

朱丽华,蒋翠花,张健,等. 不同程度肝肾损伤的高尿酸血症大鼠模型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 1-8.

Zhu LH, Jiang CH, Zhang J, et al. Hyperuricemia rat models with various degrees of hepatic and renal injuries [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.001

不同程度肝肾损伤的高尿酸血症大鼠模型研究

朱丽华^{1,2}, 蒋翠花², 张 健², 张现涛^{3*}, 殷志琦^{1*}

(1. 中国药科大学中药学院中药制剂系, 南京 211198; 2. 江苏省中医药研究院转化医学实验室, 南京 210028;
3. 南京海鲸药业有限公司, 南京 210031)

【摘要】 目的 筛选稳定的高尿酸血症大鼠模型方法。**方法** 单用或联合氧嗪酸钾、果糖、次黄嘌呤造模, 观察不同给药方式和时间制备的高尿酸血症大鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮水平、黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XO)、谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)活性、肝肾病理切片变化、肾三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ATP binding cassette subfamily g member 2, ABCG2)蛋白表达情况。**结果** 与正常组相比, 单用氧嗪酸钾造模 7 d 大鼠血清尿酸、尿素氮水平、AST、XO 活力显著上升($P<0.05$), 肝肾有轻微损伤, 肾 ABCG2 蛋白表达显著下降($P<0.05$)。果糖和氧嗪酸钾联合造模 7 d 大鼠血清尿酸显著升高($P<0.05$), 血清肌酐、尿素氮水平、AST、ALT、XO 活力、肾 ABCG2 蛋白表达无差异变化($P>0.05$), 联合造模 14 d 大鼠血清尿酸、尿素氮水平和 XO 活力显著上升($P<0.05$), AST 和 ALT 活力无差异变化($P>0.05$), 肝肾损伤不显著。次黄嘌呤和氧嗪酸钾联合造模 7 d, 大鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮水平、AST、ALT、XO 活性显著升高($P<0.05$), 肝肾损伤严重, 肾 ABCG2 蛋白表达量下降($P<0.05$)。**结论** 单用氧嗪酸钾可建立轻微肝肾损伤的急性高尿酸血症模型, 果糖联合氧嗪酸钾可建立肝肾损伤小的慢性高尿酸血症模型, 次黄嘌呤联合氧嗪酸钾可建立肝肾损伤严重的急性高尿酸血症模型。

【关键词】 高尿酸血症; 大鼠模型; 氧嗪酸钾; 次黄嘌呤; 果糖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0001-08

Hyperuricemia rat models with various degrees of hepatic and renal injuries

ZHU Lihua^{1,2}, JIANG Cuihua², ZHANG Jian², ZHANG Xiantao^{3*}, YIN Zhiqi^{1*}

(1. Department of TCMs Pharmaceuticals, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China. 2. Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028. 3. Nanjing Haijing Pharmaceutical Co, Ltd, Nanjing 210031)

【Abstract】 Objective To establish a stable rat model of hyperuricemia. **Methods** By administering potassium oxonate alone or in combination with fructose or hypoxanthine, a hyperuricemia model was established with different administration times using various modeling method. The levels of serum uric acid, creatinine, urea nitrogen, xanthine oxidase (XO), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) activity of hyperuricemia rats were measured. Pathological changes in the liver and kidney were observed. Protein expression of ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) were analyzed. **Results** Compared with the normal group, the levels of the serum uric acid, urea nitrogen, AST, and XO activity in rats administered potassium oxonate alone for 7 days were increased significantly ($P<0.05$), while the liver and kidney were slightly injured and kidney ABCG2 protein expression was decreased significantly

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81872984); 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2019388)。

【作者简介】 朱丽华(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药理学。E-mail: 459472550@qq.com

【通信作者】 殷志琦(1975—), 女, 教授, 博士, 研究方向: 中药学。E-mail: chyzq2005@126.com

张现涛(1978—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 中药学。E-mail: 1059740615@qq.com * 共同通信作者

($P < 0.05$). Compared with the normal group, the level of serum uric acid in rats was increased significantly ($P < 0.05$), whereas the levels of creatinine, urea nitrogen, AST, ALT, and XO activity and kidney ABCG2 protein expression showed no significant changes ($P > 0.05$) in the group with 7 day of combined potassium oxonate and fructose administration. The levels of serum uric acid, urea nitrogen, and XO activity were increased significantly ($P < 0.05$) and the levels of AST and ALT activity showed no significant changes ($P > 0.05$) in the group with 14 days of potassium oxonate and fructose administration. There were no significant morphological changes in the liver and kidney of rats. Compared with the normal group, the levels of serum uric acid, creatinine, urea nitrogen, and AST, ALT, XO activity in rats with 7 days of potassium oxonate and hypoxanthine administration were increased significantly ($P < 0.05$). Kidney ABCG2 protein expression was decreased significantly ($P < 0.05$) and the damage of the liver and kidneys was severe. **Conclusions** Potassium oxonate alone was suitable to establish a rat model of acute hyperuricemia with mild hepatic and renal injuries. Fructose combined with potassium oxonate may successfully establish a chronic hyperuricemia rat model with no significant effects on the liver or kidneys. Hypoxanthine combined with potassium oxonate successfully established an acute hyperuricemia rat model with severe hepatic and renal injuries.

【**Keywords**】 hyperuricemia; rat model; potassium oxonate; hypoxanthine; fructose

高尿酸血症是由于嘌呤代谢紊乱或尿酸排泄不足所导致体内尿酸升高的代谢紊乱疾病,已成为继高血压、高血糖、高血脂之后的第四大健康风险因素,即常说的“第四高”^[1]。随着生活水平的提高和饮食结构的改变、人口老龄化及肥胖的流行,高尿酸血症在世界各地的发病率和患病率均呈逐渐上升趋势^[2]。近年,中国沿海地区和发达城市高尿酸血症发病率已高达 25%,且呈年轻化趋势^[3-4]。持续高尿酸可引发肾衰或痛风,也会促进肥胖、代谢综合征、脂肪肝和糖尿病等代谢疾病的发生发展^[5],危害人类健康。

高效、稳定的高尿酸血症动物模型是防治高尿酸血症药物研究的重要基础。目前主要是通过增加体内尿酸来源(如腺嘌呤、酵母)、减少肾对尿酸排泄(如乙胺丁醇)、抑制尿酸氧化酶活性(如氧嗪酸钾)、基因改造(如敲除 *ABCG2*)等方式进行药物单独或联合造模来构建高尿酸血症模型^[6]。但这些造模方法评价标准不统一,稳定性差,并伴随不同程度肾损伤^[7]。此外,同一造模方法在不同实验环境、实验条件等因素影响下,效果也会有所不同,因此至今国内外尚无公认、统一的高尿酸血症模型。

因此,本研究将氧嗪酸钾、果糖、次黄嘌呤 3 种造模剂单用或联合造模,在不同的造模时间、造模方式下建立大鼠高尿酸血症模型,通过观测大鼠的血尿酸、肌酐、尿素氮水平、AST、ALT 和 XO 活力、肝肾病理切片、肾 ABCG2 蛋白表达的变化情况,评价各种造模的优劣势,以期高尿酸血症模型的合理建立和应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 85 只,体重 220~240 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005]。大鼠饲养于江苏省中医药研究院 SPF 级实验动物中心[SYXK(苏)2016-0018],饲养温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 $(60 \pm 10)\%$,采用 12 h:14 h 昼夜间断照明,动物自由进食和饮水。动物实验方案通过江苏省中医药研究院的实验动物使用与管理委员会审批(AEWC-20180724-40),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氧嗪酸钾(YQ34L-LA)购于东京化成工业株式会社;果糖(J01J10R89818)购于上海源叶生物科技有限公司;次黄嘌呤(G1725018)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;尿酸试剂盒(20190812)、肌酐试剂盒(20191104)、尿素氮试剂盒(20191104)、XO 试剂盒(20190902)、ALT 试剂盒(20200928)、AST 试剂盒(20200927)均购于南京建成生物工程研究所;羧甲基纤维素钠(C1814029)购于阿拉丁公司;BCA 蛋白定量检测试剂盒(120219200601)、PMSF(ST506)、RIPA 裂解液(P0013B)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(AO208)、ECL 化学发光试剂盒(071119200611)、Buffering 上样缓冲液(042220200929)均购于上海碧云天生物技术有限公司;兔抗 ABCG2 抗体(L10123192)、兔抗 β -actin 抗体(I11181372)均购于沈阳万类生物科技有限公司;苏木素-伊红染液(KGA224)购于江苏凯基生物

技术股份有限公司。

MS205DU 电子分析天平(瑞士 Mettler Tolerdo 公司);Allera64R 低温高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);SynergyH1 酶联免疫检测仪(美国伯腾仪器有限公司);Axlo VertA1 倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);164-5052 Western 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore Corporation 公司);SPE10-0111 apphire 双模式多光谱激光成像系统(美国 AZURE 公司);Sceint2-48 高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);690BR028786 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂的配制

称量羧甲基纤维素钠(CMC-Na)样品 5.000 g,加入 1000 mL 蒸馏水,配制 0.5% CMC-Na 溶液。以 CMC-Na 溶液做溶媒,分别配制 10 mg/mL、30 mg/mL 的氧嗪酸钾混悬液,10 mg/mL 的次黄嘌呤混悬液。采用蒸馏水配制 5% 的果糖无色透明溶液。将配置好的溶液置于 4℃ 冰箱储存。

1.3.2 动物分组与造模方式

SD 大鼠适应性喂养一周后,大鼠随机分为方法 1~方法 7 各组,包括正常组和模型组,每组 6 只大鼠,为排除其他因素的影响,在同等条件下,正常组给予 0.5% CMC-Na 来替代造模剂,各种高尿酸大鼠模型组具体制备方法见表 1。实验期间,实验大鼠自由饮水和摄食。

1.3.3 样品的收集和处理

取血前禁食不禁水 12 h,氧嗪酸钾末次造模后 1 h 时取血。血样室温下静置 1 h 后,3500 r/min 离心 15 min,收集上清液,置于-80℃ 条件下保存。

1.3.4 生化指标的测定

按试剂盒说明书测定大鼠血清的尿酸、肌酐、尿素氮含量、AST、ALT 和 XO 活性。

1.3.5 肝肾组织病理学观察

实验结束后安乐处死大鼠,快速剥离肝肾组织,生理盐水冲洗干净,置于 10% 福尔马林液 48 h。然后进行脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色等操作,光学显微镜下观察并拍照。

1.3.6 蛋白印迹分析

准确称取 100 mg 肾皮质组织,加入含蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液 1 mL 进行组织匀浆,4℃,12000 r/min 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 蛋白分析试剂盒检测蛋白浓度。将蛋白质样品和上样缓冲液以 4:1 的比例混合并煮沸 5 min 后,将混合物在 10% SDS-PAGE 电泳凝胶中分离,并转移至 PVDF 膜,将膜置于 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h,然后用 ABCG2 抗体 4℃ 孵育过夜。第 2 天将膜取出,用 TBS-Tween 洗涤 3 次,每次 5 min,加入二抗室温孵育 1 h,TBS-Tween 洗涤 3 次,每次 5 min。蛋白印迹成像系统对膜成像,Image J 软件进行光密度分析。

1.4 统计学方法

采用 GraphPade7 统计学软件进行统计分析,实验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组试验组间比较采用 *T* 检验法分析,多个试验组间比较采用单因素方差 ANOVA 法分析, $P < 0.05$ 视为统计学上有差异显著。

2 结果

2.1 血清尿酸、肌酐、尿素氮的变化情况

如表 2 所示,单次使用氧嗪酸钾造模,方法 1 和方法 2 均可使血尿酸含量显著性升高($P < 0.01$),且方法 1 效果更优。但两个方法中模型大鼠的血肌酐和血尿素氮水平相较于正常组无显著变化($P > 0.05$)。

连续 7 d 用氧嗪酸钾单独造模或联合造模后,与各方法中正常组相比,方法 3 中模型组大鼠的血

表 1 高尿酸血症大鼠模型方法制备

Table 1 Preparation of rat model of hyperuricemia

造模时间 Days of modeling	方法分类 Method classification	氧嗪酸钾 (mg/(kg·d)) Potassium oxonate	次黄嘌呤 (mg/(kg·d)) Hypoxanthine	果糖 Fructose
单次给药 Single-day administration	方法 1 Method 1	300(ip)	/	/
	方法 2 Method 2	100(ip)	/	/
	方法 3 Method 3	100(sc)	/	5%(ig)
持续 7 d 7-day consecutive modeling	方法 4 Method 4	300(ip)	/	/
	方法 5 Method 5	300(ip)	100(ig)	/
持续 14 d 14-day consecutive modeling	方法 6 Method 6	100(sc)	/	5%(ig)
	方法 7 Method 7	300(ip)	/	/

注:sc:皮下注射;ip:腹腔注射;ig:灌胃。

Note. sc, Hypodermic injection. ip, Intraperitoneal injection. ig, Intragastric administration.

清尿酸显著升高 ($P < 0.05$), 而肌酐和尿素氮无显著性差异 ($P > 0.05$)。方法 4 中模型组大鼠血清尿酸 ($P < 0.01$) 和尿素氮含量显著增高 ($P < 0.05$), 而肌酐无显著性差异 ($P > 0.05$)。方法 5 模型组大鼠血清尿酸 ($P < 0.01$)、肌酐和尿素氮水平均显著性上升 ($P < 0.05$)。

连续 14 d 用氧嗪酸钾单独造模或联合造模后, 与各方法中正常组相比, 方法 6 模型组大鼠的血清尿酸和尿素氮水平显著性升高 ($P < 0.05$), 而肌酐无显著性差异 ($P > 0.05$)。方法 7 模型组大鼠的血清尿酸 ($P < 0.01$) 和尿素氮水平显著性上升 ($P < 0.05$), 而肌酐无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 血清谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、黄嘌呤氧化酶 (XO) 活性的变化情况

AST 和 ALT 是临床上常用于反应肝损伤情况的指标。如表 3 所示, 单次使用氧嗪酸钾造模, 方法 1 和方法 2 模型组大鼠的血清 AST 和 ALT 活性相较于正常组无显著性变化 ($P > 0.05$)。连续 7 d 用氧嗪酸钾单独造模或联合造模后, 与各方法中正常组相比, 方法 3 模型组大鼠的血清 AST 和 ALT 活性均无显著性差异 ($P > 0.05$), 方法 4 模型组大鼠血清 AST 活性显著性上升 ($P < 0.05$), ALT 活性无明显变化 ($P > 0.05$); 方法 5 模型组大鼠 AST 和 ALT 活性均显著性增高 ($P < 0.05$)。连续 14 d 用氧嗪酸钾单独造模或联合造模后, 与各方法中正常组相比, 方法 6 模型组大鼠的血清 AST 和 ALT 活性无显著性变化 ($P > 0.05$), 方法 7 模型组大鼠的血清 AST 活性显著升高 ($P < 0.05$), ALT 活性无明显变化 ($P > 0.05$)。

XO 是生成尿酸的关键酶, XO 活性增加可造成体内尿酸生成过多。如表 4 所示, 在连续 7 d 用氧嗪酸钾单独造模或联合造模后, 与各方法中的正常组相比, 方法 3 模型组大鼠的血清 XO 活力无显著性差异 ($P > 0.05$), 方法 4 和方法 5 模型组大鼠的血清 XO 活力均显著性增高 ($P < 0.01$)。在连续 14 d 用氧嗪酸钾单独造模或联合造模后, 与各方法中正常组相比, 方法 6 模型组大鼠的血清 XO 活力显著性升高 ($P < 0.05$), 方法 7 模型组大鼠的血清 XO 活力无明显变化 ($P > 0.05$)。

2.3 肝肾组织的病理切片

如图 1A~1G 所示, 7 种造模方法中正常组大

鼠肝小叶结构均清晰、完整, 肝细胞大小形态均正常, 界限清晰, 肝索以中央静脉为中心呈放射状规则排列, 结构正常。如图 1H~1J、1N 所示, 造模方法 1、2、3、6 的模型组大鼠肝病理切片均未见明显病变, 肝小叶完整, 中央静脉清晰可见, 肝细胞界限分明, 大小正常, 肝索排列规则。如图 1K 所示, 方法 4 模型组大鼠肝板结构被破坏, 炎性细胞浸润, 肝细胞出现轻微水变性。如图 1L 所示, 方法 5 模型组大鼠肝小叶被破坏, 肝细胞水肿, 肝细胞核大小不一。如图 1M 所示, 方法 7 模型组大鼠肝小叶结构不完整, 肝细胞出现水变性, 脂肪病变, 肝索排列不规则。

如图 2A~2G 所示, 7 种造模方法中正常组大鼠肾小球大小、形态均正常, 边界清晰, 鲍曼氏囊腔明显, 肾小管结构正常清晰, 上皮细胞排列整齐。如图 2H~2J 所示, 方法 1、2、3 模型组大鼠肾病理切片未发现明显病变, 肾小球和肾小管结构、大小均正常, 肾间质无炎性浸润。如图 2K 所示, 方法 4 模型组大鼠肾小球萎缩, 微量炎性细胞外漏, 肾小管管腔扩张。如图 2L 所示, 方法 5 模型组大鼠肾小管和上皮细胞病变严重, 肾小管细胞空泡变性和上皮细胞肿胀, 部分上皮细胞脱落, 出现肾小管管型, 肾间质有炎性细胞的浸润且伴有水肿。如图 2N 所示, 方法 6 模型组大鼠肾小管和上皮细胞结构被破坏, 部分肾小管上皮细胞脱落, 胞浆淡然。如图 2M 所示, 方法 7 模型组大鼠肾小球出现严重萎缩现象, 大小和形态均被破坏, 上皮细胞排列不整齐, 部分上皮细胞脱落。

2.4 肾 ABCG2 蛋白的表达

ABCG2 编码分泌性尿酸转运蛋白, 其主要在肠道和肾近端小管刷状缘中调节尿酸排泄, 若 ABCG2 缺乏, 尿酸排泄减少^[8]。本研究采用蛋白质印迹分析单用氧嗪酸钾造模、氧嗪酸钾联合果糖造模、氧嗪酸钾联合次黄嘌呤造模这三种造模方法对于肾尿酸转运体 ABCG2 蛋白表达的影响。实验结果如图 3A~3B 所示, 与各方法中正常组相比, 方法 3 模型组大鼠 ABCG2 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 方法 4 和方法 5 模型组大鼠肾 ABCG2 蛋白表达显著性下降 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮的变化情况 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Changes of serum uric acid, creatinine, urea nitrogen in each group of rats

方法分类 Method classification	组别 Groups	血清尿酸 ($\mu\text{mol/L}$) Serum uric acid	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$) Creatinine	尿素氮 (mmol/L) Urea nitrogen
方法 1 Method 1	正常组 Normal group	100.8 $\pm$ 30.1	45.4 $\pm$ 8.1	4.4 $\pm$ 0.2
	模型组 Model group	201.7 $\pm$ 12.1 ^{##}	46.8 $\pm$ 8.0	4.5 $\pm$ 0.2
方法 2 Method 2	正常组 Normal group	85.5 $\pm$ 25.5	45.4 $\pm$ 11.8	4.6 $\pm$ 0.3
	模型组 Model group	206.0 $\pm$ 54.8 ^{##}	46.8 $\pm$ 13.8	4.5 $\pm$ 0.4
方法 3 Method 3	正常组 Normal group	144.5 $\pm$ 28.0	12.2 $\pm$ 5.6	4.7 $\pm$ 1.4
	模型组 Model group	211.5 $\pm$ 23.1 ^{##}	14.2 $\pm$ 8.1	3.7 $\pm$ 1.4
方法 4 Method 4	正常组 Normal group	84.8 $\pm$ 11.5	69.2 $\pm$ 10.6	4.3 $\pm$ 0.2
	模型组 Model group	268.4 $\pm$ 36.6 ^{##}	65.3 $\pm$ 7.8	5.5 $\pm$ 0.8 [#]
方法 5 Method 5	正常组 Normal group	195.8 $\pm$ 11.1	130.9 $\pm$ 13.9	4.4 $\pm$ 0.3
	模型组 Model group	678.7 $\pm$ 30.5 ^{##}	162.8 $\pm$ 27.8 [#]	7.8 $\pm$ 1.2 ^{##}
方法 6 Method 6	正常组 Normal group	121.2 $\pm$ 31.5	14.9 $\pm$ 3.1	3.8 $\pm$ 0.9
	模型组 Model group	208.2 $\pm$ 64.0 ^{##}	11.2 $\pm$ 1.9	5.4 $\pm$ 0.7 [#]
方法 7 Method 7	正常组 Normal group	191.4 $\pm$ 19.3	45.2 $\pm$ 8.5	3.7 $\pm$ 0.8
	模型组 Model group	267.5 $\pm$ 30.1 ^{##}	40.9 $\pm$ 8.2	5.5 $\pm$ 1.5 [#]

注:各方法的模型组与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

Note. Comparison of model group with normal group for each method, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 3 各组大鼠血清 AST、ALT 活性的变化情况 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Changes of serum AST, ALT activity in each group of rats

方法分类 Method classification	组别 Groups	AST 活性 (U/L) AST activity	ALT 活性 (U/L) ALT activity
方法 1 Method 1	正常组 Normal group	30.4 $\pm$ 13.1	22.9 $\pm$ 11.2
	模型组 Model group	33.1 $\pm$ 0.8	20.1 $\pm$ 7.8
方法 2 Method 2	正常组 Normal group	30.5 $\pm$ 12.1	23.1 $\pm$ 10.2
	模型组 Model group	29.7 $\pm$ 11.5	26.4 $\pm$ 3.9
方法 3 Method 3	正常组 Normal group	33.2 $\pm$ 13.8	20.5 $\pm$ 5.3
	模型组 Model group	35.5 $\pm$ 3.5	15.8 $\pm$ 4.4
方法 4 Method 4	正常组 Normal group	31.3 $\pm$ 7.8	25.5 $\pm$ 11.1
	模型组 Model group	54.9 $\pm$ 19.6 [#]	20.5 $\pm$ 9.3
方法 5 Method 5	正常组 Normal group	29.2 $\pm$ 6.9	9.0 $\pm$ 3.2
	模型组 Model group	41.2 $\pm$ 7.6 [#]	13.8 $\pm$ 1.8 [#]
方法 6 Method 6	正常组 Normal group	33.1 $\pm$ 11.6	20.5 $\pm$ 5.2
	模型组 Model group	50.0 $\pm$ 7.8	17.5 $\pm$ 6.0
方法 7 Method 7	正常组 Normal group	29.1 $\pm$ 6.9	9.1 $\pm$ 3.1
	模型组 Model group	42.0 $\pm$ 5.4 [#]	9.7 $\pm$ 6.4

注:各方法的模型组与正常组比较,[#] $P<0.05$ 。

Note. Comparison of model group with normal group for each method, [#] $P<0.05$.

表 4 各组大鼠的 XO 活力变化情况 (U/L, $\bar{x}\pm s$)
Table 4 Changes of XO activity of rats in each group

方法分类 Method classification	正常组 Normal group	模型组 Model group
方法 3 Method 3	34.16 $\pm$ 23.14	35.00 $\pm$ 8.69
方法 4 Method 4	15.27 $\pm$ 1.21	19.54 $\pm$ 2.50 ^{##}
方法 5 Method 5	16.55 $\pm$ 1.95	25.02 $\pm$ 2.87 ^{##}
方法 6 Method 6	16.18 $\pm$ 2.13	39.34 $\pm$ 3.9 ^{##}
方法 7 Method 7	15.44 $\pm$ 1.61	15.33 $\pm$ 2.44

注:各方法的模型组与正常组比较,^{##} $P<0.01$ 。

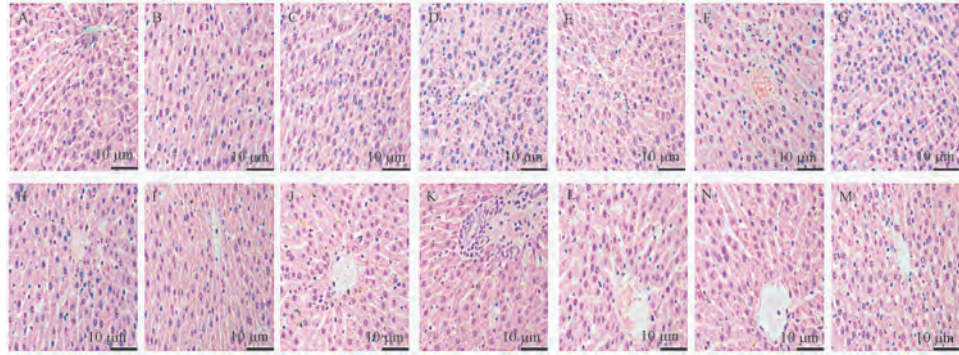
Note. Comparison of model group with normal group for each method, ^{##} $P<0.01$.

3 讨论

尿酸是人类体内嘌呤物质经过一系列酶反应

的最终产物,其中,XO 是尿酸生成的关键酶,可催化黄嘌呤氧化成尿酸^[9]。人体内尿酸大部分由肾排泄出体外,小部分由肠道负责排泄出体外。嘌呤摄入过多或嘌呤代谢酶功能异常所造成的尿酸分泌过多和肾尿酸排泄不足是高尿酸血症的主要病因^[10]。

根据高尿酸血症的发病机制,现有的实验研究中多采用增加尿酸前体物质(如酵母、腺嘌呤)、减少尿酸排泄(如氧嗪酸钾、乙胺丁醇)、基因改造(敲除 *GLUT9*)等方法进行单一或联合建造高尿酸血症模型。Chen 等^[11]采用 10% 酵母提取物糊剂按照 7.5 g/(kg·d) 饲养大鼠 5 周成功建立的高尿酸

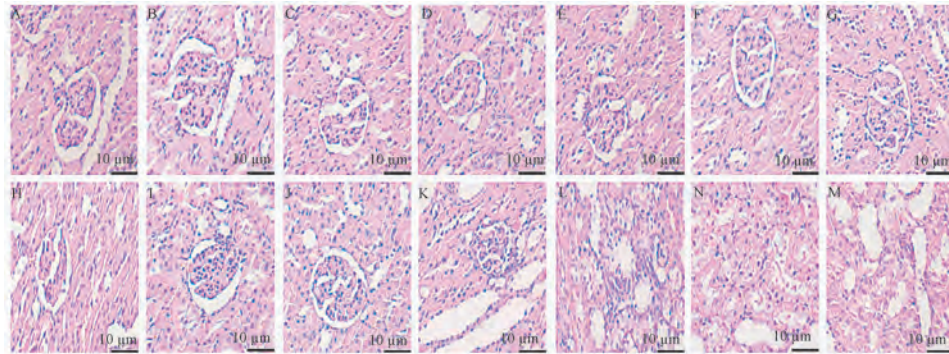


注:A:方法 1 正常组;B:方法 2 正常组;C:方法 3 正常组;D:方法 4 正常组;E:方法 5 正常组;F:方法 6 正常组;G:方法 7 正常组;H:方法 1 模型组;I:方法 2 模型组;J:方法 3 模型组;K:方法 4 模型组;L:方法 5 模型组;N:方法 6 模型组;M:方法 7 模型组。

图 1 各组大鼠肝组织病理染色示意图(HE 染色)

Note. A, Method 1 normal group. B, Method 2 normal group. C, Method 3 normal group. D, Method 4 normal group. E, Method 5 normal group. F, Method 6 normal group. G, Method 7 normal group. H, Method 1 model group. I, Method 2 model group. J, Method 3 model group. K, Method 4 model group. L, Method 5 model group. N, Method 6 model group. M, Method 7 model group.

Figure 1 Schematic diagram of pathological staining of rat liver tissue in each group(HE staining)



注:A:方法 1 正常组;B:方法 2 正常组;C:方法 3 正常组;D:方法 4 正常组;E:方法 5 正常组;F:方法 6 正常组;G:方法 7 正常组;H:方法 1 模型组;I:方法 2 模型组;J:方法 3 模型组;K:方法 4 模型组;L:方法 5 模型组;N:方法 6 模型组;M:方法 7 模型组。

图 2 各组大鼠肾组织病理染色示意图(HE 染色)

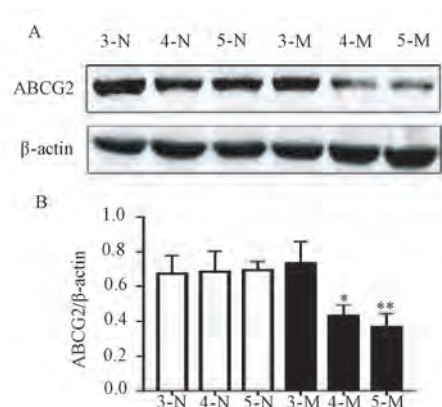
Note. A, Method 1 normal group. B, Method 2 normal group. C, Method 3 normal group. D, Method 4 normal group. E, Method 5 normal group. F, Method 6 normal group. G, Method 7 normal group. H, Method 1 model group. I, Method 2 model group. J, Method 3 model group. K, Method 4 model group. L, Method 5 model group. N, Method 6 model group. M, Method 7 model group.

Figure 2 Schematic diagram of pathological staining of rat kidney tissue in each group(HE staining)

血症大鼠模型,但酵母粉灌胃体积大,易造成实验动物损伤或死亡。沈桂芹等^[12]用 300 mg/kg 氧嗪酸钾与 250 mg/kg 乙胺丁醇联合造模,大鼠血尿酸出现先升高后降低的现象。Diwan 等^[13]发现喂 4 周含 0.75%腺嘌呤饲料大鼠的血清尿素氮和肌酐、蛋白尿水平升高,出现肾纤维化、高脂血症和血管钙化等特征,这是因为腺嘌呤会形成极难溶于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,沉积于肾小管及其肾间质,引起以肾间质小管损伤为主的肾衰竭^[14],这种造模方式不符合临床上高尿酸血症的发病机制。Lu 等^[15]在纯 C57BL/6J 小鼠上通过敲除尿酸酶基因,小鼠尿酸水平超过 420 mmol/L,但小鼠肾损伤严重且存活率低。因此,本研究综合前人研究,结合高尿酸

临床发病机制和大鼠尿酸代谢特点,采用了尿酸前体物质和尿酸排泄抑制剂进行造模,希望更好地建立高尿酸血症模型。

本研究选择氧嗪酸钾、果糖、次黄嘌呤三种造模剂单用或联用建造高尿酸血症模型,其主要原理如下所述。人类在进化中编码尿酸酶的基因沉默失活,但啮齿类动物编码尿酸氧化酶的基因并未沉默,尿酸氧化酶可将尿酸分解为尿囊素从而排除体外^[16],故啮齿类动物体内不易造成高尿酸血症。为了减少大鼠与人类体内对于尿酸代谢的差距,需抑制大鼠体内的尿酸氧化酶活性。氧嗪酸钾为三氮杂苯类化合物,其结构与尿酸的嘌呤环类似,可竞争性地与尿酸酶结合,抑制尿酸分解为尿囊素排出



注:A: Western blot 结果; B: ABCG2 蛋白灰度值与 β -actin 灰度值比值。3-N、4-N、5-N 分别为方法 3、4、5 的正常组, 3-M、4-M、5-M 分别为方法 3、4、5 的模型组, 各方法模型组与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 肾 ABCG2 蛋白的表达情况

Note. A, Data were analyzed using Western blot. B, Ratio of ABCG2/ β -actin. 3-N, 4-N, 5-N are the normal groups of methods 3, 4, 5 respectively. 3-M, 4-M, 5-M are the model groups of methods 3, 4, 5 respectively. Comparison of model group with normal group for each method, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Expression of kidney ABCG2 protein

体外,从而易造成大鼠体内尿酸升高^[17]。因此,本研究主要选择氧嗪酸钾单用或与其他药物联用构建高尿酸血症模型。本研究单用氧嗪酸钾单次造模、连续 7 d 造模和连续 14 d 造模均发现模型组相对于正常组血尿酸显著性升高。单用氧嗪酸钾连续造模 14 d 相较于连续造模 7 d 模型组尿酸值上升不多,这可能是当尿酸浓度升高,对尿酸氧化酶具有反馈性调节,尿酸氧化酶的表达或活性增加,导致尿酸浓度有所降低。本研究同时还采用了果糖进行造模,是由于果糖在果糖激酶的催化下磷酸化为果糖 1-磷酸,降低胞内磷酸盐和 ATP 的水平。细胞内磷酸盐快速减少会刺激 AMP 降解为次黄嘌呤,次黄嘌呤在 XO 的作用下最终产生尿酸^[18],使体内尿酸升高。本研究大鼠用果糖联合氧嗪酸钾连续造模 7 d 和 14 d 均能使尿酸显著性上升,相较于单用氧嗪酸钾造模,该造模方式尿酸值稳定。与正常组相比,果糖联合氧嗪酸钾连续造模 7 d 模型组 XO 活性无显著性差异,连续造模 14 d 模型组 XO 活性具有显著性差异,这可能说明果糖联合氧嗪酸钾造模适合建立长期、稳定的高尿酸血症模型。本研究采用次黄嘌呤,是因为次黄嘌呤为尿酸的前体物质,其在一系列酶的作用下最终可转换成尿酸,从而使体内尿酸升高^[19]。本研究大鼠用次黄

嘌呤联合氧嗪酸钾造模尿酸值是单用氧嗪酸钾造模的 3 倍,这说明次黄嘌呤能使尿酸含量非常显著上升。

肾是尿酸主要的排泄器官,高尿酸血症往往会导致尿酸及其结晶沉积在肾中,从而造成不同程度的肾功能损伤。研究表明,可溶性尿酸具有氧化和促炎作用^[20],可诱导肾足细胞损伤^[21]。尿酸水平的升高会导致肾内皮功能紊乱,从而增加慢性肾病的风险^[22]。尿酸溶解度下降和过饱和会造成尿酸钠晶体的形成,尿酸钠晶体在肾中的直接沉积会引起肾小管间质的损伤,从而可引起慢性尿酸性肾病、急性尿酸性肾病和尿酸性肾结石^[23]。本研究单用氧嗪酸钾造模发现,模型组大鼠尿素氮水平显著升高,肌酐无显著性差异,出现轻微肾损伤,与 Chen 等^[24]研究结果一致,说明单用氧嗪酸钾造模只适合建立急性高尿酸血症伴随轻微肾损伤模型。本研究氧嗪酸钾联合次黄嘌呤造模,肌酐和尿素氮显著上升,肾损伤严重,这可能是由于次黄嘌呤自身能增强大鼠肾皮质和髓质的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶的活性所导致的^[25],说明氧嗪酸钾联合次黄嘌呤适合建立急性高尿酸血症伴随严重肾损伤模型。本研究氧嗪酸钾联合果糖连续造模 7 d 时未出现肾损伤,连续造模 14 d 出现轻微肾损伤,说明氧嗪酸钾联合果糖适合建立慢性高尿酸血症逐渐伴随肾损伤的模型。

研究表明,高尿酸血症与脂肪肝的患病率成独立正相关关系^[26]。高尿酸可以直接刺激肝细胞的脂肪合成,导致肝细胞脂质代谢紊乱、氧化应激损伤和胰岛素敏感性下降相关^[27]。本研究单用氧嗪酸钾造模 7 d 或 14 d 的模型组大鼠血清 AST 活性显著上升,但 ALT 活性无显著变化,肝病理切片中肝细胞出现了轻微的脂肪变性,说明单用氧嗪酸钾连续造模 7 d 或 14 d 会造成轻微肝损伤。氧嗪酸钾联合次黄嘌呤造模的大鼠血清 AST 和 ALT 活性均显著升高,且肝病理切片中肝细胞出现了轻微的脂肪变性,说明氧嗪酸钾联合次黄嘌呤造模会造成较严重肝损伤,这可能是由于体内尿酸的升高从而引起肝脂肪合成增加所导致的。有研究报道,果糖可诱导肝脂肪堆积^[28],但本研究果糖联合氧嗪酸钾造模的大鼠血清 AST 和 ALT 活性均无变化,且肝病理切片并未发现明显肝病变,可能是由于造模时间尚未引起上述病变,这与李琴等^[29]用 5% 果糖联合氧嗪酸钾造模两周,但未发现肝有损伤的结果一

致,这说明果糖联合氧嗪酸钾造模短期内不会造成肝损伤。

综上所述,本实验成功构建了几种不同程度肝肾损伤的高尿酸血症大鼠模型。分析模型结果可知,单用氧嗪酸钾连续造模 7 d 适合短期内建立急性高尿酸血症伴随轻微肝肾损伤模型。用 5% 果糖联合氧嗪酸钾造模更贴近人类因为高糖饮食可诱导的高尿酸血症,该造模方式适合建立肝肾损伤小的慢性高尿酸血症动物模型。次黄嘌呤联合氧嗪酸钾适合建立肝肾损伤严重的高尿酸血症模型。但这些模型的具体机制和应用还需进一步探索,以便为高尿酸血症模型建立提供更全面科学的依据。

参考文献:

- [1] 林淑芃.《中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)》解读[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(6): 460-462.
- [2] Kuo CF, Grainge MJ, Zhang W, et al. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(11): 649-662.
- [3] 冯学轩, 刘月姝, 饶子亮, 等. 急、慢性高尿酸血症模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 74-80.
- [4] 李慧卉. 高尿酸血症和痛风的流行病学及其危险因素的研究进展[J]. 首都食品与医药, 2019, 26(16): 13-14.
- [5] Battelli MG, Bortolotti M, Polito L, et al. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(8): 2557-2565.
- [6] 何宏明, 冯育林, 张武岗, 等. 不同方法建立高尿酸血症动物模型研究进展[J]. 江西中医药, 2015, 46(12): 72-75.
- [7] 吴燕升, 万强, 史丽强, 等. 多种方法探索高尿酸血症大鼠模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19(1): 7-10.
- [8] Takada T, Ichida K, Matsuo H, et al. ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2014, 33(4-6): 275-281.
- [9] Battelli MG, Bortolotti M, Polito L, et al. Metabolic syndrome and cancer risk: the role of xanthine oxidoreductase [J]. Redox Biol, 2019, 21: 101070.
- [10] Lu J, Dalbeth N, Yin H, et al. Mouse models for human hyperuricaemia: a critical review [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(7): 413-426.
- [11] Chen J, Zhou J, Wei S, et al. Effect of a traditional chinese medicine prescription quzhuotongbi decoction on hyperuricemia model rats studied by using serum metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1026: 272-278.
- [12] 沈桂芹, 于世家. 尿酸排泄不良型高尿酸血症动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 55-59.
- [13] Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(1): 5-11.
- [14] 裴忆雪, 刘永杰, 张笛, 等. 建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 46-54.
- [15] Lu J, Hou X, Yuan X, et al. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders [J]. Kidney Int, 2018, 93(1): 69-80.
- [16] Kratzer JT, Lanaspas MA, Murphy MN, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(10): 3763-3768.
- [17] 王陈芸, 李哲丽, 叶允松, 等. 氧嗪酸钾致小鼠急性高尿酸血症动物模型的研究及评价[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 176-180.
- [18] Nakagawa T, Johnson RJ, Andres-Hernando A, et al. Fructose production and metabolism in the kidney [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(5): 898-906.
- [19] 朱祥祥, 方颖莹, 庞敏霞, 等. 不同造模因素复制小鼠高尿酸血症模型的比较研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(2): 142-148.
- [20] Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M, et al. Soluble uric acid activates the NLRP3 inflammasome [J]. Sci Rep, 2017, 7: 39884.
- [21] Asakawa S, Shibata S, Morimoto C, et al. Podocyte injury and albuminuria in experimental hyperuricemic model rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 3759153.
- [22] Yang X, Gu J, Lv H, et al. Uric acid induced inflammatory responses in endothelial cells via up-regulating (pro) renin receptor [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1163-1170.
- [23] 张彩霞, 侯艳培, 李冰. 高尿酸血症的肾损害[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(4): 366-368.
- [24] Chen YS, Chen CJ, Yan W, et al. Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory actions of vaticaffinol isolated from dipterocarpus alatus in hyperuricemic mice [J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(5): 330-340.
- [25] 张雄峰, 李正胜, 钟琴, 等. 尿酸性肾病啮齿类动物模型制备研究概述[J]. 内科, 2019, 14(2): 191-193.
- [26] 赵雪诚, 万政策, 李冰丽, 等. 体检人群中高尿酸血症与脂肪肝的相关性研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(4): 320-322.
- [27] 徐思博, 刘晓静. 高尿酸血症与非酒精性脂肪肝的关系研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2020, 43(1): 59-62, 67.
- [28] Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, et al. Fructose and sugar: a major mediator of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol, 2018, 68(5): 1063-1075.
- [29] 李琴, 刘杰, 刘先俊, 等. 果糖联合氧嗪酸钾建立高尿酸血症大鼠模型[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(7): 569-576.

[收稿日期] 2021-01-13

曹育,安玉兰,张卓铭,等. 针刺对阿尔茨海默症小鼠海马 CA1 区树突结构及认知功能影响的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 9-15.

Cao Y, An YL, Zhang ZM, et al. Effect of acupuncture on the dendritic structure of the hippocampal CA1 area and cognitive functions in mice with Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.002

针刺对阿尔茨海默症小鼠海马 CA1 区树突结构及 认知功能影响的研究

曹 育¹, 安玉兰¹, 张卓铭², 翟春涛³, 武峻艳^{4*}

(1.山西中医药大学第三临床学院推拿科,山西 晋中 030619;2.山西中医药大学基础医学院中医医学史教研室,山西 晋中 030619;3.山西中医药大学第三临床学院针灸科,山西 晋中 030619;4.山西中医药大学第三临床学院脑病一科,山西 晋中 030619)

【摘要】 目的 探讨针刺对阿尔茨海默症小鼠海马 CA1 区树突结构及认知功能的影响。**方法** 24 只雄性快速老化 SAMP8 小鼠,随机分为模型组和针刺组,各 12 只;另选取 12 只雄性正常老化 SAMR1 小鼠为对照(对照组)。对照组和模型组小鼠不做处理,针刺组小鼠接受为期 8 周(隔日治疗一次)的针刺治疗,针刺部位为百会穴、肾俞穴、太溪穴。Morris 水迷宫实验检测小鼠认知功能;取小鼠海马 CA1 区, Golgi 染色观察锥体细胞树突结构;免疫组织化学染色法检测 $A\beta_{1-40}$ 和 Tau 表达;Western blot 检测 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平。**结果** (1)与对照组比较,模型组水迷宫训练第 5 天时逃避潜伏期较高,而跨平台次数较低($P<0.05$)。与模型组比较,针刺组水迷宫训练第 5 天时逃避潜伏期较低,而跨平台次数较高($P<0.05$)。(2)与对照组比较,模型组基底树突长度、顶端树突长度、基底树突分支数目和顶端树突分支数目均较低($P<0.05$)。与模型组比较,针刺组上述指标均较高($P<0.05$)。(3)与对照组比较,模型组 $A\beta_{1-40}$ 和 Tau 表达的平均光密度值较高($P<0.05$)。与模型组比较,针刺组上述指标较低($P<0.05$)。(4)与对照组比较,模型组 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平均较低($P<0.05$)。与模型组比较,针刺组上述指标均较高($P<0.05$)。**结论** 针刺百会、肾俞和太溪穴可能通过激活 BDNF/SYN/MAP2 信号通路,改善海马 CA1 区树突长度和分支数目从而改善快速老化 SAMP8 小鼠的认知功能。

【关键词】 针刺;阿尔茨海默症;认知;突触可塑性;树突

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0009-07

Effect of acupuncture on the dendritic structure of the hippocampal CA1 area and cognitive functions in mice with Alzheimer's disease

CAO Yu¹, AN Yulan¹, ZHANG Zhuoming², ZHAI Chuntao³, WU Junyan^{4*}

(1. Department of Massage, Third Clinical College, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China.
2. Department of History of Traditional Chinese Medicine, Basic Medical College, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619. 3. Department of Acupuncture and Moxibustion, Third Clinical College, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619. 4. Department of Encephalopathy, First Clinical College, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619)

【基金项目】 国家自然科学基金(青年科学基金)项目(81804174)。

【作者简介】 曹育(1976—),女,讲师,研究方向:针灸推拿学。E-mail:loophite@163.com

【通信作者】 武峻艳(1979—),女,博士,研究方向:中医针灸治疗脑病的基础与临床研究。E-mail:54caoyu@sohu.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of acupuncture on the dendritic structure of the hippocampal CA1 area and cognitive functions in Alzheimer's disease mice. **Methods** Twenty-four male rapidly aging SAMP8 mice were randomly divided into model and acupuncture groups with 12 mice each. Another 12 male normal aging SAMR1 mice were used as the control (control group). Mice in control and model groups were untreated. Mice in the acupuncture group received acupuncture treatment for 8 weeks (once every other day). The acupuncture sites were Baihui, Shenshu, and Taixi. A Morris water maze test was used to assess mouse cognitive functions. After collecting the mouse hippocampal CA1 area, Golgi staining was used to observe the structure of pyramidal cell dendrites. Immunohistochemical staining was used to detect expression of $A\beta_{1-40}$ and Tau. Western blot was used to measure BDNF, SYN, and MAP2 protein expression levels. **Results** (1) Compared with the control group, the model group had a higher escape latency on the 5th day of water maze training, while the number of cross-platforms was lower ($P<0.05$). Compared with the model group, the acupuncture group had a lower escape latency on the 5th day of water maze training, and a higher number of cross-platforms ($P<0.05$). (2) Compared with the control group, the lengths of basal and apical dendrites, and the numbers of basal dendrites and branches of apical dendrites were all lower in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the above indicators were all higher in the acupuncture group ($P<0.05$). (3) Compared with the control group, the average optical density of $A\beta_{1-40}$ and Tau expression was higher in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the above indicators were lower in the acupuncture group ($P<0.05$). (4) Compared with the control group, the protein expression levels of BDNF, SYN, and MAP2 were lower in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the above indexes were higher in the acupuncture group ($P<0.05$). **Conclusions** Acupuncture at Baihui, Shenshu and Taixi might improve the cognitive function of rapidly aging SAMP8 mice by activating BDNF/SYN/MAP2 signaling pathway and improving the length and number of dendritic branches in the CA1 region of hippocampus.

【Keywords】 acupuncture; Alzheimer's disease; cognition; synaptic plasticity; dendrites.

阿尔茨海默症 (Alzheimer disease, AD) 是以记忆力障碍、执行功能损害和人格改变等全面性痴呆表现为特征的神经退行性疾病。AD 占痴呆诊断的 80%, 自 2010 年以来, AD 的发病率呈逐年上升趋势^[1]。许多研究表明, 线粒体功能障碍、Tau 蛋白异常磷酸化、氧化应激损伤等均与 AD 的发生密切相关^[2]。遗憾的是, 目前还没有药物能够有效治疗 AD。针灸作为祖国传统医学, 为 AD 的预防和治疗提供了思路^[3-4]。中医认为, AD 的发生以本虚为主, 患者肾虚精亏, 不能上充于脑, 最终脑髓空虚导致灵机使用, 引发痴呆。依据“肾脑相济”理论, 针刺百会、肾俞和太溪穴可以改善痴呆大鼠的认知功能^[5]。然而针刺治疗 AD 的生物学机制目前尚未明确。

有研究显示, 痴呆患者的海马神经轴突营养不良, 并且存在树突棘丢失和树突复杂性降低等现象^[6]。可溶性 $A\beta$ 蛋白可破坏突触超微结构和马神经元树突结构、减少棘突密度, 引起痴呆认知功能障碍^[7]。海马 CA1 区锥体细胞损伤与神经认知功能障碍密切相关^[8]。为了探讨针刺治疗 AD 的机制, 本研究以 SAMP8 快速老化小鼠为研究对象, 观察针刺百会、肾俞和太溪穴后小鼠海马 CA1 区树突结构及认知功能的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级快速老化雄性 SAMP8 小鼠和 12 只 SPF 级雄性正常老化 SAMR1 小鼠, 均 7 月龄, 体重 (32.23 ± 5.09) g, 购于至善 (北京) 健康医学研究院 [SCXK (京) 2017-0001]。在温度 $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 40%~60% 的环境中, 明暗周期为 12 h/12 h 条件下于山西中医药大学实验动物中心 [SYXK (晋) 2018-0002] 饲养, 允许所有小鼠自由进食和进水, 适应性喂养一周后进行后续实验。本研究所有操作严格遵循中国实验动物福利法, 符合 3R 原则。动物实验经过山西中医药大学动物实验伦理委员会批准 (SZLLSC2019-0160)。

1.2 主要试剂与仪器

Golgi 染色试剂盒 (批号 HTKNS1125) 购于北京博蕾德科技发展有限公司; 戊巴比妥 (批号 2017089) 和多聚甲醛 (批号 2017087) 购于北京迈瑞达科技有限公司; 免疫组化检测试剂盒 (批号 074K00)、BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 L2800)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 67H04) 均购于美国 Sigma 公司; Tau (批号 ab109302)、 $A\beta_{1-40}$ (批号 ab00109)、脑源性神经营养因子 (Brain-derived

neurotrophic factor, BDNF)(批号 ab223354)、突触素(Synaptophysin, SYN)(批号 321207)、微管相关蛋白 2(Microtubule-associated protein 2, MAP2)(批号 ab870921)和 GAPDH 内参抗体(批号 ab204276)均购于英国 Abcam 公司;水迷宫设备购于上海软隆科技发展有限公司;针灸针购于泰兴市天和医疗器械有限公司;KH-LQ3800 冰冻切片机购于湖北孝感阔海医疗科技有限公司;CX31 光学显微镜为日本奥林巴斯公司生产;WD-9413B 型凝胶成像分析系统购于济南东仪实验室设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及治疗

将 24 只 SAMP8 小鼠随机分为模型组和针刺组,每组 12 只;将 12 只 SAMR1 小鼠作为对照组。针刺组采用针刺治疗 8 周,模型组和对照组正常饲养,不进行干预。参考《普通高等教育“十一五”国家级规划教材:针灸学(第 2 版)》,选取百会穴(顶骨正中)、肾俞穴(第 2 腰椎下两旁约 5 mm)、太溪穴(内踝后方凹陷部位),用 30 号针刺入,每次留针 20 min,每隔 5 min 行针一次,行针时捻针速度为每分钟 200 次,捻针 20 次为行针 1 次。隔日针刺一次,连续针刺治疗 8 周。

1.3.2 Morris 水迷宫实验检测小鼠认知功能

针刺治疗 8 周后,用 Morris 水迷宫实验检测所有小鼠的学习记忆能力^[9]。该实验分为两个部分:(1)定位导航实验:将小鼠放入水中(水深约 20~25 cm,水温约 $(23\pm 1)^{\circ}\text{C}$)自由游泳 2 min,适应环境。每天训练 4 次,共训练 5 d。选取水迷宫其中 1 个象限放置平台,将经过环境适应的小鼠小心放入水池。记录 4 次小鼠 2 min 内寻找到平台的时间(逃避潜伏期),计算平均值。(2)空间探索实验:上述实验完成后将平台撤除,并将小鼠从某一象限小心放入水中,记录小鼠 2 min 内的跨平台次数。

1.3.3 Golgi 染色观察海马 CA1 区锥体细胞树突结构

每组随机选取 8 只小鼠,用 2%戊巴比妥麻醉,剂量为 10 mL/kg。固定小鼠,开胸后暴露心脏,剪开左心室,插入灌注针至升主动脉,血管夹固定主动脉处。灌注无菌生理盐水,待右心耳肿大后剪破,观察到肝肺变白,右心耳流出液澄清后,灌注 4%多聚甲醛。待全身僵硬后取脑。每组中随机选 4 只进行 Golgi 染色。Golgi 染色:取完整脑组织于

Golgi-Cox 中,避光放置 2 周。经过海马区冠状面以厚度为 100 μm 作连续切片。无菌蒸馏水漂洗,浸泡于 Golgi-Cox 溶液,去离子水漂洗。梯度乙醇脱水,二甲苯透化,中性树胶封片。光学显微镜下观察小鼠海马 CA1 区的 Golgi 染色,锥体细胞选择的标准为:锥体细胞位于 CA1 区内;细胞的形清晰,胞体及分支的染色均一致;第三分支完整。应用 Image J 软件(Neuron J 分析插件)量化树突数量和长度,用 Sholl 进行树突复杂性分析。以神经元胞体为中心,做间距为 40 μm 的同心圆,分析树突和同心圆的交点数,以反映树突分支数量。

1.3.4 免疫组织化学染色法检测海马 CA1 区 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 Tau 蛋白表达

每组随机选 4 只小鼠用于免疫组织化学染色。取脑后放置于 4%多聚甲醛中固定,再放入 30%蔗糖中沉淀脱水。应用冰冻包埋剂将脑组织包埋,行冠状面连续切片,厚度为 15 μm 。每只小鼠取 4 张切片进行免疫组织化学染色。步骤如下:首选灭火内源性过氧化物酶,随后 0.01% PBS 冲洗 3 次,再进行微波抗原修复。用 10%山羊血清孵育 1 h,随后吸除羊血清,加入 $\text{A}\beta_{1-40}$ 抗体或 Tau 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内孵育过夜,滴加生物素标记的二抗,再次孵育 30 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白工作液,最后用二氨基联苯胺(DAB)显色 15 min,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。显微镜下观察,选取海马 CA1 区 10 个高倍镜视野,对阳性表达区(染色为棕黄色)进行图像分析,测定光密度值。

1.3.5 Western blot 检测海马 CA1 区 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平

选取 4 只小鼠,取海马 CA1 区检测蛋白。用 RAPI 裂解液提取组织总蛋白,用 BCA 试剂盒检测 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白浓度,电泳,分离蛋白,转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入抗 BDNF(1:500)、抗 SYN(1:200)或抗 MAP2(1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后加入二抗(羊抗兔,1:500),封闭 1 h。以 GAPDH 作为内参,用 ECL 发光仪对蛋白成像,灰度值用 Image J 软件分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 软件,计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,采用 LSD-*t* 检验比较组内的差异,单因素方差分析比较多组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 三组小鼠认知功能比较

三组小鼠的逃避潜伏期和跨平台次数的差异有统计学意义(F 值分别为 26.002 和 18.734, $P < 0.001$)。与对照组比较,模型组水迷宫训练第 5 天时逃避潜伏期较高,而跨平台次数较低($P < 0.001$)。与模型组比较,针刺组水迷宫训练第 5 天时逃避潜伏期较低,而跨平台次数较高(P 值分别为 0.009 和 0.001),见图 1。

2.2 三组海马 CA1 区树突结构比较

Golgi 染色显示,对照组小鼠海马 CA1 区椎体细胞形态良好,模型组小鼠椎体细胞受损,而 8 周的针刺治疗可以改善 SAMP8 小鼠椎体细胞损伤(图 2A)。三组小鼠的基底树突长度、顶端树突长度、基底树突分数数目和顶端树突分支数目的比较均有统计学意义(F 值分别为 18.001、21.561 和 9.089, $P < 0.01$)。与对照组比较,模型组基底树突长度、顶端树突长度、基底树突分数数目和顶端树突分支数目均较低(P 值分别为 0.013、0.009、0.037 和 0.010)。与模型组比较,针刺组上述指标均较高(P 值分别为 0.022、0.016、0.013、0.032),见图 2B。Sholl 分析中,同心圆半径为 40 μm 、80 μm 、120 μm 、160 μm 时,模型组交点数明显低于对照组,而针刺组明显高于模型组($P < 0.05$),见图 2C。

2.3 三组海马 CA1 区 $\text{A}\beta_{1-40}$ 表达水平比较

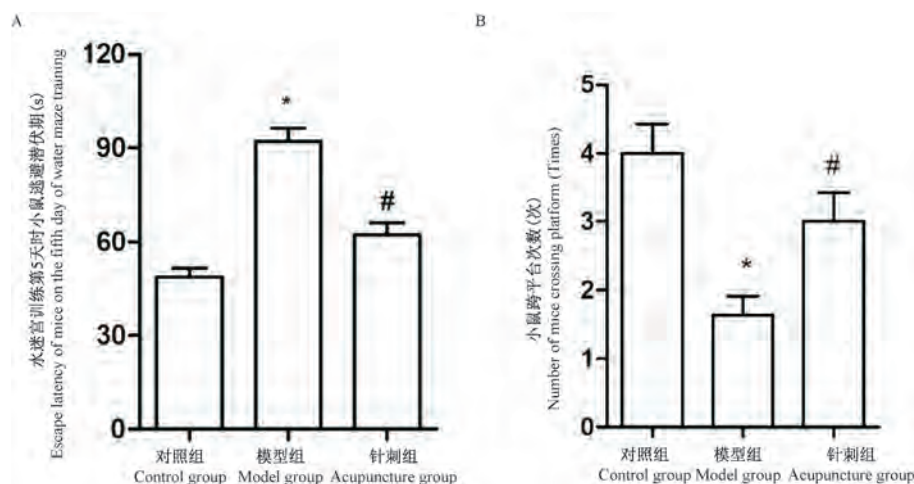
$\text{A}\beta_{1-40}$ 和 Tau 阳性细胞均为胞浆内呈现棕黄色沉淀物。三组小鼠海马 CA1 区 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 Tau 表达的平均光密度值的比较有统计学意义(F 值分别为 10.890 和 7.562, P 均 < 0.01)。与对照组比较,模型组 $\text{A}\beta_{1-40}$ 和 Tau 表达的平均光密度值较高(P 均 < 0.001)。与模型组比较,针刺组上述指标较低(P 均 < 0.05),见图 3。

2.4 Western blot 检测海马 CA1 区 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平

三组海马 CA1 区 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平的比较均有统计学差异(F 值分别为 8.098、5.443 和 10.023, P 均 < 0.05)。与对照组比较,模型组 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平均较低(P 值分别为 0.001、0.008 和 0.003)。与模型组比较,针刺组 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平均较高(P 值分别为 0.011、0.019 和 0.007),见图 4。

3 讨论

AD 严重影响了老年人的生存质量,给家庭和社会带来了沉重负担。从中医角度讲,AD 的发生与肾虚有关,肾气推动运化无力,在脑内形成痰淤。AD 病变部位在大脑,但是病机为本虚标实,肾虚精亏^[5]。《医学心悟》中也提到:“肾主智,肾虚则智不足”^[10]。本研究基于“肾脑相济”理论,针刺快速老

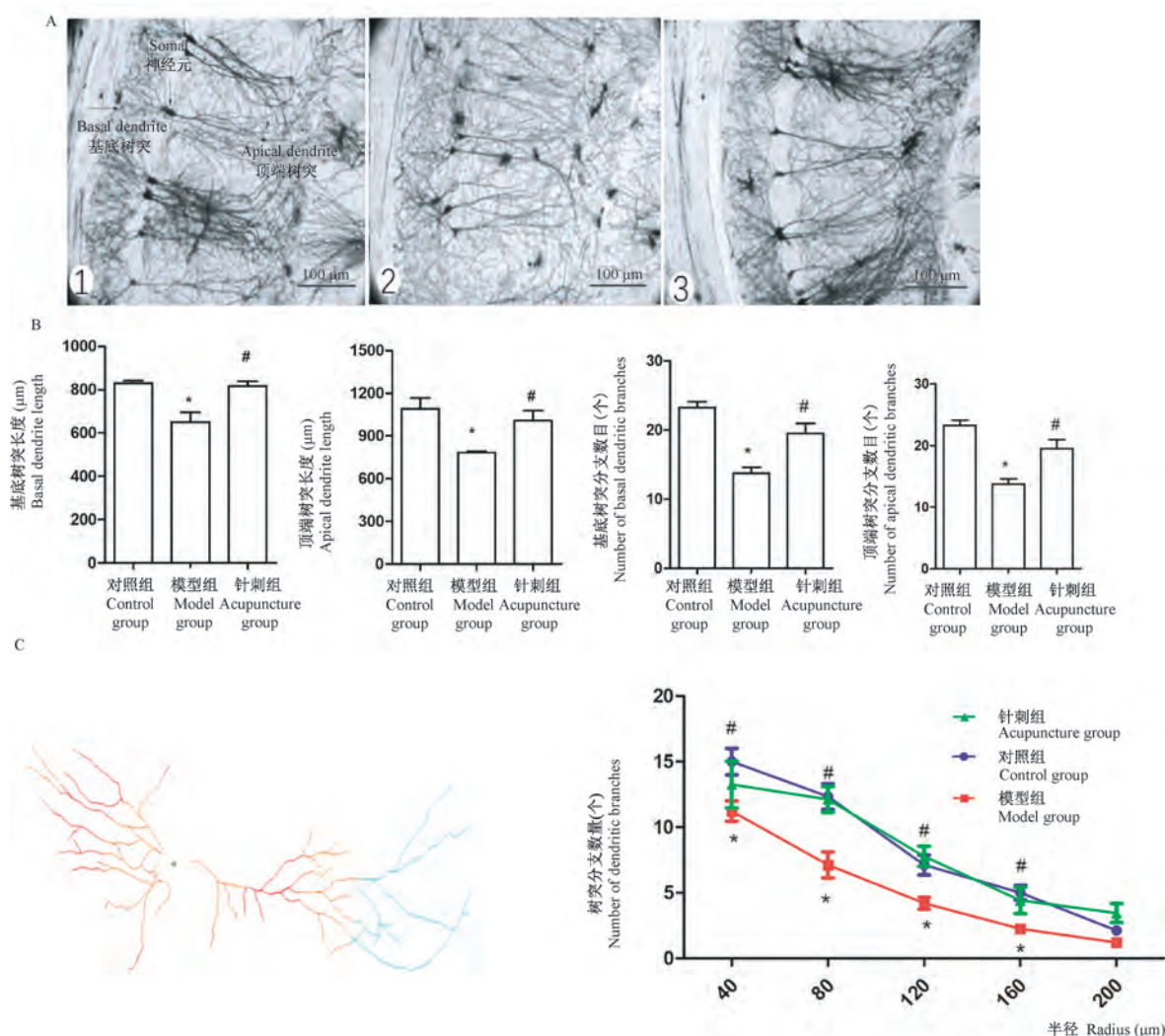


注:A:各组水迷宫训练第5天时小鼠逃避潜伏期时间比较;B:各组小鼠跨平台次数比较。与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。下同。

图1 Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆功能($n = 12$)

Note. A, Escape latency of mice in each group was compared on the fifth day of water maze training. B, Comparison of cross platform times of mice in each group. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. The same as below.

Figure 1 Morris water maze test to detect learning and memory function in mice



注:A:Golgi 染色观察海马 CA1 区椎体神经元形态,①:对照组;②:模型组;③:针刺组。B:Image J 软件(Neuron J 分析插件)分析树突数量和长度;C:树突分支数的 Sholl 分析。

图 2 三组海马 CA1 区树突结构比较($n=4$)

Note. A, Golgi staining to observe the morphology of vertebral neurons in hippocampal CA1 area, ①, Control group. ②, Model group. ③, Acupuncture group. B, Image J software (Neuron J analysis plug-in) analyzes the number and length of dendrites. C, Sholl analysis of dendritic branches.

Figure 2 Comparison of the dendritic structure of the hippocampal CA1 area of the three groups

化 SAMP8 小鼠的百会、肾俞和太溪穴进行治疗。百会穴属于膀胱经,是调节大脑功能的重要穴位^[11];肾俞穴属足太阳膀胱经穴,对腰膝酸软、肾虚精亏的治疗有较好的疗效^[12];太溪穴主治肾病,具有滋阴益肾和清热生气之效^[13]。本研究中,治疗 8 周后 SAMP8 小鼠认知功能和海马 CA1 区的 $A\beta_{1-40}$ 和 Tau 蛋白表达水平均明显改善,提示针刺治疗 AD 有效。研究结果与王旭等^[5]报道类似。

针刺治疗痴呆的机制目前未完全明确,可能与改善脑内多巴胺水平、增加抗氧化能力、降低炎症损伤、抑制神经元凋亡和促进脑血管新生等有

关^[14-15]。本研究从突触可塑性角度对针刺治疗 AD 的机制进行探讨。树突的形态对神经元的生理功能起到了决定性的作用,可通过调节神经元的信号输入及对信息的处理速度和能力,进而影响突触后的输出。既往研究证实,树突在学习记忆的形成中发挥重要作用^[16]。海马 CA1 区椎体细胞损伤与神经认知功能障碍密切相关^[8]。本研究用 Golgi 染色观察了海马 CA1 区椎体细胞树突结构的变化,结果显示 SAMP8 小鼠椎体细胞基底树突长度、顶端树突长度、基底树突分数数目和顶端树突分支数目发生异常变化,这与 Wang 等^[17]报道一致。另外,

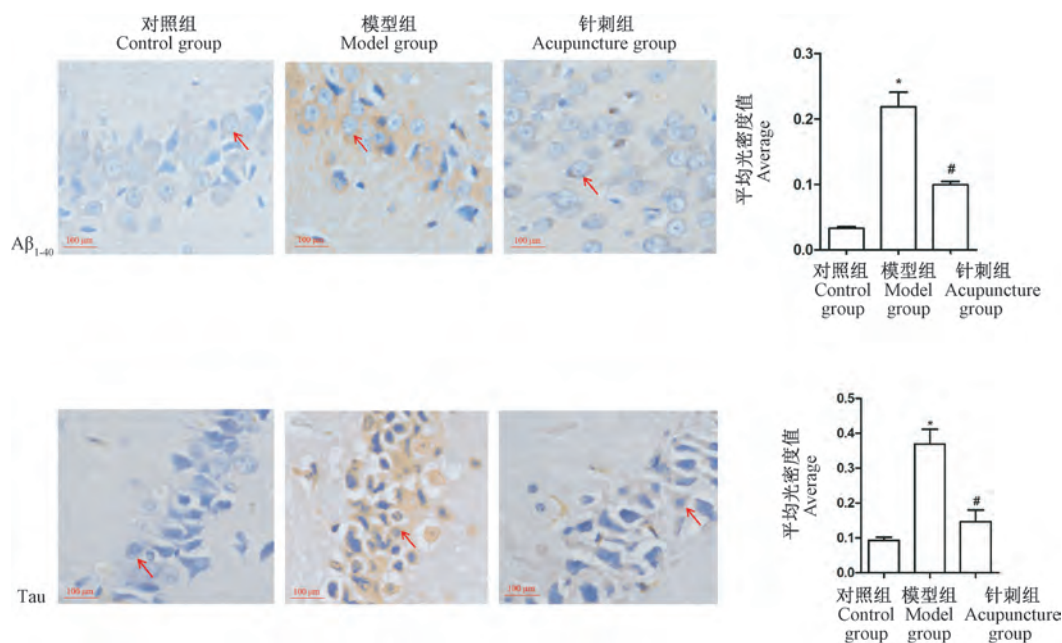


图3 免疫组织化学染色法检测海马 CA1 区 Aβ₁₋₄₀ 和 Tau 表达 (n=4)

Figure 3 Immunohistochemical staining method to detect the expression of Aβ₁₋₄₀ and Tau in hippocampal CA1 area

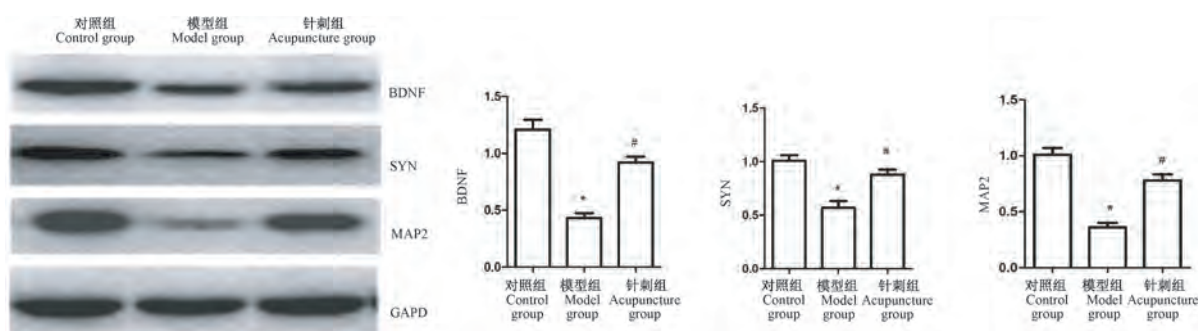


图4 Western blot 检测海马 CA1 区 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平 (n=4)

Figure 4 Western blot detection of BDNF, SYN and MAP2 protein expression levels in hippocampal CA1 area

Sholl 分析结果也显示, SAMP8 小鼠的树突分支明显变少。本研究中, SAMP8 小鼠接受针刺 8 周治疗后, 椎体细胞基底树突长度、顶端树突长度、基底树突分数数目和顶端树突分支数目明显增高。提示针刺能够改善海马 CA1 区树突结构实现的。

为了验证针刺对神经可塑性的影响, 我们检测了海马 CA1 区 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平。BDNF 是学习和记忆所必须的物质, 能够增强突触后致密物上 N-甲基-D 天冬氨酸受体 1 和 2B 的磷酸化, 促进长时程抑制的产生; 另外, BDNF 可以调控树突和轴突的生长, 影响突触可塑性^[18]。SYN 参与突触囊泡形成和胞吐, 通过调节神经递质的释放, 影响突触形成和发育^[19]。MAP2 是重要的细胞骨架, 存在于神经元胞体和树突中, 是许多蛋白激

酶的底物, 如细胞外调节蛋白激酶和 cAMP 依赖蛋白激酶等。MAP2 与突触可塑性及认知功能密切相关^[20]。既往有研究发现, BDNF/SYN/MAP2 信号通路与神经可塑性及认知功能密切相关^[21]。本研究显示, 针刺 8 周后 SAMP8 小鼠海马 CA1 区 BDNF、SYN 和 MAP2 蛋白表达水平明显下降。提示针刺可能是通过 BDNF/SYN/MAP2 信号通路影响海马树突结构。

综上所述, 本研究发现, 基于“肾脑相济”理论, 针刺百会、肾俞和太溪穴可能通过激活 BDNF/SYN/MAP2 信号通路, 改善海马 CA1 区树突长度和分支数目, 从而下改善快速老化 SAMP8 小鼠的认知功能。本研究为针刺治疗 AD 提供了一定的理论基础, 未来需要更深入地进行机制学研究。

参考文献:

- [1] Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's disease: past, present, and future [J]. J Int Neuropsychol Soc, 2017, 23 (9-10): 818-831.
- [2] Jayedi A, Rashidy-Pour A, Shab-Bidar S. Vitamin D status and risk of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis of dose-response [J]. Nutr Neurosci, 2019, 22(11): 750-759.
- [3] Song YY, Xu WT, Zhang XC, et al. Mechanisms of electroacupuncture on Alzheimer's disease: a review of animal studies [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(6): 473-480.
- [4] Li X, Zhao J, Li Z, et al. Applications of Acupuncture therapy in modulating the plasticity of neurodegenerative disease and depression: do microRNA and neurotrophin BDNF shed light on the underlying mechanism? [J]. Neural Plast, 2020, 2020: 8850653.
- [5] 王旭, 王玥, 于嵩, 等. 基于“肾脑相济”理论的电针疗法对痴呆小鼠脑内 β -淀粉样蛋白及中性内肽酶表达的影响 [J]. 针刺研究, 2018, 43(1): 20-23.
- [6] Cochran JN, Hall AM, Roberson ED. The dendritic hypothesis for Alzheimer's disease pathophysiology [J]. Brain Res Bull, 2014, 103: 18-28.
- [7] Pedrazzoli M, Losurdo M, Paolone G, et al. Glucocorticoid receptors modulate dendritic spine plasticity and microglia activity in an animal model of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2019, 132: 104568.
- [8] Counts SE, Alldred MJ, Che S, et al. Synaptic gene dysregulation within hippocampal CA1 pyramidal neurons in mild cognitive impairment [J]. Neuropharmacology, 2014, 79: 172-179.
- [9] Park MH, Lee M, Nam G, et al. N, N'-Diacetyl-p-phenylenediamine restores microglial phagocytosis and improves cognitive defects in Alzheimer's disease transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(47): 23426-23436.
- [10] 张可, 任路, 李丹, 等. 老年性痴呆病因病机从肾论 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 719-721.
- [11] 丁婷婷, 贾孟辉, 侯荔枝, 等. 发旋和百会穴关系探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 918-920.
- [12] 高珊, 李瑞, 田环环. 肾俞穴的研究进展 [J]. 中国针灸, 2017, 37(8): 845-850.
- [13] 孙忠广, 张剑, 邹军. 刺激太溪穴的功能性核磁共振成像研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(2): 437-439.
- [14] Kwon CY, Lee B, Suh HW, et al. Efficacy and safety of auricular acupuncture for cognitive impairment and dementia: a systematic review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 3426078.
- [15] Harris ML, Titler MG, Struble LM. Acupuncture and acupressure for dementia behavioral and psychological symptoms: a scoping review [J]. West J Nurs Res, 2020, 42(10): 867-880.
- [16] Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, et al. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition [J]. Trends Neurosci, 2010, 33(3): 121-129.
- [17] Wang S, Yu L, Yang H, et al. Oridonin attenuates synaptic loss and cognitive deficits in an A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151397.
- [18] Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and hippocampal synaptic plasticity [J]. Vitam Horm, 2017, 104: 153-195.
- [19] Harper CB, Mancini GMS, van Slegtenhorst M, et al. Altered synaptobrevin-II trafficking in neurons expressing a synaptophysin mutation associated with a severe neurodevelopmental disorder [J]. Neurobiol Dis, 2017, 108: 298-306.
- [20] Bodakuntla S, Jijumon AS, Villablanca C, et al. Microtubule-associated proteins: structuring the cytoskeleton [J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(10): 804-819.
- [21] 林阳阳, 徐洋凡, 冯慧婷, 等. 功能性电刺激对血管性痴呆大鼠认知功能和海马区脑源性神经营养因子-突触素-微管相关蛋白 2 通路的影响 [J]. 中华物理医学与康复医学杂志, 2020, 42(8): 679-684.

[收稿日期] 2020-11-04

张英琦,焦谊,于天源,等. 两种兔发热模型体温变化特点初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 16-21.

Zhang YQ, Jiao Y, Yu TY, et al. Preliminary study of the characteristics of body temperature changes in two rabbit fever models [J].

Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 16-21.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.003

两种兔发热模型体温变化特点初探

张英琦¹, 焦 谊¹, 于天源^{1*}, 刘志凤¹, 刘 迪^{1,2}, 王厚融¹, 徐亚静¹, 官 乾¹

(1.北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029; 2.北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

【摘要】 目的 研究比较不同浓度干酵母、脂多糖注射诱导兔发热模型的体温变化特点,为基础实验提供参考。**方法** 将30只2月龄新西兰雄兔随机分为5组,分别为正常组、20%干酵母组、10%干酵母组、0.5 μg/mL脂多糖组、0.2 μg/mL脂多糖组,每组各6只。干酵母组于造模前及造模后每1 h监测肛温至26 h、脂多糖组于造模前及造模后每20 min监测肛温至造模后6 h,记录体温与其他症状、体征的变化特点,绘制平均体温曲线,计算各时间点体温变化,比较各组体温变化趋势。**结果** 皮下注射干酵母悬浊液,注射后2 h内体温下降,低于基础体温。2~4 h体温开始上升,6~8 h达峰值,高温可持续至少20 h,且随注射浓度的增加,升温值增大,峰值出现的时间延后。耳缘静脉注射脂多糖,40 min开始发热,体温曲线为双相热或三相热,致热后60~80 min达体温曲线第一峰,发热可持续至致热后240~300 min,且升温值与脂多糖注射剂量无明显关系,随注射剂量增大发热时程增长。**结论** 干酵母和脂多糖是诱导兔发热的可靠模型,干酵母模型为长时、高热发热模型,脂多糖模型发热时程较短。应根据实验需要选择合适的致热模型。

【关键词】 发热;动物模型;兔;体温

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0016-06

Preliminary study of the characteristics of body temperature changes in two rabbit fever models

ZHANG Yingqi¹, JIAO Yi¹, YU Tianyuan^{1*}, LIU Zhifeng¹, LIU Di^{1,2}, WANG Hourong¹, XU Yajing¹, GUAN Qian¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

2. Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

【Abstract】 Objective To provide a reference for basic experiments by studying and comparing the characteristics of body temperature changes in rabbit fever models induced by injection of various concentrations of dry yeast and lipopolysaccharide. **Methods** Thirty 2-month-old male New Zealand rabbits were randomly divided into five groups: a normal group, two groups injected with 10% or 20% dry yeast suspension, and two groups injected with 0.2 or 0.5 μg/mL lipopolysaccharide solution with six rabbits in each group. The anal temperature of dry yeast groups was monitored every hour for 26 h before and after modeling, and that of lipopolysaccharide groups was monitored every 20 min for 6 h before and after modeling. The changes in body temperature and other symptoms were recorded, an average body temperature curve was drawn, changes in body temperature at each time point were calculated, and the trends of the body temperature change in each group were compared. **Results** Two hours after the dry yeast suspension was injected subcutaneously, body

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81873392);北京市自然科学基金(7192113)。

【作者简介】 张英琦(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:小儿推拿退热机制。E-mail: zhangyingqi0305@163.com

【通信作者】 于天源(1965—),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:推拿治疗周围神经损伤的机理、小儿推拿退热机制。

E-mail: yutianyuan@sina.com

temperature decreased to lower than the basal body temperature. However, body temperature began to rise in 2~4 h, reached its peak in 6~8 h, then leveled off for at least 20 h. With the increase in concentration, the temperature rise was increased and the peak occurred later. Lipopolysaccharide was injected intravenously at the ear margin and fever began in 40 min. The body temperature curve showed biphasic or triphasic heat and reached the first peak in 60~80 min and then leveled off for 240~300 min. The temperature rise had no obvious relationship with the injection dose of lipopolysaccharide, but the fever duration was increased with the increase in dose. **Conclusions** Dry yeast and lipopolysaccharide are reliable agents to induce fever in rabbits. The dry yeast model is a long-term high fever model, while the lipopolysaccharide model has a short fever time. The appropriate model to induce fever should be selected in accordance with the experimental requirements.

