

郭正昌,赵泽玉,张宗耀,等. 小肠类器官的构建及传代培养 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 1-6.

Guo ZC, Zhao ZY, Zhang ZY, et al. Establishment and passage of small intestine organoids [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 1-6.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.001

小肠类器官的构建及传代培养

郭正昌,赵泽玉,张宗耀,周翔,周波*

(安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230032)

【摘要】 目的 探索小肠隐窝分离、小肠类器官培养、传代、冻存、复苏和蛋白提取的方法,研究 R-Spondin1 的浓度对小肠类器官成熟的影响。**方法** 分离小鼠小肠隐窝,在模拟体内肠道干细胞生长、增殖的体外 3D 培养体系中培养,倒置显微镜观察小肠类器官的形成过程。用 1 mL 注射器切割小肠类器官进行传代。设置 R-Spondin1 浓度梯度,在不同时间点比较小肠类器官形态。**结果** 成功的完成了小肠类器官的分离培养、传代、冻存、复苏及蛋白提取工作。确定了隐窝与单细胞可以进行培养的比例标准且发现在 R-Spondin1 浓度低于 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基中,小肠隐窝不能成长为成熟的小肠类器官。**结论** 小肠类器官体外培养体系的建立,尤其传代培养的成功将为在体外长期研究小肠上皮提供新的、更符合生理的实验模型。隐窝与单细胞比例标准的确定将大幅提高小肠类器官培养的成功率,蛋白质的提取将有利于蛋白组学的研究。

【关键词】 肠上皮细胞;类器官;三维细胞培养;干细胞;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0001-06

Establishment and passage of small intestine organoids

GUO Zhengchang, ZHAO Zeyu, ZHANG Zongyao, ZHOU Xiang, ZHOU Bo*

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 Objective To explore the method of small intestinal crypts isolation, organoids culture, passage, cryopreservation and recovery, and protein extraction, then study the effect of R-Spondin1 concentration on intestinal organoids maturation. **Methods** Isolate the small intestinal crypts, cultivate them in an *in vitro* 3D culture system that simulates the growth and proliferation of small intestinal stem cells *in vivo*, and observe the formation of intestinal organoids with an inverted microscope. The small organoids were cut with a 1 mL syringe for passage. Set R-Spondin1 concentration gradient and compare organoids morphology at different time points. **Results** Successfully completed the separation culture, passage, cryopreservation, resuscitation and protein extraction of intestinal organoids and found that the intestinal crypts in the medium with a bottom concentration of less than 0.5 $\mu\text{g/mL}$ cannot grow into mature intestinal organoids. **Conclusions** The establishment of an *in vitro* culture system for small intestine organoids, especially the success of subculture, will provide a new and more physiological experimental model for long-term study of intestinal epithelium *in vitro*. The determination of the ratio of crypts to single cells will greatly improve the success rate of intestinal organoids culture, and the extraction of proteins will be beneficial to the study of proteomics.

【Keywords】 intestinal epithelial cell; organoids; 3D cell culture; stem cell; mouse

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81801952);安徽省自然科学基金项目(1708085QH199)。

【作者简介】 郭正昌(1994—),男,硕士研究生,专业:胃肠外科。E-mail:1154700591@qq.com

【通信作者】 周波(1985—),男,主治医师,副教授,硕士生导师,博士,研究方向:胃肠道肿瘤与消化道损伤修复。

E-mail:zhb0468@gmail.com

小肠类器官是小肠干细胞在体外进行 3D 培养时,以连续分化的方式形成的一种多细胞类型的三维结构,其与体内小肠上皮的生理结构和功能有很大的相似性。作为一个新的小肠上皮研究模型,由 Clever 教授及其团队^[1]于 2009 年通过体外三维培养富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体(Lgr5)基因表达的肠道干细胞率先完成体外的构建。

研究表明,许多肠道疾病的病变起始于肠道上皮,在炎症性肠病中肠道上皮中的杯状细胞水平降低导致粘蛋白的分泌减少,这也被认为是炎症性肠病的一个特征性标志^[2]。另外,许多肠道感染性疾病也被证实与病原体和肠道上皮细胞之间的相互作用有关。现已有研究者开始利用小肠类器官模型来开展病原体与宿主之间的相互作用关系及其致病机制的研究^[3-5]。此外,小肠作为人重要的器官之一,执行着消化、吸收、分泌、免疫屏障等多方面的功能,肠道疾病的发生也与肠道屏障的破坏有关^[6-9]。小肠类器官作为模拟体内小肠上皮的模型,自成功构建以来,已在肠道感染性疾病^[10]、再生医学^[11]、肿瘤学^[12]、药理学^[13]和营养学^[14]的研究中得以应用,然而,现在国内关于小肠类器官的研究鲜有开展。

由于小肠类器官的构建步骤复杂,模型构建尚未成熟,本研究着重探索及优化小肠隐窝的分离、培养、小肠类器官传代、冻存及复苏的方法,在此基础上研究 R-Spondin1(R 脊椎蛋白 1)浓度对小肠类器官形成的影响及小肠类器官的蛋白提取方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 3 只,体重 20~25 g,6~8 周龄,雌雄不限,由安徽医科大学实验动物中心[SCXK(皖)2017-001]提供,安徽医科大学实验伦理委员会审批号(LLSC20180416)。无菌手术在安徽医科大学实验动物中心屏障设施中进行[SYXK(皖)2017-0124]。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

类器官基础培养基:Advanced DMEM/F12(美国 Invitrogen 公司,货号:12634-010);类器官完全培养基:基础培养基添加 1% L-glutamine(美国 Invitrogen 公司,货号:25030);1% pen/strep(美国 Invitrogen 公司,货号:15140-148);1% Hepes 10

mmol/L(美国 Invitrogen 公司,货号:15630080);N2 supplement 1:100(美国 Invitrogen 公司,货号:17502-048);B27 supplement 1:50(美国 Invitrogen 公司,货号:17504-044);0.1 $\mu\text{g/mL}$ Recombinant Mouse Noggin Protein(美国 R&D Systems 公司,货号:1967-NG-025);0.5 $\mu\text{g/mL}$ Recombinant Mouse R-Spondin1 Protein(美国 R&D Systems 公司,货号:3474-RS-050);0.05 $\mu\text{g/mL}$ Recombinant Mouse EGF Protein(美国 R&D Systems 公司,货号:2028-EG-200);Matrigel Matrix 基质胶(美国 BD 公司,货号:356231);EDTA(美国 Sigma 公司,货号:431788-25G);DPBS(美国 Hyclone 公司,货号:SH3002802.02);肠类器官冻存液:80% Advanced DMEM/F12(美国 Invitrogen 公司,货号:12634-010);10% DMSO(美国 Sigma 公司,货号:D2650-100ML);10% FBS(美国 Gibco 公司,货号:10270-106)。倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);电泳仪(北京六一);电热恒温培养箱(上海三发科学);脱色摇床(金坛市泰纳仪器);曝光仪(上海勤翔)。RIPA 裂解液(碧云天公司,货号:P0013B)。

1.3 实验方法

1.3.1 小肠类器官的分离

将小鼠腹腔麻醉后脱颈椎处死,放于 75%乙醇中浸泡 10 min。在生物安全柜中,于小鼠会阴处开一小口,沿着腹正中线切开皮肤至剑突下,用 Alice 钳将皮肤向两边拉开,逐层进腹。找到胃的幽门,在幽门下 5 cm 处及距回盲部 5 cm 处分离断小肠。将小肠放入冰 DPBS 中,小心的去除残留的肠系膜及血管,然后用 10 mL 注射器吸取冰 DPBS 从靠近幽门端轻柔的冲洗肠腔,使肠内容物排出。用眼科剪小心的纵向切开小肠,用细胞计数板轻轻地刮去小肠绒毛,将刮去绒毛的小肠切成 2~3 mm 的小段收集到 50 mL 的离心管中。用移液枪吸取 15 mL 的冰 DPBS,轻柔地反复吹打几次,重复上述步骤,至上清液变澄清。弃上清,并取 20 mL 2.5 mmol/L 的 EDTA(乙二胺四乙酸)溶液于离心管中,将离心管放于冰上置于 20 r/min 的摇床上摇晃 30 min。然后用润湿的移液器轻柔的吹打 3 次,将吹打后的溶液过 70 μm 的滤网到 50 mL 锥形管中,标记为第 1 管,重复上述步骤依次标记 2、3、4、5 管。分别取 10 μL 滤液于载玻片上观察,保留小肠隐窝较多且杂细胞较少的管。将目标管放于离心机中,4℃、1200 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀在 10 mL

5% BSA/DPBS 溶液中重悬,再以相同的离心参数离心,重复 3 次,最后 1 次重悬后取 10 μ L 悬液计数,并计算离心管中的隐窝总数。

1.3.2 小肠类器官的培养

尽可能多的弃去上清液,以 1 μ L 基质胶 12.5 个隐窝计算应加入的基质胶体积,在离心管中用移液器重悬肠隐窝,注意不要吹出气泡,基质胶易凝,此步骤冰上操作。用移液器吸取 50 μ L 悬液,一次性打入到在培养箱中孵育过的 24 孔板中,种板后将 24 孔板放于培养箱中孵育 30 min 至基质胶完全聚合。待基质胶完全聚合后沿孔壁添加 500 μ L 类器官生长培养基。24 孔板放于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d(培养基变黄)更换培养液。

1.3.3 小肠类器官的传代

培养 7~10 d 或类器官中央变黑时可以传代,提前将 24 孔板放于培养箱中预孵育至少 30 min。吸走待传代孔的培养液,每孔中加 1 mL 冰 DPBS,1 min 后挑起基质胶,用 1 mL 枪头将基质胶轻轻吹散,用配备 27 $\frac{1}{2}$ G 针头的 1 mL 注射器一次性吸走悬液,重复操作 1 次,将悬液加入 5 mL 离心管中,1200 r/min、4 $^{\circ}$ C、离心 5 min,离心,弃上清,按每孔 1:3 传代。铺板及培养同类器官的培养步骤。

1.3.4 小肠类器官的冻存

选择生长状态良好的类器官(一般传代后 3~4 d),进行冻存,每两孔冻存一管。吸去培养液,加入 1 mL 细胞冻存培养液,用 1000 μ L 的枪头将基质胶吹散,后将悬液加到细胞冻存管中,放于程序性降温冻存盒中,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱放置 1 d,后转入液氮长期保存。

1.3.5 小肠类器官的复苏

预先将 24 孔板放于培养箱预孵 30 min。取出液氮中的冻存管,放于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中,当冻存液刚好溶解时取出,用配备 27 $\frac{1}{2}$ G 针头的 1 mL 注射器抽吸一次,然后将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中,于 1200 r/min、4 $^{\circ}$ C 的离心机中离心 5 min,弃上清,加入 5 mL 冰 DPBS 重悬,重复上述离心步骤,弃上清。按照之前类器官培养的步骤铺板和培养,每冻存管小肠类器官传 4 孔。

1.3.6 小肠类器官的蛋白提取

小肠类器官在基质胶中 3D 培养与传统的贴壁和悬浮培养不同,蛋白提取时操作也有所区别,本研究探索了小肠类器官蛋白提取的方法。首先吸除 24 孔板中的培养基,加入 1 mL 冰 DPBS,将 24 孔

板放于冰上 30 min 溶解基质胶,用 1000 μ L 枪头的移液枪重悬,然后将悬液转移至 15 mL 离心管中,另外加入 5 mL 冰 DPBS,800 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,小心的去除上清,再次用 5 mL DPBS 重悬肠类器官,在同样条件下再次离心,去除上清液,保留沉淀。然后按照每 2 孔类器官加入 200 μ L RIPA 裂解液,冰上充分裂解后离心收集上清。

1.3.7 R-Spondin1 浓度对小肠类器官生长的影响

Wnt 激动剂 R-Spondin1 与 Lgr5 结合,是单个 lgr5⁺ 小肠干细胞构建小肠类器官的重要因素之一^[1],然而,在肠类器官体外培养过程中 R-Spondin1 的浓度使用仍有争议^[15-16]。在此我们通过在培养基中设置 0.25 μ g/mL、0.50 μ g/mL、0.75 μ g/mL 这 3 个浓度梯度,通过在不同时间点对肠类器官的形态观察,来探索 R-Spondin1 的浓度对肠类器官形成的影响。

2 结果

2.1 合理的肠隐窝比例更有利于肠类器官的形成

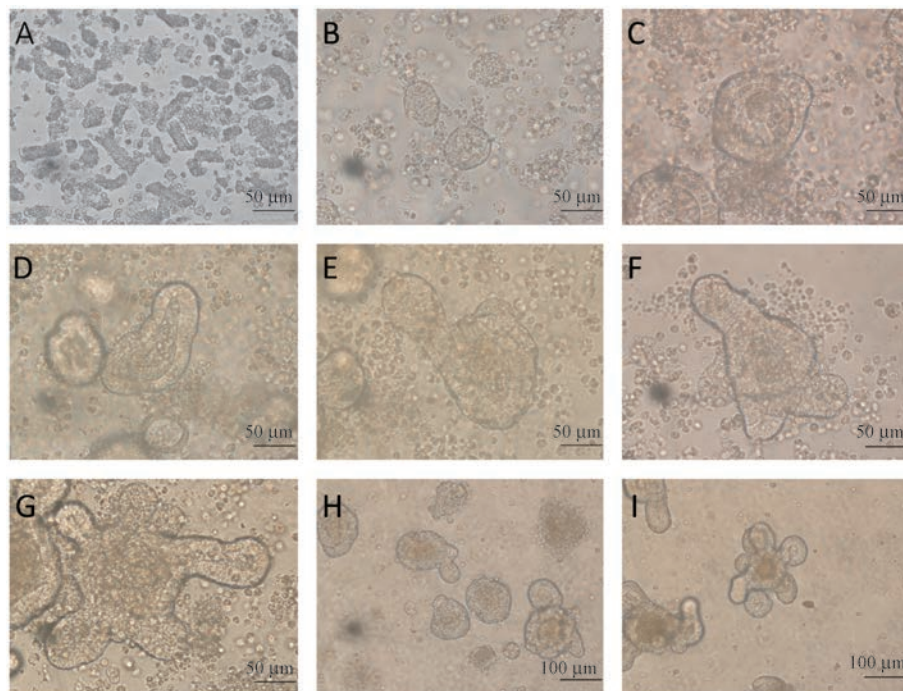
小肠隐窝分离后,将悬液置于倒置显微镜下观察,刚分离出的小肠隐窝在形态学呈短棒状结构(图 1A)。短棒状结构较多,游离的细胞单较少,以图 1A 的标准分离出来的小肠隐窝与单细胞的比例关系培养后更易形成类器官。

2.2 小肠类器官的建立及传代培养

刚分离出的小肠隐窝呈短棒状(图 1A),分离培养后 6 h 开始出现圆圈状结构(图 1B);培养第 2 天,圆圈状结构开始出现出芽趋势,中间可见管腔(图 1C);培养第 3 天小肠类器官变大,出芽更加明显(图 1D);培养后第 4 天,小肠类器官体积变大且管腔壁明显增厚,出芽数增多(图 1E);培养后第 5 天,出芽数继续增多(图 1F);培养后第 6.5 天形成围绕中央管腔的花环状结构,管腔中央脱落的细胞开始凋亡,颜色变深(图 1G),此时可进行传代;切割传代后观察小肠类器官被切割成小肠类器官碎片(图 1H);在与原代培养细胞相同的条件下,小肠类器官碎片在第 4 天重新长成成熟的类器官结构(图 1I),此时的小肠类器官可用于后续实验。

2.3 Western blot 验证蛋白提取方法有效

对提取的蛋白进行蛋白电泳,管家基因 GAPDH 表达如图 2 所示,这证实了上述蛋白提取方法是有效的,此模型作为疾病的模型,某种干预因素施加后,用上述方法提取蛋白可以在蛋白水平验证干预



注:A:小肠隐窝刚分离;B:小肠隐窝培养 6 h,已形成圆圈结构;C:培养第 2 天的小肠类器官开始萌芽;D:培养第 3 天的小肠类器官;E:培养第 4 天的小肠类器官出芽数增多;F:培养第 5 天的小肠类器官;G:培养第 6.5 天的小肠类器官呈现特征性的花环状结构;H:传代后被切割的小肠类器官;I:传代后第四天重新形成成熟的小肠类器官结构。

图 1 小肠类器官的形成及传代过程中的形态改变

Note. A, Small intestinal crypts just separated. B, Small intestinal crypts have been cultured for 6 hours and have formed a circle structure. C, Small intestinal organoids started to bud after 2 days of culture. D, Small intestinal organoids on day 3 of culture. E, Increased number of small intestinal organoids budding on the 4th day of culture. F, Small intestine organoids on day 5 of culture. G, The small intestine organoids on the 6.5th day of culture present a characteristic floral ring structure. H, The small organoids pieces after passage. I, The mature small intestinal organoid structure is reformed on the fourth day after passage.

Figure 1 Small intestine organoid formation and morphological changes during passage



注:收集蛋白进行免疫印迹实验分析,可见管家基因 GAPDH 表达,证实蛋白提取有效。

图 2 Western blot 验证蛋白提取有效

Note. The protein was collected and analyzed by western blot, which showed that the housekeeping gene GAPDH was expressed, which confirmed that the protein extraction was effective.

Figure 2 Western blot demonstrated that protein extraction was effective

因素对肠道上皮的影响。

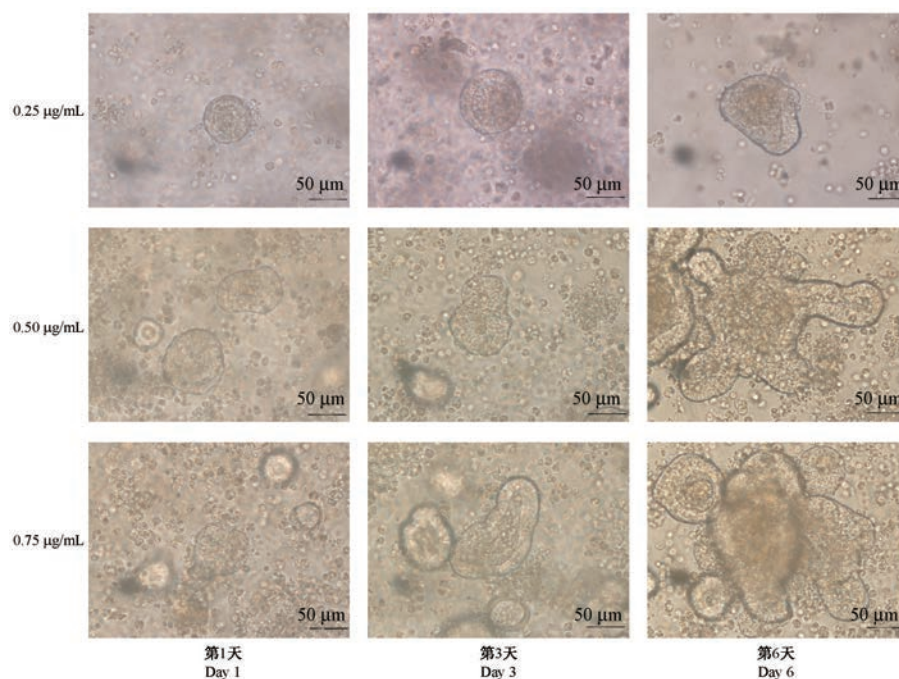
2.4 低 R-Spondin1 浓度小肠类器官的成熟受限

如图 3 所示,小肠隐窝分离后在含有低浓度的 R-Spondin1 培养基中小肠隐窝的成圈时间无明显差别,在后续的培养过程中低浓度的肠类器官大部分成为类球体,出芽数明显减少,大部分不出芽。在

较高浓度的 R-Spondin1 培养基中培养小肠类器官能顺利出芽,且最终可以形成成熟的肠类器官,低于 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的 R-spondin1 会影响肠类器官的成熟。本研究还发现在低浓度 R-Spondin1 培养基中培养的小球体在移入较高浓度的 R-Spondin1 小肠类器官培养基中能重新成长为成熟的肠类器官。

3 讨论

小肠上皮是单个细胞层,由增殖的隐窝和分化的绒毛组成,包括分泌细胞(如杯状细胞和肠内分泌细胞)、吸收细胞(如肠细胞)、潘氏细胞和干细胞等小肠细胞类型^[17-18]。小肠上皮的更新依赖于位于肠隐窝底部附近的肠道干细胞,它们快速分裂、运输扩增的子细胞至隐窝的其余部分,并逐渐转移至肠绒毛的侧翼,在那里子细胞分化,吸收营养,最终在绒毛顶端凋亡。肠道内稳态的维持主要依靠四条典型的信号通路控制:WNT^[19]、Notch^[20]、EGF、



注:小肠类器官在 0.25 µg/mL、0.50 µg/mL、0.75 µg/mL R-Spondin1 浓度梯度下培养,在第 1 天、第 3 天、第 6 天观察肠类器官的形态改变。

图 3 不同浓度 R-Spondin1 小肠类器官形态比较

Note. The small intestinal organoids were cultured under a concentration gradient of R-spondin1 at 0.25 µg/mL, 0.50 µg/mL, and 0.75 µg/mL, and the morphological changes of small intestinal organoids were observed on day 1, day 3, and day 6.

Figure 3 Comparison of morphology of small intestinal organoids with different concentrations of R-Spondin1

BMP^[21]。Clever 教授^[1]通过在添加有 EGF(表皮生长因子)、Noggin(头蛋白)、R-spondin1 这些细胞因子的培养基中,3D 培养 Lgr5 基因表达的肠道干细胞成功的完成了小肠类器官的构建。作为一种新兴的模型,小肠类器官已经获得了广泛的关注,因为小肠类器官的结构包括大部分小肠上皮细胞类型^[22],此外,单细胞测序显示小肠类器官含有先前未鉴定的细胞亚型^[23-24]。因此,小肠类器官概括了自然组织的主要特征,这对于研究细胞类型的动态平衡和疾病状态之间相互作用的复杂性具有很高的价值^[25]。小肠类器官相关病理检测技术的发展也将推动小肠类器官体外培养体系的应用^[26]。

然而国内外关于小肠类器官的构建现仍无统一标准,类器官构建的难点在于细节的把控,小肠绒毛的处理不当、培养密度的大小以及污染等问题都会很大程度上的影响小肠类器官构建的成功率。肠道上皮分离物中隐窝和游离单细胞的比例是后期培养成败的关键,本文通过用细胞计数板刮去小肠绒毛,多次吹打,过滤选定小肠隐窝数量较多而游离的单细胞较少的目标管进行培养。通过取样观察在培养前建立了可以进行后续培养的肠隐窝

与单细胞比例的标准(图 1A),这很大程度上提高了小肠类器官培养的成功率,避免了盲目培养带来的实验成本的增加。在传代过程中综合使用了机械法和消化法两种方法处理成熟的类器官,我们发现机械法在传代过程中能更好的保持隐窝的数量及活性。蛋白组学是基础性研究的重要组成部分,小肠类器官由于其在三维条件下培养,其蛋白提取过程与传统的贴壁及悬浮培养大有不同,本研究中我们通过在低温条件下溶解基质胶成功的收集了小肠类器官,蛋白质的成功提取将有助于研究干扰因素在蛋白层面对小肠道上皮的影响。R-Spondin1 作为小肠培养过程中重要的细胞因子,在此研究中我们发现当其浓度低于 0.50 µg/mL 不利于肠类器官的成熟,因此使用合理的 R-Spondin1 浓度也决定着小肠类器官培养的成功。

目前以类器官作为疾病的模型及前临床模型已开始用于科学研究。由于类器官作为疾病的前临床模型在药物开发、基因及细胞疗法等方面有良好的应用前景,而国内关于类器官的研究正处于起步阶段。本文继续完善了小肠类器官的分离、培养、传代、冻存和复苏及蛋白提取工作,可以为小肠类器官的构建及应用提供新的参考。

参考文献:

- [1] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche [J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 262–265.
- [2] Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 298–306.
- [3] Yin YB, Bijvelds M, Dang W, et al. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids [J]. *Antiviral Res*, 2015, 123: 120–131.
- [4] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids [J]. *Science*, 2016, 353(6306): 1387–1393.
- [5] Kolawole AO, Mirabelli C, Hill DR, et al. Astrovirus replication in human intestinal enteroids reveals multi-cellular tropism and an intricate host innate immune landscape [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(10): e1008057.
- [6] Gribble FM, Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(4): 226–237.
- [7] Schroeder BO. Fight them or feed them; how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota [J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2019, 7(1): 3–12.
- [8] Soderholm AT, Pedicord VA. Intestinal epithelial cells: at the interface of the microbiota and mucosal immunity [J]. *Immunology*, 2019, 158(4): 267–280.
- [9] Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1): 9–21.
- [10] Yin Y, Bijvelds M, Dang W, et al. Modeling rotavirus infection and antiviral therapy using primary intestinal organoids [J]. *Antiviral Res*, 2015, 123: 120–131.
- [11] Nakamura T, Sato T. Advancing intestinal organoid technology toward regenerative medicine [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(1): 51–60.
- [12] Sato T, Stange DE, Ferrante M, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and barrett's epithelium [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1762–1772.
- [13] Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(344): 344ra84.
- [14] van der Wielen N, ten Klooster JP, Muckenschnabl S, et al. The noncaloric sweetener rebaudioside a stimulates glucagon-like peptide 1 release and increases enteroendocrine cell numbers in 2-dimensional mouse organoids derived from different locations of the intestine [J]. *J Nutr*, 2016, 146(12): 2429–2435.
- [15] Li D, Dong H, Kohan AB. The isolation, culture, and propagation of murine intestinal enteroids for the study of dietary lipid metabolism [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1576: 195–204.
- [16] Mahe MM, Aihara E, Schumacher MA, et al. Establishment of gastrointestinal epithelial organoids [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2013, 3(4): 217–240.
- [17] Kuratnik A, Giardina C. Intestinal organoids as tissue surrogates for toxicological and pharmacological studies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(12): 1721–1726.
- [18] Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications [J]. *Science*, 2013, 340(6137): 1190–1194.
- [19] Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4 [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(4): 379–383.
- [20] van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 959–963.
- [21] Haramis APG, Begthel H, van den Born M, et al. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine [J]. *Science*, 2004, 303(5564): 1684–1686.
- [22] Onozato D, Yamashita M, Nakanishi A, et al. Generation of intestinal organoids suitable for pharmacokinetic studies from human induced pluripotent stem cells [J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46(11): 1572–1580.
- [23] Haber AL, Biton M, Rogel N, et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium [J]. *Nature*, 2017, 551(7690): 333–339.
- [24] Grun D, Lyubimova A, Kester L, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types [J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 251–255.
- [25] Fair KL, Colquhoun J, Hannan NRF. Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease [J]. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 2018, 373(1750): 20170217.
- [26] 万光升, 张新艳. 小鼠小肠类器官体外培养体系的建立与应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(5): 513–518.

[收稿日期] 2020-05-22

王雨晴,陈志刚,张斯佳,等. 神经干细胞在缺氧后的分化情况及相关信号通路初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 7-15.

Wang YQ, Chen ZG, Zhang SJ, et al. A preliminary study on the differentiation of neural stem cells after hypoxia and related signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 7-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.002

神经干细胞在缺氧后的分化情况及相关信号通路初探

王雨晴^{1,2}, 陈志刚², 张斯佳¹, 王荣亮¹, 罗玉敏¹, 赵海苹^{1*}

(1.首都医科大学宣武医院,脑血管病研究室,北京 100053;

2.北京中医药大学东方医院,脑病一科,北京 100078)

【摘要】 目的 观察缺氧缺糖后神经干细胞在不同时间点的分化趋势,以及与信号通路促红细胞生成素受体(EPOR 和 β CR)和 PDZ 连接激酶(PBK)的相关性。**方法** 分离小鼠原代神经干细胞,制备氧糖剥夺(OGD)模型,缺氧 3 h,复氧 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h,观察神经干细胞 OGD 的分化趋势,采用 RT-PCR 技术检测少突胶质细胞标志物 CNP 和 MBP、星型胶质细胞标志物 GFAP 和 S100B、神经元标志物 RBFOX3、MAP2 和 TUBB3 以及信号分子 EPOR、CSF2RB、PBK 的基因表达,并进行了 Pearson 相关性分析。**结果** (1) OGD 处理促进神经干细胞向少突胶质细胞方向分化, *Cnp* 和 *Mbp* 表达呈升高趋势,复氧 4 h *Cnp* 显著升高。(2) OGD 处理促进神经干细胞向星形胶质细胞方向分化,复氧 2~8 h *S100b* 显著升高,复氧 2 h 和 6 h *Gfap* 表达显著降低,复氧 8 h 表达显著增加。(3) OGD 处理减少神经干细胞向神经元方向分化, *Rbfox3* 以及 *Tubb3* 表达显著降低,复氧 2 h 和 6 h 最为显著。(4) *Pbk* 在复氧 1 h 和 8 h 显著降低, *Epor*、*Pbk* 与 *Cnp* 的表达呈正相关, *Pbk* 与 *Mbp* 的表达呈正相关。**结论** 缺氧缺糖损伤显著促进神经干细胞向少突胶质细胞和星形胶质细胞新生,同时抑制向神经元方向的分化。EPOR 以及 PBK 可能参与到脑缺血后神经干细胞向少突胶质细胞分化的调控过程,为进一步研究相关信号通路在缺血后神经再生中的调控机制提供了基础。

【关键词】 神经干细胞分化;缺氧;促红细胞生成素受体;T-LAK 细胞源蛋白激酶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0007-09

A preliminary study on the differentiation of neural stem cells after hypoxia and related signaling pathways

WANG Yuqing^{1,2}, CHEN Zhigang², ZHANG Sijia¹, WANG Rongliang¹, LUO Yumin¹, ZHAO Haiping^{1*}

(1. Cerebrovascular Diseases Research Institute, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China.

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

【Abstract】 Objective To observe the trend of differentiation of neural stem cells (NSCS) at different time points after oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) and its correlation with Erythropoietin Receptor (EPOR), β -Common Receptor (β CR) and PDZ-binding-kinase (PBK). **Methods** The primary neural stem cells of mice were isolated and the OGD model was made. The OGD was hypoxia for 3 hours, reoxygenation for 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours and

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81771412,81801149)。

【作者简介】 王雨晴(1992—),女,博士研究生,研究方向:脑血管病发病机制。E-mail: BUCMWYQ@163.com

【通信作者】 赵海苹(1979—),女,副研究员,研究方向:脑血管病发病机制。E-mail: zhaohaiping1980@163.com

8 hours. The differentiation trend of neural stem cells was observed. CNP and MBP, GFAP and S100B, RBFOX3, MAP2 and TUBB3, EPOR, CSF2RB and PBK were detected by RT-PCR and Pearson correlation analysis was carried out.

Results 1, OGD treatment promoted the differentiation of neural stem cells to oligodendrocytes, and the expressions of *Cnp* and *Mbp* were increased obviously at 4 h after OGD. 2, OGD treatment promoted the differentiation of neural stem cells to astrocytes, and the expression of *Gfap* was decreased at 2~6 h after OGD, while the expression of *Gfap* was increased at 1 h and 8 h after OGD. The expression of *S100b* was significantly increased at 2~8 h after OGD. 3, OGD treatment reduced neuronal differentiation of neural stem cells, and the expression of *Rbfox3* and *Tubb3* were decreased after OGD significantly at 2 h and 6 h after OGD. 4, *Pbk* was reduced at 1 h and 8 h after OGD. *Epor* and *Pbk* were positively correlated with the expression of *Cnp*, and *Pbk* was positively correlated with the expression of *Mbp*. **Conclusions** Hypoxia injury significantly promoted the formation of oligodendrocytes and astrocytes and inhibited the neuronal differentiation of neural stem cells. EPOR and PBK may be involved in the differentiation of neural stem cells to oligodendrocytes. These result may provide a basis for the further research on the related mechanism of nerve regeneration after ischemia.

【Keywords】 neural stem cell differentiation; hypoxia; erythropoietin receptor; T-Lak cell derived protein kinase

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是存在于神经系统中,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能以及自我更新能力的细胞群。上世纪 60 年代科学家发现成体哺乳动物脑内一些区域分布着神经干细胞,即神经再生区域。目前成体大脑内公认的神经再生区域主要为侧脑室室管膜下区(subependymal ventricular zone, SVZ)以及海马齿状回颗粒下区(subgranular zone, SGZ)。其中 SVZ 区的神经干细胞在增殖分化为不同的子代后可迁移至脑内其他区域,在损伤后的神经功能恢复中具有重要意义。影响 NSCs 增殖及分化的方式包括调节胞内转录因子、改变神经发生微环境以及激活胞外 Eph/ephrin、Notch、Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt 多种信号通路等^[1-4]。研究表明,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对脑缺血具有神经保护作用,体内体外实验均证明 EPO 具有促进神经干细胞分化的作用, EPO 主要通过 EPOR (erythropoietin receptor) 和 β CR (β -common receptor) 组成同二聚体和异二聚体的受体发挥作用,但是具体介导神经干细胞分化的受体类型还不清楚。众所周知, MAPK 级联反应几乎控制着所有细胞功能,包括适应、增殖、分化、存活、凋亡等。PBK (PDZ-binding-kinase) 是丝裂原活化蛋白激酶 MAPKK 家族的新成员,有研究表明 PBK 对脑缺血具有一定的保护作用^[5-6]。然而 PBK 是否参与缺血性损伤后神经再生即神经干细胞的分化目前尚不清楚。在本实验中我们通过原代神经干细胞氧糖剥夺模型(oxygen and glucose deprivation, OGD)初步分析了神经干细胞向不同成熟神经细胞方向分化的趋势以及 EPO 受体和

PBK 与神经细胞标志物表达的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 孕鼠 1 只,孕龄为 12~14 d,体重 23 g 左右,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],实验于首都医科大学宣武医院脑血管病实验室动物实验屏障设施中进行[SYXK(京)2015-0016]。动物实验中涉及的动物所有操作程序已经得到首都医科大学宣武医院实验动物管理和使用委员会的批准(XWH20190603),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12、Neurobasal 培养基,购于 Invitrogen 公司;TRIzol 试剂、无 RNA 酶的水、无 RNA 酶的糖原购于 Invitrogen life technologies;三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)购于华美生物工程公司;乙酸钠、甲醛、氯仿、异丙醇、100%乙醇购于上海化学试剂有限公司;甲醛上样染液购于 Ambion;琼脂糖购于生工生物工程有限公司;RNA 酶抑制剂购于 Epicentre;SuperScript™ III Reverse Transcriptase、5 × RT 缓冲液购于 Invitrogen;2.5 mmol/L dNTP 混合液购于 HyTest Ltd;2×PCR master mix 购于 Arraystar。

洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems);ViiA 7 Real-time PCR System (Applied Biosystems)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经干细胞的培养和分组

参考文献^[7-10]选择孕龄为 12~14 d 的 C57BL/6 孕鼠,断颈处死后取出胚胎置于清洁的 PBS 中,分离胚胎脑的皮层神经干细胞,用 0.25% 胰酶消化 5 min 后离心除去胰酶,加入含 DNase 的培养基轻柔吹打细胞团块至单细胞状态,900 r/min 离心 4 min 后用完全培养基(DMEM/F12+Neurobasal+B27+PS+GlutaMax+EGF+FGF)重悬,后接种于低吸附六孔培养板。2~3 d 后传代,用 Accutase 消化神经球至单细胞,后离心除去 Accutase,完全培养基重悬细胞并继续置于低吸附六孔培养板。连续传代两次后收集细胞,消化至单细胞后接种至 PDL 包被过的细胞板,使细胞在单层贴壁状态下生长。将细胞分为 6 组,即对照(control)组,OGD/R 处理后 1 h 组,2 h 组,4 h 组,6 h 组以及 8 h 组。每组 3 孔细胞。

1.3.2 神经干细胞氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型

将单层贴壁原代神经干细胞换至无糖培养基中并置于密闭缺氧盒中,向盒内持续通入 95% N₂ + 5% CO₂ 的混合气体 5 min,使盒内的空气被完全置换成不含氧气的混合气体。将缺氧盒置于 37℃ 培

养箱,3 h 后将细胞板从缺氧盒中取出并将培养基置换成完全培养基(DMEM/F12+Neurobasal+B27+PS+GlutaMax+EGF+FGF),放入培养箱继续培养,后分别于不同时间点(OGD/R 后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h)收集细胞。

1.3.3 RT-PCR 法检测转录水平

分别于 OGD 3 h 复氧后不同时间点收集神经干细胞,采用 TRIzol 法提取 RNA,使用 NanoDrop[®] ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度。根据 SuperScript[™] III Reverse Transcriptase 试剂盒进行 cDNA 合成。使用 Primer 5.0(英骏生物技术有限公司)设计引物, β -actin(*Actb*)做为内参(见表 1)。使用 2×PCR master mix 试剂盒及 ViiA 7 Real-time PCR System 进行实时定量 PCR 检测 2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶(*Cnp*)、髓鞘碱性蛋白(*Mbp*)、胶质纤维酸性蛋白(*Gfap*)、中枢神经特异性蛋白(*S100b*)、神经元核抗原(*Rbfox3*)、微管相关蛋白 2(*Map2*)、微管蛋白(*Tubb3*)、促红细胞生成素受体(*Epor*)、共 β 亚基异源受体(*Csf2rb*)以及 PDZ 连接激酶(*Pbk*)的转录水平。技术重复 3 次。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

基因名 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度(bp) Product length
<i>Cnp</i>	F:5' GCCTTCAAGAAAGAGCTTCG 3' R:5' CAGATCACTGGGCCACAAC 3'	291
<i>Mbp</i>	F:5' TCCGACGAGCTTCAGACCA 3' R:5' ACCCCTGTCACCGCTAAAGA 3'	207
<i>Gfap</i>	F:5' AACAACTGGCTGCGTAT 3' R:5' CTGCCTCGTATTGAGTGC 3'	235
<i>S100b</i>	F:5' CCCTCATTGATGTCTTCCACC 3' R:5' TTCCTGCTCCTTGATTCTCTC 3'	128
<i>Rbfox3</i>	F:5' TGGATTTTATGGTCTGAGATT 3' R:5' CATAACTGTCACTGTAGGCTGCT 3'	95
<i>Map2</i>	F:5' TCTCTAAAGAACATCCGTCAC 3' R:5' ATCTTCACATTACCACCTCC 3'	143
<i>Tubb3</i>	F:5' GCGCCTTTGGACACCTATT 3' R:5' CCAGCACCCTCTGACCAA 3'	58
<i>Epor</i>	F:5' TCCTGGAGCACCTATGACC 3' R:5' CGAGATGAGGACCAGAATGA 3'	283
<i>Csf2rb</i>	F:5' TGGAGCAAGTGGAGCGAA 3' R:5' CACAGCCAAAGCGAAGGAT 3'	121
<i>Pbk</i>	F:5' AGAGGGTTGTCTATTCTCC 3' R:5' CTTTGTTCGGCTCTTCTATT 3'	238
<i>Actb</i>	F:5' GTACCACCATGTACCCAGGC 3' R:5' AACGCAGCTCAGTAACAGTCC 3'	247

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 以及 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据及作图。组间比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 结果以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。相关性分析采用 Pearson 相关检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD 处理促进神经干细胞向少突胶质细胞方向分化

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测少突胶质细胞标志物 CNP 及 MBP 的基因表达。结果提示在 OGD 复氧后各时间点, *Cnp* 及 *Mbp* 的表达水平较 control 组均有升高的趋势, 在 OGD 复氧后 4 h 时 *Cnp* 升高最为显著, 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 1)。综上, 缺氧缺糖损伤增加了神经干细胞向少突胶质细胞方向的分化。

2.2 OGD 促进神经干细胞向星形胶质细胞方向分化

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测星形胶质细胞标志物 GFAP 及 S100B 的基因表达。神经干细胞 OGD 复氧后 2 h 和 6 h *Gfap* 的表达水平显著降低, 8 h 表达水平显著升高, 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 各时间点 *S100b* 的表达水平均有升高, 2 h、4 h、6 h、8 h 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.3 OGD 处理减少了神经干细胞向神经元方向的分化

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测神经元标志物 RBFOX3、MAP2 以及 TUBB3 的基因表达。OGD 复氧后 2~8 h 三者的 mRNA 表达水平均有降低, 其中 *Rbfox3* 及 *Tubb3* 在 2 h、4 h、6 h 时降低最为显著且与 control 组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 3)。综上, OGD 损伤减少了神经干细胞向神经元方向分化从而损伤神经元再生。

2.4 *Epor* 及 *Pbk* 的转录水平与少突胶质细胞分化呈正相关

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测信号分子 EPOR、CSF2RB(β CR) 以及 PBK 的基因表达情况。

与 control 组相比, *Epor* 和 *Csf2rb* 在神经干细胞 OGD 复氧后 1 h 有降低趋势, 4 h、6 h、8 h 时有升高趋势; *Pbk* 在神经干细胞 OGD 复氧后各时间点表达均降低, 其中 1 h 及 8 h 较为显著, 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 4)。

通过分析比较三类神经细胞分化标志物与三种信号分子的转录水平相关性, 我们发现 EPOR 与少突胶质细胞标志物 CNP 的基因表达呈正相关 ($r = 0.52, P < 0.05$); 蛋白激酶 PBK 与少突胶质细胞标志物 CNP、MBP 的基因表达也呈正相关 ($r = 0.51$ 和 $r = 0.5, P < 0.05$)。三种信号分子的基因表达与星形胶质细胞标志物、神经元标志物均无明显的相关性 (图 5、图 6)。以上结果表明 EPOR 及 PBK 可能参与神经干细胞向少突胶质细胞分化的过程。

3 讨论

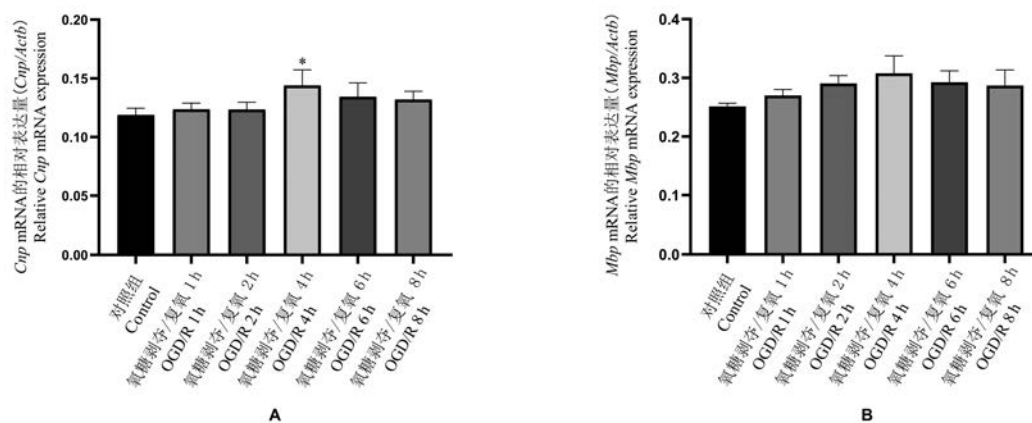
本实验结果显示缺氧缺糖损伤促进神经干细胞向少突胶质细胞以及星形胶质细胞方向的分化, 同时抑制其向神经元方向的分化。另外, 本研究发现 *Epor* 以及 *Pbk* 的表达与少突胶质细胞的分化呈正相关, 提示 EPOR 与 PBK 可能参与少突胶质细胞新生。

少突胶质细胞是中枢神经系统的主要胶质细胞之一, 其主要功能是在中枢神经系统中包绕轴突、形成绝缘的髓鞘结构、协助生物电信号的跳跃式高效传递并维持和保护神经元的正常功能。少突胶质细胞对氧化损伤、兴奋性毒性和其他类型的缺血诱导损伤具有独特的敏感性。已有研究证实, 在缺血性中风急性期和亚急性期轴突均会发生快速和显著的损伤^[11-13]。而卒中也会在一定程度上诱导轴突再生^[14]。在本实验中少突胶质细胞分子标志物 CNP 的 mRNA 水平在 OGD/R 处理后 4 h 明显上升, 证实了卒中后的轴突再生作用可能是由少突胶质细胞新生的增强所引发。轴突再生是损伤后神经功能恢复的重要基础, 因此促进轴突再生被视为缺血性卒中的治疗策略之一。

本研究通过检测 OGD/R 后不同时间点各种细胞分化标志物与 *Epor*、*Csf2rb*(β CR) 以及 *Pbk* 的转录水平并分析数据发现, 少突胶质细胞的标志物之一 *Cnp* 与受体 *Epor* 以及蛋白激酶 *Pbk* 的转录水平均呈正相关, 另一标志物 *Mbp* 与蛋白激酶 *Pbk* 的转录水平呈正相关。PBK 被证实在多个系统的恶性肿瘤组织中高表达, 通过激活下游 MAPK (p38、ERK、

JNK) 信号通路,对恶性肿瘤的发生发展、治疗预后起到重要作用^[15-16]。在脑缺血相关的研究中也同样发现 MAPK 及上游 MAP2K、MAP3K 具有新的潜在药物靶点^[17]。研究证明大鼠缺血 24 h 脑组织芯片中, PBK 的 mRNA 水平变化较其上游 MAP3Ks、

其他 MAP2Ks、下游 MAPK 家族成员更为显著^[18]。在脑缺血-再灌注早期, TOPK (PBK) 在大鼠脑缺血皮层神经元中活化,可以起到抗氧化及神经保护作用^[5]。以上研究证实 PBK 能够减轻缺血性神经损伤。EPOR 是一种广泛表达的细胞表面受体,既往

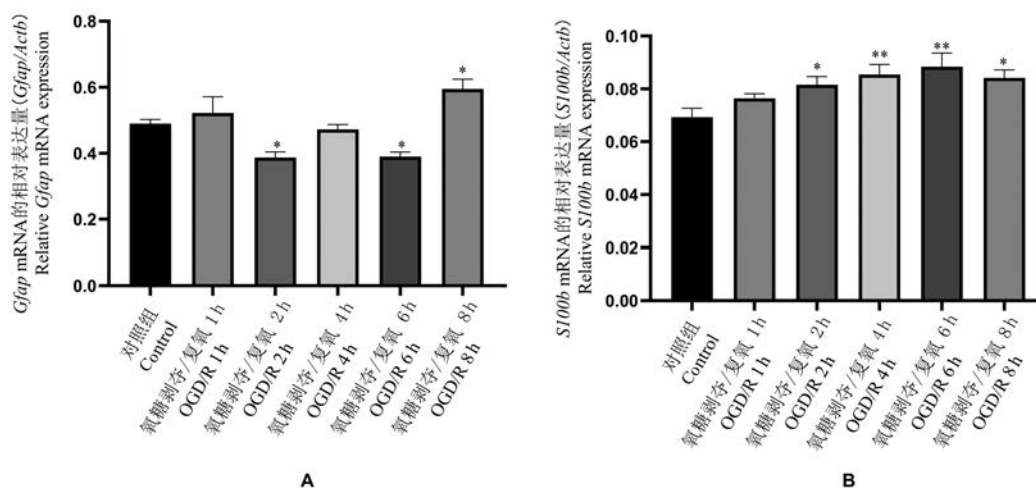


注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点少突胶质细胞标志物 CNP 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点少突胶质细胞标志物 MBP 的基因表达情况。Cnp:2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶基因。Mbp:髓磷脂碱性蛋白基因。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 Cnp、Mbp 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of oligodendrocyte marker CNP in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of oligodendrocyte marker MBP in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. Cnp, 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene. Mbp, Monobutyl phthalate gene. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Expression levels of Cnp and Mbp at different time points after OGD/R in neural stem cells



注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点星形胶质细胞标志物 GFAP 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点星形胶质细胞标志物 S100B 的基因表达情况。Gfap:胶质纤维酸性蛋白基因。S100b:S100β 蛋白基因。与对照组相比, * $P < 0.05$;与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

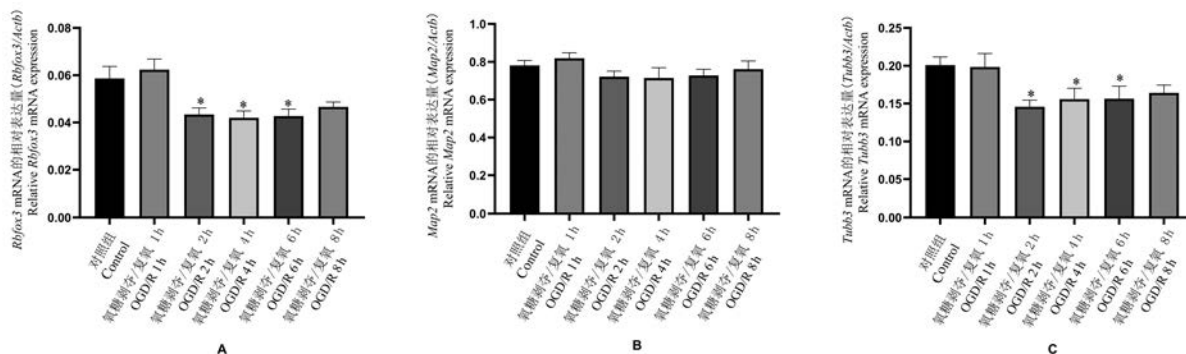
图 2 Gfap、S100b 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of astrocyte marker GFAP in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of astrocyte marker S100B in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. Gfap, Glial fibrillary acidic protein gene. S100b, S100 beta protein gene. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Expression levels of Gfap and S100b at different time points after OGD/R in neural stem cells

其形成的异源二聚体被认为主要参与介导 EPO 促进红系祖细胞生成成熟红细胞, 最近的研究表明 EPO 除了具有造血活性外, 还具有广泛的组织保护活性。它可作用于机体除造血细胞外的多种组织

和细胞, 包括神经系统、心脏、肾等, 通过减少细胞凋亡、抑制炎症反应、促进血管生长、促进功能恢复等发挥其保护作用^[19-20]。CSF2RB 通过与 EPOR 相关联形成 EPO 敏感的组织保护性异质二聚体受体

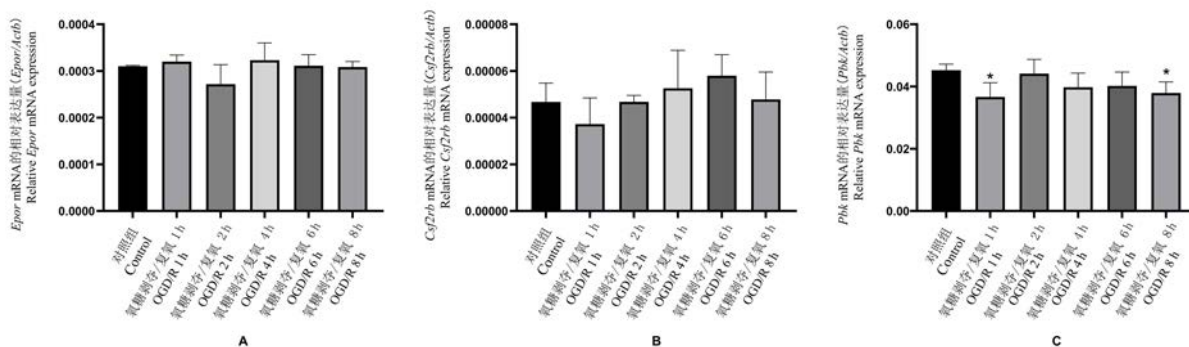


注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点神经元标志物 RBFOX3 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点神经元标志物 MAP2 的基因表达情况;C:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点神经元标志物 TUBB3 的基因表达情况。*Rbfox3*:神经元核蛋白基因;*Map2*:微管相关蛋白-2 基因;*Tubb3*: β III 微管蛋白基因。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 *Rbfox3*、*Map2* 以及 *Tubb3* 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of neuron marker RBFOX3 in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of neuron marker MAP2 in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. C, The gene expressions of neuron marker TUBB3 in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. *Rbfox3*, Neuronal nuclear protein gene. *Map2*, Microtubule-associated protein-2 gene. *Tubb3*, Beta III-tubulin gene. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Expression levels of *Rbfox3*, *Map2* and *Tubb3* at different time points after OGD/R in neural stem cells

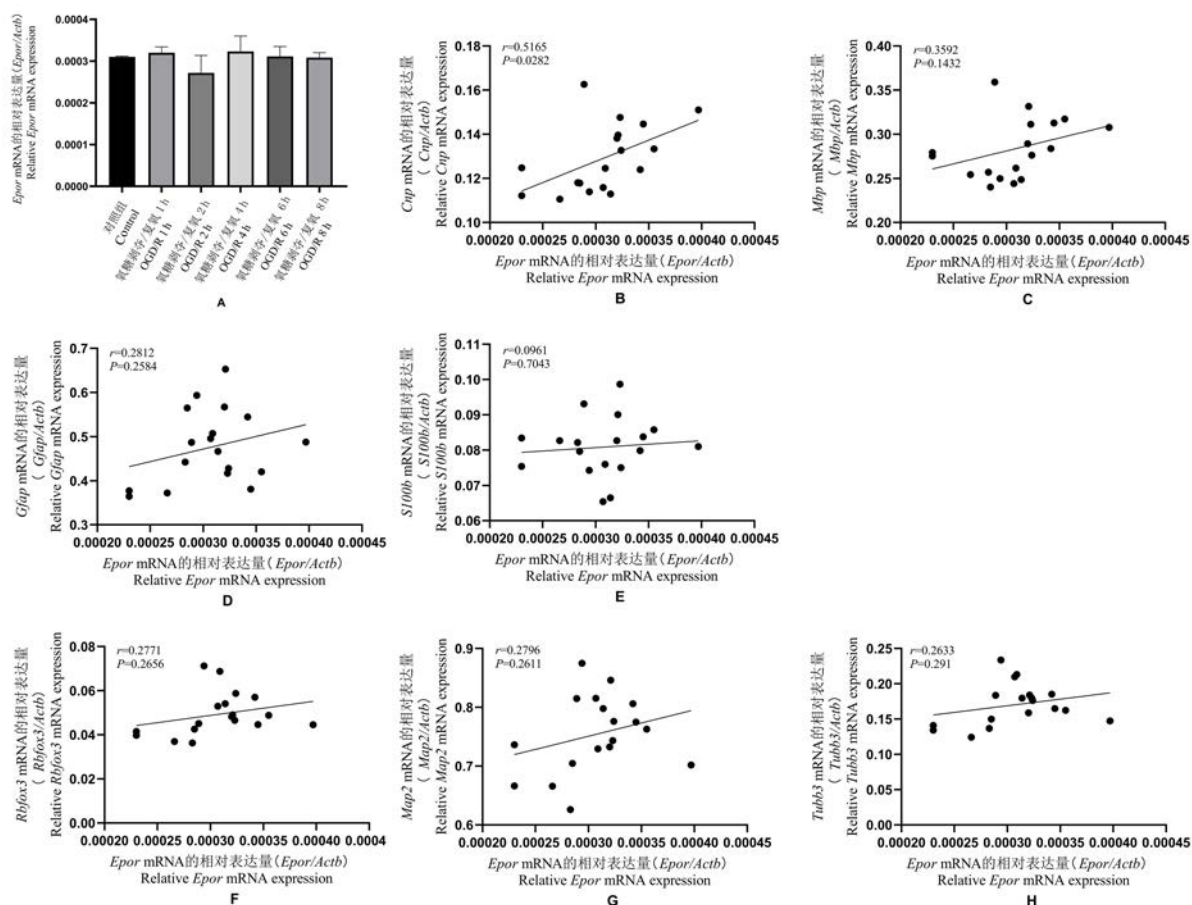


注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点信号分子 EPOR 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点信号分子 CSF2RB 的基因表达情况;C:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点信号分子 PBK 的基因表达情况。*Epor*:促红细胞生成素受体基因;*Cs2rb*:共 β 亚基异源受体基因;*Pbk*:PDZ 连接激酶基因。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 *Epor*、*Cs2rb* 以及 *Pbk* 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of the signal molecule EPOR in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of the signal molecule CSF2RB in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. C, The gene expressions of the signal molecule PBK in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. *Epor*, Erythropoietin receptor gene. *Cs2rb*, Common beta-subunit heteroreceptor gene. *Pbk*, PDZ-binding-kinase gene. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Expression levels of *Epor*, *Cs2rb* and *Pbk* at different time points after OGD/R in neural stem cells



注:A; *Epor* 在神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点的表达水平;B;信号分子 *Epor* 和少突胶质细胞标志物 *Cnp* 的相关性;C;信号分子 *Epor* 和少突胶质细胞标志物 *Mbp* 的相关性;D;信号分子 *Epor* 和星形胶质细胞标志物 *Gfap* 的相关性;E;信号分子 *Epor* 和星形胶质细胞标志物 *S100b* 的相关性;F;信号分子 *Epor* 和神经元标志物 *Rbfox3* 的相关性;G;信号分子 *Epor* 和神经元标志物 *Map2* 的相关性;H;信号分子 *Epor* 和神经元标志物 *Tubb3* 的相关性。

图5 各类细胞标志蛋白与信号分子 EPOR 的相关性分析

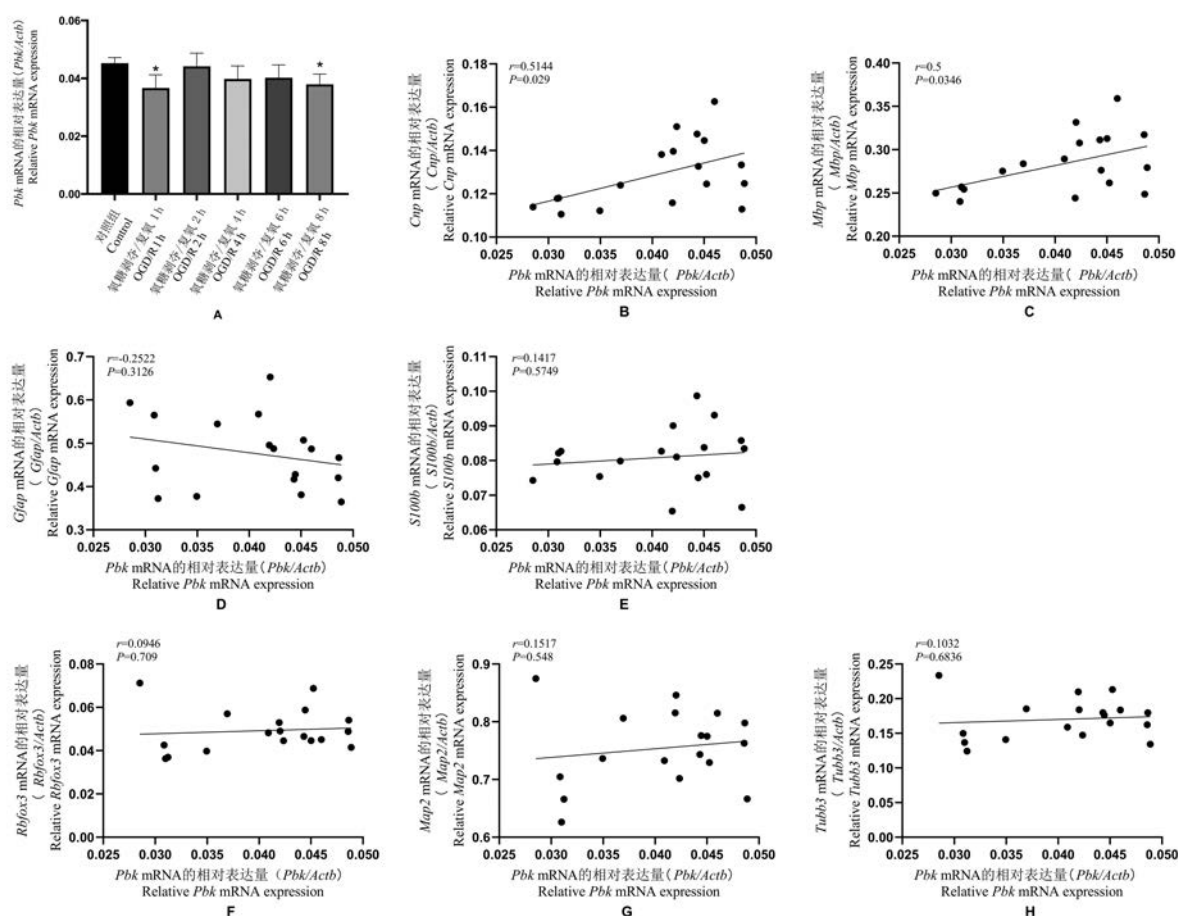
Note. A, Expression levels of *Epor* at different time points after OGD/R in neural stem cells. B, Correlation between *Epor* and *Cnp*. C, Correlation between *Epor* and *Mbp*. D, Correlation between *Epor* and *Gfap*. E, Correlation between *Epor* and *S100b*. F, Correlation between *Epor* and *Rbfox3*. G, Correlation between the *Epor* and *Map2*. H, Correlation between the *Epor* and *Tubb3*.

Figure 5 Correlation analysis of cell marker proteins with signal molecule EPOR

进行信号传导,起到神经保护作用^[21-22]。我们的实验结果进一步提示 PBK、EPOR 可能参与缺血性损伤后神经干细胞向少突胶质细胞方向的分化,即少突胶质细胞新生的过程,从而促进了卒中后轴突再生以及神经功能恢复。两个分子之间是否存在作用关系尚需进一步的研究探讨。

星形胶质细胞起支持和分隔神经细胞的作用。GFAP 是一种Ⅲ型中间丝状蛋白,参与细胞骨架的构成并维持其张力强度,是星形胶质细胞活化的标志物^[23]。S100B 蛋白主要在星形胶质细胞中表达,其过量释放可促进脑损伤后神经炎症反应的激活和进展^[24]。本实验结果提示神经干细胞缺氧缺糖

后 2 h 和 6 h *Gfap* 的表达减少,8 h 时表达升高;*S100b* 的表达水平则于神经干细胞损伤后逐渐增加,6 h 时达到最高,8 h 时较前稍有下降。既往学者研究发现,体外培养星形胶质细胞损伤后 *S100B* 的总体表达呈单峰变化趋势,损伤后 6 h 达到高峰,具有时序性变化的规律^[25]。大鼠脑缺血再灌注后 *S100B* 和 *GFAP* 的表达时间变化关系研究也有说明,缺血再灌注早期 *S100B* 可因星形胶质细胞受损而渗漏到外周微环境,进而刺激其合成水平上升,表达增加且呈双峰趋势;而 *GFAP* 则于 *S100B* 达高峰后,反应性星形胶质细胞开始参与损伤后修复和胶质瘢痕形成时表达增加^[26]。结合本研究实验结



注:A: *Pbk* 在神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点的表达水平;B: 信号分子 *Pbk* 和少突胶质细胞标志物 *Cnp* 的相关性;C: 信号分子 *Pbk* 和少突胶质细胞标志物 *Mbp* 的相关性;D: 信号分子 *Pbk* 和星形胶质细胞标志物 *Gfap* 的相关性;E: 信号分子 *Pbk* 和星形胶质细胞标志物 *S100b* 的相关性;F: 信号分子 *Pbk* 和神经元标志物 *Rbfox3* 的相关性;G: 信号分子 *Pbk* 和神经元标志物 *Map2* 的相关性;H: 信号分子 *Pbk* 和神经元标志物 *Tubb3* 的相关性。

图 6 各类细胞标志蛋白与信号分子 PBK 的相关性分析

Note. A, Expression levels of *Pbk* at different time points after OGD/R in neural stem cells. B, Correlation between *Pbk* and *Cnp*. C, Correlation between *Pbk* and *Mbp*. D, Correlation between *Pbk* and *Gfap*. E, Correlation between *Pbk* and *S100b*. F, Correlation between *Pbk* and *Rbfox3*. G, Correlation between *Pbk* and *Map2*. H, Correlation between *Pbk* and *Tubb3*.

Figure 6 Correlation analysis of cell marker proteins with signal molecule Pbk

果考虑缺血性损伤后神经干细胞可向星形胶质细胞分化,参与炎症反应,继而发生凋亡、坏死。8 h 后更多的星形胶质细胞生成、激活,成为反应性星形胶质细胞参与胶质瘢痕的形成。后续我们可以进一步探究神经干细胞氧糖剥夺/复氧 8 h 以后的星形胶质细胞标志物变化情况。

大量研究结果已表明缺血性脑损伤后成体神经再生作用增强,对神经功能的恢复具有促进作用^[27-28]。然而其机制目前尚不清楚。在本实验中,利用体外神经干细胞氧糖剥夺模型模拟缺血性脑损伤后神经干细胞的变化。结果显示 OGD/R 后 2~6 h 神经元的再生被抑制,表明脑缺血会直接抑制

成体神经再生,即缺血后成体神经再生的增强并不是由缺血刺激直接引发的,可能是由周围微环境的变化引起。具体的作用机制还需要进一步探究。

综上所述,本实验结果提示缺氧缺糖损伤显著促进了少突胶质细胞和星形胶质细胞新生,同时抑制了神经干细胞向神经元方向的分化。转录分析结果提示 EPOR 以及 PBK 可能参与神经干细胞向少突胶质细胞方向的分化,为进一步研究缺血后神经再生机制提供了基础。未来的研究应继续探讨 EPOR 以及 PBK 参与缺血后少突胶质细胞再生的机制以及其他的调节通路,为临床转化提供更多可干预的分子靶点。

参考文献:

- [1] 刘正, 邵子玮, 袁文华, 等. Eph/ephrin 信号通路与神经干细胞的增殖和分化 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(13): 2101-2106.
- [2] Chen L, Huang K, Wang R, et al. Neuroprotective effects of cerebral ischemic preconditioning in a rat middle cerebral artery occlusion model; the role of the notch signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8168720.
- [3] Bowman AN, Van AR, Palmer TD, et al. Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/ β -catenin-responsive neural stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(18): 7324-7329.
- [4] Zhou Z, Dun L, Wei B, et al. Musk Ketone induces neural stem cell proliferation and differentiation in cerebral ischemia via activation of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Neuroscience, 2020, 435: 1-9.
- [5] Zhao H, Wang R, Tao Z, et al. Ischemic postconditioning relieves cerebral ischemia and reperfusion injury through activating T-LAK cell-originated protein kinase/protein kinase b pathway in rats [J]. Stroke, 2014, 45(8): 2417-2424.
- [6] Han Z, Zhao H, TAO Z, et al. TOPK promotes microglia/macrophage polarization towards M2 phenotype via inhibition of HDAC1 and HDAC2 activity after transient cerebral ischemia [J]. Aging Dis, 2018, 9(2): 235-248.
- [7] 顾恩妍, 哈福, 李林凤, 等. 神经干细胞分离培养方法的介绍 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(11): 53-57.
- [8] 张凤兰, 杨璐军, 朱红梅, 等. 不同胎龄小鼠脑组织中神经干细胞所占比例的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 48-52.
- [9] 卢延华, 管博文, 刘旭, 等. 模拟衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 153-160.
- [10] 王菲, 原一桐, 高渊涛, 等. tdTomato 转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 1-9.
- [11] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death [J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 913-922.
- [12] Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, et al. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage [J]. Brain Res, 2000, 886(1-2): 190-207.
- [13] Hinman JD. The back and forth of axonal injury and repair after stroke [J]. Curr Opin Neurol, 2014, 27(6): 615-623.
- [14] Li S, Overman JJ, Katsman D, et al. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke [J]. Nat Neurosci, 2010, 13(12): 1496-1504.
- [15] 曾晨曦, 袁萍, 孙军. 抗肿瘤药物: Pbk/TOPK 抑制剂的研究进展 [J]. 生命的化学, 2018, 38(1): 150-155.
- [16] 高志, 陈军梅, 陈迪, 等. TOPK 与部分常见恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. 微循环学杂志, 2019, 29(4): 88-91.
- [17] Mao LM, Wang JQ. Synaptically localized mitogen-activated protein kinases: local substrates and regulation [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(9): 6309-6315.
- [18] Zhao H, Wang R, Tao Z, et al. Activation of T-LAK-cell-originated protein kinase-mediated antioxidation protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. FEBS J, 2014, 281(19): 4411-4420.
- [19] Nguyen AQ, Cherry BH, Scott GF, et al. Erythropoietin: powerful protection of ischemic and post-ischemic brain [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(11): 1461-1475.
- [20] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(8): 4635-4640.
- [21] Bennis Y, Sarlon-Bartoli G, Guillet B, et al. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential [J]. Thromb Haemost, 2012, 10(9): 1914-1928.
- [22] Ding J, Wang J, Li QY, et al. Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT pathway of carbamylated erythropoietin in hypoxic neurons [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(7): 5051-5060.
- [23] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology [J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(1): 7-35.
- [24] Belozor OS, Yakovleva DA, Potapenko IV, et al. Extracellular S100 β disrupts bergman glia morphology and synaptic transmission in cerebellar purkinje cells [J]. Brain Sci, 2019, 9(4): 80.
- [25] 胡玲, 余彬华, 陈晓刚, 等. S100 β 在体外培养大鼠大脑皮质星形胶质细胞损伤后的表达研究 [J]. 华西医学, 2009, 24(9): 2367-2369.
- [26] Yasuda Y, Tateishi N, Shimoda T, et al. Relationship between S100 β and *Gfap* expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia [J]. Brain Res, 2004, 1021(1): 20-31.
- [27] Wiltout C, Lang B, Yan Y, et al. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis [J]. Neurochem Int, 2007, 50(7-8): 1028-1041.
- [28] Williamson MR, Jones TA, Drew MR. Functions of subventricular zone neural precursor cells in stroke recovery [J]. Behav Brain Res, 2019, 376: 112209.

[收稿日期] 2020-04-28

丁振禹,何耀华. 阿托伐他汀对 ApoE^{-/-}小鼠关节损伤的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 16-21.

Ding ZY, He YH. The protective effect of atorvastatin on joint injury in ApoE^{-/-} mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 16-21.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 01. 003

阿托伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠关节损伤的保护作用

丁振禹,何耀华*

(上海交通大学附属第六人民医院骨科,上海 200233)

【摘要】 目的 观察阿托伐他汀对 ApoE^{-/-}小鼠关节损伤的保护作用。**方法** 将 40 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组和药物组,高脂饲料喂养,药物组给予阿托伐他汀 10 mg/(kg·d)灌胃,模型组给予等量生理盐水灌胃。20 只对照组 C57BL/6J 小鼠普通饲料喂养。全自动生化分析仪检测血脂变化,ELISA 方法检测血清 IL-6、TNF-α 水平,取膝关节组织标本做 HE 染色、番红 O-固绿染色观察组织形态学变化,透射电镜观察软骨细胞超微结构变化。**结果** 与模型组相比,阿托伐他汀干预药物组血清 TC、TG 和 LDL-C 均明显下降($P<0.01$),而 HDL-C 水平升高($P<0.01$),血清炎症因子 IL-6 和 TNF-α 明显下降($P<0.01$),软骨细胞超微结构的损伤明显改善,膝关节滑膜炎症细胞浸润减少,软骨组织结构损伤和骨化程度明显减轻,显著延缓疾病进程。**结论** 阿托伐他汀可通过调节血脂和下调炎症因子对 ApoE^{-/-}小鼠关节损伤产生保护作用。

【关键词】 阿托伐他汀;血脂;炎症因子;关节损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0016-06

The protective effect of atorvastatin on joint injury in ApoE^{-/-} mice

DING Zhenyu, HE Yaohua*

(Department of Orthopedics, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of atorvastatin on joint injury in ApoE^{-/-} mice. **Methods** Forty ApoE^{-/-} mice were randomly divided into a model group and a drug group. All mice were fed a high-fat diet. The drug group received atorvastatin 10 mg/(kg·d), and the model group received the same amount of normal saline. Twenty normal C57BL/6J mice (control group) were fed a normal diet. We used an automatic biochemical analyzer to detect changes in blood lipids, and ELISA was used to detect serum IL-6 and TNF-α concentrations. Knee joint tissue samples were harvested for HE staining and safranin O-fast green staining to observe tissue morphological changes, and transmission electron microscopy was used to observe chondral ultrastructural changes. **Results** Compared with the model group, serum TC, TG, and LDL-C concentrations in the atorvastatin (drug) group were significantly decreased ($P<0.01$), while HDL-C concentrations increased ($P<0.01$), and the serum inflammatory factors, IL-6 And TNF-α decreased significantly ($P<0.01$). Chondral ultrastructural damage improved significantly with atorvastatin. Inflammatory cell infiltration in the synovial membrane of the knee joint decreased, as did the degree of cartilage tissue structural damage and ossification, which significantly delayed the disease process. **Conclusions** Atorvastatin can protect against joint damage in ApoE^{-/-} mice by regulating blood lipids and down-regulating inflammatory factors.

