and paclitaxel on human malignant lymphocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 183(1): 222–230.
- [37] 赖洵, 闻艳, 华映坤, 等. 紫杉醇联合 IFN α -2b 明显增强对 K652 细胞的诱导凋亡作用 [J]. *医学研究杂志*, 2006, 35(2): 35, 48.
- [38] 潘敏, 赵轶, 蒲丹, 等. 去甲斑蝥素和紫杉醇联合诱导白血病细胞 K562 凋亡 [J]. *武警医学*, 2012, 23(10): 845–847.
- [39] Sun RG, Chen WF, Qi H, et al. Biologic effects of SMF and paclitaxel on K562 human leukemia cells [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(1): 1–10.
- [40] Yang S, Wang P, Wang X, et al. Efficacy of combined therapy with paclitaxel and low-level ultrasound in human chronic myelogenous leukemia cell line K562 [J]. *J Drug Target*, 2013, 21(9): 874–884.
- [41] Wang Y, Zhou L, Xiao M, et al. Nanomedicine-based paclitaxel induced apoptotic signaling pathways in A562 leukemia cancer cells [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 149: 16–22.
- [42] Dai Y, Huang J, Xiang B, et al. Antiproliferative and apoptosis triggering potential of paclitaxel-based targeted-lipid nanoparticles with enhanced cellular internalization by transferrin receptors-a study in leukemia cells [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2018, 13(1): 271.
- [43] Al-almi O, Sammons J, Martin JH, et al. Divergent effect of taxol on proliferation, apoptosis and nitric oxide production in MHH225 CD34 positive and U937 CD34 negative human leukaemia cells [J]. *Leuk Res*, 1998, 22(10): 939–945.
- [44] Colburn DE, Thomas DA, Giles FJ. Phase II study of single agent paclitaxel in adult patients with relapsed acute lymphocytic leukemia [J]. *Invest New Drugs*, 2003, 21(1): 109–111.
- [45] Lu Y, Jamieson L, Brasier AR, et al. NF-kappaB/RelA transactivation is required for atypical protein kinase C iota-mediated cell survival [J]. *Oncogene*, 2001, 20(35): 4777–4792.
- [46] See HT, Thomas DA, Bueso-Ramos C, et al. Secondary leukemia after treatment with paclitaxel and carboplatin in a patient with recurrent ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(1): 236–240.
- [47] Seymour JF, Juneja SK, Campbell LJ, et al. Secondary acute myeloid leukemia with inv(16): report of two cases following paclitaxel-containing chemotherapy and review of the role of intensified ara-C therapy [J]. *Leukemia*, 1999, 13(11): 1735–1740.
- [48] Yeasmin S, Nakayama K, Ishibashi M, et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia following paclitaxel- and carboplatin-based chemotherapy in an ovarian cancer patient: a case report and literature review [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18(6): 1371–1376.

〔收稿日期〕2020–10–21