

许永劫,许雯,陈钢,等. 2 种高糖诱导海马神经元模型应用及优势比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 1-8.
Xu YJ, Xu W, Chen G, et al. Application and comparison of the advantages of two high-glucose-induced hippocampal neuron models [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 1-8.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 001

2 种高糖诱导海马神经元模型应用及优势比较

许永劫^{1,3}, 许雯², 陈钢², 林海容², 黄昶煜东², 朱丽英², 潘卫^{1,2,3*}

(1. 贵州医科大学附属医院产前诊断中心, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550025;
3. 贵州医科大学公共卫生学院, 贵阳 550025)

【摘要】 目的 比较 2 种高糖诱导海马神经元模型优缺点, 探讨 2 种细胞模型在不同情况下应用效果。**方法** 体外培养原代海马神经元和 HT-22 海马神经元细胞系, 分为对照组和高糖组。神经元纯度鉴定, 细胞活力检测, 转染试剂对细胞活性和转染效率的影响, 流式细胞术观察细胞凋亡情况, Western blot 检测凋亡蛋白表达情况。**结果** 原代海马神经元纯度 85% 以上; 成功复制 2 种高糖诱导神经元细胞模型; 高糖作用时间 48 h, 原代海马神经元细胞活性稳定在 80%, HT-22 细胞活性达 95% 以上; 不同种脂质体转染试剂均能损伤 2 种细胞模型, LipoRNAiMax 毒性较小, 其中 HT-22 细胞受损小, HT-22 细胞转染效率较高; 2 种模型细胞凋亡显著 ($P<0.05$), 其中原代神经元凋亡率更高, 凋亡蛋白 Bcl-2 均表达下降, 原代神经元 Bax 表达增高 ($P<0.05$), HT-22 细胞中 Bax 表达无差异。**结论** 2 种高糖诱导海马神经元细胞模型具备不同的优缺点, 细胞模型的选择应根据实际情况考虑。

【关键词】 糖尿病脑病; 海马神经元; 细胞模型; 应用优势

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0001-08

Application and comparison of the advantages of two high-glucose-induced hippocampal neuron models

XU Yongjie^{1,3}, XU Wen², CHEN Gang², LIN Hairong², HUANG Changyudong², ZHU Liying², PAN Wei^{1,2,3*}

(1. Prenatal Diagnosis Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China.
2. School of Laboratory Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025.
3. School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

【Abstract】 Objective To compare the advantages and disadvantages of two high-glucose-induced hippocampal neuron models, and explore their application in different situations. **Methods** Primary hippocampal neurons and HT-22 hippocampal neuron cell lines were cultured *in vitro* and divided into control and high glucose groups. Neurons were purified and cell viability was measured. The effect of transfection reagents on cell viability and transfection efficiency was determined and flow cytometry was used to observe cell apoptosis. Western blot was used to detect apoptotic protein expression. **Results** The purity of primary hippocampal neurons was >85%. Two high-glucose-induced neuronal cell models were successfully modeled. The high-glucose action time was 48 hours, the activity of primary neurons was stable at 80%, and the activity of HT-22 cells was >95%. The liposome transfection reagents caused damage in the two cell models. LipoRNAiMax was less toxic to HT-22 cells, which also had a high transfection efficiency. The two models showed

【基金项目】 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81960151, 81960822); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字 [2018] 021 号); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2019] 2802 号); 贵州省区域内一流学科建设项目-公共卫生与预防医学 (黔教科研发 2017 [85] 号)。

【作者简介】 许永劫 (1994—), 男, 博士研究生, 研究方向: 从事糖尿病并发症领域。E-mail: 422526543@qq.com

【通信作者】 潘卫 (1966—), 女, 博士, 博士生导师教授, 研究方向: 从事糖尿病并发症研究。E-mail: pw_6602@sina.com

significant apoptosis, compared with the primary neuron control group, the apoptosis rate of the primary neuron high glucose group increased, compared with the HT-22 control group, the HT-22 high glucose group increased cell apoptosis ($P < 0.05$). Compared with HT-22 high glucose group, the apoptotic rate of primary neurons high glucose group was higher, the expression of apoptotic protein Bcl-2 was decreased, and the expression of Bax was increased in primary neurons ($P < 0.05$). Compared with HT-22 control group, there was no difference in the expression of Bax in HT-22 high glucose group.

Conclusions The two high-glucose-induced hippocampal neuron cell models had different advantages and disadvantages. The choice of cell model should be considered based on actual conditions.

【Keywords】 diabetic encephalopathy; hippocampal neurons; cell model; application advantages

糖尿病是急需攻克的世界性重大疾病,发病人数多,并发症多^[1]。糖尿病脑病是糖尿病的重大并发症之一,缺乏有效的预防和治疗方案,这与其发病机制不明有密切关系^[2-3]。糖尿病脑病的发病机制复杂,目前研究均未能阐释其发病机制^[4-6]。

由于糖尿病脑病患者临床标本获取困难,多数研究采用动物或细胞模型。研究发现海马区是糖尿病脑病的主要病变区^[7],海马神经元功能直接影响机体认知功能^[8]。现阶段糖尿病脑病细胞模型基于海马神经元进行高糖诱导处理,以求模拟神经元生物学变化过程^[8]。已有研究通过构建高糖诱导原代海马神经元细胞模型、高糖诱导 PC12 大鼠嗜铬瘤细胞系、高糖诱导 HT-22 小鼠海马神经元等^[9-11],研究糖尿病脑病的发病机制,但目前未出现公认的较为稳定和经典的糖尿病脑病细胞模型,这与海马神经元培养困难、细胞不增值、转染效率低下有关。因此,选择适合的细胞模型是研究糖尿病脑病的重要基础。

本课题组一直致力于糖尿病脑病海马神经元机制研究,构建以原代 SD 大鼠海马神经元和 HT-22 小鼠海马神经元的高糖诱导细胞模型,本文旨在通过系统评估 2 种细胞模型的优缺点,为后期不同细胞模型的选择及应用提供数据参考,为糖尿病脑病发病机制的研究提供有效手段。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

100 只出生 24 h 内 SPF 级 SD 大鼠乳鼠,体重 9~11 g,由贵州医科大学动物中心提供[SCXK(黔)2018-0001],实验动物由贵州医科大学动物中心代养[SYXK(黔)2016-003],喂养期间自由饮水进食,室内温度(24±1)℃。所有动物实验均经本校动物实验伦理委员会审核并批准(IACUC-1900620),严格

格遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

HT-22 细胞系购于中乔新舟公司。

1.2 主要试剂与仪器

CCK-8 试剂盒(日本同仁);DMEM 培养基、Neurobasal-A 培养基、B-27 神经元营养因子(美国 Gibco 公司);脂质体 Lipo2000 和 LipoRNAiMax 转染试剂(美国赛默飞);双染凋亡试剂盒(中国凯基);Bax 和 Bcl-2 抗体(武汉三鹰);胎牛血清(以色列 BI);流式细胞仪(Navios,美国贝克曼);倒置荧光显微镜(Ti2-U,日本尼康);Western blot 设备(美国伯乐);细胞培养箱(40 PLATE BIOSOURCE,日本 SANYO);酶标仪(IMARK,美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

按照课题组原代海马神经元培养方式^[12],取乳鼠海马组织,经过消化分离纯化后,以每毫升 1×10^5 个浓度种植到培养瓶中。HT-22 细胞按照课题组培养方式进行复苏、传代,按每毫升 1×10^5 个浓度种植到培养瓶中。原代神经元每 2 d 需半定量换液一次,HT-22 细胞生长至 90%需进行细胞传代处理。

1.3.2 细胞分组

原代海马神经元培养到第 5 天,进行细胞分组,分为原代对照组(25 mmol/L)和原代高糖组(45 mmol/L),高糖作用时间 48 h。选择对数生长期 HT-22 细胞,进行消化、传代后,分为 HT-22 对照组(25 mmol/L)和 HT-22 高糖组(55 mmol/L),高糖作用时间 48 h。

1.3.3 NSE 免疫组织化学染色鉴定神经元纯度

按课题组之前的方法^[12],取培养至第 5 天的原代神经元进行 NES 染色,全部操作严格按照说明书进行。显微镜下观察和计数海马神经元纯度,棕色细胞为海马神经元。

1.3.4 CCK-8 检测 2 种细胞模型活力

原代对照组、原代高糖组神经元和 HT-22 对照组、HT-22 高糖组按每毫升 1×10^5 个浓度种植于 96 孔板中,高糖作用时间 12 h、24 h、48 h 后,按照 CCK-8 试剂盒操作说明,每孔加入 5 μ L CCK-8 试剂,每组需 5 个复孔,避光放置 37℃ 细胞培养箱孵育 2 h 后,上酶标仪 450 nm 波长检测各组细胞活性。

1.3.5 不同转染试剂对神经元模型影响

脂质体 Lipo2000 和 LipoRNAiMax 分别作用于原代对照组、原代高糖组神经元和 HT-22 对照组、HT-22 高糖组,每组按每毫升 1×10^5 个浓度种植于 96 孔板和 6 孔板中,同时设置不加脂质体的原代空白对照组和 HT-22 空白对照组,5 μ L 脂质体和 5 μ L 阴性荧光 siRNA(浓度 20 μ m)按 1:1 比例融入 100 μ L OptiMEM 培养基中,后加入培养板中,作用 5 h 后。细胞换液,按 1.3.4 CCK-8 法检测细胞活力。作用 12 h 后,使用倒置荧光显微镜观察不同转染试剂在海马神经元转染效率。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡

原代对照组、原代高糖组神经元和 HT-22 对照组、HT-22 高糖组到达作用时间后,使用 0.25% 无 EDTA 胰酶消化后,收集细胞,按照双染凋亡试剂盒说明书进行,PBS 洗涤 3 次后收集细胞,加入 500 μ L Buffer 后,分别每孔加入 5 μ L PI 和 FITC 后,室温避光混匀,1 h 内上流式细胞仪检测。

1.3.7 Western blot 检测凋亡蛋白表达情况

收集各组细胞后,按照课题组之前的方法提取细胞总蛋白,采用 BCA 法定量蛋白浓度。按每孔 35 μ g 上样量,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将目的蛋白转印到 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭 2 h 后,加入兔单抗 Bax(1:2000)、Bcl-2(1:2000)、 β -actin(1:5000),4℃ 摇床孵育过夜,第 2 天 TBST 漂洗 3 次后,孵育羊抗兔二抗(1:10000)2 h 后,ECL 法显色,上曝光仪收集图像,Image J 软件分析目的蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

收集整理数据后,采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量数据均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验分析各组数据差异,当 $P < 0.05$ 时,差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代海马神经元培养及鉴定

从 24 h 乳鼠海马中提取原代海马神经元后,种植于培养基中。细胞生长第 1 天,细胞基本贴壁,细胞周围出现光晕(见图 1A);细胞培养至第 3 天,细胞进一步变大呈锥形,突触生长迅速,形成稀疏的网状结构(见图 1B);到第 7 天后,细胞胞体光晕显著,细胞间网络密集(见图 1C);细胞经 NSE 免疫组织化学染色后,阳性细胞为棕黑色(见图 1D),细胞分布均匀,细胞间突触由网络连接,经显微镜下计数,本实验海马神经元纯度达 85%,符合后续试验要求。

2.2 2 种高糖诱导神经元细胞形态变化

在高糖诱导原代海马神经元中,对照组神经元生长状态良好,细胞胞体发亮,突触数量多;高糖组细胞状态较差,细胞胞体变暗、数量减少、突触减少(见图 2)。在高糖诱导 HT-22 小鼠海马神经元中,对照组神经元数量多,状态良好;高糖组细胞数量减少,细胞状态变差(见图 2)。2 种细胞模型中,高糖作用 48 h 后,神经元数量均减少,细胞状态显著下降,提示高糖可损伤神经元。

2.3 2 种高糖诱导神经元细胞活力变化情况

由 CCK-8 法检测不同细胞组的细胞活力,与原代对照组对比,原代高糖组细胞活力随着作用时间延长,细胞活力逐渐下降,到 48 h 作用时间后,细胞活性降到最低(见图 3)。HT-22 对照组细胞活力较高,与 HT-22 对照组对比,HT-22 高糖组细胞活力在 12 h 和 24 h 逐渐下降,但在高糖作用 48 h 后,细胞活力有上升趋势(见图 3)。原代高糖组细胞活性持续下降,而 HT-22 高糖组细胞活力在下降后呈现一个恢复状态。

2.4 不同脂质体对神经元活力影响

我们运用 2 种不同脂质体作用 2 种神经元模型中。由 CCK-8 检测结果可知,2 种脂质体均能导致原代神经元对照组和高糖组神经元大量死亡,导致细胞活力大幅下降($P < 0.05$)(见图 4);2 种脂质体作用 HT-22 对照组和高糖组神经元后,两组细胞均部分死亡,2 组细胞活力有一定程度下降,其中 LipoRNAiMax 对神经元伤害小于 Lipo2000, ($P < 0.05$)(见图 4)。综合以上结果,我们认为原代神经元受脂质体影响较大,不适合后续分子生物学实验

研究,而脂质体 LipoRNAiMax 对 HT-22 神经元细胞毒性小,因此我们后期选择 LipoRNAiMax 作用 HT-22 神经元,进行后续实验。

2.5 不同脂质体对神经元转染效率

上面的结果提示,脂质体 LipoRNAiMax 对神经元的损伤小,因此我们选择该脂质体进行细胞转染。原代海马神经元加入脂质体和阴性荧光 siRNA 后,荧光显微镜下观察细胞发现,对照组和高糖组基本无显著荧光(见图 5),提示细胞转染效率低下;HT-22 海马神经元加入脂质体和阴性荧光 siRNA 后,荧光显微镜激发后,对照组和高糖组观察到大量绿色荧光(见图 5),提示 HT-22 神经元转染效率较高,可用于后续实验。

2.6 2 种高糖诱导神经元细胞凋亡率

采用流式细胞术检测 2 种细胞模型凋亡情况,原代海马神经元高糖组与对照组相比,细胞凋亡显

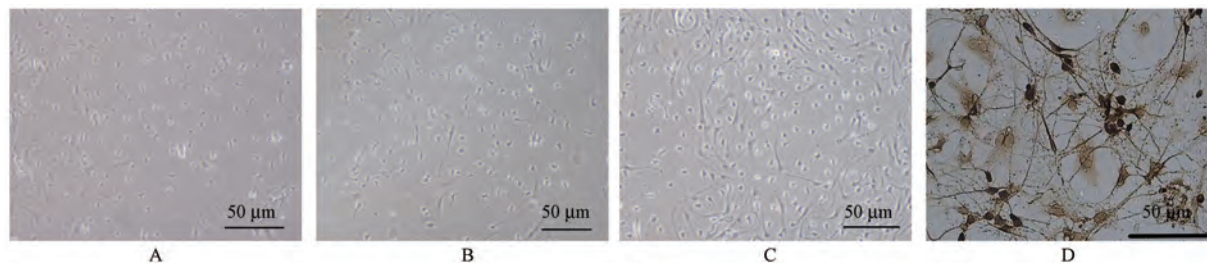
著增加($P<0.05$)(见图 6);HT-22 高糖组较对照组相比,细胞凋亡稍有增加,差异无统计学意义($P<0.05$)(见图 6)。

2.7 2 种高糖诱导神经元细胞凋亡蛋白表达情况

凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达直接关系细胞凋亡水平。Western blot 结果显示,与原代神经元对照组相比,原代高糖组海马神经元中 Bcl-2 表达下降、Bax 表达上升,差异有统计学意义($P<0.05$)(见图 7);与 HT-22 对照组相比,海马神经元中 Bcl-2 表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$),Bax 表达无显著差异(见图 7)。

3 讨论

由于无法获得临床患者样本,现阶段糖尿病脑病发病机制研究多基于细胞模型和动物模型,已有大量实验基于高糖诱导神经元模型探究糖尿病脑

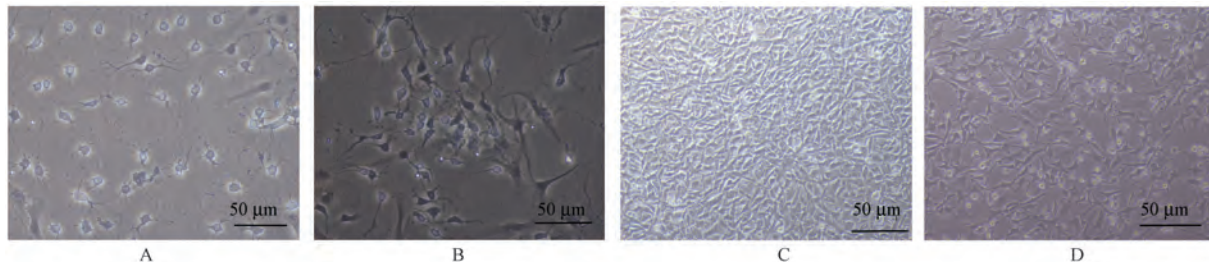


注:A:神经元培养第 1 天;B:神经元培养第 3 天;C:神经元培养第 5 天;D:海马神经元纯度鉴定。

图 1 原代神经元培养及鉴定

Note. A, Culture day 1. B, Culture day 3. C, Culture day 5. D, Hippocampal neuronal cells were identified following immunocytochemical staining with anti neuron specific enolase.

Figure 1 Culture and identification of primary hippocampal neurons



注:A:原代神经元对照组(正常培养至第 7 天);B:原代神经元高糖组(培养至第 5 天后,加高糖培养基继续培养 48 h 至第 7 天);C:HT-22 对照组(正常糖浓度培养 48 h);D:HT-22 高糖组(高糖浓度培养 48 h)。

图 2 2 种高糖诱导海马神经元细胞形态变化

Note. A, Primary neuron control group (Normal culture to day 7). B, Primary neuron high glucose group (After culturing to the 5th day, add high-glucose medium to continue culturing for 48 h to the 7th day). C, HT-22 control group (Normal glucose concentration cultured for 48 h). D, HT-22 high glucose group (High glucose concentration culture for 48 h).

Figure 2 Two kinds of high glucose induce neuronal cell morphology

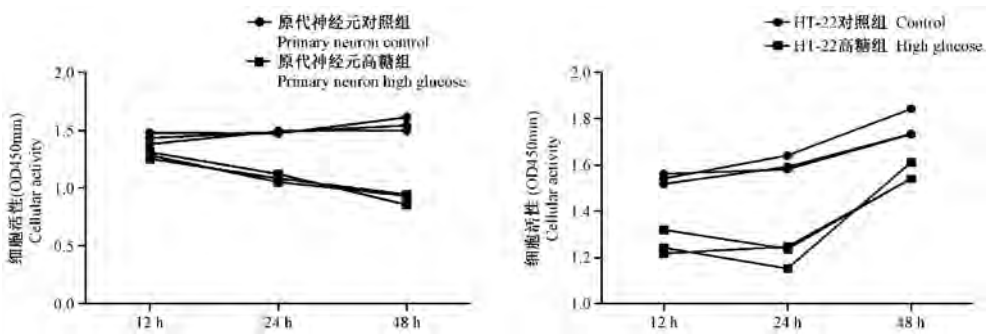
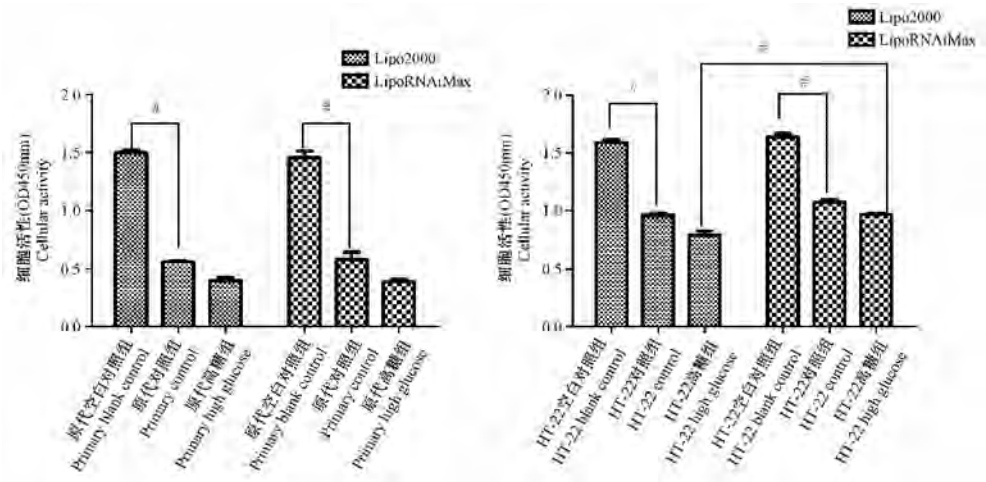


图 3 2 种高糖诱导神经元细胞活性变化

Figure 3 Two kinds of high glucose induced changes in cell viability of neuron model



注:2 组间比较, $^{\#}P<0.05$ 。

图 4 2 种脂质体对神经元活性影响

Note. Comparison between the 2 groups, $^{\#}P<0.05$.

Figure 4 Effect of two kinds of liposomes on neuronal activity

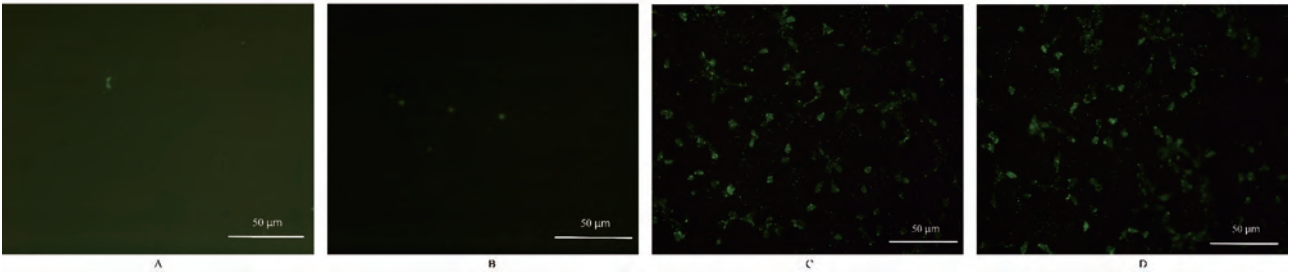
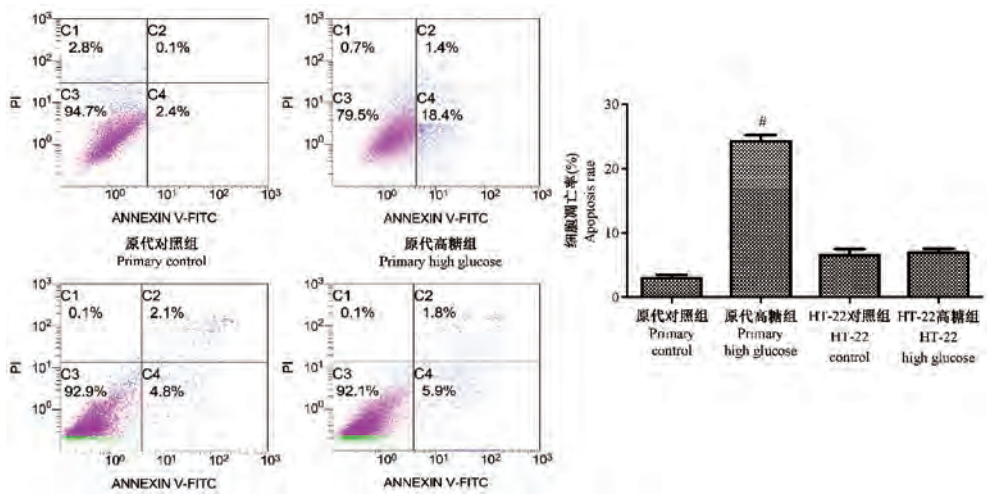


图 5 2 种高糖诱导神经元转染效率

Note. A, Primary neuron control group (Normal culture to day 7). B, Primary neuron high glucose group (After culturing to the 5th day, add high-glucose medium to continue culturing for 48 h to the 7th day). C, HT-22 control group (Normal glucose concentration cultured for 48 h). D, HT-22 high glucose group (High glucose concentration culture for 48 h).

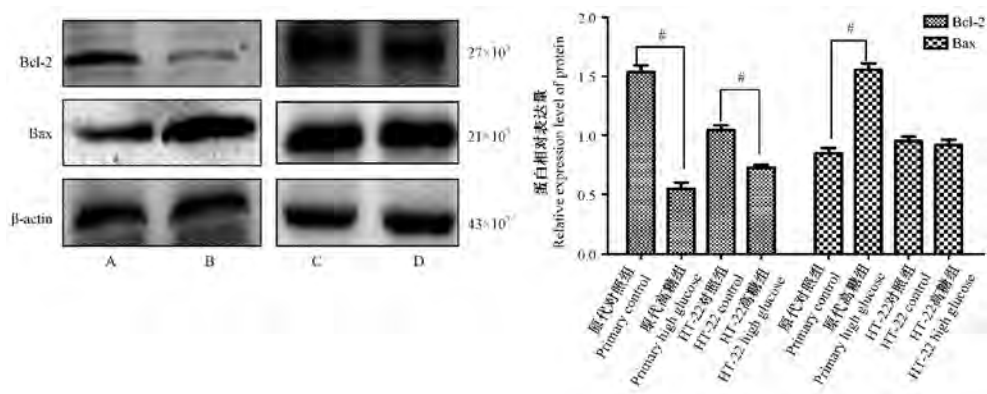
Figure 5 Two kinds of high glucose induce neuronal transfection efficiency



注:与原代对照组比较, $^{\#}P<0.05$ 。
图 6 2 种高糖诱导神经元凋亡情况

Note. Compared with the primary control group, $^{\#}P<0.05$.

Figure 6 Two kinds of high glucose induce neuronal cell apoptosis rate



注:A:原代神经元对照组;B:原代神经元高糖组;C:HT-22 对照组;D:HT-22 高糖组。2 组间比较, $^{\#}P<0.05$ 。

图 7 2 种高糖诱导神经元凋亡蛋白表达情况

Note. A, Primary neuron control group. B, Primary neuron high glucose group. C, HT-22 control group. D, HT-22 high glucose group. Comparison between the 2 groups, $^{\#}P<0.05$.

Figure 7 Two kinds of high glucose induce neuronal apoptosis protein expression

病可能的作用机制。本课题组前期构建 2 种高糖诱导海马神经元细胞模型为糖尿病脑病研究提供参考方法。同时有报道利用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞作为类神经元细胞研究糖尿病脑病,文献报道 PC12 细胞在结构与功能上与神经元类似,相比神经元培养更为简单,因此被运用于神经疾病研究^[13]。本课题组结合文献报道,将实验细胞选为海马神经元,海马区作为认知功能的主要功能结构,其神经元的功能直接影响机体认知^[14-15],PC12 细

胞虽然能一定程度模拟神经元,但依据不能代表海马神经元的生理过程,因此我们将海马神经元作为细胞模型的首选。
大量体外试验证明,海马神经元基础培养糖浓度为 25 mmol/L,该浓度下神经元生长旺盛、突触密集^[16-17]。本文也将 2 种细胞对照组糖浓度设置为 25 mmol/L,所培养原代海马神经元纯度高和 HT-22 海马神经元均长势良好、形成密集的网络结构。为了模拟糖尿病脑病的高糖环境,我们分别按照 2 种

细胞的高糖模型条件给予高糖刺激,随着高糖作用时间的延长,原代神经元细胞活性持续下降,而 HT-22 海马神经元活性在 24 h 达到最低,随后活性上升。我们推测原代海马神经元由于其无法增殖,在高糖环境的持续刺激下,神经元受损严重;而 HT-22 由于其可增殖特性,在高糖环境短暂刺激后,细胞产生一定抗性,加之细胞增值过程中可消耗葡萄糖,糖浓度下降导致细胞活性升高。我们的结果与谭潮航等^[18]研究结果类似,他选择 40 mmol/L 糖浓度作用 HT-22 细胞,但并未发现细胞活力随时间延长升高。因此我们建议若选择 HT-22 细胞作为研究对象,可适当考虑提高糖浓度或缩短作用时间。由于原代海马神经元提取和培养较昂贵、复杂,若课题组经费有限或实验条件不足,可考虑选择 HT-22 细胞,但原代海马神经元源于乳鼠海马组织,更能真实反映神经元的生长发育过程,值得我们考虑。

分子生物学手段是研究基因功能的主要途径,在疾病发病机制中研究运用广泛^[19],常用分子生物学技术如 RNAi 技术、基因过表达载体等已广泛运用在细胞模型中。无论是基因干扰还是基因过表达均离不开细胞转染,大量研究证明神经元存在转染效率低、细胞易受损等问题,这极大限制了后续研究^[20]。常用的转染方式有磷酸钙法、脂质体法、电穿孔法、病毒感染等^[21],由于价格和仪器受限,脂质体转染是目前应用最广泛的转染手段。因此本文选择常用的脂质体 LipoRNAiMax 和 Lipo2000 作用神经元,本文结果显示原代海马神经元受脂质体毒性影响大,很难应用后期研究,这与李莎等^[22]研究不符合,可能脂质体用量过大有关;选择 LipoRNAiMax 作用 HT-22 神经元,可见荧光 siRNA 可进入神经元中,且细胞活性受损较轻,可用于后续实验。研究报道利用慢病毒和电穿孔法转染原代神经元可作为高效的技术手段^[23],但受困其高昂和仪器,很难大规模使用,脂质体转染仍是首选。因此我们建议若在高糖诱导神经元模型中使用转染技术,选择 HT-22 细胞有助于后续实验进行。

目前有关糖尿病脑病发病机制解释很多,其中神经元凋亡增加被认为是认知功能障碍发生的主要因素之一。血糖浓度异常升高可引起神经细胞凋亡增加,学习记忆能力下降,导致认知功能障碍^[24]。Bcl-2 与 Bax 是经典的凋亡相关蛋白,其数量平衡是维持细胞凋亡的重要环节^[25],研究发现在

正常大鼠海马中 Bcl-2 扮演着抑制神经元凋亡的作用^[26-27]。本研究在高糖诱导原代海马神经元中发现,细胞受高糖刺激后,凋亡率显著升高,且凋亡相关蛋白 Bcl-2 显著下降、Bax 显著升高,这与闫斌等^[28]的实验结果一致;在高糖诱导的 HT-22 神经元中,细胞凋亡并不显著,但凋亡蛋白 Bcl-2 下降,我们推测由于 HT-22 细胞可进行增殖,导致细胞凋亡率无显著变化。综上我们建议若选择 HT-22 细胞,应适当提高糖浓度,以便更好模拟高糖损伤神经元过程。

综上所述,本文所介绍的 2 种高糖诱导神经元细胞模型具备不同的优势和应用价值,均可应用于糖尿病脑病发病机制的研究。针对不同的实验目的,我们建议因地制宜的选择细胞模型,有助于课题的实施和完成,同时可根据实验情况,可适当改变细胞模型中糖浓度或作用时间,以便更好研究疾病发生过程。

参考文献:

- [1] 李欣悦,李倩,石桂英,等. 干细胞治疗 2 型糖尿病及其并发症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 96-102.
- [2] Ke R, Wang Y, Hong S, et al. Endoplasmic reticulum stress related factor IRE1 α regulates TXNIP/NLRP3 - mediated pyroptosis in diabetic nephropathy [J]. Exp Cell Res, 2020, 396(2): 112293.
- [3] Shi S, Yin HJ, Li J, et al. Studies of pathology and pharmacology of diabetic encephalopathy with KK-Ay mouse model [J]. CNS Neurosci Ther, 2020, 26(3): 332-342.
- [4] Dong M, Ren M, Li C, et al. Analysis of metabolic alterations related to pathogenic process of diabetic encephalopathy rats [J]. Front Cell Neurosci, 2018, 12: 527.
- [5] Bhusal A, Rahman MH, Lee IK, et al. Corrigendum: role of hippocampal lipocalin-2 in experimental diabetic encephalopathy [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 239.
- [6] 赵军,褚亚君,梁晋裕,等. 跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 65-71.
- [7] Bhusal A, Rahman MH, Lee IK, et al. Role of Hippocampal lipocalin-2 in experimental diabetic encephalopathy [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 25.
- [8] 刘申贝,戴瑛,赵军宁. 糖尿病脑病的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(6): 444-445.
- [9] 许永劫,李程程,朱金凤,等. 高糖诱导大鼠海马神经元细胞模型建立及细胞凋亡的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(1): 28-32.

- [10] 朱金凤, 许永劼, 朱丽英, 等. 不同浓度葡萄糖对小鼠海马神经元细胞系 HT-22 细胞凋亡的影响 [J]. 天津医药, 2019, 47(11): 1121-1125.
- [11] Zhao SY, Liao LX, Tu PF, et al. Icaritin Inhibits AGE-induced injury in PC12 cells by directly targeting apoptosis regulator bax [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7940808.
- [12] 高超, 杜贵琴, 许永劼, 等. 海马神经元原代细胞培养方法的改良 [J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(8): 894-898.
- [13] 詹琳, 袁新初, 占海霞, 等. 胰高血糖素样肽 1-受体/沉默信息调节因子 1 通路参与高糖诱导大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 细胞衰老 [J]. 解剖学杂志, 2016, 39(3): 257-261.
- [14] 李爱平, 田静, 周芝文, 等. 氟西汀对卒中后抑郁模型大鼠的行为及海马神经元新生的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 41-47.
- [15] 张英英, 单海军, 娄元俊, 等. 抗瘤增智颗粒调控 TLR4/HMGB1/p-I κ B- α 信号通路保护癫痫幼鼠海马神经元的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 92-98.
- [16] Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination [J]. *J Neurosci Res*, 1993, 35(5): 567-576.
- [17] 凌俊辉, 钟珠, 蔡斯俏, 等. 高糖培养对乳鼠海马神经元存活及 c-fos 蛋白表达影响 [J]. 广东医学院学报, 2013, 31(3): 256-259.
- [18] 谭潮航, 肖凡, 弓慧, 等. 高糖通过诱导 HT22 细胞衰老和凋亡抑制细胞生长 [J]. 蛇志, 2017, 29(3): 267-269.
- [19] 陈瑜. 分子生物学技术在重大感染性疾病诊治中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(5): 334-336.
- [20] 詹从清, 黄静, 魏燕燕, 等. 小鼠大脑皮质神经元电穿孔转染条件的优化 [J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(3): 253-257.
- [21] 郑红云, 李艳. 大鼠胚胎原代海马神经元两种转染方法的比较 [J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(6): 689-692.
- [22] 李莎, 司尧, 冯宝峰, 等. 利于树突棘形态学观察的原代海马神经元转染方法的优化 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41(5): 532-534, 557, 634.
- [23] 李兴统, 汤红艳, 马微, 等. 一种高纯度原代神经元培养和高效转染的方法 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(32): 5186-5190.
- [24] Kim TW, Park HS. Physical exercise improves cognitive function by enhancing hippocampal neurogenesis and inhibiting apoptosis in male offspring born to obese mother [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 347: 360-367.
- [25] 张梅, 王跃新, 侯晓华, 等. bcl-2 基因修饰神经干细胞移植修复大鼠脊髓损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 35-41.
- [26] 蔺心敬, 李吕力, 杨德刚, 等. 血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡和蛋白表达实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(19): 2326-2329.
- [27] 董雅洁, 高维娟, 钱涛, 等. Bcl-2 抑制剂对黄芪注射液减轻缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 11-17.
- [28] 闫斌, 王靖博, 张宏, 等. 槲皮素对高糖培养海马神经元凋亡及 Akt, p-Akt, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2017, 23(12): 1390-1396.

[收稿日期] 2020-11-04

周唯君,彭涛,周栋珍,等. *rpl15* 在斑马鱼胚胎中的表达形式探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 9-15.
Zhou WJ, Peng T, Zhou DZ, et al. Expression of *rpl15* in zebrafish embryos [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 9-15.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 002

rpl15 在斑马鱼胚胎中的表达形式探究

周唯君^{1,2}, 彭涛^{1,2}, 周栋珍^{2,4}, 杨懿琛², 周艳华², 李化^{1,2},
何志旭^{2,3*}, 舒莉萍^{1,2*}

(1.贵州医科大学细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室,贵州省再生医学重点实验室,基础医学院免疫学教研室,贵阳 550004;2.中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室,贵阳 550004;
3.遵义医科大学附属医院儿科学教研室,贵州 遵义 563003;4.贵州大学,贵阳 550025)

【摘要】目的 探究 *rpl15* 基因在野生型斑马鱼胚胎中的表达形式。**方法** 利用 NCBI 和 Ensemble 数据库进行 *rpl15* 基因的共线性分析和 Rpl15 蛋白质序列相似性分析,使用 MEGA X 软件绘制进化树;构建 *pCS2⁺-rpl15* 重组质粒,再利用 T3 聚合酶制备地高辛标记的 *rpl15* 反义 RNA 探针,用全胚胎原位杂交检测 *rpl15* 基因的 mRNA 水平的表达;通过 Western blot 检测 24、48 和 72 hpf 斑马鱼胚胎中 Rpl15 蛋白的表达。**结果** 在进化过程中,*rpl15* 基因相对保守。构建了 *pCS2⁺-rpl15* 重组质粒,原位杂交结果显示在 24 hpf,*rpl15* 基因在斑马鱼的几乎所有细胞中广泛表达;到 48 hpf,*rpl15* 在中枢神经系统的表达最强并且在胰腺的表达也开始显现;72 hpf 仍然可见 *rpl15* 在后脑中的表达以及胰腺、肝和肠道中的表达。Western blot 结果显示 24、48 和 72 hpf 斑马鱼胚胎中 Rpl15 蛋白的相对表达量随时间增加而增多。**结论** 系统观察了斑马鱼发育过程中 *rpl15* 的表达部位及表达水平的变化,为斑马鱼 *rpl15* 缺失模型的建立提供了实验基础。

【关键词】 斑马鱼;*rpl15* 基因;原位杂交;基因表达;反义 mRNA;胚胎发育

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0009-07

Expression of *rpl15* in zebrafish embryos

ZHOU Weijun^{1,2}, PENG Tao^{1,2}, ZHOU Dongzhen^{2,4}, YANG Yichen², ZHOU Yanhua², LI Hua^{1,2},
HE Zhixu^{2,3*}, SHU Liping^{1,2*}

(1.National & Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine, School of Basic Medicine, Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China. 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Guiyang 550004. 3. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003.
4. Guizhou University, Guiyang 550025)

【Abstract】Objective To investigate the expression of *rpl15* in zebrafish. **Methods** The NCBI and Ensemble databases were used to analyze the co-collinearity of the *rpl15* gene and the sequence similarity of rpl15 protein. MEGA X software was used to align *rpl15* in different organizations. The mRNA expression of *rpl15* was detected in whole embryos by *in situ* hybridization with an *rpl15* antisense RNA probe, and the expression of rpl15 protein in 24, 48, and 72 hpf zebrafish embryos was detected by western blotting. **Results** The *rpl15* gene is relatively conserved during evolution. A *pCS2⁺-rpl15* recombinant plasmid was constructed, and *in situ* hybridization result showed that at 24 hpf, *rpl15* was

【基金项目】 国家自然科学基金(31860325);贵州省科技计划项目(黔科合基础[2020]1Y092、黔科中引[2019]4008)。

【作者简介】 周唯君(1995—),女,硕士研究生,研究方向:血液及干细胞免疫。E-mail:632314630@qq.com

【通信作者】 舒莉萍(1974—),女,教授,研究方向:血液及干细胞免疫。E-mail:gyslp456@163.com

何志旭(1967—)男,教授,研究方向:血液及干细胞免疫。E-mail:hzx@gmc.edu.cn * 共同通信作者

widely expressed in most cells of zebrafish. At 48 hpf, *rpl15* expression was highest in the central nervous system and it was also present in the pancreas. At 72 hpf, *rpl15* expression was still present in the posterior brain, as well as the pancreas, liver, and intestine. The relative protein expressions of Rpl15 in 24, 48, and 72 hpf zebrafish embryos increased with increasing time. **Conclusions** Changes in the expression sites and expression levels of *rpl15* in zebrafish during development were systematically observed, which provide the experimental basis for establishing a model of *rpl15* deletion in zebrafish.

【**Keywords**】 zebrafish; *rpl15* gene; *in situ* hybridization; gene expression; antisense RNA; embryonic development

核糖体蛋白(ribosomal proteins, RPs)广泛存在于细胞中,参与 RNA 结合的过程,并在蛋白质的生物合成中发挥重要作用,同时还在细胞的增殖与凋亡、耐药、发育、免疫等多个方面发挥作用^[1-2]。RPs 的功能障碍与如血液系统疾病、代谢性疾病与癌症等的多种疾病密切相关^[3]。核糖体蛋白 L15 (ribosomal protein L15, *RPL15*)是核糖体 L15E 蛋白家族的成员,*RPL15* 主要定位于真核细胞的核仁内并且呈现点状分布,位于 60 S 的核糖体大亚基上,对核仁的形成及核仁结构的维持有着重要的作用^[4]。

随着对 *RPL15* 的深入研究,*RPL15* 表达水平的异常与多种疾病的发生或发展有着密切关联,在胃癌、食管癌、胰腺癌及结肠癌中均发现 *RPL15* 的异常表达^[5-8]。在先天性红系再生障碍性贫血(Diamond-Blackfan anemia, DBA)中也发现了一个由 *RPL15* 基因突变引起的 DBA 新亚型,由此确定了 *RPL15* 为一个新的 DBA 致病基因之一^[9]。DBA 是一种罕见的常染色体骨髓衰竭综合征,也被认为是一种核糖体病,患病者具有核糖体蛋白基因突变。DBA 的主要表现为:红细胞再生障碍性贫血、皮肤和骨骼异常以及癌症易发,在临床上,DBA 一直缺乏有效的治疗,主要是通过长期输注红细胞和使用激素冲击疗法来缓解病程的进展,唯一的治疗方式为造血干细胞移植^[10]。核糖体蛋白的表达受到影响将会进而影响细胞的存活^[11]。然而对于核糖体蛋白在这些疾病中发挥作用的作用机制及分子机制不甚清楚。

斑马鱼作为与人类造血调控高度保守的模式生物,其拥有造血系统发育过程与人类相似、胚胎发育迅速、饲养成本相对低廉且易于观察等优势。本研究旨在斑马鱼中找到人 *rpl15* 基因的同源物,分析其部分遗传学特征,通过探究 *rpl15* 基因在胚胎中的表达形式,以期了解 *rpl15* 基因在造血发育过程中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验中采用 0~3 日龄的 Tübingen 品系野生型斑马鱼的胚胎与幼鱼,其中用于繁殖幼鱼的成鱼体重约为 350~400 mg,雌雄各 10 尾,严格遵循使用实验动物的 3R 原则,所用斑马鱼均为本实验室自行繁育、培养[SYXK(黔)2018-0001]。所有研究方案均通过贵州医科大学实验动物伦理委员会的审批(No.1603041)。

1.2 主要试剂与仪器

pCS2+ 载体由本实验室保存;*E.coli* DH5 α 菌株、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;高保真 KOD-PLUS PCR 酶购自日本 Toyobo 公司;反转录试剂 First Stand cDNA Synthesis Kit、限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*T₄* DNA 连接酶、NE-PERTM 细胞核和细胞质提取试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒均自美国 Thermo Fisher 公司;DIG RNA Labeling Mix、蛋白酶 K 购自瑞士 Roche 公司;TRIzol 试剂、NucAwayTM Spin Columns 购自美国 Ambion 公司;T3 聚合酶购自美国 Promega 公司;BCIP/NBT 购自日本 VectorLab 公司;Rabbit Anti-RPL15 抗体和 Goat Anti-Rabbit IgG H & L(HRP)均购自英国 Abcam 公司;PVDF 膜和 ECL 化学发光液均购自美国 Millipore 公司;PCR 仪购于德国 Eppendorf 公司;分子杂交箱购于美国 UVP 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 斑马鱼养殖方法

斑马鱼野生型 Tübingen 品系养殖标准参照 The Zebrafish book^[12],养殖在本课题组 28.5℃ 的 14 h 光照/10 h 黑暗的循环水系统中^[13]。按照雌雄 1:2 或者 1:1 的比例将性成熟(16~24 周龄)的斑马鱼进行配对,并在中间用透明胶板隔开,在第 2 天光照刺激 5~10 min 后拔去胶板,约在 1.5 h 后收集斑马鱼胚胎,加入胚胎培养液 eggwater(0.06 mg/mL

海盐、0.5 mg/L 亚甲基蓝)并置于 28.5℃ 的培养箱中孵化,每天更换 eggwater 两次并吸出死胚。

1.3.2 基于数据库和软件的斑马鱼 *rpl15* 基因生物信息学分析

在美国国家生物信息技术中心(NCBI)数据库中分别查找出 *rpl15* 基因在人类、斑马鱼、小鼠染色体的位置,记录汇总,并与 Ensemble 数据库中的基因信息进行比对,进行共线性分析并绘图。分别记录人类、斑马鱼、小鼠和果蝇等物种的 *rpl15* 基因的蛋白序列,用 DNAMAN 进行多序列比对出蛋白质相似性,再利用 MEGA X 构建系统发生树,采用 Neighbor-joining 算法并运行 500 次 bootstarp 对系统发生树进行评估。

1.3.3 斑马鱼总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

收集 0.75~72 hpf (hourspost-fertilization,受精后小时)之间多个时相的斑马鱼胚胎置于离心管中(30 枚/管),蛋白酶 K 脱卵膜,每管再加入 1 mL TRIzol 充分匀浆处理,经氯仿抽提两次,然后异丙醇沉淀、75%乙醇洗涤晾干后,加入适量 DEPC 水溶解。反转录按照 First Stand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明书在 PCR 仪上操作,得到的 cDNA 置于 -20℃ 冻存。

1.3.4 制备地高辛标记的 *rpl15* 基因的反义 mRNA 探针

根据 GenBank 中的 *rpl15* 基因序列(NM_001003447.1)设计引物(表 1),引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。将用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后的 *pCS2+*载体和用同样两种酶切处理的 *rpl15* 基因片段用 *T₄* DNA 连接酶进行重组连接,测序鉴定重组质粒的序列并比对无误后,将重组质粒 *pCS2+*-*rpl15* 经 *EcoR* I 单酶切线性化,*T3* 体外转录后经核酸纯化柱纯化,最后将得到的探针分装并置于 -80℃ 备用。

1.3.5 斑马鱼全时相胚胎原位杂交

收集 0.75~72 hpf 之间的 11 个时相点的胚胎,每组 35 枚,脱膜用 4% PFA 固定,甲醇梯度脱水后置于 -20℃ 冻存备用。固定好的胚胎洗去多余甲醇,时相大于 24 hpf 的胚胎用蛋白酶 K 进行通透处

理,先置于 68℃ 杂交炉中预杂交 1 h,再加入地高辛标记的 *rpl15* 反义 mRNA 探针杂交过夜。第 2 天依次用不同浓度的 SSC 缓冲液洗去多余的探针,加入稀释 5000 倍的 anti-DIG-AP 于 4℃ 反应过夜。第 3 天用 MABT 洗掉多余抗体,再加入新鲜配制的 BCIP/NBT 避光显色,在体式显微镜下观察到出现蓝紫色杂交信号即终止染色,并用 4% PFA 固定后,将胚胎放在均匀涂抹甲基纤维素的玻璃皿上,在体视显微镜下拍照。

1.3.6 Western blot 法检测斑马鱼 Rpl15 蛋白表达水平

收集 24、48、72 hpf 胚胎,每组 50 枚,使用 NE-PERTM 细胞核和细胞质提取试剂分别提取斑马鱼胚胎细胞质和细胞核的蛋白质,经 BCA 蛋白定量后上样。变性的蛋白在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离,然后湿转至甲醇激活的 PVDF 膜上。再以 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h;1×TBST 洗 3 次后,加入稀释 1000 倍的 Rabbit Anti-RPL15 抗体于 4℃ 孵育过夜;1×TBST 洗 3 次后,加入稀释 2000 倍的 Goat Anti-Rabbit IgG H & L(HRP)室温孵育 2 h;1×TBST 洗 3 次后,根据 ECL 检测试剂盒的说明书配制曝光液,使用化学发光分析仪检测,扫描图像后,用 ImageJ 8.0 软件分析目的蛋白与 GAPDH 的灰度值。

1.4 统计学方法

所有实验均重复三次或三次以上,并用 GraphPadPrism 8.0 软件中的单因素方差进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同物种间 *rpl15* 基因的生物信息学分析结果

对斑马鱼和人类的 *rpl15* 基因进行了同线性分析(synteny analysis),结果显示,*rpl15* 基因位于斑马鱼 19 号染色体上,其上、下游 6 个基因在内的基因组序列,在小鼠 14 号染色体及人类 3 号染色体短臂上能找到与其相对应的同源区(图 1)。利用 DNAMAN 软件对比分析斑马鱼、人类和小鼠 *rpl15* 蛋白质的相似性,结果显示,斑马鱼 *rpl15* 氨基酸序

表 1 斑马鱼 *rpl15* 基因 PCR 引物序列
Table 1 Primers used for PCR of zebrafish *rpl15* gene

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence	产物长度(bp) Amplicon length
<i>rpl15</i> -F	CCGGAATTCCCTTCATCGGGCTCCAAGAC	246
<i>rpl15</i> -R	ATAAGAATGCGCCGACGCTCCTCAGCTACTGACT	

列与人氨基酸序列相似度为 95%,与小鼠的相似度为 74%。使用 MEGA X 绘制 14 个物种 *rpl15* 的系统发育树(图 2)。

2.2 *pCS2⁺-rpl15* 重组质粒测序结果

将经氨苄抗性筛选的重组质粒用 RT-PCR 初步验证,再将 RT-PCR 验证结果为正确(图 3)的质粒进行测序,通过比对测序结果与 *rpl15* 的基因序列一致,未发生突变(图 4)。

2.3 *rpl15* 基因在野生型斑马鱼胚胎发育早期的表达模式

在野生型斑马鱼胚胎发育过程中,在 0.75~24

hpf 均可见 *rpl15* 基因在组织中广泛表达的阳性杂交信号;在 24 hpf, *rpl15* 基因在斑马鱼的几乎所有细胞中广泛表达,在眼睛的表达最强;到 48 hpf, *rpl15* 在中枢神经系统、咽弓和肝肠中表达最强,在胰腺中的表达也开始显现;72 hpf 仍然可见 *rpl15* 在后脑中的表达以及胰腺、肝和肠道中的表达(图 5)。

2.4 不同时相斑马鱼胚胎中 *Rpl15* 蛋白表达情况

Western blot 结果显示,24 hpf 时几乎观察不到 *Rpl15* 蛋白质的表达,在 24、48、72 hpf,随着时间的增加, *Rpl15* 蛋白质的相对表达量逐渐增多(图 6)。

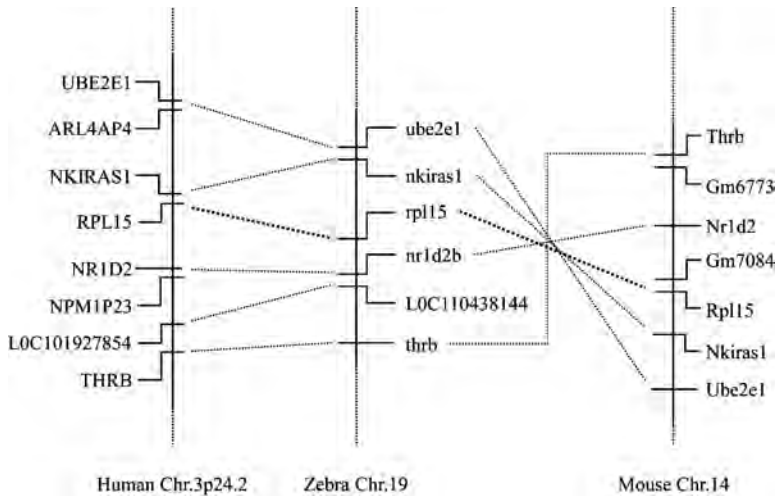


图 1 *rpl15* 基因的 Synteny 分析结果

Figure 1 Synteny analysis of *rpl15* gene among homo sapiens and zebrafish

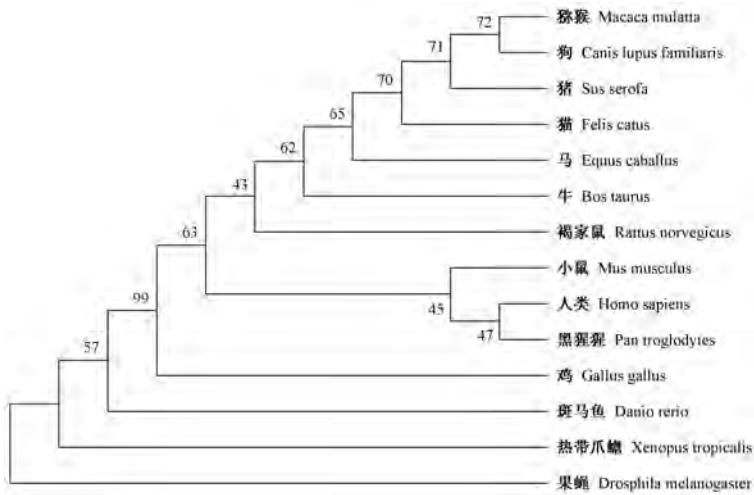
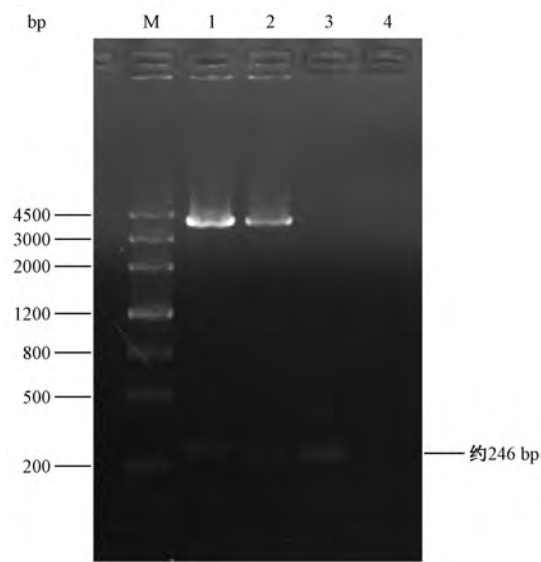


图 2 *rpl15* 基因的系统发育分析

Figure 2 Alignment of *rpl15* in different organizations



注:M:DNA mark Ⅲ;泳道 1: $pCS2^{+}$;泳道 2: $pCS2^{+}-rpl15$;
泳道 3: $rpl15$ RT-PCR 产物;泳道 4:空白组。

图 3 $pCS2^{+}-rpl15$ 重组质粒 *EcoR* I 、
Not I 双酶切产物电泳鉴定结果

Note. M, DNA mark Ⅲ. 1, $pCS2^{+}$. 2, $pCS2^{+}-rpl15$. 3,
 $rpl15$ RT-PCR products. 4, Blank control.

Figure 3 Electrophoresis of double digested product of
 $pCS2^{+}-rpl15$ recombinant plasmid by
EcoR I and *Not* I

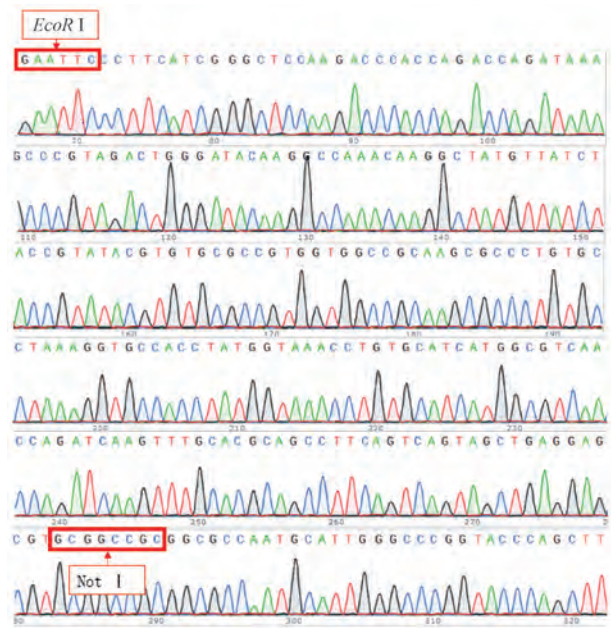


图 4 $pCS2^{+}-rpl15$ 重组质粒测序结果

Figure 4 Gene sequencing analysis of $pCS2^{+}-rpl15$
recombinant plasmid

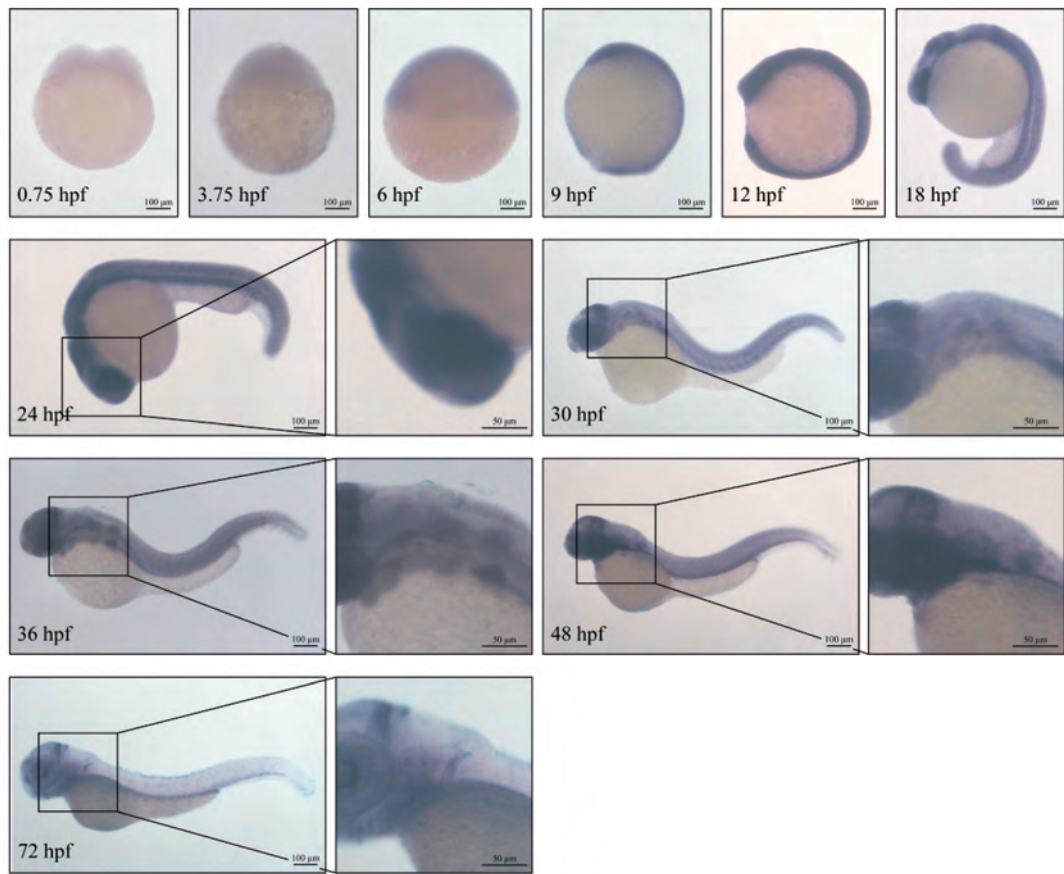
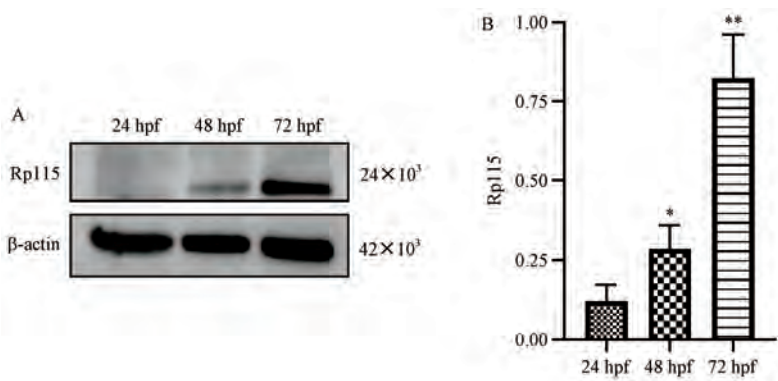


图 5 原位杂交技术检测 $rpl15$ 基因在野生型斑马鱼胚胎发育过程中的表达情况

Figure 5 In situ hybridization of $rpl15$ gene



注:A:不同时相胚胎中 Rpl15 蛋白电泳图;B:不同时相胚胎中 Rpl15 蛋白表达水平(相对灰度值)。与 24 hpf 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 6 野生型斑马鱼胚胎不同时相的 Rpl15 蛋白水平的表达情况

Note. A, Electrophoresis of Rpl15 protein in embryos in different phases. B, Expression levels of Rpl15 protein in embryos in different phases (relative gray values). Compared with 24 hpf, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Rpl15 protein expression in zebrafish embryos at different time points

3 讨论

异常的核糖体生物合成导致的核仁增大是在 100 多年前的癌细胞中首次观察到的,RP 基因的种系突变引起了与癌症相关的核糖体病 DBA,DBA 是第一个被发现和研究最广泛的核糖体疾病,DBA 分子发病机制的第一个重大突破来自发现核糖体蛋白 S19 基因的突变^[2-4]。随后又在 DBA 中发现了包括 RPL15 在内的其他 20 余个核糖体蛋白(RP)基因的突变^[14]。虽然在过去的二十年中已经进行了广泛的研究,但由于患者样本的可获得性有限,缺乏合适的动物模型,携带致病 RP 基因纯合突变的敲除小鼠在发育早期死亡,如 $RPL5^{-/-}$ 、 $RPS19^{-/-}$ 的小鼠出现胚胎期致死,杂合突变体没有表现出异常症状^[15]等原因,对 DBA 的发病机制仍然知之甚少,临床上也没有有效的治疗方法。在肿瘤样本中已证实有一些的 RP 的表达增加,但其意义尚不清楚。如在胃癌、食管癌、结肠癌中均发现 $RPL15$ 的高表达^[5-8]。在乳腺癌患者体内全基因组激活筛选促进远处转移的基因研究中发现, $RPL15$ 的高表达增加了多个器官的转移性生长,并选择性增强了其他核糖体蛋白的翻译^[16]。在本研究中,斑马鱼 Rpl15 蛋白和人类的 RPL15 蛋白的相似度高,提示 $rpl15$ 基因与人类高度相似及在进化过程中是相对保守的,利用斑马鱼来建立 $rpl15$ 缺乏的模型是可行的,为深入研究 RPL15 的功能奠定实验基础。

斑马鱼(Danio rerio)是一种小型淡水鱼,最初起源于印度,是可用于研究人类疾病的脊椎动物发育生物学模式生物中的一种新的有效模式生

物^[17-19]。与小鼠模型相比,用斑马鱼作为 DBA 模型具有许多优势,包括胚胎发育快、胚胎透明,个体小易养殖,且在斑马鱼进化过程中,造血调控的基因高度保守,可用于研究造血发育系统。此外,斑马鱼的研究中还有一些疾病建模技术,如使用吗啉代反义寡核苷酸(morpholino, MO)敲低靶基因的表达或使用 CRISPR/Cas9 系统敲除目标基因来建立疾病模型^[20]。本研究采用全胚胎原位杂交及免疫印迹试验分析在野生型斑马鱼胚胎发育过程中不同时期的组织中 mRNA 和蛋白水平的表达情况,有助于了解斑马鱼胚胎发育过程中该基因的表达情况。

本实验中制备了地高辛标记的 $rpl15$ 基因反义 mRNA 探针,通过全胚胎原位杂交了解到 $rpl15$ 作为核糖体蛋白,主要表达在包括肝、胰腺、肠道等内胚层组织,且在胚胎发育的过程中的脑部、眼睛、体节等组织中也观察到其表达。 $rpl15$ 的表达在斑马鱼胚胎发育的不同阶段均有发现,这提示 $rpl15$ 基因在斑马鱼胚胎发育的过程中起着重要的作用。

脊椎动物的造血发育是一个复杂的、多因素协调的过程^[21]。24 hpf 是斑马鱼原始造血的关键时期,此时斑马鱼的心脏开始跳动^[22]。斑马鱼不同发育阶段的 Rpl15 的蛋白结果表明,24 hpf 斑马鱼胚胎中几乎观察不到 Rpl15 蛋白水平的表达。提示在早期发育过程中 Rpl15 可能在 24 hpf 后的斑马鱼胚胎中开始发挥作用,其表达量在胚胎发育过程中随着时间的增加而增多。为本课题组使用 MO 或 CRISPR/Cas9 技术建立下调 $rpl15$ 基因表达的模型提供了实验基础。

综上所述,本研究首先利用生物信息学确定了在斑马鱼的 *rpl15* 的高度保守性及利用斑马鱼建立 *rpl15* 基因相关的疾病模型是可行的;其次,全胚胎原位杂交技术证实, *rpl15* 基因在野生型斑马鱼胚胎发育过程中广泛表达,几乎所有组织中均能检测到 *rpl15* 的表达,尤其是在发育中的胰腺、肝和肠道中, *rpl15* 可能对斑马鱼胚胎的发育至关重要;最后通过免疫印迹证实 Rpl15 在 24 hpf 的胚胎中几乎没有表达,表明 Rpl15 蛋白表达开始于原始造血的关键期之后。本研究提示,可以利用斑马鱼建立以 *rpl15* 为靶点的疾病模型,为建立 *rpl15* 缺乏的疾病模型建立了实验基础。

参考文献:

- [1] Pelletier J, Thomas G, Volarević S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(1): 51-63.
- [2] Nikulin AD. Structural aspects of ribosomal RNA recognition by ribosomal proteins [J]. Biochemistry (Mosc), 2018, 83(1): S111-S133.
- [3] Lessard F, Brakier-Gingras L, Ferbeyre G. Ribosomal proteins control tumor suppressor pathways in response to nucleolar stress [J]. Bioessays, 2019, 41(3): e1800183.
- [4] Aspesi A, Ellis SR. Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(4): 228-238.
- [5] Wang H, Zhao LN, Li KZ, et al. Overexpression of ribosomal protein L15 is associated with cell proliferation in gastric cancer [J]. BMC cancer, 2006, 6: 91.
- [6] Yan TT, Fu XL, Li J, et al. Downregulation of RPL15 may predict poor survival and associate with tumor progression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37028-37042.
- [7] Dong Z, Jiang H, Liang S, et al. Ribosomal protein L15 is involved in colon carcinogenesis [J]. Int J Med Sci, 2019, 16(8): 1132-1141.
- [8] Kim HJ, Maiti P, Barrientos A. Mitochondrial ribosomes in

- cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 47: 67-81.
- [9] Wlodarski MW, Da Costa L, O'Donohue MF, et al. Recurring mutations in are linked to hydrops fetalis and treatment independence in Diamond-Blackfan anemia [J]. Haematologica, 2018, 103(6): 949-958.
- [10] Vlachos A, Muir E. How I treat Diamond-Blackfan anemia [J]. Blood, 2010, 116(19): 3715-3723.
- [11] Russo A, Russo G. Ribosomal proteins control or bypass p53 during nucleolar stress [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 140.
- [12] Westerfield M. The zebrafish book (Danio rerio) [M]. MWesterfield.
- [13] 李志操, 黄波, 向文碧, 等. 红系祖细胞在造血缺陷斑马鱼体内的移植 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 84-89.
- [14] Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction [J]. Blood, 2010, 115(16): 3196-3205.
- [15] Kazerounian S, Yuan D, Alexander MS, et al. Rpl5-inducible mouse model for studying diamond-blackfan anemia [J]. Discoveries (Craiova), 2019, 7(3): e96.
- [16] Ebright RY, Lee S, Wittner BS, et al. Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis [J]. Science, 2020, 367(6485): 1468-1473.
- [17] Ablain J, Zon LI. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases [J]. Trends Cell Biol, 2013, 23(12): 584-586.
- [18] Oyarbide U, Topczewski J, Corey SJ. Peering through zebrafish to understand inherited bone marrow failure syndromes [J]. 2019, 104(1):13-24.
- [19] Raby L, Volkel P, Le Bourhis X, et al. Genetic engineering of Zebrafish in cancer research [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(8): 2168.
- [20] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 227-229.
- [21] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology [J]. Cell, 2008, 132(4): 631-644.
- [22] Zhang J, Hamza I. Zebrafish as a model system to delineate the role of heme and iron metabolism during erythropoiesis [J]. Mol Genet Metab, 2019, 128(3):204-212.

[收稿日期] 2020-11-23

石桂英,黄艺滢,雷雪裴,等. 小鼠肺间充质干细胞的分离、培养和鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 16-20.
Shi GY, Huang YY, Lei XP, et al. Isolation, culture, and characterization of mouse lung-resident mesenchymal stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 16-20.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 003

小鼠肺间充质干细胞的分离、培养和鉴定

石桂英,黄艺滢,雷雪裴,路亚岚,白琳*

(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 建立稳定的小鼠肺间充质干细胞分离、培养、鉴定技术,利用小鼠肺间充质干细胞研究肺组织修复和再生机制。**方法** 无菌分离小鼠肺,采用胶原酶消化和组织贴壁法分离培养肺间充质干细胞,观察细胞形态和生长特性,流式分析细胞表面标记,进行体外成脂、成骨诱导分化。**结果** 两种方法都成功分离培养了肺间充质干细胞,流式分析显示 Sca-1、CD90、CD29、CD44 均为高表达,CD31、CD45 均为低表达。体外诱导后,肺间充质干细胞可以分化成脂肪细胞和成骨细胞。**结论** 本研究利用两种方法分离培养小鼠肺间充质干细胞,两种分离方法获得的细胞均具有间充质干细胞类似的表面标记物,具有成脂、成骨分化能力。

【关键词】 肺间充质干细胞;流式分析;诱导分化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0016-05

Isolation, culture, and characterization of mouse lung-resident mesenchymal stem cells

SHI Guiying, HUANG Yiying, LEI Xuepei, LU Yalan, BAI Lin*

(Institute of Laboratory Key Laboratory of Human Disease 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 Key Laboratory of Human Disease Models, State Administration of Traditional Chineses Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable method for the isolation, culture, and characterization of mouse lung-resident mesenchymal stem cells, which will then be used to study lung repair and regeneration mechanisms. **Methods** Mouse lungs were obtained via germ-free procedures and were mechanically minced and/or digested with collagenase. Cell morphology was observed by phase-contrast microscopy, cell surface markers were detected by flow cytometry, and cells were induced to differentiate into adipocytes or osteoblasts. **Results** We successfully isolated and cultured mouse lung-resident mesenchymal stem cells. FACS analysis demonstrated high expressions of Sca-1, CD90, CD29, and CD44, and low expressions of CD31 and CD45. The lung-resident stem cells differentiated into adipocytes or osteoblasts. **Conclusions** We isolated cells that expressed mesenchymal stem cell markers and had multi-directional differentiation ability.

【Keywords】 lung-resident mesenchymal stem cell; FACS analysis; induced differentiation

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31672374);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2019-I2M-1-006);北京市自然科学基金重点项目(5171001)。
[作者简介] 石桂英,女,副主任技师,研究方向:干细胞临床转化。E-mail:guiying_shi77@163.com
[通信作者] 白琳,女,副研究员,研究方向:干细胞临床转化。E-mail:bailin49@163.com

间充质干细胞是一群能够形成克隆的成纤维样细胞。国际细胞和基因治疗学会(International Society for Cell & Gene Therapy, ISCT)对间充质干细胞的分类标准是:高表达 CD73、CD90 和 CD105,不表达血液细胞标记如 CD34、CD45、CD11b 等^[1]。间充质干细胞在组织再生修复、免疫调节等方面具有重要作用,在各组织器官中都有组织特异性的间充质干细胞^[2]。肺作为多种动物的呼吸器官,机体通过肺与外界环境进行气体交换,各种有害物质如化学氧化剂、蛋白酶、病毒、细菌等都可造成肺损伤。尽管存在众多因素会导致肺损伤,但正常个体仍能保持正常的肺功能,这说明肺部具有强大的损伤修复和再生能力^[3]。肺间充质干细胞(lung-resident mesenchymal stem cell, lr-MSC)首先是在肺灌洗液中发现的,2014 年 Rolandsson 等^[4]在支气管壁和肺实质的血管周组织中分离出 lr-MSC,证实了 lr-MSC 的位置和表型等特征。与骨髓间充质干细胞相比,lr-MSC 表达相似的表面蛋白,在转录组、蛋白质组和分泌组学等方面均有所不同^[5-6],其在肺生理和病理过程中的作用,以及在治疗肺部疾病中的应用前景,还有待深入研究^[2]。

本项目从 C57BL/6J 小鼠中利用两种方法分离培养了 lr-MSC,对其的形态、生长特性、表面标记物及多向分化能力进行分析,发现 lr-MSC 为成纤维样细胞,表达 Sca-1、CD90、CD29、CD44 等干细胞表面标记,不表达血管内皮标记 CD31 和白细胞表面标记 CD45,具有成脂、成骨分化能力。lr-MSC 的分离、培养和鉴定可以为研究 lr-MSC 的功能提供体外模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57 小鼠 6 只,体重 18~22 g,4 周龄,雌雄各半,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004],实验操作在研究所解剖室进行[SYXK(京)2019-0014],实验方案经本研究所实验动物使用与管理委员会审批(BL17002),实验中按实验动物使用的 3R 原则执行。

1.2 主要试剂与仪器

细胞培养用胎牛血清(批号:1908360C)、 α -MEM(批号:2120408)、DPBS(批号:2120391)、青链霉素(批号:2076677)、胰酶(批号:2062475)、流式抗体等均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;组

织消化用 I 型胶原酶(批号:9001-12-1)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;成骨(批号:191002G001、成脂(批号:191107G001)诱导培养液均购自赛业(苏州)生物科技有限公司;流式细胞仪为 Aria II,购自美国 Becton Dickinson 公司; CO_2 培养箱购自美国 Thermo 公司;倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肺间充质干细胞的分离培养

脱颈椎处死小鼠,75%乙醇浸泡消毒后,置于超净台上,无菌条件下分离肺组织,用 PBS 冲洗干净,剪成 1 mm³ 小组织块,一半加入 α -MEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、1%青链霉素)直接接种 6 孔板,37℃,5% CO_2 培养,每 3 d 换液,细胞从组织块爬出融合达 80%左右时,胰酶消化细胞进行传代,同时去除组织块;另一半加入等体积 0.1%胶原酶 I,37℃振荡消化 2 h,加入等体积 PBS 后离心,1500 r/min,5 min,弃上清,加入 2 mL α -MEM 完全培养基,经 70 μm 细胞筛过滤,计数,接种到 6 孔板,10⁶ 细胞/孔,37℃,5% CO_2 培养。24 h 后换液,此后每 3 d 换液,细胞融合达 80%左右时,进行传代。

1.3.2 生长曲线测定

取第 3 代生长状态良好的细胞,接种 24 孔板,10⁴ 个/孔。自接种后第 2 天起,每隔 48 h 取 3 孔消化计数,记录细胞数,绘制生长曲线。

1.3.3 流式细胞术检测干细胞比例

取第 3 代生长状态良好的细胞,胰酶消化收集细胞,计数,离心,1500 r/min,5 min,弃上清,加入适量 PBS,调整细胞浓度为 10⁷/mL,取 10⁶ 细胞加入流式抗体,进行染色,4℃,30 min。染色抗体为:CD31-FITC, CD90-FITC, CD29-PE, CD45-PE, Sca-1-PE-cy7, CD44-APC-cy7。

1.3.4 诱导成脂

取第 3 代生长状态良好的细胞,接种 24 孔板,10⁴ 个/孔,37℃,5% CO_2 培养,当细胞融合达 80%以上时,吸弃培养基,加入 2 mL 成脂诱导培养基,之后每 3 d 换液,诱导 21 d 左右,观察细胞变化,对照组加 α -MEM 完全培养基。成脂鉴定采用油红 O 染色:吸弃诱导培养基,加 PBS 洗 2 次;加 4%多聚甲醛固定 30 min;吸弃多聚甲醛固定液,加入 60%异丙醇洗 2 次;加入油红 O 染色液,染色 60 min;吸弃染色液,加 PBS 洗 3 次,倒置显微镜观察、拍照。

1.3.5 诱导成骨

取第 3 代生长状态良好的细胞,接种 24 孔板, 10^4 个/孔, 37°C , 5% CO_2 培养,当细胞融合达 60%~80%时,吸弃培养基,加入 2 mL 成骨诱导培养基,之后每 3 d 换液,诱导 21 d 左右。成骨鉴定采用茜素红染色:吸弃诱导培养基,加 PBS 洗 2 次;加 4% 多聚甲醛固定 30 min;吸弃多聚甲醛固定液,加茜素红染色液,染色 5 min;吸弃染色液,加 PBS 洗 3 次,倒置显微镜观察、拍照。

1.4 统计学方法

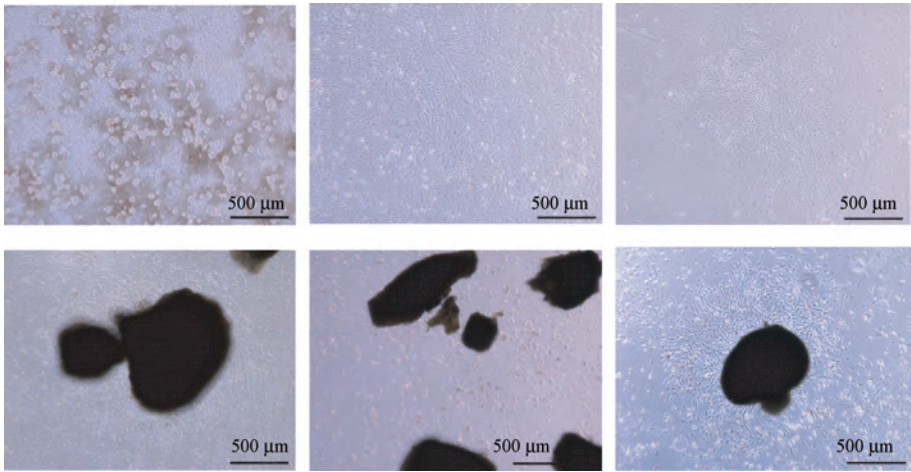
数据统计分析采用 GraphPad Prism 6 软件,结

果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较用 t 检验, $P<0.05$,认为差异显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 生长特性

本实验采用胶原酶消化和肺组织块直接培养两种方法分离 lr-MSC。胶原酶消化法,在接种后第 2 天即可见细胞贴壁,之后迅速扩增;而组织块培养法,细胞贴壁较慢,第 4 天时可见细胞贴壁(图 1)。两种方法分离的细胞传代至第三代时,细胞均为成纤维样形态,传代时间基本一致(图 2)。

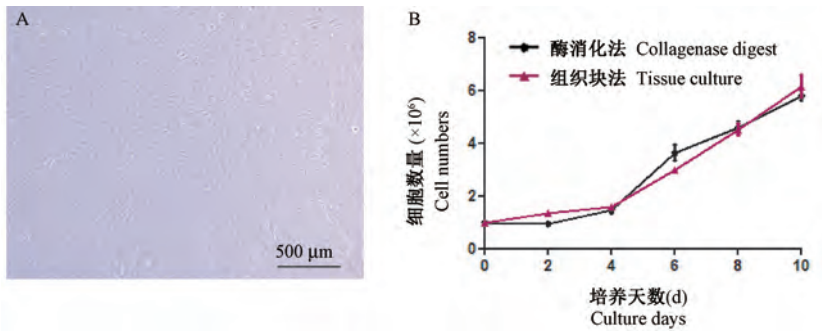


注:上行为肺组织经胶原酶 I 消化后细胞贴壁生长状态,从左到右依次为培养 2、5、8 d 的细胞;下行为肺组织直接培养的细胞贴壁生长状态,从左到右依次为培养 2、5、8 d 的细胞。

图 1 原代肺间充质干细胞的贴壁生长状态

Note. Upper line shows the status of cell adherent growth after collagenase I digestion, from left to right, the culture day is 2, 5, 8 days. Next line shows the status of cell adherent growth with lung tissues, from left to right, the culture day is 2, 5, 8 days.

Figure 1 Lung mesenchymal stromal cells



注:A:细胞形态;B:生长曲线。

图 2 肺间充质干细胞的形态和生长曲线

Note. A, Cell morphology. B, Growth curve.

Figure 2 Morphology and growth curve of lung mesenchymal stromal cells

2.2 干细胞比例

取第三代细胞标记间充质干细胞表面标记物,阴性标记物 CD45、CD31 均为低表达,阳性标记物 Sca-1、CD90、CD29、CD44 的表达量均在 90% 以上(图 3)。从细胞表面标记物表达来看,所得细胞符合干细胞特性。

2.3 诱导成脂能力

为检测 lr-MSC 的成脂分化能力,取第三代细胞接种至 24 孔板,成脂诱导液诱导 21 d 后,油红 O 染色,可见细胞内有红色脂滴,但仍有部分细胞未分化为脂肪细胞(图 4)。

2.4 诱导成骨能力

为检测 lr-MSC 的成骨分化能力,取第三代细胞接种至 24 孔板,成骨诱导液诱导 21 d 后,茜素红染色,可见钙盐沉积着红色(图 5)。

3 讨论

作为机体与外环境进行气体交换的器官,肺组织结构复杂,构成细胞较多,包括多种上皮细胞、内皮细胞和间充质细胞等^[7]。Hegab 等^[8]分离了 lr-MSC,发现这些细胞表型为 Sca1⁺ CD45⁻ CD31⁻,体外培养时能够自我更新,并能分化成内皮细胞、肺泡上皮细胞等,同时还具有间充质干细胞的特性;将 lr-MSC 移植到肺损伤小鼠模型中,可以提高小鼠的生存率,减少肺损伤。已有研究表明,lr-MSC 是肺组织修复和再生的重要调节因子,特发性肺纤维化是由 lr-MSC 分化为成肌细胞所导致的^[9-10]。本研究采用胶原酶消化和肺组织块直接培养两种方法分离 lr-MSC。胶原酶消化法,细胞贴壁快,可在较短时间内获得大量细胞;而组织块培养法,细胞

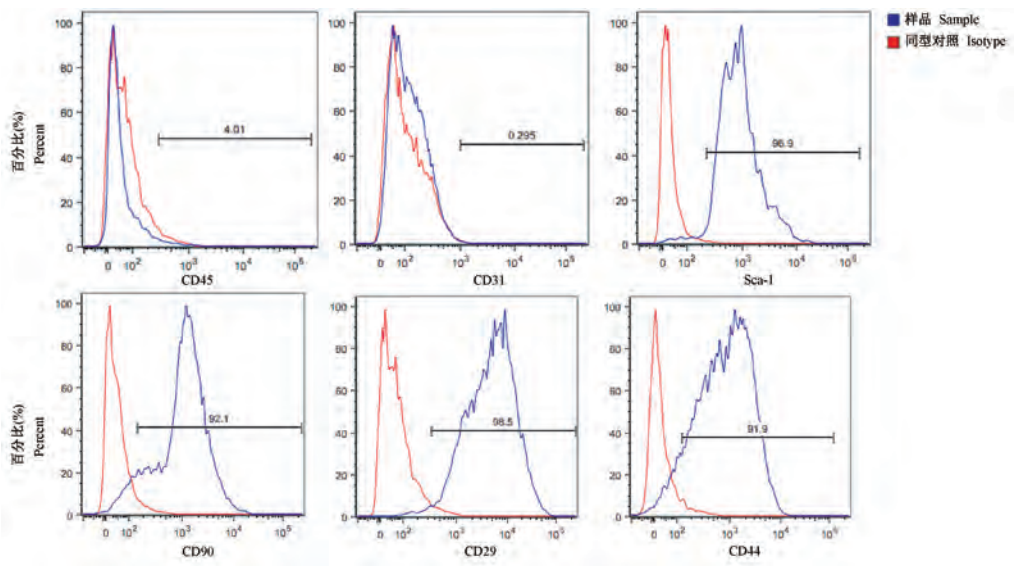


图 3 肺间充质干细胞的表面标记流式分析

Figure 3 FACS results for the surface markers of lung mesenchymal stromal cells

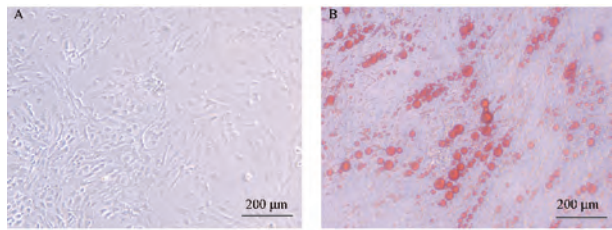


图 4 肺间充质干细胞成脂分化

Note. A, Control group. B, Induced group.