【Keywords】 atorvastatin; blood lipids; inflammatory factors; joint injury

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81871755)。

【作者简介】丁振禹(1989—)男,博士,骨科医师,研究方向:骨、关节、软组织损伤修复。E-mail: d_zhenyu@126.com

【通信作者】何耀华(1970—)男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:骨、关节、软组织损伤修复。E-mail: heyaohua@sjtu.edu.cn

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的关节退行性疾病,肥胖的中老年人发病率比较高^[1-2]。OA 发病机制复杂,而且发病后随着疾病进展病理改变难以逆转,因此 OA 的早期有效预防和治疗,延缓疾病进程尤其重要。流行病学资料调查显示 OA 与肥胖、脂质代谢紊乱及炎症因素密切相关,脂代谢异常会促进骨关节炎的发展^[3],因此通过改善血脂水平、减少炎症发生可能是预防和治疗 OA 的一种重要措施。研究发现阿托伐他汀除降低血脂外,还具有抗炎、抗氧化、改善血管内皮细胞的功能,发挥重要的抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 作用^[4],但其在 OA 发生发展的作用研究较少。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 参与脂蛋白代谢和转化过程, ApoE 基因突变或缺失,会导致人和动物血脂代谢紊乱,血脂水平升高。ApoE 基因敲除 (apolipoprotein E-knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠模型已被广泛应用于高血脂及相关疾病的研究。本实验选择 ApoE^{-/-}小鼠加喂高脂饲料诱导构建高脂血症动物模型,以血脂、血清炎症因子 IL-6、TNF- α 及膝关节组织病理学变化为指标,观察阿托伐他汀干预治疗对 ApoE^{-/-}小鼠关节损伤的保护作用,为他汀类药物的作用应用于 OA 的预防治疗奠定良好基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级雄性 ApoE^{-/-}小鼠 40 只,6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,两批小鼠体重均为 18~22 g,均购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2018-0006],动物饲养于上海市第六人民医院动物实验室 [SYXK (沪) 2016-0020],动物实验通过上海市第六人民医院动物福利伦理委员会批准 (NO:2019-0058)。实验研究过程中遵循替代、减少、优化的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

阿托伐他汀片 (每片 20 mg,辉瑞制药有限公司,批号 DG4709);小鼠白介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (D721022-0048)、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (D721026-0048) 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;番红 O-固绿染液 (GI374) 购自 Solarbio 公司。

全自动生化分析仪 (roche cobas 8000); Olympus-BX51 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); HT7500 电镜 (日本 HITACHI 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组、给药和模型建立

选取 6 周龄 ApoE^{-/-}雄性小鼠 40 只,随机分为模型组和药物组,高脂饲料喂养 (脂肪 21%+胆固醇 0.15%+基础饲料 78.85%),药物组阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) (生理盐水溶解) 灌胃,模型组等量生理盐水灌胃。对照组选取 20 只同龄 C57BL/6J 雄性小鼠,普通饲料喂养。

1.3.2 标本取材及处理

每组小鼠分别喂养至 18 周和 30 周各取 10 只,腹腔麻醉,左心室取血检测血清指标;剪取膝关节部位组织标本用于 HE 染色、番红 O-固绿染色;打开膝关节腔,取胫骨平台软骨做电镜检测。

1.3.3 血清指标检测

取动物全血室温下静置 2 h,3000 r/min 离心 10 min,收集血清。全自动生化分析仪检测总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 含量。按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤,酶标仪检测样本 OD 值,计算血清 IL-6、TNF- α 的浓度。

1.3.4 HE 和番红 O-固绿染色

各组小鼠膝关节标本,室温条件下 4% 多聚甲醛固定 3 d,然后 10% EDTA 溶液中浸泡脱钙,每 5 d 换液一次,室温下脱钙 4 周。用流水冲洗,石蜡包埋,组织连续切片厚度 5 μ m。

(1) HE 染色

膝关节组织切片二甲苯常规脱蜡处理;苏木素染色 10 min,伊红染色 30 min,梯度乙醇脱水各 10 s;二甲苯 I 溶液、二甲苯 II 溶液、二甲苯 III 溶液各 10 min;中性树胶封片,显微镜下观察膝关节组织学变化。

(2) 番红 O-固绿染色

膝关节组织切片常规二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水;1% 固绿染色 1.5 min,0.1% 乙酸分化 10 s,再入 0.5% 番红 O 染色 1 min;95% 乙醇溶液分色 30 s,蒸馏水冲洗 3 min,常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜下观察膝关节软骨内蛋白多糖 (染色下呈红色) 的丢失情况以及膝关节软骨组织结构破坏的程度。

1.3.5 电镜

切取膝关节胫骨平台全层软骨组织,组织修块

约 1 mm^3 , 先置于 3% 戊二醛前固定 2 h (4℃); 再后固定于 1% 锇酸 2 h (4℃), 梯度乙醇及丙酮脱水, Epon812 包埋, 半薄切片定位, 超薄切片 70 nm, 醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染色, 透射电镜观察软骨组织超微结构。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件, 计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血脂水平

18 周龄和 30 周龄小鼠, 与对照组比较, 模型组血清 TC、TG 和 LDL-C 均升高 ($P < 0.01$), HDL-C 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 药物组给予阿托伐他汀干预治疗后血清 TC、TG 和 LDL-C 均明显下降 ($P < 0.01$), 而 HDL-C 水平升高 ($P < 0.01$)。30 周和 18 周小鼠相同组内血脂水平比较无统计学意义。见表 1。

2.2 各组小鼠血清炎症因子水平

18 周龄和 30 周龄小鼠, 与对照组比较, 模型组血清 IL-6 和 TNF- α 均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比

较, 药物组给予阿托伐他汀干预治疗后血清 IL-6 和 TNF- α 均下降 ($P < 0.01$); 30 周模型组和药物组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平均高于 18 周相同组水平 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 HE 染色

18 周龄小鼠, 对照组膝关节软骨结构完整, 表面光滑, 滑膜无炎症细胞浸润; 模型组关节软骨面粗糙, 软骨细胞排列紊乱、数量减少, 滑膜有炎症细胞浸润, 关节腔内有赘生物形成; 药物组较模型组关节损伤明显减轻, 关节软骨表面光滑, 结构完整, 软骨细胞数量减少, 滑膜未见明显病理学改变。见图 1。

2.4 电镜

18 周龄小鼠, 对照组膝关节软骨细胞呈椭圆形, 细胞表面有丰富的微绒毛样突起, 细胞核完整, 染色质均匀, 胞质内有丰富的粗面内质网, 线粒体结构正常。模型组软骨细胞表面微绒毛突起明显减少, 核膜不完整, 染色质聚集、分布不均匀, 粗面内质网减少, 线粒体呈髓样变性, 自噬小体增多。药物组较模型组软骨细胞损伤减轻, 细胞表面微绒毛突起略有增加, 染色质聚集程度减轻, 粗面内质网增多, 部分线粒体呈空泡状, 仍可见自噬小体。见图 2。

表 1 各组小鼠血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 1 Levels of blood lipids in different groups

鼠龄 Mice age	分组 Groups	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
18 周 18 Weeks	对照组 Control group	4.34 $\pm$ 0.62	1.14 $\pm$ 0.10	1.94 $\pm$ 0.13	1.69 $\pm$ 0.13
	模型组 Model group	16.88 $\pm$ 2.05**	1.83 $\pm$ 0.16**	0.61 $\pm$ 0.16**	14.66 $\pm$ 0.87**
	药物组 Drug group	11.00 $\pm$ 1.36 $\Delta\Delta$	1.35 $\pm$ 0.27 $\Delta\Delta$	0.83 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	9.37 $\pm$ 0.93 $\Delta\Delta$
30 周 30 Weeks	对照组 Control group	4.85 $\pm$ 0.69	1.12 $\pm$ 0.23	1.94 $\pm$ 0.30	1.63 $\pm$ 0.41
	模型组 Model group	21.56 $\pm$ 1.41**	3.76 $\pm$ 0.25**	0.57 $\pm$ 0.13**	19.02 $\pm$ 0.97**
	药物组 Drug group	12.06 $\pm$ 0.66 $\Delta\Delta$	1.25 $\pm$ 0.29 $\Delta\Delta$	0.93 $\pm$ 0.62 $\Delta\Delta$	10.38 $\pm$ 3.19 $\Delta\Delta$

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

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

表 2 各组小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 2 Serum levels of IL-6 and TNF- α in different groups

鼠龄 Mice age	分组 Groups	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
18 周 18 Weeks	对照组 Control group	30.11 $\pm$ 0.36	96.84 $\pm$ 3.99
	模型组 Model group	315.80 $\pm$ 1.21**	295.10 $\pm$ 6.29**
	药物组 Drug group	89.52 $\pm$ 0.59 $\Delta\Delta$	102.31 $\pm$ 5.67 $\Delta\Delta$
30 周 30 Weeks	对照组 Control group	33.96 $\pm$ 4.99	99.98 $\pm$ 3.89
	模型组 Model group	374.46 $\pm$ 23.30** $\Delta\Delta$	342.69 $\pm$ 16.73** $\Delta\Delta$
	药物组 Drug group	103.21 $\pm$ 4.84 $\Delta\Delta$ Δ	117.43 $\pm$ 4.94 $\Delta\Delta$ Δ

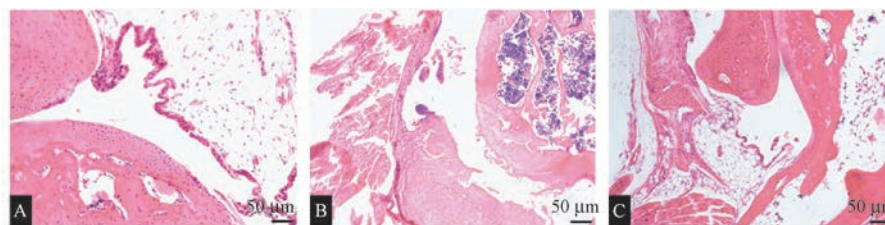
注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; 同组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$. Compared with the same group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$.

2.5 番红 O-固绿染色

30 周龄小鼠,正常对照组关节软骨表面光滑,软骨基质呈均匀紫红色,软骨下骨呈绿色。模型组关节软骨表面结构明显破坏,关节软骨剥脱,软骨

基质番红 O 染色严重丢失,骨化严重,关节腔内赘生物形成明显增多;与模型组比较,药物组关节软骨结构损伤减轻,关节软骨表面粗糙不平,软骨基质番红 O 染色增多。见图 3。

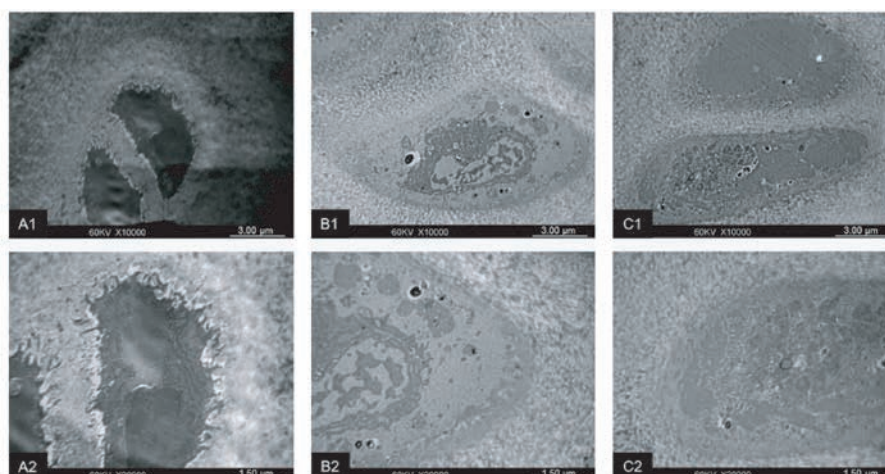


注:A:对照组;B:模型组;C:药物组。

图 1 各组小鼠膝关节 HE 染色组织学观察

Note. A, Control group. B, Model group. C, Drug group.

Figure 1 Histological observation of knee joints by HE staining in different groups

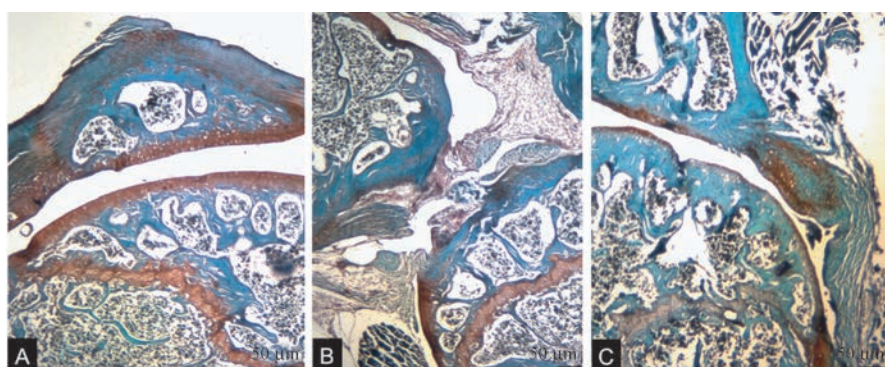


注:A1-A2:对照组;B1-B2:模型组;C1-C2:药物组。

图 2 各组小鼠关节软骨细胞超微结构透射电镜观察

Note. A1-A2, Control group. B1-B2, Model group. C1-C2, Drug group.

Figure 2 Observation of Chondral ultrastructure by transmission electron microscope in different groups



注:A:对照组;B:模型组;C:药物组。

图 3 各组小鼠膝关节番红 O-固绿染色组织学观察

Note. A, Control group. B, Model group. C, Drug group.

Figure 3 Histological observation of knee joints by Safranin O-Fast Green staining in different groups

3 讨论

OA 是一种以关节滑膜炎、关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病,膝关节是疾病好发部位。近年来随生活水平提高及人们膳食结构的改变,大量高脂、高糖膳食摄入及运动减少,以肥胖、高血脂及高血糖为主要表现的代谢综合征呈增长趋势^[5],脂代谢的紊乱导致骨代谢异常,致使 OA 患病率不断增加。越来越多的证据^[6-7]表明 OA 不单是生物学应力改变或与衰老相关的疾病,脂质代谢紊乱、体液炎症性介质参与疾病的发生进展,血清胆固醇是 OA 进展的危险因素。载脂蛋白 ApoE 是低密度脂蛋白和肝细胞乳糜微粒残粒受体的配体,与脂蛋白的代谢密切相关。ApoE^{-/-}小鼠可以自发产生高脂血症、伴随炎症因子产生增多促进形成 AS,是研究 AS 发病机制以及治疗等方面经典的动物模型之一,喂养高脂饮食能加速疾病进程^[8-10]。本实验观察到 ApoE^{-/-}小鼠喂饲高脂饲料动物血脂、炎症因子 IL-6、TNF- α 升高,膝关节有滑膜炎细胞浸润、软骨面损伤、关节腔内有赘生物形成等 OA 表现,而且随小鼠周龄增加,膝关节软骨表面结构破坏程度加重,骨化严重,关节腔内赘生物形成明显增多,进一步证实 OA 的发生发展与高血脂及炎症因子密切相关。

研究发现 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等细胞因子在 OA 疾病进展中起重要作用,引起关节软骨基质降解、骨质的破坏及滑膜细胞凋亡^[11-12],脂肪组织也能合成 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子,特别是髌下脂肪垫可释放多种炎症及脂肪因子参与 OA 进展^[13]。因此降低血脂、抑制炎症因子的产生可能是治疗 OA 的一种重要策略。阿托伐他汀是临床治疗高脂血症的首选他汀类药物,主要作用部位在肝,能够竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶,接受阿托伐他汀治疗的患者在 TC、TG 和 HDL-C 方面有明显改善,阿托伐他汀能阻断或者逆转 AS 的发生和发展,是最常用的治疗和预防心血管疾病的药物^[14-15]。临床研究证实冠心病和高血压患者服用阿托伐他汀可下调血清促炎因子 IL-6 和上调 TGF- β 水平,减少并发症的发生^[16]。阿托伐他汀显著降低 AS 模型动物血脂及炎症因子 IL-6、TNF α 水平,动脉粥样斑块变小、抑制 AS 疾病的发展^[8, 17]。研究发现 OA 及 AS 的发生发展存在共同的危险因素,如高龄、肥胖、血脂代谢紊乱、慢性炎症等^[18-19]。转基因高脂动物模

型证实,饲用阿托伐他汀能明显降低血清胆固醇水平,有效缓解 OA 进程^[20]。本实验观察到阿托伐他汀干预治疗的 ApoE^{-/-}小鼠,膝关节损伤程度减轻,明显延缓病程进展,与上述结果一致,推测他汀类药物通过改善血脂水平、减少炎症因子 IL-6、TNF α 的产生可能为 OA 提供一定的防治作用。

他汀类药物在 OA 中作用的研究已引起人们的关注,临床观察发现,心血管疾病患者服用他汀类药物能减少 OA 发生^[21],体外实验^[22]发现阿托伐他汀在白介素-1 诱导的大鼠骨关节炎软骨移植培养模型中,具有抗炎和软骨保护作用。动物实验^[23]证明阿托伐他汀减轻谷氨酸钠碘乙酸(monosodium iodoacetate, MIA)诱导的大鼠 OA 疼痛,并通过抑制氧化应激反应保护软骨降解损伤。以上结果进一步证明了阿托伐他汀在 OA 防治中潜在的价值。

综上所述,阿托伐他汀通过调节血脂代谢、减少炎症因子产生等机制发挥 OA 保护作用,明显延缓疾病进程,本实验为阿托伐他汀应用于 OA 的预防治疗提供了更充实的实验依据,阿托伐他汀在临床用途广泛,但确切的机制目前尚不完全清楚,有待进一步深入研究和探讨。

参考文献:

- [1] Nelson AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(3): 319-325.
- [2] Kulkarni K, Karssiens T, Kumar V, et al. Obesity and osteoarthritis [J]. Maturitas, 2016, 89: 22-28.
- [3] Liu Y, Zhang H, Liang N, et al. Prevalence and associated factors of knee osteoarthritis in a rural Chinese adult population: an epidemiological survey [J]. BMC Public Health, 2016, 16: 94.
- [4] Liping Z, Xiufang L, Tao Y, et al. Efficacy comparison of rosuvastatin and atorvastatin in the treatment of atherosclerosis and drug safety analysis [J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31(5): 2203-2208.
- [5] Derks TG, van Rijn M. Lipids in hepatic glycogen storage diseases: pathophysiology, monitoring of dietary management and future directions [J]. J Inher Metab Dis, 2015, 38(3): 537-543.
- [6] Farnaghi S, Crawford R, Xiao Y, et al. Cholesterol metabolism in pathogenesis of osteoarthritis disease [J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20(2): 131-140.
- [7] 柏茂盛, 赵建宁, 洪叶. 脂代谢与骨代谢信号通路及与骨代谢相关疾病的关系: 理论进展与热点方向 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(20): 3269-3274.
- [8] Guo X, Wang L, Xia X, et al. Effects of atorvastatin and/or probucol on recovery of atherosclerosis in high-fat-diet-fed

- apolipoprotein E-deficient mice [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1445–1453.
- [9] 王成, 胡乃华, 余琳媛, 等. 降脂模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 121–130.
- [10] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM_{2.5} 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 33–39.
- [11] Malemud CJ. Negative regulators of JAK/STAT signaling in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 484.
- [12] Blom AB, van der Kraan PM, Van Den Berg WB. Cytokine targeting in osteoarthritis [J]. Curr Drug Targets, 2007, 8(2): 283–292.
- [13] Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Runhaar J, et al. The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(7): 876–882.
- [14] van Leuven SI, Kastelein JJ. Atorvastatin [J]. Expert Opin Pharmacother, 2005, 6(7): 1191–1203.
- [15] Zhu YC, Jiang XZ, Bai QK, et al. Evaluating the efficacy of atorvastatin on patients with carotid plaque by an innovative ultrasonography [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(3): 830–837.
- [16] Sepehri Z, Masoumi M, Ebrahimi N, et al. Atorvastatin, losartan and captopril lead to upregulation of TGF- β , and downregulation of IL-6 in coronary artery disease and hypertension [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168312.
- [17] Sun B, Rui R, Pan H, et al. Effect of combined use of astragaloside IV (AsIV) and Atorvastatin (AV) on expression of PPAR- γ and inflammation-associated cytokines in atherosclerosis rats [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 6229–6236.
- [18] Zhuo Q, Yang W, Chen J, et al. Metabolic syndrome meets osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(12): 729–737.
- [19] June RK, Liu-Bryan R, Long F, et al. Emerging role of metabolic signaling in synovial joint remodeling and osteoarthritis [J]. J Orthop Res, 2016, 34(12): 2048–2058.
- [20] Gierman LM, Kuhnast S, Koudijs A, et al. Osteoarthritis development is induced by increased dietary cholesterol and can be inhibited by atorvastatin in APOE * 3 Leiden.CETP mice--a translational model for atherosclerosis [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(5): 921–927.
- [21] Veronese N, Koyanagi A, Stubbs B, et al. Statin use and knee osteoarthritis outcomes: a longitudinal cohort study [J]. Arthritis care Res (Hoboken), 2019, 71(8): 1052–1058.
- [22] Pathak NN, Lingaraju MC, Balaganur V, et al. Anti-inflammatory and chondroprotective effects of atorvastatin in a cartilage explant model of osteoarthritis [J]. Inflamm Res, 2015, 64(3–4): 161–169.
- [23] Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, et al. Effect of atorvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy [J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(3): 513–519.

[收稿日期]2020-08-10

孙晓峰,刘涛,曾贵荣,等. 左归丸对磷酸胺氮芥体外诱导损伤颗粒细胞自噬与凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 22-26.

Sun XF, Liu T, Zeng GR, et al. Effect of Zuogui pill on autophagy and apoptosis of injured granulosa cells induced by phosphoramid mustard *in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 22-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.004

左归丸对磷酸胺氮芥体外诱导损伤颗粒细胞 自噬与凋亡的影响

孙晓峰¹, 刘 涛², 曾贵荣³, 陈勇超², 伍参荣^{4*}, 乔 江⁵

(1.湖南中医药大学医学院组织学与胚胎学教研室,长沙 410208; 2.湖南中医药大学医学院临床医学专业,长沙 410208; 3.湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410331; 4.湖南中医药大学医学院免疫学教研室,长沙 410208; 5.湖南中医药大学附属第一医院妇产科,长沙 410007)

【摘要】 目的 探讨磷酸胺氮芥(phosphoramid mustard, PM)诱导卵巢颗粒细胞损伤的机制及左归丸含药血清对受损颗粒细胞自噬与凋亡的影响。**方法** 制备左归丸含药血清,体外培养原代大鼠卵巢颗粒细胞,待细胞生长至底壁的 75%~80%时随机分为 4 组:①对照组(Control);②模型组(M);③左归丸含药血清组(10%ZGW);④模型+左归丸含药血清组(M+10%ZGW)、以 PM 处理②④组 24 h 建立化疗源性颗粒细胞损伤模型后,①②组中加入 10%正常大鼠血清,③④组中加入 10%左归丸含药血清,37℃,5% CO₂ 条件下培养 24 h。流式细胞术检测各组颗粒细胞凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测卵巢自噬启动因子 Beclin-1、微管结合蛋白轻链 3(LC3B)、自噬受体蛋白 P62、凋亡蛋白 Bax、Caspase3 的表达。**结果** 与对照组相比:模型组细胞凋亡率明显上升,Beclin-1、LC3B、Bax 及 Caspase3 蛋白表达量增高,P62 蛋白表达量下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。10%左归丸含药血清可显著降低模型组颗粒细胞凋亡率,下调受损颗粒细胞中 Beclin-1、LC3B、Bax 及 Caspase3 蛋白的表达,上调受损颗粒细胞中 P62 蛋白的表达,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PM 诱导了卵巢颗粒细胞损伤,促进了颗粒细胞凋亡,激活了颗粒细胞自噬/溶酶体降解途径;10%左归丸含药血清可降低化疗损伤性颗粒细胞凋亡率,与自噬相关蛋白的表达相关。

【关键词】 左归丸含药血清;磷酸胺氮芥;颗粒细胞;自噬;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0022-05

Effect of Zuogui pill on autophagy and apoptosis of injured granulosa cells induced by phosphoramid mustard *in vitro*

SUN Xiaofeng¹, LIU Tao², ZENG Guirong³, CHEN Yongchao², WU Canrong^{4*}, QIAO Jiang⁵

(1. Department of Histoembryology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.

2. Clinical Medical Undergraduate, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208.

3. Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs&Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331.

4. Department of Immunology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208.

5. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of traditional Chinese Medicine, Changsha 410007)

【基金项目】 湖南省自然科学基金(2018JJ2290);国家自然科学基金(81774362,81303004)。

【作者简介】 孙晓峰(1975—),女,副教授,博士,硕士生导师,从事生殖内分泌疾病及肿瘤基础性研究工作。E-mail:2642724115@qq.com

【通信作者】 伍参荣(1951—),女,教授,博士生导师,从事生殖免疫研究工作。E-mail:001194@hnetcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of phosphoramidate mustard (PM)-induced ovarian granulosa cell damage and the effect of serum containing Zuogui pill on autophagy and apoptosis of damaged granulosa cells. **Methods** Serum containing Zuogui pill was prepared and primary rat ovarian granulosa cells were cultured *in vitro*. At 75% ~ 80% confluence, the cells were divided into four groups: group 1: control; group 2: model (M); group 3: serum containing Zuogui pill (10% ZGW); and group 4: model + serum containing Zuogui pill (M + 10% ZGW). The model of chemotherapy-induced granulosa cell injury was established in groups 2 and 4 after PM treatment for 24 hours. In groups 1 and 2, 10% normal rat serum was added. In groups 3 and 4, 10% serum containing Zuogui pill was added, followed by culture for 24 hours at 37°C with 5% CO₂. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of granulosa cells in each group and expression of Beclin-1, LC3B, P62, Bax, and Caspase-3 was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate of the model group was increased significantly, expression of Beclin-1, LC3B, Bax, and Caspase-3 protein was increased, and expression of P62 protein was decreased ($P < 0.05$). The 10% serum containing Zuogui pill significantly reduced the apoptosis rate of granulosa cells in the model group, downregulated the expression of Beclin-1, LC3B, Bax, and Caspase-3 protein in damaged granulosa cells, and upregulated the expression of P62 protein in damaged granulosa cells ($P < 0.05$). **Conclusions** PM damages ovarian granulosa cells, promotes apoptosis of granulosa cells, and activates the autophagy/lysosome degradation pathway in granulosa cells. The 10% serum containing Zuogui pill reduces the apoptosis rate of chemotherapy-treated granulosa cells, which is related to expression of autophagy proteins.

【Keywords】 serum containing Zuogui pill; phosphoramidate mustard; granulosa cells; autophagy; apoptosis

卵巢早衰 (Premature ovarian failure, POF) 是指各种因素导致的女性卵巢储备功能下降,由此引发提前绝经(40 岁之前)以及低雌激素、高促性腺激素症状。近年来医源性因素逐渐发展为 POF 的重要因素^[1-2],化疗为其中之一,常见药物有环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)、顺铂等。化疗所造成的 POF 给女性患者带来严重的生理问题和心理困扰^[3]。因此,如何恢复化疗后女性卵巢功能,从而提高患者生存质量显得尤为重要。颗粒细胞围绕在卵母细胞周围,不仅为卵母细胞提供营养支持,而且对卵泡的发育和成熟起重要作用^[4-5]。大量研究证实:CTX 在体内被激活成具有活性的细胞毒性代谢物丙烯醛和 PM,通过形成共价 DNA 加合物造成 DNA 结构破坏,从而阻断 DNA 复制,抑制细胞的增殖,甚至诱导其凋亡。左归丸是中医妇科临床治疗 POF 的常用方药,临床多以其为基本方加减。本课题组前期药效学研究的卵巢组织免疫组化检测结果显示:在体内动物实验中,左归丸降低了化疗源性 POF 小鼠颗粒细胞凋亡^[6]。自噬与凋亡能通过多种通路相互协调转化,共同促进细胞死亡,而目前关于 CTX 损伤颗粒细胞以及左归丸保护颗粒细胞的机制中是否存在自噬过程的研究甚少。本实验以 PM(CTX 的体外活性成分)建立化疗源性体外颗粒细胞损伤模型,通过流式细胞术和 Western blot 检测各实验组颗粒细胞凋亡率及自噬与凋亡相关蛋白如卵巢自噬启动因子 Beclin-1、微管结合蛋

白轻链 3(LC3BI/LC3BII)、自噬受体蛋白 P62、凋亡蛋白 Bax、Caspase3 的表达,进一步探讨 CTX 的活性成分——PM 建立体外诱导颗粒细胞损伤模型以及左归丸含药血清对颗粒细胞损伤的保护作用及相关机制,为进一步揭示此过程中是否存在自噬与凋亡的交叉对话关系奠定基础,以期临床靶向治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 60 只,SPF 级,体重 250~270 g,8 周龄,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],在湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室 SPF 级实验室饲养[SYXK(湘)2015-0016]。动物实验经湖南省药物安全评价研究中心伦理委员会批准(2019024),过程中遵循实验动物学的 3R 原则。

1.1.2 实验细胞

原代大鼠卵巢颗粒细胞,批号:iCell201910027,赛百慷上海生物技术股份有限公司产品。

1.2 主要试剂与仪器

左归丸方剂由熟地、山药、枸杞、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶组成,购自湖南中医药大学附属第一医院,按照 8:4:4:3:4:4:4:4 比例制成

生药 1 g/mL 的中药浸膏备用;PM(江苏倍达医药科技有限公司合成,批号 20180908);电泳仪,北京六一公司产品;化学发光仪,博路腾公司产品;流式细胞仪, CytoFlex 公司产品;倒置显微镜, OLYMPUS IX71 产品; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,批号:640914, Biolegend 产品;BCA 蛋白定量试剂盒,批号:P0012S,碧云天产品;RIPA 蛋白裂解液,批号:P0013B,碧云天产品;二抗:Anti Rabbit IgG/HRP,批号:AS014Abclonal 公司产品。一抗:兔抗 P62,批号:A19700、兔抗 BECLIN,批号:A7353、兔抗 CASP3,批号:A19654、兔抗 BAX,批号:A19684、兔抗 LC3B,批号:A19665,均为 Abclonal 公司产品; β -actin 内参,批号:AC026, Abclonal 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 造模与分组

将原代大鼠卵巢颗粒细胞接种于 96 孔板中,待细胞生长至底壁的 75%~80%时,将细胞分为 4 组:①对照组(Control);②模型组(M);③左归丸含药血清组(10%ZGW);④模型+左归丸含药血清组(M+10%ZGW)。除对照组及左归丸含药血清组外,其余 2 组每孔加入 200 μ L 终浓度为 30 μ mol/L 的 PM 进行处理,37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 细胞培养箱,培养 24 h。

1.3.2 左归丸含药血清制备与给药

SD 大鼠 60 只随机分为 2 组:即正常血清组和 ZG 血清组各 30 只。1 g/mL 的 ZG 浸膏,根据成人与大鼠体表面积,换算成大鼠的用量,相当于临床等效剂量的 9 倍,即按照 245.7 g/(kg·d),每天分两次给 ZG 血清组大鼠灌服,连续 3 d,正常血清组给予等量纯净水,于末次灌胃后 2~2.5 h 麻醉后腹主动脉采血,静置 30 min,离心后,无菌分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存,实验前 56 $^{\circ}$ C 30 min 灭活,0.22 μ m 滤器过滤后使用。PM 处理相应组 24 h 后,Control 组及 M 组加入 10% 正常大鼠血清;10%ZGW 组及 M+10%ZGW 组加入 10% 左归丸含药血清,37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱,培养 24 h。

1.3.3 流式细胞术测定细胞凋亡情况

各组细胞离心收集,用 4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 洗涤 2 次,然后用 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞,调节其浓度为 10⁶/mL,取 100 μ L 细胞悬浮于 5 mL 流式管中,加入 5 μ L Annexin V-APC 混匀后,再加入 5 μ L Propidium Iodide 混匀,于室温避光孵育 15 min,随后重悬于 400 μ L PBS,400 目筛网过滤,加样于流式

细胞仪(FACS)检测细胞凋亡。获得细胞凋亡数据后用 ModFitLT 软件进行细胞凋亡相对定量分析。实验重复 3 次,结果取 3 次平均值。

1.3.4 Western blot 检测各组目标蛋白的表达

用胰酶消化好各组细胞后加入新鲜培养基,反复吹打使其脱壁并分散,制成细胞悬液,取各组适量细胞悬液置于已编号的 EP 管内经 1000 r/min 的速度离心 5 min 后,弃去上清液,加入适量生理盐水再次离心,弃去生理盐水。在 EP 管内加入一定量 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白后,以 14000 r/min 的速度离心 10 min,取上清液。按照相应的稀释倍数将上样缓冲液加入上清液中,在 105 $^{\circ}$ C 环境中变性蛋白 10 min,备用。变性后的各组蛋白经 SDS 凝胶电泳(1~2 h)、转膜(60~80 min)、封闭(30~60 min)、孵一抗(4 $^{\circ}$ C 过夜)、洗膜(10 min $\times$ 3 次)、孵二抗(60 min)、再次洗膜(10 min $\times$ 3 次)等步骤后,使用 ECL 显影液进行显影,处理图像,定性和定量分析各组条带 Beclin-1、LC3B、Bax 及 P62 的表达。实验重复 3 次,结果取 3 次平均值。

1.4 统计学方法

计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用 SPSS 16.0 进行统计分析,统计学意义的水平设定为 $P < 0.05$,用 Leven's test 方法检验正态性和方差齐性,如果符合正态性和方差齐性,用单因素方差分析(ANOVA)和 LSD- t 进行统计分析。

2 结果

2.1 左归丸含药血清对颗粒细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测凋亡结果见表 1、图 1。可知:模型组较对照组颗粒细胞早期和晚期凋亡率上升,差异具有统计学意义。而 10%左归丸含药血清不仅能降低正常颗粒细胞的凋亡率,还可以降低 PM 诱发的卵巢颗粒细胞凋亡,且早期凋亡率有近 4 倍差异,晚期凋亡率也有超过 2 倍的差异,差异具有统计学意义。

2.2 左归丸含药血清对 Bax、LC3B、Beclin-1、P62 及 Caspase3 蛋白表达的影响

如图 2、表 2 所示,模型组较对照组 Bax、LC3B、Beclin-1 及 Caspase3 蛋白表达上升,P62 蛋白表达下降,差异具有统计学意义;而 10%左归丸含药血清可降低正常和受损颗粒细胞 Bax、LC3B、Beclin-1 及 Caspase3 蛋白表达,升高正常和受损颗粒细胞 P62 蛋白表达,差异具有统计学意义。

表 1 左归丸含药血清对颗粒细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Effect of serum containing Zuogui Pill on apoptosis of granule cells

分组 Groups	对照组 Control	左归丸含药血清组 10%ZGW	模型组 M	模型组+左归丸含药血清组 M+10%ZGW
早期凋亡率(%) Early apoptosis rate	3.21±0.29	1.43±0.07 *	9.12±0.84 *	2.41±0.13 #
晚期凋亡率(%) Late apoptosis rate	31.86±2.17	9.51±0.49 *	48.92±0.65 *	22.44±0.50 #
总凋亡率(%) Total apoptosis rate	35.07±2.19	10.95±0.56 *	58.04±0.90 *	24.85±0.47 #

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, # $P < 0.05$.

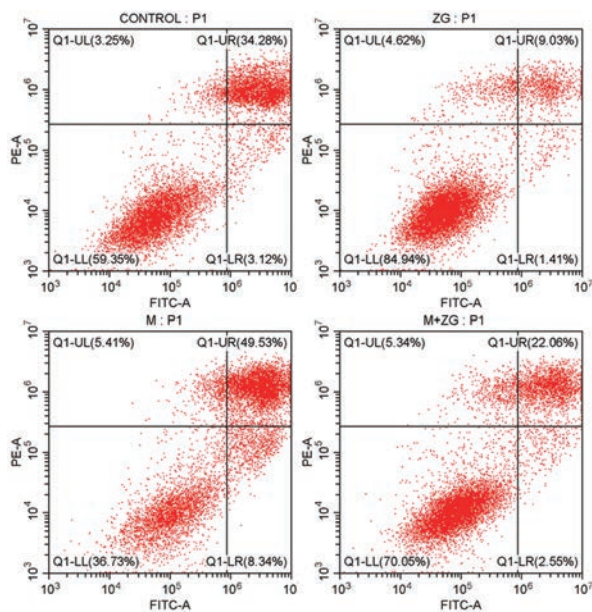


图 1 各组细胞周期分布

Figure 1 cell cycle distribution of each group

表 2 各组目标蛋白灰度分析数值统计 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Gray level analysis value statistics of target protein in each group

分组 Groups	对照组 Control	左归丸含药血清组 10%ZGW	模型组 M	模型组+左归丸含药血清组 M+10%ZGW
P62/β-actin	1.13 ± 0.22	1.70 ± 0.29 *	0.69 ± 0.05 *	0.92 ± 0.06 #
BECLIN-1/β-actin	0.94 ± 0.11	0.60 ± 0.12 *	1.83 ± 0.18 *	1.30 ± 0.16 #
CASP3/β-actin	0.91 ± 0.07	0.46 ± 0.16 *	1.98 ± 0.29 *	1.09 ± 0.06 #
BAX/β-actin	1.06 ± 0.29	0.71 ± 0.14 *	2.55 ± 0.72 *	1.34 ± 0.53 #
LC3B/β-actin	0.97 ± 0.06	0.65 ± 0.08 *	1.95 ± 0.24 *	1.40 ± 0.21 #

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, # $P < 0.05$.

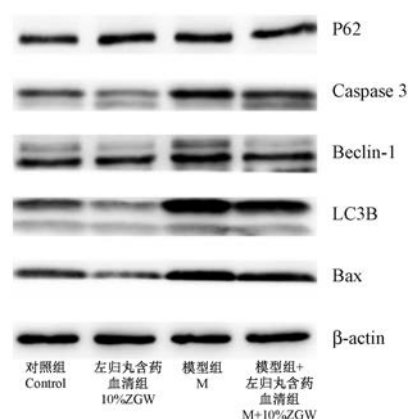


图 2 左归丸含药血清对 Bax、LC3B、Beclin-1、P62 及 Caspase3 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of serum containing Zuogui Pill on protein expression of Bax, LC3B, Beclin-1, P62 and Caspase3

3 讨论

随着肿瘤发病的年轻化以及自身免疫性疾病发病率的升高,化疗药物的使用也随之上升,由此对女性患者所带来的 POF 问题引起许多学者的关注。化疗药物对卵巢的影响主要与其对颗粒细胞和卵母细胞的损害有关,且呈剂量依赖性^[7]。CTX 是基础的化疗药物,其可影响卵巢血供^[8]、诱导颗粒细胞凋亡^[9]以及形成卵巢氧化应激损伤^[10],大多数研究集中在 CTX 诱导颗粒细胞凋亡这一机制上。

细胞自噬和凋亡被认为是代表细胞死亡机制的连续部分;自噬为凋亡所必需,自噬先于凋亡,进而促进凋亡;或自噬抑制凋亡;或者自噬与凋亡共同促进细胞死亡,抑制其中之一都会转变为另一种细胞死亡途径。自噬作为真核细胞内广泛存在的降解和再循环系统,在废物清除、结构重建、细胞生长发育、蛋白代谢平衡维持和细胞内环境稳定中起重要作用^[11]。Beclin-1 是自噬启动关键因子;LC3B 是自噬体的标记蛋白,新合成的 LC3B 蛋白经加工后成为 LC3B-I,位于细胞质中,随后 LC3B-I 与磷脂

酰乙醇胺连接,通过泛素化样酶促反应成为 LC3B-II,与自噬体的内膜和外膜均结合,自噬体内膜的 LC3B-II 在自噬溶酶体中被降解而进入再循环,LC3B 的合成、LC3B-I 到 LC3B-II 的转化率是检测自噬的通用指标;自噬底物的降解通过标记细胞内部受体蛋白 P62 的降解来佐证自噬的完成,P62 蛋白水平高低与自噬活性成反比,其增加提示自噬/溶酶体降解途径被抑制,其表达量变化可用于监测自噬流^[12]。研究发现自噬与凋亡存在着分子联系,在死亡受体和线粒体介导的细胞凋亡通路中,自噬的调控蛋白 Beclin1 是 Caspase-3、-7、-8 的剪切对象^[13],而 Bax 属于 Bcl-2 家族成员之一,可作为 Caspase-3 的上游调控蛋白,启动 Caspase 级联反应^[14]。目前尚未有研究揭示 PM 损伤颗粒细胞的机制中是否同时存在自噬与凋亡现象?二者是否存在交叉对话?

中医临床上治疗 POF 时针对不同病因并无特定的治疗方法,而是从辩证论治出发,以补肾填精为主、活血理气为辅,左归丸是补肾填精的主要方剂。课题组前期研究及其他相关研究证实:以 CTX 为代表的一些化疗药物可通过上调 Bax 蛋白的表达、下调 Bcl-2 蛋白的表达、促进卵巢颗粒细胞凋亡而造成卵巢损伤。而左归丸可降低化疗源性 POF 小鼠颗粒细胞凋亡率,保护卵巢功能^[6,15-16]。本实验建立 PM 体外诱导原代卵巢颗粒细胞损伤模型,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率并通过蛋白表达角度观察颗粒细胞中自噬相关蛋白如 Beclin-1、LC3BI/LC3BII 及凋亡相关蛋白 Bax、Caspase3 的表达情况。结果显示:①模型组颗粒细胞凋亡率较对照组而言显著升高,10%左归丸含药血清可降低颗粒细胞凋亡率;②自噬相关蛋白如 Beclin-1、LC3BI/LC3BII 及凋亡相关蛋白 Bax、Caspase3 在 PM 作用的颗粒细胞中,相对于对照组而言有高表达,10%左归丸含药血清可下调上述蛋白在模型组中的表达;然而受体蛋白 P62 的表达较对照组降低,10%左归丸含药血清可上调模型组 P62 蛋白的表达。以上结果说明 PM 可通过促进凋亡、激活自噬/溶酶体降解途径的机制损伤颗粒细胞;10%左归丸含药血清能缓解由此带来的损伤,同时影响了颗粒细胞自噬和凋亡过程,二者同时存在,且可能存在交叉对话。

综上所述,PM 促进了颗粒细胞的凋亡过程,与自噬相关,二者可能存在交叉对话。左归丸含药血清抑制了化疗损伤源性卵巢颗粒细胞凋亡,降低此过程中自噬与凋亡的活性,为下一步深入探讨自噬

与凋亡间交叉对话点奠定了实验基础,同时为左归丸的药效学研究提供了新的理论及实验基础,也为 POF 的防治提供新理论。如能选择性地抑制卵巢细胞的自噬与凋亡过程,保护卵巢逃避化疗药物的作用或化疗后帮助恢复卵巢功能,则能极大地造福于化疗后 POF 患者,对于临床具有重要意义。

参考文献:

- [1] 薛晴,曾诚,周应芳. 妇科手术及放化疗与卵巢早衰[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(8): 713-717.
- [2] 吴结英,胡卫华. 卵巢早衰的病因学研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2019, 38(4): 332-336, 344.
- [3] Chen H, Xiao L, Li J, et al. Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in premenopausal women [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 3(3): CD008018.
- [4] 吴玉萍,赵茵茵,周玉霞,等. 颗粒细胞在卵母细胞发育成熟中的作用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2017, 36(6): 503-506.
- [5] Tang ZR, Zhang R, Lian ZX, et al. Estrogen-receptor expression and function in female reproductive disease [J]. Cells, 2019, 8(10): 1123.
- [6] 阳松威,孙晓峰,贺又舜,等. 左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响[J]. 中成药, 2016, 38(4): 717-722.
- [7] Petru E. Fertility preservation and infertility treatment in breast cancer patients [J]. Wien Med Wochenschr, 2010, 160(19-20): 487-492.
- [8] Meirou D, Biederman H, Anderson RA, et al. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction [J]. Clin Obstet Gynecol, 2010, 53(4): 727-739.
- [9] 火夏琴,荀元凤,周利军,等. 化疗致卵巢早衰分子机制及药物预防的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(10): 796-798.
- [10] 张婷,贺婉红,俸灵林. 化疗药物卵巢毒性的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(8): 879-885.
- [11] Yim WW, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy [J]. Cell Discov, 2020, 6(1): 6.
- [12] Jiang P, Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. Methods, 2015, 75: 13-18.
- [13] Cao Y, Han X, Pan H, et al. Emerging protective roles of shengmai injection in septic cardiomyopathy in mice by inducing myocardial mitochondrial autophagy via Caspase-3/Beclin-1 axis [J]. Inflamm Res, 2020, 69(1): 41-50.
- [14] 许国平,杨鹏,祁宏. Bcl-2 蛋白家族调节凋亡和自噬信号通路的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(6): 1127-1134.
- [15] 曹金凤,郝红娟,王惠兰,等. 顺铂、依托泊苷、长春新碱、博来霉素对人卵巢颗粒细胞影响及其机制[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(11): 835-838.
- [16] 梁嘉丽,邝兆民,杨静,等. 补肾阴及补肾阳法对化疗诱导的卵巢早衰大鼠外周血 TNF- α 、IFN- γ 水平及卵巢颗粒细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1): 139-142.

[收稿日期]2020-05-12

吴献贤,刘星,张娜,等. 醋酸脱氧皮质酮(DOCA)加高盐诱导动脉瘤发生发展的作用及潜在机制[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 27-34.

Wu XX, Liu X, Zhang N, et al. The role and potential mechanism of deoxycorticosterone acetate plus salt-induced aneurysm development [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 27-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.005

醋酸脱氧皮质酮(DOCA)加高盐诱导动脉瘤 发生发展的作用及潜在机制

吴献贤^{1,2}, 刘 星^{1,2}, 张 娜³, 李雨涵³, 杜星辰³, 杨志伟^{1,2*}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021; 2. 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021; 3. 宁夏医科大学, 银川 750004)

【摘要】 目的 探讨醋酸脱氧皮质酮(DOCA)加高盐在不同时间点对腹主动脉瘤的诱导作用,及潜在分子机制。**方法** 将10月龄C57BL/6J小鼠分为两组:高盐组(HS),DOCA加高盐组(DOCA+HS)。两组小鼠在接受不同的处理一周,两周,三周时分别超声并取材,观察腹主动脉的扩张情况和动脉瘤的形成情况;HE染色,Masson染色和弹力纤维染色检测腹主动脉病理状态、胶原沉积和弹力纤维断裂情况;免疫组织化学法检测平滑肌细胞降解,腹主动脉炎症细胞浸润;RT-PCR检测炎症因子、抗炎因子的表达;转录组测序(RNA-Sequence)分析比较两组小鼠处理三周时动脉组织差异性表达基因及差异表达基因富集的信号通路。**结果** 与单纯高盐饮水组相比,DOCA加高盐处理一周无法诱导小鼠腹主动脉瘤的形成,处理两周能显著诱导动脉瘤的发生,动脉瘤发生率为44%,处理三周时动脉瘤发生率为65%;DOCA加高盐处理两周和三周后,腹主动脉处胶原沉积增多,出现弹力纤维断裂,平滑肌细胞降解;炎症细胞浸润明显增多,浸润的炎症细胞以巨噬细胞和T细胞为主;炎症因子表达明显增加,抗炎因子表达下降;进一步的转录组测序结果表明两组小鼠在处理三周后差异表达的基因主要富集在免疫系统和代谢通路中,并且发现介导白细胞粘附的关键分子PSGL-1在DOCA加高盐处理三周后表达明显升高。**结论** DOCA加高盐处理两周即可诱导小鼠腹主动脉瘤的发生,PSGL-1及其介导的炎症反应可能在其中发挥着重要作用。

【关键词】 动脉瘤;醋酸脱氧皮质酮;高盐;炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)01-0027-08

The role and potential mechanism of deoxycorticosterone acetate plus salt-induced aneurysm development

WU Xianxian^{1,2}, LIU Xing^{1,2}, ZHANG Na³, LI Yuhuan³, DU Xingchen³, YANG Zhiwei^{1,2*}

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission, Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Laboratory Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021. 3. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(CIFMS, 2016-I2M-1-016);国家自然科学基金青年项目(81800402)。

【作者简介】 吴献贤(1988—)女,博士,助理研究员,研究方向:心血管疾病发病机制。E-mail: wuxianxian2017@163.com

【通信作者】 杨志伟(1969—)男,博士,研究员,研究方向:心血管疾病发病机制。E-mail: yangzhiwei@cnilas.pumc.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the induction of abdominal aortic aneurysm by DOCA plus high salt at different time points and the underlying molecular mechanism. **Methods** Ten-month-old C57BL/6J mice were divided into two groups: a high-salt group (HS) and a DOCA plus high-salt group (DOCA+HS). Each group received the designated treatments for 1 week, 2 weeks, and 3 weeks. At the end of treatment, the mice were anesthetized with isoflurane followed by ultrasonography and aorta collection to observe abdominal aorta expansion and aneurysm formation. H&E staining, Masson's staining, and elastic fiber staining were performed to detect pathological changes, collagen deposition, and elastic fiber fragmentation, respectively. Immunohistochemistry was used to detect abdominal aortic inflammatory cell infiltration, and RT-PCR was used to detect the mRNA expression of inflammatory and anti-inflammatory factors. RNA sequencing was conducted to analyze the differentially-expressed genes and the enrichment signaling pathways of these genes in the arterial tissues of the two groups of mice after 3 weeks of treatment. **Results** Compared with the HS group, DOCA+HS treatment for 1 week did not induce the formation of abdominal aortic aneurysms in mice, but after 2 weeks of treatment, the mice began to form aortic aneurysms. The incidence of aortic aneurysm was 44% at week 2 and 65% at week 3. With increased duration of DOCA+HS treatment, collagen deposition in the abdominal aorta increased, and elastic fiber fragmentation was observed. Meanwhile, high inflammatory cell infiltration (mainly macrophages and T cells) was observed in the abdominal aorta of mice after treatment with DOCA+HS for 2 weeks and 3 weeks. The mRNA levels of inflammatory factors increased significantly, while the mRNA levels of anti-inflammatory factors decreased. Additional transcriptome sequencing result showed that the differentially-expressed genes in the two groups of mice after 3 weeks of treatment were enriched mainly in the immune system and metabolic pathways, and that levels of the key molecule PSGL-1, which mediates leukocyte adhesion, increased significantly after 3 weeks of DOCA+HS treatment. **Conclusions** DOCA+HS treatment can induce abdominal aortic aneurysm formation in mice after 2 weeks of therapy. PSGL-1 and its mediated inflammation may play important roles.

【Keywords】 aneurysm; deoxycorticosterone acetate; high salt; inflammation

动脉瘤为主动脉的病理性扩张,扩张的主动脉直径超过正常动脉直径的 50%即可被定义为动脉瘤。根据动脉瘤出现的解剖位置不同,可分为胸主动脉瘤(thoracic aortic aneurysm, TAA)和腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm),其中腹主动脉瘤最为常见^[1]。AAA 的发生与衰老,性别,动脉粥样硬化和吸烟有关,但与遗传关联较弱。动脉瘤破裂是动脉瘤最危险的并发症,是引发致死的主要原因^[2]。当前,开放手术修复和血管内修复是唯一被广泛使用的治疗主动脉瘤的方法,尚无用于治疗这种破坏性疾病的有效药物^[3-4]。尽管对于 AAA 的研究已长达数十年,但 AAA 的发病机制并不十分清楚。因此,阐明这种疾病的分子基础,找到新的治疗靶点,开发有效抑制动脉瘤发生发展的有效药物仍是动脉瘤研究的重点问题。

实验动物模型是研究动脉瘤发病机制、开发有效治疗药物的重要工具。通过遗传操作或化学试剂诱导的多种主动脉瘤小鼠模型广泛应用于动脉瘤相关研究中。这些动物模型和人类动脉瘤相比,都有其相应的缺点,比如常用的血管紧张素 II 诱导的小鼠动脉瘤模型就需要在 ApoE 或者是 LDLR 敲除的背景下实现^[5]。近年来有研究报道给予醋酸

脱氧皮质酮(DOCA)或醛固酮加高盐处理三周能诱导 10 月龄小鼠动脉瘤的形成,并且该方法诱导的动脉瘤和人类动脉瘤有很多相似之处^[6]。尽管该模型强调了盐皮质激素受体激动剂及高盐在动脉瘤中的作用^[7],但是关于其内在机制有待探究,并且 DOCA 加高盐诱导动脉瘤的形成是否和诱导时间有关也许进一步验证。

因此,本研究采用 10 月龄 C57BL/6J 小鼠,并通过 DOCA 加高盐分别处理一周,两周,三周,观察 DOCA 加高盐处理不同时间对动脉瘤形成的影响,并检测不同时间点动脉病理结构变化,炎症细胞浸润情况,炎症因子的表达,并通过 RNA 测序找到差异表达的基因及相关信号通路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,120 只,10 月龄,体重(30±5)g,由北京维通利华实验动物中心提供[SCXK(京)2016-0009]。实验动物在中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物设施中开展[SYXK(京)2015-0035]。与实验动物相关的操作已获得中国医学科学院医学实验动物研究所实

验动物使用与管理委员会的批准 (ILAS-YZW2017007)。实验过程中严格遵循使用实验动物的 3R 原则,给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DOCA 缓释药片 (50 mg, 21 d 释放) 购自美国 Innovative Research of America; CD3 单克隆抗体 (sc-20047) 购自美国 Santa Cruz 公司; CD68 (ab201340) 单克隆抗体购自英国 abcam, ly6B.2 (MCA771GA) 单克隆抗体购自美国 BIO-RAD; 荧光二抗 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150113)、Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150157) and Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 568) (ab175471) 均购自英国 abcam; Masson 染色试剂盒及弹力纤维试剂盒均购自中国北京索莱宝; 兔超敏二步法试剂盒购自中国中杉金桥 (PV9001); DAB 显色试剂盒购自中国中杉金桥 (ZLI-9019); PCR 引物及 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; DEPC 水购自美国 QIAGEN 公司; PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; RNA 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (RR036A) 购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将 10 月龄 C57BL/6J 小鼠随机分为两组: 高盐组 (HS), DOCA 加高盐组 (DOCA+HS)。DOCA 给药方式为背部皮下植入 DOCA 缓释药片 (50 mg, 21 d 释放), 高盐给予方式为盐水喂养 (含 0.9% NaCl 和 0.2% KCl 的水)。各组在经过不同处理 1 周, 2 周, 3 周时分别取 20 只小鼠采用异氟烷麻醉后进行小动物超声并取材。

1.3.2 小动物超声

给药结束后, 小鼠采用 2% 异氟烷吸入麻醉, 使用脱毛膏将小鼠腹部毛发去除。将小鼠仰卧位固定, 在其腹部涂抹超声透射凝胶。将探头置于腹部, 轻微调整探头以找到腹主动脉肾上节段, 获取相同节段 M 型动脉超声图像, 使用“门三联征” (肝动脉, 肝静脉和胆管) 作为解剖标记, 以评估每只小鼠相同位置的横断面图像。测定并统计各组小鼠肾上腹主动脉处血管内径。

1.3.3 HE 染色

染色前, 将组织切片用二甲苯彻底脱蜡, 经过梯度乙醇 (无水乙醇, 95%, 80%) 水洗后, 再用水洗。

然后用苏木精染液染 3~5 min, 自来水洗 1 min 后, 用 75% 盐酸乙醇液分化数秒钟, 后使用蓝化液返蓝, 然后用 0.5% 伊红水溶液染色 1 min, 经乙醇脱水, 二甲苯透明后, 中性树胶封片。

1.3.4 Masson 染色

染色前, 将石蜡切片常规脱蜡至水。采用改良 Masson 三色染色液试剂盒对动脉组织中的胶原纤维进行染色, 染色后胶原纤维呈蓝色, 肌纤维和细胞质呈红色。

1.3.5 EVG 染色

染色前, 将石蜡切片常规脱蜡至水。采用 Weigert 弹力纤维染色液试剂盒对主动脉壁的弹力纤维进行染色, 观察各组弹力纤维的断裂情况。

1.3.6 免疫组织化学法

将小鼠腹主动脉组织用 10% 福尔马林固定, 固定后用石蜡包埋。包埋后的组织块进行切片 (4 μm), 之后将组织切片用二甲苯脱蜡后在不同浓度梯度乙醇溶液中由高向低浸泡浸水, 并使用 0.3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性。然后用 0.5% triton 敷育 15 min 进行破膜, 0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 修复抗原。用羊血清封闭非特异性结合位点, 然后用目标单克隆抗体 ($\alpha\text{-SMA}$) 杂交, 4℃ 温育过夜。用超敏二步法试剂盒孵育后 DAB 显色试剂盒镜下显色, 苏木素染色, 镜下观察。对于检测炎症细胞浸润的免疫荧光实验, 无需采用 H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶, 并且和相应的目标抗体杂交之后, 采用荧光二抗进行敷育, DAPI 染核后封片, 镜检。

1.3.7 RT-PCR

取少量动脉组织放入 1.5 mL EP 管中, 加入 100 μL TRIzol, 用电动研磨棒研磨均匀后加入 900 μL TRIzol 混匀, 之后加入 200 μL 氯仿, 充分上下颠倒混匀后, 冰上静置 3~5 min, 13500 r/min, 4℃ 离心 15 min, 取上清。加入 500 μL 异丙醇混匀后, 冰上静置 10 min, 13500 r/min 离心 10 min 弃上清。加入 1 mL DEPC 水稀释的 75% 的乙醇, 4℃, 12 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 得 RNA 沉淀。将 RNA 沉淀充分晾干后, 加入适量的 DEPC 水稀释。使用 RNA 反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 并用 One-stop PCR 仪检测相应基因的 mRNA 表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法检测各个基因的相对表达水平。本研究所用引物见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名 Gene names	引物序列 Primer sequences
TNF- α	F: CCCTCAGACTCAGATCATCTTCT R: GCTACGACGTGGGCTACAG
IL-1 β	F: GCAACTGTTCTGAACTCAACT R: ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	F: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC R: TTGCTCCTTAGCCACTCCTTC
CCL-2	F: TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA R: GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
IL-10	F: GCTCTTACTGACTGGCATGAG R: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
IL-13	F: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG R: GGTCTTGTGTGATGTTGCTCA
GAPDH	F: AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC R: TCCACCACCCAGTTGCTGTA

1.3.8 转录组测序

采用 TRIzol 法提取小鼠(HS 和 DOCA+HS 处理 3 周的小鼠)腹主动脉节段总 RNA,利用 Qubit 3.0 进行 RNA 定量,Agilent 2100 生物分析仪评估 RNA 提取质量。之后进行普通转录组文库,文库质检合格后,对文库进行 pooling,选择 Novaseq6000 上机测序。测序实验及初步分析由北京基石生命科技有限公司进行。以 $|\log FC| \geq 2$ 和 $P_{adj} < 0.005$ 为阈值筛选差异表达的基因,并对差异表达的基因进行功能注释。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析,数据表示为平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)。两组间比较采用 Student's *t* 检验,两个因素的多重比较采用双因素方差分析。每组小鼠的存活率和成瘤率采用卡方检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 DOCA 加高盐处理不同时间对动脉瘤的诱导作用

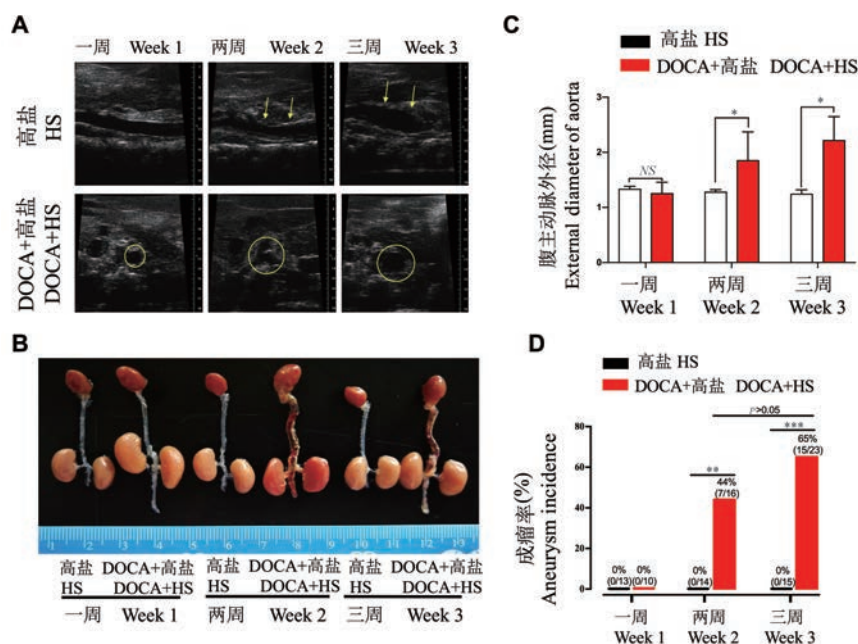
小鼠腹主动脉超声结果显示,DOCA 加高盐处理一周并未引起腹主动脉内径的扩张,处理两周时可见腹主动脉扩张,处理三周时腹主动脉扩张更为明显(图 1A),对主动脉进行拍照,并测量其外径,统计动脉瘤发生率,发现 DOCA 加高盐处理一周未引起小鼠动脉主动脉外径的扩张和瘤的形成,而处理两周时主动脉明显扩张,此时动脉瘤成瘤率为 44%;处理三周后主动脉外径增加更为明显,此时动脉瘤成瘤率为 65%(图 1B~1D)。

2.2 DOCA 加高盐处理不同时间对胶原沉积、弹力纤维断裂和平滑肌细胞降解的影响

本研究进一步对小鼠主动脉病理表型进行分析,HE 染色结果显示 DOCA 加高盐处理两周的小鼠出现了明显的夹层动脉瘤,并且动脉外壁可见少量炎症细胞,处理三周后夹层动脉瘤进一步扩大,动脉外壁见大量炎症细胞(图 2A)。Masson 染色结果显示 DOCA 加高盐处理一周和两周并没有影响动脉外壁胶原沉积量,而处理三周后胶原沉积量有少量增多趋势(图 2B)。弹力纤维染色结果显示,DOCA 加高盐处理一周和两周时均未引起弹力纤维的断裂,而处理三周时可见弹力纤维断裂现象(图 2C)。免疫组化结果显示,DOCA 加高盐处理一周时,平滑肌细胞结构完整,而处理两周后 α -SMA 出现大量降解,三周后降解丢失现象更为明显(图 2D)。

2.3 DOCA 加高盐处理不同时间促进动脉组织炎症细胞浸润和炎症因子的表达

之后检测了动脉组织中浸润的炎症细胞类型,图 3A~C 显示 DOCA 加高盐处理一周时动脉组织中未见 CD3⁺T 细胞,CD68⁺巨噬细胞和 LY6B.2⁺中性粒细胞的浸润,处理两周时可见这三种类型细胞的浸润,处理三周时浸润的细胞进一步增多,其以 CD3⁺T 细胞核 CD68⁺的巨噬细胞为主,LY6B.2⁺中性粒细胞的浸润较少。进一步检测动脉组织中炎症因子的表达发现,DOCA 加高盐处理能促进炎症因子(TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 CCL-2)的表达,而抑制抗炎性因子(IL-10 和 IL-13)的表达,且这种促进或抑制作用与处理时间高度相关(图 3D)。

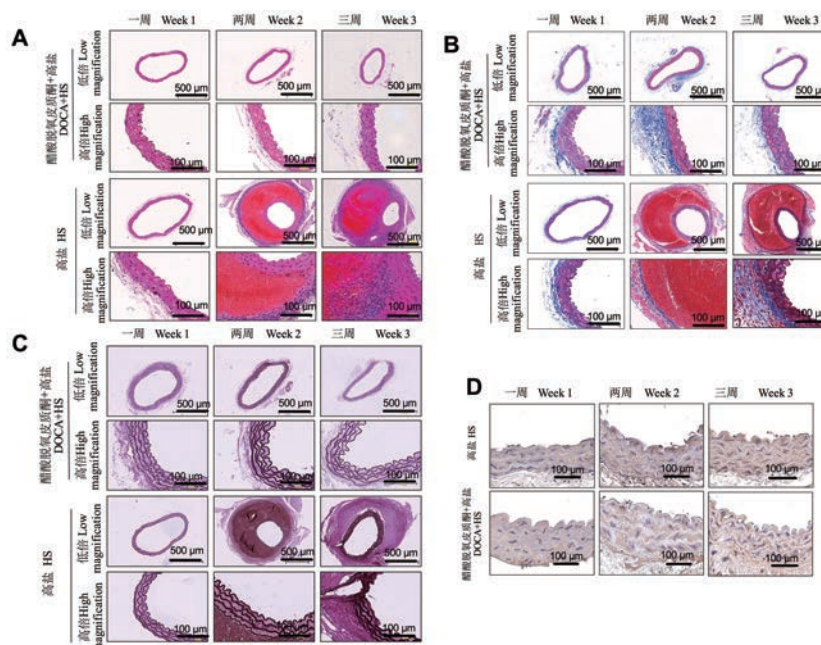


注: HS:高盐;DOCA:醋酸脱氧皮质酮;A:腹主动脉超声图;B:各组主动脉大体代表图片;C:主动脉外径统计结果,与 HS 组同时时间点比较,two-way ANOVA, * $P < 0.05$;D:各组成瘤率,卡方检验, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 DOCA 加盐处理不同时间对动脉瘤形成的影响

Note. HS, high salt. DOCA, Deoxycorticosterone acetate. A, Representative ultrasound images of abdominal aorta. B, Representative photographs of aortas. C, Quantification of the external diameter of abdominal aorta. Compared with HS group at the same time point, two-way ANOVA, * $P < 0.05$. D, The aortic aneurysm incidence, chi-square test, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 1 Effect of DOCA plus salt on the induction of aortic aneurysm in aged mice at different time points



注:α-SMA,平滑肌肌动蛋白;A:HE 染色代表图;B:Masson 染色代表图;C:弹力纤维染色代表图;D:α-SMA 免疫组化代表图。

图 2 DOCA 加高盐处理不同时间对主动脉病理结构的影响

Note. α-SMA, α-smooth muscle actin. A, HE staining representative image. B, Masson staining representative image. C, Elastin staining representative image. D, α-SMA immunohistochemical representative image.

Figure 2 Effect of DOCA plus salt on the vascular pathology of aged mice at different time points

2.4 RNA 测序分析 DOCA 加高盐处理三周小鼠动脉组织中差异表达基因的变化

为了进一步探究 DOCA 加高盐诱导小鼠动脉瘤发生的分子机制,我们对 DOCA 加高盐处理三周小鼠的腹主动脉组织 RNA 进行测序分析,并和 HS 组进行比较。图 4A 为差异表达基因的热图结果,图 4B 为差异表达基因的通路富集结果,可见上调基因主要富集在免疫、代谢、止血和中性粒细胞降解等途径中,而下调基因则主要富集在信号传导、脂质代谢、蛋白质代谢和免疫系统。图 4C 为止血、免疫、细胞外基质重构通路中的一些差异表达基因的热图。从中我们发现和炎症反应密切相关的,介导白细胞与内皮粘附的关键分子 P-选择素糖蛋白配体-1 (PSGL-1) 的表达明显升高。

3 讨论

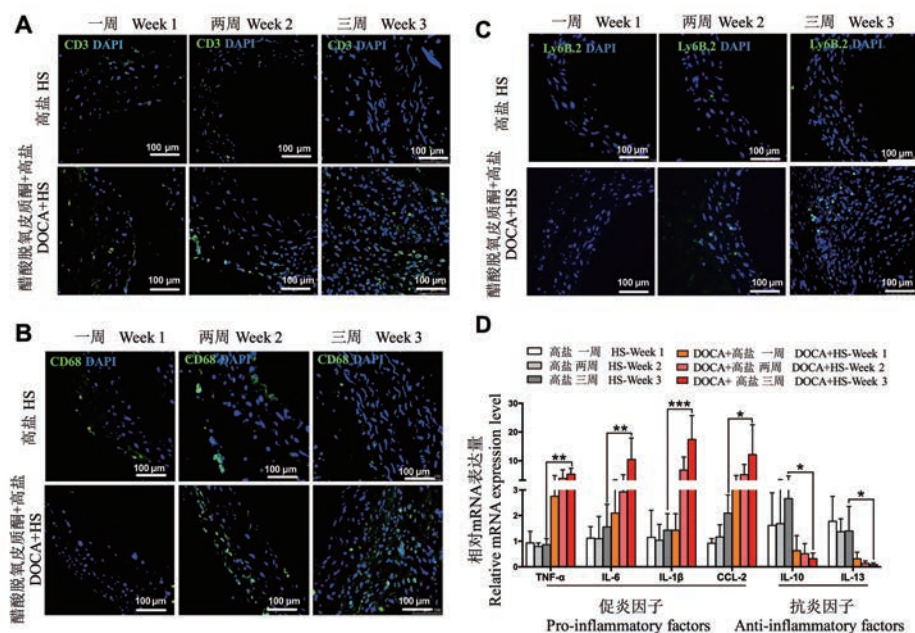
主动脉瘤根据发病位置可分为胸主动脉瘤 (TAA) 和腹主动脉瘤 (AAA)。TAA 发生在所有年龄段的人,男女发病率相似,并且与遗传因素高度相关。相反,AAA 的发生与衰老,男性,动脉粥样硬化和吸烟有关,但与遗传关联较弱^[8]。小鼠腹主动脉瘤动物模型是研究腹主动脉瘤的重要工具,对阐释腹主动脉瘤的病理生理学机制,研发和评价主动脉瘤的治疗药物都具有重要意义^[9]。本研究采用 DOCA 加高盐诱导腹主动脉瘤,结果发现 DOCA 加高盐处理不同时间对动脉瘤的形成有不同的效果,DOCA 加高盐处理一周并不能诱导动脉瘤的生成,处理两周时有小鼠开始形成动脉瘤,并且形成的动脉瘤不止局限于腹主动脉节段,胸主动脉也可见明显的动脉瘤夹层。DOCA 加高盐处理三周时动脉瘤的发病率进一步升高,但是我们并没有进一步延长处理时间观察更长时间处理对动脉瘤发病率的影响。因为三周时,开始有小鼠因为动脉瘤破裂死亡,死亡率高达 35%。进一步延长处理时间在增加小鼠成瘤率的同时,也必然加剧动脉瘤破裂的风险。

在病理学上,AAA 的特征是动脉壁各层扩张,这可归因于弹性蛋白的断裂,平滑肌细胞凋亡,胶原蛋白的代偿性沉积,炎症细胞的浸润,氧化应激等^[10-11]。我们的研究发现,DOCA 加高盐处理两周时虽然有小鼠开始形成动脉瘤,但此时胶原纤维沉积并没有变多,弹性纤维也未出现断裂,直到处理

三周时才可见大量平滑肌细胞降解,胶原纤维沉积和弹性纤维断裂现象,此结果提示弹力纤维断裂和动脉瘤形成可能并不是因果关系,有可能是动脉瘤形成后才出现弹力纤维的断裂,从而促进动脉管壁的进一步扩张。而胶原纤维的沉积也是一种代偿性沉积,当 DOCA 处理两周时虽然已经有胶原纤维的产生,但此时机体产生的蛋白水解酶可以降解这些胶原纤维,所以并未见大量胶原纤维沉积现象。而处理三周时,机体产生的蛋白水解酶不足以降解产生的胶原纤维,导致胶原纤维沉积增多。

以往研究表明炎症在动脉瘤的发生发展中具有重要意义,慢性主动脉炎症所导致的一系列蛋白水解酶(例如基质金属蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶)的释放,以及氧化性自由基,炎症因子的生成是引起主动脉中膜破坏以及血管平滑肌细胞凋亡和功能障碍的原因^[12-13]。炎症反应的发生离不开炎症细胞的浸润,浸润的炎症细胞包括 T 细胞, B 细胞, 巨噬细胞, 粒细胞^[14-15]。我们的 HE 染色结果初步显示 DOCA 加高盐处理三周后动脉外壁有大量炎症细胞浸润。进一步的研究发现浸润的炎症细胞以 T 细胞和巨噬细胞为主,也有少量的粒细胞。DOCA 加高盐处理一周、两周和三周均能够增加动脉组织炎症因子表达水平,降低抗炎因子表达水平,但是只有在处理三周时这种变化才有显著意义。值得注意的是,虽然 DOCA 加高盐处理一周并没有诱导动脉瘤的形成,但此时动脉组织中炎症因子的表达已出现增加趋势,抗炎因子的表达出现降低趋势,提示 DOCA 加高盐诱导的炎症反应在其诱导的动脉瘤发生中起着重要的作用。

本研究进一步的 RNA 测序分析结果表明 DOCA 加高盐处理三周组和高盐处理三周组相比,其差异表达的基因主要富集在免疫系统、信号传导、代谢、止血等信号通路中,其中我们发现止血通路中的一个基因 P-选择素糖蛋白配体-1 (PSGL-1) 在 DOCA 加高盐处理三周后表达明显增加, PSGL-1 和炎症的发生密切相关,在各种白细胞表面广泛表达,是介导炎症反应的起始步骤^[16-18],我们以往的研究发现 PSGL-1 和盐敏感性高血压的发生发展密切相关^[19-20],但是关于 PSGL-1 在动脉瘤中的作用还未见报道,探究 PSGL-1 和动脉瘤发生发展的关系是我们今后研究的方向。

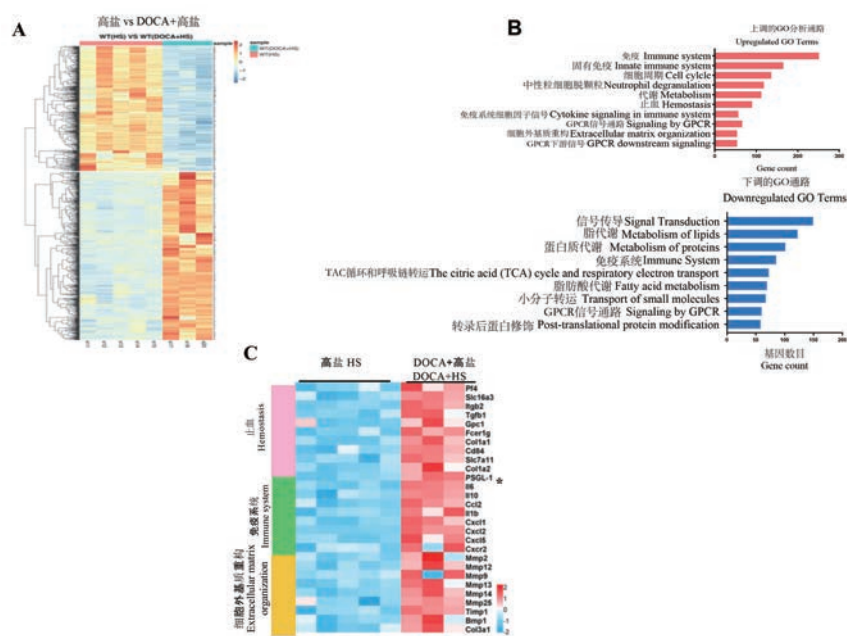


注:A:CD3⁺T 细胞在动脉组织中的浸润;B:CD68⁺巨噬细胞在动脉组织中的浸润;C:LY6B.2⁺粒细胞在动脉组织中的浸润;D:炎症因子和抗炎因子的表达情况。与 HS 组同时时间点比较,two-way ANOVA, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 DOCA 加盐处理不同时间对炎症细胞浸润和炎症因子表达的影响

Note. A, CD3⁺T cells infiltration in arterial tissue. B, CD68⁺ macrophage infiltration in arterial tissue. C, LY6B.2⁺ granulocyte infiltration in arterial tissue. D, The mRNA expression levels of inflammatory factors and anti-inflammatory factors. Compared with HS group at the same time point, two-way ANOVA, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Effect of DOCA plus salt on inflammatory cells infiltration, and on the expression of inflammatory cytokines of mice at different time points



注:A:热图;B:GO 富集结果;|logFC| ≥ 2 , Padj <0.005 ;C:与止血、免疫系统和细胞外基质重构相关差异表达基因热图。

图 4 RNA 测序分析结果

Note. A, Heat map. B, GO enrichment analysis. |logFC| ≥ 2 and Padj <0.005 . C, Heatmap displaying some key differentially expressed genes enriched in hemostasis, immune system and extracellular matrix organization pathways.