【Keywords】 fever; animal model; rabbit; body temperature

发热是多种疾病常见的共有临床表现^[1], 大多发热性疾病患者的体温变化往往反映病情变化和病变的特点。近年来各种发热模型的建立为研究解热药物、发热退热机理的研究提供了重要的依据。兔温度恒定, 对致热物质反应敏感, 发热曲线典型, 常用于发热的实验研究^[2]。干酵母 (dry yeast) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 致热模型是目前常用的实验用发热模型。不同文献报道中发热模型的选择、使用剂量、体温变化等不同, 通过参考文献常难以决定进行实验或预实验的选择。为深入研究常用的兔发热模型的体温变化特点, 本实验对新西兰幼兔, 干酵母和脂多糖模型的发热过程和特点进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2 月龄清洁级新西兰雄兔 30 只, 体重 (2 ± 0.5) kg, 体温 (39 ± 0.5) °C, 购于北京隆安实验动物养殖中心 [SCXK (京) 2019-0006]。饲养于北京中医药大学实验动物中心 [SYXK (京) 2020-0033], 单笼饲养, 饲料由北京中医药大学实验动物中心提供。本实验经过北京中医药大学 IACUC 的批准 (BUCM-4-2020083102-3013), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (Sigma 公司, 型号 055: B5 L2880-25 mg); 高活性干酵母 (安琪酵母股份有限公司); 生理盐水 (石家庄四药有限公司); 信息化生物信号采集与处理系统 (成都泰盟科技有限公司 BL-420N); 温度探头 (成都泰盟科技有限公司 CW100); 电子天平 (美国双杰 (兄弟) 集团有限公司 TCA 6 kg/1 g)

1.3 实验方法

1.3.1 干酵母混悬液的配制

精密称取干酵母 20 g、10 g, 逐渐加入常温生理

盐水研磨为均匀的悬浆, 最后定容为 100 mL (20%、10%), 此溶液需在临用前配置。

1.3.2 脂多糖溶液的配制

精密称取脂多糖 1 mg, 加 50 mL 常温生理盐水, 充分振荡溶解, 使其浓度为 20 µg/mL, 作为对照品贮备液。再取适量原液稀释至 0.5 µg/mL、0.2 µg/mL, 置于 4°C 冰箱中保存备用。

1.3.3 动物适应性饲养

兔购入后置于室温 20°C ~ 25°C, 相对湿度为 40% ~ 60% 的饲养室内, 饲养 3 d 后用于实验。实验室的温度控制在 (25 ± 1) °C, 相对湿度为 40% ~ 60%。兔全部采取颈部固定, 于实验前 3 d, 每日定时固定, 使其提前适应实验室环境及实验操作。

1.3.4 动物基础体温测定

在固定至兔体温稳定时, 将 BL-420 温度探头蘸取少许石蜡油, 插入肛门内 5 cm 左右 (在离探头 5 cm 处用黑色记号笔标记, 确保每次插入深度一致) 待稳定后记录。测量兔的体温 3 次, 取其平均值作为正常基础体温。实验当日待体温稳定后, 测量兔的体温 3 次, 4 d 体温平均值作为基础体温, 选取基础体温在 38.5°C ~ 39.5°C、波动在 0.5°C 以内者纳入实验。

1.3.5 分组

筛选合格的 30 只新西兰雄兔, 按基础体温, 采用随机数字表法随机分为 5 组。正常组、20% 干酵母组、10% 干酵母组、0.5 µg/kg 脂多糖组、0.2 µg/kg 脂多糖组, 每组各 6 只。

1.3.6 模型的建立

脂多糖 (LPS) 组: 耳缘静脉注射 0.5 µg/mL、0.2 µg/mL 的 LPS 溶液 1 mL/kg。干酵母组: 背部皮下注射 20%、10% 干酵母混悬液 5 mL/kg。

1.3.7 体温监测

20% 干酵母组、10% 干酵母组于注射后每 1 h 测量体温一次至造模后 9 h、24 h、25 h、26 h 再各监测

一次体温。0.5 $\mu\text{g/kg}$ 脂多糖组、0.2 $\mu\text{g/kg}$ 脂多糖组于注射后每 20 min 测量体温一次至体温恢复正常或 6 h。计算各模型各时间点平均体温值,绘制平均体温反应曲线;计算每组各时间点升温值 ΔT (ΔT =各时间点监测体温-基础体温);比较不同模型的发热过程和特点及体征变化。

1.4 统计学方法

实验中得到的数据使用 SPSS 统计软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析,所有数据使用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 各模型体征变化

干酵母组注射部位在颈后约平 2 胸椎处,此处皮肤松弛,便于皮下注射,注射后局部出现硬结、肿胀。注射时可见动物明显的烦躁现象,如强烈挣扎。体温降低阶段,精神不佳。见表 1,随体温升高,精神逐渐萎靡,心率加快,呼吸明显加快、变浅,可闻及粗大喘息声,头面、耳廓明显发烫,耳部血管充盈,大便质稀,20%干酵母组可见夹杂白色黏液分泌物,10%干酵母组偶可见肛门少量白色粘液分泌物。0.5 $\mu\text{g/kg}$ LPS 组,注射后出现精神不振,随体温的升高,出现呼吸、心率加快、粗大喘息声、流白色浊涕、大便不成形等症状。0.2 $\mu\text{g/kg}$ 发热过程中腹泻症状较轻,偶可见少量清稀白涕。各组动物随着体温逐渐恢复正常,精神状态渐好,呼吸、心率正常,饮水增加,无二次发热现象。

2.2 不同浓度干酵母发热模型体温变化

于 2 个实验组兔子背部同一位置皮下分别注射 20%、10%干酵母悬浊液,记录每只、各时间点体温值,将同一时间点各个样本取平均值作平均体温反应曲线,如图 1 所示。皮下注射干酵母后,体温先下降,20%、10%干酵母组最大降温均出现在注射后 1 h,后体温逐渐上升,约 2 h 升温至基础体温。2~4 h 开始大幅升温,4 h 后升势稍减弱,直至上升至最高峰,微下降后可维持高温至 26 h。通过对干酵母各时间点升温值分析,如表 2 所示,20%干酵母组最大升温值出现在注射后 8 h,10%干酵母组最大升温值出现在注射后 6 h,且 20%组最大升温值明显高于 10%干酵母组。直至注射后 26 h,20%干酵母组仍维持在约 2℃升温值,10%干酵母组维持在约 1℃升温值。

2.3 不同剂量 LPS 发热模型体温变化

在 2 个实验组兔子耳缘静脉分别注射 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 、0.2 $\mu\text{g/kg}$ LPS,记录造模过程中每只兔每 20 min 体温值,将同一时间点各个样本取平均值,做体温反应曲线,如图 2 所示;对每 20 min 各组升温值比较,如表 3 所示。发热可持续约 300 min。耳缘静脉注射 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 呈明显三相热曲线,最高温出现在体温曲线第二峰,注射后 180 min。耳缘静脉注射 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 呈双相热曲线,最高温出现在体温曲线第一峰,注射后 80 min。以体温较基础体温上升 0.6℃以上判定为发热^[3],0.5 $\mu\text{g/kg}$ 组发热可持续约 300 min,0.2 $\mu\text{g/kg}$ 组可持续约 240 min。

表 1 发热状态下各模型体征变化

Table 1 Changes of physical signs of each model under fever state

组别 Groups	剂量 Dose	心率 Heart rate	喘息声 Gasp	流涕 Snot	大便 Faeces
20%干酵母 20% dry yeast	5 mL/kg	明显加快 Significantly accelerated	粗大 Loud	未见 None seen	质稀,伴白色黏液 Thin, with white mucus
10%干酵母 10% dry yeast	5 mL/kg	加快 Accelerated	明显 Strong	未见 None seen	质稀,偶见白色黏液 Dilute, occasionally with white mucus
脂多糖 LPS	0.5 $\mu\text{g/kg}$	加快 Accelerated	粗大 Loud	白色浊涕 Turbid white snot	质稍稀 Slightly dilute
脂多糖 LPS	0.2 $\mu\text{g/kg}$	加快 Accelerated	微弱 Weak	偶见清稀白涕 Clear dilute white	质稍稀 Slightly dilute

表 2 不同浓度兔干酵母模型各时间点升温值比较

Table 2 Comparison of temperature rise values of rabbit dry yeast models with different concentrations at each time point

组别 Groups	基础体温(℃) Basal body temperature	体温变化值 ΔT (℃) Temperature change value ΔT								
		4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	24 h	25 h	26 h
20%	39.10 $\pm$ 0.13	1.06 $\pm$ 0.50	1.24 $\pm$ 0.46	1.68 $\pm$ 0.53	1.88 $\pm$ 0.21	2.24 $\pm$ 0.29	1.91 $\pm$ 0.36	1.80 $\pm$ 0.49	1.95 $\pm$ 0.45	1.95 $\pm$ 0.38
10%	39.31 $\pm$ 0.16	1.03 $\pm$ 0.59	1.38 $\pm$ 0.58	1.74 $\pm$ 0.45	1.54 $\pm$ 0.14	1.49 $\pm$ 0.49	1.22 $\pm$ 0.50	1.12 $\pm$ 0.56	1.10 $\pm$ 0.55	0.98 $\pm$ 0.70

表 3 LPS 不同注射剂量升温值比较

Table 3 Comparison of temperature rise values in rabbit LPS model with different doses

监测时间 Detection time	体温变化值 $\Delta T(^{\circ}\text{C})$ Temperature change value ΔT	
	0.5 $\mu\text{g/kg}$ LPS	0.2 $\mu\text{g/kg}$ LPS
0 min	39.35 $\pm$ 0.13	39.21 $\pm$ 0.28
20 min	0.60 $\pm$ 0.48	0.33 $\pm$ 0.23
40 min	0.79 $\pm$ 0.50	0.72 $\pm$ 0.19
60 min	1.04 $\pm$ 0.52	0.53 $\pm$ 0.43
80 min	0.74 $\pm$ 0.31	1.07 $\pm$ 0.27
100 min	0.86 $\pm$ 0.55	0.91 $\pm$ 0.27
120 min	1.12 $\pm$ 0.39	0.96 $\pm$ 0.34
140 min	1.26 $\pm$ 0.68	0.29 $\pm$ 0.81
160 min	1.26 $\pm$ 0.29	0.44 $\pm$ 0.70
180 min	1.43 $\pm$ 0.43	0.22 $\pm$ 0.48
200 min	1.20 $\pm$ 0.42	0.75 $\pm$ 0.52
220 min	1.11 $\pm$ 0.49	0.72 $\pm$ 0.46
240 min	1.04 $\pm$ 0.52	0.51 $\pm$ 0.32
260 min	0.79 $\pm$ 0.39	0.18 $\pm$ 0.39
280 min	0.56 $\pm$ 0.37	-0.12 $\pm$ 0.41
300 min	1.12 $\pm$ 0.39	0.56 $\pm$ 0.34
320 min	0.44 $\pm$ 0.69	0.21 $\pm$ 0.39

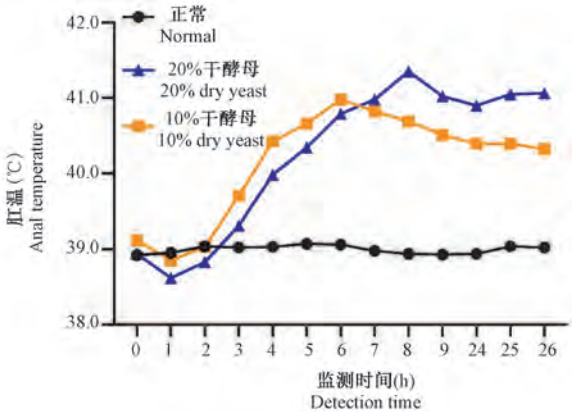


图 1 兔干酵母致热模型平均体温曲线

Figure 1 Mean body temperature curve of rabbit dry yeast fever model

2.4 各模型发热过程特点

如表 4 所示,干酵母模型在注射后会出现体温下降,注射 LPS 组无此现象。不同浓度干酵母所引起的最大降温值无明显差异。从发热潜伏期看,干酵母组发热过程缓慢,需要约 4 h,且发热潜伏期与浓度无明显关系。高浓度较低浓度发热潜伏期更短。LPS 组是快速发热模型,低剂量组较高剂量组发热潜伏期稍短。最大变化值(最高温与最低温差值),干酵母组变化较大,达 2 $^{\circ}\text{C}$ 以上,且变化值随浓度增大而升高。LPS 组变化值低于干酵母组,且变化值与剂量无明显关系。干酵母组出现峰值的时间较晚,在造模注射后 6~8 h, LPS 组在 2~3 h。发热时程较长的是干酵母模型, LPS 模型能维持 3~5 h,且剂量越大,发热时程越长。

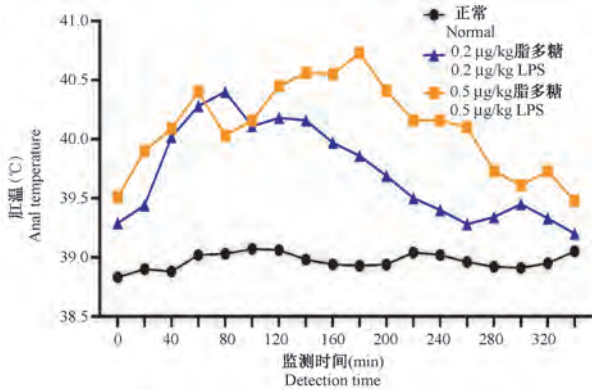


图 2 兔 LPS 致热模型平均体温曲线

Figure 2 Mean body temperature curve of rabbit LPS-induced fever model

表 4 兔发热模型体温变化趋势

Table 4 Change trend of body temperature in rabbit fever model

组别 Groups	剂量 Dose	最大降温值($^{\circ}\text{C}$) Maximum cooling value	发热潜伏期 Fever latency	最大变化值($^{\circ}\text{C}$) Maximum change value	出现峰值时间 Peak time	发热时程 Fever time-histories
20% 干酵母 20% dry yeast	5 mL/kg	0.56 $\pm$ 0.22	3.83 $\pm$ 0.75 h	2.88 $\pm$ 0.28 [#]	8.2 $\pm$ 0.84 h [#]	>20 h
10% 干酵母 10% dry yeast	5 mL/kg	0.56 $\pm$ 0.26	4.00 $\pm$ 1.26 h	2.00 $\pm$ 0.52	6.33 $\pm$ 1.21 h	>20 h
脂多糖 LPS	0.5 $\mu\text{g/kg}$	—	36.67 $\pm$ 19.66 min	1.62 $\pm$ 0.24	160.00 $\pm$ 53.67 min	246.67 $\pm$ 41.31 min [*]
脂多糖 LPS	0.2 $\mu\text{g/kg}$	—	36.67 $\pm$ 8.16 min	1.41 $\pm$ 0.20	126.67 $\pm$ 73.40 min	190.00 $\pm$ 41.47 min

注:与 10% 干酵母组比较, [#] $P<0.05$;与 0.2 $\mu\text{g/kg}$ LPS 组比较, ^{*} $P<0.05$ 。

Note. Compared to 10% dry yeast group, [#] $P<0.05$. Compared to 0.2 $\mu\text{g/kg}$ LPS group, ^{*} $P<0.05$.

3 讨论

干酵母发热是由全菌体及菌体内所含的荚膜多糖和蛋白质所致的^[4],是注射部位的局部溃烂引发的剧烈炎症反应^[5],是长程热病证候模型的代表试剂^[6]。实验结果显示:干酵母模型会使动物出现短时间降温,与文献记载一致。王菊英等^[7]研究证实通过体外 34℃ 短时间孵育,可使酵母菌迅速活化,减少皮下注射对动物的刺激,克服大鼠体温下降的现象。实验时可参考此法,或治疗、干预时间选择在体温下降期结束之后。降温结束后体温迅速升高,并能长时间维持在高温状态,注射 26 h 后仍能观察到注射局部有明显的炎症症状。两组体温变化趋势基本一致,降温幅度与干酵母浓度无明显关系,升温幅度与注射的干酵母浓度呈正相关,升温作用持久稳定,适用于作用缓慢而持久的清热药的解热作用观察。王筠默^[8]认为研究解热药需要较长时间高热模型时,采用较高浓度(7%)酵母较低浓度(4%)更为理想,有热度高、持续时间较长等优点,与本实验结果相同。在实验应用中,动物全身表现与临床伴内脏或皮肤有明显炎症的里热证类似^[9],可应用于药效较为显著的、对应中医里热证的解热药物研究,可根据模拟发热程度、药物作用强弱选用合适的干酵母浓度,故实验研究如药物对不同发热程度的影响宜选用此模型。

脂多糖为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,通过内毒素作用于免疫细胞产生内源性致热原,通过中枢介质作用于体温调节中枢引起发热^[10]。研究结果显示:随 LPS 注射剂量的增加,兔发热反应逐渐增强,发热持续时间延长。发热峰形也有变化,0.5 μg/kg 呈明显三相热,0.2 μg/kg 发热曲线虽有三个峰,但第三峰是体温正常范围内的波动,故归其为双相热。本研究发热曲线趋势与文献报道基本一致:LPS 发热模型呈现多相热,有 2~3 个高峰。浓度加大,发热峰值出现的时间出现延迟,发热的时间延长^[11]。杨果杰等^[12]经兔静脉注射 0.2 μg/kg LPS 出现典型的双峰发热反应,第二峰高于第一峰值。但本研究结果 0.2 μg/kg 组体温第一峰高于第二峰,初步判断是由动物品系和实验室环境因素所致,具体原因需进一步实验研究。卢芳等^[13]验证

脂多糖造模方法不具有明显的量效关系,随着剂量的加大,体温升高幅度没有增加,本研究结果与此一致。LPS 诱导的发热表现为双相热或三相热,并伴有精神萎靡和轻微腹泻等症状,与临床感染性炎症所致发热相似^[14],可用于筛选解热药物并探讨炎性发热机制。实验过程中偶尔出现不明原因死亡、不同组不同程度的腹泻、出血、皮下瘀斑等表现。预先注射小剂量后,机体能够抵抗大剂量 LPS 的毒性作用。与首次接触相比,再次受 LPS 攻击后死亡率、体温与代谢的变化等毒性反应的程度均显著降低。于征森等^[15]建议温病卫气分模型宜用单次静脉注射法,营血分或气血两燔证模型用间隔 24 h 的两次 LPS 注射法,长期发热的温病模型如留恋气分证或肝肾阴伤证可用多次注射法,内闭外脱证模型使用大剂量 LPS 注射。LPS 模型亦用于急性肺损伤^[16]、肝损伤^[17]、脓毒症^[18]等研究,大剂量注射易导致内脏损伤、休克甚至死亡。且剂量与致热力并非正比关系,应在达到模型目的的基础上尽量减少损害。实验时可以考虑多次注射减轻 LPS 毒性反应的影响。以上同种发热模型组间比较看出,同种致热原致热,出现发热的潜伏期与剂量无明显关系,但致热原的浓度越高,出现峰值的时间越迟,发热的时程越长。在实验研究中,选择发热模型应综合考虑干预手段和模型的特点。对于疗效和作用特点不明确的药物,建议选用致热时程长,发热稳定的干酵母模型,以确保能检测药物解热作用的全过程。

实验过程中发现,实验前的适应性固定和测温可减小实验中动物应激状态下情绪大幅波动对体温、呼吸的影响,减少意外死亡率。实验室内的温度和湿度也是影响动物模型体温的重要因素。杨果杰等^[12]建议动物在购入后应在室温 25℃,湿度 40%~60%的实验室内适应性固定 3 d,兔以颈部固定方法为宜。不同品种动物反应性不同。如鼠类对 LPS 天然抵抗,而兔、羊等动物则敏感。影响致热原敏感性的因素还包括:动物品系、年龄、麻醉差异等。因此进行合理的预实验,摸索实验条件对于建立稳定的模型十分重要。

参考文献:

- [1] Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever' -- a

- review [J]. J Infect Public Health, 2011, 4(3): 108-124.
- [2] 裴莹, 陈泽林, 金颖, 等. 刺络拔罐法对内毒素致热家兔的退热作用及机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1588-1592.
- [3] 徐剑钦, 潘永明, 陈诚, 等. 细菌内毒素致 WHBE 兔致热敏感性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(11): 13-17.
- [4] 叶红, 朱丽娜, 冯甲棣, 等. 丁香酚对酵母菌发热大鼠血浆及脑脊液中精氨酸加压素含量的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(3): 260-261, 264.
- [5] 李欣芮, 宋惠欣. 发热模型的研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(4): 77-79.
- [6] 黄志桓, 柳长凤, 刘树民, 等. 基于代谢组学技术的 2,4-二硝基苯酚和干酵母致热病证候模型的对比研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 61-65.
- [7] 王菊英, 马剑峰, 孙茹, 等. 面包干酵母致热病理模型的改良研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(1): 27-28.
- [8] 王筠默. 解热药研究中动物发热模型比较——介绍家兔酵母发热法 [J]. 中草药通讯, 1978, 8: 35-49.
- [9] 孙文鹏, 陈财德, 贾慧文, 等. 复制临床发热症状动物模型的研究进展 [J]. 中国中医急症, 2013, 22(10): 1755-1757.
- [10] 夏鸿, 丁文文. 四氢嘧啶类新衍生物(XD-7006)对脂多糖所致大鼠发热的解热作用 [J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 637-640.
- [11] 左泽平, 王志斌, 郭玉东, 等. 常用大鼠发热模型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(2): 52-57.
- [12] 杨果杰, 陈秀莲, 邵萍, 等. 内毒素法兔发热动物模型及其标准化的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2001, 4: 57-60.
- [13] 卢芳, 董培良, 陈平平, 等. 三种热病证候模型最佳造模方法的探索与评价 [J]. 山东中医杂志, 2009, 28(2): 114-116.
- [14] 唐晓峰, 薛漫清, 王晖. 大鼠发热模型及发热机制的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2009, 25(3): 327-331.
- [15] 于征森, 伍军军, 赵光峰, 等. 脂多糖注射法制作兔温病实验模型研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(2): 286-288.
- [16] 周垂杨, 杨明, 高仁贤. 苯甲酰芍药苷对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤保护作用及分子机制研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(9): 698-702, 708, 687.
- [17] 杨广越, 陶乐, 沈东晓, 等. 下瘀血汤调控中性粒细胞浸润抑制脂多糖诱导肝损伤机制 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(10): 87-92.
- [18] 章国军, 李健. 宣肺调肠方对脓毒症大鼠肠道损伤的修复作用及机制研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(3): 527-532.

[收稿日期]2020-12-04

陈莹, 邓炎尧. CircHIPK3 低表达调控 miR-124/STAT3 轴抑制 A β 诱导的海马神经元凋亡的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 22-29.

Chen Y, Deng YY. Low expression of circHIPK3 regulates the miR-124/STAT3 axis and inhibits A β -induced apoptosis of hippocampal neurons [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 22-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.004

CircHIPK3 低表达调控 miR-124/STAT3 轴抑制 A β 诱导的海马神经元凋亡的机制研究

陈莹¹, 邓炎尧^{2*}

(1. 长沙市第一医院 神经内科, 长沙 410005; 2. 长沙市第一医院 神经医学中心, 长沙 410005)

【摘要】 目的 探讨环状 RNA 同源域相互作用蛋白激酶 3 (circHIPK3) 低表达对 β -淀粉样蛋白 (A β) 诱导的海马神经元凋亡的影响。方法 采用生物信息学软件预测和双荧光素酶报告基因实验验证微小 RNA-124 (miR-124) 与 HIPK3、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 的靶向关系; 将体外培养的原代海马神经元分为对照组 (正常培养)、A β 组 (给予 A β 刺激)、A β +siSTAT3-NC 组 (转染 siSTAT3-NC 后给予 A β 刺激)、A β +siHIPK3 组 (转染 siHIPK3 后给予 A β 刺激)、A β +siHIPK3+antimiR-NC 组 (共转染 siHIPK3 和 inhibitor-NC 后给予 A β 刺激)、A β +siHIPK3+antimiR-124 组 (共转染 siHIPK3 和 miR-124 inhibitor 后给予 A β 刺激)、A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组 (共转染 siHIPK3, miR-124 inhibitor 和 siSTAT3-NC 后给予 A β 刺激) 和 A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 组 (共转染 siHIPK3, miR-124 inhibitor 和 siSTAT3 后给予 A β 刺激)。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 HIPK3 和 miR-124 表达水平, 免疫印迹法 (Western blot) 检测 STAT3 蛋白表达水平, 噻唑蓝 (MTT) 法和流式细胞仪分别检测海马神经元存活率和凋亡率, 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase-3) 活性检测试剂盒检测 Caspase-3 活性。结果 生物信息学软件预测、双荧光素酶报告基因实验证实 HIPK3 可与 miR-124 靶向结合; 生物信息学软件预测、双荧光素酶报告基因实验和 Western blot 实验证实, miR-124 可靶向调控 STAT3 蛋白表达。与对照组比较, A β 组海马神经元中 HIPK3 表达水平、STAT3 蛋白表达水平、凋亡率和 Caspase-3 活性明显升高, 而海马神经元存活率和 miR-124 表达水平明显降低 ($P<0.05$); 与 A β +siHIPK3-NC 组比较, A β +siHIPK3 组中上述各指标明显逆转 ($P<0.05$); 与 A β +siHIPK3+antimiR-NC 组比较, A β +siHIPK3+antimiR-124 组中各指标呈明显变化 ($P<0.05$), 且趋势与 A β +siHIPK3 组相反; 与 A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组比较, A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 组中各指标呈明显变化 ($P<0.05$), 且趋势与 A β +siHIPK3+antimiR-124 组相反; 而 A β 组与 A β +siHIPK3-NC 组之间、A β +siHIPK3 组与 A β +siHIPK3+antimiR-NC 组之间以及 A β +siHIPK3+antimiR-124 组与 A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组之间各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 CircHIPK3 低表达可抑制 A β 诱导的海马神经元凋亡, 其作用机制与调控 miR-124/STAT3 轴有关。

【关键词】 阿尔茨海默病; 环状 RNA HIPK3; 微小 RNA-124/信号转导和转录激活因子 3 轴; 海马神经元; β -淀粉样蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0022-08

Low expression of circHIPK3 regulates the miR-124/STAT3 axis and inhibits A β -induced apoptosis of hippocampal neurons

CHEN Ying¹, DENG Yanyao^{2*}

(1. Department of Neurology, the First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China.

2. Neurological Centre, the First Hospital of Changsha, Changsha 410005)

【基金项目】 湖南省自然科学基金科卫联合项目 (2019JJ80066)。

【作者简介】 陈莹 (1981—), 女, 副主任医师, 研究方向: 头痛、痴呆、脑血管病。E-mail: watersavin@sina.com

【通信作者】 邓炎尧 (1987—), 女, 主治医师, 研究方向: 阿尔茨海默病。E-mail: donedaiy@sina.com

【 Abstract 】 Objective To explore the effect of low expression of circular RNA homeodomain-interacting protein kinases 3 (circHIPK3) on the apoptosis of hippocampal neurons induced by Amyloid β -protein ($A\beta$). **Methods** Bioinformatics software prediction and double luciferase reporter gene experiments were used to investigate the targeting relationships between microRNA-124 (miR-124) with HIPK3 and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Primary hippocampal neurons were cultured *in vitro* and divided into the control group (normal cultured), the amyloid β -protein ($A\beta$) group ($A\beta$ stimulation), the $A\beta$ + siSTAT3-NC group ($A\beta$ stimulation after transfection of siSTAT3-NC), the $A\beta$ + siHIPK3 group ($A\beta$ stimulation after transfection of siHIPK3), the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-NC group ($A\beta$ stimulation after cotransfection of siHIPK3 and inhibitor-NC), the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 group ($A\beta$ stimulation after cotransfection of siHIPK3 and miR-124 inhibitor), the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 + siSTAT3-NC group ($A\beta$ stimulation after cotransfection of siHIPK3, miR-124 inhibitor and siSTAT3-NC) and the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 + siSTAT3 group ($A\beta$ stimulation after cotransfection of siHIPK3, miR-124 inhibitor and siSTAT3). The expression levels of HIPK3 and miR-124 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and expression level of STAT3 protein was detected by Western blot. Survival and apoptosis rates of hippocampal neurons were measured by the thiazole blue (MTT) method and flow cytometry, respectively. Caspase-3 activity was detected by Cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme 3 (Caspase-3) activity detection kit. **Results** Bioinformatics and double luciferase reporter gene experiments showed that HIPK3 targeted miR-124. Bioinformatics, double luciferase reporter gene experiments and Western blot demonstrated that miR-124 targeted STAT3 protein expression. Compared with the control group, expression levels of HIPK3 and STAT3 protein, and the apoptosis rate and caspase-3 activity in hippocampal neurons were significantly higher in the $A\beta$ group, whereas the survival rate of neurons and expression level of miR-124 were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with those in the $A\beta$ + siSTAT3-NC group, the above indexes were significantly reversed in the $A\beta$ + siHIPK3 group ($P < 0.05$). Compared with those in $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-NC group, the above indexes showed significant changes in the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 group ($P < 0.05$), and the trend was opposite to those in the $A\beta$ + siHIPK3 group. Compared with the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 + siSTAT3-NC group, the indexes of the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 + siSTAT3 group were markedly changed ($P < 0.05$), and the trend was opposite to those of the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 group. There were no significant differences between the $A\beta$ and $A\beta$ + siHIPK3-NC groups, the $A\beta$ + siHIPK3 and $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-NC groups, or the $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 + siSTAT3-NC and $A\beta$ + siHIPK3 + anti-miR-124 + siSTAT3 groups. **Conclusions** The low expression of circHIPK3 can inhibit apoptosis of hippocampal neurons induced by $A\beta$, and its mechanism is related to regulation of the miR-124/STAT3 axis.

【 Keywords 】 Alzheimer's disease; circular RNA HIPK3; microRNA-124/signal transducer and activator of transcription 3 axis; hippocampal neurons; amyloid β -protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种缺乏有效治疗手段的老年痴呆病,其发病率随着老龄化的加剧有明显升高的趋势^[1]。 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -protein, $A\beta$) 是一种多肽,其在特定脑区内聚集引起海马神经元凋亡导致的神经元数量减少被认为是 AD 发病的重要因素^[2-3]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类研究较为广泛的非编码 RNA,其异常表达可通过特异性调控相关靶基因影响细胞生物学行为,在包括 AD 在内的多种疾病中起着重要作用^[4]。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是广泛存在于生物体内的另一类非编码 RNA,也是调控 miRNA 的重要分子,可通过富含 miRNA 结合位点而发挥竞争性内源 RNA 的作用^[5]。同源结构域相互作用蛋白激酶 3 (homeodomain-interacting protein kinases 3, HIPK3) 是

众多 circRNA 中的一员,被证实可通过调控细胞凋亡参与肺癌、白内障和脓毒症等多种疾病的发生发展,然而其在 AD 中的作用并不清楚^[6-8]。本研究通过生物信息学软件预测发现, HIPK3 与 miR-124 之间存在互补结合位点,同时 miR-124 和信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 之间存在互补结合位点; miR-124 被报道在 AD 中低表达,而 STAT3 在 AD 中高表达,且两者均与 $A\beta$ 诱导的神经细胞凋亡有关^[9-10]。因此,猜测 HIPK3 可通过调控 miR-124/STAT3 轴介导 $A\beta$ 诱导的神经细胞凋亡进而影响 AD 的发生发展。为验证上述猜想,本研究开展体外细胞实验,靶向干扰 HIPK3 表达观察 HIPK3 低表达是否通过调控 miR-124/STAT3 轴影响 $A\beta$ 诱导的神经细胞凋亡过程,以期为 AD 的发生机制及治疗提供新线索。

1 材料和方法

1.1 实验动物

16 只 SPF 级新生 SD 雄性大鼠(出生 24 h 以内),体重(7.027 ± 0.055)g,购于上海杰思捷实验动物有限公司[SCXK(沪)2018-0004],饲养于中南大学湘雅医学院实验动物学部[SYXK(湘)2020-0019]。本实验经长沙市第一医院伦理委员会批准(IACUC-26-2019),在实验过程中按照动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

含胎牛血清的 DEME/F12 培养基(货号:PM150312C,武汉普诺赛生命科技有限公司);胰蛋白酶、TRIzol 试剂、LipoHigh 脂质体高效转染试剂、噻唑蓝 [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 细胞增殖检测试剂盒(货号:A003702、B610409、E607403、E606334,上海生工生物工程有限公司); $\text{A}\beta 1 \sim 42$ (货号:L2B010,上海领潮生物科技有限公司);实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)试剂盒(货号:QPG-020~QPG-023,上海吉玛制药技术有限公司);含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteiny aspartate specific proteinase 3, Caspase-3)活性测定试剂盒和膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒(货号:BC3830、CA1020,北京索莱宝科技有限公司);STAT3 抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(货号:4904、5174,美国 CST);靶向抑制 HIPK3 基因的 siRNA(siHIPK)及相应阴性对照(siHIPK-NC)(货号:CS1004、CN1001)、靶向抑制 STAT3 基因的 siRNA(siSTAT3)及相应阴性对照(siSTAT3-NC)(货号:CS1010、CN2001)和 miR-124 mimics 和 miR-124 inhibitor 及相应阴性对照 miR-NC、inhibitor-NC(货号:CM1005、CM2005、CS7005、CS8005)由南通市百奥迈科生物技术有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠海马神经元原代培养

将大鼠处死后,在无菌环境下取脑并分离海马组织;将其剪碎后,加入质量浓度为 0.125% 胰蛋白酶消化 30 min;再加入等体积 DEME/F12 培养基(含 20% 胎牛血清)终止消化。以新鲜培养基吹打

后,将细胞悬液过 200 目筛网进行过滤;调整细胞浓度后,接种至经 L-多聚赖氨酸处理后的 6 孔板上,置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱内常规培养;48 h 后,加入浓度为 5 mg/mL 阿糖胞苷以抑制非神经细胞的活性。每 3 d 更换 1/2 原培养基,在培养 5 d 后,采用神经元特异性树突标志物微管相关蛋白 2(microtubule associated protein-2, MAP2)免疫组化染色进行鉴定,采用纯度在 95% 以上的神经元进行实验。

1.3.2 实验分组与转染

实验分为对照组:正常培养; $\text{A}\beta$ 组:以 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h; $\text{A}\beta$ +siHIPK-NC 组:转染 siHIPK-NC 后以 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h; $\text{A}\beta$ +siHIPK3 组:转染 siHIPK3 后以 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h;另外,设 $\text{A}\beta$ +siHIPK3+antimiR-NC 组:共转染 siHIPK3 和 inhibitor-NC 后给予 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h; $\text{A}\beta$ +siHIPK3+antimiR-124 组:共转染 siHIPK3 和 miR-124 inhibitor 后给予 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h; $\text{A}\beta$ +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组:共转染 siHIPK3、miR-124 inhibitor 和 siSTAT3-NC 后给予 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h; $\text{A}\beta$ +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 组:共转染 siHIPK3、miR-124 inhibitor 和 siSTAT3 后给予 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta 1 \sim 42$ 处理 48 h。其中每组设 3 个平行。将对数生长期的海马神经元接种至 6 孔板上,常规培养至 75%~80% 融合度时,根据实验分组并参照 LipoHigh 脂质体高效转染试剂说明书进行瞬时转染;转染 5 h 后换新鲜培养基继续培养 48 h。

1.3.3 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 的靶向关系

starBase 和 TargetScan 生物信息学软件预测发现 miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 之间存在互补的结合位点;将含 miR-124 与 CircHIPK3/STAT3 结合位点及突变结合位点的序列片段克隆重组至 pGL3-basic 荧光素酶报告载体上构建 HIPK3/STAT3 野生型(WT)及突变型(MUT)荧光素酶报告载体,命名为 HIPK3/STAT3-WT、HIPK3/STAT3-MUT。将 miR-124 mimics、阴性对照 miR-NC 与 HIPK3/STAT3-WT、HIPK3/STAT3-MUT 载体质粒共转染至海马神经元中,其中每个处理设 3 个平行;待转染 48 h 后参照试剂盒说明书检测神经元荧光素酶活性。实验重复 3 次。另外,将转染 miR-124 mimics 的海马神经元作为 miR-124 组,转染 miR-NC 的海马神经

元作为 miR-NC 组,采用免疫印迹法(Western blot)检测 miR-NC 组和 miR-124 组中 STAT3 蛋白表达情况。

1.3.4 qRT-PCR 检测海马神经元中 HIPK3 和 miR-124 表达水平

参照 TRIzol 试剂说明书提取待测海马神经元总 RNA 后,行逆转录合成单链 cDNA,以 cDNA 为模板上荧光定量 PCR 仪进行扩增。上海生工生物工程合成的 PCR 引物序列如下:HIPK3 上游引物:5'-ATGGCCTCACAAGTCTTGTC-3',下游引物:5'-GCACTACCTTTCTGGAAGGAT-3'; miR-124 上游引物:5'-CGTGTTCACAGCGGACCTTG-3',下游引物:5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'; GAPDH 上游引物:5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3',下游引物:5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3', U6 上游引物:5'-GCTTCGGCAGCACATATACT-3',下游引物:5'-ATCCTTGCAGGGGCCA-3'。配置 20 μ L 反应体系:10 μ L 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Tag II、10 μ mol/L 上下游引物各 0.8 μ L、模板 DNA 2 μ L 和 6.4 μ L ddH₂O。PCR 扩增参数:94 $^{\circ}$ C 3 min($\times$ 1), 94 $^{\circ}$ C 20 s($\times$ 35), 58 $^{\circ}$ C 30 s($\times$ 35), 72 $^{\circ}$ C 30 s($\times$ 35), 72 $^{\circ}$ C 5 min($\times$ 1)。其中,GAPDH 和 U6 为内参,海马神经元中 CircHIPK3 和 miR-124 表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。实验重复 3 次。

1.3.5 Western blot 检测海马神经元中 STAT3 蛋白表达

参照试剂盒说明书提取神经元总蛋白后,二奎啉甲酸法检测总蛋白浓度与纯度。将蛋白样品与上样缓冲液按照 1:1 比例混合后,沸水浴煮沸 5 min。将蛋白样品上样至电泳凝胶中行电泳分离后,半干法转至聚偏氟乙烯膜上。经脱脂奶粉封闭处理后,加入稀释 2000 倍的 STAT3 和 GAPDH 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;经稀释 5000 倍的二抗室温孵育 2 h 后,暗室内显影液显影曝光。GAPDH 作检测内参,凝胶成像分析系统扫描分析神经元中 STAT3 蛋白的表达水平。实验重复 3 次。

1.3.6 MTT 法检测海马神经元存活率

将对数生长期海马神经元接种至 96 孔板上后,在培养箱内常规培养至贴壁后,根据实验要求进行处理,并将只含有培养基的孔作为调零组;待处理结束后,加入 20 μ L 浓度 5 g/L MTT 试剂;作用 4 h 后,再加入 150 μ L 二甲基亚砷;震荡反应至蓝紫色结晶溶解后,酶标仪在 490 nm 波长处检测海马神经

元吸光度值(A),并计算海马神经元存活率。实验重复 3 次。其中,存活率(%)=(实验组 A-调零组 A)/(对照组 A-调零组 A) $\times$ 100%。

1.3.7 流式细胞仪检测海马神经元凋亡率

胰蛋白酶消化收集处理结束后的各组海马神经元后,加入磷酸缓冲液重悬并使用上样缓冲液调整细胞浓度至每毫升 10^5 个;取 200 μ L 细胞悬液于反应管中,先后加入 5 μ L FITC 标记的 Annexin-V 和 5 μ L PI;充分混匀后,置于避光环境下反应 15 min;补加上样缓冲液后,上流式细胞仪检测海马神经元凋亡率。实验重复 3 次。

1.3.8 Caspase-3 活性测定试剂盒检测海马神经元 Caspase-3 活性

根据实验要求对海马神经元进行相应处理后,根据试剂盒说明书检测海马神经元 Caspase-3 活性。实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示实验数据。两组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 的靶向关系

图 1A 结果显示,miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 之间存在互补的结合位点。表 1 结果显示,与相应对照 miR-NC 相比,miR-124 mimics 可使转染 HIPK3-WT 和 STAT3-WT 细胞的荧光素酶活性明显降低($P<0.05$),但对转染 HIPK3-MUT 和 STAT3-MUT 细胞的荧光素酶活性无明显影响($P>0.05$);另外,图 1B 和表 1 结果显示,与 miR-NC 组比较,miR-124 mimics 组 STAT3 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。

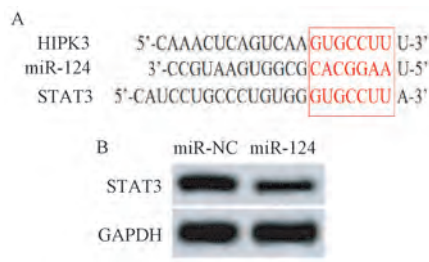
2.2 转染后海马神经元中 HIPK3、miR-124 和 STAT3 蛋白的表达水平

图 2 和表 2 结果显示,与对照组比较, $A\beta$ 组海马神经元中 HIPK3 和 STAT3 蛋白表达水平明显升高,而 miR-124 表达水平明显降低($P<0.05$);与 $A\beta$ 组比较, $A\beta$ +siHIPK-NC 组中 HIPK3、miR-124 和 STAT3 蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$);与 $A\beta$ +siHIPK-NC 组比较, $A\beta$ +siHIPK3 组中 HIPK3 和 STAT3 蛋白表达水平明显降低,而

miR-124 表达水平明显升高 ($P<0.05$)。

2.3 下调 HIPK3 表达对 A β 诱导的海马神经元凋亡影响

图 3 和表 3 结果显示,与对照组比较,A β 组海马神经元存活率明显降低,而凋亡率和 Caspase-3 活性明显升高 ($P<0.05$);与 A β 组比较,A β +siHIPK-NC 组海马神经元存活率、凋亡率和 Caspase-3 活性差异均无统计学意义 ($P>0.05$);而 A β +siHIPK3 组海马神经元存活率较 A β +siHIPK-NC 组明显升高,而凋亡率和 Caspase-3 活性较 A β +siHIPK-NC 组明显降低 ($P<0.05$)。



注:A:miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 之间互补结合位点;B: Western blot 检测 STAT3 蛋白表达。

图 1 miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 的靶向关系

Note. A, Complementary binding sites between miR-124 and HIPK3 and STAT3. B, Expression of STAT3 protein was detected by Western blot.

Figure 1 Targeting relationship of miR-124 with HIPK3 and STAT3

表 1 各组荧光素酶活性和 STAT3 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 1 Comparison of luciferase activity and STAT3 protein expression in each group

组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity				STAT3/GAPDH
	HIPK3-WT	HIPK3-MUT	STAT3-WT	STAT3-MUT	
miR-NC 组 miR-NC group	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	0.67 $\pm$ 0.05
miR-124 组 miR-124 group	0.38 $\pm$ 0.03	0.98 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.03
<i>t</i>	62.000	1.000	74.000	0.667	14.920
<i>P</i>	<0.001	0.332	<0.001	0.514	<0.001

表 2 各组中 HIPK3、miR-124 和 STAT3 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 2 Comparison of protein expression levels of HIPK3, miR-124 and STAT3 in each group

组别 Groups	HIPK3	miR-124	STAT3/GAPDH
对照组 Control group	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	0.65 $\pm$ 0.04
A β 组 A β group	3.62 $\pm$ 0.37 *	0.38 $\pm$ 0.04 *	1.20 $\pm$ 0.11 *
A β +siHIPK-NC 组 A β +siHIPK-NC group	3.58 $\pm$ 0.32	0.36 $\pm$ 0.03	1.18 $\pm$ 0.13
A β +siHIPK3 组 A β +siHIPK3 group	1.24 $\pm$ 0.12 #	0.59 $\pm$ 0.06 #	0.73 $\pm$ 0.06 #
<i>F</i>	194.876	347.377	59.275
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 A β +siHIPK-NC 组比较,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with A β +siHIPK-NC group, # $P<0.05$.

2.4 miR-124 低表达调控 STAT3 对 A β 诱导的海马神经元凋亡影响

表 4 和图 4 结果显示,与 A β +siHIPK3 组比较,A β +siHIPK3+antimiR-NC 组海马神经元中 miR-124、STAT3 蛋白、存活率、凋亡率和 Caspase-3 活性差异均无统计学意义 ($P>0.05$);与 A β +siHIPK3+antimiR-NC 组比较,A β +siHIPK3+antimiR-124 组中 miR-124 表达水平和海马神经元存活率明显降低,而 STAT3 蛋白表达水平和海马神经元凋亡率、Caspase-3 活性明显升高 ($P<0.05$);与 A β +siHIPK3+antimiR-124 组比较,A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组中 miR-124、STAT3 蛋白、存活率、凋亡率和 Caspase-3 活性差异均无统计学意义 ($P>0.05$);与 A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组比较,A β +siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 组中 STAT3 蛋白表达水平和海马神经元凋亡率、Caspase-3 活性明显降低,而海马神经元存活率明显升高 ($P<0.05$)。

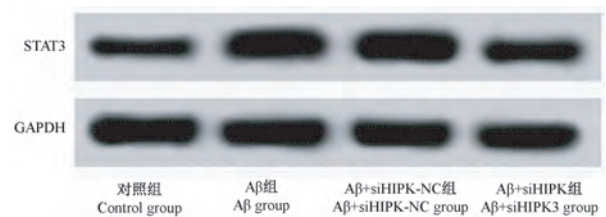


图 2 Western blot 检测各组 STAT3 蛋白表达

Figure 2 The expression of STAT3 protein was detected by Western blot

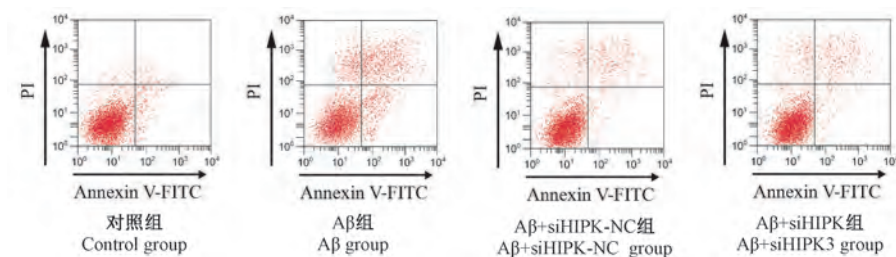


图3 流式细胞仪检测各组海马神经元凋亡结果

Figure 3 Apoptosis of hippocampal neurons was detected by flow cytometry

表3 各组海马神经元存活率、凋亡率和 Caspase-3 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 Comparison of survival rate, apoptosis rate and Caspase-3 activity of hippocampal neurons in each group

组别 Groups	存活率 (%) Survival rate	凋亡率 (%) Apoptosis rate	Caspase-3 活性 Caspase-3 activity
对照组 Control group	100.00±0.00	9.27±1.36	1.00±0.00
Aβ组 Aβ group	49.63±4.25 *	28.55±3.12 *	2.28±0.17 *
Aβ+siHIPK-NC组 Aβ+siHIPK-NC group	52.32±3.86	27.76±3.25	2.26±0.15
Aβ+siHIPK3组 Aβ+siHIPK3 group	80.85±5.12 [#]	15.10±1.23 [#]	1.39±0.10 [#]
F	353.508	138.134	240.757
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 Aβ+siHIPK-NC 组比较, [#] $P<0.05$ 。Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with Aβ+siHIPK-NC group, [#] $P<0.05$.表4 各组 miR-124、STAT3 蛋白表达水平和存活率、凋亡率和 Caspase-3 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 4 Comparison of miR-124, STAT3 protein expression level, survival rate, apoptosis rate and Caspase-3 activity in each group

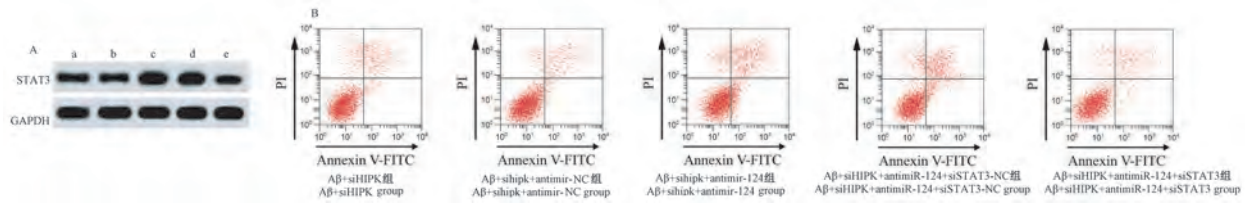
组别 Groups	miR-124	STAT3/ GAPDH	存活率 (%) Survival rate	凋亡率 (%) Apoptosis rate	Caspase-3 活性 Caspase-3 activity
Aβ+siHIPK3组 Aβ+siHIPK3 group	1.00±0.00	0.72±0.06	81.93±5.35 [#]	15.10±1.23 [#]	1.37±0.11 [#]
Aβ+siHIPK3+antimiR-NC组 Aβ+siHIPK3+antimiR-NC group	0.97±0.09	0.74±0.06	80.87±5.58	15.05±1.13	1.40±0.12
Aβ+siHIPK3+antimiR-124组 Aβ+siHIPK3+antimiR-124 group	0.26±0.04 *	1.31±0.15 *	50.28±3.03 *	26.12±3.38 *	2.74±0.15 *
Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC组 Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC group	0.27±0.05 *	1.33±0.12 *	52.06±3.08 *	27.15±3.43 *	2.79±0.16 *
Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3组 Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 group	0.25±0.03	0.73±0.06 [#]	62.52±5.01 [#]	20.36±1.37 [#]	1.89±0.13 [#]
F	361.489	65.742	67.181	36.239	158.482
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Aβ+siHIPK3+antimiR-NC 组比较, * $P<0.05$;与 Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组比较, [#] $P<0.05$ 。Note. Compared with Aβ+siHIPK3+antimiR-NC group, * $P<0.05$. Compared with Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC group, [#] $P<0.05$.

3 讨论

miRNAs 是一类可通过降解靶基因或阻断其转录后翻译进而发挥负向调控靶基因作用的小分子 RNA,与 AD 的发生发展密切相关^[11]。circRNA 是一个环形内源性 RNA 分子,由前体 mRNA 反向剪接产生,因作为 miRNA“海绵体”在 AD 中引起关注^[5]。Qian 等^[12]报道指出,microRNA-338-5p 的下调有助于 AD 的病理特征缓解。Lu 等^[13]研究发现,circHDAC9 可通过调控 miR-138/Sirt1 通路降低 Aβ

生成,被认为可能是 AD 治疗的潜在靶点。Yang 等^[14]研究指出,circ-0000950 通过直接海绵化 miR-103 可促进神经元凋亡、提高炎性细胞因子水平和抑制轴突生长,进而发挥着促进 AD 发生发展的作用。HIPK3 是一个与多种疾病发生关系密切的 circRNA。Teng 等^[15]在卵巢癌中研究发现,沉默 circHIPK3 可促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭并抑制细胞凋亡。Si 等^[16]在心肌梗死研究中发现,circHipk3 过表达通过海绵吸附 miR-133a 促进冠状动脉血管内皮细胞的增殖、迁移和血管生成,减轻



注:A:Western blot 检测各组 STAT3 蛋白表达;B:流式细胞仪检测各组海马神经元凋亡图。a: Aβ+siHIPK3 组;b: Aβ+siHIPK3+antimiR-NC 组;c: Aβ+siHIPK3+antimiR-124 组;d: Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC 组;e: Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 组。

图 4 miR-124 对 Aβ 诱导的海马神经元凋亡影响

Note. A, Expression of STAT3 protein was detected by Western blot. B, Apoptosis of hippocampal neurons in each group was detected by flow cytometry. a, Aβ+siHIPK3 group. b, Aβ+siHIPK3+antimiR-NC group. c, Aβ+siHIPK3+antimiR-124 group. d, Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3-NC group. e, Aβ+siHIPK3+antimiR-124+siSTAT3 group.

Figure 4 Effect of miR-124 on apoptosis of hippocampal neurons induced by Aβ

了心肌梗死后的心功能不全和纤维化面积。Fu 等^[17]在神经退行性疾病亨廷顿病中发现, HIPK3 是细胞自噬的负调节因子和突变的 HTT/Hdh 蛋白水平的正调节因子, 而敲低其表达可通过增强自噬减少突变的 HTT/Hdh 蛋白水平, 减轻细胞毒性。然而, HIPK3 在 AD 中的作用如何并不清楚。

miR-124 是 miRNAs 家族成员, 在神经系统发育、损伤和修复等过程中发挥着重要作用^[18]; STAT3 是一个机体内广泛表达的信号传导和转录激活因子, 被激活后可通过调控细胞增殖、分化和凋亡等参与多种疾病的发生发展^[19-20]。在 AD 中 miR-124 呈低表达状态, 而 miR-124 过表达可通过靶向调控 BACE1 抑制 Aβ 诱导的神经细胞凋亡^[9]; 而 STAT3 在 AD 中呈高表达状态, 且在 Aβ 诱导的神经细胞凋亡过程中发挥着重要的促进作用^[10]。Chen 等^[21]研究显示, HIPK3 可通过 miR124-3p-STAT3 信号途径调节肺癌细胞自噬。本研究采用生物信息学软件预测发现, miR-124 与 HIPK3 和 STAT3 之间存在互补的结合位点; 另外, 双荧光素酶报告基因实验及 Western blot 实验证实了 HIPK3 可与 miR-124 靶向结合, miR-124 可靶向调控 STAT3 蛋白表达。这提示, HIPK3 可能通过调控 miR-124/STAT3 轴介导 Aβ 诱导的神经细胞凋亡过程, HIPK3 可能在 AD 发生发展过程中扮演着重要角色。

本研究成功干扰抑制 HIPK3 表达后发现, Aβ 刺激所致海马神经元存活率降低及凋亡率、凋亡执行因子 Caspase-3 活性升高均明显受到抑制, 并上调海马神经元中 miR-124 表达且下调 STAT3 蛋白表达。结果表明, CircHIPK3 低表达可抑制 Aβ 诱导的海马神经元凋亡并调控 miR-124/STAT3 表达。另外, 本研究进一步抑制 miR-124 表达后发现, Aβ 作用下的海马神经元中 STAT3 蛋白表达水平、凋亡

率和 Caspase-3 活性明显升高, 而海马神经元存活率降低; 同时, 靶向抑制 STAT3 表达后发现, miR-124 低表达对海马神经元的上述作用明显逆转。结果表明, miR-124 低表达可通过靶向调控 STAT3 促进 Aβ 诱导的海马神经细胞凋亡。提示, HIPK3 低表达抑制 Aβ 诱导的海马神经细胞凋亡可能是通过调控 miR-124/STAT3 轴来实现的。

综上所述, CircHIPK3 低表达可抑制 Aβ 诱导的海马神经元凋亡, 其作用机制与调控 miR-124/STAT3 轴有关。本研究初次在细胞层面上证实了 CircHIPK3 在海马神经元凋亡过程中的作用, 后续将在体内动物模型中进一步探索 CircHIPK3 在 AD 大鼠模型海马神经元凋亡中的作用, 以期为 AD 发病机制和治疗提供新的参考依据。

参考文献:

- [1] 张记春, 黄庚娣, 孟雪, 等. 阿尔茨海默病转基因小鼠极早期嗅觉工作记忆的损害特征 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 437-443.
- [2] 李舸, 李航, 刘书华, 等. 利用功能基因 PCR 芯片探讨过表达 Slt2 基因与老年小鼠淀粉样蛋白产生沉积的关系 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 272-279.
- [3] 刘莎, 张玲燕, 孙爽, 等. 人脐带间充质干细胞条件培养液对 Aβ 损伤原代海马神经元凋亡的影响 [J]. 河北医药, 2018, 40(6): 805-809.
- [4] 徐堂文, 刘奕君. 微小核糖核酸在阿尔茨海默病中的研究进展 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2017, 38(12): 1177-1180.
- [5] 张燕燕, 任国诚, 张琼. 环状 RNA: 潜在的新型 miRNA 活性调控分子 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(11): 1158-1163.
- [6] Lu H, Han X, Ren J, et al. Circular RNA HIPK3 induces cell proliferation and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer through sponging miR-149 [J]. Cancer Biol Ther, 2020, 21(2): 113-121.
- [7] Liu X, Liu B, Zhou M, et al. Circular RNA HIPK3 regulates

- human lens epithelial cells proliferation and apoptosis by targeting the miR-193a/CRYAA axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2277-2285.
- [8] Liu B, Hou Q, Ma Y, et al. HIPK3 mediates inflammatory cytokines and oxidative stress markers in monocytes in a rat model of sepsis through the JNK/c-Jun signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 1127-1142.
- [9] Zhao MY, Wang GQ, Wang NN, et al. The long-non-coding RNA NEAT1 is a novel target for Alzheimer's disease progression via miR-124/BACE1 axis [J]. *Neurol Res*, 2019, 41(6): 489-497.
- [10] Arunsundar M, Shanmugarajan TS, Ravichandran V. 3, 4 - dihydroxyphenylethanol attenuates spatio-cognitive deficits in an Alzheimer's disease mouse model; modulation of the molecular signals in neuronal survival-apoptotic programs [J]. *Neurotox Res*, 2015, 27(2): 143-155.
- [11] 黄文辉, 顾雪锋, 李克深. 微小 RNA 在神经退行性疾病发病机制中作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2016, 56(41): 106-109.
- [12] Qian Q, Zhang J, He FP, et al. Down-regulated expression of microRNA-338-5p contributes to neuropathology in Alzheimer's disease [J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 4404-4417.
- [13] Lu YJ, Tan L, Wang X. Circular HDAC9/microRNA-138/Sirtuin-1 pathway mediates synaptic and amyloid precursor protein processing deficits in Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Bull*, 2019, 35(5): 877-888.
- [14] Yang H, Wang H, Shang H, et al. Circular RNA circ_0000950 promotes neuron apoptosis, suppresses neurite outgrowth and elevates inflammatory cytokines levels via directly sponging miR-103 in Alzheimer's disease [J]. *Cell cycle*, 2019, 18(18): 2197-2214.
- [15] Teng F, Xu J, Zhang M, et al. Comprehensive circular RNA expression profiles and the tumor-suppressive function of circHIPK3 in ovarian cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 112(1): 8-17.
- [16] Si XY, Zheng H, Wei G, et al. CircRNA Hipk3 induces cardiac regeneration after myocardial infarction in mice by binding to Notch1 and miR-133a [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21(1): 636-655.
- [17] Fu Y, Sun X, Lu B. HIPK3 modulates autophagy and HTT protein levels in neuronal and mouse models of Huntington disease [J]. *Autophagy*, 2018, 14(1): 169-170.
- [18] 杨俊娜, 何丽, 徐陶, 等. miR-124 在神经系统发育、损伤及修复中作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2018, 58(20): 100-103.
- [19] 王金, 徐平. 信号传导和转录激活因子 3 在认知功能障碍中的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(10): 1740-1742.
- [20] Feng X, Xiong W, Yuan M, et al. Down-regulated microRNA-183 mediates the Jak/Stat signaling pathway to attenuate hippocampal neuron injury in epilepsy rats by targeting Foxp1 [J]. *Cell cycle*, 2019, 18(22): 3206-3222.
- [21] Chen X, Mao R, Su W, et al. Circular RNA circHIPK3 modulates autophagy via MIR124-3p-STAT3-PRKAA/AMPK α signaling in STK11 mutant lung cancer [J]. *Autophagy*, 2019, 16(4): 659-671.

[收稿日期] 2020-10-15

刘振方,孟祥彩,武玉,等. microRNA-574-3p 抑制结肠癌细胞增殖的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 30-35.
Liu ZF, Meng XC, Wu Y, et al. Mechanism of microRNA-574-3p in inhibiting the proliferation of colon cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 30-35.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.005

microRNA-574-3p 抑制结肠癌细胞增殖的机制研究

刘振方^{1*}, 孟祥彩², 武玉², 刘晓飞¹, 米永鹏¹

(1. 石家庄市中医院普外科, 石家庄 050051; 2. 秦皇岛市第一医院普外科, 河北 秦皇岛 066000)

【摘要】 目的 观察微小 RNA-574-3p (microRNA-574-3p, miR-574-3p) 对结肠癌细胞增殖的影响, 并探讨其潜在的作用机制。**方法** 采用结肠癌细胞 HCT116 作为实验对象, 细胞转染 miR-574-3p mimic 和阴性对照分别作为 miR-574-3p mimic 组和阴性对照组, 同时以正常 HCT116 细胞作为空白对照组。RT-qPCR 检测细胞 miR-574-3p 表达; CCK-8 法检测细胞增殖活力; 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力; 流式细胞术检测细胞周期变化; Western blot 法检测 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 及 P53 蛋白表达变化。**结果** 与阴性对照组相比, miR-574-3p mimic 组 miR-574-3p 表达明显上调 ($P < 0.01$), 且在 36~72 h 细胞活力明显降低 ($P < 0.01$)。与阴性对照组相比, miR-574-3p mimic 组细胞克隆形成率显著降低 ($P < 0.01$), 同时 S 期细胞比例显著增加 ($P < 0.01$)。相较于阴性对照组, miR-574-3p mimic 组 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$), P53 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。阴性对照组与空白对照组上述各指标均无明显差异。**结论** miR-574-3p 可抑制结肠癌 HCT116 细胞增殖, 这可能与下调 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 及上调 P53 蛋白表达, 最终诱导细胞 S 期阻滞有关。

【关键词】 结肠癌; 微小 RNA-574-3p; 细胞周期; 增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0030-06

Mechanism of microRNA-574-3p in inhibiting the proliferation of colon cancer cells

LIU Zhenfang^{1*}, MENG Xiangcai², WU Yu², LIU Xiaofei¹, MI Yongpeng¹

(1. Department of General Surgery, Shijiazhuang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050051, China.

2. Department of General Surgery, First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000)

【Abstract】 Objective Observe the effect of microRNA-574-3p (miR-574-3p) on the proliferation of colon cancer cells, and explore its potential mechanism. **Methods** HCT116 colon cancer cells were transfected with miR-574-3p mimics or a negative control and used miR-574-3p mimics and negative control groups, respectively. Normal HCT116 cells were used as the blank control group. RT-qPCR was used to detect expression of miR-574-3p. CCK-8 assays were used to measure cell proliferation. Colony formation assay was used to assess cell clone formation. Flow cytometry was used to detect cell cycle changes. Western blot was used to detect expression of Cyclin A1, CDK2, PCNA, Cdc25A, and p53 proteins. **Results** Compared with the negative control group, expression of miR-574-3p in the miR-574-3p mimics group was upregulated significantly ($P < 0.01$), and cell viability was significantly reduced at 36~72 h ($P < 0.01$). Compared with the negative control group, the colony formation rate was significantly reduced in the miR-574-3p mimics group ($P < 0.01$), while the proportion of S-phase cells was increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the negative control group, expression of Cyclin A1, CDK2, PCNA, and Cdc25A was significantly downregulated in the miR-574-3p mimic group ($P <$

[基金项目] 河北省 2020 年度医学科学研究课题计划 (20201428)。

[作者简介] 刘振方 (1985—), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 结肠癌生物治疗。E-mail: liuzhenfang0716@163.com

0.01) and expression of p53 protein was upregulated significantly ($P < 0.01$). There was no significant difference in the above indicators between negative control and blank control groups. **Conclusions** MiR-574-3p inhibits the proliferation of HCT116 colon cancer cells, which may be related to the downregulation of Cyclin A1, CDK2, PCNA, and Cdc25A and the upregulation of p53 protein expression, which ultimately induces cell cycle arrest in S phase.

【Keywords】 colon cancer; microRNA-574-3p; cell cycle; proliferation

结肠癌是常见的消化道系统恶性肿瘤,严重威胁着患者的身心健康。国际癌症研究机构发布的《全球癌症报告》数据显示,2018 年结肠癌发病率全球第三,而死亡率高居第二^[1]。在我国,结肠癌的发病率呈逐年上升趋势并趋于年轻化^[2]。因此,如何有效预防和治疗结肠癌是临床需要解决的迫切问题。目前,结肠癌的治疗仍以传统手术、化学治疗和放射治疗为主^[3]。随着医药产业的发展,新兴的生物治疗也逐渐应用于临床。但仍有部分结肠癌患者治疗效果不佳。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类高度保守的功能性非编码 RNA。miRNA 在细胞分化、组织形成及个体发育中发挥重要作用^[4]。同时,miRNA 也与众多疾病密切相关,如在肿瘤^[5]、糖尿病^[6]、阿尔茨海默症等^[7]。miR-574-3p 是 miRNA 家族中的一员,研究显示,miR-574-3p 参与胃癌^[8]、乳腺癌^[9]及肝癌^[10]的恶性进展。最近的研究报道,miR-574-3p 可靶向抑制结肠癌 SW480 和 HT29 细胞周期蛋白 D2 表达,从而抑制细胞生长和迁移^[11]。提示,miR-574-3p 可能影响结肠癌细胞周期进程。但 miR-574-3p 在结肠癌中的作用还不是十分清楚,有待于进一步研究。本研究以结肠癌细胞 HCT116 为研究对象,通过转染 miR-574-3p mimic 外源性过表达 miR-574-3p 水平,观察后者对细胞增殖的影响,并对相关作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞

人结肠癌细胞 HCT116,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基 (批号:8120357)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (批号:2132094P) 和磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer solution, PBS) (批号:AE29561133),购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒 (批号:D03062005),购自美国 MedChemExpress 公司;细胞周期染色分析试剂盒 (批号:20-15183),购自美国 Abbkine 公司;miR-574-3p mimic 转染试剂

盒 (批号:20191225),购自上海艾博思公司;RNAiso for Small RNA 试剂盒 (批号:9753A)、PrimeScript™ RT reagent Kit (批号:AK4102) 和 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green® Kit (批号:638314) 购自大连 TaKaRa 公司;细胞裂解液 (批号:20191029) 和结晶紫染色液 (批号:20191025) 购自北京索莱宝公司;CyclinA1 抗体 (批号:9)、CDK2 抗体 (批号:8)、PCNA 抗体 (批号:3)、Cdc25A 抗体 (批号:12) 及 P53 抗体 (批号:8) 及 GAPDH 抗体 (批号:21),购自美国 Cell Signaling Technology 公司;羊抗兔 IgG-HRP 抗体 (批号:abs132004-06),购自上海爱必信公司。

Multiskan Sky 全波长酶标仪和 QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR 系统,美国 Thermo Fisher 公司产品;TS100 倒置显微镜,日本尼康公司产品;Gel Doc XR+凝胶成像系统、电泳仪、转膜槽及转印夹,美国 Bio-Rad 产品;Accuri C6 Plus 流式细胞仪,美国 BD 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HCT116 细胞以 RPMI 1640 培养基 (含 10% FBS 和 1% 青链霉素) 置于 37℃、5% CO₂、95% 空气的细胞培养箱中培养。

1.3.2 转染 miR-574-3p mimic 上调细胞 miR-574-3p 表达

分组:细胞转染 miR-574-3p mimic 和阴性对照分别作为 miR-574-3p mimic 组和阴性对照组,同时以正常 HCT116 细胞作为空白对照组。转染:将对数期细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中,培养过夜。分别向含有 2 ng miR-574-3p mimic 和阴性对照的管中加入 1 mL RNase-free 水配制成母液。各取两种母液 2 μ L 加入 98 μ L 无血清 RPMI 1640 培养基中。同时,将 2 μ L Lipofectamine 加入 98 μ L 无血清 RPMI 1640 培养基中。静置 5 min 后将上述两种稀释液混合以形成复合物,室温保温 20 min。取出细胞,弃去旧培养基,加入 1 mL 无血清 RPMI 1640 培养基。将两种复合物分别加入细胞中,将细胞置于培养箱中继续培养 24 h。以 RT-qPCR 检测细胞

miR-574-3p 表达水平。

1.3.3 RT-qPCR 检测细胞 miR-574-3p 表达水平

收集 miR-574-3p mimic 组、阴性对照组及空白对照组细胞,采用 RNAiso for Small RNA 试剂盒提取细胞总 RNA,检测总 RNA 浓度并将各组浓度调整一致。各取 1 μ g RNA 以 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录为 cDNA,将 cDNA 稀释备用。同时,将 miR-574-3p 和内参 U6 的特异性引物稀释备用。利用 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green® Kit 在 QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR 系统中进行扩增,每组设置 3 个重复孔。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-574-3p 的相对表达水平。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞增殖活力

取对数期 miR-574-3p mimic 组、阴性对照组及空白对照组细胞以每孔 9×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,分别培养 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 进行检测。检测时每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,培养箱中孵育 4 h。使用酶标仪测定 450 nm 光的吸光度值。

1.3.5 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力

将对数期 miR-574-3p mimic 组、阴性对照组及空白对照组细胞以每孔 300 个接种于 6 孔板中,细胞置于培养箱中培养 10 d。细胞以 PBS 洗去培养基,每孔加入 5% 多聚甲醛溶液固定 10 min。PBS 洗去多聚甲醛,各加入结晶紫染色液 1 mL,染色 10 min。清水洗去染色液,用相机拍照并进行统计。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期

miR-574-3p mimic 组、阴性对照组及空白对照组细胞生长至对数期时以 PBS 洗一遍,1000 r/min 离心 5 min 收集细胞,用预冷的 75% 乙醇对细胞进行固定。细胞以 2000 r/min 离心 5 min,加入 400 μ L 溴化乙锭 (PI, 50 μ L/mL) 和 100 μ L RNase A (100 μ g/mL),4℃ 避光孵育 30 min。以 Accuri C6 Plus 流式细胞仪上机检测并分析细胞周期。

1.3.7 蛋白印迹检测各组 CyclinE 蛋白表达变化

miR-574-3p mimic 组、阴性对照组及空白对照组细胞生长至对数期时以 PBS 洗一遍,用总蛋白提取试剂 RIPA 细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)冰上裂解细胞 10 min。蛋白刮刀刮下细胞并收集于 1.5 mL EP 管中,12000 r/min 离心 20 min,吸取上清液至新的 EP 管备用。用 BCA 蛋白定量试剂盒对各上清进行定量。制备 30 μ g/10 μ L 的蛋白样品,100℃ 变性 5 min。进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并将蛋

白转印至 PVDF 膜上,5% 的脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 4 h,用 CyclinA1 (1:1000)、CDK2 (1:2000)、PCNA (1:1000)、Cdc25A (1:1000)、P53 (1:2000) 及 GAPDH (1:1000) 抗体于 4℃ 孵育过夜。TBST 洗 PVDF 膜 3 次,羊抗兔 IgG-HRP 抗体室温孵育 1 h, PBS 洗 PVDF 膜 3 次,以 ECL 化学发光液对 PVDF 膜进行显色,Gel Doc XR+凝胶成像系统进行显影,读取相应蛋白条带灰度值。

1.4 统计学方法

以 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,所有数据经正态性检验符合正态分布,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间数据比较采用单因素方差分析,事后两两多重比较以 LSD-*t* 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

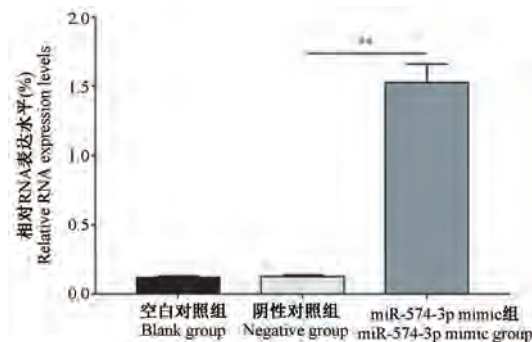
2 结果

2.1 转染 miR-574-3p mimic 增强 HT-29 细胞 miR-574-3p 表达

RT-qPCR 结果显示,空白对照组、阴性对照组、miR-574-3p mimic 组 miR-574-3p 表达水平分别为 $(0.12 \pm 0.01)\%$ 、 $(0.13 \pm 0.01)\%$ 及 $(1.53 \pm 0.14)\%$,空白对照组与阴性对照组比较无明显差异,与阴性对照组相比,miR-574-3p mimic 组 miR-574-3p 表达明显上调($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 转染 miR-574-3p mimic 抑制 HT-29 细胞增殖

CCK-8 结果显示,12~72 h,空白对照组和阴性对照组细胞生长曲线相类似,而 miR-574-3p mimic 组细胞生长较为缓慢。与阴性对照组相比,miR-574-3p mimic 组细胞在 36~72 h 细胞活力均明显降低($P < 0.01$)。见图 2。



注:与阴性对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图 1 各组细胞 miR-574-3p 表达变化($n=6$)

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

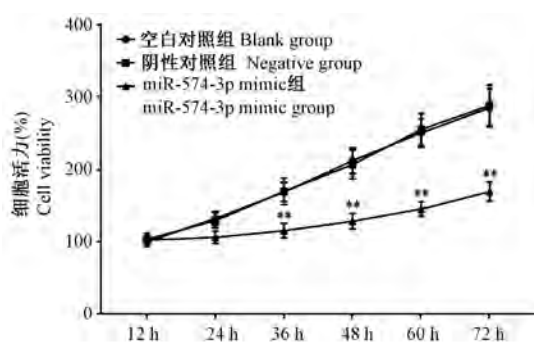
Figure 1 Changes of miR-574-3p expression in each group

2.3 转染 miR-574-3p mimic 抑制 HT-29 细胞克隆形成

平板克隆实验结果显示,空白对照组、阴性对照组、miR-574-3p mimic 组细胞克隆形成率分别为 100%、(102.60±9.60)% 及 (35.65±3.35)%。空白对照组与阴性对照组比较无明显差异,与阴性对照组相比,miR-574-3p mimic 组细胞克隆形成率显著降低($P<0.01$)。见图 3。

2.4 转染 miR-574-3p mimic 诱导 S 期 HT-29 细胞比例增加

流式细胞仪检测结果显示,空白对照组、阴性对照组、miR-574-3p mimic 组 S 期细胞比例分别为 (13.86±2.65)%、(15.12±2.88)% 及 (35.36±4.50)%。空白对照组与阴性对照组比较无明显差异,与阴性对照组相比,miR-574-3p mimic 组 S 期细胞比例显著增加($P<0.01$)。见图 4。



注:与阴性对照组相比,** $P<0.01$ 。

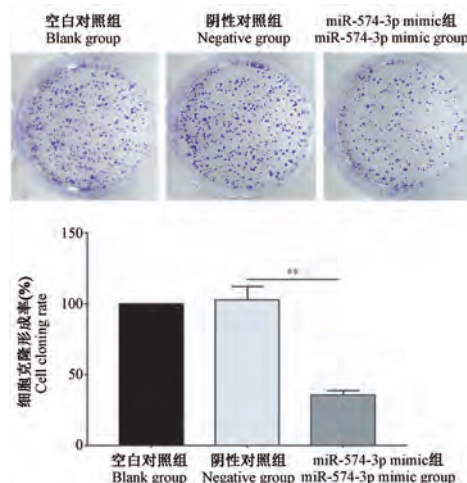
图 2 各组细胞 12~72 h 生长曲线($n=3$)

Note. Compared with negative group, ** $P<0.01$.

Figure 2 12~72 h growth curve of cells in each group

2.5 转染 miR-574-3p mimic 诱导 S 期相关蛋白表达变化

Western blot 结果显示,空白对照组、阴性对照组及 miR-574-3p mimic 组细胞 CyclinA1 蛋白表达为 100%、(96.32±7.80)% 及 (35.36±4.50)%, CDK2 蛋白表达为 100%、(103.90±8.92)% 及 (33.30±3.56)%, PCNA 蛋白表达为 100%、(105.25±9.85)% 及 (18.98±1.60)%, Cdc25A 蛋白表达为 100%、(100.80±8.65)% 及 (35.66±3.28)%, P53 蛋白表达分别为 100%、(97.68±9.28)% 及 (563.50±36.67)%。空白对照组与阴性对照组比较各蛋白表达无明显差异,与阴性对照组相比,miR-574-3p mimic 组 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 蛋白表达显著下调($P<0.01$),P53 蛋白表达明显上调($P<0.01$)。见图 5。



注:与阴性对照组比较,** $P<0.01$ 。

图 3 各组细胞克隆形成能力比较($n=3$)

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

Figure 3 Comparison of cell clone formation ability in each group

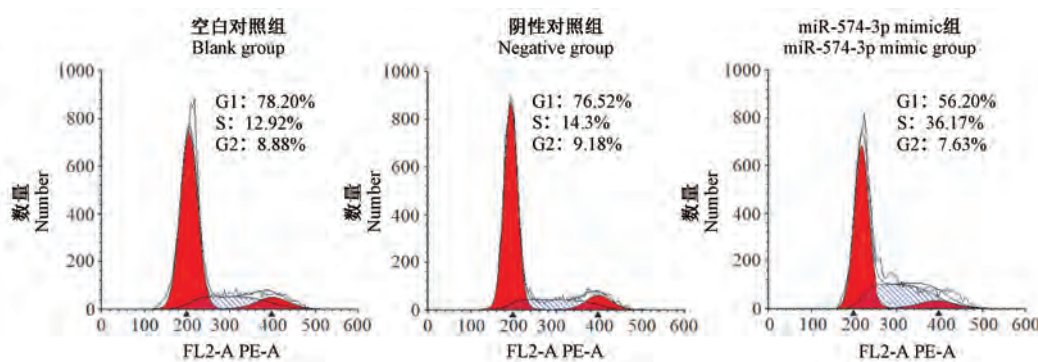
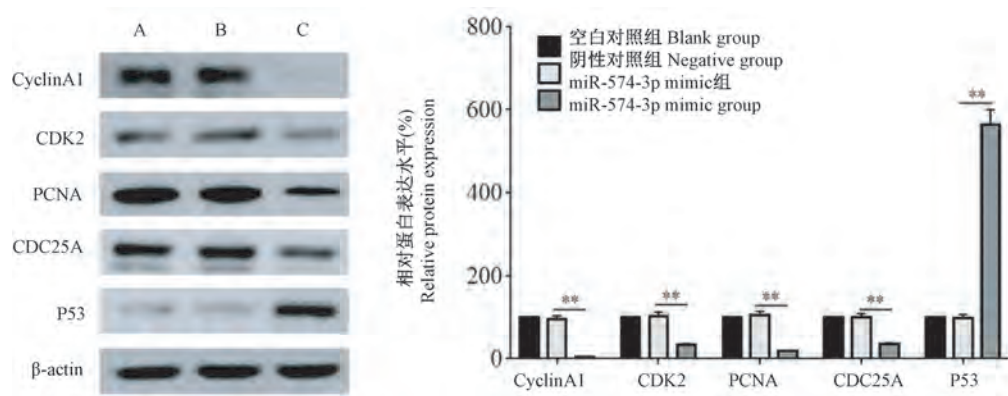


图 4 各组细胞周期变化($n=3$)

Figure 4 Cell cycle changes in each group



注:A:空白对照组;B:阴性对照组;C:miR-574-3p mimic 组。与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图5 各组细胞S期相关蛋白表达变化($n=3$)

Note. A, Blank group. B, Negative group. C, miR-574-3p mimic group. Compared with the negative group,

** $P < 0.01$.

Figure 5 Changes in the expression of S-phase related proteins in each group

3 讨论

miR-574-3p 作为 miRNA 的一种,在包括肿瘤在内的多疾病中发挥一定作用^[12-13]。miR-574-3p 已被证实涉及胃癌、乳腺癌及肝癌等多种肿瘤细胞的恶性生物学行为^[8-10]。研究显示,miR-574-3p 可通过靶向 FAM3C 和 MAPK1 抑制食道癌的增殖和侵袭^[13]。还有研究通过转染 miR-574-3p mimic 或 miR-574-3p inhibitor 调控 miR-574-3p 表达发现,miR-574-3p 能抑制 MMP3 表达从而在卵巢癌中发挥抑癌作用^[14]。Yang 等^[15]同样通过转染 miR-574-3p mimic 或 miR-574-3p inhibitor 发现,miR-574-3p 能通过靶向 IL6/JAK/STAT3 途径诱导慢性髓样白血病细胞增殖抑制和凋亡。这些提示,miR-574-3p 在恶性肿瘤中可能发挥抑癌作用。结肠癌相关报道显示,miR-574-3p 通过靶向抑制结肠癌细胞周期蛋白 D2 表达而抑制细胞生长和迁移^[11]。但 miR-574-3p 在结肠癌中的作用还不是十分清楚,有待于更多研究探讨。本研究通过转染化学合成的 miR-574-3p mimic 成功诱导 HCT116 细胞过表达 miR-574-3p。进一步研究显示,miR-574-3p mimic 能明显诱导 HCT116 细胞活力和克隆形成能力降低。提示,miR-574-3p 可抑制结肠癌细胞 HCT116 增殖,这与研究报道^[11]结果相类似。但 miR-574-3p 抑制 HCT116 细胞增殖的信号机制还不完全清楚。

细胞周期是细胞基本的生命活动过程,可分为分裂期和分裂间期,分裂间期又分为 G1 期、S 期、G2 期,细胞生命活动的大部分时间是在分裂间期度

过的^[16-17]。一般来说,周期进程的速度与细胞增殖密切相关。细胞周期的有序进行依赖于周期调控系统的严密调控。当这种调控系统的某个环节受到影响后,细胞可能停留在细胞周期的某一期而不能进入下一周期,这种现象被称为细胞周期阻滞^[16-17]。本研究显示,HCT116 细胞转染 miR-574-3p mimic 后 S 期细胞比例明显增加。结合增殖实验结果提示,miR-574-3p 可诱导 HCT116 细胞 S 期阻滞。研究显示,人参皂苷 Rg5 通过降低 Cyclin A1、CDK2、PCNA 蛋白表达和升高 P21 蛋白表达,从而诱导胃癌 MKN-45 细胞发生 S 期阻滞^[18]。另有研究显示,亚砷酸钠可通过上调 SH-SY5Y 细胞 p53 蛋白表达和下调 CDC25A、CyclinA 及 CDK2 蛋白诱导 SH-SY5Y 细胞 S 期阻滞,从而抑制细胞生长^[19]。提示,CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 及 P53 蛋白参与细胞 S 期调控。为了探讨 miR-574-3p 影响 HCT116 细胞 S 期阻滞的作用机制,本研究对上述蛋白进行了观察。结果显示,HCT116 细胞转染 miR-574-3p mimic 后 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 蛋白表达显著下调,P53 蛋白表达明显上调。提示,miR-574-3p 可能通过诱导 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 蛋白表达显著下调,及 P53 蛋白表达上调,而诱导 HCT116 细胞 S 期阻滞。而前文中 miR-574-3p 抑制 HCT116 细胞增殖,可能与阻滞细胞于 S 期而不能进入 G2 期有关。但本研究目前只通过转染 miR-574-3p mimic 对结肠癌中 miR-574-3p 的作用进行了研究,后续本研究还会以 miR-574-3p inhibitor 进行进一步验证。

近年来,核酸类药物逐渐成为生物医药发展的前沿领域,与此同时作为功能性 RNA 的 miRNA 已经逐渐成为研究热点。本研究发现,miR-574-3p 可抑制结肠癌细胞 HCT116 增殖,而该作用可能与下调 CyclinA1、CDK2、PCNA、Cdc25A 蛋白表达,及上调 P53 蛋白表达,最终诱导细胞 S 期阻滞有关。因此,阻遏 miR-574-3p 及其下游信号靶点可能是结肠癌治疗的潜在方法。本研究为临床治疗结肠癌提供了基础理论支持,但在结肠癌中 miR-574-3p 的功能作用还未完全明了,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1): 87-97.
- [2] 王雯邈,袁芑. 晚期大肠癌靶向及免疫治疗进展 [J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(4): 379-381, 376.
- [3] Brandi G, De Lorenzo S, Nannini M, et al. Adjuvant chemotherapy for resected colorectal cancer metastases: Literature review and meta-analysis [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(2): 519-533.
- [4] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [5] 徐绍莲,何晓刚,张露,等. microRNA-100 对乳腺细胞和乳腺癌细胞增殖能力的负调控作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 177-182.
- [6] 谢志国,李蒙禹,俞海波,等. 自身免疫糖尿病患者外周血单个核细胞 miR-142 和 miR-143 表达的研究 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2019, 35(8): 690-696.
- [7] 刘辰庚,郝婷,杨婷婷,等. 血浆外泌体 microRNA-29c 在阿尔茨海默病早期诊断价值的初步研究 [J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(5): 761-764.
- [8] Shen X, Xue Y, Cong H, et al. Dysregulation of serum microRNA-574-3p and its clinical significance in hepatocellular carcinoma [J]. Ann Clin Biochem, 2018, 55(4): 478-484.
- [9] Ujihira T, Ikeda K, Suzuki T, et al. MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer [J]. Sci Rep, 2015, 5: 7641.
- [10] Zhang R, Wang M, Sui P, et al. Upregulation of microRNA-574-3p in a human gastric cancer cell line AGS by TGF- β 1 [J]. Gene, 2017, 605: 63-69.
- [11] Li WC, Wu YQ, Gao B, et al. MiRNA-574-3p inhibits cell progression by directly targeting CCND2 in colorectal cancer [J]. Biosci Rep, 2019, 39(12): 20190976.
- [12] Gong X, Qiu J, Qiu G, et al. Adrenomedullin regulated by miRNA-574-3p protects premature infants with bronchopulmonary dysplasia [J]. Biosci Rep, 2020, 40(5): 20191879.
- [13] Jin LL, Zhang SJ, Lu GX, et al. miR-574-3p inhibits proliferation and invasion in esophageal cancer by targeting FAM3C and MAPK1 [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2020, 36(5): 318-327.
- [14] Zheng J, Zhou Y, Li XJ, et al. MiR-574-3p exerts as a tumor suppressor in ovarian cancer through inhibiting MMP3 expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(16): 6839-6848.
- [15] Yang H, Zhang J, Li J, et al. Overexpression of miR-574-3p suppresses proliferation and induces apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via targeting IL6/JAK/STAT3 pathway [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5): 4296-4302.
- [16] Dalton S. Linking the cell cycle to cell fate decisions [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(10): 592-600.
- [17] Ragkousi K, Gibson MC. Epithelial integrity and cell division: Concerted cell cycle control [J]. Cell Cycle, 2018, 17(4): 399-400.
- [18] 赵翔宇,何振宇,宰守峰. 人参皂苷 Rg5 对胃癌细胞周期和侵袭的影响及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(1): 51-55.
- [19] 柳香香,孙达权,许键炜,等. 亚砷酸钠对 SH-SY5Y 细胞周期的影响及 MPST 过表达的干预 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 634-639.