Figure 4 Adipogenic differentiation of lung mesenchymal stromal cells

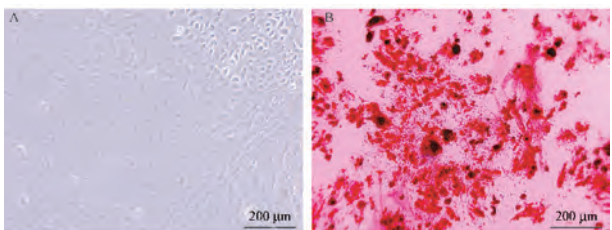


图 5 肺间充质干细胞成骨分化

Note. A, Control group. B, Induced group.

Figure 5 Osteogenic differentiation of lung mesenchymal stromal cells

贴壁较慢,第 4 天时可见细胞贴壁。在之后的传代过程中,两种方法分离所得细胞的增殖速度基本一致。本研究两种方法分离的细胞表型无差别,与 Hegab 等^[8] 分离的细胞表型一致,表现为 $Scal^{+}CD45^{-}CD31^{-}CD90^{+}CD29^{+}CD44^{+}$ 。在分化能力方面,本研究进行了成脂和成骨诱导分化,诱导 21 d 后分别形成了脂滴和钙盐沉积,可见所得 lr-MSC 具有多向分化能力。在诱导 21 d 后仍有部分细胞未分化,这可能与诱导液的诱导效率、诱导时间,以及 lr-MSC 细胞组成等有关,在后续研究中将调整诱导液各组分的浓度、延长诱导时间以提高诱导效率,同时分析 lr-MSC 多种表面标记,以深入了解 lr-MSC 的细胞组成情况。

本研究成功分离获得了 lr-MSC,建立了稳定的 lr-MSC 分离、培养和鉴定技术体系,这将为后续深入研究提供基础。

参考文献:

[1] Jiang W, Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells [J]. Cell Prolif, 2020, 53(1): e12712.

[2] Sveiven SN, Nordgren TM. Lung-resident mesenchymal stromal cells are tissue-specific regulators of lung homeostasis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 319(2): L197-L210.

[3] Kotton DN, Fine A. Lung stem cells [J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1): 145-156.

[4] Rolandsson S, Andersson Sjöland A, Brune JC, et al. Primary

mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells [J]. BMJ Open Respir Res, 2014, 1(1): e000027.

[5] Rolandsson Enes S, Andersson Sjöland A, Skog I, et al. MSC from fetal and adult lungs possess lung-specific properties compared to bone marrow-derived MSC [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29160.

[6] Rolandsson Enes S, Åhrman E, Palani A, et al. Quantitative proteomic characterization of lung-MSC and bone marrow-MSC using DIA-mass spectrometry [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9316.

[7] Schiller HB, Montoro DT, Simon LM, et al. The human lung cell atlas: a high-resolution reference map of the human lung in health and disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 61(1): 31-41.

[8] Hegab AE, Kubo H, Fujino N, et al. Isolation and characterization of murine multipotent lung stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(4): 523-536.

[9] Cao H, Chen X, Hou J, et al. The Shh/Gli signaling cascade regulates myofibroblastic activation of lung-resident mesenchymal stem cells via the modulation of Wnt10a expression during pulmonary fibrogenesis [J]. Lab Invest, 2020, 100(3): 363-377.

[10] Wang C, Cao H, Gu S, et al. Expression analysis of microRNAs and mRNAs in myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells [J]. Differentiation, 2020, 112: 10-16.

[收稿日期]2020-11-05

杨羽,赵菊花,黎官印,等. 可善挺通过抑制 C5a/C5aR1 通路对银屑病小鼠皮肤炎症和自噬的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 21-28.

Yang Y, Zhao JH, Li GY, et al. Cosentyx regulates skin inflammation and autophagy in psoriasis mice through the C5a/C5aR1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 21-28.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 004

可善挺通过抑制 C5a/C5aR1 通路对银屑病小鼠皮肤炎症和自噬的调控作用

杨羽,赵菊花*,黎官印,李达,王洁,陈颖,李燃

(川北医学院第二临床医学院·南充市中心医院,四川南充 637000)

【摘要】 目的 本研究拟通过咪喹莫特(IMQ)小鼠银屑病模型,探究可善挺(Cosentyx)通过 C5a/C5aR1 通路对银屑病小鼠皮肤炎症和自噬的调控作用。**方法** 8 周龄雄性 BALB/c 小鼠 27 只,随机分成 3 组(每组 9 只):空白对照组(Blank group)、银屑病模型组(Model group)、可善挺治疗组(Cosentyx-treat group),除空白对照组外,其余两组采用咪喹莫特(IMQ)制备银屑病模型,可善挺治疗组给与可善挺(第 1、6、13 天皮下注射,1 d 两次,每次 4.5 mg/kg)干预。通过 HE 染色观察可善挺对银屑病模型小鼠皮肤组织的病理损伤的影响,通过 ELISA 检测小鼠皮损组织中促炎因子 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的分泌情况,通过分光光度法检测小鼠皮损组织中髓过氧化物酶(MPO)活性,通过 Western blot 检测小鼠皮损组织中 Beclin 1 的表达量和 LC3-II/LC3-I 值,通过免疫组化法检测小鼠皮损组织 C5a、C3、C5aR1、C1qB 的表达水平。**结果** 可善挺抑制了皮损组织中 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 的表达,提高了 Beclin 1 的表达和 LC3-II/LC3-I 比值,同时可善挺下调了 C5a/C5aR1 通路中 C1qB、C3、C5a、C5aR1 分子的表达。**结论** 可善挺抑制了 C5a/C5aR1 通路,可以通过 C5a/C5aR1 通路调控银屑病皮损组织中炎症因子的表达,减缓银屑病炎症反应,同时可善挺增强了银屑病皮损组织中自噬作用,但无法确定可善挺是否通过 C5a/C5aR1 通路对银屑病皮损组织中自噬作用进行调控,因此机制还需进一步确定。

【关键词】 银屑病炎症;可善挺;C5a/C5aR1 通路;自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0021-08

Cosentyx regulates skin inflammation and autophagy in psoriasis mice through the C5a/C5aR1 signaling pathway

YANG Yu, ZHAO Juhua*, LI Guanyin, LI Da, WANG Jie, CHEN Ying, LI Ran

(Nanchong Central Hospital, the Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

【Abstract】 Objective To explore the regulatory effect of Cosentyx on skin inflammation and autophagy in psoriasis mice (IMQ-induced) through the C5a/C5aR1 pathway. **Methods** Twenty-eight 8-week-old BALB/c male mice were assigned to three groups of nine mice each: Blank, Psoriasis-Model, and Cosentyx-Treated Groups. All except the Blank Group received IMQ and the Cosentyx-Treated Group was treated with Cosentyx (subcutaneous injection, 4.5 mg/kg twice a day on days 1, 6, and 13). HE staining was used to observe the effect of Cosentyx on pathological damage in the skin of psoriasis mice. ELISA was used to measure the secretion of the proinflammatory cytokines IL-4, IL-8, TNF- α , and

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(18PJ421)。

[作者简介] 杨羽(1988—),女,主治医师,硕士,研究方向:皮肤性病学。E-mail: yu707yang@sina.com

[通信作者] 赵菊花(1977—),女,主任医师,硕士生导师,研究方向:皮肤性病学。E-mail: 214104642@qq.com

IL-1 β in psoriasis mouse skin. Spectrophotometry was used to observe the activity of medullary peroxidase (MPO) in mouse skin. Western blot analyses were used to measure Beclin 1 expression and LC3-II/LC3-I values. Immunohistochemistry analyses were performed to detect the expressions of C5a, C3, C5aR1, and C1qB in skin. **Results** Cosentyx inhibited the expressions of IL-4, IL-8, TNF- α , IL-1 β , and MPO in dermal tissues, improved Beclin 1 expression and the LC3-II/LC3-I ratio, and downregulated the expressions of C1qB, C3, C5a, and C5aR1. **Conclusions** Cosentyx inhibited the C5a/C5aR1 pathway, regulated the expression of inflammatory cytokines in psoriasis skin, and slowed psoriasis inflammation. Cosentyx enhanced autophagy in psoriasis skin tissues but we did not determine whether Cosentyx controlled autophagy through the C5a/C5aR1 pathway. Therefore, the mechanism requires further study.

[Keywords] psoriasis inflammation; Cosentyx; C5a/C5aR1 pathway; autophagy

银屑病是一种具有强遗传易感性和自身免疫性致病特征的慢性炎症性皮肤病^[1], 对患者的身体健康和 生活质量产生显著影响^[1-3]。可善挺(司库奇尤单抗注射液, Cosentyx)是临床上治疗中度至严重斑块性银屑病的药物, 通过拮抗 IL-17 治疗银屑病^[4]。最近有研究表明 C5a/C5aR1 通路在咪喹莫特(IMQ)诱导的小鼠银屑病皮损中的重要性^[5], 提示可以通过调节 C5a/C5aR1 信号缓解炎症反应, 治疗银屑病。但迄今为止, 可善挺是否通过 C5a/C5aR1 通路治疗银屑病尚无报道, 因此本试验通过咪喹莫特制造银屑病小鼠模型, 探究可善挺通过 C5a/C5aR1 通路对银屑病小鼠皮肤炎症和自噬的调控作用, 为临床上治疗银屑病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

27 只雄性 8 周龄 BALB/c 小鼠, SPF 级, 体重 (25 $\pm$ 2) g, 购于成都达硕生物有限公司[SCXK(川)2020-030], 实验在四川大学华西医院动物实验中心进行[SYXK(川)2018-119], 本实验严格按照 3R 原则进行, 并通过了四川大学华西医院实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批(IACUC 2020310A)。

1.2 主要试剂与仪器

可善挺® (1 mL: 150 mg, 司库奇尤单抗注射液, Cosentyx, 瑞士诺华公司); 咪喹莫特 (IMQ) 乳膏 (181201, 四川明欣药业有限责任公司); 兔抗 LC3 (ab48394)、兔抗 Beclin (ab62557)、C1qB 兔抗 (ab92508)、C3 兔抗 (ab200999)、C5a 兔抗 (ab202039)、C5aR1 兔抗 (ab252435) 均购自英国 Abcam 公司; 酶标仪 (美国, 赛默飞); ECL 凝胶成像系统 (美国, BIO-RAD 公司) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

小鼠适应性饲养 1 周后, 将小鼠随机分为 3 组,

每组 9 只: 分别为空白对照组 (Blank group)、银屑病模型组 (Psoriasis-model group)、可善挺治疗组 (Cosentyx-treat group), 分组具体处理如下:

空白对照组 (Blank group): 仅做备皮处理, 使小鼠背部暴露出约 4 cm $\times$ 4 cm 矩形无毛区域。如备皮过程中不慎划伤小鼠皮肤, 则立即使用百多邦软膏外涂于患处避免感染并将受伤小鼠单笼饲养直至伤口痊愈。

银屑病模型组 (Psoriasis-model group): 备皮, 使小鼠背部暴露出约 4 cm $\times$ 4 cm 矩形无毛区域, 用 0.06~0.07 g 咪喹莫特乳膏均匀涂抹于小鼠背部无毛区域, 厚度约为 1~2 mm, 充分涂抹以使药物被皮肤吸收, 早晚各一次, 涂抹 7 d。7 d 后小鼠皮肤造模区域出现鳞屑、红斑以及脱屑情况, 表明造模成功。同时从造模开始的第 1、6、13 天在银屑病造模部位附近进行皮下注射生理盐水, 1 d 两次 (早晚各一次), 每次 30 μ L/kg, 两次则 60 μ L/kg, 避免在银屑病皮损部位进行注射。

可善挺治疗组 (Cosentyx-treat group): 治疗组造模方式与模型组相同, 然后分别从造模开始的第 1、6、13 天在银屑病造模部位附近进行皮下注射可善挺® (司库奇尤单抗注射液), 1 d 两次 (早晚各一次), 每次 30 μ L/kg, 两次则 60 μ L/kg, 避免在银屑病皮损部位进行注射。

分别在造模第 2、7、14 天均采用脱颈椎法处死, 每次 3 只, 用无菌手术剪剪取小鼠背部靶皮损皮肤, 并将该皮肤组织平均分为若干份保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3.2 HE 染色

将小鼠皮损组织用 4% 中性甲醛溶液固定, 浓度梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 成片, 苏木精与伊红染色, 在显微镜下观察第 14 天各组小鼠局部皮损组织的病理学改变拍照并保存。

1.3.3 ELISA 检测

将皮损组织匀浆加入 ELISA 板中,室温孵育,洗板 5 次后加入酶联亲和物,室温孵育,洗板,加入底物溶液,室温下避光孵育,最后加入终止液终止反应。测定 450 nm 处吸光度(A)值。用 IL-4、IL-8、TNF- α 和 IL-1 β 的标准品分别制备梯度浓度的工作液,测定标准曲线,计算第 2、7、14 天局部皮损组织中促炎因子 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的分泌情况。

1.3.4 髓过氧化物酶(MPO)活性检测

按照 MPO 检测试剂盒说明书(中国,南京建成生物有限公司)将皮损组织与试剂二混合成 5% 匀浆,加入试剂三,37℃ 水浴 15 min,分装成两管,均加入试剂四,然后其中一管加显色剂,另一管加双蒸水作为对照,37℃ 水浴 30 min,加入试剂七,60℃ 水浴 10 min,水浴后立即在 460 nm 处测其吸光度值。然后对第 2、7、14 天各组小鼠局部皮损组织中性粒细胞(MPO)的浸润情况进行计算,计算活性值公式如下:

$$\text{MPO 活力(U/g 组织湿片)} = (\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}) / (11.3 \times \text{取样量})。$$

1.3.5 Western blot 检测

通过皮损组织组织蛋白提取、BCA 法蛋白浓度确定、SAS-PAGE 凝胶电泳、转膜、蛋白免疫印迹、显色反应等步骤,显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像,Image-Pro Plus 分析光密度,以 β -actin 为内参,空白对照组目标蛋白质相对含量为 1,计算各组蛋白质的相对表达量,以此检测第 2、7、14 天各组小鼠自噬相关基因 Beclin 1 和自噬体的经典标记物微管相关蛋白 LC3-II/LC3-I 蛋白在各组小鼠局部皮损组织中的表达量。

1.3.6 免疫组化法检测

将小鼠皮损组织切片后,选用 3% H_2O_2 阻断 5 min, PBS 洗涤,选择加入对应的缓冲液,孵化 10 min,洗涤,滴入 5% BSA 封闭液,室温孵化 30 min,滴入抗体进行孵育,洗涤,生物素标记,二抗孵育,洗涤, BAD 显色,苏木素复染,在显微镜下观察 C5a、C3、C5aR1、C1qB 的表达情况,并利用图像分析利用成像自动分析系统 Image-ProPlus 进行光密度扫描处理,求出各个标本的积分光密度(IOD)与面积;平均光密度(AOD)即为积分光密度与面积的比值,代表各组标本中细胞化学反应强度的变化。免疫组织化学染色图片显示棕黄色为阳性。

1.4 统计学方法

用 SPSS 19.0 分析软件进行数据处理分析,数据结果均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间比较,分析方法为 Duncan 多重比较方法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 可善挺减缓银屑病模型小鼠皮肤损伤程度

HE 染色结果见图 1,空白对照组皮肤组织表皮结构完整清晰,角化层明显,复层扁平上皮层较薄,细胞排列较为整齐紧密;真皮内胶原纤维交错排列,胞质红染、均匀;结缔组织与脂肪层结构清晰可见;皮下肌层肌纤维排列整齐,体积大小均一,细胞核形态正常,核仁多分布四周;未见明显病理变化。而通过咪喹莫特造模后,可见复层扁平上皮层增厚,细胞排列紊乱,表皮外层覆盖一层痂皮;真皮浅层部分胶原纤维坏死,坏死区域内可见少量的单个圆形深染的淋巴细胞浸润,较多长椭圆形的成纤维细胞和长梭形的纤维细胞增生,真皮内出血,可见较多红细胞渗出于纤维组织之间。经可善挺治疗后,皮肤复层扁平上皮层增厚、细胞排列紊乱、真皮浅层部分胶原纤维坏死、真皮浅层部分内淋巴细胞浸润和真皮内出血情况等均有所改善,表明可善挺能明显抑制咪喹莫特诱导的银屑病引起的小鼠局部皮肤损伤。

2.2 可善挺减轻银屑病模型小鼠皮肤炎症反应

通过对小鼠皮损组织中 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 的分泌量检测(见图 2)发现,银屑病模型组小鼠皮损组织中 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 分泌量在第 2、7、14 天均显著高于空白对照组($P < 0.05$),表明咪喹莫特诱导了小鼠局部皮损组织的炎症。经可善挺治疗后,第 2 天,与造模组相比,IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 分泌量均下降($P > 0.05$),治疗第 7 天,可善挺治疗组 IL-4 分泌量显著低于造模组($P < 0.05$),IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 也低于造模组($P > 0.05$),治疗第 14 天,可善挺治疗组 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 分泌量均显著低于造模组($P < 0.05$),这些结果提示可善挺可以降低皮损组织中促炎因子 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 的分泌和减轻中性粒细胞(MPO)的浸润情况,从而减轻咪喹莫特诱导的银屑病模型小鼠皮肤炎症反应。

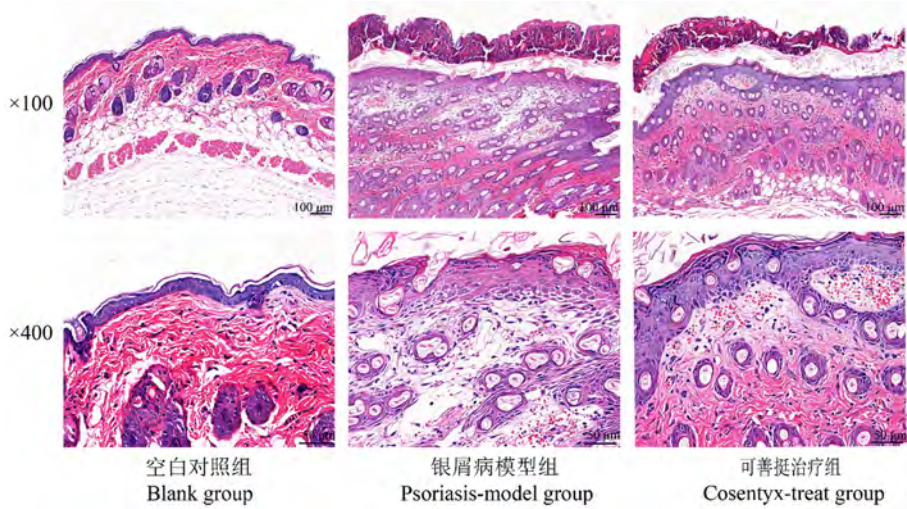
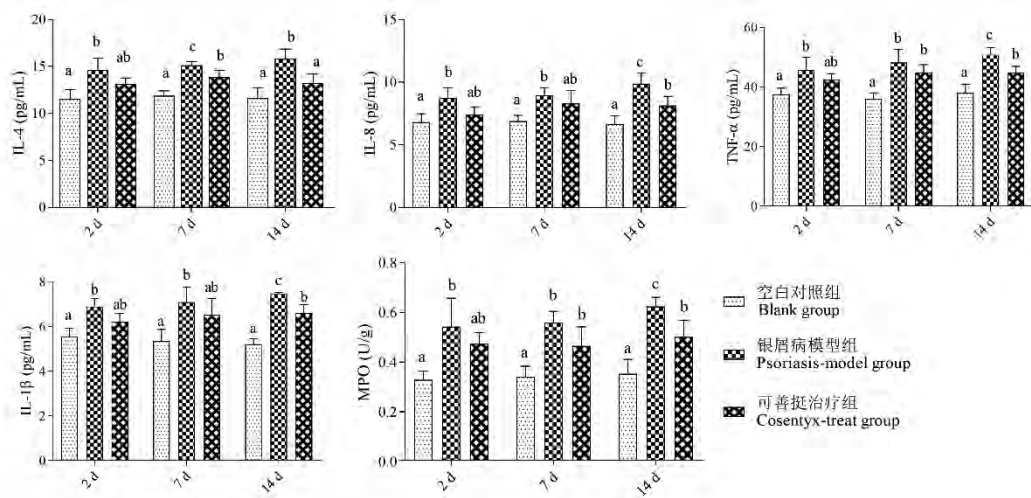


图 1 小鼠皮肤 HE 染色结果
Figure 1 HE staining results of mouse skin



注:组间比较,有字母相同, $P > 0.05$;无字母相同, $P < 0.05$ 。

图 2 皮损组织中 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 和 MPO 的检测结果

Note. Comparison between groups, there are letters the same, $P > 0.05$. No letters the same, $P < 0.05$.

Figure 2 Results of IL-4, IL-8, TNF- α , IL-1 β , and MPO in lesion tissue

2.3 可善挺增强银屑病模型小鼠皮肤组织自噬活性

Beclin 1 和 LC3-II/LC3-I 检测结果如图 3 所示,银屑病模型组小鼠 Beclin 1 相对蛋白表达量和 LC3-II/LC3-I 比值在第 2、7、14 天均显著低于空白对照组 ($P < 0.05$),提示咪喹莫特诱导的银屑病降低了细胞自噬活性。可善挺治疗第 2 天,治疗组 Beclin 1 相对蛋白表达量和 LC3-II/LC3-I 比值均高于模型组,但差异不显著 ($P > 0.05$),治疗第 7 天和第 14 天,治疗组 Beclin 1 相对蛋白表达量和

LC3-II/LC3-I 比值显著高于模型组 ($P < 0.05$),本实验结果表明可善挺能增强银屑病模型小鼠皮肤组织自噬活性。

2.4 可善挺对银屑病模型小鼠 C5a/C5aR1 通路的影响

2.4.1 可善挺对银屑病模型小鼠 C1qB 分子表达的影响

免疫组化法检测小鼠皮损组织 C1qB 分子表达结果图 4 所示,结果表明,实验的第 2 天,第 7 天和第 14 天咪喹莫特诱导的银屑病模型组小鼠皮损组

织 C1qB 分子均被广泛活化。在实验的第 7 天和第 14 天,与银屑病模型组相比,可善挺治疗组小鼠皮损组织中 C1qB 分子活化被抑制,其中第 7 天 C1qB 分子表达显著降低($P<0.05$)。

2.4.2 可善挺对银屑病模型小鼠 C3 分子表达的影响

免疫组化法检测小鼠皮损组织 C3 分子表达结果如图 5 所示,结果表明,实验的第 2 天,第 7 天和第 14 天咪喹莫特诱导的银屑病模型组小鼠皮损组织 C3 分子均被广泛活化。在实验的第 2 天和第 7 天,与银屑病模型组相比,可善挺治疗组小鼠皮损组织 C3 分子活化被明显抑制($P<0.05$),表明可善挺抑制了 C3 分子的表达。

2.4.3 可善挺对银屑病模型小鼠 C5a 分子表达的影响

免疫组化法检测小鼠皮损组织 C5a 分子表达结果如图 6 所示,结果表明,实验的第 2 天,第 7 天和第 14 天咪喹莫特诱导的银屑病模型组小鼠皮损组织 C5aR1 分子均被广泛活化。在实验的第 2 天、第 7 天和第 14 天,与银屑病模型组相比,可善

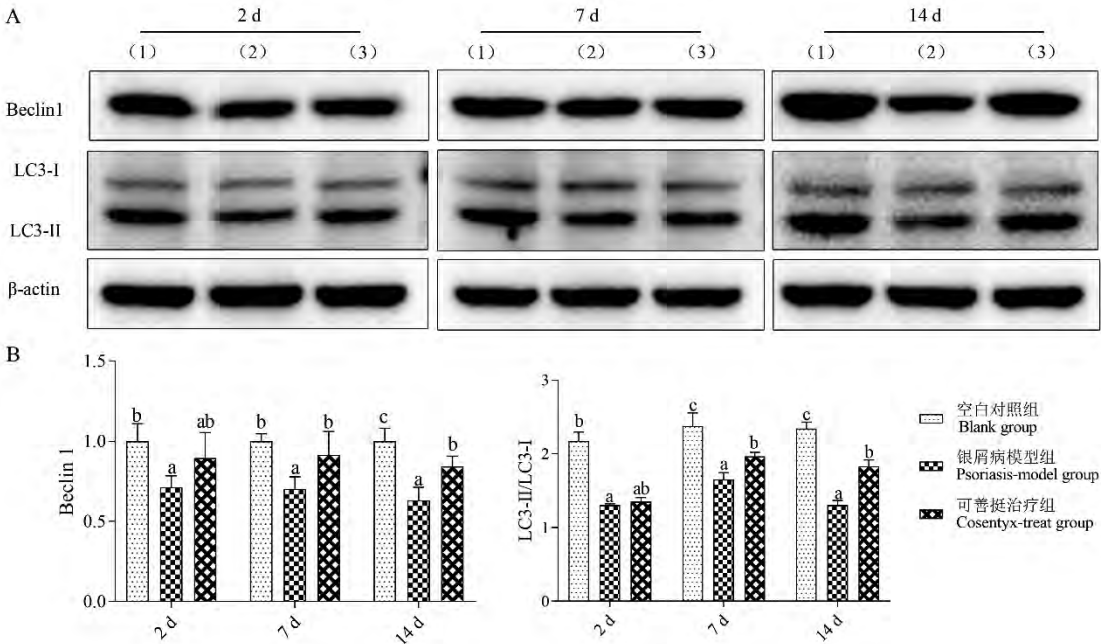
挺治疗组小鼠皮损组织 C5aR1 分子活化被抑制,第 7 天和第 14 天 C5a 分子的表达被显著抑制($P<0.05$)。

2.4.4 可善挺对银屑病模型小鼠 C5aR1 分子表达的影响

免疫组化法检测小鼠皮损组织 C5aR1 分子表达结果如图 7 所示,结果表明,实验的第 2 天,第 7 天和第 14 天咪喹莫特诱导的银屑病模型组小鼠皮损组织 C5aR1 分子均被广泛活化。在实验的第 2 天和第 7 天,与银屑病模型组相比,可善挺治疗组小鼠皮损组织 C5aR1 分子活化被明显抑制($P<0.05$),结果与 C3 分子检测结果一致。

3 讨论

咪喹莫特(IMQ)是银屑病模型常用的诱导剂,符合银屑病模型的多项标准^[6-8],并且 IMQ 造模简单,成本低,因此本实验采用 IMQ 诱导的小鼠银屑病模型^[9]。本实验 HE 染色结果显示,IMQ 诱导的银屑病模型组小鼠局部损伤皮肤出现了复层扁平上皮层增厚,细胞排列紊乱,淋巴细胞浸润,纤维细

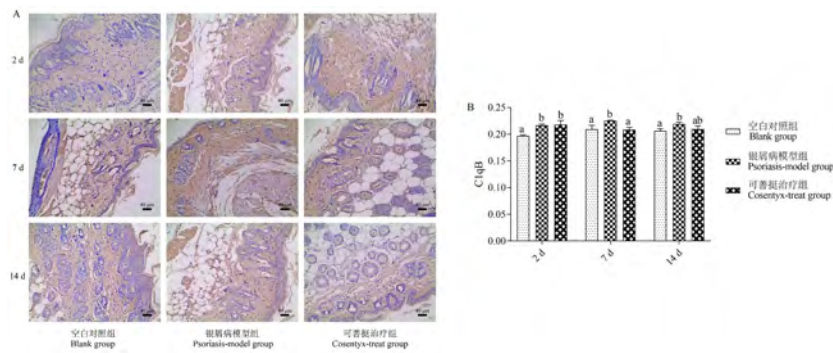


注:A:Western blot 结果条带。(1):空白对照组;(2):银屑病模型组;(3):可善挺治疗组;B:Western blot 统计结果。组间比较,有字母相同, $P>0.05$;无字母相同, $P<0.05$ 。

图3 Western blot 检测皮肤组织中 Beclin 1 蛋白相对表达量和 LC3- II/LC3-I 蛋白表达量比值

Note. A, Results of Western blot band. (1), Blank group. (2), Psoriasis-model group. (3), Cosentyx-treatment group. B, Statistics of Western blot. Comparison between groups, there are letters the same, $P>0.05$. No letters the same, $P<0.05$.

Figure 3 Results of Beclin 1 and LC3- II/LC3-I in lesion tissue

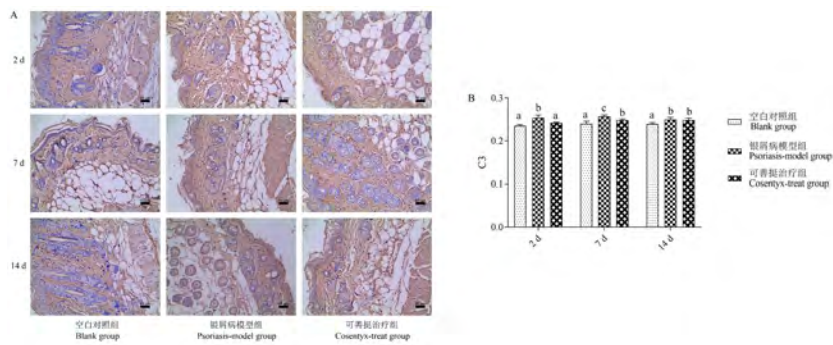


注:组间比较,有字母相同, $P > 0.05$;无字母相同, $P < 0.05$ 。

图 4 皮损组织 C1qB 免疫组化检测结果

Note. Comparison between groups, there are letters the same, $P > 0.05$. No letters the same, $P < 0.05$.

Figure 4 Immunohistochemical result of C1qB in skin lesions



注:组间比较,有字母相同, $P > 0.05$;无字母相同, $P < 0.05$ 。

图 5 皮损组织 C3 免疫组化检测结果

Note. Comparison between groups, there are letters the same, $P > 0.05$. No letters the same, $P < 0.05$.

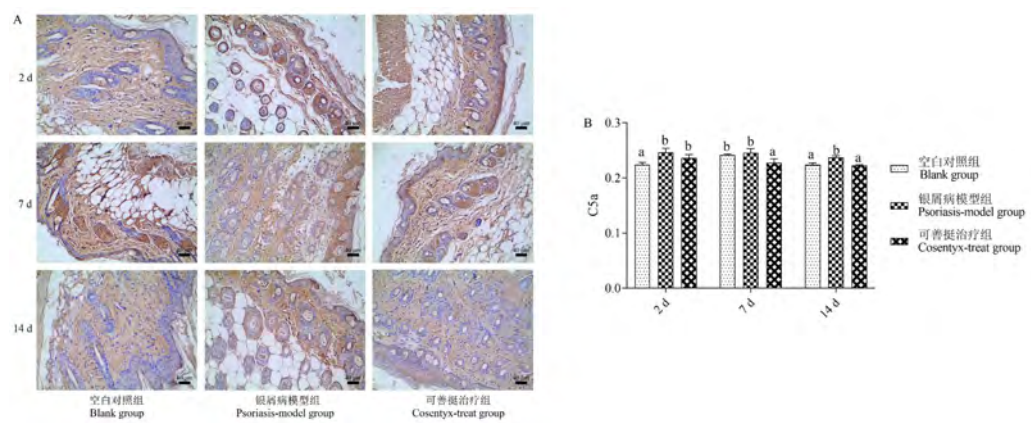
Figure 5 Immunohistochemical result of C3 in skin lesions

胞增生等银屑病组织典型病变,表明 IMQ 诱导的银屑病样小鼠模型建立成功。可善挺治疗组 HE 染色结果表明,可善挺一定程度上抑制了小鼠皮肤组织复层扁平上皮层增厚,淋巴细胞浸润,纤维细胞增生等现象,提示可善挺减缓了银屑病模型小鼠皮肤损伤程度,MPO 检测结果也表明,可善挺降低了银屑病皮损组织中炎性细胞浸润。

补体系统作为抵御外来病原体的第一道防线,是先天免疫最重要的分支之一^[5]。补体通过经典途径、替代途径和凝集素途径汇集到 C3 分子水平发挥作用^[10]。C1qB 是补体经典途径重要分子,通路激活后,补体 C3 分子活化,然后 C3 分子通过活化下游 C5a/C5aR1 通路进而参与疾病的发生^[11],此外,补体活化过程产物 C3a(C3 裂解产物)和 C5a 也会参与炎症反应^[12]。有研究表明补体系统参与

了银屑病炎症过程,C5a/C5aR1 通路可以调节银屑病小鼠皮损组织中 TNF- α , IFN- α/γ , IL-17A, IL-22, IL-23A 等促炎因子的表达^[5]。而银屑病是一种以 Th1、Th2 和 Th17 炎症轴失衡为特征的疾病^[13],可善挺是 IL-17A 拮抗剂^[14],研究表明可善挺可以通过拮抗 IL-17 治疗银屑病^[4],但尚无人研究可善挺是否通过 C5a/C5aR1 信号通路调节银屑病炎症。因此,本研究准备补上这个空白,我们实验证明可善挺可能通过抑制 C5a/C5aR1 通路,降低 IL-4、IL-8、TNF- α 、IL-1 β 炎症因子的表达,提示靶向抑制 C5a/C5aR1 信号通路可能是一种新的治疗银屑病的方法。

自噬是细胞受到应激时消除受损或有害成分,从而使细胞存活的细胞过程^[15-17]。Beclin1(也称为 Atg6)是自噬初始阶段双膜自噬体形成所必需的因

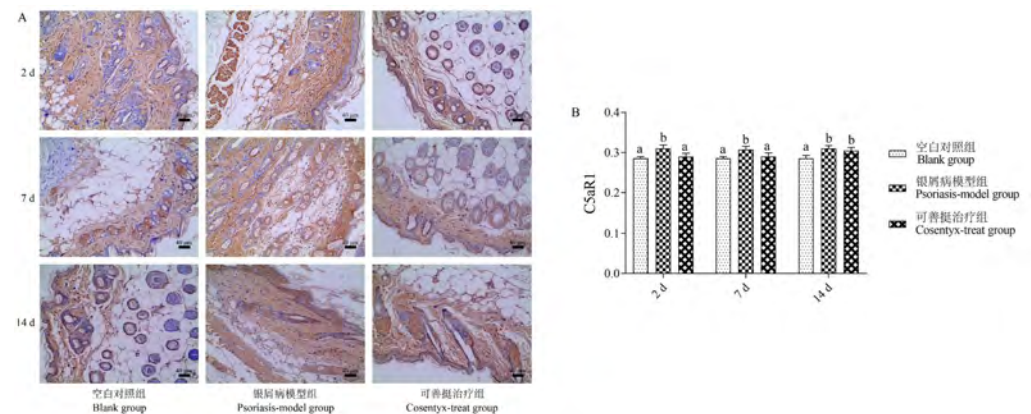


注:组间比较,有字母相同, $P > 0.05$;无字母相同, $P < 0.05$ 。

图 6 皮损组织 C5a 免疫组化检测结果

Note. Comparison between groups, there are letters the same, $P > 0.05$. No letters the same, $P < 0.05$.

Figure 6 Immunohistochemical result of C5a in skin lesions



注:组间比较,有字母相同, $P > 0.05$;无字母相同, $P < 0.05$ 。

图 7 皮损组织 C5aR1 免疫组化检测结果

Note. Comparison between groups, there are letters the same, $P > 0.05$. No letters the same, $P < 0.05$.

Figure 7 Immunohistochemical result of C5aR1 in skin lesions

子^[18],主要通过与其他自噬相关蛋白如 Bcl-2、Vps34 等结合形成巨大的蛋白复合物来促进自噬的启动^[19]。LC3 与自噬空泡的数量成正比,LC3-I 向 LC3-II 转化被认为是自噬活化的标志^[20-22]。补体系统与细胞自噬也具有相关性,自噬过程中,C3 可以通过 C3/ATG16L1 通路激活细胞自噬^[23]。有研究表明,在糖尿病条件下,C3 蛋白维持自噬,防止 β 细胞死亡^[23]。在生理条件下,补体蛋白 C3 沉积在细菌上,通过直接的 C3/ATG16L1 相互作用使细菌被靶向自噬,导致自噬依赖的细菌生长受限^[24]。在本研究中可善挺抑制了 C5a/C5aR1 信号通路,但却提高了银屑病皮损组织中的自噬活性,表明 C3 在

银屑病模型中可能不是参与调控银屑病细胞自噬的主要途径,可善挺可能通过其它通路对细胞自噬进行调节。因此,针对可善挺活化银屑病皮损组织细胞自噬的分子机制有待进一步研究。

本研究表明,可善挺增强了银屑病小鼠皮损组织自噬活性,并通过调节 C5a/C5aR1 信号通路缓解了 IMQ 诱导的银屑病小鼠皮损组织炎症,为临床上使用可善挺治疗银屑病提供了理论依据。同时也表明靶向抑制 C5a/C5aR1 信号通路是一种可行的治疗银屑病的方法。此外,可善挺是否通过 C5a/C5aR1 通路调节银屑病皮损组织细胞自噬效果还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1475.
- [2] Szepietowski JC, Reich A. Pruritus in psoriasis: An update [J]. *Eur J Pain*, 2016, 20(1): 41–46.
- [3] Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, et al. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases [J]. *J Am Acad Dermatol*, 1999, 41(3): 401–407.
- [4] Bilal J, Berlinberg A, Bhattacharjee S, et al. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of the interleukin (IL) – 12/23 and IL-17 inhibitors ustekinumab, secukinumab, ixekizumab, brodalumab, guselkumab and tildrakizumab for the treatment of moderate to severe plaque psoriasis [J]. *J Dermatolog Treat*, 2018, 29(6): 569–578.
- [5] Zheng QY, Liang SJ, Xu F, et al. C5a/C5aR1 pathway is critical for the pathogenesis of psoriasis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1866.
- [6] 高敏虹. 雷帕霉素调控原肌球蛋白(TPMs)在银屑病中的作用机制 [D]. 山东: 山东大学, 2018.
- [7] 朱震宇, 周逸颖, 陈霭如, 等. 雷公藤内酯醇改善 IMQ 诱导的银屑病样小鼠模型症状的初步探究 [J]. *南京大学学报 (自然科学版)*, 2018, 54(5): 992–1000.
- [8] 牛雪丽. 白细胞介素-18 影响咪喹莫特诱导的银屑病小鼠模型皮肤炎症的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [9] 吴剑平, 谢倩, 陈林, 张军峰. 咪喹莫特对 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(9): 1–6.
- [10] Ajona D, Castaño Z, Garayoa M, et al. Expression of complement factor H by lung cancer cells: effects on the activation of the alternative pathway of complement [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17): 6310–6318.
- [11] 陈立颖. C5a/C5aR 通路促 FGL2 表达在结肠癌中的机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [12] Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Pio R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 85: 153–163.
- [13] Campanati A, Orciani M, Lazzarini R, al et. TNF- α inhibitors reduce the pathological Th(1)–Th(17)/Th(2) imbalance in cutaneous mesenchymal stem cells of psoriasis patients [J]. *Exp Dermatol*, 2017, 26(4): 319–324.
- [14] Fala L. Cosentyx (Secukinumab): first IL-17A antagonist receives FDA approval for moderate-to-severe plaque psoriasis [J]. *Am Health Drug Benefits*, 2016, 9: 60–63.
- [15] Wang C, Wang Y, McNutt MA, et al. Autophagy process is associated with anti-neoplastic function [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(6): 425–432.
- [16] Fougeray S, Pallet N. Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(1): 34–45.
- [17] Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013, 61(1): 43–58.
- [18] Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein [J]. *Cell Res*, 2007, 17(10): 839–849.
- [19] Chen S, Rehman SK, Zhang W, et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(2): 220–229.
- [20] Zhang X, Zheng J, Yan Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 regulates autophagy in acute lung injury through AMPK/mTOR signaling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 672: 108061.
- [21] Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12–Apg5 conjugate [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(9): 1679–1688.
- [22] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720–5728.
- [23] Toledo M, Singh R. Complement C3 and autophagy keep the β cell alive [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 4–6.
- [24] Sorbara MT, Foerster EG, Tsalikis J, et al. Complement C3 drives autophagy-dependent restriction of cyto-invasive bacteria [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(5): 644–652.

[收稿日期] 2020–09–28

李凡,张学林,冯静茹,等. 四君子汤含药血清通过抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 通路影响卵巢癌细胞的上皮间质转化 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 29-37.

Li F, Zhang XL, Feng JR, et al. Sijunzi Decoction containing serum affects the epithelial mesenchymal transition of ovarian cancer cells by inhibiting the RhoA/Rac1/Cdc42 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 29-37.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 005

四君子汤含药血清通过抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 通路影响卵巢癌细胞的上皮间质转化

李 凡^{*}, 张学林, 冯静茹, 郝 洁, 周 蕾

(河北北方学院附属第二医院, 张家口 075100)

【摘要】 目的 探索四君子汤含药血清对卵巢癌细胞增殖迁移、侵袭及上皮间质化的影响,并初步研究其作用机理。**方法** 体外培养人卵巢癌细胞(SKOV3)和人卵巢上皮细胞,随机分为空白对照组、舒尼替尼组、四君子汤 I 组、II 组和 III 组。噻唑蓝法检测各组 SKOV3 细胞和人卵巢上皮细胞增殖变化情况;划痕实验和侵袭(transwell)实验检测各组 SKOV3 细胞迁移和侵袭能力;蛋白免疫印迹分析法检测各组 SKOV3 细胞上皮型钙粘蛋白(E-cadherin)、神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(Rac1)和细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42)蛋白表达情况;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测各组 SKOV3 细胞 RhoA、Rac1 和 Cdc42 mRNA 表达变化。**结果** 各组人卵巢上皮细胞存活率差异无统计学意义($P>0.05$)。与空白对照组相比,舒尼替尼组 SKOV3 细胞存活率、划痕愈合率、侵袭数量、N-cadherin、Vimentin 蛋白、RhoA、Rac1、Cdc42 mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞存活率、划痕愈合率、侵袭数量、N-cadherin、Vimentin 蛋白、RhoA、Rac1、Cdc42 mRNA 和蛋白表达依次降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达依次升高($P<0.05$),呈剂量依赖性。四君子汤 III 组上述指标和舒尼替尼组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 四君子汤含药血清能够抑制人卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质化,可能与 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路激活受阻相关。

【关键词】 四君子汤含药血清;人卵巢癌细胞;Ras 同源基因家族成员 A;Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1;细胞分裂周期蛋白 42;上皮间质化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0029-09

Sijunzi Decoction containing serum affects the epithelial mesenchymal transition of ovarian cancer cells by inhibiting the RhoA/Rac1/Cdc42 pathway

LI Fan^{*}, ZHANG Xuelin, FENG Jingru, HAO Jie, ZHOU Lei

(the Second Hospital Affiliated to Hebei North University, Zhangjiakou 075100, China)

【Abstract】 Objective To explore the effects of Sijunzi Decoction containing serum on the proliferation, migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition of ovarian cancer cells, and the mechanism involved. **Methods** Human ovarian cancer cells (SKOV3) and human ovarian epithelial cells were cultured *in vitro* and randomly divided into

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划项目(20200496)。

[作者简介] 李凡(1984—),男,本科,主管检验师,研究方向:肿瘤免疫。E-mail: lifanfan492@163.com

blank control, sunitinib, and Sijunzi Decoction I, II, and III groups. The methyl thiazolyl tetrazolium assay was used to detect the proliferation of SKOV3 cells and human ovarian epithelial cells. The migration and invasion abilities of SKOV3 cells were examined using the scratch test and transwell test. The protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, RAS homolog gene family member A (RhoA), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), and cell division cycle 42 (Cdc42) in SKOV3 cells were detected by western blotting. In addition, the mRNA expressions of RhoA, Rac1, and Cdc42 in SKOV3 cells were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** There was no significant difference in the survival rate of human ovarian epithelial cells among the groups ($P>0.05$). Compared with the blank control group, the survival rate, wound healing rate, invasion number, protein expressions of N-cadherin and vimentin, and mRNA and protein expressions of RhoA, Rac1, and Cdc42 in SKOV3 cells in the sunitinib group were significantly lower ($P<0.05$), and the protein expression of E-cadherin was significantly higher ($P<0.05$). The survival rate, wound healing rate, invasion number, protein expressions of N-cadherin and vimentin, and mRNA and protein expressions of RhoA, Rac1, and Cdc42 in SKOV3 cells in the Sijunzi Decoction I, II, and III groups were decreased ($P<0.05$), and the protein expression of E-cadherin was increased ($P<0.05$) dose-dependently. There was no significant difference in these indexes between the Sijunzi Decoction III and sunitinib groups ($P>0.05$). **Conclusions** Sijunzi Decoction containing serum inhibits the proliferation, migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition of human ovarian cancer cells, which may be related to inhibition of the RhoA/Rac1/Cdc42 signaling pathway activation.

[Keywords] Sijunzi Decoction containing serum; human ovarian cancer cell; Ras homolog gene family member A; Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; cell division cycle 42; epithelial mesenchymal

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是全球第六大常见的女性妇科疾病,死亡率居妇科恶性肿瘤之首^[1-2]。由于 OC 患者发作时具有隐匿性,因此确诊时 70% 处于晚期,为提高 OC 患者的生存率增加了挑战,因此开发新型有效药物改善 OC 治疗效果是当务之急^[3]。四君子汤由人参、白术、茯苓和炙甘草四味中药材组成,对脾胃气虚、调节肠道蠕动和促进消化等具有良好的治疗效果^[4]。此外,朱超等^[5]研究发现,四君子汤能够抑制胃癌细胞株侧群细胞的增殖和侵袭能力。Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA)、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) 和细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cycle 42, Cdc42) 与细胞迁移和侵袭密切相关,已被证实阻断 RhoA/Rac1/Cdc42 信号途径,能够抑制风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的迁移和侵袭行为,但四君子汤对卵巢癌迁移和侵袭的影响及其具体作用机制尚不明确^[6]。本实验旨在探索四君子汤含药血清对人卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,并初步研究其与 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路的关联,为 OC 的临床治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 50 只,8 周龄,体重(200±20)g,

均为雌性,购自上海剑钝生物科技有限公司[SCXK(沪)2019-0027],动物饲养于河北北方学院(药理学系)[SYXK(冀)2019-004]。本研究经河北北方学院附属第二医院伦理委员会批准(伦审 IACUC2019-0307 号),实验符合 3R 保护原则。

1.1.2 细胞

人卵巢癌细胞 SKOV3 购自中国科学院细胞库,批号 TCHu185;人卵巢上皮细胞购自北京北纳创联生物技术研究院,批号 BNCC340096。

1.2 主要试剂与仪器

四君子汤颗粒(人参 12 g,白术 12 g,茯苓 12 g,炙甘草 6 g)由本院中药房提供;舒尼替尼(原料药,纯度≥98%,批号 20190109)购自武汉贝尔卡生物医药有限公司;McCOY's 5A 培养基(批号 M9420)、RPMI 1640 培养基(批号 31800022)、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂(批号 M8180)、Matrigel 胶(批号 356234)、RIPA 裂解液(批号 R0010)、ECL 发光液(批号 PE0010)、TRIzol 试剂盒(批号 15596-018)、逆转录试剂盒(批号 T2210-200T)、无血清培养基(批号 ML4011)均购自北京 Solarbio 公司;胎牛血清(批号 C0225)、胰酶消化液(批号 C0201)、上皮型钙粘蛋白(E-cadherin)兔抗人多克隆抗体(批号 AF6759)、波形蛋白(Vimentin)兔抗人单克隆抗体(批号 AF1975)、神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)兔抗人多克隆抗体(批号 AF0243)、RhoA 兔抗人单克隆抗体(批号 AF2179)、

Rac1 兔抗人多克隆抗体(批号 AF7854)、Cdc42 兔抗人单克隆抗体(批号 AF2794)均购自上海碧云天生物技术有限公司;GAPDH 兔抗人多克隆抗体(批号 PA1-16777)、山羊抗兔 IgG(H+L)二级抗体(批号 A32731)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

Heracell™ 240i 型 CO₂ 细胞培养箱、Multiskan Sky 型全波长酶标仪、GENESYS™ 50 型可见光/紫外分光光度计均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Gel Doc™ XR+型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;2720 型实时荧光定量 PCR(Real time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR)仪购自美国 ABI 公司;LW300LFT-LED 型荧光显微镜购自北京测维光电仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备

将 50 只 SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为 5 组:不含药血清组、舒尼替尼阳性药物组、2.07 g/kg(1/2 等效剂量)四君子汤给药组、4.14 g/kg(1 倍等效剂量)四君子汤给药组、8.28 g/kg(2 倍等效剂量)四君子汤给药组,每组 10 只,给药剂量参照“人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表”计算。不含药血清组给予生理盐水灌胃,灌胃体积 5 mL;舒尼替尼组给予 10.14 g/kg 舒尼替尼灌胃,每天 1 次,灌胃体积 5 mL;各四君子汤组给予对应剂量的四君子汤分别进行灌胃处理,每天 2 次,每次 2.5 mL;连续 7 d,第 8 天末次给药 1 h,麻醉后,无菌环境下经腹动脉采血,4℃静置 2 h,离心(3000 r/min, 15 min)3 次,同组合并上清,56℃灭活 30 min,过滤除菌,得不含药血清、舒尼替尼含药血清、四君子汤低、中、高剂量组含药血清,-20℃保存备用。

1.3.2 细胞培养及分组

将 SKOV3 细胞接种于含有 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞融合 80%左右,每隔 1 d 更换一次培养液。取对数期生长的 SKOV3 细胞,随机分为空白对照组、舒尼替尼组、四君子汤 I 组、II 组、III 组,接种于 96 或 6 孔板,分别用体积分数为 20%的不含药血清(空白对照组)、舒尼替尼含药血清(舒尼替尼组)、四君子汤低剂量含药血清(四君子汤 I 组)、四君子汤中剂量含药血清(四君子汤 II 组)和四君子汤高剂量含药血清(四君子汤 III 组),处理 24 h,其中 96 孔板培养液量为每孔 200 μL,6 孔板培养液量为每

孔 2 mL,收集细胞用于后续实验。另将用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养的人卵巢上皮细胞接种于 96 孔板,按照上述方法分组并处理 24 h 后用于后续实验。

1.3.3 MTT 实验

向 1.3.2 各组 SKOV3 细胞孔板中加入 5 μL 5 mg/mL MTT 溶液,培养箱孵育 4 h,吸去上清液,每孔添加 100 μL 二甲基亚砜,37℃摇床震荡 10 min,570 nm 下测量各孔 OD 值,计算细胞存活率,以上每组设置 6 个复孔。存活率(%)=(实验孔 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照组 OD 值-调零孔 OD 值)。按照上述方法测定人卵巢上皮细胞的存活率。

1.3.4 划痕实验

待 1.3.2 各组 SKOV3 细胞融合至 85%左右,用 200 μL 枪头垂直划痕,PBS 清洗 3 次,加入无血清培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,显微镜下观察并记录 0 h 和 24 h 时划痕变化情况,计算各组细胞愈合率。愈合率=(0 h 划痕距离-24 h 划痕距离)/0 h 划痕距离×100%。

1.3.5 Transwell 实验

收集 1.3.2 各组 SKOV3 细胞,调整浓度为每毫升 2×10^5 个,取 200 μL 接种于预铺设 Matrigel 基底胶的上室,下室添加每孔 500 μL 完全培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱 24 h,甲醛固定 25 min,结晶紫染色 25 min,随机抽取 6 个视野,高倍(×200)显微镜下观察并计数。

1.3.6 蛋白免疫印迹分析实验

收集 1.3.2 各组 SKOV3 细胞,加入 RIPA 裂解液裂解,测量各组总蛋白含量。取等量蛋白上样、12%聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、脱脂牛奶封闭 4 h,洗膜,加入一抗 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、RhoA、Rac1、Cdc42 和 GAPDH(1:1000),4℃孵化过夜,洗膜然后加入二抗(1:5000),室温封闭 1 h, TBST 洗膜,曝光显影并记录,计算目标蛋白相对表达值。目标蛋白相对表达量=目标条带灰度值/GAPDH 灰度值。

1.3.7 qRT-PCR 实验

按照 TRIzol 说明书,提取 1.3.2 各组细胞总 RNA,纯化后,使用紫外分光光度计计算 RNA 纯度($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$),逆转录(37℃ 60 min, 95℃ 3 min)得 cDNA。以各组 cDNA 为模板,进行扩增反应。PCR 反应条件:95℃预变性 3 min,95℃变性 15 s,60℃退火 40 s,95℃延伸 15 s,共 40 次循环。以

GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法分析 RhoA、Rac1 和 Cdc42 基因表达情况。RhoA、Rac1、Cdc42 及 GAPDH 引物序列见表 1,均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 统计学方法

以统计学软件 SPSS 22.0 分析实验数据,计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多组间比较使用单因素方差分析,进一步两组间比较行 SNK-*q* 检验,当 $P<0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四君子汤含药血清对 SKOV3 细胞及人卵巢上皮细胞存活率变化影响

与空白对照组相比,舒尼替尼组 SKOV3 细胞存活率显著降低($P<0.05$),四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞存活率依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性。四君子汤 III 组与舒尼替尼组 SKOV3 细胞存活率差异无统计学意义($P>0.05$)。各组人卵巢上

皮细胞存活率差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 四君子汤含药血清对 SKOV3 细胞迁移能力的影响

与空白对照组相比,舒尼替尼组 SKOV3 细胞划痕愈合率显著降低($P<0.05$),四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞划痕愈合率依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性。四君子汤 III 组与舒尼替尼组细胞划痕愈合率差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1、表 3。

2.3 四君子汤含药血清对 SKOV3 细胞侵袭数量变化

与空白对照组相比,舒尼替尼组 SKOV3 细胞侵袭数量显著降低($P<0.05$),四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞侵袭数量依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性。四君子汤 III 组与舒尼替尼组细胞侵袭数量差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2、表 4。

表 1 RhoA、Rac1、Cdc42 和内参 GAPDH 引物序列		
Table 1 Primer sequences of RhoA, Rac1, Cdc42 and internal reference GAPDH		
基因 Gene	上游引物(5'-3') Upstream primer	下游引物(5'-3') Downstream primer
RhoA	TCTGTCCCAACGTGCCCATCAT	CTGCCCTTCTCAGGTTTCACCG
Rac1	CGGTGAATCTGGGCTTATGGGA	GGAGGTTATATCCTTACCGTACG
Cdc42	TGACAGATTACGACCGCTGAGTT	GGAGTCTTTGGACAGTGGTGAG
GAPDH	GATTCCACCCATGGCAAATT	TCTCGCTCCTGGAAGATGGT

表 2 各组 SKOV3 细胞及人卵巢上皮细胞存活率变化情况($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Changes in survival rate of SKOV3 cells and human ovarian epithelial cells in each group

组别 Groups	SKOV3 细胞存活率(%) SKOV3 cell survival rate	人卵巢上皮细胞存活率(%) Human ovarian epithelial cell survival rate
空白对照组 Blank control group	98.22±1.39	97.77±1.13
四君子汤 I 组 Sijunzi Decoction I group	80.17±1.50 ^a	96.03±2.75
四君子汤 II 组 Sijunzi Decoction II group	64.04±2.04 ^{ab}	96.52±2.04
四君子汤 III 组 Sijunzi Decoction III group	43.56±2.52 ^{abc}	97.86±1.91
舒尼替尼组 Sunitinib group	46.74±2.34 ^{abc}	96.93±2.33

注:与空白对照组相比,^a $P<0.05$;与四君子汤 I 组相比,^b $P<0.05$;与四君子汤 II 组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction I group, ^b $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction II group, ^c $P<0.05$.

表 3 四君子汤含药血清作用后各组 SKOV3 细胞划痕愈合率($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Healing rate of scratches of SKOV3 cells in each group after the effect of Sijunzi decoction-containing serum

组别 Groups	SKOV3 细胞划痕愈合率(%) Healing rate of scratches of SKOV3 cells
空白对照组 Blank control group	0.03±0.02
四君子汤 I 组 Sijunzi Decoction I group	78.16±1.41 ^a
四君子汤 II 组 Sijunzi Decoction II group	47.34±1.76 ^{ab}
四君子汤 III 组 Sijunzi Decoction III group	6.17±2.13 ^{abc}
舒尼替尼组 Sunitinib group	8.05±1.82 ^{abc}

注:与空白对照组相比,^a $P<0.05$;与四君子汤 I 组相比,^b $P<0.05$;与四君子汤 II 组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction I group, ^b $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction II group, ^c $P<0.05$.

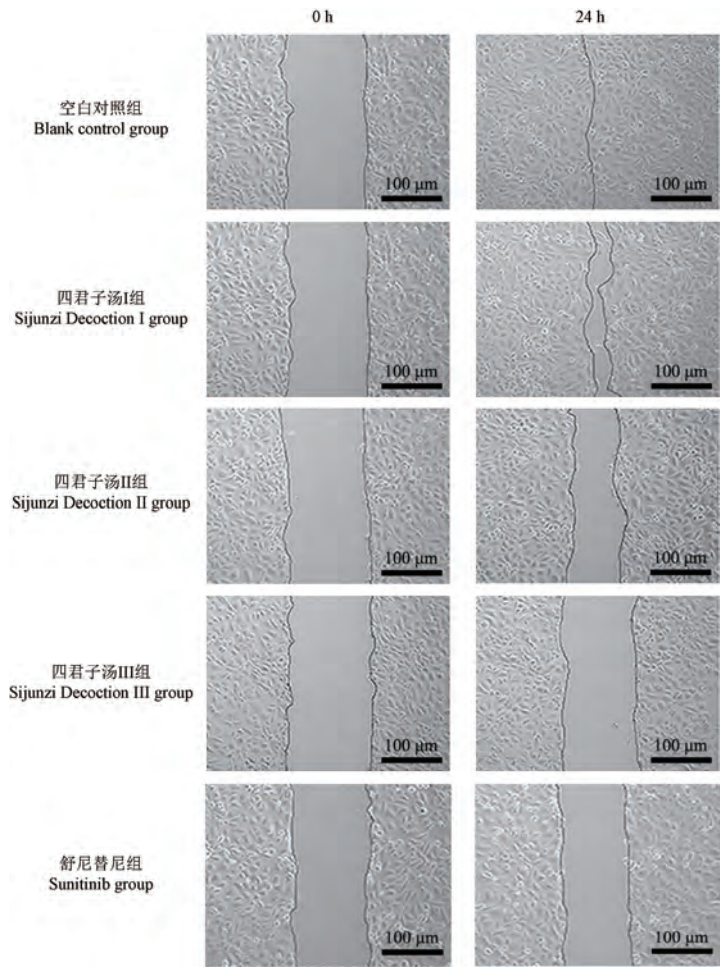


图 1 各组 SKOV3 细胞迁移图片

Figure 1 SKOV3 cell migration pictures of each group

表 4 四君子汤含药血清作用后各组 SKOV3 细胞侵袭数量($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Number of SKOV3 cell invasion in each group after the effect of Sijunzi decoction

组别 Groups	细胞侵袭数量 Number of SKOV3 cell invasion
空白对照组 Blank control group	240. 28±10. 23
四君子汤 I 组 Sijunzi Decoction I group	174. 07±12. 11 ^a
四君子汤 II 组 Sijunzi Decoction II group	110. 29±10. 05 ^{ab}
四君子汤 III 组 Sijunzi Decoction III group	76. 73±11. 32 ^{abc}
舒尼替尼组 Sunitinib group	81. 58±12. 17 ^{abc}

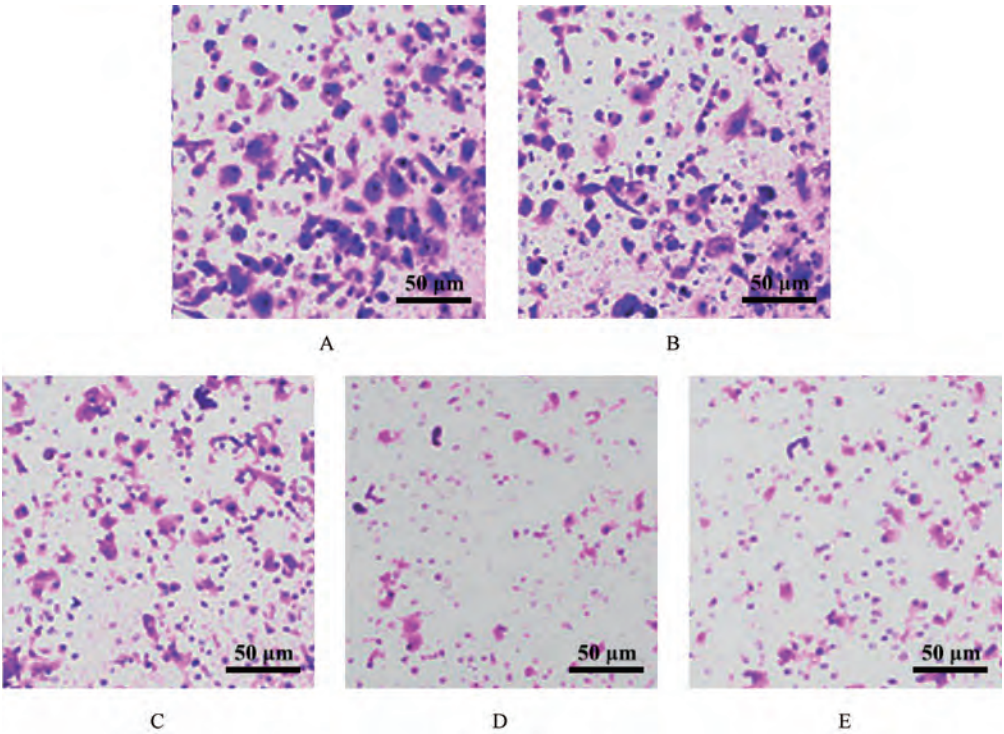
注:与空白对照组相比, ^a $P<0.05$;与四君子汤 I 组相比, ^b $P<0.05$;与四君子汤 II 组相比, ^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction I group, ^b $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction II group, ^c $P<0.05$.

2.4 四君子汤含药血清对 SKOV3 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

与空白对照组相比,舒尼替尼组 SKOV3 细胞 E-cadherin 蛋白表达显著升高($P<0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达显著降低($P<0.05$),四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞 E-cadherin 蛋白表达依次升高($P<0.05$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达依次降低($P<0.05$)。四君子汤 III 组与舒尼替尼组细胞 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3、表 5。

2.5 四君子汤含药血清对 RhoA、Rac1 和 Cdc42 表达的影响

与空白对照组相比,舒尼替尼组 SKOV3 细胞 RhoA、Rac1、Cdc42 mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.05$),四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞 RhoA、Rac1、Cdc42 mRNA 和蛋白表达依次降低($P<0.05$)。四君子汤 III 组与舒尼替尼组细胞 RhoA、Rac1、Cdc42 mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 4、表 6。

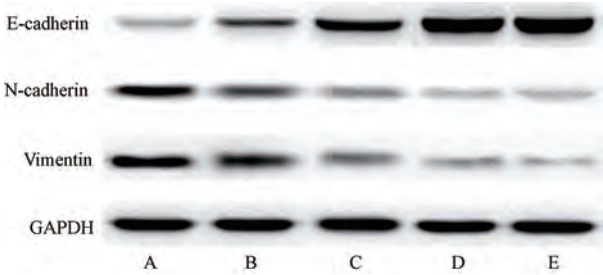


注:A:空白对照组;B:四君子汤 I 组;C:四君子汤 II 组;D:四君子汤 III 组;E:舒尼替尼组。

图 2 四君子汤含药血清对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色)

Note. A, Blank control group. B, Sijunzi Decoction I group. C, Sijunzi Decoction II group. D, Sijunzi Decoction III group. E, Sunitinib group.

Figure 2 Effect of Sijunzi decoction-containing serum on the invasion ability of SKOV3 cells (Crystal violet staining)

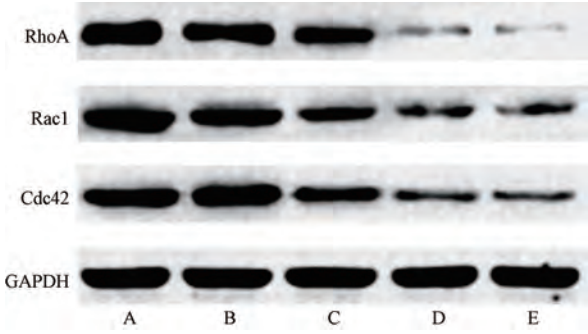


注:A:空白对照组;B:四君子汤 I 组;C:四君子汤 II 组;D:四君子汤 III 组;E:舒尼替尼组。

图 3 各组 SKOV3 细胞 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达电泳图

Note. A, Blank control group. B, Sijunzi Decoction I group. C, Sijunzi Decoction II group. D, Sijunzi Decoction III group. E, Sunitinib group.

Figure 3 E-cadherin, N-cadherin and Vimentin protein expression electrophoresis of SKOV3 cells in each group



注:A:空白对照组;B:四君子汤 I 组;C:四君子汤 II 组;D:四君子汤 III 组;E:舒尼替尼组。

图 4 各组 SKOV3 细胞 RhoA、Rac1 和 Cdc42 蛋白表达电泳图

Note. A, Blank control group. B, Sijunzi Decoction I group. C, Sijunzi Decoction II group. D, Sijunzi Decoction III group. E, Sunitinib group.

Figure 4 RhoA, Rac1 and Cdc42 protein expression electrophoresis of SKOV3 cells in each group

表 5 各组 SKOV3 细胞 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达情况($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 5 E-cadherin, N-cadherin and Vimentin protein expression of SKOV3 cells in each group

组别 Groups	E-cadherin 蛋白 E-cadherin protein	N-cadherin 蛋白 N-cadherin protein	Vimentin 蛋白 Vimentin protein
空白对照组 Blank control group	0.12±0.02	0.85±0.03	1.03±0.02
四君子汤 I 组 Sijunzi Decoction I group	0.37±0.01 ^a	0.47±0.02 ^a	0.61±0.01 ^a
四君子汤 II 组 Sijunzi Decoction II group	0.82±0.02 ^{ab}	0.22±0.01 ^{ab}	0.32±0.01 ^{ab}
四君子汤 III 组 Sijunzi Decoction III group	1.16±0.04 ^{abc}	0.09±0.02 ^{abc}	0.18±0.02 ^{abc}
舒尼替尼组 Sunitinib group	1.11±0.05 ^{abc}	0.07±0.01 ^{abc}	0.15±0.03 ^{abc}

注:与空白对照组相比,^a $P<0.05$;与四君子汤 I 组相比,^b $P<0.05$;与四君子汤 II 组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction I group, ^b $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction II group, ^c $P<0.05$.

表 6 各组 SKOV3 细胞 RhoA、Rac1 和 Cdc42 mRNA 表达情况($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 6 RhoA, Rac1 and Cdc42 protein expression of SKOV3 cells in each group

组别 Groups	RhoA		Rac1		Cdc42	
	mRNA	蛋白 protein	mRNA	蛋白 protein	mRNA	蛋白 protein
空白对照组 Blank control group	1.06±0.03	1.09±0.03	1.10±0.02	1.12±0.02	0.95±0.02	1.01±0.02
四君子汤 I 组 Sijunzi Decoction I group	0.82±0.01 ^a	0.85±0.02 ^a	0.86±0.02 ^a	0.90±0.03 ^a	0.72±0.02 ^a	0.81±0.02 ^a
四君子汤 II 组 Sijunzi Decoction II group	0.51±0.02 ^{ab}	0.52±0.02 ^{ab}	0.54±0.01 ^{ab}	0.50±0.02 ^{ab}	0.45±0.03 ^{ab}	0.48±0.02 ^{ab}
四君子汤 III 组 Sijunzi Decoction III group	0.21±0.01 ^{abc}	0.17±0.03 ^{abc}	0.27±0.02 ^{abc}	0.21±0.01 ^{abc}	0.23±0.02 ^{abc}	0.23±0.02 ^{abc}
舒尼替尼组 Sunitinib group	0.20±0.02 ^{abc}	0.13±0.03 ^{abc}	0.29±0.03 ^{abc}	0.23±0.01 ^{abc}	0.25±0.02 ^{abc}	0.22±0.01 ^{abc}

注:与空白对照组相比,^a $P<0.05$;与四君子汤 I 组相比,^b $P<0.05$;与四君子汤 II 组相比,^c $P<0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction I group, ^b $P<0.05$. Compared with the Sijunzi Decoction II group, ^c $P<0.05$.

3 讨论

OC 具有骨盆腔广泛扩散的特征,癌细胞的转移是造成这种结果的重要原因^[7]。目前,OC 的治疗主要以外科手术治疗为基础,辅以化学疗法,但大多数患者会在术后阶段复发,导致 OC 的 5 年生存率仅为 44%^[8]。血清药理学是一种广泛用于中药和复方药物药效及药理机制研究的实验方法,已证实臭牡丹含药血清能够抑制肝癌细胞的增殖和迁移^[9]。

四君子汤四君子汤来源于宋代《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓和甘草组成,主要含有多糖、皂苷和黄酮类等有效成分,具有增强免疫、抗肿瘤和抗衰老等作用^[10]。近来研究显示,四君子汤在抗肿瘤方面能够抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[11]。本研究结果显示,与空白对照组相比,四君子汤含药血清 I、II、III 组和舒尼替尼组人卵巢上皮细胞存活率差异无统计学意义,提示四君子汤含药血清对人卵巢上皮细胞存活率无影响。黄晓燕等^[12]和洪亚群等^[13]研究发现,四君子汤含药血清

或其有效成分对肠癌 SW480 细胞或胃癌细胞具有增殖抑制作用。本研究发现,与舒尼替尼组相比,四君子汤 III 组 SKOV3 细胞存活率、愈合率、侵袭数量差异无统计学意义;与空白对照组相比,四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞存活率、愈合率、侵袭数量依次降低,提示四君子汤含药血清能有抑制人卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭行为,高浓度的四君子汤含药血清和舒尼替尼作用相当。

上皮-间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是恶性肿瘤浸润转移的关键步骤,与肿瘤细胞的侵袭和迁移密切相关^[14-15]。在该过程中,对上皮细胞黏附连接至关重要的 E-cadherin 蛋白表达下降,而间充质标记物 N-cadherin 和 Vimentin 表达升高^[16]。本研究发现,与空白对照组相比,四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞 E-cadherin 蛋白表达依次升高,N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达依次降低,提示四君子汤含药血清可以抑制人卵巢癌细胞的 EMT 进程。Liu 等^[17]研究显示,通过抑制 EMT 过程能够调节卵巢癌的转移能力,因此推测四君子汤含药血清可能通过抑制 EMT 进程,干预卵巢癌细胞的迁移

和侵袭,可能为四君子汤应用于 OC 的辅助治疗提供了参考。

Rho 家族小分子鸟苷三磷酸酶(Small GTPases of Rho family, Rho GTPases)包含小型 GTPases 的 Ras 超家族的子家族,能够诱导肌动蛋白细胞骨架动力学和基因转录的协调变化,驱动细胞黏附、迁移、形态变化等^[18-19]。RhoA、Rac1 和 Cdc42 是 Ras 超家族的三个重要成员,在调节细胞 EMT 进程中发挥重要作用^[20]。在乳腺癌肿瘤细胞中,抑制 RhoA、Rac1 和 Cdc42 表达,能够促进细胞间质向上皮样转变,并促进 E-cadherin 表达^[21]。本研究发现,与空白对照组相比,四君子汤 I、II、III 组 SKOV3 细胞 RhoA、Rac1、Cdc42 mRNA 和蛋白表达呈剂量依赖性降低,四君子汤 III 组作用效果与舒尼替尼作用效果相当,提示四君子汤对人卵巢癌细胞 EMT 过程的抑制作用,可能与抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路相关。舒尼替尼是一种多靶点抗肿瘤药物,可以通过抑制多个受体的酪氨酸激酶活性参与实体瘤的发生发展,本研究发现舒尼替尼能够抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路抑制卵巢癌细胞的生物学行为,推测舒尼替尼的抗肿瘤机制也可能与 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路或其相关蛋白有关,但四君子汤含药血清和舒尼替尼的具体作用靶点是否一致,仍待考究。另有研究显示^[22],RhoA、Rac1 和 Cdc42 表达下调可以抑制类风湿性关节炎中的成纤维滑膜细胞的迁移和侵袭,因此推测,四君子汤含药血清可能通过抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路,抑制细胞 EMT 发生,从而抑制人卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭。此外,四君子汤含药血清中含有人参皂苷 Rb1、Re、Rg1、甘草酸、甘草次酸和甘草素葡萄糖醛酸六种化学成分^[23-24],其中人参皂苷 Rb1^[25]和甘草酸^[26]已分别被证实能够抑制乳腺癌细胞的 EMT 和迁移及侵袭,而人参皂苷 Re 对肿瘤细胞具有抑制作用^[27],人参皂苷 Rg1 主要用于神经系统疾病的治疗^[28],因此四君子汤含药血清中调控 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路的具体有效成分尚不明确,需进行更深入的研究和探索。

综上所述,四君子汤含药血清对人卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭行为的抑制作用,可能与抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路,抑制 EMT 发生相关,表明四君子汤在 OC 治疗方向具有潜在治疗或辅助治疗价值,可能为临床治疗 OC 提供了新的思路和方法。但鉴于 OC 发病机制及四君子汤中药成分的

复杂性,本课题组将针对四君子汤中不同成分组合含药血清对卵巢癌细胞的作用效果,以及四君子汤含药血清有效成分对 RhoA/Rac1/Cdc42 信号通路及卵巢癌细胞的影响进行更深入的研究和探索,以期能够完善四君子汤含药血清对卵巢癌药理学分析。

参考文献:

- [1] Chen Z, Guo X, Sun S, et al. Serum miR-125b levels associated with epithelial ovarian cancer (EOC) development and treatment responses [J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 311-317.
- [2] Wang Q, Shi W. UNBS5162 inhibits SKOV3 ovarian cancer cell proliferation by regulating the PI3K/AKT signalling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 2976-2982.
- [3] 黄家凤, 黄羽棠, 代谊, 等. Ct-OATP1B3 基因对人卵巢癌细胞迁移、侵袭与增殖调控的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(4): 499-506.
- [4] 刘琳, 李岩. 四君子汤对胃肠道药理作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25(5): 990-994.
- [5] 朱超, 刘瑞, 郭晨旭, 等. 四君子汤及其拆方对胃癌 SGC-7901 侧群细胞增殖、侵袭能力的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(11): 1201-1207.
- [6] Laragione T, Harris C, Gulko PS, et al. TRPV2 suppresses Rac1 and RhoA activation and invasion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 268-273.
- [7] Zhang Q, Len TY, Zhang SX, et al. Exosomes transferring long non-coding RNA FAL1 to regulate ovarian cancer metastasis through the PTEN/AKT signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(21): 10921.
- [8] Huang D, Chen J, Yang C, et al. TPX2 silencing mediated by joint action of microvesicles and ultrasonic radiation inhibits the migration and invasion of SKOV3 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 7627-7635.
- [9] 胡琦, 朱定耀, 谭小宁, 等. 臭牡丹含药血清抑制人肝癌 MHCC97-H 细胞侵袭与迁移的作用及其机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(21): 2691-2694.
- [10] 纪云飞, 王瑞君, 李晓波. 复方四君子汤的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(5): 837-843.
- [11] 徐云丹, 赵刚. 四君子汤与 5-FU 联用对结肠癌 HT-29 细胞生长的抑制效应 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(4): 16-19.
- [12] 黄晓燕, 王萌, 刘礼剑, 等. 四君子汤含药血清对 RNA 干扰后的大肠癌 SW480 细胞超微结构、端粒长度及 h TERT 表达的影响 [J]. *江苏中医药*, 2019, 51(3): 78-82.
- [13] 洪亚群, 黄浏姣. 四君子汤含药血清对胃癌抑制作用的药效成分研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(4): 820-821.
- [14] Song Y, Yuan H, Wang J, et al. KLHL22 regulates the EMT and proliferation in colorectal cancer cells in part via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:

3981–3993.

[15] Wang Z, Liu Y, Wang M, et al. Effects of miR-492 on migration, invasion, EMT and prognosis in ovarian cancer by targeting SOX7 [J]. J BUON, 2020, 25(2): 797–804.

[16] Gou J, Hu T, Li L, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition regulated by twist basic helix-loop-helix transcription factor 2 (Twist2) in embryo implantation in mice [J]. Reprod Fertil Dev, 2019, 31(5): 932–940.

[17] Liu N, Peng SM, Zhan GX, et al. Human chorionic gonadotropin β regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in human ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2017, 38(3): 1464–1472.

[18] Aspenström P. The intrinsic GDP/GTP exchange activities of Cdc42 and Rac1 are critical determinants for their specific effects on mobilization of the actin filament system [J]. Cells, 2019, 8(7): 759.

[19] Xu X, Zhou W, Chen Y, et al. Immediate early response protein 2 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via regulating the activity of Rho GTPases [J]. Neoplasma, 2020, 67(3): 614–622.

[20] Xiang S, Li M, Xie X, et al. Rapamycin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelium cells through regulation of Rho GTPases [J]. FEBS J, 2016, 283(12): 2309–2325.

[21] Horibata S, Rogers KE, Sadegh D, et al. Role of peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in mammary carcinoma cell migration [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 378.

[22] Shi DL, Shi GR, Xie J, et al. MicroRNA-27a inhibits cell migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by targeting follistatin-like protein 1 in rheumatoid arthritis [J]. Mol Cells, 2016, 39(8): 611–618.

[23] 尚如霞, 徐卫东, 许晓倩, 等. 四君子汤血清药效成分的 HPLC-MS 分析 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(6): 529–533.

[24] 尚如霞, 徐卫东, 谢超. 超高效液相色谱-质谱法测定四君子汤含药血清中人参皂苷 Rg1、Re、Rb1 的含量 [J]. 医药前沿, 2018, 8(29): 43–45.

[25] 王楠, 廖莎, 陈璐, 等. 人参皂苷 Rb₁ 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞上皮-间质转化及 ROR1 表达的影响 [J]. 中国药业, 2020, 29(21): 25–29.

[26] Zhang Z, Feng Y, Li ZY, et al. Antiproliferative and apoptotic activity of glycyrrhizic acid in MCF-7 human breast cancer cells and evaluation of its effect on cell cycle, cell migration and mTOR/PI3K/Akt signalling pathway [J]. Arch Med Sci, 2019, 15(1): 174–182.

[27] 张丽娜, 明有山, 曲波权, 等. 微生物转化人参皂苷 Re 为人参皂苷 Rh1 的研究 [J]. 中国酿造, 2017, 36(11): 114–117.

[28] 杜依楚, 潘玉君. 人参皂苷 Rg1 在神经系统疾病中的作用机制进展 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(10): 178–182.

[收稿日期] 2020–07–03

新型骨髓增生异常综合征小鼠模型

中国医学科学院医学实验动物研究所肿瘤课题组的研究者们在遗传多样性(CC)小鼠的研究中,发现并鉴定了一种新型的骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)小鼠模型——JUN 小鼠自发模型。

通过理化检测发现 CC 小鼠中的 JUN 小鼠品系外周血中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞数目降低。骨髓评估表明,髓中造血多能祖细胞(MPP)的分化发育异常是导致外周血细胞减少的原因。

与 MDS 患者血涂片进一步对比分析发现,在 JUN 小鼠中可找到 MDS 患者相应的异常细胞发育形态,尤其多见 MDS 特征性 Pseudo-Pelger-Huet 细胞。早期研究证实 Rps14 基因单倍体缺失可引起 MDS, JUN 小鼠的基因测序分析也发现了 MDS 相关突变基因 Rps14。此外, JUN 小鼠的 MDS 发病率高达 100%, 并且 86% 可向急性髓系白血病(acute myeloblastic leukemia, AML)转化。

这种自发 MDS 模型将有助于新药开发和促进新治疗方法的临床前评估。例如,临床试验中正在开发的 MDS 治疗药物,如激酶抑制剂、去乙酰化酶抑制剂和 DNA 甲基转移酶抑制剂等,可以在招募患者之前先在自发 MDS 小鼠模型中进行测试,以确保疗效。

综上所述, JUN 小鼠 MDS 模型将为研究 MDS 的发生发展和 MDS 向 AML 转化的机制提供一个更加清晰和有价值的研究模型,加深了对异质性疾病潜在机制的认识,利于提高治疗 MDS 患者的能力。

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, 4: 169–180)

夏一鸣,黄晓玲,仝慧慧,等. 中枢神经系统 TauT 基因敲除大鼠的构建及对线粒体 DNA 氧化损伤影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 38-47.

Xia YM, Huang XL, Tong HH, et al. Construction of TauT gene knockout in the central nervous system of rats and its effect on oxidative damage of mitochondrial DNA [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 38-47.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 006

中枢神经系统 TauT 基因敲除大鼠的构建及对线粒体 DNA 氧化损伤影响

夏一鸣¹,黄晓玲¹,仝慧慧¹,齐浩铭¹,莫丽冬²,王 辰²,范维佳²,黄慧玲^{2*}

(1.天津医科大学,天津 300070;2.天津市环湖医院,天津市神经外科研究所,天津市脑血管与神经变性重点实验室,天津 300350)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxP 技术相结合构建牛磺酸转运体(taurine transporter, TauT)在中枢神经系统中条件性敲除大鼠,并对其脑组织线粒体 mtDNA 及线粒体呼吸链酶活性进行初步研究。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxP 技术获得 TauT 基因第 5 外显子两端含有 loxP 位点的杂合子大鼠(TauT^{loxP/WT})。将获得的 TauT^{loxP/WT}大鼠与 Nestin-Cre 大鼠交配,经繁殖和鉴定最终获得神经特异性 TauT 基因敲除大鼠(TauT^{loxP/loxP/Cre+})。通过 Real-time PCR、Western blot、免疫组化对 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠进行基因和蛋白表达检测,用 HE 染色观测其脑组织形态,并对脑组织 mtDNA 拷贝数和线粒体呼吸链酶(I / II / III / IV / V)活性进行检测。**结果** 与野生型大鼠相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠脑组织中 TauT 基因和蛋白表达显著降低, TauT 基因在中枢神经系统被成功敲除,模型构建成功; HE 染色显示 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠脑细胞数量和密度有所降低,而老年 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠脑中细胞病变更加明显。此外,与野生型大鼠相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠脑组织线粒体呼吸链复合酶 I、III、IV、V 酶活性显著降低,但 mtDNA 拷贝数却明显上升。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxP 技术成功了构建中枢神经系统 TauT 基因敲除大鼠模型,并初步验证了此模型对脑组织及其线粒体呼吸链酶和 mtDNA 的影响,为研究牛磺酸及 TauT 对脑组织的分子机制提供了新的模型平台。

【关键词】 TauT 基因;条件敲除;CRISPR/Cas9;Cre-loxP;大鼠;线粒体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0038-10

Construction of TauT gene knockout in the central nervous system of rats and its effect on oxidative damage of mitochondrial DNA

XIA Yiming¹, HUANG Xiaoling¹, TONG Huihui¹, QI Haoming¹, MO Lidong², WANG Chen²,
FAN Weijia², HUANG Huiling^{2*}

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China. 2. Tianjin Huanhu Hospital, Neurosurgery Institute of Tianjin, Tianjin Key Laboratory of Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases, Tianjin 300350)

【Abstract】 Objective CRISPR/Cas9 and Cre-loxP were used to construct the conditional knockout of taurine transporter (TauT) in the central nervous system of rats. The mitochondrial mtDNA and mitochondrial respiratory chain enzyme activities in brain tissues were studied. **Methods** CRISPR/Cas9 and Cre-loxP techniques were used to obtain

【基金项目】天津市应用基础及前沿技术重点项目(16JCZDJC35500);国家自然科学基金面上项目(81571216)。

【作者简介】夏一鸣(1995—),男,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。E-mail: 1565215506@qq.com

【通信作者】黄慧玲(1965—),女,研究员,博士,研究方向:神经创伤修复与治疗。E-mail: huanghuiling@126.com

heterozygous rats ($\text{TauT}^{\text{loxP/WT}}$) with loxP at both ends of exon 5 of the TauT gene. The obtained $\text{TauT}^{\text{loxP/WT}}$ rats were mated with Nestin-Cre rats. After breeding and identification, neural-specific TauT gene knockout rats ($\text{TauT}^{\text{loxP/loxP/Cre}^+}$) were obtained. The gene and protein expressions of $\text{TauT}^{\text{loxP/loxP/Cre}^+}$ rats were detected by Real-time PCR, Western blot, and immunohistochemistry. The morphology of brain tissue was observed by hematoxylin-eosin staining. The mtDNA copy number and mitochondrial respiratory chain enzyme (I/II/III/IV/V) activity in brain tissue were examined. **Results** Compared with wild-type rats, TauT gene and protein expressions in $\text{TauT}^{\text{loxP/loxP/Cre}^+}$ rat brain tissues were significantly decreased, and the TauT gene was successfully knocked out in the central nervous system indicating the knockout model was successfully constructed. Hematoxylin-eosin staining showed that the number and density of brain cells were decreased in $\text{TauT}^{\text{loxP/loxP/Cre}^+}$ rats and cytopathic changes more obvious in the brains of old $\text{TauT}^{\text{loxP/loxP/Cre}^+}$ rats. In addition, compared with wild-type rats, the activities of mitochondrial respiratory chain complex enzymes I, III, IV, and V were significantly decreased, but the copy number of mtDNA was significantly increased. **Conclusions** The model of TauT gene knockout in the central nervous system of rats was successfully constructed using CRISPR/Cas9 and Cre-loxP technology. The effects of TauT knockout in the central nervous system on brain tissues, respiratory chain enzymes, and mtDNA of mitochondria were verified, providing a new model platform for the study of the molecular mechanisms of taurine and TauT in brain tissues.