Figure 4 RNA sequence analysis result

参考文献:

- [1] Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al. 2010 Accf/Aha/Aats/Acr/Asa/Sca/Scai/Sir/Sts/Svm guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease. a report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines, american association for thoracic surgery, american college of radiology, American stroke association, society of cardiovascular anesthesiologists, society for cardiovascular angiography and interventions, society of interventional radiology, society of thoracic surgeons, and society for vascular medicine [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(14): e27-e129.
- [2] Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, et al. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms [J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(2): 92-102.
- [3] Golledge J, Muller J, Daugherty A, et al. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(12): 2605-2613.
- [4] Wang YD, Liu ZJ, Ren J, et al. Pharmacological therapy of abdominal aortic aneurysm: An update [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2018, 16(2): 114-124.
- [5] Patelis N, Moris D, Schizas D, et al. Animal models in the research of abdominal aortic aneurysms development [J]. Physiol Res, 2017, 66(6): 899-915.
- [6] Liu S, Gong MC, Guo Z. A new mouse model for introduction of aortic aneurysm by implantation of deoxycorticosterone acetate pellets or aldosterone infusion in the presence of high salt [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1614: 155-163.
- [7] Liu S, Xie Z, Daugherty A, et al. Mineralocorticoid receptor agonists induce mouse aortic aneurysm formation and rupture in the presence of high salt [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(7): 1568-1579.
- [8] Santosa F, Schrader S, Nowak T, et al. Thoracic, abdominal and thoracoabdominal aortic aneurysm [J]. Int Angiol, 2013, 32(5): 501-505.
- [9] Senemaud J, Caligiuri G, Etienne H, et al. Translational relevance and recent advances of animal models of abdominal aortic aneurysm [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(3): 401-410.
- [10] Yan H, Cui B, Zhang X, et al. Antagonism of toll-like receptor 2 attenuates the formation and progression of abdominal aortic aneurysm [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(3): 176-187.
- [11] Quintana RA, Taylor WR. Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation [J]. Circ Res, 2019, 124(4): 607-618.
- [12] Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(6): 539-552.
- [13] Erhart P, Cakmak S, Grond-Ginsbach C, et al. Inflammasome activity in leucocytes decreases with abdominal aortic aneurysm progression [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(4): 1299-1308.
- [14] Raffort J, Lareyre F, Clement M, et al. Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(8): 457-471.
- [15] Samadzadeh KM, Chun KC, Nguyen AT, et al. Monocyte activity is linked with abdominal aortic aneurysm diameter [J]. J Surg Res, 2014, 190(1): 328-334.
- [16] Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, et al. P-Selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells [J]. Blood, 1996, 88(8): 3010-3021.
- [17] Dang B, Wiehler S, Patel KD. Increased Psgl-1 expression on granulocytes from allergic-asthmatic subjects results in enhanced leukocyte recruitment under flow conditions [J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(4): 702-710.
- [18] An G, Wang H, Tang R, et al. P-Selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6chi Monocytes and a major determinant for ly-6chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice [J]. Circulation, 2008, 117(25): 3227-3237.
- [19] Yang Y, Liu X, Liu Y, et al. The development of salt-sensitive hypertension regulated by PSGL-1 gene in mice [J]. Cell Biosci, 2018, 8: 20.
- [20] 付惠, 毛红亚, 姜晓亮, 等. PSGL-1 通过炎症反应在小鼠盐敏感性高血压中的作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 54-59.

[收稿日期] 2020-10-09

蔡承敏,何玉茂,余亚东. 缬沙坦对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞活性损伤的干预作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 35-42.

Cai CM, He YM, Yu YD. Intervention of valsartan on high glucose-induced injury of rat glomerular mesangial cells activity [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 35-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.006

缬沙坦对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞活性损伤的干预作用

蔡承敏*, 何玉茂, 余亚东

(九江市中医医院, 江西 九江 332000)

【摘要】 目的 探讨缬沙坦对高糖诱导的大鼠肾细胞增殖和凋亡的影响与机制。**方法** 利用高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 损伤,并给予不同浓度的缬沙坦。Western blot 检测增殖凋亡相关蛋白细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (Cleaved caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 和 NOTCH1 信号通路蛋白 jagged1、NOTCH1 的表达,噻唑蓝 (MTT) 比色法测定细胞增殖活力,流式细胞仪评估细胞周期与凋亡。采用 NOTCH1 信号通路激活剂 Jagged 1/Fc 融合蛋白和缬沙坦处理高糖诱导的 HBZY-1,观察其对细胞的增殖、周期和凋亡的影响。**结果** 高糖诱导的 HBZY-1 中 CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达水平、24 h、48 h 和 72 h 的细胞增殖活力、S 期细胞比例显著降低,G0~G1 期细胞比例、Cleaved caspase-3、Bax、jagged1 和 NOTCH1 蛋白表达水平、细胞凋亡率明显升高 ($P<0.05$)。0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦显著提高 CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达水平、24 h、48 h、72 h 的细胞增殖活力和 S 期细胞比例,明显降低 G0~G1 期细胞比例、Cleaved caspase-3、Bax、jagged1、NOTCH1 蛋白表达水平与细胞凋亡率,且均呈浓度依赖性 ($P<0.05$)。NOTCH1 信号通路激活剂 Jagged 1/Fc 融合蛋白部分逆转缬沙坦对高糖处理的 HBZY-1 增殖、周期和凋亡的影响。**结论** 缬沙坦通过抑制 NOTCH1 信号通路,促进高糖处理的大鼠肾小球系膜细胞增殖与周期,并减轻细胞凋亡。

【关键词】 缬沙坦;NOTCH1 信号通路;高糖;大鼠肾小球系膜细胞;增殖;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0035-08

Intervention of valsartan on high glucose-induced injury of rat glomerular mesangial cells activity

CAI Chengmin*, HE Yumao, YU Yadong

(Jiujiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiujiang 332000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of valsartan on high glucose-induced rat kidney cell proliferation and apoptosis. **Methods** High glucose was used to induce HBZY-1 damage in rat mesangial cells, and different concentrations of valsartan were given. Western blot detected of proliferation and apoptosis-related proteins CyclinD1, Cleaved caspase-3, Bcl-2 related X protein (Bax), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), and NOTCH1 signaling pathway protein jagged1, NOTCH1 expression, MTT colorimetric method was performed to determine cell proliferation activity, and flow cytometry was applied to evaluate cell cycle and apoptosis. The high glucose-induced HBZY-

[基金项目] 江西省卫生计生委科技计划资助项目 (20167148)。

[作者简介] 蔡承敏 (1978—), 女, 副主任医师, 本科, 研究方向: 肾内科临床。E-mail: har8lw@163.com

1 was treated with NOTCH1 signaling pathway activators Jagged 1/Fc fusion protein and valsartan, and its effects on cell proliferation, cell cycle and apoptosis were observed. **Results** The expression level of CyclinD1, Bcl-2 protein, cell proliferation activity at 24 h, 48 h and 72 h, and S-phase cell ratio in HBZY-1 induced by high glucose were significantly decreased, and G0-G1-phase cell ratio, Cleaved caspase-3, Bax, jagged1 and NOTCH1 protein expression levels and apoptosis rate were greatly increased ($P < 0.05$). 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{mol/L}$ valsartan obviously improved the expression levels of CyclinD1, Bcl-2, cell proliferation activity at 24 h, 48 h and 72 h, and S-phase cell ratio, while dramatically reduced G0-G1-phase cell ratio, the expression levels of Cleaved caspase-3, Bax, jagged1, NOTCH1 and the apoptosis rate, all in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). NOTCH1 signaling pathway activator Jagged 1/Fc fusion protein partially reversed the effects of valsartan on the proliferation, cell cycle and apoptosis of HBZY-1 treated with high glucose. **Conclusions** Valsartan can promote the proliferation and cell cycle of rat mesangial cells treated with high glucose by inhibiting the NOTCH1 signaling pathway, and reduce the apoptosis.

【Keywords】 valsartan; NOTCH1 signaling pathway; high glucose; rat mesangial cells; proliferation; apoptosis

糖尿病肾病是糖尿病最严重的微血管并发症之一。它已经成为终末期肾病发展的主要危险因素^[1]。但是,糖尿病肾病的发病机理尚未完全确定,并且尚无用于预防和治疗糖尿病肾病发生的药物,这已成为世界范围内公共卫生的负担。最近,肾小球系膜细胞功能障碍已被证明在糖尿病肾病的发病机制中起着至关重要的作用^[2]。缬沙坦(valsartan, Val)是血管紧张素 II 受体拮抗剂抗高血压类药物,对糖尿病大鼠足细胞损伤具有显著的保护作用^[3],通过上调骨形态发生蛋白-7 (BMP-7)的表达发挥保护糖尿病肾病的功能^[4]。在糖尿病小鼠肾小球组织中,缬沙坦影响 NOTCH1 信号通路表达^[5]。尽管缬沙坦的临床使用有所增加,但其对糖尿病肾病治疗作用的潜在机制仍不清楚,需要进一步研究。作为高度保守的信号调节剂,NOTCH 信号通路在诸如细胞增殖,分化,凋亡和成熟等生理过程中起着重要作用^[6]。NOTCH1 蛋白是 NOTCH1 蛋白家族中具有代表性的受体,其下游细胞内结构域被认为是治疗各种肾疾病的关键靶标^[7]。根据上述研究结果,推测缬沙坦对糖尿病肾病治疗作用与 NOTCH1 信号传导途径有关。因此,当前的研究建立了高葡萄糖(HG)诱导的大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 损伤模型,模拟糖尿病肾病来对细胞增殖、周期和凋亡进行评估,采用不同浓度缬沙坦干预细胞,并结合 NOTCH1 信号通路,以确定缬沙坦对糖尿病肾病治疗作用的潜在机制。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 购自美国模式培养物保存中心(ATCC)。

1.2 主要试剂

缬沙坦购自北京诺华制药公司, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM 培养基) 购自美国 Gibco 公司; NOTCH1 信号通路激活剂 Jagged 1/Fc 融合蛋白购自美国 R&D System 公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 购自上海君瑞生物公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 购自美国 Sigma 公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质分析试剂盒、细胞周期检测试剂盒、Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物公司;兔抗细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)抗体、兔抗活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(Cleaved caspase-3)抗体、兔抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体、兔抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)抗体、兔抗 jagged1 抗体、兔抗 NOTCH1 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的 II 抗购自上海艾博抗公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,并置于饱和湿润、37℃、5% CO₂ 的培养箱中生长。

1.3.2 细胞分组与处理

将 HBZY-1 分为 NC 组(即对照组,未处理的细胞),HG 组(即模型组,30 mmol/L 葡萄糖处理细胞 48 h),Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组(1 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦处理细胞 48 h),HG+Val 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组(30 mmol/L 葡萄糖和 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦处理细胞 48 h^[8]),HG+Val 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组(30 mmol/L 葡萄糖和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦处理细胞 48 h),HG+Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组(30 mmol/L 葡萄糖和 1 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦处理细胞 48 h),

HG+Val+PBS 组 (30 mmol/L 葡萄糖、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦和与激活剂等量的 PBS 处理细胞 48 h), HG+Val+Jagged 1/Fc 组 (30 mmol/L 葡萄糖、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦和终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ NOTCH1 信号通路激活剂 Jagged 1/Fc 融合蛋白处理细胞 48 h^[9])。其中,缬沙坦使用培养基配制出 0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度。

1.3.3 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、jagged1 和 NOTCH1 的表达

收集不同处理的 HBZY-1,在 RIPA 缓冲液中进行蛋白的抽提。使用 BCA 蛋白质分析试剂盒对蛋白定量。然后取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白分离后,转至聚偏二氟乙烯膜,然后用 5% 脱脂奶粉封闭膜 2 h。随后将膜与 I 抗在 4℃ 孵育过夜,并与 HRP 标记的 II 抗 (1:5000) 室温孵育 2 h。I 抗包括抗 CyclinD1、Cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、jagged1、NOTCH1 (均为 1:1000 稀释) 和抗 β 肌动蛋白 (β -actin) (1:2000 稀释)。通过增强的化学发光系统显影、曝光。以 β -actin 为对照,采用凝胶成像分析各蛋白的表达水平。

1.3.4 MTT 比色法检测细胞增殖活力

各组 HBZY-1 经不同的处理后,分别在 96 孔板中接种 24 h、48 h 和 72 h。接下来,每孔细胞中加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,并继续孵育。4 h 后,加入 200 μL 的二甲基亚砷充分溶解反应结晶。在 Bio Tek 酶标仪读取 450 nm 的吸光度,以实验组与对照组吸光度的比值表示细胞的增殖活力。

1.3.5 流式细胞术检测细胞周期与凋亡

各组 HBZY-1 经不同的处理后,根据细胞周期检测试剂盒的指示,收集 1×10^5 个细胞,经 70% 冷乙醇固定后,加入 500 μL PI/RNase A 染色工作液,避光孵育 30~60 min,于流式细胞仪检测波长 488 nm 处的红色荧光,分析细胞周期。遵循 Annexin V-FITC/PI 试剂盒的规程,HBZY-1 使用 binding buffer 重悬,收集 1×10^5 个细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀和 5 μL PI 工作液混匀,之后避光反应 15 min,通过 FACSCalibur 流式细胞仪评估细胞凋亡。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计与分析,计量资料表示为平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间数据比较用单因素方差分析,组间多重比较用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

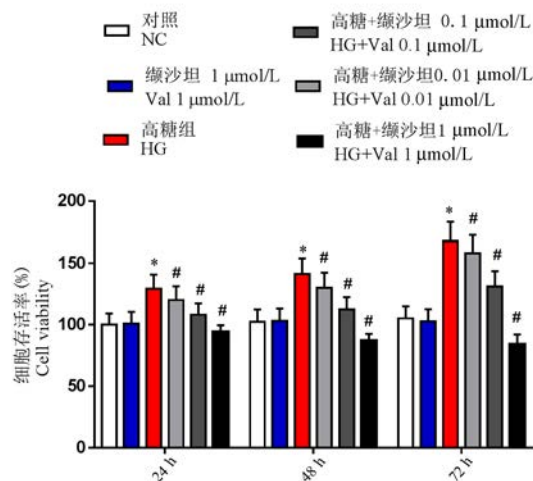
2 结果

2.1 缬沙坦促进高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 增殖

MTT 检测结果见图 1。与 NC 组相比较,Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 24 h、48 h 和 72 h 的增殖活力无显著变化 ($P > 0.05$),而 HG 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 24 h、48 h 和 72 h 的增殖活力明显降低 ($P < 0.05$)。与 HG 组相比较, HG+Val 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组、HG+Val 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组和 HG+Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 HBZY-1 24 h、48 h 和 72 h 的细胞增殖活力显著升高,且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。

2.2 缬沙坦促进高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 细胞周期

Western blot 和流式细胞术检测结果见图 2。与 NC 组相比较, HG 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 中 CyclinD1 蛋白表达显著降低, G0-G1 期细胞比例明显增加, S 期细胞比例显著减少 ($P < 0.05$), G2-M 期细胞比例无明显变化 ($P > 0.05$)。与 HG 组相比较, HG+Val 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组、HG+Val 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组和 HG+Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 HBZY-1 的 CyclinD1 蛋白表达和 S 期细胞比例显著升高, G0-G1 期细胞比例明显降低,且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$),同时, G2-M

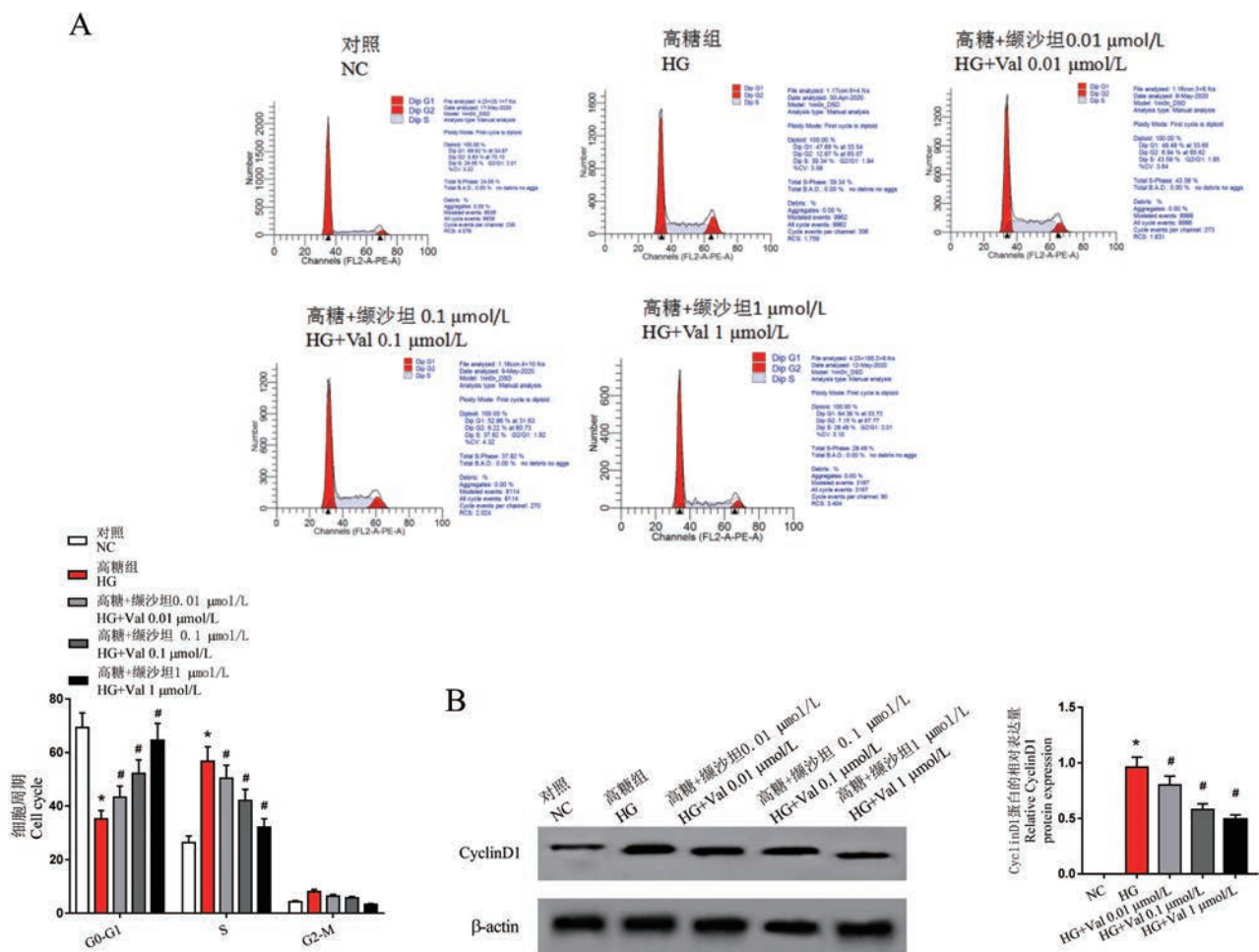


注:与 NC 组相比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 缬沙坦促进高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 增殖

Note. Compared with NC group, * $P < 0.05$. Compared with HG group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Valsartan promoted the proliferation of rat glomerular mesangial cells HBZY-1 after high glucose treatment



注:A:流式细胞术检测大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 细胞周期;B:Western blot 检测 CyclinD1 蛋白的表达。与 NC 组相比较, * $P<0.05$;与 HG 组相比较, # $P<0.05$ 。

图 2 缬沙坦促进高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 (48 h) 细胞周期和 CyclinD1 蛋白的表达

Note. A, Flow cytometry to detect the cell cycle of rat glomerular mesangial cells HBZY-1. B, Western blot to detect the expression of CyclinD1 protein. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with HG group, # $P<0.05$.

Figure 2 Valsartan promoted the cell cycle and CyclinD1 protein expression in rat glomerular mesangial cells HBZY-1 (48 h) treated with high glucose

期细胞比例无显著变化($P>0.05$)。

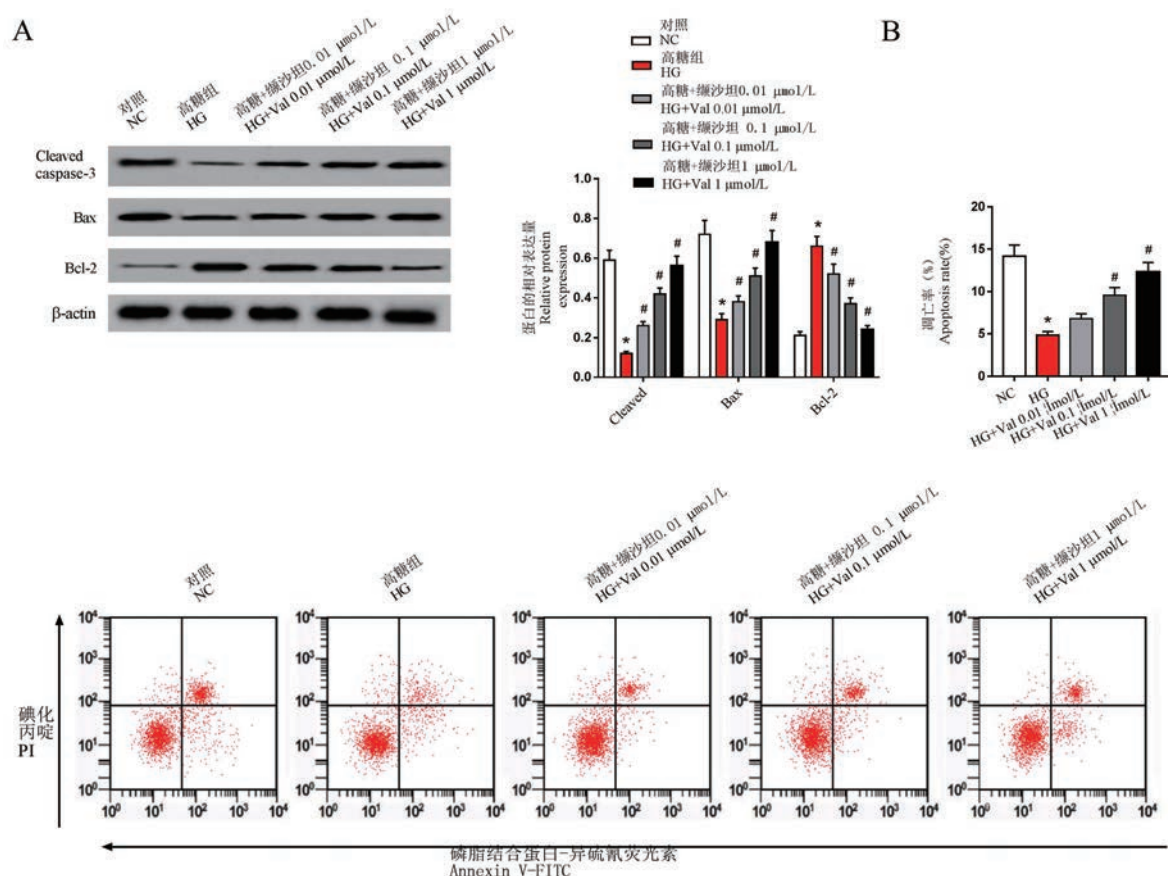
2.3 缬沙坦抑制高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 凋亡

Western blot 检测和流式细胞术检测结果见图 3。与 NC 组相比较, HG 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达水平明显增加, Bcl-2 蛋白表达水平显著减少, 细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)。与 HG 组相比较, HG + Val 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组、HG + Val 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组和 HG + Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达水平显

著降低, Bcl-2 蛋白表达水平明显升高, 细胞凋亡率显著减少, 均呈浓度依赖性($P<0.05$)。

2.4 缬沙坦抑制高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 NOTCH1 信号通路

Western blot 检测结果见图 4。与 NC 组相比较, HG 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 中 jagged1 和 NOTCH1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与 HG 组相比较, HG + Val 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 组、HG + Val 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组和 HG + Val 1 $\mu\text{mol/L}$ 组 jagged1 和 NOTCH1 蛋白表达水平明显降低, 且呈浓度依赖性($P<0.05$)。



注:A:Western blot 检测缬沙坦抑制高糖处理 48 h 大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达;B:流式细胞术检测大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 凋亡。与 NC 组相比较, * $P < 0.05$;与 HG 组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 缬沙坦抑制高糖处理大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 凋亡

Note. A, Western blot detection of valsartan inhibits the expression of HBZY-1 Cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 protein in rat glomerular mesangial cells treated with high glucose for 48 h. B, flow cytometry detection of rat kidney HBZY-1 apoptosis of mesangial cells. Compared with NC group, * $P < 0.05$. Compared with HG group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Valsartan inhibited the apoptosis of HBZY-1 glomerular mesangial cells in rats treated with high glucose

2.5 NOTCH1 信号通路激活剂部分逆转缬沙坦对高糖处理的大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的增殖和细胞周期的影响

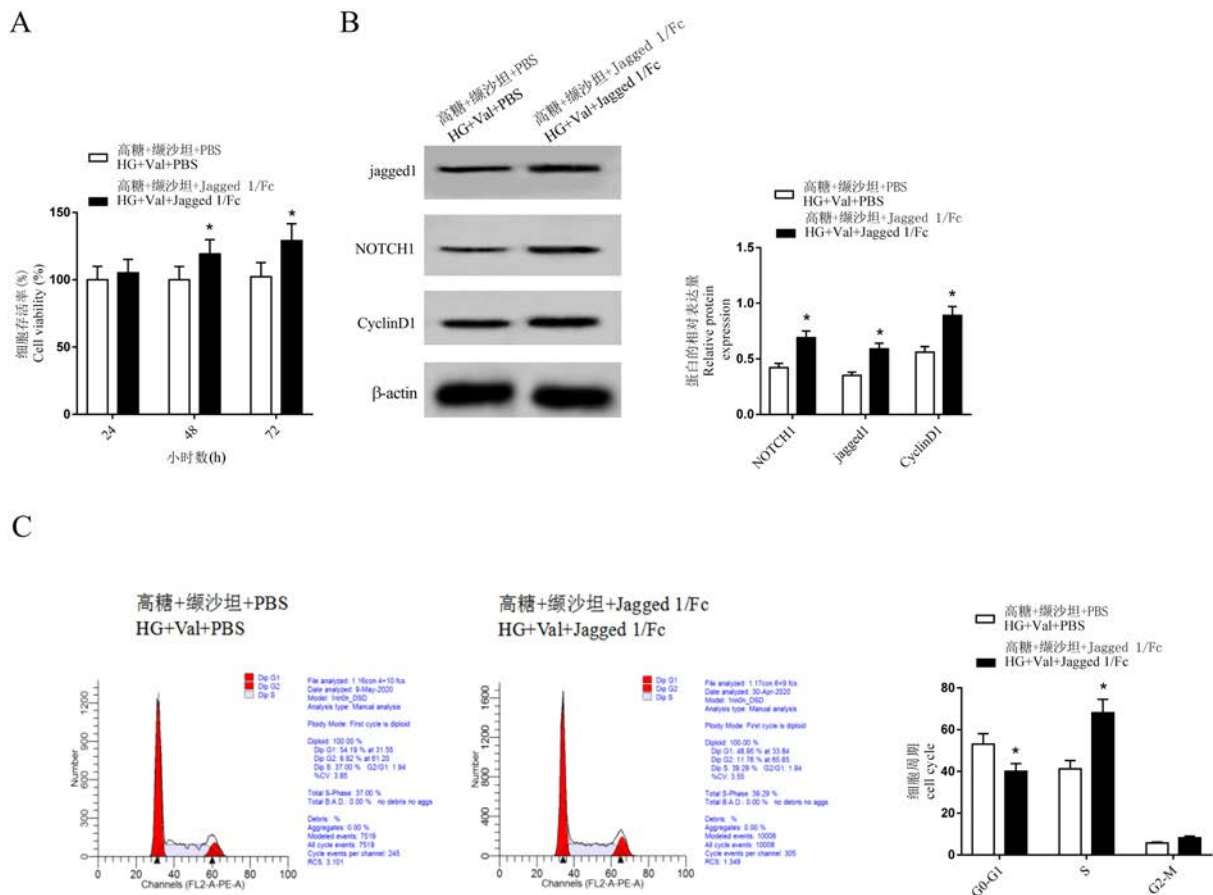
Western blot 检测、MTT 检测和流式细胞术检测结果见图 5。与 HG+Val+PBS 组相比较, HG+Val+Jagged 1/Fc 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的 NOTCH1、jagged1 蛋白表达水平明显升高, CyclinD1 蛋白表达水平降低, 且 24 h、48 h 和 72 h 的细胞增殖活力明显降低, G0-G1 期细胞比例显著增加, S 期细胞比例明显减少 ($P < 0.05$), G2-M 期细胞比例无显著变化 ($P > 0.05$)。

2.6 NOTCH1 信号通路激活剂部分逆转缬沙坦对高糖处理的大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 凋亡的影响

Western blot 检测和流式细胞术检测结果见图 6。与 HG+Val+PBS 组相比较, HG+Val+Jagged 1/Fc 组大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的 Cleaved caspase-3、Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低, 且细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)。

3 讨论

临床上, 糖尿病肾病具有多种症状特征, 例如蛋白尿。作为肾小球的固有细胞之一, 肾小球系膜细胞在糖尿病肾病的发病机理中发挥着重要的作用^[9]。越来越多的证据已经确认, 肾小球系膜细胞凋亡有助于蛋白尿的加重和糖尿病性肾小球硬化的发展^[10]。因此, 确定导致肾小球系膜细胞凋亡的



注:与 NC 组相比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 Western blot 检测大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 jagged1 和 NOTCH1 蛋白的表达

Note. Compared with NC group, * $P < 0.05$. Compared with HG group, # $P < 0.05$.

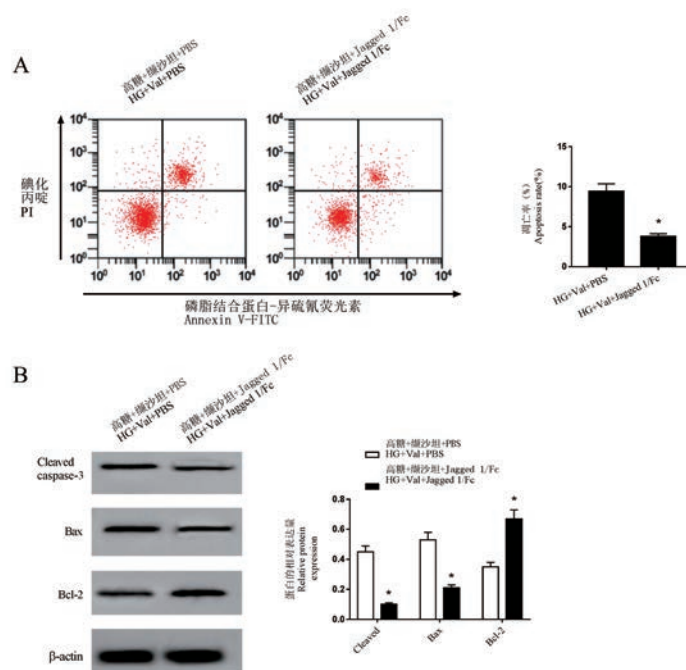
Figure 4 Western blot detected the expression of HBZY-1 jagged1 and NOTCH1 proteins in rat glomerular mesangial cells

可能机制对于深入了解糖尿病肾病的发病机理是十分必要的。本研究实验结果表明,大鼠肾小球系膜细胞暴露于高糖条件下可导致细胞增殖减少,阻滞细胞周期,且细胞凋亡增加^[11]。而缬沙坦的处理可以减轻高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞损伤,并且,可以抑制高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞中 NOTCH1 信号通路活性,证明了缬沙坦在预防或治疗糖尿病肾病方面的潜力。

缬沙坦是临床常用的降血压药物,此外,其在糖尿病肾病中的功能得到了广泛关注。各种研究已经证明,缬沙坦可以保护高糖刺激的肾小球足细胞或系膜细胞损伤,产生治疗糖尿病肾病的功效^[12-13]。目前的研究评估了缬沙坦在高糖损伤大鼠肾小球系膜细胞中的作用。与 HG 模型组相比,0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦干预细胞 48 h 后,细胞的增殖活力、S 期细胞比例、细胞增殖相关蛋白

CyclinD1 蛋白表达明显增强,G0-G1 期细胞比例、细胞的凋亡率、促凋亡蛋白 Bax、凋亡执行蛋白酶 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著提高。当前研究的结果表明,缬沙坦对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 损伤表现出治疗作用。值得注意的是,缬沙坦的浓度越高,其治疗效果越显著。

NOTCH 信号通路在维持进化过程中起着高度保守的信号调节系统的作用,并在细胞的正常增殖和分化中发挥重要作用。在脊椎动物中,配体(Delta-like 或 Jagged 蛋白)激活跨膜受体 NOTCH1-4。激活后,NOTCH 细胞内结构域(NICD)的切割允许其易位至细胞核,从而通过途径核效应子 RBPJ 激活目标基因,例如 HES bHLH 转录因子^[14]。该通路的失调与多种疾病有关,包括糖尿病肾病。越来越多的研究检测到,糖尿病肾病中 NOTCH1 信号传

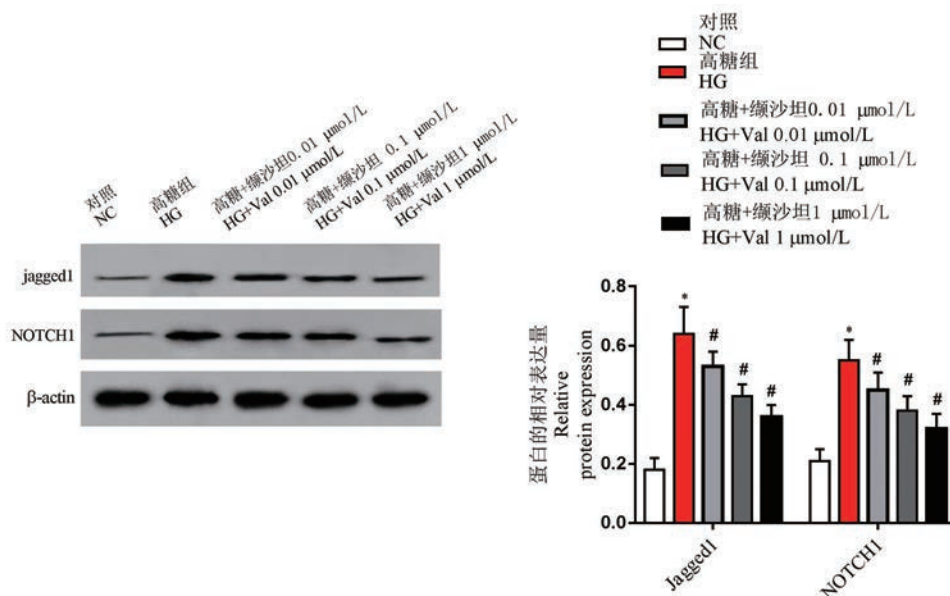


注:A:MTT 检测细胞增殖活性;B:Western blot 检测大鼠肾小球系膜 HBZY-1 jagged1、NOTCH1、CyclinD1 蛋白的表达;C:流式细胞术检测大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的细胞周期。与 HG+Val+PBS 组相比较, * $P<0.05$ 。

图 5 NOTCH1 信号通路激活剂部分逆转缬沙坦对高糖处理的大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 的增殖和周期的影响

Note. A, MTT detection of cell proliferation activity. B, Western blot detection of rat mesangial HBZY-1 jagged1, NOTCH1, CyclinD1 protein expression. C, Flow cytometry detection of rat mesangial cells HBZY-1 cell cycle. Compared with the HG+Val+PBS group, * $P<0.05$.

Figure 5 The NOTCH1 signaling pathway activator partially reversed the effect of valsartan on the proliferation and cycle of rat glomerular mesangial cells HBZY-1 treated with high glucose



注:A:流式细胞术检测大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 凋亡;B:Western blot 检测大鼠肾小球系膜 HBZY-1 Cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达。与 HG+Val+PBS 组相比较, * $P<0.05$ 。

图 6 NOTCH1 信号通路激活剂部分逆转缬沙坦对高糖处理的大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 凋亡的影响

Note. A, Flow cytometry to detect rat glomerular mesangial cells HBZY-1 apoptosis. B, Western blot to detect rat glomerular mesangial cells HBZY-1 Cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression. Compared with the HG+Val+PBS group, * $P<0.05$.

Figure 6 The NOTCH1 signaling pathway activator partially reversed the effect of valsartan on the apoptosis of rat glomerular mesangial cells HBZY-1 treated with high glucose

导途径转导的异常激活^[15]。在糖尿病肾病的病理过程中,高血糖和血液动力学改变会诱导 NOTCH 信号通路的 jagged1 配体和 NOTCH1 受体表达增加,从而导致受体结构发生改变^[16]。一些研究已证明,阻断 NOTCH1 信号传导途径对糖尿病肾病是一种有效的治疗策略^[17]。本研究表明,不同浓度的缬沙坦均可抑制高糖诱导的 NOTCH1 信号通路活性,降低 jagged1、NOTCH1 蛋白表达,并呈浓度依赖性,与文献^[5]报道的缬沙坦降低糖尿病小鼠肾小球组织中 jagged1、Notch1 表达的结果相同。进一步的研究发现,NOTCH1 信号通路激活剂 Jagged 1/Fc 融合蛋白处理细胞后,缬沙坦对高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 增殖、周期的促进作用被部分逆转,其对细胞凋亡的抑制作用也被部分逆转。由此可见,缬沙坦可以保护大鼠肾小球系膜细胞免受高糖诱导的损伤,其潜在机制是通过抑制 NOTCH1 传导途径来实现的。

综上所述,0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的缬沙坦可以浓度依赖性的促进高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞增殖和周期,并抑制期凋亡,其发挥保护作用的机制与抑制 NOTCH1 信号通路活性有关,这为糖尿病肾病治疗药物的开发提供了新的途径和依据。

参考文献:

- [1] Li S, Li W, Wu R, et al. Epigenome and transcriptome study of moringa isothiocyanate in mouse kidney mesangial cells induced by high glucose, a potential model for diabetic-induced nephropathy [J]. AAPS J, 2019, 22(1): 8.
- [2] Yunlei D, Qiuling F, Xu W, et al. Transient high-glucose stimulation induces persistent inflammatory factor secretion from rat glomerular mesangial cells via an epigenetic mechanism [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(5): 1747-1754.
- [3] 李明慧, 马瑞霞, 阎文静, 等. Ang II 上调 TRPC6、NFAT2 介导 2 型糖尿病肾病足细胞损伤 [J]. 青岛大学学报(医学版), 2019, 55(3): 299-302, 307.
- [4] 栾健, 王艳, 马瑞霞. 缬沙坦对糖尿病肾病大鼠肾组织 BMP-7 表达的影响 [J]. 山东医药, 2010, 50(17): 28-29.
- [5] 王晓梅, 丁洋, 赵玉峰, 等. 缬沙坦对糖尿病小鼠肾小球组织中 Notch 信号通路表达及细胞外基质生成的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(4): 397-400.
- [6] Zhang Z, Wang H. lncRNA SNHG1 suppresses gastric cancer cell proliferation and promotes apoptosis via Notch1 pathway [J]. J BUON, 2020, 25(1): 302-307.
- [7] He Y, Zhang M, Wu Y, et al. Aberrant activation of Notch-1 signaling inhibits podocyte restoration after islet transplantation in a rat model of diabetic nephropathy [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 950-964.
- [8] 史永红, 段惠军, 王丽晖, 等. 缬沙坦对高糖培养系膜细胞信号转导和转录活化因子 1,3 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(2): 203-206.
- [9] Chen HM, Dai JJ, Zhu R, et al. RCAN1.4 mediates high glucose-induced matrix production by stimulating mitochondrial fission in mesangial cells [J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20192759.
- [10] Wang Y, He Z, Yang Q, et al. XBP1 inhibits mesangial cell apoptosis in response to oxidative stress via the PTEN/AKT pathway in diabetic nephropathy [J]. FEBS Open Bio. 2019, 9(7): 1249-1258.
- [11] Wang Z, Li Y, Wang Y, et al. Pyrroloquinoline quinine protects HK-2 cells against high glucose-induced oxidative stress and apoptosis through Sirt3 and PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(2): 398-404.
- [12] 朱伶俐, 叶迅. 缬沙坦抑制高糖环境下足细胞损伤的机制探究 [J]. 中国现代医生, 2017, 55(33): 35-39.
- [13] 袁琴, 吕川, 吴灿, 等. 缬沙坦抑制高糖刺激下系膜细胞血管紧张素 II-Notch 通路 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(1): 5-9.
- [14] Cheung L, Le Tissier P, Goldsmith SG, et al. NOTCH activity differentially affects alternative cell fate acquisition and maintenance [J]. Elife, 2018, 7: e33318.
- [15] Nishad R, Mukhi D, Tahaseen SV, et al. Growth hormone induces Notch1 signaling in podocytes and contributes to proteinuria in diabetic nephropathy [J]. J Biol Chem, 2019, 294(44): 16109-16122.
- [16] Wei B, Liu YS, Guan HX. MicroRNA-145-5p attenuates high glucose-induced apoptosis by targeting the Notch signaling pathway in podocytes [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1915-1924.
- [17] Tian H, Yang J, Xie Z, et al. Gliquidone Alleviates diabetic nephropathy by inhibiting Notch/Snail signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5): 2085-2097.

[收稿日期] 2020-06-08

田璐. 扶正抗癌汤含药血清调节 EMT 进程抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞转移及侵袭作用的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 43-49.

Tian L. Inhibitory effects of Fuzheng Kang-Ai decoction on migration and invasion of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells by regulating the epithelial-mesenchymal transition process [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 43-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.007

扶正抗癌汤含药血清调节 EMT 进程抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞转移及侵袭作用的研究

田 璐*

(辽宁中医药大学附属医院妇产科, 沈阳 110032)

【摘要】 目的 研究扶正抗癌汤含药血清抑制 HO-8910PM 细胞转移及侵袭的作用及潜在机制。**方法** 将 48 只 SD 大鼠随机分为正常组及扶正抗癌汤低(4.725 g/(kg·d))、中(9.45 g/(kg·d))、高(18.9 g/(kg·d))剂量组,灌胃给药,每天 1 次,共持续 7 d;分离含药血清,用于孵育 HO-8910PM 细胞。通过划痕实验、Transwell 实验、ELISA 实验、实时定量 PCR 实验及 Western blot 实验检测相关指标变化情况。**结果** 与正常组比较,低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后,迁移率及穿膜细胞数均明显降低($P<0.01$);与正常组比较,低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 12 h、24 h 和 48 h 后, FN 蛋白表达明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与正常组比较,低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后, E-cadherin mRNA 表达增加($P<0.01$),而 vimentin、N-cadherin mRNA 表达及 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达显著减少($P<0.01$)。**结论** 扶正抗癌汤具有抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞转移及侵袭的作用,该作用与阻碍 TGF- β 1/Smad3 通路活化,进而调节 EMT 进程有关。

【关键词】 扶正抗癌汤含药血清;卵巢癌;转移;侵袭;EMT 进程

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0043-07

Inhibitory effects of Fuzheng Kang-Ai decoction on migration and invasion of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells by regulating the epithelial-mesenchymal transition process

TIAN Lu*

(Obstetrics and Gynecology Department in Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional
Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effects of Fuzheng Kang-Ai (FZKA) decoction on the migration and invasion of human ovarian carcinoma (HO-8910PM) cells and the underlying mechanisms. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into a control group, low-dose FZKA group (4.725 g/(kg·d)), medium-dose FZKA group (9.45 g/(kg·d)), and high-dose FZKA group (18.9 g/(kg·d)). The drug was administered by gavage once per day for 7 days. The decoction was isolated and used to incubate HO-8910PM cells, and changes in the related indices were detected by the cell scratch test, transwell assay, ELISA, real-time quantitative PCR, and Western blot. **Results** Compared with the control

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(No. L201909)。

[作者简介] 田璐(1982—)女,博士,研究方向:妇科肿瘤、多囊卵巢综合征。Email:ingrid_114@163.com

group, after 24 hours of low-, medium-, and high-dose FZKA decoction treatment, HO-8910PM cell mobility and invasion were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the control group, after 12-, 24-, and 48 h of low-, medium-, and high-dose FZKA decoction treatment of HO-8910PM cells, FN protein expression decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the control group, after 24 h of low-, medium- and high-dose FZKA decoction treatment of HO-8910PM cells, E-cadherin mRNA expression increased ($P < 0.01$), while vimentin, N-cadherin mRNA, TGF- $\beta 1$, and p-Smad3 expression decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** FZKA can inhibit the migration and invasion of HO-8910PM cells, by inhibiting TGF- $\beta 1$ /Smad3 pathway activation and further regulation of the EMT process.

【Keywords】 Fuzheng Kang-Ai(FZKA) decoction; ovarian carcinoma; migration; invasion; EMT process

卵巢癌为女性生殖器官常见恶性肿瘤,发病率排在女性各类肿瘤的第 3 位,而致死率高居第 1 位,严重威胁女性生命健康^[1-2]。由于卵巢癌缺少有效准确的早期诊断方法,加之发病隐匿,导致确诊患者中约 70%~80% 已为晚期,失去了手术治疗的最佳时期^[3]。化疗为晚期卵巢癌的主要治疗手段,虽然可暂时缓解病情,但存在严重的毒副作用、耐药及高复发率等缺点^[4]。卵巢癌的转移及侵袭是导致治疗失败和死亡的首要原因,如何抑制卵巢癌的转移及侵袭对提高患者的治愈率和生存率至关重要^[5]。

传统中药由于具有多靶点、多途径、疗效确切及低毒副作用等优势,在卵巢癌的治疗领域逐渐引起了人们的关注^[6-7]。扶正抗癌汤为辽宁中医药大学附属医院院内制剂,已广泛应用于非小细胞肺癌等多种肿瘤的治疗,取得了很好的临床疗效^[8]。然而关于扶正抗癌汤对肿瘤细胞转移及侵袭作用的研究报道较少。因此,本研究以人卵巢癌 HO-8910PM 细胞为研究对象,主要观察扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞转移及侵袭的作用,并进一步探讨其能否通过调节 TGF- $\beta 1$ /Smad3 通路及影响上皮间质转化(EMT)进程起到抗卵巢癌转移及侵袭的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性 48 只,体重 200~220 g,6~8 周龄,购于沈阳茂华生物科技有限公司[SCXK(辽)2017-0001]。SD 大鼠饲养于辽宁中医药大学实验动物中心[SYXK(辽)2019-0004];本实验获我校实验动物伦理委员会审批(21000092018069),按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 实验细胞

人卵巢癌 HO-8910PM 细胞,购于上海美轩生

物科技公司。

1.2 主要试剂与仪器

扶正抗癌汤由红人参 25 g、白术 10 g、甘草 10 g、半夏 15 g、浙贝母 15 g、枳壳 15 g、陈皮 15 g、半枝莲 10 g、白花舌草 50 g、竹茹 20 g、茯苓 20 g 及生姜 5 g 组成;经 2 次水煎后,合并药液,并浓缩至含生药 2 g/mL 药液,过滤,分装灭菌。胎牛血清、DMEM、胰蛋白酶,美国 Mediatech 公司;Matrigel 胶,美国 BD 公司;Transwell 小室,美国康宁公司;纤维连接蛋白(FN)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒,上海酶联生物公司;TRIzol、逆转录试剂盒及实时定量 PCR 检测试剂盒,日本 TaKaRa 公司;转移生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、磷酸化 Smad 同源物蛋白 3(p-Smad3)多克隆抗体,美国 Cell Signaling 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体,北京金杉中桥生物公司。超净工作台(型号:SW-CJ1FD,苏州净化设备公司);CO₂ 培养箱(型号:3111,美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(型号:DFC259,德国 Leica 公司);多功能酶标仪(型号:ELX808,美国 BioTek 公司);实时定量 PCR 系统(型号:7500,美国 ABI 公司);蛋白电泳仪(型号:DYCZ-24EN,北京六一仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备含药血清

将 48 只 SD 大鼠随机分为正常组及扶正抗癌汤低、中、高剂量组,12 只/组;依据人与大鼠剂量换算方法,以标准质量/人的体重 $\times 6.3$ 为高剂量(18.9 g/(kg·d))组,在此基础上稀释 1 倍(9.45 g/(kg·d))为中剂量组,稀释 2 倍为低剂量(4.725 g/(kg·d))组,灌胃给药,每天 1 次;正常组灌胃等体积蒸馏水,给药体积为 1 mL/100 g,共持续 7 d。末次灌胃给药后 2 h,经后股动脉采血,分离血清;在 56℃ 条件下将补体灭活,用 0.22 μ m 无菌滤膜过滤,分装于离心管中在低温冰箱中保存备用。

1.3.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基对 HO-8910PM 细胞进行培养,培养条件为 5% CO₂、37℃;使用胰蛋白酶(0.25%)消化细胞及传代,至对数生长期时用于后续实验研究。

1.3.3 划痕实验检测 HO-8910PM 细胞转移能力

在 6 孔培养板中接种对数生长期的 HO-8910PM 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养,待 24 h 细胞贴壁后,倒掉培养基;PBS 漂洗后,用无菌的移液器枪头沿中轴轻轻划线。PBS 漂洗,加入 DMEM 培养基(分别含 10% 正常组大鼠血清及 10% 低、中、高剂量扶正抗癌汤组大鼠含药血清),继续培养 24 h,拍照。通过给药前与给药后的划痕宽度,计算细胞相对迁移率,细胞相对迁移率(%)=(1~24 h 划痕宽度/0 h 划痕宽度)×100%

1.3.4 Transwell 实验检测 HO-8910PM 细胞侵袭能力

将稀释好的 Matrigel 胶加入到 Transwell 小室中,37℃ 下于 CO₂ 培养箱中放置 1 h,将多余培养基弃掉。HO-8910PM 细胞培养至对数生长期,离心后用无血清培养基重悬,并调整密度为每毫升 1×10^6 个,取 200 μL 细胞悬液加入到 Transwell 上室中;下室加入 700 μL DMEM 培养基(分别含 10% 正常组大鼠血清及 10% 低、中、高剂量扶正抗癌汤组大鼠含药血清),继续培养 24 h。将多余培养液弃掉,经 4% 多聚甲醛固定,并用结晶紫染色 0.5 h。显微镜下拍照,并计数细胞穿膜个数。

1.3.5 ELISA 实验检测 HO-8910PM 细胞上清液 FN 蛋白表达

HO-8910PM 细胞在 DMEM 培养基(分别含 10% 正常组大鼠血清及 10% 低、中、高剂量扶正抗癌汤组大鼠含药血清)培养 12 h、24 h 及 48 h 后,离心,收集各组细胞上清液。参考 FN 检测试剂盒中的操作步骤,通过 ELISA 实验检测细胞上清液 FN 蛋白表达。

1.3.6 实时定量 PCR 实验检测 HO-8910PM 细胞 E-Cadherin、vimentin 及 N-Cadherin mRNA 表达

HO-8910PM 细胞用 DMEM 培养基(分别含 10% 正常组大鼠血清及 10% 低、中、高剂量扶正抗癌汤组大鼠含药血清)培养 24 h 后,离心,收集各组细胞。TRIzol 法提取总 RNA,逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,实时定量 PCR 引物由大连宝生物公司合成。E-cadherin 引物:上游 5'-GACACTGGTGCCATTTCCAC-3',下游 5'-AGTTCGAGGTTCTGCTATGGG-3';

vimentin 引物:上游 5'-AGGCAAAGCAGGAGTCCACT-3',下游 5'-CGTTCCAGGGACTCATTGGT-3';N-cadherin 引物:上游 5'-GCAACGACGGGTAGTCAACC-3',下游 5'-GACACGGTTGCAGTTGACTGAG-3';GAPDH 引物:上游 5'-GCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3',下游 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。实时定量 PCR 反应体系为:上、下游引物各 1 μL,2×SYBR Green Mix 10 μL,蒸馏水 6 μL,cDNA 2 μL,总反应体积 20 μL。以 GAPDH 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,检测各组 HO-8910PM 细胞 E-Cadherin、vimentin 及 N-Cadherin mRNA 的表达。

1.3.7 Western blot 实验检测 HO-8910PM 细胞 TGF-β1、p-Smad3 蛋白表达

HO-8910PM 细胞处理方法同“1.3.6”。细胞总蛋白使用 RIPA 裂解液提取,按照 BCA 试剂说明书检测细胞蛋白含量。每个上样孔加 20 μg 蛋白样品,10% SDS-PAGE 分离,湿法转膜,5% 脱脂奶粉封闭。分别加入 TGF-β1、p-Smad3 抗体,稀释比例为 1:2500,4℃ 孵育过夜;TBST 溶液漂洗 3 次后,加入稀释好的二抗(1:5000),4℃ 孵育 1 h。TBST 溶液漂洗,加入 ECL 发光液显色,拍照,各组细胞光密度值用 Image Lab 软件分析。

1.4 统计学方法

各组数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,通过 SPSS 20.0 软件进行统计分析。若方差不齐,两两比较采用单因素方差分析 Dunnett's T3 进行;若方差齐,两两比较采用单因素方差分析 LSD-t 检验进行。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 提示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 扶正抗癌汤含药血清抑制 HO-8910PM 细胞转移

本研究通过细胞划痕实验检测了扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞迁移率的影响,结果见图 1 及表 1。与正常组比较,低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后,HO-8910PM 细胞迁移率明显降低($P < 0.01$),且随着药物剂量的增加,细胞迁移率逐渐越低。

2.2 扶正抗癌汤含药血清抑制 HO-8910PM 细胞侵袭

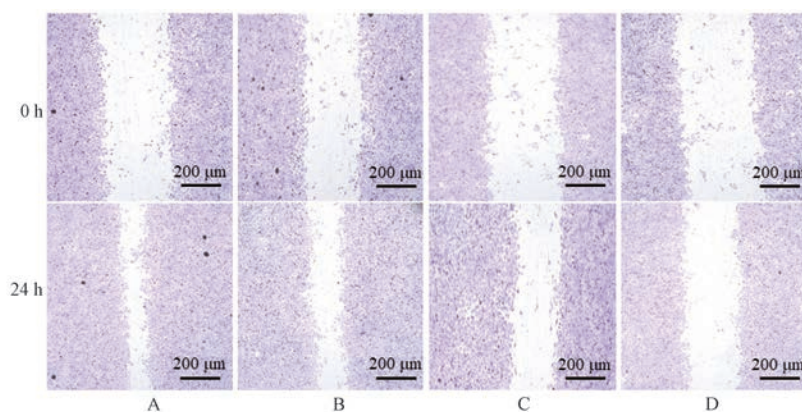
本研究通过 Transwell 实验检测了扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞侵袭能力的影响,结

果见表 2 及图 2。与正常组比较,低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后,HO-8910PM 细胞穿膜细胞数明显降低 ($P < 0.01$),且该作用具有剂量依赖性。

2.3 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 FN 蛋白表达的影响

FN 蛋白参与 EMT 进程,在肿瘤细胞间的黏附、

转移及侵袭中发挥重要作用,本研究采用 ELISA 法检测了扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 FN 蛋白表达的影响,结果见表 3。与正常组比较,低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 12 h、24 h 和 48 h 后,HO-8910PM 细胞在三个时间点的 FN 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且该作用具有时间依赖性 & 剂量依赖性。



注: A: 正常组; B~D: 4.725、9.45、18.9 g/(kg·d) 扶正抗癌汤组。

图 1 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞迁移率的影响

Note. A, Normal group. B~D, 4.725, 9.45, 18.9 g/(kg·d) FZKAT drug serum groups.

Figure 1 Effect of FZKAT drug serum on migration rate of HO-8910PM cells

表 1 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Effect of FZKAT drug serum on migration rate of HO-8910PM cells

组别 Groups	剂量 (g/(kg·d)) Dose	迁移率 (%) Migration rate
正常组 Normal group	0	82.03±10.12
扶正抗癌汤低剂量组 FZKAT drug serum low dose group	4.725	67.24±7.20**
扶正抗癌汤中剂量组 FZKAT drug serum medium dose group	9.450	54.17±5.13**
扶正抗癌汤高剂量组 FZKAT drug serum high dose group	18.900	41.79±4.58**

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

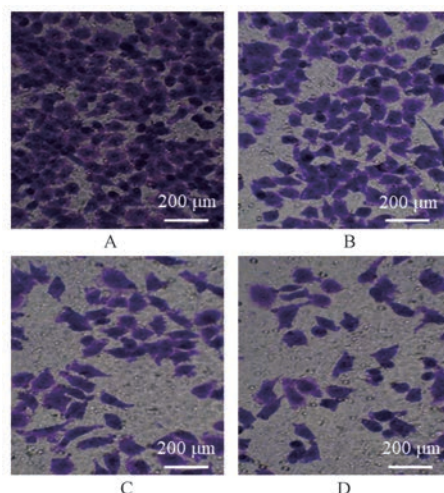
表 2 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effect of FZKAT drug serum on invasion of HO-8910PM cells

组别 Groups	剂量 (g/(kg·d)) Dose	穿膜细胞数 (个) Wear membrane cell count (number)
正常组 Normal group	0	154.55±18.02
扶正抗癌汤低剂量组 FZKAT drug serum low dose group	4.725	105.48±12.67**
扶正抗癌汤中剂量组 FZKAT drug serum medium dose group	9.450	67.92±8.46**
扶正抗癌汤高剂量组 FZKAT drug serum high dose group	18.900	48.37±5.13**

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

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



注: A: 正常组; B~D: 4.725、9.45、18.9 g/(kg·d) 扶正抗癌汤组。

图 2 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞侵袭能力的影响

Note. A, Normal group. B~D, 4.725, 9.45, 18.9 g/(kg·d)) FZKAT drug serum groups.

Figure 2 Effect of FZKAT drug serum on invasion of HO-8910PM cells

2.4 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 E-Cadherin、vimentin 及 N-Cadherin mRNA 表达的影响

EMT 进程在细胞水平上以间质特性增强, 上皮特性丧失为主要特征, 在分子水平上表现为 vimentin 和 N-cadherin 表达增加, 而 E-cadherin 表达减少。本研究采用实时定量 PCR 法检测了扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 E-Cadherin、vimentin 及 N-Cadherin mRNA 表达的影响, 结果见表 4。与正常组比较, 低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后, HO-8910PM 细胞 E-cadherin mRNA 表达增加 ($P < 0.01$), 而 vimentin 和 N-cadherin mRNA 表达减少 ($P < 0.01$)。

2.5 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 TGF- β 1/Smad3 通路的影响

TGF- β 1/Smad3 通路在 EMT 发生和肿瘤细胞转移、侵袭过程起着重要调控作用, 本研究采用 Western blot 实验检测了扶正抗癌汤含药血清对 HO-

表 3 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 FN 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of FZKAT drug serum on FN expression of HO-8910PM cells

组别 Groups	剂量(g/(kg·d)) Dose	纤维连接蛋白 (ng/mL) Fibronectin		
		12 h	24 h	48 h
正常组 Normal group	0	72.36±8.64	73.12±8.46	71.82±7.23
扶正抗癌汤低剂量组 FZKAT drug serum low dose group	4.725	63.94±7.20 *	59.69±6.87 **	54.87±6.76 **
扶正抗癌汤中剂量组 FZKAT drug serum medium dose group	9.450	61.38±7.79 **	52.51±5.04 **	40.23±5.37 **
扶正抗癌汤高剂量组 FZKAT drug serum high dose group	18.900	55.53±6.05 **	41.40±6.38 **	33.41±5.22 **

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

表 4 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 E-Cadherin、vimentin 及 N-Cadherin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of FZKAT drug serum on E-Cadherin, vimentin and N-Cadherin mRNA expressions of HO-8910PM cells

组别 Groups	剂量(g/(kg·d)) Dose	E-钙黏蛋白 E-Cadherin	波形蛋白 Vimentin	N-钙黏蛋白 N-Cadherin
正常组 Normal group	0	0.30±0.04	0.45±0.06	0.64±0.08
扶正抗癌汤低剂量组 FZKAT drug serum low dose group	4.725	0.36±0.04 **	0.31±0.03 **	0.43±0.05 **
扶正抗癌汤中剂量组 FZKAT drug serum medium dose group	9.450	0.42±0.05 **	0.27±0.04 **	0.39±0.04 **
扶正抗癌汤高剂量组 FZKAT drug serum high dose group	18.900	0.51±0.05 **	0.22±0.03 **	0.38±0.05 **

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

8910PM 细胞 TGF- β 1 及 p-Smad3 蛋白表达的影响, 结果见图 3 及表 5。与正常组比较, 低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24 h 后, HO-8910PM 细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达显著减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

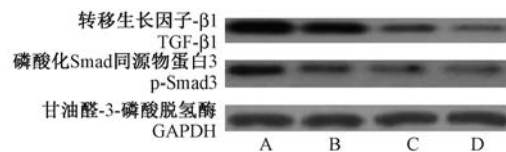
3 讨论

EMT 是指由上皮细胞向间质细胞转化的现象, 其在卵巢癌、骨肉瘤、胰腺癌、结肠癌、肺癌及乳腺癌等多种肿瘤的转移及侵袭中起着关键性作用^[9-10]。FN 蛋白广泛存在于细胞外液、细胞表面及结缔组织中, 是细胞外基质的重要组成部分, 参与细胞的粘附、迁移及分化; 在 EMT 进程中 FN 表达升高, 进而促进肿瘤细胞的转移及侵袭^[11]。E-cadherin 表达减少, vimentin 和 N-cadherin 表达增加是肿瘤细胞发生 EMT 的重要证据。E-Cadherin 参与维持上皮组织完整性和细胞极性, 广泛存在于上皮组织中, 当肿瘤细胞 E-Cadherin 表达下调时, 可引起侵袭性生长, 导致肿瘤细胞的远端转移^[12]。Vimentin 主要负责维持细胞骨架的完整性, 为间充质来源细胞中的一种中间纤维蛋白, vimentin 高表达标志着 EMT 进程及肿瘤细胞转移、侵袭的发生^[13]。N-cadherin 参与细胞黏附、细胞的信号转导、细胞识别及细胞运动等生物学过程, 其表达量与肿瘤的转移及侵袭程度呈正相关性^[14]。

TGF- β 1/Smad3 通路在肿瘤细胞的增殖、凋亡、EMT 进程及转移、侵袭中发挥着重要作用^[15]。TGF- β 1 存在于多种细胞中, 具有抑制免疫监视、刺激细胞增殖、分化、迁移及促进炎症因子表达等作用^[16]。研究发现^[17], 在恶性肿瘤细胞中 TGF- β 1 表

达量增加, 进而与 p-Smad3 形成复合物并一同进入细胞核内, 介导 EMT 进程, 引发肿瘤细胞的转移、侵袭过程。阻碍 TGF- β 1/Smad3 通路活化, 影响 EMT 进程是抑制肿瘤细胞转移、侵袭的关键^[18]。研究发现^[19], 白藜芦醇可以阻断 TGF- β 1/Smad3 信号通路转导, 抑制人肺癌 A549 细胞的增殖及 EMT 进程, 减少 A549 细胞的转移及侵袭。血根碱也可以干预 TGF- β 1/Smad 信号通路, 抑制卵巢癌 A2780/Taxol 细胞的生长及转移^[20]。

本研究结果发现, 与正常组比较, 低、中、高剂量扶正抗癌汤组含药血清处理 HO-8910PM 细胞后, 迁移率及穿膜细胞数均明显降低, 提示扶正抗癌汤具有抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞转移及侵袭的作用; 同时, vimentin、N-cadherin mRNA 表达及 FN、TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达也明显降低, 而 E-cadherin mRNA 表达增加, 表明扶正抗癌汤抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞转移及侵袭的作用与阻碍 TGF- β 1/Smad3 通路活化, 进而调节 EMT 进程有关。



注: A: 正常组; B~D: 4.725、9.45、18.9 g/(kg·d) 扶正抗癌汤组。

图 3 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 TGF- β 1/Smad3 通路的影响

Note. A, Normal group. B~D, 4.725, 9.45, 18.9 g/(kg·d) FZKAT drug serum groups.

Figure 3 Effect of FZKAT drug serum on TGF- β 1 and p-Smad3 protein expressions of HO-8910PM cells

表 5 扶正抗癌汤含药血清对 HO-8910PM 细胞 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 5 Effect of FZKAT drug serum on TGF- β 1 and p-Smad3 protein expressions of HO-8910PM cells

组别 Groups	剂量 (g/(kg·d)) Dose	转移生长因子- β 1/甘油醛-3- 磷酸脱氢酶 TGF- β 1/GAPDH	磷酸化 Smad 同源物蛋白 3/甘油醛-3- 磷酸脱氢酶 p-Smad3/GAPDH
正常组 Normal group	0	1.43 $\pm$ 0.17	0.95 $\pm$ 0.11
扶正抗癌汤低剂量组 FZKAT drug serum low dose group	4.725	1.14 $\pm$ 0.12 **	0.34 $\pm$ 0.04 **
扶正抗癌汤中剂量组 FZKAT drug serum medium dose group	9.450	0.42 $\pm$ 0.05 **	0.23 $\pm$ 0.03 **
扶正抗癌汤高剂量组 FZKAT drug serum high dose group	18.900	0.30 $\pm$ 0.04 **	0.19 $\pm$ 0.02 **

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

参考文献:

- [1] 李佳旎, 周雪影, 李亚兰. 卵巢癌患者发病危险因素及术后康复效果影响因素分析 [J]. 中国卫生统计, 2019, 36(1): 62-64.
- [2] Ståhlberg K, Svensson T, Granath F, et al. Evaluation of prevalent and incident ovarian cancer co-morbidity [J]. Br J Cancer, 2012, 106(11): 1860-1865.
- [3] 赵婷婷, 沈国栋, 胡卫平. 卵巢癌转移相关分子标记物及靶向性治疗药物的研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2015, 42(4): 457-460.
- [4] Zheng H, Zhang M, Ma S, et al. Identification of the key genes associated with chemotherapy sensitivity in ovarian cancer patients [J]. Cancer Med, 2020, 9(14): 5200-5209.
- [5] Wang J, Hu Y, Ye C, et al. miR-1224-5p inhibits the proliferation and invasion of ovarian cancer via targeting SND1 [J]. Hum Cell, 2020, 33(3): 780-789.
- [6] 曹俊红, 姬霞, 杜文霞, 等. 青蒿鳖甲方对二甲苯基诱导雌鼠卵巢癌的影响及作用机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(9): 1573-1578.
- [7] 李航, 杨蝶, 刘慧芝. 复方丹参滴丸靶向调节 JAK2/STAT3 途径抑制卵巢癌大鼠的机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2269-2271, 后插 15.
- [8] 吴姗姗, 王柏山, 严峰, 等. 服用扶正抗癌方前后非小细胞肺癌患者 CD8⁺T 细胞表达 NKG2D 与其细胞毒活性的相关性分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 549-554.
- [9] 袁赤亭, 雷新环, 洪盾. 上皮细胞间质转化和骨肉瘤侵袭转移相关性研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(10): 14-17.
- [10] 华海侠, 刘瑞吉, 于晓麟, 等. 靶向 HDAC6 信号抑制非小细胞肺癌 A549 细胞上皮-间质转化的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 61-67.
- [11] 崔江河, 韩光宇, 何光梅, 等. 人参皂苷 CK 联合 5-氟尿嘧啶对人胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、凋亡及上皮间质转化的影响 [J]. 中国药房, 2017, 28(31): 4388-4392.
- [12] 王桦影, 余文燕, 王国娟, 等. 二至丸对人结肠癌细胞的侵袭转移作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 28-33.
- [13] 丁志丹, 方泽民, 王旭广, 等. 贝母素乙调控 PI3K/Akt/mTOR 通路减缓上皮-间质转化进程抑制人肺癌 A549 细胞侵袭及迁移的研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1382-1387.
- [14] 薛德冬, 李锐. 乙酰紫草素对人结肠癌 HCT116 细胞增殖、凋亡及上皮间充质转化的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 401-404.
- [15] Mo C, Liu T, Zhang S, et al. Reduced N-acetylglucosaminyltransferase III expression via Smad3 and Erk signaling in TGF- β 1-induced HCC EMT model [J]. Discov Med, 2017, 23(124): 7-17.
- [16] Liang M, Liu XC, Liu T, et al. GLI-1 facilitates the EMT induced by TGF- β 1 in gastric cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(20): 6809-6815.
- [17] Wang X, Zhang G, Cheng Z, et al. Knockdown of LncRNA-XIST suppresses proliferation and TGF- β 1-induced EMT in NSCLC through the Notch-1 pathway by regulation of miR-137 [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2018, 22(6): 333-342.
- [18] 瞿晓媛, 邵文琳, 徐益恒, 等. 桂皮醛通过 TGF- β 信号通路调控结肠癌细胞侵袭和转移研究 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(3): 340-344, 349.
- [19] 张云珍, 方海燕, 余红, 等. 白藜芦醇抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路对人肺上皮细胞 A549 EMT 调控的影响及机制 [J]. 广东医学, 2019, 40(15): 2130-2134.
- [20] 张素仙, 王妍妍, 张琴, 等. 血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌 A2780/Taxol 细胞生长及 TGF- β 1/Smad 通路抑制的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(6): 717-720.

[收稿日期]2020-06-10

董琳琳, 闫慧敏, 丰晨然, 等. 痰喘宁合剂平喘、镇咳、祛痰作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 50-58.

Dong LL, Yan HM, Feng CR, et al. Anti-asthmatic, antitussive and expectorant effects of the Tanchuanning mixture [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 50-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.008

痰喘宁合剂平喘、镇咳、祛痰作用研究

董琳琳^{1#}, 闫慧敏^{2#}, 丰晨然¹, 石璐¹, 苗丰¹, 赵一颖¹, 陈芳²,
孙文燕^{1*}, 郝静^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院中药药理系, 北京 102488;

2. 国家儿童医学中心 首都医科大学附属北京儿童医院中医科, 北京 100045)

【摘要】 目的 研究痰喘宁合剂平喘、镇咳、祛痰作用。**方法** 采用卵蛋白所致大鼠哮喘模型, 观察大鼠气道阻力(R_L)的变化, 运用 ELISA 法检测分析各组大鼠血清中 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平, 并在镜下进行实验大鼠肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) WBC 及 EOS 计数, HE 染色观察肺组织病理变化并对其进行评分。采用氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠, 观察痰喘宁合剂的平喘作用。采用氨水引咳小鼠、枸橼酸引咳豚鼠, 观察痰喘宁合剂的镇咳作用。采用小鼠气管段酚红排泌量实验, 观察痰喘宁合剂的祛痰作用。**结果** 痰喘宁合剂可降低哮喘大鼠气道阻力, 降低血清 IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平, 减少 BALF 中 WBC 及 EOS 数量, 改善肺组织损伤情况, 延长豚鼠引喘潜伏期 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 延长豚鼠及小鼠咳嗽潜伏期, 减少咳嗽次数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 增加酚红排泌量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 痰喘宁合剂具有平喘、镇咳、祛痰作用。

【关键词】 痰喘宁合剂; 平喘; 镇咳; 祛痰

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0050-09

Anti-asthmatic, antitussive and expectorant effects of the Tanchuanning mixture

DONG Linlin^{1#}, YAN Huimin^{2#}, FENG Chenran¹, SHI Lu¹, MIAO feng¹, ZHAO Yi ying¹,
CHEN Fang², SUN Wenyan^{1*}, HAO Jing^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. National Center for Children's Health, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100045)

【Abstract】 Objective To investigate the anti-asthmatic, anti-tussive, and expectorant effects of Tanchuanning mixture. **Methods** An Asthma model in rats was established by sensitization and challenge with ovalbumin (OVA) and then airway resistance (R_L) was observed. Serum levels of IgE, IL-4, IL-17, and TNF- α were analyzed by ELISAs. The numbers of WBCs and EOSs in BALF of rats were counted and HE staining of lung tissue was performed to observe

【基金项目】 闫慧敏全国名老中医药专家传承工作室 (国中医药人教发[2016]42 号)。

【作者简介】 董琳琳 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药抗炎与免疫药理研究。E-mail: 1726376728@qq.com

闫慧敏 (1954—), 女, 本科, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 小儿疾病的中西医结合诊治。

E-mail: huiminyan@sina.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 孙文燕 (1970—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药防治免疫性疾病的药理学研究及中药毒理学研究。

E-mail: sunwy@bucm.edu.cn

郝静 (1972—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 小儿疾病的中西医结合诊治。E-mail: haojing115@sina.com

^{*} 共同通信作者

pathological changes. Methacholine chloride and histamine phosphate were used to induce asthma in guinea pigs to observe the anti-asthmatic effect of Tanchuanning mixture. The anti-tussive effect of Tanchuanning mixture was observed in a cough mouse model induced by ammonia and guinea pig model induced by citric acid. A phenol red excretion test in the tracheas of mice was used to observe the expectorant effect of Tanchuanning mixture. **Results** Tanchuanning mixture reduced airway resistance, decreased IgE, IL-4, IL-17, TNF- α levels in serum and the number of WBCs and EOSs in BALF, and alleviated lung tissue damage in asthmatic rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Tanchuanning mixture prolonged asthma and cough latencies in guinea pigs and mice, respectively, reduced the cough times in mice, and increased phenol red excretion in mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Tanchuanning mixture has obvious anti-asthmatic, anti-tussive, and expectorant effects.