[收稿日期]2020-12-08

樊东哲, 张晓斌, 牟淑敏. miR-122 在糖尿病肾病小鼠肾组织中表达变化及作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 36-41.

Fan DZ, Zhang XB, Mu SM. Expression and mechanism of miR-122 actions in renal tissue of diabetic nephropathy mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 36-41.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.006

miR-122 在糖尿病肾病小鼠肾组织中表达变化及作用机制

樊东哲^{1*}, 张晓斌¹, 牟淑敏²

(1. 山东中医药大学第二附属医院肾病诊疗中心, 济南 250000; 2. 山东中医药大学附属医院内分泌科, 济南 250000)

【摘要】 目的 探讨 miR-122 在糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 小鼠肾组织中的表达变化以及沉默 miR-122 对 DN 小鼠肾组织的影响及可能的机制。**方法** 采用链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射联合高糖高脂饮食建立 C57BL/6 小鼠 DN 模型。将造模成功的 30 只 DN 小鼠随机分为模型组、antagomir-NC 组、antagomir-122 组, 每组 10 只, 另外选取未做任何处理的健康 C57BL/6 小鼠 10 只作为正常对照组。造模成功后, antagomir-122 组和 antagomir-NC 组每 7 d 分别给予尾静脉注射 antagomir-122 和 antagomir-NC 进行干预, 模型组和正常对照组给予尾静脉注射等量生理盐水代替。8 周后收集血清、尿液后处死小鼠取得肾标本, 自动生化仪检测血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 和 24 h 尿蛋白定量水平, 过碘酸雪夫 (PAS) 染色评价肾组织病理学变化, qRT-PCR 检测肾组织 miR-122 的表达水平, 试剂盒检测肾组织谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, Western blot 检测肾组织 Sirt1、 α -SMA、fibronectin 蛋白的表达水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组小鼠肾小球硬化评分上升 ($P < 0.05$), 肾组织 miR-122 和 α -SMA、fibronectin 蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$), 血清 Cr、BUN 水平, 24 h 尿蛋白定量水平, 肾组织 MDA 水平明显增高 ($P < 0.05$), 肾组织 GSH-Px 和 SOD 水平、Sirt1 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。模型组与 antagomir-NC 比较, 各项指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 antagomir-NC 组比较, antagomir-122 组小鼠肾小球硬化评分下降 ($P < 0.05$), 肾组织 miR-122 和 α -SMA、fibronectin 蛋白的表达明显降低 ($P < 0.05$), 血清 Cr、BUN 水平, 24 h 尿蛋白定量水平, 肾组织 MDA 水平明显下降 ($P < 0.05$), 肾组织 GSH-Px 和 SOD 水平、Sirt1 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-122 在 DN 小鼠肾组织中表达升高。沉默 miR-122 通过抗氧化应激和纤维化对 DN 小鼠肾组织起到明显的保护作用, 其机制可能与其对 Sirt1 基因的调控有关。

【关键词】 miR-122; Sirt1; 小鼠; 糖尿病肾病; 氧化应激; 纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0036-06

Expression and mechanism of miR-122 actions in renal tissue of diabetic nephropathy mice

FAN Dongzhe^{1*}, ZHANG Xiaobin¹, MU Shumin²

(1. Department of Nephrology Center, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000, China. 2. Department of Endocrine, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250000)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-122 in the kidneys of diabetic nephropathy (DN) mice and the effect of miR-122 in the kidney of DN mice. **Methods** Streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection

[基金项目] 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0083)。

[作者简介] 樊东哲 (1985—), 硕士, 主治医师, 研究方向: 糖尿病肾病。E-mail: fandongzhe@yeah.net

combined with a high-sugar and high-fat diet was used to establish the DN C57BL/6 mouse model. Thirty DN mice were randomly divided into the model group, antagomir-NC group and antagomir-122 group (10/group). In addition, 10 healthy C57BL/6 mice without any treatment were selected as a normal control group. After the successful establishment of the model, the antagomir-122 and antagomir-NC groups were given tail vein injections of antagomir-122 and antagomir-NC every 7 days, and the model and normal control groups were given tail vein injections of the same volume of normal saline. After 8 weeks, serum and urine samples were collected and mice were sacrificed to obtain kidney specimens. An automatic biochemical analyzer was used to detect serum creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN) and 24 h urine protein levels. Periodic acid schiff staining was used to evaluate renal histopathological changes, qRT-PCR was used to detect expression levels of miR-122 in renal tissue, and a kit was used to detect levels of glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in renal tissues. Western blot was used to detect protein levels of Sirtuin 1 (Sirt1), α -smooth muscle actin (α -SMA), and fibronectin in renal tissue. **Results** Compared with the normal control group, the glomerulosclerosis score of mice increased ($P<0.05$), the expression of miR-122, α -SMA and fibronectin protein in renal tissue increased ($P<0.05$), circulating levels of Cr and BUN, and quantitative levels of 24 h urine protein and MDA levels in renal tissue were all significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of Sirt1 protein, and SOD and GSH-Px levels in renal tissue were all significantly reduced ($P<0.05$) in the model group. There were no significant differences in the endpoints examined between the model group and antagomir-NC group. Compared with the antagomir-NC group, the glomerulosclerosis score, miR-122 expression, renal α -SMA and fibronectin protein levels, Cr and BUN levels, and 24 h urinary protein and renal tissue MDA levels were significantly decreased ($P<0.05$), and renal tissue GSH-Px, SOD, and Sirt1 protein expression levels were significantly increased ($P<0.05$) in the antagomir-122 group. **Conclusions** The expression of miR-122 was increased in kidneys of DN mice. Silencing miR-122 can protect renal tissues of DN mice from anti-oxidative stress and fibrosis, and its mechanism may be related to the regulation of Sirt1.

【Keywords】 miR-122; Sirt1; mice; diabetic nephropathy; oxidative stress; fibrosis

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的并发症之一, 是世界范围内导致终末期肾疾病的主要原因, 其发病率逐年上升, 严重危害人类的健康^[1]。在中国, DN 已经成为我国公共卫生的主要问题之一, 给个人、家庭和社会带来了巨大的负担。肾小球肥大增生、基底膜增厚、细胞外基质增多是 DN 的病理特征, 随着 DN 的进展, 逐渐发展为肾小球硬化、间质纤维化, 导致肾功能的丧失。DN 的发生发展机制复杂, 目前尚未完全阐明, 并且目前尚无有效的治疗方法。

目前随着研究的深入, 微小 RNA (miRNAs) 被发现对包括糖尿病肾病在内的多种疾病的发生发展均有着重要的调控作用^[2-3]。miR-122 定位于人染色体 18q21.31 上, 在肝中高表达, 与精子发生、肝细胞发育、脂质代谢、胆固醇合成以及恶性肿瘤的发生关系密切^[4]。近期研究发现 DN 患者血清 miR-122 水平明显升高, 并且血清 miR-122 水平与蛋白尿、肾小球滤过率显著相关, 提示 miR-122 可能参与了 DN 的发生进展, 但具体作用机制尚不明确^[5]。因此, 本研究中, 我们通过建立 DN 小鼠模型, 观察 miR-122 在 DN 小鼠肾组织的表达变化, 并进一步观察沉默 miR-122 对 DN 小鼠肾组织的影响

及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 50 只, 鼠龄 8~9 周, 体重 (24.5±1.6) g, 购自山东斯科贝斯生物科技公司 [SCXK(鲁)2016-0001], 在山东中医药大学附属医院实验动物中心屏障环境 [SYXK(鲁)2018-0015] 常规饲养。本研究经本院伦理委员会批准 (IACUC2019081501), 所有操作均符合动物实验学“3R”原则。

1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (STZ) (美国 Sigma 公司, 批号: S0130); TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司, 批号: 15596018); 反转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒 (北京全式金生物公司, 批号: AH341-01、AQ321-01); 过碘酸雪夫 (PAS) 染色试剂盒 (北京索莱宝公司, 批号: G1280); antagomir-122、antagomir-NC (上海吉玛制药公司); 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成生物公司, 批号: A005-1-1、A003-1-2、A001-3-1); 一抗 Sirt1、fibronectin、GAPDH 抗体 (英

国 Abcam 公司,批号:ab189494、ab268021、ab8245);一抗 α -SMA、HPR 标记的二抗(武汉博士德公司,批号:BM0002、BA1050)。

1.3 实验方法

1.3.1 DN 模型制备及动物分组

50 只 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后,随机选取 40 只小鼠采用 STZ 腹腔注射联合高糖高脂饮食建立 DN 小鼠模型,剩余 10 只小鼠作为正常对照组。建立 DN 模型的小鼠首先给予高脂高糖饲料喂养 8 周,给予 STZ(30 mg/kg)单次腹腔注射一次后,继续给予高脂高糖饲料喂养 4 周后,选取空腹血糖(FPG) ≥ 16.7 mmol/L,24 h 尿蛋白定量 ≥ 20 mg 的小鼠作为 DN 模型小鼠^[6-7],最终成功造模 30 只。正常对照组给予正常饲料常规喂养,给予腹腔单次注射等量的柠檬酸缓冲液。将 30 只 DN 小鼠随机分成分为模型组、antagomir-NC 组、antagomir-122 组,每组 10 只。antagomir-122 组和 antagomir-NC 组造模后,每 7 d 分别给予尾静脉注射 antagomir-122(30 mg/kg)和 antagomir-NC(30 mg/kg)进行干预,模型组和正常对照组给予尾静脉注射等量生理盐水代替。干预 8 周后,取得小鼠血、24 h 尿液后处死小鼠,获取肾标本。

1.3.2 肾功能检测

取小鼠血,3000 r/min 离心 15 min 取得上层血清,使用全自动生化分析仪检测小鼠血清尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)水平;取小鼠 24 h 尿液,全自动生化分析仪检测小鼠 24 h 尿蛋白定量。

1.3.3 组织病理学分析

小鼠处死后,取出左肾,应用 10% 中性甲醛固定,经石蜡包埋后,连续切 4 μ m 切片,应用 PAS 试剂盒进行染色,光学显微镜下观察肾组织病理学改变,每张切片随机选取 5 个不同视野,参考文献的方法进行肾小球硬化评分^[8]。

1.3.4 qRT-PCR 检测肾组织中 miR-122 的表达水平

取小鼠部分右肾皮质组织,TRIzol 试剂提肾皮质组织总 RNA,鉴定总 RNA 浓度和纯度后,应用反转录试剂盒反转录合成 cDNA。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书配置扩增反应体系,miR-122 引物序列,正向:5'-GGGTGGAGTGTGACAATGG-3',反向:5'-TGCCTGTCGTGGAGTC-3',以 U6 作为内参照,引物序列,正向:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',反向:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-

3'。反应条件:95℃ 30 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s,共 40 个循环。miR-122 表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.3.5 Western blot 检测肾组织 Sirt1、 α -SMA、fibronectin 蛋白的表达水平

小鼠处死后,取部分右肾皮质组织,RIPA 裂解液裂解组织,提取组织总蛋白,Bradford 法测得总蛋白浓度,取得 30 μ g 蛋白样本,行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转至 PVDF 膜,室内封膜 1 h,分别加入一抗 Sirt1(稀释度 1:1000)、 α -SMA(稀释度 1:2000)、fibronectin(稀释度 1:1000)和 GAPDH(稀释度 1:5000)抗体,4℃ 孵育过夜,加入二抗后,37℃ 孵育 1 h,曝光,显影,最后使用 Image-J 软件分析各组蛋白的条带灰度值。

1.3.6 氧化应激水平检测

小鼠处死后,取部分右肾皮质组织,裂解匀浆后测定蛋白浓度,分别应用 GSH-Px、MDA、SOD 试剂盒参照说明书操作,检测各组小鼠肾组织 GSH-Px、MDA、SOD 的水平。

1.4 统计学方法

SPSS 20.0 进行统计分析,计量数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾功能的比较

与正常对照组比较,模型组小鼠血清 Cr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量水平均明显增高($P < 0.05$);模型组与 antagomir-NC 组比较,各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与 antagomir-NC 组比较,antagomir-122 组小鼠血清 Cr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量水平均明显降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 各组小鼠肾小球硬化的比较

与正常对照组比较,模型组小鼠肾小球硬化评分明显增高($P < 0.05$);模型组与 antagomir-NC 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与 antagomir-NC 组比较,antagomir-122 组小鼠肾小球硬化评分明显降低($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组小鼠肾组织 miR-122 和 Sirt1 蛋白表达的比较

与正常对照组比较,模型组小鼠肾组织 miR-122 的表达水平明显增高($P < 0.05$),而 Sirt1 蛋白的表达水平明显降低($P < 0.05$);模型组与 antagomir-NC 组比较,各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$);

与 antagomir-NC 组比较, antagomir-122 组小鼠肾组织 miR-122 的表达水平明显降低 ($P<0.05$), 而 Sirt1 蛋白的表达水平明显升高 ($P<0.05$)。见图 3。

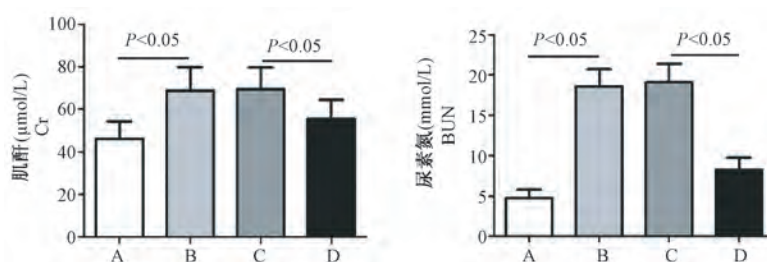
2.4 各组小鼠肾组织氧化应激水平的比较

与正常对照组比较, 模型组小鼠肾组织 MDA 水平明显增高 ($P<0.05$), 而 GSH-Px 和 SOD 水平明显降低 ($P<0.05$); 模型组与 antagomir-NC 比较, 各项指标差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 antagomir-NC 组比较, antagomir-122 组小鼠肾组织 MDA 水平明显降低 ($P<0.05$), 而 GSH-Px 和 SOD 水平均明显

升高 ($P<0.05$)。见图 4。

2.5 各组小鼠肾组织 α -SMA、fibronectin 蛋白表达水平的比较

与正常对照组比较, 模型组小鼠肾组织 α -SMA、fibronectin 蛋白表达水平均明显增高 ($P<0.05$); 模型组与 antagomir-NC 组比较, 各项指标差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 antagomir-NC 组比较, antagomir-122 组小鼠肾组织 α -SMA、fibronectin 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。见图 5。

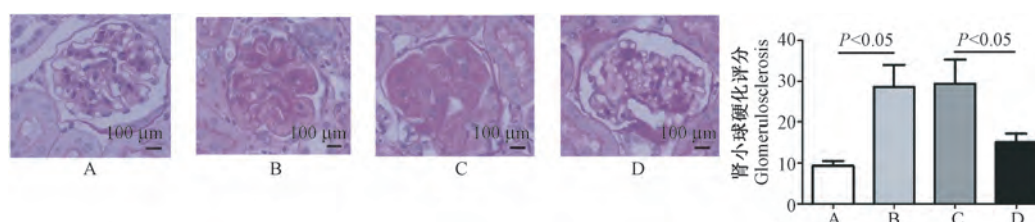


注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: Antagomir-NC 组; D: Antagomir-122 组。

图 1 各组小鼠肾功能的比较

Note. A, Normal control group. B, Model group. C, Antagomir-NC group. D, Antagomir-122 group.

Figure 1 Comparison of renal function in each group

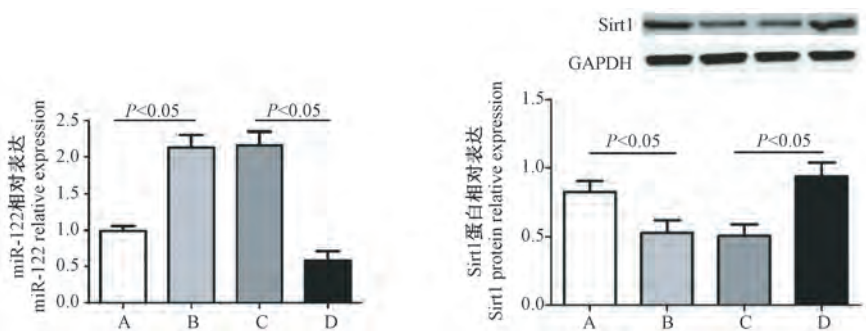


注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: Antagomir-NC 组; D: Antagomir-122 组。

图 2 各组小鼠肾小球硬化的比较

Note. A, Normal control group. B, Model group. C, Antagomir-NC group. D, Antagomir-122 group.

Figure 2 Comparison of glomerulosclerosis in each group

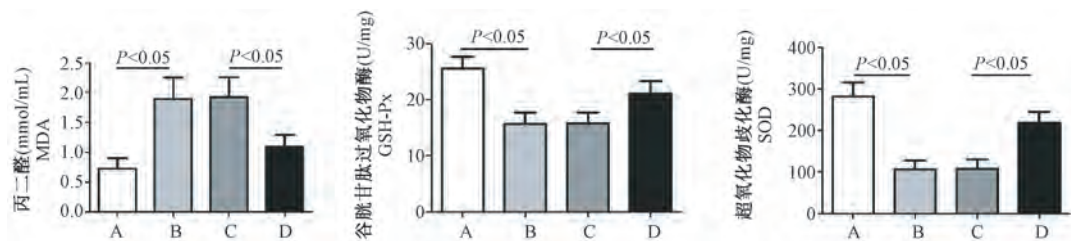


注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: Antagomir-NC 组; D: Antagomir-122 组。

图 3 各组小鼠肾组织 miR-122 和 Sirt1 蛋白表达的比较

Note. A, Normal control group. B, Model group. C, Antagomir-NC group. D, Antagomir-122 group.

Figure 3 Comparison of miR-122 and Sirt1 protein expression in renal tissue of mice in each group

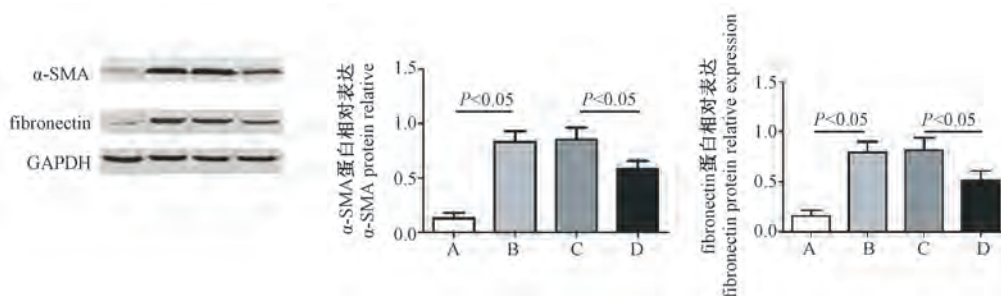


注:A:正常对照组;B:模型组;C:Antagomir-NC组;D:Antagomir-122组。

图4 各组小鼠肾组织氧化应激水平的比较

Note. A, Normal control group. B, Model group. C, Antagomir-NC group. D, Antagomir-122 group.

Figure 4 Comparison of oxidative stress levels in kidney of mice in each group



注:A:正常对照组;B:模型组;C:Antagomir-NC组;D:Antagomir-122组。

图5 各组小鼠肾组织 α-SMA、fibronectin 蛋白表达水平的比较

Note. A, Normal control group. B, Model group. C, Antagomir-NC group. D, Antagomir-122 group.

Figure 5 Comparison of the expression levels of α-SMA and fibronectin in renal tissues of mice in each group

3 讨论

DN 是糖尿病患者晚期的一个主要并发症,以肾小球硬化和肾小管间质纤维化为主要病理特点,据研究报道,至少大约 1/3 的 1 型糖尿病和 1/2 的 2 型糖尿病会出现不同程度的肾功能不全,是终末期肾疾病的主要原因^[9]。DN 发生发展进展复杂,涉及多种基因的异常表达和多种信号通路的异常改变,至今尚不完全明确^[10]。研究证据表明,miR-31^[11]、miR-124a^[12]、miR-320a^[13] 等许多 miRNA 在 DN 中异常表达,这些异常表达的 miRNAs 及其靶基因在 DN 发病机制中起着重要作用^[14],为 DN 的靶向治疗提供了新的研究方向。文献报道 miR-122 在 DN 患者血清中表达升高,并且患者肾功能密切相关^[5],但具体作用机制尚不清楚。为了研究 miR-122 在 DN 中可能的作用机制,本研究采用目前国内常用的 STZ 腹腔注射联合高糖高脂饮食的方法建立小鼠 DN 模型,我们发现模型组小鼠肾组织中 miR-122 表达水平较正常对照组明显升高。我们通过给予小鼠尾静脉注射 antagomir-122,抑制 DN 小鼠肾组织中 miR-122 的表达,结果显示,随着 DN 小鼠肾组织中 miR-122 表达的降低,antagomir-122 组小鼠肾小球硬化评分、血清 Cr、BUN 水平、24 h 尿蛋

白定量水平明显降低,提示沉默 miR-122 表达能够对 DN 小鼠肾组织起到明显的保护作用。

氧化应激是病理状态下机体的抗氧化系统被抑制,过量的 ROS 聚积而无法及时清除,导致脂质过氧化和蛋白质变性,从而导致炎症反应、肾小球肥大硬化和肾纤维化。氧化应激是 DN 的发病发展的重要机制之一,抗氧化治疗在 DN 的防治中有着广泛的前景^[15-16]。MDA 是组织细胞过氧化损伤过程中的中间产物,可以反映出细胞的氧化损伤程度,MDA 水平检测可以有效反应机体的氧化应激水平^[17]。GSH-Px 和 SOD 是氧化应激反应中重要抗氧化酶,其水平可以反应出细胞对氧自由基的清除能力^[18]。研究中我们也发现,与正常对照组比较,模型组肾组织 MDA 水平明显增高,GSH-Px 和 SOD 水平明显降低,提示氧化应激在 DN 发生进展中发挥重要作用。进一步我们发现,与 antagomir-NC 组比较,antagomir-122 组小鼠肾组织 MDA 水平明显降低,肾组织 GSH-Px 和 SOD 水平明显升高,提示沉默 miR-122 表达能够减轻 DN 小鼠肾组织的氧化应激从而起到保护作用。α-SMA、fibronectin 蛋白异常增高是反应肾纤维化程度的标志性蛋白^[19],研究中我们发现,与正常对照组比较,模型组小鼠肾组织 α-SMA、fibronectin 蛋白表达水平均明显增高,提示

DN 小鼠肾组织存在明显纤维化。进一步我们发现,与 antagomir-NC 组比较,antagomir-122 组小鼠肾组织 α -SMA、fibronectin 蛋白表达水平均明显降低,提示沉默 miR-122 表达能够减轻 DN 小鼠肾组织的纤维化。

Sirt1 是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化酶,属于 Sirtunis 家族之一,在肾小管上皮细胞中表达较高^[20]。Sirt1 在 DN 发生进展中作用的研究较多,Sirt1 能够通过抗氧化应激、抗纤维化、抗炎及调控自噬从而对 DN 的产生保护作用已经得到公认^[21]。本研究中我们也发现,与正常对照组比较,模型组小鼠肾组织 Sirt1 蛋白表达水平明显降低。近期研究发现,miR-122 能够靶向调控 Sirt1 参与机体多种重要的生理活动^[22-23],为了探讨 miR-122 对 DN 影响是否与 Sirt1 有关,我们通过研究发现,与 antagomir-NC 组比较,antagomir-122 组小鼠肾组织 Sirt1 蛋白表达水平明显升高,提示沉默 miR-122 表达对 DN 小鼠肾组织的保护作用可能与其对 Sirt1 的调控有关。

总之,miR-122 在 DN 小鼠肾组织中表达升高。沉默 miR-122 能够通过抗氧化应激和纤维化对 DN 小鼠肾组织起到明显的保护作用,其机制可能与其调控 Sirt1 有关,为 DN 的治疗提供新的研究方向。

参考文献:

- [1] Shimizu M, Wada T. Nephrotic syndrome in diabetic nephropathy and diabetes [J]. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 2014, 56(4): 500-509.
- [2] Ichii O, Horino T. MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals [J]. J Toxicol Pathol, 2018, 31(1): 23-34.
- [3] 田莎莎, 杨晓鹏, 郭琿. 微小 RNA 在糖尿病肾病中的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(27): 58-61.
- [4] 李绍祥, 李浩然, 张成平, 等. miR-122 的研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(9): 146-150.
- [5] Regni A, Liu G, Zhong X, et al. Evaluation of serum microRNAs in patients with diabetic kidney disease: a nested case-controlled study and bioinformatics analysis [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 1699-1708.
- [6] 杨焯, 张园园, 田燕燕, 等. 活性维生素 D3 对糖尿病肾病大鼠转化生长因子 β 1 及相关因子的调节作用 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2015, 31(1): 66-70.
- [7] Lee TN, Albom WE, Knierman MD, et al. The diabetogenic antibiotic streptomycin modifies the tryptic digest pattern for peptides of the enzyme O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase that contain amino acid residues essential for enzymatic activity [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(6): 710-718.
- [8] Maric C, Sandberg K, Hinojosa-Laborde C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 β -estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(6): 1546-1556.
- [9] Qi C, Mao X, Zhang Z, et al. Classification and differential diagnosis of diabetic nephropathy [J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 8637138.
- [10] Kawanami D, Matoba K, Utsunomiya K. Signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. Histol Histopathol, 2016, 31(10): 1059-1067.
- [11] Rovira-Llopis S, Escribano-Lopez I, Diaz-Morales N, et al. Downregulation of miR-31 in diabetic nephropathy and its relationship with inflammation [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(3): 1005-1014.
- [12] Sun J, Zhao F, Zhang W, et al. BMSCs and miR-124a ameliorated diabetic nephropathy via inhibiting notch signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(10): 4840-4855.
- [13] He M, Wang J, Yin Z, et al. MiR-320a induces diabetic nephropathy via inhibiting MafB [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(10): 3055-3079.
- [14] Petrillo F, Iervolino A, Zacchia M, et al. MicroRNAs in renal diseases: a potential novel therapeutic target [J]. Kidney Dis (Basel), 2017, 3(3): 111-119.
- [15] Miranda-Díaz AG, Pazarín-Villaseñor L, Yanowsky-Escatell FG, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 7047238.
- [16] Manda G, Checherita AI, Comanescu MV, et al. Redox signaling in diabetic nephropathy: hypertrophy versus death choices in mesangial cells and podocytes [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 604208.
- [17] Rehman K, Akash MSH. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(11): 3577-3585.
- [18] Fetoni AR, Paciello F, Rolesi R, et al. Targeting dysregulation of redox homeostasis in noise-induced hearing loss: Oxidative stress and ROS signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 135: 46-59.
- [19] 权晓娟, 梁春联, 孙明珠, 等. 吡非尼酮对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病大鼠肾纤维化的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(3): 215-218, 224.
- [20] Dong YJ, Liu N, Xiao Z, et al. Renal protective effect of sirtuin 1 [J]. J Diabetes Res, 2014, 2014: 842786.
- [21] 陶鹏宇, 张悦. SIRT1 在糖尿病肾病进展中的作用 [J]. 基础医学与临床, 2019, 39(3): 439-443.
- [22] Long JK, Dai W, Zheng YW, et al. miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Mol Med, 2019, 25(1): 26.
- [23] Bai Y, Chen K, Zhan J, et al. miR-122/SIRT1 axis regulates chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis [J]. Biosci Rep, 2020, 40(6): BSR20191908.

[收稿日期] 2020-11-01

张志恒,贾海燕,崔朝初,等. 龙胆苦苷对 H₂₂肝癌小鼠肿瘤生长抑制及抗血管生成的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (10): 42-47.

Zhang ZH, Jia HY, Cui CC, et al. Inhibitory effect of gentiopicroside on tumor growth and anti-angiogenesis in mice with H₂₂ hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 42-47.

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

龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长抑制及 抗血管生成的分析

张志恒^{1*}, 贾海燕¹, 崔朝初², 张莹雪³

(1.聊城市中医医院肿瘤科,山东 聊城 252000;2.河南科技大学医学院,河南 洛阳 471000;
3.山东中医药大学药学院, 济南 250355)

【摘要】 目的 探讨龙胆苦苷对 H₂₂肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用及抗血管生成机制。**方法** 右腋皮下注射 H₂₂细胞悬液建立 H₂₂肝癌小鼠模型,并随机分为模型组、龙胆苦苷低、高剂量组(50 mg/kg、100 mg/kg)及环磷酰胺组(20 mg/kg),每组 10 只;另选取 10 只健康小鼠,作为正常组;给药 14 d 后,检测体重、瘤重、抑瘤率、胸腺指数、脾指数、血清干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)含量及瘤组织碱性成纤维生长因子(bFGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)、磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶(p-PI3K)及磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)表达水平。**结果** 与 H₂₂肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠体重无明显变化($P>0.05$),而瘤重明显降低($P<0.01$),其抑瘤率分别为 30.43%及 42.93%;与 H₂₂肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数、脾指数及血清 IFN- γ 、IL-2 含量明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而瘤组织 bFGF、TGF- β 、VEGF、p-PI3K 及 p-Akt 表达明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 龙胆苦苷对 H₂₂肝癌小鼠肿瘤生长及血管生成均有抑制作用,该作用与提高免疫力,增加血清 IFN- γ 、IL-2 含量及抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

【关键词】 龙胆苦苷;肿瘤生长;血管生成;肝癌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0042-06

Inhibitory effect of gentiopicroside on tumor growth and anti-angiogenesis in mice with H₂₂ hepatocellular carcinoma

ZHANG Zhiheng^{1*}, JIA Haiyan¹, CUI Chaocun², ZHANG Yingxue³

(1. Department of Oncology in Liaocheng Traditional Chinese Medicine Hospital, Liaocheng 252000, China.

2. Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000. 3. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effects of gentiopicroside on tumor growth and anti-angiogenesis in mice with H₂₂ hepatocellular carcinoma. **Methods** A H₂₂ hepatocellular carcinoma mouse model was established by subcutaneous injection of a H₂₂ cell suspension into the right axilla. Mice with H₂₂ hepatocellular carcinoma were randomly divided into a model group, low and high dose gentiopicroside groups (50 and 100 mg/kg, respectively), and a cyclophosphamide group (20 mg/kg) with 10 mice in each group. Another 10 healthy mice were used as the normal group. After 14 days of administration, body weight, tumor weight, tumor inhibition rate, thymus index, spleen index, serum IFN- γ

[基金项目] 河南省科技重点攻关项目(102102310063);河南科技大学研究生创新基金(XJJ-YJS-Z027)。

[作者简介] 张志恒(1973—),男,副主任医师,研究方向:肿瘤的诊疗。E-mail:zhangzh6221@163.com

and IL-2 contents, and expression levels of bFGF, TGF- β , VEGF, p-PI3K, and p-Akt were measured in tumor tissues.

Results Compared with the H₂₂ hepatocellular carcinoma model group, the body weights of mice in low and high dose groups of gentiopicroside did not change significantly ($P>0.05$), while the tumor weight was reduced significantly ($P<0.01$), with the tumor inhibition rates of 30.43% and 42.93%, respectively. Compared with the H₂₂ hepatocellular carcinoma model group, the thymus index, spleen index, and serum IFN- γ and IL-2 contents of mice in low and high dose gentiopicroside groups were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while expression of bFGF, TGF- β , VEGF, p-PI3K, and p-Akt in tumor tissues was decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** Gentiopicroside has an inhibitory effect on tumor growth and anti-angiogenesis effect in H₂₂ hepatocellular carcinoma mice, which is related to improving immunity, increasing serum IFN- γ and IL-2 levels, and inhibition of activation of the PI3K/Akt signaling pathway.

【Keywords】 gentiopicroside; tumor growth; angiogenesis; hepatocellular carcinoma

肝癌在我国高发,具有预后差、易转移复发、生存时间较短及恶性程度高等特点,在肿瘤引起的相关死亡中高居第 2 位^[1]。化学治疗是治疗肝癌的常用手段,但常导致消化道及肝、肾损伤、骨髓抑制,并出现白细胞减少、便秘、腹痛腹泻、食欲不振、恶心呕吐等不良反应^[2]。龙胆苦苷是我国传统中药龙胆草及秦艽中的主要活性物质,属于环烯醚萜苷类化合物,具有健胃利胆、抗病原微生物、抗炎及保肝等多种药理作用^[3]。体外实验发现^[4-7],龙胆苦苷对人卵巢癌及肝癌细胞等的增殖有抑制作用,但关于龙胆苦苷的体内抗肿瘤作用研究未见报道。因此,本研究以 H₂₂ 肝癌小鼠为研究对象,主要探讨龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长抑制及抗血管生成分析,以期为进一步的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 雄性小鼠 60 只,体重 20~22 g,来源于北京维通利华公司[SCXK(京)2017-0033]。无菌手术在山东大学实验动物中心进行[SYXK(鲁)2019-0005]。本实验获我院伦理委员会审批通过(LCZYYY2020012707),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞

肝癌 H₂₂ 细胞,购于中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

龙胆苦苷为南京道斯夫公司产品,批号 181116A,纯度>95%;干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒,购于深圳达科为生物公司,批号分别为 20180516、20180427;兔抗鼠碱性成纤维生长因子(bFGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子

(VEGF)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)及磷酸化 Akt(p-Akt)抗体均购于美国 Abcam 公司,批号分别为 ab246354、ab229856、ab69479、ab154598、ab182651、ab8805、ab38449。Epoch 型酶标仪,美国 Bio-tek 公司;蛋白电泳及转膜仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 H₂₂ 肝癌小鼠模型的建立

将培养至对数生长期的 H₂₂ 细胞接种于 KM 小鼠,7 d 后抽取腹水,经 D-Hanks 液洗涤后离心,并调整细胞悬液密度为每毫升 5.0×10^6 个。在小鼠右腋皮下注射上述细胞悬液 0.2 mL,建立 H₂₂ 肝癌小鼠模型。

1.3.2 分组及给药

造模后将小鼠按体重随机分为 4 组,分别为模型组、龙胆苦苷低、高剂量组(50 mg/kg、100 mg/kg)及阳性药物环磷酰胺组(20 mg/kg),每组 10 只;另选取 10 只健康小鼠,作为正常组。分组后第 2 天开始给药,龙胆苦苷低、高剂量组灌胃给药,每天一次;环磷酰胺组腹腔注射给药,隔天一次;正常组及模型组灌胃等体积的生理盐水。给药周期为 14 d,记录造模前及治疗 14 d 后的各组小鼠体重。

1.3.3 瘤重、抑瘤率、胸腺指数和脾指数测定

在末次给药后 24 h,各组小鼠采用颈椎脱臼法处死。剥离肿瘤组织及胸腺、脾,滤纸拭去表面残余血液后,电子天平精密称重。按下式分别计算抑瘤率、胸腺指数和脾指数。

抑瘤率(%) = (模型组瘤重 - 给药组瘤重 / 模型组瘤重) $\times 100\%$

胸腺指数(mg/10 g) = 胸腺重 / 体重

脾指数(mg/10 g) = 脾重 / 体重

1.3.4 ELISA 法测定各组小鼠血清 IFN- γ 及 IL-2 含量

各组小鼠在处死前,取血,分离血清。按照

ELISA 检测试剂盒说明书中的操作步骤,分别检测各组小鼠血清 IFN- γ 及 IL-2 含量。

1.3.5 蛋白免疫印迹法测定各组小鼠瘤组织相关蛋白表达

采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行目的蛋白的分离。电泳完成后,常规操作转膜,其中兔抗鼠 bFGF、TGF- β 、VEGF、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 及 β -actin 抗体,均为 1:1000 倍稀释,二抗为 1:2000 倍稀释。采用电化学发光法显色并拍照,蛋白条带灰度值经 Image J 软件分析后,计算各组目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行分析与统计,所得数据均用“平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,独立样本 t 检验用于两组数据比较,单因素方差分析用于多组数据比较。 $P<0.05$,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 龙胆苦苷对各组小鼠体重变化的影响

造模前各组小鼠体重无明显变化($P>0.05$);治疗 14 d 后,与正常组及 H₂₂ 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠体重无明显变化($P>0.05$),而环磷酰胺组小鼠体重明显降低($P<0.01$)。结果见表 1。

2.2 龙胆苦苷对各组小鼠瘤重及抑瘤率的影响

与 H₂₂ 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤重均明显降低($P<0.01$),龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠的抑瘤率分别为 30.43%、42.93%及 69.2%。结果见表 2。

表 1 龙胆苦苷对各组小鼠体重变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of gentiopicroside on body weight of mice in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	体重(g) Body weight	
		造模前 Before model establishment	治疗 14 d 后 After 14 d treatment
正常组 Normal group	/	20.04 $\pm$ 2.42	32.72 $\pm$ 3.57
模型组 Model group	/	19.86 $\pm$ 2.39	33.53 $\pm$ 4.06
龙胆苦苷低剂量组 Gentiopicroside low does group	50	19.67 $\pm$ 1.87	31.61 $\pm$ 3.32
龙胆苦苷高剂量组 Gentiopicroside high does group	100	20.25 $\pm$ 2.18	30.87 $\pm$ 3.13
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	20	20.13 $\pm$ 1.95	22.41 $\pm$ 2.86 ^{b,d}

注:与正常组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^d $P<0.01$.

2.3 龙胆苦苷对各组小鼠胸腺指数和脾指数的影响

与正常组比较,H₂₂肝癌模型组小鼠胸腺指数及脾指数无明显变化($P>0.05$),龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数及脾指数明显升高($P<0.01$),而环磷酰胺组小鼠胸腺指数及脾指数明显降低($P<0.01$);与 H₂₂肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数及脾指数明显升高($P<0.01$),而环磷酰胺组小鼠胸腺指数及脾指数明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 3。

2.4 龙胆苦苷对各组小鼠血清 IFN- γ 及 IL-2 含量的影响

与正常组比较,H₂₂肝癌模型组、龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠血清 IFN- γ 、IL-2 含量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 H₂₂肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠血清 IFN- γ 、IL-2 含量明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而环磷酰胺组小鼠血清 IFN- γ 、IL-2 含量明显降低($P<0.01$)。结果见表 4。

2.5 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- β 及 VEGF 表达的影响

与 H₂₂肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- β 及 VEGF 表达均明显降低($P<0.01$)。结果见图 1 和表 5。

2.6 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达的影响

与 H₂₂肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠 p-PI3K 及 p-Akt 表达均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 2 和表 6。

表 2 龙胆苦苷对各组小鼠瘤重及抑瘤率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of gentiopicroside on tumor weight and tumor inhibition rate of mice in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	瘤重(g) Tumor weight	抑瘤率(%) Tumor inhibition rate
正常组 Normal group	/	/	/
模型组 Model group	/	1.84 $\pm$ 0.23	/
龙胆苦苷低剂量组 Gentiopicroside low does group	50	1.28 $\pm$ 0.15 ^d	30.43
龙胆苦苷高剂量组 Gentiopicroside high does group	100	1.05 $\pm$ 0.12 ^d	42.93
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	20	0.57 $\pm$ 0.06 ^d	69.2

注:与模型组比较,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the model group, ^d $P<0.01$.

表 3 龙胆苦苷对各组小鼠胸腺指数和脾指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effects of gentiopicroside on thymus index and spleen index of mice in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	胸腺指数 (mg/10 g) Thymus index	脾指数 (mg/10 g) Spleen index
正常组 Normal group	/	10.72±1.26	43.53±5.15
模型组 Model group	/	9.26±1.10	41.12±4.64
龙胆苦苷低剂量组 Gentiopicroside low does group	50	15.48±1.28 ^{b,d}	51.16±6.24 ^{b,d}
龙胆苦苷高剂量组 Gentiopicroside high does group	100	17.55±1.32 ^{b,d}	62.64±5.96 ^{b,d}
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	20	5.31±0.67 ^{b,d}	36.19±4.03 ^{b,c}

注:与正常组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

表 4 龙胆苦苷对各组小鼠血清 IFN- γ 及 IL-2 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effects of gentiopicroside on serum IFN- γ and IL-2 contents of mice in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	干扰- γ (mmol/L) IFN- γ	白细胞介素-2 (mmol/L) IL-2
正常组 Normal group	/	57.94±6.74	110.27±12.24
模型组 Model group	/	40.53±4.06 ^b	48.59±5.17 ^b
龙胆苦苷低剂量组 Gentiopicroside low does group	50	46.56±5.48 ^{b,c}	81.10±9.14 ^{b,d}
龙胆苦苷高剂量组 Gentiopicroside high does group	100	51.88±5.4 ^{a,d}	94.31±11.83 ^{b,d}
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	20	23.35±2.65 ^{b,d}	36.08±4.52 ^{b,d}

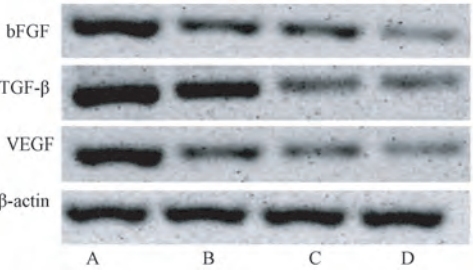
注:与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

表 5 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- β 及 VEGF 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effects of gentiopicroside on the expressions of bFGF, TGF- β and VEGF in tumor tissues of mice in each group

组别 Groups	剂量(mg/kg) Dose	碱性成纤维生长 因子/ β -肌动蛋白 bFGF/ β -actin	转化生长因子- β / β -肌动蛋白 TGF- β / β -actin	血管内皮生长因子/ β -肌动蛋白 VEGF/ β -actin
模型组 Model group	/	1.08±0.11	1.12±0.14	0.96±0.09
龙胆苦苷低剂量组 Gentiopicroside low does group	50	0.46±0.05 ^d	0.81±0.10 ^d	0.73±0.08 ^d
龙胆苦苷高剂量组 Gentiopicroside high does group	100	0.38±0.04 ^d	0.60±0.07 ^d	0.35±0.04 ^d
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	20	0.21±0.02 ^d	0.52±0.06 ^d	0.28±0.04 ^d

注:与模型组比较,^d $P<0.01$ 。
Note. Compared with the model group, ^d $P<0.01$.



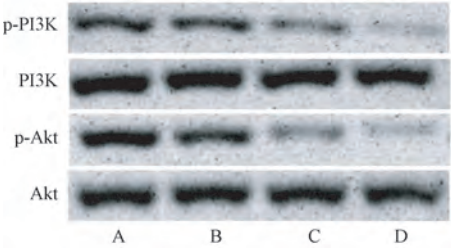
注:A:模型组;B:龙胆苦苷低剂量组;C:龙胆苦苷高剂量组;D:环磷酰胺组。

图 1 蛋白免疫印迹法检测龙胆苦苷对

各组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- β 及 VEGF 表达的影响

Note. A, Model group. B, Gentiopicroside low does group. C, Gentiopicroside high does group. D, Cyclophosphamide group.

Figure 1 Effects of gentiopicroside on the expressions of bFGF, TGF- β and VEGF in tumor tissues of mice in each group by Western blot



注:A:模型组;B:龙胆苦苷低剂量组;C:龙胆苦苷高剂量组;D:环磷酰胺组。

图 2 蛋白免疫印迹法检测龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达的影响

Note. A, Model group. B, Gentiopicroside low does group. C, Gentiopicroside high does group. D, Cyclophosphamide group.

Figure 2 Effects of gentiopicroside on the expressions of p-PI3K and p-Akt in tumor tissues of mice in each group by Western blot

表 6 龙胆苦苷对各组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Effects of gentiopicroside on the expressions of p-PI3K and p-Akt in tumor tissues of mice in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶/磷脂酰肌醇-3 激酶 p-PI3K/PI3K	磷酸化蛋白激酶 B/蛋白激酶 B p-Akt/Akt
模型组 Model group	/	0.84±0.09	1.27±0.14
龙胆苦苷低剂量组 Gentiopicroside low dose group	50	0.72±0.08 ^c	0.95±0.11 ^d
龙胆苦苷高剂量组 Gentiopicroside high dose group	100	0.43±0.05 ^d	0.56±0.06 ^d
环磷酰胺组 Cyclophosphamide group	20	0.31±0.03 ^d	0.35±0.04 ^d

注:与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。Note. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

3 讨论

肝癌起病隐匿,多数患者被确诊时已处于晚期,失去了手术治疗的良机。传统中药由于毒副作用低、疗效确切,具有多靶点、多途径等优势,在肝癌治疗领域逐渐引起了人们的关注^[8]。本研究选择的阳性药物环磷酰胺为临床治疗肝癌常用的化疗药物,具有抑制肿瘤生长及抗血管生成作用,免疫抑制、骨髓抑制等毒副作用较常见^[9]。本研究结果发现,与 H₂₂ 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠的瘤重均降低,提示龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠的肿瘤生长具有抑制作用;同时,龙胆苦苷低、高剂量组小鼠胸腺指数及脾指数升高,而环磷酰胺组小鼠胸腺指数及脾指数降低,提示龙胆苦苷的抗肿瘤作用与提高免疫力有关。IFN- γ 与 IL-2 等细胞因子在调节免疫以及肿瘤免疫反应调节中起重要作用,与非特异性免疫系统中的 NK 细胞关系密切^[10]。INF- γ 具有广泛的免疫调节作用,是一种高效的抗肿瘤生物活性物质,可由活化的 T 淋巴细胞产生^[11]。IL-2 能诱导机体抗肿瘤免疫反应,是肿瘤免疫治疗的重要细胞因子;IL-2 也可以直接使瘤体消退或停止生长,从而达到抗肿瘤作用^[12]。H₂₂ 肝癌小鼠经治疗后,与 H₂₂ 肝癌模型组比较,龙胆苦苷组小鼠血清 IFN- γ 及 IL-2 含量均升高,而环磷酰胺组小鼠血清 IFN- γ 及 IL-2 含量降低,上述结果进一步表明,龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长的抑制作用与增加血清 IFN- γ 、IL-2 含量有关。

新生血管的生成一方面可以为肿瘤细胞的转移提供通道,另一方面也可以为肿瘤的持续生长提供营养支持,对肿瘤的发生、发展及转移具有重要意义^[13]。血管生成是一个多因子参与的复杂调控

过程,抑制血管生成是抗肿瘤药物研究的重要方向,羟基红花黄色素 A 及人参皂苷 Rg3 等都可以抑制 H₂₂ 肝癌小鼠血管生成,进而发挥抗肝癌作用^[14-15]。bFGF、TGF- β 及 VEGF 等是肿瘤新生血管形成的标志蛋白,其中 bFGF 能够刺激内皮细胞内纤维蛋白酶和胶原蛋白酶的生成,进而促进新血管的生成;TGF- β 主要的作用为促进内皮细胞的增殖与分化,是肿瘤恶化的重要指标;VEGF 是最有效的促血管生成因子,对淋巴管的形成、血管的渗漏以及内皮细胞的增殖均有促进作用^[16-17]。多项研究已证实^[18-19],降低 bFGF、TGF- β 及 VEGF 表达可以有效抑制血管生成。本研究结果同样发现,与 H₂₂ 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤组织 bFGF、TGF- β 及 VEGF 表达均降低,提示龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠血管生成具有抑制作用。PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要的信号转导途径,阻断该通路的激活可以下调 bFGF、TGF- β 及 VEGF 的表达,进而抑制血管新生^[20-22]。本研究结果发现,与 H₂₂ 肝癌模型组比较,龙胆苦苷低、高剂量组及环磷酰胺组小鼠瘤组织 p-PI3K 及 p-Akt 表达均降低,表明龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠血管生成的抑制作用与抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

综上所述,本研究证实龙胆苦苷对 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤生长及血管生成均有抑制作用,该作用与提高免疫力,增加血清 IFN- γ 、IL-2 含量及抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

参考文献:

- [1] 朱笑生,刘文超.原发性肝癌全球流行情况和危险因素的新进展[J].现代肿瘤医学,2018,26(14):2297-2301.
- [2] 白芸,李永臻,祁艳娟,等.黄芪多糖联合 5-FU 对肝癌 HepG2 细胞 EMT 转化的影响[J].中国比较医学杂志,2021,

- 31(2): 8-15.
- [3] 李生浩, 李俊义, 武昆利, 等. 龙胆苦苷的药理作用及分子机制研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(1): 158-162.
- [4] Li X, Yang C, Shen H. Gentiopicroside exerts convincing antitumor effects in human ovarian carcinoma cells (SKOV3) by inducing cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of cell migration [J]. J BUON, 2019, 24(1): 280-284.
- [5] 赵忠伟, 韩鹏. 龙胆苦苷对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(24): 6082-6083.
- [6] 高天勤, 李欣, 董圣军, 等. 龙胆苦苷对人上皮性卵巢癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响及机制 [J]. 山东医药, 2019, 59(11): 22-25.
- [7] Huang XJ, Li J, Mei ZY, et al. Gentiopicroside and sweroside from *Veratilla baillonii* Franch. induce phosphorylation of Akt and suppress Pck1 expression in hepatoma cells [J]. Biochem Cell Biol, 2016, 94(3): 270-278.
- [8] Ma L, Wang B, Long Y, et al. Effect of traditional Chinese medicine combined with western therapy on primary hepatic carcinoma: A systematic review with meta-analysis [J]. Front Med, 2017, 11(2): 191-202.
- [9] 黄天敏, 杨映霞, 张宏亮, 等. 蛞蝓提取物对环磷酰胺治疗肝癌的增效减毒作用 [J]. 中国药房, 2021, 32(1): 17-23.
- [10] 王小蔓, 卢玉婷, 潘虹虹. 人参提取液对妇科肿瘤患者的血清 IL-2、IFN- γ 浓度及淋巴细胞亚群的影响 [J]. 实用预防医学, 2017, 24(12): 1443-1445.
- [11] Li N, Jilisihan B, Wang W, et al. Soluble LAG3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8⁺T cell frequency and secretion of IL-12 and INF- γ in peripheral blood [J]. Cancer Biomark, 2018, 23(3): 341-351.
- [12] Wrangle JM, Patterson A, Johnson CB, et al. IL-2 and Beyond in cancer immunotherapy [J]. J Interferon Cytokine Res, 2018, 38(2): 45-68.
- [13] 平晓芳, 崔锡梅, 陈伟, 等. 木犀草素对黑色素瘤 B16 细胞系生长、转移及血管生成拟态形成的抑制作用研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52(6): 401-407.
- [14] 张静宇, 杨芳芳, 李京敏, 等. 羟基红花黄色素 A 抑制 H₂₂ 小鼠肝癌移植瘤血管生成及减少 MMP-3 的表达 [J]. 基础医学与临床, 2017, 37(1): 71-75.
- [15] 王爱红, 赵菊梅, 杜娟, 等. 人参皂苷 Rg3 联合顺铂抑制小鼠肝细胞癌转移及微血管生成的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 82-87.
- [16] Lund EL, Thorsen C, Pedersen MW, et al. Relationship between vessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in small cell lung cancer *in vivo* and *in vitro* [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(11): 4287-4291.
- [17] Yang J, Wang Y, Zeng Z, et al. Smad4 deletion in blood vessel endothelial cells promotes ovarian cancer metastasis [J]. Int J Oncol, 2017, 50(5): 1693-1700.
- [18] 李黎, 吴勉华, 周红光, 等. 消癌解毒方对 H₂₂ 荷瘤小鼠血管生成相关因子的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(7): 1378-1383.
- [19] 邢天容, 吕敬媛, 朴英兰, 等. 沙利度胺联合放疗对宫颈癌裸鼠移植瘤的 VEGF、bFGF、TNF- α 表达的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(16): 3038-3042.
- [20] Zhang J, Song H, Lu Y, et al. Effects of estradiol on VEGF and bFGF by Akt in endometrial cancer cells are mediated through the NF- κ B pathway [J]. Oncol Rep, 2016, 36(2): 705-714.
- [21] Baek SH, Ko JH, Lee JH, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- β -Induced EMT of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation [J]. J Cell Physiol, 2017, 232(2): 346-354.
- [22] 李磊, 高绚照, 马连萍, 等. 积雪草苷通过激活 PI3K/Akt 信号通路缓解局灶性脑梗死大鼠脑组织损伤和诱导血管新生 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(17): 2068-2072, 2078.

[收稿日期] 2020-12-24

曾江琴,孙勤国,徐鸿婕,等. 小陷胸汤对高血脂小鼠血管内皮的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 48-53.
Zeng JQ, Sun QG, Xu HJ, et al. Protective effect of Xiaoxianxiong Decoction on vascular endothelium in hyperlipidemia mice [J].
Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 48-53.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.008

小陷胸汤对高血脂小鼠血管内皮的保护作用

曾江琴¹,孙勤国¹,徐鸿婕¹,丁晓明¹,牟艳杰¹,蒋跃文^{2*}

(1.武汉市第三医院中医科,武汉 430060;2.湖北中医药大学,武汉 430061)

【摘要】 目的 探讨小陷胸汤对高血脂症(hyperlipemia,HLP)小鼠血管内皮损伤的影响。**方法** 选用 36 只 C57BL/6 小鼠,随机分为对照组,模型组,低剂量组(0.03 g/mL 小陷胸汤)、中剂量组(0.06 g/mL 小陷胸汤)、高剂量组(0.12 g/mL 小陷胸汤)和洛伐他丁组(2.5 mg/kg 洛伐他丁),每组 6 只,通过高脂饲料喂养 8 周建立 HLP 模型并予以相应药物进行干预。给药期间观察各组小鼠一般行为学状态,每周称重一次;HE 染色观察主动脉血管组织病理学变化;免疫组化法检测小鼠主动脉组织血管假性血友病因子(von Willebrand factor,vWF)的表达;qRT-PCR 检测小鼠主动脉组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、酪氨酸蛋白激酶 Eph 受体 B4(Eph receptor B4,EphB4)及其胞膜附着型配体 B2(EphrinB2)的 mRNA 水平;Western blot 检测小鼠主动脉组织 VEGF、EphB4 和 EphrinB2 蛋白水平。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠活动量和摄食量减少,毛发较差,体重增加,主动脉组织中 vWF、VEGF、EphB4、EphrinB2 表达水平升高;与模型组相比,小陷胸汤各剂量组和洛伐他丁组小鼠活动量和摄食量增加,毛发光亮,体重减少,主动脉组织中 vWF、VEGF、EphB4、EphrinB2 表达水平降低($P<0.05$);与低剂量组比较,中、高剂量组小鼠主动脉组织中 VEGF、EphB4 和 EphrinB2 mRNA 及蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论** 小陷胸汤可抑制 HLP 的发展,对小鼠血管内皮具有保护作用。

【关键词】 小陷胸汤;高血脂症;血管内皮

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0048-06

Protective effect of Xiaoxianxiong Decoction on vascular endothelium in hyperlipidemia mice

ZENG Jiangqin¹, SUN Qinguo¹, XU Hongjie¹, DING Xiaoming¹, MOU Yanjie¹, JIANG Yuewen^{2*}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China.

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061)

【Abstract】 Objective To explore the effect of Xiaoxianxiong Decoction on vascular endothelial injury in mice with hyperlipidemia (Hyperlipemia, HLP). **Methods** Thirty-six C57BL/6 mice were randomly divided into control, model, low dose group (0.03 g/mL Xiaoxianxiong Decoction), medium dose (0.06 g/mL Xiaoxianxiong Decoction), high dose group (0.12 g/mL Xiaoxianxiong Decoction), and Lovastatin (2.5 mg/kg lovastatin) groups. Six rats in each group were fed a high fat diet for 8 weeks to establish the HLP model and administered corresponding drugs for treatment. During the administration period, the general behavioral state of mice in each group was observed and mice were weighed once a week. HE staining was used to observe histopathological changes of aortic vessels. Immunohistochemistry was used to detect expression of von Willebrand factor (vWF) in aortic tissues of mice. qRT-PCR was used to measure mRNA levels of

[基金项目] 武汉市卫生计生委科研计划资助项目(WZ18A01)。

[作者简介] 曾江琴(1978—),女,硕士,副主任医师,研究方向:经方防治重大疾病的理论与实验研究。E-mail:29271737@qq.com

[通信作者] 蒋跃文(1980—),男,博士,副教授,研究方向:经方防治重大疾病的理论与实验研究,心脑血管方向。

E-mail: hbwhjyw@126.com

vascular endothelial growth factor (VEGF), EPH receptor B4 (EphB4), and Ephrin-B2 (EphrinB2) in aortic tissues of mice. Western blot was used to measure the protein levels of VEGF, EphB4, and EphrinB2 in aortic tissues of mice.

Results Compared with the control group, the activity and food intake of mice in the model group was decreased, hair was poor, weight had increased, and the expression levels of vWF, VEGF, EphB4, and EphrinB2 were increased in aortic tissue. Compared with the model group, the activity and food intake of mice in each dose group of Xiaoxianxiong Decoction and the Lovastatin group were increased, hair was brighter, weight was reduced, and the expression levels of vWF, VEGF, EphB4, and EphrinB2 were decreased in aortic tissue ($P < 0.05$). Compared with the low dose group, mRNA and protein expression levels of VEGF, EphB4, and EphrinB2 were decreased in medium and high dose groups ($P < 0.05$).

Conclusions Xiaoxuai decoction inhibits the development of HLP and protects the vascular endothelium of mice.

【Keywords】 Xiaoxianxiong Decoction; Hyperlipidemia; Vascular endothelium

高脂血症(hyperlipidemia, HLP)是一种因体内血脂水平过高引发的全身性脂质代谢紊乱疾病^[1],常见于中老年人,隐匿性强,没有明显的临床症状,但长期得不到改善会诱发冠心病、动脉粥样硬化等一系列心脑血管疾病^[2-3]。有研究表明,HLP 极易损伤血管内皮细胞,造成血管内皮功能障碍,进而加重心脑血管疾病^[4]。中医认为,HLP 的核心发病机制为痰瘀阻络^[5-6],以化痰祛瘀通络方能向愈^[7]。小陷胸汤由黄连、瓜蒌、半夏三味药组成,黄连降火结热,瓜蒌润燥涤垢,半夏散结豁痰,合之以清热化痰、宽胸散结^[8-9]。本研究采用高脂饲料喂养制作小鼠 HLP 模型,初步探索小陷胸汤对 HLP 小鼠血管内皮的保护作用,以期为 HLP 的临床防治提供一定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

36 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,5 周龄,体重 20~22 g,于 SPF 级条件下饲养。小鼠由三峡大学实验动物中心[SCXK(鄂)2017-0012],动物实验在武汉华联科生物技术有限公司动物中心进行[SYXK(鄂)2018-0104],饲养温度 22℃~26℃,相对湿度 50%~60%,循环光照。本研究动物实验方案合理,符合实验动物的“3R”原则,经武汉华联科生物技术有限公司伦理审查委员会批准(HLK-20190106-01)。

1.2 主要仪器与试剂

小陷胸汤由黄连 3 g,瓜蒌 30 g,半夏 12 g 三方组成,武汉市第三医院中药房提供。使用传统方法经浸泡、煎煮、过滤、浓缩等步骤制成煎剂,分别调制成每毫升含生药 0.03 g、0.06 g、0.12 g 汤剂,低温冷藏待用。

洛伐他丁(上海阿拉丁生化科技股份有限公

司,中国,批号:Lot#c1925105);高脂饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司,中国,批号:D12492);苏木精、伊红、中性树脂、DAB 显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,中国,批号:G1140、E8090、G8590、DA1010-2);蛋白质 Marker(thermo,美国,批号:26634);RIPA(强)组织细胞快速裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、兔抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体、兔抗酪氨酸蛋白激酶 Eph 受体 B4(EPH receptor B4, EphB4)及其胞膜附着型配体 B2(Ephrin-B2, EphrinB2)抗体(bioswamp,中国,批号:W1689、W1712、PAB43958、PAB33625、PAB41809);SYBR Green PCR 试剂盒(KAPA Biosystems,美国,批号:KM4101);逆转录试剂盒(TaKaRa,中国,批号:639505)。

正置显微镜、石蜡切片机(Leica,德国,型号:DM1000);生物组织包埋机(湖北泰维科技实业股份有限公司,中国,型号:TB-718D);自动组织脱水机(湖北康强医疗器械有限公司,型号:TKD-TSF);酶标仪(Ladysystems,美国,型号:MK3);电泳仪(BIO-RAD,美国,型号:mini protean 3 cell);PCR 仪(杭州柏恒科技有限公司,中国,型号:GE48527)。

1.3 实验方法

1.3.1 HLP 小鼠模型的建立、分组和给药

适应性喂养 7 d 后,对照组 6 只采用正常饲料喂养,剩余小鼠采用高脂饲料喂养 8 周。将高脂饲料喂养的小鼠随机分为 5 组:模型组(0.5 mL 生理盐水)、低剂量组(0.03 g/mL 小陷胸汤)、中剂量组(0.06 g/mL 小陷胸汤)、高剂量组(0.12 g/mL 小陷胸汤)和阳性对照组(2.5 mg/kg 洛伐他丁),每组 6 只,给予相应药物灌胃治疗,每日 1 次。每天观察大鼠的毛发状态、摄食量、饮水量、活动量等变化,每周测一次体重。8 周后,采用 1%戊巴比妥钠麻醉后取血,分离血清,处死小鼠,收集脾、肝(称重)、主动

脉血管组织,保存待测。

1.3.2 HE 染色观察

将小鼠主动脉组织固定,脱水,包埋成蜡块,切至 3 μm ,切片脱蜡,复水,水洗;苏木精染色 3~6 min,水洗;1%盐酸乙醇 1~3 s,水洗;促蓝液返蓝 5~10 s,冲洗 15~30 min;0.5%伊红染色 2~3 min,水洗;80%乙醇 15~30 s,95%乙醇 15~30 s;无水乙醇 1~3 s;二甲苯透明,中性树脂固封;显微镜下拍照观察。

1.3.3 免疫组化染色观察

主动脉血管组织制作切片,脱蜡至水,自来水冲洗 10 min;0.01 mol/L 柠檬酸钠高压修复 20 min,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;3% H_2O_2 湿盒孵育 10 min,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;10%山羊血清湿盒孵育 30 min,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;滴加兔抗血管假性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;室温下修复 40 min,PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次;滴加 maxvision 二抗,湿盒孵育 1 h,PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次;DAB 染色,自来水冲洗;苏木素复染 3 min,1%盐酸乙醇分化,自来水冲洗,乙醇脱水后二甲苯透明 3 min $\times$ 2 次,封片;显微镜下拍照观察,分别测量出血管组织中阳性区面积、阳性区积分光密度,计算阳性区域平均光密度值(average optical density, AOD)=阳性区积分光密度/阳性区面积。

1.3.4 Western blot 检测

提取主动脉组织蛋白并定量,取 20 μg 蛋白置于 80 V 下预电泳 40 min,再在 120 V 下电泳 50 min;采用湿转转膜的方式在 90 V 下转膜 50 min,5%脱脂奶粉封闭 2 h;滴加兔抗 EphB4 抗体(1:1000)、兔抗 EphrinB2 抗体(1:1000)、兔抗 VEGF 抗体(1:500)和膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBST 洗涤 5 min $\times$ 3 次;加二抗室温孵育 1 h;PBST 洗涤 5 min $\times$

3 次,滴加 ECL 发光液显影,读取灰度值。

1.3.5 qRT-PCR 检测

取主动脉组织样本,按照试剂盒说明书步骤提取总 RNA 并进行反转录扩增,以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR,反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 25 s,39 个循环。见表 1。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行数据的统计分析,计量数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析法分析多组间的差异, $P<0.05$ 表示差异显著,有统计学意义;采用 Leica Application Suite 图象系统采集主动脉血管组织图片。

2 结果

2.1 小鼠一般状态及体重变化

给药期间,正常组小鼠摄食量、饮水量和活动量均正常,毛发光亮;模型组小鼠摄食量和活动量减少,毛发较差。低、中、高剂量组和洛伐他丁组小鼠行为状态有所好转。

如表 2 所示,与对照组比较,8 周末模型组小鼠体重显著增加($P<0.05$);与模型组比较,8 周末小陷胸汤各剂量组、洛伐他丁组均有显著性降低($P<0.05$)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
EphB4-F	CCTCACTATTCTGCTTTTCG
EphB4-R	AGATTTTCTTCTGCTGCTCCT
EphrinB2-F	ATTCAGCCCTAACCTCT
EphrinB2-R	GTCTTGTGGACCGTG
VEGF-F	GACCAAAGAAAGACAGAAC
VEGF-R	GCAGGAACATTACACG
GAPDH-F	CCTCCGTGTTCTCTAC
GAPDH-R	GACAACCTGGTCTCTCA

表 2 小鼠体重的变化(g)

Table 2 Changes of body weight in mice

分组 Groups	0 周 0 week	2 周 2 week	4 周 4 week	6 周 6 week	8 周 8 week
对照组 Control group	22.08 $\pm$ 0.44	24.55 $\pm$ 1.21	25.45 $\pm$ 1.19	27.55 $\pm$ 1.72	28.80 $\pm$ 1.74
模型组 Model group	21.17 $\pm$ 1.40	25.92 $\pm$ 1.07 [*]	28.20 $\pm$ 0.24 [*]	30.43 $\pm$ 0.47 [*]	32.13 $\pm$ 0.34 [*]
低剂量组 Low-dose group	20.98 $\pm$ 0.46	23.47 $\pm$ 0.68 [#]	24.38 $\pm$ 0.83 [#]	26.02 $\pm$ 1.29 [#]	26.02 $\pm$ 1.59 [#]
中剂量组 Medium-dose group	22.30 $\pm$ 0.68	24.88 $\pm$ 1.29	25.67 $\pm$ 1.55 [#]	26.77 $\pm$ 0.90 [#]	27.43 $\pm$ 0.60 [#]
高剂量组 High-dose group	21.10 $\pm$ 0.78	23.03 $\pm$ 0.64 [#]	24.28 $\pm$ 0.74 [#]	25.10 $\pm$ 0.92 [#]	25.58 $\pm$ 1.02 [#]
洛伐他丁组 Lovastatin group	21.20 $\pm$ 0.91	23.20 $\pm$ 1.23 [#]	24.05 $\pm$ 1.11 [#]	24.48 $\pm$ 1.23 [#]	24.55 $\pm$ 1.19 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.

2.2 小鼠主动脉血管组织病理形态学观察

如图 1 所示,对照组小鼠主动脉组织外、中、内三层结构清晰完整,排列紧密有序;模型组主动脉内膜增厚,中层平滑肌细胞排列紊乱,弹力纤维出现明显断裂;低、中、高剂量组和洛伐他丁组内皮组织结构及状态均有不同程度改善。

2.3 小陷胸汤对 HLP 小鼠主动脉组织 vWF 含量的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠主动脉 vWF 表达显著增加($P<0.05$);与模型组比较,小陷胸汤中、高剂量组和洛伐他丁组 vWF 表达显著减少($P<0.05$)。

2.4 小陷胸汤对 HLP 小鼠主动脉组织中 EphB4、EphrinB2 和 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响

如图 3 和图 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠 EphB4、EphrinB2、VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,低、中、高剂量组和洛伐他丁组小鼠 EphB4、EphrinB2、VEGF mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与低剂量组比较,中剂量和高剂量组小鼠主动脉组织中 EphB4、EphrinB2、VEGF mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

HLP 是导致动脉粥样硬化的重要病理基础,也是造成心脑血管病变的主要因素,严重危害着人类的身体健康。血管内皮功能障碍与众多心血管疾病关系密切^[10]。血管内皮细胞是血液和管壁组织之间的第一通透性屏障,在抗凝、抗血小板聚集和维持血液通道等方面发挥作用。长期高血脂会促

进内皮细胞产生自由基,氧化生物膜内的不饱和脂肪酸,导致内皮细胞损伤,引起内皮细胞功能障碍^[11]。因此,治疗 HLP 应重视对血管内皮细胞功能的改善。小陷胸汤最早出自张仲景的《伤寒论》,取黄连、半夏、瓜蒌入药,此方辛开苦降^[12],具有清热化痰、宽胸散结之功。本研究以 HLP 小鼠模型为研究对象,证明了各剂量的小陷胸汤可不同程度改善 HLP 小鼠的饮食量和活动量,也显著改善了小鼠主动脉内皮结构损伤、平滑肌细胞排列紊乱程度,提示小陷胸汤对 HLP 小鼠血管内皮具有保护作用。

vWF 是一种由内皮细胞和单核细胞产生的多聚糖蛋白,正常生理状态下储存在胞质内的 Weibel-palade 小体中,内皮细胞受到损伤时会释放过量的 vWF,激活血小板,引发血栓的形成^[13],因此 vWF 被认为是内皮受损的特异性标志物^[14]。在本研究中,HLP 小鼠 vWF 表达明显增加,提示高血脂造成内皮细胞损伤,而经小陷胸汤治疗可以下调 vWF

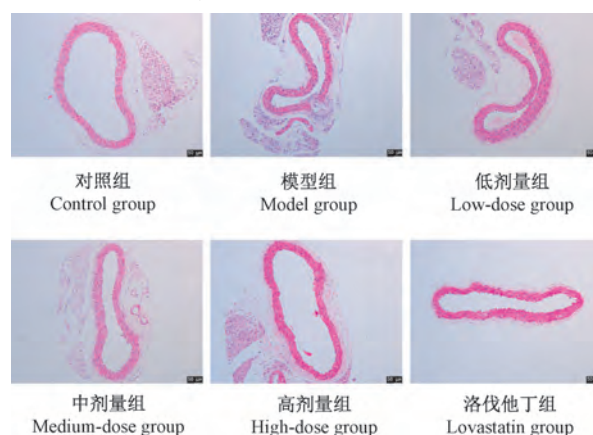
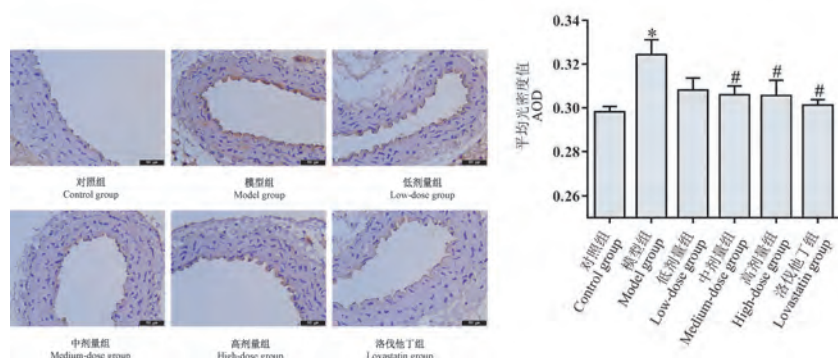


图 1 小鼠主动脉 HE 染色

Figure 1 HE staining of aorta in mice

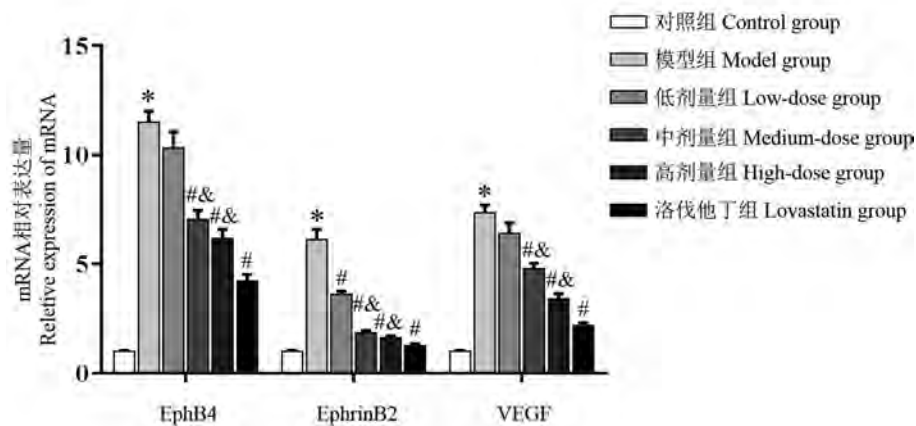


注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图 2 小鼠主动脉组织中 vWF 的表达

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

Figure 2 Expression of vWF in aorta of mice



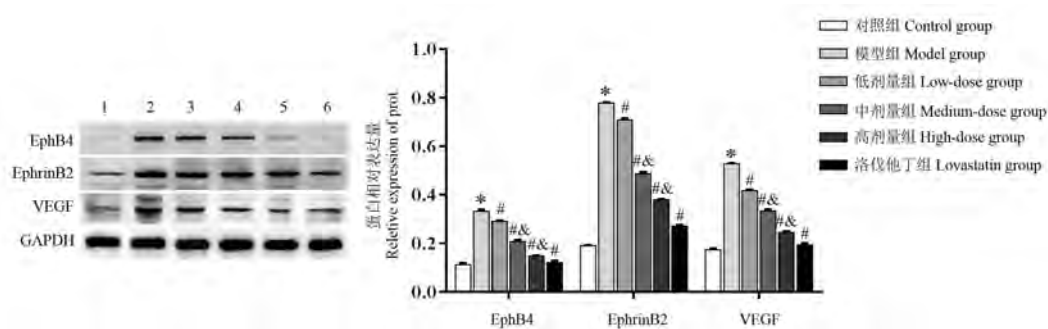
注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$;与低剂量组比较, & $P < 0.05$ 。

图3 小鼠主动脉组织中 EphB4、EphrinB2 和 VEGF 的 mRNA 水平

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

Compared with the low-dose group, & $P < 0.05$.

Figure 3 Levels of EphB4, EphrinB2 and VEGF mRNA in aorta of mice



注:1:对照组;2:模型组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;6:洛伐他丁组。与对照组比较,

* $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$;与低剂量组比较, & $P < 0.05$ 。

图4 小鼠主动脉组织中 EphB4、EphrinB2 和 VEGF 蛋白的表达

Note. 1, Control group. 2, Model group; 3, Low-dose group. 4, Medium-dose group. 5, High-dose group. 6, Lovastatin

group. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the low-

dose group, & $P < 0.05$.