[Keywords] TauT gene; conditional knockout; CRISPR/Cas9; Cre-loxP; rat; mitochondria

基因敲除技术是通过同源重组将靶基因的某些重要外显子或功能结构域、甚至所有外显子敲除掉,导致靶基因的表达失败。而条件性基因敲除技术可以对感兴趣的特异性组织或细胞中的细胞进行时空特异性的敲除,却不造成生物本身的死亡。自从 1994 年 Gu 等^[1]第一次报道了利用噬菌体 P1 的 I 型拓扑异构酶 Cre 重组酶条件性敲除 DNA 聚合酶 β 片段后,在新型基因打靶中,Cre-loxP 重组系统获得广泛应用,成为条件性打靶技术、诱导性基因打靶、时空特异性基因打靶策略核心。随着 CRISPR/Cas9 技术的迅速崛起,使用 CRISPR/Cas9 技术和 Cre-loxP 技术条件性敲除小鼠或大鼠已成为基因敲除研究的新型方式。

牛磺酸(taurine, Tau)是一种内源性的含硫 β -氨基酸,化学结构式为 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ 。 Tau 虽不参与蛋白质的合成,但是具有非常广泛的营养生理作用^[2]。 Tau 能够改善低蛋白孕鼠甲状腺功能,可以促进大脑的发育^[3-4]。在脑组织中, Tau 含量水平非常高,高达 40 mmol/L ^[5]。研究表明:长期缺乏 Tau 将导致脑萎缩、心力衰竭、视网膜病或免疫缺陷^[6-7]。文献报道以及我们的前期研究显示: Tau 对维持机体正常功能有广泛的生物学作用,对神经组织缺血、缺氧及缺血再灌注损伤具有明显的防治作用^[8]。

Tau 主要是通过细胞膜上高亲和性的牛磺酸转运体(taurine transporter; TauT ; slc6a6)逆浓度梯度主动跨膜转运,以维持脑细胞内的 Tau 高浓度(胞内浓度约为细胞外的 400 倍),调节脑细胞渗透压^[9]。

TauT 由 621 个氨基酸组成,分子质量约为 70×10^3 ,存在于细胞膜上,包含 12 个跨膜螺旋结构域。一个分子的 Tau 的主动摄取需要 2~3 个钠离子和 1 个氯离子转运进细胞质^[10]。 TauT 的活性对 Tau 的转运起着至关重要的作用。

我们的课题一直关注 Tau 对神经疾病后线粒体功能的影响,我们的研究和文献报道也证实: Tau 对线粒体功能稳定具有重要的保护作用^[11-12]。线粒体(mitochondrion)被称为细胞的氧化中心和“动力工厂”,为有机体提供约 90% 的能量。线粒体参与很多疾病的生理、病理过程。一方面, Tau 是线粒体 tRNA 的组成部分,线粒体 tRNA 中缺乏 Tau 修饰会引起线粒体疾病^[13-14]。另一方面,它可抑制多种刺激下介导的细胞凋亡^[15-16], Tau 的缺乏会引起线粒体呼吸链复合酶 I、III 活性降低,ATP 生成减少、超氧化物生成增加和自噬的缺陷^[17-18]。

传统 Tau 缺乏模型的构建基本采用加入胍基乙烷磺酸盐等 TauT 抑制剂,或者通过喂养不含 Tau 食物的饲料来抑制 Tau 的摄入^[19-20]。在本课题中,我们首次利用 Cre-loxP 技术和 CRISPR/Cas9 技术构建神经特异性敲除 TauT 基因大鼠模型($\text{TauT}^{\text{loxP/loxP/Cre}^+}$),使得 TauT 基因能够在大鼠脑组织中稳定敲除,克服了传统 Tau 缺乏模型的不稳定、持续时间短等缺点。这为研究 Tau 对神经系统中的作用提供了新的长久模型,并可以在此平台下研究 TauT 在各种神经疾病治疗和诊断中的作用及分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

神经特异性表达 Nestin-Cre 雄性大鼠, SPF 级, 1 只, 体重 200 g (购自中国医学科学院医学实验动物研究所[SCXK(京)2019-0011]); $TauT^{loxP/WT}$ 大鼠雌雄各 1 只, 体重 200 g, 委托中国医学科学院医学实验动物研究所基因工程创制平台构建; 实验所用的条件性敲除大鼠 ($TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠) 为 Nestin-Cre 大鼠和 $TauT^{loxP/WT}$ 大鼠杂交后获得。实验中所用 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、野生型 SD 大鼠 (WT 大鼠, 北京华阜康生物科技股份有限公司购买[SCXK(京)2019-0008]) 均为 SPF 级健康雄性大鼠, 2 月龄大鼠每组各 24 只, 体重 (250 ± 30) g。12 月龄大鼠每组各 2 只, 体重 (850 ± 30) g。

$TauT^{loxP/WT}$ 和 Nestin-Cre 大鼠以及 WT 大鼠均在中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心 SPF 环境中饲养[SYXK(津)2019-0002], 温度 25℃ 左右、空气湿度保持在 50%、明暗循环 12 h/d。实验研究的全部动物均遵守 3R 原则且通过中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员审查 (DWLL-20180916 和 DWLL-20180917)。

1.2 主要试剂与仪器

体外转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, Am1345); EasyPure Genomic DNA Kit (北京全式金生物技术有限公司, EE101-12); $2 \times Taq$ PCR StarMix、总 RNA 提取试剂盒、FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (天根生化科技(北京)有限公司, KT201、DP419、KR118、FP205); 高效 RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司, R0010); PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (美国 Thermo 公司, 26619); Millipore Western blot ECL (德国 Merck 公司, WBKLS0500); TauT 一抗 (英国 St John's Laboratory, STJ95923); GAPDH 一抗 (美国 Proteintech 公司, 60004-1-Ig); HRP 标记的山羊抗小鼠二抗、抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, ZB-2305、ZB-2301); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, P0006); 动物细胞/组织活性线粒体分离试剂盒、线粒体呼吸链复合物 I (NADH-辅酶 Q 还原酶, Complex I)、线粒体呼吸链复合物 II (琥珀酸-辅酶 Q 还原酶, Complex II)、线粒体呼吸链复合物 III (辅酶 Q-细胞

色素 C 还原酶, Complex III)、线粒体呼吸链复合物 IV (正铁细胞色素 C-氧化还原酶, Complex IV)、线粒体呼吸链复合物 V (F₀F₁-ATP 酶/ATP 合成酶, Complex V) 的活性比色法定量检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, GMS10006.2、GMS50007、GMS50008、GMS50009、GMS50010、GMS50083); 高电流电泳仪 PowerPac™ HC (美国 Bio-RAD 公司, 1645052); 多功能成像系统 (法国 Vilber 公司, HC006); PCR 仪 (杭州博日科技股份有限公司, TC-96/G/H(b)); 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司, LC480); 显微镜 (日本 OLYMPUS 公司, BX53); 全自动免疫组化仪 (德国 Leica 公司, BOND-III); 紫外/可见分光光度计 (英国 JENWAY 公司, 6850)。

1.3 实验方法

1.3.1 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠的构建

$TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠模型构建首先需要利用 CRISPR/Cas9 技术构建 $TauT^{loxP/WT}$ 杂合子大鼠。一方面针对 TauT 基因第 5 外显子 390 bp 序列两端设计两个不同的 sgRNA 序列 (Rat-TauT-gRNA-up: 5'-TAGGCCCCCTTTGTCCCACAGAC-3', Rat-TauT-gRNA-down: 5'-AAACGTCTGTGGGACAAAGGGG-3'; R-TauT-gRNA-up: 5'-TAGGGACAGACCCTGTCTCTGG-3', R-TauT-gRNA-down: 5'-AAACCCAGAGACAGG GTCTGTC-3'), 合成的 sgRNA 单链通过退火复性结合成小片段, 连接到 BsaI 酶处理的线性化的表达质粒 (pUC57-sgRNA) 中, 经质粒的连接、转化后再通过 Dra I 内切酶线性化后转录出 sgRNA。另一方面构建 Cas9 表达载体 (pST1374-NLS-flag-linker-Cas9), 再用 Age I 内切酶线性化转录出 Cas9 mRNA。通过将体外转录的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 以及 TauT 基因第 5 外显子两端各含有一个 loxP 序列的供体通过显微注射法注射进 SD 大鼠受精卵, 利用同源重组获得 F0 代 $TauT^{loxP/WT}$ 杂合子大鼠 (图 1 所示)。

将获得的 $TauT^{loxP/WT}$ 大鼠杂交繁殖得到 $TauT^{loxP/loxP}$ 纯合子大鼠, 并和 Nestin-Cre 大鼠进行杂交, 获得 $TauT^{loxP/WT/Cre+}$ 转基因大鼠, 再由 $TauT^{loxP/WT/Cre+}$ 大鼠和 $TauT^{loxP/loxP}$ 大鼠杂交得到神经特异性 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 基因敲除大鼠。

1.3.2 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠 PCR 鉴定

将出生 21 d 左右的大鼠, 剪趾编号并提取基因组总 DNA, PCR 扩增目的条带, 电泳成像分析。根

据两个 loxP 外端基因序列设计引物。loxP 上游引物: 5'-ATTTCAGTCACTCATCCGTCCCT-3', 下游引物: 5'-TCTGACAGTTAAAGAATCTAAGGCTCA-3', 片段大小为 712 bp。Cre 鉴定上游引物: 5'-TACTGACGGTGGGAGAATG-3', 下游引物: 5'-CTGTTTCACTATCCAGGTTACG-3', 片段大小为 432 bp。将鉴定的 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠, 提取脑组织 DNA 进一步 PCR 鉴定, $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠在脑组织中 loxP 引物扩增条带为 290 bp。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑及各器官 TauT 基因表达量

2 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、WT 雄性大鼠脑及各脏器组织研磨后取 100 mg 左右, 提取总 RNA, 接着反转录成 cDNA 后, 进行实时荧光定量 PCR (qPCR)。TauT 目的基因引物序列: 上游 5'-GAGGTCATCATAGGCCAGTAC-3'; 下游 5'-GTACACATTCAGGAGGGACAC-3', 片段大小为 120 bp。GAPDH 内参引物序列: 上游 5'-AACTCCCATCTTCCACC-3'; 下游 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAG-3', 片段大小为 100 bp。20 μ L PCR 反应体系: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, ddH₂O 7.8 μ L, 引物各 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。

qPCR 相对定量分析: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 其中 $[\Delta\Delta Ct = (\text{待测目的基因平均 Ct 值} - \text{待测内参基因平均 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因平均 Ct 值} - \text{对照组内参基因平均 Ct 值})]$ 。

1.3.4 Western blot 检测 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑及各器官 TauT 蛋白表达

2 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、WT 雄性大鼠脑组织及心、肝、肾, 匀浆裂解后, 11430 r/min 离心 10 min, 取上清, Bradford 法测定蛋白浓度。上样总蛋白浓度为 40 μ g, SDS-PAGE 电泳, 70 V, 40 min 后转 120 V 至溴酚蓝条带到底部, 300 mA 转膜 90 min, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TauT 一抗 (1:1000)、GAPDH 一抗 (1:10000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, TauT 用山羊抗兔二抗 (1:10000) 和 GAPDH 使用的山羊抗小鼠二抗 (1:10000) 常温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 显影、成像。

1.3.5 免疫组化及 HE 染色

选取 2 月龄、12 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠和 WT 大鼠各 2 只, 用 PBS 心脏灌注至血液流尽后, 换 4%

多聚甲醛继续灌注至大鼠身体僵硬, 取脑, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水, 石蜡包埋, 切片脱蜡至水后, 分别做 HE 染色和免疫组化。HE 染色: 苏木精染色, 水洗, 伊红染色, 水洗, 脱水封片, 镜下观察。免疫组化: 取 2 月龄大鼠的切片脱蜡至水后, 封闭、TauT 一抗 (1:100)、冲洗、TauT 二抗孵育、冲洗、DAB 染色、苏木精复染、脱水透明、封片, 镜下观察并分析。

1.3.6 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑组织 mtDNA 拷贝数检测

2 月龄 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 大鼠、WT 雄性大鼠脑组织研磨后取 100 mg 左右, 提取总 DNA, 使用 40 ng DNA 作为起始量, 进行实时荧光定量 PCR。目的基因 COX I 上游基因引物: 5'-TAATTCGAGCTGAACTAGGAC-3', 下游引物: 5'-TACAAGTCAGTTC CCGAAGC-3'; 片段大小 143 bp。内参基因 Rpl4 上游基因: 5'-CACGCAAGAAGATTCATCGC-3', 下游引物 5'-AACAATCTTCTCCGATTGTC-3'; 片段大小 194 bp。20 μ L PCR 反应体系: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, ddH₂O 7.8 μ L, 引物各 0.6 μ L, 模板 1 μ L。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。计算方法同 1.3.3。

1.3.7 $TauT^{loxP/loxP/Cre+}$ 、WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合酶活性测定

线粒体呼吸链复合酶活力的测定, 均根据试剂盒说明书操作执行。简单来说, 将 2 组大鼠脑组织剪碎匀浆后, 1430 r/min, 10 min 取上清, 再 9525 r/min, 10 min 取沉淀, 反复冻融破碎线粒体后, Bradford 法测蛋白浓度, 然后使用紫外/可见分光光度计进行线粒体呼吸链酶活性测定。Complex I、II、III、IV、V 分别在 340 nm、600 nm、550 nm、550 nm、340 nm 波长下测吸光度。酶活力计算公式: $[(\text{样品读数} - \text{背景读数}) \times \text{体系容量 (mL)} \times \text{样品稀释倍数}] \div [\text{样品容量 (mL)} \times \text{毫摩尔吸光系数} \times \text{反应时间 (min)}] = \text{单位/毫升} \div (\text{样品蛋白浓度}) \text{毫克/毫升} = \text{单位/毫克}$ 。Complex I/II/III/IV/V 结果单位分别为: $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol DCPIP}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol CoQH}_2/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol CytC}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; $\mu\text{mol NADH}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析。实验结果数据均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立 t 检验, $P < 0.05$ 时表示

组间具有显著差异, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 大鼠构建及遗传分析

基因测序和序列比对结果显示 loxP 序列被成功插入在第 5 外显子两端(图 2A、2B)。我们对插入的 loxP 序列进行遗传分析。TauT^{loxP/WT}×WT 出生的 F1 代中只有阴性和杂合子; TauT^{loxP/WT} × TauT^{loxP/WT} 出生的 F2 代 TauT^{loxP/loxP} 大鼠比例为 22.2%; TauT^{loxP/WT} × TauT^{loxP/loxP} 出生的 F3 代中

TauT^{loxP/loxP} 大鼠比例为 52.4%。综上, loxP 插入 TauT 基因第 5 外显子两端后能够稳定的遗传,且符合孟德尔遗传定律,结果如表 1 所示。

2.2 基因型鉴定结果

新生大鼠脚趾 DNA 的 PCR 鉴定结果如图 3: TauT^{loxP/loxP} 纯合子为一条带,712 bp; TauT^{loxP/WT} 杂合子为两条带,712 bp 和 632 bp; TauT^{WT/WT} 阴性为一条带,632 bp(图 3A); Cre 为一条带,437 bp(图 3B); TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑组织 TauT 基因被敲除后条带大小为 290 bp(图 3C)。

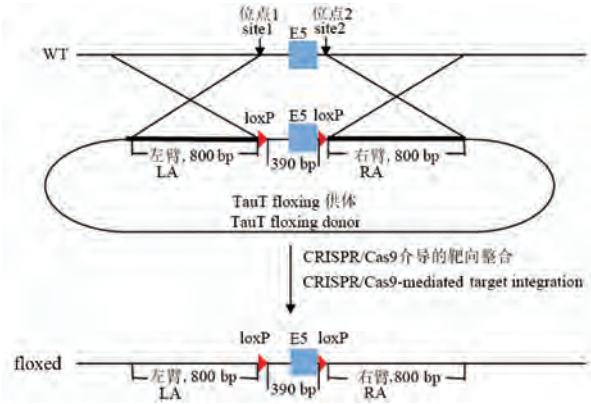
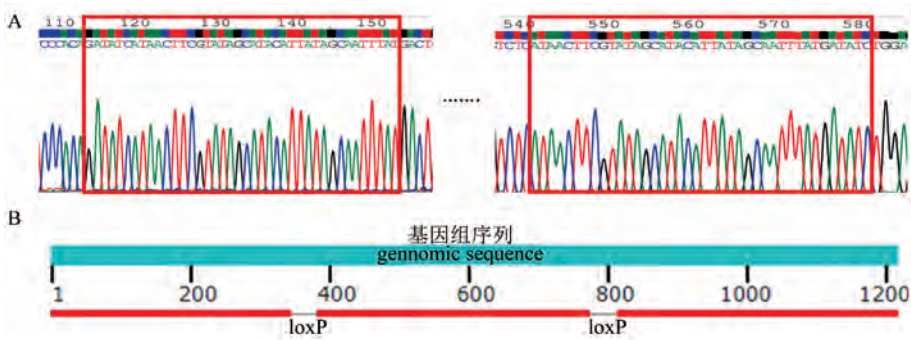


图 1 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 TauT^{loxP/WT} 大鼠示意图

Figure 1 TauT^{loxP/WT} rat schematic diagram constructed by CRISPR/Cas9 technology



注:A;基因测序结果显示第 5 外显子两端插入 loxP 序列(红色框);B;与基因组序列比对结果显示第 5 外显子两端 loxP 序列被插入。

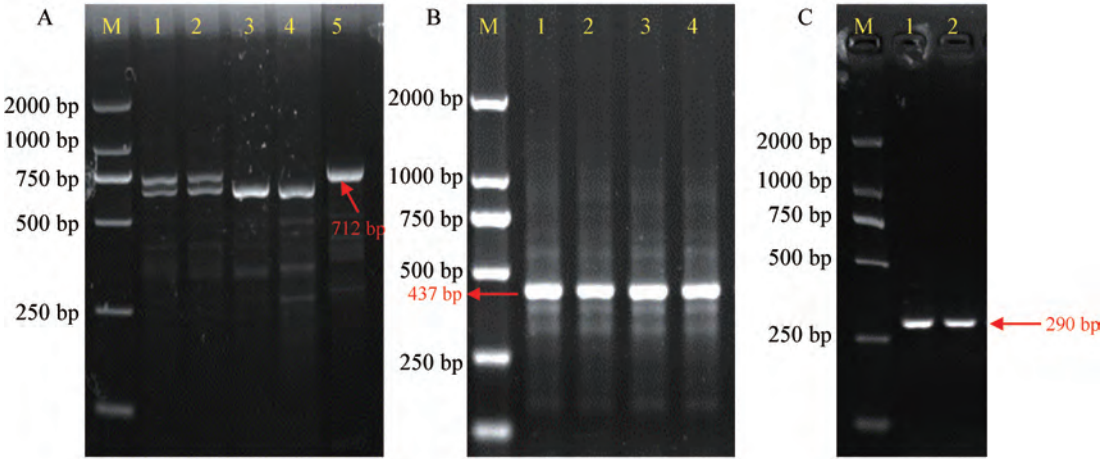
图 2 loxP 基因序列比对结果

Note. A, Gene sequencing results showed that loxP sequences were inserted at both ends of the fifth exon(red box). B, Comparison with the genome sequence showed that loxP sequences were inserted at both ends of the fifth exon.

Figure 2 loxP gene sequence alignment results

表 1 F1~F3 代大鼠繁殖情况
Table 1 Reproduction of F1~F3 generation rats

代数 Generations	出生大鼠只数 Number of born rats	雄性大鼠只数 Number of male rats	雌性大鼠只数 Number of female rats	TauT ^{WT/WT} 只数 Number of TauT ^{WT/WT}	TauT ^{loxP/WT} 只数 Number of TauT ^{loxP/WT}	TauT ^{loxP/loxP} 只数 Number of TauT ^{loxP/loxP}	纯合率(%) Homozygote rate
F1	43	23	20	22	21	0	0
F2	18	10	8	6	8	4	22.2
F3	21	8	13	0	10	11	52.4



注:M;DNA 标记;A:1、2;TauT^{loxP/WT};3、4;TauT^{WT/WT};5;TauT^{loxP/loxP};B:1、2、3、4;Cre 阳性;C:1;大脑 TauT 基因敲除结果;2;小脑 TauT 基因敲除结果。

图 3 条件性基因敲除大鼠部分 PCR 鉴定结果

Note. M, DNA marker. A, 1/2, TauT^{loxP/WT}. 3/4, TauT^{WT/WT}. 5, TauT^{loxP/loxP}. B, 1, 2, 3 and 4, Cre positive. C, 1, Result of brain TauT gene knockout. 2, Result of cerebellar TauT gene knockout.

Figure 3 Partial PCR identification results of conditional gene knockout rats

此外,通过 RT-PCR 显示:TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠大脑和肾组织 TauT mRNA 表达量相比较 WT 组显著降低;而在心、肝组织中 TauT mRNA 表达量没有显著差异(如图 4)。

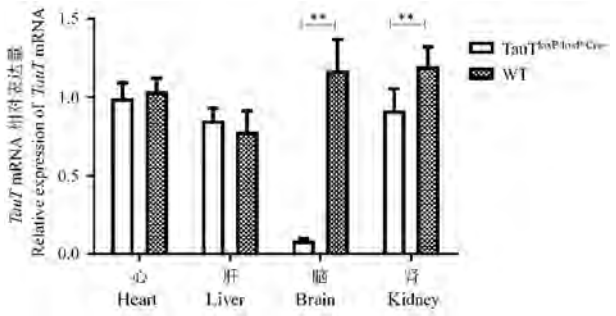
2.3 Western blot 及免疫组化检测 TauT^{loxP/loxP/Cre+}、WT 大鼠脑组织及各器官 TauT 蛋白的表达

免疫印迹实验结果显示:TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠 TauT 蛋白在脑组织中表达显著降低,而在心、肝、肾组织中和 WT 大鼠蛋白表达量并无明显差异(如图 5A、5B)。

此外,通过免疫组化观察 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠大脑皮层和海马(CA3 区)和小脑中 TauT 蛋白表达与 WT 组大鼠相比明显减少,而在心、肝、肾组织两者无明显差异。这与免疫印迹结果一致(如图 6)。

2.4 TauT^{loxP/loxP/Cre+}、WT 大鼠脑组织 HE 染色结果

从 HE 染色结果显示:2 月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠与 WT 大鼠相比,大脑皮质和海马 DG 区细胞数量和密度有所减少(图 7A/7B、7A1/7B1)。而 12 月龄的 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠与 WT 大鼠相比,大脑皮质和海马 DG 区细胞极性消失,结构排列疏松紊乱,细胞核胞浆分界模糊(图 7C/7D、7C1/7D1)。此外,12 月龄大鼠脑皮质和海马 DG 区与 2 月龄大鼠相比,细胞结构疏松,细胞排列不规则,这种



注:TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠 TauT mRNA 表达相对定量分析比较。与 WT 组比较,***P*<0.01。

图 4 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 和 WT 大鼠脑组织及各器官 TauT mRNA 表达情况(*n*=6)

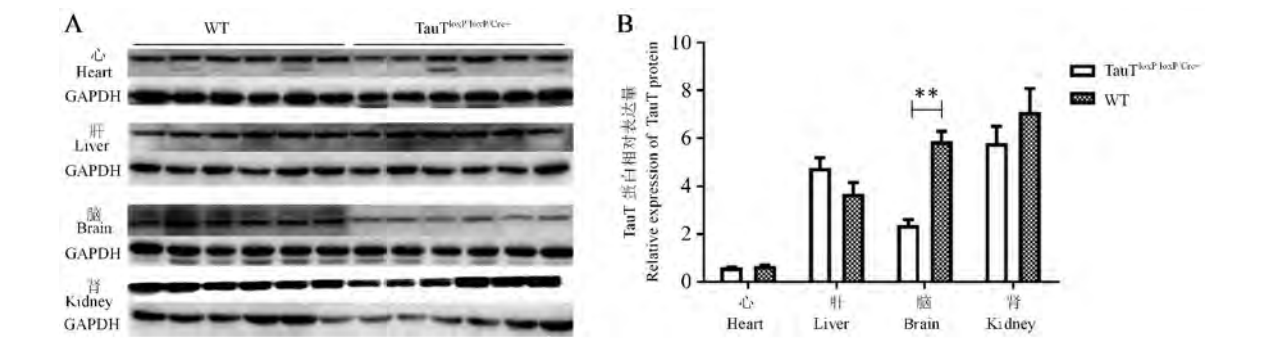
Note. TauT mRNA expression in TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats was compared quantitatively. Compared with WT group, ***P*<0.01.

Figure 4 TauT mRNA expression in brain tissues and organs of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats

现象在 12 月龄的 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠中更加明显(如图 7)。

2.5 TauT^{loxP/loxP/Cre+}、WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性和 mtDNA 相对表达量检测

结果显示:和 WT 大鼠相比,TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠线粒体呼吸链复合物 I、III、IV、V 均显著低于 WT 组酶活性,而只有线粒体复合酶 II 没有受到影响(如图 8A;表 2)。此外,TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑组织 mtDNA 表达量比 WT 大鼠显著升高(如图 8B)。

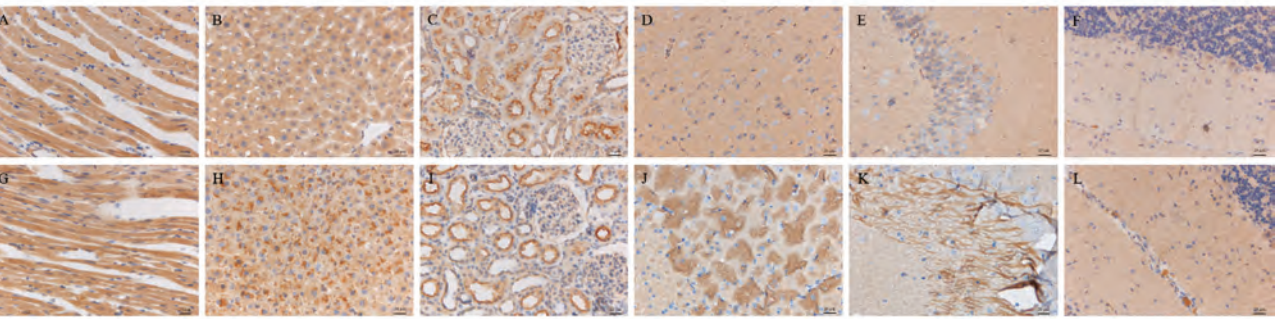


注:A: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠心、肝、脑、肾 TauT 蛋白表达情况; B: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠组蛋白表达相对定量分析比较。与 WT 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠大鼠脑组织及其它器官 TauT 蛋白表达情况 ($n = 6$)

Note. A, Expression of TauT protein in heart, liver, brain and kidney of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats. B, Relative quantitative analysis of TauT protein expression in the TauT^{loxP/loxP/Cre+} and WT groups. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 TauT protein expression in brain tissues and other organs of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats

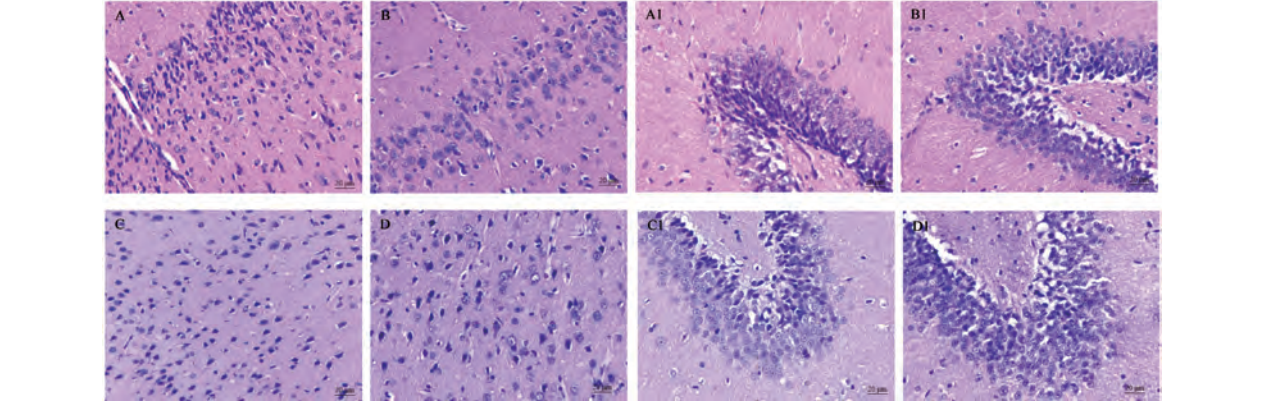


注:A、B、C、D、E、F: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠心、肝、肾、皮质、海马 (CA3)、小脑; G、H、I、J、K、L: WT 大鼠心、肝、肾、皮质、海马 (CA3)、小脑。

图 6 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠在心、肝、肾、皮层、海马和小脑免疫组化结果比较

Note. A/B/C/D/E/F, TauT^{loxP/loxP/Cre+} rat heart, liver, kidney, cortex, hippocampus (CA3), cerebellum. G/H/I/J/K/L, WT rat heart, liver, kidney, cortex, hippocampus, cerebellum.

Figure 6 Comparison of immunohistochemical results in the heart, liver, kidney, cortex, hippocampus and cerebellum of TauT^{loxP/loxP/Cre+} and WT rats

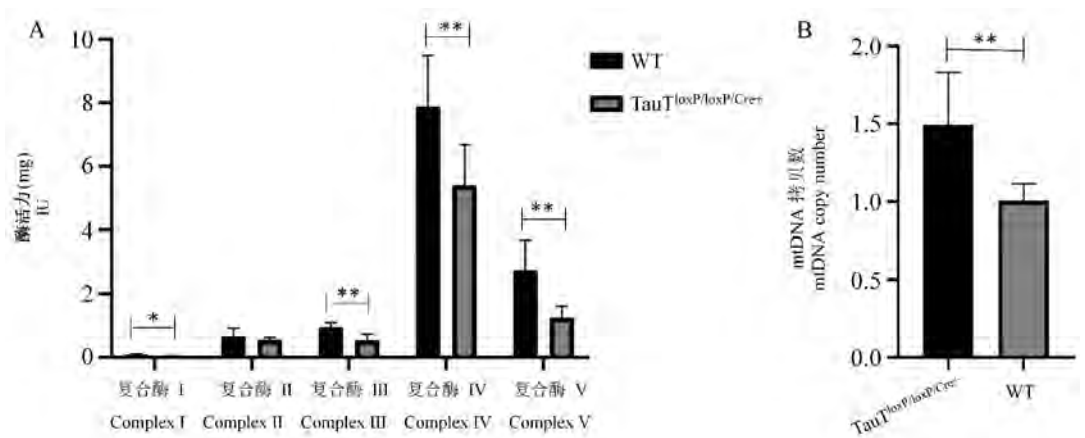


注:A、A1: 2 月龄 WT 大鼠皮质、海马; B、B1: 2 月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠皮质、海马; C、C1: 12 月龄 WT 大鼠皮质、海马; D、D1: 12 月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠皮质、海马。

图 7 不同月龄 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠脑皮质、海马 HE 染色

Note. A/A1, Cortex and hippocampus of 2-month-old WT rats. B/B1, Cortex and hippocampus of 2-month-old TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats. C/C1, Cortex and hippocampus of 12-month-old WT rats. D/D1, Cortex and hippocampus of 12-month-old TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats.

Figure 7 HE staining of cerebral cortex and hippocampus in TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats of different months of age



注:A: TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性;B: TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织 mtDNA 相对表达量。与 WT 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 8 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物酶活性和 mtDNA 相对表达量($n=6$)
Note. A, Activity of mitochondrial respiratory chain complex in brain tissue of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats. B, Relative expression levels of mtDNA in brain tissues of TauT^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats. Compared with WT group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 8 Activity of mitochondrial respiratory chain complex enzyme in TauT^{loxP/loxP/Cre+} rat and WT rat brain tissues

表 2 TauT^{loxP/loxP/Cre+}大鼠和 WT 大鼠脑组织线粒体呼吸链复合酶活性测定 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Activity of mitochondrial respiratory chain complex enzymes in brain tissues of TauT ^{loxP/loxP/Cre+} rats and WT rats					
分组 Groups	复合酶 I Complex I	复合酶 II Complex II	复合酶 III Complex III	复合酶 IV Complex IV	复合酶 V Complex V
TauT ^{loxP/loxP/Cre+}	0.04±0.00 *	0.55±0.08	0.53±0.18 **	5.41±1.18 **	1.25±0.33 **
WT	0.08±0.01	0.64±0.26	0.94±0.14	7.90±1.50	2.74±0.87

注:与 WT 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with WT group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

传统的条件性敲除技术需要使用胚胎干细胞的同源重组、胚胎操作、显微注射和辅助生殖技术^[21],操作繁琐,实验周期长^[22]。目前,对于 TauT 敲除模型的研究,一般通过敲除 TauT 第 1 外显子或者第 2~5 外显子形成 TauT 全身性敲除小鼠, TauT 的全身性敲除会引起心肌功能的损伤和视网膜变形以及运动能力的减弱^[23-24]。众所周知,大鼠提供的人类疾病模型,尤其是神经疾病的行为学和药理学上,大鼠比小鼠提供更有效的生理学指标^[25-26]。本文我们用 SD 大鼠,选择 TauT 第 5 外显子,运用 CRISPR/Cas9 技术在基因组中产生精确的双链断裂,提高了基因打靶的效率,同时利用同源重组机制,整合转染的同源 DNA 模板^[27-28]。结合 Cre-loxP 技术,构建 TauT 在中枢神经系统中特异性敲除大鼠模型。查阅文献,这是在国际上 Tau 领域中第一次利用大鼠的 TauT 基因的条件性敲除报道,进一步证明 CRISPR/Cas9 技术介导目的基因的条件性敲除

是一种十分可靠的方法^[22]。

本实验成功构建了 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠模型,从大鼠繁殖情况来看,插入的 loxP 序列可以稳定遗传,且符合孟德尔遗传定律。通过 RT-PCR 结果显示:与 WT 大鼠比较, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠在脑组织中 TauT mRNA 表达水平显著降低,表明 TauT 基因的确被明显敲除。免疫印迹显示:与 WT 相比, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠 TauT 表达在脑中显著降低,而在心、肝和肾中 TauT 表达并无显著差异,这与大脑组织的免疫组化结果一致。对提取 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠的小脑做免疫组化结果也表明了 TauT 蛋白的敲除。但是在本实验中发现大脑组织仍有少量的 TauT 的基因和蛋白表达,这可能与 Nestin-Cre 大鼠有关。为了实现中枢神经系统 TauT 基因的特异性敲除, Cre 重组酶的表达受大鼠 Nestin 启动子和内含子 2 增强子控制。Nestin 是神经干细胞特征性标志物,在胚胎发育早期的神经上皮中表达,对神经元分化具有重要作用。由于 Nestin 神经特异性启动只在神经干细胞中表达,而我们的样本是取自大鼠

半脑,这其中包含着大量的细胞类型,可能包含着 TauT 表达的细胞,从而导致产生了少量的 TauT 表达。

有趣的是,在对心、肝和肾组织的 TauT mRNA 表达水平研究发现: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠的心和肝组织 TauT mRNA 表达水平没有受到影响,肾组织中 TauT mRNA 表达水平却显著降低,但不影响其 TauT 蛋白表达。这种结果表明: Nestin-Cre 介导的重组不仅发生在神经外胚层,也发生在肾细胞类型中。这也证实了 Dubois 研究 Nestin-Cre 大鼠在肾中表达的结果^[29]。本实验中我们多次实验证实大鼠肾的 TauT mRNA 基因下降而蛋白质表达不变,表明对于肾,中枢神经 TauT 敲除只是影响其转录水平,还未出现翻译水平的变化即蛋白功能的变化。这可能是由于 mRNA 表达量的下调不足以引起蛋白表达量的变化。一般而言,真核生物中基因表达的转录和翻译两个水平所发生时间和位点存在时空间隔,后者因磷酸化等一系列转录后修饰,对蛋白功能的调控比较复杂。由于不同的半衰期, mRNA 和蛋白质水平有时不能直接相关,有时会有相反的结果。

从基因敲除大鼠表型上观察,我们很难判断 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠和 WT 大鼠之间的区别。观察其生长 1~6 月龄体重变化过程中, TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠并没有显示出明显的不同,出生也没有出现致死现象,其脑、心、肝、肾、肺、脾等脏体系数的比较也无明显区别(数据未列出)。这与我们同期所构建的 TauT 全身性敲除大鼠会体重减轻有所不同^[30]。对 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠的核磁共振检测,也未发现实验大鼠脑部无明显病变,核磁波谱也显示 ROI 区的 Tau 水平无明显差异(数据未列出)。但 HE 染色显示: TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑皮质、海马 DG 区细胞数量和致密度有所减低,这可能是由于 TauT 的敲除会导致 Tau 供给不足,使脑组织细胞体积调节能力降低,从而影响了脑组织细胞形态、数量的变化。此外, TauT 敲除在脑中可能出现时间累积效应。与年老的 WT 大鼠相比,年老大鼠 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠脑皮质和海马 DG 区细胞出现极性消失,结构排列疏松、紊乱以及细胞核胞浆分界模糊等现象,这些结果表明 TauT 敲除会加速大鼠的衰老。

利用我们所构建的 TauT^{loxP/loxP/Cre+} 大鼠模型,我们初步研究了脑组织线粒体的 mtDNA 和线粒体呼吸链复合酶 I、II、III、IV、V 活性。发现中枢神经系统的 TauT 的条件性敲除会抑制脑组织线粒体呼吸

链复合酶 I、III、IV、V 活性,而复合酶 II 的活性没有收到影响。我们分析,这可能与 Tau 的抗氧化特性和阻止线粒体渗透性的转变有关^[11], TauT 敲除抑制了 Tau 的摄取,从而导致线粒体抵抗细胞内的氧化应激和渗透性转变能力降低,线粒体呼吸链复合酶活性降低, ATP 合成的减少。而大鼠脑组织 mtDNA 的拷贝数可能是对其线粒体 ATP 减少所做的代偿性的增加^[31]。后期我们进一步实验进行论证。

综上所述,我们用 CRISPR/Cas9 和 Cre-loxp 技术成功构建了中枢神经系统 TauT 敲除大鼠模型,发现 TauT 的敲除对脑组织的形态、线粒体呼吸链复合酶活性及 mtDNA 拷贝数都有着较显著影响,为研究 Tau 及 TauT 在中枢神经系统中的作用提供一种有效的实验平台,为进一步研究 Tau 治疗神经疾病的机理提供了一种稳定而有力的工具。

参考文献:

- [1] Gu H, Marth JD, Orban PC, et al. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [J]. Science, 1994, 265(5168): 103-106.
- [2] Rippes H, Shen W. Review: taurine: a "very essential" amino acid [J]. Mol Vis, 2012, 18: 2673-2686.
- [3] 李平丽, 吴晓, 杨建成. 牛磺酸对宫内生长受限孕鼠生长轴激素与基因的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 345-350.
- [4] Tochitani S. Functions of maternally-derived taurine in fetal and neonatal brain development [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 975(1): 17-25.
- [5] Pasantes-Morales H, Hernández-Benítez R. Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions? [J]. Neurochem Res, 2010, 35(12): 1939-1943.
- [6] Ansar M, Ranza E, Shetty M, et al. Taurine treatment of retinal degeneration and cardiomyopathy in a consanguineous family with SLC6A6 taurine transporter deficiency [J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(4): 618-623.
- [7] Dong JF, Zheng XQ, Rui HB. Effect of taurine on immune function in mice with T-cell lymphoma during chemotherapy [J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(11): 1090-1094.
- [8] Wang Q, Fan W, Cai Y, et al. Protective effects of taurine in traumatic brain injury via mitochondria and cerebral blood flow [J]. Amino acids, 2016, 48(9): 2169-2177.
- [9] Oja SS, Saransaari P. Significance of taurine in the brain [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 975(1): 89-94.
- [10] Lambert IH. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells [J]. Neurochem Res, 2004, 29(1): 27-63.
- [11] Ahmadi N, Ghanbarinejad V, Ommati MM, et al. Taurine

- prevents mitochondrial membrane permeabilization and swelling upon interaction with manganese; Implication in the treatment of cirrhosis-associated central nervous system complications [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(11): e22216.
- [12] 范维佳, 黄慧玲, 蔡英, 等. 牛磺酸对重型颅脑创伤大鼠线粒体呼吸链酶活性的影响 [J]. 中华创伤杂志, 2015, 31(3): 254-258.
- [13] Suzuki T, Suzuki T, Wada T, et al. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases [J]. EMBO J, 2002, 21(23): 6581-6589.
- [14] Suzuki T, Nagao A, Suzuki T. Human mitochondrial diseases caused by lack of taurine modification in mitochondrial tRNAs [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, 2(3): 376-386.
- [15] Wu G, Yang J, Lv H, et al. Taurine prevents ethanol-induced apoptosis mediated by mitochondrial or death receptor pathways in liver cells [J]. Amino Acids, 2018, 50(7): 863-875.
- [16] Li K, Inam-U-Llah, Shi X, et al. Anti-apoptotic effect of taurine on schwann cells exposed to high glucose *in vitro* [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1155: 787-799.
- [17] Jong CJ, Ito T, Schaffer SW. The ubiquitin-proteasome system and autophagy are defective in the taurine-deficient heart [J]. Amino Acids, 2015, 47(12): 2609-2622.
- [18] Lambert IH, Kristensen DM, Holm JB, et al. Physiological role of taurine--from organism to organelle [J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 213(1): 191-212.
- [19] Gaucher D, Arnault E, Husson Z, et al. Taurine deficiency damages retinal neurones: cone photoreceptors and retinal ganglion cells [J]. Amino Acids, 2012, 43(5): 1979-1993.
- [20] Miyazaki T, Sasaki SI, Toyoda A, et al. Influences of taurine deficiency on bile acids of the bile in the cat model [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1155: 35-44.
- [21] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells [J]. Cell, 1987, 51(3): 503-512.
- [22] Kudyba HM, Cobb DW, Florentin A, et al. CRISPR/Cas9 gene editing to make conditional mutants of human malaria Parasite *P. falciparum* [J]. J Vis Exp, 2018, 139: 57747.
- [23] Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, et al. Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice [J]. FASEB J, 2002, 16(2): 231-233.
- [24] Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, et al. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(5): 927-937.
- [25] Carreira JC, Jahanshahi A, Zeef D, et al. Transgenic rat models of huntington's disease [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2015, 22: 135-147.
- [26] Smalley E. CRISPR mouse model boom, rat model renaissance [J]. Nat Biotechnol, 2016, 34(9): 893-894.
- [27] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res, 2013, 23(5): 720-723.
- [28] Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9 [J]. Cell Res, 2014, 24(1): 122-125.
- [29] Dubois NC, Hofmann D, Kaloulis K, et al. Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues [J]. Genesis, 2006, 44(8): 355-360.
- [30] 仝慧慧, 齐浩铭, 王辰, 等. CRISPR/Cas9 系统介导 *Slc6a6* 基因敲除大鼠的繁殖与鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 44-50.
- [31] Otten AB, Smeets HJ. Evolutionary defined role of the mitochondrial DNA in fertility, disease and ageing [J]. Hum Reprod Update, 2015, 21(5): 671-689.

[收稿日期]2020-12-25

景亮, 祁永章. 红景天苷对糖尿病足溃疡大鼠 Nrf2/Keap1 信号通路及伤口愈合的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 48-54.

Jing L, Qi YZ. Effects of salidroside on the Nrf2/Keap1 signaling pathway and wound healing in rats with diabetic foot ulcer [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 48-54.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 007

红景天苷对糖尿病足溃疡大鼠 Nrf2/Keap1 信号通路及伤口愈合的影响

景 亮^{1*}, 祁永章²

(1. 青海大学附属医院临床药学科, 西宁 810000; 2. 青海大学附属医院整形门诊, 西宁 810000)

【摘要】 目的 探究红景天苷(Sal)对糖尿病足溃疡(DFU)大鼠核转录因子 E2 相关因子 2/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Nrf2/Keap1)信号通路及伤口愈合的影响。**方法** 采用高脂高糖饲料喂养结合腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病大鼠模型,并于足背部除毛剪皮至筋膜,制作面积约为 3 mm×7 mm 的溃疡创面建立 DFU 大鼠模型,随机分为 DFU 模型组(DFU 组)、Sal 低(Sal-L, 0.1 g/(kg·d))、中(Sal-M, 0.2 g/(kg·d))高(Sal-H, 0.3 g/(kg·d))剂量组,阳性药物二甲双胍组(MET 组, 0.65 g/(kg·d)),另设血糖正常创面大鼠为对照组(NC 组),连续灌胃 2 周。分别于治疗第 7 天、第 14 天后检测各组大鼠体重及空腹血糖(FBG)水平,免疫组化检测创面组织 CD34 表达情况,计算创面微血管密度(MVD);生物化学法测定创面组织 MDA、SOD 水平;免疫印迹(Western blot)检测创面组织 Nrf2、Keap1 蛋白表达。**结果** 治疗第 0 天各组大鼠体重之间比较无统计学意义($P>0.05$),各组 DFU 组、Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠 FBG 水平均高于 NC 组($P<0.05$);治疗第 7 天、第 14 天,与 NC 组比较,DFU 组、Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠体重、FBG 水平、MDA 含量、Keap1 蛋白表达量均升高($P<0.05$),创面愈合率、CD34 阳性细胞、MVD、SOD 活性、Nrf2 蛋白表达量显著降低($P<0.05$);与 DFU 组比较,Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠体重、FBG 水平、MDA 含量、Keap1 蛋白表达量均显著降低($P<0.05$),创面愈合率、CD34 阳性细胞、MVD、SOD 活性、Nrf2 蛋白表达量显著升高($P<0.05$),其中 Sal-L 组与 MET 组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** Sal 可能通过调节 Nrf2/Keap1 信号通路,增加 DFU 大鼠抗氧化能力,促进创面愈合。

【关键词】 红景天苷;糖尿病足溃疡大鼠;核转录因子 E2 相关因子 2/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 信号通路;伤口愈合

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0048-07

Effects of salidroside on the Nrf2/Keap1 signaling pathway and wound healing in rats with diabetic foot ulcer

JING Liang^{1*}, QI Yongzhang²

(1. Department of Clinical Pharmacy, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810000, China.
2. Plastic Surgery Clinic, Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of salidroside (SAL) on nuclear transcription factor-E2 related factor 2/Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1 (Nrf2/Keap1) signaling pathway and wound healing in rats with diabetic foot ulcer (DFU). **Methods** Diabetes was induced in rats by feeding of a high-fat and high-glucose diet and intraperitoneal injecting of streptozotocin (STZ), and the back of the foot was shaved and cut to the fascia to create an ulcer

[基金项目] 2019 年青海省卫生计生课题(2019-wjzdx-50)。
[作者简介] 景亮(1982—),男,本科,主管药师,研究方向:临床药学研究。E-mail:nike3143@163.com

wound with an area of approximately 3 mm×7 mm to establish DFU rat model. The rats were randomly allocated to a DFU model group; Sal-L (0.1 g/(kg·d)), Sal-M (0.2 g/(kg·d)), Sal-H (0.3 g/(kg·d)) groups, metformin group (MET, 0.65 g/(kg·d)), and set normal blood glucose wound rats as the control group (NC group), and all were gavaged daily for 2 weeks. The body mass and concentration of fasting-blood glucose (FBG) of all the rats were measured on the 7th and 14th days of treatment; the expression of CD34 was assessed by immunohistochemistry; the microvascular density (MVD) of the wounds was calculated; the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) concentrations were measured biochemically, and the expression of Nrf2 and Keap1 proteins in the wound tissue was measured by Western blot.

Results Prior to the start of treatment, there was no significant difference in the body mass between the groups, while the FBG of the DFU, Sal-L, Sal-M, Sal-H, and MET groups was higher than that of the NC group ($P<0.05$). On the 7th and 14th day of treatment, the body mass, FBG, MDA content, and Keap1 protein expression in the DFU, Sal-L, Sal-M, Sal-H, and MET groups were higher than those in the NC group ($P<0.05$); and the wound healing rate, CD34 positive cells, MVD, SOD activity, and Nrf2 protein expression were significantly lower ($P<0.05$). The body mass, FBG, MDA content, and Keap1 protein expression in the Sal-L, Sal-M, Sal-H, and MET groups were lower than those in the DFU group ($P<0.05$); and the wound healing rate, CD34 positive cells, MVD, SOD activity, and Nrf2 protein expression were significantly higher ($P<0.05$). However, there were no significant differences between the Sal-L and MET groups ($P>0.05$). **Conclusions** Sal may increase the antioxidant capacity and promote wound healing in rats with DFU via the Nrf2/Keap1 signaling pathway.

【Keywords】 salidroside; diabetic foot ulcer rats; nuclear transcription factor-E2 related factor 2/Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1 signaling pathway; wound healing

糖尿病足是糖尿病常见并发症之一,可导致足部出现不同程度感染、溃疡、坏疽,增加截肢风险,严重影响患者身心健康及生活质量^[1-2]。糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是极其难愈性溃疡,且易反复发作,然而如何促进其创面愈合是至今困扰医学界学者的难题之一^[3]。红景天苷(salidroside, Sal)是红景天主要活性成分,具有消炎、镇痛、抗疲劳、抗氧化及免疫调节等多种药理作用^[4],对糖尿病肾病大鼠^[5]、胃溃疡^[6]等具有较好治疗作用,但关于 Sal 对 DFU 的影响尚鲜有研究,基于此,本研究提出假说,Sal 可能对 DFU 有一定治疗作用。核转录因子 E2 相关因子 2/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Nuclear transcription factor-E2 related factor2/Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1, Nrf2/Keap1) 信号通路在氧化应激过程中起重要作用,研究报道 Sal 可通过调节 Nrf2/Keap1 通路对肝损伤具有保护作用^[7],且 Nrf2 激动剂可治疗糖尿病血管并发症^[8]。因此本研究通过建立 DFU 大鼠模型,拟探究 Sal 对 DFU 大鼠 Nrf2/Keap1 信号与伤口愈合的作用,初步揭示其药理机制,为临床 DFU 的治疗提供理论基础,带来新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 100 只,购自北京维

通利华实验动物技术有限公司上海分公司[SCXK(沪)2017-0011],体重 200~210 g,于本院动物中心清洁级动物房饲养[SYXK(青)2017-0012],饲养条件:温度设为 21℃~25℃、湿度设为 40%~60%,12 h/12 h 光照/黑暗交替照明,保持饲料饮水供应充足,使大鼠自由饮水饮食。本研究动物实验已经由本院动物实验伦理委员会批准(P-SL-20180099)。实验严格遵守动物实验中的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

红景天苷(Sal,货号:SMB00072,纯度≥95%)、链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(货号:S0130, HPLC≥98%)购自 Sigma-Aldrich 公司;盐酸二甲双胍肠溶胶囊(国药准字 H20103017,生产批号:20180124)购自北京协和药厂;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(货号:20170401)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量检测试剂盒(货号:D799761-0050)购自上海生工生物工程股份有限公司;兔源 anti-CD34 一抗(货号:ab81289)、兔源 anti-Nrf2 一抗(货号:ab137550)、兔源 anti-Keap1 一抗(货号:ab139729)、兔源 anti-GAPDH 一抗(货号:ab181602)、羊抗兔 IgG 二抗(货号:ab205718)均购自英国 Abcam 公司;光学显微镜(型号 IX75)购自日本奥林巴斯公司;酶标仪(型号 MODEL550)购自美国 Bio-Rad 公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 DFU 模型制备

参考文献^[9]并稍作修改制备 DFU 大鼠模型,所有造模大鼠均予以高糖高脂饲料喂养 4 周,一次性腹腔注射 STZ(65 mg/kg),1 周后尾静脉采血测得空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG) ≥ 16.7 mmol/L、体重无明显降低者为糖尿病模型制备成功。成模 2 周后大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,于足背部消毒后用印章标记面积约为 3 mm×7 mm 的标记,创面除毛剪皮至筋膜,医用纱布覆盖后,包扎固定,另取 16 只正常饲料喂养大鼠腹腔注射等量生理盐水并进行足背部脱毛进行创面造模处理。

1.3.2 分组及给药方法

成模大鼠随机分为 DFU 模型组(DFU 组)、Sal 低(Sal-L)、中(Sal-M)高(Sal-H)剂量组,阳性药物二甲双胍组(MET 组),另设正常饲料喂养腹腔注射生理盐水并创面造模大鼠为正常对照组(NC 组),每组各 16 只。Sal-L、Sal-M、Sal-H 组分别给予 Sal 0.1 g/kg、0.2 g/kg、0.3 g/kg,所选剂量参考文献^[10]并稍作修改, MET 组给予 MET 0.65 g/kg, NC 组、DFU 组给予等量生理盐水,每天 1 次,连续灌胃 14 d。

1.3.3 体重及 FBG 水平测定

分别于治疗第 0 天、第 7 天、第 14 天测定各组大鼠体重变化,并尾尖采血,采用血糖监测仪监测空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)。

1.3.4 创面愈合率检测

干预治疗 7 d、14 d 后,肉眼观察各组大鼠创面愈合情况,并将带有网格的透明膜贴于创面处,采用扫描仪及 Adobe photoshop CS6 软件分析定量创面面积,计算创面愈合率=(造模时创面面积-治疗结束后创面面积)/造模时创面面积×100%。

1.3.5 创面组织 MVD 检测

干预治疗 7 d、14 d 后,各组大鼠分别随机抽取 8 只,2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处死大鼠,取创面组织制备石蜡切片,常规脱蜡至水采用免疫组化(SP 染色)法检测创面组织 CD34 阳性表达情况。石蜡切片经内源性酶灭活、抗原修复、封闭后依次添加 anti-CD34 抗体(1:200)及 IgG(1:5000)抗体孵育, PBS 洗涤后 DBA 显色。苏木素复染、脱水、透明,封片,显微镜下观察。细胞质出现棕褐色颗粒为阳性细胞,10 倍镜视野下选取微血管密集度区,40 倍镜视野下计数所有微血管。采用 MetaMorph-

LCI 型图像分析系统,分析创面组织 MVD^[11]。

1.3.6 创面组织中氧化应激相关指标检测

干预治疗 7 d、14 d 后,每组各选取 8 只大鼠,匀浆制备大鼠创面组织样品液,采用试剂盒通过生物化学法测定 MDA 及 SOD 活性水平,具体步骤参照其说明书指导进行。

1.3.7 创面组织中 Nrf2、Keap1 蛋白表达检测

采用免疫印迹(Western blot)法分别检测各组大鼠(与 1.3.6 共用 8 只大鼠)治疗 7 d、14 d 后创面组织中 Nrf2、Keap1 蛋白表达情况。采用试剂盒提取各组大鼠创面组织总蛋白后通过 BCA 法测定其浓度,具体步骤参照各自说明书指导进行,保存在 -80℃ 备用。蛋白样品上样后,以 SDS-PAGE 电泳进行分离,接着采用湿转实验将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜,37.5℃ 下封闭,添加兔源 anti-Nrf2 一抗(稀释比例为 1:1000)、兔源 anti-Keap1 一抗(稀释比例为 1:1000)、兔源 anti-GAPDH 一抗(稀释比例为 1:5000),4℃ 冰箱中孵育 12 h, TBST 缓冲液洗膜,添加羊抗兔二抗 IgG(稀释比例为 1:5000)于 37.5℃ 下孵育, TBST 缓冲液洗膜后显色、曝光、拍照,观察结果并运用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

实验数据都为计量资料,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并运用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、FBG 水平比较

治疗第 0 天各组大鼠体重之间比较无统计学意义($P > 0.05$),各组 DFU 组、Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠 FBG 水平均高于 NC 组($P < 0.05$);治疗 7 d、14 d, DFU 组、Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠体重、FBG 水平均高于 NC 组($P < 0.05$);与 DFU 组比较, Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠体重、FBG 水平均显著降低($P < 0.05$),其中 Sal-L 组与 MET 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、图 2。

2.2 各组大鼠创面愈合率比较

治疗 7 d、14 d, DFU 组、Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠创面愈合率均低于 NC 组($P < 0.05$);与 DFU 组比较, Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠创面愈合率显著增加($P < 0.05$),其中 Sal-L 组与

MET 组差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

2.3 各组大鼠创面组织 MVD 比较

治疗 7 d、14 d,与 NC 组比较,DFU 组大鼠创面组织 CD34 阳性细胞及 MVD 显著降低($P<0.05$);

与 DFU 组比较,Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠创面组织 CD34 阳性细胞及 MVD 显著增加($P<0.05$),其中 Sal-L 组与 MET 组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4,图 5,图 6。

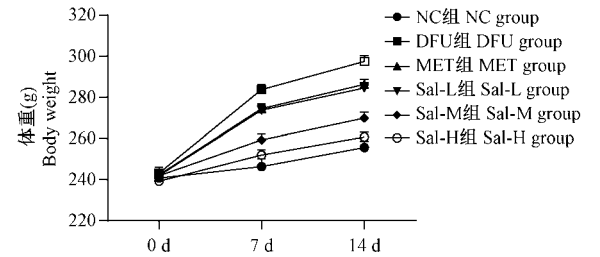


图 1 各组大鼠体重、FBG 水平比较

Figure 1 Comparison of body weight and FBG level of rats in each group

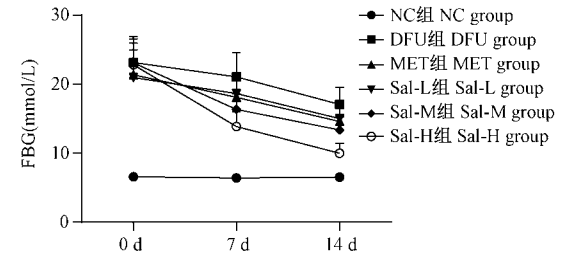
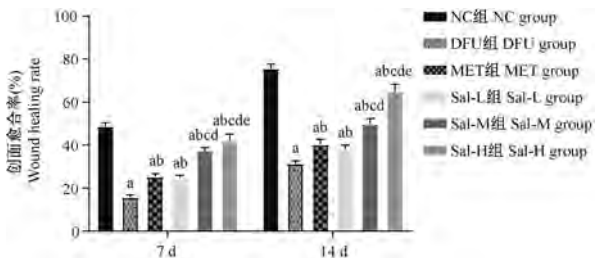


图 2 各组大鼠 FBG 水平比较

Figure 2 Comparison of FBG level of rats in each group

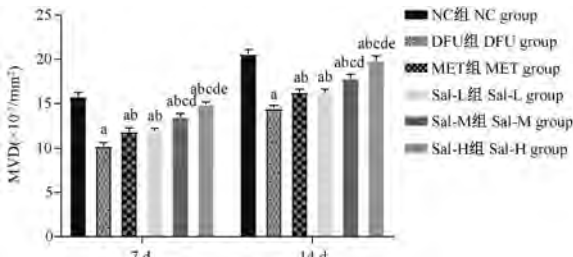


注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 DFU 组比较,^b $P<0.05$;与 MET 组比较,^c $P<0.05$;与 Sal-L 组比较,^d $P<0.05$;与 Sal-M 组比较,^e $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠创面愈合率比较

Note. Compared with NC group, ^a $P < 0.05$. Compared with DFU group, ^b $P < 0.05$. Compared with MET group, ^c $P < 0.05$. Compared with Sal-L group, ^d $P < 0.05$. Compared with Sal-M group, ^e $P < 0.05$.

Figure 3 Comparison of wound healing rate of rats in each group

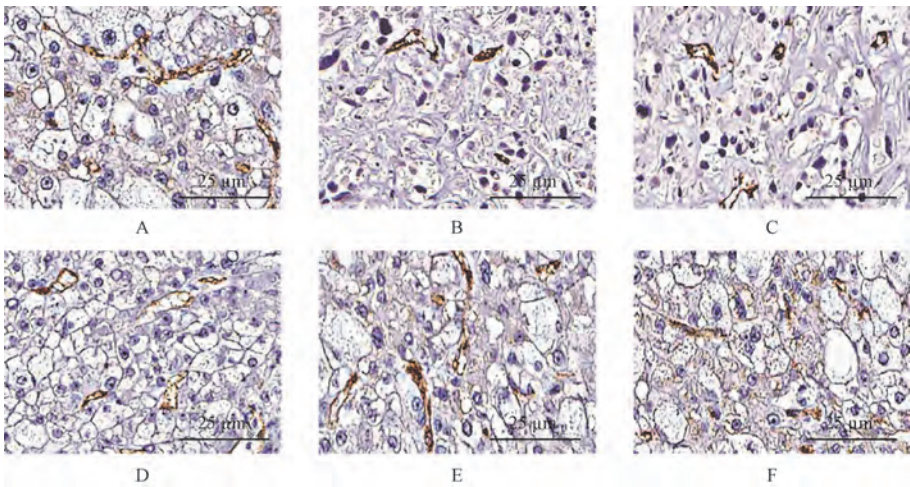


注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 DFU 组比较,^b $P<0.05$;与 MET 组比较,^c $P<0.05$;与 Sal-L 组比较,^d $P<0.05$;与 Sal-M 组比较,^e $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠创面组织 MVD 比较

Note. Compared with NC group, ^a $P < 0.05$. Compared with DFU group, ^b $P < 0.05$. Compared with MET group, ^c $P < 0.05$. Compared with Sal-L group, ^d $P < 0.05$. Compared with Sal-M group, ^e $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of MVD in wound tissue of rats in each group



注:A:NC 组;B:DFU 组;C:MET 组;D:Sal-L 组;E:Sal-M 组;F:Sal-H 组。

图 5 各组大鼠 7 d 创面组织微血管 CD34 蛋白表达比较

Note. A, NC group. B, DFU group. C, MET group. D, Sal-L group. E, Sal-M group. F, Sal-H group.

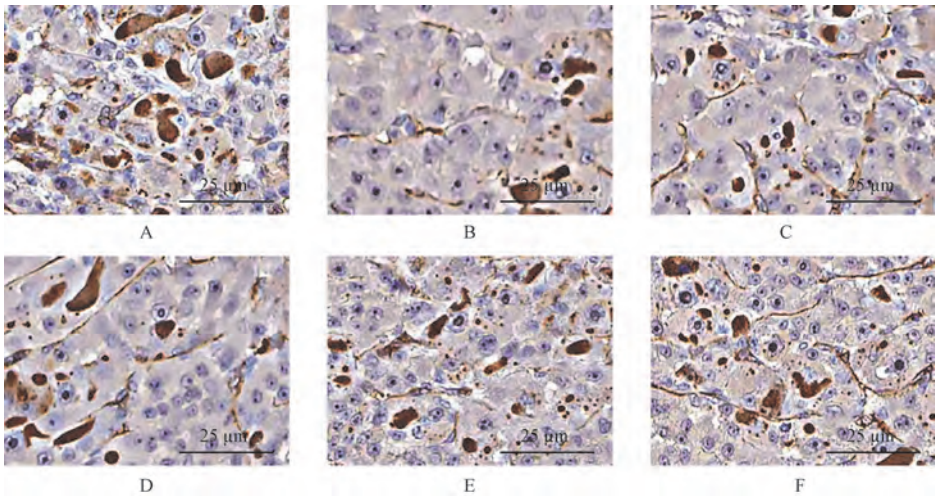
Figure 5 Comparison of CD34 protein expression in microvessels of wound tissues of rats in each group on day 7

2.4 各组大鼠创面组织氧化应激相关指标比较

治疗 7 d、14 d,与 NC 组比较,DFU 组大鼠创面组织 MDA 含量显著升高($P<0.05$),SOD 活性显著降低($P<0.05$);与 DFU 组比较,Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠创面组织 MDA 含量显著降低($P<0.05$),SOD 活性显著增加($P<0.05$),其中 Sal-L 组与 MET 组差异无统计学意义($P>0.05$),详见图 7、图 8。

2.5 各组大鼠创面组织中 Nrf2、Keap1 蛋白表达量比较

治疗 7 d、14 d,与 NC 组比较,DFU 组大鼠创面组织中 Nrf2 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)、Keap1 蛋白表达量升高($P<0.05$);与 DFU 组比较,Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠创面组织 Nrf2 蛋白表达量显著增加($P<0.05$),Keap1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$),其中 Sal-L 组与 MET 组差异无统计学意义($P>0.05$),详见图 9、图 10、图 11。

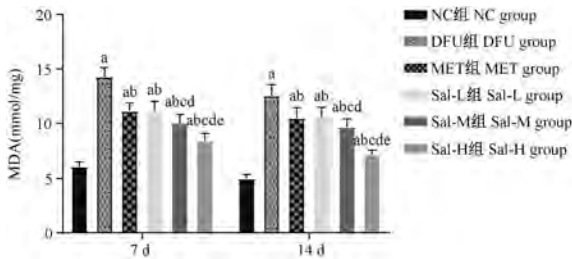


注:A:NC 组;B:DFU 组;C:MET 组;D:Sal-L 组;E:Sal-M 组;F:Sal-H 组。

图 6 各组大鼠 14 d 创面组织微血管 CD34 蛋白表达比较

Note. A, NC group. B, DFU group. C, MET group. D, Sal-L group. E, Sal-M group. F, Sal-H group.

Figure 6 Comparison of CD34 protein expression in microvascular tissue of 14 days in rats of each group

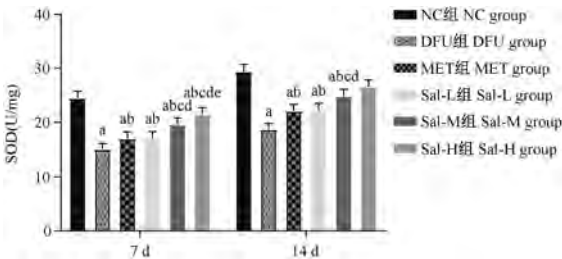


注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 DFU 组比较,^b $P<0.05$;与 MET 组比较,^c $P<0.05$;与 Sal-L 组比较,^d $P<0.05$;与 Sal-M 组比较,^e $P<0.05$ 。

图 7 各组大鼠创面组织氧化应激相关指标(MDA)比较

Note. Compared with NC group, ^a $P < 0.05$. Compared with DFU group, ^b $P < 0.05$. Compared with MET group, ^c $P < 0.05$. Compared with Sal-L group, ^d $P < 0.05$. Compared with Sal-M group, ^e $P < 0.05$.

Figure 7 Comparison of oxidative stress related indexes in wound tissue of rats in each group(MDA)



注:与 NC 组比较,^a $P<0.05$;与 DFU 组比较,^b $P<0.05$;与 MET 组比较,^c $P<0.05$;与 Sal-L 组比较,^d $P<0.05$;与 Sal-M 组比较,^e $P<0.05$ 。

图 8 各组大鼠创面组织氧化应激相关指标(SOD)比较

Note. Compared with NC group, ^a $P < 0.05$. Compared with DFU group, ^b $P < 0.05$. Compared with MET group, ^c $P < 0.05$. Compared with Sal-L group, ^d $P < 0.05$. Compared with Sal-M group, ^e $P < 0.05$.

Figure 8 Comparison of oxidative stress related indexes in wound tissue of rats in each group(SOD)

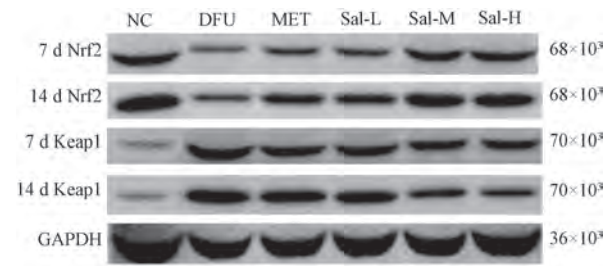
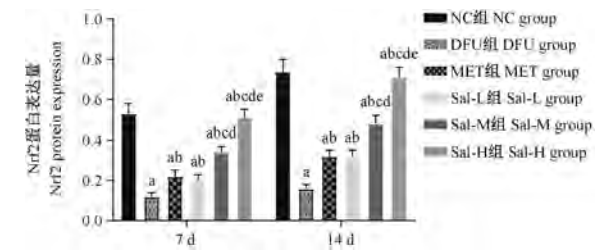


图9 Western blot 检测大鼠创面组织中 Nrf2、Keap1 蛋白表达

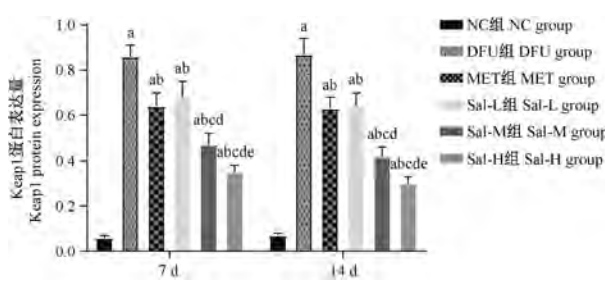
Figure 9 Expression of Nrf2 and Keap1 protein in wound tissue was detected by Western blot



注:与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 DFU 组比较, ^b*P* < 0.05; 与 MET 组比较, ^c*P* < 0.05; 与 Sal-L 组比较, ^d*P* < 0.05; 与 Sal-M 组比较, ^e*P* < 0.05。

图10 各组大鼠创面组织中 Nrf2 蛋白表达量比较
Note. Compared with NC group, ^a*P* < 0.05. Compared with DFU group, ^b*P* < 0.05. Compared with MET group, ^c*P* < 0.05. Compared with Sal-L group, ^d*P* < 0.05. Compared with Sal-M group, ^e*P* < 0.05.

Figure 10 Comparison of Nrf2 protein expression in wound tissue of rats in each group



注:与 NC 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 DFU 组比较, ^b*P* < 0.05; 与 MET 组比较, ^c*P* < 0.05; 与 Sal-L 组比较, ^d*P* < 0.05; 与 Sal-M 组比较, ^e*P* < 0.05。

图11 各组大鼠创面组织中 Keap1 蛋白表达量比较
Note. Compared with NC group, ^a*P* < 0.05. Compared with DFU group, ^b*P* < 0.05. Compared with MET group, ^c*P* < 0.05. Compared with Sal-L group, ^d*P* < 0.05. Compared with Sal-M group, ^e*P* < 0.05.

Figure 11 Comparison of Keap1 protein expression in wound tissue of rats in each group

3 讨论

慢性溃疡创面愈合是多种因素共同作用的结果,新生血管可为创面愈合提供血氧供应,其生成多少及快慢可影响 DFU 创面愈合,创面难愈与肉芽组织生长期气虚血瘀有关。中医理论亦认为,DFU 属“脱疽”、“消渴”范畴,该病主要病机为毒瘀阻络,因此治疗 DFU 重在清热解毒、活血化瘀、去腐生肌,活血通脉^[11]。Sal 是传统中药红景天主要活性成分之一,现代医学研究发现,Sal 具有抗氧化^[12]、抗细胞损伤、抗肿瘤等多种生物作用^[13]。韩静等^[14] 研究报道,Sal 可促进脑组织内源性神经再生,增加脑内神经营养因子表达,改善脑缺血损伤的神经行为学症状。赵红姝等^[15] 研究报道,高山红景天组方口服可降低糖尿病大鼠视网膜血管内皮生长因子表达,减少血管增生。侯丹等^[16] 研究报道,Sal 可能通过增加 Nrf2、HO-1 等蛋白表达,抑制氧化应激,改善糖尿病大鼠肝糖脂水平。因此本课题组推测,Sal 可能对 DFU 创面愈合有一定积极作用。本研究首先建立 DFU 大鼠模型,结果发现,与 NC 组比较,DFU 组、Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组、MET 组大鼠体质量、FBG 水平均显著升高,提示模型制备成功。经 Sal 治疗后,DFU 大鼠 FBG 水平显著降低,创面组织愈合率、CD34 阳性细胞及 MVD 显著增加,提示 Sal 可降低 DFU 大鼠血糖水平,促进血管新生,促进 DFU 创面愈合。

DFU 大鼠持续高糖状态可诱导机体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量增多,产生氧化应激,引起胰岛素 β 细胞损伤,转而加重病情,形成恶性循环,溃疡经久不愈。Nrf2/Keap1 是机体抗氧化损伤的关键信号通路,其中 Nrf2 是重要抗氧化因子,可通过核转位进入细胞核与氧化反应元件 (antioxidant responsive element, ARE) 启动 HO-1、SOD、GSH-PX 等抗氧化酶表达,而 Keap1 是 Nrf2 重要调节因子,可与 Nrf2 结合藕联呈复合物抑制 Nrf2 活性^[17-18]。Bitar 等^[19] 研究报道,氧化应激是慢性糖尿病并发症的主要因素,与 Nrf2 缺失导致的氧化应激积累密切相关。Hayashi 等^[20] 研究报道,Nrf2 通过加速细胞迁移参与角膜上皮创伤愈合过程,可能是治疗诸如干眼或慢性角膜上皮缺损等角膜上皮疾病的良好靶点。Rabbani 等^[21] 研究报道,抑制 Keap1 基因表达可加速糖尿病创面愈合。李丹等^[22] 研究报道,运动可通过激活大鼠心机 Keap1/Nrf2 信号通路,促进下游 SOD、GSH-PX 等抗氧化酶

表达,提高心肌抗氧化能力,抵抗糖尿病诱导的心肌氧化损伤。本研究结果发现,与 NC 组比较,DFU 组大鼠创面组织中 Nrf2 蛋白表达量、SOD 活性显著降低,Keap1 蛋白表达量、MDA 含量升高;与 DFU 组比较,Sal 可增加创面组织 Nrf2 蛋白表达量及 SOD 活性,降低 Keap1 蛋白表达量及 MDA 含量,提示 Sal 可能通过调节 Nrf2/Keap1 信号通路,促进抗氧化酶表达,提高 DFU 大鼠抗氧化能力,促进创面愈合。

综上所述,Sal 可能通过调节 Nrf2/Keap1 信号通路,增加 DFU 大鼠抗氧化能力,促进创面愈合,本研究首次探究 Sal 促进 DFU 大鼠创面愈合作用机制,可能对临床 DFU 治疗提供新的靶点及参考。但关于 Sal 外敷效果及促进 DFU 是否涉及其他信号通路共同参与尚不清楚,有待进一步深入探究。

参考文献:

[1] Liu Y, Zhou S, Gao Y, et al. Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer [J]. Asian J Pharm Sci, 2019, 14(2): 130-143.

[2] Price BL, Morley R, Bowling FL, et al. Susceptibility of monomicrobial or polymicrobial biofilms derived from infected diabetic foot ulcers to topical or systemic antibiotics *in vitro* [J]. PLoS One, 2020, 15(2): e228704.

[3] Wang A, Toma MA, Ma J, et al. Circular RNA hsa_circ_0084443 is upregulated in diabetic foot ulcer and modulates keratinocyte migration and proliferation [J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2020, 9(4): 145-160.

[4] 李慧,孙乐栋.红景天苷抗衰老和抗氧化药理机制研究新进展[J].中国医药导报,2018,15(7):51-54,81.

[5] 朴敏虎,王程瑜,李香丹,等.红景天苷对糖尿病肾病大鼠的治疗作用及其机制探讨[J].山东医药,2017,57(10):34-36.

[6] Chang X, Luo F, Jiang W, et al. Protective activity of salidroside against ethanol-induced gastric ulcer via the MAPK/NF-kappaB pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 604-615.

[7] 左玮,张波,梅丹.红景天苷对乙酰氨基酚诱导肝损伤模型小鼠 Keap1-Nrf2 信号通路的影响 [J]. 中国药房,2018,29(11):1487-1490.

[8] 李俊,冯丽洁,刘一平.有氧运动对 2 型糖尿病大鼠血管炎症及 Nrf2/ARE 信号通路的影响 [J]. 免疫学杂志,2019,35

(2): 179-184.

[9] 李友山,郑琪,冀凌云,等.改良 STZ 法制备糖尿病足溃疡大鼠模型 [J]. 辽宁中医杂志,2016,43(1):158-160.

[10] 冷伟,陈明霞,刘春莹,等.红景天苷对链尿佐菌素诱导的糖尿病肾病大鼠肾间质纤维化的改善作用及机制研究 [J]. 卫生研究,2019,48(3):366-373.

[11] 郑琪,李友山.四效散对糖尿病足溃疡大鼠创面愈合的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):114-118.

[12] 范芳芳,郭非非,张雯,等.基于网络药理学的藏药大花红景天抗氧化应激分子机制研究 [J]. 中国中药杂志,2018,43(9):1789-1797.

[13] 孙安琪,颜天华,巨修练.红景天苷药理作用及分子机制的研究进展 [J]. 时珍国医国药,2018,29(6):1440-1443.

[14] 韩静,张继州,肖庆,等.红景天苷促大鼠脑缺血再灌注组织的神经再生作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(10):1015.

[15] 赵红姝,魏文斌.高山红景天组方对糖尿病鼠视网膜中 VEGF 表达的影响 [J]. 眼科研究,2010,28(6):513-518.

[16] 候丹,许光远,张苗,等.红景天苷改善糖尿病大鼠肝脏脂类水平的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):130-134.

[17] 胡流芳,王迎,任汝静,等.Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J].国际药学研究杂志,2016,43(1):146-152,166.

[18] Danilovic D, de Mello ES, Frazzato E, et al. Oncogenic mutations in KEAP1 disturbing inhibitory Nrf2 - Keap1 interaction: Activation of antioxidative pathway in papillary thyroid carcinoma [J]. Head Neck, 2018, 40(6):1271-1278.

[19] Bitar MS, Al-Mulla F. A defect in Nrf2 signaling constitutes a mechanism for cellular stress hypersensitivity in a genetic rat model of type 2 diabetes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 301(6):E1119-E1129.

[20] Hayashi R, Himori N, Taguchi K, et al. The role of the Nrf2-mediated defense system in corneal epithelial wound healing [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61(1):333-342.

[21] Rabbani PS, Zhou A, Borab ZM, et al. Novel lipoproteoplex delivers Keap1 siRNA based gene therapy to accelerate diabetic wound healing [J]. Biomaterials, 2017, 132(1):1-15.

[22] 李丹,王世强.运动对 Keap1/Nrf2 信号通路增强糖尿病大鼠心肌抗氧化能力的研究 [J]. 中国糖尿病杂志,2019,27(5):386-392.

[收稿日期] 2020-09-25

李盼盼,符健,陈伟,等. 前列地尔对暴发性肝衰竭大鼠 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路及肝功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 55-62.

Li PP, Fu J, Chen W, et al. Effects of alprostadiol on the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway and liver function in rats with fulminant hepatic failure [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 55-62.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 008

前列地尔对暴发性肝衰竭大鼠 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路及肝功能的影响

李盼盼^{1*}, 符 健¹, 陈 伟², 陈 丽¹

(1.海南省人民医院(海南医学院附属海南医院)感染科,海口 570100;2.海南医学院第二附属医院药学部,海口 570100)

【摘要】 目的 探究前列地尔(PGE1)对暴发性肝衰竭(FHF)大鼠对肝功能的影响,并探讨其对真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)/激活转录因子 4(ATF4)/C/EBP 同源蛋白(CHOP)通路的调控作用。**方法** SPF 级 SD 雄性大鼠 90 只按随机数表法分为对照组、模型组、阳性对照组、低、中、高剂量 PGE1 组,除对照组外,其它组大鼠均采用腹腔注射 D-氨基半乳糖(D-GalN)-大肠杆菌内毒素脂多糖(LPS)的方法建立 FHF 大鼠模型,对照组腹腔注射等量的生理盐水。造模 6 h 后,阳性对照组及低、中、高剂量 PGE1 组分别尾静脉注射促肝细胞生长素 1.36 mg/kg, PGE1 12.5、25、37.5 μ g/kg,每天 1 次,连续给药 3 d,对照组和模型组尾静脉注射等量的生理盐水。在造模 72 h 后处死大鼠,腹主动脉采血,检测血清丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)水平;解剖取肝组织用苏木精-伊红(HE)染色法观察各组大鼠肝组织病理学变化;采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法检测肝组织中 eIF2 α /ATF4/CHOP/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA 和蛋白、磷酸化-eIF2 α (p-eIF2 α)蛋白水平。**结果** 与对照组相比,模型组肝细胞广泛变性并有局灶性坏死,中央静脉受损,血清 ALT、AST、TBIL,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、低、中、高剂量 PGE1 组肝细胞损害有所降低,坏死细胞数量减少,血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平降低($P<0.05$);且随着 PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PGE1 可能通过抑制 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路表达,减轻大鼠肝细胞凋亡,达到保护肝的作用,可能作为 FHF 潜在的治疗药物。

【关键词】 前列地尔;暴发性肝功能衰竭;大鼠;真核翻译起始因子 2 α ;激活转录因子 4;C/EBP 同源蛋白
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0055-08

Effects of alprostadiol on the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway and liver function in rats with fulminant hepatic failure

LI Panpan^{1*}, FU Jian¹, CHEN Wei², CHEN Li¹

(1. Department of Infection, Hainan Provincial People's Hospital (Hainan Hospital Affiliated to Hainan Medical College), Haikou 570100, China. 2. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100)

【基金项目】 海南省卫生计生行业科研项目(18A200189)。
【作者简介】 李盼盼(1988—), 硕士, 主治医师, 研究方向: 各类肝病的基础和临床研究。E-mail: yangyaowu19621@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of prostaglandin E1 (PGE1) on liver function in rats with fulminant hepatic failure (FHF), and to explore its regulatory effects on the eukaryotic translation-initiation factor 2 α (eIF2 α)/activating transcription factor 4 (ATF4)/C/EBP homologous protein (CHOP) pathway. **Methods** Overall, 90 specific pathogen-free Sprague-Dawley rats were divided into control, model, positive control, low-, medium-, and high-dose PGE1 groups according to the random number table method. Except for the control group, all rats were intraperitoneally injected with D-galactosamine (D-GalN)-lipopolysaccharide (LPS) to establish the FHF rat model, and the control group received an intraperitoneal injection of the same volume of normal saline. At 6 hours after modeling, the positive control group and low-, medium-, and high-dose PGE1 groups were administered a tail vein injection of 1.36 mg/kg hepatocyte growth promoting factor and 12.5, 25, or 37.5 μ g/kg PGE1, respectively, once a day for 3 consecutive days. The control group and the model group were administered a tail vein injection of the same volume of normal saline. The rats were euthanized at 72 hours after modeling and abdominal aorta blood was collected. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bilirubin (TBIL) were measured. Liver tissues were dissected and stained with hematoxylin and eosin (HE) to observe pathological changes. mRNA and protein levels of eIF2 α /ATF4/CHOP/caspase-3 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot was used to measure phosphorylated-eIF2 α (p-eIF2 α) protein levels. **Results** Compared with the control group, hepatocytes in the model group showed extensive degeneration and focal necrosis, and the central venous was damaged. The levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3, and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in liver tissues were higher ($P < 0.05$). Compared with the model group, the damage to hepatocytes and the number of necrotic cells were decreased in the positive control, low-, medium-, and high-dose PGE1 groups. The levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in liver tissues were lower ($P < 0.05$). With an increase in PGE1 dosage, the levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in the liver tissues of low-, medium-, and high-dose PGE1 groups were decreased ($P < 0.05$) dose-dependently. Compared with the positive control group, the levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in the liver tissues of the low- and medium-dose PGE1 groups were higher ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in liver tissues between the positive control group and the high-dose PGE1 group ($P > 0.05$). **Conclusions** PGE1 may reduce the apoptosis of rat hepatocytes and protect the liver by inhibiting the expression of the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway, which may be a potential therapeutic target for FHF.