【Keywords】 Tanchuanning mixture; anti-asthmatic effect; anti-tussive effect; expectorant effect

咳嗽是儿童常见多发病,多伴有咳痰、喘息等表现,往往反复发作,难以根治。该病病理表现多以慢性气道炎症、气道高阻力为主,易受吸烟及环境中的过敏原或生活污染物影响^[1]。痰湿蕴肺型咳嗽在临床中较为常见,中医理论认为其主要病因是阴虚肺热,脾肾亏虚^[2]。痰喘宁合剂为北京儿童医院的院内制剂,用于痰湿蕴肺型患儿有确切临床疗效^[3],而对其药效尚缺乏系统研究。本研究分别采用卵蛋白所致过敏性哮喘大鼠模型、氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠模型、氨水引咳小鼠模型、枸橼酸引咳豚鼠模型、小鼠气管段酚红排泄量实验,观察痰喘宁合剂的平喘、镇咳、祛痰作用,以期为其临床合理应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 5 周龄(体重 130~150 g) 84 只,SPF 级 ICR 小鼠 4 周龄(体重 14~16 g) 144 只,均雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。SPF 级豚鼠 4 周龄 132 只,体重 200~230 g,雌雄各半,购自于北京科宇动物养殖中心[SCXK(京)2018-0010]。实验前适应性饲养 7 d,实验期间,保持动物房室温在 $(21 \pm 5)^\circ\text{C}$,相对湿度为 40%~70%,光照条件设置为 12 h/12 h 明暗交替。实验大鼠自由进食,自由饮水。所有涉及动物的相关实验程序均已经过北京中医药大学学术委员会实验动物伦理小组委员会批准(bucm-4-20190611-2045),大鼠、小鼠饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验室[SYXK(京)2016-0038],豚鼠饲养于中国中医科学院中药安全评价实验室[SYXK(京)2016-0013],并经过中国中医科学院中药研究所动物实验福利伦理审查通过(20193004)。实验过程中所有操作均符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

痰喘宁合剂(北京儿童医院);卵蛋白(Sigma,批号:SLBV7493);注射用氢氧化铝凝胶(Pierce,批号:SH255260);磷酸组胺,氯化乙酰甲胆碱(Bioruler,批号分别为:3410,r621712);醋酸地塞米松(天津力生制药股份有限公司,批号:20170401);氨溴特罗(北京韩美药品有限公司,批号:H20040317);小青龙合剂(西安天一秦昆制药有限公司,批号:180306);10%中性缓冲福尔马林固定液,Harris 苏木素,0.5%伊红,中性树胶封片剂(北京益利精细化学品有限公司);Rat IgE、IL-4、IL-17、TNF- α ELISA 试剂盒(瑞格博,批号分别为:20200129.60139R、20200129.60021R、20200129.60032R、20200129.60080R);瑞氏吉姆萨染色液(南京建成);枸橼酸,酚红(Salarbio,批号分别为:126E041,1211C031);氨水(北京化工厂,批号:20141008)。

402A、B 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司);Buxco 实验动物气道阻力和肺顺应性有创检测仪器(美国 Buxco 公司);移液器(美国 Eppendorf 公司);台式离心机,低温水平高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司);Tissue-TEK VIP6 生物组织脱水仪、Tissue-TEK TEC 生物组织包埋仪(日本樱花公司);Leica RM2235 组织切片仪、Leica HI1210 捞片机、Leica HI1220 烤片机、Leica ST5020 自动染色仪、Leica CV5030 自动封片机(德国莱卡公司);Olympus BX53 显微镜(美国奥林帕斯公司);Path QC 病理质控和资料管理系统(中国朗珈公司);酶标仪(美国 Epoch, BioTek 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 痰喘宁合剂平喘作用研究

(1) 卵蛋白(OVA)所致哮喘大鼠实验

将 SD 大鼠随机分为 7 组^[4]:正常组、模型组、痰喘宁合剂低剂量组(7.5 mL/kg)、痰喘宁合剂中

剂量组(15 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(30 mL/kg)、醋酸地塞米松组(0.55 mg/kg)、小青龙合剂组(4 mL/kg)。每组 12 只,雌雄各半。除正常组外,其余动物建立哮喘大鼠模型:于实验第 1 日、第 8 日在大鼠的腹腔、两腹股沟注射每 mL 含 10 mg OVA、100 mg AL(OH)₃ 的混悬液,注射剂量为(腹腔 0.5 mL,两腹股沟各 0.25 mL),正常组注射相同体积的生理盐水。实验第 15 天,各组按剂量灌胃,正常组及模型组给予生理盐水。模型组和各给药组在给生理盐水或相应药物 1 h 后用 1% OVA 雾化激发 30 min,正常组则用生理盐水代替,连续 7 d。于末次激发 24 h 后,大鼠麻醉,仰面固定,气管插管,置于密闭体描箱内,肺功能仪系统辅助呼吸。等待大鼠气道阻力基线稳定,滴加不同浓度的氯化乙酰甲胆碱 20 μ L(0、6.25、12.5 和 50 mg/mL),雾化 30 s,记录 3 min,检测气道阻力(R_L)。将大鼠从密闭体描箱取出,腹主动脉取血,室温静置 2 h 后,4℃,3000 r/min 离心 10 min,ELISA 法检测血清中 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 的含量。分别将 2 mL、2 mL、1 mL 生理盐水于气管插管处缓慢注入,停留约 10 s 后,缓慢抽回,收集灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),4℃,1500 r/min 离心 10 min,取沉淀用 0.2 mL PBS 混悬,瑞氏染色,用于 WBC 及 EOS 计数。取出大鼠右肺下叶组织,将其置于 10% 福尔马林固定液中,进行常规石蜡包埋并切片,HE 染色,光学显微镜下观察右肺下叶组织病理变化,并进行支气管及周围炎症评分。根据其病变的严重程度半定量为:无病变,记 0 级,为 0 分;轻度,记 I 级,为 1 分;中度,记 II 级,为 2 分。

HE 染色步骤如下:二甲苯溶液 I、II 浸泡各 15 min 脱蜡;100% 乙醇溶液 I、II 浸泡 5 min;95%、85%、75% 梯度乙醇溶液浸泡,各 5 min;苏木素染液染色 5 min,水洗;盐酸乙醇溶液分化 2~3 s,水洗;氨水溶液浸泡返蓝 1 min,水洗;伊红染液染色 5 min;75%、85%、95% 梯度乙醇溶液浸泡,各 5 min;100% 乙醇溶液 I、II 浸泡,各 5 min;二甲苯溶液 I、II 浸泡,各 5 min;中性树胶封片。

(2) 氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠实验

将豚鼠置于雾化器内^[5],以 2% 氯化乙酰甲胆碱与 0.1% 磷酸组胺等体积混合液定量恒压喷雾 10 s,记录 2 min 内豚鼠从接受喷雾开始到出现喘息性抽搐,直至跌倒的潜伏期。引喘潜伏期超过 120 s 者舍弃不用。将筛选出的豚鼠随机分为模型组、痰喘宁合剂低剂量组(8.4 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(16.8 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(33.6

mL/kg)、氨溴特罗组(4.5 mL/kg)、小青龙合剂组(4.5 mL/kg),每组 10 只,雌雄各半。各组按剂量灌胃,模型组灌胃等量生理盐水,连续 7 d。末次给药 1 h 后,用上述方法测定各组豚鼠引喘潜伏期。

1.3.2 痰喘宁合剂镇咳作用研究

(1) 枸橼酸引咳豚鼠实验

将豚鼠置于雾化器内^[6],以 17.5% 的枸橼酸雾化 1 min,并持续刺激 4 min,测定 5 min 内豚鼠的咳嗽次数,小于 10 次者舍去。将筛选合格的豚鼠随机分为模型组、痰喘宁合剂低剂量组(8.4 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(16.8 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(33.6 mL/kg)、氨溴特罗组(4.5 mL/kg)、小青龙合剂组(4.5 mL/kg),每组 10 只,雌雄各半。各组按剂量灌胃,模型组灌胃等量生理盐水,连续 3 d。末次给药 1 h 后,用上述方法测定各组豚鼠咳嗽潜伏期及咳嗽次数。

(2) 氨水引咳小鼠实验

将小鼠随机分为模型组、痰喘宁合剂低剂量组(5.72 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(11.43 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(22.85 mL/kg)、氨溴特罗组(5.70 mL/kg)、小青龙合剂组(6.50 mL/kg),每组 12 只,雌雄各半。各组小鼠按剂量灌胃,模型组灌胃等量的生理盐水,连续 3 d。末次给药 1 h 后,将小鼠置于倒置的 500 mL 烧杯中,放入注有 0.2 mL 氨水的棉球。1 min 后将棉球取出,观察 2 min。小鼠第一次咳嗽(小鼠张大嘴,同时腹部收缩,偶有咳嗽声)时间即为咳嗽潜伏期,并记录 3 min 内咳嗽次数。

1.3.3 痰喘宁合剂祛痰作用研究

将小鼠随机分为模型组^[6]、痰喘宁合剂低剂量组(5.72 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(11.43 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(22.85 mL/kg)、氨溴特罗组(5.70 mL/kg)、小青龙合剂组(6.50 mL/kg),每组 12 只,雌雄各半。各组小鼠按剂量灌胃,模型组灌胃等量的生理盐水,连续 3 d。末次给药 30 min 后,腹腔注射 2.5% 的酚红溶液(0.2 mL/10 g)。30 min 后处死,剪开颈部,暴露气管,剪下自甲状软骨至气管分叉处的一段气管,放入 2 mL 碳酸氢钠与生理盐水的混合液中(比例为 1:15),酶标仪检测 546 nm 处的吸光度(OD)值,利用标准曲线计算酚红排泄量。

1.4 统计学方法

所有实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS 9.2 统计软件处理。气道阻力检测结果进行多因素重复测量方差分析,病理炎症评分用

Ridit 评级方法进行分析。其余指标,若各组数据服从正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析,两组比较采用 q 检验;若各组数据不服从正态分布或方差不齐,则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰喘宁合剂平喘作用研究

2.1.1 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠气道阻力的影响

相较于正常组,模型组大鼠 R_L 在乙酰甲胆碱浓度为 0、12.5、50 mg/mL 时均升高 ($P < 0.05$)。相较于模型组,痰喘宁合剂低剂量组与小青龙合剂组在乙酰甲胆碱浓度为 0、12.5、50 mg/mL 时 R_L 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);痰喘宁合剂中剂量组在乙酰甲胆碱浓度为 6.25 mg/mL 时,相对于模型组, R_L 有所升高 ($P < 0.05$);醋酸地塞米松组在乙酰甲胆碱浓度为 50 mg/mL 时, R_L 降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.1.2 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠血清 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平的影响

相较于正常组,模型组大鼠血清中 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$);相较于模型组,醋酸地塞米松组 IgE 水平降低,痰喘宁合剂各剂量组 IgE 水平均有降低趋势 ($P > 0.05$);相较于模型组,痰喘宁合剂中剂量组及醋酸地塞米松组 IL-4、IL-17 及 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);小

青龙合剂组 IL-17 水平降低 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

2.1.3 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠肺泡灌洗液 WBC 及 EOS 的影响

相较于正常组,模型组大鼠 BALF 中 WBC 数量和 EOS 百分比升高 ($P < 0.01$)。相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、醋酸地塞米松组及小青龙合剂组均可降低 BALF 中 WBC 数量和 EOS 百分比 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

2.1.4 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠肺组织病理影响

正常组大鼠支气管管腔未见扩张,管腔内无分泌物,皱襞如常,上皮细胞未见变性、坏死及脱落,平滑肌层未见增生,管壁未见增厚;周围血管未见增生及扩张,间质及肺泡腔未见明显炎症。模型组大鼠支气管管腔局部见代偿性扩张,管腔内见分泌物,皱襞或增生或平坦,上皮细胞变性,局部可见脱落,管壁增厚,平滑肌层增生明显;周围血管增生、扩张,间质及肺泡腔见中等量炎症,肺组织炎症评分升高(与正常组相比, $P < 0.01$)。痰喘宁合剂低剂量组支气管管腔轻度扩张,管腔内罕见分泌物,皱襞较为平坦,上皮细胞轻度变性,未见坏死及脱落,管壁轻度增厚,平滑肌层增生较少量;周围血管增生、扩张,间质及肺泡腔见中等量炎症,肺组织炎症评分有降低趋势(与模型组相比, $P > 0.05$)。痰喘宁合剂中剂量组支气管管腔轻度扩张,支气管管腔内未见分泌物,皱襞较为明显,上皮细胞变性不明显,

表 1 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠 R_L 的影响 ($\bar{x} \pm s$, cmH₂O/(mL/s), $n = 12$)

Table 1 Effects of Tanchuaning Mixture on airway resistance in asthmatic rats induced by OVA

Mch (mg/mL)	剂量 (mL/kg) Dose	0	6.25	12.5	50
正常组 Normal group	—	0.34±0.09	0.46±0.11	0.51±0.07	0.60±0.13
模型组 Model group	—	0.45±0.12 ^a	0.50±0.21	0.72±0.30 ^a	1.01±0.47 ^a
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	0.44±0.30	0.59±0.29	0.66±0.21	0.71±0.23 ^c
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	0.32±0.08 ^c	0.38±0.09	0.50±0.15 ^c	0.49±0.16 ^d
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	0.31±0.11 ^d	0.46±0.12	0.46±0.14 ^d	0.61±0.26 ^c
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	0.37±0.10	0.58±0.13 ^c	0.66±0.10	0.77±0.25
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	0.39±0.08	0.52±0.16	0.64±0.31	0.74±0.31

注:与正常组相比, ^a $P < 0.05$;与模型组相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^a $P < 0.05$. Compared with the model group, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$.

未见坏死及脱落,管壁轻度增厚,平滑肌层增生不明显;周围少量血管增生、扩张,间质及肺泡腔见少量炎症,肺组织炎症评分降低(与模型组相比, $P<0.05$)。痰喘宁合剂高剂量组支气管管壁轻度扩张,管腔内未见分泌物,皱襞较为明显,上皮细胞变性不明显,未见坏死及脱落,管壁增厚及平滑肌层增生均不明显;周围极少量血管增生、扩张,间质及肺泡腔见少量炎症,肺组织炎症评分降低(与模型组相比, $P<0.01$)。醋酸地塞米松组支气管管腔扩张不明显,管腔内可见分泌物,皱襞代偿性增生,上皮细胞轻度变性,未见坏死及脱落,支气管管壁轻度增厚,平滑肌层增生不明显;周围血管增生、扩

张,间质及肺泡腔见中等量炎症,肺组织炎症评分降低(与模型组相比, $P<0.05$)。小青龙合剂组支气管管腔扩张不明显,支气管管腔内偶见分泌物,皱襞代偿性增生,管腔上皮细胞轻度变性,未见坏死及脱落,管壁轻度增厚,平滑肌层增生不明显;周围血管增生、扩张,间质及肺泡腔见中等量炎症(与模型组相比, $P>0.05$)。结果见表 4 及图 1。

2.1.5 痰喘宁合剂对氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠的影响

相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、氨溴特罗组、小青龙合剂组引喘潜伏期均延长($P<0.01$)。结果见表 5。

表 2 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠血清 IgE、IL-4、IL-17 及 TNF- α 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 2 Effect of Tanchuaning Mixture on the levels of serum IgE, IL-4, IL-17 and TNF- α in asthmatic rats induced by OVA

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	IgE (U/mL)	IL-4 (ng/L)	IL-17 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
正常组 Normal group	—	6.40 $\pm$ 1.38	34.25 $\pm$ 4.25	45.65 $\pm$ 10.94	60.19 $\pm$ 16.62
模型组 Model group	—	11.44 $\pm$ 5.36 ^b	47.27 $\pm$ 16.07 ^b	86.35 $\pm$ 41.51 ^b	110.73 $\pm$ 65.31 ^b
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	6.14 $\pm$ 3.47 ^d	28.55 $\pm$ 10.60 ^d	41.73 $\pm$ 24.33 ^d	46.81 $\pm$ 30.94 ^d
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	8.59 $\pm$ 1.19	38.43 $\pm$ 5.28	56.90 $\pm$ 9.51 ^d	75.30 $\pm$ 19.49
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	9.06 $\pm$ 4.12	40.20 $\pm$ 8.95	64.31 $\pm$ 24.01	81.17 $\pm$ 32.63
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	7.98 $\pm$ 2.79	35.1 $\pm$ 9.67 ^c	53.26 $\pm$ 16.17 ^d	64.56 $\pm$ 35.10 ^c
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	10.20 $\pm$ 3.97	43.92 $\pm$ 12.94	69.01 $\pm$ 32.59	97.46 $\pm$ 51.16

注:与正常组相比,^b $P<0.01$;与模型组相比,^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 3 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠 BALF 中 WBC 及 EOS 的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Tanchuaning Mixture on WBC and EOS in BALF of OVA-induced asthma rats

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	WBC ($10^7/L$)	EOS (%)
正常组 Normal group	—	15.08 $\pm$ 2.91	1.67 $\pm$ 1.15
模型组 Model group	—	46.08 $\pm$ 8.35 ^b	5.92 $\pm$ 1.88 ^b
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	31.17 $\pm$ 6.51 ^d	3.50 $\pm$ 1.31 ^d
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	33.25 $\pm$ 6.84 ^d	3.58 $\pm$ 1.44 ^d
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	35.58 $\pm$ 6.89 ^d	3.75 $\pm$ 1.36 ^d
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	33.42 $\pm$ 6.64 ^d	3.42 $\pm$ 1.24 ^d
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	33.67 $\pm$ 5.53 ^d	3.25 $\pm$ 1.54 ^d

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

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

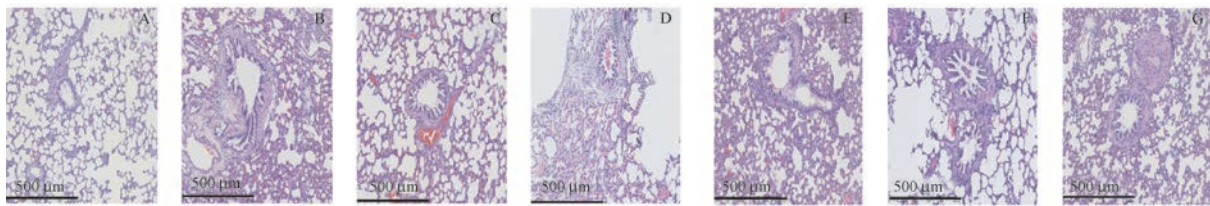
表 4 痰喘宁合剂对 OVA 所致支气管哮喘大鼠肺组织病变程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of Tanchuaning Mixture on the degree of lung tissue lesion in bronchial asthma rats induced by OVA

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	病变程度 Grade of pathological changes			评分 Score
		0 级 Grade 0	I 级 Grade I	II 级 Grade II	
正常组 Normal group	—	8	4	0	0.33±0.49
模型组 Model group	—	0	6	6	1.50±0.52 ^b
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	2	8	2	1.00±0.60 ^c
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	0	3	9	1.75±0.45
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	1	8	3	1.16±0.57
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	2	8	2	1.00±0.60 ^c
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	3	9	0	0.75±0.45 ^d

注:与正常组相比, ^b $P < 0.01$;与模型组相比, ^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 $P < 0.01$.



注:A:正常组;B:模型组;C:醋酸地塞米松组;D:小青龙合剂组;E:低剂量组;F:中剂量组;G:高剂量组。

图 1 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠肺组织病理的影响 (HE 染色)

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Dexamethasone acetate group. D, Xiaoqinglong Mixture group. E, Low dosage group. F, Moderate dosage group. G, High dosage group.

Figure 1 Effect of Tanchuaning Mixture on the pathology of lung tissue in asthma rats induced by OVA (HE staining)

2.2 痰喘宁合剂镇咳作用研究

2.2.1 痰喘宁合剂对枸橼酸引咳豚鼠的影响

相较于模型组,痰喘宁合剂中、高剂量组,氨溴特罗组,小青龙合剂组咳嗽潜伏期均延长 ($P < 0.01$),低剂量组咳嗽潜伏期有延长趋势 ($P > 0.05$)。相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、氨溴特罗组、小青龙合剂组咳嗽次数减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见表 6。

2.2.2 痰喘宁合剂对氨水引咳小鼠的影响

相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组,氨溴特

罗组,小青龙合剂组咳嗽潜伏期均延长 ($P < 0.01$);相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、氨溴特罗组、小青龙合剂组咳嗽次数均减少 ($P < 0.01$)。结果见表 7。

2.3 痰喘宁合剂祛痰作用研究

相较于模型组,痰喘宁合剂低、高剂量组,氨溴特罗组,小青龙合剂组气管段酚红排泄量均升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见表 8。酚红标准曲线见图 2。

表 5 痰喘宁合剂对豚鼠引喘作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 5 Effect of Tanchuanning Mixture on guinea pig's induced asthma

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	引喘潜伏期 (s) Induced asthma incubation period
模型组 Model group	—	34.1±6.66
氨溴特罗组 Ambroxol Group	4.5	94.3±28.99 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.5	59.7±13.37 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuanning Mixture low dosage group	8.4	62.9±19.46 ^b
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuanning Mixture moderate dosage group	16.8	67.4±14.57 ^b
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuanning Mixture high dosage group	33.6	69.8±8.33 ^b

注:与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

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

表 6 痰喘宁合剂对枸橼酸引咳豚鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 6 Effect of Tanchuanning Mixture on citrate guinea pig

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	咳嗽潜伏期 (s) Cough latency	咳嗽次数 (次) Number of coughs (times)
模型组 Model group	—	108.7±44.07	24.1±9.49
氨溴特罗组 Ambroxol Group	4.5	170.9±38.95 ^b	6.3±4.08 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.5	211.1±62.64 ^b	4.8±2.09 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuanning Mixture low dosage group	8.4	115.2±63.97	14.9±6.47 ^a
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuanning Mixture moderate dosage group	16.8	168.9±38.22 ^b	5.8±3.55 ^b
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuanning Mixture high dosage group	33.6	197.9±57.02 ^b	4.1±2.28 ^b

注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

表 7 痰喘宁合剂对氨水引咳小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 7 Effect of Tanchuanning Mixture on mice induced by cough with ammonia

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	咳嗽潜伏期 (s) Cough latency	咳嗽次数 (次) Number of coughs (times)
模型组 Model group	—	51.92±13.91	45.42±9.37
氨溴特罗组 Ambroxol Group	5.70	108.25±31.83 ^b	11.33±4.50 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	6.50	115.92±20.87 ^b	11.42±4.19 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuanning Mixture low dosage group	5.72	69.08±26.42 ^b	30.33±11.83 ^b
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuanning Mixture moderate dosage group	11.43	87.75±23.13 ^b	24.08±14.52 ^b
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuanning Mixture high dosage group	22.85	92.67±19.80 ^b	22.25±12.06 ^b

注:与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

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

表 8 痰喘宁合剂对小鼠气管段酚红排泌量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 8 Effect of Tanchuaning Mixture on the excretion of phenol red in tracheal segment of mice

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	酚红浓度 ($\mu\text{g/mL}$) Phenol red concentration
模型组 Model group	—	0.075 $\pm$ 0.0048
氨溴特罗组 Ambroxol Group	5.70	0.088 $\pm$ 0.013 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	6.50	0.094 $\pm$ 0.018 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	5.72	0.090 $\pm$ 0.013 ^b
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	11.43	0.082 $\pm$ 0.012
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	22.85	0.087 $\pm$ 0.018 ^a

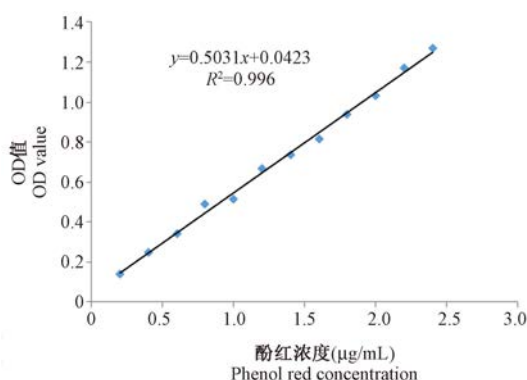
注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。Note. Compared with the model group, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

图 2 酚红的标准曲线

Figure 2 Standard curve of phenol red

3 讨论

儿童咳嗽、哮喘易反复发作,最终可引发哮喘。痰喘宁合剂组方是闫慧敏教授在老专家刘韵远先生治疗哮喘经验方的基础上,根据当代儿童哮喘特点进行加减化裁而成^[3],全方由炙麻黄、白果、醋五味子、干姜、炒紫苏子、白前、蜜百部、川芎、青黛等 12 味中药组成,有宣肺化痰、止咳平喘功效,作为北京儿童医院的协定处方及院内制剂在临床用于儿童哮喘的治疗已有二十余年,尤其在治疗痰湿蕴肺型患儿方面,疗效确切。本实验对痰喘宁合剂平喘、镇咳和祛痰作用进行了研究。

哮喘患者因炎症导致气道狭窄造成气道阻力增大,最终表现出咳嗽、呼吸急促等表现^[7]。气道高反应性是评判哮喘模型是否成功的重要客观性指标之一。动物实验中多采用有创或无创方法进行气道阻力测定来反映气道顺应性情况^[8]。本实

验结果显示,相比于正常组,模型组气道阻力随乙酰甲胆碱浓度升高而显著升高,提示本研究大鼠哮喘模型复制成功;相比于模型组,痰喘宁合剂低剂量组气道阻力显著降低,中、高剂量组有一定降低趋势,提示痰喘宁合剂对气道高反应性具有一定的降低作用。

哮喘是 IgE 介导的以炎性细胞浸润,炎性因子分泌增多为主要特征的呼吸系统疾病。IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞的 IgE 受体结合并激活细胞,释放组胺及炎症介质,引发炎症反应^[9]。Th1/Th2 细胞失衡学说是哮喘发病机制之一^[10]。Th2 细胞介导嗜酸性细胞炎症反应。炎性因子 IL-4 由 Th2 细胞分泌,而 IL-4 分泌增多可导致嗜酸性粒细胞的蓄积,加重炎症反应。IL-4 还可促进 IgE 的合成,从而加重气道炎症^[11]。本研究中,模型组血清 IgE、IL-4 水平显著升高,痰喘宁合剂中剂量组 IL-4 水平明显降低,痰喘宁合剂各剂量组 IgE 均呈下降趋势。研究表明,Th2 细胞优势在揭示哮喘发作机制方面稍显不足,Th17 细胞也参与了哮喘的发生发展^[12]。IL-17 由 Th17 细胞分泌,不仅参与 Th17 细胞介导的嗜中性细胞气道炎症,还可加重 Th2 细胞诱导的嗜酸性细胞炎症^[13]。TNF- α 是常见的内源性炎性因子,通过募集炎性细胞,促进其他炎性因子的释放使炎症加重,还可引起气道高反应性^[14],增加氧化应激参与哮喘的发生发展^[15]。临床研究表明,在哮喘患者的肺组织及痰液中检测到高水平的 TNF- α 。本研究显示,痰喘宁合剂可降低 IL-17、TNF- α 水平,减少 BALF 中 WBC 及 EOS 数量,减轻大鼠肺组织病理损害和气道炎症。

乙酰胆碱作为一种神经递质,可促进肺泡巨噬细胞释放趋化因子,使大量炎性细胞及炎性因子聚集在气道平滑肌,增强其收缩能力,加重哮喘病情^[16]。组胺由肥大细胞释放,当机体受到过敏原刺激时,组胺释放增多,造成气道狭窄,呼吸困难。在豚鼠实验中,磷酸组胺可通过其受体,使气道平滑肌收缩增强,加重气道炎症。因此,本研究采用二者结合的方式,研究痰喘宁合剂的平喘作用。结果显示,豚鼠出现明显的呼吸困难,喘息甚至跌倒症状,而痰喘宁合剂各剂量组可明显延长豚鼠的引喘潜伏期,提示痰喘宁合剂可显著改善气道平滑肌痉挛等症,具有一定的平喘作用。

咳嗽是咳嗽中枢受到外界刺激的一种生理反应,咳嗽反复发作极大地影响了患者的生活质量^[17]。咳嗽反射弧包括感受器、传入神经、神经中枢、效应器、传出神经,对反射弧中的感受器和传出神经进行刺激最易引发咳嗽反应。本研究采用氨水及枸橼酸引咳小鼠及豚鼠,结果表明痰喘宁合剂各剂量组均能明显延长咳嗽潜伏期及减少咳嗽次数,镇咳作用明显。

痰液由气管及支气管黏膜分泌。正常状态下,痰液分泌较少,可湿润呼吸道。疾病状态下,痰液过于黏稠,不易排出,可引起气道狭窄,从而加重病情^[18]。祛痰药物多为降低痰液黏稠度,促进痰液排出。祛痰作用实验中,酚红作为指示剂,可通过其排泄量的多少间接评价药物的祛痰效果。结果表明,痰喘宁合剂可增加小鼠气管段的酚红排泄量,提示痰喘宁合剂对痰液的排出有一定的促进作用。

以上研究结果表明,痰喘宁合剂具有一定的平喘、镇咳、祛痰作用,但其作用机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Eigenmann P. Asthma from infancy to childhood, and allergy perception in adolescents [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2020, 31(2): 115-116.
- [2] 李岚, 陈华, 俞景茂. 俞景茂教授运用止嗽方治疗小儿咳嗽经验 [J]. *中国中西医结合儿科学*, 2019, 11(4): 279-281.
- [3] 吕莉. 痰喘宁合剂治疗痰湿蕴肺型小儿慢性咳嗽临床疗效观察 [D]. 北京: 首都医科大学, 2016.
- [4] 高琴琴. 桂芍子喘颗粒对支气管哮喘大鼠的干预作用及 MUC5AC/EGFR 通路的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [5] 周艳丽, 阮研硕, 劳文艳, 等. 哮喘动物模型的建立方法研究进展 [J]. *环境与健康杂志*, 2017, 34(10): 931-936.
- [6] 王翰华, 杨晓春, 陈云. 宁海白枇杷花醇提物不同极性部位的止咳化痰抗炎活性 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(6): 1431-1434.
- [7] Anderson SD. Challenge tests to assess airway hyperresponsiveness and efficacy of drugs used in the treatment of asthma [J]. *J Aerosol Med*, 1996, 9(1): 95-109.
- [8] Hoymann HG. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 55(1): 16-26.
- [9] Lommatzsch M, Geißler K, Bergmann KC, et al. IgE and anti-IgE in asthma: A chequered history [J]. *Pneumologie*, 2017, 71(6): 398-405.
- [10] Ji NF, Xie YC, Zhang MS, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1): 76-81.
- [11] Bui TT, Piao CH, Song CH, et al. Bupleurum chinense, extract ameliorates an OVA-induced murine allergic asthma through the reduction of the Th2 and Th17 cytokines production by inactivation of NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1085-1095.
- [12] Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2019, 13(11): 1057-1068.
- [13] Despotovic M, Stoimenov TJ, Stankovic I, et al. Gene polymorphisms of tumor necrosis factor α and antioxidant enzymes in bronchial asthma [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24(2): 251-256.
- [14] Wang Q, Doerschuk CM. Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6487-6494.
- [15] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma --present in most, absent in many [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 57-65.
- [16] Koarai A, Ichinose M. Possible involvement of acetylcholine-mediated inflammation in airway diseases [J]. *Allergol Int*, 2018, 67(4): 460-466.
- [17] 付书婕, 黄兴振, 巫玲玲, 等. 剑花提取物的止咳祛痰平喘作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(1): 18-21.
- [18] 卢靖, 熊万娜, 邓裕彦, 等. 天黄猴枣散的解热、祛痰平喘及抗惊厥作用研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(1): 188-191.

[收稿日期] 2020-05-23

李梦媛,杨星九,张文龙,等. DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株的构建与研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 59-65.

Li MY, Yang XJ, Zhang WL, et al. Establishment and analysis of the H1299 cell line for HNRNPK downregulated by DOX [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 59-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.009

DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株的构建与研究

李梦媛,杨星九,张文龙,李维莎,曹琳,刘宏飞,高 蓐*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100121)

【摘要】 目的 构建 DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株,并研究 HNRNPK 下调对细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 用包装好的慢病毒感染 H1299 细胞,感染 72 h 后利用嘌呤霉素筛选阳性细胞并扩大培养获得稳转株,通过定量 PCR 与 Western blot 检测 HNRNPK 表达效率,并研究 HNRNPK 下调对细胞增殖与凋亡的影响。**结果** 成功构建了 DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株,HNRNPK 的下调抑制了 H1299 细胞的增殖,但对其凋亡没有明显影响。**结论** HNRNPK 下调抑制了 H1299 细胞的增殖。

【关键词】 HNRNPK;DOX;细胞增殖;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0059-07

Establishment and analysis of the H1299 cell line for HNRNPK downregulated by DOX

LI Mengyuan, YANG Xingjiu, ZHANG Wenlong, LI Weisha, CAO Lin, LIU Hongfei, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine Beijing; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish the H1299 cell line with HNRNPK downregulated by DOX and study the effect of HNRNPK downregulation on cell proliferation and apoptosis. **Methods** H1299 cells were infected with a packaged lentivirus. After 72 h, positive cells were selected by puromycin and expanded to a stable transgenic cell line. The expression efficiency of HNRNPK was detected by qPCR and Western blot. The effects of HNRNPK downregulation on cell proliferation and apoptosis were analyzed. **Results** The H1299 cell line with HNRNPK downregulated by DOX was established successfully. Downregulation of HNRNPK inhibited the proliferation of H1299 cells but did not affect apoptosis. **Conclusions** Downregulation of HNRNPK inhibits the proliferation of H1299 cells.

【Keywords】 HNRNPK; DOX; cell proliferation; apoptosis

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程-重大协同创新项目-协同创新团队资助(2016-I2M-3-019)。

【作者简介】 李梦媛(1988—),女,主管技师,研究方向:肿瘤学。E-mail:limengyuan767@126.com

【通信作者】 高蓐(1980—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:肿瘤学。E-mail:gaoran26@hotmail.com

核不均一核糖核蛋白 K (heterogeneous nucleoribonucleoprotein K, HNRNPK) 是 hnRNPs 家族成员之一,其基因位于人第 9 号染色体 q21.32~q21.33,序列高度保守,含有 3 个 K 同源区(K homologue, KH),每个 K 同源区由 65~70 个氨基酸组成,该区域能够与 RNA 和 DNA 结合并相互作用^[1-2]。HNRNPK 还含有一个核定位信号(nuclear localization signals, NLS)以及一个核穿梭结构域(nuclear shuttling domain, KNS)^[3];NLS 调节 HNRNPK 从胞浆到核的转运,KNS 则通过核孔复合物调节双向穿梭^[4]。HNRNPK 特殊的分子结构使其能够参与转录调控、RNA 加工与翻译以及转录后修饰等多种细胞进程^[5]。大量研究显示 HNRNPK 与目前威胁人类生命的肿瘤疾病密切相关,多种肿瘤的形成和发展都与该家族蛋白有关^[1]。

HNRNPK 在原发性和转移性肺癌中高表达^[6],而其在多种肿瘤中的高表达通常与不良预后相关^[7-8]。然而 HNRNPK 在肺癌中的具体作用机制仍然未知,需要进一步研究。本实验构建了荧光素酶标记的由强力霉素(doxycycline, DOX)调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株,旨在为进一步研究 HNRNPK 在肺癌发生发展中的作用机制提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

H1299 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。

1.2 主要试剂与仪器

PBS、RPMI 1640 培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清等购自美国 Gibco 公司;D-Luciferin 购自北京泛博生物化学有限公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒、购蛋白预染 Marker 自 Thermo Fisher 公司;SYBR green 荧光染料购自日本 Toyobo 公司;定量 PCR 专用 96 孔板购自 ABI 公司;HNRNPK 抗体购自 Abcam 公司;p53、p21、CCND1 抗体购自 CST 公司;Rb、磷酸化 Rb、CDK4、Cyclin-D1 等抗体购自 Santa Cruz 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物公司;CCK-8 细胞活性检测试剂盒、Annexin V (633) 凋亡检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;嘌呤霉素购自 Merk 公司;DOX 由上海吉凯基因科技有限公司提供。

实时荧光定量 PCR 仪为 BIO-RADCFX Connect

Real-Time PCR System;酶标仪为 BIO-RADiMarkMicroplate Reader;流式细胞仪为 BD FACS Aria II Cell Sorter;活体光学成像系统为 IVIS-Lumina II。

引物合成与 DNA 测序服务由英潍捷基(上海)公司提供。HNRNPK 的 siRNA 由本实验室设计,序列如表 1 所示,带有 DOX 识别位点的干扰慢病毒载体由上海吉凯基因科技有限公司构建。

1.3 实验方法

1.3.1 病毒感染与稳转株的筛选

慢病毒的转染严格按照吉凯基因慢病毒使用操作手册进行。复苏并培养 H1299 细胞,调整细胞状态。将其制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,接种于 6 孔细胞培养板。37℃ 培养 18 h 后,稀释病毒至 MOI=10,感染细胞,继续培养 8 h,观察细胞状态并更换培养基。感染病毒 72 h 后,用 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素筛选细胞 48 h,在显微镜下观察细胞生长状态,将阳性细胞进行扩大培养,并用 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素维持培养。

1.3.2 DOX 诱导后 H1299 细胞的生长状态

将筛选后的细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板。继续培养 6~8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导细胞,37℃ 继续培养 48 h。在显微镜下观察 DOX 诱导前后细胞的生长状态。

1.3.3 稳转株荧光素酶活性的检测

慢病毒载体带有荧光素酶表达序列,检测稳转株中荧光素酶的活性。用无菌 ddH₂O 溶解 D-Luciferin 干粉,并用 0.22 μm 滤膜过滤除去杂质,储备液浓度为 30 mg/mL ,分装后于 -20℃ 冰箱保存。用 37℃ 预热好的完全培养基按体积比 1:200 稀释 D-Luciferin 储备液,配制成终浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液。去除步骤 1.3.2 中细胞的培养上清,按 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 D-Luciferin 工作液,避光孵育 10 min 后,进行图像分析。

1.3.4 Real-time PCR 检测稳转株 HNRNPK 的表达效率

将细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 1 mL 接种于 12 孔细胞培养板,继续培养 6~8 h,待细胞贴壁后用 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的 DOX 诱导细胞,37℃ 继续培养 48 h。

依据 TRIzol 试剂与反转录试剂盒说明书操作步骤收集各孔细胞并提取获得细胞的总 RNA,进行

反转录得到 cDNA。应用 Real-time PCR 进行检测,并通过阈值循环数计算各组细胞中 HNRNPK 的相对表达量。实验中, GAPDH 与 HNRNPK 基因的上下游引物序列如表 2 所示,反应体系的成分配制如表 3 所示,设定反应程序: 95℃ 3 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 扩增 40 个循环; 熔解曲线为 60℃ ~ 95℃ 升温。实验结束后通过 HNRNPK 的相对表达量找出 DOX 诱导稳转细胞株稳定下调 HNRNPK 的最佳浓度。

1.3.5 Western blot 检测稳转株 HNRNPK 的表达水平

将细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 1 mL 接种于 12 孔细胞培养板,继续培养 6 ~ 8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导细胞, 37℃ 继续培养 48 h。

收集培养板中各孔的细胞,通过 RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白,检测并调整各组细胞的蛋白浓度。配制浓度为 12% 的分离胶,进行 SDS-PAGE 电泳。然后,按 300 mA 电流强度进行转膜,将蛋白条带转至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的封闭液于室温封闭 PVDF 膜 1 h,以减少非特异性结合。随后按 1:1000 的比例稀释 HNRNPK 抗体,于 4℃ 孵育 PVDF 膜。次日,用 0.1% 的 PBST 洗膜 3 次,加入稀释比例为 1:10000 的 HRP 标记的 IgG,于室温孵育 1 h。再次洗膜 3 次后加显影液,观测各组蛋白条带的大小与位置。

1.3.6 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖的影响

制备细胞悬液并计数,按 3×10^3 个/孔将细胞接种于 96 孔细胞培养板, 37℃ 培养 6 ~ 8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 溶液持续诱导培养细胞。接种当天待细胞贴壁后,取一组细胞培养上清,按 CCK-8; 培养上清体积比为 1:100 的比例加入 CCK-8,在 CO_2 培养箱中继续培养 2 h,观察显色程度,用酶标仪测定其在 450 nm 波长处的吸光度,其后每隔 24 h 检测一次培养上清的 OD_{450} ,直至第 96 h。

1.3.7 HNRNPK 下调对 H1299 细胞凋亡的影响

将细胞制备成每毫升 5×10^4 个细胞浓度的悬液,每孔 2 mL 接种于 6 孔细胞培养板,继续培养 6 ~ 8 h,待细胞贴壁后用工作浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DOX 诱导细胞, 37℃ 继续培养 48 h。

细胞凋亡的检测严格按照 AnnexinV (633) 凋亡检测试剂盒说明书进行。收集 6 孔板中的细胞,用

适量的培养基将细胞悬液转移至离心管中, 1000 r/min 离心 3 min,弃去上清。加入 PBS 溶液离心洗涤细胞两次,用 100 μL 稀释好的 1×Annexin V Binding Solution 重悬细胞,分别向细胞悬液中加入 5 μL Annexin V (APC) 结合物与 5 μL PI Solution (PE),室温下避光孵育 15 min。加入 400 μL 1×Annexin V Binding Solution,通过流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行检测。

1.3.8 HNRNPK 下调对 H1299 细胞周期的影响

培养、收集细胞步骤同 1.3.7。用预冷的 PBS 洗涤细胞两次,然后用 70% 的乙醇固定细胞。加入 PBS 离心洗涤除去乙醇后,加入含 0.1% RNaseA 的 PI 染液,室温避光染色 30 min,通过流式细胞仪检测细胞周期。

1.3.9 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖相关的信号通路的影响

步骤同 1.3.5,检测 p53、p21、CCND1、Rb、p-Rb、Cyclin-D1、CDK4 等蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism V.5.0 软件,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对数据进行 *t* 检验以及统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DOX 诱导 HNRNPK 下调后 H1299 细胞的生长状态

细胞状态如图 1 所示,感染病毒的 H1299 细胞与对照组细胞在大小、形态上并无明显差异。但 DOX 诱导 48 h 后二者的生长密度明显不同,可能在 HNRNPK 下调后, H1299 细胞的增殖速度受到了影响。

2.2 稳转株荧光素酶活性的检测

实验结果如图 2 所示,与未感染慢病毒的 H1299 细胞对比,空白对照病毒组与 HNRNPK 干扰病毒组的细胞均具备荧光素酶活性,能够发出明显的荧光。

2.3 H1299 稳转株 HNRNPK 的表达效率

定量 PCR 结果如图 3A 所示,经不同浓度的 DOX 诱导 48 h 后, H1299 稳转株中 HNRNPK 的 mRNA 表达水平明显下调。在 DOX 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HNRNPK 的 mRNA 表达水平能够下调约 65% ~ 70%,且在这两个浓度下 HNRNPK

的相对表达量并无显著差异,表明 DOX 诱导稳转细胞株中 HNRNPK 下调的最佳浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。Western blot 结果如图 3B 所示,在 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DOX 诱导 48 h 后,H1299 稳转株中 HNRNPK 的蛋白表达也被下调。

2.4 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖的影响

通过 CCK-8 细胞活性检测试剂盒检测细胞增殖,结果如图 4 所示,在 DOX 的诱导下,HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞增殖速度明显减慢,与对照组比较,二者有显著差异,表明 HNRNPK 下调能够抑制 H1299 细胞的增殖。

2.5 HNRNPK 下调对 H1299 细胞凋亡的影响

经 DOX 诱导细胞 48 h 后,通过 Annexin V (633) 凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞数量。结果如图 5 所示,HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞的凋亡数量与对照组比较,并无显著差异,表明 HNRNPK 下调对 H1299 细胞的凋亡没有明显影响。

2.6 HNRNPK 下调对 H1299 细胞周期的影响

通过 PI 染色检测细胞周期,结果如图 6 所示,HNRNPK 下调后, G_0/G_1 期细胞的百分比明显高于对照组,S 期细胞的百分比则明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$); G_2/M 期细胞的百分比差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 HNRNPK 的下调抑制了 H1299 细胞从 G_0/G_1 期向 S 期发展的周期

进程。

2.7 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖相关的信号通路的影响

经 DOX 诱导细胞 48 h 后,通过 Western blot 检测细胞中 p53、p21 等蛋白的表达水平。结果如图 7 所示,H1299 作为 p53 缺失的细胞株,细胞中检测不到 p53 表达;而在 HNRNPK 表达下调后,p21 的表达水平上调,CCND1 与 Cyclin-D1 的表达水平下调;CDK4 与 Rb 蛋白的表达水平没有明显变化,但 Rb 蛋白的磷酸化水平下调。

表 1 siRNA

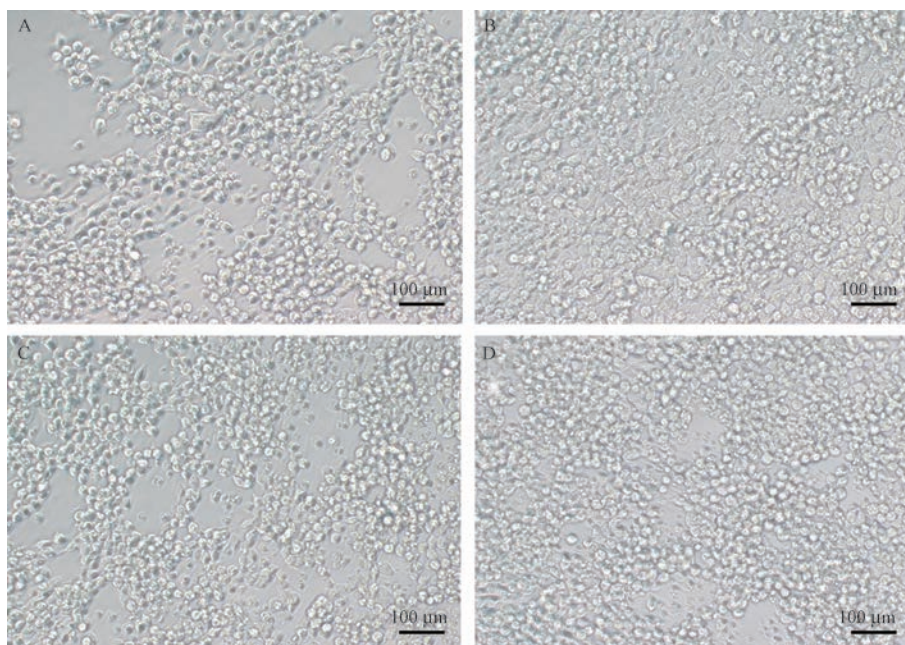
Table 1 siRNA

名称 Name	靶点序列(5'-3') Target Sequence
HNRNPK	GAGCTTCGATCAAAATTGA

表 2 Real-time PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for the Real-time PCR assay

引物名称 Names	引物序列(5'-3') Sequence
hnRNPK-F	AGGTCGCTGTGAACGGATTG
hnRNPK-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
GAPDH-F	AGACCTGGAGACCGTTAC
GAPDH-R	ATAAGCCATCTGCCATTC



注:A:对照病毒组;B:HNRNPK 干扰病毒组;C:DOX 诱导 48 h 后的对照病毒组;D:DOX 诱导 48 h 后的 HNRNPK 干扰病毒组。

图 1 DOX 诱导后 H1299 细胞的生长状态

Note. A, Group of LV-NC-RNAi. B, Group of LV-HNRNPK-RNAi. C, Group of LV-NC-RNAi after 48 h. D, Group of LV-HNRNPK-RNAi after 48 h.

Figure 1 Cellular states of H1299 cells after DOX induction

表 3 Real-time PCR 反应体系
Table 3 Real-time PCR reaction components

组分 Components	体积(μL) Volume
基因组 DNA Genomic DNA	2.0
上游引物 Forward primer	1.0(10 μmol/L)
下游引物 Reverse primer	1.0(10 μmol/L)
SYBR Green	10.0
ddH ₂ O	6.0
总体积 Total volume	20.0

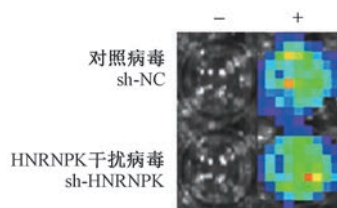
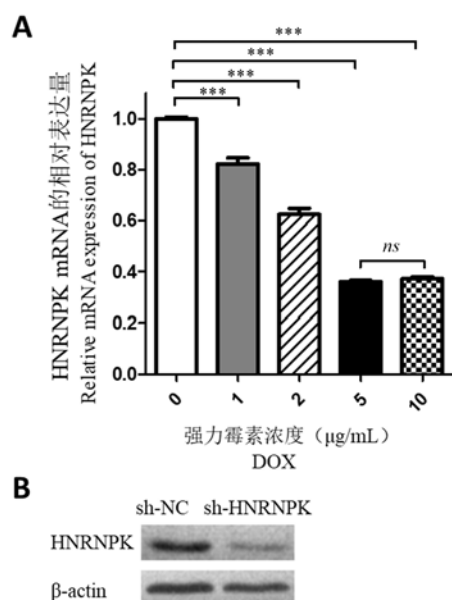


图 2 稳转株荧光素酶活性的检测

Figure 2 Detection of luciferase in stable transgenic cell line



注:A:定量 PCR;B:Western blot;与对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

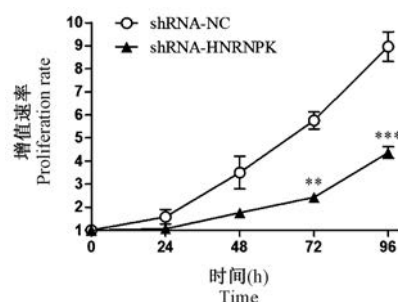
图 3 不同剂量 DOX 诱导 HNRNPK 下调的表达效率($n=3$)

Note. A, qPCR. B, Western blot. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 HNRNPK downregulated by different doses of DOX

3 讨论

目前,大量研究已证实 HNRNPK 在各种肿瘤组织中高表达,且与口腔鳞状细胞癌、前列腺癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌、鼻咽癌及黑色素瘤等的预后呈负相关,但其对于肺癌与肝癌的预后情况仍然未



注:与对照组比较, $n=3$,** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$ 。

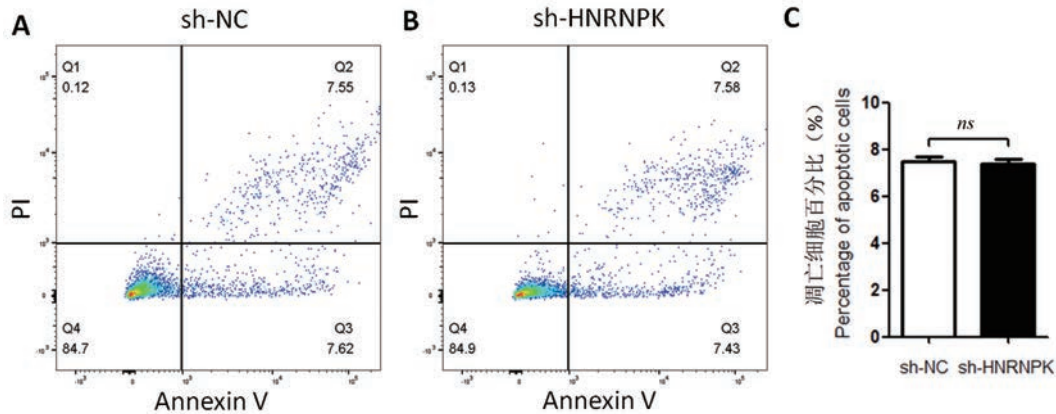
图 4 HNRNPK 下调对 H1299 细胞增殖的影响

Note. Compared with the control group, $n=3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Effects on H1299 cells proliferation of HNRNPK downregulation

知^[9-10]。HNRNPK 的异常表达在不同肿瘤中发挥的功能也各不相同。Gallardo 等^[11]通过构建 HNRNPK 基因敲除杂合子(Hnrnpk^{+/-})小鼠,证实 HNRNPK 在血液系统恶性肿瘤中发挥抑癌基因的作用。Huang 等^[12]发现过表达的 HNRNPK 能够通过调节 p53 相关信号通路抑制胃癌。Li 等^[13]研究发现 HNRNPK 在神经母细胞瘤患者的肿瘤中高表达并伴有不良预后。非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinom, NSCLC)是最常见的肺癌类型,是我国城市人口恶性肿瘤死亡的主要原因^[14]。陈燕等^[6]发现 HNRNPK 在肺癌原发灶及支气管切缘组肺癌组织中高表达,而在正常组织及炎性对照组中的表达率则相对较低。同时, HNRNPK 在肺癌转移及浸润组织中高阳性表达,提示 HNRNPK 的高表达可能与肺癌的转移有关。然而, HNRNPK 在肺癌发生发展中的具体作用机制尚不完全清楚。

HNRNPK 在多种肿瘤的发生发展中参与调控癌基因与抑癌基因的表达,并参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移与侵袭等多种生物学过程^[9]。Huang 等^[12]研究发现过表达的 HNRNPK 能够通过调控细胞周期相关蛋白 p53/p21/Cyclin-D1 抑制胃癌细胞增殖与肿瘤生长。Chen 等^[15]研究显示 HNRNPK 能够通过调控 Cyclin-D1 与细胞周期 G₀/G₁ 期开关蛋白 2 等促进膀胱癌细胞的增殖。HNRNPK 作为转录因子能够与 eIF4E 的启动子结合,同时与 p21 mRNA 的 3'端非翻译区域结合,以此抑制 p21 翻译,进而促进翻译起始、细胞分裂和肿瘤形成^[7,16]。此外,在多种肿瘤组织中, HNRNPK 的高表达通常伴随着高水平的 c-myc, HNRNPK 能够

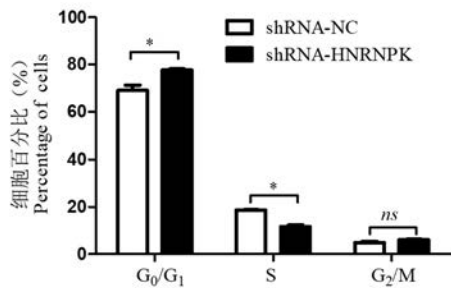


注: A: 对照病毒组; B: HNRNPk 干扰病毒组; C: 凋亡细胞的百分比; 与对照组比较, $n=3$ 。

图 5 HNRNPk 下调对 H1299 细胞凋亡的影响

Note. A, Group of LV-NC-RNAi. B, Group of LV-HNRNPk-RNAi. C, Percent of apoptotic cells. Compared with the control group, $n=3$.

Figure 5 Effects on H1299 cells apoptosis of HNRNPk down regulation



注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 6 HNRNPk 下调对 H1299 细胞周期的影响 ($n=3$)

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

Figure 6 Effects on cell cycle of HNRNPk downregulation in H1299 cells

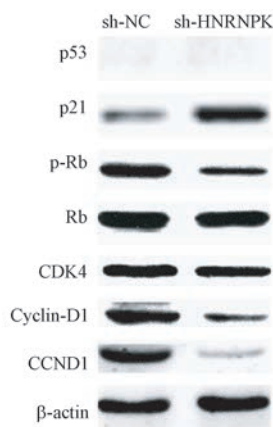


图 7 HNRNPk 下调对 H1299 细胞增殖相关的信号通路的影响

Figure 7 Effects on proliferation related signaling pathways of HNRNPk downregulation in H1299 cells

通过与 c-myc 启动子的 poly(C) 结合促进 c-myc 转

录,参与肿瘤细胞的增殖调控^[5]。因此, HNRNPk 能够通过多种途径参与肿瘤细胞的增殖调控。HNRNPk 也能够通过多种途径参与肿瘤细胞的凋亡调控。Chen 等^[17]的研究中发现 HNRNPk 能够通过调节下游的抗凋亡基因发挥抗凋亡活性, HNRNPk 在鼻咽癌细胞中能够与抗凋亡基因 FLIP 的启动子结合并导致其转录激活。Yang 等^[18]的研究发现 HNRNPk 第 296 与 299 位精氨酸的甲基化能够抑制促凋亡激酶 PKC δ 介导的第 302 位丝氨酸磷酸化,进而抑制 DNA 损伤诱导的凋亡。HNRNPk 作为 p53 的共激活因子对调节 DNA 损伤修复起重要作用, DNA 损伤促使 HNRNPk 被募集到 p53 下游基因的启动子,促使 p21、HDM2、C/EBP α 和 C/EBP β 表达; HNRNPk 的下调减少 p53 转录,从而导致 DNA 损伤诱导的细胞周期停滞^[19]。

本实验中成功构建了荧光素酶标记的由 DOX 调控 HNRNPk 稳定下调的 H1299 细胞株,能够通过 DOX 选择性地诱导细胞在特定时间点下调 HNRNPk 表达。人非小细胞肺癌细胞 H1299 来源于淋巴结转移,其均一性地缺失 p53 蛋白表达^[20]。已有研究证实 HNRNPk 能够与 p21 mRNA 的 3' 端非翻译区域结合,抑制 p21 翻译,从而促进肿瘤发生^[7]。癌基因 CCND1 能够编码 G₁/S-特异性周期蛋白 Cyclin-D1,其能够通过 p21 相互作用使细胞周期进程从 G₁ 期向 S 期发展。Cyclin-D1 的主要功能是促进细胞增殖,其过度表达可能导致细胞失控或癌变。Cyclin-D1 能够结合并激活 G₁ 期特有的周期蛋白依赖性激酶 CDK4, CDK4 能够磷酸化 G₁ 期

周期抑制蛋白 Rb,使其从所结合的 E2F1 转录因子上解离,释放 E2F1,推动细胞周期由 G₁ 期进入 S 期,促进细胞增殖^[21]。本实验中,HNRNPK 的下调使得 p21 的表达升高,CCND1 与 Cyclin-D1 的表达降低,从而使 Rb 蛋白的磷酸化受到抑制,进一步抑制细胞周期进程从 G₁ 期向 S 期发展。因此,通过 DOX 诱导 HNRNPK 表达水平下调,可能通过调控 p21 及其相关细胞周期调节蛋白的信号通路,从而抑制了 H1299 细胞的增殖。本实验中,HNRNPK 的下调对 H1299 细胞的凋亡没有明显影响,可能是由于 H1299 细胞本身缺失 p53 蛋白表达,导致 HNRNPK 表达下调后无法通过 p53 及其下游信号通路参与细胞周期调控,因而不能引发细胞凋亡。综上所述,本实验中 HNRNPK 的下调抑制了肺癌细胞的增殖,结合以往的研究^[6,11-13],证实 HNRNPK 在肺癌中的高表达可能发挥着促进肺癌发展的作用,并进一步说明 HNRNPK 的异常表达可能有着双重功能,其不同种类的肿瘤中能够产生不同的影响。此外,H1299 细胞中插入了荧光素酶表达序列,使其能够在生物体内标记并跟踪肿瘤细胞的成瘤部位、肿瘤大小与转移情况,通过活体成像实时观测肿瘤在生物体内的发展,一方面为研究 HNRNPK 在肺癌发生发展中的功能与机制提供了更便利的条件,同时也为抗肿瘤相关的基础研究与临床研究提供了理论基础和实验依据。

参考文献:

- [1] Chen Y, Zeng Y, Xiao Z, et al. Role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development [J]. J Cell Biochem, 2019, 120 (9): 14296-14305.
- [2] 张国新, 张文龙, 李梦媛, 等. hnRNPs 家族参与调控肿瘤免疫微环境的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28 (2): 273-277.
- [3] Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, et al. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif [J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21 (5): 1193-1198.
- [4] Chkheidze AN, Liebhaber SA. A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the α CP RNA-binding proteins [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23 (23): 8405-8415.
- [5] Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, et al. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (13): 4535-4543.
- [6] 陈燕, 李为民, 张尚福. hnRNP K 在肺癌组织中的表达 [J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11 (2): 241-245.
- [7] Lynch M, Chen L, Ravitz MJ, et al. hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25 (15): 6436-6453.
- [8] Notari M, Neviani P, Santhanam R, et al. A MAPK/HNRNP pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation [J]. Blood, 2006, 107 (6): 2507-2516.
- [9] 杨明, 聂国辉, 柯朝阳. hnRNP K 蛋白功能与肿瘤的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25 (18): 3605-3610.
- [10] 黄昊, 杨星九, 李梦媛, 等. 异质性胞核糖核蛋白 K 与肿瘤研究的最新进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27 (11): 100-105.
- [11] Gallardo M, Lee H, Zhang X, et al. hnRNPK is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies [J]. Cancer cell, 2015, 28 (4): 486-499.
- [12] Huang H, Han Y, Yang X, et al. HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8 (61): 103364-103374.
- [13] Li D, Wang X, Mei H, et al. Long noncoding RNA pancEts-1 promotes neuroblastoma progression through hnRNPK-mediated b-Catenin stabilization [J]. Cancer Res, 2018, 78 (5): 1169-1183.
- [14] 宋慧华, 付秀华. 非小细胞肺癌常见驱动基因及相应靶向药物的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26 (8): 1531-1536.
- [15] Chen X, Gu P, Xie R, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21 (7): 1266-1279.
- [16] Bomsztyk K, van Seuningen I, Suzuki H, et al. Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein [J]. FEBS Lett, 1997, 403 (2): 113-115.
- [17] Chen LC, Chung IC, Hsueh C, et al. The antiapoptotic protein, FLIP, is regulated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and correlates with poor overall survival of nasopharyngeal carcinoma patients [J]. Cell Death Differ, 2010, 17 (9): 1463-1473.
- [18] Yang JH, Chiou YY, Fu SL, et al. Arginine methylation of hnRNP K negatively modulates apoptosis upon DNA damage through local regulation of phosphorylation [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (15): 9908-9924.
- [19] Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, et al. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage [J]. Cell, 2005, 123 (6): 1065-1078.
- [20] 卞春安, 蒋琰华, 陆世民, 等. p53 和 p16 基因过表达对入肺腺癌细胞株 H1299 生物学功能影响实验研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 5 (5): 307-314.
- [21] John RR, Malathi N, Ravindran C, et al. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior [J]. Indian J Dent Res, 2017, 28: 187-192.

[收稿日期] 2020-05-12

杨仁国,贺微微,罗婷婷. miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 66-72.

Yang RG, He WW, Luo TT. miR-29b-3p regulates lipid metabolism and fibrosis by targeting IGF-1 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 66-72.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.010

miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化

杨仁国,贺微微,罗婷婷*

(四川省医学科学院四川省人民医院感染科,成都 610072)

【摘要】 目的 探讨 miR-29b-3p 在非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 模型中的表达情况,并确定 miR-29b-3p 在脂质沉积和肝细胞纤维化中的潜在功能。**方法** 使用棕榈酸 (PA) 构建 L02 细胞 NAFLD 模型。通过 RT-qPCR 或 Western blot 测定细胞中 miR-29b-3p 和胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 的表达水平。将 miR-29b-3p 模拟物/抑制剂或 IGF-1 siRNA 转染到 NAFLD 细胞模型中,通过油红 O 染色,甘油三酯和总胆固醇测定法测定脂质积累。使用双重荧光素酶实验确定 miR-29b-3p 和 IGF-1 之间的靶向关系。**结果** miR-29b-3p 在 NAFLD 体外细胞模型中上调,而 IGF-1 则在下降;miR-29b-3p 显著抑制了 L02 细胞模型中的脂质蓄积和纤维化程度;沉默 IGF-1 增强了 miR-29b-3p 过表达并对 L02 细胞模型的脂质积累和纤维化产生影响。**结论** miR-29b-3p 通过靶向 IGF-1 对肝细胞 L02 细胞模型中脂质蓄积和纤维化产生负调控作用,表明 miR-29b-3p 可能是 NAFLD 的治疗靶标。

【关键词】 非酒精性脂肪肝病;miR-29b-3p;胰岛素样生长因子-1;脂肪堆积;纤维化;L02 细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0066-07

miR-29b-3p regulates lipid metabolism and fibrosis by targeting IGF-1 in non-alcoholic fatty liver disease

YANG Renguo, HE Weiwei, LUO Tingting*

(Department of Infections, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Province People's Hospital, Chengdu 610072, China)

【Abstract】 Objective Circulating miR-29b has been reported to be positively correlated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, the role of miR-29b-3p in NAFLD progression is unclear. The purpose of this study was to evaluate the expression of miR-29b-3p in NAFLD models and to identify the potential functions of miR-29b-3p in lipid accumulation and fibrosis in hepatocytes. **Methods** Palmitic acid (PA)-treated L02 cells were used as an *in vitro* cellular model of NAFLD. miR-29b-3p and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression levels were determined by RT-qPCR or Western blot. miR-29b-3p mimic/inhibitor or IGF-1 siRNA were transfected into L02 cells exposed to PA. Lipid accumulation was determined by oil red O staining, and triglyceride and total cholesterol assays. Direct interaction between miR-29b-3p and IGF-1 was determined by dual-luciferase reporter assay. **Results** The result revealed that miR-29b-3p was upregulated in our *in vitro* cellular model of NAFLD while IGF-1 concentrations decreased. miR-29b-3p inhibition

【基金项目】 四川省科技厅科普作品创作项目 (2019JDKP0058)。

【作者简介】 杨仁国 (1980—),男,主治医师,硕士,研究方向:肝病。E-mail: yshfujs@163.com

【通信作者】 罗婷婷 (1983—),女,博士,主治医师,研究方向:肝病。E-mail: flyrain_ing@163.com

significantly suppressed lipid accumulation and fibrosis in PA-treated L02 cells. miR-29b-3p targets IGF-1 and suppresses its expression *in vitro*. Interestingly, the effects of miR-29b-3p overexpression on lipid accumulation and fibrosis in PA-treated L02 cells was enhanced by IGF-1 silencing. **Conclusions** Our result suggested that miR-29b-3p has a negative regulatory effect on lipid accumulation and fibrosis in hepatocytes by targeting IGF-1. This study provides evidence that miR-29b-3p might be a promising therapeutic target for NAFLD.

【Keywords】 NAFLD; miR-29b-3p; IGF-1; lipid accumulation; fibrosis; L02 cells

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是一个包含非酒精性脂肪肝 (NAFL), 非酒精性脂肪肝炎 (NASH) 及肝硬化等病变的病理综合征, 是最常见的临床肝病, 病理学改变与酒精性肝病相似^[1-3]。其中肥胖, 2 型糖尿病, 高胰岛素血症和血脂异常等代谢综合征被认为是 NAFLD 发生的主要因素^[4-5]。啮齿动物中的 NAFLD 通常是由高脂饮食 (HFD) 引起的, 会刺激肝脏中脂肪的过度积累并增强巨噬细胞的活化, 从而加剧胰岛素抵抗, 肝炎症和纤维化^[6]。尽管基于 NAFLD 发病机理的“两次打击”理论已被广泛接受, 但 NAFLD 发展中涉及的机制仍在争论中。

miRNA 是一类小非编码 RNA, 长度为 19~24 个核苷酸, 主要通过多种核苷酸的 3'-非翻译区 (3'-UTR) 结合, 在转录后水平上负面调节基因表达, 从而发挥其生物学作用。肝中 miR-29b 的表达已为人所知, 但其功能尚不清楚。Sendi 等^[7]报道 miR-29b 和 CLDN 是慢性丙型肝炎中肝纤维化晚期和 HCV-RNA 的新预测因子。Zhang 等^[8]证明 miR-29b 可以抑制肝星状细胞中胶原的成熟, 最近研究显示血清 miR-29b 与 NAFLD 之间存在正相关^[9]。而 IGF-1 是一种重要的合成代谢生长因子, 在生长过程中参与组织发育, 成熟组织和细胞的适应和再生^[10], 血清 IGF-1 水平低与 NAFLD 的组织学严重程度升高相关^[11]。尽管研究表明 miR-29b 可以通过靶向 IGF-1 抑制结直肠癌细胞的生长并调节成骨细胞分化^[12], 但尚不清楚 miR-29b 是否可以靶向 IGF-1 来调节 NAFLD 中的脂质蓄积和肝纤维化。因此, 本研究旨在探讨 miR-29b 在 NAFLD 中对 IGF-1 的作用和潜在的调控机制, 为临床治疗作基础研究。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

L02 细胞系购于中国武汉普诺赛生命科技公司。

1.2 主要试剂与仪器

RIPA-1640 培养基 (含双抗)、胎牛血清、减血清

培养基均购于 Gibco 公司; 牛血清白蛋白、购于 Sigma 公司; 油红 O 染色剂购于北京索莱宝公司; 甘油三酯 (TG) 与总胆固醇 (TC) 试剂盒购于南京建成公司; miR-29b-3p 模拟物、抑制剂与阴性对照模拟物均购于广州日博生物有限公司; IGF-1 siRNA 与阴性对照 siRNA 由上海基因制药科技有限公司合成; RNA 提取试剂盒购于赛默飞世尔公司; RNA 逆转录试剂盒购于宝日医生物技术 (北京) 有限公司; psiCHECK-2 荧光素酶载体、双荧光素报告试剂试剂盒购于普洛麦格 (北京) 公司; IGF-1、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 和 β -actin 均购于 abcam 公司; 所有引物及序列由上海生工股份有限公司提供; RT-qPCR 系统; 酶标仪 (Thermo 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 全能成像仪 (Bio-Rad 公司); 蛋白质电泳仪 (Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 NAFLD 细胞模型的构建

将 L02 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (含 1% 的青霉素与链霉素) 中, 在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中连续培养, 中途更换培养液进行传代备用。使用含有 1% 无脂肪酸的牛血清白蛋白的培养基制备 0.3 mmol/L 棕榈酸溶液, 将培养至生长对数期后的 L02 细胞重新培养至 6 孔板, 生长贴壁后用 0.3 mmol/L PA 溶液在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 供后续实验使用。

1.3.2 细胞转染

将培养好的细胞进行分组: 空白组、模型组 (50 pmol/mL 阴性对照 si-RNA)、阴性对照组 (50 pmol/mL 阴性对照模拟物)、抑制组 (50 pmol/mL miR-29b-3p 抑制剂)、过表达组 (50 pmol/mL miR-29b-3p 模拟物) 和 IGF-1 沉默组 (50 pmol/mL miR-29b-3p 模拟物+40 pmol/mL IGF-1 siRNA), 除空白组外, 各组按说明书进行转染 24~48 h 后进行后续实验。

1.3.3 载体构建及双荧光素酶检测实验

使用 Targetscan Human 7.2 数据库 (<http://www.targetscan.org>) 进行生物信息学预测, 发现 IGF-1 是 miR-29b-3p 的直接靶点, 然后使用双荧光

素酶报告进行验证:通过 PCR 扩增包含 miR-29b-3p 结合位点的野生型 (WT) 或突变型 (Mut) 片段的 IGF-1 3' 非翻译区,然后将其克隆到 psiCHECK-2 荧光素酶载体中以形成报告子载体,分别命名为 IGF-1 wt 和 IGF-1 Mut。将 L02 细胞接种到 24 孔板 (5×10^4 细胞/孔⁻¹) 培养 24 h 后,用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 IGF1 3'UTR 载体 (WT 和 Mut)、100 ng/mL 的 pRL-TK 荧光素酶质粒以及 50 pmol/mL 的 miR-29b-3p 模拟物、抑制剂和 NC 模拟物、抑制剂共同转染。转染后 48 h,使用双荧光素报告试剂盒测量荧光素酶活性。

1.3.4 脂质沉积指标测定

各组细胞用 PBS 清洗后加入无水乙醇 500 μL ,细胞刮收集细胞后 3000 r/min 离心收集上清液,按试剂盒说明书测定 TG 与 TC 的含量。

1.3.5 油红 O 染色

各组细胞培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定 1 h,0.2% 的油红 O 异丙醇染液染色 20 min,清洗后烘干,在倒置显微镜下观察,拍照。

1.3.6 RT-qPCR

各组按照 RNA 提取与逆转录试剂盒说明书进行操作,使用 RT-qPCR 法检测 miR-29b-3p 基因的表达,使用软件分析检测样本的 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

值反映相对表达水平。

1.3.7 Western blot

使用 Western blot 法测定细胞中检测 IGF-1、纤维化标志蛋白 $\alpha\text{-SMA}$ 、Collagen I 和 Collagen III 的蛋白表达量。

1.4 统计学方法

数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 SPSS 25.0 用于数据分析,进行方差齐性检测,统计方法为单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 PA 对 L02 细胞中 miR-29b-3p 与 IGF-1 的影响

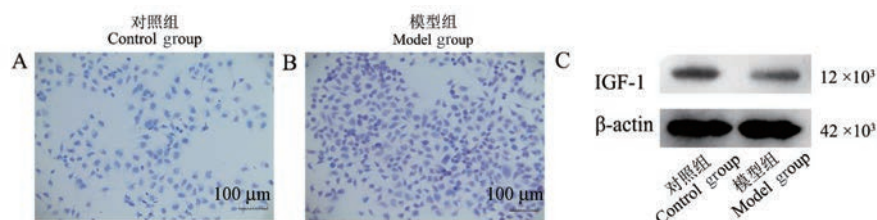
检测发现,与对照组相比,模型组的 TG 和 TC 含量显著增加 ($P < 0.05$) (表 1);同时,油红 O 染色显示 L02 细胞在 PA 未做处理的 L02 细胞中未出现脂质滴 (图 1A),处理后显示出明显的脂质滴 (图 1B),综合两项结果说明 NAFLD 细胞模型构建成功。RT-qPCR 与 Western blot 检测结果显示,与对照组相比,PA 处理后,L02 细胞中 miR-29b-3p 显著增加,而 IGF-1 表达降低 ($P < 0.05$) (表 1 和图 1C)。

表 1 PA 对 L02 细胞中 miR-29b-3p 与 IGF-1 的影响 ($n=3$)
Table 1 Effect of PA on miR-29b-3p and IGF-1 in L02 cells

组别 Groups	TG (mmol/L)	TC ($\mu\text{mol/L}$)	miR-29b-3p ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein
对照组 Control group	0.227 $\pm$ 0.015	0.160 $\pm$ 0.026	1.007 $\pm$ 0.129	1.034 $\pm$ 0.132
模型组 Model group	0.837 $\pm$ 0.042 **	0.743 $\pm$ 0.071 **	1.823 $\pm$ 0.114 **	0.789 $\pm$ 0.056 **

注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

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



注:A、B:油红染色图;C:蛋白质印迹图。

图 1 NAFLD 细胞模型中油红染色与 WB 结果图

Note. A/B, Oil red staining diagrams. C, Western blot.