Figure 4 Expression of EphB4, EphrinB2 and VEGF protein in aorta of mice

的表达,提示小陷胸汤能缓解内皮细胞的损伤。

EphB4/EphrinB2 双向信号通路在血管新生中的意义重大,EphB4 在静脉内皮细胞上特异性地表达,而 EphrinB2 特异性地表达在动脉内皮细胞上^[15]。蔡金等^[16]通过清脑益髓调督法电针治疗急性脑梗死发现,该法通过上调 EphrinB2 表达,促进血管新生进而对脑梗死起到治疗的作用。Noren 等^[17]研究表明,在 MOPC315 肿瘤模型中,新生血管内皮细胞表达的磷酸化 EphrinB2 表达量较高,其与肿瘤细胞表达的 EphB4 相互作用并促进血管的新生。VEGF 是血管新生的主要调控因子,能够促进血管内皮细胞的有丝分裂。张振强等^[18]研究表明

HLP 病理条件会刺激大鼠脑组织 VEGF 的表达以促进新生血管的形成。研究表明,高血脂症诱发机体内源性保护的机制之一是促进血管的生成^[19],因此可通过促进血管生成因子的变化判断高血脂症导致的血管内皮损伤的程度。在本研究结果中,HLP 小鼠 EphB4、EphrinB2 和 VEGF mRNA 水平增加,提示高血脂症诱发了机体内源性保护,促进血管的生成,小陷胸汤治疗后的 HLP 小鼠中 EphB4、EphrinB2 和 VEGF mRNA 及蛋白表达水平下降,且中、高剂量组 EphB4、EphrinB2 和 VEGF mRNA 及蛋白表达水平显著低于低剂量组,存在一定的剂量依赖性,提示新生血管减少,进一步提示小陷胸汤能

改善高血脂症引起的病理反应,抑制高血脂症的发展。

综上所述,通过高血脂症导致的小鼠行为变化、主动脉血管组织病变程度及各因子表达水平可判断小陷胸汤具有缓解高血脂症诱导病理反应,改善血管内皮损伤的功效,后续可进一步分析其具体的机制。

参考文献:

- [1] 李月英, 钱义明. 中医药治疗高脂血症的研究进展 [J]. 按摩与康复医学, 2013, 12: 17-18.
- [2] 朱铁梁, 杨波, 郭一沙, 等. 黄连素对高脂血症大鼠降血脂及抗氧化作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(4): 369-372.
- [3] 邱巧丽, 苏洁, 陈素红, 等. 复方白术提取物对高脂血症大鼠脂质代谢、血液流变学和微循环的影响 [J]. 中成药, 2016, 38(7): 1437-1443.
- [4] 王彤, 李京. 中药红曲煎剂治疗高血脂症及其对血管内皮保护作用影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 119-121.
- [5] 张振强, 贾亚泉, 王自闯, 等. 化痰通络汤预先灌胃的合并高脂血症脑缺血大鼠神经系统功能、脑组织病理变化观察 [J]. 山东医药, 2018, 58(43): 47-50.
- [6] 冯利民, 李立凤, 杜武勋, 等. 高脂血症基本病机与证型规律研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3101-3103.
- [7] 吴昊, 蔡少杭. 血脂异常的中医药研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2013, 30(3): 221-224.
- [8] 韩晓春, 张成博, 马婷, 等. 基于网络药理学的小陷胸汤功效机制研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42(6): 539-543.
- [9] 张保国, 刘庆芳. 经方小陷胸汤药理学研究与临床应用 [J]. 中成药, 2012, 34(11): 2206-2210.
- [10] Kedziora-Kornatowska K, Czuczejko J, Pawluk H, et al. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension [J]. Cell Mol Biol Lett, 2004, 9(4): 635-641.
- [11] Shin HS, Han JM, Kim HG, et al. Anti-atherosclerosis and hyperlipidemia effects of herbal mixture, *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Curcuma longa* Linne, in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(1): 142-150.
- [12] 张利民, 邹莲霞, 巫祖强, 等. 小陷胸汤对糖尿病前期痰湿蕴热质患者胰岛素抵抗指数及 β 细胞功能的影响 [J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(4): 52-55.
- [13] Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(7): 1335-1342.
- [14] 陈路, 方红城, 张志杰, 等. 血脂康对高血压合并高血脂患者血管内皮功能的影响 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(24): 72-74.
- [15] 颜坚, 彭细峰, 蔡玉莲, 等. sEphB4 对糖尿病视网膜病变兔模型视网膜血管内皮细胞 EphB4/EphrinB2 和 VEGF 表达的影响 [J]. 中国医药科学, 2018, 8(7): 51-54.
- [16] 蔡金, 唐朝政, 朱广旗, 等. 清脑益髓调督法对 MCAO 大鼠脑组织中 ephrinB2 mRNA 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1777-1780.
- [17] Noren NK, Foos G, Hauser CA, et al. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(8): 815-825.
- [18] 张振强, 宋军营, 贾亚泉, 等. 高脂血症对脑缺血大鼠血管调节因子的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(2): 127-132.
- [19] 张振强, 贾亚泉, 宋军营, 等. 高脂血症对大鼠脑组织 MMP-2 表达及新生血管的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2013, 48(5): 609-612.

[收稿日期] 2021-01-26

刘逍遥,范琼尹,高健,等. 关于黄褐斑动物模型的复制与思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 54-60.

Liu XY, Fan QY, Gao J, et al. Preparation and reflection on animal models of melasma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 54-60.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.009

关于黄褐斑动物模型的复制与思考

刘逍遥¹, 范琼尹², 高 健², 苏泽琦^{2,3}, 张晶璇², 赵保胜², 朱佩轩¹, 王 停^{2,3*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029;

3. 国家中医药管理局 名医方重点实验室, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察不同种属和造模方法对黄褐斑动物模型的影响, 为成功复制符合黄褐斑临床病症特点的动物模型提供思路借鉴。**方法** 使用 SD 大鼠, KM 小鼠以及 C57BL/6 小鼠复制黄褐斑动物模型。其中 SD 大鼠, 随机分为正常组和黄体酮高、中、低剂量造模组 (25 mg/kg, 15 mg/kg 和 7.5 mg/kg), KM 小鼠, 随机分为正常组和黄体酮高、低剂量造模组 (30 mg/kg, 20 mg/kg), 造模组分别于后肢根部肌内注射黄体酮注射液, 正常组于相同部位注射与高剂量造模组等体积的生理盐水, 连续 30 d。此外, C57BL/6 小鼠, 随机分为正常组、紫外线联合黄体酮造模组和紫外线造模组, 紫外线联合黄体酮造模组后肢根部肌内注射 20 mg/kg 的黄体酮注射液, 每日一次, 同时每 2 d 进行一次紫外线照射, 紫外线组每天肌内注射等体积生理盐水, 每 2 d 进行一次紫外线照射, 正常组注射等体积生理盐水, 不做紫外干预, 连续 21 d。各组造模结束后取病变局部皮肤组织做 HE 染色和 Masson-Fontana 染色, 光镜下观察黑色素颗粒变化情况。**结果** 与正常组相比, SD 大鼠和 KM 小鼠造模组黑色素未见明显变化, C57BL/6 小鼠造模组黑色素颗粒明显增多。**结论** 黄体酮单独干预 SD 大鼠和 KM 小鼠等白化鼠难以模拟黄褐斑黑色素沉着的典型临床表现, C57BL/6 小鼠是一个建立黄褐斑模型相对可靠的动物品系, 利用紫外线联合黄体酮以及单独紫外线照射的方法均能成功复制 C57BL/6 小鼠黄褐斑动物模型。

【关键词】 黄褐斑; 动物模型; C57BL/6 小鼠; 黄体酮; 紫外线

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0054-07

Preparation and reflection on animal models of melasma

LIU Xiaoyao¹, FAN Qiongyin², GAO Jian², SU Zeqi^{2,3}, ZHANG Jingxuan², ZHAO Baosheng², ZHU Peixuan¹,
WANG Ting^{2,3*}

(1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

2. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029.

3. Key Laboratory of Famous Doctors and Famous Prescriptions Under State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective To observe the effects of different animal breeds and modeling method on animal models of melasma, and provide ideas for the successful preparation of animal models exhibiting the clinical features of melasma. **Methods** Animal models of melasma were prepared using SD rats, and KM and C57BL/6 mice. The SD rats were randomly divided into a normal group and high, medium and low dose progesterone groups (25, 15 and 7.5 mg/kg, respectively). KM mice were randomly divided into a normal group, and high-dose and low-dose progesterone groups (30 and 20 mg/kg, respectively). Animals in the treated groups were injected with progesterone in the main muscle of the hind

【基金项目】 北京中医药大学横向课题项目 (2019110031001241)。

【作者简介】 刘逍遥 (1994—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 体病相关与慢病防控研究。E-mail: 20180931082@bucm.edu.cn

【通信作者】 王停 (1973—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中药新药研发研究。E-mail: wangting1973@sina.com

leg. Animals in the normal group were injected with the same volume of normal saline at the same site as the high-dose group for 30 consecutive days. In addition, C57BL/6 mice were randomly divided into normal, ultraviolet-progesterone model and ultraviolet model groups. In the ultraviolet-progesterone group, 20 mg/kg progesterone was injected into the main muscle of the hind leg once a day, and ultraviolet light was given once every two days. The ultraviolet group received intramuscular injections of normal saline at the same volume and frequency and with similar ultraviolet irradiation treatment, while the normal group received the same volume of normal saline without ultraviolet treatment for 21 consecutive days. After treatment, local skin tissue samples from each group were taken for hematoxylin-eosin and Masson-Fontana staining, and changes to melanin particles were observed under light microscopy. **Results** Compared with the normal groups, no significant changes in melanin were observed in the SD rats and KM mice, while significantly more melanin particles was observed in C57BL/6 mice. **Conclusions** The typical clinical manifestations of chloasma are difficult to simulate by progesterone treatment alone in albino rodents, such as SD rats and KM mice. C57BL/6 mice provide a relatively reliable animal strain for the establishment of melasma models. Animal melasma models using C57BL/6 mice can be successfully established by means of ultraviolet exposure combined with or without progesterone treatment.

【Keywords】 melasma; animal models; C57BL/6 mice; progesterone; ultraviolet

黄褐斑是一种获得性黑色素沉着性皮肤病,常见于中青年女性,以面部淡褐色至深褐色界限清楚的斑片为主要临床表现^[1]。因其多发于面部,严重影响患者容貌、心理和社交,已经成为女性身心健康的一大杀手^[2]。黄褐斑病因病机复杂,确切发病机制尚不清楚,且其临床研究有一定的局限性,因此通过模拟临床发病过程而建立黄褐斑动物模型是研究黄褐斑疾病的重要方法之一。

目前认为,黄褐斑可能与紫外线辐射、口服避孕药以及女性性激素水平变化等因素有关^[3-5],根据“雌激素和黄体酮增多进而刺激黑色素细胞而致色素沉着”的发病假说以及“日光照射是黄褐斑发生发展的重要因素”等^[6],常采用紫外线照射、肌内注射黄体酮注射液以及紫外线照射联合肌内注射黄体酮注射液的方法建立黄褐斑动物模型。但在黄体酮注射剂量、紫外线照射参数以及动物品系的选择等方面尚存在一定的争议,使目前建立的动物模型方法种类较多,尚未建立统一的模型制备方法。因此,本文通过采用肌内注射不同剂量黄体酮的方法建立 SD 大鼠和 KM 小鼠黄褐斑模型,以及通过紫外线照射和紫外线照射联合黄体酮的方法建立 C57BL/6 小鼠黄褐斑模型,综合探讨造模方法、黄体酮注射剂量以及动物品种等因素对黄褐斑成模的影响,以期研究黄褐斑的发病机制以及黄褐斑动物模型建立提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 20 只,SPF 级,体重(200±20)g,健康雌性 KM 小鼠 15 只,SPF 级,体重(20±

2)g,均由北京维通利华生物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0011][SCXK(京)2016-0006];健康雌性 C57BL/6 小鼠 9 只,SPF 级,六周龄,体重(16~18)g,由北京斯贝福实验动物有限公司提供[SCXK(京)2019-0010]。所有动物均饲养于北京中医药大学屏障环境动物饲养室[SYXK(京)2016-0038],室内温度 20℃~25℃,相对湿度 40%~60%,光照周期明暗各 12 h,动物饲养期间可自由摄食和饮水,实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会审查(BUCM-2019081901-3056),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

脱毛膏(广州宏莱生物科技有限公司,国妆特字 G20160106);10%福尔马林中性组织固定液(南昌雨露实验器材有限公司,中国);电动宠物剃毛器(宁波神剑电器制造有限公司);黄体酮注射液(浙江仙琚制药有限公司,批号:181210);苏木素-伊红(HE)染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:20200508);Masson-Fontana 黑色素染色液(北京雷根生物技术有限公司,货号:DJ0021-3*50ML);生理盐水(辰欣药业股份有限公司,批号 1902180724);多功能电子天平(BSA323S,德国 Satorius 公司);分体式包埋机(EG1150,德国 Leica 公司);半自动轮转式切片机(RM2245,德国 Leica 公司);病理图像采集系统(BX53-DP26,日本 OLYMPUS 公司);光学显微镜(OlyPus BX4,中国上海赖氏电子科技有限公司);窄谱 311 紫外线光疗仪(SH1B,上海希格玛高技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 黄体酮注射剂量、动物品种对黄褐斑动物模型的影响

动物适应性饲养 7 d 后,将 20 只 SD 大鼠按照体重随机分为 4 组:正常组以及黄体酮高、中、低剂量造模组,每组 5 只;15 只 KM 小鼠按体重随机分为 3 组:正常组以及黄体酮高、低剂量造模组,每组 5 只。于实验前 24 h 将所有动物脊柱两侧及靠臀部皮肤用剃毛器脱毛后,用温和型脱毛膏脱毛,脱毛面积 2 cm×2 cm。脱毛后背部皮肤光洁正常、没有刺激性,之后每周脱毛 1 次,以免影响观察。

SD 大鼠实验中黄体酮高、中、低剂量造模组分别在 SD 大鼠后肢根部肌内注射黄体酮注射液 25 mg/kg、15 mg/kg、7.5 mg/kg,每日一次,两后肢交替注射,连续注射 30 d,正常组注射与高剂量黄体酮造模组等体积的生理盐水。KM 小鼠实验中黄体酮高、低剂量造模组分别在 KM 小鼠后肢根部肌内注射黄体酮注射液 30 mg/kg、20 mg/kg,每日一次,两后肢交替,连续 30 d,正常组注射与黄体酮高剂量造模组等体积的生理盐水。实验动物分组及造模剂量见表 1。

表 1 SD 大鼠、KM 小鼠实验动物分组与给药剂量表

实验动物 Experimental animals		组别 Groups	剂量 Doses
SD 大鼠 SD rats		正常组 Normal group	/
		黄体酮高剂量造模组 High-dose progesterone modeling group	25 mg/kg
		黄体酮中剂量造模组 Medium-dose progesterone modeling group	15 mg/kg
		黄体酮低剂量造模组 Low-dose progesterone modeling group	7.5 mg/kg
KM 小鼠 KM mice		正常组 Normal group	/
		黄体酮高剂量造模组 High-dose progesterone modeling group	30 mg/kg
		黄体酮低剂量造模组 Low-dose progesterone modeling group	20 mg/kg

表 2 C57BL/6 小鼠实验动物分组及造模安排表

Table 2 Grouping and modeling schedule of C57BL/6 mice

组别 Groups	黄体酮注射液 Progesterone injections	紫外线照射 Ultraviolet exposure	生理盐水 Physiological saline solution
正常组 Normal group	/	/	0.01 mL/10 g
紫外线联合黄体酮造模组 UV combined progesterone modeling group	0.01 mL/10 g(20 mg/kg)	30 s	/
紫外线造模组 UV modeling group	/	30 s	0.01 mL/10 g

1.3.2 造模方法对黄褐斑动物模型的影响

动物适应性饲养 7 d 后,将 9 只 C57BL/6 小鼠按照体重随机分为正常组、紫外线造模组以及紫外线联合黄体酮造模组,每组 3 只。紫外线造模组与紫外线照射联合黄体酮造模组于实验第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 天下午 15:00-17:00 用紫外线光疗仪照射 30 s,紫外线灯管距脱毛后的皮肤表面约为 2 cm,紫外灯管辐照面积为 11×2 cm²,正常组不做紫外干预。照射紫外线 30 min 前,紫外线联合黄体酮造模组在小鼠后肢根部肌内注射 20 mg/kg 的黄体酮注射液,紫外线造模组和正常组注射等体积生理盐水,每天一次,共 21 d。实验分组、黄体酮注射剂量以及紫外线照射剂量见表 2,紫外线照射时间安排见图 1。

1.3.3 皮肤组织病理学观察

实验第 22 天,C57BL/6 小鼠取血后,取耳部、背部新鲜皮肤组织(1.0 cm×1.0 cm),放入 10%中性福尔马林固定 24 h 后,脱水,常规石蜡包埋,连续 3 μm 厚切片两张,一张用于 HE 染色,另一张用于 Masson-Fontana 特殊染色,中性树胶封片后,光学显微镜下观察,并以 40×的最终放大倍数对切片进行拍照;实验第 31 天 SD 大鼠用 1%戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉采血、KM 小鼠取血,处死动物后取背部新鲜皮肤组织(1.0 cm×1.0 cm),用同样的方法进行组织病理学观察。

2 结果

2.1 黄体酮注射剂量、动物品种对黄褐斑动物模型背部皮肤组织 HE 染色结果的影响

HE 染色条件下,黑色素细胞多呈棕黄色或棕褐色。造模后 SD 大鼠、KM 小鼠背部皮肤组织 HE 染色,光学显微镜下观察,正常组和黄体酮各剂量造模组背部皮肤表皮基层层均未观察到明显的黑色素颗粒,见图 2。

2.2 黄体酮注射剂量、动物品种对黄褐斑动物模型背部皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果的影响

Masson-Fontana 黑色素染色下,黑色素颗粒呈黑色。造模后 SD 大鼠、KM 小鼠背部皮肤组织进行 Masson-Fontana 黑色素染色,光学显微镜下观察,正常组和黄体酮高剂量造模组背部皮肤表皮基底层均未观察到明显的黑色素颗粒,结果见图 3。

2.3 造模方法对黄褐斑动物模型皮肤组织 HE 染色结果的影响

光学显微镜下观察 C57BL/6 小鼠耳部、背部皮肤组织 HE 染色结果,造模后正常组背部皮肤表皮基底层可观察到散在分布的黑色素颗粒,紫外线联合黄体酮造模组和紫外线组背部皮肤表皮基底层黑色素颗粒较正常组明显增多;造模后正常组耳部

皮肤组织表皮基底层可观察到散在分布的黑色素颗粒,紫外线联合黄体酮造模组和紫外线造模组可观察到明显的黑色素颗粒,HE 染色结果见图 4。

2.4 造模方法对黄褐斑动物模型皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果的影响

光学显微镜下观察 C57BL/6 小鼠耳部、背部皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果,造模后正常组背部皮肤表皮基底层可以观察到极少数量的黑色素颗粒,紫外线联合黄体酮造模组和紫外线组背部皮肤表皮基底层黑色素颗粒较正常组明显增多;造模后正常组耳部皮肤组织表皮基底层可以观察到散在分布的黑色素颗粒,紫外线联合黄体酮造模组和紫外线造模组可以观察到明显的黑色素颗粒,Masson-Fontana 染色结果见图 5。

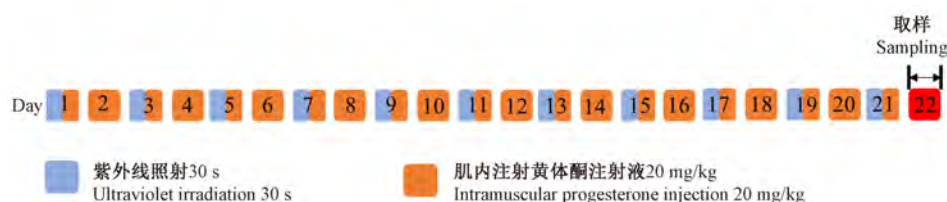
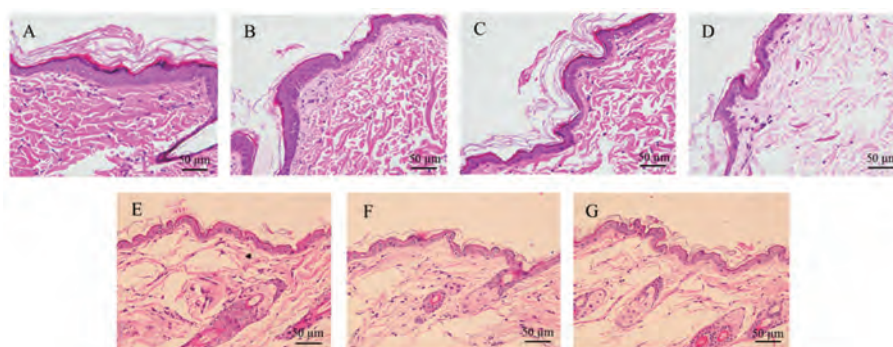


图 1 紫外线照射及黄体酮注射时间安排

Figure 1 Schedule of UVB exposure and progesterone injection

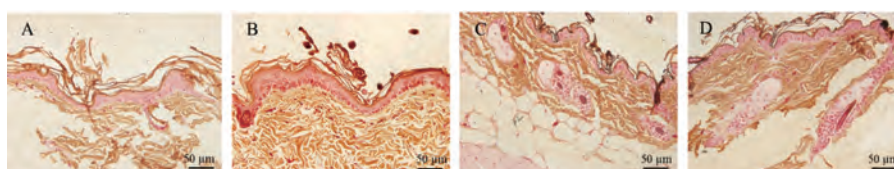


注:A-D:SD 大鼠正常组、黄体酮高、中、低剂量造模组;E-G:KM 小鼠正常组、黄体酮高、低剂量造模组。

图 2 SD 大鼠、KM 小鼠背部皮肤组织 HE 染色结果

Note. A-D, Normal group, high, medium and low dose progesterone model group in the SD rats. E-G, Normal group, the high-dose and low-dose progesterone model group in the KM mice.

Figure 2 Results of HE staining of dorsal skin tissues of SD rats and KM mice

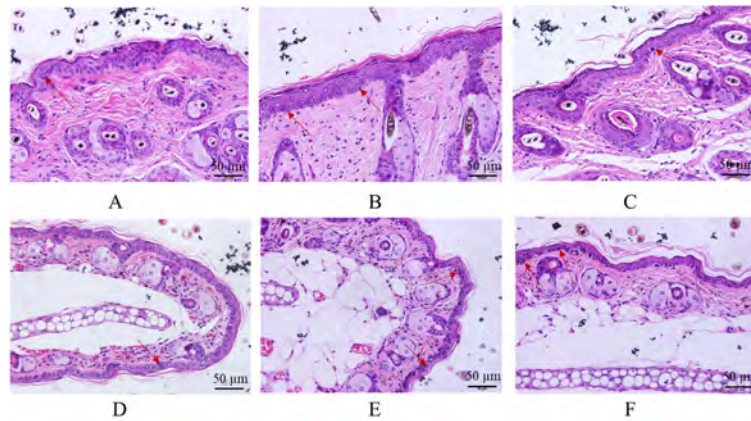


注:A:SD 大鼠正常组;B:SD 大鼠黄体酮高剂量造模组;C:KM 小鼠正常组;D:KM 小鼠黄体酮高剂量造模组。

图 3 SD 大鼠、KM 小鼠背部皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果

Note. A, Normal group in the SD rats. B, High-dose progesterone modeling group in the SD rats. C, Normal group in the KM mice. D, High-dose progesterone modeling group in the KM mice.

Figure 3 Results of Masson-Fontana staining of dorsal skin tissues of SD rats and KM mice

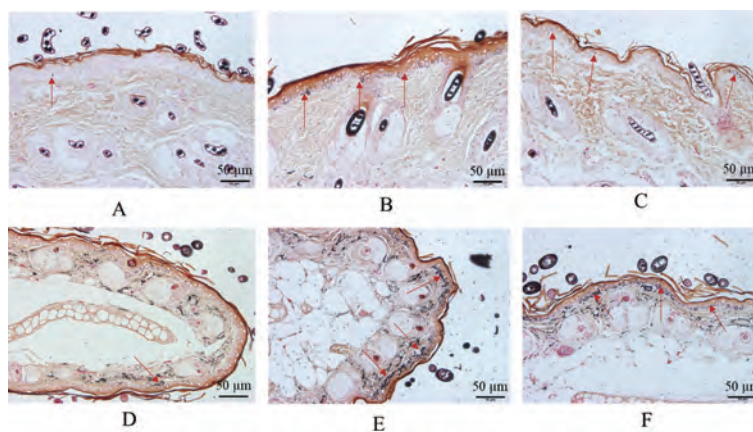


注:A-C:正常组、紫外线联合黄体酮造模组以及紫外线造模组背部皮肤组织 HE 染色结果;D-F:正常组、紫外线联合黄体酮造模组以及紫外线造模组耳部皮肤组织 HE 染色结果,图中箭头所示为黑色素颗粒。

图 4 C57BL/6 小鼠背部、耳部皮肤组织 HE 染色结果

Note. A-C, Results of HE staining of skin tissues on the back of the normal group, UV combined progesterone modeling group and UV modeling group, respectively. D-F, Results of HE staining of skin tissues on the ears of the normal group, UV combined progesterone modeling group and UV modeling group, respectively, with melanin particles shown as arrows in the figure.

Figure 4 HE staining results of skin tissue on the back and ear of C57BL/6 mice



注:A-C:正常组、紫外线联合黄体酮造模组以及紫外线造模组背部皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果;D-F:正常组、紫外线联合黄体酮造模组以及紫外线造模组耳部皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果,图中箭头所示为黑色素颗粒。

图 5 C57BL/6 小鼠背部、耳部皮肤组织 Masson-Fontana 染色结果

Note. A-C, Results of Masson-Fontana staining of skin tissues on the back of the normal group, UV combined progesterone modeling group and UV modeling group, respectively. D-F, Results of Masson-Fontana staining of skin tissues on the ears of the normal group, UV combined progesterone modeling group and UV modeling group, respectively, with melanin particles shown as arrows in the figure.

Figure 5 Masson-Fontana staining results of skin tissue on the back and ear of C57BL/6 mice

3 讨论

黑色素是由皮肤组织表皮基底层黑色素细胞中的酪氨酸在酪氨酸酶以及酪氨酸酶相关蛋白的催化作用下形成的一种生物色素,是决定皮肤颜色的主要因素,在抵御紫外线等有害刺激中起着重要的防御作用,但当黑色素生成过多或黑色素的代谢出现异常时,过多的黑色素由黑色素细胞向上迁移,最终积累在皮肤表面,造成肉眼可见的黑色素,黄褐斑便是一种因皮肤中黑色素异常累积形成的

疾病^[7]。

目前,国内学者在建立黄褐斑动物模型时多选择 KM 小鼠和 SD 大鼠等动物品种^[8],在造模方法上,多根据其与紫外线辐射、内分泌等因素有关而采用紫外线照射、肌注黄体酮注射液等方法模拟疾病临床发病因素进行造模;而国外学者多采用 C57BL/6 小鼠、HRM-2 无毛鼠等动物品系,在造模方法上多使用紫外线照射^[9]。有文献报道,紫外线照射和黄体酮攻击的方法均可以成功建立黄褐斑动物模型^[10],日光中的紫外线作为一种外源性刺

激,能氧化破坏皮肤中的巯基(-SH)而提高酪氨酸酶的活性,酪氨酸酶在刺激黑色素细胞的分裂,增加单位面积内黑色素细胞数量的同时,也会促使黑色素细胞中黑素小体的分泌和移动扩散,最终引起皮肤色素沉着^[11-12];黄体酮可通过增加黑色素细胞数量和黑色素合成过程中关键酶的活性来增加黑色素^[13]。从造模原理上来看,紫外线能从病因和症状两个方面模拟黄褐斑的发病,黄体酮能够从病因角度模拟黄褐斑的发病,而紫外线联合黄体酮的方法在模拟太阳光照射的同时又增加了激素的影响,模拟了黄褐斑临床发病的多因性。关于黄褐斑动物模型的制备,我国虽出台了相应的草案^[6],但因草案中未明确指出动物的品系、紫外线的辐照强度等模型制备中的关键因素,对相关科研工作者带来了困扰,一定程度上影响了模型的复制,所以本研究通过复制国内外常见的几种模型,以期探索一种符合黄褐斑临床疾病特点的模式制备方法。

在黄褐斑动物模型的评价上,目前尚缺少公认的评价标准。因黄褐斑临床以面部斑块为主要表现,所以从表观指标上观察到局部皮肤的明显斑块是评价黄褐斑动物模型成功与否的重要指标,但因表观指标带有一定的主观性,且会受到灯光、像素以及动物皮肤表面污染等外界因素的干扰,在一定程度上限制了其的应用,相关文献研究表明仅有 33.65% 的文献涉及表观指标的分析^[8]。病理指标可从微观角度反映组织病理学变化,故局部组织病理学变化常常被用来评价黄褐斑动物模型或在动物水平评价药物治疗黄褐斑的疗效,是评价黄褐斑动物模型的金指标^[8,14]。在评价方法上,HE 染色可以看到局部皮肤组织的结构变化,但在该条件下黑色素通常呈黄棕色或棕褐色,不易与其它色素区分,而 Masson-Fontana 染色后可以清楚的看到呈黑色的黑色素,根据黄褐斑获得性色素沉着的疾病特点,目前多使用 HE 染色、Masson-Fontana 染色以及免疫组化等方法对局部皮肤中黑色素颗粒、黑色素细胞的数量以及相关蛋白的表达情况进行定性和定量分析^[8,15-16]。

3.1 黄体酮注射剂量对复制 SD 大鼠、KM 小鼠黄褐斑模型的影响

根据国内模型多选用 SD 大鼠和 KM 小鼠以及多采用肌注黄体酮注射液建立黄褐斑模型的研究现状,本研究采用肌内注射黄体酮注射液,每天一次,连续 30 d 的方法复制 SD 大鼠、KM 小鼠黄褐斑动物模型。因黄体酮的注射剂量是影响模型成功与否的关键因素,而目前所建立的模型中,SD 大鼠

的注射剂量存在较多争议,常用剂量有 7.5 mg/(kg·d)^[17]、10 mg/(kg·d)^[10]、20 mg/(kg·d)^[18]和 25 mg/(kg·d)^[10],所以本研究同时设置了高、中、低(25 mg/(kg·d)、15 mg/(kg·d)、7.5 mg/(kg·d))三个剂量,在同一实验条件下探讨黄体酮剂量对 SD 大鼠黄褐斑模型的影响。通过文献调研,KM 小鼠的注射剂量比较一致,多为 20 mg/(kg·d)^[19-20],所以本研究仅探讨了高、低(30 mg/(kg·d)、20 mg/(kg·d))两个剂量黄体酮对模型的影响,以利于优化模型。

建模完成后,SD 大鼠和 KM 小鼠背部皮肤组织 HE 染色和 Masson-Fontana 染色结果显示,各组均未观察到明显的黑色素颗粒。我们推测出现这种现象的原因可能与造模方法或者动物品系的选择密切相关。有文献报道使用肌内注射 7.5 mg/(kg·d)的黄体酮注射液,连续 30 d 的方法建立了花豚鼠黄褐斑动物模型^[21],说明黄体酮造模方法的可行性。同时本研究根据文献中报道的常用剂量对黄体酮设置了多个浓度考察,因此也排除黄体酮注射剂量问题对造模的影响。

黑色素作为维持正常皮肤颜色的一种色素,正常组皮肤的表皮基底层也应该能看到少量黑色素颗粒,但本实验中正常 SD 大鼠和 KM 小鼠均未观察到黑色素表达。有研究表明白化鼠没有活跃的黑素细胞,不能用来研究色素斑、老年痣等色素沉着性疾病^[22],而 SD 大鼠和 KM 小鼠均属于白化鼠,因此种属可能是导致模型复制出现问题的原因。

3.2 不同造模方法对复制 C57BL/6 小鼠黄褐斑模型的影响

鉴于国外学者在动物水平研究黑色素时常使用紫外线照射的方法建立 C57BL/6 小鼠黄褐斑动物模型^[9,23],该品系动物不是白化病鼠,因此,本研究选用了 C57BL/6 小鼠,采用紫外线照射以及紫外线照射联合黄体酮的方法探讨造模方法对黄褐斑模型的影响,通过对比 C57BL/6 小鼠与 SD 大鼠、KM 小鼠的实验结果,也可以进一步说明动物品系对黄褐斑模型的影响。另外,因目前使用 C57BL/6 小鼠建立黄褐斑动物模型的观测部位多选择耳部,有研究表明 C57BL/6 小鼠的耳部皮肤较躯干皮肤含有更多的黑色素细胞^[23],所以本研究同时选取耳部、背部皮肤组织作为观察部位,以验证 C57BL/6 小鼠黑色素细胞表达的活跃部位。

造模后,正常组背部皮肤组织表皮基底层可以观察到散在分布的黑色素颗粒,正常组的耳部皮肤组织表皮基底层可以观察到明显的黑色素颗粒,利

用紫外线照射以及紫外线联合黄体酮的方法建立 C57BL/6 小鼠模型后,光学显微镜下观察小鼠背部和耳部皮肤组织 HE 染色和 Masson-Fontana 染色结果,各组均可以观察到黑色素颗粒的存在,且造模组的黑色素颗粒较正常组明显增多,耳部皮肤较背部皮肤更明显。此外,背部、耳部皮肤组织的 HE 染色和 Masson-Fontana 染色的结果提示,两种方法均可成功复制黄褐斑模型。

黄褐斑作为一种损容性疾病,其确切发病机制尚不清楚,临床发病率呈逐年递增趋势,所以深入研究黄褐斑对于明确其发生发展的病理学机制以及降低发病率具有重要的临床意义和社会价值。因病理指标是评价黄褐斑动物模型成功与否的金指标,而临床研究难以从组织病理学角度研究黄褐斑发生和发展,存在一定的局限性,所以基于动物模型研究黄褐斑的组织病理学变化,并在此基础上进行机制研究显得尤为重要。本研究结果显示,因黄褐斑是一种色素沉着性疾病,在复制疾病模型时,不建议选择 SD 大鼠、KM 小鼠等白化鼠,而 C57BL/6 小鼠因其耳部皮肤和背部皮肤均含有一定量的黑色素细胞,是一个较好的复制黄褐斑动物模型的动物品系。而在模型复制的方法上,利用紫外线联合黄体酮或者单独紫外线照射的方法均可建立黄褐斑模型,但模型的维持时间还有待进一步实验探索。今后,我们将从模型维持时间、紫外线不同照射剂量的对比研究、单独黄体酮复制 C57BL/6 小鼠模型以及各造模方法的原理等方面进一步探索,以期寻找更合适的造模方法,为黄褐斑的基础研究提供更多的实验数据支撑。

参考文献:

- [1] 穆志娟. 黄褐斑中医治疗研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(6): 762-763.
- [2] Maranzatto CF, Miot HA, Miot LD, et al. Psychometric analysis and dimensional structure of the Brazilian version of melasma quality of life scale (MELASQoL-BP) [J]. An Bras Dermatol, 2016, 91(4): 422-428.
- [3] Lee AY. Recent progress in melasma pathogenesis [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2015, 28(6): 648-660.
- [4] Ogbecchie-Godec OA, Elbuluk N. Melasma: an Up-to-date comprehensive review [J]. Dermatol Ther (Heidelb), 2017, 7(3): 305-318.
- [5] Hsieh PW, Hung CF, Lin CH, et al. Anti-melasma codrug of retinoic acid assists cutaneous absorption with attenuated skin irritation [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2017, 114: 154-163.
- [6] 苗明三, 付珍娜, 曹利华. 黄褐斑动物模型制备规范(草案) [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 649-653.
- [7] 张向娜. 茶叶中 EGCG、ECG 和 GCG 对 B16F10 细胞内黑色素生成的影响及机理研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [8] 武晏屹, 田硕, 苗明三. 基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 70-75.
- [9] You YJ, Wu PY, Liu YJ, et al. Sesamol inhibited ultraviolet radiation-induced hyperpigmentation and damage in C57BL/6 mouse skin [J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(7): 207.
- [10] 邓志博, 何施逸, 王乾力, 等. 两种方法建立 SD 大鼠黄褐斑模型的比较实验研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(15): 1993-1996.
- [11] 丁娜. 玉容面膜治疗黄褐斑的临床观察及其对豚鼠模型作用的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [12] 袁敏芳, 刘涛峰. 黄褐斑病因及发病机制的研究进展 [J]. 中医医药临床杂志, 2013, 25(1): 81-83.
- [13] Im S, Lee ES, Kim W, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes [J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(1): 58-64.
- [14] 刘逍遥, 王停, 朱佩轩, 等. 黄褐斑动物模型的研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 200-208.
- [15] Hwang E, Lee TH, Lee WJ, et al. A novel synthetic Piper amide derivative NED-180 inhibits hyperpigmentation by activating the PI3K and ERK pathways and by regulating Ca²⁺ influx via TRPM1 channels [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2016, 29(1): 81-91.
- [16] Hwang GY, Choung SY. Anti-melanogenic effects of Aster spathulifolius extract in UVB-exposed C57BL/6J mice and B16F10 melanoma cells through the regulation of MAPK/ERK and AKT/GSK3 β signalling [J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 68(4): 503-513.
- [17] 蒲春霞, 何海蓉. 大鼠黄褐斑动物模型的建立 [J]. 河北科技师范学院学报, 2013, 27(2): 66-69.
- [18] 王萍. 本草养颜膏治疗黄褐斑的实验研究 [J]. 中医研究, 2008, 21(7): 9-11.
- [19] 秦健, 李炜弘, 黄勤挽, 等. 加味圣愈膏对黄体酮所致黄褐斑模型小鼠肝脏和皮肤中 SOD 活力的影响 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 2(11): 2047.
- [20] 覃永健, 冷文婷. 白玉散局部外敷治疗黄褐斑机理的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 128-129.
- [21] 何盾, 吴芳兰, 徐晓凡, 等. 熊果苷对黄褐斑鼠模型治疗效果及机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(34): 6-10.
- [22] Naganumaa M, Yagi E, Fukuda M. Delayed induction of pigmented spots on UVB-irradiated hairless mice. [J]. J Dermatol Sci, 2001, 25(1): 29-35.
- [23] Kumar KJ, Vani MG, Wang SY, et al. In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: a novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases [J]. Biofactors, 2013, 39(3): 259-270.

[收稿日期] 2020-09-11

薛飞,董传莹,田莉,等. 芦荟大黄素调控 miR-30b 促进子宫内膜癌细胞自噬的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 61-67.

Xue F, Dong CY, Tian L, et al. Aloe emodin regulates miR-30b to promote autophagy in endometrial cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 61-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.010

芦荟大黄素调控 miR-30b 促进子宫内膜癌细胞自噬的研究

薛飞*, 董传莹, 田莉, 张春瑞

(郑州澍青医学高等专科学校临床医学系, 郑州 450000)

【摘要】 目的 探讨芦荟大黄素(AE)调控子宫内膜癌细胞 HEC-1-B 中 miR-30b 表达促进细胞自噬的作用机制。**方法** 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 miR-30b 在正常子宫内膜细胞和不同子宫内膜癌细胞株 HEC-1-A、HEC-1-B、RL95-2 中的表达水平。取 miR-30b 表达水平最高的 HEC-1-B 癌细胞分为 HEC-1-B 癌细胞组、miR-30b inhibitor NC 组(转染 miR-30b inhibitor NC)、miR-30b inhibitor 组(转染 miR-30b inhibitor)以及 AE 组(30 μ mol/L AE, 未转染)和 AE+转染组; AE+miR-30b mimics NC 组(30 μ mol/L AE, 转染 miR-30b mimics NC)、AE+miR-30b mimics 组(30 μ mol/L AE, 转染 miR-30b mimics)。qRT-PCR 法检测各组细胞 miR-30b 表达水平; CCK-8 法检测各组细胞增殖活性; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 单丹磺酰尸胺(MDC)荧光染色法检测各组细胞自噬率; 蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测各组细胞自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-I、LC3-II 和 p62 表达水平。**结果** 与人正常子宫内膜上皮细胞相比, HEC-1-A、HEC-1-B 和 RL95-2 癌细胞中 miR-30b 表达水平显著升高($P < 0.05$)。其中 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平最高, 所以后续将选择 HEC-1-B 癌细胞进行转染实验。与 HEC-1-B 癌细胞组和 miR-30b inhibitor NC 组相比, miR-30b inhibitor 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高($P < 0.05$)。与 HEC-1-B 癌细胞组相比, AE 组和 AE+miR-30b mimics NC 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高($P < 0.05$)。与 AE+miR-30b mimics NC 组相比, AE+miR-30b mimics 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), 细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著降低($P < 0.05$)。**结论** 子宫内膜癌细胞中 miR-30b 表达较高, AE 可能通过抑制 miR-30b 表达, 促进癌细胞自噬和凋亡, 抑制癌细胞增殖, 而过表达 miR-30b 可逆转 AE 发挥的作用。

【关键词】 芦荟大黄素; miR-30b; 子宫内膜癌细胞; 自噬; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0061-07

Aloe emodin regulates miR-30b to promote autophagy in endometrial cancer cells

XUE Fei*, DONG Chuanying, TIAN Li, ZHANG Chunrui

(Department of Clinical Medicine, Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of aloe emodin (AE) in promoting autophagy by regulating miR-30b expression in endometrial carcinoma cell line HEC-1-B. **Methods** The expression level of miR-30b in normal

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(16B320028)。

[作者简介] 薛飞(1986—), 男, 本科, 讲师, 研究方向: 普通外科。E-mail: xfsqoffice@163.com

endometrial cells and endometrial cancer cell lines HEC-1-A, HEC-1-B, and RL95-2 was measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). HEC-1-B cancer cells with the highest expression level of miR-30b were divided into a HEC-1-B cancer cell group, miR-30b inhibitor NC group (transfected with miR-30b inhibitor NC), miR-30b inhibitor group (transfected with miR-30b inhibitor), AE group (30 $\mu\text{mol/L}$ AE, untransfected), AE+transfection group: AE+miR-30b mimics NC group (30 $\mu\text{mol/L}$ AE, transfected with miR-30b mimics NC), and AE+miR-30b mimics group (30 $\mu\text{mol/L}$ AE, transfected with miR-30b mimics). The expression level of miR-30b, cell proliferation, apoptosis rate, and autophagy rate were determined by qRT-PCR, CCK-8 assays, flow cytometry, and monodansulfonyl cadaverine fluorescence staining respectively. Western blot was used to measure the protein expression levels of Beclin 1, LC3-I, LC3-II, and p62. **Results** Compared with normal human endometrial epithelial cells, expression levels of miR-30b were significantly higher in HEC-1-A, HEC-1-B, and RL95-2 cancer cells ($P < 0.05$). The expression level of miR-30b was the highest in HEC-1-B cancer cells. Thus, HEC-1-B cancer cells were selected for transfection experiments. Compared with HEC-1-B cancer cell and miR-30b inhibitor NC groups, the miR-30b inhibitor group had a significantly lower miR-30b expression level, cell proliferation rate, and p62 protein expression level ($P < 0.05$), and significantly higher apoptosis rate, autophagy rate, Beclin 1 protein expression level, and LC3-II/I ratio ($P < 0.05$). Compared with the HEC-1-B group, AE and AE+miR-30b mimics NC groups had significantly lower miR-30b expression levels, cell proliferation rates and p62 protein expression levels ($P < 0.05$), and a significantly higher apoptosis rate, autophagy rate, Beclin 1 protein expression level, and LC3-II/I ratio ($P < 0.05$). Compared with the AE+miR-30b mimics NC group, the AE+miR-30b mimics group had a significantly higher miR-30b expression level, cell proliferation rate, and p62 protein expression level ($P < 0.05$), and significantly lower apoptosis rate, autophagy rate, Beclin 1 protein expression level, and LC3-II/I ratio ($P < 0.05$). **Conclusions** Expression of miR-30b is high in endometrial carcinoma cells. AE may inhibit the expression of miR-30b, promote autophagy and apoptosis of cancer cells, and inhibit the proliferation of cancer cells. Overexpression of miR-30b reverses the effect of AE.

【Keywords】 aloe emodin; miR-30b; endometrial cancer cells; autophagy; proliferation; apoptosis

子宫内膜癌是来源于子宫内膜上皮细胞的恶性肿瘤,近年来,其发病率和死亡率持续上升,约占女性生殖道恶性肿瘤的 20%~30%,早期患者多为局限性病变,以手术治疗为主,但因早期常忽略不规则阴道排液和流血现象,易失去早期诊断的机会,而晚期及复发患者的治疗以放化疗为主的综合性治疗^[1]。芦荟大黄素 (aloe emodin, AE) 是一种天然的蒽醌衍生物,可从芦荟中提取,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、神经保护和肝保护等作用^[2]。研究发现,AE 不但能够诱导非小细胞肺癌的自噬和凋亡^[3],还能通过激活人胰腺癌细胞凋亡和自噬相关通路,破坏癌细胞线粒体膜电位,具有明显的抑癌作用^[4]。另有研究发现 AE 通过上调 miR-133 表达减轻心肌梗死和心肌细胞凋亡^[5]。而 miRNAs 是在真核生物中发现的长度约为 19~25 个核苷酸的非编码小 RNA,在转录后基因的表达调控中起重要作用^[6],其中,miR-30b 过表达可降低自噬相关标记基因的表达且直接靶向 Beclin1 基因^[7]。而 Beclin1 是第一个在哺乳动物中发现的与自噬相关的抑癌基因,是调控细胞自噬活性的关键靶点^[8]。但是,目前 AE 调控 miR-30b 对子宫内膜癌细胞自噬的研究尚未见报道。因此,本研究通过上调或抑制子宫内

膜癌细胞 HEC-1-B 中 miR-30b 表达,并使用 AE 培养该细胞,观察其对细胞生长及自噬的影响,旨在揭示 AE 调控 miR-30b 促进 HEC-1-B 癌细胞自噬的作用机制,为子宫内膜癌的治疗提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 细胞

人子宫内膜腺癌细胞株 HEC-1-A (目录号: TCHu149)、HEC-1-B (目录号: TCHu115)、RL95-2 (目录号: TCHu198) 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;人正常子宫内膜上皮细胞株由南方医科大学实验室赠与。

1.2 主要试剂与仪器

AE (纯度: HPLC $\geq 98\%$, 规格: 每瓶 20 mg, 货号: SA8200)、BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: PC0020) 和 ECL 显色试剂盒 (货号: SW2040) 均购自北京索莱宝生物科技有限公司;胰蛋白酶 (货号: 27250018)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; 货号: 16140071) 和 RPIM-1640 培养基 (货号: 72400120) 均购自美国 Gibco 公司;细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8; 货号: CK04) 购自上海复申生物科技有限公司;96 孔板 (货号: F600418) 购自上海

生工生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒(货号:DP431)购自北京天根生化科技有限公司;逆转录试剂盒(货号:QP056)购自美国 Genecopoeia 公司;miR-30b、U6 引物以及 miR-30b 模拟物(miR-30b mimics)、miR-30b 模拟物阴性对照(miR-30b mimics NC)、miR-30b 抑制物(miR-30b inhibitor)、miR-30b 抑制物阴性对照(miR-30b inhibitor NC)均由上海生工生物科技有限公司合成;蛋白 marker(货号:B2787-1VL)、 β -actin 鼠抗(货号:AB1970-100UL)和 PVDF 膜(货号:3010040001)均购自美国 Sigma 公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(货号:LHK601-020)购自嘉美生物技术有限公司;Lipofectamine 3000 转染试剂盒(货号:L3000015)购自美国 Invitrogen 公司;单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)荧光检测试剂盒(货号:KFS305)购自北京百奥莱博科技有限公司;Beclin1 兔多克隆抗体(货号:ab62557)、p62 兔单克隆抗体(货号:ab211324)、LC3-II 和 LC3-I 兔单克隆抗体(货号:ab221794)以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(货号:ab150077)均购自美国 Abcam 公司;酶标仪 Fax-20100 购自美国 INStat 公司;尼康 SMZ745 光学显微镜购自于上海普赫生物科技有限公司;FACSCanto 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司;徕卡倒置荧光显微镜 DMILLED 购自上海成贯仪器有限公司;全能型凝胶成像分析系统 ChemiDoc-MP 购自山东三瑞科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

分别将各个细胞株接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,放于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,使细胞呈单层贴壁生长。

1.3.2 qRT-PCR 检测正常子宫内膜细胞和子宫内膜癌细胞中 miR-30b 表达水平

使用 RNA 提取试剂盒分别提取正常子宫内膜细胞和子宫内膜癌细胞 HEC-1-A、HEC-1-B、RL95-2 细胞株的总 RNA,逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书配置 PCR 反应体系:2×SYBR mix 10 μ L, H₂O 8 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,10×cDNA 模板 1 μ L。反应条件设定为:94℃ 预变性 5 min、94℃ 变性 15 s、55℃ 退火 50 s、35 个循环、72℃ 延伸 10 min。以 U6 为内参,根据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 算法,计算 miR-30b 表达水平。

miR-30b 和 U6 引物序列见表 1。

1.3.3 细胞转染与分组

HEC-1-B 癌细胞随机分为 HEC-1-B 癌细胞组(正常培养,未转染)、miR-30b inhibitor NC 组(正常培养,转染 miR-30b inhibitor NC)、miR-30b inhibitor(正常培养,转染 miR-30b inhibitor)以及 AE 组(含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养^[9],未转染)、AE+miR-30b mimics NC 组(含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养,转染 miR-30b mimics NC)、AE+miR-30b mimics 组(含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养,转染 miR-30b mimics),当 HEC-1-B 癌细胞生长密度达 50%~60% 时,使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒转染细胞后分别进行正常培养或使用含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养,各组细胞继续培养 24 h 后,检测各项指标。

1.3.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性

收集各组细胞,调整细胞浓度为每毫升 1×10^5 个,每孔接种 100 μ L 至 96 孔板中,空白孔加入 100 μ L 培养基,在 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁,加入浓度为 10% 的 CCK-8 溶液,继续培养 2 h 后,于酶标仪上检测各孔在 450 nm 波长下的 OD 值。每组各设 6 个复孔。细胞增殖率(%)=(实验组 OD_{450nm}-空白组 OD_{450nm})/(对照组 OD_{450nm}-空白组 OD_{450nm})。

1.3.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

收集转染或培养 24 h 后的各组细胞,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 400 μ L 结合缓冲液悬浮细胞,再加入 5 μ L Annexin V 染液,轻轻混匀后于 2℃~8℃ 下避光孵育 15 min,然后加入 10 μ L PI 轻轻混匀,再次于 2℃~8℃ 避光孵育 5 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率,每组重复 6 次。

1.3.6 MDC 试剂盒检测各组细胞自噬率

取转染或培养 24 h 后的各组细胞,每组设置 6 个复孔重复,每孔取 2 mL 细胞悬液,800 r/min 离心 5 min,弃上清,1×Wash buffer 清洗细胞 1 次并重悬

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

引物名称 Name	序列(5'-3') Sequence
miR-30b	F:AGTCTATACAAGGCAAGCTCTC
	R:CCCAATACGACCAATCCGTT
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA
	R:AACGCTTCACGAATTGCGT

细胞,调整浓度为每毫升 1×10^5 个,各取 90 μL 细胞悬液至新的 EP 管中,加入 10 μL MDC 染液,轻轻混匀,室温避光孵育 30 min,然后 800 r/min 离心 5 min,弃上清,1 $\times$ Wash buffer 清洗细胞 2 次后,加入 100 μL collection buffer 重悬细胞滴加于载玻片上,盖上盖玻片,于荧光显微镜下观察(激发波长 355 nm,阻断波长 512 nm)并计数 MDC 阳性细胞(核周和胞浆出现高密度着色点),以 MDC 阳性细胞率表示细胞自噬率。

1.3.7 Western blot 法检测各组细胞中自噬相关蛋白表达水平

收集转染或培养 24 h 后的各组细胞,采用蛋白抽提试剂盒提取各组细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,依次进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转 PVDF 膜、5%脱脂奶粉封闭、1:2000 浓度稀释后的 Beclin1、p62、LC3-II 和 LC3-I 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育、置于含辣根过氧化物酶缀合的二抗 (1:5000) 中室温孵育 2 h、洗膜,用 ECL 试剂盒显色,全能型凝胶成像分析系统拍照,以 β -actin 为内参,分析各组蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

本研究所得数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 GraphPad Prism7.0 软件绘制条形图,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验;当 $P < 0.05$ 时,代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30b 在正常子宫内膜细胞和不同子宫内膜癌细胞株中的表达

与人正常子宫内膜上皮细胞 (1.00 ± 0.00) 相比,HEC-1-A、HEC-1-B 和 RL95-2 癌细胞中 miR-30b 表达水平分别为 (1.87 ± 0.19)、(2.14 ± 0.22)、(1.69 ± 0.17) 均显著升高 ($P < 0.05$)。其中 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平最高,所以后续将选择 HEC-1-B 癌细胞进行转染实验。

2.2 抑制 miR-30b 对 HEC-1-B 癌细胞增殖、凋亡及自噬的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组和 miR-30b inhibitor NC 组相比,miR-30b inhibitor 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高 ($P < 0.05$)。见

图 1、图 2。

2.3 AE 对 HEC-1-B 癌细胞 miR-30b 表达水平的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组 (1.00 ± 0.00) 相比,AE 组 (0.32 ± 0.04) 和 AE+miR-30b mimics NC 组 (0.35 ± 0.05) 癌细胞中 miR-30b 表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组 (1.17 ± 0.12) 癌细胞中 miR-30b 表达水平显著升高 ($n=6, P < 0.05$)。

2.4 AE 对 HEC-1-B 癌细胞增殖活性和凋亡的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组相比,AE 组和 AE+miR-30b mimics NC 组癌细胞增殖率显著降低,细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组癌细胞增殖率显著升高,细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

2.5 AE 对 HEC-1-B 癌细胞自噬率的影响

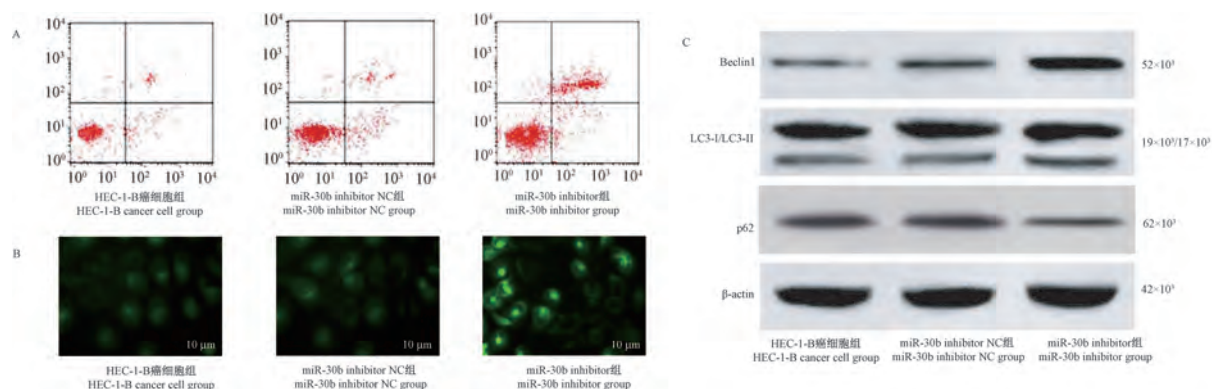
与 HEC-1-B 癌细胞组 (2.26 ± 0.29)% 相比,AE 组 (24.57 ± 2.51)% 和 AE+miR-30b mimics NC 组 (29.22 ± 3.20)% 癌细胞自噬率显著升高 ($P < 0.05$);与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组 (15.19 ± 1.71)% 癌细胞自噬率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 AE 对 HEC-1-B 癌细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组相比,AE 组和 AE+miR-30b mimics NC 组癌细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高,p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组癌细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著降低,p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 6、图 7。

3 讨论

子宫内膜癌好发于围绝经期与绝经后妇女,目前早期患者的 5 年生存率可达 80%~90%,但晚期患者预后较差,5 年生存率仅为 5%,确切病因仍不清楚,临床观察发现可能与雌激素对子宫内膜的长期持续刺激有关,还可能与子宫内膜增生、不育、晚绝经、家族史等有关^[10],其发病机制也较为复杂。因此探究子宫内膜癌具体发病机制对其后期治疗至关重要。本研究发现,与正常子宫内膜上皮细胞

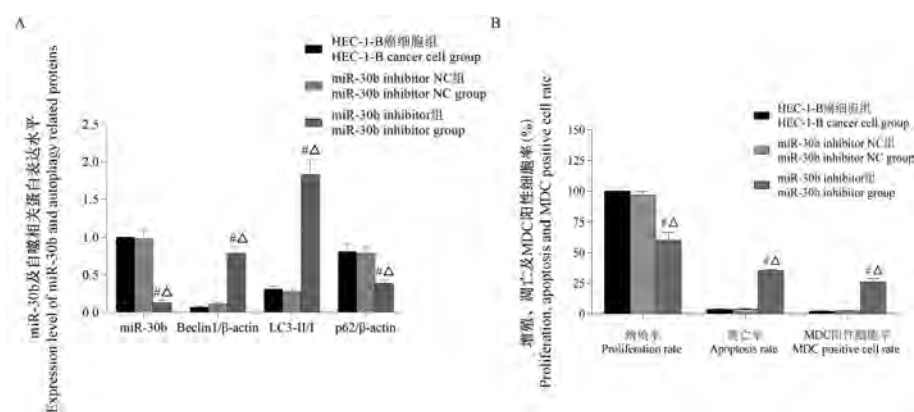


注:A:细胞凋亡检测图;B:细胞自噬小体荧光图;C:Western blot 检测自噬相关蛋白。

图 1 各组癌细胞增殖、凋亡及自噬比较

Note. A, Apoptosis detection chart. B, Autophagy body fluorescence diagram. C, Western blot analysis of autophagy related proteins.

Figure 1 Comparison of proliferation, apoptosis and autophagy of cancer cells in each group

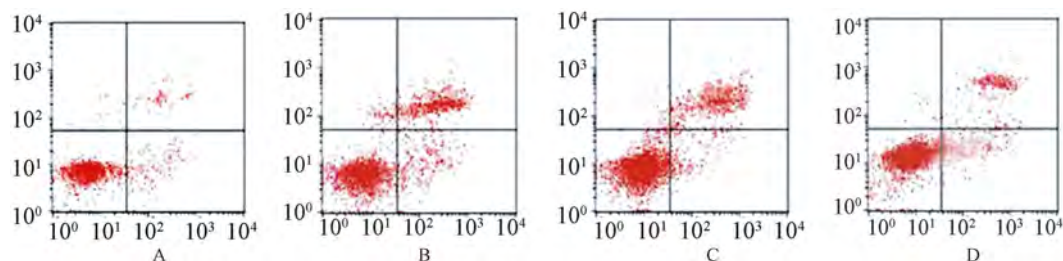


注:A:miR-30b 及自噬相关蛋白表达水平;B:增殖、凋亡及 MDC 阳性细胞率。与 HEC-1-B cancer cell 组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与 miR-30b inhibitor NC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 2 各组 HEC-1-B 癌细胞增殖凋亡及自噬比较

Note. A, Expression level of miR-30b and autophagy related proteins. B, Proliferation, apoptosis and MDC positive cell rate. Compared with HEC-1-B cancer cell group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with miR-30b inhibitor NC group, $^{\Delta}P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of proliferation, apoptosis and autophagy of HEC-1-B cancer cells in each group



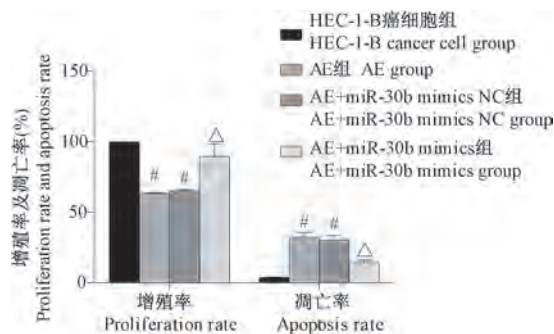
注:A:HEC-1-B 癌细胞组;B:AE 组;C:AE+miR-30b mimics NC 组;D:AE+miR-30b mimics 组。

图 3 各组细胞凋亡情况检测结果

Note. A, HEC-1-B cancer cell group. B, AE group. C, AE+miR-30b mimics NC group. D, AE+miR-30b mimics group.

Figure 3 Detection results of apoptosis in each group.

相比,不同子宫内膜癌细胞株 HEC-1-A、HEC-1-B 和 RL95-2 中 miR-30b 表达水平均显著升高,其中 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平最高。



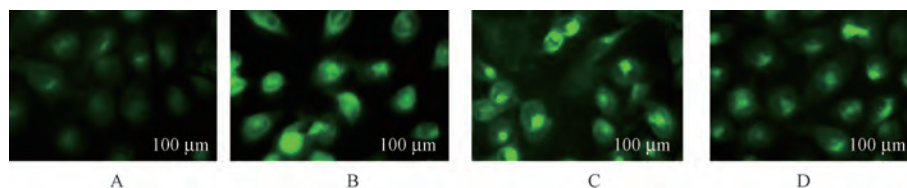
注:与 HEC-1-B 癌细胞组相比,[#] $P < 0.05$;与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,[△] $P < 0.05$ 。

图 4 各组 HEC-1-B 癌细胞增殖率和凋亡率比较

Note. Compared with HEC-1-B cancer cell group, [#] $P < 0.05$.

Compared with AE+miR-30b mimics NC group, [△] $P < 0.05$.

Figure 4 The ratio of proliferation rate and apoptosis rate of HEC-1-B cancer cells in each group

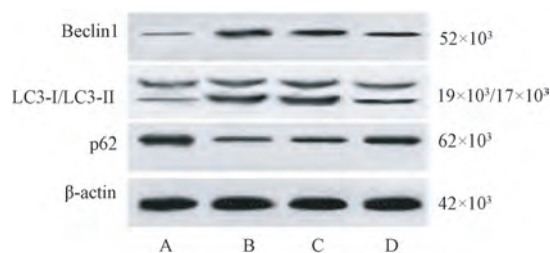


注:A:HEC-1-B 癌细胞组;B:AE 组;C:AE+miR-30b mimics NC 组;D:AE+miR-30b mimics 组。

图 5 各组 HEC-1-B 癌细胞自噬小体荧光图

Note. A, HEC-1-B cancer cell group. B, AE group. C, AE+miR-30b mimics NC group. D, AE+miR-30b mimics group.

Figure 5 Fluorescence of autophagy bodies of HEC-1-B cancer cells in each group



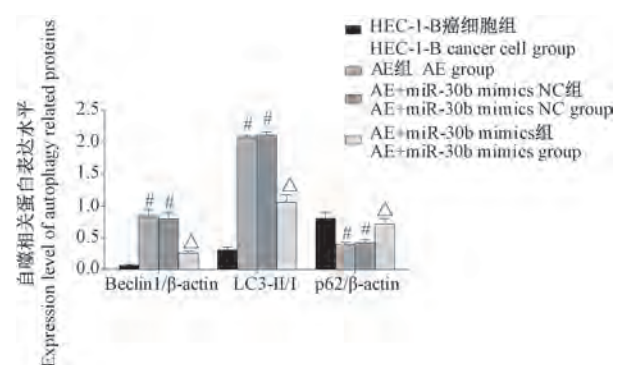
注:A:HEC-1-B 癌细胞组;B:AE 组;C:AE+miR-30b mimics NC 组;D:AE+miR-30b mimics 组。

图 6 各组 HEC-1-B 癌细胞自噬相关蛋白表达 Western blot 图

Note. A, HEC-1-B cancer cell group. B, AE group. C, AE+miR-30b mimics NC group. D, AE+miR-30b mimics group.

Figure 6 Expression of autophagy related proteins in HEC-1-B cancer cells of each group by Western blot

AE 为大黄中有效抗菌成分,在多种人类癌细胞系中具有抗癌特性,包括抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭,诱导细胞周期阻滞和细胞死亡,调节免疫信号等^[11]。除本身具有的抗肿瘤作用外,还可提高肿瘤对放疗、化疗的敏感性^[12]。另外刘豪杰等^[13]研究发现,AE 可通过提高胃癌细胞自噬,诱导细胞凋亡,Gao 等^[14]研究发现 AE 可诱导宫颈癌细胞凋亡。而诱导癌细胞自噬和凋亡可发挥抗子宫内膜癌的作用^[15]。其中自噬蛋白 Beclin1 表达水平及 LC3-II/I 比值可用于反映自噬程度,而自噬溶酶体降解底物 p62 表达的增加与自噬水平呈反相关^[16]。本研究发现,AE 可显著降低 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平,显著提高细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值,提示 AE 可能通过促进 HEC-1-B 癌细胞自噬,进一步促进其凋亡,抑制其增殖,但是否调控 miR-30b 尚需进一步研究。



注:与 HEC-1-B 癌细胞组相比,[#] $P < 0.05$;与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,[△] $P < 0.05$ 。

图 7 各组 HEC-1-B 癌细胞中 Beclin1、p62 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值比较

Note. Compared with HEC-1-B cancer cell group, [#] $P < 0.05$.

Compared with AE+miR-30b mimics NC group, [△] $P < 0.05$.

Figure 7 Comparison of Beclin1 and p62 protein expression levels and LC3-II/I ratio in HEC-1-B cancer cells of each group

Li 等^[17]研究发现 miR-30b 可通过抑制自噬减轻肝缺血再灌注损伤。miR-30b 还通过抑制耐顺铂胃癌细胞的自噬来消除肺腺癌转移相关转录本 1 诱导的顺铂耐药性^[18]。本研究发现,抑制 miR-30b 可显著降低 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平、细胞增殖率、以及 p62 蛋白表达水平,显著提高细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值,提示抑制 miR-30b 可能通过促进 HEC-1-B 癌细胞自噬,进一步促进其凋亡。而 Bai 等^[19]研究发现 AE 不但可通过抑制 miR-1 来缓解高脂饮食诱导的大鼠心电图 Q 波和 T 波时间延长,还可通过上调 miR-15a,从而抑制凋亡相关基因 Bcl-2 表达,诱导乳腺肿瘤细胞凋亡^[20]。本研究为进一步探究 AE 调控 miR-30b 对 HEC-1-B 癌细胞的影响,将 HEC-1-B 癌细胞转染 miR-30b mimics 后,使用 AE 处理,发现与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著升高,而细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著降低,提示上调 miR-30b 可逆转 AE 对癌细胞发挥的作用。

综上所述,AE 可能通过抑制 miR-30b 表达,促进 HEC-1-B 癌细胞自噬,进一步抑制癌细胞增殖,促进其凋亡,而上调 miR-30b 可逆转 AE 对 HEC-1-B 癌细胞的作用。然而 AE 对子宫内膜癌的作用机制较为复杂,尚需深入研究。

参考文献:

- [1] 王艺霖,张溪.化疗在子宫内膜癌中的应用进展[J].现代妇产科进展,2018,27(4):314-317.
- [2] Dong X, Zeng Y, Liu Y, et al. Aloe-emodin: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(2): 270-281.
- [3] Shen F, Ge C, Yuan P. Aloe-emodin induces autophagy and apoptotic cell death in non-small cell lung cancer cells via Akt/mTOR and MAPK signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 886: 173550.
- [4] Du Y, Zhang J, Tao Z, et al. Aloe emodin exerts potent anticancer effects in MIA-PaCa-2 and PANC-1 human pancreatic adenocarcinoma cell lines through activation of both apoptotic and autophagic pathways, sub-G1 cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) [J]. *J Buon*, 2019, 24(2): 746-753.
- [5] Yu Y, Liu H, Yang D, et al. Aloe-emodin attenuates myocardial infarction and apoptosis via up-regulating miR-133 expression [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146: 104315.
- [6] 马小军,刘尚禹,张祎年,等. miRNAs 在儿童中枢神经系统常见恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(2): 234-237.
- [7] Wang J, Sun YT, Xu TH, et al. MicroRNA-30b regulates high phosphorus level-induced autophagy in vascular smooth muscle cells by targeting BECN1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 530-536.
- [8] 蒲倩.自噬相关基因 Beclin1 在乳腺癌发生发展及治疗中的作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1): 98-103.
- [9] 潘思影,田莉,李伟宏.芦荟大黄素对子宫内腺癌细胞 HEC-1-B 迁移及侵袭的影响 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(24): 108-110.
- [10] 包晓霞,唐瑶,鲁周南,等.清热解方连花汤提取物诱导子宫内腺癌 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞自噬的作用及其机制研究 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(2): 150-154.
- [11] Sanders B, Ray AM, Goldberg S, et al. Anti-cancer effects of aloe-emodin: a systematic review [J]. *J Clin Transl Res*, 2017, 3(3): 283-296.
- [12] 曾英,李灵洁,程大梅,等.芦荟大黄素对宫颈癌 HeLa 细胞放射敏感性的影响及其机制研究 [J]. *肿瘤药学*, 2018, 8(5): 690-694.
- [13] 刘豪杰,陈文礼,陈雪蕾.芦荟大黄素对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡,自噬及 p53/AMPK/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国药师*, 2019, 22(10): 1829-1834.
- [14] Gao R, Wu X, Huang Z, et al. Anti-tumor effect of aloe-emodin on cervical cancer cells was associated with human papillomavirus E6/E7 and glucose metabolism [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3713-3721.
- [15] 康晶,银铎.二甲双胍治疗子宫内膜癌作用机制的研究进展 [J]. *山东医药*, 2019, 59(1): 98-101.
- [16] 展凡,王玉涵,王萌,等.新藤黄酸抑制人肝癌细胞 BEL-7402 自噬作用研究 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(3): 46-50.
- [17] Li SP, He JD, Wang Z, et al. miR-30b inhibits autophagy to alleviate hepatic ischemia-reperfusion injury via decreasing the Atg12-Atg5 conjugate [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(18): 4501-4514.
- [18] Xi Z, Si J, Nan J. LncRNA MALAT1 potentiates autophagy-associated cisplatin resistance by regulating the microRNA30b/autophagy-related gene 5 axis in gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 239-248.
- [19] Bai Y, Su Z, Sun H, et al. Aloe-emodin relieves high-fat diet induced QT prolongation via miR-1 inhibition and IK1 up-regulation in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5): 1961-1973.
- [20] Jiang X, Liu Y, Zhang G, et al. Aloe-emodin induces breast tumor cell apoptosis through upregulation of miR-15a/miR-16-1 that suppresses BCL2 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5108298.

[收稿日期] 2020-11-23

李春桃,唐苏婷,徐云柯,等. miR-16-5p 靶向 NLRP1 抑制缺氧复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 68-75.

Li CT, Tang ST, Xu YK, et al. miR-16-5p targets NLRP1 to inhibit BRL-3A cell pyrolysis induced by hypoxia-reoxygenation [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 68-75.

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

miR-16-5p 靶向 NLRP1 抑制缺氧复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡

李春桃,唐苏婷,徐云柯,高 源,郭 勇,方 超,喻淋淋*

(西南医科大学附属中医医院肝胆外科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨 miR-16-5p 对缺氧复氧诱导的大鼠正常肝细胞系 BRL-3A 焦亡的作用以及作用机制。**方法** 通过细胞缺氧复氧的方法构建肝缺血再灌注损伤(HIRI)的体外模型,通过流式细胞术检测细胞焦亡率;通过荧光实时定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-16-5p 的表达水平;运用 miR-16-5p mimic 在细胞中过表达 miR-16-5p 并研究 miR-16-5p 对细胞焦亡的影响;通过蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测焦亡相关蛋白 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达水平;通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验预测并鉴定 miR-16-5p 与 NLRP1 的靶向关系;通过过表达和干扰 NLRP1,研究 NLRP1 及 miR-16-5p/NLRP1 轴对细胞焦亡的影响。**结果** 与空白对照组相比,模型组焦亡率极显著上升($P<0.01$),miR-16-5p 表达量显著降低($P<0.05$)。过表达 miR-16-5p 极显著抑制细胞焦亡($P<0.01$)并抑制焦亡相关蛋白 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验显示 NLRP1 是 miR-16-5p 的靶基因,过表达 miR-16-5p 显著降低了 NLRP1 的 mRNA 和蛋白水平($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。此外,过表达 NLRP1 逆转了 miR-16-5p 对细胞焦亡的抑制作用($P<0.01$)和对 caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达的抑制作用($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** miR-16-5p 通过靶向 NLRP1 来抑制 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达,从而改善缺氧复氧引起的 BRL-3A 细胞焦亡。

【关键词】 miR-16-5p;NLRP1;缺氧复氧;BRL-3A;焦亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0068-08

miR-16-5p targets NLRP1 to inhibit BRL-3A cell pyrolysis induced by hypoxia-reoxygenation

LI Chuntao, TANG Suting, XU Yunke, GAO Yuan, GUO Yong, FANG Chao, YU Linlin*

(the TCM Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of miR-16-5p on pyrolysis of rat normal liver cell line BRL-3A induced by hypoxia-reoxygenation. **Methods** An *in vitro* model of hepatic ischemia reperfusion injury was established by cellular hypoxia-reoxygenation and the pyrolysis rate was measured by flow cytometry. RT-qPCR was used to measure the expression level of miR-16-5p. Overexpressed miR-16-5p in cells by miR-16-5p mimics was used to examine the effect of miR-16-5p on pyrolysis. Western blot was used to measure protein expression levels of pyrolysis-related proteins caspase 1, IL-1 β , and IL-18. The relationship between miR-16-5p and NLRP1 was predicted through bioinformatics

【基金项目】西南医科大学-西南医科大学附属中医医院自然科学基金青年苗圃项目(2018XYLE-051)。

【作者简介】李春桃(1988—),男,硕士,住院医师,研究方向:肝癌及其多药耐药相关研究。E-mail:373632809@qq.com

【通信作者】喻淋淋(1987—),男,学士,主治医师,研究方向:肝癌及其缺血再灌注损伤机制研究。E-mail:qwertyui552@163.com

analysis and dual luciferase reporter gene assays. Interference and overexpression of NLRP1 were performed to investigate the effect of NLRP1 and the miR-16-5p/NLRP1 axis on pyrolysis. **Results** Compared with the blank control group, the pyrolysis rate of the model group was increased significantly ($P < 0.01$) and expression of miR-16-5p was decreased significantly ($P < 0.05$). Overexpression of miR-16-5p significantly decreased the pyrolysis rate ($P < 0.01$) and inhibited the expression of caspase 1, IL-1 β , and IL-18 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The dual luciferase reporter gene assay showed that NLRP1 was a target gene of miR-16-5p. Overexpression of miR-16-5p significantly reduced the mRNA and protein levels of NLRP1 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Additionally, overexpression of NLRP1 reversed the inhibitory effect of miR-16-5p on pyrolysis ($P < 0.01$) and the inhibitory effect on the expression of caspase 1, IL-1 β , and IL-18 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusions** MiR-16-5p inhibits expression of caspase 1, IL-1 β , and IL-18 by targeting NLRP1, thereby improving pyrolysis of BRL-3A cells caused by hypoxia-reoxygenation.