[Keywords] alprostadil; fulminant hepatic failure; rat; eukaryotic translation-initiation factor 2 α ; activating transcription factor 4; C/EBP homologous protein

暴发性肝功能衰竭 (fulminant hepatic failure, FHF) 是一种以急性严重肝损害为特征的临床综合征, 又称为暴发性肝炎或急性肝衰竭^[1]。FHF 主要表现为肝细胞短时间内出现大面积坏死及凋亡, 肝功能出现严重失代偿, 导致严重并发症^[2]。肝细胞凋亡可由细胞内或细胞外信号通路触发, 如 DNA 损伤、氧化应激和内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 等。已知 ERS 出现在多种肝病中, 如病毒性肝炎、药物性肝损伤、心脏缺血再灌注损伤等^[3-5]。当内质网的稳态在病理条件下受到干扰时, 未折叠的蛋白质反应 (unfolded protein reaction, UPR) 被激活, UPR 进一步激活 ERS 相关蛋白, ERS

相关蛋白包括真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation-initiation factor 2 α , eIF2 α)、激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 和 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP), eIF2 α /ATF4/CHOP 通路在 ERS 和 UPR 条件下, 可诱导肝细胞凋亡^[6]。研究发现, eIF2 α /ATF4/CHOP 通路在抗肿瘤中具有重要作用, 地兰佐米可通过诱导 ERS 并激活 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路, 促进肝癌细胞的凋亡, 表现出良好的临床抗肿瘤作用^[7]。前列地尔即前列腺素 E1 (Prostaglandin E1, PGE1), 是一种血管活性药物, 具有扩血管、改善微循环障碍的作用^[8]。研究发现, PGE1 有助于缓解肝硬化患

者炎症状态,改善肝功能,提高临床疗效^[9]。Guo 等^[6]研究还指出,PGE1 具有防止 ERS 诱导的肝细胞凋亡的功能。研究发现,促肝细胞生长素可改善急性慢性肝炎患者肝功能指标,缩短治疗时间,用药安全^[10],因此,本研究将其作为阳性对照药物。因此本研究通过制备 FHF 大鼠模型,探究 PGE1 对 FHF 大鼠 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路及肝功能的影响,以期为临床治疗 FHF 筛选新的治疗药物。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 96 只,5 周龄,体重 150~180 g,由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2019-0002],大鼠饲养于海南医学院实验动物中心[SYXK(琼)2020-0007],所有动物均严格按照动物饲养规则喂养,温度为 25℃,湿度为 60%。实验符合 3R 原则,本研究经海南省人民医院伦理委员会批准(202001037)。

1.2 主要试剂与仪器

D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)大肠杆菌内毒素脂多糖(*E. coli* endotoxin lipopolysaccharide, LPS)(批号分别为:G0500、L4516,美国 Sigma 公司);PGE1(前列地尔注射液,批号:20190912,北京泰德制药股份有限公司);促肝细胞生长素注射液(批号:20191218,威海赛洛金药业有限公司);丙氨酸氨基转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(Total bilirubin, TBIL)检测试剂盒(批号分别为:M30679、M31447、M30175,上海信帆生物科技有限公司);苏木素伊红(HE)染色试剂盒(批号:G1120,德国默克公司);TRIzol 试剂(批号:15596026,美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为:SL-30779、A53225,赛默飞世尔科技中国有限公司);SYBR Premix Ex Taq 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(批号:RR036A,大连 TaKaRa 公司);兔抗鼠磷酸化-eIF2 α (phosphorylation-eIF2 α , p-eIF2 α)、eIF2 α /ATF4/CHOP、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、GAPDH 一抗(批号分别为:ab169528、ab184909、ab11419、ab133619、ab123977、ab10009,美国 Abcam 公司);羊抗鼠二抗(批号:7074P2,美国 CST 公司)。全自动生化分析仪(型

号:CS-400B,上海寰熙医疗器械有限公司);光学显微镜(型号:CX43,日本奥林巴斯公司);紫外分光光度计(型号:Alpha-1860Plus,上海谱元仪器有限公司);qRT-PCR 仪(型号:7300,美国 ABI 公司);电泳仪(型号:JY-SCZ2+,北京君意生物科技有限公司);凝胶成像仪(型号:Gel Doc EZ,上海艾研生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制作

大鼠 96 只适应性观察喂养一周,随机抽取 16 只作为对照,其余 80 只为造模组。手术前 12 h 禁止饮食,饮水自由。称重标记后,俯卧位固定于手术台,用 1 mL 无菌生理盐水溶解 D-GalN(300 mg/kg)-LPS(30 μ g/kg)后腹腔注射^[11],此模型是肝衰竭的经典模型,能准确反应肝细胞功能、代谢及形态学变化,重复性好。造模 4 h 后随机抽取造模组及对照大鼠各 1 只,取肝组织 HE 染色观察肝病理变化,另将所有大鼠经剪尾采血检测肝功能(ALT、AST、TBIL),较对照组明显升高($P<0.05$)视为造模成功。排除死亡、造模不成功的 4 只大鼠,共造模成功 76 只(1 只用于验证是否成功,另外 75 只分成五组),成功率 95%。对照组大鼠注入等量灭菌生理盐水。

1.3.2 动物模型的分组及给药

造模大鼠按随机数表法分成 5 组,包括模型组($n=15$)、阳性对照组($n=15$)、低、中、高剂量 PGE1 组(每组 $n=15$);1.3.1 中剩下的 15 只正常大鼠作为对照组。造模 6 h 后,阳性对照组大鼠尾静脉注射促肝细胞生长素 1.36 mg/kg^[12];低、中、高剂量 PGE1 组大鼠分别尾静脉注射 PGE1 12.5、25、37.5 μ g/kg^[13];每天 1 次,连续给药 3 d,对照组和模型组尾静脉注射等量的生理盐水。

1.3.3 大鼠肝功能水平的检测及 HE 染色观察肝组织病理学变化

造模 72 h 后,采用 1%戊巴比妥钠 4 mL/kg 腹腔内注射麻醉,麻醉生效后,将大鼠采取仰卧位,无菌条件下切口开腹,腹主动脉采血,离心收集血清,测定 ALT、AST、TBIL 水平。获取大鼠肝组织 100 mg,15%福尔马林液固定后,常规石蜡包埋,4 μ m 切片。使用二甲苯脱蜡,再使用从低到高浓度的乙醇进行水化。水化后使用苏木精进行染色,流水稍洗去燃料,再用 0.1%盐酸乙醇进行分化,然后水洗去多余染料。伊红液染色,染色后流水洗去多余染

料。水洗后再用从低到高浓度的乙醇进行醇洗以及脱水处理。最后用二甲苯进行透明,用树脂进行封片,置于光学显微镜下进行观察。

1.3.4 qRT-PCR 法检测大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 表达水平

取大鼠肝组织并剪碎,按照 TRIzol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测总 RNA 纯度及浓度,根据逆转录试剂盒说明将 RNA 反转录为 cDNA。参照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 反应,反应体系为 20 μL:2×SYBR Mix 10 μL,H₂O 8 μL,正反向引物各 0.5 μL,模板 1 μL。反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 40 s,40 个循环,72℃ 延伸 10 min。以 GAPDH 基因为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 相对表达量。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3.5 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测大鼠肝组织中 p-eIF2α、eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平

取大鼠肝组织并剪碎,添加蛋白裂解液置于冰上 30 min,离心后收集上清液,参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定肝组织中蛋白总浓度,配制 10%分离胶、5%浓缩胶,取 50 μg 蛋白上样,待蛋白样品刚进入浓缩胶时电压设置为 80 V,进入分离胶后,电压升高至 120V,电泳结束后,将目的条带凝胶切除,目的蛋白凝胶转移到 PVDF 膜上,冰上进行转膜反应,电压为 100 V,反应时间 1 h,结束后用 TBST 溶液清洗,加入 5%脱脂牛奶室温下进行 1 h 封闭,TBST 溶液清洗后,加入一抗(p-eIF2α、eIF2α、ATF4、CHOP、Caspase-3、GAPDH,稀释倍数均为 1:1000),4℃过夜,TBST 清洗后加入羊抗鼠二抗(稀释倍数 1:5000),室温下孵育 2 h,TBST 清洗后,ECL 显色置于凝胶成像仪中观察各组蛋白表达情况。实验采用 Image J 软件对 Western blot 条带进行采集分析,并计算目的条带与相应内参 GAPDH 的比值。

1.4 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计,计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内有差异进一步两两比较采用 SNK-*q* 法进行检验,当 $P<0.05$ 为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能相关指标的比较

各组大鼠肝功能相关指标比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 明显升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、低、中、高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 明显降低($P<0.05$);且随着 PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 明显升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平无明显差异($P>0.05$)。见表 2。

2.2 PGE1 对大鼠肝组织病理学的影响

对照组大鼠肝细胞排列整齐、致密、形态完整,未出现病理学损害;模型组大鼠肝细胞广泛变性并有局灶性坏死,空泡细胞质,中央静脉受损;阳性对照组大鼠用药后肝细胞损害有所缓解;PGE1 组随药物浓度的升高,肝细胞损害有所降低,细胞变形减轻,坏死细胞数量逐渐减少。见图 1。

2.3 各组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平的比较

各组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组及低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平均降低($P<0.05$);且随着

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	参考序列号 Reference serial number	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
eIF2a	NM_001109339.1	CACTTCAGAATGCCGGTCT	AACAAGCTGACATAGGCCCC
ATF4	NM_024403.2	TCCTGAACAGCGAAGTGTG	CATCCATAGCCAGCCATTCT
CHOP	NM_001109986.1	AGCAGAGGTCACAAGCACCT	CTCCTTCATGCGCTGTTCC
Caspase-3	XM_010645199.2	GCCTGTAGAGGAACAGAATTAG	GTGGTATTCCGTACTAACAGTG
GAPDH	NM_017008.4	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平均升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平无显著差异($P>0.05$)。见表 3。

2.4 各组大鼠肝组织中 p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平的比较

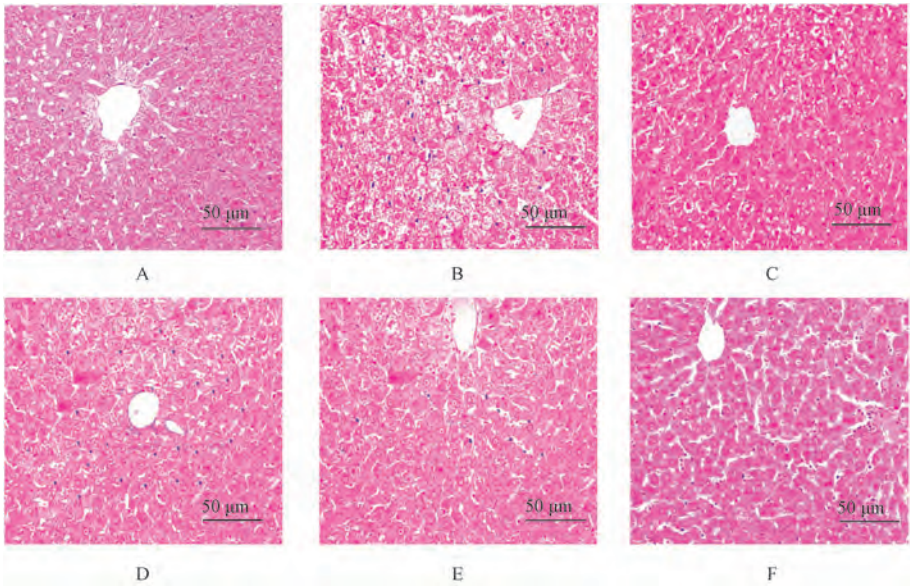
各组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠肝组织中

p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组及低中高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平均降低($P<0.05$);且随着 PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平无显著差异($P>0.05$)。见表 4、图 2。

表 2 各组大鼠肝功能相关指标的比较($\bar{x}\pm s, n=15$)
Table 2 Comparison of liver function related indexes of rats in each group

组别 Groups	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mmol/L)
对照组 Control group	46.32 $\pm$ 7.65	65.85 $\pm$ 9.26	1.48 $\pm$ 0.36
模型组 Model group	215.52 $\pm$ 32.28 ^a	142.51 $\pm$ 20.15 ^a	21.26 $\pm$ 4.65 ^a
阳性对照组 Positive control group	105.24 $\pm$ 10.51 ^{ab}	86.36 $\pm$ 11.52 ^{ab}	3.56 $\pm$ 0.85 ^{ab}
低剂量 PGE1 组 Low dose PGE1 group	181.59 $\pm$ 29.52 ^{abc}	136.53 $\pm$ 24.61 ^{abc}	18.63 $\pm$ 3.21 ^{abc}
中剂量 PGE1 组 Medium dose PGE1 group	156.59 $\pm$ 21.38 ^{abcd}	112.68 $\pm$ 18.36 ^{abcd}	11.42 $\pm$ 1.35 ^{abcd}
高剂量 PGE1 组 High dose PGE1 group	113.43 $\pm$ 12.86 ^{abde}	89.36 $\pm$ 14.86 ^{abde}	4.57 $\pm$ 1.14 ^{abde}
<i>F</i>	315.712	119.463	450.078
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阳性对照组比较,^c $P<0.05$;与低剂量 PGE1 组比较,^d $P<0.05$;与中剂量 PGE1 组比较,^e $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with positive control group, ^c $P<0.05$. Compared with low dose PGE1 group, ^d $P<0.05$. Compared with medium dose PGE1 group, ^e $P<0.05$.



注:A:对照组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量 PGE1 组;E:中剂量 PGE1 组;F:高剂量 PGE1 组。

图 1 PGE1 对大鼠肝组织病理学的影响(HE 染色)

Note. A, Control group. B, Model group. C, Positive control group. D, Low dose PGE1 group. E, Medium dose PGE1 group. F, High dose PGE1 group.

Figure 1 Effect of PGE1 on liver histopathology in rats(HE staining)

表 3 各组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 3 Comparison of eIF2α, ATF4, CHOP and Caspase-3 mRNA levels in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	eIF2α mRNA	ATF4 mRNA	CHOP mRNA	Caspase-3 mRNA
对照组 Control group	1.02±0.13	1.00±0.12	1.03±0.14	1.06±0.12
模型组 Model group	4.38±0.65 ^a	3.81±0.64 ^a	2.85±0.31 ^a	3.62±0.39 ^a
阳性对照组 Positive control group	1.25±0.18 ^{ab}	1.45±0.24 ^{ab}	1.15±0.14 ^{ab}	1.19±0.13 ^{ab}
低剂量 PGE1 组 Low dose PGE1 group	3.25±0.42 ^{abc}	2.85±0.42 ^{abc}	2.14±0.22 ^{abc}	2.82±0.35 ^{abc}
中剂量 PGE1 组 Medium dose PGE1 group	2.41±0.31 ^{abcd}	2.02±0.38 ^{abcd}	1.52±0.16 ^{abcd}	1.89±0.29 ^{abcd}
高剂量 PGE1 组 High dose PGE1 group	1.32±0.25 ^{abde}	1.52±0.31 ^{abde}	1.26±0.15 ^{abde}	1.21±0.14 ^{abde}
F	516.300	283.299	499.264	621.886
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阳性对照组比较,^c $P<0.05$;与低剂量 PGE1 组比较,^d $P<0.05$;与中剂量 PGE1 组比较,^e $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with positive control group, ^c $P<0.05$. Compared with low dose PGE1 group, ^d $P<0.05$. Compared with medium dose PGE1 group, ^e $P<0.05$.

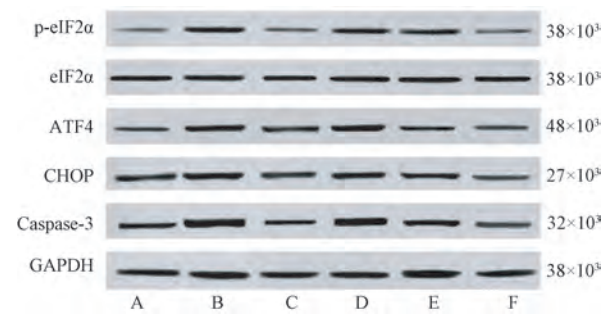
表 4 各组大鼠肝组织中 p-eIF2α/eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 4 Comparison of protein expression levels of p-eIF2α/eIF2α, ATF4, CHOP and Caspase-3 in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	p-eIF2α/eIF2α	ATF4/GAPDH	CHOP/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
对照组 Control group	0.29±0.05	0.85±0.09	1.05±0.07	1.02±0.12
模型组 Model group	0.95±0.14 ^a	1.45±0.18 ^a	1.68±0.18 ^a	1.78±0.26 ^a
阳性对照组 Positive control group	0.43±0.09 ^{ab}	0.91±0.11 ^{ab}	1.13±0.09 ^{ab}	1.09±0.15 ^{ab}
低剂量 PGE1 组 Low dose PGE1 group	0.75±0.22 ^{abc}	1.31±0.16 ^{abc}	1.52±0.15 ^{abc}	1.62±0.21 ^{abc}
中剂量 PGE1 组 Medium dose PGE1 group	0.61±0.13 ^{abcd}	1.12±0.13 ^{abcd}	1.31±0.13 ^{abcd}	1.34±0.18 ^{abcd}
高剂量 PGE1 组 High dose PGE1 group	0.46±0.12 ^{abde}	0.96±0.12 ^{abde}	1.16±0.11 ^{abde}	1.07±0.13 ^{abde}
F	122.003	121.391	145.970	119.497
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阳性对照组比较,^c $P<0.05$;与低剂量 PGE1 组比较,^d $P<0.05$;与中剂量 PGE1 组比较,^e $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with positive control group, ^c $P<0.05$. Compared with low dose PGE1 group, ^d $P<0.05$. Compared with medium dose PGE1 group, ^e $P<0.05$.



注:A:对照组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量 PGE1 组;E:中剂量 PGE1 组;F:高剂量 PGE1 组。

图 2 各组大鼠肝组织中 p-eIF2α、eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平

Note. A, Control group. B, Model group. C, Positive control group. D, Low dose PGE1 group. E, Medium dose PGE1 group. F, High dose PGE1 group.

Figure 2 Protein expression levels of p-eIF2α, eIF2α, ATF4, CHOP and Caspase-3 in liver tissue of rats in each group

3 讨论

FHF 是一种复杂的临床综合征,由多种病因引

起,如肝炎病毒感染、药物的毒性反应、自身免疫性肝病等,临床表现出大量肝细胞坏死和严重肝功能损伤,且在首发症状出现 8 周内发生肝性脑病^[14]。当前针对 FHF 缺乏有效治疗手段,病死率高,急需治疗 FHF 的有效方法。

PGE1 是一种天然的内源性血管舒张药,在调节细胞功能上具有重要作用,临床上用于多个系统疾病的治疗,如心脑血管疾病、肝肾综合征、呼吸系统疾病等^[15]。研究表明,PGE1 对肝具有显著的保护作用,对于改善肝微循环、扩张肝血管,增加肝血窦流量,促进肝细胞 DNA 合成,加速肝细胞再生等方面具有重要作用^[16]。因此探究 PGE1 对 FHF 的影响,对探明如何防治 FHF 具有重要意义。研究发现,PGE1 可通过改善肝微循环提高重症肝炎患者肝功能指标,且不增加不良反应风险^[17]。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 升高;与模型组比较,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 依次降低,高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平与阳性对照组无明显差

异。提示 PGE1 同阳性对照药物具有相似作用,均可降低 FHF 大鼠肝功能指标 ALT、AST、TBIL 水平,进而改善肝功能,且呈剂量依赖。宋景春等^[18]研究发现,PGE1 联合核苷类抗病毒药物可以明显改善乙型肝炎感染失代偿期肝硬化患者的肝功能,减轻肝纤维化程度、抑制血清炎性因子产生,临床疗效显著。病理学结果也显示,对照组大鼠肝细胞排列整齐、致密、形态完整,未出现病理学损害;模型组大鼠肝细胞广泛变性并有局灶性坏死,空泡细胞质,中央静脉受损;阳性对照组大鼠用药后肝细胞损害有所缓解;PGE1 组随药物浓度的升高,肝细胞损害有所降低,细胞变形减轻,坏死细胞数量逐渐减少。提示 PGE1 可改善大鼠肝损伤状况。

ERS 是一种重要的细胞自我防御机制,由主标记物葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和三种应激传感器蛋白激酶样内质网激酶 (PERK)、激活转录因子 6 (ATF6) 和肌醇需求激酶 1 α (IRE1 α) 调节,短期轻度的 ERS 会启动促生存途径;但长期重度的内质网应激会导致细胞发生凋亡^[19]。研究认为,轻度的 ERS 可激活 UPR,主要通过磷酸化细胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular signal regulated kinase, PERK)、肌醇需求酶 1、活性转录因子-6 三种内质网膜蛋白信号通路起到促生存作用^[20]。但重度且持久的 ERS 则导致 ERS 相关蛋白通路激活,启动凋亡途径,对不能挽救的细胞进行清除。在正常生理条件下,PERK 由于与葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GPR78) 结合而处于非活性状态,一旦发生 ERS, GPR78 与 PERK 的管腔结构域分离,导致 PERK 的寡聚化和反式自磷酸化,PERK 成为一种能够促进 eIF2 α 亚单位磷酸化的活性激酶,促进 eIF2 α 水平升高, eIF2 α 则进一步诱导 ATF4 的优先翻译,在长时间 ERS 条件下,当肝细胞自我适应性调节失败时,PERK 还可能通过激活下游 CHOP 来触发促凋亡信号,从而促进肝细胞凋亡^[21]。细胞凋亡受到多种基因的调控, Caspase-3 为主要的凋亡执行蛋白,被激活后能分解细胞的骨架蛋白、细胞器等结构,参与细胞凋亡的执行过程^[22]。研究发现,ERS 还可以激活 Caspase 蛋白家族的级联反应,通过激活 Caspase-3 触发凋亡途径,导致细胞死亡^[23]。因此本研究将 Caspase-3 纳入检测因素,探究肝细胞凋亡水平。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α 、

eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均升高;与模型组比较,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均逐渐降低;且高剂量 PGE1 组与阳性对照组各 mRNA 和蛋白水平比较差异无统计学意义。推测 PGE1 可通过减缓肝细胞 ERS 反应,从而降低 eIF2 α 亚单位磷酸化水平,进而减少 ATF4 的释放和转录作用, CHOP 等促凋亡蛋白及凋亡相关蛋白 Caspase-3 等表达水平降低,最终达到保肝护肝的作用。

综上所述, PGE1 可能通过抑制 ERS, 降低 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路表达水平,进而减缓大鼠肝细胞凋亡进程,达到保肝护肝的作用。但本研究也存在不足之处,如:未进行 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况、未在研究中设计通路抑制剂进行验证,后续研究中将完善实验设计。

参考文献:

- [1] Crespo I, Fernández-Palanca P, San-Miguel B, et al. Melatonin modulates mitophagy, innate immunity and circadian clocks in a model of viral-induced fulminant hepatic failure [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(13): 7625-7636.
- [2] 陈月桥, 王挺帅, 石清兰, 等. 解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭大鼠肝组织 TLR2、TLR4 和 TNF- α mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(9): 1811-1814.
- [3] Guo X, Liu WL, Yang D, et al. Hepatitis C virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human fetal liver stem cells [J]. J Pathol, 2019, 248(2): 155-163.
- [4] Ruan Z, Liang M, Deng X, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects fatty liver against ischemia-reperfusion injury by regulating endoplasmic reticulum stress-induced autophagy in macrophage through mediating the class A scavenger receptor pathway in rats [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(1): 306-316.
- [5] Zeng J, Jin Q, Ruan Y, et al. Inhibition of TGF β -activated protein kinase 1 ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury via endoplasmic reticulum stress suppression [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(12): 6846-6859.
- [6] Guo Y, Guo R, Su Y, et al. The PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway plays a role in regulating monocrotaline-induced endoplasmic reticulum stress in rat liver [J]. Res Vet Sci, 2020, 130(1): 237-239.
- [7] Li J, Zhuo JY, Zhou W, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers delanzomib-induced apoptosis in HCC cells through the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(6): 2875-2889.
- [8] 魏立业, 傅向华. 前列腺素 E1 脂微球制剂预处理对大鼠心肌缺血/再灌注损伤微循环障碍的影响 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32: 18-19.

- [9] 刘均政. 前列地尔辅助治疗对乙型肝炎肝硬化抗病毒疗效的影响 [J]. 徐州医科大学学报, 2019, 39(3): 207-211.
- [10] 谢莹, 徐文胜, 高月求, 等. 注射用促肝细胞生长素治疗急性慢性肝炎疗效及用药安全性 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(22): 2729-2734.
- [11] 刘江凯, 刘香丽, 李聪聪, 等. LPS/D-GaLN 诱导大鼠急性肝损伤动物模型的建立 [J]. 中国急救医学, 2019, 39(2): 175-178.
- [12] 孙琳琳, 朱争艳, 杜智, 等. 脐带间充质干细胞旁分泌物质对暴发性肝衰竭大鼠肝功能及肝细胞增殖的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(4): 313-317.
- [13] 周卉, 苏旭东. 重组人表皮生长因子联合前列地尔对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -连环素信号通路表达的影响 [J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(3): 259-263.
- [14] Wang Q, Liu L, Zhang S, et al. Long noncoding RNA NEAT1 suppresses hepatocyte proliferation in fulminant hepatic failure through increased recruitment of EZH2 to the LATS2 promoter region and promotion of H3K27me3 methylation [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(3): 461-472.
- [15] 马娜, 杨世诚, 付乃宽. 前列腺素 E1 预防老年冠心病患者介入治疗后造影剂肾病的作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(3): 245-249.
- [16] Yang FW, Fu Y, Li Y, et al. Prostaglandin E1 protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via protein kinase A-dependent induction of glucose-regulated protein 78 expression [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(40): 7253-7264.
- [17] 廖红保, 沈明. 替诺福韦酯联用前列地尔对重症乙型肝炎患者的疗效评价 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(11): 1331-1334.
- [18] 宋景春, 张海涛, 刘斌, 等. 前列地尔联合核苷类抗病毒药物对 HBV 感染失代偿期肝硬化患者肝功能、肝纤维化指标及血清炎症因子的影响 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(8): 593-597.
- [19] 王慧娟, 徐玲, 田原, 等. 内质网应激在乙型重型肝炎(肝衰竭)中的作用研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(4): 244-249.
- [20] Ishibashi T, Morita S, Kishimoto S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor signaling regulates inositol-requiring enzyme 1 α activation to protect β -cells against terminal unfolded protein response under irremediable endoplasmic reticulum stress [J]. J Diabetes Investig, 2020, 11(4): 801-813.
- [21] Wang Y, Pan T, Li L, et al. Benzo(a)pyrene promotes Hep-G2 cell migration and invasion by upregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression [J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 8325-8332.
- [22] Tsutsui K, Haraguchi S. Neuroprotective actions of cerebellar and pineal allopregnanolone on Purkinje cells [J]. FASEB Bioadv, 2020, 2(3): 149-159.
- [23] Abdullah A, Ravanian P. Kaempferol mitigates Endoplasmic Reticulum Stress Induced Cell Death by targeting caspase 3/7 [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2189.

[收稿日期]2020-09-25

盛静宇,朱海根,王丽. miR-433-3p 通过调控 MAPK8 蛋白在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 63-70.

Sheng JY, Zhu HG, Wang L. miRNA-433-3p protects against H₂O₂-induced injury to cardiac myocytes by targeting MAPK8 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 63-70.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 009

miR-433-3p 通过调控 MAPK8 蛋白在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用

盛静宇^{1,2}, 朱海根^{2*}, 王 丽³

(1. 江苏大学附属武进医院 徐州医科大学武进临床学院心电学科, 江苏 常州 213000;
2. 江苏大学附属武进医院 徐州医科大学武进临床学院全科医学科, 江苏 常州 213000;
3. 常州德安医院院感科, 江苏 常州 213000)

【摘要】 目的 探究 miR-433-3p 在过氧化氢(H₂O₂) 诱导的大鼠心肌细胞(H9c2) 损伤中的作用及具体机制的研究。**方法** 构建氧化应激损伤模型, 以 H9c2 心肌细胞为研究对象, 通过转染 miR-433-3p 模拟物(miR-433-3p mimics)、miRNA 阴性对照(miR-NC)、阴性对照(pcDNA-NC) 和 MAPK8 过表达质粒(pcDNA-MAPK8) 至 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞中, 将细胞分为对照组(Control)、H₂O₂ 模型组(H₂O₂)、H₂O₂ + miRNA 阴性对照组(H₂O₂ + miR-NC)、H₂O₂ + miR-433-3p 模拟物组(H₂O₂ + miR-433-3p mimics)、H₂O₂ + miR-433-3p 模拟物 + pcDNA 阴性对照组(H₂O₂ + miR-433-3p mimics + pcDNA-NC) 和 H₂O₂ + miR-433-3p 模拟物 + MAPK8 过表达组(H₂O₂ + miR-433-3p mimics + pcDNA-MAPK8)。采用 qRT-PCR 法检测 miR-433-3p 和 MAPK8 在 H9c2 细胞中的 mRNA 表达水平。MTT 法和 ELISA 试剂盒分别检测细胞活性和乳酸脱氢酶(LDH) 释放量。Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、MAPK8 和 GAPDH 的蛋白表达水平。双荧光素酶报告实验检测 miR-433-3p 与 MAPK8 之间的靶向关系。**结果** 与对照组相比, miR-433-3p 在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达。相比较 H₂O₂ + miR-NC 组, miR-433-3p 过表达可以显著降低 LDH 释放量并增强细胞活力。此外, 相比较 H₂O₂ + miR-NC 组, miR-433-3p 过表达可以显著降低促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 的表达水平, 而促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平。双荧光素酶报告实验显示 miR-433-3p 可以靶向结合 MAPK8 并负调控 MAPK8 的表达。过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞活性损伤和细胞凋亡的抑制作用。**结论** miR-433-3p 通过负靶向调控 MAPK8 在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用。

【关键词】 miR-433-3p; H9c2 心肌细胞; MAPK8

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0063-08

miRNA-433-3p protects against H₂O₂-induced injury to cardiac myocytes by targeting MAPK8

SHENG Jingyu^{1,2}, ZHU Haigen^{2*}, WANG Li³

(1. Department of Electrophysiology, Wujin Clinical College of Xuzhou Medical University, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213000, China. 2. Department of General Medicine, Wujin Clinical College of Xuzhou Medical University, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213000. 3. Department of Hospital-acquired Infection Control, Changzhou De'an Hospital, Changzhou 213000)

【基金项目】 常州市科技应用基础研究计划资助项目(CJ20160001)。

【作者简介】 盛静宇(1979—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病。E-mail: shengjingyu@163.com

【通信作者】 朱海根(1972—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 全科医学。E-mail: zhg801@163.com

[Abstract] **Objective** To explore the role and underlying mechanisms of miR-433-3p in hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced injury to H9c2 cardiomyocytes. **Methods** An oxidative stress injury model of H9c2 cardiomyocytes was established. H9c2 cardiomyocytes were transfected with miR-433-3p mimics, miRNA mimic negative control (miR-NC), pcDNA-NC, and a MAPK8 overexpression plasmid (pcDNA-MAPK8) and treated with H_2O_2 . H9c2 cells were divided into Control, H_2O_2 , H_2O_2 + miR-NC, H_2O_2 + miR-433-3p mimic, H_2O_2 + miR-433-3p mimic + pcDNA-NC, and H_2O_2 + miR-433-3p mimic + pcDNA-MAPK8 groups. The mRNA expressions of miR-433-3p and MAPK8 in H9c2 cells were detected by qRT-PCR assay. Cell viability and the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released were detected by MTT assay and ELISA kits, respectively. Cell apoptotic-related protein expressions of Bax, Bcl-2, caspase-3, and cleaved caspase-3 were measured by Western blot analysis. The luciferase reporter assay was performed for testing the targeting relationship between miR-433-3p and MAPK8. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-433-3p was lower in H_2O_2 -induced H9c2 cardiomyocytes. Compared with the H_2O_2 + miR-NC group, miR-433-3p overexpression significantly reduced the amount of LDH released and enhanced cell viability. In addition, compared with the H_2O_2 + miR-NC group, miR-433-3p overexpression significantly decreased the expressions of the pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase-3, but increased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. The luciferase reporter assay showed that miR-433-3p directly targeted MAPK8 and negatively regulated the expression of MAPK8. Overexpression of MAPK8 reversed the inhibitory effects of miR-433-3p overexpression in H_2O_2 -induced H9c2 cell injury and apoptosis. **Conclusions** miR-433-3p has a protective role in cardiomyocyte injury induced by H_2O_2 through the negative regulation of MAPK8.

[Keywords] miR-433-3p; H9c2 cardiomyocytes; MAPK8

心血管疾病作为全球发病率和死亡率最高的疾病给患者健康带来了严重的挑战^[1]。据目前研究所知,心血管疾病潜在的病理变化主要包括心脏衰竭、心肌梗死、心房颤动、动脉粥样硬化和缺血再灌注^[2]。值得注意的是,心肌梗死是威胁人类健康和导致心肌细胞死亡的主要因素之一^[3]。研究发现,在心肌梗死的过程中,心肌细胞会在相当长的一段时间内遭受缺血缺氧导致的不可逆转的细胞死亡或心功能不全^[4]。减少心肌细胞凋亡和损伤可以明显改善心功能和心脏重构。因此,保护心肌细胞凋亡在抑制心血管疾病的发展过程中发挥着极其关键的作用。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类长度约为 18~24 个核苷酸的内源性非编码 RNA 分子,可以通过靶向结合含有部分互补序列的 mRNA 的 3' 非编码区 (3' UTR) 端而对 mRNA 进行转录后水平调控,进而影响细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移等生物学功能^[5-7]。越来越多的研究表明 miRNAs 在多种心脏疾病中发挥重要作用^[8-10]。miR-433-3p 是位于 12 号染色体上的抑癌基因,可以抑制多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和耐药^[11-12]。除肿瘤细胞外,心肌中 miR-433-3p 可以通过靶向调节有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8) 影响心肌纤维化的进程^[13]。但 miR-433-4p 是否能够通过 MAPK8 调控在心血管疾病中发挥作用还尚未报道。在本研究中,我们将心肌细胞

H9c2 暴露于过氧化氢 (H_2O_2) 刺激中以模拟氧化应激引起的心肌损伤,并探讨 miR-433-3p 在 H_2O_2 诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 损伤中的作用及潜在机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠心肌细胞 H9c2 购买于中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基 (批号: A4192101)、胎牛血清 FBS (批号: 15140163)、青霉素和链霉素 (批号: 15140-122) (美国 Gibco 公司); MTT 检测试剂盒 (批号: ST316)、乳酸脱氢酶 ELISA 活性检测试剂盒 (批号: C0016); 全蛋白提取试剂盒 (批号: P0033)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号: P0012S) (上海碧云天生物公司); miR-433-3p 模拟物 miR-433-3p mimics、miRNA 阴性对照 miR-NC、MAPK8 过表达载体 pcDNA-MAPK8、阴性对照 pcDNA-NC (上海吉玛制药有限公司); Bcl-2 抗体 (批号: 2875)、Bax 抗体 (批号: 14796)、Caspase-3 抗体 (批号: 9662)、Cealve Caspase-3 抗体 (批号: 9661)、MAPK8 抗体 (批号: 9255)、GAPDH 抗体 (批号: 5174)、羊抗兔二抗 (批号: 2985S) (美国 Cell Signaling Technology 公司); SYBR Green qPCR 试剂盒 (批号: RR420A) (大连 TaKaRa 公司); 转

染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 (批号: 11668027) (美国 Invitrogen 公司); 双荧光素酶检测试剂盒 (批号: C8304) (美国 Promega 公司); 酶标仪 (批号: MB16-414) (上海皓庄仪器公司); 倒置相差显微镜 (批号: STM7) (日本奥林巴斯公司); 蛋白凝胶成像仪 (批号: Bio6000) (中晶有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和处理

将 H9c2 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中。细胞在 37℃、95% 空气和 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育。每 48 h 更换一次培养基。当细胞融合度达到 90% 以上时进行传代培养。取对数生长期细胞进行后续实验。将对数生长期的 H9c2 细胞按照每毫升 3×10³ 个的密度接种于 96 孔板 24 h 后, 分别加入 0、25、50、100、200 μmol/L 的 H₂O₂ 继续培养 24 h。采用 MTT 法检测 H₂O₂ 对心肌细胞 H9c2 活力的影响并筛选出最合适的 H₂O₂ 浓度。

1.3.2 细胞转染及分组

当 H9c2 细胞生长密度达到 80% 时用胰蛋白酶消化细胞, 并按照每毫升 2×10⁵ 个的密度将细胞接种到 6 孔板中。待细胞生长密度达到 70% 时, 用 200 μmol/L 的 H₂O₂ 处理 24 h。随后采用 Lipofectamine 2000 将 miR-NC (miRNA 阴性对照组), miR-433-3p mimics (miR-433-3p 模拟物组), miR-433-3p mimics 与 pcDNA-NC (miR-433-3p 模拟物+pcDNA 阴性对照组), miR-433-3p mimics 与 pcDNA-MAPK8 (miR-433-3p 模拟物+MAPK8 过表达组) 转染至细胞。转染 6 h 后更换完全培养基并继续培养 48 h, 以备后续实验。

1.3.3 MTT 法检测细胞活力

取转染 48 h 后的 H9c2 细胞按照每毫升 1×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板中。常规培养 24、48、72 h 后。每孔加入终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 孵育 4 h 后倒掉上清, 加入 150 μL 的二甲基亚砜室温孵育 10 min。采用全自动酶标仪在 570 nm 时检测各孔的 OD 值。

1.3.4 ELISA 检测 LDH 水平

根据 1.3.2 的方法对细胞进行分组后, 严格按照 ELISA 试剂盒的操作说明检测 H9c2 细胞培养液

中的 LDH 水平。

1.3.5 qRT-PCR 检测 miR-433-3p 和 MAPK8 的表达水平

收集各组细胞, 用 PBS 清洗细胞后, 采用 TRIzol 溶液提取 RNA 后逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板严格按照 SYBR Green qPCR 试剂盒标准说明书分别进行目的基因的荧光定量 PCR 扩增。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 共计 45 个循环。以 GAPDH 或 U6 作为内参并采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-433-3p 和 MAPK8 的相对表达量。其中所使用的引物详见表 1。

1.3.6 Western blot 法检测相关蛋白表达水平

收集各组细胞, 用 PBS 清洗细胞后, 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。采用 BCA 浓度检测试剂盒对蛋白提取物进行定量。每孔 20 μg 上样量, 通过 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 将蛋白印迹转移到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶封膜 2 h, 加入标记一抗 4℃ 孵育过夜, PBS 清洗 PVDF 膜后在加入标记二抗孵育 1 h。加 ECL 显影液进行显影。以 GAPDH 作为内参。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验

采用 miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) 网站预测 miR-433-3p 和 MAPK8 的靶向作用位点。构建野生型和突变型的 MAPK8 3' UTR 区域的重组质粒, 分别与 miR-433-3p 或 miR-NC 共转染至 H9c2 细胞。48 h 后严格按照双荧光素酶检测试剂盒检测细胞中荧光素酶的活性。

1.4 统计学方法

采用统计学分析软件 SPSS 18.0 分析实验结果。所有实验数据均采用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组之间比较采用 *t* 检验, 多组之间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 被认为差异显著, 具有统计学意义。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

名称 Name	序列(5'→3') Sequence
miR-433-3p	F:TCGGCAATCATGATGGGC
miR-433-3p	R:CTCAACTGCTGTCGTGG
U6	F:CTCGCTTCGGCAG
U6	R:AACGCTTCACGAATTTG
MAPK8	F:TCCCAGCTGACTCAGAGCAT
MAPK8	R:GCTTCATCTACGAGATCCTT
GAPDH	F:GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
GAPDH	R:TTGAGGTCAATGAAGGGTC

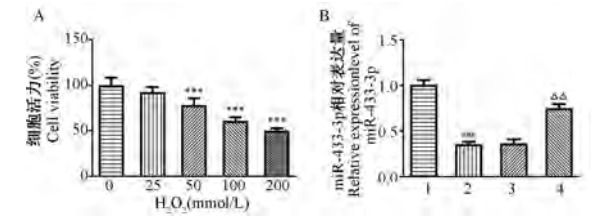
2 结果

2.1 miR-433-3p 在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达

采用 H₂O₂ 构建心肌细胞氧化应激损伤模型。0、25、50、100、200 μmol/L 的 H₂O₂ 处理 H9c2 细胞 48 h 后, MTT 检测结果显示, 相对比对照组, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, H9c2 细胞活力逐渐减少, 且有显著性差异 ($P<0.001$, 图 1A)。在 H₂O₂ 浓度为 200 μmol/L 时, 细胞活力下降为初始值的 50%。因此选择该浓度作为后续实验研究的 H₂O₂ 诱导剂量。接下来, 我们采用 qRT-PCR 法检测 miR-433-3p 在 H9c2 细胞中的 mRNA 表达水平, H₂O₂ 组 miR-433-3p 表达水平比对照组显著减少; 与 H₂O₂ + miR-NC 组相比, 转染了 miR-433-3p mimics 的细胞中 miR-433-3p 表达水平显著升高 ($P<0.01$, 图 1B)。表明 miR-433-3p 过表达质粒构建成功。

2.2 miR-433-3p 过表达减轻了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤

与对照组相比, H₂O₂ 组 H9c2 细胞中的 LDH 释放量显著升高; 与 H₂O₂ + miR-NC 组相比, H₂O₂ + miR-433-3p mimics 组 H9c2 细胞中的 LDH 释放量



注:A:MTT 检测不同剂量的 H₂O₂ 对 H9c2 细胞活力的影响;B:qRT-PCR 检测 H₂O₂ 处理下的 H9c2 细胞中 miR-433-3p 表达水平的变化。1:对照组;2:H₂O₂ 组;3:H₂O₂ + miR-NC 组;4:H₂O₂ + miR-433-3p mimics 组。与 0 μmol/L 组比, *** $P<0.001$; 与对照组比较, ### $P<0.001$; 与 H₂O₂ + miR-NC 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 1 miR-433-3p 在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达
Note. A, Cell viabilities of H9c2 cells exposed to different doses of H₂O₂ were determined with MTT assay. B, Level of miR-433-3p in H9c2 cells treated with H₂O₂ were detected by qRT-PCR. 1, Control group. 2, H₂O₂ group. 3, H₂O₂ + miR-NC group. 4, H₂O₂ + miR-433-3p mimics group. Compared with 0 μmol/L group, *** $P<0.001$. Compared with control group, ### $P<0.001$. Compared with H₂O₂ + miR-NC group, $\Delta\Delta P<0.01$.

Figure 1 Level of miR-433-3p was downregulated in H9c2 cardiomyocytes treated with H₂O₂

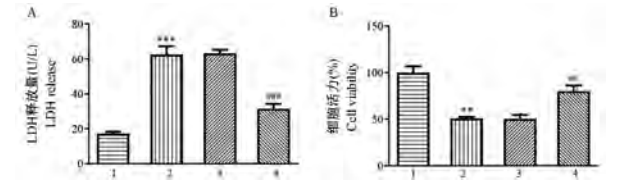
显著降低 (均 $P<0.001$, 图 2A)。与对照组相比, H₂O₂ 组的 H9c2 细胞活性显著降低; 与 H₂O₂ + miR-NC 组相比, H₂O₂ + miR-433-3p mimics 组的 H9c2 细胞活性显著升高 (均 $P<0.01$, 图 2B)。以上实验结果表明在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞中 miR-433-3p 过表达可以明显减轻细胞活性损伤。

2.3 miR-433-3p 过表达抑制了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡

与对照组相比, H₂O₂ 组 H9c2 细胞中促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 表达水平显著升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低; 与 H₂O₂ + miR-NC 组相比, H₂O₂ + miR-433-3p mimics 组 H9c2 细胞中 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$, 图 3)。以上实验结果表明 miR-433-3p 过表达抑制了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡。

2.4 miR-433-3p 负靶向调控 MAPK8 的表达

通过 miRDB 在线生物信息网站分析, miR-433-3p 可以与 MAPK8 的 3' UTR 相结合。双荧光素酶报告基因实验表明在 MAPK8 野生型表达的 H9c2 细胞中, 与 miR-NC 组相比, miR-433-3p mimics 组的



注:A:ELISA 检测 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导下的 H9c2 细胞内 LDH 释放量的影响;B:MTT 检测 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导下的 H9c2 细胞活性的影响。1:对照组;2:H₂O₂ 组;3:H₂O₂ + miR-NC 组;4:H₂O₂ + miR-433-3p mimics 组。与对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与 H₂O₂ + miR-NC 组比较, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

图 2 miR-433-3p 过表达减轻了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤

Note. A, Effect of miR-433-3p overexpression on the release of LDH in H9c2 cells treated with H₂O₂ was analyzed by ELISA assay. B, Effect of miR-433-3p overexpression on the viability of H9c2 cells treated with H₂O₂ was examined by MTT assay. 1, Control group. 2, H₂O₂ group. 3, H₂O₂ + miR-NC group. 4, H₂O₂ + miR-433-3p mimics group. Compared with control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with H₂O₂ + miR-NC group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 2 miR-433-3p overexpression attenuated H₂O₂-induced activity damage in H9c2 cardiomyocytes

荧光素酶活性显著下降($P<0.001$,图 4A)。与 miR-NC 组相比,miR-433-3p 过表达能显著抑制 MAPK8 的 mRNA 表达水平($P<0.001$,图 4B)。与 miR-NC 组相比,miR-433-3p 过表达能显著抑制 MAPK8 的蛋白表达水平($P<0.001$,图 4C)。

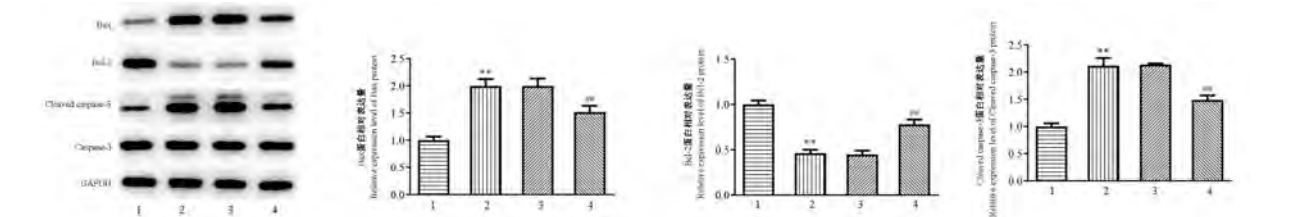
2.5 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤的保护作用

在 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞中过表达 MAPK8,与对照组相比,过表达 MAPK8 组中 MAPK8 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$,图 5A)。与 H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组相比,H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组中的 LDH 释放量显著升高($P<0.01$,图 5B)。与 H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-

NC 组相比,H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组中的细胞活性显著下降($P<0.01$,图 5C)。这些实验结果表明过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 损伤的保护作用。

2.6 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的抑制作用

与 H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组相比,H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组 H9c2 细胞中促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase3 的表达水平显著升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平显著降低($P<0.01$,图 6)。这些实验结果表明过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的抑制作用。

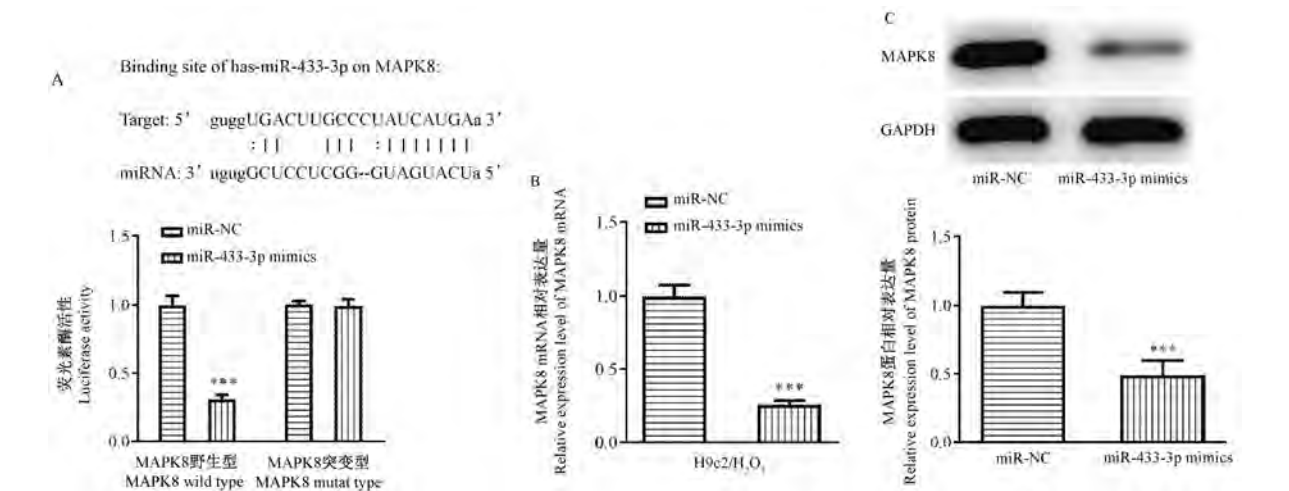


注:1:对照组;2:H₂O₂ 组;3:H₂O₂+miR-NC 组;4:H₂O₂+miR-433-3p mimics 组。与对照组比较,** $P<0.01$;与 H₂O₂+miR-NC 组比较,## $P<0.01$ 。

图 3 miR-433-3p 过表达抑制了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡

Note. 1, Control group. 2, H₂O₂ group. 3, H₂O₂+miR-NC group. 4, H₂O₂+miR-433-3p mimics group. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with H₂O₂+miR-NC group, ## $P<0.01$.

Figure 3 miR-433-3p overexpression inhibited the apoptosis of H9c2 cells treated with H₂O₂

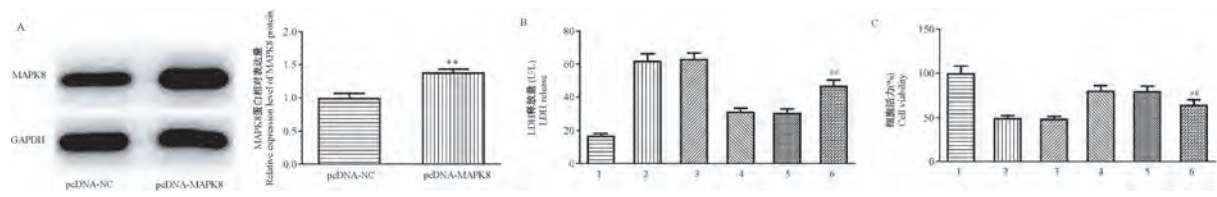


注:A:双荧光素酶报告基因检测 miR-433-3p 和 MAPK8 之间的关系;B:qRT-PCR 检测 miR-433-3p 过表达对 MAPK8 蛋白水平的影响;C:Western blot 检测 miR-433-3p 过表达对 MAPK8 mRNA 水平的影响。与 miR-NC 组比较,*** $P<0.001$ 。

图 4 miR-433-3p 负靶向调控 MAPK8 的表达

Note. A, Relationship between miR-433-3p and MAPK8 was detected by luciferase reporter assay. B, Effect of miR-433-3p overexpression on MAPK8 protein level was examined by qRT-PCR. C, Effect of miR-433-3p overexpression on MAPK8 mRNA level was observed by Western blot. Compared with miR-NC group, *** $P<0.001$.

Figure 4 Expression of MAPK8 was negatively regulated by miR-433-3p

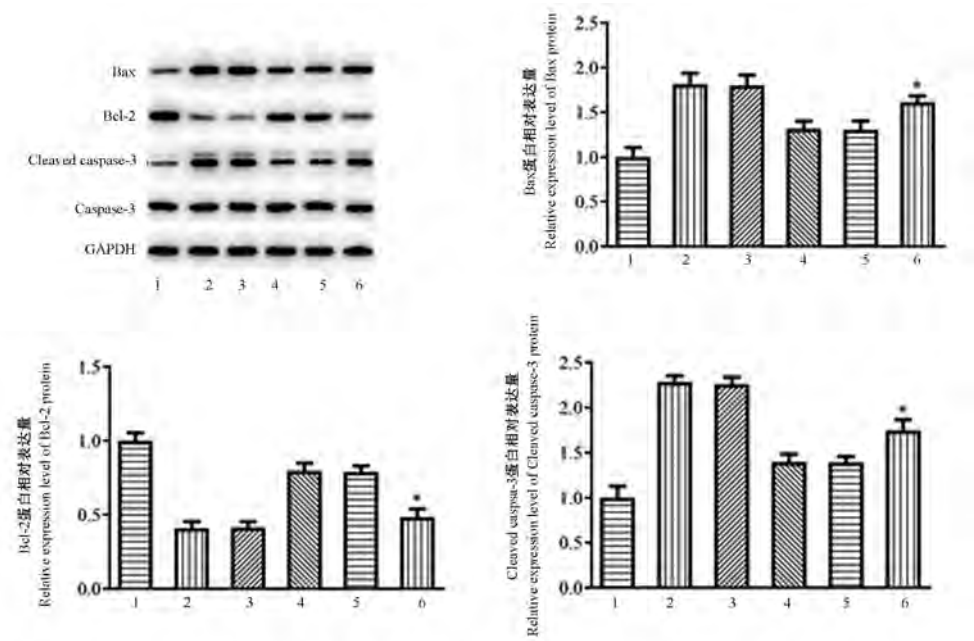


注:A:Western blot 检测 MAPK8 过表达质粒转染效率;B:ELISA 检测过表达 MAPK8 对 H₂O₂ 诱导下的 H9c2 细胞内 LDH 释放量的影响;C:MTT 检测过表达 MAPK8 对 H₂O₂ 诱导下的 H9c2 细胞活性的影响。1:对照组;2:H₂O₂ 组;3:H₂O₂+miR-NC 组;4:H₂O₂+miR-433-3p mimics 组;5:H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组;6:H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组。与 pcDNA-NC 组比较, ** $P < 0.01$;与 H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤的保护作用

Note. A, Transfection efficiency of MAPK8 overexpression plasmid was detected by western blot analysis. B, Effect of overexpression of MAPK8 on the release of LDH in H9c2 cells treated with H₂O₂ was analyzed by ELISA assay. C, Effect of overexpression of MAPK8 on the viability of H9c2 cells treated with H₂O₂ was examined by MTT assay. 1, Control group. 2, H₂O₂ group. 3, H₂O₂+miR-NC group. 4, H₂O₂+miR-433-3p mimics group. 5, H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC group. 6, H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 group. Compared with pcDNA-NC group, ** $P < 0.01$. Compared with H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Overexpression of MAPK8 reversed the protective effect of miR-433-3p overexpression on the activity damage of H9c2 cells treated with H₂O₂



注:1:对照组;2:H₂O₂ 组;3:H₂O₂+miR-NC 组;4:H₂O₂+miR-433-3p mimics 组;5:H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组;6:H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组。与 H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 6 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的抑制作用

Note. 1, Control group. 2, H₂O₂ group. 3, H₂O₂+miR-NC group. 4, H₂O₂+miR-433-3p mimics group. 5, H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC group. 6, H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 group. Compared with H₂O₂+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Overexpression of MAPK8 reversed the protective effect of miR-433-3p overexpression on apoptosis of H9c2 cells treated with H₂O₂

3 讨论

研究表明 H_2O_2 诱导的多个基因的表达变化与心肌细胞损伤密切相关^[14-16]。但 H_2O_2 诱导心肌细胞损伤过程中的基因调控目前还尚不清楚。MicroRNA 是一种内源性的小编码 RNA, 可以通过与靶基因的 3' UTR 相结合, 在转录后调节靶基因的表达进而导致翻译抑制或靶基因的降解^[17-18]。心血管系统疾病是人类发病率和死亡率的主要原因且预后较差, 目前由于心肌损伤诊断仅局限在常规心电图、血清特异性敏感因子(如心肌酶、心肌肌钙蛋白等)等有限手段, 因此发现新的心肌损伤生物标志物和治疗手段显得尤为重要。一些研究表明, miRNAs 不仅在心血管发育中发挥重要作用, 而且在心脏肥厚、心力衰竭、缺血性心脏病等心血管疾病中也发挥重要作用^[19-22]。MiR-433-3p 通常作为抑癌基因在人类肿瘤的发生和发展中发挥着不同功能^[12, 23-24]。据报道, miR-433-3p 在胃癌^[25]、非酒精性脂肪肝炎患者内脏脂肪组织^[26]和乙型肝炎病毒相关肝细胞癌中表达下调^[27]。此外, miR-433 能够负靶向调节宫颈癌 HeLa 细胞中负责 5-氟尿嘧啶敏感性的胸苷酸合成酶^[28]。在心肌中 miR-433-3p 通过靶向调节 MAPK8 从而影响心肌纤维化的过程^[13]。然而, miR-433-3p 在心血管疾病中的研究尚未有过相关报道。在本研究中, 我们发现在 H_2O_2 处理心肌细胞 24 h 后, 细胞活性呈剂量依赖性的下降。且相比较对照组, miR-433-3p 的表达水平在 H_2O_2 处理的心肌细胞 H9c2 中显著下降。预示了 miR-433-3p 可能参与 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤过程。但 miR-433-3p 在 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤中的具体作用和机制还有待研究。

心肌缺血后, 心肌细胞膜外出现大量损伤标志物的外漏。其中乳酸脱氢酶 (LDH) 被认为是最能反映出心肌损伤程度的重要分子, 通过 LDH 水平的检测可以有效反映出心肌损伤的程度^[29]。此外, 由于 H_2O_2 被广泛用于诱导不同细胞类型的凋亡反应, 而心肌细胞 H9c2 也常被用于研究心肌细胞凋亡^[30]。也有相关研究显示氧化应激和细胞凋亡与心血管疾病密切相关。例如, miR-1 会影响 H9c2 心肌细胞的抗氧化应激和抗凋亡能力^[31]。因此我们继续探讨了 miR-433-3p 对 H_2O_2 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的作用。在本研究中, 我们发现 H_2O_2 能显著增强 H9c2 细胞中的 LDH 的水平, 并诱导促凋

亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 表达水平的升高和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平的下降进而促进细胞凋亡。而 miR-433-3p 过表达可以抑制由 H_2O_2 诱导的 LDH 水平上升和细胞凋亡, 有效改善心肌细胞 H9c2 的损伤。

有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8) 是一类在多种细胞中扮演着重要调控作用的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。它在影响细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、细胞死亡和炎症等病理过程中发挥着重要的生物学作用^[32-33]。在心肌损伤中, miR-190 可以通过调节 MAPK8/ERK 信号通路保护心肌细胞 H9c2 免受 H_2O_2 诱导的凋亡^[34]。此外, miR-433-3p 可以通过靶向调节 MAPK8 影响心肌纤维化的进程^[13]。因此, 我们推测 miR-433-3p 可能通过靶向 MAPK8 影响心肌细胞的损伤和凋亡。在本研究, 我们发现 miR-433-3p 可以负靶向调控 MAPK8。过表达 MAPK8 可以逆转 miR-433-3p 过表达对 H_2O_2 诱导的心肌细胞活性损伤和凋亡的保护作用。总之, 在 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞活性损伤和凋亡中 miR-433-3p 可以通过靶向调控 MAPK8 发挥保护作用。

综上所述, miR-433-3p 在 H_2O_2 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达, 并能通过直接靶向 MAPK8 减轻由 H_2O_2 诱导的氧化应激和细胞凋亡。这一研究成果将有助于阐明治疗缺血性心肌损伤的信靶点。

参考文献:

- [1] Poole-Wilson P. The prevention of cardiovascular disease worldwide: whose task and WHO's task? [J]. Clin Med (Lond), 2005, 5(4): 379-384.
- [2] Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling [J]. Pharmacol Ther, 2009, 123(2): 255-278.
- [3] Qiu H, Liu JY, Wei D, et al. Cardiac-generated prostanoids mediate cardiac myocyte apoptosis after myocardial ischaemia [J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(3): 336-345.
- [4] Katz AM, Messineo FC. Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium [J]. Circ Res, 1981, 48(1): 1-16.
- [5] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.
- [6] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. Nature, 2010, 466(7308): 835-840.
- [7] Baek D, Villén J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output [J]. Nature, 2008, 455(7209): 64-71.

- [8] Chen C, Ponnusamy M, Liu C, et al. MicroRNA as a therapeutic target in cardiac remodeling [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 1278436.
- [9] Chen XP, Chen YG, Lan JY, et al. MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG [J]. Cancer Lett, 2014, 353(2): 201–210.
- [10] Feng Y, Sun T, Yu Y, et al. MicroRNA-370 inhibits the proliferation, invasion and EMT of gastric cancer cells by directly targeting PAQR4 [J]. J Pharmacol Sci, 2018, 138(2): 96–106.
- [11] Xue J, Chen LZ, Li ZZ, et al. MicroRNA-433 inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting p21 activated kinase (PAK4) [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 399(1–2): 77–86.
- [12] Hu H, Jie HY, Zheng XX. Three circulating LncRNA predict early progress of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(1–2): 117–125.
- [13] Tao L, Bei Y, Chen P, et al. Crucial role of miR-433 in regulating cardiac fibrosis [J]. Theranostics, 2016, 6(12): 2068–2083.
- [14] Seddon M, Looi YH, Shah A M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Heart, 2007, 93(8): 903–907.
- [15] Berg K, Jynge P, Bjerve K, et al. Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction [J]. Free Radic Res, 2005, 39(6): 629–636.
- [16] Takano H, Zou Y, Hasegawa H, et al. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases [J]. Antioxid Redox Signal, 2003, 5(6): 789–794.
- [17] De Ronde MW, Ruijter JM, Moerland PD, et al. Study design and qPCR data analysis guidelines for reliable circulating miRNA biomarker experiments: a review [J]. Clin Chem, 2018, 64(9): 1308–1318.
- [18] Raitoharju E, Oksala N, Lehtimäki T. MicroRNAs in the atherosclerotic plaque [J]. Clin Chem, 2013, 59(12): 1708–1721.
- [19] Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy [J]. Nat Med, 2007, 13(5): 613–618.
- [20] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart; do they play a role in cardiac hypertrophy? [J]. Am J Pathol, 2007, 170(6): 1831–1840.
- [21] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy [J]. Circ Res, 2007, 100(3): 416–424.
- [22] Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(48): 18255–18260.
- [23] Tang X, Lin J, Wang G, et al. MicroRNA-433–3p promotes osteoblast differentiation through targeting DKK1 expression [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179860.
- [24] Shi Q, Wang Y, Mu Y, et al. miR-433-3p inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting GRB2 [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(5): 2187–2196.
- [25] Luo H, Zhang H, Zhang Z, et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28(1): 82.
- [26] Estep M, Armistead D, Hossain N, et al. Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non - alcoholic fatty liver disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 32(3): 487–497.
- [27] Wang W, Zhao LJ, Tan YX, et al. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(38): 5442–5453.
- [28] Gotanda K, Hirota T, Matsumoto N, et al. MicroRNA-433 negatively regulates the expression of thymidylate synthase (TYMS) responsible for 5-fluorouracil sensitivity in HeLa cells [J]. BMC cancer, 2013, 13(1): 369.
- [29] 陈坚, 丁振华, 刘坚. 艾拉莫德联合甲氨蝶呤对类风湿性关节炎患者血清炎症因子及骨代谢的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(7): 552–555.
- [30] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 过氧化氢通过线粒体通路和死亡受体通路诱导心肌细胞凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(3): 185–188.
- [31] Chen T, Ding G, Jin Z, et al. Insulin ameliorates miR-1-induced injury in H9c2 cells under oxidative stress via Akt activation [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 369(1–2): 167–174.
- [32] Tiwari N, Meyer-Schaller N, Arnold P, et al. Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk8) [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57329.
- [33] He W, Wang Q, Xu J, et al. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation [J]. Autophagy, 2012, 8(12): 1811–1821.
- [34] Zhai CL, Tang GM, Qian G, et al. miR-190 protects cardiomyocytes from apoptosis induced by H₂O₂ through targeting MAPK8 and regulating MAPK8/ERK signal pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(4): 2183–2192.

李清禹,杨浩然,贾伟伟,等. 不同剂量异丙肾上腺素致大鼠急性心肌损伤模型的制备及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 71-75,114.

Li QY, Yang HR, Jia WW, et al. Preparation and evaluation of an acute myocardial injury model induced by different doses of isoproterenol in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 71-75,114.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 010

不同剂量异丙肾上腺素致大鼠急性心肌损伤模型的制备及评价

李清禹¹,杨浩然¹,贾伟伟¹,任 珊¹,张宇航¹,帅智峰²,林 岩^{1*}

(1.齐齐哈尔医学院基础医学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2.齐齐哈尔医学院病理学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的 研究不同剂量异丙肾上腺素对大鼠心功能和病理形态损伤的影响。**方法** SD 大鼠随机分为四组,即 Control 组,低剂量模型组(25 mg/kg),中剂量模型组(50 mg/kg),高剂量模型组(100 mg/kg)。模型组颈部多点皮下注射不同剂量异丙肾上腺素连续 2 d,Control 组注射等量生理盐水。最后一次给药 24 h 后描计心电图(ECG)检测 QRS 间期,P 波时程与波幅;TTC 染色检测心肌梗死面积,HE 染色观察心肌组织病理形态。**结果** 与正常对照组比较,不同剂量模型组大鼠心重及左室重均明显升高($P < 0.01$);ECG 显示,高剂量模型组 P 波时程增加($P < 0.01$),低剂量模型组与高剂量模型组 P 波波幅增加($P < 0.05, P < 0.01$),同时有心律不齐的心电图表现。TTC 染色和 HE 染色均有心肌损伤的病理改变。**结论** 模型组大鼠心肌组织均有不同程度损伤,高剂量模型组心肌损伤最严重,为缺血/梗死类心脏疾病的动物模型制备和相关机制研究提供依据。

【关键词】 心肌缺血;异丙肾上腺素;心电图;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0071-05

Preparation and evaluation of an acute myocardial injury model induced by different doses of isoproterenol in rats

LI Qingyu¹, YANG Haoran¹, JIA Weiwei¹, REN Shan¹, ZHANG Yuhang¹, SHUAI Zhifeng², LIN Yan^{1*}

(1. Qiqihar Medical University of Basic Medicine, Qiqihar 161006, China.

2. Qiqihar Medical University of Pathology, Qiqihar 161006)

【Abstract】 Objective To study the effects of different doses of isoproterenol (ISO) on cardiac function and pathological morphology in rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into Control, low-dose model (ISO 25 mg/kg), medium-dose model (ISO 50 mg/kg), and high-dose model (ISO 100 mg/kg) groups. In the model group, different doses of ISO were injected subcutaneously at multiple points in the neck for two consecutive days whereas the Control group received the same volume of saline. Changes in heart rate, QRS interval, duration and amplitude of P-waves were detected by electrocardiogram (ECG). The myocardial infarct size was detected by TTC staining and the pathological morphology of myocardial tissues was observed by HE staining 24 hours after the last administration. **Results** Compared with the Control group, the heart and left ventricular weights of rats in different dose model groups were significantly increased ($P < 0.01$) and the ECG of rats showed that the P-wave duration in the high-dose model group was increased

[基金项目] 黑龙江省 2019 年大学生创新创业训练计划项目(201911230004);黑龙江省 2020 年大学生创新创业训练计划项目(202011230017)。

[作者简介] 李清禹(1999—),男,主要从事临床医学研究。E-mail:540643953@qq.com

[通信作者] 林岩(1975—),女,教授,硕士生导师,主要从事心血管疾病预防发病机制研究。E-mail:863838107@qq.com

($P < 0.01$), the P-wave amplitude in the low-dose and high-dose model groups was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively) and arrhythmia was present. TTC staining and HE staining showed pathological changes related to myocardial injury. **Conclusions** Different degrees of damage were observed in myocardial tissues of the model groups and the most serious myocardial injury was observed in the high-dose model group. This study provides a basis for animal model development and research of the mechanisms of ischemic/infarct heart disease.

【Keywords】 myocardial ischemia; isoproterenol; electrocardiogram; rats

随着全球人口老龄化的加剧,心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)已成为严重的公共卫生问题^[1-2],迫切需要进一步的基础和临床研究以应对 CVD 的严峻挑战。CVD 的发生常伴有心肌缺血性损伤,成功制备心肌缺血损伤动物模型是研究心肌梗死类疾病病理机制和药物治疗的重要环节。因此,建立与人的心肌缺血症状接近的动物模型尤为重要。常用的模型制备方法有手术法、药物诱导法等^[3]。手术法的操作较为复杂,大鼠的个体差异和术者的水平参差不齐等因素往往导致大鼠存活率及造模成功率下降^[4-5]。药物诱导法对大鼠的损伤较小,具有实验周期短、对实验人员的要求较低等优势。异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)可激动心脏 β_1 受体使心肌产生正性作用,导致血管强烈舒张引起舒张压明显下降,进而导致冠状动脉灌注不足,使大鼠持续产生心功能障碍和左心室扩张,ISO 心肌缺血模型是诱导心肌损伤的一种简单、无创、经济、快速的模型^[6]。国内外通常使用中等剂量 ISO 10 ~ 120 mg/kg 连续两次或多次皮下注射方式和高剂量 ISO 150 ~ 400 mg/kg 以单次剂量或连续两次施用的方式制备急性心肌损伤模型,高剂量 ISO 制备模型的实验动物死亡率较高^[7]。另外,有研究表明短时间内通过皮下和腹腔注射 ISO 所引起的心肌损伤差异不大^[8]。所以本实验采用皮下注射的方式给予大鼠中等剂量的 ISO 制备急性心肌损伤模型。通过评价不同剂量 ISO 对大鼠左室功能的影响,以建立简单易行的大鼠急性心肌损伤模型,为研究人员选择合适的造模方法提供参考和借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠共 32 只,雄性,8~10 周龄,体重 230~250 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[SCXK(辽)2015-0001],实验环境为齐齐哈尔医学院动物实验中心屏障环境动物实验室[SYXK(黑)2016-001]。实验设计经齐齐哈尔医学院医学实验动物伦理委员会评审通过(QMU-AECC-2019-53),

按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

ISO(美国 sigma 公司 WXBC3929V);氯化钠注射液(河北天成药业 C17010901);TTC 试剂盒(北京蓝博斯特生物 CT29142210)。泰盟 BL-420S 生物信号采集与分析系统、抗干扰鼠台(成都泰盟);转轮式切片机(Leica Biosystems);组织研磨刀(德国 IKA)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与模型建立

将大鼠随机分为 4 组,每组 8 只:正常对照组、高剂量模型组、中剂量模型组、低剂量模型组。采用颈部皮下多点注射 ISO 的方法复制心肌损伤动物模型,高、中、低剂量模型组皮下注射 ISO 剂量分别为 100 mg/kg, 50 mg/kg 和 25 mg/kg,每天 1 次,连续 2 d,最后一次给药 24 h 后麻醉大鼠做心电图检测,Control 组给予等量的生理盐水。

1.3.2 各组大鼠心电图检测

大鼠麻醉后固定于抗干扰鼠台,将三个针形电极扎入大鼠皮下右上肢,右下肢,左下肢相应位置,连接泰盟 BL-420S 生物信号采集系统,选择对应通道,输入信号为心电图,待波形稳定后连续描记大鼠 II 导联心电图 2 min^[9]。

1.3.3 各组大鼠 TTC 染测量心肌梗死面积

大鼠麻醉后,开胸取出心脏,剪下右心室,将左心室心肌横切切成 2~3 mm 薄片,置于 1% TTC 磷酸缓冲液中染色,37℃ 恒温水浴 5~10 min,取出放入 10% 甲醛溶液中固定,正常心肌组织染呈红色,梗死区呈白色^[10]。

1.3.4 苏木精-伊红(HE)染色观察心肌组织病理学形态

参照文献方法^[11]操作,取大鼠心肌组织置于 4% 多聚甲醛中保存,常规制备石蜡组织切片,苏木精-伊红染色后,固定封片,光学显微镜观察各组大鼠心肌组织病理变化。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 15.0 软件进行统计与分析。计量资

料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析用于比较组间差距。 $P<0.05$ 差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、心重和左室重比较

不同剂量模型组与正常对照组比较,大鼠心重及左室重均明显升高,差异均由统计学意义($P<0.01$),见表 1。

2.2 各组大鼠心电图(ECG)结果比较

分别测定实验开始前和最后一次给药 24 h 后大鼠Ⅱ导联心电图,每只动物测定十个心电周期,手动测量 ECG 各参数。结果见下表 2,图 1。检测结果表明,大鼠个体间心电图结果差异较大,与 Control 组相比,高剂量模型组的 P 波时程增加($P<0.01$),低剂量模型组与高剂量模型组 P 波波幅增加($P<0.05,P<0.01$),同时大鼠出现了心律不齐的心电图表现。

2.3 各组大鼠心肌组织氯化三苯基四氮唑(TTC)染色结果比较

TTC 染色后存活心肌被染为红色,梗死区因不着色而呈现白色。染色结果显示高剂量模型组与对照组相比白色区面积明显增大,中剂量模型组和低剂量模型组白色区面积相对较小,以上结果表明各模型组大鼠心肌均有不同程度损伤,其中高剂量模型组损伤最为严重,结果见图 2。

2.4 各组大鼠心肌组织 HE 染色比较

HE 染色显示,对照组大鼠心肌组织结构清晰,横纹排列整齐,细胞核卵圆居中。不同剂量模型组心肌组织出现病理性色素沉着,部分细胞核出现固缩、溶解、碎裂;出现炎症反应带,炎症细胞浸润,以心肌内膜面尤为严重;中剂量模型组与高剂量模型组部分出现坏死,见图 3。

3 讨论

心肌损伤、缺血梗死是临床多种心血管疾病的主要病因,成功制备心肌损伤动物模型是研究心肌梗死类疾病病理机制和药物治疗的重要环节。ISO 可引起舒张压明显下降,冠脉灌注压下降,心肌细胞缺血缺氧,通过氧化应激, Ca^{2+} 超载,细胞自噬与凋亡等多种因素造成心肌细胞损伤^[12]。心肌缺血、压力负荷过重或交感神经过度兴奋等多种原因均导致心肌损伤,从而引起心肌结构和功能的异常,最终导致心室收缩功能或舒张功能发生障碍^[13]。超声心动图、核磁共振、左心室插管以及心脏称重等均可用于大鼠心脏功能的测定,心电图是临床检查中诊断心率失常、心肌受损的重要方法之一,因此通过无创性的心电图检测评价大鼠心脏损伤具备一定的协助诊断价值^[14]。

本实验结果表明,大鼠麻醉状态下心电图和人体心电图有相似之处,有明显的 P 波和 QRS 波群,但大鼠心率比较快,心室波形没有明显的 ST 段。

表 1 不同剂量异丙肾上腺素对大鼠体重、心重和左室重的影响($n=8$)
Table 1 Effect of different dose of ISO on the body weight, heart weight and left ventricle weight in rats

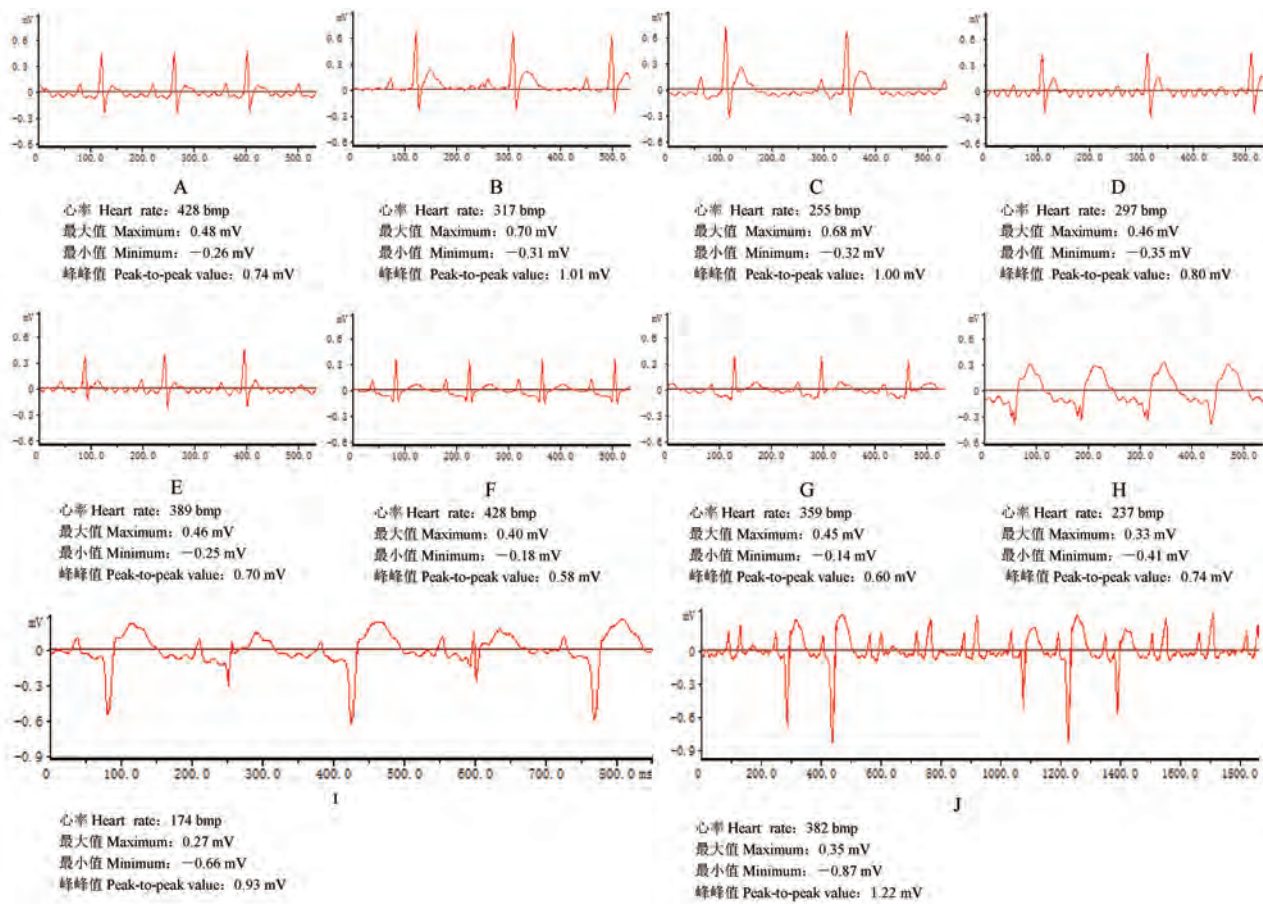
分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	体重 (g) Body weight	心脏重量 (g) Heart weight	左心室重量 (g) Left ventricle weight
对照组 Control group	0	218.25±19.01	0.63±0.07	0.44±0.33
低剂量组 Model-L group	25	213.83±14.34	0.81±0.08**	0.57±0.06**
中剂量组 Model-M group	50	225.13±10.37	0.81±0.05**	0.54±0.05**
高剂量组 Model-H group	100	211.71±15.30	0.83±0.06**	0.57±0.06**

注:与空白组相比,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$.

表 2 不同剂量异丙肾上腺素对大鼠心电图的影响($n=8$)
Table 2 Effect of different dose of ISO on ECG in rats

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	心率 (bpm) Heart rate	P 波时限 (ms) Duration of P wave	P 波振幅 (mV) Amplitude of P wave	QRS 间期 (ms) QRS Interval
对照组 Control group	0	304.12±13.51	15.04±1.69	0.08±0.02	22.97±2.56
低剂量组 Model-L group	25	336.94±15.48	15.40±1.69	0.15±0.04**	19.25±2.98
中剂量组 Model-M group	50	351.76±20.62*	16.48±1.84	0.10±0.02	26.62±5.54
高剂量组 Model-H group	100	352.07±18.73*	18.63±1.21**	0.13±0.01*	25.23±1.64

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

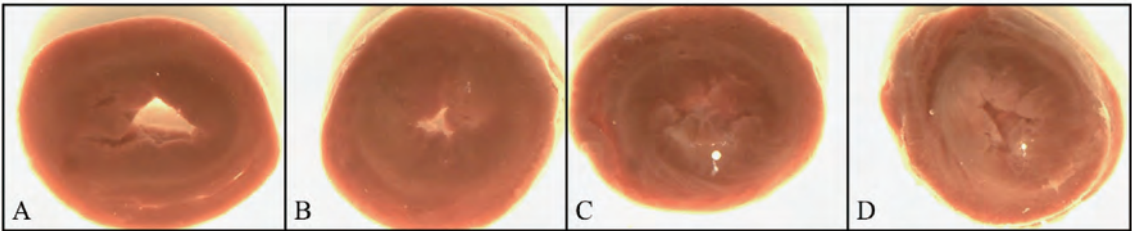


注:A:对照组建模前;B:低剂量组建模前;C:中剂量组建模前;D:高剂量组建模前;E:空白组建模后;F:低剂量组建模后;G:中剂量组建模后;H:高剂量组建模后;I:低剂量组心律失常;J:高剂量组心律失常。

图 1 不同剂量异丙肾上腺素作用前后大鼠心电图

Note. A, Control before modeling. B, Model-L before modeling. C, Model- M group before modeling. D, Model-H before modeling. E, Control after modeling. F, Model-L after modeling. G, Model-M after modeling. H, Model-H after modeling. I, Model-L, arrhythmia. J, Model-H, arrhythmia.

Figure 1 Electrocardiogram of rats before and after the action of different dose of isoproterenol



注:A:对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组。

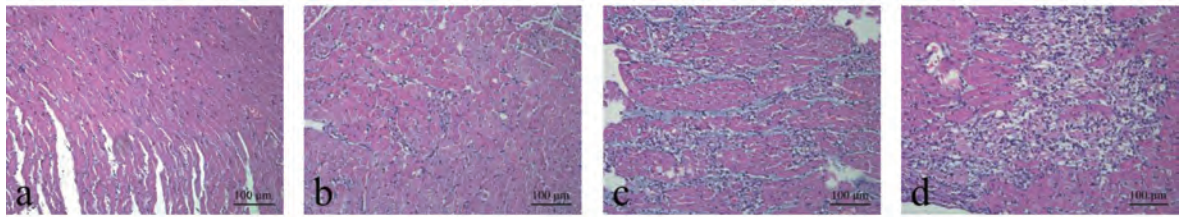
图 2 不同剂量异丙肾上腺素作用大鼠心肌组织 TTC 染色

Note. A, Control group. B, Model-L group. C, Model-M group. D, Model-H group.

Figure 2 TTC staining of ventricular tissue of rats treated by different dose of isoproterenol

与正常对照组比较,不同剂量模型组大鼠心重及左室重均明显升高,实验开始前各组大鼠心电图均正常,与 Control 组相比,高剂量模型组的 P 波时程增加,低剂量模型组与高剂量模型组 P 波波幅增加,同时大鼠出现了心律不齐的心电图表现。P 波振幅

增加表明右房扩大,P 波时程增加表明左房扩大,两者同时增加表明双房扩大,同时结合心重和左室重测量结果,表明大鼠处于代偿性心脏肥大。TTC 是一种脂溶性光敏感复合物,常用作染色剂检测哺乳动物组织的缺血梗塞,它与组织中脱氢酶反应产生



注:a;对照组;b:低剂量组;c:中剂量组;d:高剂量组

图3 不同剂量异丙肾上腺素作用大鼠心肌组织 HE 染色

Note. a, Control group. b, Model-L group. c, Model-M group. d, Model-H group.