Figure 1 Oil red staining and Western blot results in NAFLD cell model

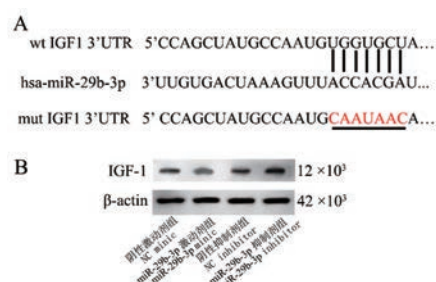
2.2 IGF-1 是 miR-29b-3p 的直接作用靶点

双重荧光素酶报告基因检测发现, miR-29b-3p 的过表达明显降低了野生型 IGF-1 3'-UTR 荧光素酶的活性 ($P<0.05$), 而 miR-29b-3p 的抑制作用显著提高了野生型 IGF-1 3'-UTR 的荧光素酶的活性 ($P<0.05$), 而突变型 IGF-1 3'-UTR 荧光素酶的活性在用 miR-29b-3p 模拟物或抑制剂转染后没有明显变化 ($P>0.05$); 同时, 在用 miR-29b-3p 激动剂转染后, IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达显著性降低, 而 miR-29b-3p 抑制剂转染后 IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达显著性升高 ($P<0.05$), 见图 2、表 2。

2.3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型的影响

进一步设计功能丧失实验以验证 miR-29b-3p 在脂质代谢和肝细胞纤维化中的作用。与模型组相比, 抑制 miR-29b-3p 后, 经 PA 诱导处理的 L02 细胞中 TG 和 TC 含量显著降低 ($P<0.05$); 油红 O 染色结果表明, 抑制 miR-29b-3p 后再经过 PA 处理可以减少 L02 细胞中脂质滴的数量。此外, 我们发现抑制 miR-29b-3p 可以显著性降低 PA 处理后 L02 细

胞中 IGF-1 与纤维化标记物 (包括 α -SMA, I 型胶原和 III 型胶原) 的蛋白质表达水平 ($P<0.05$), 见表 3、图 3。



注: A: 预测的 miR-29b-3p 在 IGF-1 上的结合位点; B: 各组 IGF-1 的蛋白质印迹图。

图 2 双重荧光素酶报告与 IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达结果图

Note. A, Predicted miR-29b-3p binding site on IGF-1. B, IGF-1 of each group Western blot.

Figure 2 Dual luciferase report and IGF-1 protein and mRNA expression results

表 2 双重荧光素酶报告与 IGF-1 蛋白和 mRNA 的表达结果 ($n=3$)

Table 2 Dual luciferase report and IGF-1 protein and mRNA expression results

组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity		IGF-1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein
	野生型 WT	突变型 Mut		
阴性激动剂组 NC mimic group	1.00±0.02	1.00±0.07	1.00±0.09	1.00±0.00
miR-29b-3p 激动剂组 MiR-29b-3p mimic group	0.67±0.04**	1.00±0.08	0.52±0.05**	0.77±0.08**
阴性抑制剂组 NC inhibitor group	1.11±0.05	1.00±0.08	0.91±0.16	0.98±0.18
miR-29b-3p 抑制剂组 MiR-29b-3p inhibitor group	1.30±0.06**	1.00±0.04	1.26±0.05**	1.51±0.33*

注: 与阴性激动剂组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. Compared with the negative agonist group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

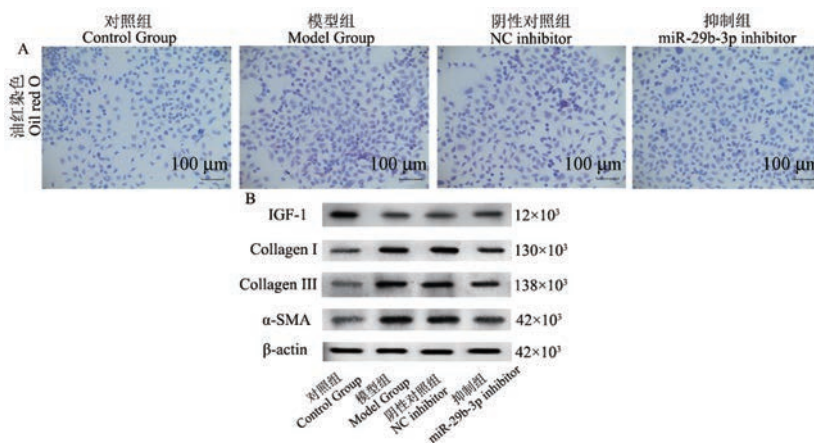
表 3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型的影响结果 ($n=3$)

Table 3 Effect of miR-29b-3p inhibition on NAFLD cell model

组别 Groups	TG (mmol/L)	TC (μ mol/L)	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein	α -SMA	Collagen I	Collagen III
对照组 Control group	0.24±0.03	0.16±0.02	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组 Model group	0.85±0.08**	0.78±0.12**	0.54±0.05**	2.03±0.23**	1.79±0.06**	2.73±0.31**
阴性对照组 NC inhibitor group	0.81±0.07**	0.81±0.04**	0.53±0.02**	2.05±0.22**	1.81±0.31**	2.66±0.24**
抑制组 MiR-29b-3p inhibitor group	0.47±0.09***	0.53±0.04***	0.69±0.08#	1.38±0.25#	1.17±0.24#	1.49±0.21##

注: 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

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



注:A:油红染色结果;B:蛋白质印迹结果。

图3 抑制 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型的影响

Note. A, Oil red staining result. B, Western blot.

Figure 3 Effect of miR-29b-3p inhibition on the NAFLD cell model

2.4 过表达 miR-29b-3p 与沉默 IGF-1 对 NAFLD 细胞模型的影响

功能修复实验显示,与模型组相比,过表达组与沉默组的 TG 和 TC 含量显著性增加以及脂质积累增加($P < 0.05$)。Western 印迹结果显示,沉默组中纤维化标记物(包括 α -SMA, I 型胶原和 III 型胶原)的蛋白表达水平增加,IGF-1 蛋白的表达降低($P < 0.05$),见表 4、图 4,说明沉默 IGF-1 的表达可增加 miR-29b-3p 的效果,促进 NAFLD 的形成。

3 讨论

NAFLD 是一种慢性进行性肝病,属于单纯性肝脂肪变性,是一种可能发展为严重肝硬化的疾病^[13]。因此,了解 NAFLD 的发病机理并开发有效的治疗方法就变得越来越大重要。miRNA 在各种生理和病理学过程中起重要作用,包括细胞增殖、分化、代谢和先天免疫^[14]。目前研究已从高脂饮食或遗传因素诱导的肥胖鼠类和重度 NAFLD 患者的肝中发现了 miRNA 失调,这提示 miRNA 在饮食调节引起的肝功能障碍发展中的潜在作用^[15]。最近的研究表明,各种 miRNA 被确定为脂类代谢、胰腺细胞发育、脂肪因子表达和脂肪形成中的重要调控因子^[16]。此外,miRNA 被认为是包括 NAFLD 在内的人类肝疾病的潜在治疗靶标和生物标记物^[17]。因此在本研究中,我们着眼于 miR-29b-3p 的异常表达,并通过靶向 IGF-1 研究了 miR-29b-3p 对 NAFLD 体外脂质代谢和纤维化的调节。

越来越多的研究强调了 miRNA 在肝功能和疾

病中基因调控的作用。许多关于 NAFLD 的肝脏病理学,包括肝炎症反应、结构损伤和脂质沉积,均由一种或多种 miRNA 调节^[18]。例如,miR-192-5p 可以通过直接 NAFLD 中 SCD-1 的蛋白表达来抑制脂质合成^[19]。He 等^[20]报告说,miR-26a 通过 NAFLD 中 miR-26a/IL-6/I/L7 信号通路发挥免疫调节作用。miR-29 家族包括三个同源基因,即 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c,它们由两个基因簇编码^[21]。Peng 等^[22]报道,miR-29 在 SCAP/SREBP-1 信号传导中介导新的负反馈回路,以控制脂质代谢。最近的研究表明,miR-29b 与 NAFLD 呈正相关关系^[9]。但是,没有证据显示 miR-29b-3p 在调控 NAFLD 细胞模型的脂质蓄积和纤维化作用。PA 是高脂食物中最常见的游离脂肪酸之一,也是体循环中第二丰富的游离脂肪酸^[23]。在本研究中,模型组细胞 TG 和 TC 的含量显著增加与油红 O 染色中出现明显的脂质滴证明我们通过 PA 成功构建了 NAFLD 体外细胞模型。同时,miR-29b-3p 在 NAFLD 体外细胞模型中高度表达,而 IGF-1 表达显著降低($P < 0.05$),这些数据表明 miR-29b-3p 和 IGF-1 在 NAFLD 过程中起关键作用。

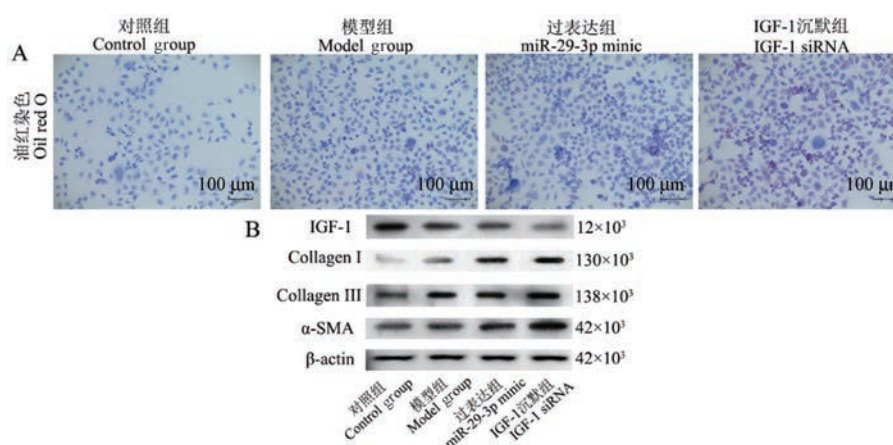
众所周知,miRNA 通过直接调控靶基因来产生细胞生物学行为。目前已经鉴定出许多 miR-29b-3p 的靶基因,其中就包括 IGF-1^[12]。在本研究中,为了进一步研究 miR-29b-3p 调控 NAFLD 细胞模型中脂质蓄积和纤维化的分子机制,使用生物信息学数据库预测 miR-29b-3p 的潜在靶标。其结果揭示了 IGF-1 是 L02 细胞中 miR-29b-3p 的直接靶标,双

表 4 过表达 miR-29b-3p 与沉默 IGF-1 对 NAFLD 细胞模型的影响 ($n=3$)
Table 4 Effects of overexpression of miR-29b-3p and silent IGF-1 on NAFLD cell model

组别 Groups	TG (mmol/L)	TC (μ mol/L)	IGF-1 蛋白 IGF-1 protein	α -SMA	Collagen I	Collagen III
对照组 Control group	0.27 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	0.87 $\pm$ 0.09**	0.81 $\pm$ 0.16**	0.69 $\pm$ 0.07**	1.18 $\pm$ 0.03*	1.55 $\pm$ 0.24*	1.19 $\pm$ 0.04*
过表达组 MiR-29b-3p mimic group	1.19 $\pm$ 0.12***	1.03 $\pm$ 0.05***	0.53 $\pm$ 0.05***	1.36 $\pm$ 0.02***	2.34 $\pm$ 0.16***	1.40 $\pm$ 0.10***
IGF-1 沉默组 IGF-1 siRNA	1.40 $\pm$ 0.07***	1.32 $\pm$ 0.15***	0.41 $\pm$ 0.07***	1.96 $\pm$ 0.12***	2.86 $\pm$ 0.13***	1.72 $\pm$ 0.15***

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

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



注:A:油红染色结果;B:蛋白质印迹结果。

图 4 过表达 miR-29b-3p 与沉默 IGF-1 对 NAFLD 细胞模型的影响

Note. A, Result of oil red staining. B, Western blot.

Figure 4 The effect of overexpression of miR-29b-3p and silenced IGF-1 on NAFLD cell model

重荧光素酶报告基因检测、RT-qPCR 和 Western blot 的结果也证明 miR-29b-3p 靶向 IGF-1 并在体外抑制 IGF-1 表达。

为了更深入地探讨 miR-29b-3p 与 IGF-1 的调节关系,我们设计了功能丧失实验,进一步探讨了 miR-29b-3p 对 NAFLD 细胞模型中 IGF-1 表达的调节作用。结果表明,抑制 miR-29b-3p 表达可减少 NAFLD 体外细胞模型中 TG 和 TC 的生成,并减少脂滴的数量和纤维化标记物的蛋白表达水平,表明 miR-29b-3p 可能在 NAFLD 脂质积累和肝细胞纤维化中起着负调节剂的作用。同时 PA 处理后,IGF-1 的表达显著下降,并且被 miR-29b-3p 抑制,提示抑制 miR-29b-3p 可以减少 NAFLD 细胞模型的脂质蓄积和肝细胞纤维化,其机制与 miR-29b-3p 调节 IGF-1 蛋白表达有关。

为了确定 IGF-1 是否参与 miR-29b-3p 调节的肝细胞脂质积累和纤维化,我们设计功能修复实

验。如预期的那样,在 IGF-1 被 siRNA 沉默后,miR-29b-3p 模拟物在 NAFLD 细胞模型中诱导 TG 和 TC 生成以及脂质积累增加,同时过表达的 miR-29b-3p 诱导 L02 细胞大量聚集包括 α -SMA、I 型胶原和 III 型胶原等纤维化标记物,并进一步降低 IGF-1 蛋白的表达水平。综上所述,沉默 IGF-1 增强了 miR-29b-3p 对脂质积累和纤维化标记蛋白表达水平的促进作用,说明 miR-29b-3p 通过直接靶向 IGF-1 改进了肝细胞的脂质蓄积和纤维化,发挥促 NAFLD 的功能。

总而言之,本研究证明了在 NAFLD 体外模型中 miR-29b-3p 表达升高,而 IGF-1 表达则在下降。我们的研究进一步证明,抑制 miR-29b-3p 可靶向抑制 NAFLD 中的 IGF-1 减少肝细胞脂质蓄积和纤维化。我们的数据丰富了 miRNA 在 NAFLD 发育中的生物学功能。同时,我们的研究表明抑制 miR-29b-3p 可能是 NAFLD 治疗的有前途的策略。

参考文献:

- [1] Ray K. NAFLD-the next global epidemic [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(11): 621.
- [2] Williams T. Metabolic syndrome; nonalcoholic fatty liver disease [J]. FP Essent, 2015, 435: 24-29.
- [3] 范建高. 中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版) [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2012, 4(7): 4-10.
- [4] Agrawal S, Duseja A. Nonalcoholic fatty liver disease--the clinician's perspective [J]. Trop Gastroenterol, 2014, 35(4): 212-221.
- [5] Wong VW, Wong GL, Choi PC, et al. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease; a prospective study with paired liver biopsies at 3 years [J]. Gut, 2010, 59(7): 969-974.
- [6] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis [J]. Hepatology, 2006, 43(2): S99-S112.
- [7] Sendi H, Mehrab-Mohseni M, Russo MW, et al. Baseline hepatic levels of mir-29b and claudin are respectively associated with the stage of fibrosis and HCV RNA in hepatitis C [J]. Clin Exp Gastroenterol Hepatol, 2019, 1(1):105.
- [8] Zhang Y, Ghazwani M, Li J, et al. miR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4): 940-944.
- [9] He Z, Yang JJ, Zhang R, et al. Circulating miR-29b positively correlates with non-alcoholic fatty liver disease in a Chinese population [J]. J Dig Dis, 2019, 20(4): 189-195.
- [10] Timmer LT, Hoogaars WMH, Jaspers RT. The role of IGF-1 signaling in skeletal muscle atrophy [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1088: 109-137.
- [11] Dichtel LE, Corey KE, Misdraji J, et al. The association between IGF-1 levels and the histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2017, 8(1): e217.
- [12] Zeng Q, Wang Y, Gao J, et al. miR-29b-3p regulated osteoblast differentiation via regulating IGF-1 secretion of mechanically stimulated osteocytes [J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24: 11.
- [13] Dong XC. FOXO transcription factors in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Liver Res, 2017, 1(3): 168-173.
- [14] Szabo G, Bala S. microRNAs in liver disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9): 542-552.
- [15] Yamada H, Suzuki K, Ichino N, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver [J]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 99-103.
- [16] Zhang Y, Cheng X, Lu Z, et al. Upregulation of miR-15b in NAFLD models and in the serum of patients with fatty liver disease [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 99(3): 327-334.
- [17] He Z, Hu C, Jia W. miRNAs in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Front Med, 2016, 10(4): 389-396.
- [18] Dattaroy D, Seth RK, Das S, et al. Sparstolonin B attenuates early liver inflammation in experimental NASH by modulating TLR4 trafficking in lipid rafts via NADPH oxidase activation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 310(7): G510-G525.
- [19] Liu XL, Cao HX, Wang BC, et al. miR-192-5p regulates lipid synthesis in non-alcoholic fatty liver disease through SCD-1 [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(46): 8140-8151.
- [20] He Q, Li F, Li J, et al. microRNA-26a-interleukin (IL)-6-I/L7 axis regulates the development of non-alcoholic fatty liver disease in a murine model [J]. Clin Exp Immunol, 2017, 187(1): 174-184.
- [21] Massart J, Sjögren RJO, Lundell LS, et al. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle [J]. Diabetes, 2017, 66(7): 1807-1818.
- [22] Ru P, Guo D. microRNA-29 mediates a novel negative feedback loop to regulate SCAP/SREBP-1 and lipid metabolism [J]. RNA Dis, 2017, 4(1): e1525.
- [23] Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al. Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health [J]. Molecules, 2015, 20(9): 17339-17361.

[收稿日期] 2020-05-29

邓莉,赵延礼,何宗钊,等. 基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 73-78.

Deng L, Zhao YL, He ZZ, et al. Effect of propofol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the Rho/Rho kinase signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 73-78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 01. 011

基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果

邓莉¹, 赵延礼², 何宗钊^{3*}, 司立宁⁴, 吕志坚¹

(1.青海大学附属医院麻醉科, 西宁 810001; 2.青海大学医学院基础医学部, 西宁 810001;
3.青海省人民医院重症医学科, 西宁 810007; 4.青海大学附属医院重症医学科, 西宁 810001)

【摘要】 目的 基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果。**方法** SD 大鼠 100 只分成:对照组、模型组、丙泊酚低、中、高剂量组 (20.0、40.0、80.0 mg/kg), 模型组、丙泊酚低、中、高剂量组建立脑缺血再灌注损伤模型, 建模成功后, 丙泊酚低、中、高剂量组给予相应剂量丙泊酚灌胃, 对照组和模型组给予等体积生理盐水, 持续给予 4 周, 实验结束后, 对每只大鼠进行神经功能缺损评分, 行贴纸去除及平衡木行走实验, 对大鼠海马区进行病理评分, 同时测定大鼠脑组织中 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白水平。**结果** 模型组神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分、脑组织海马区 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组 ($P<0.05$); 丙泊酚各剂量组神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分、脑组织海马区 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白表达水平明显低于模型组 ($P<0.05$); 且随着丙泊酚给药剂量的增加, 神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分、脑组织海马区 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白表达水平逐渐降低, 剂量-效应关系明显 ($P<0.05$)。对照组海马区神经元细胞完整, 排列紧密; 模型组海马区神经元排列松散, 细胞深染固缩, 有片状坏死, 神经细胞间质隔离; 丙泊酚高剂组神经元细胞趋于正常; 丙泊酚中、低剂量组较模型组而言, 神经细胞疏松、固缩程度轻, 神经元细胞核仁清楚可见。**结论** 丙泊酚能减轻大鼠脑缺血再灌注神经功能损伤; 其机制与丙泊酚能抑制 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白的表达进而抑制 Rho/Rho-kinase 信号通路的激活有关。

【关键词】 Rho/Rho-kinase 信号通路; 丙泊酚; 脑缺血再灌注损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0073-06

Effect of propofol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the Rho/Rho kinase signaling pathway

DENG Li¹, ZHAO Yanli², HE Zongzhao^{3*}, SI Lining⁴, YU Zhijian¹

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China.

2. Department of Basic Medicine, Medical College of Qinghai University, Xining 810001.

3. Department of Intensive Medicine, Qinghai People's Hospital, Xining 810007.

4. Department of Intensive Medicine, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001)

【基金项目】 青海省科技计划项目 (2017-ZJ-758)。

【作者简介】 邓莉 (1981—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 麻醉及重症血流动力学研究。E-mail: 86230213@qq.com

【通信作者】 何宗钊 (1981—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 重症医学, 休克与微循环。E-mail: 541251777@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of propofol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the Rho/Rho kinase signaling pathway. **Methods** One hundred SD rats were divided into control, model, and propofol low, medium, and high dose (20, 40, and 80 mg/kg) groups. Rats in the model and propofol low, medium, and high dose groups were used to establish a cerebral ischemia-reperfusion injury model. After successful modeling, rats in propofol low, medium, and high dose groups were administered the corresponding dose of propofol and rats in control and model groups were administered the same volume of normal saline for 4 weeks. Then, each rat was scored for neurological deficits, stickers were removed, and balance beam walking experiments were performed. Pathological scores in the hippocampus of rats were calculated. Rho and Rho kinase mRNA and protein levels were determined in rat brain tissue. **Results** The neurological deficit score, bilateral sticker removal time, balance beam time, pathological score of the hippocampus, and Rho and Rho kinase mRNA and protein expression levels in the model group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The neurological deficit score, bilateral sticker removal time, balance beam time, pathological score of the hippocampus, and Rho and Rho kinase mRNA and protein expression levels in all propofol groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). With the increase of the propofol dose, the neurological deficit score, the time of side sticker removal, balance beam time, pathological score of the hippocampus, and Rho and Rho kinase mRNA and protein expression levels were decreased gradually and dose-response relationships were obvious ($P < 0.05$). In the control group, neuronal cells were intact with a normal structure, clear staining, and oval nucleus in the center. In the model group, a large number of necrotic neurons were seen with obvious cell loss and nuclear pyknosis. In the high dose propofol group, a small number of necrotic neuronal cells were seen, the neuronal cell structure was relatively complete, and the nuclei of neurons were oval in the center. Compared with the model group, the numbers of necrotic neurons were decreased in middle and low dose propofol groups, but the meridians were loose and disordered, the nucleus exhibited pyknosis, and loss was obvious. **Conclusions** Propofol reduces neurological damage in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. The mechanism is related to inhibition of Rho and Rho kinase mRNA and protein expression by propofol and thus inhibition of activation of the Rho/Rho kinase signaling pathway.

【Keywords】 Rho/Rho-kinase signaling pathway; propofol; cerebral ischemia-reperfusion injury

缺血性中风是导致全球成人死亡和获得性残疾的主要因素之一。目前,大约有 1500 万中风患者,每年因此造成 500 万人死亡^[1-2]。脑缺血/再灌注损伤的发生主要有如下几种机制,包括兴奋性毒性,炎症,神经元凋亡和脑水肿。此外,众所周知,急性炎症反应和细胞凋亡在由脑再灌注损伤产生的神经元细胞的继发性损伤中起关键作用^[3]。Rho 是小分子 GTPase 超家族的一部分,在多种细胞过程中起关键作用,包括基因转录,细胞迁移,运动,凋亡,神经再生和细胞形态,并能够通过磷酸化调节细胞肌动蛋白的重组 Rho 激酶(Rho-kinase), Rho-kinase 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, Rho-kinase 激活并调节多种细胞功能,包括形态,粘附,运动性和增殖。研究表明, Rho-kinase 被抑制后,可减少神经元的炎症和细胞凋亡,并在脑缺血/再灌注中维持神经功能^[4],抑制 Rho 激酶可以保护神经细胞免受内皮素 1 诱导的缺血性损伤^[5]。丙泊酚为烷基酸类的短效静脉麻醉药。静脉注射后迅速分布于全身,40 s 内可产生睡眠状态,进入麻醉迅速、平稳。丙泊酚的镇痛效应较弱,可使颅内压降低、脑耗氧量及脑血流量减少。对呼吸系统有抑制作

用,可出现暂时性呼吸停止;对循环系统也有抑制作用,可出现血压降低。先前的研究表明^[6],丙泊酚在体内对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)发挥了有益的作用;丙泊酚对 MIRI 大鼠模型的保护作用涉及抗氧化和抗炎过程^[7]。本研究拟基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果,为脑缺血再灌注损伤的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD(Sprague Dawley)大鼠 100 只,年龄 6 周;体重 225 ~ 243 g,雌雄各半;青海大学医学院动物实验中心提供并饲养[SCXK(青)2018-0013][SYXK(青)2017-0014],本研究经青海大学附属医院科研伦理委员会批准(20180815),大鼠饲养环境为:22℃ ~ 24℃;50% ~ 55%;12 h 黑暗/光照循环。实验研究过程中严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(30 mg/kg; H31020240,上海新亚洲制药有限公司,中国 上海);TRIzol(sigma 美国,

56262); RNeasy Mini Kit (TaKaRa, 中国, 2544); RIPA 缓冲液 (Santa Cruz, USA, 52547); BCA 试剂盒 (赛默飞世, 美国, 20147); 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, sigma, 45955); 聚偏二氟乙烯 (PVDF, sigma, 854175); 牛血清白蛋白 (BSA, 碧云天科技, 410254); 兔抗大鼠 Rho (ab54835; 1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA); Rho-kinase (ab45171, 1:2000; Abcam, Cambridge, MA, USA); β -actin 单克隆抗体 (ab134181; 1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA); 山羊抗兔二抗 (C86 SSA004; 1:1000, 上海 Canspec 科技有限公司, 中国上海); NanoDrop2000c 分光光度计 (美国赛默飞世); Applied Biosystems 7500 (美国通用)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

根据体重随机分成 5 组: 对照组、模型组、丙泊酚低剂量组 (20.0 mg/kg)、丙泊酚中剂量组 (40.0 mg/kg)、丙泊酚高剂量组 (80.0 mg/kg)、每组 20 只, 雌雄各半。前期预实验求出丙泊酚对脑缺血再灌注大鼠 LC_{50} 为 160 mg/kg, 以 $1/2 LC_{50}$ 为高剂量, 2 倍间距求出中、低剂量。

1.3.2 各实验组的制备及神经运动功能评分

模型组、丙泊酚各剂量组通过腹膜内注射用 3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 并固定头和四肢放在不锈钢手术台上。刮毛和灭菌后进行颈正中切口, 暴露左颈内动脉 (ICA) 后, 将尼龙手术丝插入其中, 当远端遇到阻力时, 停止插入, 并用根据 Koizumi 方法测量的插入深度结扎 ICA, 闭塞 2 h 后, 取下线以允许缺血区域的完全再灌注, 然后建立大脑中动脉闭塞 (MACO) 的大鼠模型。术后给予 20 万 U 青霉素肌肉注射, 连续使用 3 d。对照组除不阻断大鼠大脑中动脉外, 其余操作同上。丙泊酚各剂量各剂量术后第 1 天开始腹腔给予相应药物, 持续给予 4 周, 对照组和模型组给予等体积生理盐水。试验结束后 (第 29 天), 对每只大鼠的神经功能缺损评分。包括运动、感觉、反射和平衡能力测试等。采用以下评分制度: 0 级, 无赤字; 1 级, 右前爪未能伸展; 2 级, 向右旋转; 3 级, 从右到右; 4 级, 无法自发行走, 意识水平降低。

1.3.3 贴纸去除及平衡木行走实验

实验结束后 (第 29 天), 依据相关文献对大鼠行贴纸去除及平衡木行走实验^[8-9]。简而言之: 边长为 10 mm 的正方形黏性纸粘住大鼠前肢掌面, 记

录大鼠去除黏性纸的时间; 大鼠于平衡木上行走, 平衡木长 80 cm、宽 2.5 cm, 距离地面高 10 cm 并, 记录大鼠穿越平衡木的时间。

1.3.4 各组大鼠海马区病理结构观察

实验结束后 (第 29 天) 处死大鼠, 获取海马组织, 对海马组织常规脱水、脱腊, HE 染色观察病理结构变化。简而言之: (I) 二甲苯 (I) 15 min、二甲苯 (II) 15 min、二甲苯: 无水乙醇 = 1:1 2 min、100% 乙醇 (I) 5 min、100% 乙醇 (II) 5 min、80% 乙醇 5 min、蒸馏水 5 min、苏木精液染色 5 min、水洗 10 min 或流水冲洗 5 min、1% 盐酸乙醇 30 s、水洗 30 s、蒸馏水过洗 5 s、0.5% 伊红液染色 1~3 min、蒸馏水稍洗 30 s、80% 乙醇稍洗 30 s、95% 乙醇 (I) 1 min、95% 乙醇 (II) 1 min、无水乙醇 (I) 3 min、无水乙醇 (II) 3 min、二甲苯 (I) 3 min、二甲苯 (II) 3 min、中性树脂胶封固。

1.3.5 各组大鼠海马区病理评分

在高倍视野下 ($\times 40$), 每 1/10 病变面积计一个单位, 一个单位的变性评为 0.2 分, 一个单位的坏死评为 2 分。

1.3.6 大鼠脑组织海马区中 Rho、Rho-kinase mRNA 水平的测定

试验结束后 (第 29 天) 处死大鼠, 获取脑组织海马区, TRIzol 提取脑组织海马区总 RNA。使用 NanoDrop2000c 分光光度计 ($A_{260}: A_{280} > 1.8$) 测量 RNA 的纯度和浓度, 通过琼脂糖凝胶电泳结合溴化乙锭染色评估 RNA 的完整性。根据制造商提供的说明使用 RNeasy Mini Kit 进行逆转录反应。简而言之, 在 42℃ 下用 DNA 酶从 1 μ g 总 RNA 中去除污染的基因组 DNA 2。接下来, 将 1 μ L 包含寡核苷酸 (dT) 和随机引物的逆转录引物混合物, 1 μ L 逆转录酶, 4 μ L 5 $\times$ 逆转录缓冲液和 4 μ L DEPC 处理过的水添加到上述 DNase 处理的 RNA 中模板中的总反应体积为 20 μ L。将反应液在 37℃ 孵育 15 min, 然后在 85℃ 孵育 5 s, 然后保存在 4℃ 下。使用 Applied Biosystems 7500 检测系统进行实时 PCR。实时 PCR 的引物序列如下: Rho: 5'-TACCCTGGGAGACAGAATGAAAAGC-3' (正向) 和 5'-CACCTGTGTTTCTCAGCCCTTCTCT-3' (反向); Rho-kinase: 5'-ATGACAGGGCTGGAAGTGACC-3' (正向) 和 5'-ACTATGTCCCAGTCAGGGCTCT-3' (反向); β 肌动蛋白: 5'-CTTAGTTCGTTACACCCCTTCTTG-3' (正向) 和 5'-CTGTCACCTTCACCGTCC

AGTTT-3' (反向)。引物由生工科技合成(上海, 中国)。对于反应, 将 1 μ L cDNA, 12.5 μ L 2 $\times$ SYBR Green I Master Mix, 10 pmol 特定正向引物, 10 pmol 反向引物和 0.5 μ L ROX II 合并, 并用 DEPC 处理过的水加入最终体积为 25 μ L。反应参数包括在 95 $^{\circ}$ C 下孵育 30 s, 然后在 95 $^{\circ}$ C 下进行 40 次循环, 每次 5 s, 然后在 60 $^{\circ}$ C 下进行 34 次循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对靶基因定量, 其中 $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{治疗组}) - Ct(\text{治疗组}) \text{内部对照}] - [Ct(\text{对照组}) - Ct(\text{对照组}) \text{内部对照}]$ 。β-肌动蛋白用作内部对照。

1.3.7 大鼠脑组织海马区中 Rho、Rho-kinase 蛋白水平的测定

实验结束后(第 29 天)处死大鼠, 获取脑组织海马区, 用预冷的 PBS 洗涤, 并在 RIPA 缓冲液中裂解, 然后使用 BCA 试剂盒测量蛋白质浓度。用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 25 μ g 蛋白质样品, 并通过半干电泳转移将其转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 牛血清白蛋白封闭过夜后, 将标本与兔抗大鼠 Rho, Rho-kinase 和 β-actin 单克隆抗体在摇床上于 4 $^{\circ}$ C 放置 2 h。然后将 PVDF 膜与山羊抗兔二抗在摇床上孵育 4 h。随后进行化学发光, 并使用 Quantity One 软件进行定量分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 对数据进行录入、统计学分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析比较, 多重比较采用 LSD-*t* 检验, 检验水准 α 为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠神经运动功能评分及海马组织病理评分的比较

模型组神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分明显高于对照组 ($P < 0.05$); 丙泊酚各剂量组神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分明显低于模型组 ($P < 0.05$); 且随着丙泊酚给药剂量的增加, 神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分逐渐降低, 剂量-效应关系明显 ($P < 0.05$) (见表 1)。

2.2 丙泊酚对各组大鼠海马结构的影响

图 1 可见, 对照组海马区神经元细胞完整, 排列紧密; 模型组海马区神经元排列松散, 细胞深染固缩, 有片状坏死, 神经细胞间质隔离; 丙泊酚高剂量组神经元细胞趋于正常; 丙泊酚中、低剂量组较模型组而言, 神经细胞疏松、固缩程度轻, 神经元细胞核仁清楚可见。

2.3 各组大鼠脑组织海马区 Rho、Rho-kinase mRNA 表达水平的比较

模型组 Rho、Rho-kinase mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); 丙泊酚各剂量组 Rho、Rho-kinase mRNA 表达水平明显低于模型组 ($P < 0.05$); 且随着丙泊酚给药剂量的增加, Rho、Rho-kinase mRNA 表达水平逐渐降低, 剂量-效应关系明显 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.4 各组大鼠脑组织海马区 Rho、Rho-kinase 蛋白表达水平的比较

模型组 Rho、Rho-kinase 蛋白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); 丙泊酚各剂量组 Rho、Rho-kinase 蛋白表达水平明显低于模型组 ($P < 0.05$); 且随着丙泊酚给药剂量的增加, Rho、Rho-kinase 蛋白表达水平逐渐降低, 剂量-效应关系明显 ($P < 0.05$), 见表 3 及图 2。

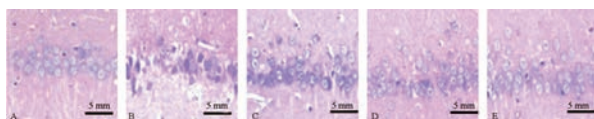
表 1 各组大鼠神经运动功能评分及海马组织病理评分的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Comparison of neuromotor function score and hippocampal histopathology score of rats in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	神经功能缺损评分 (分) Neurological impairment score (points)	双侧贴纸去除时间 (s) Double-sided sticker removal time	平衡木过杆时间 (s) Balance beam crossing time	海马组织病理评分 (分) Hippocampal histopathology score (points)
对照组 Control group	—	0.00 $\pm$ 0.00	26.34 $\pm$ 6.87	1.99 $\pm$ 0.34	0.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	—	10.66 $\pm$ 0.471 ¹⁾	103.63 $\pm$ 25.651 ¹⁾	16.54 $\pm$ 6.871 ¹⁾	9.96 $\pm$ 0.561 ¹⁾
丙泊酚组 Propofol Group	20	8.14 $\pm$ 0.341 ¹⁾²⁾	80.76 $\pm$ 8.121 ¹⁾²⁾	12.30 $\pm$ 0.511 ¹⁾²⁾	8.65 $\pm$ 0.441 ¹⁾²⁾
	40	6.23 $\pm$ 0.231 ¹⁾²⁾³⁾	51.28 $\pm$ 9.881 ¹⁾²⁾³⁾	8.65 $\pm$ 0.511 ¹⁾²⁾³⁾	5.98 $\pm$ 0.481 ¹⁾²⁾³⁾
	80	5.35 $\pm$ 0.161 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	50.32 $\pm$ 9.161 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	4.71 $\pm$ 0.501 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	3.99 $\pm$ 0.391 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与丙泊酚组低剂量比较, ³⁾ $P < 0.05$; 与丙泊酚组中剂量比较, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$. Compared with the model group, ²⁾ $P < 0.05$. Compared with the low dose of the propofol group, ³⁾ $P < 0.05$. Compared with the dose in the propofol group, ⁴⁾ $P < 0.05$.



注:A:对照组;B:模型组;C:丙泊酚组低剂量组;D:丙泊酚组中剂量组;E:丙泊酚组高剂量组。

图 1 丙泊酚对各组大鼠海马结构的影响(HE 染色)

A, Control group. B, Model group. C, Propofol group low-dose group. D, Propofol group medium-dose group. E, Propofol group high-dose group.

Figure 1 Effect of propofol on the hippocampus structure of each group of rats (HE staining)

表 2 各组大鼠脑组织海马区 Rho、Rho-kinase mRNA 表达水平的比较($n=20$)

Table 2 Comparison of Rho and Rho-kinase mRNA expression levels of rats in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	Rho mRNA	Rho-kinase mRNA
对照组 Control group	-	1.47±0.580	1.36±0.250
模型组 Model group	-	6.65±0.491 ¹⁾	7.54±0.541 ¹⁾
	20	6.00±0.291 ¹⁾²⁾	6.54±0.231 ¹⁾²⁾
丙泊酚组 Propofol Group	40	5.21±0.341 ¹⁾²⁾³⁾	5.11±0.371 ¹⁾²⁾³⁾
	80	4.21±0.321 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	3.25±0.281 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与丙泊酚组低剂量比较,³⁾ $P<0.05$;与丙泊酚组中剂量比较,⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with the low dose of the propofol group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with the dose in the propofol group, ⁴⁾ $P<0.05$.

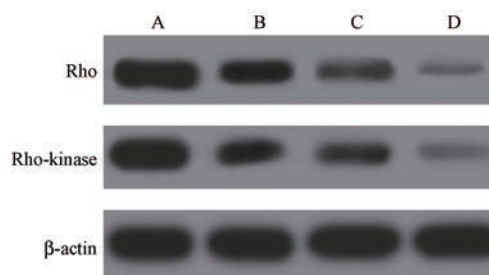
表 3 各组大鼠脑组织海马区 Rho、Rho-kinase 蛋白表达水平的比较($n=20$)

Table 3 Comparison of Rho and Rho-kinase protein expression levels of rats in each group

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	Rho	Rho-kinase
对照组 Control group	-	0.98±0.32	1.41±0.34
模型组 Model group	-	5.65±0.241 ¹⁾	6.32±0.241 ¹⁾
	20	4.65±0.541 ¹⁾²⁾	4.12±0.54
丙泊酚组 Propofol Group	40	3.21±0.351 ¹⁾²⁾³⁾	3.11±0.431 ¹⁾²⁾³⁾
	80	1.54±0.541 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.85±0.371 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与丙泊酚组低剂量比较,³⁾ $P<0.05$;与丙泊酚组中剂量比较,⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$. Compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$. Compared with the low dose of the propofol group, ³⁾ $P<0.05$. Compared with the dose in the propofol group, ⁴⁾ $P<0.05$.



注:A:对照组;B:模型组;C:丙泊酚组低剂量组;D:丙泊酚组中剂量组;E:丙泊酚组高剂量组。

图 2 各组大鼠脑组织海马区 Rho、Rho-kinase 蛋白表达水平的比较

Note. A, Control group. B, Model group. C, Propofol group low-dose group. D, Propofol group medium-dose group. E, Propofol group high-dose group.

Figure 2 Comparison of Rho and Rho-kinase protein expression levels of rats in each group

3 讨论

丙泊酚是一种短效的静脉催眠麻醉剂,可通过多种机制为脑缺血再灌注提供保护。丙泊酚(2,6-二异丙基苯丙醇)是一种速效,持续时间短的静脉内催眠麻醉剂,在脑手术期间和之后被广泛使用。异丙酚的化学结构类似于具有抗氧化特性的 α -生育酚(维生素E)的活性核^[10]。本研究结果显示;丙泊酚各剂量组神经功能缺损评分、双侧贴纸去除时间、平衡木过杆时间、海马组织病理评分明显低于模型组。这说明,丙泊酚能减轻大鼠脑缺血再灌注神经功能损伤。根据先前的研究,炎症,氧化应激和细胞凋亡是脑缺血再灌注损伤有害过程的三个主要机制,被证明是全球第二大常见致死因素,也是成人神经系统残疾的主要原因。此外,凋亡是脑缺血再灌注损伤的主要原因之一,因此,抑制神经元凋亡是治疗缺血性中风的关键目标。证据表明凋亡在缺血后神经细胞死亡中起重要作用,这表明抑制凋亡性细胞死亡的治疗性干预措施可能会减轻脑缺血再灌注损伤。近期研究表明^[11-12],丙泊酚可抑制神经细胞线粒体细胞色素c的释放,进而抑制神经细胞凋亡。本次研究病理结果显示:对照组海马区神经元细胞完整,排列紧密;模型组海马区神经元排列松散,细胞深染固缩,有片状坏死,神经细胞间质隔离;丙泊酚高剂组神经元细胞趋于正常;丙泊酚中、低剂量组较模型组而言,神经细胞疏松、固缩程度轻,神经元细胞核仁清楚可见。这与上述讨论一致。

本研究结果显示:模型组 Rho、Rho-kinase

mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组;丙泊酚各剂量组 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白表达水平明显低于模型组;且随着丙泊酚给药剂量的增加,Rho、Rho-kinase mRNA 表达水平逐渐降低,剂量-效应关系明显。这说明,丙泊酚能抑制 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白表达水平的表达进而抑制 Rho/Rho-kinase 信号通路的激活。炎症反应,神经细胞内钙超载和细胞凋亡已被证明是脑 I/R 损伤的主要原因。属于高度保守的先天免疫受体 GTPase 超家族的 Rho 可以识别从死亡/垂死细胞释放的外源病原体或与损伤相关的分子模式(DAMP)。Rho 是第一个被表征的哺乳动物 GTPase,主要在小胶质细胞,星形胶质细胞,神经元和内皮细胞中表达。许多研究表明,Rho 在脑缺血/再灌注的病理过程中起关键作用,并且在缺血后小鼠脑中 Rho 的 mRNA 上调^[13-14]。免疫组织化学研究表明,在 MCAO 小鼠模型中,缺血/再灌注后 Rho 阳性细胞从 1 h 逐渐增加至 22 h。此外,在缺血/再灌注后,Rho-KO 小鼠的梗死面积和神经功能缺损均低于野生型小鼠^[15]。Rho 可以激活 Rho-kinase 和有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号传导途径,导致神经炎症反应。c-jun 氨基末端激酶(JNK)是 Rho-kinase 的主要组成部分,已被证明在脑缺血/灌注损伤后的神经元凋亡中起关键作用^[16]。大量证据表明,Bcl-2 充当 Rho-kinase 的非核底物,并通过调节线粒体膜的通透性在细胞内凋亡信号转导中发挥关键作用。Caspase-3 是凋亡执行过程中的关键分子,抑制其激活可能在凋亡级联反应的最后一步起作用并阻止凋亡细胞的死亡^[17-18]。结合本次研究结果,提示对 Rho/Rho-kinase 信号通路的抑制可能是治疗脑缺血再灌注损伤的新方向。

综上所述,丙泊酚能减轻大鼠脑缺血再灌注神经功能损伤;其机制与丙泊酚能抑制 Rho、Rho-kinase mRNA 和蛋白的表达进而抑制 Rho/Rho-kinase 信号通路的激活有关。

参考文献:

- [1] Kulcsar Z, Carrera E, Michel P. Endovascular treatment for acute ischemic stroke [J]. Rev Med Suisse, 2017, 13(560): 886-889.
- [2] Chu HJ, Tang SC, Lee CW, et al. Endovascular thrombectomy for acute ischemic stroke: A single-center experience in Taiwan [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(9): 806-813.
- [3] 黄丽,朱彩霞,张芹欣,等.四种开窍药对急性不完全性脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用[J].中国比较医学杂志,2018,28(8): 77-82.
- [4] Okumoto K, Ono T, Toyama R, et al. New splicing variants of mitochondrial Rho GTPase-1 (Miro1) transport peroxisomes [J]. J Cell Biol, 2018, 217(2): 619-633.
- [5] Huetsch JC, Walker J, Udem C, et al. Rho kinase and Na⁺/H⁺ exchanger mediate endothelin-1-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration [J]. Physiol Rep, 2018, 6(9): e13698.
- [6] García-Martín E, Martínez C, Serrador M, et al. Gamma-aminobutyric acid (gaba) receptors rho (gabrr) gene polymorphisms and risk for migraine [J]. Headache, 2017, 57(7): 1118-1135.
- [7] Russell AP, Wallace MA, Kalanon M, et al. Striated muscle activator of Rho signalling (STARS) is reduced in ageing human skeletal muscle and targeted by miR-628-5p [J]. Acta Physiol (Oxf), 2017, 220(2): 263-274.
- [8] 王明洋,冯璐,范妹婕,等.复方脑肽节苷脂注射液激活线粒体自噬改善脑缺血再灌注损伤[J].中国康复理论与实践,2016,22(7): 750-753.
- [9] 徐悦,郑永强,付蓓蓓.复方脑肽节苷脂对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用[J].中国药业,2018,28(10): 13-16.
- [10] Feng AY, Kaye AD, Kaye RJ, et al. Novel propofol derivatives and implications for anesthesia practice [J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2017, 33(1): 9-15.
- [11] Flores FJ, Hartnack KE, Fath AB, et al. Thalamocortical synchronization during induction and emergence from propofol-induced unconsciousness [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(32): E6660-E6668.
- [12] Zhou J, Wang F, Zhang J, et al. The interplay of BDNF-TrkB with NMDA receptor in propofol-induced cognition dysfunction: Mechanism for the effects of propofol on cognitive function [J]. BMC Anesthesiol, 2018, 18(1): 35.
- [13] Wang ZH, Zhu D, Xie S, et al. Inhibition of rho-kinase attenuates left ventricular remodeling caused by chronic intermittent hypoxia in rats via suppressing myocardial inflammation and apoptosis [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 70(2): 102-109.
- [14] Mochalov SV, Tarasova NV, Kudryashova TV, et al. Higher Ca²⁺-sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity [J]. Acta Physiol (Oxf), 2018, 223(3): e13044.
- [15] Inaba H, Yamakawa D, Tomono Y, et al. Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498(3): 544-550.
- [16] Wen N, Hui H, Zi Y, et al. Mitochondrial oxidative damage and apoptosis induced by high glucose through Rho kinase signal pathway in renal tubular epithelial cells [J]. Asian Pac J Trop Med, 2018, 11(6): 399-404.
- [17] 薛威,唐虹,孙雨倩,等.二苯乙炔苷抑制 NADPH 氧化酶对小鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J].中国实验动物学报,2019,27(2): 208-214.
- [18] Srinivasan S, Ashok V, Mohanty S, et al. Blockade of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibits the contractility and invasion potential of cancer stem like cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 21418-21428.

[收稿日期]2020-05-24

惠香香,白明,苗明三. 基于数据挖掘的 274 例类风湿关节炎动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 79-86.

Hui XX, Bai M, Miao MS. Analysis of 274 rheumatoid arthritis animal models by data mining [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 79-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.012

基于数据挖掘的 274 例类风湿关节炎动物模型应用分析

惠香香,白明*,苗明三*

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 目的 研究类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)动物模型造模要素,为提高造模成功率及评价受试药物有效性提供方法学参考。**方法** 以类风湿关节炎和动物模型为主题词,搜索中国期刊全文数据库(CNKI)和万方数据库(2017 年 1 月-2020 年 6 月)相关期刊文献,收集实验动物种类、激发方式、致炎方法、检测指标等,建立数据库,使用 Excel 2013、SPSS Statistics 19.0 统计软件对导入的检测指标进行关联规则分析和因子分析。**结果** 纳入符合标准的期刊文献 274 篇,其中使用最多的实验动物种类为雄性 SD 大鼠(69 次,25.18%)和雌性 Wistar 大鼠(54 次,19.71%);使用较多的致炎方法为 CIA 法(172 次,62.77%)和 AA 法(82 次,29.93%)等;使用较多的激发方式为尾根部皮下注射(71 次,25.91%)和右后足跖皮内注射等(52 次,18.98%)等;检测最多的指标为足跖肿胀度(133 次,17.48%)、关节炎评分指数(84 次,11.04%)、血清中 TNF- α 水平(74 次,9.72%)和关节组织病理(66 次,8.67%)等。**结论** 类风湿关节炎动物模型造模时建议使用雄性 SD 大鼠或雌性 Wistar 大鼠,采用尾根部皮下注射的方式致炎,用牛 II 型胶原蛋白与弗氏不完全或完全佐剂 1:1 混匀成的乳剂,每点 0.1 mL 致炎,可以提高模型的成功率。经过查阅近三年文献,共筛选出符合要求的文献 274 篇。该文分析已有动物模型,为类风湿关节炎动物模型的进一步完善、模型评价的规范化提出建议,提高动物模型与临床的吻合度,从模型动物选择、类风湿关节炎模型类型、造模用药以及检测指标等方面总结类风湿关节炎动物模型的研究进展,促进类风湿关节炎的深入研究。

【关键词】 类风湿关节炎;动物模型;因子分析;数据挖掘

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)01-0079-08

Analysis of 274 rheumatoid arthritis animal models by data mining

HUI Xiangxiang, BAI Ming*, MIAO Mingsan*

(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Objective To study the modeling elements of rheumatoid arthritis (RA) animal models and provide a methodological reference to improve the success rate of modeling and evaluate the effectiveness of tested drugs. **Methods** Rheumatoid arthritis and animal models were used as subject headings and the relevant journal documents of CNKI and

[基金项目] 河南省产学研合作(182107000029);国家国际合作基地(2016-65);国家中医药管理局中医药标准化专项(2017-149-11)。

[作者简介] 惠香香(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail: huixiangxiang163@163.com

[通信作者] 苗明三(1965—),男,教授,博士,主要从事中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com

白明(1968—),女,副教授,硕士,主要从事中药药理研究。E-mail: baiming666@126.com * 共同通信作者

Wanfang databases (January 2017 to December 2019) were searched. The experimental animal species, excitation method, inflammatory method, and detection indexes were collected and a database was established. Excel 2012 and SPSS Statistics 19.0 statistical software were used to carry out association rule and factor analyses of imported traditional Chinese medicine. Statistical analysis was also carried out. **Results** A total of 259 periodicals were included, among which male SD rats (69 times, 25.18%) and male Wistar rats (54 times, 19.71%) were the most frequently used experimental animals. The most frequently used inflammatory method were CIA (172 times, 62.77%) and AA (82 times, 29.93%). The most frequently used stimulation method were subcutaneous injection of the tail root (71 times, 25.91%) and intradermal injection of the right hind foot (52 times, 18.98%). The most frequently detected indexes were the swelling degree of the foot sole (133 times, 17.48%), arthritis score index (84 times, 11.04%), serum TNF- α level (74 times, 9.72%), and joint histopathology (66 times, 8.67%). **Conclusions** The result suggested the use of male SD or Wistar rats to induce inflammation by subcutaneous injection at the tail root when establishing animal models of rheumatoid arthritis. The success rate of the model can be improved using 0.1 ml emulsion mixed with bovine type II collagen and Freund's incomplete or complete adjuvant at 1:1. After consulting the literature in the past 3 years, 274 articles meeting the requirements were selected. This study analyzed the existing animal models, provides suggestions to improve animal models of rheumatoid arthritis and standardize model evaluation, improves the coincidence degree between animal models and the clinic, summarizes the research progress of animal models of rheumatoid arthritis from the aspects of model animal selection, types of rheumatoid arthritis models, modeling drugs and detection indexes, and promotes in-depth research of rheumatoid arthritis.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; animal models; factor analysis; data mining

类风湿关节炎是一种慢性的以累及关节为主的多系统炎症的自身免疫疾病。主要临床表现为慢性,进行性,对称性,多滑膜关节炎和关节外表现^[1]。主要以破坏关节为主,据调查,类风湿关节炎发病人群年龄范围广,男性和女性均有可能患上该病,女性的发病率更高,患者年龄大多在 30~50 之间^[2]。如果患者未能及时就医,病情会逐渐加重,产生如关节肿胀、疼痛加剧、行动能力受阻,甚至终生残疾^[3-5],需要重点持续关注。

1 资料和方法

1.1 数据来源

以“类风湿关节炎”和“动物模型”为主题^[6-13],在中国知网数据库和万方数据库高级检索界面进行搜索,时间范围是 2017 年 1 月-2020 年 6 月,共检索到期刊文献 565 篇。

1.2 文献筛选标准

①剔除标准:会议、硕博论文等不作为纳入的范畴;排除综述类和资料不全的文献。②纳入标准:研究类风湿关节炎的全部造模成功的动物实验文献,最终从 565 篇文章中找到有效文献 274 篇。

1.3 数据处理

实验动物名称、种类等均参照《实验动物和动

物实验技术》进行规范,统一处理具有不同名称的动物种类。将收集的实验动物种类、激发方式、致炎方法和剂量、检测指标等录入 Excel 2013 归纳处理,建立类风湿关节炎动物模型的数据库。

1.4 统计学方法

筛选出符合纳入标准的文献 274 篇,将收集的实验动物种类、激发方式、致炎方法和剂量、检测指标等输入 Excel 2013 表格中统计,使用 SPSS Statistics 19.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 统计学结果

2.1.1 实验动物种类

将录入的 274 篇实验文献中的全部实验动物种类进行分类排序^[14-24],统计得出共有 33 种实验动物模型选择。在这些实验动物中,使用频数 ≥ 15 的共有 6 种,累积出现 197 次,使频数最高的前 6 位分别是雄性 SD 大鼠(69 次,25.18%)、雄性 Wistar 大鼠(54 次,19.71%)、SD 大鼠,雌雄各半(26 次,9.49%)和雌性 Wistar 大鼠(23 次,8.39%)、SD 大鼠,雌雄皆可(22 次,8.03%)、雄性 DBA/1 J 小鼠(18 次,6.57%)。在 274 篇实验文献中,实验动物种类分布情况详情见表 1。

表 1 实验动物种类频数分布
Table 1 Frequency distribution of experimental animal species

动物种类 Animal species	频数/次 Frequency/Times	动物种类 Animal species	频数/次 Frequency/Times
雄性 SD 大鼠 Male SD rats	69	雄性 Lysm-GFP 小鼠 Male Lysm-GFP mice	2
雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	54	雄性小鼠, 未标明种类 Male mice, unspecified species	2
SD 大鼠, 雌雄各半 SD rats, half male and half female	26	大耳白兔, 雌雄各半 White rabbit with big ears, half male and half female	2
SD 大鼠 雌雄皆可 SD rats are both male and female	22	C57BL/6 小鼠和 KitW-sh/W-sh 小鼠 C57BL/6 mice and KitW-sh/W-sh mice	1
雌性 Wistar 大鼠 Female Wistar rats	23	C5BL/6 J 小鼠 C5BL/6 J mice	1
雄性 DBA/1 J 小鼠 Male DBA/1 J mice	18	ICOS 转基因小鼠 ICOS transgenic mice	1
雌性 SD 大鼠 Female SD rats	13	Wistar 大鼠, 雌雄各半 Wistar rats, half male and half female	1
新西兰大白兔 New Zealand White Rabbit	7	Wistar 大鼠, 雌雄各半 Wistar rats, half male and half female	1
Wistar 大鼠, 雌雄皆可 Wistar rats, male and female	5	雌性 DBA/1 J 小鼠 Female DBA/1 J mice	1
青紫蓝家兔, 雌雄各半 Blue and purple rabbits, half male and half female	5	雌性恒河猴 Female rhesus monkey	1
日本大耳白兔 Japan white rabbit	5	雌性健康大鼠 Female healthy rats	1
雌性 Lewis 大鼠 Female Lewis rats	3	大鼠, 雌雄不限 Rats are of either sex	1
雄性 C57BL/6 小鼠 Male C57BL/6 mice	3	雄性 Lewis 大鼠 Male Lewis rat	1
D1R/- 和 D2R/- 小鼠 D1R/- and D2R/- mice	2	雄性 Wistar 小鼠 Male Wistar mice	1
成年雄性猕猴 Adult male macaque	2	壹级 SD 大白鼠 Class I SD rat	1

2.1.2 造模激发方式

将 274 篇实验文献所涉及的造模激发方式进行分类规范。统计得出, 274 篇实验文章涵盖了 31 种激发方式。其中, 使用最多激发方式为尾根部皮下注射 (71 次, 25.91%)。造模激发方式分类及使用频次见表 2。

2.1.3 致敏方法

将 274 篇实验文献所涉及的致敏方法进行规范。统计得出, 274 篇实验文章涵盖了 10 种致敏方法。其中, 使用较多的致敏方式为 CIA 法 (172 次, 62.77%) 和 AA 法 (82 次, 29.93%)。致敏方法分类、使用造模药物及使用频数见表 3。

2.1.4 检测指标

将录入的 274 篇实验文献中的全部检测指标进行分类排序。274 篇实验文献涵盖 69 种不同的指标类型, 累积频数 761 次。其中检测较多的指标为

足跖肿胀度 (133 次, 17.48%)、关节炎评分指数 (84 次, 11.04%)、血清中 TNF- α 水平 (74 次, 9.72%)、关节滑膜组织病理切片 (66 次, 8.67%)、测定血清 IL-1 β 水平 (46 次, 6.04%) 等。检测指标分类及使用频数见表 4。

2.1.5 高频检测指标因子分析

筛选使用频数 ≥ 9 的高频检测指标, 经统计检验, KMO 检验值为 0.533 > 0.5, Bartlett 球形度检验的 χ^2 值为 547.88, 自由度为 210, $P < 0.001$, 提示数据具有较好的线性关系, 可进行因子分析。选取最大方差法旋转, 提取得到 10 个公因子, 累积方差贡献率 65.31%。其中血清 TNF- α 水平、血清 IL-1 β 水平、血清 IL-6 水平的因子贡献率最高, 表明在类风湿关节炎研究中血清 TNF- α 水平、血清 IL-1 β 水平、血清 IL-6 水平相关性最高, 常常一同检测, 详情见表 5。

表 2 造模激发方式分类及使用频数统计

Table 1 Classification and frequency statistics of modeling excitation methods

激发方式 Excitation mode	频数/次 Frequency/Times	激发方式 Excitation mode	频数/次 Frequency/Times
尾根部皮下注射 Subcutaneous injection of caudal root	71	尾根部、后肢踝关节皮内注射。腹腔注射 Intradermal injection of tail root and hind limb ankle joint. Intraperitoneal injection	1
右后足跖皮内注射 Intraplantar injection of right posterior foot	52	尾静脉注射,加腹腔注射 Tail vein injection plus intraperitoneal injection	1
左后足趾皮内注射 Intradermal injection of left posterior toe	33	颈、背部 5 个不同部位进行皮内注射 Intradermal injection was performed at 5 different parts of neck and back	1
尾根部、背部及足跖部皮下注射 Subcutaneous injection of tail root, back and foot plantar	28	两侧股骨头对应的外部皮肤,尾根部皮内注射 External skin corresponding to femoral heads on both sides, tail root intradermal injection	1
背部及尾根部多点皮下注射 Multiple subcutaneous injections at back and tail root	20	皮肤、脚掌、尾部,分点皮内注射 Skin, sole and tail, divided into intradermal injections	1
在背部皮下注射 Subcutaneous injection in back	15	腹腔注射 Intraperitoneal injection	1
背部及左或右足跖多点皮下注射 Multi-point subcutaneous injection of dorsal and left or right metatarsal	8	兔肩胛间区分 5 个部位皮下注射 Subcutaneous injection of rabbit interscapular region in 5 parts	1
双侧膝关节腔内注射 Bilateral intracavitary injection of knee joint	7	背部肩胛骨之间对称选择 3 对 Choose 3 pairs symmetrically between back scapula	1
左右后足跖皮下注射 Subcutaneous injection of left and right hind feet	7	右侧膝关节腔、足跖皮内、背部及尾部 Right knee joint cavity, foot plantar intradermal, back and tail	1
足趾部皮下注射 Subcutaneous injection of toe	6	左侧后足趾掌心处皮内注射 Intradermal injection at palm of left posterior toe	1
尾根部、左或右后肢足趾多点皮内注射 Multi-point intradermal injection of toe of tail root, left or right hind limb	3	背部和双膝关节腔选择 6 点皮下注射 Subcutaneous injection at 6 o'clock was selected for back and double knee joint cavities	1
灌胃 Stomach irrigation	3	尾根部及臀部两侧皮下注射 Subcutaneous injection at tail root and hip	1
左足踝关节皮下注射 Subcutaneous injection of left foot ankle joint	2	颈、背、尾部多点皮内注射 Multiple intradermal injections of neck, back and tail	1
皮肤、脚掌、尾部,5 点皮内注射 Skin, sole, tail, 5-point intradermal injection	2	左后肢踝关节骨缝处注射 Injection at ankle joint of left hindlimb	1
腹腔注射加静脉注射 Intraperitoneal injection plus intravenous injection	1	套管针内注射 Intratrocac injection	1
腹腔注射加皮下注射 Intraperitoneal injection plus subcutaneous injection	1		

3 讨论

RA 发病因素很多,与遗传、免疫细胞的突变等具有一定的关系。发病机制目前还尚未完全阐明^[25],中医认为 RA 的发病机制是机体在正气不足

的条件下,风、寒、湿等外感六淫所致,即“合而为痹”^[26]。现代医学研究认为,人体的免疫功能变强,免疫细胞、细胞因子网络调节失衡是 RA 的发病机制^[27]。因此在临床治疗类风湿关节炎或建立类风湿关节炎动物模型时要从这些方面入手。建立类

表 3 致敏方法分类及使用频数统计

Table 3 Classification and frequency statistics of sensitization methods

模型类型 Types of models	造模药物 Modelling drug	频数/次 Frequency/Times
胶原诱导性关节炎 CIA	牛 II 型胶原蛋白与弗氏不完全或完全佐剂 1:1 混匀成乳剂 Bovine type II collagen is mixed with Freund's incomplete or complete adjuvant 1:1 to form emulsion	172
佐剂性关节炎 AA	完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂 Complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant	82
卵蛋白诱导联合低温冷冻法 Egg protein induction combined with low temperature freezing	卵蛋白与完全弗氏佐剂 Egg protein and complete Freund's adjuvant	9
口服牛 II 型胶原蛋白诱发类风湿性关节炎模型 Rheumatoid arthritis model induced by oral administration of bovine type ii collagen	阿司匹林和 CCl ₄ +LPS+牛 II 型胶原蛋白和脂多糖 Aspirin and CCl ₄ +LPS+ Bovine Type II Collagen and Lipopolysaccharide	3
K/B×N 血清构建的转移性关节炎小鼠模型 A mouse model of metastatic arthritis constructed by K/B×N serum	K/B×N 小鼠血清 K/B×N mouse serum	2
佐剂诱导性关节炎 AIA	完全弗氏佐剂和卡介苗冰浴下混和成乳剂 Complete Freund's adjuvant and BCG are mixed into emulsion in ice bath	2
博来霉素诱导的类风湿性关节炎 Rheumatoid arthritis induced by bleomycin	博来霉素 Bleomycin	1
胶原抗体诱导关节炎 CAIA	抗 II 型胶原的 5 种单克隆抗体复合物和脂多糖 Five Monoclonal antibody complexes and lipopolysaccharide against type II collagen	1
热杀死结核分枝杆菌诱导的类风湿性关节炎 Rheumatoid arthritis induced by heat killing mycobacterium tuberculosis	热杀死结核分枝杆菌 Heat kills mycobacterium tuberculosis	1
合成环瓜氨酸蛋白短肽诱导 Induction of short peptide of synthetic cyclic citrullinated protein	CCit-Vim+KLH 溶液与等体积的完全弗氏佐剂或不完全弗氏佐剂混匀乳化 CCit-Vim+KLH solution is uniformly mixed with equal volume of complete Freund's adjuvant or incomplete Freund's adjuvant for emulsification	1

表 4 检测指标分类及使用频数

Table 4 Classification and frequency of detection indexes

检测指标 Detection Indicator	频数/次 Frequency/Times	检测指标 Detection Indicator	频数/次 Frequency/Times
足跖肿胀度 Swelling degree of foot sole	133	检测外周血 Detection of peripheral blood	3
关节炎评分指数 Arthritis score index	84	TGF- β mRNA 的表达水平 Expression level of TGF- β mRNA	3
血清中 TNF- α 水平 TNF- α level in serum	74	滑膜组织 mPD-L1 的表达 Expression of mPD-L1 in Synovial Tissue	3
关节组织病理 Histopathology of joints	66	i NOS 蛋白 i NOS protein	3
血清 IL-1 β Serum IL-1 β	46	血浆 IL-1 β Plasma IL-1 β	3
测定血清 IL-6 水平 Serum IL-6 level was measured	42	血浆白细胞介素-6 水平 Plasma IL-6 level	3
血清中 IL-17 水平 IL-17 level in serum	25	血浆肿瘤坏死因子- α 水平 Plasma TNF- α level	3
体重 Body mass	23	丙二醛水平 MDA	2
血清中 IL-10 水平 IL-10 level in serum	19	超氧化物歧化酶水平 SOD	2

检测指标 Detection Indicator	频数/次 Frequency/Times	检测指标 Detection Indicator	频数/次 Frequency/Times
一般形态观察 General morphological observation	16	滑膜组织情况、检测白细胞介素-23 水平 Synovial tissue, detection, IL-23 level	2
影像学检查 Imaging examination	15	血浆 IFN- γ 水平 Plasma IFN- γ level	2
痛阈值 Pain threshold	15	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px	1
炎症因子水平测定 Determination of inflammatory factor level	13	血浆白细胞介素-8 Plasma IL-8	1
脏器病理观察 Pathological observation of viscera	13	IL-10 mRNA 的表达水平 Expression level of IL-10 mRNA	1
血清中 IFN- γ 水平 IFN- γ level in serum	10	白介素-21 核糖核酸表达表达 Expression level of IL-21mRNA	1
脾系数 Splenic coefficient	10	滑膜组织情况、检测 IL-1 水平 Synovial tissue and IL-1 level were detected	1
血清 CRP Serum CRP	9	滑膜组织 hs CRP 水平 Detection of hs CRP level in synovial tissue	1
血清 RF Serum RF	9	滑膜组织 IL-1 β 水平 IL-1 β level in synovial tissue	1
踝关节 VEGF 的表达 Expression of VEGF in ankle joint	7	关节滑膜组织 TLR4 mRNA 检测 Detection of TLR4mRNA in synovial tissue of joint	1
MMP-3 mRNA 相对表达量 MMP-3 mRNA relative expression	7	关节软骨 Smad5 mRNA 表达 Expression of Smad5 mRNA in articular cartilage	1
滑膜组织中 IL-4 表达 Expression of IL-4 in synovial tissue	6	Q-marker 的预测 Q-marker prediction	1
MMP-9 mRNA 相对表达量 MMP-9 mRNA relative expression	6	滑膜液中 OPN 的含量 OPN content in synovial fluid	1
踝关节组织 TNF- α 表达水平 TNF- α Expression level in ankle joint tissue	6	滑膜液中 IL-17 的含量 Content of IL-17 in synovial fluid	1
血清中 TGF- β 水平 TGF- β level in serum	6	滑膜组织中 FOS 蛋白表达水平 FOS protein expression level in synovial tissue	1
血清 HIF-1 α 的含量检测 Detection of HIF-1 α in serum	5	血浆 IL-2、IL-4、IL-17 表达 Expression of plasma IL-2, IL-4 and IL-17	1
血清 PGE2 含量 Serum PGE2 content	5	血浆 CRP 水平 Plasma CRP level	1
血浆 IL-18 水平 Plasma IL-18 level	5	血清 IL-23 水平 Serum IL-23 level	1
血清中 VEGF 水平 VEGF level in serum	5	基质金属蛋白酶-1 MMP-1 mRNA	1
测定血清 IL-2 水平 Serum IL-2 level was measured	5	基质金属蛋白酶-13 RNA MMP-13 mRNA	1
踝关节 NF- κ B 表达 NF- κ B expression in ankle joint	4	ESR 血沉 ESR erythrocyte sedimentation rate	1
踝关节组织 IL-10 表达水平 Expression of IL-10 in ankle joint tissue	4	转录因子 T-bet Transcription factor T-bet T-bet	1
踝关节组织 IL-17 表达水平 Expression of IL-17 in ankle joint tissue	4	血清 IL-13 Serum IL-13	1
踝关节组织 TGF- β 表达水平 Expression of TGF- β in ankle joint tissue	4	血清中 IL-12 IL-12 in serum	1
踝关节组织 IFN- γ 表达水平 Expression of IFN- γ in ankle joint tissue	4	血清中 IL-18 IL-18 in serum	1
滑膜液中 IL-10 的含量 Content of IL-10 in synovial fluid	4		

表 5 高频检测指标因子分析(频数 ≥ 9)
Table 5 Factor analysis of high frequency detection index (Frequency ≥ 9)

公因子 Common factor	因子贡献率(%) Factor contribution rate	因子分析检测指标组合 Factor analysis detection index combination
F1	10.74	血清 TNF- α 水平、血清 IL-1 β 水平、血清 IL-6 水平 Serum TNF- α level, serum IL-1 β level, serum IL-6 level
F2	9.09	血清 RF、血清 CRP、足跖肿胀度、一般形态观察 Observation on serum RF, serum CRP, foot-sole swelling degree and general morpholog
F3	6.96	脾系数、炎症因子水平测定 Determination of spleen coefficient and inflammatory factors
F4	6.51	关节滑膜炎评分指数 Joint synovitis scoring index
F5	6.30	影像学检查、痛阈 Imaging examination, pain threshold
F6	5.85	关节组织病理、体重 Joint histopathology, body mass
F7	5.66	血清 IL-10 水平、血清 IL-17 水平 Serum IL-10 and IL-17 levels
F8	5.22	脏器病理观察 Pathological observation of viscera
F9	5.09	血清 VEGF 水平 Serum VEGF level
F10	5.02	血清 IFN- γ 水平 Serum IFN- γ level

风湿关节炎动物模型,是利用所选品系的物种更好地模仿类风湿关节炎的过程与特征。类风湿关节炎动物模型的造模方法可供选择的有很多,在建立动物模型时要综合考虑到方法、种类、用途及实际条件等。目前常用于建立 RA 模型的动物有大鼠、小鼠、兔子、猴等。通过对类风湿关节炎造模实验文献中的数据进行挖掘整理可知,建立类风湿关节炎动物模型选择多使用雄性 SD 大鼠、雄性 Wistar 大鼠、SD 大鼠,雌雄各半、雌性 Wistar 大鼠。造模方法使用较多的分别为 CIA 法和 AA 法,AA 类风湿关节炎模型和 CIA 类风湿关节炎模型因为造模周期短、费用消耗少、以及指标监测较为简单而脱颖而出成为最常用的两个复制 RA 的模型,但是 AA 模型病变有自限性,有与人类不符的缺点。CIA 模型无 RF 因子,而且没有复发情况和病情波动,与临床上类风湿关节炎的诊断标准仍存在一定差异。K/B $\times$ N 血清诱导的关节炎模型可以在多种品系的小鼠中导致可再生关节炎,是一种可再生 RA 模型,与人 RA 特征非常相似,是研究 RA 的理想小鼠模型。但是其具有造价高以及违背伦理的缺点,所以应用较少。在未来进行类风湿关节炎研究时可根据实验条件、所侧重的研究因素,建立类风湿关节炎模型^[28]。在动物性别选择上,大多实验文章选择雄性动物,造模方法采用尾根部皮内注射 0.1 mL 的

方式,用牛 II 型胶原蛋白与弗氏不完全或完全佐剂 1:1 混匀成乳剂致敏,同时在 7 d 或 21 d 后以同样方式加强免疫可以提高模型的成功率,指标选取建议表观指标选择足跖肿胀度和关节炎评分指数,造模成功表观指标为动物毛发逐渐失去光泽,前肢、后肢陆续出现红肿现象,功能障碍,活动减少,体重下降等。在进行实验期间,需要每隔一周对其关节炎指数以及体重进行评价^[29]。病理指标选择关节滑膜组织病理切片观察、生化指标选择检测血清中和滑膜液 TNF- α 水平、测定血清 IL-6 水平和血清 IL-1 β 表达水平,测试是否模型组比空白组在疾病活动期表达增加。与给药组进行比对,测试受试药物是否对治疗类风湿关节炎起效。其中 IL-6 是导致关节滑膜炎的重要因子,主要功能是促进 B 淋巴细胞的增殖并使其产生免疫球蛋白,刺激滑膜组织产生类风湿因子。TNF- α 在炎症反应和免疫反应中发挥着重要作用,是维持体内免疫平衡的重要介质,低浓度时对机体起防御保护作用,但高浓度却会导致炎症发生和组织损伤。IL-1 β 在类风湿关节炎软骨破坏中以及在传递信息和调节免疫细胞激活、增殖和炎症反应中发挥着重要作用^[30-31]。

通过对近三年的实验 RA 模型数据整理挖掘,可总结到以上信息,期望能为提高造模成功率及为评价受试药物有效性提供方法学参考。但是目前

类风湿关节炎发病机制还未完全研究清楚,选用的模型动物与人存在种属差异,而且大部分只能从一个方面或一些方面复刻人类 RA,所以寻找一个接近人的种属,方便经济的动物模型是我们今后进行 RA 研究的共同目标。

参考文献:

- [1] 肖勇洪,张霞,彭江云,等.扶阳法治疗类风湿关节炎研究进展[J].时珍国医国药,2019,30(10):2468-2470.
- [2] 丁子桐,熊海霞,高琴琴,等.胶原诱导性关节炎病/证模型大鼠血清细胞因子表达谱的初步研究[J].中国比较医学杂志,2019,29(4):28-33.
- [3] 展俊平,谷慧敏,孟庆良,等.虎潜丸加减治疗类风湿关节炎肝肾阴虚证的临床观察[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):107-113.
- [4] 范天田,舒晓芳,姚博,等.基于数据挖掘的马文辉治疗类风湿关节炎用药规律研究[J].中华中医药杂志,2018,33(3):1067-1069.
- [5] 李潭,王怡杨,丛珊,等.雪莲注射液对胶原诱导性关节炎大鼠 Th1/Th2 平衡及 Th17 细胞的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(12):5661-5664.
- [6] 付旭阳,高丽,吕宏,等.基于数据挖掘分析蒙药忠伦-5 治疗类风湿关节炎的作用机制[J].中国药理学通报,2020,36(1):127-134.
- [7] 陈德塔,李玉梅,陈林,等.附子复方在类风湿关节炎动物模型中的研究进展[J].辽宁中医杂志,2019,46(12):2675-2678.
- [8] 刘杨,姜珊珊,陈向云,等.黑骨藤追风活络胶囊对类风湿关节炎大鼠 PI3K/AKT/HIF-1 α 通路的作用[J].中国免疫学杂志,2019,35(18):2206-2212.
- [9] 刘琴,陈芳,朱以良,等.一种新的佐剂性关节炎兔成纤维样滑膜细胞分离培养法[J].第二军医大学学报,2019,40(7):793-797.
- [10] 马艳,符标芳,闫国跃,等.民族医药干预类风湿性关节炎动物模型实验的研究进展[J].大众科技,2019,21(7):61-64.
- [11] 冯露露,施旻,刘剑英,等.猴耳环正丁醇部位抗类风湿性关节炎的作用及机制研究[J].中药新药与临床药理,2019,30(7):779-784.
- [12] 卜祥伟,张红红,张建萍,等.基于数据挖掘探讨孟凤仙教授治疗类风湿关节炎用药规律[J].中华中医药学刊,2018,36(7):1573-1576.
- [13] 范天田,舒晓芳,姚博,等.基于数据挖掘的马文辉治疗类风湿关节炎用药规律研究[J].中华中医药杂志,2018,33(3):1067-1069.
- [14] 施佳君,陈方明,马全鑫,等.胶原诱导 Wistar 和 Lewis 大鼠类风湿关节炎模型病理特点的比较[J].中国比较医学杂志,2018,28(4):19-26,37.
- [15] 明建松,王晓雪,杨梦晨,等.miR-145-5p 对胶原诱导的关节炎小鼠关节炎症的影响[J].天津医科大学学报,2019,25(2):115-118.
- [16] 杜成成,谭余庆,沈建英,等.双氢青蒿素对两种类风湿关节炎模型的影响及机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(10):48-56.
- [17] 谷雨龙,朱丹,柏冬,等.黄芪赤风汤对大鼠胶原诱导性关节炎的治疗作用[J].山东医药,2018,58(44):14-17.
- [18] 苏杉,王蓉,刘飞,等.秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎模型大鼠关节保护作用及其机制[J].中国临床药理学杂志,2018,34(21):2542-2545.
- [19] 陈曾凤,罗涛,陈汉玉,等.栀子苷对大鼠类风湿性关节炎的治疗作用和机制研究[J].临床和实验医学杂志,2018,17(20):2158-2161.
- [20] 曾家顺,董晓,刘俊,等.虎杖苷对类风湿关节炎大鼠的治疗机制探究[J].天然产物研究与开发,2018,30(10):1681-1686.
- [21] 范凯健,吴菁,李允武,等.诱导型与转基因型类风湿性关节炎模型的研究进展[J].实用药物与临床,2018,21(6):709-713.
- [22] 廖婉婷,潘文疆,蔡聪艺,等.七叶莲对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用[J].海峡药学,2018,30(6):25-27.
- [23] 罗尚文,王燕燕,张学农,等.复方鹿角霜浸膏对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用[J].中成药,2018,40(6):1253-1258.
- [24] 薛崇祥,韩蕊,何世勇,等.从中西医结合角度建立类风湿性关节炎的细胞和动物模型[J].中国中医药现代远程教育,2018,16(9):152-155.
- [25] 陈程,黄光辉,黄豆豆,等.类风湿关节炎啮齿类实验动物模型的研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(3):428-434.
- [26] 刘元刚,刘树滔,饶平凡.类风湿性关节炎啮齿动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2007,15(6):470-473.
- [27] 赵静,刘伟伟,李雪萍,等.青藤碱对佐剂诱导性关节炎模型大鼠炎症相关因子表达的影响[J].重庆医学,2018,47(7):879-882.
- [28] 孙佳蕾,武平,陈白露,等.类风湿关节炎动物模型在中医研究中的应用[J].现代中西医结合杂志,2015,24(4):444-447.
- [29] 郭晴晴,郑康,赵雨坤,等.胶原诱导类风湿性关节炎小鼠的重要脏器病理变化[J].世界科学技术-中医药现代化,2018,20(1):123-127.
- [30] Buhrmann C, Popper B, Aggarwal BB, et al. Resveratrol downregulates inflammatory pathway activated by lymphotoxin α (TNF- β) in articular chondrocytes: Comparison with TNF- α [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0186993.
- [31] Khalafalla MG, Woods LT, Camden JM, et al. P2X7 receptor antagonism prevents IL-1 β release from salivary epithelial cells and reduces inflammation in a mouse model of autoimmune exocrinopathy [J]. J Biol Chem, 2017, 292(40):16626-16637.