【Keywords】 miR-16-5p; NLRP1; hypoxia-reoxygenation; BRL-3A; pyrolysis

肝缺血再灌注损伤 (Hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 是各种肝手术过程的主要并发症,例如肝移植和因罹患肝癌而进行的肝切除术^[1-4]。HIRI 会造成肝及远端器官的损伤,对术后恢复及临床预后造成严重影响^[5-6]。研究 HIRI 的潜在机制并寻找可以有效改善 HIRI 的新型治疗靶点具有重要意义。最近的研究发现,细胞焦亡 (pyroptosis) 可能参与了 HIRI,抑制细胞焦亡可能成为一种新的治疗 HIRI 的策略^[7-9]。细胞焦亡于 1992 年由 Zychlinsky 等^[10]发现并命名,是一种有别于凋亡的细胞程序性死亡。在形态学上,细胞焦亡的典型特征是细胞的过度肿胀、快速裂解和细胞内容物的释放,生化特征为炎性小体的激活促进半胱天冬酶 1 前体 (pro-caspase1) 的切割活化并介导促炎介质白细胞介素 1 β (Interleukin-1 beta, IL-1 β)、白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18) 等的释放^[11]。

微小 RNA (miRNA) 是长度在 21-25 nt 的短链非编码 RNA,通过靶向目的基因的 3' 端非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 干扰目的基因的表达而发挥生物学功能^[12]。最新证据表明,miRNA 参与了细胞焦亡的调控。王艳等^[13]发现 miR-214 通过靶向 caspase1 改善高糖诱导的心肌细胞焦亡。Xue 等^[14]发现 miR-21 通过靶向锌指蛋白 A20 基因调控核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 的表达,从而促进了脂多糖诱导的巨噬细胞焦亡。一项研究表明,miR-16-5p 在肝移植后 HIRI 患者中表达下调,但 miR-16-5p 在 HIRI 中的作用还不明确^[15]。Yang 等^[16]发现,miR-16-5p 能够抑制炎症因子的活性改善急性肺损伤。本研究采用缺氧复氧的方法模拟肝缺血再灌注损伤,基于

细胞焦亡探讨 miR-16-5p 对缺氧复氧诱导的肝细胞的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠正常肝细胞 BRL-3A (货号 CL-0036) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

FAM FLICA™ Caspase-1 kit (货号: ICT097) 购自英国 AbD Serotec 公司; 碘化丙锭 PI 溶液 (货号: C0080)、RPMI-1640 培养基 (货号: 31800)、化学发光显影液 (货号: PE0010)、胰酶 (货号: T1350) 购自北京索莱宝科技有限公司; RNAiso Plus (货号: 9108Q)、RNAiso for Small RNA (货号: 9753Q)、PrimeScript™ RT Master Mix (货号: RR036Q)、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (货号: 638315)、TB Green® Fast qPCR Mix (货号: RR430S) 以及 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green® Kit (货号: 638314) 购自日本 TaKaRa 公司; 胎牛血清 (FBS) (货号: SH30084.03) 购自美国 Hyclone 公司; OPTI-MEM 培养基 (货号: 31985088) 以及青链霉素双抗 (货号: 15240062), 购自美国 Gibco 公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013B) 购自上海碧云天公司; 蛋白定量试剂盒 (货号: 23250)、Lipofectamine™ 3000 (货号: L3000008) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 抗 NLRP1 (货号: sc-166368) 的一抗购自美国 Santa Cruz 公司; 抗 caspase1 (货号: ab74279)、IL-1 β (货号: ab9787)、IL-18 (ab191860)、 β -actin (货号: ab8226) 的一抗及辣根素过氧化物酶标记的二抗 (货号: ab205718) 购自英国 Abcam 公司; miR-16-5p 模拟物 (miR-16-5p mimic, 货号: miR10000785-1-5)、阴性对照模拟物 (NC mimic, 货号: miR1N0000001-1-5)、NLRP1 小干

扰 RNA (si-NLRP1, 货号: siG170413090825-1-5)、阴性对照小 RNA (si-NC, 货号: siN0000002-1-5) 购自广州锐博生物有限公司; pcDNA3.1-NLRP1 (ov-NLRP1) 过表达质粒及其阴性对照 (ov-NC) 由成都擎科梓熙生物科技有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及造模

BRL-3A 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中, 并放置于 37℃, 含 5% 二氧化碳的细胞培养箱中。2 d 换液一次, 细胞长至 90% 融合时进行传代。缺氧/复氧造模: 细胞过夜培养后, 加入不含 FBS 和双抗的培养基, 放置于 37℃、94% 氮气、5% 二氧化碳、1% 氧气条件的三气培养箱中进行缺氧 12 h 处理, 再放入正常培养箱复氧 4 h, 收集细胞。

1.3.2 细胞转染及分组

miRNA 的转染: 首先将 miR-16-5p mimic 或 NC mimic 用 100 μ L 的无血清 Opti-MEM 稀释成 50 nmol/L, 将 1.5 μ L LipofectamineTM 3000 用 100 μ L 的无血清 Opti-MEM 培养基稀释并保持 5 min。随后, 分别将稀释的 miR-16-5p mimic 或 NC mimic 与 LipofectamineTM 3000 混合并在 37℃ 下孵育 30 min。BRL-3A 细胞接种于 24 孔板中过夜培养, 第 2 天弃掉培养基, 加入无血清 Opti-MEM 培养基饥饿细胞 4 h, 再分别将孵育好的混合物加入细胞中, 放入细胞培养箱中培养 6 h 更换培养基, 培养 48 h 后收集细胞。siRNA 及过表达质粒的转染: 首先将 si-NLRP1、si-NC、ov-NLRP1、ov-NC 用 100 μ L 的无血清 Opti-MEM 稀释成 20 μ mol/L (siRNA) 或 20 mg/L (过表达质粒), 将 1.5 μ L LipofectamineTM 3000 用 100 μ L 的无血清 Opti-MEM 培养基稀释并保持 5 min。随后, 分别将稀释的 si-NLRP1、si-NC、ov-NLRP1、ov-NC 与 LipofectamineTM 3000 混合并在 37℃ 下孵育 30 min。BRL-3A 细胞接种于 24 孔板中过夜培养, 第 2 天弃掉培养基, 加入无血清 Opti-MEM 培养基饥饿细胞 4 h, 再分别将孵育好的混合物加入细胞中, 放入细胞培养箱中培养 6 h 更换培养基, 培养 48 h 后收集细胞。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR)

MiR-16-5p 的检测: RNAiso for Small RNA 提取细胞总 RNA, Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 将总 RNA 反转录为 cDNA。反应体系为: 超纯水 9

μ L、2 $\times$ TB Green Advantage Premix 12.5 μ L、50 $\times$ ROX Dye 0.5 μ L、上游引物 0.5 μ L、mRQ 3' Primer 0.5 μ L、cDNA 模板 2 μ L。反应条件为: 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 退火延伸 20 s, 40 个循环。

NLRP1 的检测: RNAiso Plus 提取细胞总 RNA, PrimeScriptTM RT Master Mix 将总 RNA 反转录为 cDNA。反应体系为: 超纯水 7 μ L、2 $\times$ TB Green Mix 10 μ L、上游引物 1 μ L、下游引物 1 μ L、cDNA 模板 1 μ L。反应条件为: 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 退火 10 s, 72℃ 延伸 10 s, 40 个循环。

引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司进行合成或试剂盒自带, 引物信息如下: miR-16-5p (上游引物: 5' TAGCAGCACGTAAATATTGGCG 3', 下游引物由 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green[®] Kit 提供, 退火温度 60℃)、NLRP1 (上游引物: 5' GCCCTGGAGACAAAGAATCC 3', 下游引物: 5' AGTGGGCATCGTCATGTGT 3', 退火温度 58℃)、U6 (上下游引物均由 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green[®] Kit 提供, 退火温度 60℃)、 β -actin (上游引物: 5' AGGGAAATCGTGCGTGAC 3', 下游引物: 5' CGCTCATTCGCGATAGTG 3', 退火温度 56℃)。

1.3.4 Caspase1 FLICA/PI 双染法流式细胞术检测细胞焦亡

各组细胞经过胰酶消化, PBS 洗涤细胞 2 次, 1000 r/min 离心 5 min。根据说明书, 加入 5 μ L caspase1 FLICA 避光孵育 1 h, PBS 洗涤细胞 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 再加入 5 μ L PI 避光孵育 15 min, 上 FACSCaliburTM (BD, 美国) 流式细胞仪检测细胞焦亡。

1.3.5 蛋白免疫印迹实验 (Western blot)

RIPA 裂解液裂解细胞 30 min 提取各组细胞总蛋白, 蛋白定量试剂盒对总蛋白浓度进行定量。用 12% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 分离等量蛋白, 并转移到聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上, 在室温下用 10% 的脱脂牛奶封闭后, 将膜与抗 NLRP1、caspase1、IL-1 β 、IL-18、 β -actin 的一抗在 4℃ 下过夜。冲洗后, 将膜与二抗在室温下孵育 2 h。使用化学发光显影剂使蛋白条带可视化, 并使用 BioSpectrum 成像系统 (UVP, 美国) 进行分析。

1.3.6 双荧光素酶报告基因实验

NLRP1 3' UTR 片段上海汉恒生物科技有限公

司合成。将片段插入 pSI-Check2 双荧光素酶报告载体 (Progen, 美国) 构建重组质粒 (pSI-Check2-NLRP1 3' UTR)。BRL-3A 细胞接种于 96 孔板中过夜培养, 第 2 天弃掉培养基, 加入无血清 Opti-MEM 培养基饥饿细胞 4 h。将 10 μ L 的 Opti-MEM 与 0.16 μ g 的 pSI-Check2-NLRP1 3' UTR 重组质粒以及 5 pmol 的 miR-16-5p mimic/NC mimic 充分混匀后室温放置 5 min, 用 10 μ L Opti-MEM 稀释 0.3 μ L 的 Lipofectamine™ 3000, 然后将稀释的质粒、模拟物和转染试剂混合, 孵育 30 min。将混合液加入细胞, 放入细胞培养箱中培养 6 h 更换培养基, 培养 48 h 后收集细胞。然后参照双荧光素酶报告基因试剂盒的说明书检测荧光活性。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 20.0 软件对本实验所有数据进行统计分析, 多组间差异使用单因素方差分析并进行事后最小显著差异检验 (least significant difference, LSD), 两组间差异分析采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著差异, $P < 0.01$ 为差异有极显著。

2 结果

2.1 缺氧/复氧后 BRL-3A 细胞发生焦亡并造成 miR-16-5p 表达量降低

如图 1A 所示, 与空白对照组相比, 模型组 PI+Caspase1 阳性率极显著上升 ($P < 0.01$), 提示缺氧/复氧造成 BRL-3A 细胞发生焦亡。此外, 与空白对照组相比, 模型组 miR-16-5p 的表达量显著降低 ($P < 0.05$) (图 1B), 提示 miR-16-5p 可能参与了缺氧/复氧造成的 BRL-3A 细胞焦亡。

2.2 过表达 miR-16-5p 能够抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡

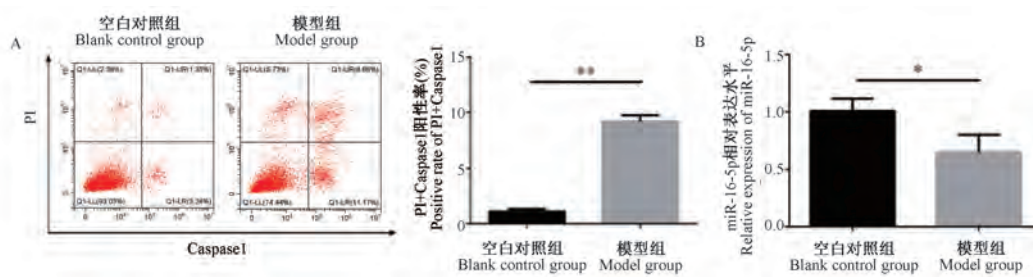
为了探讨 miR-16-5p 在细胞焦亡中的作用, 我们在 BRL-3A 细胞中对 miR-16-5p 进行了过表达。如图 2A 所示, miR-16-5p mimic 组 miR-16-5p 表达量是 NC-mimic 组的 152 倍, 提示在 BRL-3A 细胞中过表达 miR-16-5p 成功。随后通过流式细胞术检测过表达 miR-16-5p 对 BRL-3A 细胞焦亡的影响。如图 2B 所示, 与空白对照组相比, 模型组 PI+Caspase1 阳性率极显著上升 ($P < 0.01$); 模型组与 NC-mimic 组 PI+Caspase1 阳性率差异不显著 ($P > 0.05$); 与 NC-mimic 组相比, miR-16-5p mimic 组 PI+Caspase1 阳性率极显著降低 ($P < 0.01$)。提示 miR-16-5p 能够抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡。

2.3 miR-16-5 过表达通过抑制 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达起抗焦亡的作用

如图 3 所示, 与空白对照组相比, 模型组 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达量极显著上升 ($P < 0.01$); 模型组与 NC-mimic 组 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达量差异不显著 ($P > 0.05$); 与 NC-mimic 组相比, miR-16-5p mimic 组 Caspase1 表达量极显著下调 ($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-18 表达量显著下调 ($P < 0.05$)。

2.4 NLRP1 是 miR-16-5p 的靶基因

为进一步探讨 miR-16-5p 的作用机制, 通过 Targetscan 在线软件 (http://www.targetscan.org/vert_72/) 预测了 miR-16-5p 的潜在靶基因, 发现 NLRP1 的 3' UTR 与 miR-16-5p 存在潜在结合关系 (图 4A)。通过构建 NLRP1 3' UTR 的双荧光素酶报告载体, 与 NC-mimic/miR-16-5p mimic 共同转染 293T 细胞, 双

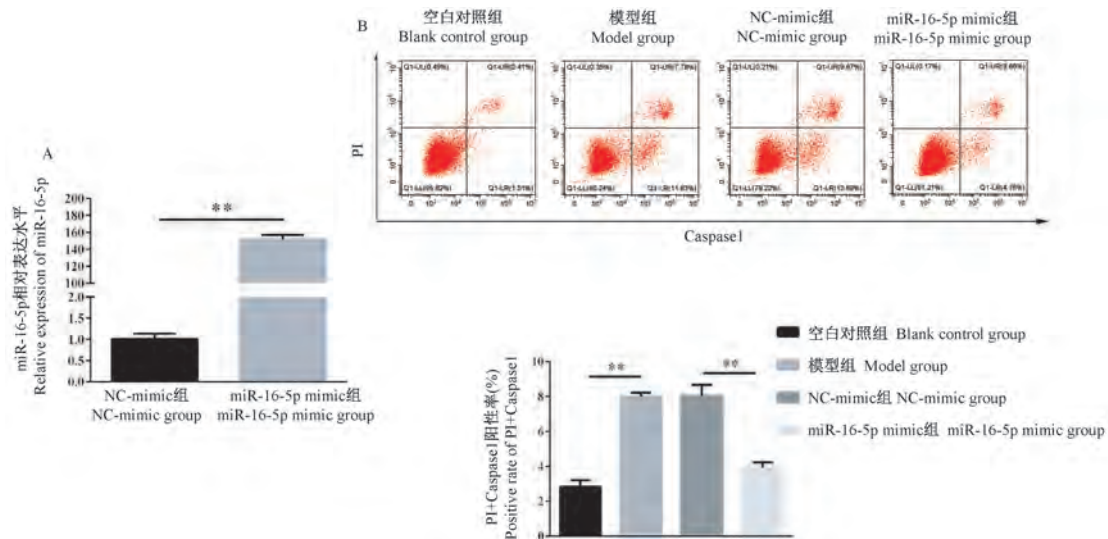


注: A: 流式细胞术检测缺氧/复氧对 BRL-3A 细胞 PI+Caspase1 阳性率的影响; B: RT-qPCR 检测缺氧/复氧对 BRL-3A 细胞 miR-16-5p 表达的影响。与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 缺氧/复氧对 BRL-3A 细胞焦亡及 miR-16-5p 表达的影响

Note. A, Flow cytometry was used to detect the effect of hypoxia/reoxygenation on the positive rate of PI+Caspase1 in BRL-3A cells. B, RT-qPCR was used to detect the effect of hypoxia/reoxygenation on the expression of miR-16-5p in BRL-3A cells. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Effects of hypoxia/reoxygenation on pyrolysis and the expression of miR-16-5p in BRL-3A cells

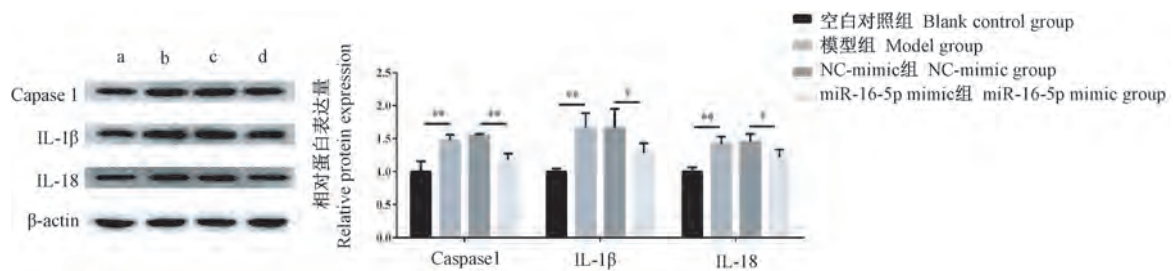


注:A:RT-qPCR 检测 miR-16-5p 过表达效率;B:流式细胞术检测 miR-16-5p 过表达对 BRL-3A 细胞 PI+Caspase1 阳性率的影响。与空白对照组或 NC-mimic 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 miR-16-5p 对缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡的影响

Note. A, RT-qPCR was used to detect the overexpression efficiency of miR-16-5p in BRL-3A cells. B, Flow cytometry was used to detect the effect of miR-16-5p overexpression on the positive rate of PI+Caspase1 in BRL-3A cells. Compared with the blank control group or the NC-mimic group, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of miR-16-5p on pyrolysis induced by hypoxia/reoxygenation in BRL-3A cells



注: a:空白对照组;b:模型组;c: NC-mimic 组;d: miR-16-5p mimic 组。与空白对照组或 NC-mimic 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 miR-16-5p 对 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响

Note. a, Blank control group. b, Model group. c, NC-mimic group. d, miR-16-5p mimic group. Compared with the blank control group or the NC-mimic group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

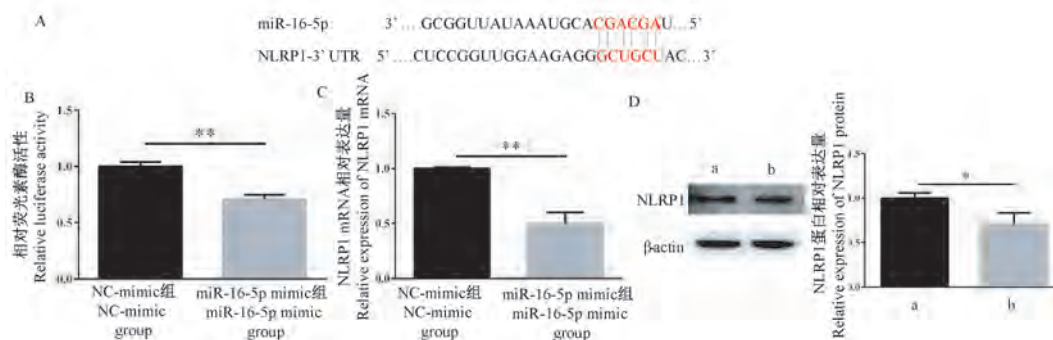
Figure 3 Effect of miR-16-5p on the expression of Caspase1, IL-1β and IL-18 in BRL-3A cells

荧光素酶报告系统检测荧光活性。结果如图 4B 显示,miR-16-5p mimic 组相对荧光活性极显著低于 NC-mimic 组($P < 0.01$)。此外,过表达 miR-16-5p 极显著降低了 NLRP1 的 mRNA 水平($P < 0.01$)(图 4C),显著降低了 NLRP1 的蛋白水平($P < 0.05$)(图 4D)。

2.5 miR-16-5p 通过调控 NLRP1 抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡

为进一步探讨 miR-16-5p 靶基因 NLRP1 在细胞焦亡中的作用,本研究通过小 RNA 干扰技术干扰 NLRP1 在 BRL-3A 细胞中的表达(图 5A),与 si-NC 组相比,si-NLRP1 组 NLRP1 蛋白水平极显著

降低($P < 0.01$);与 ov-NC 组相比,ov-NLRP1 组 NLRP1 蛋白水平极显著增加($P < 0.01$)。随后通过流式细胞术检测 miR-16-5p/NLRP1 轴对 BRL-3A 细胞焦亡的影响。如图 5B 所示,si-NLRP1 组与 miR-16-5p mimic 组 PI+Caspase1 阳性率极显著低于模型组($P < 0.01$);ov-NLRP1 组 PI+Caspase1 阳性率极显著高于模型组($P < 0.01$);过表达 NLRP1 极显著逆转了 miR-16-5p mimic 对 BRL-3A 细胞焦亡的抑制作用($P < 0.01$)(图 5B)。提示 miR-16-5p 通过调控 NLRP1 能抑制缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡。

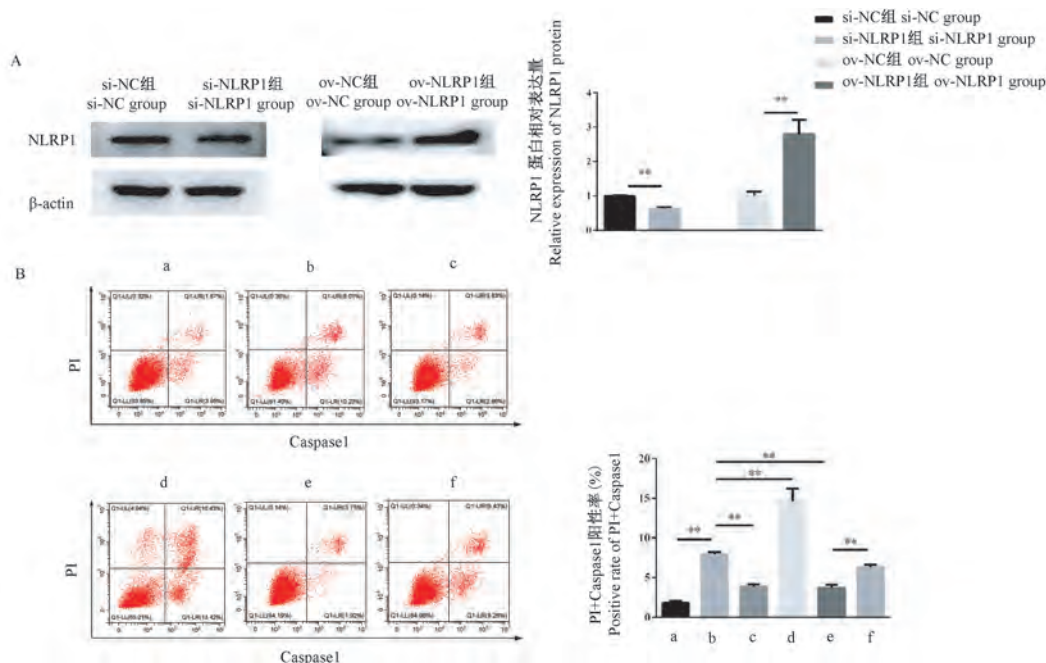


注:A;NLRP1 3' UTR 与 miR-16-5p 的潜在结合位点;B:将连有 NLRP1 3' UTR 的双荧光素酶报告载体与 NC-mimic/miR-16-5p mimic 共同转染 293T 细胞,证实 NLRP1 是 miR-16-5p 的靶基因;C:RT-qPCR 检测 miR-16-5p 对 NLRP1 mRNA 表达的影响;D:Western blot 检测 miR-16-5p 对 NLRP1 蛋白表达的影响。a:NC-mimic 组;b:miR-16-5p mimic 组。与 NC-mimic 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 miR-16-5p 直接靶向 NLRP1 并抑制 NLRP1 的表达

Note. A, Sequence of the binding sites between NLRP1 3' UTR and miR-16-5p. B, NLRP1 3' UTR, connected to the luciferase coding region, were transfected into 293T cells with NC-mimic or miR-16-5p mimic to confirm NLRP1 is the target gene of miR-16-5p. C, RT-qPCR was used to detect the effect of miR-16-5p on NLRP1 mRNA expression. D, Western blot was used to detect the effect of miR-16-5p on NLRP1 protein expression. a, NC-mimic group. b, miR-16-5p mimic group. Compared with the NC-mimic group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 miR-16-5p directly targets NLRP1 and inhibits the expression of NLRP1



注:A:Western blot 检测 NLRP1 的过表达和干扰效率;B:流式细胞术检测 miR-16-5p/NLRP1 轴对 BRL-3A 细胞 PI+Caspase1 阳性率的影响;a:空白对照组;b:模型组;c:si-NLRP1 组;d:ov-NLRP1 组;e:miR-16-5p mimic 组;f:miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 组。与模型组或 miR-16-5p mimic 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 NLRP1 对缺氧/复氧诱导的 BRL-3A 细胞焦亡的影响

Note. A, Western blot was used to detect the interference and overexpression efficiency of NLRP1. B, Flow cytometry was used to detect the effect of miR-16-5p/NLRP1 axis on the positive rate of PI+Caspase1 in BRL-3A cells. a, Blank control group. b, Model group. c, si-NLRP1 group. d, ov-NLRP1 group. e, miR-16-5p mimic group. f, miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 group. Compared with the model group or the miR-16-5p mimic group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of miR-16-5p/NLRP1 axis on pyrolysis induced by hypoxia/reoxygenation in BRL-3A cells

2.6 miR-16-5p 通过抑制 NLRP1 调控 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达

如图 6 所示,与模型组相比,与 si-NLRP1 组 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 表达量极显著下调 ($P < 0.01$),ov-NLRP1 组 Caspase1、IL-18 表达量极显著上调 ($P < 0.01$),IL-1 β 表达量显著上调 ($P < 0.05$)。与 miR-16-5p mimic 组相比,miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 组 Caspase1、IL-18 表达量显著上调 ($P < 0.05$),IL-1 β 表达量极显著上调 ($P < 0.01$)。

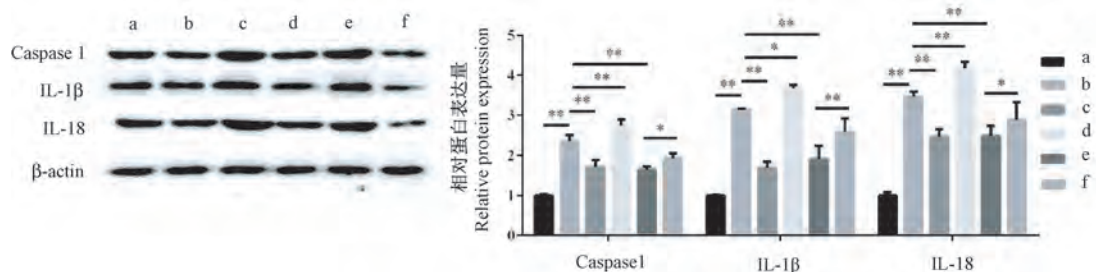
3 讨论

目前,关于 HIRI 仍旧缺乏有效干预手段^[17]。最近的研究表明,细胞焦亡途径可能是 HIRI 发展中的关键因素。在本研究中,通过对正常大鼠肝细胞系 BRL-3A 进行缺氧复氧处理,建立 HIRI 体外模型。本研究发现,缺氧复氧能导致 caspase1/PI 阳性率的增加,caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平上升,提示缺氧复氧诱导肝细胞焦亡模型构建成功。

本研究发现缺氧复氧能导致肝细胞中 miR-16-5p 的表达水平下降,提示 miR-16-5p 可能与缺氧复氧诱导肝细胞损伤有关。Zhang 等^[18]发现 miR-16-5p 通过靶向细胞因子诱导的细胞凋亡抑制剂 1 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1, CIAPIN1) 调节核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路介导的炎症从而改善缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤。而 Chen 等^[19]发现 miR-16-5p 通过靶向 B 细胞淋巴瘤 2 基因 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 加剧了肾的缺血再灌注损伤。但 miR-16-5p 在缺氧复氧诱导的肝细胞损伤的作用尚不明确。本研究运用

miR-16-5p mimic 在肝细胞中过表达了 miR-16-5p,发现过表达 miR-16-5p 能显著降低 caspase1/PI 阳性率,并抑制 caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平,提示 miR-16-5p 可以有效抑制缺氧复氧诱导的肝细胞焦亡从而改善细胞损伤。

为了进一步研究 miR-16-5p 抑制细胞焦亡的机制,通过 Targetscan 在线软件预测了 miR-16-5p 的潜在靶基因,发现 NLRP1 的 3' UTR 与 miR-16-5p 存在潜在结合关系。接下来,我们通过双荧光素酶报告基因实验确定了 NLRP1 为 miR-16-5p 的靶基因,过表达 miR-16-5p 能显著降低 NLRP1 的 mRNA 和蛋白表达水平。NLRP1 属于 Nod 样受体家族,与凋亡相关斑点样蛋白 (Apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 以及 caspase1 一同构成炎症小体复合物,炎症小体的激活诱导 caspase1 的活化,caspase1 诱导细胞膜膨胀破裂并促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟和释放,导致细胞焦亡^[20-21]。Tan 等^[22]发现颞叶癫痫患者海马区中 NLRP1 与 caspase1 蛋白表达升高,在癫痫小鼠模型中干扰 NLRP1 与 caspase1 的表达可以显著降低神经元焦亡。李嵘等^[23]发现 miR-497 可以靶向 NLRP1 抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞焦亡。但 NLRP1 是否参与了缺氧复氧诱导的肝细胞焦亡尚不清楚。本研究通过小 RNA 干扰技术干扰 NLRP1 在肝细胞中的表达水平,发现降低 NLRP1 的表达可以抑制 caspase1/PI 阳性率,并下调 caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平。与之相反,过表达 NLRP1 进一步促进了缺氧复氧导致的 caspase1/PI 阳性率增加,上调 caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达水平,并逆转了 miR-16-5p 对焦亡的抑制作用,提示 NLRP1 可能是缺氧复氧诱导的肝细胞焦



注:a:空白对照组;b:模型组;c:si-NLRP1组;d:ov-NLRP1组;e:miR-16-5p mimic组;f:miR-16-5p mimic+ov-NLRP1组。与模型组或miR-16-5p mimic组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 6 miR-16-5p/NLRP1 轴对 BRL-3A 细胞 Caspase1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响

Note. a, Blank control group. b, Model group. c, si-NLRP1 group. d, ov-NLRP1 group. e, miR-16-5p mimic group. f, miR-16-5p mimic+ov-NLRP1 group. Compared with the model group or the miR-16-5p mimic group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of miR-16-5p/NLRP1 axis on the expression of Caspase1, IL-1 β and IL-18 in BRL-3A cells

亡过程中的关键因子,而 miR-16-5p 通过抑制 NLRP1 的表达来抑制缺氧复氧诱导的肝细胞焦亡。

综上,本研究发现 miR-16-5p 能够抑制 caspase1、IL-1 β 、IL-18 的表达改善缺氧复氧引起的 BRL-3A 细胞焦亡,其机制可能是通过靶向调控 NLRP1 的表达。

参考文献:

- [1] Arkadopoulos N, Defterevos G, Nastos C, et al. Development of a porcine model of post-hepatectomy liver failure [J]. J Surg Res, 2011, 170(2): e233-e242.
- [2] Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, et al. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock; the role of hypoxemic resuscitation [J]. PloS One, 2012, 7(3): e32968.
- [3] Lu TF, Yang TH, Zhong CP, et al. Dual effect of hepatic macrophages on liver ischemia and reperfusion injury during liver transplantation [J]. Immune network, 2018, 18(3): e24.
- [4] 沈洁, 从长慧. 异氟烷预处理对大鼠肝缺血再灌注时脑线粒体钙及线粒体转运通道的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(3): 25-29.
- [5] Van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, et al. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(3): 394-400.
- [6] Kretschmar M, Krüger A, Schirmer W. Hepatic ischemia-reperfusion syndrome after partial liver resection (LR): hepatic venous oxygen saturation, enzyme pattern, reduced and oxidized glutathione, procalcitonin and interleukin-6 [J]. Exp Toxicol Pathol, 2003, 54(5-6): 423-431.
- [7] 王小莹, 申丽娟, 刘作金. 细胞焦亡与肝脏缺血再灌注损伤 [J]. 重庆医学, 2019, 48(18): 3184-3187.
- [8] 孙向丽. PGAM5/Caspase-1 介导细胞焦亡参与肝脏缺血再灌注损伤的机制研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2019.
- [9] 谷保红. 细胞焦亡在小鼠肝脏缺血再灌注损伤中的作用研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [10] Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages [J]. Nature, 1992, 358(6382): 167-169.
- [11] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109.
- [12] Chou J, Shahi P, Werb Z. microRNA-mediated regulation of the tumor microenvironment [J]. Cell cycle, 2013, 12(20): 3262-3271.
- [13] 王艳, 赵然尊, 陈攀科, 等. 微小 RNA-214 改善高糖诱导的 H9c2 细胞焦亡的机制探讨 [J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(10): 820-828.
- [14] Xue Z, Xi Q, Liu H, et al. miR-21 promotes NLRP3 inflammasome activation to mediate pyroptosis and endotoxic shock [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 461.
- [15] Gehrau RC, Mas VR, Dumur CI, et al. Regulation of molecular pathways in ischemia-reperfusion injury after liver transplantation [J]. Transplantation, 2013, 96(10): 926-934.
- [16] Yang Y, Yang F, Yu X, et al. miR-16 inhibits NLRP3 inflammasome activation by directly targeting TLR4 in acute lung injury [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108664.
- [17] Jiménez-Castro MB, Comide-Petronio ME, Gracia-Sancho J, et al. Inflammasome-mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury [J]. Cells, 2019, 8(10): 1131.
- [18] Zhang HJ, Zhang YN, Teng ZY. Downregulation of miR-16 protects H9c2(2-1) cells against hypoxia/reoxygenation damage by targeting CIAPIN1 and regulating the NF- κ B pathway [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3113-3122.
- [19] Chen HH, Lan YF, Li HF, et al. Urinary miR-16 transactivated by C/EBP β reduces kidney function after ischemia/reperfusion-induced injury [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27945.
- [20] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. Cell, 2010, 140(6): 821-832.
- [21] 丁世彬, 高丽云, 李玉春, 等. 慢性 PM2.5 暴露对 C57BL/6J 小鼠肺组织炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 444-449.
- [22] Tan CC, Zhang JG, Tan MS, et al. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 18.
- [23] 李嵘, 郑昊林, 田秀娟, 等. microRNA-497 在肾小球系膜细胞焦亡中的作用及机制 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(6): 533-538.

[收稿日期] 2020-09-11

吴亚辉, 乔梁, 林洪启. 基于 Cx43/mito-KATP 信号轴观察右美托咪定预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏的保护机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 76-84.

Wu YH, Qiao L, Lin HQ. The protective mechanism of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion of the isolated rat heart uses the connexin 43/mito-KATP signaling axis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 76-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.012

基于 Cx43/mito-KATP 信号轴观察右美托咪定 预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏的保护机制

吴亚辉¹, 乔 梁², 林洪启^{3*}

(1.河南省人民医院麻醉科室, 郑州 450003; 2.河南省人民医院耳鼻喉科, 郑州 450003;
3.华中阜外医院麻醉科室, 郑州 450003)

【摘要】 目的 探讨右美托咪定预处理对大鼠离体缺血再灌注 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 心脏的保护作用以及对缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43)/线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mito-KATP) 信号轴的调控机制。**方法** 构建离体心脏 Langendorff 灌注模型。采用随机数字表法将 50 个离体心脏分为 5 组 ($n=10$): 空白组 (Blank 组)、缺血再灌注组 (I/R 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理组 (I/R+Dex 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理+mito-KATP 通道阻断剂 5-HD 组 (I/R+Dex+5-HD 组)、缺血再灌注+mito-KATP 通道阻断剂组 (I/R+5-HD 组)。采用停灌 30 min, 再灌注 120 min 的方法制备大鼠离体心脏心肌缺血再灌注损伤模型。Blank 组以 K-H 溶液持续灌流 180 min; 模型组以 K-H 溶液灌流 30 min, 停止 30 min, 再以 K-H 溶液灌流 120 min, 造成 MIRI 损伤; I/R+Dex 组以含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 30 min, 停止 30 min, 再以 K-H 溶液灌流 120 min; I/R+Dex+5-HD 组先以含 10 mg/L 的 mito-KATP 通道阻断剂 5-羟羧酸 (5-HD) 的 K-H 溶液灌流 15 min, 含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 15 min, 停止 30 min, 再以 K-H 溶液灌流 120 min; I/R+5-HD 组先以含 10 mg/L 的 5-HD 的 K-H 溶液灌流 30 min, 停止 30 min, 再以 K-H 溶液灌流 120 min。TTC 染色检测各组心脏心肌梗死面积比例。免疫组化检测各组心脏中 Cx43 的表达。Western blot 检测各组心脏中 p-Cx43 的表达水平。**结果** 与 Blank 组相比, I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, Cx43、p-Cx43 的表达明显降低; 与 I/R 组相比, I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显降低, Cx43、p-Cx43 的表达升高, I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, Cx43、p-Cx43 的表达明显降低; 与 I/R+Dex 组相比, I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, Cx43、p-Cx43 的表达明显降低, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定预处理能够促进 Cx43 的表达及磷酸化, 促进 mito-KATP 通道的开放, 减轻离体心脏的缺血再灌注损伤。

【关键词】 缝隙连接蛋白 43; 线粒体 ATP 敏感性钾通道; 右美托咪定预处理; 离体心脏; 缺血再灌注损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0076-09

The protective mechanism of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion of the isolated rat heart uses the connexin 43/mito-KATP signaling axis

WU Yahui¹, QIAO Liang², LIN Hongqi^{3*}

(1. Henan Provincial People's Hospital Department of Anesthesiology, Zhengzhou 450003, China.

[作者简介] 吴亚辉 (1982—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 心肌保护和脑保护。E-mail: 272411645@qq.com

[通信作者] 林洪启 (1972—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 围术期器官保护。E-mail: lhq9988@126.com

2. Henan Provincial People's Hospital Department of Otorhinolaryngology, Zhengzhou 450003.

3. Department of Anesthesiology of Central China Fuwai Hospital, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion injury (MIRI) in isolated rat hearts and its potential regulatory mechanism via the connexin 43 (Cx43)/mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mito-KATP) signaling axis. **Methods** The isolated heart Langendorff perfusion model was used. The random number table method was used to divide 50 isolated hearts into 5 groups ($n=10/\text{group}$): control (Blank group), ischemia-reperfusion (I/R group), ischemia-reperfusion + dexmedetomidine preconditioning (I/R+Dex group), ischemia-reperfusion+dexmedetomidine preconditioning+mito-KATP channel blocker 5-HD (I/R+Dex+5-HD group), and ischemia-reperfusion+mito-KATP channel blocker (I/R+5-HD group) groups. The rat model of isolated myocardial ischemia-reperfusion injury was prepared by stopping perfusion for 30 min and reperfusion for 120 min. The Blank group was continuously perfused with K-H solution for 180 min. The I/R group was perfused with KH solution for 30 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min, causing MIRI injury. The I/R+Dex group was perfused with KH solution containing 10 mg/L dexmedetomidine for 30 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min. The I/R+Dex+5-HD group was perfused with KH solution containing 10 mg/L of mito-KATP channel blocker 5-hydroxykynanic acid (5-HD) for 15 min, perfused with KH solution containing 10 mg/L of dexmedetomidine for 15 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min. The I/R+5-HD group was perfused with KH solution containing 10 mg/L of 5-HD for 30 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min. Triphenyltetrazolium chloride staining was used to detect the proportion of cardiac infarction in each group. The expression of Cx43 in rat hearts from each group was detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the heart expression levels of p-Cx43 in each group. **Results** Compared with the Blank group, the myocardial infarction area of the I/R, I/R+Dex, I/R+Dex+5-HD and I/R+5-HD groups were significantly increased, and the expression levels of Cx43 and p-Cx43 were significantly decreased. Compared with the I/R group, the area of myocardial infarction in the I/R+Dex and I/R+Dex+5-HD groups were significantly reduced, and the expression levels of Cx43 and p-Cx43 were increased. Compared with the I/R group, the area of myocardial infarction in the I/R+5-HD group was significantly increased, and the expression levels of Cx43 and p-Cx43 were significantly reduced. Compared with the I/R+Dex group, the areas of myocardial infarction in the I/R+Dex+5-HD and I/R+5-HD groups, were significantly reduced, and the expressions of Cx43 and p-Cx43 were reduced. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Dexmedetomidine preconditioning can promote the expression and phosphorylation of Cx43, and the opening of the mito-KATP channel, and reduce ischemia-reperfusion injury of isolated hearts.

【Keywords】 connexin43; mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; dexmedetomidine preconditioning; Isolated heart; ischemia-reperfusion injury

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 常发生在心肺复苏、冠状动脉搭桥术、溶栓疗法和心脏移植等过程中,主要的临床表现为缺血再灌注后的心室舒缩功能障碍,心肌细胞的能量异常,心律失常,血管无复流以及心室超微结构变化,致使心肌损伤加重的现象^[1]。MIRI 的病理机制十分复杂,尚未完全明确。迅速恢复心脏缺血后的灌注,是降低患者心肌梗死的面积,改善其临床预后的关键因素^[2]。右美托咪定是在 ICU 和临床麻醉中广泛应用的镇静和镇痛药物。研究表明作为一种高选择性 α_2 肾上腺素受体激动剂,右美托咪定在外科手术中具有良好的心脏保护作用^[3]。杨冯睿等^[4]研究表明

在离体心脏 MIRI 模型中,应用右美托咪定在缺血前进行预处理能明显降低离体心脏的心肌损伤,降低其梗死面积。但对右美托咪定预处理对心脏的保护机制的报道较少。缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 动物心室工作细胞的主要连接蛋白,在心肌细胞的细胞膜以及线粒体膜上广泛表达。研究显示 Cx43 磷酸化后能够调控缝隙连接的传导与细胞膜的通透功能,在维系心室舒缩功能中发挥重要作用^[5]。定位与线粒体膜上的线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mito-KATP) 被认为是器官缺血保护的效应器,心肌缺血后,mito-KATP 通道开放,发挥心脏保护的作用^[6]。研究表明

mito-KATP 通道参与心肌缺血预适应的过程,保护脏器免于损伤。但右美托咪定预处理对心脏的保护机制是否与 Cx43 和 mito-KATP 通道有关尚未有确切的报道^[7]。本研究通过建立大鼠离体心脏灌流模型,进而复制缺血再灌注(I/R)模型,从 Cx43 的表达和 mito-KATP 通道的开放出发,来探讨右美托咪定预处理对心脏的保护机制,从而为临床医师的药物选择积累基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~10 周清洁级 50 只 SD 雄性大鼠,体重 220~250 g,从河南省实验动物中心采购[SCXK(豫)2017-0001],动物饲养在郑州大学实验动物中心[SYXK(豫)2018-0003]。本研究的实验目的以及操作经郑州大学实验动物中心伦理委员会审核批准(IACUC20200613-15),在实验过程中,遵循 3R 原则,给与实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸右美托咪定注射液(dexmedetomidine hydrochloride inject, 2 mL:200 μ g, 5 瓶/盒,国药准字:H20090248,江苏恒瑞医药股份有限公司,生产批号:7WS-0563R);mito-KATP 通道阻断剂 5-羟葵酸(5-HD)(美国 abcam 公司,生产批号:ADX-0096V);HE 试剂盒(上海碧云天生物技术公司,生产批号:7604BG-1A);TTC 染色试剂盒(广东锐博生物科技技术股份有限公司,生产批号:YTO0064);兔抗大鼠 Cx43 抗体(生产批号:RB0019-01-1A)、p-Cx43 抗体(生产批号:RB0630-056L)、兔抗大鼠 GAPDH(生产批号:RB0328-073C)(德国 Rebstock 公司);Western blot 试剂盒(生产批号:JV-0018SD-3F)、免疫组化试剂盒(生产批号:JV-0567H-5N)(美国 Jackson 公司)。

ML870 八道通生理记录仪(加拿大 Visual Sonics 公司);离体心脏 Langendorff 灌流装置(普升科技有限公司);Gel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司);R290 深冷冰箱(德国维根斯公司);IX70-S8F2 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);TCS SP2 型电镜(德国 Leica 公司);TGL-16G 高速低温离心机(北京六一仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠离体心脏 Langendorff 灌流模型的建立

50 只大鼠适应性喂养一周后,随机分为 5 组,

每组 10 只,分别为空白组(Blank 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理组(I/R+Dex 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理+mito-KATP 通道阻断剂 5-HD 组(I/R+Dex+5-HD 组)、缺血再灌注+mito-KATP 通道阻断剂组(I/R+5-HD 组)。造模方法如下^[8]:使用 36 mg/kg 的浓度为 1.6%戊巴比妥钠将大鼠麻醉,腹腔注射 25 mg/kg 肝素钠进行抗凝,开胸,沿主动脉弓将心脏切下取出,转移至 4℃的 Krebs-Henseleit(K-H)溶液中轻柔挤压以排出余血,以动脉针埋入主动脉同时以缝合线将其扎紧,悬挂在 Langendorff 灌流装置上,排净 Langendorff 管中的气体后,将灌流管插入主动脉。以 12 mL/min 的恒流速将 K-H 液逆流灌注 30 min,以稳定心脏的活动;采用 ML870 型八道通生理记录心脏的左室的收缩曲线,监测心率(heart rate, HR)、左室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP)、左室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)、左室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)等参数的变化。待心脏活动平衡后即可造模,本研究中以全心缺血/再灌注的方式造模,即全心停灌 30 min,再灌注 120 min,造模成功标准^[9]:HR $\geq$ 200 次/分,左室发展压(left ventricular development pressure, LVDP) $\geq$ 50 mmHg。本研究使用的 K-H 溶液现用现配,主要的成分如下(g/L):KCl 0.35, NaCl 6.89, MgSO₄ 0.29, NaHCO₃ 2.09, CaCl₂ 0.283, 葡萄糖 1.99, KH₂PO₄ 0.16, pH 维持在 7.3~7.4。

1.3.2 实验分组处理

Blank 组心脏以 K-H 溶液持续灌流 180 min;模型组心脏以 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min,造成 MIRI 损伤;I/R+Dex 组心脏以含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min;I/R+Dex+5-HD 组心脏先以含 10 mg/L 的 5-HD 的 K-H 溶液灌流 15 min,含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 15 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min;I/R+5-HD 组心脏先以含 10 mg/L 的 5-HD 的 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min^[10]。

1.3.3 酶联免疫测定试剂盒(enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA)检测各组心脏冠脉流出液心肌钙蛋白 I(cTnI)的含量

心脏缺血再灌注 180 min 后 5 min 内心脏冠脉

漏出液的总量,即为冠脉流量 (coronary outflow, CF),同时留取各组心脏冠脉漏出液 2 mL,离心后,收集上清,ELISA 试剂盒检测冠脉漏液中 cTnI 的含量。

1.3.4 TTC 染色检测各组心脏心肌梗死面积比例

灌注 180 min 结束后,取下心脏,在 -80°C 深冷冰箱中冷冻 5 min 后,剔除心脏组织,将心脏横断成 6~7 块约 2 mm 厚度的组织。同时将 100 mg 的心脏组织,以 2% TTC 在室温下避光染色 20 min,10% 福尔马林溶液固定 24 h,数码相机拍照,梗死区域呈白色或灰白色,非梗死区域呈鲜红色^[11],留取图像,同时采用 Alpha View 图像分析软件分析梗死面积占左心室总面积的百分比。

1.3.5 各组心脏病理学改变

取出 100 mg 的心脏组织,PBS 缓冲液冲洗 3 次,HE 染色,制片,光镜下观察各组心脏的组织形态变化。

1.3.6 各组心脏超微结构病理损伤

取出 100 mg 的心脏组织,经固定,脱水,包埋,以及醋酸双氧铀 (uranyl acetate) 及枸橼酸铅 (lead citrate) 染色后,制成 50 nm 切片,干燥后,电镜观察各组心脏超微结构病理改变。

1.3.7 免疫组化检测各组心脏中 Cx43 的表达

取出 100 mg 的心脏组织,10% 的聚甲醛固定 2 h,脱水,透明,浸蜡后切片,以枸橼酸钠缓冲液进行高温抗原修复后,双氧水封闭,PBS 冲洗后,加入一抗 (1:500), 4°C 孵育过夜,次日加入二抗 (1:2000),二氨基联苯胺 (DAB) 染色,苏木素染核,清洗、脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜下观察,目的蛋白在胞质中呈棕褐色^[12]。

1.3.8 Western blot 检测各组心脏中 p-Cx43 的表达水平

取出 100 mg 的心脏组织,常规裂解、匀浆、离心后,测定蛋白浓度,电泳分离,转膜、封闭,滴加一抗 (均为 1:500), 4°C 孵育过夜,次日清洗后加入二抗 (均为 1:1000),显色,凝胶成像仪下读取各条带灰度值,以 GAPDH 作为内参,计算目的蛋白相对表达水平。

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,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异显著,具有统计学意义。

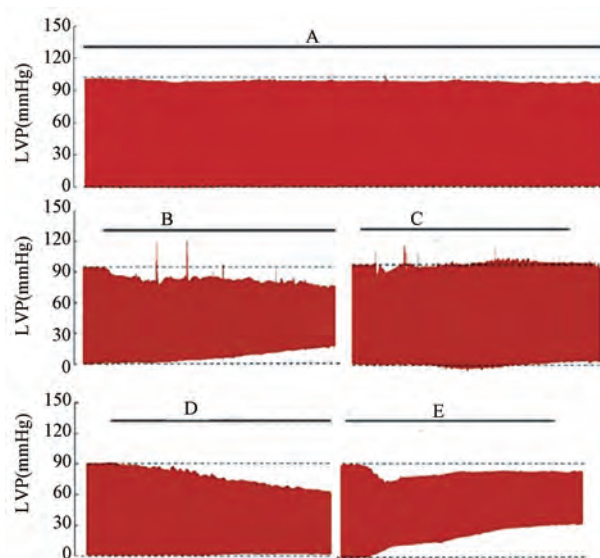
2 结果

2.1 各组大鼠离体心脏血流动力学参数的比较

在心脏 K-H 液持续灌流 180 min 内,Blank 组心脏的左心室收缩力未出现明显波动,说明在本实验操作过程中,离体心脏状态良好,无心功能降低的状况出现,如图 1 所示。各组离体心脏血流动力学参数比较如图 2 所示,与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显升高,I/R+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。各组心脏的 HR 差异不明显,不具有统计意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠离体心脏心肌梗死面积的比较

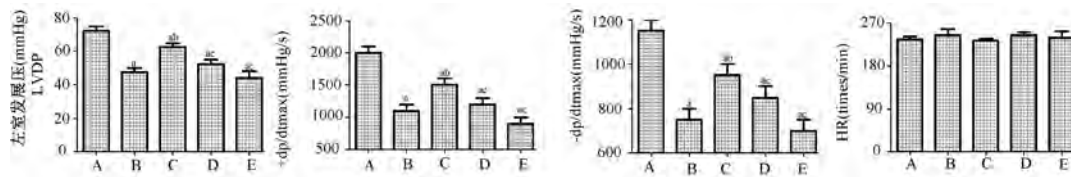
TTC 染色结果如图 3 所示,与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),与模型组相比,I/R+Dex 组、I/R+



注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。

图 1 各组大鼠离体心脏左心室收缩力 (LVP) 的实时监测
Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Figure 1 Real-time monitoring of left ventricular contractility (LVP) of isolated rats hearts of in each group

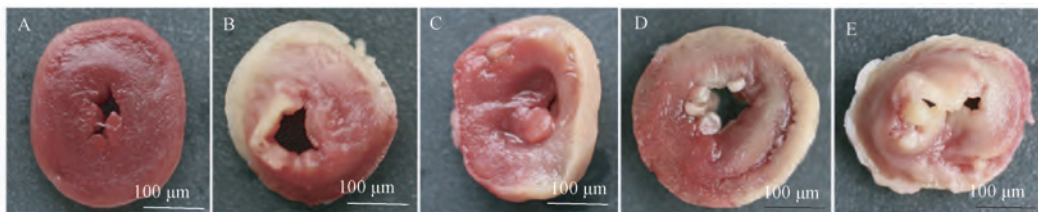


注: A: Blank 组; B: I/R 组; C: I/R+Dex 组; D: I/R+Dex+5-HD 组; E: I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比, ^a $P<0.05$; 与 I/R 相比, ^b $P<0.05$; 与 I/R+Dex 组相比, ^c $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠离体心脏血流动力学参数比较

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P<0.05$. Compared with I/R group, ^b $P<0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of hemodynamic parameters of isolated rat hearts in each group



注: A: Blank 组; B: I/R 组; C: I/R+Dex 组; D: I/R+Dex+5-HD 组; E: I/R+5-HD 组。

图 3 TTC 染色结果

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

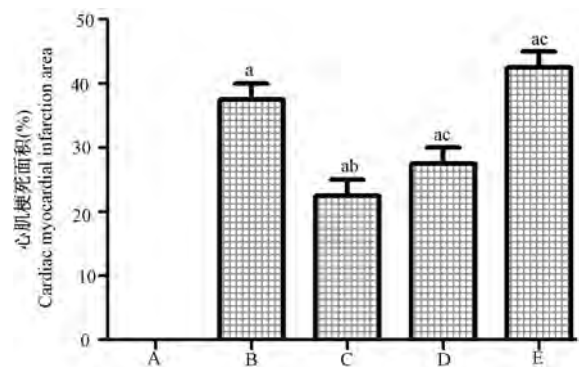
Figure 3 Results of TTC staining

Dex+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显降低, I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$), 与 I/R+Dex 组相比, I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 4。

2.3 各组大鼠离体心脏心肌组织病理损伤和超微结构的变化

HE 染色结果如图 5 所示, Blank 组心脏细胞形态正常, 胞核规则, 横纹清晰可辨, 心肌纤维排列, 间质未见明显异常; I/R 组心脏心肌纤维排列紊乱, 分布松散, 出现或断裂, 或溶解的现象, 细胞间质增宽明显, 水肿严重, 炎性细胞浸润明显, 细胞胞核严重固缩, 呈现多处坏死灶点; I/R+Dex 组, I/R+Dex+5-HD 组心脏的心肌细胞损伤明显比 I/R 组均有不同城的减轻, 并且 I/R+Dex 组的病理损伤比 I/R+Dex+5-HD 组还要缓解; I/R+5-HD 组心脏的心肌损伤最为严重。

电镜下观察各组大鼠心肌组织超微结构改变如图 6 所示: Blank 组心脏心肌横纹清晰, 心肌纤维排列规则, 胞核性状正常, 线粒体嵴结构、形态和数量正常; I/R 组心脏心肌纤维出现大面积的溶解现象, 胞核明显扩大, 核膜破裂, 染色质固缩明显, 线粒体数量减少, 肿胀明显, 呈现空泡样变性, 嵴结构



注: A: Blank 组; B: I/R 组; C: I/R+Dex 组; D: I/R+Dex+5-HD 组; E: I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比, ^a $P<0.05$; 与 I/R 相比, ^b $P<0.05$; 与 I/R+Dex 组相比, ^c $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠离体心脏心肌梗死面积比较

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P<0.05$. Compared with I/R group, ^b $P<0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of myocardial infarction area in isolated rats hearts in each group

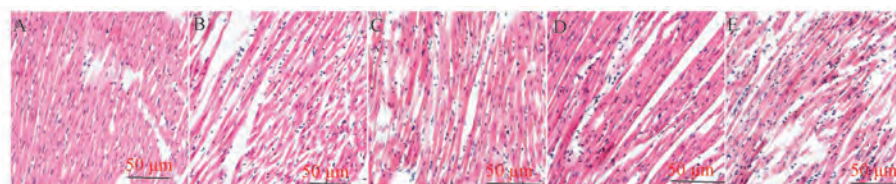
或变短或变疏或断裂或缺失, 胶原纤维松散的排列; I/R+Dex 组心肌纤维排列趋于规整, 细胞稍见肿胀, 少部分线粒体存在空泡样变性, 坏死病灶明显减小; I/R+Dex+5-HD 组心脏心肌细胞损伤明显缓解, 细胞排列趋于规则, 线粒体损伤明显减轻, 但比

I/R+Dex 组恢复的程度要小;I/R+5-HD 组心脏心肌坏死病灶面积以及分布灶点最为严重,线粒体的空泡样变性更为严重。

2.4 各组大鼠离体心脏冠脉流量以及冠脉漏出液中 cTnI 的含量的比较

与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 CF 明显降低,cTnI 的含量明显升高,差异均具有统计学意义 ($P <$

0.05),与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的 CF 明显升高,cTnI 的含量明显降低,I/R+5-HD 组心脏的 CF 明显降低,cTnI 的含量明显升高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 CF 明显降低,cTnI 的含量明显升高,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 7。

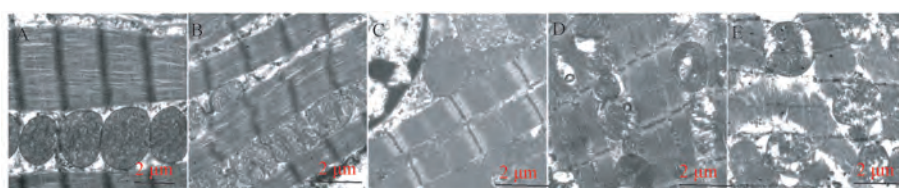


注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。

图 5 HE 染色结果

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Figure 5 Results of HE staining

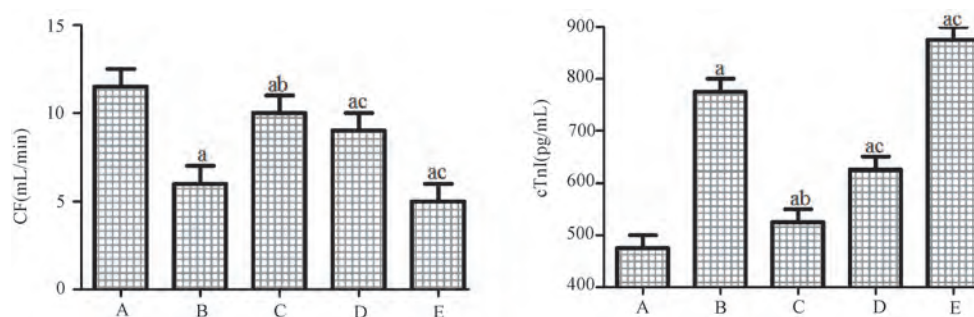


注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。

图 6 电镜观察结果

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Figure 6 Observation results under electron microscope



注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比,^a $P < 0.05$;与 I/R 相比,^b $P < 0.05$;与 I/R+Dex 组相比,^c $P < 0.05$ 。

图 7 各组大鼠离体心脏冠脉流量以及冠脉漏出液中 cTnI 的含量的比较

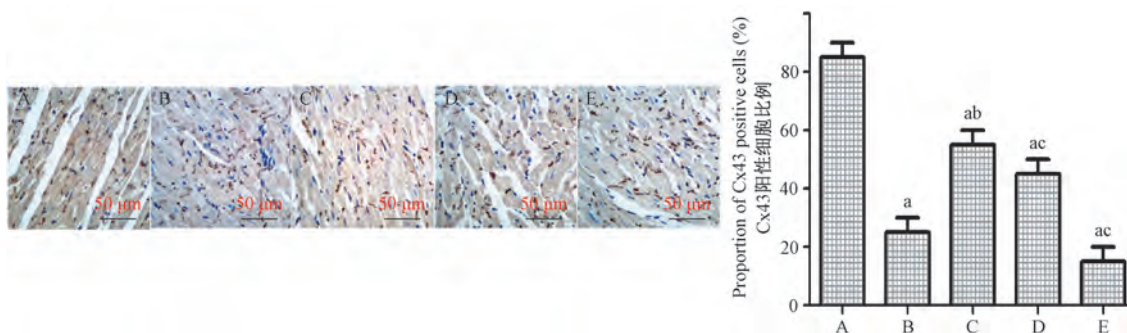
Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Compared with Blank group, ^a $P < 0.05$. Compared with I/R group, ^b $P < 0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P < 0.05$.

Figure 7 Comparison of the coronary flow and the content of cTnI in the coronary leakage of rat isolated hearts in each group

2.5 各组大鼠离体心脏中 Cx43 的表达

免疫组化结果显示,与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显升高,Cx43 的表达明显升高,I/R+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见图 8。

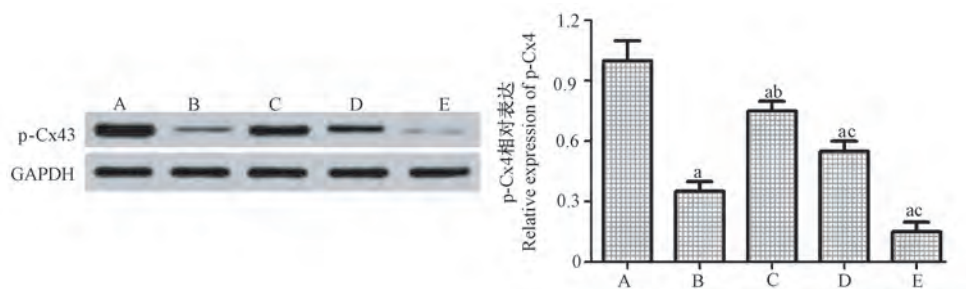


注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比,^a $P<0.05$;与 I/R 相比,^b $P<0.05$;与 I/R+Dex 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 8 各组大鼠离体心脏中 Cx43 的表达

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P<0.05$. Compared with I/R group, ^b $P<0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P<0.05$.

Figure 8 Expression of Cx43 in the isolated rats hearts in each group



注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比,^a $P<0.05$;与 I/R 相比,^b $P<0.05$;与 I/R+Dex 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 9 各组大鼠离体心脏中 Cx43 的磷酸化

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P<0.05$. Compared with I/R group, ^b $P<0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P<0.05$.

Figure 9 Phosphorylation of Cx43 in the isolated rat hearts of each group

3 讨论

当前,可以通过手术、溶栓等手段使缺血性心脏重新获得血液灌注,是组织器官的功能得以恢复,但是心脏组织缺血时间较长,缺血厚度心肌细胞在血流再灌注的过程中释放大量的炎性介质,给血管内皮细胞以及心室工作细胞带来一定的损伤,引起心肌细胞功能障碍,导致心肌变性或坏死,组织承受的损伤加重,形成 MIRI^[13]。MIRI 是冠状动脉旁路移植术、经皮冠状动脉介入术(PCI)等术后严重的并发症,是导致患者死亡的重要因素。缩短器官缺血时间、减轻 MIRI 损伤,在改善 PCI 等术后患者远期预后方面具有重大意义。

右美托咪定具有良好的镇静、镇痛、无呼吸抑制、止涎、利尿和抑制交感神经活性等药理学活性。作为辅助用药,在全身麻醉、小儿麻醉、局部麻醉以及无痛检查中广泛应用^[14]。但临床应用中右美托咪定显示了良好的器官保护作用引起广泛关注^[15]。阮孝国等^[16]研究表明右美托咪定可减轻关节镜下膝关节韧带修复术患者在术中的肢体缺血-再灌注损伤。符炜等^[17]临床研究表明右美托咪定对风心瓣膜置换术患者围术期心肌损伤具有保护作用。Yoshikawa 等^[18]研究表明右美托咪定的应用能够保护高血压性肥厚型大鼠心脏免受损伤。但是右美托咪定在 MIRI 中的应用的报道较少。本实验采用动物基础实验技术成熟且广泛应用的 Langendorff 离体心脏灌注模型,避免生物体神经、内分泌、体液、信号传导等因素对结果的影响的同时,能够直接且客观地评价药物对研究结果的影响。LVDP、 dp/dt_{max} 、 $-dp/dt_{max}$ 是临床上评价左室血流动力学的重要参数,心肌梗死面积是缺血再灌注对心脏损伤的终末表现。心脏冠脉流量以及冠脉漏出液中 cTnI 的含量是衡量心肌损伤快速而敏感的指标^[19]。本研究在成功建立离体心脏缺血再灌注模型后,与 I/R 组相比,I/R+Dex 组心脏的上述指标均有不同程度的好转;HE 以及超微结构观察显示,I/R+Dex 组的病理损伤以及心脏超微结构损伤明显缓解。说明右美托咪定预处理在缺血再灌注损伤中对离体大鼠心脏的保护作用。

明确药物的作用位点,一方面有助于阐明疾病的分子机制,另一方面更有助于针对疾病作用位点的靶向治疗。Cx43 是构成细胞间连接的基本结构的膜蛋白,不仅具有细胞间通讯交流的功能,其表

达与活化后还能调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡。研究证实作为心室心肌细胞缝隙连接的最主要组成成分,Cx43 的表达、分布以及磷酸化水平直接影响着心脏的结构与功能的变化,与慢性心衰、肥厚性心肌病等心血管疾病的密切相关^[20]。mito-KATP 通道是线粒体膜上的依赖钾浓度的离子通道。研究表明 mito-KATP 通道是多种心血管疾病缺血预处理后心肌免受损伤,发挥保护的终末效应分子,同时也是启动心肌自我防护效应的关键信号分子^[21]。Pisarenko 等^[22]研究表明在整体缺血的离体灌注工作大鼠心脏中,mito-KATP 通道的开放有助于减轻离体心脏的缺血再灌注损伤。研究表明缺血预处理能够促进 Cx43 的磷酸化,但是就在右美托咪定预处理中,是否存在 Cx43 的激活以及 mito-KATP 通道的开放,尚未有定论。本研究以 mito-KATP 通道阻断剂作为对照组研究 Cx43 的表达以及 mito-KATP 通道的开放在右美托咪定预处理的作用。结果显示阻断 mito-KATP 通道后,与 I/R 组相比,I/R+5-HD 组的心功能参数明显降低,心肌梗死面积明显升高,说明当离体心脏发生缺血再灌注时,心脏自动开放 mito-KATP 通道,与既往研究一致;与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43、p-Cx43 的表达均明显降低,心肌梗死面积明显升高,心肌病理损伤加重。说明右美托咪定预处理能够促进 mito-KATP 通道的开放,促进 Cx43 的表达以及磷酸化,以发挥心脏保护的作用。

综上所述,右美托咪定预处理能够促进 Cx43 的表达以及磷酸化,促进 mito-KATP 通道的开放,减轻离体心脏的缺血再灌注损伤。但是临床上右美托咪定预处理能否发挥相同的效应还待更为系统的研究。

参考文献:

- [1] Russo I, Penna C, Musso T, et al. Platelets, diabetes and myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16(1): 71-82.
- [2] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin SL, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2018, 234(1): 214-222.
- [3] Bunte S, Behnenburg F, Majewski N, et al. Characteristics of dexmedetomidine preconditioning in the field of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Anesth Analg, 2020, 130(1): 90-98.
- [4] 杨冯睿, 易汉, 汪超, 等. miR-208b-3p 在右美托咪定减轻大

- 鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(2): 153-155.
- [5] Kang PT, Chen CL, Lin P, et al. Mitochondrial complex I in the post-ischemic heart: reperfusion-mediated oxidative injury and protein cysteine sulfonation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 121(8): 190-204.
- [6] 刘为, 黄丽萍, 田伟, 等. 线粒体 ATP 敏感性钾通道在尿皮质素后处理对大鼠心肌细胞保护效应中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(2): 174-177.
- [7] Yokoyama S, Nakagawa I, Ogawa Y, et al. Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus [J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0215104.
- [8] 贾敏, 王静, 张冀东, 等. 养心定悸胶囊调控 NOS 途径改善心肌缺血再灌注损伤及其引起的心律失常 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(14): 1444-1449.
- [9] 周雯静, 李进, 喻田, 等. mito-K(ATP)通道在吡那地尔后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用: 离体实验 [J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(5): 627-630.
- [10] 谢铭, 黄惠丽, 张文慧, 等. 基于不同钙释放机理的花萼海绵诱癌素 A 与去乙酰毛茛碱的正性肌力作用研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(6): 607-610.
- [11] Shu L, Zhang W, Huang C, et al. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Pi3k/Akt pathway in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(5): 1939-1948.
- [12] Reitz CJ, Alibhai FJ, Khatua TN, et al. SR9009 administered for one day after myocardial ischemia-reperfusion prevents heart failure in mice by targeting the cardiac inflammasome [J]. Commun Biol, 2019, 2: 353.
- [13] Conklin DJ, Guo Y, Nystoriak MA, et al. TRPA1 channel contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 316(4): H889-H899.
- [14] Keating GM. Dexmedetomidine: a review of its use for sedation in the intensive care setting [J]. Drugs, 2015, 75(10): 1119-1130.
- [15] Mahmoud M, Mason KP. Dexmedetomidine: review, update, and future considerations of paediatric perioperative and periprocedural applications and limitations [J]. Br J Anaesth, 2015, 115(2): 171-182.
- [16] 阮孝国, 刘贺, 孟凡民, 等. 右美托咪定对骨科下肢手术患者止血带诱发肢体缺血-再灌注损伤的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2015, 31(7): 668-670.
- [17] 符伟, 顾尔伟, 王宏, 等. 不同剂量右美托咪定对心肺转流风心瓣膜置换术患者心肌损伤的影响 [J]. 重庆医学, 2015, 44(4): 492-494.
- [18] Yoshikawa Y, Hirata N, Kawaguchi R, et al. Dexmedetomidine maintains its direct cardioprotective effect against ischemia/reperfusion injury in hypertensive hypertrophied myocardium [J]. Anesth Analg, 2018, 126(2): 443-452.
- [19] Peng YW, Mohammed A, Deatrick KB, et al. Differential effects of normoxic and hyperoxic reperfusion on global myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 31(2): 188-198.
- [20] Roell W, Klein AM, Breitbach M, et al. Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 7145-7158.
- [21] 李宏玉, 唐强, 朱路文, 等. 运动预处理对脑缺血再灌注大鼠线粒体 ATP 敏感性钾通道蛋白及细胞凋亡的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(5): 497-501.
- [22] Pisarenko OI, Shulzhenko VS, Studneva IM, et al. Signaling pathways of a structural analogue of apelin-12 involved in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury [J]. Peptides, 2015, 73(11): 67-76.

[收稿日期] 2020-08-19

吴凯,任强. MiR-338-3p 通过靶向 WNK1 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 85-92.

Wu K, Ren Q. Mechanism of miR-338-3p affecting esophageal cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis by targeting WNK1 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.013

MiR-338-3p 通过靶向 WNK1 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的机制研究

吴 凯,任 强

(淮北矿工总医院心胸外科,安徽 淮北 235000)

【摘要】 目的 探讨 miR-338-3p 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的分子机制及其对 WNK1 的靶向调控作用。**方法** 体外培养人正常食管上皮细胞株 Het-1A 与人食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706,采用 qRT-PCR 与 Western blot 分别检测 miR-338-3p、WNK1 的表达水平;以 EC9706 细胞为研究对象,分别将 miR-con、miR-338-3p mimics、si-con、si-WNK1、miR-338-3p mimics 与 pcDNA、miR-338-3p mimics 与 pcDNA-WNK1 转染至 EC9706 细胞;MTT 法检测细胞增殖、流式细胞术检测细胞凋亡、Transwell 小室实验检测迁移及侵袭能力;双荧光素酶报告实验检测 miR-338-3p 与 WNK1 的靶向关系。**结果** 与 Het-1A 比较,食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 中 miR-338-3p 的表达显著下调 ($P<0.05$),WNK1 mRNA 及蛋白表达显著上调 ($P<0.05$);转染 miR-338-3p mimics 或 si-WNK1 可明显降低 EC9706 细胞的活力、迁移及侵袭细胞数 ($P<0.05$),增加 EC9706 细胞的凋亡率 ($P<0.05$);双荧光素酶报告实验证实 miR-338-3p 靶向结合 WNK1;共转染 miR-338-3p mimics 与 pcDNA-WNK1 可明显逆转转染 miR-338-3p mimics 对细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的作用。**结论** miR-338-3p 可靶向下调食管癌中的 WNK1,进而抑制食管癌细胞的增殖、迁移及侵袭,和诱导细胞凋亡。

【关键词】 miR-338-3p;WNK1;食管癌;增殖;迁移;侵袭;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0085-08

Mechanism of miR-338-3p affecting esophageal cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis by targeting WNK1

WU Kai, REN Qiang

(Department of Cardiothoracic Surgery, Huaibei Miners General Hospital, Huaibei 235000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism of miR-338-3p in the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of esophageal cancer cells and its targeted regulation of WNK1. **Methods** Human normal esophageal epithelial cell line Het-1A and human esophageal cancer cell lines Eca-109, EC-1, and EC9706 were cultured *in vitro*. The expression levels of miR-338-3p and WNK1 were measured by qRT-PCR and Western blot, respectively. In EC9706 cells, miR-con, miR-338-3p mimics, si-con, si-WNK1, miR-338-3p mimics and pcDNA, and miR-338-3p mimics and pcDNA-WNK1 were transfected into EC9706 cells. MTT assays were used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect apoptosis, and Transwell assays were used to detect migration and invasion abilities. A dual luciferase reporter assay was used to assess the relationship between miR-338-3p and WNK1. **Results** Compared with Het-1A, the expression levels of miR-338-3p in esophageal cancer cell lines Eca-109, EC-1, and EC9706 were reduced

significantly ($P < 0.05$) and the expression levels of WNK1 mRNA and protein were increased significantly ($P < 0.05$). Transfection of miR-338-3p mimics or si-WNK1 significantly reduced the viability, migration, and invasion of EC9706 cells ($P < 0.05$), and increased the apoptosis rate of EC9706 cells ($P < 0.05$). The dual luciferase reporter assay confirmed that miR-338-3 targeted WNK1. Cotransfection of miR-338-3p mimics and pcDNA-WNK1 obviously reversed the effects of miR-338-3p mimics on cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis. **Conclusions** MiR-338-3p downregulates WNK1 in esophageal cancer, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells and inducing apoptosis.

【Keywords】 miR-338-3p; WNK1; esophageal cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis

食管癌是临床常见的恶性肿瘤,近年来,食管癌发病率逐年上升,基因异常表达、致癌信号通路的激活等均可促进食管癌的发生^[1]。miRNA 属于非编码单链小 RNA 分子,其可通过与靶基因结合从而调控靶基因表达,miRNA 异常表达可影响多种肿瘤发生及发展^[2]。既往研究显示 miRNA 表达上调或下调均可能参与食管癌发生及发展过程,并可通过调控靶基因表达从而影响食管癌细胞增殖、凋亡等生物学行为^[3-5]。miR-338-3p 在胃癌组织中表达下调^[6]。生物信息学分析显示 WNK1 可能是 miR-338-3p 的靶基因,研究表明 WNK1 表达量升高并可能促进肾癌发生及发展^[7]。但 miR-338-3p 是否可通过靶向 WNK1 影响食管癌发生发展过程尚未可知。因此,本研究通过检测食管癌细胞系中 miR-338-3p、WNK1 的表达,探讨 miR-338-3p 对食管癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响及二者的靶向关系。

1 材料和方法

1.1 细胞

人正常食管上皮细胞株 Het-1A、人食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM、胎牛血清、青霉素、链霉素、Opti-MEM 减血清培养基购自美国 Gibco 公司; miR-338-3p mimics、miR-con、si-WNK1、si-con、anti-miR-338-3p、anti-miR-con 购自上海吉玛制药技术有限公司;qRT-PCR 试剂盒(20181203)购自北京天根生化科技有限公司;MTT(20181116)购自上海泽叶生物科技有限公司;细胞凋亡试剂盒(APOAF MSDS)购自美国 Sigma 公司;双荧光素酶活性检测试剂盒购自北京索莱宝;兔抗人 WNK1 抗体购自武汉友联特生物技术有限公司;兔抗人 PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved caspase-3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公

司;FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞转染及实验分组

取对数生长期 EC9706 细胞,待细胞生长至 70% 融合度时将培养基更换为 Opti-MEM 减血清培养基,参照 Lipofectamine2000 转染试剂分别将 miR-con、miR-338-3p mimics、si-con、si-WNK1、miR-338-3p mimics 与 pcDNA、miR-338-3p mimics 与 pcDNA-WNK1 转染至 EC9706 细胞,分别记作 miR-con 组、miR-338-3p 组、si-con 组、si-WNK1 组、miR-338-3p + pcDNA 组、miR-338-3p + pcDNA-WNK1 组。同时将未经转染的 EC9706 细胞作为 NC 组。

1.3.2 qRT-PCR 检测细胞中 miR-338-3p、WNK1 mRNA 的表达水平

收集 Het-1A、Eca-109、EC-1、EC9706 细胞及各组转染后的 EC9706 细胞,采用 TRIzol 法提取细胞中的总 RNA。检测 RNA 浓度与纯度。反转录合成 cDNA。qRT-PCR 反应条件:95℃ 120 s,94℃ 45 s,60℃ 30 s,70℃ 45 s,共 40 次循环。计算 miR-338-3p、WNK1 mRNA 的相对表达量。miR-338-3p 正向引物 5'-ATCCAGTGCCTGTCGTGG-3',反向引物 5'-TGCTTCCAGCATCAGTGAT-3';WNK1 正向引物 5'-CAGAGTGAGCAGCCAACAGA-3',反向引物 5'-CCACGGACTGAGGCATACTT-3';β-actin 正向引物 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',反向引物 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3';U6 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.3.3 MTT 检测细胞增殖

EC9706 细胞每毫升 2.5×10^4 个接种于 96 孔板,每孔 100 μL,加 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,应用酶标仪检测各孔吸光度值(OD)。

1.3.4 流式细胞术评估 EC9706 细胞凋亡率

EC9706 细胞在 500 μL 结合缓冲液中重悬,参

照试剂盒说明书操作,应用流式细胞仪、FlowJo 软件分析各组 EC9706 细胞的凋亡率。

1.3.5 Transwell 实验测定 EC9706 细胞迁移及侵袭

EC9706 细胞迁移测定:将各组转染后的 EC9706 细胞(每毫升 2×10^5 个),Transwell 小室上室与下室分别加入细胞悬浮液(200 μ L)与 DMEM 培养基(600 μ L),继续培养 24 h,多聚甲醛固定后进行结晶紫溶液染色,观察迁移细胞数。EC9706 细胞侵袭实验:Transwell 小室上室使用稀释的 Matrigel 基质胶(100 μ L),包被 5 h。后续按照 EC9706 细胞迁移测定的步骤检测侵袭细胞数。

1.3.6 双荧光素酶报告基因检测 miR-338-3p 的靶基因

TargetScan 预测 miR-338-3p 与 WNK1-3' UTR 存在结合位点,构建野生型载体 WT-WNK1、突变型载体 MUT-WNK1(美国 Promega 公司),于 EC9706 细胞中分别共同转染 WT-WNK1、MUT-WNK1 与 miR-con、miR-338-3p mimics,收集 48 h 后的 EC9706 细胞进行荧光素酶活性测定。

1.3.7 Western blot 检测 EC9706 细胞中 WNK1 蛋白、PCNA 蛋白、Cleaved caspase-3 蛋白、MMP-2 蛋白及 MMP-9 蛋白表达

提取细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,SDS-PAGE 分离蛋白,转膜,封闭 2 h,依次分别加入一抗稀释液与二抗稀释液,通过 Image J 软件进行各条带灰度值的分析。

1.4 统计学方法

实验数据在 SPSS 21.0 统计学软件中整理分析,结果表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),两组间、多组间数据比较分别采用独立样本 t 检验、单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常食管上皮细胞和食管癌细胞中 miR-338-3p 和 WNK1 的表达

见图 1、表 1,qRT-PCR 法与 Western blot 法分别检测食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 中 miR-338-3p、WNK1 mRNA 及蛋白的表达量,结果显示,食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 中 miR-338-3p 的表达量显著低于 Het-1A 细胞,WNK1 mRNA 和 WNK1 蛋白的表达量显著高于 Het-1A 细胞($P < 0.05$)。表明 miR-338-3p 在食管癌中呈低表达,而 WNK1 在食

管癌细胞中呈高表达。

2.2 转染 miR-338-3p 抑制食管癌细胞 EC9706 增殖和诱导细胞凋亡

见图 2、表 2,MTT 法、流式细胞术分别检测细胞活力及凋亡率,采用 Western blot 法检测 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达量,结果显示,miR-338-3p 组食管癌细胞 EC9706 的细胞活力、PCNA 蛋白表达量低于 miR-con 组($P < 0.05$),而细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白表达量显著高于 miR-con 组($P < 0.05$)。表明 miR-338-3p 过表达能够抑制食管癌细胞增殖及促进细胞凋亡。

2.3 转染 miR-338-3p 抑制食管癌细胞 EC9706 迁移和侵袭

Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭,Western blot 法检测 MMP-2、MMP-9 蛋白水平,结果显示,与 miR-con 组比较,miR-338-3p 组食管癌细胞 EC9706 的迁移细胞数、侵袭细胞数、MMP-2、MMP-9 蛋白水平显著降低($P < 0.05$),见图 3、表 3。表明 miR-338-3p 过表达可抑制食管癌细胞迁移及侵袭。

表 1 qRT-PCR 检测正常食管上皮细胞和食管癌细胞中 miR-338-3p 和 WNK1 mRNA 的表达及 Western blot 检测 WNK1 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 qRT-PCR to detect the expression of miR-338-3p and WNK1 mRNA in normal esophageal epithelial cells and esophageal cancer cells, and Western blot to detect the expression of WNK1 protein

分组 Groups	miR-338-3p	WNK1 mRNA	WNK1 蛋白 WNK1 protein
Het-1A	1.04 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.04
Eca-109	0.52 $\pm$ 0.08*	4.04 $\pm$ 0.40*	0.53 $\pm$ 0.06*
EC-1	0.48 $\pm$ 0.06*	4.58 $\pm$ 0.45*	0.69 $\pm$ 0.07*
EC9706	0.39 $\pm$ 0.05*	5.15 $\pm$ 0.48*	0.82 $\pm$ 0.08*
F	178.121	204.239	93.745
P	0.000	0.000	0.000

注:与 Het-1A 组相比较,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the Het-1A group, * $P < 0.05$.

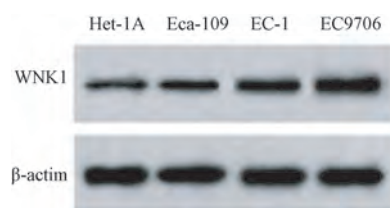
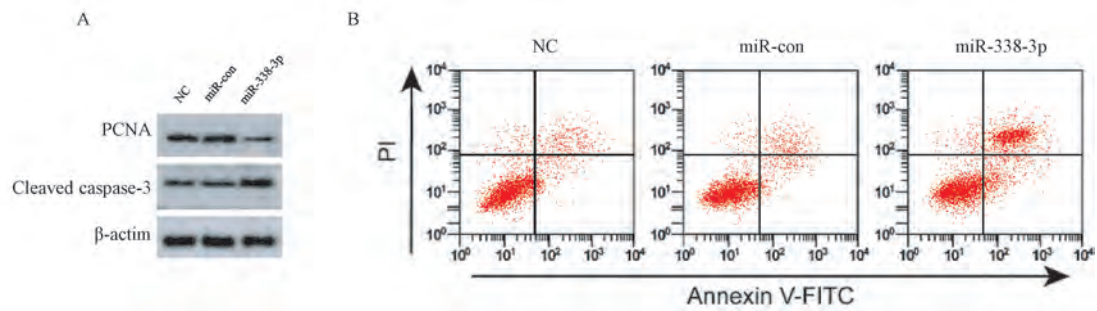


图 1 正常食管上皮细胞和食管癌细胞中 WNK1 蛋白表达
Figure 1 WNK1 protein expression in normal esophageal epithelial cells and esophageal cancer cells



注:A:转染 miR-338-3p 对细胞中 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达的检测;B:转染 miR-338-3p 对细胞凋亡的检测。

图 2 转染 miR-338-3p 对食管癌细胞 EC9706 凋亡和 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达生物影响

Note. A, Detection of PCNA and Cleaved caspase-3 protein expression in cells by transfection of miR-338-3p. B, Detection of cell apoptosis by transfection of miR-338-3p.

Figure 2 Biological effects of miR-338-3p transfection on apoptosis and expression of PCNA and cleaved caspase-3 protein in esophageal cancer cell line EC9706

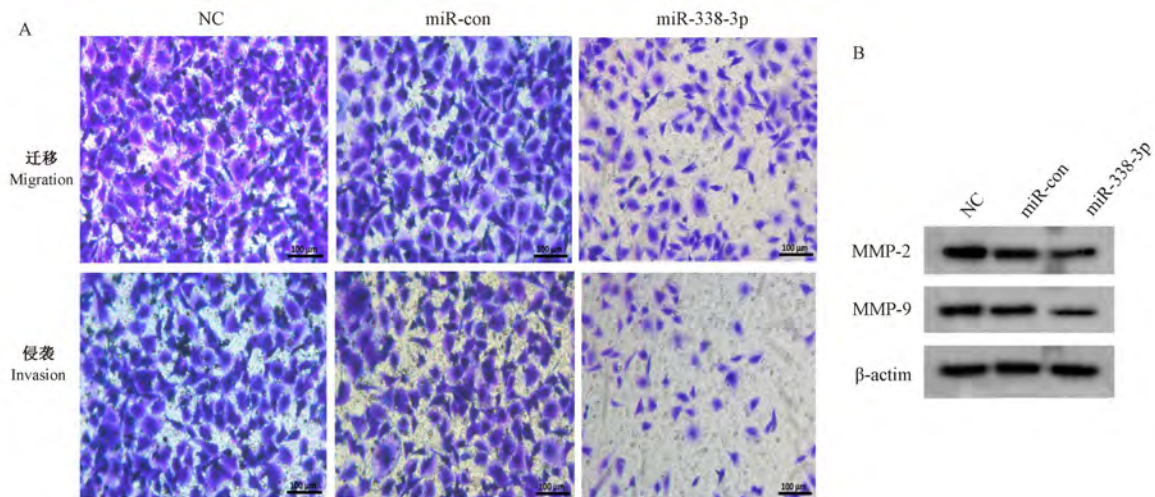
表 2 转染 miR-338-3p 对食管癌细胞 EC9706 凋亡和 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达生物影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Biological effects of miR-338-3p transfection on apoptosis and expression of PCNA and cleaved caspase-3 protein in esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	miR-338-3p	PCNA	Cleaved caspase-3	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate	细胞活力 (%) Cell viability
NC	0.98±0.08	0.58±0.07	0.22±0.02	2.92±0.35	101.32±5.44
miR-con	0.94±0.11	0.62±0.08	0.25±0.03	3.45±0.56	97.36±6.58
miR-338-3p	7.58±0.68 *	0.29±0.06 *	0.72±0.07 *	15.26±1.44 *	63.45±5.93 *
<i>F</i>	820.192	58.772	342.435	523.627	108.266
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-con 组相比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with miR-con group, * $P < 0.05$.