Figure 3 HE staining of ventricular tissue of rats treated by different dose of isoproterenol

红色的脂溶性物质,但梗死组织中脱氢酶活性下降不能与其反应,故不被染色呈苍白色^[15]。TTC 染色结合 HE 染色结果发现,中剂量和高剂量模型组心肌细胞损伤严重,出现心肌细胞坏死,炎细胞浸润及心肌梗死等损伤性表现。上述研究结果表明实验中高剂量、中剂量和低剂量模型大鼠心肌均有不同程度损伤,高剂量模型组心肌损伤最严重。

目前国内外有多种方法用来制备急性心肌损伤模型,例如低温冷冻法、冠脉微栓塞法、药物诱导法(ISO、阿霉素),最常用的便是外科手术结扎法^[16]。以往的研究报道,外科手术结扎法的实验动物死亡率可达 30%~40%,并且在麻醉、气管插管、开胸体位、冠脉结扎位置及术后护理等各个环节的操作均影响造模的成功率^[17]。冷冻法的操作相对简单,死亡率相对较低,模型复制的稳定性较高,但心肌梗死位置更集中在心外膜,不能很好的模拟临床上患者的发病机制^[18]。冠脉微栓塞法虽不进行外科手术,但以往只应用于大型实验动物心肌损伤的制备,大鼠等小型实验动物应用较少,实验难度大,对研究人员的要求较高^[19]。阿霉素诱导的大鼠心肌损伤模型在给药剂量、给药方式和给药时间上国内外尚未统一,若腹腔注射药物,则大鼠胃肠道症状明显,生存率较低^[20-21]。本实验使用 ISO 皮下注射法避免了气管插管和冠脉结扎等手术操作对大鼠造成的创伤和感染,实验周期短。实验人员仅需掌握相关的基础操作和控制药物的剂量便可复制大鼠急性心肌损伤模型。有较高的实用性、可靠性和较低的实验动物死亡率,造模成功率高^[22]。不足在于不能人为控制大鼠心肌损伤部位,不能满足一些需要精确定位实验的造模需求。另外本实验局限性是没有评估大鼠超声心动图、血流动力学和生化参数的改变,期望相关的实验人员能够进行进一步的研究。ISO 诱导的大鼠急性心肌损伤模型不仅简单且效果可靠,希望此模型能为后续关于缺

血/梗死类心脏疾病的相关机制研究提供依据和指导。

参考文献:

[1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2018 概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.

[2] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2020, 141(9): e139-e596.

[3] Rai V, Sharma P, Agrawal S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 424(1-2): 123-145.

[4] 曹珏,李贻奎,陈孟倩,等. 大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 96-100.

[5] De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion [J]. Dis Model Mech, 2020, 13(11): dmm046565.

[6] Shukla SK, Sharma SB, Singh UR. β -Adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of rats [J]. Indian J Clin Biochem, 2015, 30(1): 27-34.

[7] 梁娟,刘越,尹新华. 异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 110-114.

[8] George JC, Liner A, Hoit BD. Isoproterenol-induced myocardial injury: a systematic comparison of subcutaneous versus intraperitoneal delivery in a rat model [J]. Echocardiography, 2010, 27(6): 716-721.

[9] 曹海涛,王晨阳,华川,等. 压力负荷型慢性心衰大鼠的心电图特征 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 61-63, 75.

[10] 杨涛涛,肖颖,奚赛飞,等. 大鼠心肌梗死模型构建和评价方法的改良 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(2): 46-51, 4.

[11] Katare PB, Bagul PK, Dinda AK, et al. Toll-Like receptor 4 inhibition improves oxidative stress and mitochondrial health in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. Front Immunol, 2017, 22(8): 719.

赵苗鑫,胡相卡,董苏敏,等. 红花黄色素对糖尿病肾病小鼠肾的保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 76-81.

Zhao MX, Hu XK, Dong SM, et al. Characterization of the protective effect of safflower yellow on the kidney in diabetic mice and the mechanisms involved [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 76-81.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 011

红花黄色素对糖尿病肾病小鼠肾的保护作用及机制研究

赵苗鑫,胡相卡,董苏敏,马悦,刘晓娟,杨鹤,代春美*

(锦州医科大学,辽宁 锦州 121000)

【摘要】 目的 探讨红花黄色素(safflower yellow, SY)对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)小鼠的肾保护作用及作用机制。**方法** 采用C57BL/6J雄性小鼠,经腹腔注射STZ(50 mg/kg),连续5 d建立糖尿病小鼠模型。36只造模成功的小鼠随机分为模型组、SY低中高剂量组(10 mg/kg、30 mg/kg、90 mg/kg)。给药组小鼠分别给予不同剂量的SY,每日1次,连续给药10周。监测糖尿病小鼠的体重、血糖,分析血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平,HE染色观察肾组织病理形态变化,Western检测PKC、P-Raf、Raf、P-ERK、ERK蛋白的表达水平,ELISA试剂盒检测MDA、SOD、GSH的含量和TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组的小鼠进食、饮水量增加、体态消瘦、血糖升高。与模型组相比,给药组小鼠的体重上升、血糖下降、BUN、Scr的水平降低;肾小球肥大、基底膜增厚和肾小管空泡样病变得到改善;SOD、GSH含量上升,MDA含量下降;TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达下降;PKC、P-Raf、P-ERK蛋白的表达减少。**结论** 红花黄色素可以减弱DN炎症损伤和氧化应激损伤,其机制可能与调控PKC/Ras-Raf-MEK-ERK通路有关。

【关键词】 糖尿病肾病;红花黄色素;链脲佐菌素;PKC/Ras-Raf-MEK-ERK信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0076-06

Characterization of the protective effect of safflower yellow on the kidney in diabetic mice and the mechanisms involved

ZHAO Miaoxin, HU Xiangka, DONG Sumin, MA Yue, LIU Xiaojuan, YANG He, DAI Chunmei*
(Jinzhou Medical University, Jingzhou 121000, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effect of safflower yellow (SY) in mice with diabetic nephropathy (DN) induced by streptozotocin (STZ). **Methods** DN was induced by the intraperitoneal injection of STZ (50 mg/kg) for 5 consecutive days. Thirty-six male C57 BL/6J mice with DN were randomly allocated to a model group, and SY-10 mg/kg, SY-30 mg/kg, and SY-90 mg/kg groups. The three experimental groups were administered SY once daily for 10 weeks. Their blood glucose and body mass were monitored, and blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were analyzed. Renal pathology was assessed using hematoxylin and eosin-stained sections. The protein expression levels of PKC,

【基金项目】 辽宁省高等学校创新人才项目(LR2019028)。

【作者简介】 赵苗鑫,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学研究。E-mail:1269079148@qq.com

【通信作者】 代春美,女,博士,教授,研究方向:中药药理学及安全性评价研究。E-mail:springdaidai@163.com

P-Raf, Raf, P-ERK, ERK were measured using Western blot analysis. The contents of GSH, MDA, and SOD, and the expression levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were measured using ELISA kits. **Results** Compared with a control group, the food and water consumption and blood glucose concentration were higher, and the body mass was lower in the model group. The body mass, blood glucose, BUN, and Scr were higher in all the treatment groups, but the glomerular hypertrophy, basement membrane thickening, and vacuolar degeneration of renal tubules were ameliorated. The contents of SOD and GSH were higher, whereas that of MDA was lower, and the expression levels of proinflammatory factors were lower in the treatment groups. Finally, the protein expression of PKC, P-Raf, and P-ERK was lower in the SY-30 and SY-90 groups. **Conclusions** SY may ameliorate inflammation and oxidative stress in DN, which might be mediated via the PKC/Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway.

[Keywords] diabetic nephropathy; safflower yellow; streptozotocin; PKC/Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病人群中最常见的并发症之一^[1-2], 约占糖尿病患者的 40%, 也是糖尿病患者终末期肾病的主要因素^[3], 具有动脉粥样硬化的风险^[4]。目前普遍认为, 控制血压和血糖是预防糖尿病肾病进展的有效手段, 但是效果不理想, 尚未降低 DN 进展的风险^[5]。由于 DN 发病率高, 对人们的生活造成了严重的影响, 目前尚无有效的治疗举措, 所以探索 DN 的发病机制, 去寻找一种有效的治疗药物已经成为现在研究的热点问题。

红花黄色素 (Safflower Yellow, SY) 是从中药红花中提取的一种查尔酮类化合物^[6], 是红花中主要的有效物质^[7]。SY 不仅是中国允许使用的食用色素, 而且具有抗氧化、抗炎、扩张冠状动脉血管、免疫抑制、改善微循环、清除氧自由基等作用^[8]。在临床高血压、高血脂、冠心病、糖尿病及并发症等多种疾病中都有应用^[9]。

本研究将探讨 SY 对糖尿病肾病小鼠肾损伤是否具有保护作用及潜在机制, 从而为 SY 治疗 DN 的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只, SPF 级, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购于辽宁长生生物科技有限公司 [SCXK(辽)2020-0001]。动物实验的喂养及组织取材于锦州医科大学心脑血管重点实验室的设施内进行 [SYXK(辽)2019-0007], 已取得锦州医科大学动物伦理委员会的批准 (IACUC-2019019), 实验过程符合动物福利及相关法规、标准、指南要求, 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

红花黄色素 (批号: 36338-96-2) 购自上海广锐

公司, 纯度>95%; 链脲佐菌素 (STZ) 于美国 Sigma-Aldrich 公司购买 (批号: S0130); SOD 试剂盒 (批号: E2011)、MDA 试剂盒 (批号: E2019) 购于北京普利莱; GSH-PX 试剂盒 (批号: S0052) 购自碧云天; IL-1 β 试剂盒 (批号: RK00006)、IL-6 试剂盒 (批号: RK00008)、TNF- α 试剂盒 (批号: RK00027) 购自 AB-Clonal Technology 公司; PKC- β 抗体 (批号: A13628)、Raf 抗体 (批号: A19638)、P-Raf 抗体 (批号: AP0498)、ERK 抗体 (批号: A16686)、P-ERK 抗体 (批号: AP0472) 购自 AB-Clonal Technology 公司; β -actin 抗体 (批号: AC026)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (二抗) (批号: AS014) 购于 AB-clonal Technology 公司; ECL 曝光液购于 Biosharp 公司; 罗氏活力型血糖仪 (德国罗氏公司); Multiskan Mk3 型酶标仪 (上海赛默飞世尔仪器有限公司); 凝胶成像系统 (型号: Universal Hood 2、BIO-RAD 公司); 转印仪 (型号: Trans-Blot SD Cell、BIO-RAD 公司); BIO-RAD 电泳槽。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的建立及分组

C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄) 50 只按体重随机分成对照组 ($n=10$) 和糖尿病 (DM) 组, 参照 Sun 等^[10]研究中糖尿病肾病模型的建立, 建立 2 型糖尿病小鼠模型, 各组小鼠腹腔注射 50 mg/kg STZ (以 pH 4.2 柠檬酸钠缓冲液稀释), 连续注射 5 d。STZ 注射之前需禁食 12 h。最后一次注射 STZ 后第 7 天后尾静脉取血, 空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 则糖尿病模型造模成功。STZ 注射是公认的造糖尿病模型的方法, 且在一段时间后可成功诱导小鼠产生糖尿病肾病^[11]。40 只小鼠造模成功 36 只, 最后将存活且造模成功的 DM 小鼠随机分为 4 组: DM 组 (9 只)、DM+SY (10 mg/kg) (9 只)、DM+SY (30 mg/kg) (9 只)、

DM+SY (90 mg/kg) (9 只)。各给药组分别腹腔注射 SY 10 周,正常组模型组给予等体积蒸馏水。

1.3.2 样本的收集

连续给药 10 周,在最后一次称量小鼠体重后,用乙醚将小鼠麻醉,仰卧位固定,打开胸腔,腹主动脉取血,离心 10 min (3000 r/min) 后分离血清,部分用全自动生化分析仪分析血肌酐、尿素氮的值,部分置于-20℃ 冰箱待用。随后取出肾组织,剪去肾周围的组织及血管,用生理盐水清洗 3 遍,一部分固定于 4% 的多聚甲醛,一部分置于-80℃ 冰箱待用。

1.3.3 小鼠体重和血糖检测

各组小鼠每两周称量体重并尾静脉取血检测其空腹血糖值,在检测之前小鼠禁食不禁水 12 h。

1.3.4 小鼠肾组织 HE 染色

取一侧肾组织,用多聚甲醛固定 (浓度为 4%) 24 h 后,制作石蜡切片,脱蜡后染色,切片于 400 倍显微镜下观察肾组织的结构形态。

1.3.5 肾组织中氧化应激指标检测

将肾组织裂解充分,具体步骤严格参照小鼠 GSH、SOD、MDA 说明书进行。

1.3.6 ELISA 检测血清中炎症因子的表达

具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.3.7 Western blot 检测小鼠肾组织蛋白表达

-80℃ 冰箱中取出的肾组织,剪取 20 mg,放入 EP 管中剪碎后加入 RIPA 裂解液充分裂解后并超声,于冰上操作,裂解后于 4℃ 离心机离心 25 min (12000 r/min),将离心后抽取的上清液放入一个新的 EP 管中;BCA 法检测样品中的蛋白浓度;加

足够的电泳液后上样,90 V 电压进行蛋白的分离,电泳结束后用电转移法转移蛋白质到 PVDF 膜上,室温封闭 1~2 h;然后分别加入 PKC-β、Raf、P-Raf、ERK、P-ERK 一抗 4℃ 过夜;加入对应二抗,室温孵育 1~2 h;以 β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参。蛋白质印迹需经三次重复实验,用凝胶成像系统对各组条带进行分析,并计算目的蛋白灰度值和内参 β-actin 灰度值的比值,结果用 Image J 软件分析。

1.4 统计学方法

所有的实验均需要重复 3 次,采用 SPSS 23.0 分析软件对数据进行统计,计量资料用平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SY 对 DN 小鼠体重和血糖的影响

相比正常组,模型组小鼠的体重减轻 (*P*<0.01),血糖升高 (*P*<0.01)。经 SY 治疗后,相比模型组,各治疗组小鼠的体重上升 (*P*<0.05),血糖下降,给药 10 周后小鼠的血糖变化更明显 (*P*<0.05)。见表 1、表 2。

2.2 SY 对 DN 小鼠血肌酐 (Scr) 和尿素氮 (BUN) 的影响

相比正常组,模型组小鼠的 Scr、BUN 水平升高 (*P*<0.01);相比模型组,各治疗组小鼠的 Scr 和 BUN 水平下降 (*P*<0.05)。见表 3。

表 1 SY 对 DN 小鼠体重的影响 ($\bar{x}\pm s$, *g*, *n*=9)
Table 1 Effect of SY on body weight in DN mice

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	给药第 2 周 For two weeks	给药第 4 周 For four weeks	给药第 6 周 For six weeks	给药第 8 周 For eight weeks	给药第 10 周 For ten weeks
正常组 Normal group	/	25.67±1.15	28.22±1.09	29.67±1.50	30.05±1.61	31.44±1.33
模型 Model group	/	17.5±1.00**	17.67±1.58**	18.00±1.17**	18.39±1.11**	18.61±1.05**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	18.33±1.75	19.00±2.06	19.39±0.86 [#]	19.83±1.37 [#]	20.28±1.48 ^{##}
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	18.89±2.19	19.89±2.53 [#]	19.94±1.21 ^{##}	20.17±1.37 ^{##}	21.28±1.20 ^{##}
SY 高剂量组 SY high dose group	90	21.94±1.01 ^{##}	22.11±1.43 ^{##}	22.39±1.05 ^{##}	22.56±0.81 ^{##}	22.56±1.01 ^{##}

注:与正常组相比,** *P*<0.01;与模型组相比,[#]*P*<0.05,^{##} *P*<0.01。
Note. Compared with the normal group, ** *P*<0.01. Compared with the model group, [#]*P*<0.05, ^{##} *P*<0.01.

表 2 SY 对 DN 小鼠血糖的影响($\bar{x}\pm s$,mmol/L, $n=9$)
Table 2 Effect of SY on blood glucose in DN mice

组别 Groups	剂量(mg/kg) Dose	给药第 2 周 For two weeks	给药第 4 周 For four weeks	给药第 6 周 For six weeks	给药第 8 周 For eight weeks	给药第 10 周 For ten weeks
正常组 Normal group	/	5.02±0.50	5.86±0.55	6.04±0.78	5.02±0.42	5.52±0.67
模型组 Model group	/	23.47±3.21**	23.74±2.54**	23.73±2.38**	22.70±1.43**	21.52±1.78**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	23.88±2.28	23.21±2.27	23.37±0.70	22.24±1.35	19.58±1.23##
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	23.70±2.13	23.2±1.33	23.14±0.88	21.69±1.04	17.01±1.46##
SY 高剂量组 SY high dose group	90	21.52±1.45	23.11±0.84	23.02±1.04	20.21±0.81	15.02±1.40##

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, ## $P<0.01$.

表 3 SY 对 DN 小鼠 Scr 和 BUN 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 3 Effect of SY on Scr and BUN in DN mice

组别 Groups	剂量(mg/kg) Dose	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
正常组 Normal group	/	8.31±2.13	10.43±2.42
模型组 Model group	/	25.2±3.88**	31.39±2.00**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	21.96±2.42#	27.79±3.08##
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	18.20±1.63##	21.99±3.04##
SY 高剂量组 SY high dose group	90	16.48±2.18##	18.11±2.20##

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.3 SY 对 DN 小鼠肾组织形态学的影响

正常组小鼠肾组织大小、形态正常,结构完整,未见肾小球肥大,肾小球基底膜未见增厚、肾小管未见明显改变。模型组小鼠肾组织严重损伤,可见肾小球体积增大,肾小球基底膜(GBM)增厚,肾小管发生空泡样变性。经 SY 治疗后各组肾小球体积减小,GBM 增厚和肾小管发生空泡样变性得到不同程度改善。见图 1。

2.4 SY 对 DN 小鼠 GSH、SOD、MDA 影响

与正常组相比,模型组小鼠的 GSH、SOD 含量下降($P<0.01$);MDA 上升($P<0.01$)。与模型组相比,中高剂量治疗组小鼠的 GSH、SOD 含量上升($P<0.05$);与之相反的是经 SY 治疗后各组 MDA 的含量下降($P<0.01$)。见表 4。

2.5 SY 对 DN 小鼠炎症因子表达的影响

与正常组相比,模型组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达升高($P<0.01$)。与模型组相比,各治疗组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达呈剂量依赖性下

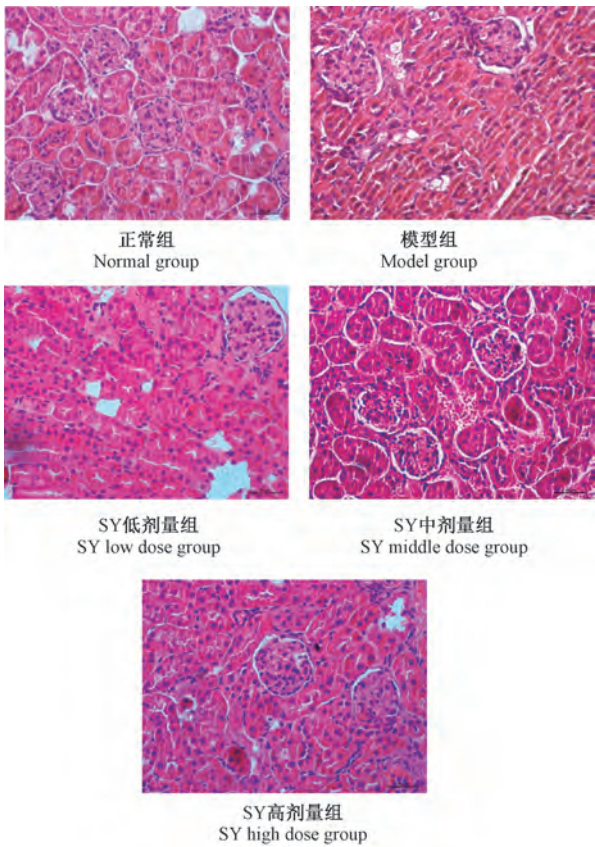


图 1 SY 对 DN 小鼠肾组织形态学的影响(HE 染色)
Figure 1 Effect of SY on renal histomorphology in DN mice(HE staining)

降($P<0.01$)。见表 5。
2.6 SY 对 DN 小鼠肾组织相关蛋白表达的影响
相比于正常组,模型组小鼠肾组织中 PKC- β 、P-Raf、P-ERK 的表达均升高($P<0.05$)。相比于模型组,中高剂量组小鼠肾组织中的 PKC- β 、P-Raf 的表达均下降($P<0.05$),高剂量组小鼠肾组织中 P-ERK 表达下降($P<0.01$)。见图 2、表 6。

表 4 SY 对 DN 小鼠 GSH、SOD、MDA 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of SY on GSH、SOD、MDA in DN mice

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	MDA (mmol/g)	GSH (mmol/g)	SOD (U/mg)
正常组 Normal group	—	1. 10±0. 07	10. 58±2. 79	32. 43±3. 86
模型组 Model group	—	6. 00±0. 74 **	4. 88±0. 93 **	8. 45±1. 35 **
SY 低剂量组 SY low dose group	10	3. 72±0. 56 [#]	6. 84±1. 42	18. 66±7. 83
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	2. 25±0. 46 [#]	7. 25±1. 68 [#]	24. 80±7. 79 [#]
SY 高剂量组 SY high dose group	90	0. 67±0. 39 [#]	8. 41±2. 17 [#]	28. 01±6. 10 [#]

注：与正常组相比，** $P<0.01$ ；与模型组相比，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 5 SY 对 DN 小鼠 TNF-α、IL-6、IL-1β 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of SY on TNF-α、IL-6、IL-1β in DN mice

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
正常组 Normal group	/	49. 43±28. 32	59. 59±7. 39	37. 33±5. 91
模型组 Model group	/	135. 94±27. 95 **	112. 10±7. 56 **	71. 30±4. 08 **
SY 低剂量组 SY low dose group	10	70. 60±15. 72 [#]	77. 00±16. 73 [#]	60. 27±10. 12 [#]
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	55. 79±19. 06 [#]	63. 93±9. 78 [#]	59. 77±1. 14 [#]
SY 高剂量组 SY high dose group	90	50. 84±17. 71 [#]	62. 04±3. 68 [#]	45. 03±3. 78 [#]

注：与正常组相比，** $P<0.01$ ；与模型组相比，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 6 SY 对 DN 小鼠 P-ERK、ERK、P-Raf、Raf、PKC 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of SY on PKC-β、ERK、P-ERK、Raf、P-Raf proteins expression in DN mice

组别 Groups	P-ERK/β-actin	ERK/β-actin	P-Raf/β-actin	Raf/β-actin	PKC/β-actin
正常组 Normal group	1. 51±0. 50	1. 69±1. 02	0. 77±0. 33	1. 57±0. 20	0. 66±0. 15
模型组 Model group	2. 46±0. 69 *	1. 59±1. 34	2. 17±0. 64 **	1. 49±0. 20	1. 35±0. 41 **
SY 低剂量组 SY low dose group	2. 08±0. 53	1. 57±1. 29	1. 85±0. 23	1. 36±0. 22	1. 07±0. 16
SY 中剂量组 SY medium dose group	1. 63±0. 28	1. 62±1. 38	1. 53±0. 37 [#]	1. 31±0. 17	0. 72±0. 94 [#]
SY 高剂量组 SY high dose group	1. 39±0. 41 [#]	1. 97±1. 96	1. 01±0. 81 [#]	1. 53±0. 11	0. 52±0. 22 [#]

注：与正常组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组相比，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

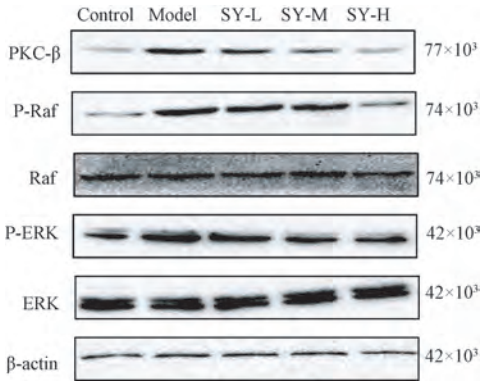


图 2 SY 对 DN 小鼠 PKC-β、ERK、P-ERK、Raf、P-Raf 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)
Figure 2 Effect of SY on PKC-β、ERK、P-ERK、Raf、P-Raf proteins expression in DN mice

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病后期的主要并发症之一，严重威胁着患者的生存质量，其发病机制复杂，其中炎症反应和氧化应激在 DN 的进展中起着非常重要的作用^[12]。红花黄色素(SY)是从红花中提取的食用天然色素，为国家级新药^[13]，能够保护肾功能，延缓或阻止糖尿病肾病的发展^[11]。本研究结果表明，SY 能增加糖尿病肾病小鼠的体重，抑制其血糖升高，且可降低血肌酐和尿素氮水平；在炎症状态和氧化应激下，肾组织会发生肾小管空泡样变性、肾小球肥大、肾小球基底膜增厚等病理性改变^[14]。通过 HE 染色观察到，经 SY 治疗后，DN 小鼠肾小管空泡样病变、肾小球肥大及肾小球基底膜增厚等病理改变均得到改善，提示其具有改善肾功能的作用。

血糖升高时经 *denovo* 合成酶途径生成的二酰甘油(DAG)含量增加,可激活蛋白激酶 C(PKC)通路,PKC 是丝氨酸苏氨酸蛋白激酶家族的一员,是调节细胞生长和功能的关键酶^[15]。PKC 通路的激活是导致糖尿病肾病发病的重要原因之一^[11]。一方面,PKC 的活化可激活 PKC/Ras-Raf-MEK-ERK 通路,进而激活 NF- κ B 信号通路,使炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放增加^[16-17]且其表达随着 DN 的进展不断升高^[17],介导与 DN 有关的多种生物效应^[18]。本研究结果表明,SY 可降低通路蛋白 PKC- β 、P-ERK、P-Raf 的表达,这可能是 SY 改善 DN 小鼠肾损伤的作用机制;同时炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达减少,说明 SY 可以通过减少炎症因子的表达水平从而对 DN 有改善作用。另外,PKC 通路的活化可增加氧化应激反应^[19]。SOD 是体内重要的抗氧化酶;GSH 是体内重要的还原剂^[20];MDA 是脂质过氧化物分解产物^[21],可间接反映组织过氧化损伤程度。本实验结果表明,SY 可增加 DN 小鼠体内 SOD、GSH 的含量,降低 MDA 的含量,表明 SY 可以通过减轻氧化应激从而对 DN 有改善作用。

综上所述,红花黄色素可能是通过抑制 PKC/Ras-Raf-MEK-ERK 信号通路以及减轻氧化应激,达到抗炎作用和抗氧化作用,进而对糖尿病肾病小鼠的肾组织起治疗作用。在后续的深入研究中,将选择临床疗效较好的药物作为阳性药,设置阳性对照组,进一步研究红花黄色素对糖尿病肾病的治疗作用。

参考文献:

- [1] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188.
- [2] 吴运斗,袁新科,李大勇,等. 喹噁环己酮对大鼠糖尿病肾病的作用及对肾脏 Ang II, VEGF 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(10): 98-104.
- [3] 李菲,王秋虹,魏军平. 中医药治疗糖尿病肾病的临床研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(17): 3471-3475.
- [4] He J, Gao HX, Yang N, et al. The aldose reductase inhibitor epalrestat exerts nephritic protection on diabetic nephropathy in db/db mice through metabolic modulation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(1): 86-97.
- [5] Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(12): 2032-2045.
- [6] 周彬,于艳梅,王志龙. 红花黄色素对糖尿病大鼠肾脏保护

作用的实验研究 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9(17): 9-10.

- [7] Ni WJ, Tang LQ, Wei W. Research progress in signalling pathway in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(3): 221-233.
- [8] Duan JL, Wang JW, Guan Y, et al. Safflower yellow A protects neonatal rat cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 487-495.
- [9] 赵洪双,周康. 红花黄色素的药理作用及研究进展 [J]. *农业开发与装备*, 2014, 6: 58.
- [10] Sun W, Liu X, Zhang H, et al. Epigallocatechin gallate upregulates NRF2 to prevent diabetic nephropathy via disabling KEAP1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 840-857.
- [11] 高燕,袁鲁亮,张海松. 红花黄色素对糖尿病肾病模型大鼠肾脏细胞血管紧张素 II 1 型受体的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(18): 2677-2683.
- [12] Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Adv Chron Kid Dis*, 2005, 12(2): 146-154.
- [13] 史敏,陈雷,龚佳佳,等. 红花黄色素的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(8): 20-29.
- [14] Kashihara N, Haruna Y, Kondeti VK, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(34): 4256.
- [15] Toyoda M, Suzuki D, Honma M, et al. High expression of PKC-MAPK pathway mRNAs correlates with glomerular lesions in human diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3): 1107-1114.
- [16] Liu CH, Hua N, Fu X, et al. Metformin regulates atrial SK2 and SK3 expression through inhibiting the PKC/ERK signaling pathway in type 2 diabetic rats [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 236.
- [17] 鲍喜静,李建英,彭一,等. 红花黄色素联合二甲双胍对早期糖尿病肾病患者 NF- κ B 炎症信号通路的影响 [J]. *河北医药*, 2017, 39(11): 1664-1666.
- [18] Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(6): 327-340.
- [19] 鲁怡然,李婧娴,赵汝星,等. 格列喹酮对糖尿病肾脏疾病改善作用的效果观察 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 25(10): 869-873.
- [20] 李艳飞,郭松超,朱翠凤,等. 大豆异黄酮对 2 型糖尿病大鼠血清中 SOD MDA GSH 及 NO 的影响 [J]. *中国药物与临床*, 2007, 7(10): 766-768.
- [21] 马冰沁,钱唯韵,罗振国,等. 芦荟苷对糖尿病肾病大鼠 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路及足细胞功能的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(9): 1-7.

柯井卫,朱永生,唐海,等. 棱术排石颗粒对肾草酸钙结石作用机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 82-87.
Ke JW, Zhu YS, Tang H, et al. Study of the mechanism whereby lengzhupaishi (rixolipite) granules prevent renal calcium oxalate stones [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 82-87.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 012

棱术排石颗粒对肾草酸钙结石作用机制的研究

柯井卫,朱永生,唐海,刘鑫,赖俊谕,刘星*

(西南医科大学附属中医医院泌尿外科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨棱术排石颗粒对肾草酸钙结石作用及对蛋白激酶 C(PKC)-核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路的影响。**方法** 将 32 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为 4 组($n=8$):对照组、模型组、治疗组和抑制剂组。除对照组外,所有大鼠 28 d 内连续给予乙二醇及氯化铵诱导大鼠泌尿系草酸钙结石形成,造模同时,治疗组灌胃给予 10.0 g/kg 的棱术排石颗粒,抑制剂组在此基础上腹腔注射 30 mg/kg R031-8220,每天 1 次,连续 28 d。实验结束后,检测各组大鼠 24 h 尿量、尿 pH 值、尿草酸(Ox)分泌量、血和 24 h 尿中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量、血液中血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)水平。Vonkossa 染色、Western blot 检测各组大鼠肾组织病理改变和 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白的表。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠 24 h 尿量、尿 pH 及血、尿中 Mg^{2+} 明显降低,肾中 SOD 酶活性明显下降,Ox、血、尿中 Ca^{2+} 、肾 MDA 水平、ROS 荧光强度水平与 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达量明显升高($P<0.05$);经棱术排石颗粒治疗后,上述指标均明显逆转,差异均具有统计学意义($P<0.05$);抑制剂组与模型组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 棱术排石颗粒可有效改善肾草酸钙结石大鼠的病理状态,可能与激活 PKC-Nrf2/ARE 抗氧化信号通路降低氧化应激水有关。

【关键词】 棱术排石颗粒;草酸钙;泌尿系结石;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0082-06

Study of the mechanism whereby lengzhupaishi (rixolipite) granules prevent renal calcium oxalate stones

KE Jingwei, ZHU Yongsheng, TANG Hai, LIU Xin, LAI Junyu, LIU Xing*

(Department of Urology, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To determine the effects of rixolipite granules on renal calcium oxalate calculi and protein kinase C (PKC)-nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) signaling to antioxidant response elements (AREs). **Methods** Thirty-two specific pathogen-free Sprague Dawley rats were randomly allocated to four groups ($n=8$ each): a control group, a model group, a treatment group, and an inhibitor group. All of the rats except the controls were administered ethylene glycol and ammonium chloride in their diet to induce urinary calcium oxalate calculus formation within 28 days. The treatment group was also administered 10.0 g/kg Lengzhu Paishi granules, and the inhibitor group was administered 30 mg/kg r031-8220 once daily by gavage for 28 days. Afterward, 24 h urine volume, urine pH, urinary oxalic acid (Ox) concentration, the circulating Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations and the 24 h urinary output of each, blood urea nitrogen (BUN), and circulating creatinine (Cr) concentrations were measured. The protein expression of PKC, Keap1, Nrf2 was characterized using von Kossa staining and Western blot. **Results** The model group had significantly

【基金项目】西南医科大学院级课题(2018ZRQN-068)。

【作者简介】柯井卫(1984—),硕士,副主任医师,研究方向:结石预防复发及男科。E-mail:2327883682@qq.com

【通信作者】刘星(1986—),男,汉族,硕士,主治医师,研究方向:结石预防及复发。E-mail:543518689@qq.com

lower 24 h urine volume, urine pH, circulating Mg^{2+} , urinary Mg^{2+} , and renal superoxide dismutase activity than the control group; and the Ox, circulating and urinary Ca^{2+} , renal malondialdehyde concentration, reactive oxygen species fluorescence intensity, and PKC, Keap1, and Nrf2 protein expression were significantly higher ($P<0.05$). Lengzhu Paishi granule treatment significantly ameliorated all these effects ($P<0.05$). There was no significant difference between the two groups ($P>0.05$). **Conclusions** Lengzhu Paishi granules prevent the pathological changes associated with renal calcium oxalate calculus formation in rats, which may be mediated through the activation of the antioxidant signaling pathway PKC-Nrf2/ARE and a reduction in oxidative stress.

【Keywords】 LengShu Paishi granule; calcium oxalate; urinary calculus; oxidative stress

泌尿系结石在全球范围内属于高发病,不同国家或地区发病率存在差异,我国发病率大约为 6% 左右,而其中大约 80% 的泌尿系结石由草酸钙组成^[1]。泌尿系统结石是一个复杂的过程,目前的研究认为与饮食、地理、气候、种族及遗传等多种因素有关^[2],但不同结石类型的发病机制尚未完全明确。随着临床上治疗设备及技术的发展,采用冲击波或其他外科手术等方法已经广泛应用于泌尿系结石的治疗。然而临床中发现,上述治疗手段治疗肾结石的过程中往往不可避免的会引起创伤性损伤甚至严重影响肾功能,且治疗后复发率可高达 70% 左右^[3]。目前在药物治疗方面,磷酸纤维素钠、正磷酸盐及噻嗪类利尿药等可应用于泌尿系结石治疗及预防其复发,但临床疗效不能达到满意效果,而且存在引起副作用的风险^[4]。中草药治疗泌尿系统结石具有悠久的历史,且在临床中取得了一定的效果,作为无创治疗方法其还具有副作用少、成本低廉等优点,被广泛应用于泌尿系结石的治疗及其研究中^[5]。本研究探讨中药复方棱术排石颗粒对大鼠尿草酸钙结石形成的作用机制进行初步探讨,从而为临床提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12~13 周龄的雄性 SD 大鼠 32 只,SPF 级,体重 200~220 g,购自西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2018-17],饲养在本单位的实验动物中心[SYXK(川)2018-065],饲养室保持良好通风,饲养环境温度为(25±2)℃,湿度(50±10)%,12 h 循环光照。正常饲养 1 周以适应环境,第 2 周开始进行实验,实验过程中遵循 3R 原则。本实验已通过西南医科大学附属中医医院动物伦理委员会审批批准(XNFS(A)-2019-062)。

1.2 主要试剂与仪器

棱术排石颗粒(药方比例为:三棱 200 g、川芎

200 g、海金沙 300 g、糊精 700 g、莪术 200 g、金钱草 600 g、牵牛子(醋制)200 g、白芍 300 g、川木通 300 g、威灵仙 300 g)有我院药剂科提供;蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 特异性抑制剂 R031-8220 (EK-0514) 采购自美国 Selleck 公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA) 浓度测定试剂盒(AE-0294)、3,3-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB) 化学发光试剂盒(AE-29984) 采购自 Sigma 公司;Vonkossa 试剂盒(BK-29402)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒(BT-019942)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒(BA-00032) 购自上海碧云天生物技术公司;PKC(ab-03941)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(epoxy chloropropane Kelch sample related protein-1, Keap1)(ab-23992)、结核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor2, Nrf2)(ab-12323)、抗氧化反应元件(antioxidant response elements, ARE) 抗体(ab-02994)、兔抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(ab-05132) 以及山羊抗兔 IgG(ab-08274) 采购自美国 abcam 公司;2',7'-二氯荧光黄双乙酸(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 试剂盒(R-029442)、Western blot 试剂盒(R-033245) 购自德国 Rebstock 公司。

石蜡切片机(M2016, 上海徠卡仪器有限公司, 中国);全自动酶标仪(680 型, 伯乐公司, 美国);电泳仪(DYY-6C, 北京六一仪器厂, 中国);凝胶成像系统(GelDoc XR+, 伯乐公司, 美国);分光光度计(Nanodrop 2000, 赛默飞世尔公司, 美国);实时荧光定量 PCR 仪(LightCycler96, 罗氏公司, 英国)。

1.3 实验方法

1.3.1 收集分析结石标本

经自行排石、外冲击波碎石、经皮肾镜碎石取石、开放性手术取石、输尿管软镜或硬镜下碎石取石、膀胱镜下碎石取石、开放性手术取石等方式收

集结号标本。结石成分通过傅立叶红外光谱仪 Turbo FT 型(美国 D&P)测定。

1.3.2 分组处理

大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 4 组,即:对照组、模型组、治疗组和抑制剂组,每组 8 只。除对照组外,所有大鼠 28 d 内连续给予 1%乙二醇及 2%氯化铵诱导大鼠泌尿系草酸钙结石形成^[6],造模同时进行药物处理,治疗组灌胃给药 10.0 g/kg 的棱术排石颗粒,抑制剂组在治疗组基础上腹腔注射 30 mg/kg R031-8220,对照组和模型组给予等量的生理盐水。

1.3.3 尿液样本收集及尿液指标分析

28 d 后,用代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿液,测定 24 h 尿量、尿液 pH 值后,取 2 mL 尿液中加入 0.5 mL 浓硫酸,300 r/min 离心 10 min,采用原子吸收光密度法测定尿液中 Ca²⁺、Mg²⁺含量。另去部分尿液采用高锰酸钾法测定尿草酸(oxalic acid, Ox)分泌量。

1.3.4 血液生化指标检测

收集尿液后,称取大鼠重量并处死各组大鼠,下腔静脉取血,3000 r/min 离心 10 min 后取上血清,使用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine ratio, Cr)中 Ca²⁺、Mg²⁺含量。

1.3.5 Vonkossa 染色观察病理学变化

左侧肾用 10%多聚甲醇固定后,常规石蜡包埋,经 Vonkossa 染色,制成切片,光镜下观察各组大鼠左侧肾的病理改变。

1.3.6 DCFH-DA 染色检测各组大鼠肾组织中活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)及与 MDA、SOD 酶的活性

取出各组大鼠的肾组织,冰冻切片,二甲苯浸

洗两次,添加 10 μmol/L DCFH-DA 染色 2 h,荧光显微镜下拍照记录,并用 Image 8.0 软件分析图像,注意所用染色剂要保证现用现配^[7]。按照各试剂盒说明书要求操作,使用相应试剂盒检测试剂盒来检测细胞中 MDA 的含量和 SOD 活性。

1.3.7 Western blot 检测检测各组大鼠肾组织 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 的表达水平

取出各组大鼠左肾组织匀浆,冰上裂解 30 min 后,离心获得上清,蛋白浓度采用 BCA 试剂盒测定,每个样品取 50 μg,然后进行 SDS-PAGE 电泳、PVDF 转膜、TBST 液封闭,维持 4℃过夜孕育,后分别加入一抗(PKC、Keap1、Nrf2、ARE)(1 : 1500),孕育 1 h,洗涤加入抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1 : 10000),加入 ECL 显色 30 min,以 GAPDH 作为内参表示蛋白相对表达水平。

1.4 统计学方法

数据分析采用软件 SPSS 16.0,符合正态分布的计量资料采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 表示差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠尿液指标的比较

各组大鼠尿液生化指标如表 1 所示,与对照组相比,模型组大鼠 24 h 尿量、尿 pH、Mg²⁺明显降低, Ox、Ca²⁺水平明显升高(*P*<0.05);经棱术排石颗粒治疗后,与模型组相比,治疗组大鼠 24 h 尿量、尿 pH、Mg²⁺明显升高, Ox、Ca²⁺水平明显降低(*P*<0.05);抑制剂组与模型组差异无统计学意义(*P*>0.05)。

表 1 棱术排石颗粒对草酸钙结石大鼠尿液指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 1 Effect of Riangzhipeishi granule on urine index of calcium oxalate calculi rats

组别 Groups	24 h 尿量(mL) 24 h urine output	pH	Ox(mmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	Mg ²⁺ (mmol/L)
对照组 Control group	14.79±2.43	6.45±0.04	0.22±0.03	0.31±0.07	0.63±0.06
模型组 Model group	6.58±0.89*	5.34±0.13*	0.45±0.10*	0.55±0.09*	0.40±0.06*
治疗组 Treatment group	11.81±1.18 [#]	6.19±0.09 [#]	0.28±0.04 [#]	0.41±0.08 [#]	0.54±0.09 [#]
抑制剂组 Inhibitor group	8.85±0.87 [△]	5.87±0.07 [△]	0.36±0.04 [△]	0.47±0.07 [△]	0.56±0.05 [△]

注:与对照组比较,**P*<0.05;与模型组比较,[#]*P*<0.05;与治疗组比较,[△]*P*<0.05。下同。
Note. Compared with the control group, **P*<0.05. Compared with the model group, [#]*P*<0.05. Compared with the treatment group, [△]*P*<0.05. The same as below.

2.2 各组大鼠血液生化指标比较

各组大鼠血液生化指标如表 2 所示,与对照组相比,模型组大鼠血清 BUN、Cr、Ca²⁺水平明显升高,Mg²⁺明显降低($P<0.05$);经棱术排石颗粒治疗后,与模型组相比,治疗组大鼠血清 BUN、Cr 水平明显降低,Mg²⁺明显升高($P<0.05$);抑制剂组与模型组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 Vonkossa 染色检测各组大鼠肾组织病理变化

Vonkossa 染色结果如图 1 所示,对照组大鼠肾表面光滑且富有弹性,色泽正常,其他组大鼠肾苍白。对照组大鼠中肾内膜层细胞排列规整,内皮连续完整,无缺损现象出现。模型组大鼠肾中膜、内膜细胞排列紊乱,内皮凸起伴有大量淋巴细胞填

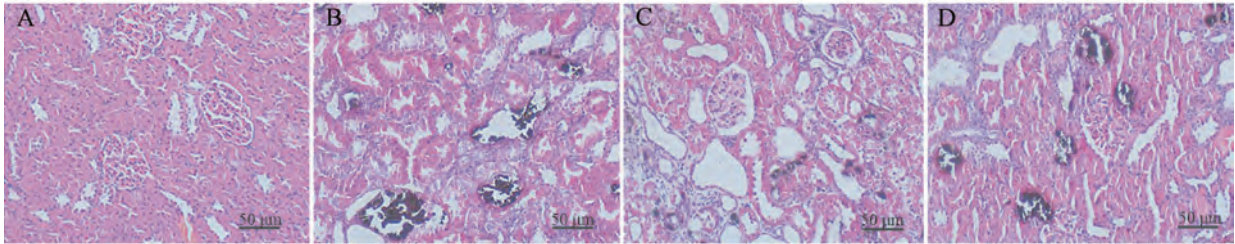
充,肾皮质及肾乳头内有草酸钙沉积,手触摸有明显颗粒感;治疗组大鼠肾中膜、内膜细胞排列较整齐,内皮轻微凸起少见淋巴细胞填充,肾皮质及肾乳头内有少有草酸钙沉积,手触摸颗粒感不明显;而抑制剂组大鼠肾病理变化与模型组相似。

2.4 各组大鼠肾 MDA、SOD、ROS 水平的比较

与对照组相比,模型组大鼠肾 MDA 水平、ROS 荧光强度明显增加,而 SOD 酶活性明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,治疗组大鼠肾组织中 MDA 水平、ROS 荧光强度明显降低,而 SOD 酶活性明显增强,差异具有统计学意义($P<0.05$);抑制剂组与模型组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2,表 3。

表 2 棱术排石颗粒对草酸钙结石大鼠血生化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Effects of Riangzhipeishi granule on blood biochemical indexes of calcium oxalate calculi rats

组别 Groups	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)	Ca ²⁺ (mmol/L)	Mg ²⁺ (mmol/L)
对照组 Control group	6.51±0.54	31.66±1.83	2.99±0.04	1.10±0.08
模型组 Model group	27.02±1.32 [*]	62.46±2.28 [*]	4.64±0.11 [*]	1.10±0.05 [*]
治疗组 Treatment group	17.42±1.17 [#]	37.17±4.22 [#]	3.44±0.08 [#]	1.09±0.06 [#]
抑制剂组 Inhibitor group	24.31±0.95 ^Δ	59.94±1.82 ^Δ	4.30±0.04 ^Δ	1.08±0.07 ^Δ



注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。下同。

图 1 Vonkossa 染色检测各组大鼠肾组织病理变化

Note. A, Control group. B, Model group. C, Treatment group. D, Inhibitor group. The same as below.

Figure 1 Pathological changes of renal tissues of rats in each group detected by Vonkossa staining

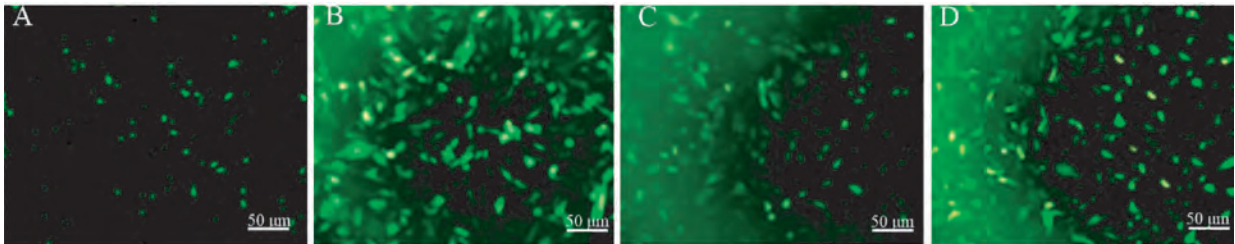


图 2 各组大鼠肾组织 ROS 水平的检测

Figure 2 Detection of ROS levels in renal tissues of rats in each group

2.5 Western blot 检测各组大鼠肾组织中 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白的表达

与对照组相比,模型组大鼠肾组织中 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达量明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,治疗组大鼠肾组织中 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达量明显下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$),抑制剂组与模型组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3,表 4。

3 讨论

根据流行病学统计^[7],泌尿系统结石的发病率逐年升高,且我国是世界上三大结石高发地之一,其中影响泌尿结石的最主要因素包括遗传、代谢、饮食和地理因素。目前临床诊断技术不断进步,大多数尿路结石患者可根据结石成分分析及代谢评估确定发病原因,这对结石的预防及治疗具有重要意义。本实验室前期分析了 1407 例四川地区尿路结石患者的结石成分,结果显示,尿路结石主要分布于上尿路,且 92.11% 的患者为草酸钙结石,该结石的位置分部与成分组成与报道基本相符^[8]。中药在治疗泌尿系统结石中取得了一定的疗效,其中

一经验方制成的中成药具有疗效确切、价格低廉且副作用低等特点具有良好的应用前景。棱术排石颗粒是我院常用治疗泌尿结石的药物,特别是对于肾草酸钙结石的治疗取得了满意的效果,但其作用机制尚无报道。

乙二醇作为草酸的前体物质,可引起肾小管上皮细胞损伤引起高草酸尿症状并最终导致肾结石的形成,氯化铵可降低尿液 pH 值,促进草酸钙结晶的形成^[9],本研究以乙二醇和氯化铵构建大鼠肾草酸钙结石模型,结果显示,模型组大鼠 24 h 尿量、尿 pH、血清及尿中 Mg^{2+} 降低,而尿 Ox、血清肾功能指标 BUN、Cr 及血清和尿中 Ca^{2+} 水平均明显升高,草酸钙结石的形成分为多个阶段,包括晶核的形成、晶体成长、集聚和滞留等多个过程, Ca^{2+} 是结石形成的必要物质,草酸钙结石以 Ca^{2+} 升高为主要标志^[10]。高 Ox 尿是草酸钙结石形成的重要影响因素, Mg^{2+} 可络合 Ox,降低 Ox 的水平从而抑制草酸钙结石的形成^[11]。病理观察显示,模型大鼠肾组织中存在大量草酸钙结晶,说明模型构建成功。经棱术排石颗粒治疗后,上述指标及病理状态均明显改善,说明棱术排石颗粒可有效抑制肾草酸钙结石的形成。

表 3 各组大鼠肾组织 MDA、SOD、ROS 比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of MDA, SOD and ROS in renal tissues of rats in each group

组别 Groups	MDA (mmol/mg)	SOD (U/mg)	ROS (U/L)
对照组 Control group	0.50±0.04	55.54±1.99	102.00±2.67
模型组 Model group	1.83±0.15 [*]	17.80±0.75 [*]	444.38±19.32 [*]
治疗组 Treatment group	1.08±0.09 [#]	47.47±1.51 [#]	225.38±18.75 [#]
抑制剂组 Inhibitor group	1.62±0.12 [△]	19.16±0.53 [△]	415.88±21.43 [△]

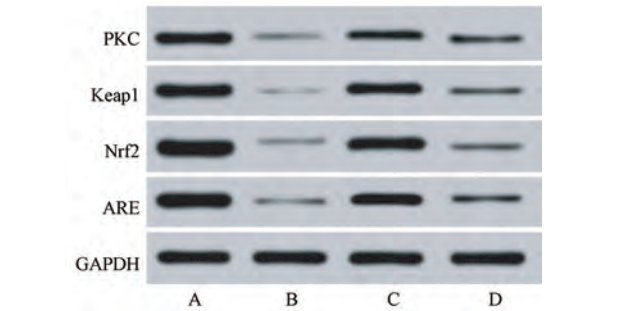


图 3 各组大鼠肾组织中 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达

Figure 3 Protein expressions of PKC, Keap1, Nrf2, and ARE in renal tissues of rats in each group

表 4 各组大鼠肾组织中 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of PKC, Keap1, Nrf2, and ARE proteins in renal tissues of rats in each group

组别 Groups	PKC	Keap1	Nrf2	ARE
对照组 Control group	0.99±0.03	1.01±0.02	1.02±0.03	1.01±0.03
模型组 Model group	0.16±0.02 [*]	0.19±0.03 [*]	0.18±0.03 [*]	0.20±0.03 [*]
治疗组 Treatment group	0.87±0.03 [#]	0.75±0.03 [#]	0.61±0.02 [#]	0.76±0.03 [#]
抑制剂组 Inhibitor group	0.19±0.02 [△]	0.22±0.02 [△]	0.26±0.01 [△]	0.25±0.02 [△]

研究发现,长期的高水平草酸可促进肾组织的氧化应激反应,产生大量的 ROS 可损伤肾小管,增加了肾小管上皮细胞表面的黏附效应,促进了草酸钙结石的形成^[12]。现代药理学研究表明,棱术排石颗粒中多种药材中含有具抗氧化活性成分,其中三棱中总茛菪类物质不仅能够清除活性氧,还可以抑制机体中氧自由基的生成以及抵抗脂质过氧化反应^[13]。研究发现,川芎可以改变糖尿病肾病氧化应激水平改善病理状态^[14]。金钱草提取物能够增加肾组织 SOD 水平,从而有效抑制结晶的形成^[15]。本研究结果显示,棱术排石颗粒治疗后大鼠 MDA 水平明显降低,SOD 酶活明显升高,说明棱术排石颗粒治疗肾草酸钙结石可能与改善氧化应激水平有关。PKC-Nrf2/ARE 信号通路是重要的抗氧化防御性转导通路^[16]。正常状态下,PKC 介导的通路下游蛋白 Nrf2 与 Keap1 结合以二聚体的形式存在,而氧化应激刺激可使 Keap1 半胱氨酸残基被修饰,从而使该二聚体发生解离,Nrf2 进入细胞核与抗氧化应激原件 ARE 相互作用,从而发挥抗氧化的作用^[17]。本研究结果显示,经过棱术排石颗粒治疗的肾草酸钙结石大鼠肾组织中 PKC、Keap1、Nrf2、ARE 蛋白表达含量均明显升高,说明棱术排石颗粒治疗的肾草酸钙结石可能是通过激活 PKC-Nrf2/ARE 抗氧化信号通路达到治疗效果。

综上所述,棱术排石颗粒可有效改善肾草酸钙结石大鼠的病理状态,其机制可能与激活 PKC-Nrf2/ARE 抗氧化信号通路降低氧化应激水有关。

参考文献:

- [1] 张雪松,高文锋,成海生.金石饮方剂与体外冲击波碎石联合治疗泌尿系结石的疗效观察及对患者血脂的影响分析[J].临床和实验医学杂志,2018,17(1):86-89.
- [2] 叶子兴,乔逸,张寅生,等.泌尿系结石代谢评估数据库的建立及临床初步应用[J].中华医学杂志,2020,100(26):2036-2039.
- [3] 周志均,李响.输尿管软镜碎石术前预置双J管必要性的荟萃分析[J].中华泌尿外科杂志,2020,41(2):138-146.
- [4] Assimos DG. Re: saRNA-mediated activation of TRPV5 reduces renal calcium oxalate deposition in rat via decreasing urinary

- calcium excretion [J]. J Urol, 2018, 199(2): 337.
- [5] 赵扬,谭艳云,刘映红,等.中药"四金"治疗泌尿系结石的研究进展[J].中医药导报,2018,24(10):110-112.
- [6] 邸彦橙,王志龙,张智慧,等.白藜芦醇通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路抑制大鼠肾草酸钙结石的形成[J].安徽医科大学学报,2020,55(1):70-74.
- [7] 梁健鹏,张天禹,杨芳,等.1843 例泌尿系结石患者结石成分分析[J].重庆医学,2019,48(4):630-633.
- [8] 汪海龙,张宗平,王安果,等.川东北地区泌尿系结石构成及其相关因素分析[J].现代泌尿外科杂志,2020,25(2):151-155.
- [9] Ribeiro LS, José J, Mój De, et al. Hydrolytic hydrogenation of cellulose to ethylene glycol over carbon nanotubes supported Ru-W bimetallic catalysts [J]. Cellulose, 2018, 25(4): 2259-2272.
- [10] van der Wijst J, van Goor MK, Schreuder MF, et al. TRPV5 in renal tubular calcium handling and its potential relevance for nephrolithiasis [J]. Kidney Int, 2019, 96(6): 1283-1291.
- [11] Miyashita M, Yamada E, Kawano M. Influence of low-molecular-weight dicarboxylic acids on the formation of calcium carbonate minerals in solutions with Mg²⁺ ions [J]. J Miner Petrol Sci, 2018, 113(4): 207-217.
- [12] Pavlakou P, Dounousi E, Roumeliotis S, et al. Oxidative stress and the kidney in the space environment [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3176.
- [13] 蔡卉,韩小波,徐静静.加味三棱丸治疗原发性痛经模型大鼠的机理研究[J].中药材,2019,42(3):657-660.
- [14] 张小敏,高磊,胡潇,等.川芎嗪对免疫介导骨髓衰竭小鼠肾脏氧化应激的影响[J].中国药理学通报,2019,35(11):1570-1574.
- [15] 刘英,王志勇,杨德慧,等.广金钱草提取物对尿石症大鼠肾功能的保护作用[J].中国老年学杂志,2018,38(10):2467-2470.
- [16] Zhang G, Yang W, Jiang F, et al. PERK regulates Nrf2/ARE antioxidant pathway against dibutyl phthalate-induced mitochondrial damage and apoptosis dependent of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells [J]. Toxicol Lett, 2019, 308(6): 24-33.
- [17] Yang B, Yin C, Zhou Y, et al. Curcumin protects against methylmercury-induced cytotoxicity in primary rat astrocytes by activating the Nrf2/ARE pathway independently of PKCδ [J]. Toxicology, 2019, 425(12): 152248.

[收稿日期] 2020-10-31

金晶玉,朱成杰,权英实,等. 罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 88-92.

Jin JY, Zhu CJ, Quan YS, et al. Ropivacaine induces apoptosis in a human colorectal cancer SW620 cell line via the mitochondrial pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 88-92.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 013

罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的实验研究

金晶玉¹,朱成杰^{2*},权英实¹,黄学洙¹

(1.延边大学附属医院麻醉科,吉林 延吉 133002;2.延边大学附属医院重症监护科,吉林 延吉 133002)

【摘要】 目的 探究罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的机制。**方法** 体外培养人结直肠 SW620 细胞,使用罗哌卡因处理人结直肠 SW620 细胞,采用 CCK-8 实验检测癌细胞活力。将结直肠癌 SW620 细胞分为:结直肠癌细胞组、低剂量罗哌卡因组、中剂量罗哌卡因组和高剂量罗哌卡因组;参考 CCK-8 实验结果,分别使用 20,50 和 100 μg/mL 浓度的罗哌卡因处理低、中、高罗哌卡因组的结直肠癌细胞;采用流式细胞仪检测各组细胞线粒体膜电位;使用蛋白质印迹检测凋亡蛋白 Bcl-2, Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 表达情况;采用流式细胞仪检测结直肠 SW620 细胞周期及凋亡情况。**结果** CCK-8 结果显示随着使用罗哌卡因剂量的增加,人结直肠 SW620 细胞的抑制率显著升高,半数致死浓度约为:69.36 μg/mL。结直肠癌细胞组细胞凋亡率为(1.52±0.11)% 显著低于低、中、高剂量罗哌卡因组[(35.91±5.69)%、(46.27±6.57)%、(69.36±8.01)%;F=559.203,P<0.001];相比结直肠癌细胞组,使用罗哌卡因处理各组线粒体膜电位、G2/M 期细胞比例、S 期细胞比例、Bax 蛋白相对表达水平均显著降低,且呈剂量依赖性(P<0.001);相比结直肠癌细胞组,使用罗哌卡因处理各组 G0/G1 期细胞比例、Bcl-2 蛋白、Caspase-3 蛋白和 Caspase-9 蛋白相对表达水平显著升高,且呈剂量依赖性(P<0.001)。**结论** 罗哌卡因可以通过线粒体途径促进人结直肠 SW620 细胞的凋亡,其作用机制可能与 Caspase-3 及 Bcl-2 信号传导相关。

【关键词】 结直肠 SW620 细胞株;罗哌卡因;线粒体通路;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0088-05

Ropivacaine induces apoptosis in a human colorectal cancer SW620 cell line via the mitochondrial pathway

JIN Jingyu¹, ZHU Chengjie^{2*}, QUAN Yingshi¹, HUANG Xuezhu¹

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133002, China.
2. Department of Intensive Care, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133002)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of ropivacaine induced apoptosis in a human colorectal cancer (CRC) SW620 cell line via the mitochondrial pathway. **Methods** Human CRC SW620 cells were cultured *in vitro* and treated with ropivacaine. The viability of cancer cells was determined by CCK-8 assay. CRC cells were divided into CRC cell, low-dose, medium-dose, and high-dose ropivacaine groups. Referring to the CCK-8 assay result, CRC cells in the low-dose, medium-dose, and high-dose ropivacaine groups were treated with 20, 50, and 100 μg/mL ropivacaine,

[基金项目] 延边大学青年基金项目(延大科合字(2016)第 31 号)。

[作者简介] 金晶玉(1982—),女,主治医师,研究方向:麻醉疼痛。E-mail: zazhishu718@163.com

[通信作者] 朱成杰(1985—),男,博士,副主任医师,研究方向:重症疾病。E-mail: 815148415@qq.com

respectively. The mitochondrial membrane potential (MMP) in each group was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis proteins (Bcl-2, Bax, caspase-3, caspase-9) was detected by western blot. The cell cycle and apoptosis of CRC SW620 cells were determined by flow cytometry. **Results** The CCK-8 assay showed that with an increase in ropivacaine dose, the inhibition rate of human CRC SW620 cells was significantly increased, and the lethal dosage 50 (LC_{50}) was approximately 69.36 $\mu\text{g/mL}$. The apoptosis rate in the CRC cell group was $1.52 \pm 0.11\%$, which was significantly lower than that in the low-dose, medium-dose, and high-dose ropivacaine groups ($35.91 \pm 5.69\%$, $46.27 \pm 6.57\%$, $69.36 \pm 8.01\%$, respectively; $F=559.203$, $P<0.001$). Compared with the CRC cell group, the MMP, ratio of cells in G2/M phase, ratio of cells in S phase, and the relative expression level of Bax protein were significantly and dose-dependently decreased in each group treated with ropivacaine ($P<0.001$), whereas the ratio of cells in G0/G1 phase, and the relative expression levels of Bcl-2, caspase-3, and caspase-9 proteins were significantly and dose-dependently increased ($P<0.001$). **Conclusions** Ropivacaine promoted the apoptosis of human CRC SW620 cells via the mitochondrial pathway and the action mechanism may involve signal transduction related to caspase-3 and Bcl-2.

【Keywords】 colorectal cancer SW620 cell line; ropivacaine; mitochondrial pathway; apoptosis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见消化道肿瘤,可能与结肠炎症进展、饮食习惯、遗传等多种因素有关,发病率和死亡率较高^[1]。CRC 早期一般无特异性症状,就诊时大多已发展至肿瘤的中晚期,常规的手术切除治疗难以清除病灶组织,术后需要辅以放化疗来降低复发风险^[2-3]。但长期大量使用化疗药物会杀伤机体正常细胞,引起骨髓抑制、肝肾毒性等,影响化疗效果^[4]。寻找一种辅助治疗 CRC 的药物来抑制肿瘤的增殖促进其凋亡尤为重要。罗哌卡因是一类酰胺类的新型局部麻醉药,具有对心脏毒性小、麻醉时间长等优点^[5]。Qin 等^[6]研究表明,罗哌卡因可以抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭及迁移,并促进其凋亡。高聪等^[7]研究表明:罗哌卡因可以有效抑制结肠癌细胞增殖,但关于罗哌卡因诱导人结直肠 SW620 细胞株凋亡的机制研究尚不明确。因此本研究选择从线粒体通路途径探究罗哌卡因对人结直肠 SW620 细胞株凋亡的作用及可能的机制,旨在为 CRC 患者治疗提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

结直肠 SW620 细胞株购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

青霉素和链霉素(北京索莱宝科技有限公司); RPMI1640 培养基、胎牛血清(美国 Hyelone 公司); Bcl-2 抗体(货号:ab32124;批号:190807)、Bax 抗体(货号:ab32503;批号:191011)、Caspase-3 抗体(货号:ab13847;批号:190701)、Caspase-3 抗体(货号:ab32539;批号:190904)购自美国 Abcam 公司。离心机(型号:TGL-16M,济南来宝医疗器械有限公

司);流式细胞仪(型号:CytoFLE,美国贝克曼有限公司);显显微镜(型号:WMS-1037)购自上海无陌光学仪器有限公司;细胞培养箱(型号:ZSP-350S,上海左乐仪器有限公司);蛋白电泳及转膜仪及相关系统(美国伯乐公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将冻存的结直肠 SW620 细胞株接种于含质量分数为 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,置于温度为 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中培养过夜,当细胞生长融合至 80%左右,加入胰蛋白酶进行消化,传代培养。

1.3.2 CCK-8 检测细胞活性

当细胞在细胞培养箱中生长汇合率达到 80%时将细胞传代接种至 24 孔板中(每孔 100 μL),使用不同浓度的罗哌卡因处理(1、5、10、20、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$)放入温度为 37℃、CO₂ 浓度为 5%的培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后,分别培养 0、1、2、3 d 后加 10 μL CCK-8 溶液培养 2 h 后使用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度值,计算结直肠 SW620 细胞的增长率。抑制率(%) = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞膜电位及细胞周期和凋亡情况

取与相应药物孵育至对数生长期的结直肠 SW620 细胞接种于 24 孔板内,采用 PBS 调整细胞浓度至每毫升 6×10^5 个,培养 48 h 后收集细胞,一部分放入流式细胞样管中,使用离心机在 2000 r/min 的条件下离心 5 min,弃上清,加入浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Rhodamine 200 μL 避光孵育 30 min,使用流式细胞仪分析结直肠 SW620 细胞的膜电位情况。

另一部分加入 200 μL 质量分数为 50 ng/L 的 PI 和质量分数为 20 ng/L 的 Nase A 染液,在温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下,共同孵育 30 min,上用流式细胞仪分析结直肠 SW620 细胞周期及凋亡率情况。

1.3.4 Western blot 检测结直肠 SW620 细胞蛋白表达水平

取与相应药物孵育至对数生长期的结直肠 SW620 细胞,离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min),采用裂解液裂解后提取总蛋白。依次进行电泳、转 PVDF 膜,加入质量分数为 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗 Bcl-2, Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 抗体 (稀释比例均为 1:500),温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,加入二抗,常规孵育 2 h,计算各蛋白相对内参蛋白为 GADPH 的表达水平。

1.4 统计学方法

采用软件为 GraphPad Prism5 软件作图,采用软件为 SPSS 22.0 软件分析所有试验数据,多组间比较使用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CCK-8 检测癌细胞活力结果

使用 CCK-8 实验检测使用不同浓度罗哌卡因处理后发现,当使用罗哌卡因浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,对结肠癌细胞的抑制率约为 (92.01 $\pm$ 4.00)% 显著低于使用哌卡因浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时的抑制率 (99.00 $\pm$ 0.01)%;随着使用罗哌卡因浓度增加,结肠癌细胞的抑制率逐渐降低 ($P<0.05$),依据本实验检测结果显示,结直肠癌 SW620 细胞的半数致死浓度约为 69.36 $\mu\text{g/mL}$,见图 1。

2.2 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞线粒体膜电位影响

检测各组细胞线粒体膜电位发现,相比结直肠癌 SW620 细胞,低剂量罗哌卡因组细胞膜电位显著降低 ($P<0.01$);相比低剂量罗哌卡因组,中剂量罗哌卡因组细胞膜电位显著降低 ($P<0.01$);相比中剂量罗哌卡因组,高剂量罗哌卡因组细胞膜电位显著降低 ($P<0.01$),见图 2。

2.3 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞周期及凋亡影响

检测罗哌卡因对各组人结直肠癌 SW620 细胞周期及凋亡影响发现,相比结直肠癌细胞组,低剂量罗哌卡因组 G0/G1 期细胞比例和细胞凋亡率均显著升高, G2/M 期和 S 期细胞比例均显著降低 ($P<0.01$);相比低剂量罗哌卡因组,中剂量罗哌卡因组

G0/G1 期细胞比例和细胞凋亡率均显著升高, G2/M 期和 S 期细胞比例均显著降低 ($P<0.01$);相比中剂量罗哌卡因组,高剂量罗哌卡因组 G0/G1 期细胞比例和细胞凋亡率均显著升高, G2/M 期和 S 期细胞比例均显著降低 ($P<0.01$)。见表 1。

2.4 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞凋亡蛋白表达影响

蛋白质印迹法检测各组细胞凋亡蛋白发现,相比结直肠癌细胞组,低剂量罗哌卡因组 Bcl-2、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达显著升高, Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$);相比低剂量罗哌卡因组,中剂量罗哌卡因组 Bcl-2、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达显著升高, Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$);相比中剂量罗哌卡因组,高剂量罗哌卡因组 Bcl-2、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达显著升高, Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$),见图 3 和表 2。

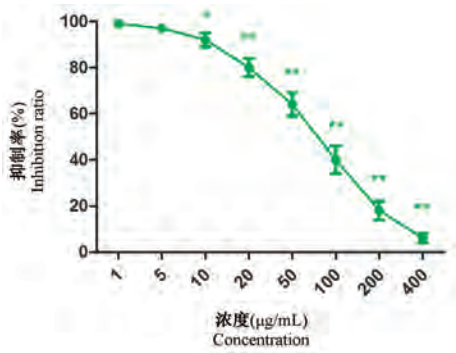
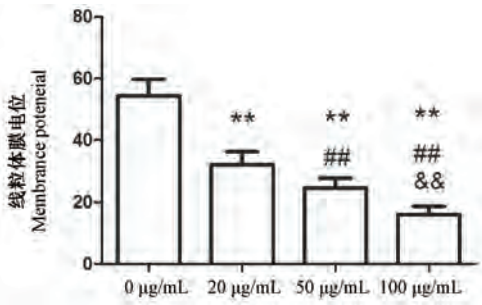


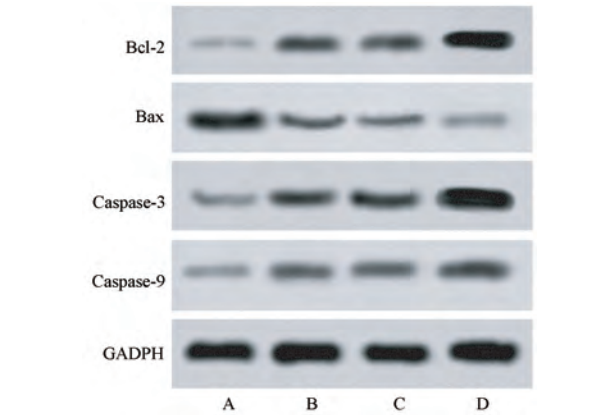
图 1 CCK-8 检测癌细胞活力结果 ($n=24$)
Figure 1 Viability of cancer cells detected by CCK-8



注:与结直肠癌细胞组相比, ** $P<0.01$;与低剂量罗哌卡因组相比, ### $P<0.01$;与中剂量罗哌卡因组相比, && $P<0.01$ 。

图 2 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞线粒体膜电位影响 ($n=24$)
Note. Compared with colorectal cancer cell group, ** $P<0.01$. Compared with low-dose ropivacaine group, ### $P<0.01$. Compared with medium-dose ropivacaine group, && $P<0.01$.

Figure 2 Effects of ropivacaine on MMP in human CRC cells



注:A:结直肠癌细胞组;B:低剂量罗哌卡因组;C:中剂量罗哌卡因组;D:高剂量罗哌卡因组。

图 3 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞凋亡蛋白表达影响 (n=24)

Note. A, CRC cell group. B, Low-dose ropivacaine group. C, Medium-dose ropivacaine group. D, High-dose ropivacaine group.

Figure 3 Effects of ropivacaine on the expression of apoptosis proteins in human CRC cells

表 1 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞周期及凋亡影响 (x̄±s, n=24)
Table 1 Effects of ropivacaine on the cycle and apoptosis of human CRC cells

组别 Groups	细胞周期分布期 Distribution of cell cycle			细胞凋亡率 (%) Apoptosis rates
	G0/G1 期 Stage G0/G1	G2/M 期 Stage G2/M	S 期 Stage S	
结直肠癌细胞组 CRC cell group	53.16±1.68	18.35±0.88	28.49±1.25	1.52±0.11
低剂量罗哌卡因组 Low-dose ropivacaine group	60.21±1.70**	16.80±0.50**	22.99±1.08**	35.91±5.69**
中剂量罗哌卡因组 Medium-dose ropivacaine group	66.07±2.01**##	15.00±0.41**##	18.93±0.97**##	46.27±6.57**##
高剂量罗哌卡因组 High-dose ropivacaine group	71.28±2.11**##&	14.01±0.32**##&	14.71±0.80**##&	69.36±8.01**##&
F	410.421	274.707	769.191	559.203
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与结直肠癌细胞组相比, ** P<0.01;与低剂量罗哌卡因组相比, ## P<0.01;与中剂量罗哌卡因组相比, & P<0.01。
Note. Compared with CRC cell group, ** P<0.01. Compared with low-dose ropivacaine group, ## P<0.01. Compared with medium-dose ropivacaine group, & P<0.01.

表 2 罗哌卡因对人结直肠癌 SW620 细胞凋亡蛋白相对表达量影响 (x̄±s, n=24)
Table 2 Effects of ropivacaine on the relative expression levels of apoptosis proteins in human CRC cells

组别 Groups	Bcl-2/GADPH	Bax/GADPH	Caspase-3/GADPH	Caspase-9/GADPH
结直肠癌细胞组 CRC cell group	0.21±0.04	1.08±0.19	0.49±0.07	0.45±0.07
低剂量罗哌卡因组 Low-dose ropivacaine group	0.45±0.07**	0.74±0.12**	0.80±0.11**	0.76±0.10**
中剂量罗哌卡因组 Medium-dose ropivacaine group	0.59±0.10**##	0.62±0.09**##	0.91±0.12**##	0.84±0.12**##
高剂量罗哌卡因组 High-dose ropivacaine group	0.89±0.12**##&	0.40±0.07**##&	1.18±0.20**##&	0.99±0.15**##&
F	250.511	121.953	109.580	96.000
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与结直肠癌细胞组相比, ** P<0.01;与低剂量罗哌卡因组相比, ## P<0.01;与中剂量罗哌卡因组相比, & P<0.01。
Note. Compared with CRC cell group, ** P<0.01. Compared with low-dose ropivacaine group, ## P<0.01. Compared with medium-dose ropivacaine group, & P<0.01.

3 讨论

细胞凋亡是指由基因调控的细胞自主性的程序性死亡,细胞主要通过细胞的凋亡调控内环境^[8]。目前研究表明,细胞凋亡主要有 3 种途径: Bcl-2/Bax 介导的线粒体细胞凋亡通路、死亡受体途径介导的细胞凋亡通路和内质网通路^[9]。其中线粒体通路是目前研究的凋亡通路中最经典的凋亡通路。Baechler 等^[10]研究表明:线粒体通路途径可通过改变线粒体膜通透性,引起细胞膜内外 Ca²⁺平衡被打破,使得细胞膜内外出现电位差,当线粒体膜电位降低会导致线粒体呼吸(电子传递)加速,氧自由基生成增加,发生氧化应激反应使得细胞凋亡。因此本研究检测了各组膜内外电位变化,发现相比结直肠癌细胞组,使用罗哌卡因各组细胞膜电位显著降低。说明使用罗哌卡因可以改变线粒体膜通透性,导致膜内外 Ca²⁺平衡被打破,降低细胞膜内电位,促进氧化应激反应诱导细胞凋亡。

线粒体通路途径诱导细胞凋亡除了通过改变粒体膜通透性引起膜电位差外,还可以通过活化 Caspase 等蛋白酶家族,诱导凋亡相关因子的释放等,引起细胞凋亡的级联反应,最终导致细胞凋亡^[11]。目前研究较多的细胞凋亡相关蛋白家族主要包括 Caspase 家族和 Bcl-2 家族。Caspase 家族中 Caspase-3 是常见的启动子,Caspase-9 是常见的执行子^[12]。当细胞接收到凋亡信号后会激活 Caspase-3,促进 Caspase-9 自身裂解产生 pro-Caspase-9,并反过来再次活化 Caspase-3 引发细胞凋亡的级联反应^[13]。除了 Caspase 家族,在 Bcl-2 家族中主要包括促凋亡基因 Bcl-2 和抑凋亡基因 Bax^[14]。本研究通过蛋白质印迹实验发现,相比结直肠癌细胞组,使用罗哌卡因处理各组结直肠癌 SW620 细胞中 Bcl-2 蛋白、Caspase-3 蛋白和 Caspase-9 蛋白相对表达水平升高,Bax 蛋白表达下降。说明罗哌卡因处理可以激活 Caspase 家族中的凋亡启动子并促进 Bcl-2 家族中的促凋亡基因的表达。王文婷等^[15]研究表明:罗哌卡因作用结直肠癌 SW620 细胞后可以调节凋亡相关蛋白表达,诱导肿瘤细胞凋亡,本研究得出的结论与其相一致。

细胞周期可分为 4 个时相:G₁、S、G₂、M。其中 G₁ 期是 DNA 合前期,主要合成 RNA 和核糖体;G₂ 期是 DNA 合成后期,主要是 RNA 和蛋白质的合成;M 期是细胞裂期,所有细胞执行定物功能;S 期是分裂期^[16]。在细胞周期中每一个误差都可能导致遗传信息的改变^[17]。本研究通过检测细胞周期发现,相比结直肠癌细胞,使用罗哌卡因各组 G₀/G₁ 期细胞比例和细胞凋亡率均显著升高,G₂/M 期和 S 期细胞比例均显著降低。姬宁宁等^[18]研究表明:罗哌卡因可以通过阻滞细胞周期,抑制癌细胞的增殖。研究结果说明使用罗哌卡因可以有效将 SW620 细胞阻滞与 G₀/G₁ 期,这可能是因为用罗哌卡因将阻滞了结直肠癌 SW620 细胞合成 RNA 和核糖体并使得细胞分裂所需的必要蛋白合成受阻导致癌细胞的增殖受到抑制。

综上所述,罗哌卡因可以通过线粒体途径促进人结直肠 SW620 细胞的凋亡,其作用机制可能与 Caspase-3 及 Bcl-2 信号传导相关。

参考文献:

- [1] 杜灵彬,李辉章,王悠清,等. 2013 年中国结直肠癌发病与死亡分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(9): 701-706.
- [2] Kanjanasilp P, Ng JL, Kajohnwongsatit K, et al. Anatomical variations of iliac vein tributaries and their clinical implications

- during complex pelvic surgeries [J]. Dis Colon Rectum, 2019, 62(7): 809-814.
- [3] Fehm HL, Späth-Schwalbe E, Pietrowsky R, et al. Adenoma recurrence rate after left-versus right-sided colectomy for colon cancer; is there really a difference between the two groups [J]. Endoscopy, 2018, 50(4): 87-92.
- [4] Sobrero A, Grothey A, Iveson T, et al. The hard road to data interpretation: three or six months of adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer [J]. Ann Oncol, 2018, 29(5): 1099-1107.
- [5] Li A, Yang F, Xin J, et al. An efficient and long-acting local anesthetic: ropivacaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for the control of pain [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 913-920.
- [6] Qin A, Liu Q, Wang J. Ropivacaine inhibits proliferation, invasion, migration and promotes apoptosis of papillary thyroid cancer cells via regulating ITGA2 expression [J]. Drug Dev Res, 2020, 81(6): 700-707.
- [7] 高聪,林大勇,韩勇,等. 罗哌卡因对结肠癌细胞增殖和裸鼠人结肠癌皮下瘤生长的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 558-563.
- [8] Pentimalli F, Grelli S, Di Daniele N, et al. Cell death pathologies: targeting death pathways and the immune system for cancer therapy [J]. Genes Immun, 2019, 20(7): 539-554.
- [9] 马盛,李筠. 受细胞内信号通路调控的细胞死亡机制研究进展 [J]. 青岛大学学报(医学版), 2018, 54(6): 747-749.
- [10] Baechler BL, Bloemberg D, Quadriatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [J]. Autophagy, 2019, 15(9): 1606-1619.
- [11] 陈晶晶,刘玲,曹梦瑶,等. PABA/一氧化氮经活性氧-线粒体膜电位途径诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(19): 2356-2360.
- [12] Zhou M, Liu X, Li Z, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells [J]. Int J Cancer, 2018, 143(4): 921-930.
- [13] Tamura R, Takada M, Sakaue M, et al. Starfish Apaf-1 activates effector caspase-3/9 upon apoptosis of aged eggs [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1611.
- [14] 丁实,赵学荣,李宝群,等. 基于 Bcl-2/Bcl-1 复合体探讨黄连素对脑缺血再灌注损伤大鼠模型的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 651-657.
- [15] 王文婷. 罗哌卡因对人结肠癌 SW620 细胞株增殖、凋亡影响的研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2016.
- [16] 宛栋,王浩,高兰妹,等. 细胞周期不同时期的肿瘤细胞光散射特性 [J]. 激光杂志, 2019, 40(11): 25-28.
- [17] 陈云茹,丹增措姆,白文东,等. SFPQ 在肝细胞癌的表达及其对细胞增殖与细胞周期的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(1): 49-57.
- [18] 姬宁宁,夏明,花景煜,等. 罗哌卡因对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长,凋亡诱导和周期阻滞的影响 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(21): 3527-3530.

乔梁,胡山岗,李荣霞. 基于 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 93-100.

Qiao L, Hu SG, Li RX. Wenyanghuayin decoction ameliorates the airway remodeling associated with bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation in the lungs of rats via the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 93-100.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 014

基于 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的作用机制

乔 梁¹, 胡山岗¹, 李荣霞^{2*}

(1.河南省中医院急诊科, 郑州 450002; 2.青海省人民医院急救中心, 西宁 810007)

【摘要】 目的 探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的作用以及对 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路的调节作用。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、对照组、实验组 ($n=15$) ; 先以卵蛋白 (OVA) 致敏刺激和雾化进行造模形成支气管哮喘模型大鼠, 后以冰水喂养给以“饮冷”刺激, 冰箱冷冻给以“形寒”刺激进行寒饮蕴肺证造模。实验组和对照组大鼠以剂量为 30 mg/kg 的温阳化饮方和雷帕霉素溶液 (以医用生理盐水进行溶解) 进行灌胃给药, 正常组和模型组以等剂量的医用生理盐水灌胃, 连续灌胃 22 d。小动物肺功能分析仪测定大鼠的肺功能; TUNEL 检测肺组织中的细胞凋亡; ELISA 法检测血清中细胞因子白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的含量; Western blot 检测肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2 的表达。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠吸气时的气道阻力 (Rinsp) 和呼气时的气道阻力 (Rexp), 血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量, 细胞凋亡率, p-ERK1/2、p-p38 MAPK、Bax 的表达出现明显升高, 肺胸通气时的动态顺应性 (Cdyn)、Bcl-2 的表达出现明显下降 (均 $P<0.05$) , 与模型组相比, 对照组和实验组大鼠 Rinsp 和 Rexp、血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量, 细胞凋亡率, p-ERK1/2、p-p38 MAPK、Bax 的表达出现明显下降, Cdyn、Bcl-2 出现明显升高 (均 $P<0.05$) 。**结论** 在支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型中, 温阳化饮方能明显抑制炎症因子的释放, 降低肺组织的细胞凋亡, 这可能与抑制 ERK1/2 和 p38MAPK 信号有关。

【关键词】 温阳化饮方; 支气管哮喘寒饮蕴肺证; ERK1/2 和 p38MAPK 信号

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0093-08

Wenyanghuayin decoction ameliorates the airway remodeling associated with bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation in the lungs of rats via the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways

QIAO Liang¹, HU Shangang¹, LI Rongxia^{2*}

(1. Emergency Department, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China.
2. Emergency Center, Qinghai People's Hospital, Xining 810007)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism whereby Wenyanghuayin decoction ameliorates airway remodeling in rats with bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation, focusing on the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways. **Methods** Sprague Dawley rats were randomly allocated to normal, model, control, and experimental groups ($n=15$ each). Ovalbumin sensitization, stimulation, and atomization were used to induce bronchial asthma in the model rats, then iced water feeding was stimulated by “cold drinking” and freezing in a refrigerator was stimulated by

[作者简介] 乔梁 (1975—), 男, 主治医师, 本科, 研究方向: 重症医学。E-mail: 179362337@qq.com

[通信作者] 李荣霞 (1978—), 女, 主任医师, 本科, 研究方向: 重症医学。E-mail: 923140188@qq.com

“form cold” to model the syndrome of cold drink accumulating in the lung. Rats in the experimental and control groups were administered 30 mg/kg Wenyanghuayin decoction or rapamycin in physiological saline by gavage, respectively, and the normal and model groups were administered the same volume of normal saline for 22 consecutive days. A small and micro animal lung function analyzer was used to assess the lung function of the rats. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis in lung tissue. ELISA kits were used to measure the serum concentrations of interleukin (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Western blot was used to measure the expression of p-ERK1/2, p-p38 MAPK, the apoptosis-related protein Bax, and Bcl2 in lung tissue. **Results** Compared with the normal group, the airway resistance during inhalation (Rinsp) and expiration (Rexp), the serum concentrations of IL-6 and TNF- α , the rate of apoptosis, and the expression of p-ERK1/2, p-p38 MAPK, and Bax were significantly higher, and the dynamic compliance (Cdyn) and expression of Bcl-2 were significantly lower (all $P < 0.05$) in the model group than in the control group. The Rinsp and Rexp, serum IL-6 and TNF- α , apoptosis rate, and expression of p-ERK1/2, p-p38 MAPK, and Bax were significantly lower; and the Cdyn and the expression of Bcl-2 were significantly higher than in the control and experimental groups (all $P < 0.05$). **Conclusions** In a rat model of airway remodeling during bronchial asthma and syndrome of cold fluid accumulation in the lung, Wenyanghuayin decoction significantly inhibits the release of proinflammatory factors and reduces lung cell apoptosis, which may be mediated via inhibition of ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways.