[收稿日期]2020-06-05

熊琳,朱婷婷,张丽玲,等. 慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 87-94.

Xiong L, Zhu TT, Zhang LL, et al. Correlation between vascular calcification and bone metabolism markers in rats with chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 87-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.013

慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究

熊琳^{1,2}, 朱婷婷^{1,2}, 张丽玲^{1,2}, 陈跃³, 杨建波³, 欧三桃^{1,2*}

(1.西南医科大学附属医院肾病内科,四川 泸州 646000; 2.四川省肾脏疾病临床医学研究中心,四川 泸州 646000; 3.西南医科大学附属医院核医学科,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 研究慢性肾病(CKD)大鼠血管钙化与血清骨代谢标志物的相关性。**方法** 将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组(18 只)和 CKD 血管钙化组(18 只)。钙化组予以腺嘌呤联合高磷饲料,对照组予以生理盐水和普通饲料。实验第 2、4、6 周末处死大鼠,留取主动脉行 Von Kossa 染色和钙含量检测钙化程度,留取血、尿检测尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)和骨代谢标志物:钙(Ca)、磷(P)、1,25-二羟基维生素 D₃(1,25(OH)₂D₃)、甲状旁腺素(PTH)、骨源性碱性磷酸酶(BALP)、骨钙素(OC)、总 I 型前胶原氨基末端肽(tPINP)、β-I 型胶原交联羧基末端肽(β-CTX)、抗酒石酸性磷酸酶-5b(TRACP-5b)及 24 h 尿蛋白定量(24 h-Upro)。**结果** 对照组各时间点主动脉 Von Kossa 染色均未见黑色物质沉积,CKD 血管钙化组随时间进展黑色物质沉积逐渐增多。与对照组相比,CKD 血管钙化组 BUN、Scr、24 h-Upro、主动脉钙含量升高($P<0.05$);Ca、1,25(OH)₂D₃、PTH、tPINP、β-CTX、TRACP-5b 降低($P<0.05$),P、Ca*P 升高($P<0.05$),BALP、OC 升高($P>0.05$);经二元 logistic 回归发现血清 Ca*P 升高、PTH 和 TRACP-5b 降低是血管钙化的独立危险因素。根据主动脉钙化程度,将 CKD 血管钙化组进一步分为轻中度钙化(2 W 和 4 W)和重度钙化(6 W)两个亚组。与轻中度钙化组相比,重度钙化组 BUN、Scr、主动脉钙含量升高($P<0.05$),24 h-Upro 升高($P>0.05$);Ca、P、1,25(OH)₂D₃、tPINP、TRACP-5b 升高($P>0.05$),Ca*P、PTH、BALP、β-CTX 升高($P<0.05$),OC 降低($P<0.05$);进行血管钙化严重程度的危险因素分析发现血清 Ca*P 升高和 OC 降低是血管钙化严重程度的独立危险因素。相关性分析显示血清 Ca*P、PTH、BALP、β-CTX 水平与血管钙化程度呈正相关,OC 与血管钙化程度呈负相关。**结论** CKD 大鼠血管钙化与骨代谢密切相关,检测血清骨代谢标志物有助于评估血管钙化的发生和判断血管钙化的严重程度及进展。

【关键词】 慢性肾病;血管钙化;骨代谢标志物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0087-08

Correlation between vascular calcification and bone metabolism markers in rats with chronic kidney disease

XIONG Lin^{1,2}, ZHU Tingting^{1,2}, ZHANG Liling^{1,2}, CHEN Yue³, YANG Jianbo³, OU Santao^{1,2*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. SiChuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000.

3. Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

[作者简介]熊琳(1994—),女,硕士研究生,研究方向:慢性肾病血管钙化。E-mail: 582591080@qq.com

[通信作者]欧三桃(1976—),女,主任医师,医学博士,研究方向:慢性肾病血管病变。E-mail: ousantao@163.com

【Abstract】 Objective To study the correlation between vascular calcification and serum bone metabolism markers in rats with chronic kidney disease. **Methods** Thirty six male SD rats were randomly divided into a control group (18 rats) and CKD vascular calcification group (18 rats). The calcification group was administered adenine combined with high phosphorus feed and the control group was administered normal saline and common feed. The rats were sacrificed after 2, 4, and 6 weeks and the aorta was collected for Von Kossa staining and calcium content analysis to detect the degree of calcification. Blood and urine were collected to detect urea nitrogen (BUN), blood creatinine (Scr), and bone metabolism markers calcium (Ca), phosphorus (P), 1,25-dihydroxy vitamin D3 [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$], parathyroid hormone (PTH), bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), total type I procollagen amino terminal peptide (tPINP), β -carboxy-terminal peptide of type I collagen (β -CTX), tartrate-resistant acid phosphatase-5b (TRACP-5b), and 24-hour urinary protein (24 h-Upro). **Results** Aortic Von Kossa staining showed no black matter deposition at each time point in the control group, whereas black matter deposition in the CKD vascular calcification group was increased gradually over time. Compared with the control group, the contents of BUN, Scr, 24 h-upro, and aortic calcium were increased in the CKD vascular calcification group ($P<0.05$). Ca, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PTH, tPINP, β -CTX, and TRACP-5b were decreased ($P<0.05$), P and Ca * P were increased ($P<0.05$), and BALP and OC were also increased ($P>0.05$). Binary logistic regression showed that increased serum Ca * P and decreased PTH and TRACP-5b were independent risk factors for vascular calcification. In accordance with the degree of aortic calcification, the CKD vascular calcification group was further divided into two subgroups: mild-moderate calcification (2 and 4 weeks) and severe calcification (6 weeks). Compared with the mild-moderate calcification group, the contents of BUN, Scr and, aorta calcium were increased in the severe calcification group, ($P<0.05$), while 24 h-upro was increased ($P>0.05$). Ca, P, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, tPINP, and TRACP-5b were also increased ($P>0.05$), while Ca * P, PTH, BALP, and β -CTX were increased ($P<0.05$), and OC was decreased ($P<0.05$). Analysis of risk factors for the severity of vascular calcification revealed that increased serum Ca * P and decreased OC were independent risk factors for the severity of vascular calcification. Correlation analysis showed that serum Ca * P, PTH, BALP, and β -CTX levels were positively correlated with vascular calcification, and OC was negatively correlated with vascular calcification. **Conclusions** Vascular calcification in CKD rats is closely related to bone metabolism. Detection of serum markers of bone metabolism is helpful to assess the occurrence of vascular calcification and judge the severity and progression of vascular calcification.

【Keywords】 chronic kidney disease; vascular calcification; bone metabolism markers

慢性肾病矿物质骨异常 (chronic kidney disease-mineral and bone disorder, CKD-MBD) 是 CKD 患者的常见并发症, 与其心血管事件及死亡率密切相关^[1]。肾性骨病特指 CKD-MBD 的骨异常, 骨活检是其诊断的金标准^[2], 但由于操作有创、费用昂贵、技术难度高、可重复性差等, 临床上骨活检的实施受到很大限制, 而检测骨代谢标志物成为临床实践中诊断肾性骨病的重要手段。血管钙化 (vascular calcification, VC) 作为 CKD-MBD 的另一重要组成部分, 也是导致 CKD 患者发生心血管事件及死亡率增加的重要危险因素^[3-4]。近年来, “骨-血管轴” 理论的提出表明肾性骨病和 VC 之间可能有着密切的联系^[5]。目前关于二者的关系的研究较少, 因此本研究旨在探讨 CKD 大鼠血管钙化及其严重程度与血清骨代谢标志物变化之间的关系, 为临床上制定和改善 CKD-MBD 的诊疗方案提供理论依据, 进而有效降低 CKD 患者心血管疾病的发生率及死亡率。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 体重 180~260 g, 6~8 周龄, 购自西南医科大学实验动物中心 [SCXK (川) 2018-17], 在西南医科大学城北校区动物房饲养 [SYXK (川) 2018-065], 相对湿度 60%~70%, 室温 24℃~26℃, 12 h 交替照明, 每笼 3 只, 遵循“3R”原则给予人道的关怀。经由西南医科大学实验动物伦理委员会审批通过 (201904158)。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤 (Sigma 公司, 美国); 1.8% 高磷饲料 (北京科澳协力饲料有限公司, 中国); Von Kossa 染色试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, 中国); 钙含量测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国); 大鼠 1,25-二羟基维生素 D3 ($1,25\text{-dihydroxy vitamin D}_3, 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ELISA 试剂盒、大鼠甲状旁腺素 (parathyroid hormone, PTH) ELISA 试剂盒、

大鼠骨源性碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP) ELISA 试剂盒、大鼠骨钙素 (osteocalcin, OC) ELISA 试剂盒、大鼠总 I 型前胶原氨基末端肽 (type I procollagen amino-terminal peptide, tPINP) ELISA 试剂盒、大鼠 β -I 型胶原交联羧基末端肽 (β -carboxy-terminal peptide of type I collagen, β -CTX) ELISA 试剂盒、大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (tartrate-resistant acid phosphatase 5b, TRACP-5b) ELISA 试剂盒 (上海泛柯实业有限公司, 中国); 全自动生化分析仪 (西门子, 德国); 标准酶标仪 (Bio-rad 公司, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组和模型制备

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 适应性喂养 2 周后, 随机分为正常对照组 ($n=18$ 只) 和 CKD 血管钙化组 ($n=18$ 只)。CKD 血管钙化组给予 1.8% 高磷饲料喂养, 第 1~4 周每日给予 2.5% 腺嘌呤混悬液 250 mg/kg 灌胃 1 次, 第 5~6 周隔日灌胃 1 次。正常对照组给予普通饲料喂养, 生理盐水 10 mL/kg 灌胃。所有大鼠自由进食及饮水。

1.3.2 组织取材和指标检测

实验第 2、4、6 周末, 分别于两组中随机选取大鼠 6 只, 收集 24 h 尿液测定 24 h 尿蛋白定量 (24 hour urine protein, 24 h-Upro)。腹主动脉采血测定尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐 (serum creatinine, Scr) 及血钙 (calcium, Ca)、血磷 (phosphorus, P)、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、BALP、OC、tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 含量。留取腹主动脉行 Von Kossa 染色及钙含量测定。

(1) 血、尿相关指标检测

全自动生化分析仪测定血 BUN、Scr、24 h-Upro 及 Ca、P。酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定血清 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、BALP、OC、tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 含量。所有试剂盒均购自上海泛柯实业有限公司, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

(2) 全段主动脉 Von Kossa 染色

主动脉置于细胞培养板中, GENMED 清理液清洗主动脉, 吸去清理液; 加入 GENMED 固定液, 室温下孵育 1 h, 吸去固定液; 再次用 GENMED 清理液清洗主动脉 2 次; 加入 GENMED 染色液, 60 W 灯下直射室温孵育 1 h, 吸去染色液; GENMED 清理液清洗主动脉; 加入 GENMED 平衡液, 室温下孵育 5 min, 吸去平衡液; GENMED 清理液清洗主动脉; 观察染色情况。

(3) 主动脉钙含量测定

取各组主动脉进行匀浆, 留取上清液备用, 按照试剂盒说明书进行相关操作步骤。主动脉钙含量 (mmol/gprot) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) $\times$ 标准品浓度 (1 mmol/L) $\div$ 待测样本蛋白浓度 (mmol/gprot)。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法; 非正态分布的计量资料用中位数 (四分位数间距) 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。点二列相关分析血清骨代谢标志物和钙化程度的相关性。二元 logistic 回归分析血管钙化及钙化程度的独立危险因素, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组和 CKD 血管钙化组肾功能和主动脉钙含量的比较

与对照组比较, 钙化组各时间点 BUN、Scr、24 h-Upro 及主动脉钙含量均明显升高 ($P < 0.05$); 钙化组中, 6 周组大鼠主动脉钙含量较 2 周、4 周组明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 全段主动脉 Von Kossa 染色和肾形态

对照组各时间点全段主动脉 Von Kossa 染色未见黑色物质沉积; 钙化组各时间点全段主动脉 Von Kossa 染色均可见黑色物质沉积, 随时间进展黑色物质沉积逐渐增多。对照组各时间点肾大小正常, 颜色暗红。CKD 血管钙化组各时间点肾体积增大, 颜色灰白, 呈“大白肾”样改变。见图 1。

2.3 两组大鼠骨代谢标志物

与对照组相比, 血管钙化组 Ca、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH 明显降低 ($P < 0.05$); P、Ca $\times$ P 明显升高 ($P < 0.05$); BALP、OC 升高但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 血管钙化的危险因素分析

将 VC 单因素分析显示骨代谢标志物差异有统计学意义的指标纳入二元 logistic 回归模型, 以是否发生 VC 为因变量, 以 Ca、P、Ca $\times$ P、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 为自变量, 结果显示 Ca $\times$ P 升高、PTH 和 TRACP-5b 降低是 VC 的独立危险因素。见表 3。

表 1 两组大鼠肾功能、尿蛋白和主动脉钙含量比较($n=6$)

Table 1 Comparison of renal function, urinary protein and aortic calcium content between two groups of rats

分组 Groups	2 周 2 Weeks		4 周 4 Weeks		6 周 6 Weeks	
	对照组 Control group	钙化组 Calcification group	对照组 Control group	钙化组 Calcification group	对照组 Control group	钙化组 Calcification group
尿素氮 (mmol/L) Blood urea nitrogen	5.19±0.42	24.89±4.84 *	5.88±0.95	31.89±4.91 * [△]	5.66±0.77	39.01±5.91 * ^{△□}
血肌酐 (μmol/L) Serum creatinine	31.73±2.51	97.12±21.31 *	34.07±1.73	129.32±7.72 * [△]	32.90±2.41	178.18±31.97 * ^{△□}
24 h 尿蛋白定量 (g/24 h) 24 hour urine protein	0.006±0.004	0.022±0.013 *	0.008±0.002	0.024±0.005 *	0.007±0.002	0.025±0.005 *
主动脉钙含量 (mmol/gprot) Aortic calcium content	0.021±0.096	0.231±0.039 *	0.029±0.011	0.252±0.133 *	0.0305±0.0122	0.478±0.197 * ^{△□}

注:与对照组相比,对照组 * $P<0.05$;与 2 周钙化组相比,[△] $P<0.05$;与 4 周钙化组相比,[□] $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with 2 weeks calcification group, [△] $P<0.05$. Compared with 4 weeks calcification group, [□] $P<0.05$.

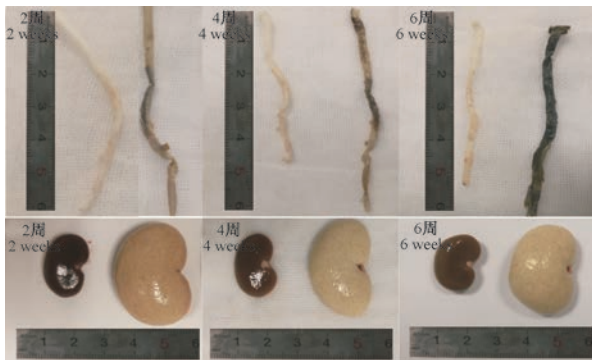


图 1 各时间点全段主动脉 Von Kossa 染色和肾形态

Figure 1 Von Kossa staining of the entire aorta and kidney morphology at each time point

2.5 不同程度血管钙化组相关指标的比较

根据主动脉 Von Kossa 染色及钙含量的检测结果,将其进一步分为轻中度钙化组(即 2 周和 4 周 CKD 钙化组)和重度钙化组(即 6 周钙化组)。与轻中度钙化组相比,重度钙化组 BUN、Scr 及主动脉钙含量明显升高($P<0.05$),24 h-Upro 升高但差异无统计学意义($P>0.05$)。骨代谢标志物:与轻中度钙化组相比,重度钙化组 $\text{Ca} * \text{P}$ 、PTH、BALP、 $\beta\text{-CTX}$ 明显升高($P<0.05$),OC 明显降低($P<0.05$), Ca 、 P 、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、tPINP、TRACP-5b 升高但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.6 血管钙化严重程度的危险因素分析

将 VC 严重程度单因素分析显示骨代谢标志物差异有统计学意义的指标纳入二元 logistic 回归模型,以是否发生严重钙化为因变量,以 $\text{Ca} * \text{P}$ 、PTH、BALP、 $\beta\text{-CTX}$ 、OC 为自变量,结果显示 $\text{Ca} * \text{P}$ 升高

和 OC 降低是 VC 严重程度的独立危险因素。见表 5。

2.7 骨代谢标志物和血管钙化程度的相关性分析

$\text{Ca} * \text{P}$ 、PTH、BALP、 $\beta\text{-CTX}$ 与钙化程度正相关,OC 与钙化程度负相关。见表 6。

3 讨论

目前,常用于建立 CKD 大鼠模型的方法包括肾大部分切除法(约 5/6)、肾动脉部分分支结扎法、冷冻加切除法、阿霉素诱导法、腺嘌呤灌胃法等,上述方法各存在优缺点^[6]。其中,腺嘌呤灌胃法诱导 CKD 大鼠模型历史悠久,进入体内后的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下形成难溶于水的 2,8—二羟基腺嘌呤,该物质经肾小球滤过后沉积在肾小管导致肾小管上皮细胞受损,同时可堵塞肾小管引起梗阻性肾病使肾单位大量丧失,导致急性肾损伤并进一步发展为慢性肾衰竭^[6]。本课题组的前期研究表明,在腺嘌呤灌胃的基础上联合高磷饮食能建立可靠的 CKD 大鼠血管钙化模型^[7]。本研究继续沿用该方法复制 CKD 大鼠血管钙化模型,结果显示与对照组相比,各时间点 CKD 血管钙化组 BUN、Scr、24 h-Upro 明显升高,肾形态呈现“大白肾”样改变,提示肾功能严重受损。此外,各时间点 CKD 血管钙化组主动脉钙含量均明显高于对照组,全段主动脉 Von Kossa 染色可见不同程度的黑色物质沉积。Von Kossa 染色作为检测 VC 的方法之一,康婷等^[8]研究证实 Von Kossa 染色呈黑色时表明血管中膜大量钙化结节形成。因此,本研究的上述结果提示,

表 2 两组大鼠骨代谢标志物的比较 ($n=18$)

Table 2 Comparison of bone metabolism markers between two groups of rats

分组 Groups	对照组 Control group	血管钙化组 Calcification group	t/Z 值 Value of t/Z	P 值 P Value
钙 (mmol/L) Ca	2.06±0.18	1.38±0.28	8.427 ^a	0.000
磷 (mmol/L) P	3.13±0.66	6.39±0.90	-12.344 ^a	0.000
钙磷乘积 Ca * P	6.50±1.65	8.76±1.94	-3.767 ^a	0.001
1,25-二羟基维生素 D3 (ng/mL) 1,25(OH) ₂ D ₃	38.33±1.80	25.45±3.93	12.661 ^a	0.000
甲状旁腺素 (pg/mL) PTH	40.53±7.02	26.56 (14.40)	-3.402 ^b	0.001
骨源性碱性磷酸酶 (pg/mL) BALP	591.23±117.31	748.07 (628.47)	-1.471 ^b	0.141
骨钙素 (ng/mL) OC	6.15±0.52	6.31±0.95	-0.631 ^a	0.533
总 I 型前胶原氨基末端肽 (ng/mL) tPINP	17.70±1.31	15.91±3.35	2.113 ^a	0.046
β-I 型胶原交联羧基末端肽 (pg/mL) β-CTX	1215.85±165.60	769.68±175.79	7.838 ^a	0.000
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (pg/mL) TRACP-5b	46.62±8.81	36.43±2.72	4.682 ^a	0.000

注: a: t 值; b: Z 值。

Note. a, t value. b, Z value.

表 3 血管钙化的危险因素分析

Table 3 Analysis of risk factors for vascular calcification

指标 Indices	B	Wald	P	OR (95% CI)
钙磷乘积 Ca * P	0.761	7.609	0.006	2.140 (1.246, 3.673)
甲状旁腺素 PTH	-0.197	9.266	0.002	0.821 (0.724, 0.932)
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b TRACP-5b	-0.225	9.471	0.002	0.799 (0.692, 0.922)

表 4 轻中度和重度血管钙化组相关指标的比较

Table 4 Comparison of related indexes in mild to moderate and severe vascular calcification groups

分组 Groups	轻中度钙化组 ($n=12$) Mild to moderate calcification group	重度钙化组 ($n=6$) Severe calcification group	t/Z 值 t/Z value	P 值 P value
尿素氮 (mmol/L) Blood urea nitrogen	28.39±5.92	39.01±5.91	-3.589 ^a	0.002
血肌酐 (μmol/L) Serum creatinine	113.62±22.41	178.18±31.97	-5.008 ^a	0.000
24 h 尿蛋白定量 (g/24 h) 24 hour urine protein	0.023±0.010	0.025±0.005	-0.371 ^a	0.715
主动脉钙含量 Aortic calcium content (mmol/g prot)	0.241±0.028	0.478±0.197	-3.059 ^a	0.027
钙 (mmol/L) Ca	1.31±0.29	1.54±0.19	-1.734 ^a	0.102
磷 (mmol/L) P	6.15±0.78	6.87±1.00	-1.671 ^a	0.114
钙磷乘积 Ca * P	7.87±1.45	10.53±1.01	-3.534 ^a	0.003
1,25-二羟基维生素 D3 (ng/mL) 1,25(OH) ₂ D ₃	24.26±3.77	27.84±3.30	-1.976 ^a	0.066
甲状旁腺素 (pg/mL) PTH	23.72±2.80	39.37±2.78	-11.229 ^a	0.000
骨源性碱性磷酸酶 BALP (pg/mL)	565.78 (419.56)	1021.83±40.11	-3.372 ^b	0.001
骨钙素 (ng/mL) OC	6.73±0.86	5.49±0.48	3.239 ^a	0.005
总 I 型前胶原氨基末端肽 (ng/mL) tPINP	14.86±3.48	18.02±1.86	-2.067 ^a	0.055
β-I 型胶原交联羧基末端肽 (pg/mL) β-CTX	665.88±110.33	977.30±26.56	-9.256 ^a	0.000
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (pg/mL) TRACP-5b	35.82±2.63	37.67±2.69	-1.399 ^a	0.181

注: a: t 值; b: Z 值。

Note. a, t value. b, Z value.

表 5 血管钙化严重程度的危险因素分析

Table 5 Analysis of risk factors for the severity of vascular calcification

变量 Variables	B	Wald	P	OR(95% CI)
钙磷乘积 $Ca \times P$	1.088	5.026	0.025	2.968(1.147,7.682)
骨钙素 OC	-2.816	4.251	0.039	0.060(0.004,0.870)

表 6 骨代谢标志物和钙化严重程度的相关性

Table 6 Correlation between bone metabolism markers and calcification severity

变量 Variables	点二列相关系数 Point two column correlation coefficient	P 值 P value
钙磷乘积 $Ca \times P$	0.662	0.003
甲状旁腺素 PTH	0.942	0.000
骨源性碱性磷酸酶 BALP	0.787	0.000
骨钙素 OC	-0.629	0.005
抗酒石酸酸性磷酸酶 5b β -CTX	0.859	0.000

随着时间进展,肾功能不断下降,主动脉钙含量进一步升高,血管钙化更加明显,并出现 CKD 典型的低钙高磷血症,表明 CKD 大鼠血管钙化模型建立成功。

骨骼是一个活跃的组织,在破骨细胞去除旧骨和成骨细胞产生骨基质并通过基质矿化形成新骨的骨重塑过程中,释放出破骨细胞和成骨细胞分泌的酶和激素,以及骨基质的胶原蛋白代谢产物或非胶原蛋白,这些物质被称为骨代谢标志物,可及时反映骨代谢状态,包括一般骨代谢指标和骨转换标志物两类。前者包含 Ca 、 P 、PTH、 $1,25(OH)_2D_3$ 等,后者可进一步分为骨形成标志物和骨吸收标志物,如反映骨形成的 BALP、tPINP、OC 等,反映骨吸收的 β -CTX、TRACP-5b 等^[9]。

既往认为 VC 是细胞和组织间钙磷结晶被动沉积于血管壁的过程,钙化血管壁的主要成分为羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA),近年来大量研究表明 VC 是血管平滑肌细(vascular smooth muscle cell, VSMC)向成骨细胞转分化的复杂生物学过程,钙化过程与骨骼形成类似^[10],矿物质骨异常有助于 VC 的发生^[11]。本研究发现,在一般的骨代谢指标中,与对照组相比,CKD 血管钙化组 Ca 、 $1,25(OH)_2D_3$ 和 PTH 明显降低, P 和 $Ca \times P$ 升高,血清 PTH 降低和 $Ca \times P$ 升高是 VC 的独立危险因素。肾功能衰竭后,肾小球滤过率下降,故尿磷排出减少,血磷逐渐升高。PTH 具有升钙降磷的生理作用,血清 PTH 降低势必导致血钙降低,血磷进一步升高。高磷血症可抑制合成 $1,25(OH)_2D_3$ 所必须的 1α -羟化酶的活性,导致 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏合成受阻。此外,肾小管受损本身可直接导致 1α -羟化酶缺乏,进一步加重 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏,导致血钙进一步降低。因

此,CKD 典型的矿物质代谢紊乱表现为低血钙、高血磷和 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏。大量研究表明,高磷血症和 $Ca \times P$ 升高是促进 VC 发生和进展的主要原因,推测与高血磷上调成骨细胞转录因子 Runx2 和 osterix 从而刺激 VSMC 向成骨细胞转分化,并促进 VSMC 基体矿化和 VSMC 凋亡细胞等相关^[11-13]。维生素 D 对骨骼矿化有重要作用,骨矿化受损与缺乏 $1,25(OH)_2D_3$ 有关。目前, $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏促进 VC 的确切机制尚不清楚,推测与骨矿化受阻致血清无机磷升高、促进成骨细胞分化因子 MSX2、BMP2 和 Runx2 的表达、诱导炎症和氧化应激致内皮间质转化等相关^[13-15]。

由于 $1,25(OH)_2D_3$ 缺乏致骨形成和矿化过程受损,缺氧诱导因子-1 α 和抗氧化剂 Nrf2 减少致骨髓细胞表达血管内皮生长因子-A 降低^[16],尿毒症毒素硫酸吡啶酚抑制成骨细胞转录因子 osterix,OC 和 BMP2 的 mRNA 表达进而抑制骨形成,同时抑制 RANKL 的表达进而抑制 RANKL 依赖的破骨细胞分化和成熟等^[17],CKD 骨转换异常可表现为低骨转换^[18-19]。本研究发现,与对照组相比,CKD 血管钙化组 tPINP、 β -CTX、TRACP-5b 明显降低,低 PTH 和 TRACP-5b 是 VC 的独立危险因素。tPINP 和 β -CTX 分别是反映骨形成和骨吸收的骨代谢标志物^[9],而 TRACP-5b 主要来源于破骨细胞,是 CKD 患者良好的骨吸收标志物。此外,PTH 被认为是评估 CKD 患者骨转换最有价值的骨代谢标志物^[20-21],低 PTH 预示着低骨转换的可能性较大。因此,本研究结果表明 CKD 血管钙化大鼠呈低骨转换,且与 VC 密切相关,这是由于低骨转换使骨骼缓冲细胞外钙和磷酸盐的能力降低,循环中升高的钙和无机磷难以进入骨骼,进而促进 VC 的发生^[19]。

本研究还发现,低 TRACP-5b 是 VC 的独立危险因素。磷酸化的骨桥蛋白(OPN)可抑制 HA 的形成和生长,TRACP 能使 OPN 去磷酸化从而消除 OPN 对 HA 的抑制作用^[22],提示 TRACP-5b 降低导致 VC 的发生可能与促进 HA 沉积于血管平滑肌相关。目前,TRACP-5b 导致 VC 发生的机制研究甚少,未来需要进一步研究。

本研究进一步探讨了骨代谢标志物与钙化严重程度的相关性,发现与轻中度钙化组相比,重度钙化组血清 $\text{Ca} \times \text{P}$ 、PTH、BALP、 β -CTX 明显升高并与钙化程度正相关,而 OC 明显降低并与钙化程度负相关,IPINP 和 TRACP-5b 随钙化程度的增加呈上升趋势,血清 $\text{Ca} \times \text{P}$ 升高和 OC 降低是钙化严重程度的独立危险因素。BALP 由成骨细胞分泌,可通过去磷酸化使 OPN 失活,从而抑制 OPN 对体外矿化的抑制作用,在很大程度上促进 VC 的发生^[22]。此外,BALP 可通过降解 VC 的重要抑制剂焦磷酸盐,促进血管中羟基磷灰石沉积导致 VC^[23],血清 BALP 升高与主动脉钙化正相关^[24-25]。OC 是骨矿化基质中最丰富的非胶原蛋白,主要由成熟的成骨细胞分泌。完全羧化的 OC 对 HA 的亲合力高,血管壁 OC 表达上调可促进血管中膜钙化^[26]。与之相反,未完全羧化的 OC 与 HA 的亲合力低,更容易被释放到血液循环中,并通过调节血管内皮功能和糖脂代谢及减轻炎症等途径对血管起保护作用^[27-28],故血清 OC 降低可能通过破坏血管内皮功能和糖脂代谢平衡间接导致血管钙化。在亚洲进行的研究中,有 37% 的报告表明血清 OC 与 VC 或动脉粥样硬化负相关^[28],低血清 OC 会增加心血管疾病发生的风险^[29-30]。另外,尽管 BALP 和 OC 均为反映骨形成的指标,但本次研究发现随着肾功能下降,血清 BALP 升高而 OC 降低,这可能是由于首先,BALP 合成与骨基质矿化密切相关,当骨骼矿化受阻时成骨细胞分泌大量的 BALP,使血清 BALP 明显升高^[9]。其次,VSMC 转分化为成骨样细胞后可分泌 BALP^[23],故循环中 BALP 水平的增加可能部分来自钙化的动脉^[31]。最后,OC 是在骨基质矿化之后才能表达^[9],故骨骼矿化受阻时血清 BALP 升高而 OC 降低。由此可见,本研究发现尽管 CKD 血管钙化大鼠处于低骨转换状态,但随着低钙血症、高磷血症、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缺乏和骨骼对 PTH 抵抗的发生,骨代谢的关键调节因子 PTH 分泌逐渐增多。升高的血清 PTH 直接作用于成骨细胞和骨细

胞促进骨形成,间接作用于破骨细胞促进骨吸收,加速骨重塑和骨转换。在这种情况下,成骨细胞和破骨细胞的活性增加,大量的钙和磷酸盐从骨骼中释放出来。此外,由于快速的骨重塑阻止了新形成骨的充分矿化,循环中钙和无机磷的水平进一步增加,从而促进血管钙化的发生和进展^[5,19]。因此,本研究的上述结果表明,随着血清 PTH、BALP 和 β -CTX 的升高和 OC 降低,血管钙化程度增加,表明骨转换速率加快和骨骼矿化受损均可加剧血管钙化,这与骨代谢加快致骨骼释放钙和磷增加以及骨骼矿化受阻共同导致血清钙磷水平升高有关,同时这也是 $\text{Ca} \times \text{P}$ 升高作为血管钙化严重程度独立危险因素的原因之一。

综上所述,本次研究表明 CKD 大鼠血管钙化与矿物质骨代谢紊乱紧密相关,钙磷乘积升高和骨转换异常会促进血管钙化的发生及进展。CKD 大鼠血管钙化与血清骨代谢标志物的关系密切,通过检测血清骨代谢标志物,有利于评估血管钙化的发生、判断其严重程度并预测其进展,对临床上制定和改善 CKD-MBD 的诊疗方案有重要意义,进而有助于降低 CKD 患者心血管疾病的发生率及死亡率,未来有必要进行更多的研究以进一步探讨相关骨代谢标志物导致血管钙化的具体机制。

参考文献:

- [1] Hruska KA, Sugatani T, Agapova O. The chronic kidney disease-Mineral bone disorder (CKD-MBD): Advances in pathophysiology [J]. Bone, 2017, 100: 80-86.
- [2] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder Working Group. KDIGO 2017 clinical practice guideline update for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) [J]. Kidney Int Suppl (2011), 2017, 7(1): 1-59.
- [3] Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update [J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(1): 31-39.
- [4] Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, et al. Coronary artery calcification and risk of cardiovascular disease and death among patients with chronic kidney disease [J]. JAMA Cardiol, 2017, 2(6): 635-643.
- [5] Evenepoel P, Opdebeeck B, David K. Bone-vascular axis in chronic kidney disease [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2019, 26(6): 472-483.
- [6] 李佳璐,刘俊亭,袁慧雅.大鼠肾衰模型造模方法及比较研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 108-113.
- [7] 蒲江,魏晓,龚财判,等.腺嘌呤加高磷饮食快速建立慢性

- 肾脏病血管钙化动物模型法 [J]. 西南军医, 2018, 20(4): 445-450.
- [8] 康婷, 陈波, 欧三桃. 慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 9-15.
- [9] 张萌萌, 张秀珍, 邓伟民, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2019) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(10): 1357-1372.
- [10] Chen NX, Moe SM. Pathophysiology of vascular calcification [J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(6): 372-380.
- [11] Ray M, Jovanovich A. Mineral bone abnormalities and vascular calcifications [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2019, 26(6): 409-416.
- [12] Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(11): 2857-2867.
- [13] Hou YC, Lu CL. Mineral bone disorders in chronic kidney disease [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(4): 88-94.
- [14] Schmidt N, Brandsch C, Kühne H, et al. Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice [J]. PloS One, 2012, 7(4): e35316.
- [15] Dalan R, Liew H, Tan WKA, et al. Vitamin D and the endothelium: basic, translational and clinical research updates [J]. Ije Metabolic & Endocrine, 2014, 4(C): 4-17.
- [16] Chen NX, O'Neill KD, Allen MR, et al. Low bone turnover in chronic kidney disease is associated with decreased VEGF-A expression and osteoblast differentiation [J]. Am J Nephrol, 2015, 41(6): 464-473.
- [17] Watanabe K, Tominari T, Hirata M, et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption [J]. FEBS Open Bio, 2017, 7(8): 1178-1185.
- [18] Drüeke, Tilman B, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2016, 89(2): 289-302.
- [19] Lu KC, Wu CC, Yen JF, et al. Vascular calcification and renal bone disorders [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014: 637065.
- [20] Evenepoel P, Cavalier E, D'Haese PC. Biomarkers predicting bone turnover in the setting of CKD [J]. Curr Osteoporos Rep, 2017, 15(3): 178-186.
- [21] Sprague SM, Bellorin-Font E, Jorgetti V, et al. Diagnostic accuracy of bone turnover markers and bone histology in patients with CKD treated by dialysis [J]. Am J Kidney Dis, 2016, 67(4): 559-566.
- [22] Halling Linder C, Ek-Rylander B, Krumpel M, et al. Bone Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase: potential co-regulators of bone mineralization [J]. Calcif Tissue Int, 2017, 101(1): 92-101.
- [23] Nizet A, Cavalier E, Stenvinkel P, et al. Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease - mineral and bone disorder [J]. Clin Chim Acta, 2020, 501: 198-206.
- [24] Yan J, Li L, Zhang M, et al. Circulating bone-specific alkaline phosphatase and abdominal aortic calcification in maintenance hemodialysis patients [J]. Biomark Med, 2018, 12(11): 1231-1239.
- [25] Ishimura E, Okuno S, Okazaki H, et al. Significant association between bone-specific alkaline phosphatase and vascular calcification of the hand arteries in male hemodialysis patients [J]. Kidney Blood Press Res, 2014, 39(4): 299-307.
- [26] 刘菊菊, 李书国, 邓娟娟, 等. 高龄大鼠血管钙化及血管壁骨桥蛋白、骨钙素表达的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 54-60, 68.
- [27] 邢晓林, 刘昊凌. 骨钙素对动脉粥样硬化作用的研究进展 [J]. 现代医学, 2018, 46(6): 732-735.
- [28] Millar SA, Patel H, Anderson SI, et al. Osteocalcin, vascular calcification, and atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8: 183.
- [29] Csiky B, Sági B, Peti A, et al. The impact of osteocalcin, osteoprotegerin and osteopontin on arterial stiffness in chronic renal failure patients on hemodialysis [J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(6): 1312-1321.
- [30] Magni P, Macchi C, Sirtori CR, et al. Osteocalcin as a potential risk biomarker for cardiovascular and metabolic diseases [J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(10): 1579-1587.
- [31] Haarhaus M, Brandenburg V, Kalantar-Zadeh K, et al. Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(7): 429-442.

[收稿日期] 2020-06-07

张田,喻国冻,顾平,等. 玉屏苍耳散对实验性 AR 大鼠维甲酸相关孤儿核受体 γ_t 及相关因子表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 95-100.

Zhang T, Yu GD, Gu P, et al. The effects of Yupingfeng powder on the expression of retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ_t and related factors in rats with allergic rhinitis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 95-100.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.014

玉屏苍耳散对实验性 AR 大鼠维甲酸相关孤儿核受体 γ_t 及相关因子表达的影响

张 田,喻国冻*,顾 平,金 莹

(贵州医科大学附属医院 耳鼻咽喉科,贵阳 550004)

【摘要】 目的 探究玉屏苍耳散对实验性变应性鼻炎 (AR) 大鼠维甲酸相关孤儿核受体 γ_t (ROR γ_t) 及相关因子表达的影响。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,玉屏苍耳散组,西替利嗪组,每组各 10 只。采用卵清蛋白致敏法构建 AR 大鼠模型。灌胃给药,给药剂量按照大鼠体重计算:玉屏苍耳散组 (10 g/kg),西替利嗪 (2 mg/kg),正常组以及模型组灌胃给予等量的生理盐,酶联免疫法检测各组大鼠鼻粘膜组织细胞因子 IL-17、TNF- α 、IL-23 以及 IL-6 的分泌水平;HE 染色检测各组大鼠鼻黏膜组织损伤程度;采用免疫组化法检测各组大鼠鼻黏膜组织中 ROR γ_t 蛋白的表达;通过 RT-PCR 检测各组大鼠鼻黏膜组织中 ROR γ_t 、IL-17 以及 IL-23 mRNA 的表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠鼻部症状评分、鼻粘膜厚度、细胞因子 IL-17、TNF- α 、IL-23、IL-6 表达及 ROR γ_t 、IL-17 以及 IL-23 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组相比,玉屏苍耳散组与西替利嗪组上述指标均明显降低 ($P<0.05$)。**结论** 玉屏苍耳散可调控 ROR γ_t 以及相关因子 IL-17、IL-23 的表达,发挥对 AR 具有免疫调节作用。

【关键词】 玉屏苍耳散;AR;大鼠;维甲酸相关孤儿受体;白细胞介素 17

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0095-06

The effects of Yupingfeng powder on the expression of retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ_t and related factors in rats with allergic rhinitis

ZHANG Tian, YU Guodong*, GU Ping, JIN Ying

(Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Yupingfeng powder on the expression of retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ_t (ROR γ_t) and related factors in experimental allergic rhinitis (AR) rats. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into a normal group, model group, Yupingfeng group, and cetirizine group, with 10 rats in each group. The AR rat model of allergic rhinitis was established using the egg albumin sensitization method. The Yupingfeng powder doses were calculated according to the rats' weights as the Yupingfeng group, 10 g/kg and cetirizine group, 2 mg/kg. The normal group and the model group were given the same amount of physiological salt by gavage, and the secretion levels of cytokines IL-17, TNF- α , IL-23, and IL-6 in the rats' nasal mucosa in each group were detected by ELISA. H&E staining was used to detect the degree of damage to the nasal mucosal tissues in each group. The expression of ROR

[作者简介] 张田 (1982—),女,硕士,副主任医师,研究方向:耳鼻咽喉科。E-mail: 173912562@qq.com

[通信作者] 喻国冻 (1965—),男,本科,教授。E-mail: ygd.1224@163.com

protein in rat nasal mucosa was detected by immunohistochemistry. The mRNA expressions of ROR γ t, IL-17, and IL-23 in the nasal mucosa of the rats in each group were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the normal group, nasal symptom scores, nasal mucosal thickness, expression levels of cytokines IL-17, TNF- α , IL-23, and IL-6, and the mRNA levels of ROR γ t, IL-17, and IL-23 were significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, values for the above indices in the Yupingfeng group and cetirizine group were significantly lower ($P < 0.05$).

Conclusions Yupingfeng powder can regulate the expression of ROR T and the related factors, IL-17 and IL-23, and play an immunomodulatory role in AR.

【Keywords】 Yuping Cang'er powder; allergic rhinitis; rats; retinoic acid related orphan receptor; interleukin-17

变应性鼻炎 (AR) 是耳鼻喉科常见疾病, 发病率达 30% 左右^[1-2], 且发病人数逐年增加^[3]。AR 的主要临床症状为鼻痒、鼻塞、喷嚏、流涕、头疼等, 严重影响患者的身心健康以及日常生活^[4]。然而常规的西药或者手术治疗效果不佳, 且病情反复, 治疗瓶颈长期存在^[5]。中医认为 AR 属“鼻鼽”范畴, 中药治疗以益气固表、宣肺通窍、补益脾肾为主。相关研究^[6]表明: 玉屏苍耳散对于 AR 具有显著的治疗效果, 可以明显改善甚至消除 AR 的相关临床症状。但是关于玉屏苍耳散对于 AR 的治疗作用机制尚未明确, 因此本研究建立实验性 AR 大鼠模型, 进一步验证了玉屏苍耳散对实验性 AR 大鼠的治疗效果并对其进行相关机制进行研究, 为该药的应用提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

11 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体重 (266 $\pm$ 15) g, 共计 40 只, 由贵州医科大学实验动物中心提供 [SCXK(黔)2018-0001]; 依照贵州医科大学实验动物中心实验动物管理办法, 室温下标准饲料、自由饮水。饲养环境: 昼夜明暗各半循环照明, 在 22 $^{\circ}$ C ~ 26 $^{\circ}$ C 下维持恒定湿度, 适应性饲养一周后用于实验。所有动物均在本实验室 SPF 级动物房饲养 [SYXK(黔)2018-0001], 动物的使用及操作按照本院动物管理委员会 (IACUC2018-035) 的规定执行, 并在不影响实验要求和结果基础上, 按照 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

玉屏苍耳散由我院中药制剂室提供; 西替利嗪 (国药准字 H20030191) 购买于成都恒瑞制药有限公司; 氢氧化铝购自天津江天化工试剂有限公司; 卵清蛋白 (OVA) 购买于美国 Sigma 公司; cDNA 逆

转录试剂盒购买于北京索莱宝科技有限公司; 戊巴比妥购买于成都嘉叶生物科技有限公司; 白细胞介素 (IL-17)、维甲酸相关孤儿核受体 γ t (ROR γ t) 以及白细胞介素 (IL-23) 引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成; IL-17、IL-6、TNF- α 以及 IL-23 酶联免疫试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; ROR γ t 免疫组化试剂盒、TRIzol 试剂盒购于美国 sigma 公司; RIPA 裂解液 I 购于英国 Abcam 公司; 紫外分光光度计 (Thermo, 美国); 倒置显微镜 (OLYMPUS, 日本); 超低温冰箱 (Siemens, 德国); 高速离心机 (Eppendorf, 德国); 切片机 (Leica, 德国); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国); 多功能酶标仪 (Thermo Fisher, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及建模

本研究设置正常组、模型组、治疗组、西替利嗪组, 每组 10 只大鼠。除正常组外, 其余各组在第 0、2、4、6、8、10、12 天以及第 14 天对于 SD 大鼠进行腹腔注射 1 mL 由 20 mg 卵清蛋白与 30 mg 氢氧化铝配置的 PBS 混悬液构建 AR 大鼠模型。正常组注射等量无菌 PBS 溶液。在第 15 ~ 30 天时间段, 正常组、模型组以 5% OVA 生理盐水 100 μ L 双侧滴鼻激发, 治疗组、西替利嗪组分别以 10 g/kg 及西替利嗪 2 mg/kg 灌胃给药, 30 min 后以 5% OVA 生理盐水共 100 μ L 双侧滴鼻激发, 正常组大鼠给予等量的不含 OVA 的 PBS 溶液, 每天 1 次。模型的建立通过大鼠鼻部症状评分进行检测: 于第一次药前以及末次给药后观察 30 min 内大鼠鼻炎症状, 评分规则^[7]如表 1。病理评分由 2 名经过训练的人员分别进行评定, 若意见不一致, 则由第 3 名人员进行评判。

表 1 大鼠鼻部症状评分表
Table 1 Rating scale of nasal symptoms in rats

症状 Symptoms	评分标准 Scoring criteria		
	轻度(1分) Mild (1 point)	中度(2分) Medium (2 points)	重度(3分) Heavy (3 points)
轻擦鼻 Dab the nasal	30 min 内 1~4 次 1~4 times within 30 minutes	30 min 内 5~9 次 5~9 times within 30 minutes	30 min 内 >10 次 More than 10 times within 30 min
喷嚏 Sneezing	30 min 内 1~3 个 1~3 within 30 minutes	30 min 内 4~10 个 4~10 within 30 minutes	30 min 内 >10 个 More than 10 within 30 minutes
清涕 Qing stuff	少量流涕 A little runny nose	流涕到鼻孔 Runny nose to nostrils	鼻腔周围附带分泌物 Secretions around the nasal cavity

1.3.2 大鼠鼻腔黏膜细胞因子检测

将各组大鼠处死后分离鼻腔黏膜,加入 RIPA 裂解 10 min,离心 5 min,收集上清,采用酶联免疫吸附试剂盒测定各组大鼠鼻粘膜组织中 IL-17、IL-23、TNF- α 以及 IL-6 的浓度。根据试剂盒说明书通过多功能酶标仪检测 450 nm 处吸光度,根据标准曲线计算各组样本中 IL-17、IL-23、TNF- α 以及 IL-6 的浓度。

1.3.3 大鼠鼻黏膜组织 HE 检测

腹腔麻醉后,固定,开胸,用注射器吸取生理盐水 100 mL 进行心脏灌注,然后灌注 100 mL 4%多聚甲醛固定液,待大鼠肝、脾变色后表示灌注完成,剔除大鼠鼻面部皮肤以及周边软组织,取包含鼻黏膜的鼻腔组织,4%甲醛溶液固定,常规石蜡切片,苏木精-伊红染色,显微镜下进行病理学观察。

1.3.4 免疫组化法检测各组大鼠鼻黏膜中 ROR γ t 的表达

采用免疫组织化学染色法(SABC)检测大鼠鼻黏膜组织中 ROR γ t 的表达:首先,将标本按常规方法制成石蜡切片,厚度为 4 μ m,常规脱蜡,血清封闭,抗原修复后根据 ROR γ t 免疫组化试剂盒说明书进行操作。待染色完成后,于显微镜下观测并拍照记录,以棕褐色或者棕黄色反应产物为阳性,采用 Image J 软件进行光密度分析。

1.3.5 qRT-PCR 检测

收集各组大鼠鼻黏膜,根据 TRIzol 试剂盒说明书操作,提取总 RNA,采用紫外分光光度计对 RNA 浓度进行检测。使用 cDNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 55 s; 59 $^{\circ}$ C 退火 45 s; 70 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 40 个循环。以 β -actin 做为扩增内参,采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪对扩增结果进行数据分析。引

物序列为, ROR γ t (正向: 5' - CATCTCCAGCCTCAGCTTTGA-3', 反向: 5' - TCCCCCAGAAGTCCTTAAATCC-3'); IL-23 (正向: 5' - ACACACACCAGTGGGACAAA -3', 反向: 5' - ACAACCATCACCACACTGGA-3'); IL-17 (正向: 5' - TCTCTGATGCTGTTGCTGCT-3', 反向: 5' - CGTGAACGGTTGAGGTAGT-3'); β -actin (正向: 5' - TTCAACGGCAGTCAAG-3', 反向: 5' - CCACGACATACTCAGCAC-3')。

1.4 统计学方法

实验数据采用软件 SPSS 21.0、GraphPad Prism 5 进行分析,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表数据间具有统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠鼻部症状评分检测

首次给药前模型组和玉屏苍耳散组以及西替利嗪组鼻部症状评分大于 5 分,相比于正常组,鼻部评分显著升高 ($P < 0.05$)。末次给药后,模型组评分显著高于正常组 ($P < 0.05$),玉屏苍耳散组以及西替利嗪组显著低于模型组 ($P < 0.05$),玉屏苍耳散组与西替利嗪组在评分上无统计学差异 ($P > 0.05$) 见表 2。

2.2 大鼠鼻黏膜组织炎症细胞因子检测

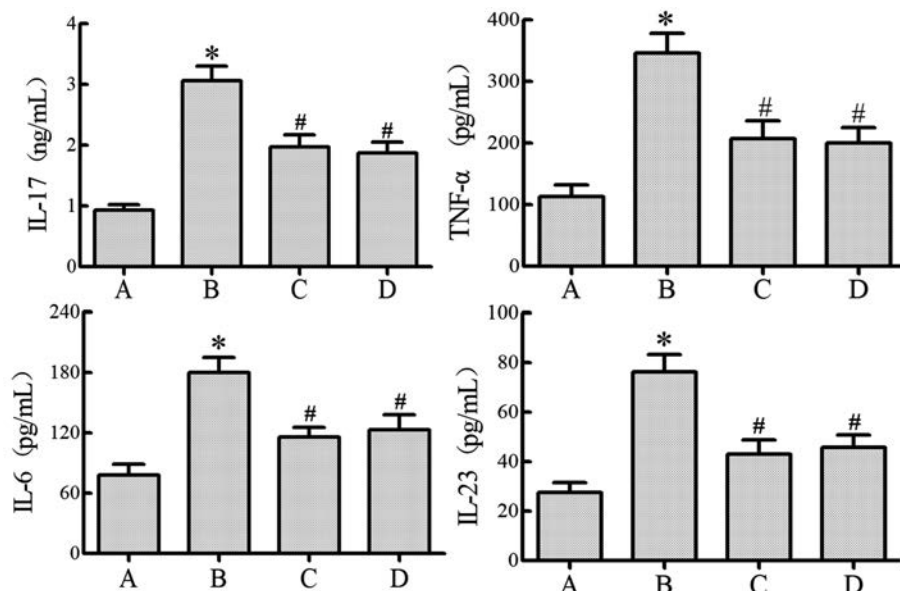
与正常组比较,模型组大鼠鼻黏膜组织中细胞因子 IL-17、IL-23、TNF- α 以及 IL-6 明显增加 ($P < 0.05$);玉屏苍耳散组与模型组相比鼻黏膜组织中 IL-17、IL-23、TNF- α 以及 IL-6 表达明显显著降低 ($P < 0.05$);玉屏苍耳散组与西替利嗪组相比,细胞因子表达无显著差异 ($P > 0.05$),见图 1。

表 2 各组大鼠鼻部症状检测($n=10$)
Table 2 Nasal symptom detection of rats in each group

组别 Groups	鼻部症状评分 Nose symptom score	
	首次给药前 Before first administration	末次给药后 After the last Administration
正常组 Normal group	1.53±0.62	1.62±0.45
模型组 Model group	7.88±0.49 [#]	8.03±0.42 [#]
玉屏苍耳散组 Yu Pingcanger Powder group	8.05±0.56	2.69±0.53 [*]
西替利嗪组 Cetirizine group	8.22±0.44	2.42±0.30 [*]

注:与模型组比, $^*P<0.05$; 与正常组比, $^{\#}P<0.05$ 。

Note. Compared with model group, $^*P<0.05$. Compared with normal group, $^{\#}P<0.05$.



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 玉屏苍耳散组; D: 西替利嗪组; 与正常组相比, $^*P<0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P<0.05$ 。下同。

图 1 各组大鼠鼻黏膜组织细胞因子分泌情况

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Yu Pingcanger Powder group. D, Cetirizine group. Compared with the normal group,

$^*P<0.05$. Compared with model group, $^{\#}P<0.05$. The same as below.

Figure 1 Cytokine secretion in nasal mucosa of rats in each group

2.3 大鼠鼻黏膜组织 HE 染色

相比于正常组, 模型组大鼠鼻黏膜组织中显著增厚($P<0.05$); 玉屏苍耳散组与西替利嗪组大鼠相比于模型组, 鼻黏膜增厚程度显著降低($P<0.05$), 玉屏苍耳散组与西替利嗪组相比无显著性差异($P>0.05$)见图 2。

2.4 各组大鼠鼻黏膜组织 ROR γ t 的表达

与正常组比较, 模型组大鼠鼻黏膜组织 ROR γ t 表达明显增加($P<0.05$); 与模型组相比, 玉屏苍耳散组与西替利嗪组大鼠鼻黏膜组织 ROR γ t 表达显

著降低($P<0.05$), 玉屏苍耳散组与西替利嗪组相比 ROR γ t 表达无明显差异($P>0.05$)见图 3。

2.5 qRT-PCR 检测大鼠鼻黏膜组织 ROR γ t、IL-23、IL-17 mRNA 的表达

与正常组比较, 模型组大鼠鼻黏膜组织 ROR γ t、IL-23 以及 IL-17 mRNA 的表达明显增加($P<0.05$); 与模型组比较, 玉屏苍耳散组与西替利嗪组大鼠鼻黏膜组织中 ROR γ t、IL-23 以及 IL-17 mRNA 的表达显著降低($P<0.05$); 玉屏苍耳散组与西替利嗪组相比无明显差异($P>0.05$), 见图 4。

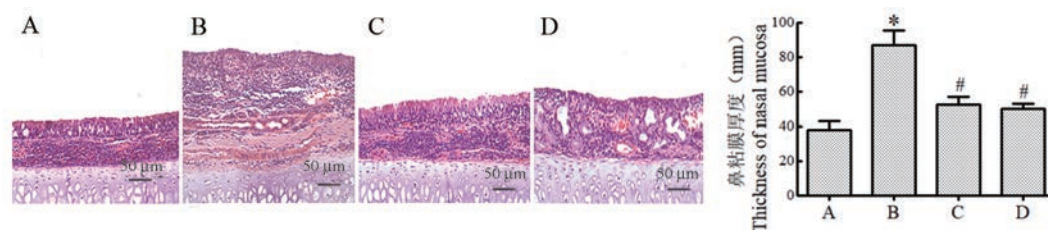


图 2 各组大鼠鼻黏膜组织 HE 染色情况

Figure 2 HE staining of nasal mucosa tissues of rats in each group

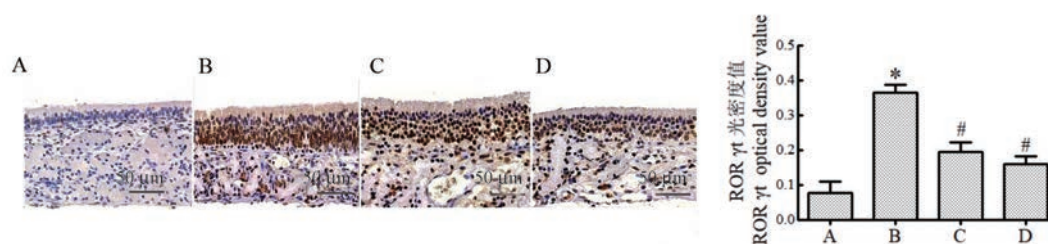


图 3 各组大鼠鼻黏膜组织 RORγt 的表达

Figure 3 Expression of ROR T in nasal mucosa of rats in each group

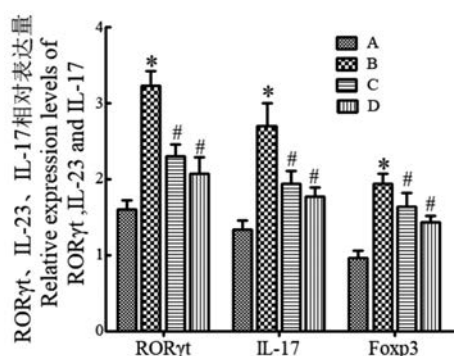


图 4 各组大鼠 RORγt 以及相关因子的表达水平

Figure 4 Expression levels of ROR T and related factors in each group

3 讨论

随着中医药理论的完善,中药应用于 AR 的研究受到众多研究者的重视与关注^[6-11]。据报道^[12],玉屏苍耳散对于 AR 具有一定的治疗效果,可明显改善 AR 的临床症状。但是,玉屏苍耳散对 AR 治疗的作用机制仍不清楚。在本研究中,建立 AR 大鼠模型,结果显示模型组大鼠鼻部症状检测评分以及炎症因子水平分泌显著高于正常组,证明模型建立成功。给予玉屏苍耳散治疗后,相比于模型组大鼠,玉屏苍耳散组大鼠的评分以及炎症因子分泌水平显著降低,表明玉屏苍耳散对于 AR 大鼠具有明显的治疗作用。

近年来,Th17 细胞被发现并被广泛研究报道,相关研究^[13-15]表明 Th17 细胞参与某些过敏性疾病的发生与发展。有研究^[16]发现在 AR 鼻粘膜中 Th17 明显升高。Th17 主要分泌细胞因子 IL-17,IL-17 具有促炎作用,可诱导促炎细胞因子如 IL-6、TNF-α 等的分泌,引发组织细胞的炎症浸润,造成组织损伤^[17]。本研究中,模型组大鼠炎症因子 TNF-α、IL-6 表达显著升高,玉屏苍耳散显著降低鼻黏膜部位的炎症因子 IL-6、TNF-α 的水平,证明玉屏苍耳散可改善 AR 大鼠鼻部组织的炎症浸润,发挥治疗作用。IL-23 作为 IL-12 家族的一员,可促进 Th17 细胞分泌 IL-17 等细胞因子发挥生物学功能,IL-23 参与 Th17 的扩增与存活,是维持 Th17 存活的重要因子^[18-19]。模型组大鼠鼻粘膜部位的 IL-23 以及 IL-17 表达水平显著高于正常大鼠,玉屏苍耳散组表达水平明显降低。

RORγt 是 Th17 细胞的特异性转录因子,RORγt 在预防免疫激活和抑制炎症病变中至关重要^[20],在过敏性疾病、感染以及自身免疫病的发生发展中起到重要作用^[21-22]。在本研究中,模型组大鼠鼻黏膜 RORγt 以及相关因子 IL-23 和 IL-17 的 mRNA 表达显著高于正常组,说明 RORγt、IL-23 和 IL-17 参与过敏性鼻炎的发展。玉屏苍耳散中的中药成分对于机体的免疫调节已有报道,刘慧等^[23]在研究治疗胶原诱导性关节炎小鼠的机制中发现,黄芪糖蛋白能够降低 RORγt 的表达水平,恢复 Th17 与 Treg 细

胞之间的平衡。另有报道称^[24],金银花可通过下调鼻黏膜 ROR γ t 表达水平,纠正其失衡,并抑制 IL-17 产生,从而缓解鼻部炎性反应。本研究中玉屏苍耳散组大鼠 ROR γ t 以及相关因子表达明显降低,揭示了玉屏苍耳散可以通过抑制 ROR γ t、IL-23 的表达,从而抑制 TH17 细胞扩增与存活,进而降低 IL-17 的分泌,抑制炎性的浸润,从而发挥对 AR 的治疗作用。

综上所述,本研究通过建立 AR 大鼠模型验证了玉屏苍耳散抑制 ROR γ t 以及相关因子 IL-17、IL-23 的表达,从而发挥对 AR 的治疗作用。由于 AR 发病因素复杂,病情发展过程受众多因素调控。因此玉屏苍耳散对于 AR 的作用机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] 宋庆均, 杨秀海, 彭维晖. 变应性鼻炎致病因素及治疗的研究进展 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(1): 83-88.
- [2] Suzuki M, Nakayama M, Ando KB, et al. Sleep disturbance and hyperactivity detected by actigraphy in rats with allergic rhinitis or attention-deficit hyperactivity disorder [J]. Tohoku J Ex Med, 2018, 246(2): 65-71.
- [3] 刘静. 基于整体观念变应性鼻炎的中医防治思路 [J]. 中医耳鼻喉科学研究, 2018, (3): 18-20, 15.
- [4] 费优鹏, 刘钢, 吴飞虎. 变应性鼻炎从风论治临床疗效观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(5): 69-72.
- [5] 史丽, 赵莉, 张红萍. 变应性鼻炎的长期抗炎治疗 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2017, 31(3): 9-12.
- [6] 黄南, 王晓龙, 赵炎. 玉屏苍耳散对过敏性鼻炎模型大鼠免疫调节的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2018, 40(3): 242-245.
- [7] 赵鹤, 曹志伟, 顾兆伟. IL-9 在变应性鼻炎小鼠模型鼻黏膜中的表达研究 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(1): 4-7.
- [8] Nelson HS. Allergen immunotherapy now and in the future [J]. Allergy Asthma Proc, 2016, 37(4): 268-272.
- [9] 王珍, 成丽兰, 章诗富. 滨蒿内酯对实验性变应性鼻炎大鼠维甲酸相关孤儿核受体 γ t 及相关因子表达的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2019, 26(2): 84-87.
- [10] Roditi RE, Ishman S, Lee S, et al. Medications for allergic rhinitis [J]. 2017, 156(1): 70-80.
- [11] 汪李琴, 杨晴, 程雷. 中药玉屏风颗粒治疗变应性鼻炎的 Meta 分析 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2018, 26(3): 223-230.
- [12] 韩春娥. 玉屏苍耳散应用于变应性鼻炎临床观察 [J]. 新中医, 2018, 50(5): 141-143.
- [13] 尹雪, 任秀敏, 刘春苗. 变应性鼻炎患者 IL-35 对于 Treg/Th17 细胞平衡的调控作用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(3): 213-216.
- [14] Liu W, Zeng Q, Zhou L, et al. Leptin/osteopontin axis contributes to enhanced T helper 17 type responses in allergic rhinitis [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2018, 29(6): 622-629.
- [15] 李媛媛, 张火林, 严共刚. 过敏性鼻炎患者血清 IL-17 和 IL-22 水平的变化及其与病情严重程度的关系 [J]. 黑龙江医学, 2015, 39(8): 921-925.
- [16] 顾兆伟, 王韞秀, 赵鹤. Th17 细胞在小鼠变应性鼻炎鼻黏膜中的表达及意义 [J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(11): 1776-1779.
- [17] 李萌, 汪受传, 魏肖云. 变应性鼻炎豚鼠血清 IgE 和 IL-6, IL-17 的变化及消风宣窍汤的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 164-167.
- [18] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006, 441(7090): 235-238.
- [19] Gu ZW, Wang YX, Cao ZW. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 22361-22369.
- [20] Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t [J]. Nat Immunol, 2008, 9(6): 641-649.
- [21] 宋辉, 顾兆伟, 赵鹤. 卵清蛋白致敏的过敏性鼻炎小鼠鼻黏膜 IL-17 mRNA/蛋白、ROR γ t、Foxp3 mRNA 表达水平的研究 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(1): 60-63.
- [22] Qu SH, Li M, Liang JP, et al. Change of Th17 and expression of ROR γ t in a murine model of allergic rhinitis after a stimulation of allergen and corticosteroid [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011, 91(6): 401-404.
- [23] 刘慧, 赵俊云, 杨向竹, 等. 黄芪糖蛋白对胶原诱导性关节炎小鼠 Th17/Treg 细胞免疫平衡的影响 [J]. 环球中医药, 2016, 9(12): 1454-1458.
- [24] 简雷, 肖才文, 何庆文, 等. 金银花提取物对变应性鼻炎小鼠细胞因子表达的影响 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2017, 46(3): 285-290.

[收稿日期] 2020-06-12

王莎莎,付瑞,王吉,等. 鼠痘病毒 FQ-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 101-105.

Wang SS, Fu R, Wang J, et al. Development of an FQ-PCR method to detect and quantitate ectromelia virus and primary applications [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 101-105.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 01. 015

鼠痘病毒 FQ-PCR 检测方法的建立及初步应用

王莎莎[#], 付 瑞[#], 王 吉^{*}, 岳秉飞^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 目的 建立鼠痘病毒(ECTV)的 TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测方法,并对实验室保存的裸鼯鼠组织样本、小鼠组织样本以及黄鼠组织样本进行检测。**方法** 根据 GenBank 中鼠痘病毒的 *crmD* 基因序列设计引物探针,建立 ECTV 的 FQ-PCR 检测方法,对保存的样本进行筛查,并对部分阳性样本进行测序鉴定。**结果** 建立的 ECTV FQ-PCR 检测方法灵敏度高、特异性强,最低能检测到 ECTV 核酸浓度为 10 copies/ μ L 的样本,方法的标准曲线相关参数符合标准。使用该方法检测实验室 63 份裸鼯鼠脾组织样本和 22 份小鼠脾组织样本,结果全为阴性,检测 4 只黄鼠组织样本,结果阳性率为 50%。阳性样本进行 PCR 检测后测序比对为 ECTV 核酸序列。**结论** 经验证,建立的 ECTV FQ-PCR 检测方法能够灵敏特异的对样本中的 ECTV 进行筛查,实验室小鼠的日常监测不应忽视 ECTV 污染的潜在风险。

【关键词】 鼠痘病毒; TaqMan 探针法荧光定量 PCR 方法; 裸鼯鼠; 黄鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0101-05

Development of an FQ-PCR method to detect and quantitate ectromelia virus and primary applications

WANG Shasha[#], FU Rui[#], WANG Ji^{*}, YUE Bingfei^{*}

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective To identify the prevalence of ECTV in mice. **Methods** A sensitive and specific FQ-PCR assay for ECTV was developed and used to detect and quantitate ECTV in mouse samples by analyzing the sequence of the *crmD* gene in ECTV. **Results** This assay detected a minimum of 10 copies of standard DNA. The assay was applied to 63 naked mole rat spleen samples and 22 mouse spleen samples raised in the laboratory, which provided negative result. In tissue samples from four ground squirrels raised in our laboratory, the positive rate was 50%. Some positive samples amplified with primers for the *crmD* gene had 99% similarities to ECTV as determined by sequencing the PCR products. **Conclusions** Our result suggest that routine surveillance of ECTV in laboratory mice cannot be ignored.