注:A:转染 miR-338-3p 对细胞迁移侵袭的检测;B:转染 miR-338-3p 对细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的检测。

图 3 转染 miR-338-3p 对食管癌细胞 EC9706 中迁移、侵袭、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Note. A, Detection of cell migration and invasion by transfection of miR-338-3p. B, Detection of MMP-2 and MMP-9 protein expression in cells by transfection of miR-338-3p.

Figure 3 Effects of miR-338-3p transfection on migration, invasion and expression of MMP-2 and MMP-9 in EC9706 cells

2.4 miR-338-3p 靶向、调控 WNK1

TargetScan 软件预测发现 miR-338-3p 与 WNK1 存在互补序列,见图 4A。双荧光素酶报告实验结果显示 miR-338-3p 过表达可降低 WT-WNK1 荧光素酶活性($P<0.05$),而对 MUT-WNK1 荧光素酶活性无明显影响($P>0.05$),见表 4。与 miR-con 组比较,miR-338-3p 组细胞中 WNK1 蛋白水平显著降低($P<0.05$);与 anti-miR-con 组比较,anti-miR-338-3p 组细胞中 WNK1 蛋白水平显著升高($P<0.05$),见图 4B、表 5。表明 miR-338-3p 可靶向结合 WNK1,并可负向调控 WNK1 的表达。

2.5 沉默 WNK1 抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭

MTT 法、流式细胞术、Transwell 实验分别检测细胞活力、凋亡率、迁移及侵袭,Western blot 法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved caspase-3 蛋白水平,结果显示,与 si-con 组比较,si-WNK1 组 EC9706 细胞活力、PCNA、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量显著

减少,而 EC9706 细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白水平明显增强,迁移细胞数与侵袭细胞数显著减少($P<0.05$),见图 5、表 6。表明沉默 WNK1 可抑制食管癌细胞增殖、迁移及侵袭。

2.6 过表达 WNK1 部分逆转 miR-338-3p 对食管癌细胞的抑制作用

MTT 法、流式细胞术、Transwell 实验分别检测细胞活力、凋亡率、迁移及侵袭,Western blot 法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved caspase-3 蛋白水平,结果显示,与 miR-338-3p + pcDNA 组比较,miR-338-3p + pcDNA-WNK1 组 EC9706 细胞的活力、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白水平比 miR-338-3p + pcDNA 组显著增加,但 EC9706 细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白水平较 miR-338-3p + pcDNA 组显著减少,且 EC9706 细胞的迁移、侵袭细胞数比 miR-338-3p + pcDNA 组显著提高($P<0.05$),见表 7、图 6。表明 WNK1 过表达能够拮抗 miR-338-3p 过表达对食管癌细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。

表 3 转染 miR-338-3p 抑制食管癌细胞 EC9706 迁移和侵袭($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 3 Transfection of miR-338-3p inhibits migration and invasion of esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	MMP-2	MMP-9	迁移细胞数 Cell migration number	侵袭细胞数 Cell invasion number
NC	1.12±0.09	0.77±0.08	294.53±15.73	127.64±8.37
miR-con	1.15±0.11	0.74±0.08	278.59±19.17	117.92±11.70
miR-338-3p	0.62±0.07*	0.44±0.05*	114.04±8.48*	62.64±5.74*
<i>F</i>	95.343	58.765	392.503	138.349
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-con 组相比较,* $P<0.05$ 。

Note. Compared with the miR-con group, * $P<0.05$.



注:A:miR-338-3p 与 WNK1 存在互补序列;B:Western blot 检测 WNK1 蛋白表达量。

图 4 miR-338-3p 与 WNK1 存在互补序列并调控 WNK1 蛋白表达

Note. A, miR-338-3p and WNK1 had complementary sequences. B, Western blot was used to detect the expression of WNK1 protein.

Figure 4 miR-338-3p has complementary sequence with WNK1 and regulates WNK1 protein expression

表 4 双荧光素酶报告实验($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Double luciferase report experiment

分组 Groups	野生型 WNK1WT-WNK1	突变型 WNK1MUT-WNK1
miR-con	1.07±0.07	1.12±0.09
miR-338-3p	0.55±0.08*	1.15±0.08
<i>t</i>	14.675	0.747
<i>P</i>	0.000	0.466

注:与 miR-con 组比较,* $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-con group, * $P<0.05$.

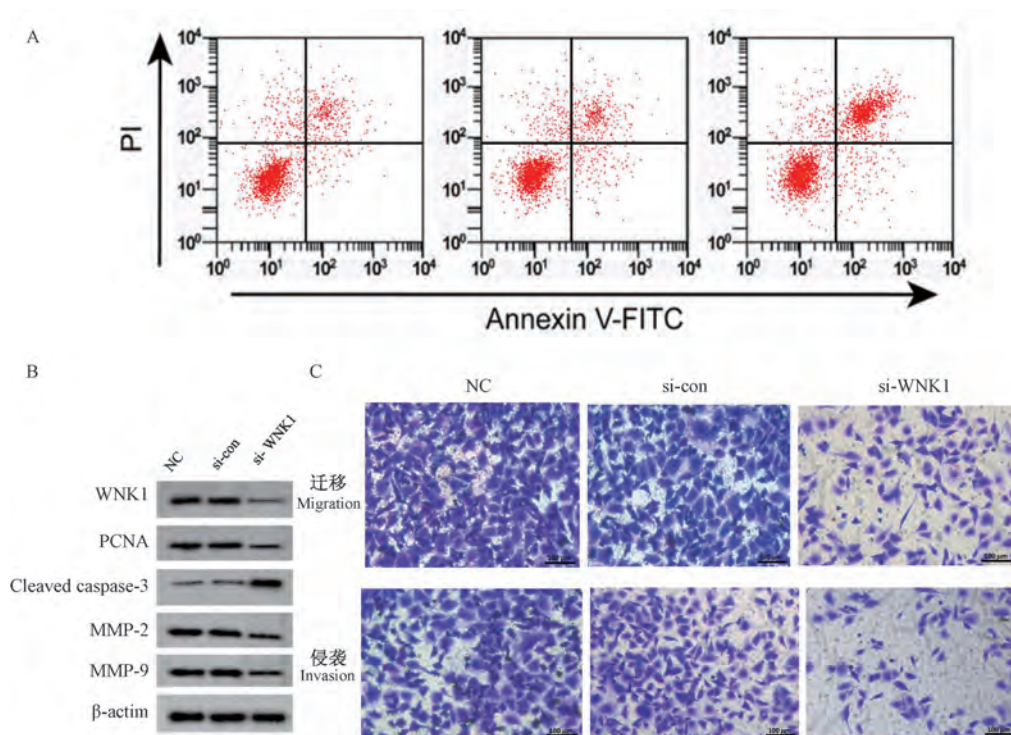
表 5 miR-338-3p 靶向调控 WNK1 表达($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 5 miR-338-3p targets WNK1 expression

分组 Groups	WNK1
miR-con	0.63±0.06
miR-338-3p	0.28±0.04*
anti-miR-con	0.58±0.06
anti-miR-338-3p	1.25±0.09 [#]
<i>F</i>	353.112
<i>P</i>	0.000

注:与 miR-con 组比较,* $P<0.05$;与 anti-miR-con 组比较,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-con group, * $P<0.05$. Compared with anti-miR-con group, [#] $P<0.05$.



注:A:沉默 WNK1 对细胞凋亡的检测;B:沉默 WNK1 对细胞中 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的检测;C:沉默 WNK1 对细胞迁移侵袭的检测。

图 5 沉默 WNK1 对食管癌细胞 EC9706 凋亡、迁移、侵袭和 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响

Note. A, Silencing WNK1 to detect cell apoptosis. B, Detection of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 protein expression in cells by silencing WNK1. C, Detection of cell migration and invasion by silencing WNK1.

Figure 5 Effects of WNK1 silencing on apoptosis, migration, invasion and protein expression of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 in esophageal cancer cell line EC9706

表 6 沉默 WNK1 抑制食管癌细胞 EC9706 增殖、迁移和侵袭 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Silencing WNK1 inhibits proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	WNK1	PCNA	Cleaved caspase-3	MMP-2	MMP-9	迁移细胞数 Cell migration number	侵袭细胞数 Cell invasion number	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate	细胞活力 (%) Cell viability
NC	0.71±0.07	0.55±0.04	0.25±0.02	0.73±0.05	0.61±0.04	291.53±18.26	121.94±9.84	3.25±0.65	99.72±5.49
si-con	0.68±0.05	0.52±0.05	0.28±0.03	0.70±0.07	0.63±0.06	285.07±19.42	114.34±11.96	3.82±0.76	95.37±7.41
si-WNK1	0.17±0.04*	0.22±0.03*	0.82±0.08*	0.35±0.03*	0.32±0.05*	94.43±8.27*	55.07±6.64*	15.81±1.54*	68.68±5.86*
F	276.300	179.820	360.818	145.193	105.545	434.622	127.450	402.845	63.879
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 si-con 组比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with the si-con group, * $P<0.05$.

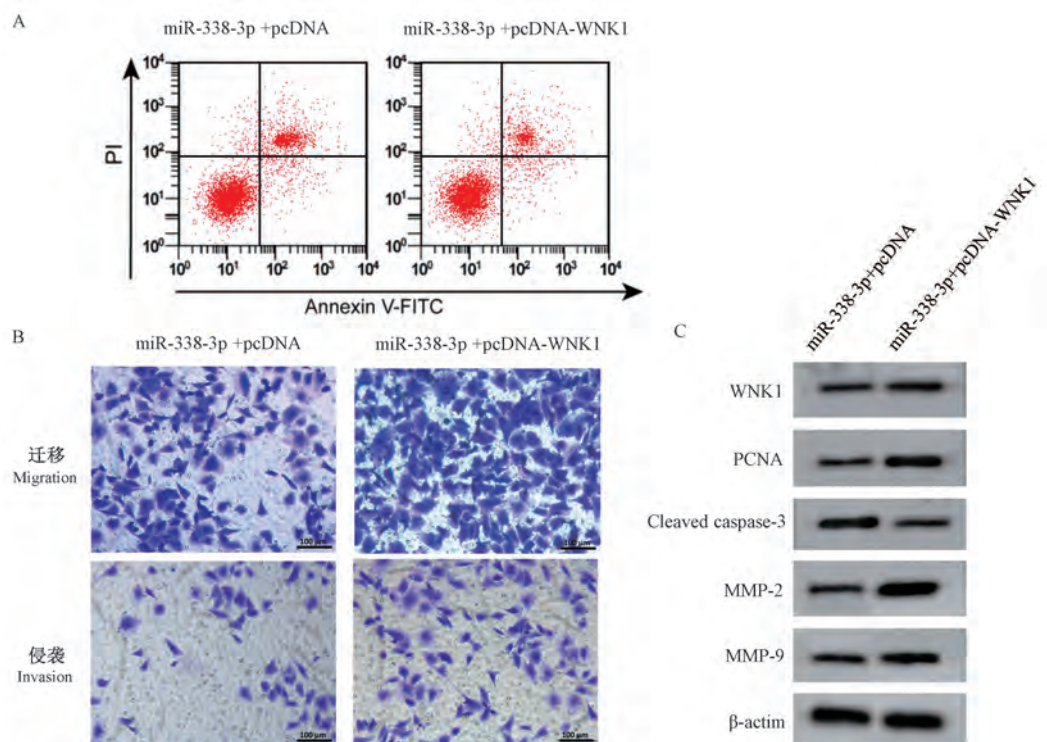
表 7 miR-338-3p 和过表达 WNK1 抑制食管癌细胞 EC9706 增殖、迁移和侵袭 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 7 miR-338-3p and WNK1 overexpression inhibit proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	WNK1	PCNA	Cleaved caspase-3	MMP-2	MMP-9	迁移细胞数 Cell migration number	侵袭细胞数 Cell invasion number	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate	细胞活力 (%) Cell viability
miR-338-3p+pcDNA	0.35±0.05	0.28±0.04	0.68±0.05	0.32±0.06	0.39±0.04	113.37±18.48	51.86±6.64	15.92±1.53	98.31±8.46
miR-338-3p+pcDNA-WNK1	0.54±0.06*	0.63±0.07*	0.44±0.06*	0.78±0.07*	0.65±0.06*	194.58±12.26*	84.27±7.39*	7.28±1.06*	142.54±15.83*
F	19.359	13.024	9.219	14.968	10.817	10.994	9.787	13.926	7.393
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-338-3p+pcDNA 组比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-338-3p+pcDNA group, * $P<0.05$.



注:A:miR-338-3p 和过表达 WNK1 对细胞凋亡的检测;B:miR-338-3p 和过表达 WNK1 对细胞迁移侵袭的检测;C:miR-338-3p 和过表达 WNK1 对细胞中 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达量

图 6 miR-338-3p 和过表达 WNK1 对食管癌细胞 EC9706 凋亡、迁移、侵袭和 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响

Note. A, Detection of apoptosis by miR-338-3p and overexpression of WNK1. B, Detection of miR-338-3p and overexpression of WNK1 on cell migration and invasion. C, miR-338-3p and overexpression of WNK1 affect the expression of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 proteins in cells.

Figure 6 Effects of miR-338-3p and WNK1 overexpression on apoptosis, migration, invasion and protein expression of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 in esophageal cancer cell line EC9706

3 讨论

miR-338-3p 在肾癌、宫颈癌、非小细胞肺癌细胞中表达下调,并可调控细胞的生物学过程,如增殖、迁移及侵袭等^[8-10]。本研究数据表明,miR-338-3p 在食管癌细胞系 Eca-109、EC-1、EC9706 中的表达下调,与上述研究结果相似,提示 miR-338-3p 在食管癌发生过程中可能发挥抑癌基因作用。本研究结果显示 miR-338-3p 过表达后食管癌细胞增殖能力显著降低,进一步分析显示 miR-338-3p 过表达后可抑制食管癌细胞中 PCNA 的表达,PCNA 表达量升高可促进细胞增殖^[11]。本研究结果提示 miR-338-3p 过表达可能通过抑制食管癌细胞 PCNA 的表达,发挥抗食管癌增殖、迁移及侵袭,和促食管癌细胞凋亡的作用,还可增强 Cleaved caspase-3 表达,抑制 MMP-2、MMP-9 表达,与相关文献报道相似^[12-13]。提示 miR-338-3p 过表达可促进细胞凋亡及抑制食管癌细胞迁移及侵袭。

miR-93 通过抑制 WNK1 表达从而抑制三阴性乳腺癌细胞迁移及侵袭^[14]。研究表明 WNK1 在肿瘤细胞中表达上调并可促进细胞迁移^[15]。与上述研究结果相似,本研究结果显示 WNK1 在食管癌中表达上调,沉默 WNK1 表达能减弱食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并诱导食管癌细胞的凋亡,双荧光素酶报告实验进一步证实 WNK1 是 miR-338-3p 的靶基因。本研究结果显示 WNK1 过表达后,miR-338-3p 过表达调控食管癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的作用被逆转。

综上所述,miR-338-3p 在食管癌细胞中呈低表达,WNK1 的表达量明显升高,miR-338-3p 过表达可抑制食管癌细胞增殖、迁移及侵袭,并可促进细胞凋亡,其作用机制可能与靶向 WNK1 而上调 Cleaved caspase-3 表达及抑制 PCNA、MMP-2、MMP-9 表达有关,miR-338-3p 可能成为食管癌靶向治疗的潜在靶点。但仍需进行体内动物实验验证 miR-338-3p 的抑癌基因作用。

参考文献:

- [1] Zhou P, Dong H, He S, et al. miR612 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development and metastasis, mediated through TP53 [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1855-1863.
- [2] Liu L, Zhao Z, Zhou W, et al. Enhanced expression of miR-425 promotes esophageal squamous cell carcinoma tumorigenesis by targeting SMAD2 [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(11): 601-611.
- [3] 汤喻, 刘军豪, 史祖宣, 等. miR-133b 通过下调转胶蛋白抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭能力 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(2): 91-96.
- [4] 戴芳, 刘涛, 郑树涛, 等. MiR-106b 对食管癌 KYSE150 细胞的生长及细胞上皮间质转化的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(12): 1466-1470.
- [5] 时军利, 王磊, 王春青, 等. miR-9-5p 通过靶向 FOXO1 基因调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2019, 28(6): 644-649.
- [6] 刘超, 王薇, 韩梅, 等. miR-338-3p 在胃癌组织中的表达及其意义 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(3): 308-311.
- [7] Kim JH, Hwang KH, Eom M, et al. WNK1 promotes renal tumor progression by activating TRPC6-NFAT pathway [J]. FASEB J, 2019, 33(7): 8588-8599.
- [8] 孙超, 王学民, 曹赫然, 等. miR-338-3p 靶向 TCF4 对人肾癌细胞增殖、凋亡和转移的调节 [J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(1): 62-68.
- [9] Qian W, Huang T, Feng W. Circular RNA HIPK3 promotes EMT of cervical cancer through sponging miR-338-3p to Up-regulate HIF-1 α [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(1): 177-187.
- [10] Yang Z, Lin X, Zhang P, et al. Long non-coding RNA LINC00525 promotes the non-small cell lung cancer progression by targeting miR-338-3p/IRS2 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124(1): 109858-109868.
- [11] 钱佳, 王熛婵, 张学俭, 等. CDK14 对人食管癌细胞增殖的影响及其可能机制研究 [J]. 胃肠病学, 2016, 21(10): 585-591.
- [12] 巫雪茹, 郑世勤, 严展鹏, 等. 澳洲茄边碱诱导食管癌细胞 KYSE150 凋亡及其机制研究 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(8): 803-808.
- [13] 郭小琦, 梁英平, 薛锋, 等. shRNA 沉默 HMGA2 对食管癌 ECA109 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 癌症进展, 2017, 15(11): 1269-1272, 1281.
- [14] Shyamasundar S, Lim JP, Bay BH. miR-93 inhibits the invasive potential of triple-negative breast cancer cells in vitro via protein kinase WNK1 [J]. Int J Oncol, 2016, 49(6): 2629-2636.
- [15] Zhu W, Begum G, Pointer K, et al. WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter facilitates glioma migration [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 31-41.

〔收稿日期〕2020-11-18

阳丽,吴湘,李昂,等. 黄芪多糖调控 Sirt1/FoxO1 通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 93-98.

Yang L, Wu X, Li A, et al. Astragalus polysaccharide regulates the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibits granulosa cell autophagy in polycystic ovary syndrome rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 93-98.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.014

黄芪多糖调控 Sirt1/FoxO1 通路抑制多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的研究

阳 丽*, 吴 湘, 李 昂, 何薇薇

(湖南省妇幼保健院, 长沙 410008)

【摘要】 目的 探究黄芪多糖(APS)调控沉默信息调节因子 1/叉头状转录因子 O1 (Sirt1/FoxO1) 通路对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠颗粒细胞自噬的影响。**方法** 大鼠中分离卵巢颗粒细胞并经促卵泡刺激素受体(FSHR)免疫荧光鉴定,且 CCK8 检测 APS 对卵巢颗粒细胞增殖的影响。 10^{-5} mol/L 丙酸睾酮、 $10 \mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24 h 诱导 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬模型, CCK8 检测细胞增殖情况;透射电镜观察自噬体情况;免疫印迹法检测细胞中 Sirt1、FoxO1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)蛋白表达情况。**结果** 免疫荧光检测显示, FSHR 蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞中的平均阳性表达量 $93.18\% > 90\%$, 可进行接下来实验。0、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 处理正常卵巢颗粒细胞,在贴壁 0、24 h 比较,细胞 OD_{450} 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组相比,模型组细胞核附近出现大量自噬小体,双层、单层膜包裹胞质形成封闭、圆形结构,部分自噬小体内膜溶解,自噬小体周围可见单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆、类似自噬小体结构;100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组与模型组细胞结构类似,随着 APS 剂量的升高,自噬小体数量减少,在 400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组时细胞正常。正常组、模型组、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组在细胞贴壁 0 h 时,细胞 OD_{450} 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细胞贴壁 24 h,与正常组相比,模型组细胞 OD_{450} 降低 ($P < 0.05$),细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细胞 OD_{450} 升高 ($P < 0.05$),细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** APS 可以抑制 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬,可能是通过抑制自噬通路 Sirt1/FoxO1 实现的。

【关键词】 黄芪多糖;沉默信息调节因子 1/叉头状转录因子 O1 通路;多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0093-06

Astragalus polysaccharide regulates the Sirt1/FoxO1 pathway and inhibits granulosa cell autophagy in polycystic ovary syndrome rats

YANG Li*, WU Xiang, LI Ang, HE Weiwei

(Hunan Maternal and Child Health Hospital, Changsha 410008, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of astragalus polysaccharides (APS) on autophagy of granulosa cells in polycystic ovary syndrome (PCOS) rats by regulating the silent mating type information regulation 2 homolog 1 (Sirt1)/forkhead box transcription factor O1 (FoxO1) pathway. **Methods** Ovarian granulosa cells were isolated from rats and identified by follicle stimulating hormone receptor (FSHR) immunofluorescence. CCK8 was used to assess the effect of APS on the proliferation of ovarian granulosa cells. Ovarian granulosa cells were treated with 1×10^{-5} mol/L testosterone propionate and $10 \mu\text{mol/L}$ C2 ceramide for 24 h to induce the autophagy model of PCOS rat granulosa cells. CCK8 was used to measure cell proliferation. Autophagy was observed by transmission electron microscope. Protein expression of Sirt1,

FoxO1, and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) was detected by Western blot. **Results** Immunofluorescence showed that average positive expression of FSHR protein in rat ovarian granulosa cells was 93.18% > 90%. In 0, 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ APS-treated normal ovarian granulosa cells, there was no significant difference in OD_{450} after adherence at 0 or 24 h ($P > 0.05$). Compared with the normal group, a large number of autophagy bodies appeared near the nucleus of the model group, and double and single layer membranes wrapped the cytoplasm to form a closed and round structure. Some of the autophagy body inner membrane had dissolved and there was a single membrane structure around the autophagosome, which contained some degraded cytoplasm similar to the autophagosome structure. The cell structure of the 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group was similar to that of the model group. With the increase of APS dosage, the number of autophagy bodies decreased and the cells were normal in the 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group. There was no significant difference in OD_{450} between normal, model, and 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ APS groups at 0 h of cell adhesion ($P > 0.05$). After 24 h of cell adhesion, compared with the normal group, OD_{450} was lower in the model group ($P < 0.05$) and the protein levels of Sirt1, FoxO1, and LC3II/LC3I were higher ($P < 0.05$). Compared with the model group, OD_{450} was higher in 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ APS groups ($P < 0.05$) and the protein levels of Sirt1, FoxO1, and LC3II/LC3I were lower ($P < 0.05$). **Conclusions** APS inhibits autophagy of granulosa cells in PCOS rats, which may be mediated by inhibiting the autophagy pathway Sirt1/FoxO1.

【Keywords】 astragalus polysaccharides; silent mating type information regulation 2 homolog 1/forkhead box transcription factor O1 pathway; granulosa cell autophagy in polycystic ovary syndrome rats

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是临床常见妇科内分泌疾病,会导致内分泌系统紊乱,而 PCOS 中出现卵巢颗粒细胞明显凋亡情况,而凋亡与自噬之间存在较多交叉位点,且自噬参与许多生理病理过程^[1-2]。卵巢颗粒细胞自噬可影响卵泡发育和卵泡闭锁,从而影响生育功能^[3]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 在黄嘌呤氧化酶诱导的肺癌中可以抑制自噬从而发挥抗肿瘤作用^[4],但在 PCOS 中尚未发现相关研究。沉默信息调节因子 1/叉头状转录因子 O1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1/forkhead box transcription factor O1, Sirt1/FoxO1) 作为自噬相关通路在 PCOS 卵巢组织中处于激活状态,可以通过对颗粒细胞、卵泡细胞的调控从而抑制卵泡正常发育过程^[5],且本研究预实验结果显示 PCOS 中颗粒细胞自噬现象明显。APS 是否影响 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬尚不清楚。因此,建立 PCOS 大鼠颗粒细胞自噬模型,探究 APS 对其影响,为临床提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,6 周龄、体重 190 ~ 210 g,购自北京维通利华实验动物有限公司 [SCXK (京) 2016-0011],饲养在中南大学湘雅二医院 [SYXK (湘) 2017-0002]。在温度 24℃ ~ 25℃、湿度 50% ~ 60%、自然光照、自由摄食饮水,定时通风环

境中饲养。本实验动物使用 3R 原则给予人道关怀,经湖南省妇幼保健院伦理委员会审核批准 (2020-S061)。

1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) (上海生物化学制药厂,批号: 820120); CCK8 试剂盒、一抗促卵泡刺激素受体 (follicle stimulating hormone receptor, FSHR)、Sirt1、FoxO1、哺乳动物同族物微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、 β -actin (美国 abcam 公司,货号分别为: ab228554、ab150557、ab189494、ab58518、ab229327、ab179467); 丙酸睾酮 (中国 aladdin 科技公司, CAS 号: 57-85-2); 自噬诱导剂 C2-神经酰胺 (美国 Sigma 公司,批号: A7191); APS (纯度 90%) (中国上海源叶生物科技有限公司,批号: 20170316)。酶标仪 (中国 BioBase 公司,型号: inark); 透射电镜 (日立高新科技有限公司,型号: ChromAssist Data Station); 蛋白凝胶系统 (上海 Bio-Rad 公司,型号: 7500)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠卵巢颗粒细胞的分离与培养

无菌环境中大鼠皮下注射 50 IU PMSG, 48 h 后大鼠处死,无菌条件下摘取卵巢,去除周围脂肪组织,低倍镜下用 25 号针头刺破卵泡,轻轻挤压,逸出卵母细胞和颗粒细胞,吹打使细胞分离,200 目网筛过滤,800 r/min 离心 10 min,弃上清,收集细胞。取部分细胞台盼蓝染色计数,未见蓝染的为死细胞。

将颗粒细胞稀释密度为每毫升 1×10^5 个,添加 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

1.3.2 免疫荧光鉴定离体的大鼠卵巢颗粒细胞

细胞贴壁生长 48 h 后经胰蛋白酶消化,直至消化成单个圆形细胞,添加 DMEM/F12 终止消化,收集细胞置于含载玻片的 24 孔培养板中,细胞爬片,待密度约 70% 时,多聚甲醛固定,细胞免疫荧光染色。滴加一抗 FSHR (1:200) 4°C 封闭过夜,滴加二抗,室温孵育 1 h,荧光显微镜卤素 2 灯光源激发绿色荧光,进行观察拍照。

1.3.3 CCK8 检测 APS 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

每毫升 1×10^5 个正常卵巢颗粒细胞接种至 96 孔板中,待细胞贴壁后加含 0、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 的 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养贴壁,分别在贴壁 0 h、24 h 加 CCK8 试剂继续培养 1~4 h,酶标仪检测 450 nm 下各孔细胞光密度(optic density, OD)。6 个重复,3 个平行。验证 APS 对正常卵巢颗粒细胞的影响。

1.3.4 PCOS 卵巢颗粒细胞的自噬模型建立

参考文献^[6]结合本实验确定诱导自噬的剂量。在前期研究发现, 10^{-5} mol/L 丙酸睾酮作用卵巢颗粒细胞 24 h 可以建立 PCOS 细胞模型,1、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24、48 h,细胞自噬染色检测试剂盒(MDC 荧光染色)检测细胞自噬情况。

1.3.5 细胞分组及给药处理

正常大鼠分离的颗粒细胞为正常组,模型组、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组。正常组为鉴定过的卵巢颗粒细胞,其余各组添加丙酸睾酮+C2-神经酰胺作用 24 h。24 h 后更换培养液,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组分别用含 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养液培养,模型组、正常组用正常 10% 胎牛血清 DMEM 培养液培养 24 h 进行实验。

1.3.6 CCK8 检测细胞增殖情况

将 1.3.5 各组细胞处理 24 h 后,参考 1.3.3 中 CCK8 试剂处理方法,检测细胞增殖情况。

1.3.7 透射电镜观察自噬体情况

将 1.3.5 各组细胞处理 24 h 后细胞消化后爬片,乙醇及丙酮脱水,环氧树脂浸透、包埋,超薄切片机切片(厚度:60 nm),醋酸双氧铀-柠檬酸铅双

重染色,透射电镜观察并拍照。

1.3.8 免疫印迹法检测细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 蛋白表达情况

将 1.3.5 各组细胞处理 24 h 后添加蛋白裂解液,冰上裂解 10 min, 4°C 13000 r/min 离心 10 min 收集总蛋白,上样 20 μg , PVDF 膜转膜后封闭;加入一抗 Sirt1、FoxO1、LC3、 β -actin, 4°C 孵育过夜;加入对应二抗,蛋白凝胶系统定量分析,待测蛋白相对表达水平=待测蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

1.4 统计学方法

本研究数据采用 GraphPad 8.0 软件进行分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$,差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠卵巢颗粒细胞的鉴定结果

FSHR 蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞的平均阳性表达量 93.18% > 90%, 见图 1。可进行接下来实验。

2.2 APS 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

0、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 处理正常卵巢颗粒细胞,分别在贴壁 0、24 h 比较,细胞 OD₄₅₀ 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 PCOS 卵巢颗粒细胞的自噬模型建立情况

1、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24、48 h,结果发现 C2-神经酰胺在 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 24 h、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞 48 h 均可诱导自噬抑制细胞增殖,结合文献及自噬效果,确定 10^{-5} mol/L 丙酸睾酮、10 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24 h 构建 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬模型。

2.4 APS 对 PCOS 卵巢颗粒自噬细胞增殖的影响

正常组、模型组、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组在细胞贴壁 0 h 时, OD₄₅₀ 差异无统计学意义($P >$

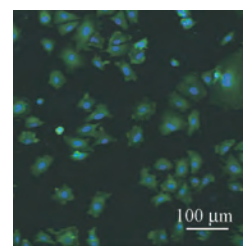


图 1 大鼠颗粒细胞的鉴定

Figure 1 Identification of rat granulosa cells

0.05)。细胞贴壁 24 h,与正常组相比,模型组细胞 OD₄₅₀降低 ($P<0.05$);与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细胞 OD₄₅₀升高 ($P<0.05$)。见表 2。

2.5 APS 对 PCOS 卵巢颗粒自噬细胞自噬的影响

与正常组相比,模型组细胞核附近出现大量自噬小体,双层、单层膜包裹胞质形成封闭、圆形结构,部分自噬小体内膜溶解,自噬小体周围可见单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆、类似自噬小体结构;100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组与模型组结构类似,随着 APS 剂量的升高,自噬小体数量减少,在 400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组时正常。见图 2。

表 1 不同浓度 APS 处理下卵巢颗粒细胞 OD₄₅₀ 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of OD₄₅₀ levels in ovarian granulosa cells treated with different concentrations of APS

组别 Groups	OD ₄₅₀	
	0 h	24 h
0 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.16 $\pm$ 0.34	3.41 $\pm$ 0.35
100 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.41 $\pm$ 0.27	3.68 $\pm$ 0.42
200 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.37 $\pm$ 0.25	3.78 $\pm$ 0.35
400 $\mu\text{g/mL}$ APS	2.29 $\pm$ 0.19	3.95 $\pm$ 0.69
<i>F</i>	1.016	1.366
<i>P</i>	0.406	0.282

2.6 APS 对 PCOS 卵巢颗粒自噬细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 蛋白的影响

与正常组相比,模型组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平升高 ($P<0.05$);与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。见图 3、表 3。

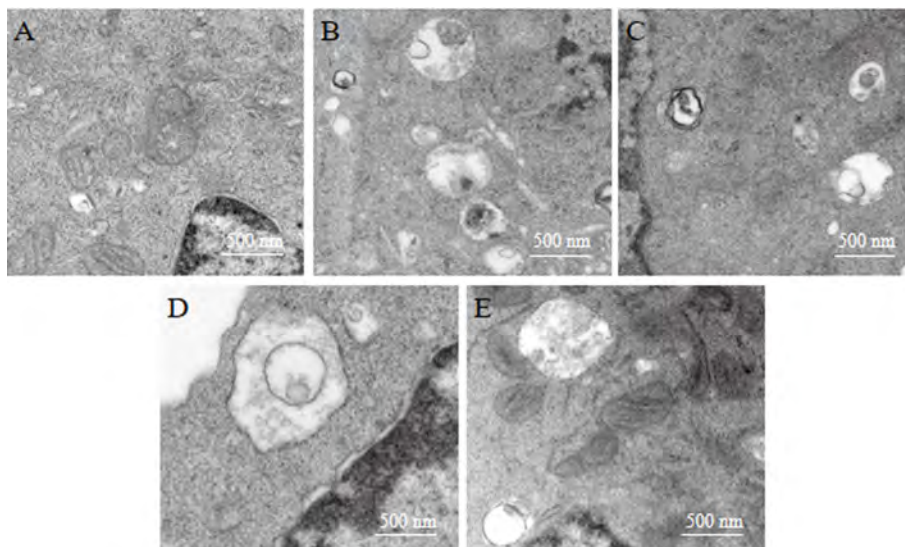
表 2 5 组细胞中 OD₄₅₀ 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of OD₄₅₀ levels in 5 groups

组别 Groups	OD ₄₅₀	
	0 h	24 h
正常组 Normal group	2.33 $\pm$ 0.34	4.06 $\pm$ 0.36
模型组 Model group	2.43 $\pm$ 0.26	2.96 $\pm$ 0.30 [#]
100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group	2.39 $\pm$ 0.37	3.51 $\pm$ 0.35 [*]
200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group	2.43 $\pm$ 0.25	3.58 $\pm$ 0.29 [*]
400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group	2.44 $\pm$ 0.36	4.67 $\pm$ 0.35 [*]
<i>F</i>	0.122	22.593
<i>P</i>	0.973	0.000

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.

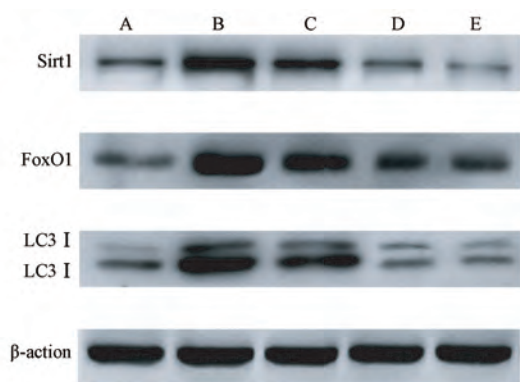


注:A:正常组;B:模型组;C:100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组;D:200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组;E:400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组。

图 2 5 组细胞中细胞自噬情况

Note. A, Normal group. B, Model group. C, 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group. D, 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group. E, 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group.

Figure 2 Autophagy in group 5 cells



注:A:正常组;B:模型组;C:100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组;D:200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组;E:400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组。

图 3 5 组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 蛋白表达情况

Note. A, Normal group. B, Model group. C, 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group. D, 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group. E, 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group.

Figure 3 Expression of Sirt1, FoxO1 and LC3 protein in 5 groups

表 3 5 组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Comparison of Sirt1, FoxO1 and LC3 II/LC3 I protein levels in cells of groups 5

组别 Groups	Sirt1	FoxO1	LC3 II/LC3 I
正常组 Normal group	0.15 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	1.86 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	0.87 $\pm$ 0.08 [#]	0.96 $\pm$ 0.08 [#]	3.86 $\pm$ 0.25 [#]
100 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 100 $\mu\text{g/mL}$ APS group	0.39 $\pm$ 0.04 [*]	0.54 $\pm$ 0.04 [*]	2.76 $\pm$ 0.05 [*]
200 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 200 $\mu\text{g/mL}$ APS group	0.13 $\pm$ 0.02 [*]	0.13 $\pm$ 0.02 [*]	1.26 $\pm$ 0.15 [*]
400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组 400 $\mu\text{g/mL}$ APS group	0.07 $\pm$ 0.04 [*]	0.11 $\pm$ 0.02 [*]	1.38 $\pm$ 0.05 [*]
F	229.229	489.202	390.917
P	0.000	0.000	0.000

注:与正常组相比,[#] $P<0.05$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.

3 讨论

颗粒细胞是卵泡主要功能细胞,与卵细胞成熟和排卵关系密切,而 PCOS 中颗粒细胞减少,导致患者无卵^[7];在本研究中以大鼠中分离卵巢颗粒细胞作为研究对象,FSHR 在卵巢颗粒细胞上表达,细胞膜上免疫荧光阳性定位,可用 FSHR 阳性率反映分离的细胞纯度,当纯度 $>90\%$ 时说明所分离颗粒细胞可进行实验。本研究中 FSHR 蛋白在大鼠卵巢颗粒细胞中的平均阳性表达量 93.18% $>90\%$,可用于研究。颗粒细胞减少这一现象与细胞凋亡有关,而

凋亡与自噬存在多重交叉,二者具有多种共同调控因子,且自噬是凋亡的必要条件,相互促进共同影响疾病^[8]。在本研究中发现,10⁻⁵ mol/L 丙酸睾酮、10 $\mu\text{mol/L}$ C2-神经酰胺作用大鼠卵巢颗粒细胞 24 h 构建 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬模型,模型组细胞增殖下降,细胞核附近出现大量自噬小体,部分自噬小体内膜溶解,自噬小体周围可见单层膜结构包裹着一些被降解的胞浆、类似自噬小体结构,提示卵巢颗粒细胞自噬现象明显,模型建立成功。APS 是黄芪干燥根主要的活性成分之一,具有介导宿主免疫反应,降低机体伤害等功能^[9];在 T 淋巴细胞经顺铂处理后自噬过多中具有抑制自噬功能,从而缓解顺铂对机体的伤害^[10]。为改善机体功能,APS 在 PCOS 卵巢颗粒细胞过度自噬中是否发挥作用尚不情况。不同剂量 APS 处理正常卵巢颗粒细胞,各组细胞 OD₄₅₀ 差异无统计学意义,提示 APS 对正常卵巢颗粒细胞增殖影响不明显。但经诱导 PCOS 颗粒细胞自噬后不同剂量 APS 处理,各组细胞 OD₄₅₀ 升高、自噬现象也得到缓解,提示 APS 可以抑制 PCOS 卵巢颗粒细胞自噬现象,从而缓解自噬过度对机体的影响。

FoxO 转录因子是一类关键调控自噬因子,激活 FoxO 可加强自噬,从而影响细胞增殖、凋亡、存活、周期等过程^[11]。FoxO 中以 FoxO1、FoxO3 广泛存在,2007 年采用 Northern 杂交和实时荧光 PCR 技术检测 FoxO1 存在于心脏、肝、头脑、骨骼、卵巢、睾丸、脾、胰腺等处,存在广泛^[12]。FoxO1 能够激活细胞参与自噬活动,同时在分子水平上参与细胞增殖、分化等过程^[13]。FoxO1 转录活性受 Sirt1 等上游转录调控因子的调节,而 Sirt1 作为沉默信息调节因子 Sir2 家族主要成员,可以通过直接作用影响自噬,或通过调节 FoxO1 影响自噬^[14-16]。在自噬过程中特征蛋白 LC3 分 I 型和 II 型,其中 LC3 I 存在细胞质中,LC3 II 存在于自噬体膜上^[17],自噬发生时 LC3 I 被 ATG7 活化后转运至 ATG3,并在 ATG3 作用修饰为 LC3 II,LC3 II/LC3 I 反映自噬情况^[18];在 PCOS 卵巢颗粒细胞自噬中 LC3 II/LC3 I 比例升高反映自噬状况^[19]。FoxO1 可以通过调节 LC3 II/LC3 I 影响自噬^[20]。本研究发现,与正常组相比,模型组细胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平升高,提示在 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬中激活 Sirt1 调控 FoxO1,从而 LC3 I 向 LC3 II 转化,促进自噬。与模型组相比,100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ APS 组细

胞中 Sirt1、FoxO1、LC3 II/LC3 I 蛋白水平降低,提示 APS 可能是通过抑制 Sirt1/FoxO1 通路发挥对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬的缓解,从而降低细胞损伤。

综上所述,APS 可能通过抑制 Sirt1/FoxO1 通路发挥抑制 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬作用,本文首次证明 APS 可减轻 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞自噬。但影响自噬通路较多,亦可能通过别的通路发挥作用,探究更多信号通路是接下来研究的内容。

参考文献:

- [1] 张娟,王立群,周月希,等.多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞中 DR5, DcR2 的表达变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 33-39.
- [2] Zeng X, Chai W. Role of SENP3 in the autophagy of granulosa cells in polycystic ovary syndrome [J]. Fertil Steril, 2018, 110(4): e119-e125.
- [3] Wang J, Ruan W, Huang B, et al. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of mouse ovarian granulosa cells [J]. Reproduction, 2019, 158(1): 61-69.
- [4] 王雪林,李杨,刘丹,等.黄芪多糖对黄嘌呤氧化酶诱导的肺癌 A549 细胞自噬及 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(12): 1676-1680.
- [5] 何轶然,张治芬,王芳,等. SIRT1、FoxO3a 在 DHEA 诱导多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢组织中的表达及意义 [J]. 浙江医学, 2018, 40(5): 429-432, 438, 550.
- [6] 邢玉,刘欣,刘杰,等.通过 p53/AMPK 信号通路研究归术益坤方对多囊卵巢综合征大鼠颗粒细胞自噬的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 5074-5077.
- [7] Wang Y, Xu S, Wang Y, et al. Identification and potential value of candidate microRNAs in granulosa cells of polycystic ovary syndrome [J]. Technol Health Care, 2019, 27(6): 579-587.
- [8] 裴晓川,张媛媛,张志华.细胞凋亡与自噬关系的探讨 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2016, 39(6): 549-552.
- [9] Dong N, Li X, Xue C, et al. Astragalus polysaccharides alleviates LPS - induced inflammation via the NF - κ B/MAPK signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(7-8): 5525-5540.
- [10] 王楠,陆金华,林胜友.黄芪多糖对大鼠 T 淋巴细胞顺铂处理后自噬的影响 [J]. 浙江临床医学, 2018, 20(4): 603-605.
- [11] Wang P, Nolan TM, Yin Y, et al. Identification of transcription factors that regulate ATG8 expression and autophagy in arabidopsis [J]. Autophagy, 2020, 16(1): 123-139.
- [12] van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(6): 440-450.
- [13] Jin JZ, Li HY, Jin J, et al. Exogenous pancreatic kininogenase protects against renal fibrosis in rat model of unilateral ureteral obstruction [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2020, 41(12): 1597-1608.
- [14] Xu J, Liu LQ, Xu LL, et al. Metformin alleviates renal injury in diabetic rats by inducing Sirt1/FoxO1 autophagic signal axis [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2019, 47(4): 599-608.
- [15] Wu Q, Hu Y, Jiang M, et al. Effect of autophagy regulated by Sirt1/FoxO1 pathway on the release of factors promoting thrombosis from vascular endothelial cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17): 4132-4139.
- [16] Lo MC, Chen JY, Kuo YT, et al. Camptothecin activates SIRT1 to promote lipid catabolism through AMPK/FoxO1/ATGL pathway in C2C12 myogenic cells [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(8): 672-683.
- [17] You ZY, Xu YF, Wan W, et al. TP53INP2 contributes to autophagosome formation by promoting LC3-ATG7 interaction [J]. Autophagy, 2019, 15(8): 1309-1321.
- [18] 李亚,李金凤,李小承,等.糖尿病小鼠海马神经元中自噬增强与热休克蛋白 B8 上调相关 [J]. 中华糖尿病杂志, 2020, 12(8): 631-636.
- [19] 白俊,吴也可,吴克明,等.雷公藤甲素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导卵巢颗粒细胞自噬的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3249-3434.
- [20] Wang J, Shen L, Hong H, et al. Atrasentan alleviates high glucose-induced podocyte injury by the microRNA-21/forkhead boxO1 axis [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 852(13): 142-150.

[收稿日期] 2020-11-18

潘叙恩, 卢章顺, 杨光, 等. 皮肤腐蚀和皮肤刺激替代试验的发展及其在化学品危险性分类的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 99-106.

Pan XE, Lu ZS, Yang G, et al. Application of alternative tests of skin corrosion and irritation for chemical hazard classification [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 99-106.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.015

皮肤腐蚀和皮肤刺激替代试验的发展及其在 化学品危险性分类的应用

潘叙恩, 卢章顺, 杨光, 钟岸, 黄志鹏, 何志荣*

(广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心), 广东省化学危害应急检测技术重点实验室,
广东省分析测试技术公共实验室, 广州 510070)

【摘要】 综述了皮肤腐蚀和皮肤刺激替代试验的发展, 介绍了最近被列入《全球化学品统一分类和标签制度(全球统一制度)》(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS)的试验和评估综合策略(Integrated Approach on Testing and Assessment, IATA)。重点讨论了各种替代试验的原理、方法和适用范围, 详细分析了各种替代试验方法在该策略应用中的优势和局限, 为今后有效利用各种替代试验及其数据开展化学品皮肤腐蚀性和刺激性分类工作提供了指引。

【关键词】 替代试验; 皮肤腐蚀; 皮肤刺激; GHS 分类; IATA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0099-08

Application of alternative tests of skin corrosion and irritation for chemical hazard classification

PAN Xuen, LU Zhangshun, YANG Guang, ZHONG An, HUANG Zhipeng, HE Zhirong*

(Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of
Emergency Test for Dangerous Chemicals, Institute of Analysis, Guangdong Academy of Sciences
(China National Analytical Center Guangzhou), Guangzhou 510070, China)

【Abstract】 The development of alternative tests for skin corrosion and skin irritation were reviewed, and the Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA), which was recently adopted by the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), was introduced. Focusing on the principles, Methods and scope of various alternative tests, the advantages and limitations of these tests in the application of IATA will be discussed to provide guidance for the classification of chemicals causing skin corrosion and irritation by effective utilization of the alternative tests and the data derived from these tests.

【Keywords】 alternative testing; skin corrosion; skin irritation; GHS classification; IATA

近现代科学技术高速发展, 目前全球已公布的物质已超过了 1.5 亿种^[1], 化学品的广泛应用一方面改善了人们的生活, 同时也提高了人们接触化学

品带来的安全风险。皮肤腐蚀性和刺激性是化学品基于联合国 GHS 分类的一种重要的潜在危险特性, 准确评估和分类化学品对皮肤的腐蚀和刺激潜

【基金项目】 广东省科学院发展专项资金项目(2019GDASYL-0105020)。

【作者简介】 潘叙恩(1984—), 男, 工程师, 硕士, 主要从事产品安全性测试和评估。E-mail: 23307345@qq.com

【通信作者】 何志荣, 男, 副研究员, 主要从事产品安全性测试和评估。E-mail: 879118294@qq.com

力,对加强化学品安全管理,预防和减少化学品事故,具有非常重要的意义。

长期以来,研究人员主要利用动物试验对该课题进行研究,Draize 等^[2]建立了利用白化兔评估化妆品对皮肤刺激潜力的方法,该方法逐步发展并在化学品皮肤腐蚀性和刺激性评估中得到广泛的应用,后来被经济合作与发展组织(OECD)采用为试验准则 404(TG404),成为 GHS 皮肤腐蚀性和刺激性的分类依据。

随着人类认知水平的提高和现代伦理学的发展,动物福利问题得到了越来越多的重视,作为传统的动物试验,Draize 试验备受质疑和争议。1959 年,动物学家 Russell 和微生物学家 Burch 共同发表了《人道实验技术原则》(The Principles of Humane Experimental Technique),系统性地提出了“3R”(Replacement, Reduction and Reduction)的概念和准则,促使动物试验的开展更符合人道主义精神^[3]。“3R”的提出为实验动物替代技术的研究确立了理论基础,替代试验的研究和应用逐渐成为化学品皮肤腐蚀/刺激潜力评估和分类的主要发展方向。

1 替代试验的发展背景

为贯彻 3R 原则,各国政府和国际组织进行了大量的工作:一方面,先后将 3R 原则引入了实验动物相关的法律法规以改善实验动物的待遇,如中国《关于善待实验动物的指导性意见》、欧盟《关于保护用于科研目的的动物的指令》、美国《美国政府关于在试验、研究和训练中使用和照顾脊椎动物的原则》、英国《动物(科学程序)法案》等^[4]。另一方面,为减少科研活动对动物体内试验的依赖,资助了大批的研究机构、组织和研究项目以支持替代方法的研究,并成立了替代方法验证中心组织系统性的方法验证,如欧盟成立的欧洲替代方法验证中心(ECVAM;后更名为替代动物实验欧盟联合参考实验室 EURL ECVAM)和美国的替代方法验证跨部门协调委员会(ICCVAM)等。随着欧盟和美国、加拿大、日本等国签署了替代方法国际合作协议(International Cooperation on Alternative Test Methods, ICATM),实验动物替代技术进入了快速发展的阶段。

实验动物替代技术的进步,使立法禁止动物体内试验得以成为可能。在欧盟,有许多法规要求使用替代方法来代替体内试验进行毒理学测试。欧

盟《化妆品法规》^[5]禁止了 2004 年以来的化妆品成品和 2009 年以来的化妆品成分进行动物体内试验,并自 2013 年起禁止销售含有经动物体内试验成分的化妆品产品。此外,欧盟《关于化学品注册、评估、许可和限制的法规》(REACH 法规)^[6-7]要求 OECD 成员国对化学品的皮肤腐蚀和刺激性评估需利用替代方法进行体外试验,除非该受试化学品不在替代方法适用的范围内或替代方法无法对受试化学品作出准确的分类和风险评估。欧盟《物质和混合物的分类、标签和包装法规》(EU CLP)^[8-9]与 REACH 法规相辅相成,在欧盟范围内执行联合国 GHS 制度关于化学品分类和标签的规定,该法规在皮肤腐蚀和刺激性分层评估中使用了证据权重(weight-of-evidence, WoE)方法,并鼓励利用来自替代方法的数据。最后,欧盟《关于保护用于科研目的的动物的指令》^[10]规定“在不妨碍禁止某些试验方法的成员国法律的前提下,如利用其它试验方法或策略可以得到所需的结果时,成员国不得利用活体动物进行试验”。欧盟的立法对全球各国的法规也产生了巨大的影响,以色列、挪威、印度、新西兰、澳大利亚、瑞士等国也先后立法禁止了化妆品产品进行动物体内试验,全球目前已有超过 30 个国家和地区实施了关于动物体内试验的相关禁令。

2 分类标准对替代试验的认可

联合国 GHS 的分类制度是目前世界范围内最具普适性的化学品分类制度,对皮肤腐蚀性和刺激性化学品进行了明确的定义和分类(见表 1)^[11],源于 OECD 统一分类和标签工作组(OECD Task Force on Harmonization of Classification and Labelling, Task Force on HCL)对健康危害的分类标准。

在较早版本的 GHS 中,针对化学品的皮肤腐蚀和皮肤刺激的定义和分类仍基于 OECD TG 404 的动物试验。得益于各国政府和科研工作者的努力,越来越多的体外方法被提出和验证成为 OECD 的试验准则,用于替代 TG 404 的动物试验。目前经 OECD 认可的替代试验方法涵盖了离体组织或器官、三维重组人类细胞组织和人造生物皮肤等模型(见表 2),已能基本满足联合国 GHS 的分类和评估需要。在 2019 年修订的第八版 GHS 中,这些替代试验方法得到了进一步的认可被正式列为分类标准,用于皮肤腐蚀(类别 1)、皮肤刺激(类别 2)的识别。

表 1 联合国 GHS 分类制度关于皮肤腐蚀性/刺激性的定义和分类
Table 1 Categories and definition of skin corrosion/irritation of UN GHS

类别 Category	定义和描述 Definition and description
类别 1 ¹⁾ (皮肤腐蚀) Category 1 (Skin corrosion)	对皮肤造成不可逆损伤,即在接触一种物质或混合物后发生的可观察到的表皮和真皮坏死 Refers to the production of irreversible damage to the skin; namely, visible necrosis through the epidermis and into the dermis occurring after exposure to a substance or mixture
类别 2/类别 3 ²⁾ (皮肤刺激/轻度刺激) Category 2/ Category 3 (Skin irritation/mild irritation)	在接触一种物质或混合物后发生的对皮肤造成可逆损伤的情况 Refers to the production of reversible damage to the skin occurring after exposure to a substance or mixture

注:1):如有充足数据及主管部门要求时,类别 1 的物质可进一步划入 1A、1B 或 1C 三个子类别之一;2):类别 3 供希望制定一种以上皮肤刺激物类别的主管部门使用,例如用于对农药进行分类。

Note. 1), Category 1 may be further divided into up to three sub-categories (1A, 1B and 1C) which can be used by those authorities requiring more than one designation for corrosivity. 2), Category 3 is available for those authorities that want to have more than one skin irritation category (e.g. for classifying pesticides).

表 2 OECD 关于皮肤腐蚀性和刺激性替代试验方法的验证和认可情况
Table 2 Validation and acceptance of OECD on the alternative testing methods of skin corrosion and irritation

毒理学终点 Toxicological endpoint	方法 Methods	验证和认可情况 Validation and acceptance
皮肤腐蚀 Skin corrosion	体外皮肤腐蚀经皮电阻(TER)试验方法 Transcutaneous electrical resistance test method (TER)	TG430:2004 年首次认可,2015 年最近更新 TG430;Originally adopted in 2004, last revised in 2015
皮肤腐蚀 Skin corrosion	人类皮肤模型(RhE)试验方法 Reconstructed human epidermis (RhE) test method	TG431:2004 年首次认可,2019 年最近更新 TG431;Originally adopted in 2004, last revised in 2019
皮肤腐蚀 Skin corrosion	膜屏障试验方法 Membrane barrier test method for skin corrosion	TG435:2006 年首次认可,2015 年最近更新 TG435;Originally adopted in 2006, last revised in 2015
皮肤刺激 Skin irritation	重建人体表皮模型试验方法 Reconstructed human epidermis test method	TG439:2010 年首次认可,2020 年最近更新 TG439;Originally adopted in 2010, last revised in 2020

3 皮肤腐蚀和刺激的试验和评估综合方法

在 GHS 第八修订版中,除了对体外试验方法的进一步认可外,还引入了新的分类和评估策略——皮肤腐蚀和刺激 IATA。该策略源于 OECD 指南 GD 203,其建立的目的是为了适应替代方法发展的新形势,满足 3R 原则和保障分类评估准确性的要求,取代原来 OECD TG404 补充文件中的测试和评估策略。

皮肤腐蚀和刺激 IATA 主要分为 3 个部分:(1)现有的信息、理化性质和非实验方法;(2)证据权重评估;(3)补充实验。根据数据和信息的来源及功能,该评估策略的信息源被分为 8 个模块,这些模块可分别应用于策略中的一个或多个部分(见表 3)^[12]。OECD GD203 指出,该评估策略的目标是在确保人身安全的前提下尽可能减少对实验动物的使用,提出在分类和评估的过程中,应最大程度运用现有的数据合理安排证据权重评估,只有在无法获得准确结果时再利用试验进行分类。

4 替代试验在皮肤腐蚀和刺激 IATA 中的应用

替代试验在皮肤腐蚀和刺激 IATA 中的应用主要体现在两个方面:首先,作为 IATA 第一部分现有皮肤腐蚀和刺激属数据的重要组成部分,基于文献和资料所得的替代试验数据可独立用于 WoE 评估或结合人类数据和动物试验数据等其他模块的信息用于综合 WoE 评估。其次,皮肤腐蚀和刺激替代试验也是该分类评估策略第三部分补充实验的重要组成部分,研究人员可对 WoE 评估无法获得确证结果的化学品执行自上而下或自下而上的试验策略,利用体外试验方法(必要时结合动物试验)进行最终的分类和评估。

在应用这些替代试验方法之前必须明确,目前已经得到认可的方法都存在着一定的局限性,至今仍然没有任何一种单一的体外试验方法可以覆盖全部分类范围。充分理解每种方法的原理、适用范围和局限性,对于研究人员选择合适的方法非常重要,是有效执行皮肤腐蚀和刺激 IATA 评估策略的关键。

表 3 皮肤腐蚀性和刺激性 IATA 的组成

Table 3 Composition of the IATA for skin corrosion and irritation

组成部分 Part	模块 Module	数据 Data
第 1 部分(现有的信息、理化性质、非实验方法) Part 1 (Existing information, physico-chemical properties and non-testing methods)	1	现有的人类皮肤腐蚀/刺激数据 Existing human data a) 非标准化的人类局部皮肤反应数据 Non-standardised human data on local skin effects b) 人体斑贴试验 Human patch test (HPT)
	2	OECD 认可的皮肤腐蚀/刺激的动物试验数据 <i>In vivo</i> skin irritation and corrosion data adopted by the OECD
	3	OECD 认可的皮肤腐蚀的体外试验数据 <i>In vitro</i> skin corrosion data adopted by the OECD
	4	OECD 认可的皮肤刺激的体外试验数据 <i>In vitro</i> skin irritation data adopted by the OECD
		其他的体内/体外数据 Other <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> data
	5	a) 未经 OECD 认可的皮肤腐蚀/刺激体外试验数据 <i>In vitro</i> skin corrosion or irritation data from test methods not adopted by the OECD b) 其他的经皮毒性数据(动物试验/体外试验) Other <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> dermal toxicity data
	6	现有的、测试或估算所得的理化性质, 如 pH、酸/碱预备物(缓冲能力) 等 Physico-chemical properties (existing, measured or estimated) e.g., pH, acid/alkaline reserve
第 2 部分(证据权重评估) Part 2(WoE analysis)	7	对于物质: 定量构效关系(QSAR)、交叉参照、分组和预测体系; 对于混合物: 架桥原则及加和法 For substances: (Q) SAR, read-across, grouping and prediction systems; For mixtures: bridging principles and theory of additivity
	8	阶段和要素的证据权重(WoE) 评估 Phases and elements of WoE approaches
第 3 部分(补充实验) Part 3 (Additional testing)	(5b)	其他的经皮毒性动物试验/体外试验(如有其他法规要求) Other <i>in vivo</i> and/or <i>in vitro</i> dermal toxicity testing (if required by other regulations)
	(3)	OECD 认可的皮肤腐蚀的体外试验 <i>In vitro</i> skin corrosion testing adopted by the OECD
	(4)	OECD 认可的皮肤刺激的体外试验 <i>In vitro</i> skin irritation testing adopted by the OECD
	(5a)	未经 OECD 认可的皮肤腐蚀/刺激体外试验 <i>In vitro</i> skin irritation testing in test method not adopted by the OECD
	(2)	OECD 认可的皮肤腐蚀/刺激的动物试验 <i>In vivo</i> skin irritation and corrosion testing adopted by the OECD

5 OECD 认可的皮肤腐蚀/刺激替代试验方法及其适用性

5.1 经皮电阻试验方法

TG430^[13] 体外皮肤腐蚀经皮电阻(transcutaneous electrical resistance, TER) 试验方法利用了离体的大鼠表皮组织对化学品的皮肤腐蚀性进行评估。受试皮肤片取自安乐处死的 28~30 d 龄的大鼠。实验过程中, 受试皮肤片安装在测试系统中, 把整个测试系统分隔为内外两层。受试物涂覆在受试皮肤片的表皮面, 保持 24 h。通过测定受试皮肤片的经皮电阻, 确定角质层的缺失程度和皮肤屏障功能的完整程度来识别受试物的腐蚀性。根据大量化学品的大鼠 TER 测试结果, 选取了 5 k Ω 作为皮肤腐蚀性的判定阈值。通常, 无论对皮肤是否具有刺激性, 对活体动物皮肤无腐蚀性的物质, 其 TER 值都不会低于该判定阈值。该方法还增加了染色试验, 进一步对 TER 测试阳性(包括 TER 接近 5 k Ω 的结果) 但无明显损伤的皮肤片进行确认。

与其他已得到 OECD 认可的替代试验相比, TG430 利用的离体皮肤模型包含了提供主要屏障功能的角质层和表皮细胞层, 以及皮脂腺、汗腺和毛囊等所有附属器官, 具有完整的皮肤组织结构, 可更近似地模拟化学品在体内发生的经皮渗透和吸收。但是, 该方法只能划分皮肤腐蚀(类别 1) 和非腐蚀性的样品, 适用于大量化学品腐蚀危险性的筛查, 并不能进一步划分皮肤腐蚀性子类别, 也不能识别非腐蚀性的样品是否具有刺激性。

5.2 重建人类表皮模型试验方法

目前已验证的利用体外重建人类表皮模型(reconstructed human epidermis test method, RhE) 的皮肤腐蚀和刺激性试验方法有 TG431^[14] 和 TG439^[15], 其原理是假设腐蚀/刺激性化学物质能够通过扩散或侵蚀作用渗透穿过角质层, 对下层的细胞产生毒性作用。该模型是利用组织工程技术构建的多层、高度分化的三维表皮模型, 包含了基底层、棘细胞层、颗粒层、角质层和脂质等与正常皮肤相似的结构。由于 TG431 和 TG439 的 RhE 模

型没有形成血管,因此选择了以细胞活性作为测定终点对细胞和组织的损伤进行评估。

TG431 用于化学品的皮肤腐蚀性的评估,方法是将受试物局部作用在三维 RhE 模型上,在特定作用时间后,利用 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑噻唑蓝 (MTT) 还原法测量受试 RhE 组织的细胞活性,然后通过与阈值的比较来识别和分类受试物腐蚀性。

TG439 用于评估化学品的皮肤刺激性,该方法进一步利用了 RhE 模型的特点,在试验过程中并不是在与受试物作用后立即测量 RhE 组织的细胞活性,而是对经过冲洗的 RhE 组织在新培养基中进行足够长时间的培养之后才进行细胞活性的测量。这样既可以使 RhE 组织从较弱的细胞毒性作用中恢复,也有足够的时间表达明确的细胞毒性作用。

与其他已获得 OECD 认可的替代方法相比, TG431 和 TG439 具有很多优势。首先, RhE 模型是由人源性的表皮角质细胞培养所得,与被模拟的人体皮肤组织不存在物种差异。其次, RhE 组织可以通过培养恢复细胞活性, TG439 是目前唯一受 OECD 认可的评估皮肤刺激性 (类别 2) 的替代方法。最后, RhE 试验方法有很多可选用的商业化模型, TG431 和 TG439 分别于 2019 年和 2020 年进行了最新的修订,目前最新版本的试验准则中已得到验证和认可的商业化模型已分别增至 5 个和 6 个 (TG431: EpiSkin™、EpiDerm™ SCT、SkinEthic™ RHE、epiCS®、LabCyte EPI-MODEL24 SCT; TG439: EpiSkin™ (SM)、EpiDerm™ SIT (EPI-200)、SkinEthic™ RHE、LabCyte EPI-MODEL24 SIT、epiCS®、Skin+®)。

需要注意的是有些化学品会在试验过程中显色或能与 MTT 作用产生非特异的颜色反应,干扰细胞活力的测定结果,虽然通过设置非特异性显色 (NSCliving) 和非特异性 MTT 反应 (NSMTT) 对照组可对这些干扰进行排除,但是针对阴性对照 NSCliving $\geq 50\%$ 和/或 NSMTT $\geq 50\%$ 的结果应十分谨慎。此外, TG431 和 TG439 的分类能力仍存在着局限性, TG431 可用于识别化学品皮肤腐蚀性 (类别 1 及子类别 1A 和 1B/1C) 和非腐蚀性,但无法进一步分辨子类别 1B 和 1C; TG439 可以区分皮肤腐蚀/刺激 (类别 1/2) 和皮肤轻度刺激/非刺激 (类别 3/不划类),但不能进一步对类别 1 和类别 2 进行识别,也无法分辨类别 3 和不划类,这些都是在利用这

些试验方法或其数据时必须注意的。

5.3 膜屏障试验方法

在 OECD 认可的对皮肤腐蚀性和刺激性的替代试验方法中, TG435^[16] 膜屏障 (membrane barrier) 试验方法是唯一一种完全基于人造的非生物皮肤模型 (artificial non-viable skin model) 的方法。其测试系统由人造的高分子生物膜和化学检测系统 (chemical detection system, CDS) 组成,原理是基于人造高分子生物膜与活体皮肤具有相似的腐蚀作用机制的假设,受试物局部作用于高分子生物膜表面,经过特定的作用时间,通过 CDS (如 pH 指示剂颜色改变、指示剂溶液其他特性改变等) 检测高分子生物膜的屏障功能是否受到破坏,受试物是否穿透了高分子生物膜,以此对受试物的腐蚀性进行识别和分类。

目前, TG435 的商业化模型只有 Corrositex® 一种,可用于识别化学品皮肤腐蚀性 (类别 1) 和非腐蚀性,基于 Corrositex® 的子分类标准可利用受试物对生物膜的穿透时间进一步划分腐蚀性子类别 1A、1B 和 1C。Corrositex® 操作简单,在评估酸、碱以及酸衍生物的皮肤腐蚀性时非常有效^[17],但基于该 CDS 的特点,不适用于评估 pH 值 4.5~8.5 及其他无法令 CDS 指示剂发生颜色变化的化学品^[18]。虽然该方法无法分辨非腐蚀化学品的皮肤刺激性 (类别 2/3) 和非腐蚀性 (不划类),但是在执行一些运输相关法规要求的测试时特别适用,如美国交通运输部的危险物质法规^[19]就明确规定了针对 TG430 或 TG431 划为腐蚀性的危险品,必须利用 TG435 或 TG404 对结果进一步确定。

6 其他的皮肤腐蚀/刺激替代试验方法

作为皮肤腐蚀和刺激 IATA 模块 5a,这些暂未受 OECD 认可的皮肤腐蚀和刺激性评估的体外模型和替代方法有许多,除了一些商业化的 RhE 模型 (KeraSkin™、EpiKutis®、EST1000®、StrataTest®、Vitrolife-Skin™、Phenion® 等)^[20-23]、开源的 RhE 模型 (OS-Rep^[24-25]) 和其他类似的 RhE 模型 (如 HaCaT 表皮模型^[26-27]、LHE 人类表皮模型^[28]、基于手术获得的人类皮肤的模型^[29]、人类全厚皮肤模型^[30]等),还包括了一些正在研究开发的新模型和新方法。

Groux 等^[31]研究了 RhE 模型响应皮肤刺激物而引起的基因表达变化,并根据基因表达水平开发

了一种方法用于划分刺激性(类别2)、轻度刺激性(类别3)和非刺激性(不划类)。Spiekstra 等^[32]研究表明在 RhE 模型中利用 IL-1 α , IL-1RA, IL-8 等生物标志物和 MTT 不仅能识别受试物的腐蚀性和刺激性,还可以确定化学物质对皮肤的刺激能力。除此以外还有许多应用了蛋白质组学和毒物基因组学技术,并非以细胞活力为测定终点的试验方法^[33-36]。

另外,Khammo 等^[37]和 Muller 等^[38]研究组还分别利用从胚胎大鼠背根节神经元提取的感觉神经元和人类诱导性多能干细胞(iPSC)构建了受神经支配的组织工程皮肤(TES)模型,可在体外试验中模拟在体内由神经性炎症造成的刺激和疼痛^[39]。

最后,还有更多基于生物打印、器官芯片等新技术应用的新模型和新方法,如 Wei 等^[40]研究利用 3D 生物打印技术构建的可有效应用于皮肤刺激研究的人类全厚皮肤模型,以及 Jusoh 等^[41]研究以脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人类真皮成纤维细胞(HDF)、角质形成细胞和微流控芯片构建的具有血管生成能力的皮肤芯片,还有 Tavares 等^[42]研究基于微生理系统构建的人类皮肤-肝双器官集成芯片。

7 结论与展望

3R 原则提出以来,实验动物福利的问题得到了更多的关注,实验动物替代技术在科技和法规的双重驱动下获得了很大的发展,人们越来越重视利用体外模型和试验方法代替动物试验进行化学品安全性的研究。近年来,在化学品皮肤腐蚀性和刺激性的研究方面,无论从替代试验方法的开发还是分类评估试验策略的创新都取得了很大的进步。越来越多的体外模型和试验方法通过了验证;基于组学技术的应用研究,更多的测定终点被提出;得益于 3D 生物打印、干细胞和生物芯片等技术的发展,构建更复杂的体外模型也成为了可能。随着科技的进步,更多的体外试验方法和模型将被开发和应用。

中国与其他主要发达国家和地区相比,在动物试验替代方法的开发和验证等方面的工作起步稍晚,在管理和发展上还存在着一定的差距。目前在实验成本方面,替代试验与动物试验相比仍不具备优势。此外,在 GHS 皮肤腐蚀性和刺激性分类的应用上,现有的替代试验方法在适用条件和分类范围

等仍存在着局限。皮肤腐蚀性和刺激性 IATA 以 3R 原则为指导,提出尽可能优先利用现有的数据进行证据权重评估,必要时再结合危险性分类需求合理地制定策略开展试验。该策略结合目前实验动物替代技术的发展现状,充分优化了皮肤腐蚀性和刺激性的分类试验流程,最大程度地减少不必要的试验和避免了对实验动物的使用,正确利用这一策略对今后有效开展皮肤腐蚀性和刺激性分类评估工作具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] American Chemical Society. CAS Content[EB/OL]. [2020-10-20]. <https://www.cas.org/about/cas-content>.
- [2] Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane [J]. J Pharmacol Exp Therap, 1944, 82(3): 377-390.
- [3] Lewis DI. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs [J]. Emerg Top Life Sci, 2019, 3(6): 675-679.
- [4] 巩和凌子,孔琪,刘江宁. 国内外实验动物法制化管理现状比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 71-75.
- [5] EU. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products [EB/OL]. [2020-10-20]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1602925987702&uri=CELEX:32009R1223>.
- [6] EU. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC[EB/OL]. [2020-10-20]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1907-20200824&qid=1603673085202>.
- [7] EU. Commission Regulation (EU) 2016/863 of 31 May 2016 amending Annexes VII and VIII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards skin corrosion/irritation, serious eye damage/eye irritation and acute toxicity [EB/OL]. [2020-10-20]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32016R0863&qid=1603673357330>.
- [8] EU. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and

- amending Regulation (EC) No 1907/2006 [EB/OL]. [2020-10-26]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32008R1272&qid=1603674276181>.
- [9] EU. Commission Regulation (EU) 2016/918 of 19 May 2016 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures [EB/OL]. [2020-10-26]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32016R0918&qid=1603674302271>.
- [10] EU. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [EB/OL]. [2020-10-26]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063&qid=1603675910045>.
- [11] UN. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Eighth revised edition [EB/OL]. [2020-10-20]. http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev08/08files_e.html.
- [12] OECD. Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation [EB/OL]. [2020-10-20]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-an-integrated-approach-on-testing-and-assessment-iata-for-skin-corrosion-and-irritation_9789264274693-en.
- [13] OECD. Test No. 430; *In Vitro* Skin Corrosion; Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) [EB/OL]. [2020-10-20]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in-vitro-skin-corrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-method-ter_9789264242739-en.
- [14] OECD. Test No. 431; *In vitro* skin corrosion; Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method [EB/OL]. [2020-10-20]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264264618-en.
- [15] OECD. Test No. 439; *In Vitro* Skin Irritation; Reconstructed Human Epidermis Test Method [EB/OL]. [2020-10-20]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-439-in-vitro-skin-irritation-reconstructed-human-epidermis-test-method_9789264242845-en.
- [16] OECD. Test No. 435; *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion [EB/OL]. [2020-10-20]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-435-in-vitro-membrane-barrier-test-method-for-skin-corrosion_9789264242791-en.
- [17] NTP. Corrositex Test Method for Dermal Corrosivity Testing [EB/OL]. [2020-10-20]. <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/test-method-evaluations/ocular/corrositex/index.html>.
- [18] NTP. Corrositex[®]: An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals [EB/OL]. [2020-10-20]. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/dermal_docs/corprrep.pdf.
- [19] U.S. DOT. Hazardous Materials Regulations [EB/OL]. [2020-10-20]. <https://www.phmsa.dot.gov/standards-rulemaking/hazmat/hazardous-materials-regulations>.
- [20] Han J, Kim S, Lee SH, et al. Me-too validation study for *in vitro* skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin[®] for OECD test guideline 439 [J/OL]. [2020-10-20]. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104725>.
- [21] 卢永波, 张荣芳, 许珊珊, 等. 一种用于体外测试的中国汉族人表皮替代模型 [A]. 中国毒理学会第六届全国毒理学大会论文摘要 [C]. 北京: 中国毒理学会; 2013.
- [22] 广东博溪生物科技有限公司. 3D 表皮模型 [EB/OL]. [2020-10-20]. <http://www.invitrotec.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=26&id=5>.
- [23] Capallere C, Plaza C, Meyrignac C, et al. Property characterization of reconstructed human epidermis equivalents, and performance as a skin irritation model [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 53: 45-56.
- [24] Mewes KR, Fischer A, Zöller NN, et al. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I) [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 36: 238-253.
- [25] Groeber F, Schober L, Schmid FF, et al. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II) [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 36: 254-261.
- [26] 刘洋, 卢涛, 周宙霖, 等. HaCaT 表皮模型作为皮肤刺激性体外替代实验的可行性研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2017, 31(10): 1262-1266.
- [27] Hyun SB, Bae S, Hyun CG. Antioxidant activities of jeju wax apple (*syzygiumsamarangense*) and safety of human keratinocytes and primary skin irritation test [J/OL]. [2020-10-20]. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020039>.
- [28] El Ghalbzouri A, Siamari R, Willemze R, et al. Leiden reconstructed human epidermal model as a tool for the evaluation of the skin corrosion and irritation potential according to the ECVAM guidelines [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(5): 1311-1320.
- [29] Miles A, Berthet A, Hopf NB, et al. A new alternative method for testing skin irritation using a human skin model: a pilot study [J]. *Toxicol In Vitro*, 2014, 28(2): 240-247.
- [30] Lönnqvist S, Briheim K, Kratz G. Non-occlusive topical exposure of human skin *in vitro* as model for cytotoxicity testing of irritant compounds [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2016, 26(2): 82-87.
- [31] Groux H, Lelièvre D, Cottrez F, et al. Evaluation of IRR-IS[®], an EpiSkin[™] based model for quantifying chemical irritation potency [EB/OL]. [2020-10-20]. <https://www.toxicology.org/pubs/docs/Tox/2012Tox.pdf>.
- [32] Spiekstra SW, Dos Santos GG, Scheper RJ, et al. Potential method to determine irritant potency *in vitro*-comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency [J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(2): 349-355.
- [33] Zhang Q, Dai T, Zhang L, et al. Identification of potential biomarkers for predicting acute dermal irritation by proteomic

- analysis [J]. J Appl Toxicol, 2011, 31(8): 762-772.
- [34] 张贤英, 张磊, 戴桃李, 等. HSP27 作为评价皮肤急性刺激性生物标志物的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(5): 887-891.
- [35] Borlon C, Godard P, Eskes C, et al. The usefulness of toxicogenomics for predicting acute skin irritation on *in vitro* reconstructed human epidermis [J]. Toxicology, 2007, 241(3): 157-166.
- [36] Niwa M, Nagai K, Oike H, et al. Evaluation of the skin irritation using a DNA microarray on a reconstructed human epidermal model [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(2): 203-208.
- [37] Khammo N, Ogilvie J, Clothier RH. Development of an innervated model of human skin [J]. Altern Lab Anim, 2007, 35(5): 487-491.
- [38] Muller Q, Beaudet MJ, DeSerres-Bérard T, et al. Development of an innervated tissue-engineered skin with human sensory neurons and schwann cells differentiated from iPS cells [J]. Acta Biomater, 2018, 82: 93-101.
- [39] Garle MJ, Fry JR. Sensory nerves, neurogenic inflammation and pain: missing components of alternative irritation strategies? A review and a potential strategy [J]. Altern Lab Anim, 2003, 31(3): 295-316.
- [40] Wei Z, Liu X, Ooka M, et al. Two-dimensional cellular and three-dimensional bio-printed skin models to screen topical-use compounds for irritation potential [J/OL]. [2020-10-20]. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00109>.
- [41] Jusoh N, Ko J, Jeon NL. Microfluidics-based skin irritation test using *in vitro* 3D angiogenesis platform [J/OL]. [2020-10-20]. <https://doi.org/10.1063/1.5093975>.
- [42] Tavares RSN, Tao TP, Maschmeyer I, et al. Toxicity of topically applied drugs beyond skin irritation: Static skin model vs. Two organs-on-a-chip [J/OL]. [2020-10-20]. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119788>.

[收稿日期]2020-11-02

将大鼠子宫内膜移植到小鼠模拟人类子宫内膜异位症的新动物模型

子宫内膜异位症是子宫内膜细胞在子宫外腹腔或盆腔生长的一种病理状态,其并发症可导致女性不孕。虽然小鼠模型在不孕和生殖领域的研究应用广泛,但因啮齿类动物没有月经周期和子宫内膜脱落,所以小鼠不可能自然出现子宫内膜异位症。如何诱导建立小鼠子宫内膜异位症的动物模型是十分必要的。

伊朗克尔曼沙医科大学解剖系的研究人员,通过对比了三种制作啮齿类动物子宫内膜异位症模型的方式,制作了一种新的用于模拟人类子宫内膜异位的动物模型。

研究将小鼠分为了手术组对照组、同种异体小鼠子宫内膜移植组,以及大鼠子宫内膜移植至小鼠手术组,其中手术组又分为子宫内膜移植至前腹壁和子宫内膜移植至肠系膜组。为了增加子宫内膜厚度便于移植及解剖操作,本实验中选用有妊娠经历的大/小鼠并放置于雄性鼠周围,诱导雌激素分泌,同时将受体小鼠暴露于雄性小鼠周围促进雌激素分泌以保证子宫内膜的激素依赖性,最终通过病理学及相关分子标志物的测定,判断模型是否构建成功。

研究发现,与对照组相比,同种及异种子宫内膜移植到小鼠腹壁的 HOXA10 和 HOXA11 的基因表达显著降低,且呈现子宫内膜细胞的高速率增殖后产生的氧化应激;对血管生成率的评价中,同种及异种小鼠子宫内膜移植组的血管生成数量高于手术对照组;且发现了巨噬细胞中含铁血黄素的沉积。提示模型中出现了血管生成及巨噬细胞的过度活化;但是只有大鼠子宫内膜移植到小鼠前腹壁模型组,可出现 VEGF-A、TNF- α 、NO、MDA、血清 CA-125 和 IL-37 浓度升高,动物总体重降低,子宫内膜病变的重量和大小显著增加。

综上所述,本文通过构建并对比了几种不同的子宫内膜异位症动物模型,发现将大鼠子宫内膜移植到小鼠前腹壁的异种移植,在形态学、组织学和遗传学上可模拟人类子宫内膜异位症,可作为一种新的子宫内膜异位症动物模型。

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(3): 268-277; <https://doi.org/10.1002/ame2.12181>)。

李哲,王卫. HIV 广谱中和抗体研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 107-113.

Li Z, Wang W. Research progress of HIV broadly neutralizing antibodies [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 107-113.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 10. 016

HIV 广谱中和抗体研究进展

李 哲,王 卫*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,
卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 HIV 病毒在全球广泛流行,导致严重传染性疾病——艾滋病(AIDS),对人类生命健康及社会发展造成严重影响。高效抗逆转录病毒疗法(HAART)虽可抑制 HIV 病毒复制,但无法清除体内病毒。预防性疫苗是
对抗 HIV 的重要工具,但由于该病毒具有遗传多样性和强变异性,此类疫苗必需能诱导出有效中和多种 HIV 病毒
株的广谱中和抗体(bNAbs)。针对 HIV-1 bNAbs 诱导和产生的研究面临许多挑战,需要加强相关方向的科技攻关
力度。本文综述了 HIV-1 bNAbs 生物特征、产生机制、诱导策略等方面的最新进展,希望为后续研究提供基础信息
和可能方向。

【关键词】 HIV-1;广谱中和抗体;生物特征;产生机制;诱导策略

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0107-07

Research progress of HIV broadly neutralizing antibodies

LI Zhe, WANG Wei*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC). Institute of Medical Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS). Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging
Infectious. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

【 Abstract 】 The HIV virus is widespread worldwide, leading to the serious and infectious acquired
immunodeficiency syndrome (AIDS), and serious impacts on human life, health and social development. Although highly
active antiretroviral therapy can inhibit HIV virus replication, it is not able to eliminate virus from the body. Preventive
vaccines are an important tool against HIV, but because the virus has genetic diversity and strong variability, such vaccines
must be able to induce broadly neutralizing antibodies (bNAbs) that broadly and effectively neutralize HIV strains.
Research targeting the induction and generation of bNAbs for the prevention of HIV has many challenges, and it is
necessary to further strengthen the scientific and technological efforts in related research directions. This review summarizes
the latest progress in HIV bNAbs, including biological characteristics, production mechanisms, induction strategies and
other aspects, with the goal to provide basic information and possible directions for subsequent research.