[Keywords] Wenyanghuayin decoction; airway remodeling of bronchial asthma with syndrome of cold fluid accumulation; ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathway

支气管哮喘是主要是炎症反应导致的累及肺组织和气管的迁延不愈的慢性疾病。临床上主要表现为胸闷、反复咳嗽、呼吸急促、喘息等症状,尚无根治性治疗手段,严重影响患者的生活质量,甚至是危及患者生命的安全。近年来,该病的发病率随工业化进程导致的环境污染的加剧而逐年上升^[1]。传统的中医药技术在控制呼吸系统炎症性反应方面具有明显的优势。支气管哮喘在中医上被称为“哮”病。寒饮蕴肺证症是“哮”病中最为常见的临床证候,机体阳气不足,肺主行水功能失调,水饮蕴积与肺,使患者出现肺阳不足,宣降失常,痰阻气滞,逐渐发展成寒饮滞留于肺^[2]。

中医师在长期的一线探索中,已经证实^[3]厚朴麻黄汤、小青龙汤等中药方剂具有宣发肃降,温补阳气,蠲化凝痰等疗效。中医传统名方——温阳化饮方主要由麻黄、五味子、桂枝、干姜、甘草、生白芍等味中药组成,是用来控制阳虚寒饮内停证候的常用方法。颜培正等^[4]研究证实温阳化饮方能明显改善“形寒饮冷”的哮喘病寒饮蕴肺证大鼠的肺功能,降低模型大鼠的死亡率。但是未深入探讨本药方对疾病的作用机制。

细胞外信号调节蛋白激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 和 p38 丝裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)是真核生物体内将胞外信号传递进胞核内的与炎症性应激密切相关的通路之一。研究表明 ERK1/2 和 p38MAPK 信号在细胞的炎症性应激

中参与调控炎症因子的分泌与释放,并且调节应激中细胞的分化和凋亡^[5]。已有大量的动物研究表明 ERK1/2 和 p38MAPK 信号在变应性鼻炎、鼻窦炎、支气管哮喘以及慢性阻塞性肺等慢性呼吸系统疾病中表达异常^[6]。本研究通过建立支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型,从炎症角度以及气道组织结构变化入手,基于 ERK1/2 和 p38MAPK 信号,来探讨温阳化饮方对支气管哮喘寒饮蕴肺证的作用机制,为中医药传统名方的临床应用提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠,8~10 周龄,体重(180±20)g,共计 60 只,从河南省实验动物中心采购[SCXK(豫)2017-0001],动物饲养在河南天致药业有限公司的 SPF 级实验动物房内[SYXK(豫)2020-0007];本研究中所有动物实验操作均在 3R 原则的指导下给与实验动物人道主义关怀,本研究经本院实验动物管理伦理委员会审核批准(IACUC 2020-068)。

1.2 主要试剂与仪器

温阳化饮方(由我院主任医师的处方,主要由麻黄、五味子、桂枝、干姜、甘草、生白芍、黄芪、人参各 10 g,细辛 5 g,黄芩 25 g 等组成,在我院的中药房抓取,并由专业中药师进行常规煎煮)。雷帕霉素(西罗莫司胶囊,0.5 mg×20 粒,华北制药股份有限公司,国药准字:H20100079)。

卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA, 每瓶 25 g, 美国 Sigma 公司, 生产批号: 350741); p-ERK1/2 (生产批号: 59042190)、p-p38 MAPK (生产批号: 59364925) 抗体 (美国 abcam 公司); 兔抗大鼠磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (生产批号: TD90M-21) 抗体 (美国 Thermo 公司); TUNEL 试剂盒 (生产批号: 45G6007) (北京华夏远洋科技有限公司); 苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosinstaining, HE) 试剂盒 (生产批号: YN-093M) (上海碧云天生物技术公司); 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (生产批号: BS-0934) (美国 Amresco 公司)。

OLYMPUS 生物显微镜 (生产批号: 6489M, Olympus 公司, 日本); -80℃ 深冷冰箱 (生产批号: 4BG5-02, 维根斯公司, 德国); Leica RM2135 组织切片机 (生产批号: V5679-0A, Leica 公司, 德国); 高速低温离心机 (生产批号: 18-00 MH, 北京六一仪器厂); 微小动物超声雾化器 (生产批号: 2XS73, Delong America 公司, 加拿大)。

1.3 实验方法

1.3.1 支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型的构建

(1) 支气管哮喘模型大鼠的造模步骤

大鼠经适应性喂养一周后, 随机分为正常组、模型组、对照组、实验组 ($n=15$)。参考文献^[7]对大鼠先进行致敏刺激, 即在第 1、8 天腹腔注射 1 mL 的抗原液 (主要有 100 mg OVA、100 mg 氢氧化铝以及 5×10^9 个已经灭活的百日咳杆菌疫苗组成), 正常组大鼠腹腔注射等剂量的医用生理盐水; 从第 15 天开始, 造模大鼠在微小动物超声雾化器上进行雾化激发, 即雾化液为: 1% OVA, 频次为: 每天一次, 持续时长为: 20 min, 不间断进行 8 d, 正常组大鼠的雾化液为医用生理盐水, 时长和频次同上。

(2) 中医中大鼠寒饮蕴肺证模型的造模步骤

除第 1、8 天外, 每天需给大鼠施加“饮冷”刺激, 即每天在 8:00AM-8:00PM 时间段中, 给大鼠 0℃ 的冰水混合物, 随后施加“形寒”刺激: 将大鼠每天放置在预先设定 0℃ 的冰箱中 3 h, 待大鼠机体恢复正常后, 准备 25℃ 上下的水, 让大鼠在其中游泳, 当其精疲力竭, 使鼻孔没入水中时, 将其捞出; 从第 15 天开始, 各组大鼠每日经雾化激发后, 放置在预先设定 0℃ 的冰箱中 3 h, 待大鼠机体恢复正常后, 准备 25℃ 上下的水, 让大鼠在其中游泳 15 min, 维持 8 d。正常组大鼠不用进行“饮冷”、“形寒”刺激,

期间所有大鼠以标准基础饲料喂养^[8]。

1.3.2 各组大鼠的药物干预

本研究中大鼠的用药剂量根据成人 (60 kg) 温阳化饮方煎剂日用药量进行计算^[9], 得出实验组大鼠的温阳化饮方的剂量约为 30 mg/kg, 本研究所用药方煎剂经本课题组专门医师在医院药房统一煎煮, 给大鼠进行药物处理前均在 25℃ 恒温水箱内放置 10 min。从造模开始第 2 天开始, 实验组和对照组大鼠以剂量为 30 mg/kg 的温阳化饮方和雷帕霉素溶液 (以医用生理盐水进行溶解) 进行灌胃给药, 正常组和模型组以等剂量的医用生理盐水灌胃, 连续灌胃 22 d。

1.3.3 各组大鼠肺功能的测定

造模过程中观察并记录各组大鼠的日常状态和习惯, 主要包括体重、饮水量、饮食量、精神状态、呼吸状况、活动量等。在进行肺功能测试时大鼠禁食不禁水 24 h, 腹腔注射 75 mg/kg 的戊巴比妥钠进行麻醉, 小动物肺功能分析仪测定大鼠肺功能^[10], 呼吸比: 15:10, 呼吸机参数为: 每分钟 75 次, 记录各组大鼠吸气时的气道阻力 (Rinsp)、呼气时的气道阻力 (Rexp)、肺胸通气时的动态顺应性 (Cdyn)。

1.3.4 各组大鼠的肺以及气管组织的病理学改变

测试完毕后, 留取 5 mL 血, 处死大鼠, 无菌剥离大鼠的肺以及气管组织, 经液氮分封存后, 放置在深冷冰箱中待测。取出各组 0.5 cm×0.5 cm 大小的肺以及气管组织, 采用 10% 的甲醛固定 24 h 切片, HE 染色, 光镜下观察病理改变。

1.3.5 电镜观察各组大鼠肺和气管组织的超微结构改变

取出各组 0.5 cm×0.5 cm 大小的肺以及气管组织, 分别制成 0.3 cm×0.5 cm 大小的超薄组织切片: 2.5% 戊二醛固定 8 h, 清洗 3 次后, 梯度浓度乙醇脱水, 置于 -20℃ 冰箱中干燥过夜, 透射电镜下观察各组大鼠的肺和气管组织超微病理结构改变。

1.3.6 TUNEL 染色检测各组大鼠肺组织中的细胞凋亡

取出各组 0.5 cm×0.5 cm 大小的肺组织, 经固定, 冰冻切片, 梯度乙醇浸洗, 风干后 3% 双氧水-甲醇浸泡, 清洗, 依次采用 0.1% TritonX-100, 0.1% 缓冲液浸泡, 清洗后, 加入 TUNNEL 反应液, 暗湿盒反应, 漂洗, 脱水, 透明, 封片, 荧光显微镜下观察。

1.3.7 ELISA 法检测各组大鼠血清中细胞因子白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的含量

取出 50% 的各组大鼠的血清,冰上解冻,根据 IL-6 和 TNF- α 试剂盒要求,绘制目标蛋白的标准曲线后,进行测定。

1.3.8 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 p-ERK1/2、p-p38MAPK、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2 的表达水平

从冰箱中取出 10% 大鼠肺组织,采用常规方法提取总蛋白,测定蛋白浓度后,准确量取 50 μ g,电泳将蛋白分离,转膜,脱脂奶粉封闭,以(1:500)比例稀释后,维持 4℃ 过夜孵育,次日,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:1500),经显色、曝光、显影、定影后,以 GAPDH 为内参来表示蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

数据统计采用 SPSS 16.0 软件,作图工具采用 Graphpad5.01,采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示符合正态分布的计量资料,采用单因素方差分析进行多组间比较,若差异存在统计学意义,则进一步组间两两比较采用 Dunnett 检验,当 $P<0.05$ 表示差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验过程中各组大鼠的一般情况

正常组大鼠精神状态良好,呼吸正常,活动量较多,反应机敏,皮毛浓密且富有光泽,进食、饮水规律,形体健壮,口、鼻等器官内无异常分泌物。模型组大鼠精神状态不佳,进食、饮水较少,喜静懒动,好扎堆,反应迟缓,皮毛粗糙,暗淡,脱落明显,呼吸急促,伴有咳嗽,骚鼻等行为,口、鼻等部位,均出现较多的粘性分泌物,大便不成形,不规律,形体日趋消瘦。对照组大鼠精神状态较模型组明显改善,饮食、饮水较为规律,呼吸较为平稳,偶有咳嗽,口、鼻的粘性分泌物明显减少,皮毛稍见脱落,体重较模型组明显增加。实验组大鼠的反应较为灵敏,已经无扎堆状况,呼吸节律趋于均匀,大小便趋于正常,饮水、饮食量较模型组明显增加,大鼠的体重增加明显。

2.2 各组大鼠肺功能的比较

各组大鼠肺功能检测结果显示,与正常组相比,模型组大鼠 Rinsp 和 Rexp 出现明显升高, Cdyn 出现明显下降(均 $P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠 Rinsp 和 Rexp 出现明显下降, Cdyn 出现明显升高(均 $P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 1。

2.3 各组大鼠肺组织的病理学损伤和超微结构的改变

HE 染色结果显示,正常组大鼠肺组织细胞排列规整,肺泡大小均匀,结构完整,未见炎性细胞浸润;模型组大鼠肺组织肺泡腔内大量炎性细胞填充,肺泡壁增厚明显,正常肺泡结构数量明显减少,间质充血明显,周围组织肿胀明显;对照组和实验组大鼠的肺组织病理损伤明显缓解,偶见炎性细胞渗出,肺泡结构趋于正常,见图 2。

电镜下观察各组大鼠的肺组织的超微结构改变结果显示,正常组大鼠肺组织内肺泡数量丰富,间质细胞内的线粒体排列规整,嵴结构完整,染色质的状态正常,核膜未见异常;模型组大鼠肺组织的线粒体数量明显减少,嵴结构排列紊乱,重叠、溶解明显,核膜缺损明显,染色质固缩严重;对照组和实验组大鼠肺组织的线粒体的数量明显有所回升,嵴结构的数量较模型组明显增加,嵴间腔明显减小,排列趋于正常,见图 3。

2.4 各组大鼠气管组织的病理学损伤和超微结构的改变

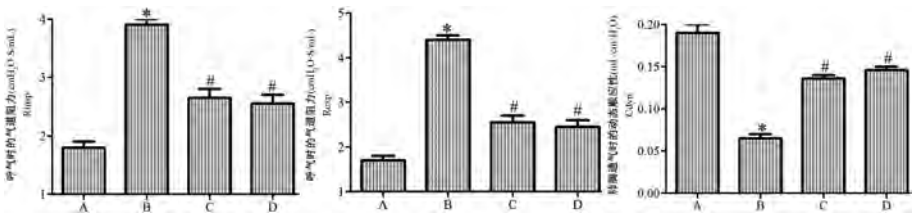
HE 染色结果显示,正常组大鼠气管组织结构完整,纤毛排列整齐,长度均一,支气管管腔通畅,平滑肌厚度均匀,未见异常;模型组大鼠气管粘膜上皮细胞可见明显的粘液物,支气管管腔内可见大量的炎性细胞填充,多处出现渗血点,纤毛粘连严重;对照组和实验组大鼠的气管组织的炎性损伤明显缓解,气管粘膜上皮细胞的纤毛排列趋于规整,稍见出血点和渗出物,但气管组织的病理损伤较模型组明显减轻,见图 4。

电镜下观察各组大鼠的气管组织的超微结构改变结果显示,正常组大鼠气管组织粘膜上皮细胞内,线粒体结构完整,嵴结构清晰可辨,核质界限清晰;模型组大鼠气管组织粘膜上皮细胞肿胀明显,线粒体失去正常结构,嵴结构或变短,或缺损,或消失,核质界限不明,染色质固缩严重;对照组和实验组大鼠气管组织的线粒体的数量明显有所回升,嵴结构趋于正常,核质界限趋于分明,核仁较为明显,见图 5。

2.5 TUNEL 检测各组大鼠肺组织细胞的凋亡

TUNEL 结果显示,与正常组相比,模型组大鼠肺组织的细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠肺组织的细胞凋亡率明显下降($P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 6。

Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组

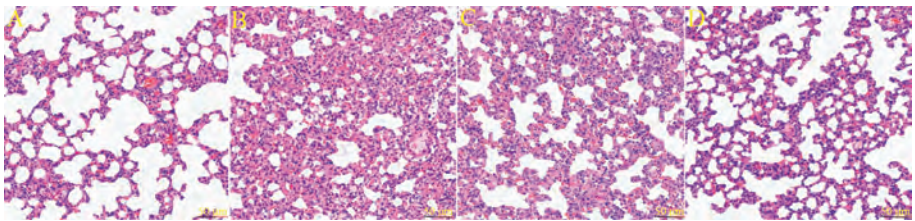


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠的肺功能

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 1 Lung function of rats in each group

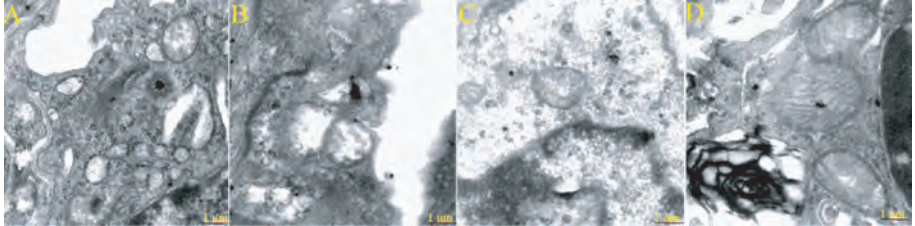


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。

图 2 肺组织病理改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 2 Pathological changes of lung tissue

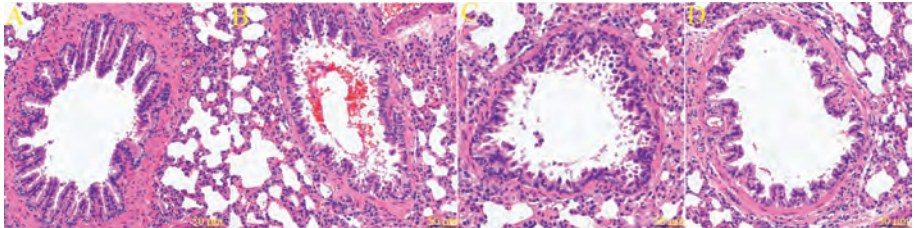


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。

图 3 肺组织超微结构改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 3 Ultrastructural changes in lung tissue



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。

图 4 气管组织病理改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 4 Pathological changes of tracheal tissue

大鼠肺组织中 Bcl-2 的表达明显下降,Bax 的表达明显升高(均 $P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠肺组织中 Bcl-2 的表达明显升高,Bax 的表达明显下降(均 $P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 7。

2.6 ELISA 测定各组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 的含量

ELISA 结果显示,与正常组相比,模型组血清中 IL-6 和 TNF-α 的水平明显升高($P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 的水平明显下降($P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 8。

2.7 Western blot 检测肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达

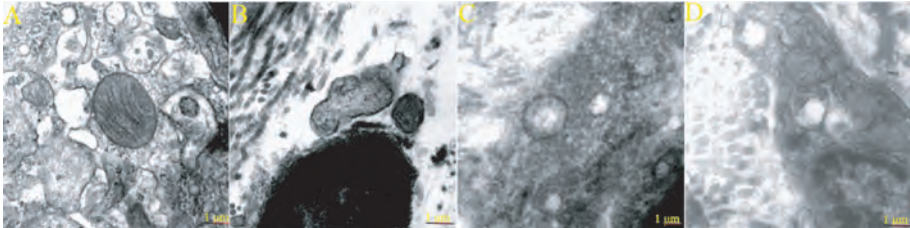
Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组大鼠肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达明显升高($P<0.05$),与模型组相比,对照组和实验组大鼠肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达明显降低($P<0.05$),对照组和实验组相比,差异不具有统计意义($P>0.05$),见图 9。

3 讨论

支气管哮喘是一种异质性的炎症性慢性疾病,

主要的病灶点位于气道以及两侧肺叶。该病受季节变化影响,多在夜间或凌晨使患者出现气促、胸闷、呼吸困难、反复咳嗽等症状,并且该病迁延不愈,容易反复发作,临床上尚无立竿见影的治疗手段,严重影响患者的生活质量^[11]。目前该病的发病人群趋于低龄化,发病率呈不断增长的趋势,严重影响我国的社会公共卫生事业的可持续性发展。虽然西医西药技术在哮喘全球防治倡议(Global Initiative for Asthma,GINA)的规范下有所突破,但是难以使全部患者从中受益^[12]。因此积极探索新的治疗方案在临床上具有重要意义。

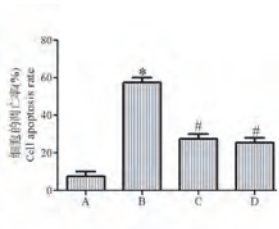
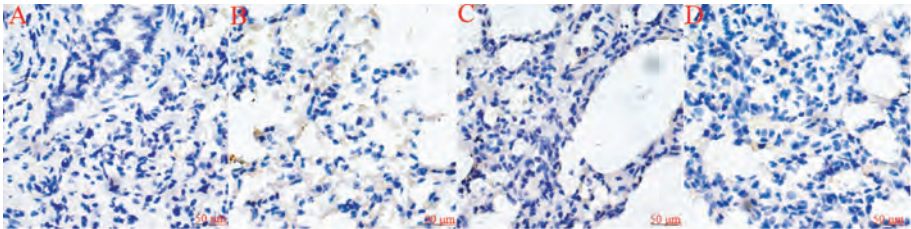
中医大家张仲景在《伤寒论》以及《金匱要略》中明确将支气管哮喘归为“哮证”“喘证”的范畴。寒饮蕴肺证在临床上最为常见^[13]。传统的中医理论认为寒饮蕴肺证由外感于寒,邪气诱发脏腑尤其是肺功能失调,痰饮内伏与肺,痰积气道,浊气难以宣降所致。历史上的中医名家对该证的治疗主要以在“宣肺平喘,温化寒痰”的指导下,以攻邪为主,对患者施以祛痰利气,扶正温阳治疗^[14]。闫伟等^[15]研究表达小青龙汤能明显抑制气道炎症性反应,提高支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠的机体免疫能力。桂素梅等^[16]临床观察表明小青龙汤能明显缓解寒饮内停证哮喘发作期患儿的临床症状。本研



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。
图 5 气管组织超微结构改变

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group.

Figure 5 Ultrastructural changes of tracheal tissue

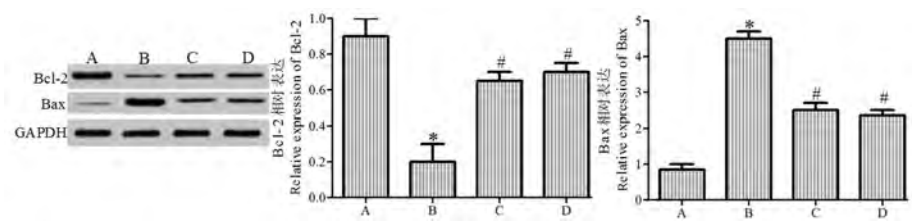


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 6 TUNEL 染色

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$

Figure 6 TUNEL staining

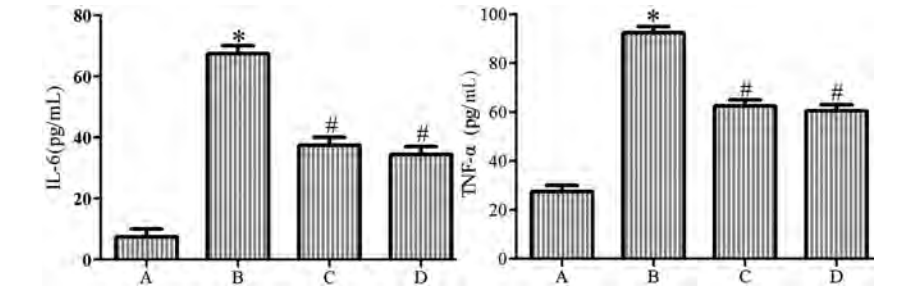


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 7 大鼠肺组织中 Bcl-2、Bax 的表达

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 7 Expression of Bcl-2 and Bax in rat lung tissue

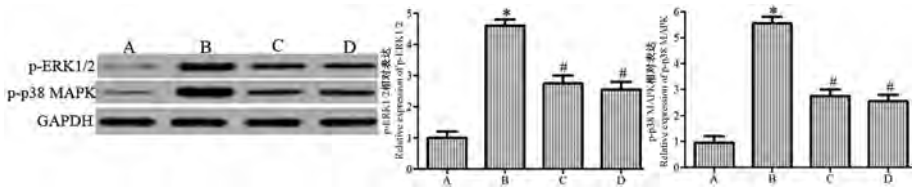


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 8 各组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 的含量

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 8 Levels of IL-6 and TNF-α in serum of rats in each group



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 9 肺组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 的表达

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Control group. D, Experimental group. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 9 Expression of p-ERK1/2 and p-p38 MAPK in rat lung tissue

究中采用的温阳化饮方是在长期的临床探索中的自拟方,本汤剂在传统的小青龙汤的基础上佐以人参、黄芪构成。人参、黄芪具有温补肺阳,调中益气的功效,本药方具有强化温阳化饮的作用,本研究结果显示,实验组大鼠在实验过程的日常行为明显比模型组有所改善,肺功能明显恢复,肺组织和气管组织的病理损伤和超微结构损伤明显缓解,证实了药物对疾病的治疗作用。

阐明药物的作用位点,不仅有利于揭示疾病的

病理机制,并且能更为有力的推动中药的开发以及临床应用。研究显示 ERK1/2 和 p38MAPK 信号在机体内广泛参与调控细胞的增殖、炎性应激、细胞凋亡以及免疫调节等生理病理过程^[17]。研究表明上、下呼吸道以及肺组织等气道组织在进行炎症性应激时,ERK1/2 被激活发生磷酸化,将炎症信号级联放大转录入核,调节 IL-6 和 TNF-α 等多种促炎因子基因的表达^[18]。Meng 等^[19]研究证实,在过敏性哮喘小鼠中,抑制 ERK1/2 信号的磷酸化,能明显改

善小鼠的气道炎症。研究证实在应激条件下,磷酸化后的 p38MAPK 激活相关效应因子的转录基因的表达,一方面推动中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的募集,强化炎症因子的分泌与释放;另一方面磷酸化后的 p38MAPK 是启动细胞凋亡开关(Bcl-2、Bax)的重要因素^[20]。赵嘉涵等^[21]研究表明阻断 p38MAPK 的激活,抑制 p38MAPK 的磷酸化,能明显减轻大鼠在肠缺血再灌注中肺组织的病理损伤。Nie 等^[22]研究证实在脂多糖诱导的急性肺损伤中, p38MAPK 特异性抑制剂能明显降低肺组织的细胞凋亡,缓解肺组织的病理损伤。本研究中实验组大鼠肺组织中的细胞凋亡率以及血清中 IL-6 和 TNF- α 的含量明显降低,肺组织中 ERK1/2、p38MAPK 的磷酸化明显受阻,推断温阳化饮方对支气管哮喘大鼠寒饮蕴肺证的干预作用通过 ERK1/2 和 p38MAPK 信号实现的。

综上所述,在支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠模型中,温阳化饮方能明显抑制炎症因子的释放,降低肺组织的细胞凋亡,这可能与抑制 ERK1/2 和 p38MAPK 信号有关。但是考虑到个人的体质的辩证关系以及对药物的敏感程度,临床上应用治疗支气管哮喘寒饮蕴肺证时需要严格遵守医师的医嘱,进行抓药或者煎煮。

参考文献:

[1] Böll S, Ziemann S, Ohl K, et al. Acid sphingomyelinase regulates T_H 2 cytokine release and bronchial asthma [J]. *Allergy*, 2020, 75(3): 603-615.

[2] 常兴, 张恬, 颜培正, 等. 雾霾的致病机制及其与哮喘寒饮蕴肺证的关系探析 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(8): 3310-3312.

[3] 孟泳, 崔应麟, 李彬. 厚朴麻黄汤对哮喘小鼠血清 IgE、IL-4、IL-13 及半胱氨酰白三烯水平的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2017, 52(2): 193-196.

[4] 颜培正, 孟庆岩, 刘燕, 等. 中药剂量对哮喘寒饮蕴肺证大鼠肺功能的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(4): 843-845.

[5] Zhang L, Liu P, Wen W, et al. IL-17A contributes to myocardial ischemic injury by activating NLRP3 inflammasome in macrophages through AMPK α /p38MAPK/ERK1/2 signal pathway in mice [J]. *Mol Immunol*, 2019, 105(1): 240-250.

[6] Pelaia C, Vatrella A, Sciacqua A, et al. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in COPD: pathobiological implications and therapeutic perspectives [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(5): 485-491.

[7] 颜玺, 薛中峰, 郭亚蕾. 苍耳子挥发油对支气管哮喘大鼠气道炎症的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(8): 915-920.

[8] 刘燕, 颜培正, 张庆祥. 温阳化饮方通过调节 MMP-9 活性干预支气管哮喘寒饮蕴肺证气道重塑的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 279-283.

[9] 陈晶, 侯志涛, 梅婷婷, 等. 温阳化饮、益气活血法对慢性心力衰竭大鼠自噬-凋亡机制的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(2): 168-170, 183.

[10] 申萌萌, 南亚楠, 唐磊, 等. 麦门冬汤对肺纤维化大鼠肺功能及内质网应激作用的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(1): 37-43.

[11] Zhou J, Lu Y, Li F, et al. *In vitro* and *in vivo* Antiallergic Effects of Taurine on Allergic Rhinitis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2020, 181(6): 404-416.

[12] Rajan S, Gogtay NJ, Konwar M, et al. The global initiative for asthma guidelines (2019): change in the recommendation for the management of mild asthma based on the SYGMA-2 trial-A critical appraisal [J]. *Lung India*, 2020, 37(2): 169-173.

[13] 冯贞贞, 谢洋, 春柳, 等. 基于隐结构结合系统聚类的新型冠状病毒肺炎中医常见证候特征研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(5): 537-543.

[14] 杨勤军, 杨程, 童佳兵, 等. 近 30 年中医药治疗支气管哮喘临床用药规律数据挖掘研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(8): 697-704.

[15] 闫伟, 刘明, 张庆祥. 小青龙汤对支气管哮喘寒饮蕴肺证大鼠 1,25 二羟维生素 D3 水平的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(11): 2806-2809.

[16] 桂素梅, 何平, 杨若俊. 小青龙汤合三子养亲汤对小儿哮喘发作期寒饮内停证的疗效评价 [J]. *健康前沿*, 2018, 27(11): 190.

[17] Li T, Wu YN, Wang H, et al. Dapk1 improves inflammation, oxidative stress and autophagy in LPS-induced acute lung injury via p38MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Immunol*, 2020, 120(4): 13-22.

[18] Zou M, Zhang G, Zou J, et al. Inhibition of the ERK1/2-ubiquitous calpains pathway attenuates experimental pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391(1): 111886.

[19] Meng P, Chen ZG, Zhang TT, et al. IL-37 alleviates house dust mite-induced chronic allergic asthma by targeting TSLP through the NF- κ B and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Immunol Cell Biol*, 2019, 97(4): 403-415.

[20] Li G, Dai Y, Tan J, et al. SB203580 protects against inflammatory response and lung injury in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1656-1662.

[21] 赵嘉涵, 贾雨涵, 汤雅婷, 等. 参麦注射液对肠缺血/再灌注肺损伤大鼠肺组织 p38MAPK 及凋亡相关基因表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(1): 65-68, 73.

[22] Nie Y, Wang Z, Chai G, et al. Dehydrocostus Lactone suppresses LPS-induced Acute lung injury and macrophage activation through NF- κ B signaling pathway mediated by p38 MAPK and akt [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1510.

范方玲,赵田,张华琼. SPF 金黄仓鼠笼具及饮水脉动真空灭菌的效果验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 101-107.
Fan FL, Zhao T, Zhang HQ. Verification of SPF golden hamster cages and drink water pulsating vacuum sterilization [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 101-107.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.08.015

SPF 金黄仓鼠笼具及饮水脉动真空灭菌的效果验证

范方玲*, 赵田, 张华琼

(成都生物制品研究所有限责任公司, 成都 610023)

【摘要】 目的 确认脉动真空灭菌器的性能,验证 SPF 金黄仓鼠笼具和饮水在规定的装载方式和灭菌条件下进行脉动真空灭菌的效果。**方法** 用专业温度探头、生物指示剂通过化学和物理方法对同载的不同物品进行脉动真空灭菌。首先进行脉动真空灭菌器空载真空保压试验和 B-D 试验及空载热分布试验,确认灭菌器本身的性能,然后按照规定的装载方式和灭菌条件进行满载热分布试验/热穿透试验/微生物挑战试验,以及无菌试验。**结果** 脉动真空灭菌器的性能合格;真空保压、B-D 试验、空载热分布试验均合格;SPF 金黄仓鼠笼具和饮水按照规定的装载方式和灭菌条件进行满载热分布试验/热穿透试验/微生物挑战试验,所有试验结果合格;抽样高压后的垫料和饮水接种培养基中培养 14 d 后,培养基中未见菌落生长,无菌试验合格。**结论** SPF 金黄仓鼠笼具和饮水在规定的装载方式和灭菌条件下进行脉动真空灭菌后能达到灭菌效果。

【关键词】 笼具;饮水;脉动真空灭菌;验证

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0101-07

Verification of SPF golden hamster cages and drink water pulsating vacuum sterilization

FAN Fangling*, ZHAO Tian, ZHANG Huaqiong

(Chengdu Institute of Biological Products Co.LTD, Chengdu 610023, China)

【Abstract】 Objective To confirm the performance of the pulsating vacuum sterilizer and its effect on SPF golden hamster cages and drinking water under specified loading and sterilization conditions. **Methods** The pulsating vacuum sterilization of different articles in the same load were performed by chemical and physical method with a professional temperature probe and biological indicator. First, a no-load pressure holding test and B-D test of the pulsating vacuum sterilizer and no-load heat distribution test were performed to confirm the performance of the sterilizer itself. Then, full-load heat distribution/heat penetration/microbial challenge, and asepsis tests were performed according to the specified loading method and sterilization conditions. **Results** The performance of the pulsating vacuum sterilizer was determined; vacuum holding pressure, B-D test, and no-load heat distribution test were all qualified. The test result of SPF golden hamster cages and drinking water subjected to full-load heat distribution/heat penetration/microbial challenge tests in accordance with specified loading method and sterilization conditions were qualified. After high pressure conditions, the sampling pads and drinking water were placed in culture medium for 14 days, but no bacterial colony growth was observed indicating the success of the sterility test. **Conclusions** SPF golden hamster cages and drinking water can be sterilized by pulsating vacuum sterilization under specified loading method and sterilization conditions.

【Keywords】 cage; drink water; pulsating vacuum sterilization; verification

[作者简介] 范方玲(1985—),女,硕士。E-mail:fflyjy@126.com

本公司 SPF 金黄仓鼠饲养在屏障环境中,为乙脑减毒活疫苗的生产提供原代肾细胞。按照实验动物环境及设施的国家标准(GB14925-2010)规定,屏障设施要严格控制人员、物品和环境空气进出^[1]。动物饲养所需要的笼具、垫料、毛巾、抹布和动物饮水需要经过灭菌后传递到工作区域^[2]。目前脉动真空灭菌器所运用的高压蒸汽灭菌技术的方法是公认的最可靠的灭菌技术之一^[3],广泛应用于实验动物屏障设施,主要承担进入屏障设施内的动物笼具、饲料、垫料、饮水和实验物品的消毒灭菌工作^[4],是保障屏障设施内环境、动物安全及控制传染性疾病蔓延的重要环节^[5]。我司也使用脉动真空灭菌器对进入屏障设施内的动物笼具、垫料、饮水等耐高温高压物品进行消毒灭菌工作。脉动真空灭菌器的设备性能和对物品的灭菌效果将直接影响到屏障设施内环境及实验动物的质量。验证是更加安全和更加先进的质量保证方法^[6]。因 SPF 金黄仓鼠饲养过程中所使用的需要高压灭菌的物品种类较多,不可能单一品种物品进行高压灭菌。故本研究以脉动真空灭菌器的性能验证为基础,将多种待灭菌物品按照规定的装载方式和灭菌条件使用脉动真空灭菌器进行灭菌效果的验证,现将 2014-2020 年的验证数据进行统计,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SPF 金黄仓鼠笼具:育种笼盒(53×38×19 cm)、运输笼盒(50×35×20 cm)、繁殖笼盒(30×23×15 cm)、相应规格笼盖;垫料(适量,预先铺放在每一个笼盒中,重叠码放,最上面一层笼盒内无垫料,装织物等)、清洁用抹布、拖布、线手套、洁净操作服、饮水瓶塞等干物。

饮水:预先灌装入瓶(满瓶),分为 250 mL 瓶装、500 mL 瓶装。

1.2 主要试剂与仪器

B-D 试纸(美国 Mesalabs 公司);生物指示剂(BI):嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢,最小含量 2.0×10^6 ,D121℃ 值为 2 min(美国 Mesalabs 公司);硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基(本公司培养基室制备)。

校准合格的 Kaye 温度记录仪(美国 Amphenol 公司);带 SIM 和配备 T 型热电偶;校

准合格的温度干井 HTR-400(美国 Amphenol 公司);校准合格的标准铂电阻,型号:IRTD-400(美国 Amphenol 公司);脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);型号 XG1.GMM-2.0;恒温培养箱:型号 BPX-162(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 灭菌参数和装载方式

(1)循环 B4(干物)的灭菌参数和装载方式

灭菌程序:织物。

灭菌参数为:真空脉冲次数 3 次,脉动上下限±80 KPa,灭菌温度 122℃,灭菌时间 1200 s,干燥时间 240 s。

装载方式有两种:1、B4-1 主要装载物为育种笼盒、运输笼盒、及笼盖、饮水瓶塞、操作服,每叠 13 个育种笼盒,最上一个盒子装有瓶塞,共 4 叠;每叠 13 个运输笼盒,最上一个盒子装有操作服,共 2 叠;1 叠育种盒盖,48 个,具体的装载方式和温度探头分布见图 1。2、B4-2 主要装载物为繁殖笼盒、笼盖、操作服、毛巾、抹布、杂物,每叠 13 个繁殖笼盒,最上一个盒子装有操作服、毛巾、抹布等织物,共 18 叠;1 叠 13 个繁殖笼盒,最上一个盒子装有杂物;1 叠 82 个繁殖盒盖,2 叠,具体的装载方式和温度探头分布见图 2。

(2)循环 A4(饮水)的灭菌参数和装载方式

灭菌程序:液体。

灭菌参数:置换时间 2400 s,灭菌温度 122℃,灭菌时间 1800 s。

装载方式有两种:1、A4-1 主要装载物为 250 mL 瓶和 500 mL 瓶,具体的装载方式和温度探头分布见图 3。2、A4-2 主要装载物为 250 mL 瓶,具体的装载方式和温度探头分布见图 4。

1.3.2 验证方法及评价标准

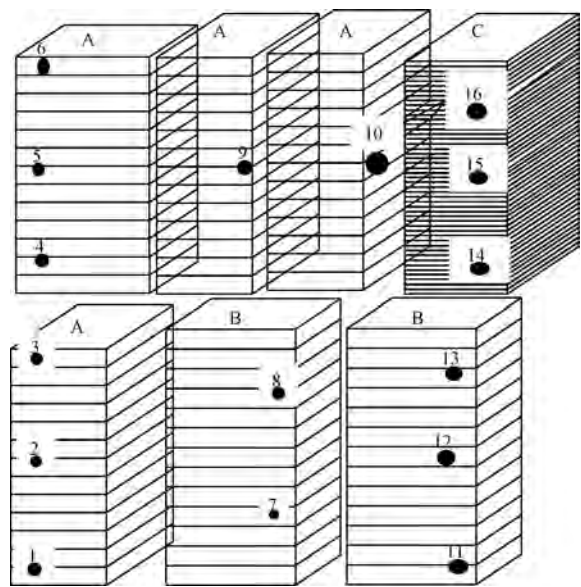
(1)真空保压试验

方法:空载状态下,启动脉动真空菌器保压程序,参数设定如下:保压限度-90 KPa,时间 900 s,泄露限度≤2 KPa。

判定标准:真空保持 15 min 后,真空检测终点压力与起点压力之差应≤2 KPa,则视为设备保压合格。

(2)B-D 试验

方法:选用预真空 122.0℃ 时灭菌 498 s 的 B-D 试纸,在灭菌器空载状态下将 BD 试纸放在排水口

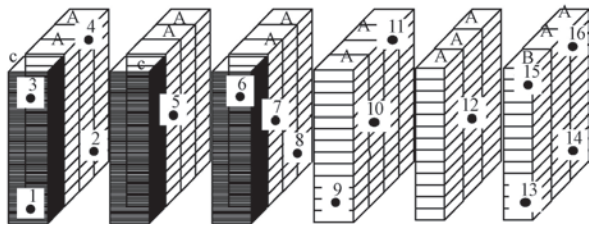


注:1~16:热电偶布点,每个热电偶旁放置一个生物指示剂。所有热电偶均位于盒子中央。A:13 个育种笼盒,最上一盒装有瓶塞;B:13 个运输笼盒,最上一盒装有操作服;C:48 个育种盒盖。

图 1 循环 B4-1(干物)装载方式和热穿透热电偶布点图

Note. 1~16, TC distribution points, and place one BI adjacent to the TC. All TCs are placed in the center sides of the boxes. A, 13 breeding cage boxes, the top box contains the bottle stopper. B, 13 transport cages, the uppermost containing operating suits. C, 48 breeder cartons.

Figure 1 Loading mode of cycle B4-1 (dry matter) and distribution diagram of thermal penetration thermocouple

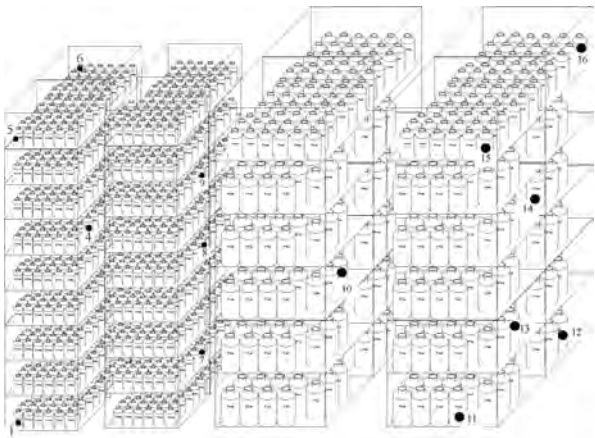


注:1~16:热电偶布点,每个热电偶旁放置一个生物指示剂。所有热电偶均位于盒子中央。A:13 个繁殖笼盒,最上一盒装有织物;B:13 个繁殖笼盒,最上一盒装有杂物;C:82 个繁殖盒盖。

图 2 循环 B4-2(干物)装载方式和热穿透热电偶布点图

Note. 1~16, TC distribution points, and place one BI adjacent to the TC. All TCs are placed in the center sides of the boxes. A, 13 breeding cages with fabric in the top box. B, 13 breeding cages, the top box contains sundries. C, 82 breeding cartridge LIDS.

Figure 2 Loading mode of cycle B4-2 (dry matter) and distribution diagram of thermal penetration thermocouple



注:1~16:热电偶布点,每个热电偶旁放置一个生物指示剂。所有热电偶布置在水瓶底部,保证顶端向上,距离底部不少于 1 cm,不大于 2 cm。

图 3 循环 A4-1(饮水)装载方式和热穿透热电偶布点图

Note. 1~16, TC distribution points, and place one BI Challenge Vials adjacent to the TC. All TCs are placed in the bottom of bottles, and verify that the top of the TC up to the bottom more than 1 cm, but less than 2 cm.

Figure 3 Loading mode of cycle A4-1 (drink water) and distribution diagram of thermal penetration thermocouple

上方 10~20 cm 处,标签向上。设定 BD 程序参数:脉动 3 次,真空脉动下限-80 KPa,真空脉动上限 80 KPa,灭菌时间 498 s,灭菌温度 122.0℃。在完成灭菌操作程序后,取出试纸包并打开观察 B-D 试纸。

判定标准:试纸颜色变成黑色(说明书给定灭菌后的合格颜色),且颜色分布均匀,提示脉动真空灭菌器能够排除冷空气 99% 以上,灭菌器真空性能合格。

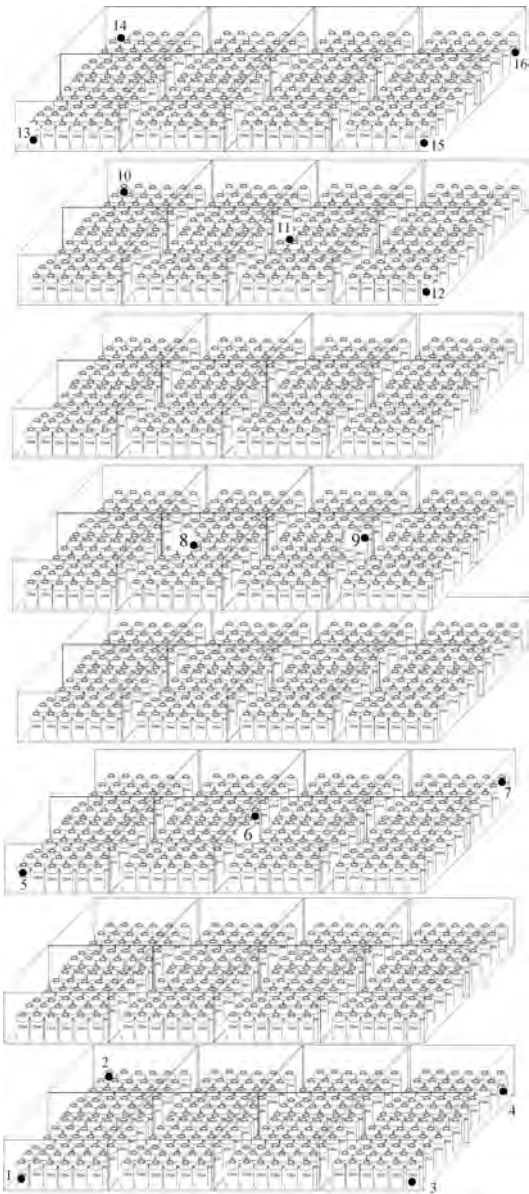
(3)空载热分布试验

方法:灭菌器在空载状态下,使用校准合格的带 SIM 和 T 型热电偶的 Kaye 温度记录仪,通过验证孔将 16 根热电偶插入蒸汽灭菌柜。将 15 支热分布热电偶按几何分布在腔室内,热电偶位置离腔室壁、地和顶不少于 5 cm,不接触腔室表面或架子(具体布点见图 5)。在灭菌器排水口主控温度探头附近布置 1 支热分布热电偶。设置 Kaye 验证仪的热电偶数据记录时间间隔为 30 s,每 30 s 对记录的温度数据进行统计分析(最小、最大、波动和平均)。同步 Kaye 记录仪和灭菌器的时钟。分别按照织物和液体程序进行灭菌。

判定标准:在灭菌阶段,所有热分布热电偶温度都在设定点 0℃~+3.0℃ 范围内,所有的热电偶的温度与同一时刻温度平均值的差值在±1℃ 范围

内,灭菌器主控温度探头的显示温度和附近热电偶温度差值在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 内,提示灭菌室内的温度分布可确定为均匀。

(4) 满载热分布、热穿透试验



注:1-16:热电偶布点,每个热电偶旁放置一个生物指示剂。所有热电偶布置在水瓶底部,保证顶端向上,距离底部不少于1 cm,不大于2 cm。

图4 循环A4-2(饮水)装载方式和热穿透热电偶布点图

Note. 1-16, TC distribution points, and place one BI Challenge Vials adjacent to the TC. All TCs are placed in the bottom of bottles, and verify that the top of the TC up to the bottom more than 1 cm, but less than 2 cm.

Figure 4 Loading mode of cycle A4-2(drink water) and distribution diagram of thermal penetration thermocouple

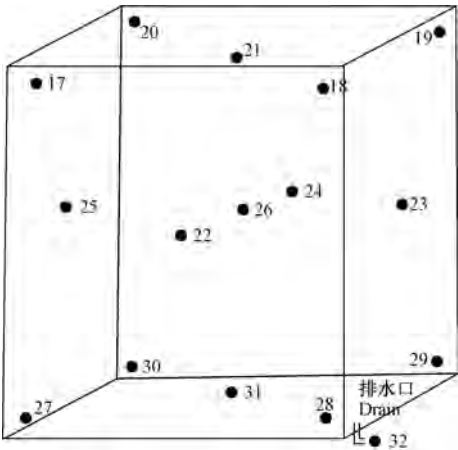
方法:使用校准合格的带SIM和T型热电偶的Kaye温度记录仪,通过验证孔将32根热电偶插入蒸汽灭菌柜中。将待灭菌物品按规定的装载方式摆放入腔室,同时将16根热穿透热电偶放在待灭菌物品中,具体的装载方式和温度探头分布见图1-图4。再将15支热分布热电偶按几何分布在腔室内(见图5),热电偶位置离腔室壁、地和顶不少于5 cm,不接触腔室表面或架子。在蒸汽灭菌柜主控温度探头附近布置1支热分布热电偶。

判定标准:灭菌程序结束后进行结果判定,在灭菌暴露期间,所有热分布热电偶温度都在设定点 $-1.0^{\circ}\text{C} \sim +3.0^{\circ}\text{C}$ 范围内,灭菌器主控温度探头的显示温度和附近热电偶温度差值在 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 内,在灭菌阶段所有的热穿透热电偶的标准灭菌时间(F_0) $\geq 18\text{ min}$,提示灭菌器在规定的装载方式和灭菌条件下满足灭菌要求。

(5) 微生物挑战试验

方法:将待灭菌物品按规定的装载方式摆放,将生物指示剂按满载热穿透试验所测试的每个点位的物品中放置1份生物指示剂(见图1~图4)。按照设定的灭菌程序进行灭菌操作,结束后将经过挑战的生物指示剂和阳性对照(同批次未经灭菌的三份生物指示剂)同时在 $55^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 下培养24 h。

判定标准:经灭菌挑战后的所有嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢指示剂管内颜色呈现紫色(说明书给定灭



注:17~32:热电偶布点。
图5 热分布热电偶布点图

Note. 17-32, TC distribution points.
Figure 5 Thermocouple placement of chamber heat distribution

菌后的合格颜色),即为培养阴性(-),且阳性对照管内的生物指示剂颜色不变(黄色),可判定灭菌效果合格。若被挑战的生物指示剂有 1 支或多支指示剂的管内培养液仍为黄色,则判定灭菌效果验证失败。

(6) 无菌试验

方法:在灭菌结束后,分别抽取各装载笼盒中的垫料和饮水送至本公司质量检定部(QC)进行无菌试验^[7],采用硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基直接接种培养法,接种后的硫乙醇酸盐流体培养基在 30℃~35℃ 培养箱中培养 14 d,接种后的胰酪大豆胨液体培养基在 20℃~25℃ 培养箱中培养 14 d。

判定标准:所有接种培养基的样品在培养 14 d 后均无菌生长,则判定无菌验证通过,若有 1 例样品长菌则视为验证失败。

2 结果

2.1 真空保压试验结果

真空保持 15 min 后,真空检测终点压力与起点压力之差≤ 2 KPa,保压试验合格(见表 1)。

2.2 B-D 试验结果

在完成灭菌操作后,取出测试包打开观察 B-D 试纸。2014~2020 年的 B-D 测试结果均是:试纸颜色变成黑色且颜色分布均匀,提示脉动真空灭菌器能够排除冷空气 99% 以上,灭菌器的真空性能试验

合格(见图 6)。

2.3 空载热分布试验结果

在完成每个灭菌周期后读取温度记录仪。数据显示(见表 2),2014~2020 年的验证测试中,两种循环在灭菌过程中,灭菌器主控温度探头显示温度和附近热电偶温度差值均在±1.0℃ 内,所有热分布热电偶温度都在设定点 0℃~+3.0℃ 范围内,所有的热电偶的温度与同一时刻的温度平均值的差值在±1℃ 范围内,空载热分布试验合格。

2.4 满载热分布/热穿透/微生物挑战试验结果

按规定的装载方式进行装载,并运行相应灭菌程序。灭菌程序结束后读取温度记录仪,数据显示(见表 3),在灭菌暴露期间,2014~2020 年的验证测试中所有热分布热电偶温度都在设定点-1.0℃~+3.0℃ 范围内,灭菌器主控温度探头显示温度和附近热电偶温度差值在±1.0℃ 内,所有热穿透热电偶的 F₀ 值≥ 18 min,满载热分布试验合格、热穿透试验合格。

灭菌程序操作完成后,取出所有被挑战的生物指示剂观察颜色并同阳性对照一起在 55℃~60℃ 下培养 24 h。被灭菌后的生物指示剂管内颜色呈现紫色,与说明书判定合格颜色一致,为培养阴性(-),同时阳性对照管内的生物指示剂颜色不变,说明 55℃~60℃ 培养 24 h 后无细菌生长,微生物挑战试验合格(见表 3)。

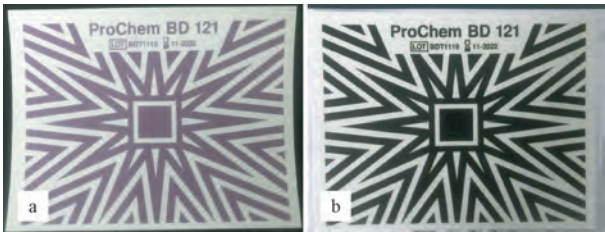
2.5 无菌试验结果

垫料和饮水在接种硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基后,放置在规定温度培养 14 d 后观察细菌生长情况。2014~2020 年的无菌试验结果均是:两种培养基中均没有菌落生长,无菌试验合格。

表 1 真空保压试验结果(KPa)

Table 1 Results of vacuum pressure holding test

测试时间 (年) Test time (Year)	起点压力 Starting pressure	终点压力 End pressure	终点压力与 起点压力之差 Difference between the end pressure and the starting pressure
2014	-90	-89	1
2015	-90	-90	0
2016	-90	-90	0
2017	-91	-90	1
2018	-90	-90	0
2019	-90	-90	0
2020	-90	-89	1



注:a:灭菌前,b:灭菌后。
图 6 B-D 试纸灭菌前后变化
Note. a, Before sterilization. b, After sterilization.

Figure 6 Changes of B-D test paper before and after sterilization

表 2 空载热分布测试结果(℃)
Table 2 Results of empty chamber heat distribution test

程序 Program	检测时间(年) Detection time (Year)	热分布热电偶 最小值 Minimum value of heat distribution TC	热分布热电偶最大值 Maximum value of heat distribution TC	所有热电偶的温度与同一 时刻平均值的最大差值 Temperature difference of all the TC with the average temperature at each time interval
B4	2014	122.34	123.92	0.57
	2015	122.83	124.78	0.49
	2016	122.48	124.81	0.85
	2017	122.80	124.99	0.98
	2018	122.51	124.54	0.90
	2019	122.42	124.90	0.52
	2020	122.64	124.57	0.71
A4	2014	122.18	124.57	0.68
	2015	123.22	124.61	0.69
	2016	122.97	124.97	0.90
	2017	122.57	124.72	0.63
	2018	122.14	124.58	0.99
	2019	122.23	124.59	0.91
	2020	122.33	124.87	0.71
接受标准 Acceptance Criteria		≥121.0	≤125.0	≤1

表 3 负载热分布/热穿透/微生物挑战测试结果
Table 3 Results of loaded chamber heat distribution/Heat penetration/BI challenge test

程序 Program	检测时间 (年) Detection time (Year)	热分布热电偶 最小值(℃) Minimum value of heat distribution TC	热分布热电偶 最大值(℃) Maximum value of heat distribution TC	热穿透热电偶 F ₀ 最小值(minutes) Minimum F ₀ value of heat penetration TC	BI 测试(降低 数量级) BI test (Reduce orders of magnitude)
B4-1	2014	122.50	124.06	30.43	>6
	2015	123.09	124.25	33.51	>6
	2016	122.76	124.78	33.24	>6
	2017	122.96	124.52	29.98	>6
	2018	122.72	124.05	26.53	>6
	2019	123.21	124.61	34.79	>6
	2020	122.86	124.98	30.83	>6
B4-2	2014	122.62	123.76	29.78	>6
	2015	123.01	124.39	33.94	>6
	2016	122.88	124.94	34.17	>6
	2017	122.23	124.04	27.62	>6
	2018	121.63	124.13	30.81	>6
	2019	122.64	124.42	31.32	>6
	2020	122.44	124.52	32.57	>6
A4-1	2014	122.54	123.76	43.28	>6
	2015	123.36	124.70	46.49	>6
	2016	122.32	124.47	34.35	>6
	2017	123.12	124.36	42.56	>6
	2018	123.30	124.76	38.15	>6
	2019	122.61	124.71	34.53	>6
	2020	122.99	124.55	42.62	>6
A4-2	2014	122.57	124.58	40.81	>6
	2015	122.93	124.24	46.20	>6
	2016	123.00	124.88	45.56	>6
	2017	122.65	124.99	39.00	>6
	2018	123.32	124.54	43.86	>6
	2019	122.61	124.07	35.87	>6
	2020	122.82	124.12	42.99	>6
接受标准 Acceptance Criteria		≥121.0	≤125.0	≥18	≥6

3 讨论

为保证高压蒸汽灭菌物品的灭菌质量^[8],灭菌后还需采取适当方法进行灭菌效果的验证^[9]。设备的验证和装载方法的验证要定期化和常态化并且符合设备验证的工艺要求^[10]。本台真空灭菌器从 2010 年启用以来,每年均进行验证。在设备的首次验证及 2014 年之前的再验证中,对每一种程序和装载的灭菌性能,都采取了测试 3 次的策略,测试结果均符合标准、验证合格。根据 2010–2013 年所积累的设备验证及运行数据,决定从 2014 年开始,每年对真空灭菌器的历史信息进行回顾性评估:收集、汇总、分析灭菌柜的验证与再验证情况、去年一年的运行情况、校准情况、变更情况以及维护保养情况确认设备运行稳定,从而确认该灭菌器本年度再验证活动中采取的装载运行次数,确认 2014 年到 2020 年验证测试中每种程序装载每年均测试 1 次。

对实验动物笼盒、垫料、饮水等进行高压灭菌,各研究采用的灭菌温度、灭菌时间、垫料包装方式等均有所不同^[11–13],但通常温度 121.3℃,稳定持续 1200 s 即可杀死细菌的繁殖体及芽孢,达到灭菌效果^[14]。本研究根据所需灭菌物品的具体特点,对于非液体类的物品采用 122℃、1200 s 的灭菌条件,垫料分装到笼盒中,笼盒使用重叠法;液体类饮水 122℃、1800 s 的灭菌条件进行灭菌程序试验。试验结果显示,不仅安全性能得到保障,而且非液体类物品灭菌效果合格、可靠,重叠笼盒(垫料)全部达到灭菌条件,干燥效果好,液体类饮水灭菌效果合格、可靠、液体损失量小。

单一品种物品的灭菌无论是灭菌过程还是灭菌程序的验证都相对容易和简单,但 SPF 金黄地鼠在饲养过程中所需要的物品种类较多,饲养笼盒及饮水瓶规格均不同,故本研究根据被灭菌物品的特性采用按照固定的多种物品组合装载的方法进行灭菌。通过灭菌器的性能验证、微生物挑战试验和无菌试验,结合蒸汽灭菌的两大基本要素,即作用时间、灭菌温度^[15],所有试验结果表明各种 SPF 金黄仓鼠笼具及不同规格动物饮水在规定的装载方式和灭菌条件下进行脉动真空灭菌验证合格,且符合现行 GMP 关于对灭菌法的要求。不仅证明了本台脉动真空灭菌器设备本身的可靠性,关键是对装载方式和灭菌程序进行了验证,保证了灭菌效果的有效性^[7],为屏障设施安全与正常运行提供有力保

障。因此,在日常工作中就必须严格按照验证过程中的物品包装方式和装载位置进行包装和装载,严格按照验证的装载灭菌程序进行灭菌,以保证灭菌的有效性和均一性^[16]。如果灭菌物品种类、装载位置、或灭菌条件发生改变必须重新做灭菌效果验证^[17]。验证后在日常生产中的每次灭菌也必须对各项参数和 F_0 值进行监测^[18]。

参考文献:

- [1] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物环境及标准: GB 14925–2010 [S]. 2010.
- [2] 中华人民共和国国务院.《病原微生物实验室安全管理条例》: 中华人民共和国国务院令 第 424 号 [S]. 2004.
- [3] 梁树森, 王华生, 孙雪莹. 高压蒸汽灭菌失败原因分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(11): 1394–1395.
- [4] 吴清洪, 袁进, 何裕德, 等. 脉动真空灭菌器在实验动物屏障设施中的使用体会 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(12): 104–106.
- [5] 李红兵, 孙博凡, 王雷, 等. 屏障设施中安装使用脉动真空灭菌器常见问题及解决办法 [J]. 实验动物科学, 2015, 32(1): 34–36.
- [6] 何国强. 制药工艺验证实施手册 [M]. 北京: 化学工业出版社; 2012.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 三部 [M]. 2020 版. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- [8] 焦家林, 李敏. 脉动真空灭菌器湿包常见原因及防范措施 [J]. 医疗装备, 2017, 30(19): 75.
- [9] 孔静. 医疗器械的灭菌方法以及灭菌效果的验证 [J]. 科技与企业, 2012, 21(4): 223–224.
- [10] 彭景峰. 高压蒸汽灭菌设备的偏差管理与维修 [J]. 设备管理与维修, 2018, 39(24): 51–52.
- [11] 杨根岭, 杨正梅, 韦莉, 等. 两种装载方法垫料压力蒸汽灭菌的比较研究 [J]. 医学动物防制, 2014, 30(6): 633–634.
- [12] 陈霆, 张丽芳, 金迎春, 等. 动物笼盒和垫料蒸汽灭菌条件的优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 81–83.
- [13] 张希牧, 田永路, 朱德生, 等. 脉动真空灭菌器灭菌效果的评定 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(6): 72–75.
- [14] 顾为望. 实验动物屏障设施建设与管理 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2002.
- [15] 邓晓东, 吕健, 夏唯, 等. 医用纱布蒸汽灭菌验证 [J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(7): 704–707.
- [16] 王舰兵, 李铎, 徐康, 等. 132℃ 灭菌法在疫苗生产中的灭菌效果验证 [J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(5): 419–421.
- [17] 王舰兵, 金鑫, 张可明, 等. 在疫苗生产和医疗行业中不同物品同载进行脉动真空灭菌的效果验证 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(24): 172–175.
- [18] 夏正明. 蒸汽灭菌验证中的温度测量系统 [J]. 上海医药, 1997, 19(2): 33.

张帆,李思洋,丁军颖,等. MicroRNA 在呼吸系统炎性疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 108-114.
Zhang F, Li SY, Ding JY, et al. Research progress of microRNA in inflammatory diseases of the respiratory system [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 108-114.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 016

MicroRNA 在呼吸系统炎性疾病中的研究进展

张帆¹,李思洋²,丁军颖^{1*},刘清泉^{1*}

(1.首都医科大学附属北京中医医院,北京市中医研究所,中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室,北京 100010;
2.北京中医药大学,北京 100029)

【摘要】 MicroRNAs (miRNAs) 是一组高度保守的非蛋白编码核苷酸序列,长度约为 20~22 个核苷酸。miRNAs 最早在线虫体内被发现,此后,对 miRNAs 的功能及作用机制的研究逐渐成为热点。目前,研究表明 miRNAs 参与肺的生长发育、炎性反应及免疫调控等,与呼吸系统疾病的发生、发展及转归有着密切的联系。明确 miRNAs 的作用靶点、运用 miRNA 干扰技术探索相关信号转导通路将有助于加深对相关疾病的理解,为临床诊治提供新的依据和方向。本文将对 miRNAs 的研究背景、形成机制、生物学功能,以及在各种呼吸系统炎性疾病中的研究及应用进展进行综述。以期对呼吸系统炎性疾病的诊治提供新的思路。

【关键词】 miRNA;感染性肺炎;创伤性肺炎;COPD

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0108-07

Research progress of microRNA in inflammatory diseases of the
respiratory system

ZHANG Fan¹, LI Siyang², DING Junying^{1*}, LIU Qingquan^{1*}

(1. Capital Medical University, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine(TCM), Beijing Institute of TCM,
Beijing Key Laboratory of Basic Research with TCM on Infectious Diseases, Beijing 100010, China.
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 MicroRNAs (miRNAs) are a group of highly conserved non-protein-coding nucleotide sequences with a length of approximately 20~22 nucleotides. miRNAs were first discovered in *Caenorhabditis elegans*. Since then, research on the function and mechanism of miRNAs has gradually increased. To date, studies have shown that miRNAs are involved in lung growth and development, inflammatory responses and immune regulation, and are closely related to the occurrence, development, and outcome of respiratory diseases. Identifying the targets of miRNAs and using miRNA interference technology to explore related signal transduction pathways will help enhance our understanding of related diseases and provide a basis for clinical diagnosis and treatment. This article reviews the research background, formation mechanism, and biological function of miRNAs, as well as research and application progress in various respiratory inflammatory diseases. This will provide new ideas for the diagnosis and treatment of respiratory inflammatory diseases.

【Keywords】 miRNA; infectious pneumonia; traumatic pneumonia; COPD

【基金项目】 国家自然科学基金(81503399,81373813);北京市自然科学基金(7182071)。

【作者简介】 张帆(1992—),女,硕士研究生,主要从事耐药菌感染及其防治机制研究。E-mail: zfanky@163.com

【通信作者】 刘清泉(1965—),男,教授,博士生导师,主要从事中西医结合危重病学研究。E-mail: liuqingquan2003@126.com

丁军颖(1977—),女,博士,副教授,主要从事耐药菌感染及其防治机制研究。E-mail: 18211197728@163.com

* 共同通信作者

近年来,随着抗生素治疗产生的毒副作用、细菌谱耐药性的增加,加之空气质量下降、环境中粉尘颗粒等有害因子增多,与肺相关的疾病,尤其是炎症性疾病,已成为发达国家和发展中国家发病率和死亡率升高的主要原因^[1]。为炎症性疾病寻找新的生物标志物和早期诊断方法引起了诸多学者的研究兴趣^[2]。诸多证据表明,miRNAs 通过各种机制影响着呼吸系统炎症性疾病的发生和发展,且 miRNA 干扰技术在其中的应用更是发挥着重要的作用。miRNA 通过抑制 mRNA 的翻译广泛参与基因表达、细胞分化、信号转导、免疫应答、肿瘤的发生等多种生命活动^[3]。miRNA 作为基因表达的关键调节剂,对呼吸系统疾病的预防、诊断和治疗起着重要的作用^[4]。本文综合分析近年来 miRNA 与呼吸系统炎症性疾病相关的研究报道,总结 miRNAs 及 miRNA 干扰技术在呼吸系统炎症性疾病研究中的进展,能够为呼吸系统炎症性疾病的研究提供更多的思考,为难治性肺炎寻找更多的突破口。

1 miRNA 的生物合成与调控

microRNAs (miRNAs) 是一组内源性非蛋白编码 RNA,长度约为 20~22 个核苷酸,其主要功能是参与基因转录后的调控。miRNA 可与其信使 RNA (message RNA, mRNA) 的 3' 端非翻译区 (universal training reactor, UTR) 结合,引起靶 mRNA 在蛋白水平上的表达抑制 (不完全互补匹配) 或靶 mRNA 的降解 (完全互补匹配),通过负向调节 mRNA 转录后抑制调节多种信号通路并影响基因表达^[5]。

miRNA 的生物合成过程主要分为以下三个阶段:① miRNA 在细胞核内经基因组 DNA 编码和 RNA 聚合酶 II 或 III 转录后,形成茎环结构的初级 miRNA (primary miRNA, pri-miRNA),随后被 RNA 聚合酶 III (RNase III) Droscha 和 DGCR8 切割形成茎环结构的前体 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA)。② Pre-miRNA 在转运蛋白 Exportin5 的协助下输出细胞核。③ Pre-miRNA 在细胞质中由 Dicer 酶切割成双链 miRNA,其中一条链即成熟 miRNA。成熟的 miRNA 结合 RNA 介导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 成为活性 miRNA。活性复合物通过碱基互补配对的方式特异性的识别靶 mRNA 的 3'-UTR 区,诱导降解或抑制靶 mRNA 的翻译,从而发挥转录后水平的调控,调节基因表达。

miRNA 发挥作用的途径主要有两种方式:①降解靶基因 mRNAs;②抑制靶基因 mRNAs 的翻译水平。两种途径的选择区别在于 miRNAs 与其靶 mRNAs 之间的互补匹配程度。如果 miRNAs 与靶 mRNAs 完全互补,miRNAs 会使对应的靶 mRNA 完全降解;而当 miRNA 与其靶基因不完全互补匹配时,只会抑制靶基因 mRNAs 的翻译,而不会导致靶 mRNAs 的降解。在许多动物体内,miRNA 是和靶 mRNA 的 3'-UTR 区域进行非完全互补结合,以此来抑制靶 mRNAs 的翻译表达,从而影响靶基因对应的蛋白质表达^[6]。

2 miRNA 与疾病的关系

目前,在植物、动物和病毒中已鉴定出数百种 miRNAs。其中,已报道并广泛研究的 miRNAs 超过 700 个^[7]。miRNAs 可以控制多种作用途径并广泛参与机体多种重要的生理及病理过程,其中包括调控细胞生长、发育、分化、增殖及凋亡^[4]。并且在调节免疫和抑制免疫反应中也发挥着重要的作用^[8]。相当多的研究表明,miRNAs 在包括神经系统^[9]、心血管系统^[10]、泌尿系统^[11]以及癌症^[12]等诸多复杂疾病中成为疾病诊断的特征性标志物 and 治疗的靶点。此外,miRNA 作为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 途径中的重要分子,研究者利用其能够调节基因表达、调控细胞的生命活动的功能,结合 RNA 干扰的原理,在体外引入特定的突变,通过同型基因化或换位将突变基因导入宿主体内原来的位置,观察表型的改变,使 miRNA 成为以阻断方式反向验证通路节点的有效工具,为疾病的研究提供了一种新的手段,且已成为当前各系统疾病研究领域的重要方法。例如,在探索和验证 miR-451a 在 SiNPs 诱导的血管内皮功能障碍和血栓形成前状态中的作用的研究中,在 SiNPs 诱导下,miR-451a 的化学模拟物可以导致 IL6R/STAT/TF 信号通路在体内外表达减弱,miR-451a 的抑制剂增强了 IL6R/STAT/TF 信号通路的激活。证实了 miR-451a 通过负调控 IL6R/STAT/TF 信号通路,SiNPs 可以加速血管内皮功能障碍和凝血前状态^[13]。在探讨 CXCR4 与神经性疼痛的关系时,在 pSNL 诱导下,鞘内注射 miR-23a 模拟物或慢病毒可导致 miR-23a 的过表达减少脊髓 CXCR4 分泌并预防 pSNL 诱导的神经性疼痛。鞘内注射 miR-23a 抑制剂或慢病毒可引起疼痛样行为。证实了 miR-23a 通过 CXCR4/

TXNIP/NLRP3 轴调节脊髓神经胶质细胞的神经性疼痛^[14]。

近年来由于环境污染以及医疗实践对呼吸系统疾病造成的不可避免的副作用,加之今年新冠病毒在全球肆虐^[15],严重威胁人类健康与社会稳定,使得分子生物学层面对呼吸系统疾病发病机制的研究热度大增,尤其是在重症呼吸感染性疾病中的研究更是备受关注。而 miRNA 干扰技术凭借高效特异的抑制靶基因表达的优势,更是成为研究者们关注的焦点。

3 呼吸系统炎性疾病中 miRNA 的研究

3.1 感染性肺炎中的 miRNA

感染性肺炎是指机体受微生物感染而产生的肺炎。主要由细菌、病毒及真菌等引起并发感染。研究表明,miRNA 能够调节宿主对细菌^[16]、病毒^[17]和真菌^[18]病原体感染的反应。miRNA 与肺部感染的发生发展、诊断及预后关系密切^[19]。运用 miRNA 干扰技术证实关键 miRNA 分子的作用将会对肺部感染性疾病的发病机制、临床诊断、治疗及预后评估产生重大影响。

3.1.1 miRNA 参与细菌性肺炎发生发展

细菌性肺炎是最常见的感染性肺炎的类型,是社区获得性肺炎的主要病原体。其中,常见的病原体包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎支原体、肺炎衣原体等。抗感染治疗是细菌性肺炎的主要治疗措施。尽管现代医学治疗感染性肺炎的方法不断发展,肺炎病原学诊断仍然存在诸多困难。近年来随着抗生素治疗产生毒副反应、细菌谱耐药性增加,细菌性肺炎的预防和治疗遭遇瓶颈。研究发现 miRNA 能够调节细菌诱发炎症的分子机制,且 miRNA 干扰技术广泛应用于其分子机制的研究中,miRNA 作为新思路新方法能够为细菌性肺炎的研究提供更多的可能。

(1) miRNA 参与调控铜绿假单胞菌肺炎

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)是临床最常见的革兰氏阴性杆菌,可存在于人体的皮肤黏膜、呼吸道及消化道。PA 感染是囊性纤维化、支气管扩张和慢性支气管炎等患者慢性气道感染的主要病因^[20]。随着抗菌药物的滥用,抗 PA 抗生素的敏感性不断下降,以及 PA 抗性的产生,致使 PA 肺炎患者病情严重,治疗困难,病死率较高^[21]。目前已有多项研究利用 miRNA 干扰反向验证了相

关 miRNA 参与调节 PA 肺炎的炎症反应过程。

miR-301b 通过影响嗜中性粒细胞向肺部的募集,调节宿主防御功能的发挥。Li 等^[22]研究发现在 PA 感染肺炎的炎症反应中,miR-301b 的表达水平升高。他们利用 miRNA 干扰技术将 miR-301b 模拟物和抑制剂分别转染至 PA 感染的细胞中,证实了 PA 感染通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 途径诱导 miR-301b 的表达。进一步研究发现咖啡因能够通过 cAMP/PKA/NF- κ B 轴的负调控来降低 miR-301b 表达水平,而抑制 miR-301b 导致其靶基因 c-Myb 转录增加,使得嗜中性粒细胞浸润水平升高,引起抗炎细胞因子的释放,进而减轻了小鼠的感染症状。

miR-466i-5p 通过影响巨噬细胞的吞噬能力以及炎症因子和抑炎因子的表达,调节肺组织中的细菌负荷及病理损伤。石萌萌等^[23]研究发现,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)释放的微粒(micro vesicles, MV)对多重耐药铜绿假单胞菌(multiple-drug resistant *pseudomonas aeruginosa*, MDR-PA)肺炎具有治疗作用。同时发现 MSC 释放的 MV 中 miR-466i-5p 表达水平较高。将 miR-466i-5p 模拟物转染至 MSC 中构建 miR-466i-5p 过表达的 MSC MV,显著降低了肺泡灌洗液中炎症因子 TNF- α 、MIP-2 及抑炎因子 IL-10 的表达水平,增强巨噬细胞的吞噬功能,降低了炎症水平及细菌负荷,改善肺组织病理损伤。证实了 MSC MV 对 MDR-PA 肺炎的治疗作用与其携带的 miR-466i-5p 有关。

(2) miRNA 参与调控肺炎链球菌肺炎

肺炎链球菌(*streptococcus pneumoniae*, Sp)属于革兰氏阳性细菌,是上呼吸道常见的定植菌。由于肺炎链球菌肺炎在社区获得性肺炎中的发病比率较高,加之当前所用的荚膜血清型疫苗存在缺点以及抗生素的耐药日趋严重^[24],迫切需要明确其免疫信号传导机制,以为其提供新的预防和治疗手段。

miR-155 参与调节宿主对 Sp 感染的防御反应,且能够增强巨噬细胞的吞噬能力。肺炎链球菌内肽酶 O(endopeptidase O, PepO)是一种新发现并广泛表达的肺炎球菌毒力蛋白,能通过腹膜渗出的巨噬细胞(peritoneal exudate macrophage, PEMs)增强 Sp 的吞噬作用^[25]。Yao 等^[26]研究发现 miR-155 在 PepO 诱导的 PEMs 中表达上调。借助 miRNA 干扰技术,证实了 PepO 诱导的 PEMs 吞噬作用在用 miR-155 抑制剂转染的细胞中减弱,而在用 miR-155

模拟物转染的细胞中增强。同时验证了 miR-155 的上调是由 TLR2/NF- κ B 信号通路介导的。这些结果证实了 miR-155 在 PepO 诱导的 PEMs 中有助于增强巨噬细胞的吞噬作用以及宿主对 Sp 的防御反应。

miRNA-302 参与调节肺泡上皮细胞的增殖,调控 Sp 感染小鼠的肺功能。Sp 感染的小鼠对肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell, AEC)的损害是一个“损害-再生”的过程^[27]。Sp 对 AEC 先是造成了实质性损害,随后引起 AEC 的缓慢再生。Wang 等^[28]研究发现在 AEC 再生的同时,miRNA-302 在 AEC 中的表达升高。他们采用 miR-302 模拟物模拟的再生疗法治疗 Sp 感染小鼠,成功促进肺泡上皮祖细胞的增殖使 AEC 再生并修复受损的肺泡上皮,改善了 Sp 感染小鼠的肺功能,提高存活率。这些发现表明,基于 miRNA 模拟物的疗法可以用作促进 AEC 再生并增强宿主从细菌性肺炎恢复的有效疗法。为开发再生医学治疗微生物感染的疗法开辟了一个领域。

3.1.2 miRNA 参与病毒性肺炎的发生发展

病毒是导致社区获得性肺炎的另一个重要原因,包括腺病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒等都是易引起病毒性肺炎的病毒。另外,目前正在流行的新型冠状病毒肺炎(COVID-19),以前流行的严重急性呼吸系统综合征(SARS)、中东呼吸系统综合征(MERS)都属于病毒性肺炎的范畴。由于病毒一般为 RNA 结构,容易变异,病毒性肺炎的治疗效果往往不如细菌性肺炎。当下爆发流行的新冠肺炎,再次提醒呼吸道病毒同样是重症肺炎病因的重要来源。目前,抗病毒药物、免疫调节剂以及特定疫苗等是较为普遍的治疗手段。除了针对病毒蛋白的抗病毒治疗外,针对病毒感染所需的宿主编码因子的治疗,能够有效降低病毒突变的几率^[29]。McCaskill 等^[30]在所有筛选的呼吸道病毒中,将多种 miRNA 模拟物或抑制剂转染到 A549 细胞中,鉴定出了几种能够抑制病毒复制的 miRNA。其中,miR-744, miR-124a 和 miR-24 具有广谱抗病毒活性,表明宿主体内的抗病毒 miRNA 可以为控制病毒感染提供补充策略。

(1) miRNA 参与调控腺病毒肺炎

腺病毒(adenovirus, Ad)感染是大多数婴幼儿社区获得性肺炎的病因,到目前为止,尚无有效的抗病毒药物可用于 Ad 肺炎的治疗,且 Ad 感染的诊断方式也十分有限^[31]。miRNA 与腺病毒复制和宿

主免疫反应有关^[32]。应用 miRNA 技术明确 miRNA 作用靶点有助于明确 miRNA 在调节宿主对腺病毒感染的反应中的作用,并丰富腺病毒感染致肺炎的诊断方式及治疗方法。

miR-27a/b 能够通过抑制人突触小体相关蛋白(SNAP25)和重组人硫氧还蛋白(TXN2)的表达抑制 Ad 感染。Machitani 等^[33]利用 miRNA 干扰技术在 miR-27a/b 模拟物转染的细胞中,发现 Ad 基因组拷贝数减少了约 80%,而用 miR-27a/b 抑制剂转染后,Ad 基因组的拷贝数大约增加了 2.5~5 倍。紧接着证实了 SNAP25 和 TXN2 是 miR-27a/b 的靶基因。这些结果表明,miR-27a/b 通过转录后基因沉默抑制 SNAP25 和 TXN2 表达,进而抑制 Ad 进入细胞并引起细胞生长周期的停滞,从而实现对 Ad 感染的有效抑制,为 Ad 感染的治疗提供了重要线索。

(2) miRNA 参与调控合胞病毒肺炎

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是最常见的呼吸道病毒。研究发现,miRNAs 参与调控免疫细胞极化和白三烯(LTs)的合成,而改善免疫耐受可以显著缓解 RSV 引起的气道炎症和支气管痉挛^[34]。miRNA 可能成为检测 RSV 感染的潜在生物标志物,甚至成为与 RSV 感染相关的反复性喘息或早期哮喘的干预及治疗策略的新靶标。

miRNA 参与调控 RSV 对宿主的持续性感染反应。许多病毒可以在宿主细胞中建立非溶细胞性慢性感染,这种病毒与宿主的长期寄生,使得宿主细胞持续性的产生感染性病毒,但却可以逃避机体的防御,没有感染的表征^[35]。RSV 也可以在其宿主细胞中建立持续性感染,且 miRNA 参与病毒调节宿主细胞对持续性感染的反应。Eilam-Frenke 等^[36]为了研究病毒与宿主细胞长期共存中 miRNA 的作用,建立了 RSV 持续感染的 HEp-2+RSV-GFP 细胞系,发现在 Hep-2+RSV-GFP 细胞中,miR-146a-5p 的表达明显上调,miR-345-5p, let-7c-5p 和 miR-221 表达下调。因此,RSV 持续性病毒感染诱导 miRNA 差异表达,miR-146-5p, miR-let-7c-5p, miR-221 和 miR-345-5p 与病毒如何调节宿主细胞对感染的反应有关。

3.2 急性肺损伤/急性呼吸系统窘迫综合征中的 miRNA

急性肺损伤(ALI)/急性呼吸系统窘迫综合征(ARDS)是继发于非心源性疾病的严重呼吸系统疾

病^[37]。由于现代复苏技术和危重疾病早期抢救水平的提高,虽然危重病患者的早期死亡率降低,但是 ALI/ARDS 的发病率却随之增加。ALI/ARDS 以弥漫性肺细胞损伤为基础,以肺血管损伤所致的肺水肿和肺组织炎性细胞浸润为其病理特征^[38]。其发病机制复杂,尚未完全明确。目前认为巨噬细胞活化释放大炎症因子是发病机制的关键^[38]。当前临床上尚无特效治疗手段。

已有多项研究通过 miRNA 干扰技术反向验证了相关 miRNA 参与 ALI/ARDS 炎症反应过程,找到了相关炎症信号转导通路,进一步明确了其发病机制。miR-34b-5p 在 ALI 的炎症反应和细胞凋亡中起关键作用。Xie 等^[39]研究发现 miR-34b-5p 能通过靶向向前颗粒蛋白(PGRN)来减轻 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型中的肺损伤。通过体内静脉注射 miR-34b-5p 拮抗剂可明显抑制 miR-34b-5p 的上调,降低炎症细胞因子的释放,减少肺泡上皮细胞的凋亡,减轻肺部炎症。进一步研究证实了 miR-34b-5p/PGRN 轴在 ALI 发病机理中的作用。此外,同样利用 miRNA 干扰技术证实,miR-297 通过靶向 CDK8 表达来影响 NF- κ B 通路,减轻 LPS 诱导的小鼠肺部损伤^[40];miR-216a 通过调节 JAK2/STAT3 和 NF- κ B 信号传导减轻 LPS 诱导的炎症损伤^[41]。

3.3 慢性阻塞性肺疾病中的 miRNA

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)简称慢阻肺,是以进行性的气流受限为主要特征的疾病,与气道和肺组织对有害气体或有害颗粒的异常慢性炎症反应有关。其中,吸烟、环境中的有毒颗粒或气体等是其发病的主要危险因素。作为一种典型的慢性气道炎症性疾病,对 COPD 的研究始终是该领域的热点,而 miRNA 及 miRNA 干扰技术在 COPD 研究中的重要性更是得到了学者的认可。

香烟烟雾(cigarette smoke, CS)作为一种强烈的炎症反应诱导剂可以通过许多机制来促进 COPD 的发生^[42]。长期接触香烟烟雾会引起支气管上皮氧化应激和凋亡,这种持续存在的炎症反应,是 COPD 重要的致病机制之一。

在吸烟引起毛细支气管炎导致的 COPD 患者中,调节相关 miRNA 的表达水平可能是治疗 COPD 的重要策略。有研究发现 miR-218 具有抗炎作用,抑制 miR-218 导致炎症细胞计数上调。Xu 等^[43]利用 miRNA 干扰技术反向验证了 miR-218 通过靶向

TNFR1 介导的 NF- κ B 活化,调节 CSE 诱导的人黏蛋白 5AC(human mucin 5 subtype AC, MUC5AC)过度生产而引起的炎症反应。同样 Song 等^[44]证实了 miR-218-5p 通过调节 BRD4 信号通路减轻香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)诱导的人肺微血管内皮细胞(human lung microvascular endothelial cells, HPMEC)损伤。此外,Sun 等^[45]证实了 miR-206 通过调节 Notch3 和 VEGFA 信号通路关键蛋白 caspase-3, caspase-9 和 Bcl-2。miR-206 抑制剂可使通路关键蛋白活性降低,显著逆转 CSE 诱导的 HPMEC 细胞凋亡。

流行病学证据表明, COPD 患者更易感受 PM_{2.5} 的影响,吸入 PM_{2.5} 后, COPD 患者会出现严重的呼吸困难和肺功能下降^[46]。在 PM_{2.5} 引起的支气管上皮损伤加重的 COPD 患者中,调节相关 miRNA 的表达水平可能是治疗该 COPD 的潜在治疗策略。Zhou 等^[47]发现在 PM_{2.5}-CSS 处理的 HBE 中 miR-194-3p 表达水平显著下降。miR-194-3p 模拟物降低了 DAPK1 和 caspase 3 的裂解,从而抑制了暴露于 PM_{2.5} 香烟烟雾中的 HBEpiCs 的凋亡。证明了 PM_{2.5} 通过直接靶向 DAPK1 来下调 miR-194-3p 并加速香烟烟雾引发的支气管上皮细胞的凋亡。

4 总结与展望

miRNA 作为近年的研究热点,在感染性肺炎、创伤性肺炎、慢阻肺等多种呼吸系统炎症疾病的发生发展、诊断治疗以及预后判断中起着不同作用,且 miRNA 干扰技术在特定炎症信号传导通路研究中更是发挥着不可或缺的作用。在以往的研究中 miRNA 更多的作为诊断或预后的生物标志物和治疗靶点。随着研究的深入,miRNA 不仅作为疾病研究的关键分子,而且将作为研究关键通路节点的有力工具,以反向验证的思路揭示系列科学问题,为肺炎信号转导通路的机制研究提供更多的可能。也将为当下肆虐的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供研究及治疗的突破口^[15]。

参考文献:

- [1] El-Gamal FM, Alserihi AM, Alhasawi AO, et al. Early effects of smoking and environmental pollution on lung function, respiratory symptoms and allergic disorders [J]. World Family Med, 2020, 18(9): 115-123.
- [2] Gon Y, Shimizu T, Mizumura K, et al. Molecular techniques for

- respiratory diseases: MicroRNA and extracellular vesicles [J]. *Respirology*, 2020, 25(2): 149–160.
- [3] Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, et al. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(4): 1955–1986.
 - [4] Stolzenburg LR, Harris A. The role of microRNAs in chronic respiratory disease: recent insights [J]. *Biol Chem*, 2018, 399(3): 219–234.
 - [5] Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2019, 20(1): 21–37.
 - [6] 许鹏. miRNA 表达谱深度分析方法与应用 [D]. 南京: 东南大学, 2018.
 - [7] Xu H, Wu Y, Li L, et al. MiR-344b-1-3p targets TLR2 and negatively regulates TLR2 signaling pathway [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12: 627–638.
 - [8] Yao Q, Song Z, Wang B, et al. Emerging roles of microRNAs in the metabolic control of immune cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 433: 10–17.
 - [9] Channakkar AS, Singh T, Pattnaik B, et al. MiRNA-137 – mediated modulation of mitochondrial dynamics regulates human neural stem cell fate [J]. *Stem Cells*, 2020, 38(5): 683–697.
 - [10] Silva DCPD, Carneiro FD, Almeida KCD, et al. Role of miRNAs on the pathophysiology of cardiovascular diseases [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2018, 111(5): 738–746.
 - [11] Metzinger-Le Meuth V, Metzinger L. miR-223 and other miRNA's evaluation in chronic kidney disease: Innovative biomarkers and therapeutic tools [J]. *Noncoding RNA Res*, 2019, 4(1): 30–35.
 - [12] Saikia M, Paul S, Chakraborty S. Role of microRNA in forming breast carcinoma [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118256.
 - [13] Feng L, Yang X, Liang S, et al. Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2019, 16(1): 16.
 - [14] Pan Z, Shan Q, Gu P, et al. miRNA-23a/CXCR4 regulates neuropathic pain via directly targeting TXNIP/NLRP3 inflammasome axis [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 29.
 - [15] Guterres A, de Azeredo Lima CH, Miranda RL, et al. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? [J]. *Infect Genet Evol*, 2020, 85: 104417.
 - [16] Zhou X, Li X, Wu M. miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2018, 3(1): 14.
 - [17] Chen L, Zhou Y, Li H. LncRNA, miRNA and lncRNA-miRNA interaction in viral infection [J]. *Virus Res*, 2018, 257: 25–32.
 - [18] 王一霖, 滕亮, 王中志, 等. miRNA 与真菌感染免疫反应相关性的研究进展 [J]. *实用皮肤病学杂志*, 2019, 12(6): 359–362.
 - [19] Poore GD, Ko ER, Valente A, et al. A miRNA host response signature accurately discriminates acute respiratory infection etiologies [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2957.
 - [20] Fesen K, Silveyra P, Fuentes N, et al. The role of microRNAs in chronic pseudomonas lung infection in Cystic fibrosis [J]. *Respir Med*, 2019, 151: 133–138.
 - [21] 胡雪君. 老年铜绿假单胞菌血流感染诊治进展 [J]. *实用老年医学*, 2019, 33(3): 215–218.
 - [22] Li X, He S, Li R, et al. Pseudomonas aeruginosa infection augments inflammation through miR-301b repression of c-Myb-mediated immune activation and infiltration [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(10): 16132.
 - [23] 石萌萌. MSC 的微粒通过 microRNA466i-5p 治疗铜绿假单胞菌肺炎的研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
 - [24] Bahy RH, Hamouda HM, Shahat AS, et al. Development and evaluation of a novel vaccine against prevalent invasive multi-drug resistant strains of Streptococcus pneumoniae [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2737.
 - [25] Agarwal V, Sroka M, Fulde M, et al. Binding of streptococcus pneumoniae endopeptidase O (PepO) to complement component C1q modulates the complement attack and promotes host cell adherence [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(22): 15833–15844.
 - [26] Yao H, Zhang H, Lan K, et al. Purified streptococcus pneumoniae endopeptidase O (PepO) enhances particle uptake by macrophages in a toll-like receptor 2 – and miR-155 – dependent manner [J]. *Infect Immun*, 2017, 85(4): e01012–e01016.
 - [27] Yang J, Hernandez BJ, Martinez Alanis D, et al. The development and plasticity of alveolar type 1 cells [J]. *Development*, 2016, 143(1): 54–65.
 - [28] Wang Y, Li Y, Zhang P, et al. Regenerative therapy based on miRNA-302 mimics for enhancing host recovery from pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(17): 8493–8498.
 - [29] Ostermann E, Tuddenham L, Macquin C, et al. Dereglulation of type I IFN-dependent genes correlates with increased susceptibility to cytomegalovirus acute infection of dicer mutant mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43744.
 - [30] McCaskill JL, Ressel S, Alber A, et al. Broad-spectrum inhibition of respiratory virus infection by microrna mimics targeting p38 MAPK signaling [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 256–266.
 - [31] Huang F, Zhang J, Yang D, et al. MicroRNA expression profile of whole blood is altered in adenovirus-infected pneumonia children [J]. *Mediat Inflamm*, 2018, 2018: 2320640.
 - [32] Wakabayashi K, Machitani M, Tachibana M, et al. A microRNA derived from adenovirus virus-associated RNAII promotes virus infection via post-transcriptional gene silencing [J]. *J Virol*, 2019, 93(2): e01265–e01318.
 - [33] Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, et al. MicroRNA miR-27 inhibits adenovirus infection by suppressing the expression of SNAP25 and TXN2 [J]. *J Virol*, 2017, 91(12): e00159–e00217.
 - [34] Feng S, Zeng D, Zheng J, et al. MicroRNAs: mediators and therapeutic targets to airway hyper reactivity after respiratory

- syncytial virus infection [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2177.
- [35] Wang YX, Niklasch M, Liu T, et al. Interferon-inducible MX2 is a host restriction factor of hepatitis B virus replication [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(5): 865–876.
- [36] Eilam-Frenkel B, Naaman H, Berkic G, et al. MicroRNA 146-5p, miR-let-7c-5p, miR-221 and miR-345-5p are differentially expressed in Respiratory Syncytial Virus (RSV) persistently infected HEp-2 cells [J]. *Virus Res*, 2018, 251: 34–39.
- [37] Abedi F, Hayes AW, Reiter R, et al. Acute lung injury: The therapeutic role of Rho kinase inhibitors [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104736.
- [38] Huang X, Xiu H, Zhang S, et al. The role of macrophages in the pathogenesis of ALI/ARDS [J]. *Mediat Inflamm*, 2018, 2018: 1264913.
- [39] Xie W, Lu Q, Wang K, et al. miR-34b-5p inhibition attenuates lung inflammation and apoptosis in an LPS-induced acute lung injury mouse model by targeting progranulin [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6615–6631.
- [40] Xi X, Yao Y, Liu N, et al. MiR-297 alleviates LPS-induced A549 cell and mice lung injury via targeting cyclin dependent kinase 8 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106197.
- [41] Kong F, Sun Y, Song W, et al. MiR-216a alleviates LPS-induced acute lung injury via regulating JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling [J]. *Hum Cell*, 2020, 33(1): 67–78.
- [42] Araya J, Tsubouchi K, Sato N, et al. PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis [J]. *Autophagy*, 2019, 15(3): 510–526.
- [43] Xu H, Sun Q, Lu L, et al. MicroRNA-218 acts by repressing TNFR1-mediated activation of NF- κ B, which is involved in MUC5AC hyper-production and inflammation in smoking-induced bronchiolitis of COPD [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 280: 171–180.
- [44] Song J, Wang Q, Zong L. LncRNA MIR155HG contributes to smoke-related chronic obstructive pulmonary disease by targeting miR-128-5p/BRD4 axis [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3): BSR20192567.
- [45] Sun Y, An N, Li J, et al. miRNA-206 regulates human pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via targeting in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 6223–6236.
- [46] Huang HC, Lin FC, Wu MF, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and PM2.5 in Taiwanese nonsmokers [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2019, 222(5): 884–888.
- [47] Zhou T, Zhong Y, Hu Y, et al. PM2.5 downregulates miR-194-3p and accelerates apoptosis in cigarette-inflamed bronchial epithelium by targeting death-associated protein kinase 1 [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13: 2339–2349.