【Keywords】 ectromelia virus; TaqMan FQ-PCR; naked mole rats; ground squirrel

鼠痘病毒(ectromelia virus, ECTV)是一类有囊膜,基因组为 180~200 kb 大小的线性双股 DNA 病毒,是动物病毒中体积大、结构最复杂的 DNA 病毒,

病毒粒子呈卵圆形或砖形,大小为 230 nm $\times$ 170 nm,在分类上属于痘病毒科,脊索动物痘病毒亚科,正痘病毒属。ECTV 的自然宿主为小鼠,1930 年首次在英

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI09B02)。

[作者简介] 王莎莎(1989—),女,免疫学硕士,从事实验动物病毒研究。E-mail: wangsha0316@126.com

付瑞(1978—),男,免疫学硕士,副研究员,从事实验动物病毒研究。E-mail: furui78@nifdc.org.cn [#]共同第一作者

[通信作者] 岳秉飞(1960—),男,研究员,博士,从事实验动物学研究。E-mail: y6784@126.com

王吉(1974—),女,硕士,研究员,从事实验动物病毒研究。E-mail: wj_nd_jds@sina.com ^{*}共同通信作者

国的实验小鼠种群中分离,随后在墨西哥、日本、美国、中国均有发现^[1]。ECTV 多呈爆发性流行,致死率较高,常造成全群淘汰,危害极大。不同宿主的易感性不同,临床上急性感染小鼠以四肢、尾和头部肿胀、溃烂、坏死甚至脚趾脱落为特征,故又称脱脚病,而隐性带毒鼠通常没有明显症状,为实验小鼠种群的重大安全隐患。实验室常用酶联免疫吸附试验检测 ECTV 抗体进行日常监测,而隐性带毒鼠的血清抗体水平较低,血清学检测方法有可能造成假阴性^[2],且感染动物的病毒抗体的产生存在空窗期,因此,对实验小鼠的 ECTV 核酸筛查在感染初期非常重要。本研究建立了 ECTV 特异灵敏的 TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 检测方法,能够实现快速批量检测,且首次在黄鼠组织中检测到 ECTV 核酸,提示在使用实验用动物时还需重视 ECTV 的感染情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

22 只 6 周龄雄性 (18~22 g) 清洁级小鼠来自中国食品药品检定研究院动物生产供应室 [SCXK (京) 2017-0005], [SYXK (京) 2017-0013], 63 只 14~34 月龄屏障环境饲养裸鼯鼠,重 22g~42g,其中雌性 31 只,雄性 32 只,由海军军医大学提供 [SCXK (沪) 2017-0002]。动物饲养于屏障设施 [SYXK (沪) 2017-0004]。由中国食品药品检定研究院审批通过 (中检动 (福) 第 2019 (A) 001 号),所有动物均按 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验样品与毒种

鼠痘病毒 (ectromelia virus, ECTV)、牛痘病毒 (vaccinia virus, VACV)、鼠腺病毒 (murine adenovirus, MAdV)、小鼠多瘤病毒 (murine polyomavirus, Poly)、小鼠微小病毒 (minute virus of mice, MVM) 为本室保存;63 份裸鼯鼠脾组织样本 (编号为 NP1~NP63 号) 来自中国人民解放军第二军医大学;22 只清洁级小鼠脾组织 (编号为 MS1~MS22) 和 4 只黄鼠的 20 份组织样本为本实验室送检样品,来自于国内 4 个实验动物使用单位,其中黄鼠的组织包括肝组织 (编号为 SQLi1~SQLi4)、脾组织 (编号为 SQS1~SQS4)、肾组织 (编号为 SQK1~

SQK4)、肺组织 (编号为 SQLu1~SQLu4)、淋巴组织 (编号为 SQLy1~SQLy4)。

1.2 主要试剂与仪器

DNA 快速提取试剂盒品牌为 QIAGEN; 普通 PCR 系列试剂及标准阳性质粒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; TaqMan Gene Expression Master Mix 品牌为 ABI。PCR 仪和核酸琼脂糖凝胶电泳仪品牌为美国 Bio-RAD; 凝胶成像分析仪品牌为美国 Kodak; 荧光定量 PCR 仪 7500fast Real-Time PCR System 品牌为美国 ABI。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计

比对 NCBI 上现有的 ECTV 基因序列,选择同源性最高的 *crmD* 基因 (NCBI ID: KJ563295) 保守区域,设计 FQ-PCR 的引物探针,序列如表 1 示。

1.3.2 质粒标准品的制备

合成 ECTV 基因 *crmD* 序列包含引物探针的部分,转入 pMD19-T 质粒中,作为 ECTV FQ-PCR 的标准质粒 pMD19-ECTV,浓度为 1.0×10^9 copies/ μ L。

1.3.3 病毒 DNA 的获取

对正常 BHK21 细胞、BHK21 细胞培养的 ECTV 毒株和 VACV、MAdV、Poly、MVM 病毒培养液,以及 63 份裸鼯鼠脾组织样本和 22 份小鼠脾组织样本、4 只黄鼠的肝、脾、肾、肺、淋巴结等 20 份组织样本按照 DNA 快速提取试剂盒操作方法进行 DNA 提取。提取的 DNA 冻存于 -30°C 备用。

1.3.4 ECTV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立

经条件优化, FQ-PCR 的最佳反应体系为引物探针混合物 ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, 模板 $1 \mu\text{L}$, 加入 TaqMan Gene Expression Master Mix 以及无 RNase 水使总反应体积达到 $20 \mu\text{L}$ 。使用荧光定量 PCR 仪 7500fast Real-time PCR System 设定程序 50°C 预热 2 min; 95°C 预变性 10 min; 扩增循环为 95°C 15 s, 60°C 1 min, 共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。

将 pMD19-ECTV 作为标准品,进行 10 倍系列稀释为 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL ,作为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,选取线性较好 6 个稀释度建立标准曲线。

1.3.5 ECTV FQ-PCR 检测方法的特异性、灵敏性、准确性和稳定性检测

表 1 用于扩增 *crmD* 基因的引物与 TaqMan 探针序列

Table 1 Primers and TaqMan probes sequences for the *crmD* gene amplification

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences	序列位置 Primer locations	扩增子大小 (bp) PCR product size
EctV-1F	GTGTTAGTTGTCTAGATTCTCTTCCAGAA	5771~5779	92
EctV-1R	AAACGATAAAGTACATCAAGACCTCACA	5835~5862	
探针 Probe	(FAM) ACGCAGTGAAGATTA(NFQ)	5819~5834	/

使用建立的 FQ-PCR 方法检测 ECTV、VACV、MAV、Poly、MVM 病毒核酸,并设立 BHK21 细胞核酸和无 RNase 水作为阴性对照 (N/C) 检测 ECTV FQ-PCR 方法的特异性。检测 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL 的标准质粒,每个稀释度做三个平行,检测方法的灵敏性。使用建立的 FQ-PCR 方法对 3 份阳性样品进行多次重复实验,评价方法的准确性和稳定性。

1.3.6 ECTV FQ-PCR 在不同样品中的应用

使用建立的 ECTV FQ-PCR 方法对 1.3.3 中获取的不同的样本 DNA 进行 ECTV 筛查,并对阳性样本使用普通 PCR 引物 crmD1: 5'-CTGCGAATTTGAAGGATC-3'; crmD2: 5'-CGTCGTGGGTGTTAGTTG-3' 进行扩增^[3],扩增产物测序鉴定。

2 结果

2.1 ECTV FQ-PCR 扩增体系及标准曲线的建立

选取标准质粒 pMD19-ECTV 稀释度为 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^3$ copies/ μL 的检测结果显示标准曲线,标准曲线如图 1 所示,其相关系数 Slope 为 -3.487、相关系数 R^2 值为 0.998,扩增效率 Eff% 为 93.544% (90%~110%之间)。

2.2 ECTV FQ-PCR 特异性检测

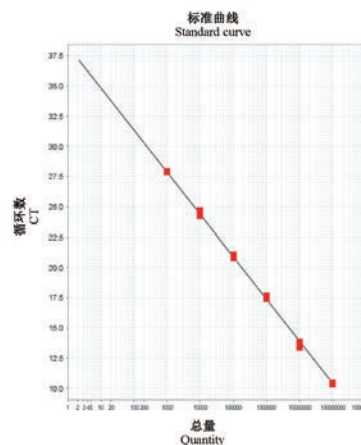
如图 2 所示,建立的 ECTV FQ-PCR 检测 VACV、MAV、Poly、MVM 病毒核酸以及 BHK21 细胞核酸和无 RNase 水均无明显扩增曲线,而对 ECTV 病毒 DNA 有 S 型扩增曲线,CT 值为 12.29,说明建立的方法有很好的特异性。

2.3 ECTV FQ-PCR 灵敏性检测

对 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ copies/ μL 稀释度的标准质粒 pMD19-ECTV 进行检测,每个稀释度三个平行,所能检测的最小浓度梯度的循环阈值 (CT) ≤ 35 ,拷贝数 (Copies) ≥ 10 时 FQ-PCR 结果可信,结果如图 3,显示标准质粒浓度为 10 copies/ μL 时 CT 值为 33.09,三个平行实验均有扩增曲线,测得拷贝数为 30.90 copies,在可信范围之内,而浓度为 1 copies/ μL 时 CT 值为 36.01,测得的拷贝数为 4.5 copies,但在三个平行实验中,仅有一个实验有数据,说明已超出检测限。因此确定该方法的灵敏度为 10 copies。

2.4 ECTV FQ-PCR 准确性和稳定性检测

使用浓度分别为 1×10^6 copies/ μL 、 1×10^5 copies/ μL 、 1×10^4 copies/ μL 的标准品进行荧光定量 PCR 检测,且进行三个平行实验,最终实测值的均

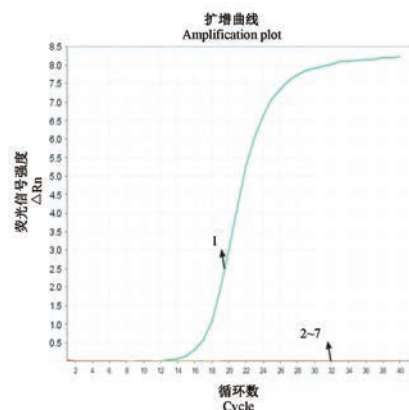


注:目标:目标 1 斜率:-3.487; Y 轴截距:38.291; 相关系数:0.998; 扩增效率:93.544%。

图 1 ECTV FQ-PCR 标准曲线

Note. Target, Target 1 Slope, -3.487. Y-Inter, 38.291. R², 0.998. Eff%, 93.544%.

Figure 1 ECTV FQ-PCR standard curve



注:1: ECTV; 2-7: VACV、MAV、Poly、MVM、BHK21 细胞、无 RNase 水。

图 2 ECTV FQ-PCR 特异性检测结果

Note. 1, ECTV. 2-7, VACV/MAV/Poly/MVM/BHK21 cell/RNase free water.

Figure 2 ECTV FQ-PCR specificity test

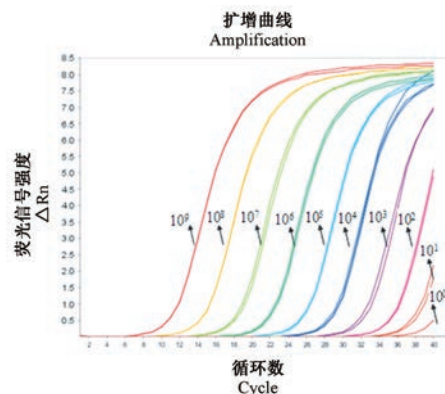


图 3 ECTV FQ-PCR 灵敏度检测扩增曲线

Figure 3 ECTV FQ-PCR sensitivity test amplification curves

值分别为 1.2×10^6 copies/ μ L、 1.078×10^5 copies/ μ L、 1.33×10^4 copies/ μ L, 计算 CTSD 值及 CV 值如表 2。3 个浓度梯度 3 次重复实验 Ct 值的变异系数(CV)均小于 5%, 表明方法重复性、稳定性良好。

2.5 ECTV FQ-PCR 在鼠组织样品中的应用

对收集到的动物组织样本进行 ECTV 筛查, 结果如表 3、图 4 所示, 显示在黄鼠的肝、脾、肾、肺、淋巴组织中均检测到 ECTV 阳性, 阳性样品中 ECTV 的核酸拷贝量均较低, 其中浓度最高的是黄鼠淋巴组织 SQLy1, 达 106.967 copies/ μ L, 且淋巴组织的检测结果均为阳性。对阳性样本进行 PCR 后测序, 显示其与 ECTV 核酸的同源性为 99%, 进一步验证了检测的黄鼠感染了 ECTV。而在实验室裸鼯鼠组织和小鼠组织 ECTV 筛查结果显示均为阴性。

3 讨论

鼠痘病毒作为我国现行国标《实验动物微生物等级及检测》(GB14922.2-2011)中规定的清洁级及以上级别小鼠的必检项目^[4], 我国实验室已经建立了较为严格的饲养管理及卫生防疫制度, 对国内实验室中的鼠痘病毒的流行情况进行了很好的控制。现行国家标准中实验动物鼠痘病毒的检测方法为血清学方法, 包括酶联免疫吸附实验、免疫酶试验、免疫荧光试验、免疫酶组织化学法, 通常情况下, 实验室的标准检测方法为酶联免疫吸附试验。据不完全统计, 我国 1983 年至 2011 年间的 7 篇关于 ECTV 的报道, 仅有两篇报道检出 ECTV 阳性, 且阳性率很低^[5]。近些年已经很少有关于 ECTV 阳性的报道, 本实验室 2017 至 2019 年间使用酶联免疫吸附试验方法检测小鼠血清中的 ECTV 抗体, 未检出阳性, 本实验使用的小鼠、裸鼯鼠、黄鼠分别使用小鼠、裸鼯鼠、大鼠的鼠痘病毒酶联免疫吸附试验方法检测为鼠痘抗体阴性。由于分子学方法直接检测抗原, 且弥补了血清学检测方法在感染空窗期检测造成的假阴性, 具有很好的应用前景。

为了全面的评价 ECTV 对实验室小鼠的感染威胁, 本研究拟建立 ECTV FQ-PCR 对裸鼯鼠、黄鼠、小鼠组织进行筛查。选取了位于 ECTV 核酸两端的重复序列中的 *CrmD* 基因的保守区域设计引物探针, 建立的 ECTV Q-PCR 能够灵敏特异的检测 ECTV 核酸, 标准曲线的相关系数 Slope 为 -3.487、相关系数 R^2 值为 0.998, 扩增效率 Eff% 为 93.544%, 最低能检测到浓度为 10copies 的样品。

表 2 荧光定量 PCR 检测方法的重复性和稳定性实验结果
Table 2 Repeatability and stability testing results of Q-PCR

标准品 (copies/ μ L) Standard sample	实验次数 Number of experiments	每次检测 CT 均值 Mean CT value per test	3 次检测 CT 均值 Mean CT value for three times tests	标准差 CT _s	变异系数 CV(%) Coefficient of variation
10^6	1	16.559	17.10	0.544	3.18
	2	17.647			
	3	17.093			
10^5	1	19.377	20.405	0.894	4.38
	2	21.002			
	3	20.835			
10^4	1	23.806	23.909	0.721	3.02
	2	24.676			
	3	23.245			

表 3 黄鼠组织样本 ECTV 检测结果

Table 3 Results of ECTV detection for ground squirrel tissue samples

组织 Tissue	编号 Number	Q-PCR		结果 * Result
		CT 值 CT value	拷贝数 Copies	
肝 Liver	SQLi1	/	/	-
	SQLi2	/	/	-
	SQLi3	36.456	3.357	-
	SQLi4	32.276	53.051	+
脾 Spleen	SQS1	36.184	4.018	-
	SQS2	/	/	-
	SQS3	34.013	16.848	+
	SQS4	/	/	-
肾 Kidney	SQK1	32.157	57.388	+
	SQK2	35.401	6.738	-
	SQK3	34.375	13.266	+
	SQK4	32.155	57.463	+
肺 Lung	SQLu1	34.302	13.921	+
	SQLu2	35.648	5.724	-
	SQLu3	37.000	2.344	-
	SQLu4	34.965	8.985	-
淋巴组织 Lymphatic tissue	SQLy1	31.214	106.967	+
	SQLy2	34.729	10.501	+
	SQLy3	34.666	10.947	+
	SQLy4	33.374	25.693	+
阳性率 Positive Rate		/	/	50% (10/20)

注: “结果 *” 中“-”表示结果为阴性; “+”指结果为阳性。

Note. “-” in “Result” indicates negative result. “+” indicates positive result.

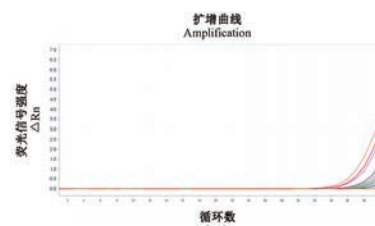


图 4 黄鼠组织 ECTV FQ-PCR 检测的扩增曲线

Figure 4 The amplification curve of ground squirrel tissue samples for ECTV FQ-PCR test

近些年关于 ECTV 的分子学诊断方法得到了广泛关注,分别针对 *ERPv_027* 基因^[6]、核心蛋白 *P4b* 基因^[7]设计了荧光定量 PCR 方法,针对 *CrmD* 基因建立了环介导等温扩增可视化检测方法^[2]。本研究针对 *CrmD* 基因建立 FQ-PCR 方法,*CrmD* 基因位于 ECTV 的两端重复序列中,相当于一个病毒粒子中含有 2 个拷贝的基因,且 *CrmD* 基因与病毒繁殖方式有关^[8],在感染组织中核酸峰度较高,进一步提高了检测的灵敏度。TaqMan 荧光定量 PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便易于高通量检测等优点,具有较高的适用性。

使用建立的 ECTV FQ-PCR 检测实验室 22 份小鼠组织,未检测出阳性,说明国内屏障系统小鼠 ECTV 的感染得到了很好的监测和控制。检测 63 份裸鼯鼠组织 ECTV 结果为阴性,说明裸鼯鼠对 ECTV 敏感性较低,但裸鼯鼠对 ECTV 是否具有抗病毒作用还需要进一步的研究分析。20 份黄鼠组织检测出 ECTV 阳性,说明黄鼠为 ECTV 的易感宿主。小鼠感染 ECTV 时,首先通过皮下感染位点扩散至淋巴结,侵入血液后引发一级病毒血症使病毒进入脾和肝^[8]。本研究在 4 只黄鼠的淋巴结均检测到 ECTV,而在肝、脾、肾、肺组织仅有部分检测出病毒,说明 ECTV 在黄鼠体内有与小鼠相似的感染途径。使用 ECTV FQ-PCR 黄鼠组织的检出率为 50%,但病毒的拷贝数都比较低,而使用血清学方法未检出黄鼠鼠痘抗体阳性可能是由于此时正处于感染初期,为鼠痘抗体产生的空窗期,因此造成假阴性,也可能是由于使用大鼠的酶联免疫吸附实验与黄鼠中鼠痘抗体没有交叉反应,造成阴性结果。黄鼠主要分布于我国北部和西部地区,由于其特有的生物学特性,已被大量用于医学实验和冬眠生理学的实验材料,神经生物学工作者也开始使用黄鼠作为研究对象^[9-10],也应用于病毒性肝炎的实验动物模型^[11]。但是黄鼠的实验动物化研究还存在很多空白,微生物携带情况及致病性研究为黄鼠饲养

规范提供技术支持,有效促进黄鼠的实验动物化进程。同时,黄鼠感染 ECTV 提示其作为新兴实验用动物使用时,需要避免其对实验动物饲养环境的污染,以免引起 ECTV 在实验室小鼠的爆发。

参考文献:

- [1] 田克恭. 实验动物疫病学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [2] 周洁, 陶凌云, 赵丽娟, 等. 鼠痘病毒环介导等温扩增可视化检测方法的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 343-349.
- [3] 付瑞, 岳秉飞, 贺争鸣, 等. 鼠痘病毒 PCR 检测方法的建立及在鼠源性生物制品检定中的应用 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(3): 12-14, 19.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB 14922.2-2011, 实验动物微生物学等级及监测 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [5] 仇保丰, 宋鸿雁, 董蓉莲, 等. 鼠痘、小鼠肝炎和鼠仙台病毒感染症的国内流行情况及防控对策 [J]. 中国动物检疫, 2015, 32(10): 14-19.
- [6] 杜江涛, 戴方伟, 周莎桑, 等. 鼠痘病毒荧光定量 Taqman-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 59-64.
- [7] Cheng W, He X, Jia H, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for detection and quantitation of orthopoxvirus by using Ectromelia virus [J]. Mol Cell Probes, 2018, 38: 45-50.
- [8] 周洁, 赵丽娟, 陶凌云, 等. 鼠痘病毒感染机制及其检测方法研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 160-164.
- [9] 夏长友, 关云涛, 魏炳泉, 等. 达乌尔黄鼠的生物学特性及实验动物化研究概况 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2006, (2): 59-60.
- [10] 王琦, 马宁, 李春明. 达乌尔黄鼠实验动物化研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 211-213.
- [11] 王静, 纪维红, 苏军虎, 等. 达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 生态学研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(8): 33-39.

[收稿日期] 2020-05-29

汤学超,王飞宇,张志钢,等. 两种不同类型左心耳封堵器的动物实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 106-112.
Tang XC, Wang FY, Zhang ZG, et al. Assessment of two different types of left atrial appendage occluder [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 106-112.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.016

两种不同类型左心耳封堵器的动物实验研究

汤学超¹,王飞宇²,张志钢³,秦永文^{4*}

(1.中国人民解放军联勤保障部队第960医院泰安院区心血管内科,山东 泰安 271000; 2.空军杭州特勤疗养中心
疗养二区,杭州 310007; 3.上海中医药大学附属普陀医院心血管内科,上海 200062; 4.上海长海医院
心血管内科,上海 200433)

【摘要】 目的 评价单盘圆柱型及双盘分体型两种不同左心耳封堵器进行动物左心耳封堵的可行性及安全性。**方法** 14只健康实验犬使用单盘圆柱型或双盘分体型左心耳封堵器经股静脉途径进行左心耳封堵,术中左房造影评价封堵后效果;对非预期死亡的实验犬立即进行大体标本检查分析死因,存活的实验犬分别于术后第45天、80天、110天、15月处死,对封堵器表面组织行HE染色及DAPI、CD31免疫荧光评价内皮化程度。**结果** 6只实验犬使用单盘圆柱型封堵器进行左心耳封堵,5条实验犬于术后30 min~8 h死亡,1条实验犬存活至15月后处死;大体心脏解剖发现4条实验犬封堵器表面均存在大量血栓,存活的1条实验犬封堵器表面约1/5未见新生组织覆盖;8只实验犬使用双盘分体型封堵器进行左心耳封堵,7例实验犬完全封堵;术后110 d新生组织完全覆盖封堵器表面,HE及免疫荧光染色呈现完整内膜形成,并可见新生血管。**结论** 单盘圆柱型封堵器植入左心耳后急性血栓发生率及即时死亡率高;双盘分体型左心耳封堵器用于封堵左心耳,器械相关并发症低,左心耳封堵术后4月覆盖盘完全完整内皮化。

【关键词】 心房纤颤;左心耳封堵术;左心耳封堵器;动物实验

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0106-07

Assessment of two different types of left atrial appendage occluder

TANG Xuechao¹, WANG Feiyu², ZHANG Zhigang³, QIN Yongwen^{4*}

(1. Department of Cardiology, the 960th Hospital of PLA, Tai'an 271000, China. 2. Department of Rehabilitation and Physiotherapy, the Second Sub-Center of Air Force Healthcare Center for Special Services, Hangzhou 310007, China.
3. Department of Cardiology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062.
4. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility and safety of two different types of left atrial appendage occluder with a single disc cylinder or double disc device. **Methods** Fourteen healthy canines were subjected to left atrial appendage closure (LAAC) with the single disc cylinder or double disc device percutaneously. Closure was evaluated by left atrial angiography. The cause of death was analyzed by gross specimen examination of dogs that had died unexpectedly. The canines were sacrificed post-procedure at 45, 80, 110 days, and 15 months. Endothelialization of the device surface was evaluated by HE staining, immunofluorescence staining of CD31, and DAPI staining. **Results** Single disc cylinder devices were implanted in six canines, five of which died within 30 min to 8 h post-procedure, and one canine survived

[作者简介] 汤学超(1982—),男,博士研究生,研究方向:心血管相关疾病。E-mail: tang0415@aliyun.com

[通信作者] 秦永文(1952—),男,教授,博士生导师。E-mail: chqinyw@163.com

until 15 months. A large number of blood clots were formed on the device surface in four canines, and one-fifth of the device surface in the surviving canine was not covered by new tissue. Double disc occluders were implanted successfully in eight canines. The left atrial appendage of seven canines was sealed completely and a small residual shunt was observed in one canine immediately post-procedure. New tissue had covered the sealing disc completely on day 110. HE and immunofluorescence staining confirmed complete intima formation and neovascularization within 4 months. **Conclusions** The incidence of acute thrombosis and the mortality rate of LAAC with a single disc device were high. LAAC with double disc devices had less device-related complications and neointima formation was completed by 4 months post-procedure.

【Keywords】 atrial fibrillation; left atrial appendage closure; left atrial appendage occluder; animal experiment

自 2001 年首个左心耳专用封堵器 PLAATO 完成动物实验并应用于人体后,国外先后有 WATCHMAN 封堵器、ACP 封堵器、Occlutech 等封堵器完成动物实验,其中 ACP 封堵器及 WATCHMAN 封堵器先后获得欧洲 CE 及美国 FDA 双认证,并均较为广泛的用于临床,且越来越多的学者认为对于存在抗凝禁忌的非瓣膜性患者,应用 WATCHMAN 左心耳封堵器进行左心耳封堵甚至可以成为预防栓塞并发症的一线方案^[1-2]。国内也有 LAmbre(深圳先健)封堵器和 Lefort 封堵器完成动物实验及临床实验,其中 LAmbre 已经于 2017 年通过中国 CFDA 的审核,开始在国内销售应用^[3-4]。如果按照封堵器结构类型分类,左心耳封堵器可以分为一体化的封堵器(如 WATCHMAN 封堵器及 Occlutech 封堵器等)及分体型的左心耳封堵器(如 ACP 封堵器及 LAmbre 封堵器等)。目前国内外还有许多机构及公司正在研发左心耳封堵器,其结构类型无非也是上述的两种结构^[5]。长海医院心内科自 2004 年就开始了左心耳封堵器的研发,历经单盘草帽、双盘分体等不同形态,最终与上海普实医疗器械科技有限公司共同研发出两种新型左心耳封堵器,分别为双盘分体型左心耳封堵器及单盘圆柱型左心耳封堵器。为进一步探讨两种不同封堵器的安全性及有效性,为下一步封堵器的研发提供参考,特进行动物实验研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康普通级比格实验犬 14 只,其中雄性 8 只,雌性 3 只,月龄 15~22 月,体重 9~12 kg,平均(10.32±0.95) kg,由上海甲干生物科技有限公司[SCXK(沪)2015-0005]提供,实验完成后过渡室观察 3 d 后送回公司,室温下标准饲养[SYXK(沪)2019-0002]。该研究经海军军医大学动物管理委员会批准实验。实验动物处置均符合国家科委

2011 年修订的《实验动物管理条例》,并遵循“减少、替代和优化”3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

速眠新 II 注射液(吉林敦化圣达动物药品有限公司生产);1%丙泊酚注射液(意大利阿斯利康公司生产);依诺肝素钠注射液(法国赛诺菲公司生产);双盘分体型左心耳封堵器(上海普实医疗器械有限公司);单盘圆柱型左心耳封堵器(上海普实医疗器械有限公司);左心耳输送系统(上海普实医疗器械有限公司)等。本实验其它药品及器材均为实验室及导管室常规器材。

双盘分体型封堵器由镍钛合金网编织的固定盘及覆盖盘组成,中间由一个不锈钢环连接,心房侧有一个连接铆可用于与输送钢丝连接。固定盘高度为 5 mm,封堵器整体高度为 8 mm。固定盘周围有 6~8 个一体化雕刻 J 型微刺,内覆 2 层无纺聚酯纤维;覆盖盘的直径较固定盘直径大于 2 mm,盘面内凹,内覆无纺聚酯纤维膜(图 1)。以固定盘直径命名封堵器规格,设置了 16 mm、18 mm、20 mm 三种规格。

单盘圆柱型左心耳封堵器的高度为 6 mm,靠近心房侧的盘面直径大于心耳侧盘面直径 2 mm,盘内缝合两层无纺聚酯纤维膜,封堵器周围有 6~8 个一体化雕刻形成的微刺,心房侧及有一个连接铆(图 2)。以靠近心房侧的盘片直径命名封堵器规格,设置了 16 mm、18 mm 及 20 mm 三种规格。

1.3 实验方法

1.3.1 术前一般处理及麻醉

实验犬实验前 12 h 禁食水。术前使用速眠新 II 0.05 mL/kg+阿托品 0.02 mg/kg 肌肉注射诱导麻醉,待动物麻醉后将实验犬固定在 DSA 床上,前胸及双侧腹股沟区去毛后,常规消毒铺无菌洞巾,穿刺股动脉后给予 1%丙泊酚注射液 1 mg/kg·20 min 维持麻醉。

1.3.2 左心耳封堵术

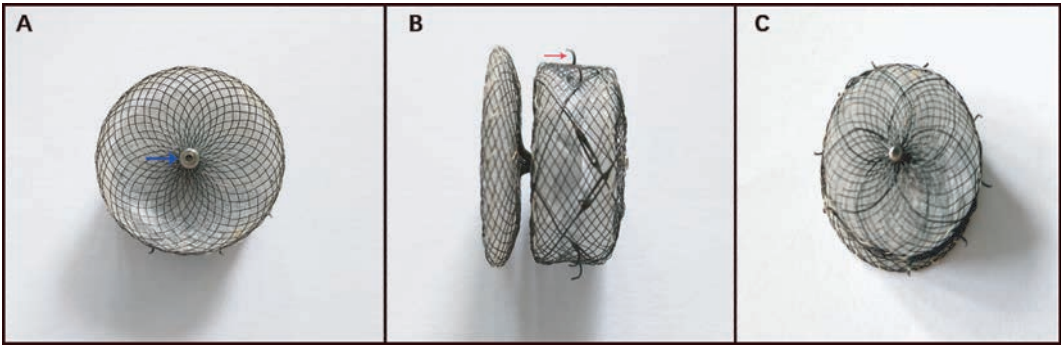


图 1 双盘分体型左心耳封堵器(18 mm 规格)
Figure 1 Left atrial appendage occluder with double-disc(size 18 mm)

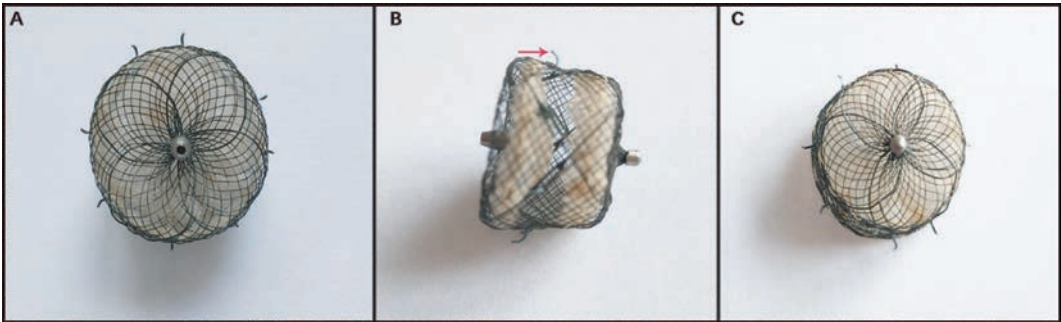


图 2 单盘圆柱型左心耳封堵器(16 mm 规格)
Figure 2 Left atrial appendage occluder with singe disc cylinder(size 16 mm)

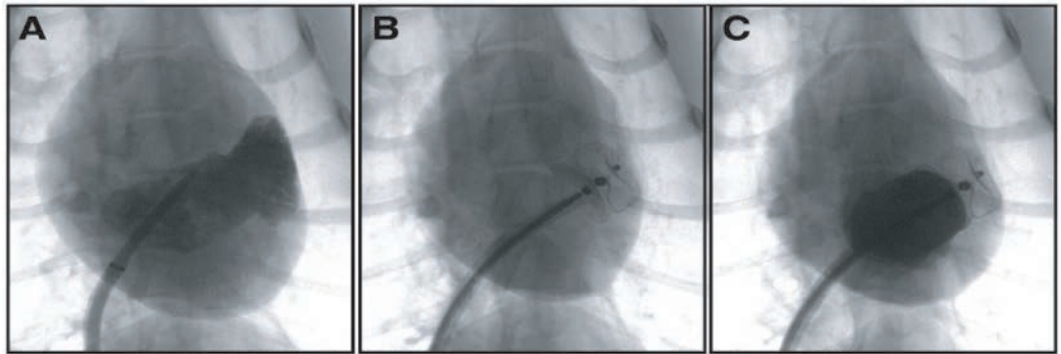


图 3 双盘分体型左心耳封堵器封堵左心耳
Figure 3 LAAC with double-disc occluder

实验犬全身麻醉后平躺固定在 DSA 手术床上,术中给予持续心电监护。穿刺右侧股静脉及左侧股动脉,分别置入 6 F 防漏血管鞘。经股动脉鞘管连接有创动脉压持续监测血压。房间隔穿刺成功后,给予普通肝素 100 IU/kg 全身肝素化,然后经内鞘送入两圈半左房钢丝至左房。沿左房钢丝将 Swartz 鞘送入左房后保留左房钢丝,退出房间隔穿刺鞘。沿左房钢丝送入 10 F 左心耳输送鞘管,退出内鞘。沿左房钢丝将 6 F 猪尾导管送至左心耳,退出左房钢丝。在 RAO25°+CAU15° 投影角度下行左心耳造影,确定左心耳形态及外口内径、着陆区内

径。逆时针旋转猪尾导管并沿猪尾导管将输送鞘管送至左心耳颈部。根据体外测试结果,和实验犬左心耳相对较小的情况,选择比开口最大内径或着陆区最大内径+2 mm 规格的封堵器,使用装载器充分排气后将其送入输送鞘管。
(1)双盘分体型封堵器的释放方法
将封堵器送至输送鞘管头端,固定推送杆,缓慢回撤输送鞘,使封堵器固定盘释放约 1/2。整体前送推送杆、输送鞘及部分释放的固定盘使固定盘送至左心耳颈部或更深处,调整位置合适后继续回撤输送鞘,使固定盘完全释放并固定在左心耳着陆

区;继续回撤输送鞘使覆盖盘释放并将左心耳口部覆盖;牵拉实验证实封堵器位置是否固定牢靠;复查造影显示左心耳是否存在残余分流。确定封堵器位置合适、无残余分流后,释放封堵器(图 3)。

(2) 单盘圆柱型封堵器的释放方法

将封堵器送至输送鞘管前端,固定推送杆,缓慢回撤输送鞘,使封堵器释放约 1/2。整体前送推送杆、输送鞘及部分释放的封堵器送至左心耳颈部或更深处,调整位置合适后继续回撤输送鞘,使封堵器完全释放并固定在左心耳着陆区。牵拉实验证实封堵器位置是否固定牢靠;复查造影显示左心耳是否存在残余分流。确定封堵器位置合适、无残余分流后,释放封堵器(图 4)。

1.3.3 术后动物处理

封堵器释放后监测生命体征 15 min,生命体征稳定后退出鞘管。术后右侧股静脉穿刺部位 8 字缝合包扎,左侧股动脉穿刺结扎止血。实验犬静脉穿刺成功后给予青霉素钠 G80 万单位静脉注射。术后 2~3 d 给予低分子肝素 1000 IU/12 h 皮下注射,青霉素 G80 万单位/12 h 肌肉注射;阿司匹林肠溶片 5 mg/kg 口服直至动物处死。术后实验犬于实验室观察饲养 3 d,观察精神状态、进食、行为及活动能力、大小便情况,实验犬恢复至术前状态后集中饲养。

1.3.4 大体标本检查

非预期死亡的实验犬立即进行大体标本检查,重点观察有无心包积液、封堵器表面血栓情况及封堵器对左上肺静脉及二尖瓣环的影响;存活的试验犬术后分别于第 45 天、80 天、110 天、15 月分别处死实验犬,将左心房剖开观察封堵器表面组织覆盖情况及封堵器与二尖瓣环、左上肺静脉的关系。

1.3.5 组织病理学检查

封堵器表面组织行 HE 染色及 DAPI、CD31 免疫荧光检查评价内皮化程度。HE 染色及荧光染色依托武汉赛维尔生物科技有限公司进行处理。普通组织病理学检查常规经过取材固定、脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、苏木素染细胞核、伊红染细胞质、脱水封片、显微镜镜检、图像采集分析过程。

2 结果

2.1 实验犬左心耳封堵术情况

6 只实验犬使用单盘圆柱型封堵器,其中 2 只实验犬使用 16 mm 规格封堵器,3 只实验犬使用 18

mm 规格封堵器,1 只实验犬使用 20 mm 规格封堵器。所有封堵器植入后左房造影均显示造影剂可充盈至阻隔膜处,但无残余分流至左心耳。

8 只实验犬使用双盘分体型封堵器进行左心耳封堵,其中使用 16 mm 及 18 mm 规格分别为 5 只及 3 只;术中除 1 例实验犬经左房造影证实存在少量残余分流外,其余 7 例均无明显残余分流。1 条实验犬于术后 9 h 死亡,另外 1 条实验犬术后 36 h 死亡,其余 6 条实验犬存活至随访期结束。

2.2 大体标本检查情况

使用单盘圆柱型封堵器进行的左心耳封堵的 6 条实验犬,5 条实验犬于术后 30 min~8 h 死亡;1 条实验犬存活至 15 月后处死。通过对死亡实验犬进行解剖,5 条实验犬术后均未发现心包积液,排除心包填塞导致的死亡。1 例实验犬术后 30 min 死亡,解剖发现左上肺静脉可见肿胀、充血,封堵器完全封堵左心耳,表面无血栓,盘面边缘与二尖瓣环相距 3 mm,与肺静脉开口相距 4 mm。死亡原因考虑封堵器压迫肺静脉导致急性肺水肿。其余 4 条实验犬封堵器表面均存在大量血栓(图 5)。存活的 1 条实验犬 15 月后处死,未见心包积液及心包粘连,左房内观察封堵器表面只见薄层半透明新生组织,且大约 1/5 的表面未见新生组织覆盖(图 6)。使用双盘分体型进行封堵的 8 例实验犬,1 例术后约 20 min 后透视发现封堵器移位,虽然实验犬 30 min 苏醒,但术后 9 h 实验犬死亡。尸检发现封堵器平躺在左心耳内,心耳内及封堵器周围可见血栓形成,并与封堵器粘连在一起;还有 1 例术后 36 h 突发股动脉穿刺部位血肿死亡。其余 6 例实验犬均存活至随访结束,随访时间为 1~15 月。

分别在术后 45 d、80 d、110 d 及 15 月处死实验犬,打开胸腔后观察心包,均未发现心包积液;剖开左心室及左心房,暴露覆盖盘,见覆盖盘未影响二尖瓣及左上肺静脉,覆盖盘表面光滑,无血栓附着。术后第 45 天表面组织为半透明组织,封堵器周围可见肉芽组织形成;术后 80 d 覆盖盘表面可见半透明新生组织,但是未能将连接铆覆盖,周边与心房壁接触部位存在一定的摩擦与溃疡,也有少量肉芽组织形成;术后 110 d、及 15 月覆盖盘表面新生组织明显增厚,连接铆亦被一层薄组织覆盖(图 7)。

2.3 组织病理学及免疫荧光检查

术后 110 d 封堵器表面组织 HE 染色,见细胞排列按照内皮、内皮下层及内膜下层排列,并可见

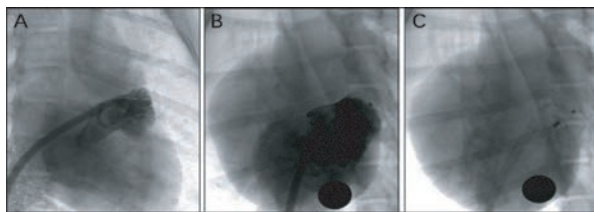
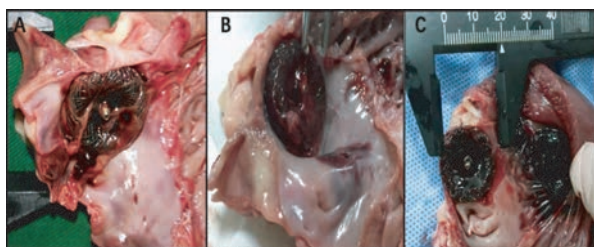


图 4 单盘圆柱型左心耳封堵器封堵左心耳(16 mm)

Figure 4 LAAC with single disc occluder

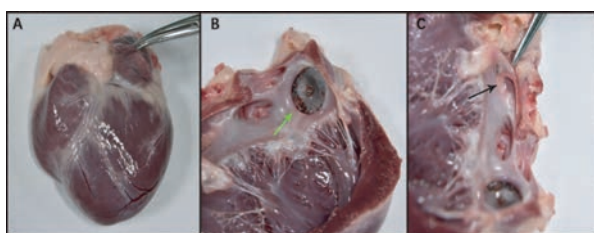


注:封堵器表面血栓形成。

图 5 应用单盘圆柱型左心耳封堵器之死亡犬

Note. Clots formation on the surface of single disc occluder.

Figure 5 Unexpected died canines with single disc occluder for LAAC



注:应用单盘圆柱型左心耳封堵器术后 15 月封堵器表面 1/5 未被新生组织覆盖。

图 6 应用单盘圆柱型左心耳封堵器之存活犬

Note. One fifth of disc was not covered by new born tissue post LAAC with single disc occluder.

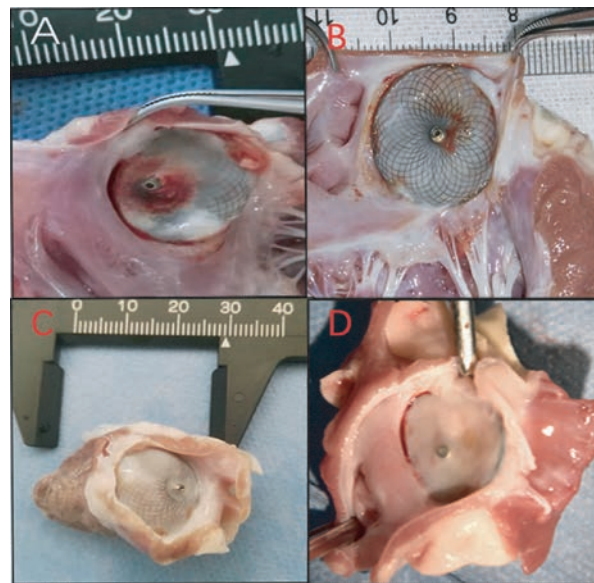
Figure 6 Survived canine with single disc occluder for LAAC

许多新生血管形成,覆盖盘表面组织形成完整的内膜结构。新生组织无明显炎症等异物反应。DAPI (Blue) 及 CD31 (Red) 免疫荧光染色,术后 45 d、80 d 可见 DAPI 及 CD31 阳性的新生内皮细胞;术后 110 d DAPI 及 CD31 阳性细胞数目明显增加(图 8)。

3 讨论

本实验分别对自主设计的两种不同结构的左心耳封堵器进行了安全性的评价,并对封堵系统的可操作性进行了评估。研究结果显示这种单盘圆柱型封堵器结构不合理,需要进一步改进;而双盘分体型封堵器生物相容性好,安全性高。

动物实验早期,我们多采用单盘圆柱型封堵器



注:A:术后 45 d 封堵器表面有半透明组织生成,封堵器周围可见肉芽组织形成;B:术后 80 d 覆盖盘表面半透明新生组织未能将连接处覆盖,周边与心房壁接触部位存在溃疡面,少量肉芽组织形成;C、D:术后 110 d 新生组织完全覆盖封堵器表面。

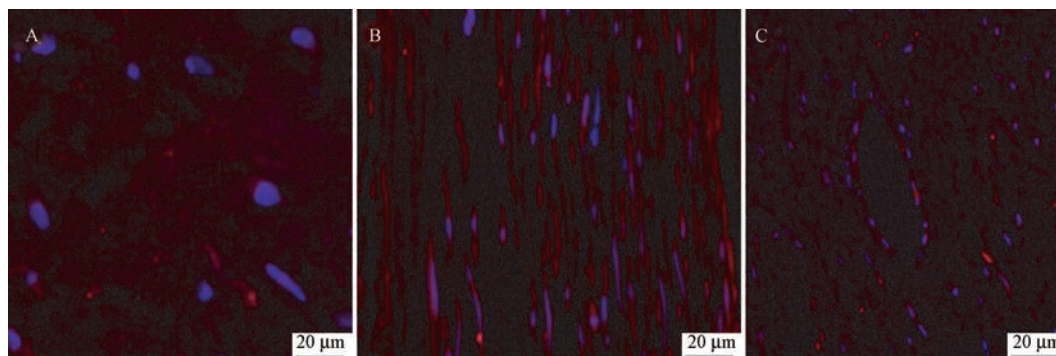
图 7 应用双盘分体型左心耳封堵器之存活犬

Note. A, Semitransparent tissue formatted on the surface of occluder and granulation tissue formatted around the occluder 45 days post procedure. B, The semitransparent new tissue on the surface of disc failed to cover the connection, there was ulcer around the contact part with atrial wall and a small amount of granulation tissue formatted 80 days post procedure. C/D, The new born tissue covered the sealing disc and connection completely 110 days post procedure.

Figure 7 Survived canines with double-disc occluder for LAAC

进行实验犬左心耳封堵,令人遗憾的是,使用单盘圆柱型封堵器进行的左心耳封堵的 6 例实验犬,5 例均在术后 8 h 内死亡。通过对死亡实验犬进行心脏解剖,发现 1 条实验犬因为选择了偏大的封堵器,导致对封堵器的左上肺静脉的压迫、急性左心衰竭死亡;其余 4 例实验犬的封堵器表面存在大量血栓,而在解剖心脏过程中均未发现明显心包积液,考虑血栓栓塞导致死亡的可能性较大。另外,存活的 1 条实验犬即使在术后 15 月进行处死,仍然发现内皮化不完整。

单盘圆柱型封堵器及目前临床应用较为广泛 WATCHMAN 封堵器同为一体化设计的左心耳封堵器,但是它术后急性血栓发生率如此高,内皮化缓慢,考虑与其结构缺陷有关。本单盘圆柱型封堵器为镍钛合金编织的圆柱状,其聚酯纤维阻隔膜内置,当植入左心耳内时编织网与阻隔膜之间存在一



注:A;术后 45 d 可见少许 DAPI 及 CD31 阳性细胞;B;术后 80 天 DAPI 及 CD31 阳性细胞增加;C;术后 110 d 可见新生血管形成(红色荧光为 CD31 阳性、蓝色荧光为 DAPI 阳性)。

图 8 不同时期免疫荧光染色

Note. A, HE and Immunofluorescence staining confirmed DAPI and CD31 positive cells 45 days post procedure. B, DAPI and CD31 positive cells increased 80 days post procedure. C, Neovascularization formatted 110 days post procedure. (CD31 positive in red fluorescence and DAPI positive in blue fluorescence).

Figure 8 Immunofluorescence staining in different periods

定的间隙,血流存在于这个间隙内,因此容易造成血栓形成;而使用聚四氟乙烯外覆的 WATCHMAN 封堵器,其表面为光滑的阻隔膜直接面对血流,因此不易形成血栓。因此,从单盘圆柱型封堵器的动物实验,我们得到的经验教训是,对于一体化的左心耳封堵器,不管采取何种阻隔膜、何种形态,其面向心房侧的结构需采取紧密结合的方式,阻隔膜与编织网内不能存在间隙,这样可能会减少血栓的形成,加快内皮化。

采用双盘分体型左心耳封堵器进行动物实验,结果则令人欣慰。8 例实验犬均成功进行了左心耳封堵,虽然发生 2 例非预期死亡,但是根据尸检结果考虑封堵器移位及股动脉血肿,均为操作相关死亡。其余 6 例使用双盘分体型封堵器进行左心耳封堵的实验犬未再发生非预期的死亡。对术后存活的实验犬定期处死后,观察封堵器的微刺对左心耳壁损伤均较小,未发现心包积液、心脏穿孔及肺动脉穿孔的情况。

应用双盘分体型封堵术后第 45 天及第 80 天覆盖盘表面就有光滑的新生组织形成,但是未能将覆盖盘的连接铆完全覆盖;术后 110 d 封堵器覆盖盘表面新生组织完全覆盖连接铆。对术后 110 d 的覆盖盘表面新生组织进行 HE 染色、免疫荧光检查,证实新生组织为完整的内膜,包括内皮、内皮下层及内膜下层。这种完全及完整内膜化既可以达到隔离心耳血栓的作用,而且还可以避免覆盖盘盘面血栓形成,理论上在内膜化完成后可无需使用抗栓药物预防器械相关血栓形成。覆盖盘完全完整内膜

化得益于这种紧密内覆式覆盖盘的处理,这为我们以后进行左心耳封堵器的研发中具有一定的意义。从对不同时间段封堵器表面内皮化及封堵器与周围组织的炎症及排异现象进行分析,我们认为双盘分体型封堵器的生物相容性好,植入体内安全。

由于实验犬的数量有限,因此未能对封堵术后覆盖盘面的内膜化过程进行详细的跟踪,但是曾经有学者作了相关的研究并进行了详细的阐述。Schwartz 等^[6]观察了 9 条实验犬及 4 例人体 WATCHMAN 封堵器植入左心耳后组织愈合过程,通过对实验犬植入封堵器 3 d、45 d、90 d 三个不同时间段及人左心耳封堵器植入 139 d、200 d、480 d、852 d 后非器械相关死亡后心脏组织检查分析认为:1.封堵器表面组织覆盖遵循以下过程,首先富含纤维蛋白的血栓形成,继而发生含有巨噬细胞及淋巴细胞的肉芽肿炎症反应使血栓机化,然后在蛋白多糖-胶原纤维基质中形成由平滑肌细胞组成的血管翳,表面内皮化进程伴随有持续血栓吸收,最后类似于心内膜的内膜化完成;2.这种组织愈合与冠脉支架植入后内皮形成、ASD、PFO 等封堵器植入后的内皮修复一致;3.实验犬可以在 45 天内完成,但人体的修复要比实验犬的修复慢。根据 Schwartz 等^[6]的研究结果,可以推断封堵器表面的内膜化时间可能与封堵器的覆盖盘面积大小关系不大,而与连接铆的长度相关。张志钢等^[7]、储国俊等^[8]曾对双盘状封堵器先后进行动物实验,证实覆盖盘能在 1 月形成一层透明的内皮,3 月内皮明显增厚,但是它们的连接铆均较长,连接铆较难完全内皮化;第

一代 ACP 左心耳封堵器同样存在连接铆较长的问题,因此器械表面血栓发生率较高^[9]。

双盘分体型左心耳封堵器特殊的设计理念使得该封堵器既可以实现盖口封堵,也可以实现堵口封堵,因为覆盖盘的内凹钝化,使得即使封堵器拽向心耳颈部,其盘片边缘对心耳壁的切割作用也被内凹的盘片所化解。虽然双盘分体型既可以堵口,也可以封口,但是何种封堵方式有利于内皮化,对周围结构影响较小,封堵方式对临床预后又有什么区别,目前尚无头对头对照研究,只有少数学者对 WATCHMAN 及 ACP 封堵器所发表的数据进行荟萃分析及文献分析,结果显示两者安全性及有效性相似,但是需要进一步的动物实验研究及临床对照研究^[10-12]。从双盘分体型封堵器的动物实验结果发现,只有 1 条实验犬实行的是盖口封堵,80 d 后解剖虽然未发现明显的血栓,但是覆盖盘与心房组织并未能融合,心房壁被磨损的痕迹明显,因此这些地方可能比较容易形成血栓。此外张志钢等^[7]的研究也存在盖口封堵时心房壁被磨损的痕迹。而双盘分体型动物实验的其余 6 条实验犬植入的封堵器覆盖盘盘面均为堵塞心耳颈部,术后不同时间段均发现其与周围组织结构融合较好。我们的动物实验也证实了这种情况,因此从这些结果分析,双盘分体型封堵器堵口封堵策略可能利于覆盖盘与周围组织的融合,减少封堵器表面血栓形成,但需要更多的动物实验及临床实验来验证。

存活的实验犬封堵术后短期使用低分子肝素抗凝,然后使用阿司匹林单联抗血小板聚集治疗,随访中未发现血栓事件发生。围术期的这种抗栓策略,在以后进一步的临床应用中具有一定的参考价值,为应用双盘分体型进行 LAAC 术后的预防血栓方案提供了动物实验依据。

在应用双盘分体型封堵器进行左心耳封堵的动物实验过程中,即使在无食道超声引导下,都可以取得很好的封堵效果,即时手术成功率高,同时还不会影响二尖瓣及左上肺静脉。因此双盘分体型封堵器封堵实验犬的左心耳,操作容易,成功封堵率高;对不同时间段封堵器表面组织新生组织的检查,认为完全完整内膜化可在 4 月内完成,生物相容性好。因此双盘分体型封堵器封堵左心耳可行,有希望在临床进一步应用。而单盘圆柱型左心耳封堵器由于存在设计的缺陷,围术期试验犬死亡率高,因此需要进一步的改进,不适合在临床应用。

本实验的主要不足:实验动物偏少,所选实验犬偏小,实验犬左心耳的大小相近,只使用了 16 mm~20 mm 规格的封堵器,缺乏较大规格封堵器的可行性及封堵效果的评价,以及完全内膜化时间的评价;本研究使用的实验犬均为健康实验犬,其心脏结构及心房、左心耳大小及左心耳壁的厚度与房颤犬存在一定的差异。

参考文献:

- [1] Saw J. Percutaneous left atrial appendage closure for stroke prevention [J]. Trends Cardiovasc Med, 2016, 26(2): 200-201.
- [2] Wintgens LIS, Maarse M, Swaans MJ, et al. The WATCHMAN left atrial appendage closure device for patients with atrial fibrillation: current status and future perspectives [J]. Expert Rev Med Devices, 2020, 17(7): 615-626.
- [3] Lam YY. A new left atrial appendage occluder (Lifetech LAMbre Device) for stroke prevention in atrial fibrillation [J]. Cardiovasc Revasc Med, 2013, 14(3): 134-136.
- [4] 李双, 徐大春, 朱梦云, 等. 三种左心耳封堵器的初步植入经验 [J]. 上海医学, 2015, 38(3): 189-192, 封三.
- [5] 孟越之, 吴晓霞, 王喜福, 等. LAMax~(TM) plus 左心耳封堵器封堵犬双叶宽开口左心耳的可行性和即刻有效性 [J]. 武警医学, 2016, (6): 589-592, 596.
- [6] Schwartz RS, Holmes DR, Van Tassel RA, et al. Left atrial appendage obliteration: mechanisms of healing and intracardiac integration [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2010, 3(8): 870-877.
- [7] 张志钢. 经皮左心耳封堵器械研制及动物实验研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [8] 储国俊. 新型镍钛合金封堵器封堵犬左心耳动物实验研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [9] Fauchier L, Cinaud A, Brigadeau F, et al. Device-related thrombosis after percutaneous left atrial appendage occlusion for atrial fibrillation [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(14): 1528-1536.
- [10] Basu RI, Khanra D, Shah S, et al. Meta-Analysis Comparing WatchmanTM and Amplatzer Devices for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation [J]. Front Cardiovasc Med, 2020, 7: 89.
- [11] Kar S, Hou D, Jones R, et al. Impact of Watchman and Amplatzer devices on left atrial appendage adjacent structures and healing response in a canine model [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2014, 7(7): 801-809.
- [12] Ledwoch J, Franke J, Akin I, et al. WATCHMAN versus ACP or Amulet devices for left atrial appendage occlusion: a sub-analysis of the multicentre LAARGE registry [J]. Euro Intervention, 2020, 16(11): e942-e949.

[收稿日期] 2020-05-23

何山川, 钱粉红. 竞争性内源 RNA 在支气管哮喘中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 113-119.

He SC, Qian FH. Research progress of competing endogenous RNA in bronchial asthma [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 113-119.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.017

竞争性内源 RNA 在支气管哮喘中的研究进展

何山川, 钱粉红*

(江苏大学附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 镇江 212000)

【摘要】 支气管哮喘是一种以气道炎症、气道高反应性和气道重塑为特征的慢性气道疾病, 常表现为反复的喘息、咳嗽和胸闷。近期许多研究表明, lncRNA 和 circRNA 可通过与 microRNA 应答元件与靶 miRNA 分子发生相互作用, 形成竞争性内源 RNA 调控网络, 参与转录后水平基因表达的调控, 影响哮喘发生发展过程。本文就 ceRNA 调控机制及其对哮喘的影响进行综述。

【关键词】 哮喘; 竞争性内源 RNA; 长链非编码 RNA; 微小 RNA; 环状 RNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0113-07

Research progress of competing endogenous RNA in bronchial asthma

HE Shanchuan, QIAN Fenhong*

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

【Abstract】 Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease characterized by airway inflammation, hyper-responsiveness, and remodeling, which are manifested as recurrent wheezing or coughing and chest distress. Recent studies indicate that lncRNAs and circRNAs competitively sponge miRNAs via microRNA response elements, form a competing endogenous RNA regulatory network, and therefore regulate post-transcriptional gene expression and play a major regulating role in the development and progression of asthma. This article reviews the mechanisms of ceRNA and its effects on asthma.

【Keywords】 asthma; competing endogenous RNA; long non-coding RNA; microRNA; circular RNA

支气管哮喘(简称哮喘)是一种遗传因素与环境因素共同参与的免疫学疾病, 是最常见的慢性气道炎症性疾病之一, 临床表现为反复发作的喘息、气急、胸闷或咳嗽等症状, 常在夜间及凌晨发作或加重, 多数患者可自行缓解或经治疗后缓解。哮喘涉及平滑肌细胞、气道上皮细胞、T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、肥大细胞等多种细胞及细胞组分, 其特征是气道炎症、气道高反应性和气道重塑^[1]。据统计, 中国 20 岁以上成人哮喘总体患病率为 4.2%, 其中 71.2% 的哮喘患者从未得到明确

诊断, 只有 5.6% 的哮喘患者接受了吸入糖皮质激素治疗^[2]。因此, 深入研究探索哮喘的发病机制, 寻找辅助诊断标志物和治疗靶标, 是目前研究的重要方向。竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 假说由 Salmena 等^[3]提出, 目前认为, 参与 ceRNA 调控网络的 RNA 包括信使 RNA (message RNA, mRNA)、微小 RNA (microRNA, miRNA)、假基因 (pseudogene)、环状 RNA (circular RNA, circRNA) 和长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 等, 其中 miRNA 是该网络的核心^[4]。

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81370119); 镇江市科技支撑计划 (SH2015044)。

【作者简介】 何山川 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 呼吸系统疾病。E-mail: hesc999@qq.com

【通信作者】 钱粉红 (1971—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 呼吸系统疾病。Email: zhaoqian604@126.com

研究表明, mRNA、假基因、lncRNA 和 circRNA 可作为内源性 miRNA 分子海绵, 通过 miRNA 结合位点竞争性结合相同的 miRNA, 从而调控基因表达^[5], 并在癌症、心血管疾病和糖尿病等多种疾病中发挥重要作用。本文现就 ceRNA 调控机制及其在哮喘中的研究进展进行综述。

1 ceRNA 调控机制概述

miRNA 是一类长度大约在 20~22 个核苷酸且具有在转录后水平调控基因表达功能的非编码 RNA。miRNA 可与其靶 mRNA 的 3' 端非翻译区 (untranslated region, UTR) 结合, 导致翻译抑制和 (或) mRNA 降解^[6]。miRNA 应答元件 (miRNA response element, MRE) 是指 mRNA、lncRNA、circRNA 等其他类型的 RNA 转录本上与 miRNA 互补性结合的一段序列, 这种结合通常会抑制目标基因的表达^[5]。在 ceRNA 调控机制中, MRE 是各种 RNA 转录本交流的媒介, mRNA、lncRNA、circRNA 等转录本均通过由 MRE 介导的“语言”进行通讯, 即具有相同 MRE 的 RNA 分子通过竞争性结合相同的 miRNA 来调控 miRNA 靶 mRNA 的表达水平, 从而构成庞大的调控网络。Ebert 等^[7]报道人工合成含有多个相同的 MRE 的 miRNA“海绵”能够特异且有效地抑制 miRNA 功能。而 ceRNA 作用机制与人工合成的 miRNA“海绵”大致相同, 可靶向结合 miRNA 并抑制 miRNA 的活性, 所以也被称为内源性 miRNA 海绵。

理论上, 任何包含 MRE 序列的 RNA 转录本 (包括 mRNA) 均可作为 ceRNA, 并通过竞争性结合同一种 miRNA 影响各自的表达水平^[5], 其中 lncRNA 和 circRNA 作为 ceRNA 已被实验证实。lncRNA 是一类长度大于 200 个核苷酸、不具备编码蛋白质功能的 RNA 分子, 相当多的研究表明, lncRNA 在炎症反应、细胞恶性转化和肿瘤转移等病理生理过程中发挥调控基因表达的关键作用^[8-10]。在呼吸系统疾病研究领域, 有研究报道 lncRNA 在哮喘、非小细胞肺癌、特发性肺纤维化等疾病中作为 ceRNA 发挥调控作用, 导致疾病进展^[11-13]。circRNA 是一类闭环状非编码 RNA, 大量存在于真核细胞转录组中, 参与转录和转录后基因的表达调控^[14]。由于 circRNA 不易被核酸外切酶降解, 且单个分子可包含多个 MRE 序列, 故较线性 RNA 分子更高效、更持久地发挥 ceRNA 功能^[15]。Hansen 等^[16]鉴定了一

种称为 CDR1as (小脑变性相关蛋白 1 反义转录物, 或称 ciRS-7) 的 circRNA, 在其序列上有超过 60 个 miR-7 结合位点, 可吸附 miR-7 发挥其“内源性海绵”作用, 抑制 miR-7 的活性, 在斑马鱼实验中 CDR1as 以类似于“敲除 miR-7”的方式阻碍了中脑发育^[15]。还有研究发现, 转录自 Y 染色体性别决定区基因的 circRNA, 包含 16 个可结合 miR-138 的 MRE, 能够负调控 miR-138 的表达^[16]。目前 circRNA 已被证实存在于心肌纤维化^[17]、糖尿病^[18]和类风湿性关节炎^[19]等疾病中具有 miRNA 分子海绵的功能。

2 ceRNA 调控支气管哮喘的发生发展

2.1 ceRNA 调控气道平滑肌细胞增殖

气道平滑肌细胞 (airway smooth muscle cell, ASMC) 是呼吸道的重要组成部分, ASMC 过度增生和肥大, 会导致气道增厚和变窄甚至气道阻塞, 故 ASMC 在哮喘、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等慢性呼吸道疾病的气道重塑形成过程中的起关键作用。在病理状态下, ASMC 由于受到各类细胞因子的刺激, 处于细胞活性和增殖能力增加的状态^[20], 同时 ASMC 可以通过释放多种蛋白酶、各型炎症因子和趋化因子参与气道炎症反应^[21]。

目前已有多项研究揭示了相关 lncRNA 参与 ASMC 的增殖。Zhang 等^[22]发现 lncRNA BCYRN1 可通过上调瞬时感受器电位通道 1 的表达来促进哮喘模型大鼠 ASMC 的增殖和迁移。进一步研究发现卵清蛋白致敏大鼠的 ASMC 中 lncRNA BCYRN1 表达增加, miR-150 表达降低, 且 lncRNA BCYRN1 水平与 miR-150 负相关, RNA pull-down 实验证实 lncRNA BCYRN1 可与 miR-150 特异性结合, 促进 ASMC 的增殖和迁移, 而五味子乙素 (Schisandrin B) 可逆转这一过程^[23]。Lin 等^[24]发现 lncRNA TUG1 在哮喘模型大鼠 ASMC 中的表达增加, 同时伴有 miR-590-5p 表达降低, 经过表达及敲减实验证实, lncRNA TUG1 表达与 miR-590-5p 呈负相关, lncRNA TUG1 可作为 ceRNA 吸附 miR-590-5p, 调节 miR-590-5p 的靶基因成纤维细胞生长因子 1 (fibroblast growth factor 1, FGF1) 的表达水平。过表达的 lncRNA TUG1 通过 lncRNA TUG1/miR-590-5p/FGF1 轴促进 ASMC 的增殖和迁移, 并抑制 ASMC 凋亡。另一项研究显示^[25], lncRNA GAS5 在哮喘模型

大鼠 ASMC 中表达水平升高并可促进 ASMC 增殖, lncRNA GAS5 能作为 miRNA 海绵吸附 miR-10a, 调节脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的表达。miR-10a 能直接结合 BDNF 的 3'端 UTR 区, 抑制 BDNF 表达。过度表达的 miR-10a 可使有丝裂原诱导的 ASMC 增殖减少 50%, 而抑制 miR-10a 使 ASMC 增殖能力增加 40%。敲低 lncRNA GAS5 能提高 miR-10a 的表达水平并显著降低其靶基因 BDNF 的表达, 抑制 ASMC 的增殖, 敲低 lncRNA GAS5 基因的哮喘小鼠气道反应性明显降低^[26]。

在人来源的 ASMC 中同样存在 ceRNA 调控机制。Perry 等^[27]报道在体外用地塞米松和胎牛血清培养人 ASMC 后, 其 mRNA、miRNA 和 lncRNA 的表达谱发生改变, 有 4 种 lncRNA (RP11-46A10.4、LINC00883、BCYRN1 和 LINC00882) 表达上调, 推测这些 lncRNA 可作为目标 miRNA 分子 (miR-150、miR-371-5p、miR-940 和 miR-1207-5p) 的分子海绵发挥调控作用, 其中 lncRNA BCYRN1 和 miR-150 的相互作用关系已在动物模型中被证实。血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等有丝分裂原通过诱导 ASMC 过度增殖, 促进哮喘气道重塑^[28]。Lin 等^[29]用 PDGF-BB 处理人 ASMC 后, 发现 lncRNA MALAT1 表达量增加, 并促使 ASMC 发生增殖和迁移。荧光素酶报告实验证实 lncRNA MALAT1 与 miR-150 存在靶向结合作用, 而 miR-150 则靶向翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 调节信号蛋白 Akt 的磷酸化水平。敲低 lncRNA MALAT1 可通过 miR-150/eIF4E 通路抑制 ASMC 增殖和迁移。Liu 等^[30]发现 lncRNA LINC00882 在 PDGF 处理的人 ASMC 中呈高表达, lncRNA LINC00882 可与 miR-3619-5p 结合并负性调节 miR-3619-5p 的表达。miR-3619-5p 靶向 β -连环蛋白 (β -catenin) 调节 ASMC 的增殖。敲减 lncRNA LINC00882 则显著地抑制了 ASMC 的增殖。这表明 lncRNA LINC00882 通过吸附 miR-3619-5p 促进 ASMC 增殖。

2.2 ceRNA 调控 CD4⁺T 细胞免疫反应

目前认为 CD4⁺T 细胞是哮喘气道炎症的重要参与者^[31]。根据表型和功能的不同可将 CD4⁺T 细胞分为辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 和调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 等。Th 细胞可进一步细分为 Th1 细胞、Th2 细胞和 Th17 细胞等亚群, 可分泌各型细胞因子

参与哮喘发病。

Th2 型细胞因子 (如 IL-4、IL-5、IL-13 等) 在哮喘气道炎症中的重要性已被广泛接受。研究显示^[32], Th 细胞向 Th2 细胞的转化导致 Th1 型和 Th2 型细胞因子失衡, Th2 细胞过度激活, 从而促进哮喘的发生和发展, 抑制 Th2 型细胞因子释放或提高 Th1/Th2 比值可能有助于缓解哮喘相关炎症。一项来自 Liang 等^[33]的研究纳入了 772 例哮喘患者和 441 例健康对照者。在哮喘组患者外周血 CD4⁺T 细胞中检测到高表达的 lncRNA MALAT1 和低表达的 miR-155。lncRNA MALAT1 表达水平与 Th1/Th2 比值及转录因子 T-bet/GATA3 比值呈负相关关系, 而 miR-155 表达水平与 Th1/Th2 比值和 T-bet/GATA3 比值呈正相关。lncRNA MALAT1 与 miR-155 互补结合, 负向调控 Th2 炎性因子的表达, 参与调节 Th1/Th2 平衡。

亦有研究报道 circRNA 可作为 ceRNA 参与哮喘 Th2 型炎症。Huang 等^[34]发现哮喘患者外周血 CD4⁺T 细胞中的 circRNA has_circ_0005519 较健康人表达增加, 且 has_circ_0005519 表达水平与 has-let-7a-5p 表达水平负相关, 实验证实 has_circ_0005519 竞争性结合 has-let-7a-5p 并促进 IL-13 和 IL-6 表达, 从而影响哮喘发展。另外, 在哮喘患者的外周血单个核细胞中也检测到 has_circ_0005519 表达升高。

Th17 细胞是 Th0 细胞在 TGF- β 、IL-6、IL-23 作用下分化产生的表达孤儿核受体 γ t (nuclear orphan receptor γ t, ROR γ t) 的 CD4⁺T 细胞亚群, Th17 细胞可通过分泌 IL-17 等细胞因子发挥强大的促炎作用。Treg 细胞是具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群, 具有限制 T 细胞免疫反应的功能。在正常机体状态下, Treg 和 Th17 细胞相互拮抗, 处于平衡状态, 而 Treg/Th17 的失衡在哮喘的发展中起着重要作用^[35]。Qiu 等^[36]报道, 在人外周血 CD4⁺T 细胞中, lncRNA MEG3 可作为 ceRNA 吸附 has-miR-17 调节 ROR γ t 表达, 从而影响哮喘患者的 Treg/Th17 平衡。其研究发现, 严重哮喘患者 CD4⁺T 细胞中 lncRNA MEG3 水平较正常人显著升高, 而 miR-17 水平较正常人降低。lncRNA MEG3 表达水平与 Th17 占 CD4⁺T 细胞百分比、IL-17 水平、IL-22 水平及 ROR γ t 的 mRNA 和蛋白水平正相关。miR-17 通过靶向 ROR γ t 调节 Treg/Th17 比值。敲低 lncRNA MEG3 可增加 miR-17 的表达水平, 并相应地降低 ROR γ t

表达水平,从而调控 Th17 细胞功能。

2.3 ceRNA 调控巨噬细胞极化

肺巨噬细胞存在于肺泡腔和肺间质中,发挥吞噬呈递抗原、分泌炎症介质及参与免疫应答的功能。巨噬细胞有 3 种表型,M1 型巨噬细胞具有促炎作用,M2 型巨噬细胞具有抗炎和免疫调节作用,调节性巨噬细胞(也称为 M2 样巨噬细胞)可在免疫反应后限制炎症进展。巨噬细胞极化可能与哮喘关系密切,研究发现巨噬细胞的活化以及向 M1 表型转化在哮喘的发展过程中起着重要作用^[37]。

Zhong 等^[38]报告 PM2.5 能诱导巨噬细胞向 M1 表型转化,并释放 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等多种促炎因子^[39],在暴露于 PM2.5 的小鼠肺组织中,885 个 lncRNA 分子和 142 个 circRNA 分子的表达水平发生改变。其中 lncRNA NONMMUT065867, lncRNA NONMMUT064312, lncRNA NONMMUT018123 的表达显著上调, circRNA CBT15_circR_1011, circRNA mm9_circ_005915 的表达显著下调,进一步分析显示这些非编码 RNA 与 TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、IL-1 β 、IL-6 等促炎细胞因子和 NLRP3 炎性小体相关。

Shang 等^[40]对小鼠哮喘模型的研究发现, circRNA mmu_circ_0001359 作为 miR-183-5p 的内源性 miRNA 海绵,增强了转录因子 FoxO1 信号介导的 M2 样巨噬细胞活化作用。体外实验和在体实验中均发现富含 mmu_circ_0001359 的外泌体通过 mmu_circ_000135/miR-183-5p/FoxO1 轴减少 M1 表型相关的细胞因子(iNOS、TNF- α 、IFN- γ)表达,降低炎症水平并减缓气道重塑。这项研究提示,可以利用 lncRNA 或 circRNA 修饰的外泌体以 ceRNA 调控网络为靶点开发哮喘新型疗法。

2.4 ceRNA 调控气道上皮细胞炎症反应

气道上皮细胞作为肺与外界环境接触的第一道屏障,在维持气道结构和功能完整性及参与气道免疫反应中起到重要作用。应激状态下的气道上皮细胞分泌的炎性介质作用于自身、抗原提呈细胞和其他气道支持细胞等,参与气道炎症的发生。Dai 等^[41]发现气管内滴注脂多糖诱导的炎症模型大鼠肺组织 lncRNA MALAT1 表达量升高, miR-146a 表达量下降,在用脂多糖诱导大鼠发生肺部炎症前注射小干扰 RNA 敲减 MALAT1 可降低大鼠肺损伤评分和 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的表达,同时 miR-146a

表达量增加;体外实验证实,在鼠肺上皮细胞和鼠肺泡巨噬细胞中, lncRNA MALAT1 通过吸附 miR-146a 调控炎性细胞因子分泌。另一项涉及 COPD 发病机制的研究指出,在经香烟烟气提取物处理的人支气管上皮细胞中, lncRNA TUG1 表达升高, lncRNA TUG1 通过特异性结合 miR-145-5p 促进双特异性磷酸酶 6 (dual-specificity phosphatase 6, DUSP6) 的表达,促进气道炎症和气道重塑^[42]。考虑到气道上皮细胞在 Th2 型免疫反应和气道黏液细胞化生中的重要作用,推测 lncRNA TUG1 在哮喘气道上皮细胞中也可作为 ceRNA 发挥调控作用。

2.5 ceRNA 与糖皮质激素抵抗

临床上部分哮喘患者给予大剂量糖皮质激素后仍不能得到理想的治疗效果,此类哮喘被定义为激素抵抗型哮喘。ASMC 中的 ceRNA 调控机制可能与糖皮质激素抵抗相关。既往研究发现 lncRNA PVT1 在非重症哮喘患者 ASMC 中表达降低,在糖皮质激素抵抗的严重哮喘患者中表达升高,且 lncRNA PVT1 与 ASMC 的增殖和 IL-6 合成释放相关^[43]。Yu 等^[44]利用大鼠哮喘模型证实 lncRNA PVT1 可作为 miR-203a 的分子海绵发挥作用,负向调节 miR-203a 表达水平并正向调节其下游转录因子 E2F3 的表达,从而促进 ASMC 的增殖和迁移,而 α -细辛脑则通过 lncRNA PVT1/miR-203a/E2F3 轴抑制 ASMC 的增殖。另有研究发现 lncRNA CASC7 可能是与糖皮质激素敏感性相关的转录本。Liu 等^[45]在严重哮喘患者的 ASMC 中检测到低表达的 lncRNA CASC7,而 miR-21 表达水平升高、Akt 活性上调。过表达 lncRNA CASC7 通过靶向结合 miR-21 抑制了 PI3K/Akt 信号通路,促进糖皮质激素受体磷酸化,从而增加了糖皮质激素的敏感性。

2.6 生物信息学预测哮喘相关的 ceRNA

Chen 等^[46]通过高通量测序技术获得了来自非重症哮喘患者、严重哮喘患者和健康人群的 mRNA、miRNA 和 lncRNA 表达谱数据,初步确定 has-miR-133a-3p、has-miR-3613-3p 和 has-miR-93-5p 是哮喘病情进展相关的 miRNA-mRNA-lncRNA 网络的关键 miRNA。在另一项研究中,Liao 等^[47]利用 Gene Expression Omnibus、StarBase、DrugBank 等在线数据库及生物信息学工具构建哮喘相关的 ceRNA 网络,确定了 5 个关键 lncRNA (MALAT1, MIR17HG, CASC2, MAGI2-AS3, DAPK1-IT1),并针对对应的 ceRNA 靶点预测了 8 种潜在靶向药(他莫昔芬,鲁

索替尼,维甲酸,槲皮素,达沙替尼,左卡尼汀,尼氟酸,格列本脲)。目前利用一些非编码 RNA 数据库可以预测与哮喘相关的 ceRNA 网络,但是不同的预测算法得到的结果不尽相同,且有关研究涉及的样本量普遍较少,故这种相关关系仍需要实验验证和临床大样本的检验。

3 ceRNA 与哮喘临床诊疗

Li 等^[48]利用 RT-qPCR 检测哮喘急性发作患者、缓解期哮喘患者、健康人血浆中 lncRNA NEAT1 和 miRNA-124 的表达,发现哮喘急性发作患者的 lncRNA NEAT1 表达量高于另外两组,且与 TNF- α 、IL-1 和 IL-17 水平及病情严重程度呈正相关,与 IL-10 水平及肺功能负相关;而 miR-124 表达量与致炎因子水平及严重程度负相关,与肺功能呈正相关,尤其是在哮喘急性发作患者中。依据 lncRNA NEAT1 与 miR-124 的负相关关系,推测 lncRNA NEAT1 可能是通过吸附 miR-124 来调节基因表达,

导致哮喘病情加重。同样地, Ye 等^[49]发现血浆中 lncRNA ANRIL 表达水平与 miR-125a 表达水平负相关, lncRNA ANRIL 与 miR-125a 比值与炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17) 水平、肺功能及病情严重程度相关,且哮喘发作患者的 lncRNA ANRIL/miR-125a 比值高于缓解期患者。可以设想的是,在未来的研究中如能确定哮喘中具有特异性的 ceRNA 调控网络,那么只需检测其中的非编码 RNA 表达水平就可将哮喘患者和其他症状类似的非哮喘患者区分开来,这将有助于哮喘早期诊断和干预,以及哮喘疑似病人的明确诊断。

4 总结与展望

目前哮喘中已知的 ceRNA 见表 1。随着核酸功能研究和检测技术的不断发展, lncRNA 和 circRNA 已经成为国内外研究的热点,但是不可忽视的是,目前在 ceRNA 研究领域仍存在一些问题和难点,比如生理条件下单个转录本的表达变化不足以抑制

表 1 参与支气管哮喘病理机制的竞争性内源性 RNA
Table 1 ceRNAs involved in the pathogenesis of bronchial asthma

竞争性内源性 RNA ceRNAs	吸附的 miRNA miRNA sponge	目标基因 Target genes	物种/细胞 Species/Cells	功能 Functions	参考文献 References
lncRNA					
lncRNA BCYRN1	miR-150	?	大鼠/气道平滑肌细胞 Rat/ASMC	ASMC 增殖和迁移 The proliferation and migration of ASMC	[23]
lncRNA TUG1	miR-590-5p	FGF1	大鼠/平滑肌细胞 Rat/ASMC	ASMC 增殖和迁移 The proliferation and migration of ASMC	[24]
lncRNA GAS5	miR-10a	BDNF	大鼠/气道平滑肌细胞 Rat/ASMC	ASMC 增殖 The proliferation of ASMC	[26]
lncRNA MALAT1	miR-150	eIF4E	人/气道平滑肌细胞 Human/ASMC	ASMC 增殖和迁移 The proliferation and migration of ASMC	[29]
lncRNA00882	miR-3619-5p	β -catenin	人/胚胎气道平滑肌细胞 Human/fetal ASMC	ASMC 细胞增殖 The proliferation of ASMC	[30]
lncRNA PVT1	miR-203a	E2F3	大鼠/气道平滑肌细胞 Rat/ASMC	ASMC 增殖和迁移 The proliferation and migration of ASMC	[44]
lncRNA CASC7	miR-21	PTEN	人/气道平滑肌细胞 Human/ASMC	调控 PI3K/AKT 信号传导通路、糖皮质激素抵抗相关 Regulating PI3K/AKT signaling pathway; corticosteroid resistance	[45]
lncRNA MALAT1	miR-155	T-bet, GATA-3	人/CD4 ⁺ T 细胞 Human/CD4 ⁺ T cell	Th1/Th2 平衡 Th1/Th2 balance	[33]
lncRNA MEG3	miR-17	ROR γ t	人/CD4 ⁺ T 细胞 Human/CD4 ⁺ T cell	IL-17 分泌、Treg/Th17 平衡 IL-17 secretion; Treg/Th17 balance	[36]
circRNA					
hsa_circ_0005519	has-let-7a-5p	IL-13, IL-6	人/CD4 ⁺ T 细胞 Human/CD4 ⁺ T cell	IL-13 和 IL-6 表达 IL-13 and IL-6 exprssion	[34]
mmu_circ_0001359	miR-183-5p	FoxO1	小鼠/巨噬细胞 Mice/macrophage	M2 巨噬细胞活化 M2 macrophage activation	[40]

注:“?”;参考文献未明确报道。

Note. ‘?’ , The corresponding reference do not point out the specific target.

miRNA 的活性,只有当 ceRNA 的丰度接近于靶 miRNA 的丰度时才能抑制 miRNA 靶标;实验中人为操控基因表达容易过量,并不能真实反应体内常态下的 ceRNA 作用;由于实验设计的可行性和实验条件的限制,ceRNA 直接互作的研究往往局限于单个基因;目前多数研究仍停留在细胞功能研究水平,需要在动物模型和临床实践中得到验证。此外 mRNA 可通过 ceRNA 机制隔离 miRNA 发挥调控作用,但在哮喘研究领域尚无涉及。

综上所述,ceRNA 假说的提出拓展了转录后水平基因表达调控的机制,对于 ceRNA 调控网络的研究揭示了其在疾病的发生、发展重要作用。目前的研究已经提示以 lncRNA BCYRN1、lncRNA MALAT1 等为代表的非编码 RNA 在哮喘中的重要作用,但相较于癌症研究领域,在支气管哮喘机制研究中涉及 ceRNA 的研究相对较少。随着对非编码 RNA 相关研究的深入,越来越多的 miRNA、lncRNA、circRNA 将被发现可作为评判哮喘病情预后的指标或者治疗的靶点。以 ceRNA 调控网络为靶标的治疗策略有望成为治疗哮喘的新途径、新方法。

参考文献:

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 (2016 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(9): 675-697.
- [2] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [3] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language [J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [4] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-352.
- [5] Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(5): 272-283.
- [6] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 351-379.
- [7] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. microRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9): 721-726.
- [8] Wei MM, Zhou GB. Long non-coding RNAs and their roles in non-small-cell lung cancer [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(5): 280-288.
- [9] Mathy NW, Chen XM. Long non-coding RNAs (lncRNAs) and their transcriptional control of inflammatory responses [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(30): 12375-12382.
- [10] Sun R, Wang R, Chang S, et al. Long non-coding RNA in drug resistance of non-small cell lung cancer: a mini review [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1457.
- [11] Yu W, Li D, Ding X, et al. LINC00702 suppresses proliferation and invasion in non-small cell lung cancer through regulating miR-510/PTEN axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(5): 1471-1485.
- [12] Wu F, Mo Q, Wan X, et al. NEAT1/hsa-mir-98-5p/MAPK6 axis is involved in non-small-cell lung cancer development [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2836-2846.
- [13] Zhao X, Sun J, Chen Y, et al. lncRNA PFAR promotes lung fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-138 to regulate the YAP1-twist axis [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(9): 2206-2217.
- [14] Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker [J]. *J Biotechnol*, 2016, 238: 42-51.
- [15] Memczak S, Jens M, Elefantioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [16] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [17] Tang CM, Zhang M, Huang L, et al. CircRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40342.
- [18] Jiang G, Ma Y, An T, et al. Relationships of circular RNA with diabetes and depression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7285.
- [19] Zheng F, Yu X, Huang J, Dai Y. Circular RNA expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis patients, based on microarray chip technology [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8029-8036.
- [20] Halayko AJ, Amrani Y. Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003, 137(2-3): 209-222.
- [21] Perry MM, Baker JE, Gibeon DS, et al. Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(1): 7-17.
- [22] Zhang XY, Zhang LX, Tian CJ, et al. lncRNAs BCYRN1 promoted the proliferation and migration of rat airway smooth muscle cells in asthma via upregulating the expression of transient receptor potential 1 [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(8): 3409-3418.
- [23] Zhang XY, Tang XY, Ma LJ, et al. Schisandrin B down-regulated lncRNA BCYRN1 expression of airway smooth muscle cells by improving miR-150 expression to inhibit the proliferation and migration of ASMC in asthmatic rats [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(6): e12382.
- [24] Lin J, Feng X, Zhang J, et al. Long noncoding RNA TUG1 promotes airway smooth muscle cells proliferation and migration via sponging miR-590-5p/FGF1 in asthma [J]. *Am J Transl*

- Res, 2019, 11(5): 3159–3166.
- [25] Hu R, Pan W, Fedulov AV, et al. microRNA-10a controls airway smooth muscle cell proliferation via direct targeting of the PI3 kinase pathway [J]. *FASEB J*, 2014, 28(5): 2347–2357.
- [26] Zhang XY, Tang XY, Li N, et al. GAS5 promotes airway smooth muscle cell proliferation in asthma via controlling miR-10a/BDNF signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 212: 93–101.
- [27] Perry MM, Tsitsiou E, Austin PJ, et al. Role of non-coding RNAs in maintaining primary airway smooth muscle cells [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 58.
- [28] Ingram JL, Bonner JC. EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases [J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(4): 409–421.
- [29] Lin L, Li Q, Hao W, et al. Upregulation of lncRNA malat1 induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells via miR-150-eIF4E/Akt signaling [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1337.
- [30] Liu Z, Mei L, He Z. Long non-coding RNA00882 contributes to platelet-derived growth factor-induced proliferation of human fetal airway smooth muscle cells by enhancing Wnt/ β -catenin signaling via sponging miR-3619–5p [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(1): 9–15.
- [31] Muehling LM, Lawrence MG, Woodfolk JA. Pathogenic CD4⁺ T cells in patients with asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(6): 1523–1540.
- [32] Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The cytokines of asthma [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 975–991.
- [33] Liang Z, Tang F. The potency of lncRNA MALAT1/miR-155/CTLA4 axis in altering Th1/Th2 balance of asthma [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(2): BSR20190397.
- [34] Huang Z, Cao Y, Zhou M, et al. Hsa_circ_0005519 increases IL-13/IL-6 by regulating hsa-let-7a–5p in CD4⁺ T cells to affect asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2019, 49(8): 1116–1127.
- [35] Ding F, Fu Z, Liu B. Lipopolysaccharide exposure alleviates asthma in mice by regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 balance [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3220–3229.
- [36] Qiu YY, Wu Y, Lin MJ, et al. LncRNA-MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate Treg/Th17 balance in patients with asthma by targeting microRNA-17/ROR γ t [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 386–394.
- [37] Korf JE, Pynaert G, Tournoy K, et al. Macrophage reprogramming by mycolic acid promotes a tolerogenic response in experimental asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(2): 152–160.
- [38] Zhong Y, Wang Y, Zhang C, et al. Identification of long non-coding RNA and circular RNA in mice after intra-tracheal instillation with fine particulate matter [J]. *Chemosphere*, 2019, 235: 519–526.
- [39] Zhong Y, Liao J, Hu Y, et al. PM2.5 upregulates microRNA-146a–3p and induces m1 polarization in RAW264.7 cells by targeting sirtuin1 [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(3): 384–393.
- [40] Shang Y, Sun Y, Xu J, et al. Exosomes from mmu_circ_0001359-Modified ADSCs attenuate airway remodeling by enhancing FoxO1 signaling-mediated M2-like macrophage activation [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 951–960.
- [41] Dai L, Zhang G, Cheng Z, et al. Knockdown of lncRNA MALAT1 contributes to the suppression of inflammatory responses by up-regulating miR-146a in LPS-induced acute lung injury [J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 59(6): 581–592.
- [42] Gu W, Yuan Y, Wang L, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes airway remodelling by suppressing the miR-145–5p/DUSP6 axis in cigarette smoke-induced COPD [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7200–7209.
- [43] Austin PJ, Tsitsiou E, Boardman C, et al. Transcriptional profiling identifies the long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation (PVT1) as a novel regulator of the asthmatic phenotype in human airway smooth muscle [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(3): 780–789.
- [44] Yu X, Zhe Z, Tang B, et al. α -Asarone suppresses the proliferation and migration of ASMCs through targeting the lncRNA-PVT1/miR-203a/E2F3 signal pathway in RSV-infected rats [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017, 49(7): 598–608.
- [45] Liu JH, Li C, Zhang CH, et al. LncRNA-CASC7 enhances corticosteroid sensitivity via inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway by targeting miR-21 in severe asthma [J]. *Pulmonology*, 2020, 26(1): 18–26.
- [46] Chen Y, Mao ZD, Shi YJ, et al. Comprehensive analysis of miRNA-mRNA-lncRNA networks in severe asthma [J]. *Epigenomics*, 2019, 11(2): 115–131.
- [47] Liao Y, Li P, Wang Y, et al. Construction of asthma related competing endogenous RNA network revealed novel long non-coding RNAs and potential new drugs [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 14.
- [48] Li X, Ye S, Lu Y. Long non-coding RNA NEAT1 overexpression associates with increased exacerbation risk, severity, and inflammation, as well as decreased lung function through the interaction with microRNA-124 in asthma [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(1): e23023.
- [49] Ye S, Zhu S, Feng L. LncRNA ANRIL/miR-125a axis exhibits potential as a biomarker for disease exacerbation, severity, and inflammation in bronchial asthma [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 34(3): e23092.