【 Keywords 】 HIV - 1; Broadly neutralizing antibodies; Biological characteristics; Production mechanism;
Induction strategy

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency
virus, HIV)感染导致细胞免疫功能缺陷,继发严重

感染或肿瘤并致命,被称之为艾滋病(acquired
immunodeficiency syndrome, AIDS)。根据 2020 年联

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81873963);国家科技重大专项课题(2017ZX10304402-001-022)。

【作者简介】 李哲(1996—),女,硕士研究生,研究方向:比较医学专业。E-mail: lizhelxz@163.com

【通信作者】 王卫(1981—),副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学。E-mail: wangw@cnilas.org

联合国艾滋病规划署公布数据,截止 2019 年底,全球 HIV 感染者 3800 万人,新感染 HIV 170 万人,因 AIDS 死亡 69 万人^[1]。在过去一段时间,科研人员从 HIV“精英控制者”体内分离出能中和多种遗传差异 HIV 病毒株的广谱中和抗体(broadly neutralizing antibodies, bNAbs)。基于动物实验和临床研究数据,bNAbs 不仅可阻断 HIV 病毒复制,还有助于清除感染细胞及增强机体免疫反应,成为 HIV 疫苗研究一个关键而重要的方向。

1 bNAbs 的分离及鉴定

1.1 bNAbs 的分离

根据中和活性和分离时间,可将 bNAbs 大致分为两代。第一代 bNAbs 在 20 世纪 90 年代分离,具有有限的中和能力;自 2009 年以来,科研人员分离出中和活性更高的广谱中和抗体,被称为第二代广谱中和抗体。

1.1.1 第一代广谱中和抗体

1994 年, Burton 等^[2]使用噬菌体展示技术,从 HIV-1 B 亚型患者体内分离识别 gp120 CD4bs 的广谱中和抗体 b12。1994 年, Buchacher 等^[3]将 HIV 感染者 PBMC 与杂交瘤细胞 CB-F7 电融合后获得识别 gp120 聚糖(2G12)、gp41 MPER(2F5、4E10)^[4-5]的 bNAbs。尽管第一代 bNAbs 在动物模型上取得不错的结果,但临床试验显示这些 bNAbs 并不能有效抑制人体内的 HIV-1 病毒^[6]。

1.1.2 第二代广谱中和抗体

利用特异性单个 B 细胞分选技术、B 细胞受体测序技术、及高通量中和抗体检测等新技术,新一代高效广谱 bNAbs 陆续被分离,且有更显著的中和宽度^[7]。科研人员利用 B 细胞分选、高通量筛选以及微量中和实验从 A 亚型 HIV 病毒感染者 PBMC 中获得针对 V1/V2 区且中和广度不同的两个抗体 PG9 和 PG16^[8]。其他 bNAbs 如 CH01-CH04^[9]、PGT141-PGT145^[10]、CAP256-VRC26.01-12^[11]也用类似的方法获得。后来 Sok 等^[12]使用重组 HIV 包膜三聚体 BG505 SOSIP.664 gp140 作为钓饵蛋白分离慢性感染者 PBMC,发现新的广谱中和抗体 PGDM1400-1412。

1.2 bNAbs 的中和作用

bNAbs 直接与 Env 三聚体结合,阻断 Env-CD4 受体结合或病毒与宿主细胞融合。根据抗原-抗体复合物的序列定位和结构分析,已确定 bNAbs 7 个

中和位点:(1)针对包膜蛋白 Env 三聚体的第一及第二可变区(V1/V2 variable domain)(如抗体 PG9, PGT145);(2)针对第三可变区(V3 variable domain)(如抗体 PGT121, 10-1074);(3)针对 CD4bs(如抗体 VRC01, N6, 3BNC117);(4)针对 gp120/gp41 的交界区域(如抗体 35022, 8ANC195);(5)针对融合肽(如抗体 VRC34.01, ACS202);(6)针对 gp120 的“沉默”面(如抗体 VRC-PG05, SF12);(7)针对 gp41 上近膜侧外部区(MPER)(如抗体 10E8)。

1.2.1 针对 V1/V2 的 bNAbs

Env 蛋白 V1/V2 区被聚糖和可变环所掩盖^[13],结构分析显示针对 V1/V2 区的特异性抗体,如 PG9、PG16、CH01-04、PGT141-145、PGDM1400-1412,和 CAP256-VRC26.01-33,利用 CDRH3(complementarity-determining region 3 loops of heavy chain, CDRH3)穿透聚糖屏障,与 V1/V2、N156/N160 聚糖形成的四元表位相互作用^[8-12]。对类似于 PGT141-145 的重轻链序列进行富集,克隆获得 13 个 PGT145 抗体变异体,命名为 PGDM1400-1412,其中 PGDM1400 中和宽度为 83%, IC₅₀ 为 0.003 μg/mL^[12]。

1.2.2 针对 V3 的 bNAbs

针对 V3 区的 bNAbs,如 PGT121、PGT128 抗体,通过不同角度突出环与 V3 区聚糖作用^[10,14]。10-1074 对 B 亚型病毒的中和宽度为 67%, IC₅₀ 为 0.1 μg/mL^[14]。

1.2.3 针对 CD4bs 的 bNAbs

细胞表面 CD4 受体是 Env gp120 的主要结合靶点, gp120 上与 CD4 结合的区域被称为 CD4 结合部位(CD4-binding site, CD4bs)。在 HIV-1 感染中, CD4bs 在序列和结构上表现出良好的异质性,已诱导出数量最多的 bNAbs^[15]。CD4bs 抗体包括 VRC01、VRC07、N6、3BNC117、N49P 可中和 90% 以上的 HIV-1 毒株^[16-19]。但很多毒株已对这类抗体产生抗性,必须克服这种耐药性才能获得最佳的临床效果^[20]。

1.2.4 针对 MPER 的 bNAbs

2012 年, Huang 等^[21]分离出 MPER 特异性抗体 10E8,识别 MPER 区 C 端螺旋结构,中和宽度为 98%, IC₅₀ 值为 0.352 mg/mL。有研究证明针对 MPER 的免疫原刺激幼稚 B 细胞可产生 4E10、10E8 样抗体^[22]。因此,该抗体及相关的疫苗接种策略一直是研究热点。

1.2.5 针对 gp120/gp41 交界区的 bNAbs

针对 gp120/gp41 交界区的 35022 是 Huang 等^[23]人于 2014 年分离得到,中和宽度为 62%, IC_{50} 值为 0.033 mg/mL,是迄今为止针对 gp120/gp41 交界区最有效力的 bNAbs。

1.2.6 针对融合肽的 bNAbs

gp41 亚基 N 端有 15~20 个疏水残基,称为融合肽,是 bNAbs 特异性识别的表位,融合肽序列具有高度保守性和特异性^[24]。VRC34.01、PGT151、ACS202 可以从不同的角度结合融合肽,并在融合肽多种构象中发挥作用。ACS202 的 CDRH3 与融合肽形成的“ β 链”相互作用,并识别 gp120 N88 位保守的 N-连接聚糖,中和宽度为 45%^[25]。

1.2.7 针对 gp120 的“沉默”面的 bNAbs

“沉默面”不受聚糖改变的影响,可保持对抗体识别和中和的敏感性。VRC-PG05 是迄今为止唯一从患者体内分离的与 gp120 结合的抗体,中和宽度 27%, IC_{50} 值为 0.8 μ g/mL。此外由 VRC-PG05 与 gp120 复合物结合片段的共晶体结构可看出,沉默面中心表位主要由 N262、N295 和 N448 位聚糖组成^[26]。

1.3 bNAbs 的分子特点

bNAbs 具有许多共同的分子特征,首先,bNAbs 要获得中和广度,需要发生多次体细胞高频突变 (somatic hypermutation, SHM);其次,bNAbs 通常有较长的 CDR3Hs^[10,27],拥有更长的 CDR3Hs 通常被认为与穿透 Env 蛋白糖链屏障的能力有关^[28-29];最后,HIV bNAbs 通常具有多反应性/自身反应性,多反应性抗体一个结合位点能够与 HIV-gp140 高亲和力结合,此外还存在其他结合位点与病毒表面其他配体低亲和力结合。能够结合不同种类的抗原,即为多反应性。多反应性抗体通过异源配体结合或杂合作用增加其对病毒的整体表观亲和力^[30]。

但 bNAbs 也有各自的特点。针对 V1/V2 区的 bNAbs 有 24~32 个氨基酸组成的 CDR3Hs^[31],这与穿透 V1/V2 区糖基屏障有关^[32]。这类抗体 V_H 突变频率为 11%~18%, V_K/V_L 突变频率为 9%~16%^[9]。针对 V3 区的 bNAbs 有 18~24 个氨基酸组成的中等长度 CDRH3, V_H 突变频率为 15%~23%, V_K/V_L 突变频率为 9%~24%,突变通常涉及碱基的插入或删除^[10]。CD4bs 抗体表现出高亲和力成熟, V_H 和 V_K 基因突变频率分别为 32%和 20%^[33]。针对 MPER 区的 bNAbs 有 17~22 个氨基酸组成的中等长度 CDRH3s,具有中高度的亲和力, V_H 突变频

率为 13%~21%, V_K/V_L 突变频率为 6%~14%^[33]。针对 gp120/gp41 交界区的抗体种系基因为 *IGHV-1-18*02*-和 *IGLV-2-14*02*, V_H 、 V_L 突变频率分别为 35%、24%,35022 具有 14 个氨基酸长度的 CDRH3^[23],这类抗体的诱导需用与 Env 结构相似的免疫原。针对融合肽的 ACS202 具有 22 个氨基酸长度的 CDRH3,尽管 VRC34.01 与 ACS202 和 PGT151 有相同的 IgHJ 种系基因 *J6*02*,有由 13 个氨基酸组成的相对较短的 CDRH3^[25]。VRC-PG05 重链和轻链种系基因为 *IGHV3-7*01* 和 *IGKV4-1*01*,其体细胞超突变的频率分别为 9%、6%^[26],SF12 的 V_H 、 V_K 突变频率分别为 17%~25%、15%~21%^[34]。其他第二代广谱中和抗体性质信息见表 1。

2 bNAbs 产生机制

深入探讨促进或抑制 bNAbs 进化的机制,可对 HIV 疫苗的设计开发带来启示。在自然感染期间,bNAbs 有两种不同的进化机制。

2.1 病毒进化驱动机制

HIV-1 毒株多样性的产生,已被证实是诱导 bNAbs 进化的重要因素。例如,bNAbs VRC26,针对于 V1/V2 区 N160 糖基表位的中和抗体,研究发现 VRC26 抗体的谱系是由带有 N160 聚糖的 SI 病毒 (superinfecting virus, SI) 所诱导^[11],T/F 病毒 (transmitted-Founder virus, T/F) 因无 N160 聚糖而无诱导抗体产生的能力。而后 SI 病毒和 T/F 病毒重组促进 *env* 多样性增高,刺激该类抗体继续发生体细胞高频突变,产生广谱中和抗体。

2.2 谱系协同进化机制

T/F Env 与 B 细胞未突变共同前体 (unmutated common ancestor, UCA) 结合诱导自体中和抗体。受抗体中和作用影响,病毒变异发生免疫逃逸,协同谱系选择对 bNAbs 谱系更为敏感的逃逸突变体,从而为 bNAbs B 细胞前体和亲和力成熟提供持续刺激^[40]。因此,通过分析病毒-抗体协同进化过程,利用不同 Env 三聚体免疫 bNAbs 中间体促进抗体亲和力成熟,就可能产生广谱中和抗体。

2.3 其他影响因素的作用

除上述两种机制外,还有其他因素影响 bNAbs 进化。宿主因素 (种族、HLA 亚型、性别、年龄、传输),抗原特异性因素 (病毒载量、抗原暴露时间、*env* 多样性),免疫环境 (免疫细胞、抗体效应功能、免疫球蛋白亚型) 等因素都可能会影响 bNAbs 的产生^[41]。

表 1 第二代广谱中和抗体性质信息表
Table 1 Information of second-generation bNAb

广谱中和抗体 Broadly neutralizing antibodies	识别表位 Recognition epitope	分离方法 Isolation method	中和宽度 (%) Neutralization breadth	测试病毒数 Number of viruses tested	V _H 突变 (nt%) V _H mutation	CDRH3 长度 (aa) CDRH3 length	分离时间 Isolation time	参考文献 References
PGDM1400	V1 /V2 可变区 V1/V2-variable loops	B 细胞分选/高通量中和筛选 B cell sorting/High-throughput screening of neutralization	83	106	24.3	34	2014	[12]
PG9		B 细胞培养/高通量中和筛选 B cell culture/High-throughput screening of neutralization	79	162	13	28	2009	[8]
PGT145		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	78	162	18	31	2011	[10]
PG16		B 细胞培养/高通量中和筛选 B cell culture/High-throughput screening of neutralization	73	162	12	28	2009	[8]
VRC26.25	V3 区 V3-glycan	B 细胞培养、分选/中和实验 B cell culture, sorting/Neutralization assays	63	200	12	36	2015	[27]
PGT128		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	72	162	19	19	2011	[10]
PGT121		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	70	162	17	24	2011	[10]
10-1074		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	67	178	26.7	24	2012	[14]
BG18	CD4 结合位点 CD4 binding site	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	62	119	21.2	21	2017	[35]
N49-P7		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	100	117	24.1	21	2018	[16]
N6		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assay	98	181	31	15	2016	[18]
VRC07-523		基因合成/定点诱变/中和实验 Gene synthesis/Site-directed mutagenesis/Neutralization assay	96	179	23.5	18	2014	[19]
VRC01	膜近端外侧区 (MPER) Membrane proximal external region	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	90	208	32	14	2010	[17]
3BNC117		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	88	120	29.7	12	2011	[36]
NIH45-46		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	86	120	32.8	18	2011	[36]
DH511.11P		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	100	210	10.6	23	2017	[37]
10E8		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/Neutralization assays	98	180	21	22	2012	[21]

续表 1

广谱中和抗体 Broadly neutralizing antibodies	识别表位 Recognition epitope	分离方法 Isolation method	中和宽度 (%) Neutralization breadth	测试病毒数 Number of viruses tested	V _H 突变 (nt%) V _H mutation	CDRH3 长度 (aa) CDRH3 length	分离时间 Isolation time	参考文献 References
8ANC195	gp120-gp41 交界区域	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/ Neutralization assays	68	120	28	22	2011	[36]
35O22	gp120-gp41 interface	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/ Neutralization assays	62	181	35	16	2014	[23]
PGT151		抗体分离/中和实验 Antibodies isolation/ Neutralization assays	66	117	20	28	2014	[38]
VRC34. 01	融合肽 Fusion peptide	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/ Neutralization assays	49	208	15	13	2016	[24]
ACS202		B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/ Neutralization assays	45	75	16. 1	22	2016	[39]
SF12	gp120 沉默面	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/ Neutralization assays	62	119	17	23	2019	[34]
VRC-PG05	Silent face of gp120	B 细胞分选/中和实验 B cell sorting/ Neutralization assays	27	208	9	17	2018	[26]

3 基于 bNAbs 的 HIV 疫苗设计策略

3.1 聚焦保守表位的设计策略

由于部分中和抗体 (antibodies that neutralize only a narrow range of viruses, nNAbs) 和 bNAbs 靶向病毒包膜糖蛋白 Env 相同区域, nNAbs 表位暴露可能会阻碍抗原与具有广谱中和潜力 B 细胞的结合^[42], 阻碍 bNAbs 的诱导。因此驱动抗体识别 Env 保守表位的一种方法是阻碍 nNAbs 表位的暴露。另一种方法是将抗体应答集中在 Env 保守表位, 例如 CD4bs, 需要优化的免疫原方案包括选择性去除聚糖, 筛选单克隆抗体, 然后再逐步恢复去除的聚糖, 从而诱导抗体的宽度^[43]。

3.2 序贯免疫设计策略

为了克服 HIV-1 病毒多样性的问题, 可能需要不同的 Env 抗原来引导体液反应朝着高中和广度方向发展。基于 HIV A、B 和 C 进化支序列设计的 SOSIP 三聚体分别以单独、组合鸡尾酒疗法以及依次顺序形式给予家兔^[44], 结果表明, 不同 Env 三聚体依次顺序诱导的情况下, 中和抗体反应得到促进。克服 HIV-1 多样性的另一种方法是使用镶嵌抗原^[43], 通过设计针对 Env 三聚体多个靶点的嵌合

免疫原, 引发机体免疫反应, 以解决 HIV 病毒遗传多样性的问题。

3.3 模仿自然感染的设计策略

HIV-1 T/F 病毒与 HIV-1 bNAbs 共进化的研究表明, 中和宽度的发展依赖于病毒 *env* 多样性的增加^[11]。极少数慢性 HIV-1 感染者会产生针对大多数病毒亚型广谱和强效的中和抗体, 这证明人类 B 细胞谱系可以克服 HIV-1 病毒极端多样性的问题。通过研究“精英中和者”体内病毒抗体共进化, bNAbs 的产生机制, 寻找诱导产生 bNAbs 的免疫原, 可促进 HIV 疫苗的研发进展。由此概括出 B 细胞谱系疫苗设计策略为: 利用特异性 B 细胞分选技术将 bNAbs 和 bNAbs 前体分离, 根据 bNAbs 和 bNAbs 前体序列推断 bNAbs 中间体序列 (intermediate antibodies, IA)、UCA 序列, 并设计出 IA、UCA 免疫原。

3.4 靶向 bNAbs B 细胞前体的设计策略

HIV-1 Env 和基于 Env 设计的免疫原通常不会与 bNAbs 的推断种系前体相互作用, 这可能是 Env 和基于 Env 设计的免疫原无法有效诱导 bNAbs 原因^[45]。“种系靶向”策略旨在激活表达未突变前体 B 细胞, 然后进一步免疫引导 bNAbs 成熟^[43]。由于

CD4bs 在 HIV-1 毒株中相对保守,成为种系靶向疫苗研究的热点。此外,也开发出胚系免疫原,以诱导 bNAbs 靶向 Env 不同表位^[43]。

4 总结

近来,抗体分离技术的进步促使大量 bNAbs 被发现,随后科研人员对于 bNAbs 的功能特性进行了诸多研究,但控制 bNAbs 进化产生的关键因素仍然未知,无法通过疫苗接种获得 bNAbs,限制了 HIV 疫苗研发。目前无用于 HIV bNAbs 研究的小动物模型,SHIV 感染恒河猴是 HIV 相关研究的理想模型。但此模型在研究 bNAbs 反应生成机制存在一些缺陷:实验周期长,体液免疫反应不确定等。因此,为深入研究 bNAbs 进化生成机制,探索影响 bNAbs 发生发展过程的关键因素,必须建立 HIV bNAbs 发生发展研究平台,特别是动物模型平台。因此,继续开发和完善动物疾病模型对于开发预防 HIV 感染的有效疫苗同样至关重要。

参考文献:

- [1] UNAIDS 2021 Epidemiological Estimates. Global HIV & AIDS statistics [EB/OL]. [2021-07-14]. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
- [2] Burton DR, Pyati J, Koduri R, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody [J]. *Science*, 1994, 266(5187): 1024-1027.
- [3] Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, et al. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10(4): 359-369.
- [4] Muster T, Steindl F, Purtscher M, et al. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 1993, 67(11): 6642-6647.
- [5] Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41 [J]. *J Virol*, 2001, 75(22): 10892-10905.
- [6] Gruell H, Klein F. Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection [J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1): 73.
- [7] Julg B, Barouch DH. Neutralizing antibodies for HIV-1 prevention [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2019, 14(4): 318-324.
- [8] Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target [J]. *Science*, 2009, 326(5950): 285-289.
- [9] Bonsignori M, Hwang KK, Chen X, et al. Analysis of a clonal lineage of HIV-1 envelope V2/V3 conformational epitope-specific broadly neutralizing antibodies and their inferred unmutated common ancestors [J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 9998-10009.
- [10] Walker LM, Huber M, Doores KJ, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies [J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 466-470.
- [11] Doria-Rose NA, Schramm CA, Gorman J, et al. Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies [J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 55-62.
- [12] Sok D, van Gils MJ, Pauthner M, et al. Recombinant HIV envelope trimer selects for quaternary-dependent antibodies targeting the trimer apex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(49): 17624-17629.
- [13] Julien JP, Lee JH, Cupo A, et al. Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(11): 4351-4356.
- [14] Mouquet H, Scharf L, Euler Z, et al. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(47): E3268-E3277.
- [15] Zhou T, Lynch RM, Chen L, et al. Structural repertoire of HIV-1-neutralizing antibodies targeting the CD4 supersite in 14 donors [J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1280-1292.
- [16] Sajadi MM, Dashti A, Rikhtegaran Tehrani Z, et al. Identification of near-pan-neutralizing antibodies against HIV-1 by deconvolution of plasma humoral responses [J]. *Cell*, 2018, 173(7): 1783-1795.
- [17] Wu X, Yang ZY, Li Y, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1 [J]. *Science*, 2010, 329(5993): 856-861.
- [18] Huang J, Kang BH, Ishida E, et al. Identification of a CD4-binding-site antibody to HIV that evolved near-pan neutralization breadth [J]. *Immunity*, 2016, 45(5): 1108-1121.
- [19] Rudicell RS, Kwon YD, Ko SY, et al. Enhanced potency of a broadly neutralizing HIV-1 antibody in vitro improves protection against lentiviral infection *in vivo* [J]. *J Virol*, 2014, 88(21): 12669-12682.
- [20] Wang Q, Zhang L. Broadly neutralizing antibodies and vaccine design against HIV-1 infection [J]. *Front Med*, 2020, 14(1): 30-42.
- [21] Huang J, Ofek G, Laub L, et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody [J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 406-412.
- [22] Krebs SJ, Kwon YD, Schramm CA, et al. Longitudinal analysis reveals early development of three MPER-directed neutralizing antibody lineages from an HIV-1-infected individual [J]. *Immunity*, 2019, 50(3): 677-691.
- [23] Huang J, Kang BH, Pancera M, et al. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface [J]. *Nature*, 2014, 515(7525): 138-142.
- [24] Kong R, Xu K, Zhou T, et al. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody [J]. *Science*, 2016, 352(6287): 828-833.
- [25] Yuan M, Cottrell CA, Ozorowski G, et al. Conformational

- plasticity in the HIV-1 fusion peptide facilitates recognition by broadly neutralizing antibodies [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(6): 873-883.
- [26] Zhou T, Zheng A, Baxa U, et al. A neutralizing antibody recognizing primarily N-linked glycan targets the silent face of the HIV envelope [J]. *Immunity*, 2018, 48(3): 500-513.
- [27] Doria-Rose NA, Bhiman JN, Roark RS, et al. New member of the V1V2 - directed CAP256 - VRC26 lineage that shows increased breadth and exceptional potency [J]. *J Virol*, 2016, 90(1): 76-91.
- [28] Julien JP, Sok D, Khayat R, et al. Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(5): e1003342.
- [29] Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, et al. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1097-1103.
- [30] Mouquet H, Scheid JF, Zoller MJ, et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation [J]. *Nature*, 2010, 467(7315): 591-595.
- [31] Wu X, Zhou T, Zhu J, et al. Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing [J]. *Science*, 2011, 333(6049): 1593-1602.
- [32] McLellan JS, Pancera M, Carrico C, et al. Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9 [J]. *Nature*, 2011, 480(7377): 336-343.
- [33] Kwong PD, Mascola JR. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies [J]. *Immunity*, 2012, 37(3): 412-425.
- [34] Schoofs T, Barnes CO, Suh-Toma N, et al. Broad and potent neutralizing antibodies recognize the silent face of the HIV envelope [J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1513-1529.
- [35] Freund NT, Wang H, Scharf L, et al. Coexistence of potent HIV-1 broadly neutralizing antibodies and antibody-sensitive viruses in a viremic controller [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(373): 2144.
- [36] Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, et al. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding [J]. *Science*, 2011, 333(6049): 1633-1637.
- [37] Williams LD, Ofek G, Schätzle S, et al. Potent and broad HIV-neutralizing antibodies in memory B cells and plasma [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(7): 2200.
- [38] Falkowska E, Le KM, Ramos A, et al. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers [J]. *Immunity*, 2014, 40(5): 657-668.
- [39] van Gils MJ, van den Kerkhof TL, Ozorowski G, et al. An HIV-1 antibody from an elite neutralizer implicates the fusion peptide as a site of vulnerability [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16199.
- [40] Bonsignori M, Liao HX, Gao F, et al. Antibody-virus co-evolution in HIV infection: paths for HIV vaccine development [J]. *Immunol Rev*, 2017, 275(1): 145-160.
- [41] Subbaraman H, Schanz M, Trkola A. Broadly neutralizing antibodies: What is needed to move from a rare event in HIV-1 infection to vaccine efficacy? [J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1): 52.
- [42] McGuire AT, Dreyer AM, Carbonetti S, et al. HIV antibodies. Antigen modification regulates competition of broad and narrow neutralizing HIV antibodies [J]. *Science*, 2014, 346(6215): 1380-1383.
- [43] van Schooten J, van Gils MJ. HIV-1 immunogens and strategies to drive antibody responses towards neutralization breadth [J]. *Retrovirology*, 2018, 15(1): 74.
- [44] Torrents de la Peña A, de Taeye SW, Sliepen K, et al. Immunogenicity in rabbits of HIV-1 SOSIP trimers from Clades A, B, and C, given individually, sequentially, or in combination [J]. *J Virol*, 2018, 92(8): e01957-e02017.
- [45] Sliepen K, Medina-Ramírez M, Yasmeen A, et al. Binding of inferred germline precursors of broadly neutralizing HIV-1 antibodies to native-like envelope trimers [J]. *Virology*, 2015, 486: 116-120.

〔收稿日期〕2020-12-08

刘彤,李丽,王海丽,等. 应激性胃溃疡相关信号通路的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 114-118,142
Liu T, Li L, Wang HL, et al. Research progress of signaling pathways related to stress-induced gastric ulcers [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 114-118,142.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.017

应激性胃溃疡相关信号通路的研究进展

刘彤¹, 李丽¹, 王海丽¹, 刘家邑¹, 陈丽丽¹, 邵阳¹, 王朝辉^{1,2*}

(1. 长春中医药大学针灸推拿学院, 长春 130117; 2. 深圳市宝安纯中医治疗医院, 广东 深圳 518101)

【摘要】 应激性胃溃疡(SGU)是由于机体遭受应激,从而出现细胞代谢障碍和损伤,最终引起胃黏膜急性糜烂与溃疡的一种疾病。其发病机制尚不明确,了解与 SGU 相关的信号通路对进一步研究 SGU 的发病机制及寻找潜在的治疗靶点有重要意义。本文对与 SGU 相关的信号通路研究进展作一综述,发现 SGU 与 JAK/STAT 信号通路、Nrf2/HO-1 信号通路、NF-κB 信号通路、ERK1/2 信号通路、Hedgehog 信号通路、TLR 信号通路、PI3K/Akt 信号通路均关系密切。希望据此能够为 SGU 发病机制的研究及新兴治疗手段的提出提供一定的科学依据。

【关键词】 应激性胃溃疡;信号通路;中医疗法;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0114-05

Research progress of signaling pathways related to stress-induced gastric ulcers

LIU Tong¹, LI Li¹, WANG Haili¹, LIU Jiayi¹, CHEN Lili¹, SHAO Yang¹, WANG Zhaohui^{1,2*}

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

【Abstract】 Stress-induced gastric ulcers(SGU) is a disease in which the body suffers from stress, Resultsing in cell metabolism disorders and damage, and eventually causing acute erosion and ulcers of the gastric mucosa. The pathogenesis of SGU is still unclear. Understanding the signaling pathways related to SGU is of great significance for further research into the pathogenesis of SGU and the search for potential therapeutic targets. This article reviews the research progress of SGU-related signal pathways, and shows that SGU and the JAK/STAT, Nrf2/HO-1, NF-κB, ERK1/2, Hedgehog, TLR, and PI3K/Akt signaling pathways are closely related. The goal of this review is to provide a certain scientific basis for the study of the pathogenesis of SGU and potential new treatment method.

【Keywords】 stress-induced gastric ulcers; signaling pathway; TCM therapy; research progress

应激性胃溃疡(stress-induced gastric ulcers, SGU)通常是指机体内稳态被破坏,由于出现细胞代谢障碍和损伤而引起的胃黏膜层的弥漫性病变^[1]。具体体现为在应激状态下(如长时间高强度运动、各种创伤、休克、严重细菌感染、手术等)导致的胃

黏膜的急性糜烂与溃疡。危重病人易发生 SGU,由此引发的出血和休克会导致非常高的死亡率^[2]。目前,SGU 的发病机制尚不完全明确,但根据现有研究表明,SGU 的发生、发展与细胞氧化应激和炎症因子密切相关^[3]。了解与 SGU 相关的信号通路

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81774393);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20200876KJ)。

【作者简介】 刘彤(1993—),女,博士研究生,研究方向:特定穴配伍规律与临床应用研究。E-mail:tongknow06@163.com

【通信作者】 王朝辉(1973—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:特定穴配伍规律与临床应用研究。E-mail:wzhiqiwei@126.com

对进一步阐明 SGU 的发病机制、发现新型治疗药物、挖掘更有效的治疗手段具有重要意义。本文对与 SGU 相关的信号通路研究进展进行综述。

1 JAK/STAT 信号通路

1.1 JAK/STAT 信号通路概况

信号转导和转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 被酪氨酸激酶 (janus kinase, JAK) 磷酸化、二聚化, 并通过核膜转运到细胞核, 调节相关基因的表达, 该信号通路即被称为 JAK/STAT 信号通路^[4]。JAK/STAT 信号通路主要由酪氨酸相关受体、JAK 及 STAT, 这 3 个主要部分组成^[5]。其中 JAK 家族主要由四个成员组成: JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2, 主要介导大约 60 种不同的细胞因子、激素和生长因子的信号转导^[6]。STAT 则由七个成员组成, 即 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6, 主要在神经元和细胞因子介导的信号通路中发挥重要作用^[7]。该信号通路与多种机体功能相关, 多种细胞因子和生长因子可通过该信号通路传递信号, 并参与一些重要的生物学过程, 包括细胞增殖、分化、凋亡、免疫调节和造血等^[4]。

1.2 JAK/STAT 信号通路与 SGU

大量的体内和体外研究表明, JAK/STAT 信号失调是各种癌症以及免疫系统疾病发病机制的驱动力^[8]。炎症因子失衡是应激性胃溃疡发生的重要因素之一。研究表明在胃溃疡患者的血清中, 其白介素-2 (interleukin-2, IL-2)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的含量高于健康人群^[9]。IL-2 和 IFN- γ 这两种炎症因子可以诱导分化出辅助型 T 细胞 1 (T helper 1 cell, Th1)^[10]。正常情况下人体中 Th1 细胞和辅助型 T 细胞 2 (T helper 2 cell, Th2) 处于相对平衡的状态, Th1 细胞的过度释放会进一步使人体内免疫反应失衡, 导致胃溃疡病情的加重。JAK2/STAT4 参与介导 Th1 细胞分化, JAK1、JAK3/STAT6 参与介导 Th2 细胞分化, 从而 JAK/STAT 通路可介导 Th1/Th2 平衡^[11]。

有研究发现, 患有应激性胃溃疡的小鼠, 在经过肝胃百合汤治疗后, 其血清中的 IL-2 及 IFN- γ 含量降低, 胃黏膜中的 JAK2/STAT4 表达有所减少^[9], 说明该药物可能通过干预 JAK/STAT 信号通路, 降低炎症因子的含量, 调节 Th1/Th2 平衡, 阻断应激性胃溃疡炎症的发展, 可见 JAK/STAT 信号通路在

调节机体免疫功能中发挥重要作用, 或许未来可以应用 JAK 阻断剂来治疗应激性胃溃疡。

2 Nrf2/HO-1 信号通路

2.1 Nrf2/HO-1 信号通路概况

转录因子 NF-E2 相关因子 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 作为抗氧化反应的关键调节因子, 在细胞氧化还原状态的调节中起关键作用^[12]。血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1) 是一种重要的内源性抗氧化剂, 其诱导的下游信号轴对多个器官均具有抗氧化的保护作用^[13]。完整的 Nrf2/HO-1 信号通路参与钙调节、氧化应激、自噬等多种反应过程。在该通路激活的情况下, 可以清除人体多余的羟自由基、单线态氧和超氧阴离子来防止脂质和蛋白质的过度氧化, 并发挥有效的抗炎、抗氧化和抗凋亡作用^[14]。

2.2 Nrf2/HO-1 信号通路与 SGU

Nrf2 及其靶基因 HO-1 作为抗氧化防御、抗炎的主要调节者, 在应激性胃溃疡的发病过程中有着重要的地位。目前研究表明, 在应激条件下, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、炎症因子等多种因素可对机体产生影响, 线粒体很容易发生线粒体突变, 从而改变细胞膜的通透性。而 Nrf2/HO-1 通路的激活可以降低线粒体的氧化应激程度, 并减轻了炎症反应, 从而缓解溃疡程度^[15]。

研究发现, 由水浸束缚法造成应激性胃溃疡的小鼠经过注射含有内源性硫化氢的药物后, 其血浆内的炎症因子, 如白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10)、白介素-12 (interleukin-12, IL-12)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α) 及 IFN- γ 含量均显著下降, 且 Nrf2 蛋白与 HO-1 蛋白均有所上调^[16], 提示该药物可激活应激状态下胃黏膜的 Nrf2/HO-1 信号通路, 降低了应激诱导的全身炎症和胃黏膜中促炎因子的表达, 阻止并改善氧化应激程度, 为今后治疗应激性胃溃疡药物的研发提供新的靶点。

3 NF- κ B 信号通路

3.1 NF- κ B 信号通路概况

核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 是一种普遍存在的转录因子, 其家族主要包括 NF- κ B1 p50、NF- κ B2 p52、RELA (又称 p65)、RELB 和 c-

REL1^[17]。NF- κ B 信号通路发生调节参与炎症和免疫反应的各种细胞因子、细胞因子受体和粘附因子的基因表达。活化后的 NF- κ B 具有暴露的核定位序列,并与 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链结合,触发下游基因表达,从而潜在促进炎症的发生^[18]。

3.2 NF- κ B 信号通路 with SGU

经典的 NF- κ B 通路主要针对 TNF- α 和白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 而定义,这两种典型的促炎细胞因子在慢性炎症性疾病,如胃溃疡、炎症性肠病中具有重要作用^[19]。目前已有许多研究结果证明胃黏膜的炎性病变及胃部肿瘤的形成中有 NF- κ B 信号通路的参与^[20-21]。

有结果证明,大鼠造模后,测定其胃黏膜 NF- κ B 下游效应分子 TNF- α 、IL-1、诱导型一氧化氮合酶 (inducible NOS, iNOS) mRNA 的表达水平,这些炎性基因的表达随着 NF- κ B 的活化,其表达均明显升高,且这些基因的转录启动时间晚于 NF- κ B 活化^[22]。说明 NF- κ B 信号通路在胃黏膜发生改变的早期就已激活,在 SGU 的病情进展中起到重要作用。

4 ERK1/2 信号通路

4.1 ERK1/2 信号通路概况

细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2) 是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的组成成员之一。MAPK 信号通路还包括 p38 MAPK 激酶和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)^[23]。ERK1/2 在胞浆中被磷酸化,随后移位到细胞核并激活转录因子,影响细胞生理。ERK1/2 信号通路参与多种调控过程,包括细胞增殖与分化、细胞迁移、代谢与转录等,并与多种疾病的发生关系密切^[24]。

4.2 ERK1/2 信号通路 with SGU

炎性细胞因子、细胞应激均可激活 ERK1/2 通路,当 ERK1/2 激活转录因子 c-Jun 和 c-fos 原癌基因蛋白 (c-fos proto-oncogene protein, c-fos) 后,可调控 IL-1、TNF- α 等炎性因子的转录,导致胃黏膜炎症的发生^[25]。

研究表明,SGU 大鼠蓝斑中的 c-fos 与 ERK1/2 的表达均有显著上升,胃黏膜损伤加重。而在注射 ERK1/2 信号通路抑制剂后,可缓解胃黏膜损伤并使星形胶质细胞与蓝斑内神经元活性下降^[26-27],推

测 ERK1/2 信号通路可以激活处于应激状态下的神经元-星形胶质细胞网络,从而加重胃黏膜的损伤,为进一步探讨应激性胃溃疡的发病机制提供思路。

5 Hedgehog 信号通路

5.1 Hedgehog 信号通路概况

Hedgehog (Hh) 信号通路是一条从细胞膜到细胞核的编码高度保守的信号传递进化途径,在胚胎发育过程中起着重要作用。它通过信号级联发挥生物学效应,最终影响胶质瘤相关癌基因 (glioma-associated oncogene1, Gli) 转录因子激活型与抑制型之间平衡的改变^[28]。目前 Gli 基因家族有 3 个成员: Gli1、Gli2、Gli3,均可作为 Hh 信号通路激活后的最后通路。胞质 Sufu (suppressor of fused) 蛋白是 Hh 信号通路下游中的关键性调控因子,可与 Gli 相结合形成蛋白复合物,进一步调节下游靶基因的表达^[29]。

5.2 Hedgehog 信号通路 with SGU

Hh 信号通路与胃的生理功能联系密切,作为胃生理和分化的调节因子对理解胃疾病的发病机制具有重要意义。研究显示, Gli1、Gli2、Sufu 参与胃酸与胃泌素分泌的过程, Gli1-Gli2-Sufu 信号通路则是多种消化系统疾病的主要转导通路^[30],因此该通路可能是研究应激性胃溃疡的重要通路之一。

有研究显示,在模型组大鼠胃黏膜组织中, Gli1、Gli2、Sufu 的表达水平均明显升高, Gli2 与 Sufu 形成的蛋白复合物也明显增加^[31],说明 Gli1-Gli2-Sufu 信号通路参与了应激性胃溃疡发生的过程。而经过石榴皮多酚处理的模型组,上述蛋白含量均有所下降,胃黏膜损伤指数、氧化应激指标也有所降低。因此猜测石榴皮多酚可通过抑制 Gli1-Gli2-Sufu 信号通路从而缓解胃黏膜损伤。

6 TLR 信号通路

6.1 TLR 信号通路概况

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是一个模式识别受体家族,在人体免疫系统中发挥重要作用。TLR 产生的信号通过 NF- κ B 信号转导途径及特定的病原体相关分子模式募集促炎细胞因子和趋化因子,促进炎症反应,同时也会激活免疫系统。因此其在调控炎症与肿瘤方面作用显著^[32]。

6.2 TLR 信号通路 with SGU

Toll 样受体家族中, Toll 样受体 4 (Toll-like

receptor 4, TLR4) 信号通路炎症反应和肿瘤进展关系最为密切。TLR4 可诱导四种衔接蛋白, 其中髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 可激活 IL-1 受体相关激酶并进一步与 TNF- α 相互作用, 释放出更多炎症因子, 使胃及其他组织器官受到损害^[33]。

研究表明, 对 SGU 大鼠进行针刺足三里、中脘之后, 其 TNF- α 等炎症因子含量均有所降低, TLR4、MyD88、NF- κ B 表达有所下降, 相关氧化应激指标也均降低^[34]。说明 TLR 信号通路参与了应激性胃溃疡的发病过程, 且针刺可以通过该通路抑制胃黏膜进一步损伤, 为治疗应激性胃溃疡提供新的治疗方法。

7 PI3K/Akt 信号通路

7.1 PI3K/Akt 信号通路概况

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 是胞内磷脂酰肌醇激酶, 其在炎症进展、新陈代谢、细胞增殖等过程发生中发挥了重要作用。蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 是一种生长因子调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 为 PI3K 下游的关键靶点, 也是 PI3K 途径的中心介质, 具有多个下游效应因子, 参与多种细胞过程^[35]。磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 是该通路的负调控因子, PTEN 功能丧失后, 会导致 PI3K/Akt 通路上调, 进而磷酸化下游信号蛋白, 如叉头转录因子 O (forkhead box O, FoxO) 来刺激细胞生长增殖^[36]。因此 PI3K/Akt 信号通路及其上下游分子可能是治疗各种炎症性疾病的靶点。

7.2 PI3K/Akt 信号通路概况与 SGU

在应激性胃溃疡中, 胰岛素 1 号增长因子 (insulin-like growth factors-1, IGF-1) 和 Akt 蛋白通过抑制胃黏膜细胞凋亡而发挥胃保护作用^[37]。IGF-1 可激活 PI3K/Akt 信号通路, 进而引发一系列级联反应, 因此 IGF-1/PTEN/Akt/FoxO 信号通路可作为抑制应激性胃溃疡发生的关键通路及靶点。

研究显示, 在正常大鼠胃黏膜中 PTEN、Akt、FoxO 主要分布在靠近黏膜肌层的胃底腺细胞质中。而在 SGU 模型大鼠胃黏膜愈合的过程之中, IGF-1、PTEN、Akt、FoxO 的活性表达均有所上升, 且其分布主要在溃疡边缘与肉芽组织之中^[38]。说明 IGF-1/PTEN/Akt/FoxO 信号通路可能通过调节大鼠胃溃疡发生和愈合过程中的细胞凋亡而发挥一

定的抗溃疡作用, 这为开发新型抗应激性胃溃疡药物提供了一定可能性。

8 小结与展望

综上所述可知, SGU 的发病与多条信号通路均有密切关系。SGU 的发生机理尚不明确, 但普遍认为是机体在不同应激状态下产生的非特异性反应, 免疫系统、循环系统、神经系统、消化系统、内分泌系统均参与了这一应激过程^[39]。且因其病程较长且没有特效药, 所以临床上有效的治疗手段较少。目前常用的药物多为抗氧化应激类药物、修复胃黏膜屏障类药物及抗炎因子表达药物^[40], 但均为作用于单一信号通路的药物。由于多条信号通路都会参与 SGU 的发生与发展, 寻找能够同时作用于多条信号通路的治疗手段成为目前研究的重点。

中医一直强调在治疗中注重整体观念, 辨证施治, 信号通路互相之间也存在“交互影响”。在现代研究中, 中药方剂与针灸已被证明可以同时作用于多条信号通路。例如, 在内分泌疾病中, 艾灸一方面可以抑制 NF- κ B 通路所引起的炎症反应, 也可以同时激活 Nrf2/HO-1 信号通路所引导的抗炎、抗氧化作用, 减轻由糖尿病引发的周围神经炎症, 为糖尿病周围神经病变患者提供治疗效果^[41]。在神经系统疾病中, 针灸可以利用信号转导途径, 涉及多条信号通路, 通过影响突触的可塑性, 增加脑源性神经营养因子, 以抗凋亡、抗炎, 维持血脑屏障功能^[42]。在胃肠道疾病中, 中药方剂可以调控多条信号通路, 缓解胃肠道炎症, 修复胃肠道黏膜, 在治疗慢性炎症性胃肠道疾病中起到较优的治疗效果^[43]。也因其疗效好, 副作用少, 作为一种绿色治疗方式更能被病人所接受。在日后的研究过程中, 可以进一步挖掘中药方剂与针灸在治疗 SGU 的过程中具体活化了哪些信号通路, 中医手段是如何通过多条途径整体治疗 SGU。这样在深入研究中医手段治疗 SGU 机制的同时, 也能够找出 SGU 发病及发病过程中所涉及的信号通路的特异性靶点, 为治疗 SGU 提供更有效的手段。

参考文献:

- [1] Xie W, Huang X, Chen R, et al. Esomeprazole alleviates the damage to stress ulcer in rats through not only its antisecretory effect but its antioxidant effect by inactivating the p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 2969-2984.

- [2] Liu X, Chen Z, Mao N, et al. The protective of hydrogen on stress-induced gastric ulceration [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(2): 197-203.
- [3] Brzozowski T, Zwirska-Korczala K, Konturek PC, et al. Role of circadian rhythm and endogenous melatonin in pathogenesis of acute gastric bleeding erosions induced by stress [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58: 53-64.
- [4] Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway [J]. *Protein Sci*, 2018, 27(12): 1984-2009.
- [5] Li HX, Zhao W, Shi Y, et al. Retinoic acid amide inhibits JAK/STAT pathway in lung cancer which leads to apoptosis [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(11): 8671-8678.
- [6] Cai B, Cai JP, Luo YL, et al. The specific roles of JAK/STAT signaling pathway in sepsis [J]. *Inflammation*, 2015, 38(4): 1599-1608.
- [7] Yu H, Pardoll D, Jove R, et al. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 798-809.
- [8] Khanna P, Chua PJ, Bay BH, et al. The JAK/STAT signaling cascade in gastric carcinoma (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1617-1626.
- [9] 毛一之. 肝胃百合汤对慢性应激胃溃疡模型小鼠 JAK/STAT 通路介导 Th1/Th2 细胞平衡的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [10] Zehn D, King C, Bevan MJ, et al. TCR signaling requirements for activating T cells and for generating memory [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(10): 1565-1575.
- [11] Ghoreschi K, Laurence A, O'shea JJ, et al. Janus kinases in immune cell signaling [J]. *Immunol Rev*, 2009, 228(1): 273-287.
- [12] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [13] Ge XH, Shao L, Zhu GJ. Oxymatrine attenuates brain hypoxic-ischemic injury from apoptosis and oxidative stress: role of p-Akt/GSK3 β /HO-1/Nrf-2 signaling pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(6): 1869-1875.
- [14] Zhang X, Yu Y, Lei H, et al. The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 5695723.
- [15] Zhang M, Pan H, Xu Y, et al. Allicin decreases lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammation in human umbilical vein endothelial cells through suppression of mitochondrial dysfunction and activation of Nrf2 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(6): 2255-2267.
- [16] Magierowski M, Magierowska K, Surmiak M, et al. The effect of hydrogen sulfide-releasing naproxen (ATB-346) versus naproxen on formation of stress-induced gastric lesions, the regulation of systemic inflammation, hypoxia and alterations in gastric microcirculation [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2017, 68(5): 749-756.
- [17] Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9): 545-558.
- [18] Soleimani A, Rahmani F, Ferns GA, et al. Role of the NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. *Gene*, 2020, 726: 144132.
- [19] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.
- [20] Sokolova O, Naumann M. NF - κ B signaling in gastric cancer [J]. *Toxins(Basel)*, 2017, 9(4): 119.
- [21] Hossen MJ, Chou JY, Li SM, et al. An ethanol extract of the rhizome of *Atractylodes chinensis* exerts anti-gastritis activities and inhibits Akt/NF- κ B signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228: 18-25.
- [22] Jia YT, Ma B, Wei W, et al. Sustained activation of nuclear factor- κ B by reactive oxygen species is involved in the pathogenesis of stress-induced gastric damage in rats [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(6): 1582-1591.
- [23] Lu N, Malemud CJ. Extracellular signal-regulated kinase: a regulator of cell growth, inflammation, chondrocyte and bone cell receptor-mediated gene expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3792.
- [24] Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(2): 105-143.
- [25] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [26] Fan F, Yang M, Geng X, et al. Effects of restraint water-immersion stress-induced gastric mucosal damage on astrocytes and neurons in the nucleus raphe magnus of rats via the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(8): 1841-1850.
- [27] Fan F, Li L, Liu W, et al. Astrocytes and neurons in locus coeruleus mediate restraint water immersion stress-induced gastric mucosal damage through the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 675: 95-102.
- [28] Skoda AM, Simovic D, Karin V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2017, 18(1): 8-20.
- [29] Konstantinou D, Bertaux-Skeirik N, Zavros Y, et al. Hedgehog signaling in the stomach [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 31: 76-82.
- [30] Engevik AC, Feng R, Yang L, et al. The acid-secreting parietal cell as an endocrine source of sonic hedgehog during gastric repair [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4627-4639.
- [31] 赖舒, 张玉方. 石榴皮多酚对大鼠应激性胃溃疡的保护作用及与 Gli1-Gli2-Sufu 信号通路和细胞因子水平改变的关系 [J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(19): 1913-1918.

王天蔚,郎巧利,杨希,等. 动物用口服抗体的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 119-125.

Wang TW, Lang QL, Yang X, et al. Research progress of oral antibodies in animals [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 119-125.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.018

动物用口服抗体的研究进展

王天蔚^{1,2,3}, 郎巧利¹, 杨希¹, 李周权^{2*}, 葛良鹏^{1*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 西南大学动物科学技术学院 生物饲料与分子营养实验室, 重庆 400715; 3. 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

【摘要】 抗体是机体分泌的用来鉴别与中和外来病原微生物如细菌、病毒等的 Y 形蛋白质, 具有保护机体健康的功能。口服抗体进入肠道内能够给予肠道被动免疫, 使肠道免受病原微生物的感染。近些年来, 越来越多的研究发现一些特异性抗体可免受胃环境的影响, 立即在动物肠道内发挥保护作用。本文介绍了口服抗体的发展过程、作用机制、制备途径、稳定特性, 并根据实际应用情况综述了天然抗体、基因工程抗体通过口服摄入的方式对动物肠道感染的保护作用。

【关键词】 口服抗体; 动物健康; 病原微生物; 肠道感染

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0119-07

Research progress of oral antibodies in animals

WANG Tianwei^{1,2,3}, LANG Qiaoli¹, YANG Xi¹, LI Zhouquan^{2*}, GE Liangpeng^{1*}

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China. 2. Key Laboratory for Bio-Feed and Molecular Nutrition, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715. 3. Sichun Academy of Animal Sciences, Chengdu 610066)

【Abstract】 Antibodies are Y-shaped proteins secreted to identify and neutralize pathogenic microorganisms, such as bacteria and viruses, which maintain our health. Oral antibodies that enter the intestinal tract provide intestinal passive immunity to protect the intestinal tract from infection by pathogenic microorganisms. In recent years, a growing number of studies have shown that the gastric environment does not affect some specific antibodies, which provide immediate protection in an animal's gut. The development process, action mechanism, preparation route, and stability characteristics of oral antibodies are introduced and the protective effect of natural antibodies and genetically engineered antibodies on intestinal infections in animals by oral intake are summarized in accordance with the practical application.

【Keywords】 Oral antibodies; Animal health; Pathogen microbiology; Intestinal infection

肠道是动物重要的消化和免疫器官, 肠道健康是保障动物健康的重要因素。病原微生物可以通过感染肠道黏膜, 影响正常的肠道功能进而影响动物健康^[1-2], 特别在动物的初生阶段, 由于肠道的发

育及免疫系统不完善, 易感染病原微生物, 这将严重影响动物的健康, 甚至导致其死亡^[3-4]。

口服抗体作为一种被动免疫药物, 以口服的途径将预先形成的抗体输送至动物肠道粘膜, 能够立

【基金项目】 国家自然科学基金(5167070727); 畜禽养殖技术研发应用基础研究(19503-20)。

【作者简介】 王天蔚(1996—), 男, 硕士, 研究方向: 单胃动物营养。E-mail: 940893978@qq.com

【通信作者】 葛良鹏(1982—), 男, 研究员。E-mail: geliangpeng1982@163.com

李周权(1964—), 男, 副教授, 硕士生导师。E-mail: marcli@126.com * 共同通信作者

刻作用于肠道发挥抗体功能,起到治疗或预防肠道病原感染的作用^[5],是一种新型肠道保护策略。相对于常规的注射免疫,口服抗体可更快的发挥抗体功能^[6]。同时,口服方式对抗体的纯度要求较低,可通过廉价的蛋白表达系统表达抗体并将抗体伴随载体一同饲喂动物^[7],较为便捷。因此,口服抗体具有广阔的应用前景,本文就口服抗体的发展过程、作用机制、制备途径、稳定特性、对动物肠道健康保护作用的应用展开综述,为口服抗体的研究提供参考。

1 口服抗体的发展过程

抗体的发现可追溯至 19 世纪末,Behring 和 Kitasato 发现血浆中含有抗白喉和破伤风毒素的物质^[8],后称之为抗体。随着对抗体研究的深入,人们发现一些抗体以口服的方式饲喂给动物,也可以达到保障动物健康的效果。目前,常见的口服抗体有卵黄抗体 (immunoglobulin of yolk, IgY)、血液抗体以及基因工程抗体。

1893 年,德国医生 Klemperer 等^[9]在免疫蛋鸡的试验中发现,经免疫的蛋鸡所产鸡蛋蛋黄中含有能够中和免疫原的特异性蛋白质,即 IgY。自此,各国学者相继对其分子结构、理化性质、制备工艺、检测方法及应用等领域进行了广泛而深入的研究。直到上个世纪末,有研究发现在饲料中添加 IgY 可降低仔猪的腹泻率、死亡率,且有效预防细菌和病毒引起的消化道疾病^[10],这是人们首次将外源抗体以口服的方式饲喂动物并取得了预防疾病的效果。目前,卵黄抗体的研究较为广泛,以其获取方式的

高效便捷、产量高等优点在动物生产中得到了广泛应用,但卵黄抗体存在通过蛋传递病原的风险。

20 世纪 80 年代,有研究表明在断奶动物的饲料中加入喷雾干燥血浆能够提高动物的采食量、加快生长速度等^[11]。后续更多的研究表明,喷雾干燥血浆发挥作用的成分是其中的特异性抗体^[12]。自此,人们展开对口服血液抗体的研究。血液抗体能否预防动物疾病取决于血液中是否含有特异性抗体,这点对血液抗体的来源提出了更高的要求。

进入 21 世纪,随着基因工程的发展,人们能够获得表达特异性抗体的基因序列,随后根据用途对抗体加以修饰改造,利用蛋白表达技术实现了特异性重组抗体的大量表达,并在活体实验中取得了良好的效果。自此,越来越多的基因工程抗体作为口服抗体被开发出来。

2 口服抗体的作用机制

自然状态下,动物肠道内含有自身抗体来保护肠道系统,人们根据此类抗体的作用机制设计外源口服抗体,以期待外源抗体通过口服的方式能够达到保护肠道健康的效果。口服抗体主要通过以下方式发挥生物学功能:直接中和病原微生物,防止病原侵入;与病原微生物结合,抑制病原微生物繁殖;诱导抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用,杀死病原微生物(图 1)。

2.1 中和病原微生物

病原与宿主肠道的粘附是其感染肠道的重要途径^[13-14],口服抗体进入肠道内,能够与病原特异性结合、中和病原产物如酶和毒素,同时能够在肠

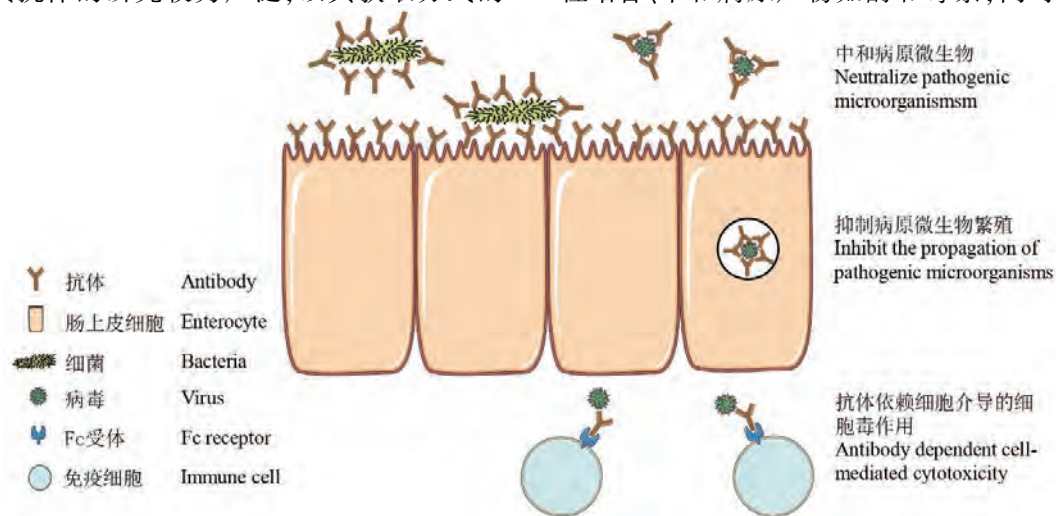


图 1 口服抗体作用机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of the mechanism of action of oral antibody

道粘膜形成一层覆盖层,抑制病原的粘附。外膜蛋白和鞭毛是细菌类病原体粘附肠道的重要毒力因子,参与肠细胞的粘附^[15],是细菌运动和定植肠道的关键^[16]。口服抗体一般具有多个抗原结合位点,能够与细菌外膜蛋白、鞭毛结合并具有类似包裹、凝集的功能,实现对细菌的快速清除,阻止细菌对肠上皮细胞的黏附。Saberianfar 等^[17]将抗体的重链可变区(variable domain of heavy-chain antibody, VHH)片段融合到猪分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, SIgA)的可结晶片段(crystallizable fragment, Fc)区域,在体外试验中验证了针对大肠杆菌黏附素的 VHH-SIgA 抗体能与 O145:Hnm、O111:Hnm、O26:H11 和 O157:H7 血清型大肠杆菌结合,并在显微镜下观察到经抗体中和后的大肠杆菌粘附肠上皮细胞的能力明显减弱。Vanmarsenille 等^[15]利用拟南芥种子表达针对弯曲杆菌外膜蛋白和鞭毛的鸡用口服抗体,将含有抗体的种子提取物加入培养弯曲杆菌的琼脂中,发现其明显减弱了弯曲杆菌的活性,将抗体稀释加入后该抑制活性作用减弱。

2.2 抑制病原微生物繁殖

病毒类病原体进入动物肠道后,口服抗体可以与之结合,形成病毒抗体复合物。病毒抗体复合物的形成可以干扰病毒在上皮细胞传染中的复制过程,当复合物进入上皮细胞后被排泄至管腔中清除^[18]。例如,在极化上皮细胞的基底外侧表面添加特异性抗病毒抗体可降低仙台病毒、轮状病毒的病毒滴度^[19-20]。

2.3 抗体依赖细胞介导的细胞毒作用

抗体依赖细胞介导的细胞毒作用是抗体发挥功能的重要途径,是指有杀伤性的免疫细胞通过其细胞表面的 Fc 受体识别包被于靶抗原上的抗体 Fc 段,直接杀死病原微生物^[21]。其中,嗜中性粒细胞被证实参与抗体介导的免疫反应,研究表明嗜中性粒细胞的 Fc 受体与抗体结合后会释放一种化学诱导剂,诱导剂会诱导嗜中性粒细胞迁移发挥免疫功能直到病原微生物被消除^[22]。到目前为止,已经证实病原微生物特异性抗体存在下,中性粒细胞对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的摄取增加^[23]。参考这一抗体作用途径,基因工程抗体融合了抗体的 Fc 区域^[24],期待口服抗体进入肠腔后能够依赖免疫细胞发挥清除病原体的作用。

3 口服抗体的制备途径

口服抗体主要有两种制备途径,一种是通过简单纯化从动物产品中获取天然抗体,另一种是根据人们的意图,通过基因工程外源表达特异性功能抗体。在天然抗体中,卵黄抗体是母鸡经特异性抗原刺激在孵育过程中由血清中的免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)转移到卵黄中形成的^[25],将蛋黄直接冷冻或喷雾干燥制成卵黄粉即可饲喂动物。从动物血液获取天然抗体主要有血浆喷雾和抗体纯化两种方式。喷雾血浆(spray-dried plasma, SDP)是利用屠宰后动物的血液,经过抗凝、离心、喷雾干燥等过程得到的粗糙口服抗体产品^[26]。如需获取更高纯度的血液天然抗体,也可通过蛋白纯化的方法从血清中提取抗体用于动物饲喂^[27]。

基因工程抗体的制备结合了基因工程以及蛋白质工程技术,人们在基因水平对抗体分子进行切割、拼接或修饰,再通过真核细胞表达获得抗体蛋白。植物表达系统已被证明可生产高价值的聚合物蛋白,大量的研究表明植物可表达用于被动免疫的口服抗体^[28]。烟草^[29]和拟南芥^[30]可稳定表达完整结构的 SIgA,并且具有免疫活性,将表达目的抗体的转基因植物与饲料一同饲喂动物,可达到口服抗体的预期效果^[31]。人们普遍认为细菌和酵母系统不能有效分泌组装好的抗体,并且正确转录后修饰的抗体水平较低^[32-33]。但最近 Viridi 等^[34]的研究表明,毕赤酵母可大量表达针对产毒性大肠杆菌的重组抗体,将含有表达抗体的酵母上清液经冷冻喷雾干燥后饲喂动物,能有效帮助动物抵御产毒性大肠杆菌的感染。

4 口服抗体的稳定性

口服抗体是一种蛋白质,经口服途径到达肠粘膜发挥作用前可能会被胃肠道消化系统水解,因此口服抗体在胃肠道中的稳定性被认为是其发挥作用的关键因素。在胃肠道中,口服抗体主要受到温度、pH、蛋白酶的影响。抗体的热稳定性相对其它蛋白质较好,大多数抗体在 37℃ 的条件下仍能保持良好的生物学活性。胃肠道内的 pH 较低,会对口服抗体与抗原的结合有一定的影响^[35],但不会造成抗体失活,酸性环境主要通过保障蛋白酶活性进而对口服抗体产生影响^[36]。在胃肠道中,口服抗体的

活性主要受蛋白酶的影响。

不同种类口服抗体在胃肠道中的稳定性差异非常大。IgY 摆动性和柔韧性较低,结构稳定,这可能是由于 IgY 分子重链和轻链间存在一个富含脯氨酸残基和甘氨酸残基的转换区。Yokoyama 等^[37]的研究发现,IgY 能够抵抗幼年动物胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的降解。

基因工程抗体是根据人们的意愿改造而成。Hu 等^[38]模拟 SIgA 的分子结构,利用中国仓鼠卵巢细胞表达出抗毒素的重组 SIgA 和 IgG,并通过蛋白纯化获得了高纯度 SIgA 和 IgG 抗体。在体外模拟胃肠道环境测试其稳定性的过程中发现,两种抗体在 37℃、pH=3.5、胃蛋白酶浓度 2000 U/mL 的条件下孵育一夜后均被完全消化,但 SIgA 的分解速度慢得多,表现出对 pH、胃蛋白酶更强的抵抗力,并且 SIgA 在整个过程均具有一定的抗原结合能力保留。基因工程表达 IgA 抗体的 VHH 较天然抗体具有更高的稳定性,可能其特殊的氨基酸序列缺少蛋白酶的作用位点^[39]。

在抵抗酶解作用的过程中,植物表达系统表现出了较大的优势。植物细胞壁为抗体提供了一个屏障,抗体在植物组织基质中得到了较好的保护,能大幅减少蛋白酶的降解作用^[40],同时植物表达的抗体铰链区糖基化也一定程度上抵御胃蛋白酶的酶解^[41]。在豆科植物的种子中,含有蛋白酶抑制剂,也可以保护种子中的抗体不被酶解^[42]。同时,Schade 等^[43]提出饲料中大量的其他蛋白质对抗体具有消化竞争作用,也有可能保障抗体的完整性。

5 口服抗体的应用

在口服抗体的应用研究中,口服抗体多以饲料添加或灌服的方式传递至动物肠道内,通过对实验动物进行攻毒处理,并观测实验动物的生理状况、生化指标和肠道病原微生物载量来评价口服抗体的功效。口服抗体的基础研究多以小鼠为实验模型,其应用研究主要在猪、禽生产中,本文将口服抗体分为天然抗体和基因工程抗体来阐述其应用研究现状。

5.1 天然抗体的应用

动物的血液中含有大量的抗体,主要以 IgG 抗体为主。研究表明,血液抗体经血浆喷雾干燥或者抗体纯化后饲喂动物能够保护肠道抵抗病原感染。Balan 等^[44]从羊血清中提纯抗体,并将其饲喂给大

鼠,经肠炎沙门氏菌攻毒后发现,与无抗体摄入的对照组相比,摄入抗体的大鼠在攻毒前后的日增重和日采食量无显著变化,基本没有沙门氏菌的感染症状。Hedegaard 等^[27]从猪血清中纯化获得天然 IgG 抗体,以 5 mg/d 的剂量饲喂断奶仔猪,并用 F4 型大肠杆菌给予攻毒。试验发现,饲料中添加 IgG 抗体的仔猪表现出对大肠杆菌更强的抵抗力,回肠肠杆菌的细菌比例极显著低于对照组仔猪,表明口服摄入的 IgG 有效抑制了大肠杆菌对仔猪肠道的感染。Bosi 等^[45]在已感染产毒性大肠杆菌的仔猪饲料中添加 6% 的 SDP,发现 SDP 可显著降低肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素 8 (Interleukin-8, IL-8) 的表达,改善了仔猪的感染症状,表明 SDP 对大肠杆菌诱导的肠道炎症具有保护效果。

卵黄抗体已广泛用于防治动物肠道类疾病,主要应用于猪、禽生产中。Vandeputte 等^[46]在肉鸡饲料中添加 5% 的抗空肠弯曲杆菌的 IgY 抗体,同时用弯曲杆菌对肉鸡进行攻毒处理。结果显示,饲料添加特异性 IgY 能显著减少空肠弯曲杆菌定植的肉鸡数量,使感染鸡的总定植率从 78% 降低至 15%。Mahdavi 等^[47]的研究表明,饲料中添加 0.2% 和 0.4% 的特异性 IgY 抗体对雏鸡回肠中大肠杆菌 O78:K80 的增殖具有明显的抑制作用。IgY 抗体同样可应用于猪生产中,猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的急性、高度接触传染性消化道疾病,仔猪感染 PEDV 的死亡率高达 80% ~ 100%,严重危害仔猪健康^[48]。在 Lee 等^[49]的研究中,新生仔猪以 500 mg/d 的剂量灌服特异性 IgY 抗体,经 PEDV 攻毒后的结果显示,口服抗 PEDV 的 IgY 抗体显著降低了仔猪的腹泻率以及死亡率,且试验组仔猪肠道仅观察到轻微的肠道损伤,表明抗 PEDV 的 IgY 抗体有效地保护仔猪肠道免受 PEDV 的感染。由此可见,口服天然抗体可有效保护病原菌对动物肠道的感染,起到肠道疾病的预防和治疗的作用。

5.2 基因工程抗体的应用

基因工程抗体主要经历多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体三个阶段。上个世纪末,de 等^[50]首次将单克隆抗体以口服的方式供给动物,通过 BABL/c 小鼠制备针对 F4 型大肠杆菌受体表位的单克隆抗体,将纯化腹水后得到的抗体以 15 mg/d

的剂量饲喂刚出生的无菌仔猪,同时对仔猪进行 F4 型大肠杆菌的攻毒处理。结果显示饲喂抗体有效降低了仔猪的死亡率,并且当抗体饲喂停止后,仔猪出现了感染症状,表明仔猪对 F4 大肠杆菌的抵抗依赖于经口服摄入的单克隆抗体。

基因工程抗体的口服应用研究主要集中在重组抗体方面。单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)由抗体重链可变区和轻链可变区通过 15~20 个氨基酸的短肽连接而成,具有抗原识别功能。Zimmermann 等^[31]利用噬菌体展示抗体库,获得了抗艾美耳球虫(*Eimeria*)单链抗体片段,并在转基因豌豆种子中成功表达该抗体。将表达抗体的豌豆种子制成碎片饲喂家禽,发现豌豆种子可以保护抗体不被胃肠道蛋白酶降解,同时表达抗体的豌豆种子显著降低了家禽 *Eimeria* 的感染率。Zhang 等^[51]将抗 PEDV 病毒单链抗体基因克隆至 pet-28 表达质粒中重组表达抗 PEDV 病毒单链抗体,仔猪以 25 mg/d 的剂量摄入该抗体后表现出轻微或无 PEDV 临床症状,病毒载量明显减少,无肠道病变,表明口服单链抗体具有预防和治疗 PEDV 的作用。骆驼体内存在天然缺失轻链的重链抗体(heavy chain of antibody, HCAs),此类抗体的抗原结合位点仅由重链的可变区 VHH 单结构域构成^[52]。VHH 抗体具有高度的亲和力、特异性和稳定性,并且它们可以在恶劣的化学和热条件下保持功能^[39]。由于它们的互补性决定区 3 (complementarity determining region 3, CDR3)的扩展,该区域呈凸环型,具有更多与抗原识别的表位^[53]。Tokuhara 等^[54]利用转基因水稻表达抗轮状病毒的特异性的抗体片段 VHH,在小鼠攻毒实验中发现,口服 VHH 可显著降低免疫功能低下和免疫缺陷小鼠的轮状病毒载量。该抗体在长期保存和煮沸后仍保持体外中和活性,即使在 94℃ 下热处理 30 min,也能对小鼠产生保护作用。Pant 等^[55]利用重组乳酸菌表达了针对轮状病毒的 VHH 抗体,小鼠口服摄入后,可显著降低其由轮状病毒引起的腹泻程度和病毒载量。由此可见,VHH 对病毒的侵染具有一定的效果,然而单个 VHH 抗体是一价的,在机体内容易被迅速清除,通过将 VHH 融合到抗体的 Fc 结构域可以在发挥功能的同时避免这些缺点。VHH 与 Fc 结构域的融合将通过增加 Fc 受体的大小和相互作用而延长体内半衰期^[56],同时融合抗体确保抗体的多价性,这对细菌凝集交联和防止细菌附着于肠绒毛

肠细胞受体极为重要^[57]。Virdi 等^[24]成功地将针对 F4 型产毒大肠杆菌的 VHH 片段融合至猪 IgA、IgG 的 Fc 区域,在拟南芥种子中表达,并通过饲喂种子的方式使仔猪获得抗体。在仔猪的攻毒实验中,每天接受 80 mg VHH-IgA 的仔猪肠道中产毒大肠杆菌载量呈下降趋势,免疫反应明显降低,体增重高于其它实验组,表明 VHH-IgA 保护了大肠杆菌对仔猪肠道的感染,而 VHH-IgG 不能抵抗大肠杆菌感染。VHH-IgG 不能保护仔猪肠道感染的原因可能是 VHH-IgA 在胃肠道中具有更好的稳定性和更高的保留效率^[58]。同样,VHH-IgA 也在毕赤酵母中成功表达,并在仔猪攻毒实验中取得了相同的效果^[34]。

综上,特异性口服抗体具有保护动物肠道健康的作用。在动物养殖领域中,人们需结合实际情况,可将口服抗体用于治疗或预防高发疾病。在这一过程中,口服抗体的特异性和使用剂量是其发挥功能的关键因素。通常情况下,口服抗体不具备广谱性,仅针对某一病原或某一类病原具有抗体功能,因此,需根据疾病病原选用特异性口服抗体。口服抗体的使用剂量受多方面因素影响,在实际应用过程中需根据具体情况添加合适的抗体剂量。其中,动物物种是影响口服抗体剂量的重要因素,以上研究表明猪类口服抗体的使用剂量高于禽类、鼠类,可推断高体重的物种所需抗体剂量更高。同时,口服抗体通常不以高纯度形式作为饲料添加剂,往往伴随其表达载体一同摄入动物体内,需要结合抗体的表达载量计算饲料中的添加量。其次,口服抗体与病原的亲和力以及病原载量也将影响抗体的使用剂量,以上研究中,大多以细菌攻毒为试验模型,而在实际生产中的疾病预防与治疗情况将与此不同,口服抗体的使用剂量也将不同。因此,口服抗体使用剂量应依据实际情况、应用目的而界定。

6 总结及展望

口服抗体作为一种被动免疫制剂可以针对肠道感染病原体给予动物肠道保护作用,尤其在初生动物肠道免疫系统不完善的情况下效果尤为明显。近些年来,口服抗体对动物保护作用的研究不断增加,取得了不错的进展,但仍存在以下不足:(1)口服抗体对整个肠道免疫系统的影响缺乏系统性研究;(2)口服抗体与肠道的相互作用机制仍需进一步研究。未来,人们将更着眼于基因工程类抗体,对抗

体的稳定性、功能性、高效性做更深入的研究,同时口服抗体是否能通过口服途径为非肠道型疾病给药也是值得探究的方向。总之,继续深入全面、系统的研究口服抗体对肠道的保护作用及防护机制,对保障动物健康、实现抗生素的替代具有重大意义。

参考文献:

- [1] Paulin SM, Jagannathan A, Campbell J, et al. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(8): 3950-3960.
- [2] Charania MA, Laroui H, Liu H, et al. Intestinal epithelial CD98 directly modulates the innate host response to enteric bacterial pathogens [J]. *Infect Immun*, 2013, 81(3): 923-934.
- [3] Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age [J]. *Proc Biol Sci*, 2015, 282(1821): 20143085.
- [4] Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(4): 822-880.
- [5] Corthesy B. Recombinant secretory immunoglobulin A in passive immunotherapy: linking immunology and biotechnology [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003, 4(1): 51-67.
- [6] Melkebeek V, Goddeeris BM, Cox E. ETEC vaccination in pigs [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2013, 152(1-2): 37-42.
- [7] Juarez P, Virdi V, Depicker A, et al. Biomanufacturing of protective antibodies and other therapeutics in edible plant tissues for oral applications [J]. *Plant biotechnol J*, 2016, 14(9): 1791-1799.
- [8] Von Behring E, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 1890, 16: 1113-1114.
- [9] Klemperer G, Klemperer F. Versuche über immunisierung und heilung bei der pneumokokkeninfektion [J]. *Berlin Klin*, 1893, 28: 833-835.
- [10] Yokoyama H, Peralta RC, Diaz RI, et al. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets [J]. *Infect Immun*, 1992, 60(3): 998-1007.
- [11] Gao YY, Jiang ZY, Lin YC, et al. Effects of spray-dried animal plasma on serous and intestinal redox status and cytokines of neonatal piglets [J]. *J Anim Sci*, 2011, 89(1): 150-157.
- [12] Pierce JL, Cromwell GL, Lindemann MD, et al. Effects of spray-dried animal plasma and immunoglobulins on performance of early weaned pigs [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(12): 2876-2885.
- [13] Buttner D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2012, 76(2): 262-310.
- [14] Dziva F, Diemen PM, Stevens MP, et al. Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis [J]. *Microbiology*, 2004, 150(11): 3631-3645.
- [15] Vanmarsenille C, Díaz Del Olmo I, Elseviers J, et al. Nanobodies targeting conserved epitopes on the major outer membrane protein of *Campylobacter* as potential tools for control of *Campylobacter* colonization [J]. *Vet Res*, 2017, 48(1): 86.
- [16] Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility [J]. *Trends Microbiol*, 2007, 15(10): 456-461.
- [17] Saberianfar R, Chin-Fatt A, Scott A, et al. *E. coli* Plant-produced chimeric VH-sIgA against enterohemorrhagic intimin shows cross-serotype inhibition of bacterial adhesion to epithelial cells [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10(1): 270.
- [18] Bakema JE, Van EM. Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies? [J]. *MABs*, 2011, 3(4): 352-361.
- [19] Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, et al. Intracellular neutralization of Sendai and influenza viruses by IgA monoclonal antibodies [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 371(4): 651-654.
- [20] Corthésy B, Benureau Y, Perrier C, et al. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion [J]. *J Virol*, 2006, 80(21): 10692-10699.
- [21] Vandervén HA, Jegaskanda S, Wheatley AK, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity and influenza virus [J]. *Curr Opin Virol*, 2017, 22: 89-96.
- [22] van der Steen L, Tuk CW, Bakema JE, et al. Immunoglobulin A: Fc(alpha)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4 [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(6): 2018-2029.
- [23] Spriel AB, Herik-OI, Sorge N, et al. Effective phagocytosis and killing of *Candida albicans* via targeting Fc gamma RI (CD64) or Fc alpha RI (CD89) on neutrophils [J]. *J Pediatr Inf Dis Soc*, 1999, 179(3): 661-669.
- [24] Virdi V, Coddens A, De BS, et al. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(29): 11809-11814.
- [25] 李玉莲, 曹满湖, 肖勇, 等. 卵黄抗体制备影响因素及其在动物生产中的应用 [J]. *中国饲料*, 2013, 4: 8-11.
- [26] 李伟锋, 王鹏, 徐幸莲, 等. 喷雾干燥鸡血浆蛋白粉工艺优化 [J]. *农业工程学报*, 2012, 28(21): 248-255.
- [27] Hedegaard CJ, Strube ML, Hansen MB, et al. Natural pig plasma immunoglobulins have anti-bacterial effects: potential for use as feed supplement for treatment of intestinal infections in pigs [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147373.
- [28] Palaci J, Virdi V, Depicker A. Transformation strategies for stable expression of complex hetero-multimeric proteins like secretory immunoglobulin A in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(9): 1760-1769.
- [29] Juarez P, Huet TE, Sarrion PA, et al. Combinatorial analysis of secretory immunoglobulin a (sIgA) expression in plants [J]. *Int*

- J Mol Sci, 2013, 14(3): 6205–6222.
- [30] Nakanishi K, Morikane S, Ichikawa S, et al. Protection of human colon cells from shiga toxin by plant-based recombinant secretory IgA [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45843.
- [31] Zimmermann J, Saalbach I, Jahn D, et al. Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens [J]. BMC biotechnol, 2009, 9: 79.
- [32] Fischer R, Stoger E, Schillberg S, et al. Plant-based production of biopharmaceuticals [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(2): 152–158.
- [33] Vasilev N, Smales CM, Schillberg S, et al. Developments in the production of mucosal antibodies in plants [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34(2): 77–87.
- [34] Viridi V, Palaci J, Laukens B, et al. Yeast-secreted, dried and food-admixed monomeric IgA prevents gastrointestinal infection in a piglet model [J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(5): 527–530.
- [35] Boswell CA, Tesar DB, Mukhyala K, et al. Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics [J]. Bioconjugate chem, 2010, 21(12): 2153–2163.
- [36] Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, et al. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review [J]. J Pharm Sci, 2020, 109(1): 169–190.
- [37] Yokoyama H, Peralta RC, Sendo S, et al. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing [J]. Am J Vet Res, 1993, 54(6): 867–872.
- [38] Hu Y, Kumru OS, Xiong J, et al. Preformulation characterization and stability assessments of secretory IgA monoclonal antibodies as potential candidates for passive immunization by oral administration [J]. J Pharm Sci, 2020, 109(1): 407–421.
- [39] Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. Vet Immunol Immunop, 2009, 128(1–3): 178–183.
- [40] Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, et al. Oral immunotherapy for allergic diseases using transgenic rice seeds: current state and future prospects [J]. Int Arch Allergy Imm, 2013, 161: 164–169.
- [41] Plomp R, Dekkers G, Rombouts Y, et al. Hinge-region O-glycosylation of human immunoglobulin G3 (IgG3) [J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(5): 1373–1384.
- [42] Avilés-Gaxiola S, Chuck-Hernández C, Serna Saldívar SO. Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review [J]. J Food Sci, 2018, 83(1): 17–29.
- [43] Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine [J]. Altern Lab Anim, 2005, 33(2): 129–154.
- [44] Balan P, Han KS, Rutherford SM, et al. Dietary supplementation with ovine serum immunoglobulin attenuates acute effects on growth, organ weights, gut morphology and intestinal mucin production in the growing rat challenged with *Salmonella enteritidis* [J]. Animal, 2011, 5(10): 1570–1578.
- [45] Bosi P, Casini L, Finamore A, et al. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. J Anim Sci, 2004, 82(6): 1764–1772.
- [46] Vandeputte J, Martel A, Canessa S, et al. Reducing *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chickens by in-feed supplementation with hyperimmune egg yolk antibodies [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8931.
- [47] Mahdavi AH, Rahmani HR, Nili N, et al. Effects of dietary egg yolk antibody powder on growth performance, intestinal *Escherichia coli* colonization, and immunocompetence of challenged broiler chicks [J]. Poultry Sci, 2010, 89(3): 484–494.
- [48] 王丽珍, 罗桂芳, 张艳萍, 等. 猪流行性腹泻病毒间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 377–383.
- [49] Lee DH, Jeon YS, Park CK, et al. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets [J]. Arch Virol, 2015, 160(9): 2197–2207.
- [50] de Geus B, Harmsen M, van Zijderveld F. Prevention of diarrhoea using pathogen specific monoclonal antibodies in an experimental enterotoxigenic *E. coli* infection in germfree piglets [J]. Vet Q, 1998, 20: S87–S89.
- [51] Zhang F, Chen Y, Ke Y, et al. Single chain fragment variable (scFv) antibodies targeting the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus provide protection against viral infection in piglets [J]. Viruses, 2019, 11(1): 58.
- [52] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status [J]. J Biotechnol, 2001, 74(4): 277–302.
- [53] Harmsen MM, Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments [J]. Appl Microbiol Biot, 2007, 77(1): 13–22.
- [54] Tokuhara D, Alvarez B, Mejima M, et al. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection [J]. Digestion, 2013, 123(9): 3829–3838.
- [55] Pant N, Hultberg A, Zhao Y, et al. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea [J]. J Infect Dis, 2006, 194(11): 1580–1588.
- [56] Hutt M, Farber-Schwarz A, Unverdorben F, et al. Plasma half-life extension of small recombinant antibodies by fusion to immunoglobulin-binding domains [J]. J Biol Chem, 2012, 287(7): 4462–4469.
- [57] Roche AM, Richard AL, Rahkola JT, et al. Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination [J]. Mucosal Immunol, 2015, 8(1): 176–185.
- [58] De Greve H, Viridi V, Bakshi S, et al. Simplified monomeric VHH-Fc antibodies provide new opportunities for passive immunization [J]. Curr Opin Biotech, 2020, 61: 96–101.