[收稿日期]2020-12-05

(上接第 75 页)

- [12] Wallner M, Duran JM, Mohsin S, et al. Acute catecholamine exposure causes reversible myocyte injury without cardiac regeneration [J]. *Circ Res*, 2016, 119(7): 865–879.
- [13] 张岩, 孙寒松, 胡盛寿, 等. 在超负荷诱导的心脏疾病中心肌细胞自噬 [J]. *国际心血管病杂志*, 2012, 39(2): 77–78, 82.
- [14] Zeciragić A, Nakas-ićindić E, Hadzović A, et al. Average values of electrocardiograph parameters in healthy adult Wistar rats [J]. *Med Arh*, 2004, 58(5): 268–270.
- [15] 王波, 李庆志, 阎德民, 等. 不同 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色方式对心肌梗死面积检测的对比 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2011, 18(2): 179–180.
- [16] Gunata M, Parlakpinar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment [J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(2): 190–217.
- [17] 贾丹丹, 许亚平, 常玉巧, 等. 提高大鼠急性心肌梗死模型成活率的一种方法 [J]. *解剖学研究*, 2019, 41(6): 548–549.
- [18] 沈明, 郭志福, 鲍礼智, 等. 大鼠心梗后心衰模型的制备及心功能评价 [J]. *实验动物科学*, 2017, 34(2): 66–70.
- [19] Wagenaar A, Wiegerinck RF, Heijnen VV, et al. Percutaneous microembolization of the left coronary artery to model ischemic heart disease in rats [J]. *Lab Anim (NY)*, 2016, 45(1): 20–27.
- [20] 张淑莹, 武晓峰, 郭丽敏, 等. 两种阿霉素心力衰竭模型及心功能进展的评估 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(12): 1–7.
- [21] 叶婷, 张梦, 张宇, 等. 阿霉素慢性心力衰竭大鼠模型不同方案的比较 [J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2016, 32(2): 154–156.
- [22] Lobo Filho HG, Ferreira NL, Sousa RB, et al. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats [J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2011, 26(3): 469–476.

[收稿日期]2020-09-26

沈宝玉,杨根梦,刘鹏亮,等. MeCP2 与物质相关障碍的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 115-121.
Shen BY, Yang GM, Liu PL, et al. MeCP2 and substance-related disorders [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 115-121.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 017

MeCP2 与物质相关障碍的研究进展

沈宝玉,杨根梦,刘鹏亮,王 上,洪仕君*,李利华*

(昆明医科大学法学院,昆明 650500)

【摘要】 物质相关障碍(substance-related disorders, SRDs)是一系列躯体及精神障碍,其中涉及毒品滥用、药物副作用及毒素暴露等,包括酒精及毒品相关障碍在内的 SRDs 已经成为严重的世界公共卫生问题。甲基化 CpG 序列结合蛋白 2(methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2)作为重要的中枢神经系统调控因子,在神经突触可塑性、神经系统发育及成熟大脑功能维持等方面发挥重要作用。大量研究表明,MeCP2 参与了多种 SRDs 的形成,主要涉及 MeCP2 对多种基因的表达调控及其对激素分泌、炎症反应及神经突触可塑性等生物学功能的调节,最终体现在 MeCP2 对奖赏行为、社交行为、认知行为及空间记忆等行为学的影响。MeCP2 对 SRDs 的调控机制较为复杂,目前的研究尚不充分。现对相关研究进行综述,旨在探讨 MeCP2 在 SRDs 中的调控机制,为 SRDs 相关研究提供参考。

【关键词】 物质相关障碍;MeCP2;酒精;苯丙胺;可卡因;阿片

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0115-07

MeCP2 and substance-related disorders

SHEN Baoyu, YANG Genmeng, LIU Pengliang, WANG Shang, HONG Shijun*, LI Lihua*

(School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Substance-related disorders (SRDs) are a series of physical and mental disorders, involving drug abuse, medicinal side effects, and toxin exposure. SRDs, including alcohol- and drug-related disorders, have become a serious worldwide public health problem. Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), an important regulator in the central nervous system, has an important role in many biological functions, such as synaptic plasticity, neuron development, and adult brain function. Many studies have shown that MeCP2 is involved in several SRDs. MeCP2 exerts its regulatory effects on the transcription of genes leading to changes in hormone levels, inflammation, and synaptic plasticity. Generally, MeCP2 influences reward behavior, social behavior, cognitive behavior, and spatial memory. The regulatory mechanism of MeCP2 on SRDs is complex and is poorly understood. Here, we review the role of MeCP2 in SRDs, which will aid future studies of SRDs.

【Keywords】 substance-related disorders; MeCP2; alcohol; amphetamine; cocaine; opium

物质相关障碍(substance-related disorders, SRDs)主要包括:酒精相关障碍(alcohol-related disorders)、苯丙胺相关障碍(amphetamine-related disorders)、可卡因相关障碍(cocaine-related disorders)及阿片相关障碍(opioid-related disorders)等。SRDs 作为严重的世界公共卫生问题,给家庭和

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81760337,81860332);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项项目(2017FE467-003);昆明医科大学毒品滥用法医病理学科技创新团队(CXTD201604);云南省教育厅科学研究基金(2019Y0343,2019Y0344)。

【作者简介】 沈宝玉(1995—),男,硕士研究生,主要从事毒品依赖及其戒断机制研究。E-mail:baoyu19950629@163.com

【通信作者】 洪仕君(1974—),男,副教授,硕士生导师,主要从事毒品依赖及其戒断机制研究。E-mail:knhongshijun@126.com

李利华(1966—),男,教授,博士生导师,硕士,主要从事毒品依赖及其戒断机制研究。E-mail:lilihua1229@126.com

* 共同通信作者

社会卫生事业带来了巨大负担^[1]。甲基化 CpG 序列结合蛋白 2 (methyl-CpG-binding protein 2, MeCP2) 是一种与甲基化 CpG 特异性结合的染色体蛋白,在调节基因表达方面发挥重要作用^[2],其生物学功能表现为促进神经系统发育、调节神经发生及分化、调节突触及神经回路形成、成熟大脑功能维持等^[3]。越来越多的研究表明,MeCP2 作为中枢神经系统功能的关键调节因子,在 SRDs 中发挥重要作用。本文针对 MeCP2 与多种 SRDs 的研究进行综述,为 SRDs 相关研究提供参考。

1 MeCP2 与酒精相关障碍

作为酒精消费大国,中国成年人总体饮酒率为 30.5%,男性饮酒率高达 53.8%,其中约四分之一的饮酒者每日饮酒^[4]。此外,过量饮酒引发的酒精相关障碍已经成为亟待解决的世界卫生问题^[5]。越来越多的研究表明,MeCP2 在酒精相关障碍中扮演着重要角色。

胎儿酒精谱系障碍 (fetal alcohol spectrum disorders, FASD) 是一组由于孕期母体饮酒导致胎儿生长缺陷的疾病,是一种常见的酒精相关障碍^[6]。Kim 等^[7]研究发现,孕鼠酒精重复摄入可致其后代出现了多动、注意力缺陷及易冲动等行为改变。而在子代前额叶皮质和纹状体中,MeCP2 表达下调、多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 及去甲肾上腺素转运体 (norepinephrine transporter, NET) 表达上调,并与母体酒精摄入呈剂量依赖性。这些结果表明,产前暴露于酒精可诱发鼠类后代行为控制障碍,这可能与 MeCP2 介导的表观遗传变化和儿茶酚胺神经递质转运系统异常有关^[7]。Shukla 等^[8]研究发现,孕期小鼠酒精摄入可诱导其雄性子代出现社交行为缺陷,而额叶皮质中 MeCP2 转录下调,白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等转录上调,并伴随着血清中的 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平上调;但雌性子代并无上述变化。而对于类 Toll 受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 缺失的孕鼠而言,酒精摄入不能诱导其雄性子代出现上述变化^[8]。这表明 TLR4 介导的 MeCP2 和炎症因子转录参与了雄性 FASD 中社交行为缺陷的形成。此外,孕鼠产前和产后的联合酒精摄入也能下调其子代海马中 MeCP2 的转录水平^[9]。Gangisetty 等^[10]的研究发现,大鼠孕期摄

入酒精可诱导其雄性子代下丘脑内侧叶中 MeCP2 的表达上调,并伴随着前阿片黑素细胞皮质激素 (proopiomelanocortin, POMC) 基因的转录下调。而 MeCP2 表达抑制后,酒精诱导的 POMC 转录下调也随之恢复。此外,母体酒精摄入也上调了其雄性子代下丘脑中促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin-releasing hormone, CRH) 的转录;而下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 轴应激反应上调了促肾上腺皮质激素 (adreno-cortico-tropic-hormone, ACTH) 及皮质酮 (corticosterone) 在血浆中的释放,当 MeCP2 表达抑制后,上述改变均恢复正常。综上所述,MeCP2 在 FASD 中起着重要的调控作用,其中可能涉及儿茶酚胺转运系统、炎症反应及激素分泌,从而影响个体行为控制及社交行为反应。

MeCP2 不仅在 FASD 中起着关键的调控作用,也在个体大脑发育的不同阶段中,调控着机体对酒精摄入的行为及神经反应。Subbanna 等^[11]的研究发现,新生小鼠早期的酒精摄入可诱导其大脑皮质和海马中 DNA 甲基化下调,并伴随着 MeCP2 的表达下调。而在大麻素 1 型受体 (cannabinoid receptor type-1, CB1R) 表达抑制后,酒精诱导的 MeCP2 表达下调也随之恢复。此外,在 CB1R 敲除小鼠中, CB1R 的缺失也阻断了酒精对 MeCP2 的下调作用。另一方面,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspases) 的广谱抑制剂 Q-VD-Oph 亦可逆转酒精对 MeCP2 的抑制作用。该研究进一步发现,在新生小鼠和成年小鼠中,酒精摄入均能下调其大脑皮质和海马中环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 磷酸化及活性调节细胞骨架相关蛋白 (activity regulated cytoskeleton-associated protein, Arc) 的表达,并诱导成年小鼠空间及社交认知缺陷,而 Q-VD-Oph 均能逆转这些改变^[11]。因此,机体发育早期的酒精摄入可通过 CB1R 及 Caspases 通路调控 MeCP2 的表达,在个体上表现为空间及社交认知缺陷。对于成年个体而言,酒精慢性摄入可致成年大鼠内侧前额叶皮质 MeCP2 的转录及表达上调,而在酒精短期摄入的成年大鼠中, MeCP2 的转录及表达没有明显变化^[12]。Repunte-Canonigo 等^[13]的研究发现,在小鼠慢性酒精摄入的戒断期,其内侧前额叶皮质及伏隔核中出现了 MeCP2 的转录上调;而 MeCP2^{308/y} 突变小鼠比正常小鼠摄入更少的酒精,并对酒精摄入具有较高的敏

感性,酒精撤消后伴随着更为严重的戒断症状;但在等量的酒精摄入后,MeCP2^{308/y}突变小鼠与正常小鼠的血液酒精浓度并无区别。

以上研究表明,MeCP2 在酒精相关障碍中发挥着重要的调节作用,而在个体大脑发育的不同阶段及脑区,MeCP2 对酒精相关障碍起着差异调节作用。在大脑发育早期,MeCP2 可通过调控基因表达、儿茶酚胺转运系统、炎症反应及激素分泌,从而影响个体行为控制、社交行为及空间认知反应;而在成年大脑中,MeCP2 主要介导了个体的酒精反应及摄入。

2 MeCP2 与苯丙胺相关障碍

苯丙胺 (amphetamine, AMPH),也称安非他明,苯丙胺类毒品是 AMPH 及其衍生的一系列精神刺激剂 (psychostimulants),主要包括甲基苯丙胺 (methamphetamine, METH)、2,5-二甲氧-4-甲基苯丙胺 (2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine)、3,4-亚甲二氧苯丙胺 (3,4-methylenedioxymphetamine)、N-甲基-3,4-亚甲二氧苯丙胺 (n-methyl-3,4-methylenedioxymphetamine) 等。以往的 20 多年间,苯丙胺相关障碍逐渐成为了严重的公共卫生问题,针对苯丙胺类毒品问题急需系统的研究、预防和治疗方案^[14]。大量研究表明,MeCP2 在苯丙胺相关障碍形成中起着重要作用,但 MeCP2 调控苯丙胺相关障碍的具体机制尚存争议。

Deng 等^[15]的研究发现,小鼠伏隔核中 MeCP2 的表达抑制或 MeCP2 基因的整体缺失均可增加 AMPH 诱导的条件位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 效应和行为敏化 (behavioral sensitization)。此外,MeCP2 对于小鼠伏隔核中 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 能突触的形成是很重要的,这些突触可能会影响小鼠对精神刺激剂的行为反应,而 MeCP2 缺失减弱了 AMPH 诱导的神经突触可塑性和即刻早期基因 (immediate early genes, IEGs) 表达^[15]。同时,急性 AMPH 摄入可显著诱导小鼠伏隔核 MeCP2 Ser421 位点磷酸化,该诱导作用是通过多巴胺 D1 受体 (dopamine receptor D1, DRD1) 信号通路介导的^[15]。Deng 等^[16]进一步研究发现,缺乏 MeCP2 Ser421 位点磷酸化的小鼠对急性 AMPH 摄入有正常的行为反应;而在 AMPH 重复摄入情况下,该种小鼠对 AMPH 诱导的行为反应有较低的阈值,并伴随着中间多棘神

经元的兴奋性降低及伏隔核 GABA 能神经元中 IEGs 的表达下调。综上所述研究结果,在个体脑发育过程中,MeCP2 的激活可促进抑制性神经元的突触形成,进而在 AMPH 诱导的奖赏行为中发挥抑制作用;而成熟个体中 MeCP2 表达的局部改变可能作为一种自我平衡的补偿机制来限制 AMPH 的奖赏特性。

与上述研究不同,在 METH 自我给药的大鼠模型中,METH 显著诱导了大鼠行为敏化及其伏隔核中 MeCP2 的表达,而通过慢病毒转染降低成年大鼠伏隔核中 MeCP2 的表达可抑制大鼠对 METH 的行为反应^[17]。此外,Wu 等^[18]的研究发现,METH 重复摄入可显著诱导小鼠行为敏化,并伴随着小鼠内侧前额叶皮质、伏隔核中 MeCP2 的表达上调。Jiang 等^[19]的研究发现,METH 急性摄入后可显著降低大鼠黑质中 MeCP2 与编码 α -突触核蛋白 (α -synuclein) 的 Snca 基因结合。此外,METH 重复摄入亦可下调小鼠海马中 MeCP2 的表达,并诱导突触素 (synaptophysin, Syn) 启动子区低甲基化、突触缩短及空间记忆增强;而在前额叶皮质中,METH 诱导了 MeCP2 高表达、Syn 启动子区高甲基化、突触密度增高及认知记忆削弱^[20]。

综上所述,MeCP2 对神经突触可塑性具有重要的调控作用,在苯丙胺类相关的奖赏行为、空间记忆及认知记忆方面扮演着重要角色;而对于 AMPH 和 METH 研究中 MeCP2 的差异调节作用目前还没有合理的解释,是否因 AMPH 和 METH 在结构上的不同引起了这种差异调节作用,还需更多研究。其中 MeCP2 对大脑发育过程中的差异调控可能部分解释了这种差异调节作用。

3 MeCP2 与可卡因相关障碍

可卡因 (cocaine) 是一种从古柯树和叶子中提取的生物碱,名为古柯碱,具有强效的中枢兴奋作用和药物依赖性。过去的十多年间,可卡因相关障碍日益严重,给公共卫生事业带来了严重的负担^[21]。以往的研究表明,MeCP2 在可卡因相关障碍中发挥着重要的调控作用。

Im 等^[22]的研究表明,可卡因长期摄入可上调大鼠纹状体中 MeCP2 的表达,并伴随着前额叶皮质的表达下调。此外,在可卡因长期摄入的大鼠中,纹状体 MeCP2 的表达抑制可限制大鼠可卡因摄入,该限制作用可能是通过上调 microRNA-212 (miR-

212) 的表达, 并进一步激活 CREB 信号通路而发挥作用的; 而在可卡因短期摄入的大鼠中, MeCP2 表达抑制对大鼠可卡因摄入并无明显影响。另一方面, 在可卡因摄入的大鼠纹状体中, miR-212 过表达抑制了 MeCP2 的表达上调; 而在可卡因长期摄入的大鼠中, 该抑制作用更加显著^[22]。该研究进一步发现, 可卡因长期摄入可上调大鼠纹状体中脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达, 而纹状体中 MeCP2 表达抑制或 miR-212 过表达均能显著抑制 BDNF 的表达上调。此外, 在可卡因长期摄入的大鼠纹状体中, BDNF 过表达可促进大鼠可卡因摄入, 而 BDNF 表达抑制可削弱大鼠可卡因摄入^[22]。上述研究结果表明, 在大鼠纹状体中存在着 MeCP2 与 miR-212 相互抑制的稳态作用, 该稳态作用调节着 BDNF 对大鼠可卡因摄入的调控作用, 其中可能涉及 CREB 信号通路。

最近的研究表明, 在可卡因相关性障碍中, MeCP2 对 BDNF 的转录调控并不局限于与 miR-212 的相互抑制作用。在可卡因自我给药的大鼠中, 可卡因能诱导海马和伏隔核中 MeCP2 的表达上调, 但在前额叶皮质中并没有显著的上调作用。此外, 可卡因可显著上调海马中 MeCP2 Ser421 位点磷酸化^[23]。而可卡因对 MeCP2 Ser421 位点磷酸化的诱导作用在以往的研究中, 已被深入探讨。Mao 等^[24]的研究发现, 可卡因摄入可在大鼠纹状体和伏隔核中诱导 MeCP2 Ser421 位点磷酸化, 该诱导作用在伏隔核中出现较早且持久, 而纹状体中 pMeCP2 的诱导需要 NMDA 谷氨酸受体 (n-methyl-d-aspartate glutamate receptor) 的参与。此外, 可卡因摄入可诱导小鼠伏隔核中 MeCP2 Ser421 位点磷酸化^[15], 而缺乏 MeCP2 Ser421 位点磷酸化的小鼠中对可卡因摄入具有较高的行为敏化反应, 并伴随着伏隔核中 CREB 的表达下调^[16]。

大量的研究表明, MeCP2 在可卡因相关障碍中的调控作用可能涉及更多的转录调控机制。Deschattrettes 等^[25]的研究发现, 在大鼠前额叶皮质中定位注射高剂量环磷酸鸟苷 (cyclic GMP, cGMP) 类似物 Br-cG 可显著降低大鼠可卡因摄入, 并伴随着前额叶皮质、伏隔核及纹状体中 MeCP2 的表达下调。Anier 等^[26]的研究发现, 可卡因可诱导蛋白磷酸酶-1 催化亚基 (protein phosphatase-1 catalytic subunit, PPIc) 启动子高甲基化和 MeCP2 的结合增加, 并伴随着 PPIc 的表达抑制; 而 IEGs

中 fosB 启动子低甲基化和 MeCP2 的结合减少, 并伴随着 fosB 的表达上调。此外, 可卡因可诱导 MeCP2^{308/y} 突变小鼠行为敏化和 IEGs 中 Fos、Junb 及 Arc 基因的转录; 相对野生型小鼠而言, MeCP2^{308/y} 突变小鼠对可卡因摄入具有较高的行为敏化, 并伴随着 Junb 和 Arc 基因的转录上调^[27]。

综上所述, MeCP2 在可卡因相关障碍形成中扮演重要角色, 其中主要涉及 MeCP2 对 BDNF、PPIc 及 IEGs 等基因的表达调节作用, 而该调节作用可能由 miR-212 和 cGMP 等介导, 最终反映为 MeCP2 对可卡因奖赏行为的调控作用。

4 MeCP2 与阿片相关障碍

阿片 (opium), 也称鸦片, 是罂粟壳及其未成熟种子的风干渗出液。其中包含许多生物碱, 但只有吗啡、可待因和罂粟碱等具有临床意义。而阿片相关障碍是阿片类药物摄入后产生的严重副作用, 也限制了阿片类药物在临床上的应用^[28]。大量研究表明, MeCP2 也参与了阿片相关障碍的形成。

以往的研究表明, MeCP2 在阿片相关障碍的行为学改变中起着重要的调控作用, 其中主要涉及 MeCP2 的转录调控作用。Zhang 等^[29]的研究发现, 吗啡摄入可诱导小鼠 CPP 效应形成, 而吗啡诱导的 CPP 效应随吗啡摄入剂量的增加而上调。此外, 杏仁中央核 (central nucleus of the amygdala, CeA) 中 MeCP2 和 BDNF 表达上调、转录抑制组蛋白二甲转移酶 (transcriptional repressor histone dimethyltransferase) G9a 表达下调, 而 MeCP2 与 G9a 基因启动子结合增加、G9a 在 BDNF 基因启动子上的结合减少。当小鼠杏仁中央核中 MeCP2 表达抑制后, BDNF 表达下调、G9a 表达上调, 而 MeCP2 与 G9a 基因启动子结合减少、G9a 在 BDNF 基因启动子上的结合增加, 吗啡诱导的 CPP 效应也随之削弱。Moulai 等^[30]研究雌性大鼠吗啡慢性摄入对子代空间记忆能力的影响, 发现其第一代和第二代子代中, 雄性大鼠空间记忆能力明显下降, 并伴随着海马中 MeCP2 的表达上调; 而雌性子代的空间记忆能力及 MeCP2 表达无明显变化。

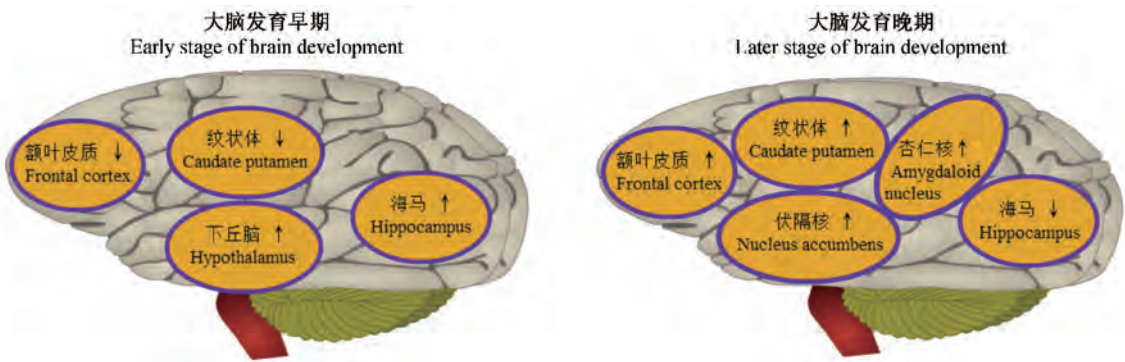
最近的研究表明, MeCP2 对阿片相关障碍的调控作用可能也涉及了 microRNA 的参与。海洛因慢性摄入可下调大鼠伏隔核中 miR-218 水平, 而 miR-218 可直接靶定于 MeCP2^[31]。此外, 大鼠伏隔核中 miR-218 过表达可限制大鼠的海洛因寻求行为; 而

在 MeCP2^{308/y} 突变小鼠中,大鼠的海洛因寻求行为也被显著削弱^[31]。Jimenez-Gonzalez 等^[32]的研究发现,吗啡可诱导斑马鱼胚胎中 miR-212 下调及 miR-132 上调,而 μ 阿片受体 (opioid receptors μ , OPRM) 拮抗剂纳洛酮可显著逆转吗啡的诱导作用。此外,该研究通过荧光素酶测定 (luciferase assay) 发现斑马鱼中 miR-212/132 与 MeCP2 的直接结合,而该结合作用调控着 BDNF 及其受体酪氨酸激酶受体 B (tyrosine receptor kinase B, TrkB) 的表达。

综上所述表明,MeCP2 通过 G9a 和 microRNA 调控着 BDNF 及 TrkB 的表达,而在个体上表现为对 CPP 效应、空间记忆和药物寻求的调控作用。

5 MeCP2 与 SRDs 的行为反应

SRDs 是一系列躯体及精神障碍,对于动物而言,表现为行为控制下降、社交行为缺陷、空间障碍及认知障碍,还包括 CPP 效应、行为敏化、药物寻求等奖赏行为。在 SRDs 的一系列行为反应过程中,MeCP2 起着重要的调控作用。目前的研究发现,MeCP2 可调控 POMC、IEGs、Snca、PP I c、BDNF 及 TrkB 等基因的表达,其中涉及了 CB1R、Caspase、CREB、DRD1 等通路及 microRNA 和 DNA 甲基化的参与,进而引起激素分泌、炎症反应及神经突触可塑性方面的改变,最终调控 SRDs 的行为反应。



注:在大脑发育的不同阶段,酒精及精神刺激剂调节几个脑区中 MeCP2 的表达。

图 1 MeCP2 在 SRDs 中的表达情况

Note. At different stages of brain development, alcohol and psychostimulants regulate the expression of MeCP2 in several brain regions.

Figure 1 Expression of MeCP2 in SRDs

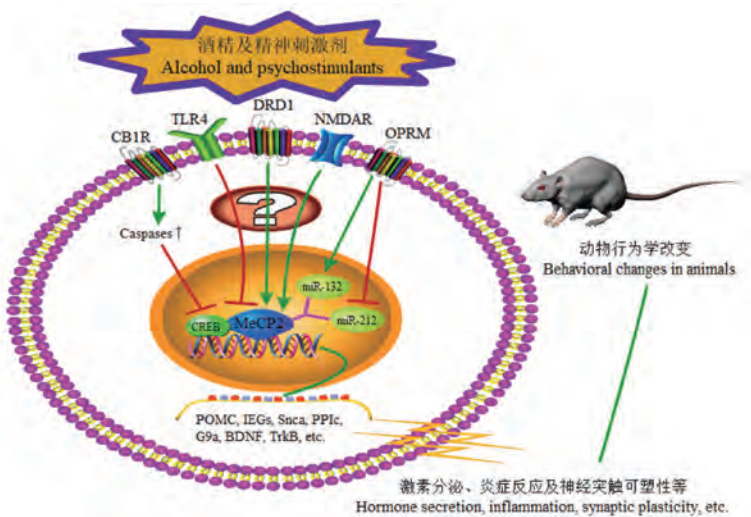


图 2 MeCP2 在 SRDs 中的调控网络

Figure 2 Regulatory network of MeCP2 in SRDs

6 小结与展望

以往的研究表明,在大脑发育的不同阶段,酒精及精神刺激剂均能诱导不同脑区中 MeCP2 的差异表达(图 1),而 MeCP2 在时段和部位的差异表达是其对 SRDs 调控的基础。MeCP2 对 SRDs 的调控机制主要涉及基因表达调控(包括 POMC、IEGs、Snca、PP1c、BDNF 及 TrkB 等基因),从而引起生物学功能改变(包括激素分泌、炎症反应及神经突触可塑性等),最终反应为 MeCP2 对行为学的影响(包括奖赏行为、社交行为、认知行为及空间记忆等)(图 2)。综合来看,MeCP2 对 SRDs 的调控作用可能是多效应稳态的结果,调控机制较为复杂,目前的研究尚不充分,还需更深入的研究。今后的研究可综合基因表达、生物学功能和行为学三个层面,并结合体内、体外实验全面地探讨 MeCP2 对 SRDs 的调控机制;而研究 MeCP2 在 SRDs 中的调控机制对于酒精、毒品及其戒断干预研究具有重要的理论价值和现实意义,这也是 SRDs 研究的新视角和方向。

参考文献:

- [1] Juibari TA, Behrouz B, Attiaie M, et al. Characteristics and correlates of psychiatric problems in wives of men with substance-related disorders, Kermanshah, Iran [J]. *Oman Med J*, 2018, 33(6): 512-519.
- [2] Chahrouh M, Jung SY, Shaw C, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription [J]. *Science*, 2008, 320(5880): 1224-1229.
- [3] Gulmez Karaca K, Brito DVC, Oliveira AMM. MeCP2: A critical regulator of chromatin in neurodevelopment and adult brain Function [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): e4577.
- [4] 李亚茹,王婧,赵丽云,等. 中国成年人饮酒习惯及影响因 [J]. *中华流行病学杂志*, 2018, 39(7): 898-903.
- [5] Global Status Report on Alcohol and Health 2018. World Health Organization. [EB/OL]. (2019). [2020-05-10]. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>.
- [6] Janczewska I, Wierzbica J, Cichon-Kotek M, et al. Fetal alcohol spectrum disorders diagnostic difficulties in the neonatal period and new diagnostic approaches [J]. *Dev Period Med*, 2019, 23(1): 60-66.
- [7] Kim P, Park JH, Choi CS, et al. Effects of ethanol exposure during early pregnancy in hyperactive, inattentive and impulsive behaviors and MeCP2 expression in rodent offspring [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(3): 620-631.
- [8] Shukla PK, Meena AS, Rao R, et al. Deletion of TLR-4 attenuates fetal alcohol exposure-induced gene expression and

- social interaction deficits [J]. *Alcohol*, 2018, 73: 73-78.
- [9] Perkins A, Lehmann C, Lawrence RC, et al. Alcohol exposure during development: Impact on the epigenome [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2013, 31(6): 391-397.
- [10] Gangisetty O, Bekdash R, Maglakelidze G, et al. Fetal alcohol exposure alters proopiomelanocortin gene expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function via increasing MeCP2 expression in the hypothalamus [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113228.
- [11] Subbanna S, Nagre NN, Shivakumar M, et al. CB1R-mediated activation of caspase-3 causes epigenetic and neurobehavioral abnormalities in postnatal ethanol-exposed mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 45.
- [12] Cui HZ, Sun MZ, Wang RZ, et al. DNA methylation in the medial prefrontal cortex regulates alcohol-related behavior in rats [J]. *Yi Chuan*, 2020, 42(1): 112-125.
- [13] Repunte-Canonigo V, Chen J, Lefebvre C, et al. MeCP2 regulates ethanol sensitivity and intake [J]. *Addict Biol*, 2014, 19(5): 791-799.
- [14] Gonzales R, Mooney L, Rawson RA. The methamphetamine problem in the United States [J]. *Annu Rev Public Health*, 2010, 31: 385-398.
- [15] Deng JV, Rodriguiz RM, Hutchinson AN, et al. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(9): 1128-1136.
- [16] Deng JV, Wan Y, Wang X, et al. MeCP2 phosphorylation limits psychostimulant-induced behavioral and neuronal plasticity [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(13): 4519-4527.
- [17] Lewis CR, Bastle RM, Manning TB, et al. Interactions between early life stress, nucleus accumbens MeCP2 expression, and methamphetamine self-administration in male rats [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(12): 2851-2861.
- [18] Wu J, Zhu D, Zhang J, et al. Melatonin treatment during the incubation of sensitization attenuates methamphetamine-induced locomotor sensitization and MeCP2 expression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, 65: 145-152.
- [19] Jiang W, Li J, Zhang Z, et al. Epigenetic upregulation of alpha-synuclein in the rats exposed to methamphetamine [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 745: 243-248.
- [20] Fan XY, Yang JY, Dong YX, et al. Oxytocin inhibits methamphetamine-associated learning and memory alterations by regulating DNA methylation at the Synaptophysin promoter [J]. *Addict Biol*, 2020, 25(1): e12697.
- [21] Kariisa M, Scholl L, Wilson N, et al. Drug overdose deaths involving cocaine and psychostimulants with abuse potential—United States, 2003–2017 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68(17): 388-395.
- [22] Im HI, Hollander JA, Bali P, et al. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212 [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(9): 1120-1127.

[23]Cotto B, Li H, Tuma RF, et al. Cocaine-mediated activation of microglia and microglial MeCP2 and BDNF production [J]. Neurobiol Dis, 2018, 117: 28-41.

[24]Mao LM, Horton E, Guo ML, et al. Cocaine increases phosphorylation of MeCP2 in the rat striatum *in vivo*: a differential role of NMDA receptors [J]. Neurochem Int, 2011, 59(5): 610-617.

[25]Deschatrettes E, Romieu P, Zwiller J. Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents: involvement of epigenetic markers [J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 16(7): 1587-1597.

[26]Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, et al. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice [J]. Neuropsychopharmacology, 2010, 35 (12): 2450-2461.

[27]Su D, Cha YM, West AE. Mutation of MeCP2 alters transcriptional regulation of select immediate-early genes [J]. Epigenetics, 2012, 7(2): 146-154.

[28]Just J, Mücke M, Bleckwenn M. Dependence on prescription opioids [J]. Dtsch Arztebl Int, 2016, 113(13): 213-220.

[29]Zhang Z, Tao W, Hou YY, et al. MeCP2 repression of G9a in regulation of pain and morphine reward [J]. J Neurosci, 2014, 34(27): 9076-9087.

[30]Moulaei N, Mondanizadeh M, Salmani ME, et al. Transgenerational consequences of prepregnancy chronic morphine use on spatial learning and hippocampal Mecp2 and Hdac2 expression [J]. Neuroreport, 2018, 29(9): 739-744.

[31]Yan B, Hu Z, Yao W, et al. MiR-218 targets MeCP2 and inhibits heroin seeking behavior [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40413.

[32]Jimenez-Gonzalez A, García-Concejo A, López-Benito S, et al. Role of morphine, miR-212/132 and mu opioid receptor in the regulation of Bdnf in zebrafish embryos [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(6): 1308-1316.

[收稿日期]2020-06-01

勘误声明

本刊对下述论文进行勘误：

出版信息	2021 年 31 卷 6 期,页码为 95-101
论文标题	全外显子组测序在自身免疫性疾病中的研究进展
稿次	☐ 录用定稿 ☐ 排版定稿 ☐ 整期定稿 ☒ 印刷版 ☐ 其它
作者	马晓敏,王欣,姚新生,谭贵琴,周芳宇,魏文文,于红松
DOI	10. 3969/ j. issn. 1671 - 7856. 2021. 06. 015
勘误内容	文章引用处 原为： 马晓敏,王欣,姚新生,等. 全外显子组测序在自身免疫性疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 95-101. Ma XM,Wang X,Yao XS, et al. Progress in research of whole-exon sequencing in patients with autoimmune diseases [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 95-101. 更改为： 马晓敏,王欣,姚新生,等. 全外显子组测序在自身免疫性疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 95-101, 115. Ma XM,Wang X,Yao XS, et al. Progress in research of whole-exon sequencing in patients with autoimmune diseases [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(6): 95-101, 115.
其他说明	

张森,洪芬芳,杨树龙. 肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 122-127.
Zhang S, Hong FF, Yang SL. Hepatic lipid metabolism and atherosclerosis treatment [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 122-127.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 018

肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗

张 森¹,洪芬芳²,杨树龙^{1*}

(1.南昌大学基础医学院生理学教研室,南昌 330006;2.南昌大学实验教学中心,南昌 330006)

【摘要】 动脉粥样硬化是一种涉及脂质代谢紊乱和慢性炎症状态的复杂的病理过程。作为人体最大的脂质代谢器官,肝通过影响脂肪生成、分解以及血清脂蛋白的摄取和分泌在脂质代谢中起着重要的作用。进一步的研究集中在以改善肝脂质代谢为基础,开发具有降脂、抗炎和抗氧化活性的新的策略上。在本综述中,探讨了以调控肝脂质代谢为靶点的动脉粥样硬化治疗新措施,包括新的生物标志物、治疗靶点、中药和天然膳食补充剂。

【关键词】 肝脂质代谢;动脉粥样硬化;中药;天然膳食补充剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0122-06

Hepatic lipid metabolism and atherosclerosis treatment

ZHANG Sen¹, HONG Fenfang², YANG Shulong^{1*}

(1. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China.
2. Department of Experimental Teaching Center, Nanchang University, Nanchang 330006)

【Abstract】 Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease caused by various pathogenic factors. Lipid metabolism disorders have a fundamental role in the pathogenesis of atherosclerosis. The liver is the largest metabolic organ in humans and has a key role in lipid metabolism by influencing fat production, fat decomposition, and the intake and secretion of serum lipoproteins. By targeting hepatic lipid metabolism, research and development studies have focused on novel lipid-lowering strategies. Here, we review novel approaches to target the regulation of liver lipid metabolism for the treatment of atherosclerosis, including new biomarkers, therapeutic targets, traditional Chinese medicine, and natural dietary supplements.

【Keywords】 hepatic lipid metabolism; atherosclerosis; Chinese herbal medicine; natural dietary supplements

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)相关疾病有很高的患病率和死亡率,是造成心血管疾病发病和死亡的主要原因之一。尽管生活方式的改善和降脂药物的使用在 AS 的临床治疗中效果显著,如临床使用最广泛的他汀类和抗血小板药物,但 AS 发病率仍然持续上升。肝作为人体最重要的脂质代谢器官,与血脂水平密切相关。肝通过调节胆固醇从头合成和胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)等机制在脂质稳态中起重要作用^[1]。此外,肝脂质代谢紊乱可促进 AS 发生发展的危险因素,包括炎症反应、氧化应激、胰岛素抵抗和泡沫细胞形成等增加。因此,针对肝脂质代谢和 AS 相关性,研究开发治疗 AS 和代谢性疾病的新药物至关重要。本文总结了以调控肝脂质代谢为主要靶点,改善 AS 病变的新措施,包括新的生物标志物、治疗靶点、中医中药和天然膳食补充剂等。这些新的干预措施通过不同的机制调控肝脂质代谢,减轻了 AS 发生发展的危险因素,为 AS 的预防、治

【基金项目】 国家自然科学基金(81660151,81660751,82060661)。
【作者简介】 张森(1996—),男,在读硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化和肠道微生物研究。E-mail: zhangsen1628@163.com
【通信作者】 杨树龙(1966—),男,教授,博士生导师,主要从事肝脏缺血损伤病理与药理和心血管生理学研究。
E-mail: slyang@ncu.edu.cn

疗、新药研究和临床用药提供了更多依据。

1 生物标志物和潜在靶点

1.1 微小 RNA

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类长度在 18–25 个核苷酸的非蛋白质编码的 RNA。miRNAs 在肥胖、糖尿病和 AS 等脂质代谢紊乱相关疾病中起到重要作用,肝、骨骼肌、心肌以及脂肪组织,均受到 miRNAs 的影响。miR-122 是肝中表达最广泛的 miRNAs。Krutzfeldt 等^[2]的研究表明 miR-122 参与肝胆固醇等脂质代谢,反义靶向 miR-122 可使血浆胆固醇水平显著下降。但 miR-122 影响胆固醇代谢的确切靶点仍不清楚。miR-33 同样与肝胆固醇代谢有关。在 miR-33a 敲除小鼠中,ATP 结合盒转运体 (ATP-binding cassette transporter A1, *Abca1*) 表达和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平显著升高^[3]。miR-148a 在人和小鼠肝组织中高度表达,miR-148a 与循环中总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和甘油三酯水平变化密切相关。Goedeke 等^[4]的研究表明,小鼠 miR-148a 过表达下调肝低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, *Ldlr*) 和 *Abca1* 的表达,导致循环中 LDL-C 水平升高和 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平降低。miR-30c 通过靶向溶血磷脂酰甘油酰基转移酶 1,抑制肝脂质的合成。过表达 APOE^{-/-} 小鼠 miR-30c 可显著降低循环中极低密度脂蛋白胆固醇和 LDL-C 水平,并减少 AS 病变面积,拮抗 miR-30c 则出现相反的表现^[5]。miR-27 可调控脂肪细胞和巨噬细胞中的脂质代谢,并与 AS 和 NAFLD 等疾病发生发展有关。徐梓馨等^[6]的研究表明,过表达 miR-27a 通过抑制脂肪酸合酶和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶的表达调节肝星状细胞脂质代谢,减轻肝脂质沉积,从而改善肝脂肪变。此外,miR-29b-3p^[7]、miR-143^[8]、miR-181a^[9]、miR-103 和 miR-107^[10] 也已被证明与肝脂质代谢有关。

由 Regulus Treeutics 和 AstraZeneca 研发的 miR-103/107 抑制剂 RG-125 用于治疗糖尿病前期患者的非酒精性脂肪性肝炎^[11–12]。RG-125 的治疗作用基于其抑制 miR-103/107 活性的能力。小鼠中 miR-103/107 沉默后,肝甘油三酯水平显著降低,胰岛素敏感性提高^[13]。因此,RG-125 有可能作为一种有效的胰岛素增敏剂。基于 miRNAs 的治疗靶向多种 mRNA 产生的协同作用对治疗脂质代谢紊乱

具有明显的优势,并阻止了耐药性的产生。但先天免疫或神经毒性的激活是 miRNAs 潜在的副作用,且每个 miRNAs 可能有数百个 mRNA 靶点,配伍不当可能会抑制其它靶点而引起不良反应。

1.2 肝 X 受体

肝 X 受体 (liver X receptor, *LXR*) 调节不同组织的脂质代谢,促进 RCT,是治疗 AS 潜在的药物靶点。*LXR* 调节 ATP 结合盒转运体家族、载脂蛋白 E、胆固醇 7 α 羟化酶 (cholesterol 7 α hydroxylase, *CYP7A1*) 等 RCT 相关基因的表达,促进外周胆固醇转运至肝转化、清除。*LXR* 的激活则直接或间接调控肝内的脂肪酸及甘油三酯合成,引起肝内新生脂肪堆积,进而导致 AS、NAFLD 等疾病^[14]。由于治疗过程中的肝脂肪生成增加和肝脂肪变性导致肝毒性,*LXR* 激动剂的临床应用并没有显著成效 (表 1)。Yu 等^[15]的研究采用 IV 型胶原 (Col IV) 靶向配体对纳米粒子进行功能化,提高了对 AS 斑块的靶向性,同时保护非靶点器官,并对聚乙二醇 (PEG) 包衣分子的长度等参数进行了优化,生成了 IV 型胶原靶向包裹 GW 的纳米粒 (Col IV-GW-NPs)。接受 Col IV-GW-NPs 干预的 LDLR^{-/-} 小鼠在治疗期间没有表现出肝脂质合成增加或高脂血症。该研究揭示了一种基于 *LXR* 的新疗法,能够在不增加血浆或肝脂质水平的情况下使 *LXR* 激动剂发挥对 AS 病变的治疗作用。

1.3 热休克蛋白 90 β

热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 是哺乳动物中含量最丰富的蛋白质,以其是否含有丰富的谷氨酰胺片段将 HSP90 分为 HSP90 α 和 HSP90 β 两类。抑制 HSP90 活性能有效改善癌症、代谢性疾病、神经退行性疾病和炎症性疾病。Zheng 等^[19]的研究表明,肝 HSP90 β 在非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 患者和肥胖小鼠中过度表达,敲除小鼠肝 HSP90 β 可显著抑制肝胆固醇和脂肪酸的从头合成。基因靶向或药物抑制 HSP90 β 可通过 *Akt-Gsk3 β -Fbw7* 途径抑制胆固醇调节元件结合蛋白 (sterol-regulatory element binding proteins, *Srebps*) 活性,改善高脂饮食引起的肝脂肪变性、2 型糖尿病和 AS。此外,他们还筛选出了一种新的 HSP90 β 特异性抑制剂—Corylin。Corylin 在肠道和肝中经历了大量的首过代谢,因此肝可能是 Corylin 发挥作用的主要靶点器官。但首过代谢可能严重影响口服药物的生物利用度。

表 1 LXR 激动剂临床研究进展
Table 1 Progress in clinical research of LXR agonists

激动剂 Agonists	NCT	临床试验分期及受试者 Clinical trial stage and participate	结果 Result
VTP-38543 ^[16]	NCT02655679	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult 临床 II 期,健康成人 Phase 2,healthy adult	完成;可显著改善脂质水平且耐受性好 Completed; significantly improve lipid levels and well tolerated
CS-8080	NCT00613431	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult	完成;未报告结果 Completed; no results posted
	NCT00796575	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult	终止;未报告结果 Terminated; no results posted
BMS-852927 ^[17]	NCT01651273	临床 I 期,服用他汀类药物≥6 周的原发性高胆固醇血症者 Phase 1,primary hypercholesterolemia on a stable daily dose of a statin for ≥ 6 weeks	终止;甘油三酯水平升高,循环中嗜中性粒细胞减少 Terminated; elevated TG levels and decreased circulating neutrophils
BMS-779788	NCT00836602	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult	完成;未报告结果 Completed; no results posted
	NCT00366522	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult	完成;未报告结果 Completed; no results posted
LXR-623 ^[18]	NCT00385489	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult	完成;未报告结果 Completed; no results posted
	NCT00379860	临床 I 期,健康成人 Phase 1,healthy adult	终止;中枢神经不良反应 Terminated; central nervous system side effects

1.4 基质金属蛋白酶 9

基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 属于基质金属蛋白酶家族,其活性的升高可加速动脉粥样硬化病变的进展,以及心肌梗死和病理性血管重塑的形成。Hernandez-Anzaldo 等^[20]的研究表明,MMP-9 是调节胆固醇代谢新的靶点,MMP-9 活性改变可影响肝对膳食胆固醇的转录反应,从而导致脂质代谢紊乱引起的动脉粥样硬化。Mmp9 敲除小鼠血浆中分泌型磷脂酶 A2 (secreted phospholipase A2, sPLA2) 活性增加。Srebp-2 在口服 sPLA2 广谱抑制剂 varespladib 的 Mmp9 敲除小鼠中表达降低。提示 MMP-9 部分通过 MMP-9—血浆 sPLA2 轴调节 Srebp-2 表达,从而导致肝胆固醇代谢紊乱。小檗碱、芪棱汤、化痰通络汤等已被证明可降低 AS 患者 MMP-9 表达,并减轻动脉粥样硬化程度。MMP-9 在 AS 中的治疗作用仍存在争议,但可作为评估 AS 患者急性心肌梗死风险的检测指标。MMP-9 在国外已被用于易损斑块的临床检测^[21-22]。

1.5 富含亮氨酸的三角状五肽重复结构蛋白

富含亮氨酸的三角状五肽重复结构蛋白 (leucine rich pentatricopeptide repeat containing protein, LRPPRC) 是 PPR 家族的主要成员之一。LRPPRC 主要定位于线粒体,在调节线粒体功能和自噬中发挥重要作用。LRPPRC 通过与线粒体

RNA 聚合酶结合形成转录起始复合物,增强肝氧化磷酸化活性,促进肝脂肪酸 β 氧化。Lei 等^[23]的研究表明,LRPPRC 通过增加肝氧化磷酸化活性,促进肝细胞脂肪酸摄取和氧化,降低肝和循环中甘油三酯和胆固醇水平,从而改善小鼠 NAFLD。Akie 等^[24]通过异位表达 LRPPRC 增加小鼠肝氧化磷酸化活性。肝氧化磷酸化活性的增加使小鼠 NAD⁺/NADH 比值显著升高,从而促进肝细胞脂肪酸完全氧化,减轻高脂饮食小鼠肝脂肪变性和炎症反应。

2 中药

2.1 灰树花

灰树花即舞茸,是一种非褶菌目多孔菌科植物,是富含纤维素、微量元素蛋白质和多糖的膳食补充剂。灰树花提取物具有多种药理作用,包括抗肿瘤、免疫调节、降压和抗氧化等功效。先前的研究表明,灰树花通过促进胆固醇向胆汁酸转化降低血脂水平^[25]。随后,Ding 等^[26]的研究表明灰树花通过下调羧甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA reductase, Hmgcr) 和乙酰辅酶 A mRNA 的表达,抑制肝胆固醇和甘油三酯合成,有效降低血清胆固醇和甘油三酯水平。此外,肠道微生物可利用灰树花分解产生的鼠李糖、海藻糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸产生短链脂肪酸,有助于改善

肠道微环境^[27]。Guo 等^[28]的研究表明,灰树花提取物可显著降低肠道葡萄球菌的丰度,且葡萄球菌丰度与肝甘油三酯、胆固醇和游离脂肪酸水平成正比。Li 等^[29]采用 16s rRNA 测序技术分析了灰树花提取物对高脂饮食大鼠肠道菌群组成的影响。灰树花提取物可降低 Firmicutes/Bacteroidetes 菌属比值。Firmicutes/Bacteroidetes 菌属比值的升高能够促进脂质的生成。灰树花提取物减轻高脂饮食大鼠肝脂肪变性,改善肝脂质代谢的活性可能与该比值的降低有关。

2.2 强心丸

强心丸是由丹参、三七和冰片等组成的复方中药,在我国的心血管疾病治疗中得到了广泛而有效的应用。强心丸主要活性成分为来源于丹参的丹参素、二羟基苯基乳酸、丹参酮 II-A 和来源于三七的三七总黄酮、三七皂苷 R1。丹参素可促进脂肪酸 β 氧化,调节胆固醇水平。三七总黄酮通过调节 CYP7A1 表达,改善肝胆汁酸和胆固醇的代谢,发挥降脂作用。中医临床上强心丸主要适用于气滞血瘀型冠心病,以活血理气为主。临床研究表明,强心丸能够显著改善冠心病患者血脂水平和血流动力学改变,减少患者心绞痛发作次数和持续时间^[30]。Deng 等^[31]的研究表明,强心丸联合重组人尿激酶原可上调 *Abcg5* 和 *Abcg8* 的表达,显著减轻 LDLR^{-/-}小鼠 AS 病变。此外,肝甘油三酯沉积可导致脂肪酸氧化和甘油三酯脂解受抑制。强心丸联合重组人尿激酶原上调了甘油三酯脂肪酶的表达,促进甘油三酯脂解,减轻肝甘油三酯沉积。

2.3 二苯乙烯苷

二苯乙烯苷(2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-d glycoside, TSG)又称芪多酚,属于多羟基芪类化合物,是何首乌的有效活性成分。TSG 具有多种生理活性和药用价值,如降血脂、清除自由基、抗肿瘤和抗动脉粥样硬化等^[32]。Yao 等^[33]利用蛋白质组学分析在 TSG 干预前后大鼠中鉴定出 5 个主要的差异表达蛋白,包括波形蛋白、热休克蛋白 70、脂皮素 1、载脂蛋白 A1 和钙网蛋白。其中,载脂蛋白 A1 对于 HDL 介导胆固醇从外周组织输送到肝十分重要。Xu 等^[34]的研究表明,TSG 干预显著减轻高脂饮食喂养的 LDLR^{-/-}小鼠肝脂肪变性和 AS 病变。TSG 可显著降低 *Srebp1* 表达,上调 *Abcg5* 和 *Cyp7a1* 的表达。提示 TSG 可通过影响肝脂质从头合成、脂肪酸 β 氧化和 RCT 等脂质代谢关键机制发挥治疗 AS 的作用。Chen 等^[35]的研究同样表明,TSG 通过促进胆固醇外流和肝对胆固醇的摄取,改善肝脂质

代谢,减轻 ApoE^{-/-}小鼠 AS 病变。

3 天然膳食补充剂

3.1 橄榄多酚

橄榄油是地中海饮食中主要的脂肪来源,橄榄油中含有的酚类化合物,可预防 AS 和 NAFLD 等多种疾病。Vergani 等^[36]的研究表明,从橄榄果渣中提取的酚类化合物可改善肝脂质蓄积和氧化应激,保护肝细胞和内皮细胞免受脂质沉积和氧化应激的侵害,具有潜在的治疗肝脂肪变性和 AS 的作用。橄榄多酚通过降低细胞外调节激酶活性以及抑制脂肪细胞分化相关基因的表达减少游离脂肪酸诱导的脂肪生成,从而减轻 HepG2 细胞脂肪变性^[37]。因此,减少肝脂质合成是橄榄多酚发挥降血脂作用的可能机制之一。

Violi 等^[38]将 25 名健康受试者按交叉设计原则随机分配为 2 组,分别添加橄榄多酚 10 g/d 和同等剂量的玉米油。结果表明,橄榄多酚可显著降低餐后 2 h 血糖和 LDL-C 水平。在 Covas 等^[39]的交叉试验中,200 名受试者分别口服 3 种不同酚类含量的橄榄油,持续三周。结果表明,TC/HDL-C 比值随着橄榄油中酚类物质含量的增加呈线性下降。但是由于橄榄多酚在肠道中吸收不完全,导致橄榄多酚生物利用度较低^[40]。然而,临床和实验室数据表明在饮食中添加适量的橄榄多酚能够发挥预防代谢综合征的作用,尤其是脂质代谢紊乱导致的 AS 和 NAFLD。进一步的研究应集中在橄榄多酚在人体内的药代动力学和药效学研究。

3.2 支链淀粉

支链淀粉又称普鲁兰多糖,是一种由发芽短梗霉发酵所产生的类似葡聚糖、黄原胶的胞外水溶性粘质多糖。支链淀粉具有无毒、无免疫原性和无致癌性等特性,广泛应用于基因传递和靶向药物治疗等生物学领域,临床多用于抗癌药物的载体^[41]。支链淀粉对肝具有特异性,可将各种物质输送到肝。Xi 等^[42]采用三聚氯氰法实现了支链淀粉与干扰素的化学偶联,使干扰素靶向肝,提高干扰素在肝中的含量。Stefan 等^[43]通过与甘油基三甲基氯化铵(GTMAC)反应成功合成了阳离子修饰的支链淀粉(Pull-GTMAC)。Pull-GTMAC 通过调节 ApoE^{-/-}小鼠肝脂质代谢相关 mRNA 的表达,如 *Ldlr*,影响脂质代谢,发挥抗 AS 作用。但是,支链淀粉是一种消化缓慢的碳水化合物,在摄入支链淀粉后可能出现胃肠道不耐受的症状,如恶心、腹部痉挛和腹胀等。

3.3 褐藻糖胶

褐藻糖胶是褐藻类植物(如海带、昆布)中特有的多糖成分,但与一般的多糖类物质不同,褐藻糖胶部分羟基被硫酸酯化,与硫酸基之间用酯键连接。褐藻糖胶具有多种生物学功能,如抗肿瘤、降脂、抗炎、抑制肾纤维化等。脂质代谢组学研究表明,褐藻糖胶可通过影响黄颡鱼幼鱼脂质成分的含量调节其生长和免疫^[44]。Yang 等^[45]的研究表明,褐藻糖胶通过上调 *Srb1* 和 *Ldlr* 表达改善 C57BL/6J 小鼠肝中脂质的摄取;通过激活小鼠肝中 *Lxrβ/Abc* 途径加速脂质代谢;通过上调 *Cyp7a1* 表达调节肝中胆固醇向胆汁酸的转化。Yin 等^[46]的研究同样表明,褐藻糖胶通过调节 ApoE^{-/-} 小鼠 *Pparα*、*Lxr* 等 RCT 相关 mRNA 和蛋白的表达改善肝脂质代谢紊乱,并且以剂量依赖性的方式减轻动脉粥样硬化病变。由中科院海洋研究所研制的昆酯珍·褐藻糖胶已上市,其含量可达到每 100 mL 超过 450 mg,可实现对海带的全食营养。褐藻糖胶属于天然食品,但由于褐藻糖胶是一种水溶性纤维,大量食用可导致暂时性软便。此外,大量食用褐藻糖胶可增加凝血时间,应避免与抗凝药物联合应用。

4 结语

综上所述,对潜在的治疗靶点进行干预可调节肝对脂质稳态的影响,发挥降脂、抗炎和抗氧化等作用;许多中药和天然膳食补充剂因其安全性和有效性较好,以及潜在的生物活性成分可以帮助预防或治疗脂质代谢紊乱相关疾病而成为 AS 防治新的策略。由于部分措施和化合物的作用机理仍不确定,且 AS 发生发展的调控机制复杂,以后的研究可着重探讨其作用的分子机制。

参考文献:

[1] Bonomini F, Filippini F, Hayek T, et al. Apolipoprotein E and its role in aging and survival [J]. *Exp Gerontol*, 2010, 45(2): 149-157.

[2] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' [J]. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-689.

[3] Horie T, Ono K, Horiguchi M, et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (*Srebp2*) regulates HDL *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(40): 17321-17326.

[4] Goedeke L, Rotllan N, Canfrán-Duque A, et al. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1280-1289.

[5] Soh J, Iqbal J, Queiroz J, et al. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion [J]. *Nat Med*, 2013, 19(7): 892-900.

[6] 徐梓馨, 罗昕, 罗声政, 等. MicroRNA27a 抑制肝星状细胞脂质代谢分子机制的初步研究 [J]. *肝脏*, 2020, 25(9): 994-997.

[7] 杨仁国, 贺微微, 罗婷婷, 等. MiR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 66-72.

[8] Jordan SD, Kruger M, Willmes DM, et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(4): 434-446.

[9] Zhou B, Li C, Qi W, et al. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(7): 2032-2043.

[10] Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedeke L, et al. MicroRNAs in metabolic disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): 178-185.

[11] Regulus Therapeutics. Regulus announces notice of allowance from U.S. patent office related to microRNA-103/107 Program in Metabolic Disorders [EB/OL]. [2014-09-24]. <http://ir.regulusrx.com/news-releases/news-release-details/regulus-announces-notice-allowance-us-patent-office-related>.

[12] Regulus Therapeutics. RG-125 (AZD4076), a microRNA Therapeutic Targeting microRNA-103/107 for the Treatment of NASH in Patients with Type 2 Diabetes/Pre-Diabetes, Selected as Clinical Candidate by AstraZeneca [EB/OL]. [2015-04-07]. <http://ir.regulusrx.com/news-releases/news-release-details/rg-125-azd4076-microrna-therapeutic-targeting-microrna-103107>.

[13] Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity [J]. *Nature*, 2011, 474(7353): 649-653.

[14] 张世昭, 马超群, 张丰翠, 等. 肝 X 受体在肝脏脂代谢中的研究进展 [J]. *浙江医学*, 2020, 42(15): 1677-1680.

[15] Yu M, Amengual J, Menon A, et al. Targeted nanotherapeutics encapsulating liver X receptor agonist GW3965 enhance antiatherogenic effects without adverse effects on hepatic lipid metabolism in *ldlr* (-/-) mice [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(20): 10.

[16] Czarnowicki T, Dohlman AB, Malik K, et al. Effect of short-term liver X receptor activation on epidermal barrier features in mild to moderate atopic dermatitis: A randomized controlled trial [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2018, 120(6): 631-640.

[17] Kirchgesner TG, Sleph P, Ostrowski J, et al. Beneficial and adverse effects of an LXR agonist on human lipid and lipoprotein metabolism and circulating neutrophils [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(2): 223-233.

[18] Katz A, Udata C, Ott E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants [J]. *J Clin Pharmacol*,

- 2009, 49(6): 643–649.
- [19] Zheng ZG, Zhang X, Liu XX, et al. Inhibition of HSP90 β improves lipid disorders by promoting mature SREBPs degradation via the ubiquitin-proteasome system [J]. *Theranostics*, 2019, 9(20): 5769–5783.
- [20] Hernandez-Anzaldo S, Brglez V, Hemmeryckx B, et al. Novel role for matrix metalloproteinase 9 in modulation of cholesterol metabolism [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(10): e004228.
- [21] Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(5): 410–428.
- [22] Nanni S, Melandri G, Hanemaaijer R, et al. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation, and genetic polymorphisms [J]. *Transl Res*, 2007, 149(3): 137–144.
- [23] Lei S, Sun RZ, Wang D, et al. Increased hepatic fatty acids uptake and oxidation by LRPPRC-driven oxidative phosphorylation reduces blood lipid levels [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 270.
- [24] Akie TE, Liu L, Nam M, et al. OXPHOS-mediated induction of NAD⁺ promotes complete oxidation of fatty acids and interdicts non-alcoholic fatty liver disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125617.
- [25] Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y, et al. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001, 226(8): 758–765.
- [26] Ding Y, Xiao C, Wu Q, et al. The mechanisms underlying the hypolipidaemic effects of grifola frondosa in the liver of rats [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1186.
- [27] Zhao R, Cheng N, Nakata PA, et al. Consumption of polysaccharides from *Auricularia auricular* modulates the intestinal microbiota in mice [J]. *Food Res Int*, 2019, 123: 383–392.
- [28] Guo WL, Deng JC, Pan YY, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Grifola frondosa* polysaccharides and their relationships with the modulation of intestinal microflora in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153: 1231–1240.
- [29] Li X, Zeng F, Huang Y, et al. The positive effects of grifola frondosa heteropolysaccharide on NAFLD and regulation of the gut microbiota [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5032.
- [30] Inoue Y, Miyashita F, Minematsu K, et al. Clinical characteristics and outcomes of intracerebral hemorrhage in very elderly [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(1): 97–102.
- [31] Deng JN, Li Q, Sun K, et al. Cardiotonic pills plus recombinant human prourokinase ameliorates atherosclerotic lesions in LDLR (–/–) mice [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1128.
- [32] 王婷, 范益. 何首乌二苯乙烯苷对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的影响 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(14): 25–28, 56.
- [33] Yao W, Fan W, Huang C, et al. Proteomic analysis for anti-atherosclerotic effect of tetrahydroxystilbene glucoside in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(2): 140–145.
- [34] Xu J, Peng Y, Zeng Y, et al. 2, 3, 4', 5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D glycoside attenuates age- and diet-associated non-alcoholic steatohepatitis and atherosclerosis in ldl receptor knockout mice and its possible mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1617.
- [35] Chen X, Tang K, Peng Y, et al. 2, 3, 4', 5-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D glycoside attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice: role of reverse cholesterol transport [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 96(1): 8–17.
- [36] Vergani L, Vecchione G, Baldini F, et al. Polyphenolic extract attenuates fatty acid-induced steatosis and oxidative stress in hepatic and endothelial cells [J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57(5): 1793–1805.
- [37] Hur W, Kim SW, Lee YK, et al. Oleuropein reduces free fatty acid-induced lipogenesis via lowered extracellular signal-regulated kinase activation in hepatocytes [J]. *Nutr Res*, 2012, 32(10): 778–786.
- [38] Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, et al. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects [J]. *Nutr Diabetes*, 2015, 5(7): e172.
- [39] Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145(5): 333–341.
- [40] Galiano V, Villalain J. Oleuropein aglycone in lipid bilayer membranes. A molecular dynamics study [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1848(11): 2849–2858.
- [41] Raychaudhuri R, Naik S, Shreya AB, et al. Pullulan based stimuli responsive and sub cellular targeted nanoplateforms for biomedical application: Synthesis, nanoformulations and toxicological perspective [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 161: 1189–1205.
- [42] Xi K, Tabata Y, Uno K, et al. Liver targeting of interferon through pullulan conjugation [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(12): 1846–1850.
- [43] Stefan J, Kus K, Wisniewska A, et al. New cationically modified pullulan attenuates atherogenesis and influences lipid metabolism in apoE-knockout mice [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2016, 67(5): 739–749.
- [44] 徐盼盼, 宋悦, 陈娟娟, 等. 基于脂质代谢组学研究褐藻糖胶对黄颡鱼幼鱼的影响 [J]. *分析化学*, 2017, 45(5): 641–677.
- [45] Yang Z, Yin J, Wang Y, et al. The fucoidan A3 from the seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances RCT-related genes expression in hyperlipidemic C57BL/6J mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 134: 759–769.
- [46] Yin J, Wang J, Li F, et al. The fucoidan from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Food Funct*, 2019, 10(8): 5124–5139.

尚开,姚启盛,付圣赐. zeste 基因同源蛋白 2 在肿瘤免疫中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 128-133.
Shang K, Yao QS, Fu SC. Research progress of enhancer of zeste homolog 2 in tumor immunity [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 128-133.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 019

zeste 基因同源蛋白 2 在肿瘤免疫中的研究进展

尚 开¹,姚启盛^{2*},付圣赐²

(1.湖北医药学院,湖北 十堰 442000;2.太和医院泌尿外科,湖北 十堰 442000)

【摘要】 zeste 基因同源蛋白 2(enhancer of zeste homolog 2,EZH2)是 EZH2 基因编码的一种赖氨酸特异性组蛋白甲基转移酶(H3K27me3),属于多梳蛋白家族(polycomb-group proteins,PcGs)成员,是 PRC2 的催化组分,通过表观遗传机制在 Lys 27 位点催化组蛋白 H3 甲基化调控基因表达。肿瘤微环境参与肿瘤发生、发展及预后,近来越来越多证据显示 EZH2 在多种免疫细胞中表达并参与调节肿瘤微环境,对不同免疫细胞、免疫应答和抗肿瘤免疫起到重要的调控作用。我们将总结其在不同细胞类型中的各种免疫调节功能,并探讨 EZH2 作为肿瘤免疫治疗靶点的潜力。

【关键词】 EZH2;肿瘤免疫;肿瘤微环境;免疫细胞;免疫治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0128-06

Research progress of enhancer of zeste homolog 2 in tumor immunity

SHANG Kai¹, YAO Qisheng^{2*}, FU Shengci²

(1.Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China. 2. Urology of Taihe Hospital, Shiyan 442000)

【Abstract】 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a histone methyltransferase and catalytic component of PRC2, catalyzes the tri-methylation of histone H3 at LYS27 (H3K27me3) to regulate gene expression through epigenetic machinery, and is a member of the polycomb group of proteins. EZH2 is involved in the epigenetic inhibition of the expressions of numerous tumor suppressor genes, regulation of the cell cycle, promotion of cell proliferation, and cell invasion. The tumor microenvironment is related to the occurrence of tumors, tumor development, and prognosis. Recently, many studies have reported that EZH2 is expressed in a variety of immune cells and regulates the tumor microenvironment. It is also an essential component of immune responses and anti-tumor immunity. We summarize the function of EZH2 in different cell types and explore its potential as a tumor immunotherapy target.

【Keywords】 EZH2; tumor immunity; tumor microenvironment; immune cell; immunotherapy

表观遗传学让我们认识到子代表型取决于亲代基因的局限性,组蛋白修饰、DNA 甲基化和非编码 RNA 等表观遗传在肿瘤的发生过程中起重要作用。细胞的生长发育同时受到环境因素影响,特定环境中表观的遗传特征甚至表现出可逆潜能^[1-2]。

EZH2 通过对组蛋白甲基化修饰,激活或抑制相关基因表达导致肿瘤发生,研究发现其还参与组成肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)干扰破坏免疫稳态而促进肿瘤进展,在不同免疫细胞中差异表达发挥不同的生理作用^[3-4]。本文就 EZH2 在

【基金项目】湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2019M060)。
【作者简介】尚开(1990—),男,硕士研究生,研究方向:前列腺癌。E-mail: 891952650@qq.com
【通信作者】姚启盛(1965—),男,博士,主任医师,教授,研究方向:泌尿系肿瘤。E-mail: hbsyyqsdr@163.com

TME 中如何调节免疫功能及其免疫治疗的意义作一综述。

1 EZH2 基因及其生物学功能

EZH2 是重要的表观遗传调控因子,是哺乳动物细胞中组蛋白 H3 赖氨酸 27 (H3K27) 甲基化的两种必需的催化酶之一,哺乳动物中已发现了两个 PcG 复合物家族: PRC1 (polycomb-complex 1) 和 PRC2。PRC1 复合物由多个亚基组成,如 PCGF、HPH、CBX 和 RING1 同源基团组成,催化组蛋白 H2A 的单双基化;而 PRC2 复合物主要由 EED、SUZ12、RbAp46/48、EZH1 或 EZH2 组成,参与 H3K27 的甲基化^[5]。EZH2 作为 PRC2 的催化亚基,是 PRC2 体外酶活性所必需的组成部分,其基因定位于 7 号染色体长臂 7q35,包含 20 个外显子,编码 746 个氨基酸残基。EZH2 包括几个结构域: SET 保守结构域(位于 C 端维持组蛋白甲基转移酶活性)、CXC 结构域和 ncRBD 结构域(与其他 PRC2 成分和调控蛋白相互作用所必需)^[6]。EZH2 修饰组蛋白 H3K27 甲基化(H3K27me3)是一种转录抑制的表观遗传标记,参与维持干细胞特性(见表 1),调控基因表达、细胞周期、细胞分化和组织器官的发育, H3K27me3 可促进多种肿瘤的发生、发展和演变^[7-9]。

2 EZH2 在肿瘤微环境中的作用

TME 影响肿瘤的发生、发展和演变,而 EZH2 可以调控 TME 不同组分的功能。肿瘤微环境不仅包括肿瘤细胞、细胞外基质、成纤维细胞、内皮细胞和脂肪细胞,还包括 T 细胞、B 细胞、调节性 T 细胞(Treg)、NK 细胞、树突状细胞(DCs)和肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)等免疫细胞^[4,10]。在 TME 中,肿瘤细胞、免疫细胞、多种细胞因子和趋化因子相互作用形成免疫稳态^[4]。EZH2 在肿瘤微环境中主要有两种免疫调节功能:维持慢性炎症和建立免疫耐受^[5]。慢性炎症可诱导表观基因重新编程,肿瘤细胞基因和表观遗传参与形成 TME,致使肿瘤发生转化,同时慢性免疫细胞与肿瘤细胞相互作用,进一步抑制抗肿瘤免疫反应,最终促进肿瘤进展^[5,11]。在前列腺癌细胞中,EZH2 激活 PI3K-AKT 信号通路介导其在 S21 位点发生磷酸化,致使 EZH2 复合体从抑制因子转变为激活因子,通过 IL-6、IL-8 和 TNF 等反作用激活 NF- κ B 靶基因,形成慢性炎症-NF-

κ B-EZH2 通路循环并促进肿瘤进展^[12]。卵巢癌中靶向 EZH2 发现相关 microRNA 表达增加,帮助肿瘤细胞逃避免疫监测^[13];弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 EZH2 基因易发生突变,导致 MHC-II 获得性缺陷,参与肿瘤免疫逃逸^[14]。恶性黑色素瘤肿瘤内 T 细胞浸润和 INF- α 可使微环境中 EZH2 表达上调, EZH2 甲基化 H3K27me3 可抑制 MHC-I、免疫蛋白酶体、细胞引诱趋化因子等抗原提呈相关蛋白,并沉默肿瘤细胞的免疫原性^[15](见表 1)。一系列报道显示 EZH2 在肿瘤免疫微环境中的作用正在不断被发现,如免疫选择、免疫编辑、免疫监测、免疫维持、免疫逃逸等^[16],研究其在不同时期不同免疫细胞类型中的调节功能,为指导临床靶向 EZH2 的免疫治疗具有重要意义。

3 EZH2 在免疫细胞中的作用

在 TME 中,EZH2 过表达或缺失均可干扰免疫稳态,其在多种免疫细胞中表达并发挥不同的生理作用。

3.1 T 细胞

初始 T 细胞识别肿瘤抗原,分化为效应性 T 细胞,趋化至肿瘤组织,形成浸润性淋巴细胞发挥效应,但其寿命短,大部分在发挥效应后凋亡,有一少部分可快速增殖、分化成效应性 T 细胞,介导最主要抗肿瘤免疫反应,即细胞免疫。TME 中记忆 T 细胞寿命长,可自我更新并在再次识别抗原时快速表达并发挥作用。EZH2 通过调节 T 细胞分化、效应、趋化和凋亡等不同功能影响其抗肿瘤作用^[17-18]。

CD8+T:EZH2 对 CD8+记忆性 T 细胞的发育和维持发挥关键作用。He 等^[18]人利用稳定表达卵清蛋白(OVA)抗原的黑色素瘤荷瘤发现,特异性敲除 T 细胞 EZH2,降低 OVA 特异性记忆性 T 细胞数量。进一步研究发现 EZH2 可通过抑制 *ID2*, *PRDM1* 和 *EOMES* 等基因转录,增强 H3K4me3 和 Pol II 与 *ID3* 基因座结合,上调 *ID3* 转录而增强记忆性 T 细胞的分化。当 TCR 信号活化 Akt,磷酸化 EZH2,其活性被抑制,能增加效应性而减少记忆性 T 细胞。EZH2 增强抗肿瘤免疫的能力还体现在能提高 CD8+T 细胞增殖活性和抵抗凋亡的能力增强。NUMB 和 FBXW7 是 Notch 的主要负性调节因子,EZH2 通过 H3K27me3 抑制 2 种阻遏物转录,从而激活 T 细胞 Notch 信号,增加细胞的增殖。抗凋亡基因 *Bcl-2* 也受 EZH2 调控。EZH2 活化,上调 *Bcl-2* 信号抵抗凋

亡,促进 T 细胞生存。Zhao 等^[13]发现,卵巢癌通过增加 microRNA101 和 microRNA26a 抑制浸润性 CD8+T 细胞中 EZH2 表达从而逃避免疫攻击,同时发现使用 shRNA 或抑制剂可干扰 CD8+T 细胞 EZH2 作用,能够抑制其抗肿瘤功能。还有学者发现 CD8+T 细胞长期暴露于抗原环境中易发生衰竭,表现为对抗原免疫反应性下降,进一步削弱抗肿瘤免疫^[19]。

CD4+T:EZH2 抑制 CD4+初始 T 细胞分化成效应细胞。通过特异性敲除 T 细胞 EZH2 发现, EZH2^{-/-}CD4+初始 T 细胞体外分化成 Th1、Th2 和 Th17 等效应细胞增多,分泌的 IFN- γ 、IL13 和 IL-17 等对应的效应分子明显增加。体内研究也有相同的结论,CD4^{Cre}Ezh2^{Fl/F1}C57 在 OVA 接触实验中诱发的过敏性哮喘症状,病理特征更严重,进一步证实了 EZH2 对 Th2 分化的抑制作用。EZH2 抑制 CD4+T 细胞分化可能与其沉默 *T-bet* 和 *Gata3* 等效应细胞关键转录因子相关,H3K27me3 在 *IFNG*、*IL10* 等基因位点的调控也依赖 PRC2-EZH2^[20]。

这些证据均表明 EZH2 在 T 细胞中扮演重要角色,EZH2 磷酸化维持记忆 CD8+T 细胞的抗肿瘤作用,与肿瘤细胞 EZH2 过表达提示其恶性程度较高是否矛盾? EZH2 在 CD4+T 细胞中的作用尚未完全明确,TME 中 T 细胞如何参与 EZH1 和 EZH2 之间的相互转换? 这些问题仍有待进一步探讨。

3.2 Treg 细胞

Treg 细胞是一类特殊的 CD4+T 细胞,对维持免疫稳态和自我耐受至关重要。EZH2 介导表观遗传对调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)的募集和发挥其免疫抑制作用不可或缺^[21]。EZH2 在未成熟或休眠的 Treg 细胞中以基础速率表达,诱导激活后迅速表达。EZH2 缺失的 Treg 细胞在突变小鼠模型中不能维持免疫稳态,表现出组织中浸润较多淋巴细胞,同时小鼠寿命缩短^[22]。FOXP3 是 Treg 的转录因子,FOXP3 表达降低可导致 EZH2 缺失,EZH2 与 FOXP3 相互作用激活 Treg,EZH2 在 FOXP3 结合位点的募集性降低,将导致 H3K27me3 沉积和基因抑制^[21]。Yang 等^[21]评估 EZH2 对 Treg 功能的影响,在特异性缺失 EZH2 的转基因小鼠发现脾和淋巴结中幼稚 T 细胞明显减少,CD4 细胞中 FOXP3 表达降低,INF- γ 和 IL-4 抗体可逆转 FOXP3 的表达,可能机制是 FOXP3 在缺失 EZH2 的转基因小鼠体内表达减少将导致 INF- γ 和 IL-4 等细胞因子异常

表达。因此,Treg 中 EZH2 的表达在 TME 发挥重要调控作用^[23],Treg 失调如何引起效应 T 细胞功能紊乱仍是一大问题。

3.3 B 细胞

EZH2 在生发中心 B 细胞(GC B)中表达升高,在介导 GC B 细胞表型中发挥重要作用,是 GC B 细胞成熟和形成免疫球蛋白亲和力所必需的^[24]。EZH2 在 B 细胞各个发育和分化阶段的作用不可或缺。在 B 细胞前体阶段,EZH2 协调 IL-7 响应能力、增殖和 Ig κ 链重组;EZH2 通过抑制浆细胞关键转录因子 Prdm1 和 Irf4,使 GC B 细胞能够耐受 AID 介导的体细胞高频突变,防止末端过早分化,促进细胞增殖;在浆细胞中,EZH2 与 Blimp-1 相互作用促进 Xbp1 和未折叠蛋白(UPR)反应以及特异性代谢,可抑制 B 细胞基因表达并提高免疫球蛋白产生率^[24]。Guo 等^[25]也证实在 EZH2 缺失的情况下,抗体分泌细胞中组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化基因将发生异常调控,致使抗体分泌细胞的成熟、新陈代谢和功能发生紊乱。TME 中 EZH2 调节 B 细胞功能发挥关键作用,如何促进 B 细胞成熟、参与形成免疫球蛋白及分泌仍有待深入研究。

3.4 NK 细胞

NK 细胞是先天免疫系统的组成部分,能够不经过 MHC-I 抗原提呈对各种外来抗原、感染和肿瘤细胞迅速作出反应^[26]。研究表明 EZH2 可通过表观遗传机制调节 NK 细胞的发育参与肿瘤免疫。造血干细胞中 CD122、NKG2D、TOLL 样受体和 NK 细胞颗粒酶可促进 NK 细胞及其前体细胞发育增殖,抑制 EZH2 后均表达增加,增强抗肿瘤作用^[27-28]。NK 细胞中靶向 EZH2 免疫治疗可能是抗肿瘤治疗的一种有效方法。

3.5 DC 细胞

树突状细胞(DC)是抗原呈递细胞,是连接先天免疫系统和适应性免疫之间的重要桥梁。Tian 等^[29]报道 EZH2 过表达在多数组织细胞和树突状细胞肿瘤的成瘤过程中发挥重要作用,如组织细胞肉瘤、滤泡性树突状细胞肉瘤、朗格汉斯细胞增多症和树突状细胞肉瘤。Gunawan 等^[30]也证实 EZH2 调节 DCs 整合素信号转导和粘附动力学,促进自身免疫性脑脊髓炎的发生。这些均表明 EZH2 在 DC 中发挥重要调控作用,但其机制尚未完全清楚。

3.6 TAM 细胞

巨噬细胞是在造血系统中形态表现多样,具

有维持体内稳态、组织修复和免疫调节等多种功能,所谓肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)指可促进肿瘤细胞增殖和存活或者调节免疫抑制微环境而促进肿瘤进展一类巨噬细胞^[31-32]。Qiao 等^[33]研究发现 EZH2 介导 H3K27me3 甲基化,沉默 MERTK、PPARG 等基因,使 IFN- γ 诱导巨噬细胞活化。另有学者也提出小胶质细胞中 EZH2 通过抑制细胞信号抑制因子 3(Socs3)可导致自身免疫性炎症,EZH2 缺失直接刺激 Socs3 表达,从而增强肿瘤坏死因子受体相关因子 6 的降解,通过建立小胶质细胞 EZH2 缺失的小鼠模型发现沉默 Socs3 可重新激活小胶质细胞的功能并抑制自身免疫性炎症^[32]。然而 TAM 中 EZH2 失调能够促进肿瘤进展的机制仍然不明。

3.7 其他细胞

PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) 是 EZH2 甲基化和降解的靶点,EZH2 通过调节 PLZF 浓度,使胸腺产生的 iNKT(invariant natural killer T)细胞数量维持在适当水平,促进免疫稳态。EZH2 的缺失使 PLZF 激活 IL-4,促进 NKT 细胞扩增,破坏 TME 适应性免疫^[34]。通过建立 EZH2 缺陷的小鼠模型也显示其中 NKT2 细胞数量增加,并导致免疫稳态紊乱和出现哮喘样病理改变;还有报道 EZH2 缺失将损害朗格汉斯细胞(langerhans cells, LCs)的粘附结构,导致迁移基底膜受阻,参与调节皮肤耐受^[35-36]。

这些结果均表明肿瘤微环境免疫改变将破坏免疫稳态可促进肿瘤发生。EZH2 在肿瘤和各种免疫细胞之间起着关键作用,对自身免疫、异源反应和抗肿瘤免疫的调控有重要意义。随着研究的深入我们可能发现新的治疗策略,提高免疫治疗的疗效。

4 EZH2 的免疫治疗

大量证据表明 EZH2 通过表观遗传参与抗肿瘤免疫和免疫逃逸,其相关的免疫治疗如免疫检查点阻滞剂和 EZH2 特异性抑制剂逐渐成为活跃的研究领域,越来越多以 EZH2 为靶点的药物被相继报道,并在体外细胞实验、体内临床前模型实验和患者临床试验中显示出对各种恶性肿瘤的抗肿瘤作用。

免疫检查点是指免疫系统存在大量抑制通路,这些通路对于维持自我耐受和调节外周组织生理免疫反应强度及持续时间,减少组织损伤至关重

要^[37]。免疫检查点阻滞剂,包括抗 CTLA-4 抗体、GITR 抗体、抗 PD-1 (PDCD1) 抗体和抗 PDL-1 (CD274) 抗体是抗肿瘤免疫治疗方法之一^[38]。有报道在结直肠癌中,靶向抑制 EZH2 可以增强 CXCL9 和 CXCL10 趋化因子的表达,阻止效应 T 细胞向 TME 的转运^[39]。通过小鼠肿瘤模型中发现 EZH2 表达升高可抑制 T 细胞抗肿瘤免疫,抗 CTLA-4 免疫治疗和靶向抑制 EZH2 可增强抗肿瘤免疫反应,改善抗肿瘤作用^[21,40]。

此外,以 EZH2 为靶点的抑制剂的研究亦是热点之一,EZH2 抑制剂能够竞争性抑制 S-腺苷-L-同型半胱氨酸水解酶(SAH),增加细胞 SAH 水平,从而抑制 S-腺苷-L-蛋氨酸依赖组蛋白赖氨酸甲基转移酶活性,可显著降低 H3K27me3 水平,具有明显抗肿瘤增殖作用^[7]。随着研究的深入,新型 EZH2 抑制剂如 GSK126^[7]、GSK343^[41]、GSK503^[41]、EI1^[7]、CPI-1205^[42]、+UNC1999^[7]、Constellation Compound 3^[7]、OR-S1^[43]、OR-S2^[43]、Tazemetostat^[44] (见表 1) 等相继被发现,特别是在 EZH2 高表达的肿瘤中应用前景极具吸引力,研究显示抑制 EZH2 有助于逆转抗肿瘤免疫,但同时在一定时间内也可降低免疫细胞的生存^[39] (见表 1)。报道指出 EZH2 在抗肿瘤免疫中对肿瘤细胞和免疫细胞表现出截然相反的作用,所以此方法对抗肿瘤免疫影响尚未完全明确,EZH2 对免疫细胞的作用可能取决于肿瘤类型、TME 和治疗方法^[15,45]。

此外,任何单一药物治疗都可使肿瘤细胞耐

表 1 临床免疫治疗结果
Table 1 Clinical immunotherapy results

肿瘤类型 Tumour cells	免疫治疗 Immunotherapy
横纹肌肿瘤 Striated muscle tumors	EI1 ^[7]
卵巢癌 Ovarian cancers	MiR-101、MiR-26a ^[13]
弥漫大 B 细胞淋巴瘤 Diffuse large B-cell lymphomas	GSK126 ^[14]
黑色素瘤 Melanomas	IL-2、TNF- α 、CTLA-4、PD-1 ^[15]
结直肠癌 Colorectal cancers	CTLA-4、PDL-1 ^[39]
上皮样肉瘤 Epithelioides sarcomas	Tazemetostat ^[44]
头颈部鳞状细胞癌 Head and neck cancers	GSK126、PD-1 ^[47]
前列腺癌 Prostate cancers	EZH2 衍生多肽 ^[48] EZH2 derived peptide

药,对 EZH2 抑制剂的耐药机制已有报道。在细胞系模型研究中,长期暴露于 EZH2 抑制剂的细胞中发现 EZH2 的两个新的次级突变(Y111L 和 Y661D)可产生协同作用导致细胞耐药^[46]。弥漫大 B 细胞淋巴瘤中 IGF-1R, PI3K 和 MAPK 通路的激活亦可促进对 EZH2 抑制剂的耐药^[14]。最新研究指出,复发性头颈部鳞状细胞癌中靶向 EZH2 可以增强抗原呈递,GSK126 联合抗 PD-1 治疗可以规避抗 PD-1 耐药,改善药物敏感性^[47](见表 1);亦有报道恶性黑色素瘤中 EZH2 失活与 CTLA-4 抗体和 IL-2 联合治疗具有协同作用^[15]。这些结果表明免疫、基因、内分泌等联合治疗可能是未来抗肿瘤的一种方法。

5 结论与展望

大量研究已表明,EZH2 是表观遗传肿瘤相关的重要调节因子,其在肿瘤免疫中的作用机制尚不明确,对靶向 EZH2 免疫治疗提出了新的挑战。EZH2 既可以作为肿瘤抑制因子,也可以作为肿瘤启动因子,取决于 EZH2 发挥功能的细胞环境。EZH2 在肿瘤中功能也可能仅仅反映了在肿瘤的不同阶段该蛋白所扮演的作用,即在肿瘤发生起始阶段表达抑制因子,当细胞环境改变时,表观遗传学参与基因调控后成为肿瘤启动因子。了解 EZH2 在 TME 复杂的作用机制应是今后研究的重点,将 EZH2 抑制剂与免疫疗法相结合可能是一有效途径,但需同时考虑其对宿主和肿瘤免疫的潜在影响,这些都有待进一步研究证实。明确 EZH2 在 TME、免疫细胞、免疫应答和抗肿瘤免疫中作用,为以后药物研发及指导临床肿瘤靶向免疫治疗具有重要意义。

参考文献:

- [1] Öst A, Lempradl A, Casas E, et al. Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity [J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1352–1364.
- [2] Nagy C, Turecki G. Transgenerational epigenetic inheritance: an open discussion [J]. *Epigenomics*, 2015, 7(5): 781–790.
- [3] Wang X, Brea LT, Yu J. Immune modulatory functions of EZH2 in the tumor microenvironment: implications in cancer immunotherapy [J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2019, 7(2): 85–91.
- [4] Tang H, Qiao J, Fu YX. Immunotherapy and tumor microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1): 85–90.
- [5] Katoh M. Mutation spectra of histone methyltransferases with canonical SET domains and EZH2 – targeted therapy [J]. *Epigenomics*, 2016, 8(2): 285–305.
- [6] Pasini D, Di Croce L. Emerging roles for Polycomb proteins in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 36: 50–58.
- [7] Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2): 128–134.
- [8] Dobenecker MW, Park JS, Marcello J, et al. Signaling function of PRC2 is essential for TCR-driven T cell responses [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(4): 1101–1113.
- [9] Toyokawa G, Takada K, Tagawa T, et al. A positive correlation between the EZH2 and PD-L1 expression in resected lung adenocarcinomas [J]. *Ann Thorac Surg*, 2019, 107(2): 393–400.
- [10] Nutt SL, Keenan C, Chopin M, et al. EZH2 function in immune cell development [J]. *Biol Chem*, 2020, 401(8): 933–943.
- [11] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436–444.
- [12] Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent [J]. *Science*, 2012, 338(6113): 1465–1469.
- [13] Zhao E, Maj T, Kryczek I, et al. Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(1): 95–103.
- [14] Bissierier M, Wajapeyee N. Mechanisms of resistance to EZH2 inhibitors in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Blood*, 2018, 131(19): 2125–2137.
- [15] Zingg D, Arenas-Ramirez N, Sahin D, et al. The histone methyltransferase Ezh2 controls mechanisms of adaptive resistance to tumor immunotherapy [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(4): 854–867.
- [16] Kang N, Eccleston M, Clermont PL, et al. EZH2 inhibition: a promising strategy to prevent cancer immune editing [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(16): 1457–1476.
- [17] Karantanos T, Christofides A, Bardhan K, et al. Corrigendum: regulation of T cell differentiation and function by EZH2 [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 346.
- [18] He S, Liu Y, Meng L, et al. Ezh2 phosphorylation state determines its capacity to maintain CD8⁺ T memory precursors for antitumor immunity [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2125.
- [19] Emran AA, Chatterjee A, Rodger EJ, et al. Targeting DNA Methylation and EZH2 activity to overcome melanoma resistance to immunotherapy [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(4): 328–344.
- [20] Zhang Y, Kinkel S, Maksimovic J, et al. The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells [J]. *Blood*, 2014, 124(5): 737–749.
- [21] Yang XP, Jiang K, Hirahara K, et al. EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10643.
- [22] DuPage M, Chopra G, Quiros J, et al. The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation [J]. *Immunity*, 2015, 42(2): 227–238.

- [23] Wang D, Quiros J, Mahuron K, et al. Targeting EZH2 reprograms intratumoral regulatory T cells to enhance cancer immunity [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(11): 3262–3274.
- [24] Béguelin W, Popovic R, Teater M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 677–692.
- [25] Guo M, Price MJ, Patterson DG, et al. EZH2 represses the B cell transcriptional program and regulates antibody-secreting cell metabolism and antibody production [J]. *J Immunol*, 2018, 200(3): 1039–1052.
- [26] Goodall KJ, Nguyen A, Sullivan LC, Andrews DM. The expanding role of murine class Ib MHC in the development and activation of Natural Killer cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 115: 31–38.
- [27] Yin J, Leavenworth JW, Li Y, et al. Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(52): 15988–15993.
- [28] Bugide S, Green MR, Wajapeyee N. Inhibition of Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) induces natural killer cell-mediated eradication of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(15): E3509–E3518.
- [29] Tian X, Xu J, Fletcher C, Hornick JL, et al. Expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) protein in histiocytic and dendritic cell neoplasms with evidence for p-ERK1/2-related, but not MYC- or p-STAT3-related cell signaling [J]. *Mod Pathol*, 2018, 31(4): 553–561.
- [30] Gunawan M, Venkatesan N, Loh JT, et al. The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(5): 505–516.
- [31] Kosoff D, Lang JM. Development and translation of novel therapeutics targeting tumor-associated macrophages [J]. *Urol Oncol*, 2019, 37(8): 556–562.
- [32] Zhang X, Wang Y, Yuan J, et al. Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3 [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(5): 1365–1382.
- [33] Qiao Y, Kang K, Giannopoulou E, et al. IFN- γ induces histone 3 lysine 27 trimethylation in a small subset of promoters to stably silence gene expression in human macrophages [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(12): 3121–3129.
- [34] Vasanthakumar A, Xu D, Lun AT, et al. A non-canonical function of Ezh2 preserves immune homeostasis [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(4): 619–631.
- [35] Tumes D, Hirahara K, Papadopoulos M, et al. Ezh2 controls development of natural killer T cells, which cause spontaneous asthma-like pathology [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 144(2): 549–560.
- [36] Loh JT, Lim TJF, Ikumi K, et al. Ezh2 controls skin tolerance through distinct mechanisms in different subsets of skin dendritic cells [J]. *iScience*, 2018, 10: 23–39.
- [37] Kim HJ, Cantor H, Cosmopoulos K. Overcoming immune checkpoint blockade resistance via EZH2 inhibition [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(10): 948–963.
- [38] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252–264.
- [39] Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nature*, 2015, 527(7577): 249–253.
- [40] Goswami S, Apostolou I, Zhang J, et al. Modulation of EZH2 expression in T cells improves efficacy of anti-CTLA-4 therapy [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(9): 3813–3818.
- [41] McCabe MT, Ott HM, Ganji G, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations [J]. *Nature*, 2012, 492(7427): 108–112.
- [42] Vaswani RG, Gehling VS, Dakin LA, et al. Identification of (R)-N-((4-methoxy-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-2-methyl-1-(1-(1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-yl)ethyl)-1H-indole-3-carboxamide (CPI-1205), a potent and selective inhibitor of histone methyltransferase EZH2, suitable for phase I clinical trials for B-cell lymphomas [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(21): 9928–9941.
- [43] Ma A, Stratikopoulos E, Park KS, et al. Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(2): 214–222.
- [44] Eich ML, Athar M, Ferguson JE 3rd, et al. EZH2-targeted therapies in cancer: hype or a reality [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(24): 5449–5458.
- [45] Gibaja V, Shen F, Harari J, et al. Development of secondary mutations in wild-type and mutant EZH2 alleles cooperates to confer resistance to EZH2 inhibitors [J]. *Oncogene*, 2016, 35(5): 558–566.
- [46] Duan R, Du W, Guo W. EZH2: a novel target for cancer treatment [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 104.
- [47] Zhou L, Mudianto T, Ma X, et al. Targeting EZH2 enhances antigen presentation, antitumor immunity, and circumvents anti-PD-1 resistance in head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(1): 290–300.
- [48] Minami T, Minami T, Shimizu N, et al. New polycomb group protein enhancer of zeste homolog (EZH) 2-derived peptide with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26(1): 133–138.

刘永芳,吴正存,马开利. 非人灵长类帕金森模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 134-142.
Liu YF, Wu ZC, Ma KL. Progression of a Parkinson's disease model in non-human primates [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 134-142.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 020

非人灵长类帕金森模型的研究进展

刘永芳¹, 吴正存¹, 马开利^{1,2*}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医学生物学研究所, 昆明 650118;
2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医学灵长类研究中心 & 神经科学中心, 北京 100005)

【摘要】 帕金森病(Parkinson's disease, PD), 作为全球第二大神经系统退行性疾病, 目前已有的治疗手段仍不能从根本上逆转疾病的进程, 而治疗手段的发现和评价离不开动物模型的建立, 一个可靠、有效的动物模型将有利于 PD 的发病机制、诊断、治疗方法以及药物筛选的研究。啮齿类动物和非脊椎动物已被广泛用于建立 PD 模型, 但其并不能完全呈现人类 PD 的行为学和病理特征, 而非人灵长类(nonhuman primate, NHP)在生理、解剖结构和免疫等方面与人最为接近, 更适合用来探索疾病机理和发现新的治疗方式, 因此, 本文就帕金森病 NHP 模型的建立方法进行综述, 为帕金森病 NHP 模型建立提供参考。

【关键词】 NHP; 帕金森病; 模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0134-09

Progression of a Parkinson's disease model in non-human primates

LIU Yongfang¹, WU Zhengcun¹, MA Kaili^{1,2*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China.
2. Medical Primate Research Center & Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005)

【Abstract】 Parkinson's disease (PD), the second most prevalent neurodegenerative disorder worldwide, lacks a cure. The discovery and evaluation of treatment method are dependent on nonhuman primate (NHP) models of PD. A reliable and valid animal model can contribute to understanding the pathogenesis, diagnosis, therapy, and drug discovery related to PD. Rodents and invertebrates are commonly used to establish PD models. However, results using rodent and invertebrate models do not accurately represent the behavioral and pathological characteristics of human PD. NHPs are the closest animals to humans in terms of physiology, structure, and immunology, which makes them suitable for studies to understand the mechanisms of disease and establish new therapies. This article reviews the progression of PD models in NHPs, thereby providing a reference for PD model establishment.

【Keywords】 NHP; Parkinson's disease; model

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是帕金森氏综合征广泛运动障碍中最常见的形式,以步态不稳、肌肉僵直、运动迟缓、静止性震颤为特征。新的诊断标准将姿势不稳排除在外。目前,全球 PD 患病人数超过六百万,65 岁以上人群发病率大约为 1.5%^[1],中国占全球发病人数的一半。据统计,随

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-2-001, 2016-I2M-1-004); 云南省科技厅基础研究专项(202001AT070144)。
【作者简介】 刘永芳(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:药理学。E-mail:15846527249@163.com
【通信作者】 马开利(1982—),男,博士,研究员,研究方向:药理学和毒理学。E-mail: mklpume@gmail.com

着人口老龄化,截至 2030 年,全球 50 岁以上发病率将会增加一倍^[2]。已有研究表明,PD 的病理改变主要是中脑黑质多巴胺能神经元的进行性丢失、纹状体多巴胺神经递质的减少以及 α 突触核蛋白包涵体的形成。临床上,PD 患者确诊时已经是疾病的中晚期,丢失了 50%~60% 多巴胺能神经元和 60%~70% 的多巴胺能神经递质,大多出现运动症状,晚期伴有疼痛和抑郁,严重影响患者的生活质量。而疾病早期,多数患者会出现便秘、嗅觉障碍、睡眠障碍等非运动症状^[3]。在确诊之前,这些非运动症状往往并不会和 PD 联系起来。目前,PD 的治疗药物以多巴胺前体药物左旋多巴和多巴胺受体激动剂为主,但随着服用时间的延长,这些药物的疗效会逐渐减弱,并会引起药物引发的震颤^[4]。近些年来,非侵入性的深部脑刺激疗法取得了良好的效果,可以缓解患者的疼痛,干细胞疗法也开始走向临床。但这些治疗手段的发现和评价都离不开动物模型的建立,一个最接近临床 PD 患者发病过程和病理变化的动物模型将有利于 PD 的发病机制、诊断、治疗方法以及药物筛选的研究。

啮齿动物已经广泛用于建立 PD 模型,而非脊椎动物,如果蝇、线虫、斑马鱼,由于其神经元数量少,便于操作,可进行药物高通量筛选,也常用于 PD 模型的建立。非人灵长类 (non-human primate, NHP),在进化上与人类关系更近,大小、行为、生理、生化、免疫功能方面与人类更相似,更适合用于模拟人类疾病模型。最常用来建立 PD 模型的 NHP 有狨猴和猕猴。猴子具有一定的学习、认知、情绪、社交能力^[5]。这使得相比较于啮齿动物和猪,猴子更便于测试精细运动和非运动症状。猴脑和人脑的高度相似使得能用磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 和正电子发射计算机断层显像 (positron emission tomography, PET) 对大脑结构和功能进行非侵入性高分辨率成像。这些证据均表明 NHP 是更适合研究 PD 的动物,因此,本文通过总结和阐明 PD 的 NHP 模型研究现状,为基于 NHP 的 PD 模型的药物评价及机制研究提供参考和依据。

1 神经毒素诱导模型

1.1 MPTP 模型

MPTP,全称 1-甲基-4 苯基-1,2,3,6-四氢吡啶,其可通过血脑屏障,被胶质细胞膜上的单胺氧

化酶 B (monoamine oxidase B, MAO-B) 代谢为 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridine ion, MPP^+),后者可由多巴胺转运体 (dopamine transporter, DAT) 转运至细胞内,与线粒体复合物 I 结合,损伤氧化呼吸链,选择性损伤多巴胺能神经元^[6]。因此,MPTP 是最常用的制备 PD 模型的神经毒素。不同猕猴物种对 MPTP 的敏感性不同,同一物种间不同猴子个体敏感性也有差异。食蟹猴和恒河猴同属于猕猴。食蟹猴对 MPTP 的敏感性强于恒河猴^[7]。Potts 等^[7]通过回顾 108 只猕猴静脉注射 MPTP 的方案,给出建议:①单次 MPTP 注射后,3~8 周内运动障碍会自发恢复,因此建议最后一次 MPTP 注射后,至少 8 周内每周进行一次症状评估;②多次低剂量注射 MPTP,可以减少并发症的发生;③可根据动物的行为学调整 MPTP 剂量,直到出现“明显运动障碍”为止。在静脉注射 MPTP 的方案中,猴子虽能保持相对稳定的症状,但仍然不能模拟 PD 慢性发生的过程。Seo 等^[8]在此基础上作了改进,建立起一个稳定的慢性 NHP 帕金森模型:一周两次小剂量 (0.2 mg/kg),左股骨区肌肉注射给药,给药 48 周后,模型猴的纹状体和黑质 TH 阳性神经元明显丢失,同时还发现模型猴中的 T 淋巴细胞慢性浸润到了脑部。类似的, Masilamoni 等^[9]采用慢性 MPTP 给药方案 (0.2~0.5 mg/kg,肌肉注射,一周一次,持续 21 周),在猴子模型中重现了 PD 病人大脑中多巴胺能神经元退变的模式。另有团队采用前 17 周每周一次肌肉注射给予 0.2 mg/kg 剂量的 MPTP,后 4 周调整为 0.5 mg/kg 的给药方案,也建立出了稳定的猕猴帕金森模型^[10]。慢性给药方案中,模型猴中脑腹侧神经元丢失多于背侧,而急性方案中腹侧和背侧丢失情况差不多。颈静脉注射所需要的 MPTP 剂量一般会比皮下给药的剂量要小。一周一次 0.5 mg/kg MPTP 皮下注射狨猴,总剂量 2.5 mg/kg 和 6 mg/kg 时,并未发现脑部明显的病理变化,行为学也不明显并且还发生恢复^[11-12]。皮下连续给予 MPTP,似乎能有更好的 PD 症状和病理表现。采用连续 3 d 分别 2 mg/kg、2 mg/kg、1 mg/kg 皮下注射的给药方法,模型猴的左右两侧大脑损伤程度不一致,行为学特征持续了 1 年以上^[13]。

老年猴通常比青年猴更易感。老年恒河猴单侧给予 MPTP,可诱导出中度帕金森症状。5~9 岁恒河猴所需要的 MPTP 剂量是 20~23 岁猴的三

倍^[14]。普遍认为,老年动物可能更能模拟 PD 病人的实际情况,但也存在不同看法。Shi 等^[15]发现给老年恒河猴 0.2 mg/kg 剂量肌肉注射 MPTP,第 1 次连续注射 15 d,间隔 8 周后,第 2 次连续注射 30 d,期间模型猴病情变化不可控,于是采用青年恒河猴分两段给予 MPTP:肌注+静脉注射,呈现了稳定的运动和非运动症状^[16]。以往的 MPTP 模型研究中,大多检测到猴子脑中有 α 突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 沉积,但没有发现磷酸化的 α -syn 聚集体。但近几年有研究者将 MPTP 给予恒河猴后,发现可产生 p- α -syn 和路易病理,但无法重现特发性 PD 尾状核-壳核渐变的特征^[17]。NHP 的 MPTP 模型总结见表 1。

1.2 6-OHDA 模型

6-OHDA,中文名称 6-羟多巴胺,是一种多巴胺(dopamine, DA)类似物,可竞争性抑制 DAT 对 DA 的摄取,进入细胞后可抑制线粒体复合物 I 和线粒体复合物 IV 的活性。6-OHDA 不能通过血脑屏障,一般需要进行脑立体定位注射。对猴脑要进行多点注射,以保证药物的均匀分布和减少自发恢复的发生。DA 神经递质的丢失、行为学的改变与 6-OHDA 剂量呈正相关性。关于 6-OHDA 关注的一个问题是注射部位的选择。研究人员将 180~216 μ g 的 6-OHDA 多点注射到猕猴的皮层和尾状核进行比较,发现二者引起注意力发展方向不同^[18]。单侧注射到猕猴纹状体内,5 月后病变侧 DA 能神经元丢失 46%,运动功能和感觉功能出现异常^[19];注射到黑质,能引起多巴胺能神经元丢失 80%,非多巴胺能神经元丢失 77%,猴子出现姿势改变,记忆障碍^[20]。有人认为,单侧模型并不能完全模拟 PD 的症状。2004 年, Milton 等^[21]发现左侧注射的 PD 模型猴子表现出空间和运动症状的单方面缺陷,而双侧注射的 PD 模型可能表现出双侧的精神障碍。2015 年, Santana 等^[22]分两个阶段对猕猴内侧前脑束 5 个位点进行脑立体定位注射 6-OHDA,总剂量为 120 μ g,发现产生了持续的帕金森症状。另外研究采用静脉注射的给药方式,以 50 mg/kg 剂量全身应用 6-OHDA,引起了心脏交感神经去支配^[23]、炎症、氧化应激、PPAR γ 激活^[24]、近端结肠儿茶酚胺损失^[25]。

2 转基因模型

目前已有的 PD 转基因模型主要基于 α 突触核

蛋白野生型及其 A53 T 突变型(第 53 位氨基酸由丙氨酸突变为苏氨酸)。同时,利用病毒载体局部或全身过表达制作转基因动物的方式,因方便、快捷而受到科研人员的青睐,并且,有效病毒载体递呈系统及高效的递送方式的选择是转基因动物成功的关键。

2.1 递呈系统的选择

目前,常用的转基因制备的病毒载体有腺相关病毒(adeno-associated viral vector, AAV)和慢病毒(lentivirus, LV)。

2.1.1 AAV 病毒系统

AAV 是单链 DNA 病毒,包装容量大约 4.7 kb,对外源基因的表达能力中等。因其不整合到宿主基因组中,因此目的基因可能在宿主传代的过程中丢失。目前共发现 12 种血清型(AAV1-AAV12),不同血清型对组织的特异性不同。神经领域使用较多的血清型有 2、5、8、9 型。AAV2 型主要针对神经系统;AAV5 型针对肺、眼、神经系统;AAV8 型针对肝、肌肉、眼、神经系统;AAV9 型针对肺、肝、肌肉、心脏和神经系统,且 AAV9 型在 NHP 脑部轴突中可以进行双向运输^[26]。运用失去复制能力的 AAV 假病毒已成为趋势,尤其是以 2 型为核心,其他型为衣壳蛋白的血清型病毒。Allocca 等^[27]发现 AAV2/5 型载体可容纳的基因组可扩大到 8.9 kb。Gerits 团队比较了不同血清型和不同启动子下报告基因在恒河猴新皮层的转导效率,发现钙调蛋白激酶 II(CaMKII α 0.4)启动子下,病毒的传播效率为:rAAV2/5>>rAAV2/7>rAAV2/8>rAAV2/9>>rAAV2/1,转导细胞的比例为:rAAV2/1>rAAV2/5>rAAV2/7=rAAV2/9>rAAV2/8^[28]。与啮齿动物不同,通用巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子在恒河猴脑中效果最差。而另一研究组给 6 只猕猴右壳核和同侧内囊注入相同剂量的病毒,发现 rAAV2/1、rAAV2/2 和 rAAV2/5 在大脑中的总体扩散没有显著差异。而在大脑和远端神经元结构(脊髓和周围神经)中,rAAV2/1 和 rAAV2/5 在每个细胞中的载体拷贝数高于 rAAV2/2^[29]。利用 AAV2/9 递送基因发现,无论动物年龄,转导的最主要的细胞类型都是星形胶质细胞和小胶质细胞。据此,综合考量与实际案例来看^[30-32],目前,AAV2/5 型和 AAV2/9 型可能更适合作为 PD 造模的血清型,AAV2/1 也可作为参考。

2.1.2 LV 病毒

LV 是一种由人免疫缺陷病毒改造而来的单链

RNA 病毒,包装容量<9 kb,能随机整合在宿主基因组中。2001 年,美国科学家将灭活的慢病毒注射进猕猴体外受精的胚泡中,制备了第一只携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的转基因猴“安迪”,但绿色荧光蛋白基因并不在其生殖细胞中表达^[33]。2008 年,Yang 等^[34]在 4~8 细胞期的胚胎中注射携带亨廷顿基因的高滴度的慢病毒,第一个亨廷顿恒河猴模型诞生,但至此,尚未证明基因能向后代传递。2009 年,日本科学家将灭活的 $5.6 \times 10^9 \sim 5.6 \times 10^{11}$ /mL 滴度的 EGFP-慢病毒注射到猕猴最早时期的胚胎中,EGFP 在猕猴后代中多个器官中表达,实现了种系的传递^[35]。

2.2 递送方式

2.2.1 局部注射

在 NHP 中,脑立体定位普遍针对黑质和纹状体,而未见有报道直接采用脑室注射。2003 年,Kirik 等^[30]率先用 AAV2 型载体通过脑立体定位注射的方式向黑质内递送野生型及 A53T 突变型的 α -syn,16 周后发现 A53T 突变引起 30%~60% 的黑质多巴胺能神经元丢失,存活的黑质神经元细胞中 90%~95% 的细胞有阳性 α -syn 包涵体。利用 rAAV2/5 型载体在成年猴腹侧中脑中表达人野生型 α -syn,然而神经变性仅局限于尾状核多巴胺能神经纤维^[31],并且他们还证实过表达人 A53T 能导致黑质多巴胺能细胞死亡^[36]。这证明 A53T 毒性强于野生型 α -syn。Koprich 等^[32]利用 AAV2/1 型载体让黑质内过表达 α -syn A53T 突变体发现病毒滴度为 1.7×10^{12} 时没有显著性的病理变化;而当滴度达到 5.1×10^{12} 时黑质多巴胺能神经元减少 50%,纹状体多巴胺减少 60%,且病毒表达持续至少 4 个月。这些证据表明,成年猴脑立体定位注射 AAV 载体可以实现局部的目的基因表达,并能表现出一定的相关表型,且可通过调整病毒滴度来控制目的基因的表达量。

除了脑立体定位外,为了探究 α -syn 从肠道逆行传播到大脑的假说,Manfredsson 等^[37]将 AAV2/5-CBA- α -syn 注射到结肠和胃,发现肠神经系统明显的 α -syn 病理,但猴子脑中并没有任何病理出现。

2.2.2 全身给药

(1) 成体全身给药

为了提高转导效率,近几年开始不断尝试宫内感染、出生后进行静脉注射或鞘内给药。2003 年,Garrett 等^[38]将 rAAV2-GFP 注射进羊膜囊,72 h 后

开始表达和分泌 GFP,并且维持了 1 年以上。rAAV2/9 静脉注射能通过血脑屏障,并长期表达。猕猴围生期后期,研究人员将 scAAV9-CMV-eGFP 通过脐静脉注射进两只猕猴胎儿,病毒转导到了中枢和外周神经系统^[39]。同时,给 P1、P30、P90、3 岁的食蟹猴静脉注射 rAAV2/9-GFP,发现成年猴子比年轻猴子转导效率低^[40]。这些数据表明,幼年比成年神经元更容易受到病毒感染。AAV9 型病毒鞘内给药也可以实现基因的持续表达,长达 4 年^[41]。

(2) 卵母细胞或胚胎时期注射

相比于胎儿或新生儿,更早的时间点还可以选择卵母细胞或胚胎前期。Niu 等^[42]以 10^9 /mL 滴度的人 A53T 突变型慢病毒递送至 M II 期恒河猴卵母细胞,之后进行体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)和胚胎植入,成功制作 6 只 A53T 转基因猴,进一步检测证实 A53T 突变基因在全身器官中表达,并出现了年龄相关的认知缺陷和焦虑,并且 A53T 突变的猴脑比鼠脑具有更广泛的神经变性。其中,值得注意的是,注射时机的选择对转基因猴组织表达的广泛性具有重要的作用。2016 年,Seita 团队用带人类巨细胞病毒即刻早期增强子和鸡 β 肌动蛋白启动子的 GFP 慢病毒表达载体注射食蟹猴,产生了全身表达 GFP 的转基因猴^[43],但发现向受精前的成熟卵母细胞注射 LV 表达系统,可在组织中实现均匀的 GFP 表达,而向受精卵中注射病毒则产生镶嵌表达的转基因猴。2017 年,Tomioka 团队报道,他们使用四环素诱导的慢病毒载体表达系统产生了新型的转基因猴^[44]。

3 基因编辑技术

基因编辑技术,如锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENS)、成簇的规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR),可以实现定点编辑。ZFN 是第一个可编程的核酸酶。1996 年,有报道将模块锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)与 FokI 限制酶非特异切割域融合,ZFN 由此产生。FokI 核酸酶必须二聚体才具有切割功能。ZFP 由包含结合锌原子的半胱氨酸和组氨酸对的 30 个氨基酸残基组成,即 ZF 基序,每个 ZF 基序识别 3~4 bp 的序列,通过将 α 螺旋插入 DNA 大沟来与 DNA 结合。与 ZFN 类似,将

来源于植物病原体的 TAL 效应子模块融合到 Folk 切割域上,称作 TALENS。TALENS 制作核酸酶的方式更简单。CRISPR/Cas 是细菌免疫系统的一部分,这个技术被分为两部分:单个指导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 和一个 Cas 核酸内切酶。最常用的 Cas 核酸内切酶是 Cas 9。ZFN 成本高,效率低;TALENS 效率高、脱靶率低、构建周期短;Cas 9 效率是 TALENS 的 5 倍,实际操作更简单。

目前,这几种技术在哺乳动物中都有一定的应用,但在帕金森猴中的应用仍极为有限。近几年,日本科学家 Coghlan 等^[45]通过基因组编辑技术突变了猕猴的 *SNCA* 基因,产生了第一只帕金森猕猴模型,猕猴在第一年出现睡眠障碍,第二年脑干出现路易病理,第三年发生震颤。2019 年,国内学者杨伟莉等^[46]使用 CRISPR Cas9 技术生成了第一只 *PINK1* 敲除猴,其皮层、纹状体、黑质出现显著神经元退性。基因编辑有着强大的应用前景,但基因编辑技术难度高,仍存在脱靶、镶嵌表达模式、低同源重组的缺点,仍面临要攻关很多问题。

4 PFF 模型/LB 模型

路易小体(Lewy bodies, LB)是 PD 的病理性标志,而 LB 中主要成分为淀粉样纤维聚集体, α -syn 是其中含量最高的成分^[47]。于是 α -syn 聚集体和 PD 的关系令人着迷。现在普遍认为 α -syn 单体和规则整齐的纤维是无毒的,而寡聚体和形成纤维之前的原纤维(preformed fibrils, PFF)是有毒的形式。其 PFF 的制备已经有一定的基础和成形的方案,而寡聚体的制备仍然存在难度。将制备的 α -syn PFF 注射进猴子体内的确产生了 PD 病理。Shimozawa 等^[48]向成年猕猴纹状体内注射 α -syn PFF,三月后, α -syn S129 磷酸化免疫反应检测阳性,而且 α -syn 从纹状体向黑质扩散,诱发了 PD 样 α 突触核蛋白病理,这是第一个猕猴 α -syn 传播模型。有团队向猕猴肠道接种 α -syn PFF,1 个月,在迷走神经和蓝斑背侧运动核检测到少量的病理性 α -syn,研究持续 12 个月,肠神经系统仍有稳定病理性的 α -syn,而脑组织中却并未发现^[37],这说明 α -syn 从外周传递到中枢可能只是偶然事件。

将 PD 患者脑中提取的 LB 接种到猴子黑质或纹状体内,也可以引起 α -syn 病理和神经退行性病变^[49]。最近,Arotcarena 等^[50]向猕猴的纹状体或肠道注射 PD 患者来源的 α -syn 聚集体,然而迷走神经

中并未发现 α -syn 病理学的改变,该研究同样不支持通过迷走神经和背侧运动核传递 α -syn 的假说。

5 讨论

NHP 的生命周期较长,这使得我们有机会来观察造模过程中的病理变化。目前,MPTP 模型是 PD 模型的金标准。神经毒物模型方法简单,易操作,病理变化一般与剂量呈正相关。由于人类对 MPTP 极其易感,所以使用 MPTP 对实验室和操作人员要求较高,防止造成 MPTP 泄露。而 6-OHDA 不能通过血脑屏障,多采取一次脑立体定位注射,相对安全很多。而神经毒物造成的伤害一般比较直接,一般没有报道有路易小体的形成,且容易错过 PD 前期的发病过程。因此,推荐低剂量、长时间给药。转基因模型通常有一定难度。合格的转基因模型应该具备以下特征:①基因能整合到宿主基因组中;②基因能表达且有生物活性;③种系传递^[51]。因为,AAV 并未整合在基因组中,所以,AAV 载体递送的基因在猴子传代的过程中可能会发生丢失。另外,研究显示小鼠脑中 p- α -syn 水平与黑质纹状体变性程度有关,而与小鼠不同的是,猴子的 p- α -syn 水平与神经变性之间没有相关性^[52]。值得注意的是,猴子本身的 α -syn 就含有 A53T 突变,所以,猴子体内过表达 α -syn A53T 突变的蛋白是否能代表人体内的 A53T 突变表型有待考证。CRISPR 技术与其他基因编辑技术相比,可以实现对特定的基因位点进行编辑,成本也降低,但操作难度大,仍存在脱靶的问题。然而,转基因模型可以从基因水平来研究疾病机理,有神经毒物模型不能替代的优点。路易小体是 PD 患者脑中标志性的病理,而 α -syn 作为其中主要的成分,被认为 PFF 形式是有毒的,现在也有人认为寡聚体毒性更强。重组 α -syn PFF 模型也重现了 PD 中多巴胺能神经元丢失的特征,但其 PFF 制备的质量通常不稳定。PD 患者脑中提取的 LB 产物成分更为复杂,达到 70 多种,不同人员,以及每一批次之间成分的差异可能会导致结果的变异。

6 小结

总之,即使 NHP 也有一定的缺陷,但仍然是与人类最接近的动物,在研究疾病机理、药物临床前安全性评价上仍然具有不可替代的作用,但由于伦理原因,要严守 3R 原则,只在必要的时候使用 NHP。

表 1 非人灵长类 MPTP 模型总结
Table 1 Summary of MPTP NHP model

动物种系、年龄 Animal, Age	给药剂量 Dose	给药途径 Route	病理 Pathology	运动症状 Motor symptom	非运动症状 Non motor symptom
Seo ^[8] 成年食蟹猴 Adult cynomolgus monkeys	0.2 mg/kg, 4~48 周, 一周一次 0.2 mg/kg, for 4~48 weeks, once a week	i.m	SN、尾状核、壳核 TH 减少; T 细胞慢性浸润; 18F-FP-CIT BP 均显着降低 TH expression level was decreased in SN, caudate nucleus and putamen; T cell chronic infiltration; 18F-FP-CIT BP decreased significantly	GA 降低 Reductions in GA	/
Fifel ^[53] 成年恒河猴 Adult rhesus monkeys	0.2 mg/kg, 开始一周 2 次, 快结束时 1~2 d 一次, 18~90 d 0.2 mg/kg, twice a week initially, towards the end of treatment, every 1~2 days	i.m	下丘脑、SCN、视网膜没有病变 No pathological changes in hypothalamus, SCN and retina	/	昼夜节律丧失或减少, 内源性昼夜节律保持完整 Loss or reduction of circadian rhythm, endogenous circadian rhythm remains intact
Villalba ^[54] 恒河猴 Adult rhesus monkeys	总剂量 4.3~8 mg/kg 4.3~8 mg/kg in total	i.m	丘脑变性; CM/Pf 体积改变, 纹状体 ChI 密度和数量降低 Thalamus degeneration; CM/Pf volume changes, striatal ChI density and number decrease	/	/
Gregory Porras ^[55]	0.2~0.5 mg/kg, 一周一次, 21 周 0.2~0.5 mg/kg, once a week, 21 weeks	i.m	/	/	/
Mahmoud ^[56] 普通狨猴 Common marmosets	1.0 mg/kg, 连续 3 d; 2.0 mg/kg, 提前连续 5 d 1.0 mg/kg, for three consecutive days; 2.0 mg/kg, for five consecutive days	s.c.	SNC 腹侧和背侧的 TH-ir 神经元数量减少了约 80%; 树突网状带变性, 尾状核、壳核退变、伏伏核没有 Number of TH-ir neurons in the ventral and dorsal sides of SNC is reduced by about 80%, dendritic reticular zone degeneration, caudate nucleus, putamen degeneration, and nucleus accumbens are not reduced.	/	/
Franke ^[11] 3~4 岁, 狨猴 3~4 years old, marmasets	0.5 mg/kg, 一周一次, 12 周; 0.5 mg/kg, 一周一次, 5 周 0.5 mg/kg, once a week, for 12 weeks; 0.5 mg/kg, once a week, for 5 weeks	s.c	黑质多巴胺能神经元数量大小没有变化, 壳核、尾状核 TH 水平未变 Number of dopaminergic neurons in the substantia nigra remains unchanged, and the level of TH in the putamen and caudate nucleus remains unchanged	不明显, 会恢复; 跳跃能力、运动、手眼协调 Not obvious, will recover; jumping ability, movement, hand-eye coordination	不明显, 会恢复 焦虑、恐惧 Not obvious, will recover Anxiety, fear

续表 1

动物种系、年龄 Animal, Age	给药剂量 Dose	给药途径 Route	病理 Pathology	运动症状 Motor symptom	非运动症状 Non motor symptom
Verhave ^[57] 普通狨猴, 2~3 岁 Common marmoset, 2 ~ 3 years old	第一周 2 mg/kg, 第二周 1.5 mg/kg, 一周 2 次 in the first week 2 mg/kg, and in the second week 1.5 mg/kg, twice a week	s.c	/	自发运动减少, 临床评分增高, 手眼协调无显著影响 Spontaneous movement decreased, clinical score increased, hand-eye coordination had no significant effect	RBD, MPTP 显著增加了 REM 睡眠期间的内源性肌肉张力 RBD, MPTP significantly increase endogenous muscle tone during REM sleep
Gourav R Choudhury ^[58] 狨猴 Marmosets	2 mg/kg, 连续 5 d 2 mg/kg, for consecutive 5 days	s.c	/	6 月内出现姿势性头部震颤、精细运动、协调逐步恶化 Postural head tremor, fine movement, and coordination gradually deteriorate within 6 months	认知障碍、睡眠紊乱、周期节律紊乱 Cognitive impairment, sleep disturbance, cyclic rhythm disturbance
Kiyoshi Ando ^[13] 普通狨猴 Common marmosets	2, 2, 1 mg/kg, 连续 3 d 2, 2, 1 mg/kg, for consecutive 3 days	s.c	稳定 Stable	跳跃能力持续受损 Continuous impairment of jumping ability	/
Philippens ^[59] 2~3 岁狨猴 2~3 years old marmosets	1 mg/kg, 连续 8 d 1 mg/kg, for consecutive 8 days	s.c	黑质 TH 丢失明显 TH neuron loss significantly in SN	运动能力下降 Motor function decreased	/
Subramanian ^[60] 4~8.5 kg 恒河猴 4~8.5kg, rhesus monkeys	0.5 mg/kg, 最多 4 次 0.5 mg/kg, no more than 4 times	i.v	稳定半帕金森症 Stable hemiparkinsonism	/	/
Rui Zhang ^[61] 恒河猴, 15~18 岁 Rhesus monkeys, 15 ~ 18 years old	0.12 mg/kg	i.v	稳定、适度 尾状核、壳核、运动皮层 Stable, moderate; Caudate nucleus, putamen, motor cortex	运动速度下降、精细活动 Movement speed, fine activity decreased	/
Emborg ^[62] 恒河猴, 5~10 岁、23~25 岁 Rhesus monkeys, 5 ~ 10 years old, 23~25 years old	低剂量, 一次 总剂量 2~4 mg Low dosage, once, 2~4 mg totally	i.v	苍白球病变 黑质 TH 减少 80%~90%, 尾状核、壳核光密度减少 60%~70% Pallor lesions, Substantia nigra TH was reduced by 80%~90%, and the optical density of caudate nucleus and putamen was reduced by 60%~70%	/	/

参考文献:

- [1] Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease; risk factors and prevention [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(12): 1257–1272.
- [2] Soukup SF, Vanhauwaert R, Verstreken P. Parkinson's disease; convergence on synaptic homeostasis [J]. *EMBO J*, 2018, 37(18): e98960.
- [3] Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P. Non-motor features of Parkinson disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(7): 435–450.
- [4] Radhakrishnan DM, Goyal V. Parkinson's disease: A review [J]. *Neurol India*, 2018, 66: S26–S35.
- [5] Lin MK, Takahashi YS, Huo BX, et al. A high-throughput neurohistological pipeline for brain-wide mesoscale connectivity mapping of the common marmoset [J]. *Elife*, 2019, 8: e40042.
- [6] Langston JW. The MPTP story [J]. *J Parkinsons Dis*, 2017, 7(s1): S11–S19.
- [7] Potts LF, Wu H, Singh A, et al. Modeling Parkinson's disease in monkeys for translational studies, a critical analysis [J]. *Exp Neurol*, 2014, 256: 133–143.
- [8] Seo J, Lee Y, Kim BS, et al. A non-human primate model for stable chronic Parkinson's disease induced by MPTP administration based on individual behavioral quantification [J]. *J Neurosci Methods*, 2019, 311: 277–287.
- [9] Masilamoni GJ, Smith Y. Chronic MPTP administration regimen in monkeys: a model of dopaminergic and non-dopaminergic cell loss in Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018, 125(3): 337–363.
- [10] Masilamoni GJ, Groover O, Smith Y. Reduced noradrenergic innervation of ventral midbrain dopaminergic cell groups and the subthalamic nucleus in MPTP-treated parkinsonian monkeys [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 100: 9–18.
- [11] Franke SK, van Kesteren RE, Hofman S, et al. Individual and familial susceptibility to MPTP in a common marmoset model for Parkinson's disease [J]. *Neurodegener Dis*, 2016, 16(5–6): 293–303.
- [12] Franke SK, van Kesteren RE, Wubben JA, et al. Progression and recovery of Parkinsonism in a chronic progressive MPTP-induction model in the marmoset without persistent molecular and cellular damage [J]. *Neuroscience*, 2016, 312: 247–259.
- [13] Ando K, Inoue T, Hikishima K, et al. Measurement of baseline locomotion and other behavioral traits in a common marmoset model of Parkinson's disease established by a single administration regimen of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine: providing reference data for efficacious preclinical evaluations [J]. *Behav Pharmacol*, 2020, 31(1): 45–60.
- [14] Ovadia A, Zhang Z, Gash DM. Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys [J]. *Neurobiol Aging*, 1995, 16(6): 931–937.
- [15] Shi L, Huang C, Luo Q, et al. The Association of Iron and the Pathologies of Parkinson's diseases in MPTP/MPP(+)-induced neuronal degeneration in non-human primates and in cell culture [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 215.
- [16] Shi L, Huang C, Luo Q, et al. Clioquinol improves motor and non-motor deficits in MPTP-induced monkey model of Parkinson's disease through AKT/mTOR pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9515–9533.
- [17] Pifl C, Schingnitz G, Hornykiewicz O. The neurotoxin MPTP does not reproduce in the rhesus monkey the interregional pattern of striatal dopamine loss typical of human idiopathic Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1988, 92(2): 228–233.
- [18] Crofts HS, Dalley JW, Collins P, et al. Differential effects of 6-OHDA lesions of the frontal cortex and caudate nucleus on the ability to acquire an attentional set [J]. *Cereb Cortex*, 2001, 11(11): 1015–1026.
- [19] Eslamboli A, Baker HF, Ridley RM, et al. Sensorimotor deficits in a unilateral intra-striatal 6-OHDA partial lesion model of Parkinson's disease in marmoset monkeys [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 418–429.
- [20] Ridley RM, Cummings RM, Leow-Dyke A, et al. Neglect of memory after dopaminergic lesions in monkeys [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 166(2): 253–262.
- [21] Milton AL, Marshall JW, Cummings RM, et al. Dissociation of hemi-spatial and hemi-motor impairments in a unilateral primate model of Parkinson's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 150(1–2): 55–63.
- [22] Santana M, Palmér T, Simplício H, et al. Characterization of long-term motor deficits in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in the common marmoset [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 290: 90–101.
- [23] Joers V, Dillek K, Rahman S, et al. Cardiac sympathetic denervation in 6-OHDA-treated nonhuman primates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104850.
- [24] Metzger JM, Matsoff HN, Zinnen AD, et al. Post mortem evaluation of inflammation, oxidative stress, and PPAR γ activation in a nonhuman primate model of cardiac sympathetic neurodegeneration [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0226999.
- [25] Shultz JM, Resnikoff H, Bondarenko V, et al. Neurotoxin-induced catecholaminergic loss in the colonic myenteric plexus of rhesus monkeys [J]. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 2016, 6(6): 279.
- [26] Green F, Samaranch L, Zhang HS, et al. Axonal transport of AAV9 in nonhuman primate brain [J]. *Gene Ther*, 2016, 23(6): 520–526.
- [27] Allocca M, Doria M, Petrillo M, et al. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(5): 1955–1964.
- [28] Gerits A, Vancraeynest P, Vreysen S, et al. Serotype-dependent transduction efficiencies of recombinant adeno-associated viral vectors in monkey neocortex [J]. *Neurophotonics*, 2015, 2(3): 031209.
- [29] Ciron C, Cressant A, Roux F, et al. Human alpha-iduronidase gene transfer mediated by adeno-associated virus types 1, 2, and 5 in the brain of nonhuman primates: vector diffusion and biodistribution [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(4): 350–360.
- [30] Kirik D, Annett LE, Burger C, et al. Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5): 2884

- 2889.
- [31] Eslamboli A, Romero-Ramos M, Burger C, et al. Long-term consequences of human alpha-synuclein overexpression in the primate ventral midbrain [J]. *Brain*, 2007, 130(3): 799-815.
 - [32] Koprich JB, Johnston TH, Reyes G, et al. Towards a non-human primate model of alpha-synucleinopathy for development of therapeutics for Parkinson's disease: optimization of AAV1/2 delivery parameters to drive sustained expression of alpha synuclein and dopaminergic degeneration in macaque [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167235.
 - [33] Wolfgang MJ, Eisele SG, Browne MA, et al. Rhesus monkey placental transgene expression after lentiviral gene transfer into preimplantation embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10728-10732.
 - [34] Yang SH, Cheng PH, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate [J]. *Nature*, 2008, 453(7197): 921-924.
 - [35] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission [J]. *Nature*, 2009, 459(7246): 523-527.
 - [36] Barkholt P, Sanchez-Guajardo V, Kirik D, et al. Long-term polarization of microglia upon α -synuclein overexpression in nonhuman primates [J]. *Neuroscience*, 2012, 208: 85-96.
 - [37] Manfredsson FP, Luk KC, Benskey MJ, et al. Induction of alpha-synuclein pathology in the enteric nervous system of the rat and non-human primate results in gastrointestinal dysmotility and transient CNS pathology [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 112: 106-118.
 - [38] Garrett DJ, Larson JE, Dunn D, et al. In utero recombinant adeno-associated virus gene transfer in mice, rats, and primates [J]. *BMC Biotechnol*, 2003, 3: 16.
 - [39] Mattar CN, Waddington SN, Biswas A, et al. Systemic delivery of scAAV9 in fetal macaques facilitates neuronal transduction of the central and peripheral nervous systems [J]. *Gene Ther*, 2013, 20(1): 69-83.
 - [40] Dehay B, Dalkara D, Dovero S, et al. Systemic scAAV9 variant mediates brain transduction in newborn rhesus macaques [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 253.
 - [41] Hordeaux J, Hinderer C, Buza EL, et al. Safe and sustained expression of human iduronidase after intrathecal administration of adeno-associated virus serotype 9 in infant rhesus monkeys [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(8): 957-966.
 - [42] Niu Y, Guo X, Chen Y, et al. Early Parkinson's disease symptoms in α -synuclein transgenic monkeys [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(8): 2308-2317.
 - [43] Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani C, et al. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24868.
 - [44] Tomioka I, Nogami N, Nakatani T, et al. Generation of transgenic marmosets using a tetracyclin-inducible transgene expression system as a neurodegenerative disease model [J]. *Biol Reprod*, 2017, 97(5): 772-780.
 - [45] Coghlan AJTNe. Monkeys created with Parkinson's [J]. 2016, 230(3078): 12.
 - [46] Yang W, Liu Y, Tu Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated PINK1 deletion leads to neurodegeneration in rhesus monkeys [J]. *Cell Res*, 2019, 29(4): 334-336.
 - [47] Rocha Cabrero F, Morrison EH. Lewy Bodies [M]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*; 2020.
 - [48] Shimozawa A, Ono M, Takahara D, et al. Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2017, 5(1): 12.
 - [49] Recasens A, Dehay B, Bové J, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys [J]. *Ann Neurol*, 2014, 75(3): 351-362.
 - [50] Arotcarena ML, Dovero S, Prigent A, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates [J]. *Brain*, 2020, 143(5): 1462-1475.
 - [51] Chansel-Debordeaux L, Bezard E. Local transgene expression and whole-body transgenesis to model brain diseases in nonhuman primate [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2(1): 9-17.
 - [52] Bourdenx M, Dovero S, Engeln M, et al. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015, 3: 46.
 - [53] Fifel K, Vezoli J, Dzahini K, et al. Alteration of daily and circadian rhythms following dopamine depletion in MPTP treated non-human primates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86240.
 - [54] Villalba RM, Pare JF, Lee S, et al. Thalamic degeneration in MPTP-treated Parkinsonian monkeys: impact upon glutamatergic innervation of striatal cholinergic interneurons [J]. *Brain Struct Funct*, 2019, 224(9): 3321-3338.
 - [55] Porras G, Li Q, Bezard E. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(3): a009308.
 - [56] Iravani MM, Haddon CO, Cooper JM, et al. Pramipexole protects against MPTP toxicity in non-human primates [J]. *J Neurochem*, 2006, 96(5): 1315-1321.
 - [57] Verhave PS, Jongsma MJ, Van den Berg RM, et al. REM sleep behavior disorder in the marmoset MPTP model of early Parkinson disease [J]. *Sleep*, 2011, 34(8): 1119-1125.
 - [58] Choudhury GR, Daadi MM. Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202770.
 - [59] Philippens IH, Wubben JA, Finsen B, et al. Oral treatment with the NADPH oxidase antagonist apocynin mitigates clinical and pathological features of parkinsonism in the MPTP marmoset model [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(3): 715-726.
 - [60] Subramanian T, Lieu CA, Guttalu K, et al. Detection of MPTP-induced substantia nigra hyperechogenicity in Rhesus monkeys by transcranial ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(4): 604-609.
 - [61] Zhang R, Andersen AH, Hardy PA, et al. Objectively measuring effects of electro-acupuncture in parkinsonian rhesus monkeys [J]. *Brain Res*, 2018, 1678: 12-19.
 - [62] Vermilyea SC, Guthrie S, Hernandez I, et al. α -Synuclein expression is preserved in substantia nigra GABAergic fibers of young and aged neurotoxin-treated rhesus monkeys [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(4): 379-387.

顾依然,朱仔燕,李春霖,等. 皮瓣实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 143-148.
Gu YR, Zhu ZY, Li CL. Research progress on an experimental animal model of skin flaps [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 143-148.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 021

皮瓣实验动物模型的研究进展

顾依然^{1,2}, 朱仔燕^{1,2}, 李春霖^{1,2}, 邓国英^{1*}

(1.上海市第一人民医院,上海 201620;2.上海交通大学医学院,上海 200025)

【摘要】 随着显微外科技术的发展,皮瓣移植技术日益成熟。为了探究皮瓣的血供特点、提高皮瓣存活率以及提升显微外科技术,皮瓣动物模型被大量建立,旨在模拟临床应用时皮瓣在活体的生理状态。至今,已经建立了各种不同动物种类、部位和功能的皮瓣动物模型,具有各自的优缺点,然而对于皮瓣实验动物模型领域的整体情况缺乏一个全面的认识和总结。因此,下文旨在对皮瓣实验动物模型领域的研究进展做一综述。

【关键词】 皮瓣;动物模型;穿支皮瓣;骨肌皮瓣;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0143-06

Research progress on an experimental animal model of skin flaps

GU Yiran^{1,2}, ZHU Ziyang^{1,2}, LI Chunlin^{1,2}, DENG Guoying^{1*}
(1. Shanghai General Hospital, Shanghai 201620, China.
2. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025)

【Abstract】 With the development of microsurgery method, flap transplantation technology has become increasingly beneficial. To explore the characteristics of the blood supply of flaps, improve the survival rate of flaps, and improve microsurgery technology, many animal models of flaps have been established to simulate the physiological status of flaps *in vivo* during clinical applications. To date, models of flaps have been established in different animal species with their own advantages and disadvantages. However, there have been no comprehensive summaries of the current state of the field of experimental animal models of flaps. Therefore, we reviewed the current research progress in the field of experimental animal models of skin flaps.

【Keywords】 skin flap; animal models; perforators flap; osseous myocutaneous flap; research progress

皮瓣动物模型为皮瓣治疗研究提供了重要研究途径,对皮瓣技术及相关基础研究的发展意义重大^[1],然而许多影响着皮瓣存活的因素尚缺少理想的解决方案^[2],由此限制了临床应用和医疗成本^[3]。因此动物模型在皮瓣技术的提升中扮演重要角色,能够了解皮瓣的解剖生理、缺血的发生机制、评价不同皮瓣手术方案的预后情况。

皮瓣技术发展至今,已经建立了各种动物模型,然而对于皮瓣实验动物模型领域的整体情况仍缺乏全面的认识和总结。建立皮瓣动物模型的意义在于模拟体外皮瓣实验,并将实验结果广泛应用于临床,因此实验动物的选择对于实验设计的成败起着至关重要的作用。本文就皮瓣实验动物模型的物种选择及其常用模式进行了综述(包括手术技术和应用领域),并尝试比较了其优缺点,旨在对皮瓣实验动物模型领域的研究进展做一综述。

【作者简介】顾依然(1999—),女,本科生,主要研究纳米硒材料与皮瓣修复。E-mail: takocelot@sjtu.edu.cn
【通信作者】邓国英(1986—),男,博士,主治医师,主要研究创伤修复与重建。E-mail: parisdeng2012@hotmail.com

1 皮瓣模型的实验动物选择

不同动物的生物学特性差异决定了其移植后的效果差异,需根据实验需要选择生物学特性接近的实验动物。在选择皮瓣实验动物时,必须考虑以下几点:动物养护成本、局部解剖类型、手术可行性以及伦理性等。

1.1 啮齿类

啮齿类动物是目前临床上最常用的动物模型^[4],适用于缺血再灌注损伤、微循环和皮瓣预制等方向的皮瓣研究,主要以小鼠和大鼠为代表。啮齿类动物皮下组织结构与人相似,普遍生命力旺盛,抗感染能力强,养护成本低,可重复性佳,性价比高^[5]。啮齿类动物皮下浅筋膜层较薄而肉膜组织较厚,与人体皮下供血模式存在差异;且鼠类体积较小,血管管径较细,手术操作较为困难,所以多被选为研究模型,对于临床手术操作的参考价值有限。

1.2 小型猪

猪是较为理想的皮瓣实验动物,可以模拟多种人体皮瓣供受区的生理表现^[6]。猪的皮下浅筋膜较发达,肉膜层相对退化,血供主要以发自深部主干血管的肌皮穿支为主,与邻近血管的吻合形成典型的血管体区^[7],与人体的皮下供血模式极其相似^[8]。因此基于猪建立的皮瓣模型更具有临床应用意义。此外,小型猪体型较大,可在背、腹部同时设计不同皮瓣进行对照实验,更有利于皮瓣存活情况的观察。但是,小型猪的饲养成本过高,因此使用较少^[9]。

1.3 其他动物

兔和狗等中型实验动物和人体解剖结构相似,且比起啮齿类动物体积更大、血管管径更粗,手术操作便捷,模型稳定性高。这类中型实验动物可用于研究泌尿^[10]、肌肉骨骼^[11]、生殖等系统^[12]的皮瓣移植功能重建,以及延迟皮瓣^[13]、扩张后行穿支皮瓣和预构皮瓣等皮瓣设计技巧^[14]。但是,虽然其饲养成本低于小型猪,但仍显著高于啮齿动物,因此使用范围有限。

2 不同皮瓣类型的动物模型

临床上通常根据不同的研究目的,结合不同动物间解剖结构和生理特性的差异,建立不同的皮瓣

动物模型,现根据不同的皮瓣类型分别简述如下(见表 1)。

2.1 随意型皮瓣模型

随意型皮瓣由于设计皮瓣部位和方向时不受轴心血管分布和走行的限制,因此有较大的取材空间,在修复创口、缺损和畸形等临床应用中也最为广泛。

大鼠背部皮瓣是典型的随意型皮瓣^[4]。在 1965 年时,McFarlane 等^[15]首次构造了一种源于深肌筋膜并包含了肉膜组织的背部头端蒂皮瓣,这种背部皮瓣没有特定的血管走行,皮瓣大小以背部骨性标志作为长宽比的限制标准,消除了不同大鼠间的个体差异。在随后的几十年中,这种大鼠背部皮瓣作为一种基础模型,被改造后运用于皮瓣的生理特性、存活率以及血运重建等研究中^[16]。

随后,Adamson 等^[17]在其基础上建立了大鼠背部尾端蒂皮瓣,将皮瓣切取面积限制在 2×7 cm 与 5×10 cm 之间,显著提高了皮瓣的存活率;kelly 等^[18]将皮瓣相对的两侧创缘相缝合,构建了一种新型管形皮瓣。其原理类似于 McFarlane 的分步剥离皮瓣,通过皮瓣延迟手术,促进皮瓣由蒂部建立丰富的血循,进一步提高了皮瓣的存活率。经过这一系列改良,大鼠背部随意型皮瓣,现已成为一种稳定、可靠的动物模型,用于研究不同药物、给药方案和皮瓣术式设计对皮瓣坏死的影响^[19]。

2.2 穿支皮瓣模型

2.2.1 一般穿支皮瓣

最早的穿支皮瓣概念由 Koshima 等^[20]在 1989 年提出,是以肌皮穿支血管为蒂的游离皮瓣。Coskunfirat 等^[21]于 2000 年建立了大鼠腹直肌肌皮穿支蒂皮瓣模型(TRAM),是一种单穿支体皮瓣,以大鼠右腹直肌近端第 2 个穿支血管为蒂,皮瓣自肉膜层下、腹直肌上切取。Hallock 等^[22]在此基础上,建立了首个大鼠上腹部穿支(DIEP)皮瓣模型。此后,这种模型一直采取切断皮瓣穿支血管后原位吻合,直到 Ozkan 等^[23]人将上腹部穿支动脉与腹壁下浅动脉,胸长静脉与股静脉连接吻合,通过转移上腹部穿支皮瓣至腹股沟区,从而建立真正的 DIEP 皮瓣模型。解决了此前穿支血管管径较细吻合困难的问题。由于该皮瓣容易制备且存活率可观,血管蒂稳定可靠,被广泛应用于皮瓣的动静脉瘘、缺血再灌注损伤、皮瓣微循环和皮瓣预制等研究。

表 1 皮瓣模型及其临床应用
Table 1 Skin flap model and its clinical application

皮瓣类型 Skin flap type	动物 Animal	皮瓣应用 Skin flap application
穿支皮瓣 Perforator flap	一般穿支皮瓣 General perforator flap	皮瓣预制、动静脉瘘及缺血再灌注损伤 Flap prefabrication, arteriovenous fistula and ischemia reperfusion injury
	游离 DIEP 皮瓣模型 Perforator DIEP flap	
	腹壁浅动脉穿支皮瓣 Perforator flap of superficial abdominal artery	
	跨区穿支皮瓣 Transregional perforator flap	模拟临床游离穿支皮瓣修复及静脉危象 Simulate the rebuilding of clinical perforator flapand venous crisis
	耳瓣模型 Ear flap model	皮瓣血管扩张机制及皮瓣促存活研究 Study on the mechanism of flap vasodilation and promoting flap survival
	背部皮窗模型 Back leather window model	跨区皮瓣存活机制 Survival mechanism of transregional perforator Flap
	腓肠肌肌瓣 Gastrocnemius muscle flap	皮瓣移植术后神经、肌肉功能转归 Prognosis of nerve and muscle after flap transplantation
	肌瓣、肌皮瓣 Muscle flap、 musculocutaneous flap	延迟皮瓣、促存活研究 Delayed flap and survival research of flap
	提睾肌肌皮瓣 Cremaster muscle flap	皮瓣移植术后肌肉微循环 Muscle microcirculation after flap transplantation
	骨肌皮瓣 Osteomuscular flap	骨肌皮瓣微循环 Osteomuscular flap microcirculation
其他皮瓣 Other flaps	逆行岛状皮瓣 Retrograde island flap	皮瓣静脉回流机制、遴选促皮瓣存活药物 Venous-returning mechanism of flaps and the selection of drugs to promote skin flap survival
	预构皮瓣 Prefabricated flap	皮瓣血管化机制、预构皮瓣设计 Mechanism of flap vascularization and the design of prefabricated flap

随后,卿黎明等^[24]建立了兔腹壁浅动脉穿支皮瓣,以前胸部为皮瓣受区,腹股沟区为皮瓣供区,将股动脉与颈总动脉行 Flow-through 动脉吻合、股静脉与颈外静脉端端吻合,进行皮瓣移植。这一动物模型所涉及的血管恒定可靠、吻合操作简单,能在不牺牲供区主干血管血液循环的前提下,精准的模拟临床游离穿支皮瓣修复以及静脉危象发生过程。但是兔成本较高,应用范围未及啮齿类动物模型广。

2.2.2 跨区穿支皮瓣观察模型

一种特殊的穿支皮瓣,可以通过观察连接穿支体之间的 choke 血管,提示跨区穿支皮瓣的存活情况。

Eriksson 等^[25]在 1980 年首次建立了小鼠耳瓣模型,小鼠耳朵少毛、皮肤菲薄,利于观察血液微循环;在此基础上,Barker 等^[26]通过切断小鼠部分耳底并结扎三条供血血管中的两条,构建出有完整神经血管束的皮瓣。这一模型可以观察皮瓣缺血再

灌注损伤,以此研究皮瓣延迟手术对皮瓣存活率的影响^[26]。但是观察效果会随着时间延长而减弱。

在此基础上,梁成等^[27]通过建立小鼠三血管体跨区耳瓣,发现术后 choke 区动静脉管径迅速扩增,表明小鼠跨区耳瓣模型可能成为研究皮瓣血管扩张机制及遴选促皮瓣存活药物的理想动物模型。

另外一种观察 choke 血管的动物模型是建立小鼠背部皮窗模型^[4]。庄跃宏等^[28]通过建立以髂腰动脉支为蒂的跨三个血管体区的皮瓣,定位到 choke 血管并安装皮窗以研究跨区皮瓣的存活机制。这种模型的缺点在于术后感染及反复麻醉观察,可能会影响小鼠的存活率。

2.3 肌瓣和肌皮瓣模型

腓肠肌肌瓣:1977 年 McCraw 等^[29]首次对肌瓣和肌皮瓣进行了研究。1987 年 Black 等^[30]建立了大鼠腓肠肌肌瓣,研究鼠类同种异体移植神经肌肉功能恢复。随后 Tonken 等^[31]发现,大鼠的腓肠肌

解剖结构与人相似,并且肌瓣切取范围广,可用于模拟临床同种异体复合皮瓣移植的神经肌肉功能转归、遴选抑制移植反应药物;若结合坐骨神经和胫神经建立功能性皮瓣,还能用于研究肌瓣表面植皮后感觉再支配。

腹直肌肌瓣和肌皮瓣:Hartrampf 等^[32]首次应用横行腹直肌(TRAM)皮瓣于乳房再造,随后作为一种软组织修复方式被广泛运用于其他领域。Zhang 等^[33]建立的大鼠腹直肌动物模型显示大鼠的腹部血供结构为腹壁上、下血管供血,与人类似,可模拟 TRAM 皮瓣的临床活体生理特性,并应用于皮瓣延迟、改善皮瓣成活率以及遴选皮瓣促存活药物^[34-35]。

提睾肌皮瓣:Grant^[36]于 1964 年首次提出了小鼠提睾肌皮瓣,幼鼠阴囊下皮肤菲薄,肌肉组织与外膜之间鲜有血管连接,易于剥离,将提睾肌扩张后置于显微镜下,静脉注射碳黑造影剂,检查微血管形态;或对局部静脉施加各种刺激后,观察血管反应,用于研究肌肉组织的微循环。Acland 等^[37]在此基础上,将提睾肌皮瓣改进为游离皮瓣,使皮瓣蒂与髂外血管吻合,用于研究横纹肌的缺血再灌注损伤。Ozer 等^[38]通过此模型结合活体荧光技术,研究白细胞内皮细胞相互作用和凋亡细胞死亡的炎症反应。

2.4 骨肌皮瓣模型

骨肌皮瓣是一种复合型皮瓣。Buncke 等^[39]对大鼠进行了带血管的关节移植,重建了大鼠的后肢,实现了最早的复合型游离骨瓣移植,但不包含肌肉组织。Hirase 等^[40]弥补了这一缺点,建立了含肌肉组织的骨肌皮瓣,现在常被用于研究移植排异反应^[41]。Linsell 等^[42]在此基础上,建立了由股骨、大腿肌以及腹股沟皮肤组织组成的大鼠骨肌皮复合皮瓣,在游离皮瓣的循环、代谢和免疫等领域具有一定研究价值。Mutaf 等^[43]建立了由隐血管为蒂,小腿内侧皮肤、半腱肌和股薄肌组成的带蒂胫骨隐血管骨段骨肌皮瓣,移植至大鼠的腹部后,皮瓣成活率可观。Rücker 等^[44]进一步建立了大鼠隐血管肌皮骨瓣模型,实现了在大鼠体内对皮瓣每一层组织的病理、生理研究。因此这种模型可以被用于肌皮骨瓣微循环的分析研究。值得一提的是,这一模型的观察期较短,不适用于长期或大量观察。

2.5 其他皮瓣动物模型

2.5.1 逆行岛状皮瓣

远端蒂皮瓣的一种特殊类型,能在不吻合血管

的前提下,将供区组织带蒂转移至受区,但其动脉血供和静脉回流均逆正常生理方向而流,静脉瓣膜导致的逆流困难是手术失败的主要原因之一^[45]。对于静脉回流途径的两种观点——“迷宫式途径”逆流理论和“瓣膜失活途径”逆流理论,张世民等^[46]设计了免隐静脉逆行岛状皮瓣,保留一组完整的隐动静脉血管鞘,另一组完全破坏静脉回流的静脉交通支仅保留主干静脉血管,以此观察两种理论下皮瓣的存活情况。因此,逆行岛状皮瓣动物模型有助于研究静脉回流机制,结合易操作、皮瓣存活率高等优点,还能帮助遴选促皮瓣存活药物。

2.5.2 预构皮瓣动物模型

预构皮瓣的概念最早由 Diller 等^[47]提出,他通过建立狗的带血供回肠瓣模型,提出了通过预构的手段可形成本不存在的皮瓣的观点。在国内,沈祖尧等^[48]通过将兔耳的中央静脉束移植入额部皮管内,形成皮瓣后行带血管蒂转移,皮瓣最终存活。这种皮瓣构建方式为早期的预构皮瓣研究构筑了基本框架。预构皮瓣的血管再生化对于皮瓣存活至关重要。因此,Tark 等^[49]运用血管内注射荧光素钠,证实增大血管载体面积显著提高皮瓣存活率。Li 等^[50]、Gumnluglu 等^[51]相继构建了大鼠腹壁上血管预构皮瓣,通过皮下局部注射腺病毒介导的血管内皮生长因子,证实了内皮生长因子能够扩大预制皮瓣面积,减少预构时间。由此可见,预构皮瓣动物模型能够研究预构皮瓣的血管化机制、促皮瓣存活的方案以及帮助临床设计高效、可靠的预构皮瓣。

3 讨论与展望

皮瓣实验动物模型在皮瓣技术的发展、皮瓣血运、生理和完善外科技术方面发挥着重要作用。然而,动物的血管解剖结构始终与人存在着差异,这意味着动物模型的实验结果运用于临床时,仍具有一定的局限性。而在其他方面,现有的皮瓣动物模型对皮瓣微循环、血管再生及缺血后再灌注损伤都提供了一定的理论基础,也验证了许多行之有效的提高皮瓣存活率的方案。但是许多动物模型仍存在一定的缺点,如动物模型的建立普遍需要较高的显微外科技术;跨区穿支皮瓣、骨肌皮瓣动物模型都存在观察期较短的问题;部分模型可重复性差等。而临床上也有许多问题亟待解决,例如移植排异反应、移植皮瓣感觉重建、皮瓣修复效果等,因此

仍需利用皮瓣动物模型进行进一步研究,有望在未来解决如上问题。

此外,尽快发展出科学可靠的非活体动物模型用于基础教学、临床技术训练,也值得深入探究。

综上所述,根据动物各自的优点和特性,结合临床需求,改善现有的皮瓣动物模型,使得皮瓣在创伤骨科、整形外科、修复重建等方向得到广泛的发展与应用。

参考文献:

- [1] 徐永清,何晓清. 皮瓣外科的新进展 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(7): 781-785.
- [2] Harder Y, Schmauss D, Wettstein R, et al. Ischemic tissue injury in the dorsal skinfold chamber of the mouse: a skin flap model to investigate acute persistent ischemia [J]. Vis Exp, 2014, 93: e51900.
- [3] Jablonka EM, Lamelas AM, Kanchwala SK, et al. A Simplified cost-utility analysis of inpatient flap monitoring after microsurgical breast reconstruction and implications for hospital length of stay [J]. Plast Reconstr Surg, 2019, 144(4): 540e-549e.
- [4] Schmauss D, Weinzierl A, Schmauss V, et al. Common rodent flap models in experimental surgery [J]. Eur Surg Res, 2018, 59(3-4): 255-264.
- [5] Kayano S, Nakagawa M, Nagamatsu S, et al. Why not perforator flap training models in rats? [J]. Plast Reconstr Aesthet Surg, 2010, 63(2): e134-135.
- [6] Nistor A, Jiga L, Georgescu D, et al. Abstract 39: the pig as an ideal training model for perforator flap dissection in living tissue [J]. Plast Reconstr Surg, 2014, 133 (3): 49.
- [7] 赵刚,芮永军,糜菁熠,等. 小型猪旋髂深动脉穿支皮瓣模型的建立 [J]. 中华显微外科杂志, 2017, 40(2): 165-167.
- [8] Daniel RK, Kerrigan CL. The omnipotent pig buttock flap [J]. Plast Reconstr Surg, 1982, 70(1): 11-16.
- [9] Fanua SP, Kim J, Shaw Wilgis EF. Alternative model for teaching microsurgery [J]. Microsurgery, 2001, 21 (8): 379-382.
- [10] Zou L, Mao S, Liu S, et al. Unilateral long-segment ureteral reconstruction using a bilateral Boari flap bridge: An experimental model in dogs [J]. Scand J Urol, 2016, 50(5): 401-404.
- [11] 王志斌,王黎敏,张慧鹏. 复合皮瓣修复兔模型腿和足骨缺损皮肤创伤的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(4): 861-863.
- [12] Lee S, Seon S, Park K, et al. Vocal fold reconstruction using an autologous pedicled fat flap in a rabbit model [J]. Laryngoscope, 2020, 130(7): 1770-1774.
- [13] Aydin OE, Algan S, Tan O. A novel method for flap delay vacuum assisted flap delay: an experimental study in rabbits [J]. Plast Surg Hand Surg, 2019, 53(4): 208-215.
- [14] Kokacya O, Eser C, Kesiktas E, et al. Perforator artery response

to tissue expansion: An experimental study in rabbits [J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(9): 1153-1159.

- [15] McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention [J]. Plast Reconstr Surg, 1965, 35: 177-182.
- [16] Conoyer JM, Toomey JM. Dorsal skin flaps in rats as an experimental model [J]. Surg Forum, 1979, 30: 510-511.
- [17] Adamson JE, Horton CE, Crawford HH, et al. Studies on the action of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap [J]. Plast Reconstr Surg, 1967, 39(2): 142-146.
- [18] Kelly CP, Gupta A, Keskin M, et al. A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention [J]. Plast Reconstr Aesthet Surg, 2010, 63(9): 1553-1556.
- [19] Seyed Jafari SM, Shafighi M, Beltraminelli H, et al. Improvement of flap necrosis in a rat random skin flap model by *in vivo* electroporation-mediated HGF gene transfer [J]. Plast Reconstr Surg, 2017, 139(5): 1116e-1127e.
- [20] Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle [J]. Br J Plast Surg, 1989, 42(6): 645-648.
- [21] Coskunfirat OK, Oksar HS, Ozgentas HE. Effect of the delay phenomenon in the rat single-perforator-based abdominal skin flap model [J]. Ann Plast Surg, 2000, 45(1): 42-47.
- [22] Hallock GG, Rice DC. Comparison of TRAM and DIEP flap physiology in a rat model [J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 114(5): 1179-1184.
- [23] Ozkan O, Koshima I, Gonda K. A supermicrosurgical flap model in the rat: a free true abdominal perforator flap with a short pedicle [J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(2): 479-485.
- [24] 卿黎明,唐举玉,杜威,等. 兔腹壁浅动脉穿支皮瓣动物模型的建立 [J]. 中华显微外科杂志, 2014, 37(4): 364-367.
- [25] Eriksson E, Boykin JV, Pittman RN. Method for *in vivo* microscopy of the cutaneous microcirculation of the hairless mouse ear [J]. Microvasc Res, 1980, 19(3): 374-379.
- [26] Barker JH, Hammersen F, Bondar I, et al. Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model [J]. Plast Reconstr Surg, 1989, 84(2): 303-313.
- [27] 梁成,庄跃宏,郑和平,等. 新型小鼠跨区供血耳瓣模型的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 25-29, 内插 5.
- [28] 庄跃宏,胡斯旺,吴东方,等. 一种研究 choke 血管新的动物模型——大鼠背部皮窗 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2011, 29(6): 609-613.
- [29] McCraw JB, Fishman JH, Sharzer LA. The versatile gastrocnemius myocutaneous flap [J]. Plast Reconstr Surg, 1978, 62(1): 15-23.
- [30] Black KS, Hewitt CW, Grisham GR, et al. Two new composite tissue allograft models in rats to study neuromuscular functional return [J]. Transplant Proc, 1987, 19(1): 1118-1119.
- [31] Tonken HP, Zhang F, Sudekum AE, et al. Microvascular transplant of the gastrocnemius muscle in rats [J]. Microsurgery, 1993, 14(2): 120-124.

- [32] Hartrampf CR, Schefflan M, Black PW. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1982, 69(2): 216-225.
- [33] Zhang F, Lineaweaver WC, Kao S, et al. Microvascular transfer of the rectus abdominis muscle and myocutaneous flap in rats [J]. *Microsurgery*, 1993, 14(6): 420-423.
- [34] Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, et al. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival [J]. *Ann Surg*, 2004, 239(6): 866-873.
- [35] Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, et al. Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study [J]. *Ann Plast Surg*, 2002, 49(1): 73-80.
- [36] Grant RT. Direct observation of skeletal muscle blood vessels (rat cremaster) [J]. *Physiol*, 1964, 172(1): 123-137.
- [37] Acland RD, Anderson G, Siemionow M, et al. Direct *in vivo* observations of embolic events in the microcirculation distal to a small-vessel anastomosis [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 84(2): 280-288.
- [38] Ozer K, Zielinski M, Unsal M, et al. Development of mouse cremaster transplantation model for intravital microscopic evaluation [J]. *Microcirculation*, 2002, 9(6): 487-495.
- [39] Buncke HJ Jr, Daniller AI, Schulz WP, et al. The fate of autogenous whole joints transplanted by microvascular anastomoses [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1967, 39(4): 333-341.
- [40] Hirase Y, Valauri FA, Buncke HJ. Prefabricated sensate myocutaneous and osteomyocutaneous free flaps: an experimental model [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1988, 82(3): 440-446.
- [41] Larsen M, Pelzer M, Friedrich PF, et al. Living bone allotransplants survive by surgical angiogenesis alone: development of a novel method of composite tissue allotransplantation [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(3): 261-273.
- [42] Linsell M, Jablonski P, Howden B, et al. The thigh flap: an osteomyocutaneous free-flap model in the rat [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1988, 81(2): 240-245.
- [43] Mutaf M, Tasaki Y, Arakaki M, et al. A true osteomyocutaneous free-flap model in rats: the saphenous artery osteomyocutaneous flap [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1995, 96(7): 1629-1635.
- [44] Rücker M, Schäfer T, Stamm A, et al. New model for *in vivo* quantification of microvascular embolization, thrombus formation, and recanalization in composite flaps [J]. *J Surg Res*, 2002, 108(1): 129-137.
- [45] 王华柱, 赵建勇, 刘志波, 等. 逆行岛状皮瓣临床应用失败原因分析及技术改进 [J]. *中华显微外科杂志*, 2005, 28(01): 74-75.
- [46] 张世民, 顾玉东, 李继峰. 逆行岛状皮瓣静脉回流的实验研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2004, 22(1): 5-7.
- [47] Diller J, Hartwell S, Anderson R. The mesenteric vascular pedicle: review of its clinical uses and report of experiments in dogs [J]. *Cleveland Clinic J Med*, 1966, 33(4): 163-169.
- [48] 沈祖尧, 王旭春, 芦家泽, 等. 血管束移位形成轴型皮瓣的试验研究 [J]. *中华外科杂志*, 1981, 11: 692-695.
- [49] Tark KC, Shaw WW. The revascularization interface in flap prefabrication: a quantitative and morphologic study of the relationship between carrier size and surviving area [J]. *J Reconstr Microsurg*, 1996, 12(5): 325-330.
- [50] Li QF, Reis ED, Zhang WX, et al. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor [J]. *J Reconstr Microsurg*, 2000, 16(1): 45-49.
- [51] Gurunluoglu R, Meirer R, Shafighi M, et al. Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication [J]. *Microsurgery*, 2005, 25(5): 433-441.

[收稿日期] 2020-10-21