[收稿日期] 2021-01-27

杨冬晗, 张文龙, 侯瑞丽, 等. Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (10): 126-130.

Yang DH, Zhang WL, Hou RL, et al. The role of the toll-like receptor 4 signaling pathway in alcoholic liver injury [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 126-130.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.019

Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展

杨冬晗¹, 张文龙², 侯瑞丽¹, 李可欣¹, 张洪然¹, 戈娜^{1*}

(1. 包头医学院营养与食品健康研究所, 内蒙古 包头 014040; 2. 包头医学院第一附属医院, 内蒙古 包头 014040)

【摘要】 柳叶刀发布的 2019 年中国疾病负担数据显示, 饮酒是导致死亡的第 10 大危险因素。而由喝酒引发的酒精性肝损伤的发病机制十分复杂, 至今仍无清晰定论。Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤的发生发展中有深远的意义。因此, 本文就 Toll 样受体 4 信号转导通路在酒精性肝损伤中的作用做一综述, 为今后酒精性肝损伤的防治提供新的研究思路。

【关键词】 酒精性肝损伤; Toll 样受体 4 信号通路; 内毒素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0126-05

The role of the toll-like receptor 4 signaling pathway in alcoholic liver injury

YANG Donghan¹, ZHANG Wenlong², HOU Ruili¹, LI Kexin¹, ZHANG Hongran¹, GE Na^{1*}

(1. Institute of Nutrition and Food Health, Baotou Medicine College, Baotou 014040, China.

2. the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou Medicine College, Baotou 014040)

【Abstract】 According to data on China's disease burden in 2019 published by the Lancet, alcohol consumption is the 10th leading risk factor for death. However, the pathogenesis of alcoholic liver injury caused by drinking is very complicated, and there is still no final conclusion. The toll-like receptor 4 signaling pathway has a key role in the occurrence and development of alcoholic liver injury. Therefore, this article reviews the role of the toll-like receptor 4 signal transduction pathway in alcoholic liver injury.

【Keywords】 alcoholic liver injury; toll-like receptor 4 signaling pathway; endotoxin

酒精性肝损伤又称酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD), 是指由于长期大量饮酒导致的肝疾病。根据世界卫生组织的报告全世界饮酒的人群中有 10%~20% 有不同程度的酒精性肝病, 是世界范围内亟待解决的严重公共卫生问题, 但发病机

制尚未完全清楚。所以, 本文将探讨影响酒精性肝病发生的关键信号通路的作用机制。

1 酒精性肝损伤发生现状

2018 年中华医学会将酒精性肝病临床分为五

【基金项目】 国家自然科学基金 (81760586); 内蒙古自治区草原英才工程青年创新人才培养计项目 (Q2017089); 内蒙古自治区卫生计生科研计划项目 (201701084); 2016 年度包头市青年创新人才项目 (包人社办字 [2017] 284 号); 内蒙古自然科学基金项目 (2019LH08039); 包头医学院科学研究基金项目 (BYJJ-YF-201716); 包头医学院科学研究基金项目 (BYJJ-YF-2018010); 内蒙古自治区研究生科研创新项目 (S2018112037Z)。

【作者简介】 杨冬晗 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 营养与疾病。E-mail: 1097179236@qq.com

【通信作者】 戈娜 (1980—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 营养与疾病。E-mail: genanihao80@163.com

型:轻症酒精性肝病,酒精性脂肪肝,酒精性肝炎,酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化^[1]。全世界约有 20 亿人饮酒,其中超过 7500 万人面临与酒精有关的肝病风险。因此,饮酒对社会资源消耗的后果是难以估量的^[2]。在中国,15 岁以上人口的人均酒精消费总量已从 2005 年 4.1 L(世界平均水平 5.5 L)上升至 2016 年人均酒精消费量 7.2 L(2010 年至 2016 年世界平均水平 6.4 L),增幅高达 76%,而 ALD 患者也正以惊人的速度在增长^[3]。在一项对中国西北地区(陕西、甘肃、新疆)18 岁以上的部分城市不同职业人群调查发现,ALD 患病率高达 8.7%^[4]。在北京 302 医院一项针对 2002—2013 年两万多例四种非感染性肝病住院患者的病例研究中发现,ALD 的住院率增加了 170%,占总住院人数的 3.9%^[5]。最近一项全国性的调查发现,目前的饮酒者包括男性中的 56%和女性中的 15%,饮酒患者障碍比例从 80 年代中期的 0.45%上升到 90 年代中期的 3.4%,酒精性肝病的死亡率占肝硬化患者死亡率的 48%,给健康和经济造成了巨大损失^[6]。一项针对国内外肝硬化患者中酒精病因构成比变化特点的 Meta 分析结果显示:近 25 年,中国肝硬化患者中酒精病因构成比为 8.48%;2006—2015 年中国肝硬化患者中酒精病因构成比为 8.07%高于 1991—2005 年的 7.04%,总体呈现上升趋势^[7]。

相对于中国,非洲、美洲、地中海区域的人均酒精消费量比较稳定,欧洲地区的人均酒精消费量则从 2005 年的 12.3 L 下降到 2016 的 9.8 L,而西太平洋和东南亚地区的人均酒精消费量均有所增加。以美国为例,2006 年发生的与酒精有关的死亡(不包括事故/凶杀案)为 22073 人,其中 13,000 人归因于酒精性肝损伤,而 2016 年因酒精导致死亡的人数为 34865 人,其中因酒精性肝损伤死亡为 21815^[8-9]。在韩国,酒精性肝炎的发病率也逐年上涨,男性上涨幅度大于女性,均呈上升趋势。但在某些西方国家如丹麦,发病率却呈下降趋势,这可能与国家鼓励健康饮酒的政策有关^[2]。由上述可知,酒精性肝病仍然是全世界范围内亟待解决的公共卫生问题。

2 Toll 样受体 4 信号通路

Toll 样受体(toll like receptor, TLR)是一类与先天免疫和炎症有关的受体,是典型的一型模式识别受体,具有促进细胞因子合成和释放引发炎症反应

的重要生物学功能,可以促进抗原提呈细胞的成熟,诱导人体获得性免疫。TLR 可以直接识别并且结合病原相关分子模式,引发下游信号转导,导致炎性细胞因子和趋化因子的释放,在机体的天然免疫防御中发挥着重要的作用^[10]。

TLR4 是 TLR 家族中第一个在哺乳动物中发现的 TLR,它能够识别病原微生物,激活病原微生物,脂蛋白和肽聚糖,促进细胞产生细胞因子、趋化因子、黏附因子和急性期蛋白调节炎症反应。属于 I 型跨膜糖蛋白受体和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),在炎症的发生、尤其是免疫系统的激活中起着重要作用。TLR4 不仅存在于与免疫相关的中性粒细胞中,还可存在于其他组织,如在肝中,通常在 Kupffer 细胞、肝细胞、肝星状细胞和肝窦内皮细胞中表达^[11]。在过去的许多研究中大多数都集中于 TLR4 的结构和功能上:一方面,TLR4 导致核转录因子激活 NF- κ B 的易位和促炎细胞因子的表达。另一方面,TLR4 的过表达或持续激活会导致机体过度炎症反应或组织损伤,是公认的促炎因子。

有研究发现,TLR4 介导的信号通路不仅控制着影响细胞存活和死亡的促炎基因,而且还能调控细胞因子的表达,使疾病向坏的方向发展^[12]。目前已知的 TLR4 介导的信号通路有两种:MyD88 依赖性途径和非依赖性途径^[13]。当 TLR4 的 TIR 结构域与接头分子 TIR 结构二聚化并活化 TLR4 后,分别招募接头分子 MyD88 接头蛋白样/TIR 相关蛋白和 β 干扰素诱导的含 TIR 结构域接头蛋白/TRIF 相关接头分子,从而使 NF- κ B 活化并进入核内启动信号转导,激活 MyD88 依赖和 MyD88 非依赖的两条信号通路^[14-15]。由上述可知,MyD88 依赖性信号途径指的是 TLR4 通过募集髓样分化因子导致 NF- κ B 的快速激活和炎性细胞因子的增加;MyD88 非依赖性途径指的是受体诱导干扰素激活 NF- κ B 和干扰素调节因子,导致干扰素的产生和 NF- κ B 活化的延迟。

3 Toll 样受体 4 信号转导通路在酒精性肝损伤中的作用

酒精性肝病的发病机制十分复杂,至今仍不够明晰,而 TLR4 信号通路的激活是酒精性肝损伤发生的一项重要机制^[16]。现有的研究发现,TLR4 表达缺失可使小鼠酒精性脂肪性肝炎的发生减弱^[17];且在大鼠实验研究中可见,在降低 TLR4 的表达后,实验组肝损伤的程度明显低于模型组,表明减少

TLR4 表达,抑制 TLR4 信号通路激活能够减轻酒精性肝损伤的程度^[18]。此外,刘馨宇^[19]通过酒精性肝损伤小鼠动物模型研究发现,通过调控 MyD88-NF- κ B 经典通路,可降低炎症反应的发生,从而对酒精性肝损伤的小鼠起到保护作用。而 Hritz 等^[15]发现,MyD88 非依赖途径的激活也可导致 NF- κ B 的激活,释放出大量的炎症因子,加重肝损伤的程度。接下来,本文将围绕 TLR4 信号通路上的关键靶标,详细综述 TLR4 信号转导通路在酒精性肝损伤中的作用。

3.1 内毒素

内毒素是革兰阴性细菌细胞壁外膜上的一种脂多糖和微量蛋白质的复合物。LPS 是其活性成分,本身对机体存在毒性,它是在细菌死亡或者溶解时,从细胞中释放出来的毒素,是革兰阴性细菌细胞壁的一种成分^[20]。急性和慢性饮酒均可引起革兰氏阴性菌易位和内毒素分泌,触发肝内 TLR4 依赖的信号级联反应的激活,并诱导促炎细胞因子包括 IL-6 及 TNF- α 的合成和释放引起炎症反应。LPS 是 TLR4 的主要配体,长期饮酒后,酒精进入体内损伤小肠黏膜,使肠道黏膜的通透性增加,肠道屏障功能受损,不能完全的清除过量的内毒素而使其进入体循环,导致血液中的 LPS 升高^[21]。在 LPS 刺激下,一些促炎细胞因子和趋化因子会直接激活肝星状细胞,使得一些炎症因子释放,加重肝损伤。Lambert 等^[22]在对大鼠喂食酒精后进行 LPS 灌胃,结果发现乙醇能够改变肠黏膜对内毒素的通透性,促进 LPS 从肠道易位至肝。还有研究表明在酒精引起的大鼠肝损伤模型中,使用抗生素多粘菌素 B 能够阻止内毒素激活 Toll 样受体,从而缓解酒精性肝病的发展进程。

3.2 LPS 受体复合物

TLR4 是 LPS 识别受体复合物的主要组成部分,LPS 在与 CD14 结合的过程中,募集 CD14 和 MD-2 等 LPS 受体分子,以及 LPS 结合蛋白(LBP),形成 LPS 受体复合物。其中,CD14 是一种以可溶性形式存在的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白,CD14 促进 LPS 向 TLR4/MD2 受体复合物的转移,并调节 LPS 的识别^[23]。CD14 可以由肝细胞合成和分泌,与肝清除内毒素功能有关。在 ALD 中,如果缺乏 CD14,则不能诱导 LPS 信号的传导,从而保护小鼠免受酒精所致的肝损伤^[24]。有研究发现,慢性酒精喂养可提高 MyD88 敲除小鼠 TLR4 共受体 CD14 和

MD2 的 mRNA 水平,而 TLR4 敲除小鼠与对照组相比无明显升高,肝损伤减弱^[25]。而 MD2 是一种可溶性蛋白,与 TLR4 非共价结合,在没有 TLR 的情况下,与 LPS 直接结合形成复合物。LBP 是一种可溶性穿梭蛋白,直接结合 LPS,促进 LPS 与 CD14 的结合。虽然没有证据表明 TLR4 可以直接与 LPS 结合,但 TLR4 可以增强 LPS 与 MD2 的结合^[26]。同时,TLR4 又可以特异性的识别 LPS,触发 TLR4 信号,激活 MyD88 依赖性途径。LPS 在引起 NF- κ B 活化的过程中要与 CD14 等结合,形成 LPS 受体复合物,当 LPS 的信号作用于 TLR4 时,TLR4 的胞浆内段与一个适配体蛋白 MyD88 相结合,激活 NF- κ B,从而引发下游炎症反应。

此外,动物研究中发现,在使用雌激素治疗的大鼠中,Kupffer 细胞上 CD14 的表达和 Kupffer 细胞对 LPS 的内毒素敏感性明显升高,缺乏 TLR4、CD14 和 LBP 的小鼠对酒精所致的肝损伤具有抗药性^[23]。同时能够降低 Kupffer 细胞的吞噬和解毒能力,进一步对肝造成损害还有 TNF- α 的增加,它会导致细胞因子不平衡并引起免疫功能的紊乱。同时作为炎症介质,TNF- α 还可通过正反馈的形式刺激 Kupffer 细胞释放更多的细胞因子如 PDGF、TGF- β 等,进一步加重酒精性肝病^[27]。

3.3 MyD88

髓样分化蛋白 88 依赖性(由 MyD88 介导)途径,即 LPS-TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路,主要介导早期的 NF- κ B 活化,启动炎症介质基因的转录,致使促炎细胞因子、趋化因子、黏附分子的分泌、释放,引发炎症反应,导致肝损伤,而该信号途径的激活又主要定位于 Kupffer 细胞,它们在肝组织的病变过程中发挥着重要的作用^[28]。Kupffer 细胞既能清除内毒素,又可被内毒素激活,从多途径对肝造成炎症损害。LPS 可与 Kupffer 细胞表面的 TLR4 结合,通过 TLR4 介导的 MyD88 依赖性途径,激活 NF- κ B 信号通路,引起致炎因子的合成和释放引起炎症反应,从而对肝造成不可逆转的损害^[29]。在确定饮酒对 MyD88 有影响后,Wagnerberger 等^[23]根据多项动物研究的结果,发现啮齿动物与人类相似,雌性啮齿动物更容易患慢性酒精引起的肝疾病,且 MyD88 的表达在雌性酒精干预的小鼠肝中显著升高。

3.4 TRIF

MyD88 依赖途径是以一种更直接、更剧烈的方

式进行表达,而 MyD88 非依赖途径则以一种延迟的方式在一定程度上发挥作用。MyD88 非依赖性途径主要负责介导后期的 NF- κ B 活化和激活干扰素调节因子,促使产生 IFN 的表达,促进 IFN 诱导基因的表达。在 MyD88 非依赖的信号通路中,LPS 刺激 MyD88 缺陷的巨噬细胞表达干扰素诱导蛋白,表达干扰素诱导基因需要依赖 TLR4,但不依赖 MyD88,激活 MyD88 非依赖途径后导致晚期 NF- κ B 的活化,释放出大量的炎症因子,造成肝的损伤^[30]。在 Kupffer 细胞中,TLR4 介导的 MyD88 非依赖信号通路的激活可能导致酒精性脂肪性肝炎,而肝星状细胞中 TLR4 信号通路的激活则促进了肝纤维化。在 TLR4 复合物中加入 TRIF 适配器后,启动 MyD88 非依赖性通路,激活 I κ K/TAK1 激酶和 IRF-3 磷酸化,并激活 NF- κ B。磷酸化的 IRF-3 形成一个复合物并转运到细胞核,随后激活干扰素- α 和 β 以及其他干扰素诱导基因的转录。而阻断与 MyD88 无关的信号分子 TRIF 则可消除酒精引起的脂肪性肝炎,提示 MyD88 非依赖性途径参与了 TLR4 介导的酒精性肝损伤^[31]。进一步的研究表明,TRIF/IRF-3 在酒精诱导的 Kupffer 细胞/巨噬细胞中 TNF- α 基因的活化中起着重要作用,从而引起酒精性肝损伤。TLR4 在酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝发展中的关键作用已在动物模型中得到了充分的证实^[32]。Hritz 等^[15]的动物实验也发现,MyD88 非依赖途径可在 ALD 的发病中起重要作用。此外,TLR4 诱导的 MyD88 非依赖性信号可激活 I κ K ϵ /NF- κ B、IRF-3 和 IFN。TRIF 调控的 IRF3 与肿瘤坏死因子基因启动子区结合,并上调了慢性酒精诱导的巨噬细胞的转录,从而导致酒精所致的脂肪变性。

3.5 NF- κ B

核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种在核细胞基因转录过程中起到重要作用的调控因子,广泛存在于真核细胞中,是由 NF- κ B/Rel 家族蛋白组成的同源或异源二聚体蛋白,有 p65 和 p50 两个亚基。正常生理情况下,未活化的 NF- κ B 与抑制蛋白(I κ B)结合,以复合物的形式存在于胞浆中。当受到外界病理性刺激时,I κ B 经 I κ B 激酶磷酸化后与 NF- κ B 解离,NF- κ B 被活化并转位进入细胞核,结合免疫炎症相关靶基因上特异的 κ B 结合位点,启动炎症介质基因的转录,致使促炎细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)、趋化因子(如 MCP-1、MIP-1 等)、白细胞黏附分子(如 ICAM-1、

VCAM-1 等)、促纤维化因子(TGF- β 1、PDGF 等)的分泌、释放,引发炎症反应,导致肝损伤^[33]。

当 TLR4 胞内段与 MyD88 结合启动 LPS 信号转导通路,最终引起 NF- κ B 的活化,激活的 NF- κ B 与抑制蛋白(I κ B)脱离移位并进入细胞核,结合免疫炎症相关靶基因上特异的 κ B 结合位点,启动炎症介质基因的转录,致使促炎细胞因子、趋化因子及黏附分子的分泌、释放,引发炎症反应,导致肝损伤。

通过本文分析可知,抑制 TLR4 信号通路能够有效的改善酒精性肝损伤。因此,探索是否可以通过阻断 Toll 样受体 4 信号转导通路的方法来防治酒精性肝损伤的发生发展,研发新型、安全、高效的阻断或抑制 TLR4 信号通路上各个环节的药物,有望成为今后预防或改善酒精性肝损伤研究的着眼点。

参考文献:

- [1] 欧阳香,程虹毓,胡伟琼,等. 黄酮类化合物抗酒精性肝损伤作用及机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9): 1200-1205.
- [2] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world [J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151-171.
- [3] Teng L, Zu Q, Li G, et al. Herbal medicines: challenges in the modern world. Part 3. China and Japan [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2016, 9(9): 1125-1233.
- [4] 延华,张粉利,高艳琼,等. 饮酒与酒精性肝病流行病学调查研究[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(7): 917-918, 920.
- [5] Chang B, Li B, Huang A, et al. Changes of four common non-infectious liver diseases for the hospitalized patients in Beijing 302 hospital from 2002 to 2013 [J]. Alcohol, 2016, 54: 61-65.
- [6] Tang YL, Xiang XJ, Wang XY, et al. Alcohol and alcohol-related harm in China: policy changes needed [J]. Bull World Health Organ, 2013, 91(4): 270-276.
- [7] 高雪霏. 近 25 年国内外肝硬化患者中酒精病因构成比变化特点 Meta 分析 [D]. 山西: 山西医科大学, 2016.
- [8] Xu J, Murphy SL, Kochanek KD, et al. Deaths: Final data for 2016 [J]. Natl Vital Stat Rep, 2018, 67(5): 1-76.
- [9] Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease [J]. Clin Liver Dis, 2012, 16(4): 659-666.
- [10] Sahlman P, Nissinen M, Pukkala E, et al. Incidence, survival and cause-specific mortality in alcoholic liver disease: a population-based cohort study [J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51(8): 961-966.
- [11] 黄蓉,倪加加,高毅. 肠道菌群-脂多糖-Toll 样受体 4 轴与肝细胞癌的关系 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(6): 1325-1328.
- [12] El-Kashef DH, Serrya MS. Sitagliptin ameliorates thioacetamide-

- induced acute liver injury via modulating TLR4/NF- κ B signaling pathway in mice [J]. *Life Sciences*, 2019, 228: 266–273.
- [13] Tanaka T, Legat A, Adam E, et al. DiC14-amidine cationic liposomes stimulate myeloid dendritic cells through Toll-like receptor 4 [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(5): 1351–1357.
- [14] 伍振辉, 孟娴, 胡佳伟, 等. TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路与肝炎-肝纤维化-肝癌轴相关性研究进展 [J]. *国际药理学研究杂志*, 2017, 44(5): 396–401.
- [15] Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88 [J]. *Hepatology*, 2008, 48(4): 1224–1231.
- [16] 常志尚, 刘颖, 苏爱, 等. 海兔素对酒精性肝损伤大鼠肝脏保护作用及机制 [J]. *食品科学*, 2019, 41(7): 131–139.
- [17] González-Guerrero C, Cannata-Ortiz P, Guerri C, et al. TLR4-mediated inflammation is a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(4): 1925–1939.
- [18] 库尔班江·麦提敏, 艾力·艾尔肯, 蒋志惠, 等. 刺糖对酒精性肝病 TNF- α 和 TLR4 表达及病理变化的影响 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(6): 29–32.
- [19] 刘馨宇. 蒲公英甾醇对小鼠酒精性和免疫性肝损伤保护作用及机制研究 [D]. 吉林: 延边大学, 2018.
- [20] 苏暄, 徐有青. 酒精性肝病国内外最新防治进展 [J]. *中国医药科学*, 2015, 5(6): 1–4.
- [21] 周俊英, 姚树坤, 赵彩彦, 等. Toll 样受体 4 及细胞因子在酒精性肝病发病机理中的作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(8): 749–751.
- [22] Lambert JC, Zhou Z, Wang L, et al. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305(3): 880–886.
- [23] Wagnerberger S, Fiederlein L, Kanuri G. Sex-specific differences in the development of acute alcohol-induced liver steatosis in mice [J]. *Alcohol Alcohol*, 2013, 48(8): 648–656.
- [24] Rishi P, Arora S, Kaur UJ, et al. Better management of alcohol liver disease using a ‘Microstructured Synbox’ system comprising *L. plantarum* and EGCG [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0168459.
- [25] Duparc T, Plovier H, Marrachelli VG, et al. Hepatocyte MyD88 affects bile acids, gut microbiota and metabolome contributing to regulate glucose and lipid metabolism [J]. *Gut*, 2017, 66(4): 620–632.
- [26] 陈维维, 张小莉. 熊果酸调控细胞因子法治疗炎症疾病的临床观察 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2019, 17(1): 141–143.
- [27] 伍振辉, 孟娴, 胡佳伟, 等. TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路与肝炎-肝纤维化-肝癌轴相关性研究进展 [J]. *国际药理学研究杂志*, 2017, 44(5): 396–401.
- [28] Jia L, Chang X, Qian S, et al. Hepatocyte toll-like receptor 4 deficiency protects against alcohol-induced fatty liver disease [J]. *Mol Metab*, 2018, 14: 121–129.
- [29] 肖达民, 李丹青, 吴艳华. 酒精性肝病的中医临床研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(1): 118–122.
- [30] 陈洁, 姜虹. TLR4 信号通路与炎症反应 [J]. *医学综述*, 2009, 15(19): 2902–2904.
- [31] Roh YS, Seki E. Toll-like receptors in alcoholic liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and carcinogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(1): 38–42.
- [32] Zhao XJ, Dong Q, Bindas J, et al. TRIF and IRF-3 binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol [J]. *Immunol*, 2008, 181(5): 3049–3056.
- [33] Chung MY, Mah E, Masterjohn C, et al. Green tea lowers hepatic COX-2 and prostaglandin E2 in rats with dietary fat-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Med Food*, 2015, 18(6): 648–655.

[收稿日期]2020-11-04

邵思迈,史洺,余姊阳,等. 阿尔茨海默病中的 β 淀粉样肽与氧化应激 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 131-135.

Shao SM, Shi M, Yu ZY, et al. Amyloid- β protein and oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 131-135.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.020

阿尔茨海默病中的 β 淀粉样肽与氧化应激

邵思迈¹, 史 洺¹, 余姊阳¹, 原 野², 游言文¹, 郝 莉¹, 张紫娟¹, 张振强^{2*}

(1.河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

【摘要】 氧化应激(oxidative stress)是影响衰老和神经系统疾病的重要因素,在多种神经退行性疾病发生发展过程中起重要作用。老年斑的主要成分是 β 淀粉样蛋白(amyloid-beta protein, A β),它在脑中的异常沉积是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病的关键因素。研究表明, A β 沉积引发的氧化应激会诱导认知记忆相关脑区的神经元丢失、死亡,最终引起 AD 病理的发生与发展。本文重点论述 AD 发生发展中淀粉样肽毒性产生的机制,大分子的氧化过程及淀粉样肽与氧化应激相互影响的过程,旨在阐明 AD 发生发展过程中淀粉样肽与氧化应激的关系,为促进 AD 抗氧化剂研究提供有力的理论支持和研究思路。

【关键词】 阿尔茨海默病; 淀粉样肽; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0131-05

Amyloid- β protein and oxidative stress in Alzheimer's disease

SHAO Simai¹, SHI Ming¹, YU Ziyang¹, YUAN Ye², YOU Yanwen¹, HAO Li¹, ZHANG Zijuan¹, ZHANG Zhenqiang^{2*}

(1. School of Basic Medical Science, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. College of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Oxidative stress is an major factor that affects aging and neurological diseases, which plays an crucial role in the development and progression of multiple neurodegenerative diseases. Amyloid-beta protein (A β) is a major component of senile plaques, and its aggregation and abnormal deposition are major contributors to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Studies have shown that oxidative stress triggered by A β deposition induces neuronal loss, cell death in cognitive memory-related brain regions, and finally causes the occurrence and development of AD pathology. This article focuses on the mechanism of toxic production of amyloid peptide in the occurrence and development of AD, the oxidation process of macromolecules and the process of the interaction between amyloid peptide and oxidative stress to clarify the relationship between amyloid peptide and oxidative stress in the occurrence and development of AD. This review provides strong theoretical support and research directions to promote studies on antioxidants in AD.

【Keywords】 Alzheimer's disease; Amyloid peptide; Oxidative stress

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的两个典型病理特征分别是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的水解产物 β 淀粉样肽

(amyloid-beta protein, A β)组成的胞外老年斑(senile plaque, SP)和微管稳定蛋白质(Tau)病理性磷酸化改变组成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle,

【基金项目】 中原千人计划-科技创新领军人才项目(204200510022); 河南省科技攻关项目(202102310078, 172102310286, 212102310828); 河南省高校重点科研项目(19A310012)。

【作者简介】 邵思迈(1994—), 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: 785854243@qq.com

【通信作者】 张振强(1971—), 医学博士, 教授, 研究生导师, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。

E-mail: zhang_zhenqiang@126.com

NFT)^[1]。越来越多来自遗传代谢、体内成像和生化研究的证据表明,寡聚、可扩散的 A β 肽组合体的累积是 AD 发生发展过程中的早期事件,甚至是启动病理级联反应的关键^[2]。

当氧化还原平衡被打破,过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)在脑内产生、蓄积,使脑细胞膜系统的蛋白、脂质和 DNA 等大分子发生氧化,即氧化应激(oxidative stress, OS)。研究表明 A β 淀粉样聚集会使线粒体氧化还原活性降低,引发 ROS 累积^[3]。毒性 A β 诱导的受损线粒体能通过触发 N-甲基-D-天冬氨酸受体依赖的 Ca²⁺ 流,导致大量 ROS 的产生,而 ROS 增加引起的氧化应激和许多抗氧化酶系统功能损伤与 AD 发展有着重要联系^[4]。此外,氧化应激会进入恶性循环,因为氧化产物 ROS 会造成生物大分子的破坏,进一步导致更高水平的 ROS 积累。故下文重点论述了 AD 中毒性 A β 的产生机制,大分子氧化及 A β 诱导氧化应激的过程,希望阐明 AD 发生发展过程中淀粉样肽与氧化应激的关系,希望对今后阿尔茨海默病抗氧化剂靶向研究有所帮助。

1 A β 产生和神经毒性

A β 是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)酶切产生的肽片段,也是 AD 患者脑组织内老年斑的主要成分。淀粉样蛋白级联学说认为, A β 沉积不仅会形成老年斑,而且沉积后纤维化且有神经毒性的 A β 是 AD 产生的重要原因^[5]。

APP 是一种特别存在于中枢神经系统(central nervous system, CNS)中的大分子跨膜糖蛋白,其表达可因氧化应激而增强。在 APP 结构中存在多种特异性的水解位点, β/γ 位点的裂解酶切可产生有神经毒性的、具有 40 或 42 个氨基酸的肽段: A $\beta_{1-40/42}$ (A $\beta_{40}/A\beta_{42}$)^[6], 而 γ -酶切位点的水解产物含有完整 A β 序列,可产生 A β_{1-42} ^[7]。APP 水解的发生主要通过 A β 生成途径与非 A β 生成途径^[8]。其中 A β 生成途径是一个连续两步的蛋白水解步骤:首先由 β -位点 APP 裂解酶 1(BACE1)通过切割 APP 产生含有 99 个氨基酸残基的羧基末端片段(CTF- β),再经 γ -分泌酶作用产生由 39~43 个氨基酸组成的毒性 A β 和 CTF- γ ^[9]。该途径的主要分泌产物为 40-氨基酸形式的 A β (A β_{1-40})和羧基端含有两个残基的次要 42-氨基酸形式,即 A β_{1-42} ,而后者也被认为是阿尔茨海默病发病的起始分子^[10]。

A β_{1-42} 二聚体是 A β 蛋白寡聚体中最小的聚合单位,也是最小的毒性单位。A β_{1-42} 在磷酸盐缓冲液中稀释后能迅速形成纤维,而 A β_{1-40} 孵育 48 h 后才能形成纤维且不能形成杂乱肽(杂乱肽即乱序重排肽,是将自然肽氨基酸序列打乱重排产生的新肽,其氨基酸组成与自然肽相同但序列不同,是缺陷产物的一种)^[11-12],所以 A β_{1-42} 比 A β_{1-40} 更易聚集,沉积时间也更早、更稳定。在单体和纤维结构的直接激发下,可溶性 β -构象诱导神经元损伤的研究结果表明只有寡聚体物会对神经元有损伤。也有研究表明氧化应激不仅会引发神经毒性,而且会增强 A β 的寡聚化程度^[13]。螺旋 A β_{1-42} 的长度更长、偶极矩更大,所以与 A β_{1-40} 相比具有更高的螺旋稳定性。高稳定性为自由基诱导脂质过氧化提供了更多时间,也为 A β_{1-42} 是肽最重要的氧化应激位点的观点提供了证据^[14]。

2 A β 与生物大分子过氧化相关

除病理状态下脑部出现的神经原纤维增粗双螺旋缠绕扭曲状态,即神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)外,AD 患者脑中氧化还原平衡状态也会发生改变^[15]。ROS 是氧被部分还原的衍生物,包括氧自由基及其歧化产物^[16]。神经元细胞新陈代谢活跃,在代谢过程中的耗氧量约占人体总量的四分之一,其含有的抗氧化分子水平也更低,所以神经元细胞受 ROS 超负荷的影响最大^[17-18]。ROS 会随着时间的推移逐步累积,并导致过度暴露于 ROS 及累积效应的细胞受损退化^[18],这也是氧化应激诱发神经退行性疾病假说的依据。研究表明神经元易受细胞衰老微环境影响, A β 沉积可通过产生过量的 ROS 来诱导细胞老化^[19]。呼吸爆发也称氧化爆发,是免疫系统的一种氧依赖性杀菌途径,这一途径会生成大量自由基,进一步加剧 A β 的沉积,形成恶性循环。在 ROS 诱导氧化应激的过程中,有神经毒性的 ROS 会攻击蛋白质、核酸和脂质膜,使细胞的功能和完整性遭到破坏。这一过程也使氧自由基大量形成,并与邻近脂肪酸链的氢分子不断结合形成脂氢过氧化物,使脂质过氧化过程不断循环。所以氧化应激多表现为蛋白质过氧化、脂质过氧化反应产物和神经毒性物质(如 A β_{1-42})的形成及核酸的过氧化修饰^[20]。A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 水平的升高也与海马和皮质中蛋白质、脂质和核酸的氧化产物水平增加有关^[21]。

2.1 A β 诱导的蛋白质过氧化

AD 中的蛋白质氧化主要可分为羰基化和硝基化。在 APP / PS1 双转基因小鼠实验中,培养的原代神经元对外源 A β_{1-42} 诱导的氧化应激与亚硝化应激的敏感性增加^[22]。在早发性 AD 病人额叶皮质中观察到蛋白质羰基水平增加引起了酶的诱导反应,同时脂质过氧化物如丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 等水平升高^[23]。另一项实验中检测到 AD 脑中蛋白质硝基化、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 水平均显著增加,这两者的一致上调表明硝基化在 AD 发生发展中起作用^[23]。

2.2 A β 诱导的脂质过氧化

过度的脂质过氧化是大多数神经退行性疾病的标志。脂质过氧化物 (lipid peroxide, LPO) 是不饱和脂肪酸与 ROS 结合的产物,会通过非酶解作用产生有强毒性的 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE)。用与 AD 患者脑组织类似浓度的 4-HNE 诱导神经元观察到神经元内的 A β 明显增加 2~6 倍^[24]。胚胎成纤维细胞被过氧化氢诱导可引起细胞中 4-HNE 水平增加, γ -分泌酶活性上调,从而加剧 APP 的裂解。过氧化的低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) 能使 A β 被清除能力下降,导致 A β 聚集。而与此结论一致, 4-HNE 绑定跨膜的 LRP1 后, AD 患者脑中 A β 含量在海马区显著增加^[25]。

2.3 A β 诱导的核酸 (DNA 和 RNA) 过氧化

在 AD 发病所涉及的机制中,氧化应激反应造成的细胞成分的破坏是关键因素。核酸的氧化标记物为定位在 A β 聚集形成的 SP 和 NFT 上的 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 和 8-羟基鸟苷 (8-hydroxy-guanosine, 8-OHG)。8-OHG 在早发性 AD 病人海马和额叶皮层中表达的增加证实了核酸过氧化与 A β 聚集相关^[26]。有临床实验采用超高效液相色谱-串联质谱法测定了 80 例患者 DNA 的氧化产物,其中 8-OHdG 和 8-OHdG/2dG 的比值在 AD 和健康者间的差异有统计学意义,可推测 DNA 氧化是 AD 的早期分子途径^[27]。RNA 氧化,尤其是额叶皮质的 mRNA 氧化也会在 AD 中发生^[28]。同时 Nunomura 等^[29] 也提出,尽管神经元 RNA 氧化基本上是与年龄相关的现象,但 RNA 损伤与 AD 前驱阶段认知障碍的发作明显相关。

3 A β 诱导氧化应激

A β 是 AD 发生发展中神经元损伤与氧化应激之间的桥梁。桑德斯-布朗衰老研究中心发现:在 AD 中,富含 A β_{1-42} 的脑区氧化应激和大分子过氧化水平升高,而在 A β_{1-42} 较少的脑区则相反^[30]。A β 会导致蛋白质被氧化修饰、功能降低并使其发挥作用的关键生化和代谢途径受损:包括葡萄糖代谢途径、mTOR 激活途径、蛋白质平衡网络和蛋白质磷酸化等^[30]。在 AD 发展过程中,APP 产生 A β 时会产生大量自由基;A β 也可以直接诱导神经元产生自由基;氧化应激诱导神经元发生脂质过氧化,并由它们的降解产物进一步氧化修饰亚细胞结构,影响神经元的功能和细胞膜的结构完整性,导致 AD 一系列病理变化的产生^[31]。关于 A β 的硫磺素染色实验也表明,在 AD 早期即 9 周龄时,5 $\times$ FAD 小鼠脑内已出现 A β 沉积阳性结果并伴有工作记忆的下降,提示淀粉样斑块在形成初期即已导致认知功能损伤^[32]。Murakami 等^[33] 的实验证明,氧化应激会加速 AD 转基因小鼠 A β 寡聚体的形成和记忆缺失,而 A β_{42} 突变体能诱导胞内 ROS 大量生成并进一步对神经元产生细胞毒性。在 Li 等^[1] 研究中发现, E22P-A β_{42} 促进了细胞内 ROS 的生成,说明毒性 A β_{42} 的形成对细胞内 ROS 产生起关键作用,而且 E22P-A β_{42} 比 Wt-A β_{42} 更快形成了聚集物的毒性中间体,表明胞浆内自由基过多可直接导致 A β_{42} 的寡聚。连续两周对大鼠注射 A β_{1-42} ,会使其脑内海马、皮质等部位的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽等抗氧化物质生成减少,由此引起大鼠学习能力与记忆功能障碍,表明 A β_{1-42} 能损伤体内抗氧化系统^[34]。

另一方面,A β 同时在线粒体中起作用。França 等^[35] 的实验分析了氧化应激是淀粉样蛋白级联反应的原因还是后果,以及抗氧化防御系统在这一过程中的作用。体外细胞研究结果表明,A β 的存在提高了细胞内氧化水平,诱导了过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和乌头酸酶等的活性。A β 还改变了耗氧量和复合体 III 和 IV 的活性,表明 A β 的毒性机制是通过增加线粒体内 ROS 的产生而诱导氧化应激的。在 A β 高表达期间,线粒体中的 ROS 浓度更高,以维持细胞器内氧化还原平衡,而这种防御系统正是淀粉样蛋白 A β 表达过程中维持线粒体完整性的基础。

在无外界影响的条件下,脑内 A β 沉积是不可

逆的过程。但最新研究发现,有靶向的抗氧化药物可能实现这一过程的逆转,说明氧自由基的代谢过程是一个动态调节过程。

4 抗氧化治疗途径与展望

神经退行性疾病的致病因素大都涉及到氧化应激,目前淀粉样 β 蛋白的毒性和氧化应激是中心假说之一。抗氧化剂是发挥延迟或抑制底物氧化作用的内源或外源性分子,有清除 ROS、抑制 ROS 生成和内源性抗氧化剂的再生等多种机制^[36]。有证据表明抗氧化剂和自由基清除剂可通过抵抗 $A\beta$ 诱导的氧化应激和体内外脂质过氧化来保护神经元^[37]。核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (nuclear factor erythroid-2-related factor2/heme oxygenase 1, Nrf2/HO-1) 信号通路是一条针对应激环境的多脏器保护通路,该通路通过调控抗氧化剂表达水平及表观遗传发挥抗氧化应激作用,可将内源性氧化应激拒于机体外,延缓疾病进展^[38]。

NXPZ-2 是一种直接抑制 Kelchlike ECH 相关蛋白 1 (Keap1)-Nrf2 相互作用的化合物,用 NXPZ-2 处理注射 $A\beta$ 寡聚体建立的小鼠模型,小鼠全细胞裂解产物检测中 Nrf2 上调、核移位增加、靶向抗氧化酶 HO-1 和 NQO-1 增加,这表明 NXPZ-2 可能是一种很有前途的 AD 治疗剂,并支持 Keap1-Nrf2 相互作用作为 AD 中 Nrf2 重新激活的有效靶点^[39]。p53 凋亡刺激蛋白抑制因子 (iASPP) 的减少与 APP/PS1 转基因小鼠脑组织对氧化应激的易感性有关。抗氧化剂紫丁香素的处理导致 iASPP 上调, iASPP 与 Keap1 的相互作用增加,其介导的 Nrf2 核转位可通过 iASPP/Nrf2 轴促进 Nrf2 下游基因的激活,恢复细胞的氧化还原平衡^[40]。

总之,氧化应激反应与 AD、 $A\beta$ 沉积之间有着密切的关系。近年来的诸多实验结论均可表明:具有清除活性氧和抑制氧化酶活性功能的物质都可以用来缓解因 $A\beta$ 毒性诱导的神经元细胞损伤。今后,对于氧化应激、 $A\beta$ 与 AD 之间的关系进行深层次的研究是非常必要的,不论是对阐明阿尔茨海默病发病机理,还是对寻找预防策略及治疗方案都有着非常重要的意义。

参考文献:

[1] Li S, Jin M, Liu L, et al. Decoding the synaptic dysfunction of bioactive human AD brain soluble $A\beta$ to inspire novel therapeutic avenues for Alzheimer's disease [J]. Acta Neuropathol

Commun, 2018, 6(1): 121.

- [2] Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, et al. Amyloid β oligomers ($A\beta$ Os) in Alzheimer's disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2018, 125: 177-191.
- [3] Alafuzoff I, Pikkarainen M, Arzberger T, et al. Inter-laboratory comparison of neuropathological assessments of beta-amyloid protein; a study of the BrainNet Europe consortium [J]. Acta Neuropathol, 2008, 115(5): 533-546.
- [4] Sutherland GT, Chami B, Youssef P, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? [J]. Redox Rep, 2013, 18(4): 134-141.
- [5] Chen XQ, Mobley WC. Alzheimer disease pathogenesis: insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric $A\beta$ and Tau species [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 659.
- [6] Zhao G, Cui MZ, Mao G, et al. gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain [J]. J Biol Chem, 2005, 280(45): 37689-37697.
- [7] Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, et al. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90: 2092-2096.
- [8] Wolfe MS. Dysfunctional γ -secretase in familial Alzheimer's disease [J]. Neurochem Res, 2019, 44: 5-11.
- [9] O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease [J]. Annu Rev Neurosci, 2011, 34: 185-204.
- [10] Kukar T, Murphy MP, Eriksen JL, et al. Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production [J]. Nat Med, 2005, 11(5): 545-550.
- [11] Visconte C, Canino J, Vismara M, et al. Fibrillar amyloid peptides promote platelet aggregation through the coordinated action of ITAM-and ROS-dependent pathways [J]. J Thromb Haemost, 2020, 18(11): 3029-3042.
- [12] Shastri N. Cell biology. Peptides, scrambled and stitched [J]. Science, 2006, 313(5792): 1398-1399.
- [13] Forloni G, Artuso V, La Vitola P, et al. Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases [J]. Mov Disord, 2016, 31(6): 771-781.
- [14] Kanski J, Aksenova M, Schöneich C, et al. Substitution of isoleucine-31 by helical-breaking proline abolishes oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42) [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(11): 1205-1211.
- [15] 胡金凤. 老年斑、神经元纤维缠结与硫酸多糖 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(1): 12-16.
- [16] Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(12): 931-947.
- [17] Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. Redox Biol, 2018, 14: 450-464.

- [18] Kim HS, Kim YJ, Seo YR. An Overview of carcinogenic heavy metal; molecular toxicity mechanism and prevention [J]. J Cancer Prev, 2015, 20(4): 232–240.
- [19] Maciel-Barón LÁ, Moreno-Blas D, Morales-Rosales SL, et al. Cellular senescence, neurological function, and redox state [J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(18): 1704–1723.
- [20] 周阳, 严丽荣, 袁少飞, 等. 氧化应激与阿尔茨海默病 [J]. 生命科学研究, 2015, 19(3): 265–275.
- [21] Butterfield DA, Lauderback CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain; potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(11): 1050–1060.
- [22] Mohammad Abdul H, Sultana R, Keller JN, et al. Mutations in amyloid precursor protein and presenilin-1 genes increase the basal oxidative stress in murine neuronal cells and lead to increased sensitivity to oxidative stress mediated by amyloid beta-peptide (1–42), HO and kainic acid; implications for Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 2006, 96(5): 1322–1335.
- [23] Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Castro-Blanco S, et al. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2004, 15(2): 287–305.
- [24] Marinari UM, Nitti M, Pronzato MA, et al. Role of PKC-dependent pathways in HNE-induced cell protein transport and secretion [J]. Mol Aspects Med, 2003, 24(4–5): 205–211.
- [25] Tabaton M, Tamagno E. The molecular link between β - and γ -secretase activity on the amyloid β precursor protein [J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(17): 2211–2218.
- [26] Lovell MA, Markesbery WR. Oxidatively modified RNA in mild cognitive impairment [J]. Neurobiol Dis, 2008, 29(2): 169–175.
- [27] Peña-Bautista C, Tirlé T, López-Nogueras M, et al. oxidative damage of DNA as early marker of Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6136.
- [28] Shan X, Lin CL. Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2006, 27(5): 657–662.
- [29] Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, et al. The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2012, 71(3): 233–241.
- [30] Butterfield D, Boyd-kimball D. Oxidative stress, amyloid – β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 62(3): 1345–1367.
- [31] Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin [J]. Prog Neurobiol, 1998, 56(3): 359–384.
- [32] 张记春, 黄庚娣, 孟雪, 等. 阿尔茨海默病转基因小鼠极早期嗅觉工作记忆的损害特征 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 437–443.
- [33] Murakami K, Irie K, Ohigashi H, et al. Formation and stabilization model of the 42-mer Abeta radical; implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(43): 15168–15174.
- [34] Park SY, Park SJ, Park TG, et al. Schizandrin C exerts anti-neuroinflammatory effects by upregulating phase II detoxifying/antioxidant enzymes in microglia [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(2): 415–426.
- [35] França MB, Lima KC, Eleutherio EC. Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(6): 1442–1452.
- [36] Chassaing S, Collin F, Dorlet P, et al. Copper and heme-mediated abeta toxicity: redox chemistry, abeta oxidations and anti-ROS compounds [J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(22): 2573–2595.
- [37] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(1): 79–84.
- [38] Ahmed SM, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(2): 585–597.
- [39] Sun Y, Huang J, Chen Y, et al. Direct inhibition of Keap1–Nrf2 Protein-Protein interaction as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease [J]. Bioorg Chem, 2020, 103: 104172.
- [40] Wang CY, Zhang Q, Xun Z, et al. Increases of iASPP-Keap1 interaction mediated by syringin enhance synaptic plasticity and rescue cognitive impairments via stabilizing Nrf2 in Alzheimer's models [J]. Redox Biol, 2020, 36: 101672.

[收稿日期] 2020–12–07

袁群,毛欣,王能,等. 亚健康状态动物模型的构建与评价研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 136-142.

Yuan Q, Mao X, Wang N, et al. Research progress in the establishment and evaluation of sub-health state animal model [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 136-142.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.021

亚健康状态动物模型的构建与评价研究进展

袁群¹,毛欣¹,王能¹,胡海林¹,曹淼¹,何清湖^{1,2*}

(1.湖南中医药大学,长沙 410208;2.湖南医药学院,湖南 怀化 418000)

【摘要】 本文从理论依据、动物选择、造模应激源、造模时间、评价指标等方面对亚健康动物实验研究的现状及存在的问题进行了阐述,提出加强亚健康动物模型的理论依据及模型考评指标的研究,注重多指标的综合分析,努力筛选出理想的、成熟的、公认的亚健康动物模型。

【关键词】 亚健康;动物模型;评价指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0136-07

Research progress in the establishment and evaluation of sub-health state animal model

YUAN Qun¹, MAO Xin¹, WANG Neng¹, HU Hailin¹, CAO Miao¹, HE Qinghu^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Hunan University of Medicine, Huaihua 418000)

【Abstract】 In this paper, the theoretical basis, animal selection, modeling stress source, modeling time, and evaluation of indexes of sub-health animal models were summarized. Research on the theoretical basis and evaluation indexes of sub-health animal models is important and comprehensive analysis of multiple indexes should be conducted to identify ideal, mature, and recognized sub-health animal models.

【Keywords】 sub-health; animal experiment; evaluation index

“亚健康”这一概念最早由前苏联学者布赫曼(N.Berhman)提出,是指介于健康与疾病之间的一种低质状态。随着经济的发展、生活水平的提高以及各种压力的增加,亚健康已经成为困扰全球的一个社会问题^[1]。据世界卫生组织最新一项调查结果表明全球75%人处于亚健康状态,健康人群仅占5%^[2]。其实早在两千多年前,《黄帝内经》一书中就有提到“圣人不治已病治未病”,虽然中医学中的“未病”不等同亚健康,但是其包括现代医学所提出的“亚健康状态”^[3],且有大量的研究采用中医“治未病”的理论来指导亚健康的中医干预,并取得较

好的效果。随着对亚健康研究的深入,由于临床研究的局限性和伦理学的限制,动物实验为亚健康本质的研究开辟了新方向,但目前对于亚健康动物模型的构建尚无统一标准或推广模型。

1 亚健康状态动物模型构建的理论依据

大量的研究证实亚健康的发生发展与不良的生活习惯、心理因素刺激、精神紧张、环境污染、个性特征和遗传因素等有关。因此,目前亚健康动物模型构建的理论依据多建立在其发生发展的躯体、心理和环境等因素上。

【基金项目】 浙江寿仙谷医药有限公司横向课题(5001/0156);湖南中医药大学护理学一级学科开放基金(2020HLX07)。

【作者简介】 袁群(1983—),女,在读博士研究生,主要从事中医亚健康临床及动物实验研究。E-mail: 181584768@qq.com

【通信作者】 何清湖(1965—),男,教授,博士生导师,主要从事中医亚健康与中医药文化研究。E-mail: hqh19651111@163.com

中医学对亚健康认识也是不断在完善。有学者认为亚健康的易感因素主要是外感和内伤两种,其主要病因是脏腑阴阳气血失调、七情内伤、气机紊乱,其次是饮食不节、劳逸损伤所致^[4-5]。但也有学者对当今亚健康的成因归纳为①与中医体质密切相关,先天不足与后天过用;②情志内伤、肝失疏泄;③饮食不节、损伤脾胃④气虚、气郁。总之离不开中医传统的“三因学说”^[6]。有研究表明亚健康患者体质以气虚质、阳虚质、湿热质多见^[7]。疲劳、失眠、记忆力减退和情绪问题是亚健康主症,因此有研究者认为亚健康状态与心、肝两脏关系最为密切。“心主神明,主血脉”,各种因素所致心血耗伤均可使得血液不能充盈于心,心神失养,从而出现记忆力减退、失眠、心悸等不良症状;而“肝主筋”,为“罢极之本”,说明疲劳的产生是以肝为核心;另“肝主藏血”,而睡眠的质量取决于阴血的盈亏,因此失眠也与肝相关;“肝主疏泄”,具备调畅情志的作用,各种精神情志症状也与肝密切相关。

以上述中医理论为依据,目前中医多从体质、五脏(尤以心、肝)入手进行亚健康动物模型的研制。

2 亚健康状态动物模型类型

目前,亚健康状态的主症变化多样,且其分类方法也未统一,因此亚健康的动物模型也多种多样。有根据常见主症模拟躯体疲劳、心理焦虑、抑郁来建立躯体亚健康、心理亚健康动物模型,也有根据应激源的来源建立心理性、疲劳性及睡眠性亚健康动物模型,但以疲劳和心理亚健康动物模型最为常见。在中医学中则多见根据中医证型来进行亚健康的分类。黄风等^[8]的调查研究发现亚健康患者中医证型以肝郁气滞、心脾两虚、肝肾阴虚、肝郁脾虚、脾肾阳虚、肺肾气虚等证型多见,张建峰等^[9]的调查发现亚健康证型以气虚型、痰湿型、肝郁型居多。因此在中医亚健康动物模型的构建中常见根据中医证型来建立亚健康动物模型,其中以肾阳虚^[10-11]、脾气虚^[12]、肝郁证^[13-14]、湿困脾胃等^[15]证型多见。

3 亚健康状态模型建立的动物选择

目前,在亚健康动物实验中,研究者们多选用大鼠、小鼠来构建动物模型。一方面是因为鼠类与人的机能、代谢、结构和疾病特点相似,尤其是大鼠

的神经系统与人类相似,另一方面是低等哺乳动物如啮齿类动物易繁殖、易饲养,麻醉及手术操作简单,维护费用较低。

4 亚健康状态造模方法

亚健康状态的产生与长期反复的社会、心理应激密切相关,因此在亚健康动物模型构建中,应激源多是模拟人类生活中的各种不良生活方式、行为习惯、社会精神压力等,有单独采用躯体、心理应激源造模,也有采用躯体心理复合应激源造模。

4.1 心理应激造模

4.1.1 单因素刺激

束缚应激(wrap restraint stress, WRS)方法在心理亚健康及疲劳型亚健康模型构建中多见,可单独也可与其他方法联合使用。研究人员^[16-19]通过使用 WRS 限制大鼠活动用以模拟人类存在的心理上的限制性因素,也有通过 WRS 后联合悬尾实验观察大鼠为克服不正常体位而进行挣扎的状况,来探讨应激对大鼠记忆能力、学习能力等的影响,造模方法中多采用每天 1 次的干预频次,连续造模 21 d。

4.1.2 非躯体复合因素

是目前心理亚健康动物模型常用造模方法,通过模拟人类生活中存在的各种不良心理应激,如孤独、昼夜节律失调、饮食不节、工作生活事件的不确定感等,在造模中常采用孤养、空瓶应激、昼夜紊乱、饮食不节、旁观电击应激等多种形式,且全部造模刺激采用随机表来安排,以使其与人类生活中所遇到的各种不良应激环境更贴近,造出的模型更具有代表性^[20-21]。

4.2 躯体应激造模

4.2.1 过度运动

构建疲劳亚健康模型时多采用此方法,且常采取无负重强制游泳^[22]、跑台训练、强迫水中站立^[23]等方法。但在造模过程中运动量和运动时间尚无统一的标准或计算公式,有研究采用每日同一运动强度、运动时间的方式,也有采取逐渐增大运动量或延长运动时间的方式来造模^[24]。造模时间也不统一,有连续造模 2 周,也有先采用无负重游泳 2 周,再采取递增负荷游泳 4 周的方式。尚未见到不同造模时间或不同运动方式造出的疲劳亚健康模型是否存在差异或优劣性的报道。

4.2.2 睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)

该方法多见于睡眠障碍或疲劳型亚健康动物

模型构建,用以模拟人类在社会中因长期的睡眠不足所致亚健康状态。多采用持续照明和或改良水平台的方式^[25-27],采用水平台的原理在于,动物发生睡眠时其由于肌肉张力松弛机体处于失平衡状态则易掉入水中,大鼠只能爬上平台,这样反复多次从而达到 SD 的效果。大部分研究采取造模时间为 2 周,于造模结束后对大鼠采用鼠尾悬挂实验检测大鼠疲劳程度与体力状态,通过大鼠“绝望”时间、挣扎次数与静止时间等对模型进行评价。

4.2.3 饮食不节

饮食不节也是现在亚健康人群常常面临的一个问题,主要包括饮食不适度、饮食不合时宜、饮食无节律和饮食过杂。在亚健康动物模型构建中多模拟人类饮食时间的不规律、饥饱无常、高脂饮食等不良饮食习惯。王辉^[28]通过采取饮食不节的方法建立大鼠亚健康状态,实验通过给予不同类型饲料(全家颗粒饲料、普通饲料和高脂饲料)结合限时给食的方法,连续 6 d 完成造模,并对模型进行评价。

4.2.4 躯体复合因素刺激

在亚健康造模中常采取复合造模的方法,有研究者运用睡眠剥夺联合负重力竭游泳的方法来建立疲劳型亚健康模型,通过动态监测与评价最终确定每日睡眠剥夺 20 h 复合负重其体重 5% 力竭游泳的作用因素,连续 4 d 即造模成功^[29]。张玥莉等^[30]模拟现代人“起居无常、饮食失节”致生物钟紊乱现象,采用打破大鼠正常生活节律,给予大鼠长期 24 h/24 h 间歇 SD 联合饮食失节的方法造成亚健康状态,持续 10 周,进行亚健康动物模型的构建通过比较正常组与模型组大鼠行为学指标、血液学指标、心电图学差异,并观察模型可逆性来判断造模成功与否。杜旭等^[31]采取 WRS 结合游泳运动 21 d 来制备亚健康状态模型。复合因素刺激方式与现代人生活特点更为贴近,能更好的模拟人类的生存环境,用该类方法所研制出的动物模型更具代表性与说服力。

4.3 躯体兼心理复合因素

单因素造模法由于涉及因素单一而常出现模型症状不明显、效果不稳定、维持时间短等情况,具有一定的局限性。为了能更好的模拟人类亚健康的成因和症状,目前多采用躯体和心理应激源刺激相结合的复合造模法,且在中医证候相结合亚健康状态中常见。有选择性的结合强迫游泳、SD、夹尾

刺激、限制活动、饮食不节等躯体、心理压力的复合刺激来进行造模^[32-34],但对于每一种刺激给与方式、强度、持续时间、评判标准等尚未统一。这也说明亚健康动物模型标准化任重而道远。

4.4 中医分型

关于亚健康的研究中,中医多数采取分型来进行辩证治疗。现有针对亚健康中医证型进行造模,如肾阳虚、阴虚、脾气虚、心肾不交、肝郁证、湿困脾胃等,都体现中医辨证论治的特点,并且在具体的实验当中也充分运用了中医辩证治疗理念。

4.4.1 肾阳虚亚健康状态模型

付芸升^[11]通过给予大鼠灌服腺嘌呤(20 mL/(kg·d),浓度 1%),连续 10 d 来研制肾阳虚夜尿症大鼠模型,周海亮等^[35]通过给予雄性大鼠灌胃腺嘌呤(200 mg/(kg·d)),连续 21 d 来建立肾阳虚证不育模型。

4.4.2 阴虚亚健康状态模型

有研究通过给大鼠灌胃性味辛、热的附子(制乌头)、甘姜(根茎姜)和肉桂(肉桂)中药汤剂构建阴虚证亚健康状态^[36],吴柳花等^[37]根据“过劳伤阴”原理采用负荷递增游泳的方法建立阴虚内热模型,每天 1 次,每周 5 d,连续造模 8 周,游泳时间由每日 10 min 逐日增加至第 8 周的每日 180 min,水深 60 cm,水温 30℃ 来制备肾阴虚模型。

4.4.3 脾气虚与湿困脾胃亚健康状态模型

刘文俊等^[38]采取饮食不节加力竭游泳的方法构建大鼠脾气虚证模型,具体方法是 3 d 为一循环,先饱食 1 d,再禁食 2 d,自由饮水,每在 28℃~32℃ 水温中游泳至力竭,连续 15 d。冯玉华等^[12]通过采取措施使大鼠饥饱失常、饮食不节、负重游泳等法式使其疲劳过度联合夹尾刺激方法激惹大鼠造成情志失调复合因素的方法构建脾气虚慢性疲劳型亚健康大鼠模型。刘瑶等^[15]采用躯体联合心理的复合刺激进行亚健康湿困脾胃病证结合动物模型的构造,具体采取水中站立、饮食调控、被迫游泳与改造环境等方式模拟“情志不遂、饮食不节、饥饱失常、过劳耗气与久居湿地、外湿过盛”等具体措施。

4.4.4 心肾不交亚健康状态模型

赵鑫等^[39]采用 4℃ 冰水游泳、45℃ 热水游泳、潮湿垫料 24 h、无垫料、昼夜颠倒、夹尾、震动鼠笼、禁食和禁水,每天随机安排 1~2 种刺激,持续 14 d,避免大鼠对外界刺激产生适应性,之后采取大鼠腹腔注射浓度为对氯苯丙氨酸(PCPA)混悬液(浓度

45 g/L, 450 mg/kg), 每日 1 次, 连续 3 d, 黄运芳等^[40]直接采取对大鼠进行腹腔注射 PCPA 混悬液 (400 mg/(kg·d)), 连续 2 d 来进行模型心肾不交失眠模型的构建。

4.4.5 肝郁证亚健康状态模型

吴天浪等^[41]采用自治颈部枷锁套在大鼠脖子上, 同时加用自制的脚镣束缚其双后足, 以限制大鼠活动, 连续 21 d, 建成亚健康状态(肝郁证)模型; 马作峰等^[42]早在 2008 年就提出亚健康从肝治的观念, 并且采取运动、睡眠剥夺、应激等符合因素进行亚健康状态模型建立, 并对其进行了评价。

5 亚健康动物模型评价

动物实验研究中, 科学合理的评价是动物模型具有可重复性的基础。目前对于亚健康的定义、诊断和分类等尚未形成统一的标准, 那该如何来评价亚健康状态动物模型的优劣? 根据亚健康产生与各种应激密不可分, 慢性应激时, 机体内稳态处于失衡状态, 可以引起动物行为学的改变, 也可通过应激引起一系列的神经生化改变, 进而影响到情绪变化, 机体免疫力下降等。因此, 对于亚健康动物模型的评价虽无统一标准, 但大多通过行为学、免疫学、神经递质等方面来进行研究与判断。

5.1 亚健康动物模型行为学改变

现有的亚健康动物模型中大多从行为学方面对模型动物进行了评价, 包括动物毛发、体重、食欲、大便形态、活动量, 也有通过旷场实验、morris 水迷宫实验、穿梭主动回避实验等考察动物模型学习记忆能力和活动时间, 通过悬尾实验、游泳耐力实验等判断模型大鼠的绝望时间、活动耐力、情绪变化等^[32, 27]。围秀秀^[22]建立心理亚健康大鼠模型后通过糖水偏爱、高架十字迷宫、明暗箱、旷场等行为学实验结合模型大鼠体质量和脏器指数未发生明显变化进行模型评价。

5.2 实验检测指标及脑中神经递质的变化

5.2.1 血液生化及肝肾功能相关指标的变化

目前对于亚健康状态的诊断和评估方法有许多种, 量化诊断法是其中一种常规的检查方式, 即体液微观筛查技术, 就是对血液代谢性指标、心肌酶谱等生化指标进行检测, 由于亚健康状态的诱因众多, 如疲劳、不良生活方式、工作压力等不同因素诱导产生的亚健康状态的临床症状与实验室检测指标均有所不同。

王德军等^[43]探讨多因素、热水游泳、睡眠不足和 WRS 所致亚健康大鼠模型结果发现不同因素诱导的亚健康状态大鼠的血液生化、血气电解质指标均出现了不同程度上的改变, 因此判定血液生化和血气电解质指标能有效评估亚健康状态机体血液微环境的改变。睡眠剥夺亚健康大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 水平明显升高, 而超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平则明显降低, 同时血液 pH 值降低, 出现酸中毒表现, 动脉血氧分压 (arterial oxygen partial pressure, PaO₂) 和氧饱和度 (oxygen saturation, SaO₂%) 均明显低于正常组^[27]; 强制游泳建立的小鼠疲劳型亚健康模型检测发现血浆中总 SOD 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LD) 活性降低, 代谢积累物 MDA 及 BUN 含量增加, 保持同等运动强度一周后, 小鼠疲劳状态未得到恢复, 证明 2 周的强制游泳时间可以建立较为稳定的疲劳模型^[22]。Sachdeva 等^[44]通过强迫游泳 28 d 建立的疲劳性亚健康大鼠模型中发现模型组大鼠除行为上有明显改变外, 氧化亚硝化应激和促炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 (TNF- α) 都有所增强。WRS 所致大鼠亚健康状态模型中氧自由基方面模型大鼠血清中 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性明显降低, MDA、LD 含量明显升高, 提示亚健康状态下抗氧化能力下降^[13]。

5.2.2 免疫功能相关指标的变化

临床调查结果显示, 亚健康患者多以脾、肾虚弱者多见, 脾细胞抗体形成能力下降, 白细胞移动抑制指数升高, 体液和细胞免疫功能下降。徐孝平等^[45]采用不同应激源构建大鼠亚健康模型, 大鼠下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 轴反应性失衡, 因皮质醇过度释放, 从而导致内分泌的紊乱, 降低淋巴细胞的功能从而出现明显的机体免疫抑制现象。但不同的应激源所致的相关指标变化不一致, 艾秀峰等^[16]从免疫功能方面对 WRS 所致亚健康大鼠模型进行了评价, 结果显示与正常对照组比较, 模型组大鼠 T 淋巴细胞增殖能力、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 细胞活性, 白介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 和干扰素- γ (Interferon-gamma, IFN- γ) 含量及胸腺指数均显著

下降,提示束缚应激致亚健康状态大鼠模型的免疫功能下降;何清湖等^[46]研究发现肾阳虚雄性亚健康大鼠血清 IgG、IgA、IgM、大鼠脾、胸腺重量指数较正常对照组均有明显降低。在评价过程中生化指标存在一定的变化,尚未达到疾病诊断标准,符合亚健康定义。还有研究通过自制应激、强迫运动和拥挤嘈杂的环境持续 4 周建立亚健康大鼠模型,也是除采取行为实验外并对其尿代谢产物进行了检测与分析,结果显示亚健康模型大鼠除一些能力物质的代谢紊乱外,还检测到类固醇技术生物合成和鞘脂代谢的改变过,其中鞘氨醇和 21-羟基孕烯醇酮可能是疲劳性亚健康大鼠的关键生物标志物,表明亚健康状态下大鼠存在免疫功能低下和 HPA 轴低活性等特点^[47]。

5.2.3 脑中神经递质的变化

亚健康状态的实质是心身问题,目前普遍认为亚健康的主要原因为社会心理因素导致的心理应激,而中枢神经系统在心理应激过程中又起着非常重要的作用。有研究表明束缚应激所致亚健康状态模型大鼠脑组织中乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, TChE) 活性和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 含量明显升高^[17]。冯玉华等^[12]发现亚健康大鼠模型多巴胺 (dopamine, DA)、5-HT 出现先下降后升高的趋势。郝文丽等^[32]采用复合因素建立的亚健康小鼠模型下丘脑多巴胺含量及海马区谷氨酸受体 NR2A mRNA 表达水平均显著低于对照组,而 5-HT 含量明显高于对照组。王秀云等^[25]的研究亚健康状态下大鼠海马结构的一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性和神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 蛋白表达减少,损害学习记忆等脑认知能力。贾临超等^[48]也进一步证实亚健康状态大鼠大脑皮质诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 表达的阳性面积和总光密度与正常对照组比较显著增加,平均光密度值显著减少,且病理表达图显示模型对照组大鼠大脑皮质的 iNOS 阳性表达量明显增加,大量的皮层细胞的细胞浆内出现棕黄色阳性表达。孟彦等^[20]研究发现亚健康状态大鼠出现明显的疲劳状态,海马 CA3 区锥体细胞数量减少,且形态不规则,包膜不完整,核膜不清,细胞核变形固缩,原位末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 观测海马细胞凋亡情况,阳性细胞散布于整个海马组织。从

上述众多的研究发现,亚健康大鼠或小鼠模型其行为上的一些表现与其神经递质的变化密不可分,也进一步证实亚健康状态不仅对行为学上有改变,而且对与机体的免疫力、认知水平、抗氧化能力等都有影响,使机体处于一种低质状态。Yasui 等^[49]采取持慢性持续应力载荷刺激,将大鼠孤养在装满水的笼子里 (水深 1.5 cm),连续 6 d,来建立疲劳状态大鼠模型,结果发现,在造模第 2 天就观察到模型组大鼠腰椎背侧根神经节 (DRG) 神经元出现超过 50% 的 ATF3 阳性神经元,再后来在模型大鼠背角内侧可见大量小胶质聚集,且模型组大鼠比目鱼的肌电活动比对照组高 2~3 倍,这些结果都表明慢性本体感受器激活诱导神经元,沿序激活脊髓反射弧,神经元的激活进一步激活沿弧形的小胶质细胞,表明本体感受器诱导的小胶质细胞激活可能使启动关键因素,以及疲劳型患者异常疼痛的维持原因。

6 小结

目前亚健康动物模型的构建大多集中在中医证型相结合亚健康、疲劳型亚健康和心理亚健康模型,已有多个团队进行了亚健康造模的探讨,也得到了一定的认可,但仍为形成一个较为理想、成熟、公认的动物模型,造模应激源多种多样,造模时间长短不一,评价指标不统一、不典型,其实质在于人体本身是一个复杂的机体,且引起亚健康的原因又复杂多样,该从哪些方面去着手构建动物模型仍需不断研究探索。同时也需进一步挖掘与完善亚健康动物模型构建的理论依据。

参考文献:

- [1] 曲堂清. 亚健康状态与中医药治疗攻略 [J]. 亚太传统医药, 2006, 1: 14-17.
- [2] 谢雁鸣, 刘保延, 朴海垠, 等. 基于临床流行病学调查的亚健康人群一般特征的探析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(7): 612-616.
- [3] 任用朋, 华琼, 刘彦妍. 中医“治未病”思想在防治肾病中的应用 [J]. 陕西中医, 2019, 40(8): 1101-1104.
- [4] 孟华, 曹勇, 黄进. 亚健康与中医心身相关理论的关系 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(5): 159-160.
- [5] 马思佳, 刘佳其, 刘若彤, 等. 浅谈传统中医理论与亚健康状态的关系 [J]. 健康之路, 2017, 16(6): 228.
- [6] 朱方石, 王小宁. 基于古代文献对亚健康状态中医认识观的探讨 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 411-412.

- [7] 陈莉莉,尹林,李红,等.基于治未病健康管理平台鹰演DDFAO技术在亚健康诊断中的应用及亚健康中医证型分布规律[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(96):162-163.
- [8] 黄风,周亚平.725例亚健康患者中医证型临床初探[J].湖南中医杂志,2014,30(10):137-138.
- [9] 张建峰,许家伦,屠立平,等.1754例非疾病人群亚健康症状及中医证型分布特点研究[J].中国中西医结合杂志,2017,37(8):934-938.
- [10] 李天禹,何清湖,卢芳国,等.雄性“肾阳虚”亚健康大鼠模型的研究[J].湖南中医药大学学报,2011,31(1):22-24.
- [11] 符芸升.亚健康肾阳虚夜尿症大鼠模型的研究[D].遵义:遵义医科大学,2019.
- [12] 冯玉华,杨育同,王坤芳.脾气虚慢性疲劳型亚健康状态大鼠模型的构建及评估[J].山西中医学院学报,2015,16(3):21-23.
- [13] 王京京,孟宏,文娜,等.电针“四关”穴对慢性疲劳大鼠模型的行为学影响[J].针刺研究,2004,29(2):130-134.
- [14] 张科庄.亚健康状态(肝郁证)对SD大鼠精子、血清睾酮、间质细胞的影响[D].成都:成都中医药大学,2008.
- [15] 刘瑶,刘伟.藿香正气散对湿困脾胃型亚健康大鼠胃肠功能的影响[J].江苏中医药,2011,43(6):89-90.
- [16] 艾秀峰,冷晓霞,陈民利.束缚应激致亚健康状态大鼠的免疫功能改变与中药干预的影响[J].实验动物与比较医学,2010,30(2):117-120.
- [17] 肖慧,冷晓霞,陈民利,等.束缚应激致亚健康状态大鼠的行为学改变及中药的干预作用[J].实验动物与比较医学,2010,30(2):124-128.
- [18] 谢日青,冷晓霞,陈民利,等.束缚应激致亚健康状态大鼠氧自由基变化及中药干预作用[J].实验动物与比较医学,2010,30(2):121-123.
- [19] 韦小霞,雷龙鸣,邱石源.背部循经推拿手法对束缚应激所致亚健康模型大鼠海马神经元的影响[J].辽宁中医杂志,2019,46(3):639-641,674.
- [20] 孟彦,颜磊,王琦,等.心理亚健康实验模型大鼠肠道菌群变化及其规律[J].药学学报,2019,54(9):1597-1605.
- [21] 张潇,武嫣斐,高耀,等.心理亚健康大鼠模型的建立及评价[J].中草药,2016,47(4):610-616.
- [22] 围秀秀.蓝莓浓缩汁对小鼠疲劳型亚健康的改善作用[D].大连:大连理工大学,2017.
- [23] 杨其波,陆炜高,屈庆群,等.牛大力对亚健康小鼠血常规影响的实验研究[J].河南中医,2016,36(7):234-236.
- [24] 岳肖华,李晏乐,曹继刚.补肝汤对亚健康疲劳状态大鼠肝脏及腓肠肌组织形态学的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(2):685-687.
- [25] 王秀云,李积胜,刘公望,等.睡眠剥夺对亚健康形成的影响及相关机制[J].天津中医药,2006,23(2):108-111.
- [26] 潘波洋.保健推拿手法对疲劳型亚健康模型大鼠免疫器官组织结构及功能影响研究[D].南宁:广西中医药大学,2019.
- [27] 傅惠英,寿旗扬,李艳伟,等.中国被毛孢发酵物对睡眠剥夺亚健康大鼠的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(6):59-62.
- [28] 王辉.饮食不节致亚健康状态大鼠模型的建立及其机制的研究[D].杭州:浙江中医药大学,2010.
- [29] 李晓勇.维康颗粒对疲劳型亚健康大鼠下丘脑蛋白谱的影响[D].广州:南方医科大学,2008.
- [30] 张玥莉,吕圭源,丁婷,等.长期起居饮食不节致亚健康状态大鼠模型的研究[J].中药药理与临床,2014,30(6):181-184.
- [31] 杜旭,刘娟,张容超,等.逆灸对亚健康状态大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴-5-羟色胺通路的影响[J].中医学报,2020,35(8):1742-1746.
- [32] 郝文丽,陈志宝,赵蕊.复合因素建立亚健康小鼠模型[J].激光生物学报,2015,24(6):580-583,561.
- [33] 马作峰,姜瑞雪,张六通,等.复合刺激对亚健康大鼠模型耐疲劳能力及血清SOD、MDA的影响[J].云南中医中药杂志,2011,32(8):54-55.
- [34] Feng S, Liu W, Zuo S, et al. Impaired function of the intestinal barrier in a novel sub-health rat model [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3459-3465.
- [35] 周海亮,周兴,李晴,等.雄蚕益肾方对肾虚大鼠睾丸抗氧化作用的影响[J].中国性科学,2020,29(12):110-113.
- [36] Yu Y, Yang S, Mao LG, et al. Identification of potential metabolic biomarkers in Yin deficiency syndrome using LC-MS [J]. Anat Rec (Hoboken), 2020, 303(8): 2121-2130.
- [37] 吴柳花,吕圭源,李波,等.黄精对长期超负荷游泳致阴虚内热模型大鼠的作用研究[J].中国中药杂志,2014,39(10):1886-1891.
- [38] 刘文俊,李振钰,许欣竹,等.脾气虚证大鼠股四头肌线粒体自噬水平及AMPK/ULK1途径变化的研究[J].北京中医药大学学报,2019,42(9):760-765.
- [39] 赵鑫,崔月莉,吴鹏,等.远志与炆远志对心肾不交失眠大鼠学习记忆、HPA轴功能及神经递质的调控作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(11):147-154.
- [40] 黄运芳,毕欣宁,郑伟,等.交泰丸对心肾不交型失眠大鼠中枢及外周神经递质的调控作用[J].中国中药杂志,2020,45(9):2172-2179.
- [41] 吴天浪,张培海,张科庄,等.亚健康状态(肝郁证)对SD大鼠生殖功能的影响[A].中国中西医结合学会男科专业委员会.第七次全国中西医结合男科学术会议及全国中西医结合男科提高班论文汇编及讲义[C].中国中西医结合学会男科

- 专业委员会:中国中西医结合学会;2011.
- [42] 马作峰,张六通,黄圣光,等.亚健康状态大鼠模型的研制[J].湖北中医杂志,2008,30(6):7-9.
- [43] 王德军,陶涛,朱科燕.不同因素致亚健康大鼠血液生化、血气电解质指标的影响[J].中国比较医学杂志,2012,22(12):54-59.
- [44] Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Epigallocatechin gallate ameliorates behavioral and biochemical deficits in rat model of load-induced chronic fatigue syndrome [J]. Brain Res Bull. 2011, 86(34): 165-172.
- [45] 徐孝平,潘永明,刘瑞敏,等.亚健康状态大鼠的神经-免疫-内分泌机制的研究[J].中国比较医学杂志,2012,22(8):33-39.
- [46] 何清湖,杨华伟,李天禹,等.天蚕壮阳散对肾虚雄性亚健康大鼠免疫功能的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(5):1298-1301.
- [47] Shao C, Ren Y, Wang Z, et al. Detection of urine metabolites in a rat model of chronic fatigue syndrome before and after exercise [J]. Biomed Res Int. 2017, 8(18): 206-217.
- [48] 贾临超,冷晓霞,陈民利,等.束缚应激致亚健康状态大鼠脑组织 iNOS 的表达及其中药干预作用[J].甘肃中医学院学报,2011,28(2):1-4.
- [49] Yasui M, Menjyo Y, Tokizane K, et al. Hyperactivation of proprioceptors induces microglia-mediated long-lasting pain in a rat model of chronic fatigue syndrome [J]. Neuro inflammation, 2019, 16(1): 67.
- [收稿日期]2020-12-21

(上接第 118 页)

- [32] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, et al. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals [J]. Int Rev Immunol, 2018, 37(1): 20-36.
- [33] Chen CY, Kao CL, Liu CM, et al. The cancer prevention, anti-inflammatory and anti-oxidation of bioactive phytochemicals targeting the TLR4 signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2729.
- [34] 姜阳.不同配穴对应激性胃溃疡大鼠氧化—抗氧化重构的影响[D].长春:长春中医药大学,2019.
- [35] Zhang M, Zhang X. The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis [J]. Arch Dermatol Res, 2019, 311(2): 83-91.
- [36] Park MK, Yao Y, Xia W, et al. PTEN self-regulates through USP11 via the PI3K-FOXO pathway to stabilize tumor suppression [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 636.
- [37] 黄攀.IGF-1/PTEN/Akt/FoxO 信号通路在大鼠水浸束缚应激中作用研究[D].南京:南京农业大学,2012.
- [38] Huang P, Zhou Z, Wang H, et al. Effect of the IGF-1/PTEN/Akt/FoxO signaling pathway on the development and healing of water immersion and restraint stress-induced gastric ulcers in rats [J]. Int J Mol Med, 2012, 30(3): 650-658.
- [39] Gyires K, Feher A. Stress, neuropeptides and gastric mucosa [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(27): 3928-3940.
- [40] 李志坤,王福文.药物治疗应激性胃溃疡的研究进展[J].医学研究生学报,2015,28(1):110-112.
- [41] Li J, Hu X, Liang F, et al. Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF- κ B in diabetic peripheral neuropathy [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 189(4): 1167-1182.
- [42] Lai HC, Chang QY, Hsieh CL. Signal transduction pathways of acupuncture for treating some nervous system diseases [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 2909632.
- [43] Shi MJ, Li RY, Zhang YB. Progress in signaling pathways involved in the treatment of ulcerative colitis with traditional Chinese medicine [J]. Prog Pharm Sci, 2016, 40(8): 610-618.
- [收稿日期]2020-11-19