[收稿日期]2020–05–11

王洁,高嵩钰,朱仁心,等. 当前新冠病毒的主要检测手段 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 120-124.

Wang J, Gao SY, Zhu RX, et al. Main detection methods of SARS-CoV-2 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 120-124.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 01. 018

当前新冠病毒的主要检测手段

王洁¹,高嵩钰²,朱仁心³,肖良^{2*}

(1.海军军医大学(第二军医大学)基础医学院学员五大队十五队,上海 200433;

2.海军军医大学(第二军医大学)海医系环境与劳动卫生学教研室,上海 200433;

3.海军军医大学(第二军医大学)海军医学系,上海 200433)

【摘要】 2019 年,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)被报道,随后疫情在世界上各个国家和地区暴发且迅速流行。COVID-19 的传染性强、病死率高,为有效控制疫情的发展,新冠病毒的检测至关重要,国内外各研究团队及机构已研发出各种检测新冠病毒的有效手段和仪器设备,本文从背景原理、应用范围以及优缺点等方面对当前已有的针对新冠病毒的主要检测手段、仪器设备等相关知识进行综述。

【关键词】 新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;核酸检测;免疫学检测;分离鉴定

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0120-05

Main detection methods of SARS-CoV-2

WANG Jie¹, GAO Songyu², ZHU Renxin³, XIAO Liang^{2*}

(1. Basic Medical Sciences, Company15 of Battalion5, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China. 2. Department of Occupational and Environmental Health, Faculty of Naval Medicine,

Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433.

3. Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433)

【Abstract】 Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by infection with the novel coronavirus (SARS-CoV-2), was reported in 2019. Subsequently, the outbreak spread rapidly in many countries and regions. COVID-19 is highly contagious and lethal, and detecting the novel coronavirus is essential to effectively control transmission during the pandemic. Research teams and institutions in China and abroad have developed various effective method and equipment to detect the new coronavirus, and in this article, we summarized the current main detection method and equipment while considering the principles, range of applications, and advantages and disadvantages.

【Keywords】 SARS-CoV-2; COVID-19; nucleic acid detection; immunological detection; isolation and identification

新冠病毒以其极强的传染性和高致死率引发了全球范围内的大规模疫情。截至 2021 年 1 月 12 日 12 时,全国累计报告确诊病例 97754 例,现有确诊病例 1454 例,境外输入 4443 例,海外现有确诊病

例 25484895 例。为了控制疫情的进一步发展,急需快速有效针对新冠病毒的检测手段。针对这一问题,国内外各研究团队和机构开发出了不同的检测手段,当前市面上已有的新冠病毒的检测手段主要

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81770329);上海市卫健委新优青(2017YQ007)。

【作者简介】 王洁(2000—),女,本科在读,研究方向:公共卫生与预防医学。E-mail: STIGAN@126.com

【通信作者】 肖良(1983—),男,副教授,研究方向:公共卫生与预防医学。E-mail: hormat830713@hotmail.com

有核酸检测方法、免疫学检测方法、病毒分离鉴定等,本文就各种检测手段的背景原理、适用范围以及优缺点等方面作一综述。

1 核酸检测方法

目前,新冠病毒的实验室检测主要依赖核酸检测。核酸检测在感染早期即可呈现阳性,但对于样品保存、核酸提取的实验条件、操作人员的熟练程度以及操作环境等都有较高要求,给大面积早期筛查和诊断带来一定的困难。

1.1 全基因组测序

目前使用最为广泛的一种基因测序技术为高通量测序(high-throughput sequencing, HTS),也叫做新一代测序(next generation sequencing, NGS)。其中,病原体宏基因组测序(mNGS)是目前临床实践中最常用的病原体基因测序方法。它是一种基于新一代测序技术的无偏好性的技术,可以一次性完成细菌、真菌、病毒以及各种病原体(例如寄生虫)的检测。mNGS 技术首先需要将病毒 RNA 制备成测序仪可以识别和分析的 DNA 文库,然后使用测序仪同时对数以百万计的核酸序列进行检测。检测结果经生物信息学软件处理,最终展现出与病毒序列相关的信息。2003 年鉴定 SARS 耗时 5 月余、2013 年鉴定 H7N9 耗时 1 月余,而在此次武汉的疫情爆发后短短 2~3 周内,中国科学家就通过基因测序的方法鉴定出新型冠状病毒,并成功绘制出其全基因组序列信息。但因 mNGS 技术操作较为复杂、检测时间相对较长(24~72 h)、检测灵敏度相对较低等原因,在检测新型冠状病毒上不易实现大范围推广和快速诊断^[1]。而 Parabricks 软件可辅助 mNGS 技术检测新冠病毒以应对疫情,通过利用 NVIDIA Parabricks 软件的 Genome Analysis Toolkit 工具包以及 GPU 加速计算,可以大幅度提高序列数据分析的速度^[2]。Parabricks 团队的软件可以在一台服务器上快速分析一个人的全部基因组变异,并且将分析时间缩短至 1 h 以内。此次疫情的传播速度是历史上前所未有的,如此的效率提升将极大地促进人们对病毒进化和疫苗开发的了解。

1.2 RT-PCR

实时荧光 RT-PCR,即实时荧光反转录聚合酶链式反应。它首先将提取的病毒基因组 RNA 通过反转录变成互补 DNA(cDNA),然后再用病原体特异性的引物,以 cDNA 作为模板扩增病原体核酸序

列,扩增的过程中荧光染料能同步整合在产物上,研究者可以通过荧光信号的强弱,进行实时检测。RT-PCR 诊断耗时短,检测样本多,结果判定简单快速,检测成本低,特别适合本次大面积流行的新冠肺炎疫情。但是该检测方法需要分子检测实验室和专业的仪器以及操作人员,操作不当或者实验室条件不足都可能会因气溶胶污染而造成假阳性。

新冠病毒的检测可以通过基于 RT-PCR 的试剂盒进行。由华西医院应斌武教授团队与柯博文教授、耿佳教授团队合作自主研发的多重荧光 RT-PCR 检测试剂盒以新型冠状病毒 ORF1ab 基因和 N 基因中的保守序列为靶点,设计特异性引物和寡核苷酸荧光探针,以高特异性的操作对病毒核酸进行检测^[3]。该产品创新性构建了防污染系统,有效降低了产物气溶胶的污染。但是该试剂盒使用时不仅需要试剂本身,还需要运作 RT-PCR 的精密仪器和经过训练的操作人员。而且,现有试剂盒中的试剂和测试条件可能没有得到进一步的优化,这将会影响检测本身的灵敏度和特异性,出现“假阳性”和“假阴性”结果。所谓假阳性指的是体内没有病毒,却检测出了新冠病毒 RNA,一般是系统污染造成的。所谓假阴性指的是一个新冠肺炎患者应该被确诊为阳性,但却未检测到新型冠状病毒 RNA。产生假阴性的原因可能包括:①因病毒变异,引物和探针不能识别变异后的序列。②采样部位不含病毒或病毒含量较低,不能真实反映疾病情况。③提取核酸质量差,或提取效率低,病毒核酸有损失。④试剂检测下限不够,或试剂性能、仪器设备稳定性欠佳⑤实验操作不当。为规避假阴性,可以从以下几个方面做出改进:①采集达到一定数量的病毒 RNA:要求采样部位含有病毒并且病毒含量要达到检测的试剂下限。可通过对疑似病人多个部位同时采样或同一部位反复检测来增加采集到病毒 RNA 的几率。②辅助 CT 影像:CT 检测只需几分钟,比较快捷。但新冠肺炎是一种病毒性肺炎,其影像学表现与许多其他病毒性肺炎的影像学发现相似,因此难以做出鉴别诊断。因此 CT 影像诊断只能作为辅助手段检测新冠病毒,在一定程度上规避假阴性。以往使用 RT-PCR 检测盒检测新冠病毒必须在中心实验室进行,检测效率较低。欧洲的 Novacyt 公司开发的便携式 RT-PCR 仪器,能够在 2 h 内获得检测结果。Qiagen 和 Biomeme 公司也开发了将样本处理和 RT-PCR 检测整合在一起的可移

动检测仪,让对样本的检测更为自动化,并且可以在疫情一线进行。

1.3 CRISPR

CRISPR 系统由向导 RNA (gRNA) 和 Cas 蛋白组成,gRNA 能够指导 Cas 蛋白识别并切割带有特异序列的 RNA 或者 DNA 分子。Cas13a 蛋白在特异性切割靶标 RNA 时,会继续切割非靶标 RNA,利用这一特点,在整个体系中加入带有荧光标记的 RNA 信号分子,当带有荧光的 RNA 被切开时就会发出荧光信号。该技术检测时间相较于 RT-PCR 更短,但是 CRISPR 系统出现时间尚短,仍存在有脱靶的可能,其灵敏度和特异性还有待考证。

CRISPR 技术的先驱张峰教授的团队^[4]使用基于 CRISPR 的技术开发了一种检测新型冠状病毒 RNA 的方法。该方法仅需纯化的核酸分子样品,并且只需简单的三个步骤即可在 1 h 内完成检测。它的优势在于不需要复杂的仪器,且最后的检测在试纸上即可进行。此外,新开发的工具利用了 SHERLOCK 技术,这套系统无论对 RNA 还是 DNA,灵敏度都达到了单分子级。

总体来看,仅通过从患者体内分离和纯化 RNA,然后使用上述步骤,就预期能够在 1 h 内进行诊断,而无需各种复杂的设备。但目前这一手段尚未用于检测患者样本,还不能直接用于临床诊断。

1.4 逆转录环介导等温扩增法 (RT-LAMP)

环介导的等温扩增 (LAMP) 技术的特点是为目标基因的特定区域设计特异性引物,并使用链置换 DNA 聚合酶在恒温条件下保温数十分钟以实现核酸扩增。RT-LAMP 法具有扩增快、操作简便、检测简便、检测结果可直观判断等优点,有助于 COVID-19 的快速、可靠的临床诊断。

沈阳化工大学尹秀山团队^[5]开发了一种基于 RT-LAMP 技术的新冠病毒检测方法 iLACO,可在 15~40 min 内快速检测新冠病毒。由于当新冠病毒 RNA 与反应混合物中的 pH 指示剂耦合时,可以通过观察颜色的变化获得检测结果。阳性反应可导致 pH 指示剂从粉红色变为黄色,阴性反应时 pH 指示剂仍保持粉红色。

从方法学上来看,核酸检测技术是最直接最本质的病原学证据,优于其他临床表现、临床体征及 CT 检测等经验判读。这就是我们说病毒核酸检测是确诊感染的“金标准”的原因。但核酸检测法的缺点在于:检测程序较复杂,需要花费数小

时,且检测结果需要经过复核,重复实验则需要花费更多的时间,导致在确诊之前,很多患者得不到及时的隔离和治疗;此外,由于口咽拭子病毒含量较低、病毒 RNA 易降解等原因,核酸检测常出现假阴性结果。

2 免疫学检测方法

2.1 间接免疫荧光法

间接免疫荧光法以荧光素标记抗球蛋白抗体,抗体与相应抗原结合后,荧光标记的抗球蛋白抗体与已结合的抗体发生作用,从而推知抗原或抗体的存在。间接免疫荧光法因其方法简便、特异性强、阳性与阴性样品的信号强度对比明显、能够精确地判断组织或细胞内荧光的分布等优点,成为各类呼吸道病原体的有效检测工具。其缺点是敏感性偏低、不能量化指标、周期长。

呼吸疾病国家重点实验室从一例新冠病毒感染重症患者的粪便中成功分离出活的新冠病毒^[6]。目前已利用间接免疫荧光实验结果显示患者血浆可识别该分离株感染细胞。

2.2 荧光免疫层析法

荧光免疫层析法是将免疫层析法与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法,通过荧光素所发的荧光即可在荧光显微镜下对抗原进行细胞定位。

目前,万孚生物公司已成功研发出 2019-nCoV 新型冠状病毒 IgM 抗体检测试剂(荧光免疫层析法)。该试剂的优点是全自动穿刺进样,封闭独立操作,可最大程度避免产生气溶胶,降低了对操作者和环境污染的风险,可在 10 min 内完成检测,可广泛用于发热门诊、急诊、门诊检验、中心实验室以及基层医疗等各级医疗卫生机构,能快速分流病人和缓解临床诊疗压力^[7]。

此外,由河南省生物工程技术研究中心王云龙教授团队成功研制出的全场景新冠病毒免疫荧光层析快检试剂盒,只需患者一滴血就可在 10 min 内完成新冠病毒的快速筛查^[8]。该试剂盒可以无需设备,多种应用场景快速、方便的筛查新冠病毒疑似感染人群。与核酸检测方式联合应用,可缩短检测窗口期,提高阳性检出率,在新冠肺炎的辅助诊断方面,具有十分重要的作用。

2.3 免疫胶体金层析技术

氯金酸在还原剂如白磷、抗坏血酸等作用下,

可聚合成一定大小的金颗粒,并由于静电形成带负电的疏水胶溶液,故称胶体金。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合。

目前,由华西医院应斌武教授团队与柯博文教授、耿佳教授团队合作,自主研发了"新型冠状病毒 2019-nCoV IgG/IgM 抗体联合检测试剂盒(胶体金法)"诊断产品^[9]。该试剂盒采用肉眼观察的方法,只需一滴血清、血浆或全血即可在 10 min 内完成所有测试,无需任何设备,操作简单,可快速筛查可疑患者,从而提供了有效的排除手段。但是此方法敏感性较低,如果材料等质量有误差,会影响检测结果,也会因病人感染时间较短或者采样部位导致病毒含量较低,导致出现假阴性。

2.4 IgG 及 IgM 抗体免疫检测

研究表明,新型冠状病毒入侵人体 3~5 d 后,其特异性 IgM 抗体多会呈现阳性,随后特异性 IgG 抗体开始由阴转阳,且恢复期其滴度较急性期大幅增高。因此,以检测病人 IgM 抗体和 IgG 抗体为主的免疫检测方法是核酸检测方法的重要补充。

目前,南开大学科研团队成功研制出新冠病毒 IgM/IgG 抗体联合检测试剂盒。其中的快速测试卡可在 15 min 左右完成检测,具有操作简便、容易判读、灵敏度高等优势^[10]。但在感染早期,人体内可能还没有产生抗体,抗体检测存在窗口期。因此,抗体检测可用于对核酸检测阴性的病例进行辅助诊断,也可以对病例进行排查筛查,但不能代替核酸检测方法。

2.5 酶联免疫吸附测定(ELISA)

酶联免疫吸附剂测定法是利用抗原与抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。冠状病毒有四种主要的结构蛋白:S 蛋白、M 蛋白、E 蛋白、N 蛋白。针对 SARS 冠状病毒的质谱分析发现 N 蛋白是引起 SARS 患者产生抗体的主要抗原。由于新冠病毒与 SARS-CoV 的 N 蛋白具有高度的序列相似性,据此推测,N 蛋白也可作为抗原用于新冠病毒的 ELISA 法检测^[11]。对新冠病毒的 N 蛋白基因进行扩增与克隆,构建 N 蛋白基因的重组表达质粒,利用大肠杆菌得到大量重组质粒的表达产物 N 蛋白,纯化后的 N 蛋白就可以作为抗原进行 ELISA 检测。

ELISA 检测法的优点是临床标本容易采集,而且患者血清中一般不含冠状病毒或者含量低,大

大降低检测人员感染风险;有较高的特异性和灵敏度;仪器操作简单^[12]。其缺点是血清中的 IgG、IgM 一般在感染后 7~14 d 才会出现,尚不能达到早期诊断的目的。

3 病毒分离培养

病毒培养是诊断流感病毒感染的传统方法之一。病毒分离培养可以在前期确定侵害性病原体起到关键作用,但是传统的分离鉴定方法需要连续培养多天,敏感性和特异性都会低于核酸检测方法,且较为耗时,不能满足大量疑似患者筛查需求。

上海市疾病预防控制中心和复旦大学上海医学院基础医学院医学分子病毒学重点实验室新型冠状病毒攻关团队,利用病毒分离培养技术成功分离并鉴定出新冠病毒毒株^[13]。经进一步纯化、扩增和鉴定后,该毒株将为新型冠状病毒疫苗、抗病毒药物研制和致病机理研究等提供重要的毒种资源,并可实时进行药物筛选及抗体中和试验和对病毒变异的监测。

4 其他方法

4.1 基因芯片技术

4.1.1 呼吸道疾病多病原体测序芯片

生捷科技公司和浙江清华长三角研究院共同研制了呼吸道疾病多病原体测序芯片,该芯片基于新一代原位合成超高密度基因芯片技术,可以同时包括新冠病毒在内的 100 多种病毒进行高通量测序,实现精确检测新冠病毒和其他常见呼吸道病原体^[14]。该测序芯片具备成本低、数据分析简单的特点,非常适合作为临床精准诊断的辅助检测工具。

4.1.2 全新微流控生物芯片

博奥生物研发成功的快速检测呼吸道多病毒的全新微流控生物芯片,通过采集患者咽拭子、痰液等分泌物样本,1.5 h 内便可一次性检测包括新冠病毒在内的 19 种呼吸道常见病毒^[15]。该芯片系统能达到快速确认新冠病毒、同时排查其他引起相似症状病毒的目的,可以对大量就诊人群实现快速及分类鉴别,从而大幅降低疑似病例数量。

4.2 快速检测方法

ID NOW 是美国使用最广泛的分子即时检测技术之一,由于其易用性、便携性和快速的结果,ID NOW 在 COVID-19 大流行中为一线医护人员提供了重要工具。ID NOW 应用 RPA (recombinase

polymerase amplification) 技术, 利用专有酶和恒温控制来实现快速的 RNA 扩增。这种成熟的分子系统将 RNA 放大了数亿倍, 从而使病毒可在 13 min 或更短的时间内被检测到。目前 ID NOW 检测 COVID-19 仅获得 FDA 在紧急使用下的授权, 可用于实验室和患者护理场所^[16]。

除此之外, 以色列希伯来大学研究人员研发出一种比传统方法更快速、材料更易得的新冠病毒检测新方法。该方法使用磁性纳米粒子材料, 可以更快从拭子样本中提取核糖核酸分子, 检测速度是原有方法的 4 至 10 倍, 且这种材料在以色列市场供应充足, 价格低廉^[17]。

5 小结

在本次疫情中, 可通过流行病学史、临床表现、核酸检测、基因测序以及抗体检测等手段来综合判断患者是否感染新冠病毒, 但在检测过程中要特别注意“假阳性”和“假阴性”的问题。从目前来看, 不同检测方法均存在着各自的优势和弊端, 只有综合运用各种检测工具, 才能实现快速高效的检测, 缩短新冠患者的诊断周期。目前新冠病毒的检测方法追求的是检测时间缩短、检测步骤简化、检测成本降低、检测环境安全、检测结果精确, 因此检测方法的改进依然值得进一步地探索。

参考文献:

- [1] 陶悦, 傅启华, 莫茜. 病原宏基因组测序在新型冠状病毒检测中的应用与挑战 [J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3): 217-220.
- [2] 英伟达中国. NVIDIA 为 COVID-19 研究人员免费提供 Parabricks [R/OL]. 英伟达中国, (2020-03-26) [2020-04-25]. <https://blogs.nvidia.cn/2020/03/26/coronavirus-research-parabricks/>.
- [3] 柯博文. 华西医院科技联合攻关团队成功研发多款新型冠状病毒检测试剂盒 [R/OL]. 四川大学华西医院, (2020-02-19) [2020-04-25]. <http://www.wchscu.cn/comprehensive/50848.html>.
- [4] Feng Zhang OOA, Jonathan SG. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [R/OL]. (2020-03-21) [2020-04-25], <https://broad.io/sherlockprotocol>.
- [5] Yan C, Cui JH, Huang L, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Clin Microbiol Infect. 2020, 26(6): 773-779.
- [6] 呼吸疾病国家重点实验室. 实验室联合广州海关及中山五院成功从新型冠状病毒肺炎患者粪便中分离出病毒 [R/OL]. 呼吸疾病国家重点实验室, (2020-02-13) [2020-04-25]. <http://www.sklrd.cn/show.php?id=1372>.
- [7] 万宇. 万孚生物: 新型冠状病毒抗体检测试剂获得注册证 [N/OL]. 中国证券报·中证网, (2020-02-23) [2020-04-25]. http://www.cs.com.cn/ssgs/gsxw/202002/t20200223_6028643.html.
- [8] 孙晓艳. 采一滴血, 十分钟检出! 河南成功研制快速筛查新冠病毒感染试剂盒 [N/OL]. 大河报, (2020-02-25) [2020-04-25]. <https://www.henan100.com/news/2020/910373.shtml>.
- [9] 王彦东. 我校疫情防控科研成果在国务院新闻发布会上受肯定 [N/OL]. 四川大学, (2020-03-19) [2020-04-25]. <http://www.scu.edu.cn/info/1207/14622.htm>.
- [10] 叶攀. 科研团队研获新冠病毒抗体检测试剂盒 15 分钟快速检测 [N/OL]. 中国新闻网, (2020-02-15) [2020-04-25]. <http://www.chinanews.com/jk/2020/02-15/9092269.shtml>.
- [11] 乔静, 庞晓峰. SARS 冠状病毒主要蛋白酶的结构及药物设计 [C]. 中国生物医学工程学会. 中国生物医学工程学会第六次会员代表大会暨学术会议论文摘要汇编. 中国生物医学工程学会: 中国生物医学工程学会, 2004: 547.
- [12] 吴桐, 马健. 新冠病毒的免疫学检测方法——ELISA 法 [N/OL]. 中国免疫学会, (2020-02-14) [2020-04-25]. <http://www.csi.org.cn/article/content/view?id=1012>.
- [13] 孙静波. 上海科学家成功分离新冠病毒毒株 [N/OL]. 中国新闻网, (2020-02-11) [2020-04-25]. <http://www.chinanews.com/sh/2020/02-11/9087457.shtml>.
- [14] 王峰. 生捷科技发布新一代超高密度测序芯片, 新冠病毒检测精度极大提升 [N/OL]. 中国网科学, (2020-03-11) [2020-04-25]. http://science.china.com.cn/2020-03/11/content_41087930.htm.
- [15] 房家梁. 程京团队争分夺秒完成病毒检测试剂盒研发 [N/OL]. 中国新闻网, (2020-03-16) [2020-04-25]. <http://www.chinanews.com/gn/2020/03-16/9126755.shtml>.
- [16] Abbot. How ID NOW Tackles COVID-19 [R/OL]. (2020-05-04) [2020-06-01]. <https://www.abbott.com/corpnnewsroom/diagnostics-testing/how-id-now-tackles-covid-19.html>.
- [17] 张樵苏. 以色列研发出新冠病毒快速检测法 [N/OL]. 新华网, (2020-04-13) [2020-04-25]. http://www.xinhuanet.com/2020-04/13/c_1125848834.htm.

[收稿日期] 2020-09-03

贾梦真,黄岩杰,杨晓青,等. 运用基因调控技术探析膜联蛋白 A2 的病理作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 125-131.

Jia MZ, Huang YJ, Yang XQ, et al. Pathological effects of annexin A2 investigated by gene regulation techniques [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 125-131.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.019

运用基因调控技术探析膜联蛋白 A2 的病理作用

贾梦真¹, 黄岩杰^{1,2*}, 杨晓青², 韩红艳³, 张建江⁴

(1.河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450046; 2.河南中医药大学第一附属医院儿科,郑州 450099;
3.河南中医药大学,郑州 450046; 4.郑州大学第一附属医院儿科,郑州 450052)

【摘要】 膜联蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2) 是一种多功能的钙依赖性磷脂结合蛋白,既往报道 ANXA2 与多种肿瘤疾病的发生发展密切相关。近年来利用基因调控技术敲低、敲除和过表达 ANXA2 的实验研究发现:ANXA2 功能复杂,参与了细胞增殖、肿瘤细胞侵袭、新血管生成、纤溶酶系统、炎症反应、上皮-间充质转化和抗癌药物的耐药性及副作用等病理过程,因此涉及多种肿瘤和非肿瘤疾病的发生发展。本文根据国内外最新进展在基因层面对 ANXA2 上述病理作用及其机制进行综述,精准揭示 ANXA2 能否作为相关疾病早期筛查和治疗的靶点。

【关键词】 膜联蛋白 A2;基因调控;病理作用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0125-07

Pathological effects of annexin A2 investigated by gene regulation techniques

JIA Mengzhen¹, HUANG Yanjie^{1,2*}, YANG Xiaoqing², HAN Hongyan³, ZHANG Jianjiang⁴

(1. First School of Clinical Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.
2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450099.
3. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046.
4. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital Pediatrics of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

【Abstract】 Annexin A2 (ANXA2) is a multifunctional calcium-dependent phospholipid-binding protein. Previous reports have shown that ANXA2 is closely related to the occurrence and development of various tumors. However, knockdown, knockout or overexpression of ANXA2 using gene regulation technologies have indicated that ANXA2 is multifunction and involved in various pathological processes including cells proliferation, tumor cell invasion, neoangiogenesis, the plasmin system, inflammatory response, epithelial - mesenchymal transition, anti-cancer drug resistance, and side effects. It also participates in the occurrence and development of tumors and non-tumor diseases. These pathological effects and pathways of ANXA2 at the genetic level were summarized on the basis of recent developments and we also explored whether ANXA2 can be used as a target for early diagnosis and treatment of the related diseases.

【Keywords】 ANXA2; gene regulation; pathological effects

【基金项目】 河南省自然科学基金资助项目(182300410346);河南省高校科技创新团队支持计划(18IRTSTHN028);河南省中医药科学研究重大专项课题(2018ZYD05)。

【作者简介】 贾梦真(1993—),女,硕士研究生,研究方向:小儿肾病。E-mail:1301903767@qq.com

【通信作者】 黄岩杰(1969—),女,博士,教授,研究员,博士生导师,研究方向:小儿肾病。E-mail: huangyanjie69@163.com

膜联蛋白 A2 (Annexin A2, ANXA2) 分子量为 36×10^3 , 含有三个不同的功能区域: N 端区域, C 端区域和核心区域^[1]。核心区域由四个重复的氨基酸序列组成, 它们紧密堆积形成一个具有凹面和凸面的弯曲结构, 凸面含有膜结合必需的钙和磷脂结合位点, N 端结构域位于核心结构的凹面, 含有组织型纤溶酶原激活剂 (tPA) 和 p11 (S100A10 的片段) 结合位点, C 端区域包含 F-肌动蛋白, 肝素和纤溶酶原结合位点^[1-2]。ANXA2 广泛分布于各种真核细胞的细胞膜、细胞质和细胞核, 参与膜转运及膜表面一系列与钙调蛋白相关的活动, 包括增殖、分化、凋亡、迁移、膜修复和炎症反应等多种细胞进程^[3]。人 ANXA2 是最早实现克隆的 ANX 家族成员之一, 在人类疾病学方面研究最广泛^[4]。既往报道 ANXA2 在多种肿瘤中过表达, 参与癌症的发生发展, 涉及多种机制, 并与预后不良密切相关^[5]。我们先前研究显示 ANXA2 在参与肾小球细胞性新月体形成的上皮细胞中高表达, 在伴有新月体病变的紫癜性肾炎患儿尿中的浓度也明显增高, 拓展了对 ANXA2 病理作用的认识^[6]。本文通过综述运用基因调控技术敲低、敲除和过表达 ANXA2 的相关研究, 以期更全面地总结 ANXA2 的病理作用及其相关作用机制, 并精准探寻可能的临床诊疗靶点。

1 基因调控技术在研究 ANXA2 功能中的应用

近年来, 基因调控技术广泛应用于 ANXA2 功能研究。基因敲除或敲低的技术包括 siRNA (small-interfering RNA) 技术、shRNA (short hairpin RNA) 技术和成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9, CRISPR/Cas9) 技术。因 ANXA2 在多种疾病中过表达, 有关探究 ANXA2 功能的细胞及动物实验多采用 siRNA 干扰技术降低 ANXA2 表达水平。靶向 ANXA2 的 siRNA 进入细胞质后, 通过 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 机制与 ANXA2 mRNA 互补结合, 从而引起目标 mRNA 降解, 实现细胞或生物体 ANXA2 基因沉默^[7-8]。但 siRNA 技术存在脱靶率问题, 在基因敲除实验中不能完全敲除目标基因。在细胞核内合成的 shRNA 可由 Drosha 酶处理后转运至细胞质, 并经 Dicer 酶将 shRNA 加工成 siRNA, shRNA 诱导的

基因沉默较 siRNA 更持久^[7]。通过将敲除 ANXA2 基因的胚胎干细胞注射至胚胎, 并植入假孕小鼠的子宫中, 经嵌合体杂交育种可产生稳定敲除 ANXA2 的小鼠^[9]。CRISPR/Cas9 系统是新兴的基因编辑技术, 通过 sgRNAs 序列特异性互补并切割靶 DNA, 导致基因部分序列缺失, 精准实现基因敲除^[10]。但应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术靶向 ANXA2 的研究较少。目前多采用构建靶向 ANXA2 基因的 DNA 质粒转染细胞实现基因的过表达^[11]。

2 敲低或敲除 ANXA2

2.1 敲低 ANXA2 可抑制细胞上皮-间充质转化及肿瘤细胞侵袭、迁移和增生

细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指具有上皮表型的细胞失去极性和粘附性等上皮特征, 转化为具有间充质表型的细胞^[12]。目前, 与 ANXA2 相关的 EMT 报道主要涉及肿瘤增殖、侵袭、迁移方面。胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA) 是一种破坏性恶性疾病, ANXA2 属于 PDA 相关抗原, 细胞表面 ANXA2 的表达随着 PDA 的进展而增加。Zheng 等^[13]通过建立小鼠 PDA 模型证实了 ANXA2 在细胞表面的定位依赖于酪氨酸 23 (Tyr-23) 位点磷酸化, 并可通过 Rho 介导 PDA 细胞中转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导 EMT。敲低 ANXA2 或使用抗 ANXA2 抗体可有效抑制 PDA 转移并提高模型小鼠存活率, 为开发靶向 ANXA2 抑制剂治疗人 PDA 提供了理论依据^[13]。在鼻咽癌中, Chen 等^[14]通过将靶向 ANXA2 的 shRNA 导入 TW01 和 BM1 鼻咽癌细胞系, 建立特异性敲低 ANXA2 细胞系, 发现敲低 ANXA2 可抑制 TGF- β 诱导的 Snail/Twist 癌症相关转录因子的表达, 抑制鼻咽癌细胞 EMT 进程, 从而减少细胞侵袭、迁移, 同时可提高放射治疗和化学治疗敏感性。2018 年, Rocha 等^[15]基于对敲低 ANXA2 的结肠直肠癌细胞研究, 提出 TGF- β 可通过其受体激活 Src 介导 ANXA2 磷酸化, 磷酸化的 ANXA2 一方面促进 E-钙粘蛋白内化, 下调 E-钙粘蛋白转录, 另一方面结合并激活 STAT3, 同时诱导 STAT3 磷酸化, 磷酸化的 STAT3 从细胞质转移至细胞核, 上调 EMT 相关转录因子 Slug 的表达, 进而上调波形蛋白和金属蛋白酶 MMP2/9 的表达^[16]。

ANXA2 可在细胞膜、细胞质等不同的细胞结构部位介导表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)功能。细胞质中的 ANXA2 在蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)和 Src 激酶介导下实现 N 端丝氨酸 25(ser-25)和 Tyr-23 位点磷酸化后,经钙离子载体或钙诱导剂移至细胞表面^[17]。2019 年, Fan 等^[18]研究表明,活化的蛋白激酶 C 受体 1(RACK1)是 ANXA2 和 Src 激酶的共受体,可介导两者结合,促进 ANXA2 磷酸化。EGFR 由细胞外配体结合结构域和胞质 C 端酪氨酸激酶结构域组成, Chaudhary 等^[19]发现在三阴性和赫赛汀耐药的乳腺癌细胞中,大量易位至细胞膜表面的 ANXA2 与 EGFR 的细胞外结构域结合,在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导下导致 EGFR 同源二聚化和酪氨酸激酶区域自磷酸化后脱离细胞膜内化进入细胞质。内化过程依赖于脂质筏对 EGFR 的内吞作用,而 ANXA2 作为 Ca^{2+} 依赖性膜结合蛋白,在富含胆固醇和/或磷脂酰肌醇 4,5-双磷酸酯域中与肌动蛋白细胞骨架相互作用,可调节脂质筏形成^[20]。研究者利用抗 ANXA2 抗体阻断细胞表面 ANXA2 功能可抑制 EGF 诱导的 EGFR 同源二聚化、酪氨酸磷酸化、内化和 EGFR 介导的下游 AKT 和 ERK 信号通路,从而抑制三阴性和赫赛汀耐药乳腺癌细胞的细胞增殖和迁移^[19]。Wang 等^[21]提出磷酸化的 EGFR 可引起细胞质 ANXA2 Tyr-23 位点磷酸化,触发 STAT3 途径。使用 shRNA 在表达 EGFR 的上皮样乳腺癌细胞系 T47D 细胞中稳定敲低 ANXA2,可抑制 ANXA2 介导的 STAT3 Tyr-705 磷酸化,降低 STAT3 活化和核转位,阻断 EMT 的发生发展,表明 ANXA2 可通过 STAT3 依赖性方式促进 EGF 诱导的乳腺癌细胞 EMT。在宫颈癌细胞中,敲低 ANXA2 可部分逆转 EGF 诱导的 CaSki 宫颈癌细胞 EMT 进程,并抑制 CaSki 细胞活力和迁移^[22]。上述结果表明 ANXA2 在 EMT 进程中发挥重要作用,可能成为潜在的治疗靶点。同时也证明了 ANXA2 可在 EGFR 信号通路的上游和下游发挥不同的作用,在 EGF 诱导的 EMT 信号通路中具有上通下联的关键功能。

2.2 敲低 ANXA2 抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,恢复顺铂耐药细胞的药物敏感性

ANXA2 作为引物识别蛋白参与 DNA 复制^[2],并通过不同的途径参与细胞周期进程。Wang 等^[23]

发现经皮下注射 ANXA2 缺陷型人肺腺癌 A549 细胞(shANXA2-A549)悬浮液的 BALB/c 裸鼠的背侧肿瘤结节明显小于对照组,用 siRNA 敲低体外培养的 A549 细胞的 ANXA2,同样细胞增殖明显受到抑制。进一步证明敲低 ANXA2 可抑制 JNK/c-Jun 通路,并诱导 p53 及其下游凋亡基因如 p21 表达,引起细胞周期 G2 期停滞,从而抑制细胞增殖^[23]。Zhang 等^[24]用 shANXA2 慢病毒转染人乳腺癌细胞系 T47D 和 MDA-MB-231,获得稳定敲低 ANXA2 的细胞,发现敲低 ANXA2 抑制 EGF 诱导的 STAT3 磷酸化,进而降低细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)水平。ANXA2 也是一种 RNA 结合蛋白,可与原癌基因 c-myc mRNA 的 3'UTR 结合,从而导致其核周定位及与细胞骨架结合,并促进 c-myc 蛋白的合成^[5]。C-myc 在促进细胞增殖和凋亡中发挥重要作用, Cyclin D1 是 c-myc 的下游因子,也是细胞增殖的关键促进因子,可延迟细胞 G1 到 S 期转变,抑制癌细胞增殖^[5]。

顺铂是非小细胞肺癌患者的常用药,主要通过相关 DNA 上的嘌呤相互作用,激活数个信号转导途径造成 DNA 损伤和线粒体凋亡并最终导致细胞凋亡,然而治疗过程中伴随的细胞凋亡作用减弱可能是肿瘤细胞获得顺铂耐药性的关键特征^[25-26]。Feng 等^[27]通过体内外细胞实验证明,非小细胞肺癌细胞的顺铂耐药性与 ANXA2 调控的 JNK/c-Jun/p53 途径中 p21 等凋亡基因的异常表达密切相关,敲低 ANXA2 增加了凋亡细胞数量,可部分恢复已耐药细胞的药物敏感性。ANXA2 也可作为凋亡细胞表面 C1q 的配体诱导自身裂解,抑制细胞周期促进凋亡^[27]。因此, ANXA2 基因可能用作耐药性非小细胞肺癌的重要治疗靶标。

2.3 敲低 ANXA2 降低博来霉素诱导的肺纤维化

博来霉素是一种临床应用广泛的抗癌药物,然而其诱导肺纤维化的发生率高达 46%,严重限制了博来霉素的临床使用和治疗效果。博来霉素诱导的肺毒性涉及氧化应激和其引起的 DNA 损伤,从而引起炎症反应。2018 年一项研究发现,生理状态下 ANXA2 可通过肌动蛋白促进噬菌体装配参与自噬过程^[28]。在小鼠肺部感染模型中, ANXA2 可通过肺泡巨噬细胞中的 AKT-雷帕霉素(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径调节自噬^[29]。2018 年,

Wang 等^[28]利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术和蛋白质组学方法证明了在 A549 细胞中 ANXA2 的 Glu139 位点可直接与博来霉素二糖片段的酰胺基结合,二者的结合可抑制 TFEB(转录因子 EB)诱导的自噬通量,进而导致肺纤维化。2019 年 Lei 等^[30]证明博来霉素可诱导肺上皮细胞中 ANXA2 向细胞表面易位,并激活整合素连接激酶/核因子- κ B(ILK/NF- κ B)途径介导炎症反应。同时将博来霉素经气管注射至缺失 ANXA2 小鼠中 14 d 后,通过 Masson 染色和羟脯氨酸(胶原蛋白的标志物)定量分析证明,低表达 ANXA2 小鼠肺间质厚度及胸膜下胶原沉积明显小于对照组,NF- κ B 磷酸化以及 p65、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)等炎症因子表达水平降低^[30]。因此,ANXA2 可通过与博来霉素结合抑制自噬,促进炎症反应诱导肺纤维化,下调 ANXA2 的表达可能是降低博来霉素所致肺部毒副作用的有效方案。

2.4 敲低 ANXA2 抑制炎症

TNF- α 是 TNF 超家族成员,介导一系列免疫反应,在炎症性肠病的发展中起关键作用。去整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinases, ADAM)17 是裂解 TNF- α 前体的关键酶,参与多种炎症性疾病的发生发展^[31]。为了明确 ANXA2 是否参与 TNF- α 裂解脱落,Tsukamoto 等^[32]在单核细胞和结肠上皮细胞系中运用 siRNA 分别敲低 ANXA2 或 ADAM,均显著地抑制了细胞中 TNF- α 的裂解脱落。Tsukamoto 等^[32]又运用免疫沉淀蛋白印迹法证实 ANXA2 可直接结合并激活 ADAM17,被激活的 ADAM17 裂解 TNF- α 的前体,使 TNF- α 的释放增加,从而加重炎症反应。因此,抑制 ANXA2 可能是减少 TNF- α 脱落,防治炎症性肠病炎症的新治疗策略。

2.5 敲低 ANXA2 减少细胞表面的低密度脂蛋白受体水平,增加高胆固醇血症发生率

文献显示,前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin9 型(proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9, PCSK9)的催化结构域可与低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的 EGF-A 结构域结合,在酸性条件下经由内体/溶酶体能有效诱导肝 LDLR 降解,较低水平的肝 LDLR 降低了血浆中低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的清除率,导致高胆固醇血

症^[33-34]。ANXA2 基因位于染色体 15q22.2 上,由 13 个外显子组成,ANXA2 的 R1 结构域由外显子 4e6 编码,外显子 4e6 具有 8 个报告的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),rs11633032 和 rs17191344 为 SNP 的功能性突变体,与 LDL-C 水平正相关,其次要等位基因可产生转录因子阻遏蛋白结合位点,抑制 ANXA2 基因表达^[35]。ANXA2 通过其 R1 域与 PCSK9 富含半胱氨酸-组氨酸的结构域结合发挥 PCSK9 功能的内源性抑制剂作用,ANXA2 单体和四聚体均可抑制 PCSK9 对细胞表面 LDLR 的降解活性,降低高胆固醇血症发生率^[35]。Ly 等^[34]发现用 shANXA2 转染人肝细胞癌细胞系 Huh7 敲低 ANXA2 细胞,可减轻 ANXA2 对 PCSK9 C 末端结构域 M1 和/或 M2 的抑制作用,使 PCSK9 mRNA 在该细胞中翻译增加,加速对 LDLR 降解,升高循环 LDL-C 水平,证实敲低 ANXA2 解除了对 PCSK9 活性的抑制作用,提高了高胆固醇血症风险。

3 过表达 ANXA2

3.1 过表达 ANXA2 加速纤溶酶产生导致肿瘤新血管生成及出血性疾病

p11 是钙结合蛋白 S100A10 的片段,在细胞内钙浓度变化的驱动下,两个 p11 的 C 末端结构域可与两个 ANXA2 单体的 N 末端氨基酸结合形成异源四聚体^[36]。锚定于内皮细胞膜表面的 ANXA2 四聚体是纤溶酶原和 tPA 的共同受体,当 ANXA2 过表达时可加速纤溶酶产生,并激活多种 MMP(如 MMP2, MMP9)参与下游蛋白水解级联反应,促进细胞外基质、基底膜溶解,释放内皮细胞以及基质中的血管生成调节剂(如血管内皮生长因子),启动血管生成系统^[5,37]。胶质母细胞瘤是最常见和致命的脑肿瘤,Maruo 等^[38]将犬神经胶质瘤细胞系 J3T 经皮下植入无胸腺小鼠中,6 周后分别在肿瘤中收集到 J3T-1 和 J3T-2 细胞系,经检测 J3T-1 细胞系中 ANXA2 表达水平高于 J3T-2 细胞系,并且 J3T-1 细胞主要聚集在肿瘤边界处的扩张血管周围,而 J3T-2 细胞则表现出弥散的单细胞浸润到周围正常的脑实质中,没有新血管生成。Onishi 等^[39]用 ANXA2 编码质粒载体(pIRES-EGFP)转染 J3T-2 细胞建立过表达 ANXA2 的 J3T-2 细胞系,并将其接种在无胸腺大鼠中 28 d 出现脑肿瘤,在肿瘤中心观察到新血管

生成而致血管扩张,同时血管内皮生长因子和血小板衍生生长因子的表达明显升高。2020 年一项最新的研究表明,在三阴性乳腺癌细胞中外泌体 ANXA2 也可促进新血管生成^[40]。总之,以上结果表明过表达 ANXA2 可通过促进血管生成因子表达诱导血管生成。

ANXA2 过表达时,纤溶酶合成量过高可致周围组织受损,甚至引发出血,其中以急性早幼粒细胞白血病最具代表性。其细胞具有特征性染色体易位 t(15; 17),也称为早幼粒细胞白血病/视黄酸受体 α (PML/RAR α) 融合基因^[41]。PML/RAR α 融合蛋白激活 ANXA2 启动子上调 ANXA2 mRNA,过表达的 ANXA2 可通过翻译后调控导致 p11 表达的增加,加速合成的 ANXA2 四聚体促进纤溶酶以异常高的速率产生,大量活性纤溶酶在血浆中累积,最终导致急性早幼粒细胞白血病出血性并发症^[41]。然而,He 等^[42]提出纤溶酶可特异性激活 Toll 样受体 4 信号途径诱导 PKC 活化,启动 ANXA2 的 ser-11 和 ser-25 位点磷酸化,使四聚体解离,游离的 p11 受到蛋白酶体依赖性多泛素化和降解,可阻止 ANXA2 向细胞表面转移,从而保持 ANXA2 单体和四聚体的精确划分。纤溶酶的这种“反馈”机制可以限制自身的生成,从而维持血管纤溶系统平衡。

3.2 过表达 ANXA2 促进上皮细胞增殖

据报道 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR) 可感知氨基酸的刺激,也可激活 PKC 和蛋白激酶 A (PKA),同时两个蛋白激酶参与介导 ANXA2 磷酸化,而激素是刺激牛乳合成和牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, BMEC) 增殖的最重要因素^[43]。因此,激素刺激下 ANXA2 与乳蛋白合成和 BMEC 增殖密切相关。Osorio 等^[44]认为氨基酸如甲硫氨酸可诱导 mTOR 途径相关蛋白磷酸化,对牛乳蛋白合成有积极作用。2018 年, Zhang 等^[43] 为了研究 ANXA2 与 BMEC 增殖和牛乳合成的分子机制,利用 pcDNA3.1-ANXA2 构建体转染 BMEC 过表达 ANXA2。结果显示,在氨基酸及雌激素刺激下, BMEC 中过表达的 ANXA2 正向调节磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 产生 PIP3,进而刺激 mTOR 磷酸化,并增加固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol response element-binding protein-1c, SREBP-1c) 和 Cyclin D1 表达水平,经由 PI3K-

mTOR-SREBP-1c/Cyclin D1 信号通路促进 BMEC 增殖,合成乳蛋白、脂肪和乳糖等乳汁原料,加速乳汁合成^[43]。正如前所述, ANXA2 可能通过影响细胞周期因子促进增殖过程。

3.3 过表达 ANXA2 参与多种病毒生命周期

文献显示, ANXA2 单体和四聚体可通过病毒-膜融合的内吞机制参与人乳头瘤病毒、肠道病毒 71、呼吸道合胞病毒、巨细胞病毒的附着和渗入细胞内,参与多种靶向上皮细胞的病毒装配、复制和释放等过程,也是促进体外流感病毒复制的前病毒宿主因子,在加速高致病性禽流感病毒 H5N1 的复制中起着重要作用^[45-46]。2019 年一篇文献显示,非结构蛋白 1 (Non-structural protein 1, NS1) 是一种多功能蛋白,包含两个不同的功能域: N 端 RNA 结合域和 C 末端效应域,效应域与宿主蛋白相互作用,抑制宿主免疫反应,调节病毒感染过程^[47]。为了研究 ANXA2 与 NS1 在禽流感病毒 H5N1 复制中的具体作用机制, Ma 等^[46]利用 RT-PCR 扩增 A549 细胞的 ANXA2 基因,然后将其克隆到 pCAGGS-HA 载体中,构建重组质粒 pCAGGS-HA-ANXA2,再用质粒及 GD1322 (H5N1 菌株) 转染 A549 细胞 24 h,检测到子代病毒滴度显著增加。免疫共沉淀实验表明 ANXA2 可作为 NS1 的靶分子,并与 NS1 C 末端效应域相互作用,加速病毒复制。细胞凋亡是抵抗病毒感染的宿主防御机制, NS1 与 p53 结合可抑制细胞凋亡,基于 ANXA2 和 NS1 之间的相互作用以及 p53 的潜在拮抗作用, NS1 可能作为桥接分子促进 ANXA2 和 p53 结合以抑制细胞凋亡^[46]。

4 总结

ANXA2 可作用于 EMT 进程的不同位点,在 EGFR 介导的 EMT 信号通路中具有上通下联的作用。ANXA2 具有博来霉素的结合靶点,两者的结合可抑制自噬通量,进而导致肺纤维化。作为支架蛋白, Tyr-23 位点磷酸化是 ANXA2 由细胞质向细胞表面移位的关键环节, ANXA2 四聚体可促进纤溶酶生成,裂解细胞外基质、基底膜,释放血管生成调节剂促进新血管生成。此外, ANXA2 还可调节细胞增生、炎症和胆固醇代谢,参与病毒生命周期复制、凋亡等过程。综上所述,运用基因调控技术精准揭示了 ANXA2 的病理作用,拓展了对 ANXA2 作用机制的认识,有助于探索针对 ANXA2 的肿瘤早期诊断

和靶向治疗,也有助于建立其他非肿瘤疾病的治疗策略。

参考文献:

- [1] Wang CY, Lin CF. Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development [J]. Dis Markers, 2014, 2014: 308976.
- [2] Grindheim AK, Saraste J, Vedeler A. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017, 1861 (11): 2515–2529.
- [3] Grewal T, Wason SJ, Enrich C, et al. Annexins—insights from knockout-mice [J]. Biol Chem, 2016, 397 (10): 1031–1053.
- [4] Moss SE, Morgan RO. The annexins [J]. Genome Biol, 2004, 5 (4): 219.
- [5] Wang T, Wang Z, Niu R, et al. Crucial role of Anxa2 in cancer progression; highlights on its novel regulatory mechanism [J]. Cancer Biol Med, 2019, 16 (4): 671–687.
- [6] 黄岩杰, 杨晓青, 刘萌, 等. 凉血解毒活血方联合西医治疗对紫癜性肾炎Ⅲ型患儿尿蛋白及尿中 ANXA2 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (1): 372–375.
- [7] Thijssen M, Brüggewirth I, Gillooly A, et al. Gene silencing with siRNA (RNA interference): A new therapeutic option during ex-vivo machine liver perfusion preservation [J]. Liver Transpl, 2019, 25 (1): 140–151.
- [8] Rai MF, Pan H, Yan H, et al. Applications of RNA interference in the treatment of arthritis [J]. Transl Res, 2019, 214: 1–16.
- [9] Ling Q, Jacovina A, Deora A. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis *in vivo* [J]. J Clin Invest, 2004, 113 (1): 38–48.
- [10] El-Mounadi K, Morales-Florian M, Garcia-Ruiz H. Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9 [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 56.
- [11] Keller AA, Maeß MB, Schnoor M, et al. Transfecting macrophages [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1784: 187–195.
- [12] Marcucci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial – mesenchymal transition; a new target in anticancer drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15 (5): 311–325.
- [13] Zheng L, Foley K, Huang L, et al. Tyrosine 23 phosphorylation-dependent cell-surface localization of annexin A2 is required for invasion and metastases of pancreatic cancer [J]. PLoS One, 2011, 6 (4): e19390.
- [14] Chen CY, Lin YS, Chen CL, et al. Targeting annexin A2 reduces tumorigenesis and therapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6 (29): 26946–26959.
- [15] Rocha MR, Barcellos-de-Souza P, Sousa-Squiavinato ACM, et al. Annexin A2 overexpression associates with colorectal cancer invasiveness and TGF- β induced epithelial mesenchymal transition via Src/ANXA2/STAT3 [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 11285.
- [16] Yuan J, Yang Y, Gao Z, et al. Tyr23 phosphorylation of Anxa2 enhances STAT3 activation and promotes proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 164 (2): 327–340.
- [17] Shetty PK, Thakur SI, Biswas S, et al. Reciprocal regulation of annexin A2 and EGFR with Her – 2 in Her – 2 negative and herceptin-resistant breast cancer [J]. PLoS One, 2012, 7 (9): e44299.
- [18] Fan Y, Si W, Ji W, et al. Rack1 mediates tyrosine phosphorylation of Anxa2 by Src and promotes invasion and metastasis in drug-resistant breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res, 2019, 21 (1): 66.
- [19] Chaudhary P, Thakur S, Shetty P, et al. Inhibition of triple-negative and Herceptin-resistant breast cancer cell proliferation and migration by Annexin A2 antibodies [J]. Br J Cancer, 2014, 111 (12): 2328–2341.
- [20] Grewal T, Enrich C. Annexins – Modulators of EGF receptor signalling and trafficking [J]. Cell Signal, 2009, 21 (6): 847–858.
- [21] Wang T, Yuan J, Zhang J, et al. Anxa2 binds to STAT3 and promotes epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells [J]. Oncotarget, 2015, 6 (31): 30975–30992.
- [22] Cui L, Song J, Wu L, et al. Role of Annexin A2 in the EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in human CaSki cells [J]. Oncol Lett, 2017, 13 (1): 377–383.
- [23] Wang CY, Chen CL, Tseng YL, et al. Annexin A2 silencing induces G2 arrest of non-small cell lung cancer cells through p53-dependent and -independent mechanisms [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (39): 32512–32524.
- [24] Zhang F, Wang Z, Yuan J, et al. RNAi-mediated silencing of Anxa2 inhibits breast cancer cell proliferation by downregulating cyclin D1 in STAT3-dependent pathway [J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 153 (2): 263–275.
- [25] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug [J]. Bioorg Chem, 2019, 88: 102925.
- [26] Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8 (2): 121–132.
- [27] Feng X, Liu H, Zhang Z, et al. Annexin A2 contributes to cisplatin resistance by activation of JNK-p53 pathway in non-small cell lung cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36 (1): 123.
- [28] Wang K, Zhang T, Lei Y, et al. Identification of ANXA2 (annexin A2) as a specific bleomycin target to induce pulmonary fibrosis by impeding TFEB-mediated autophagic flux [J]. Autophagy, 2018, 14 (2): 269–282.
- [29] Li R, Tan S, Yu M. Annexin A2 regulates autophagy in *Pseudomonas aeruginosa* infection through Akt1-mTOR-ULK1/2 signaling pathway [J]. J Immunol, 2015, 195 (8): 3901–3911.

- [30] Lei Y, Wang K, Li X, et al. Cell-surface translocation of annexin A2 contributes to bleomycin-induced pulmonary fibrosis by mediating inflammatory response in mice [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(7): 789–804.
- [31] Nishimi A, Isozaki T, Nishimi S, et al. ADAM-17 is expressed in the inflammatory myopathy and is involved with interstitial lung disease[published correction appears in Clin Rheumatol] [J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(4): 1017–1024.
- [32] Tsukamoto H, Tanida S, Ozeki K, et al. Annexin A2 regulates a disintegrin and metalloproteinase 17 – mediated ectodomain shedding of pro-tumor necrosis factor- α in monocytes and colon epithelial cells [J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19(7): 1365–1373.
- [33] Mayer G, Poirier S, Seidah NG. Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels [J]. J Biol Chem, 2008, 283(46): 31791–31801.
- [34] Ly K, Saavedra YG, Canuel M, et al. Annexin A2 reduces PCSK9 protein levels via a translational mechanism and interacts with the M1 and M2 domains of PCSK9 [J]. J Biol Chem, 2014, 289(25): 17732–17746.
- [35] Fairwozy RH, Cooper J, White J, et al. Identifying low density lipoprotein cholesterol associated variants in the Annexin A2 (ANXA2) gene [J]. Atherosclerosis, 2017, 261: 60–68.
- [36] He KL, Deora AB, Xiong H, et al. Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11 [J]. J Biol Chem, 2008, 283(28): 19192–19200.
- [37] Liu W, Hajjar KA. The annexin A2 system and angiogenesis [J]. Biol Chem, 2016, 397(10): 1005–1016.
- [38] Maruo T, Ichikawa T, Kanzaki H, et al. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas [J]. Neuropathology, 2013, 33(3): 264–275.
- [39] Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, et al. Annexin A2 regulates angiogenesis and invasion phenotypes of malignant glioma [J]. Brain Tumor Pathol, 2015, 32(3): 184–194.
- [40] Chaudhary P, Gibbs LD, Maji S, et al. Serum exosomal-annexin A2 is associated with African-American triple-negative breast cancer and promotes angiogenesis [J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1): 11.
- [41] Huang D, Yang Y, Sun J, et al. Annexin A2-S100A10 heterotetramer is upregulated by PML/RAR α fusion protein and promotes plasminogen-dependent fibrinolysis and matrix invasion in acute promyelocytic leukemia [J]. Front Med, 2017, 11(3): 410–422.
- [42] He KL, Sui G, Xiong H, et al. Feedback regulation of endothelial cell surface plasmin generation by PKC-dependent phosphorylation of annexin A2 [J]. J Biol Chem, 2011, 286(17): 15428–15439.
- [43] Zhang M, Chen D, Zhen Z, et al. Annexin A2 positively regulates milk synthesis and proliferation of bovine mammary epithelial cells through the mTOR signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3): 2464–2475.
- [44] Osorio JS, Lohakare J, Bionaz M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation [J]. Physiol Genomics, 2016, 48(4): 231–256.
- [45] Taylor JR, Skeate JG, Kast WM. Annexin A2 in virus infection [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2954.
- [46] Ma Y, Sun J, Gu L, et al. Annexin A2 (ANXA2) interacts with nonstructural protein 1 and promotes the replication of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus [J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 191.
- [47] Han CW, Jeong MS, Jang SB. Structure and Function of the influenza A virus non-structural protein 1 [J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(8): 1184–1192.

[收稿日期]2020-06-08

王赛,白明,苗明三. 阴虚证动物模型诊断指标及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 132-137.

Wang S, Bai M, Miao MS. Diagnostic index and analysis of an animal model of yin deficiency syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 132-137.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.020

阴虚证动物模型诊断指标及分析

王 赛,白 明*,苗明三*

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 通过查阅现有关于阴虚证动物实验的文章,认为以往研究涉及肾阴虚、肺阴虚、脾阴虚、胃阴虚、肝阴虚,总结出阴虚动物模型的造模方法、一般观察状态、检测指标、药物反证。为评价阴虚动物模型提供参考,为建立更统一的评价体系提供思路。

【关键词】 阴虚;动物模型;检测指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0132-06

Diagnostic index and analysis of an animal model of yin deficiency syndrome

WANG Sai, BAI Ming*, MIAO Mingsan*

(Henan University of traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 By consulting existing articles on animal experiments of yin deficiency syndrome, we considered that previous studies have involved kidney, lung, spleen, stomach, and liver yin deficiencies, and summarized the modeling method, general observation state, detection index, and drug reverse syndrome of animal models of yin deficiency to provide a reference to evaluate animal models of yin deficiency and direction to establish a more unified evaluation system.

【Keywords】 yin deficiency; animal models; testing indicators

阴虚证即阴液不足,不能制阳的证。阴液不足,则机体失去濡养,临床表现为口咽干燥,形体消瘦;阴虚不能制阳,阳亢而虚热内生,临床则表现为潮热盗汗,烦躁,两颧潮红;阴虚火旺,膀胱化源不足,则见小便短赤且黄,大肠失去濡润,则见便干,阴虚火旺,则见舌红少苔,脉细数^[1]。具体症候涉及到肾阴虚、肺阴虚、脾阴虚、胃阴虚、肝阴虚、心阴虚,涉及阴虚证的西医疾病有糖尿病、高血压、冠心病、中风、乙型肝炎、围绝经期综合征、肺癌、骨质疏松等^[2]。现有的阴虚证造模方法既有涉及到西医学的给大白鼠采取口服或注射西药、手术和感染的方法,也有中医从证的病因、病机和证候特点出发,

采取如破气温燥中药等中医病因理论来造模^[3],造模方法较多但评价指标却不尽相同,本文通过总结所有公开报道的阴虚证动物模型的一般观察状态、检测指标、药物反证进行总结,为评价阴虚证动物模型提供参考,为建立更统一的评价体系提供思路。

1 肾阴虚

1.1 造模方法

梁汝圣等^[4]通过用甲状腺素片 150 mg/kg 配制成 10 mg/mL 悬混液灌胃成功制备肾阴虚大鼠,也可以用甲状腺素加利血平^[5]这两种方法都是通过提高基础代谢率,从而引发类似肾阴虚的症状属于

【基金项目】 中原学者(162101510003);国家国际科技合作基地(2016-65)。

【作者简介】 王赛(1995—),女,硕士研究生,专业:药理学。E-mail: 5267237562@qq.com

【通信作者】 苗明三(1965—),男,教授,研究方向:中药药理学。E-mail: miaomingsan@163.com

白明(1968—),女,教授,硕士,主要从事中药药理教学与研究。E-mail: baiming666@126.com * 共同通信作者

病理模型。戴冰等^[6]通过灌胃氢化可的松,段晓红等^[7]通过腹腔注射氢化可的松均可成功复制肾阴虚动物模型。

1.2 一般状态观察

体重下降,体温上升,毛发枯槁、无光泽、易脱落,多饮,多食,多尿且黄,大便干结色黑,易怒躁动,拱背,不易抓取。

1.3 检测指标

现代研究表明肾阴虚与下丘脑-垂体-靶腺轴(肾上腺、甲状腺)的功能亢进有关,患者表现为下丘脑 CRH、ACTH、TSH 增加,促进肾上腺皮质释放糖皮质激素和甲状腺合成甲状腺激素,血中糖皮质激素和甲状腺激素含量增加^[14],又因为 CRH 及糖皮质激素的大量释放在下丘脑、垂体、性腺多水平对性腺轴产生抑制作用,从而导致生殖内分泌的紊乱,性激素等相关指标也发生改变^[15];环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷的双向调节作用作为阴阳学说的基础,阴虚病人也会表现出环磷酸腺苷水平显著升高的现象^[16]。动物实验检测指标见表 1。

1.4 药物反证

六味地黄是滋阴补肾之首方,用于治疗肾阴亏损,用该药可使血清中 cAMP、ACTH、Cor. 含量降低, cGMP、T 含量升高^[17]。

2 肺阴虚

2.1 造模方法

肺阴虚造模主要以烟熏+灌服甲状腺素或者灌

服甲状腺+利血平+SO₂ 熏蒸^[18]等复合方法,其原理是先利用甲状腺素造成阴虚,再以烟熏的方式造成咳嗽,久咳不愈则伤及肺阴。

2.2 一般状态观察

体重减轻、皮毛(光泽差、毛发凌乱脱落)、行动(烦躁易怒)、呼吸(咳嗽、少痰、哮鸣音、鼻部干燥)、肛温显著升高、面温显著升高、抓力显著降低^[19]。

2.3 检测指标

肺阴不足,虚热内生,虚热上炎而潮热颧红,会出现颧红耳赤等症状,故动物面温、肛温升高。肺热为肺阴虚的基础,而热则为炎症反应的表现^[20],故炎症因子 TNF- α 、IL-1 含量显著升高。阴虚证表现为交感神经- β 受体-cAMP 系统功能亢奋,患者血浆中 cAMP 含量增多,甲状腺激素分泌增加,则甲状腺激素 T₃、T₄ 表达水平升高。cAMP 能激活细胞内的蛋白激酶,使细胞内多种蛋白磷酸化,增强脂肪分解,使 TC、TG 水平升高^[20-23](见表 2)。

2.4 药物反证

肺阴虚证是津液消耗,肺失濡养而出现的阴津不足,以致肺失清润,宣肃失职,虚热内生等临床表现的统称。南沙参、玉竹、麦冬(同属甘凉归肺经)通过甘凉入肺从而改善物质代谢异常,其作用机制可能是通过下调肺阴虚模型动物体内过高的甲状腺激素、环核苷酸的水平,从而调节肺阴证引起的体内紊乱,改善肺阴虚证的整体证候表现^[23]。

表 1 肾阴虚检测指标
Table 1 Detection of kidney yin deficiency

指标 Indicators	结果(与正常组比较) Results(Compared with normal group)
血浆环磷酸腺苷 cAMP ^[6]	升高 Increase
血浆环磷酸鸟苷 cGMP	下降 Decline
血浆 cAMP/cGMP 比值	升高 Increase
血清三碘甲状腺原氨酸 T ₃ ^[8]	升高 Increase
血清甲状腺素 T ₄ ^[9]	升高 Increase
血清腺皮质激素 ACTH ^[10]	升高 Increase
血清皮质醇 CoR	升高 Increase
血清促甲状腺激素 TSH ^[11]	升高 Increase
血清促卵泡素 FSH ^[12]	升高 Increase
血清雌二醇 E ₂	升高 Increase
血清睾酮 T	升高 Increase
糖皮质激素受体 α GR α ^[13]	在下丘脑显著下降,在胸腺显著升高 Significant decrease in hypothalamus and significant increase in thymus
甲状腺激素受体 α/β TR α/β	在下丘脑显著下降 Significant decrease in hypothalamus
雄激素受体 AR	在胸腺显著下降 Significant decrease in thymus
肾上腺皮质激素释放激素 CRH	升高 Increase

3 脾阴虚

3.1 造模方法

脾阴虚常采用复合因素造模法,前 14 d 通过饥饱不均,例如:间隔进食或单日喂甘蓝,双日喂猪油(大鼠每只 3 mL),加上单日游泳至耐力极限使其疲劳过度造成脾气虚,后 16 d 在脾气虚基础上使用耗伤阴液药,例如:附子、吴茱萸等,制成脾阴虚模型^[24]。

3.2 一般状态观察

食量减少、体重减轻、便溏、神态萎靡、毛色干枯、蜷缩聚堆。

3.3 检测指标:

脾阴不足,脾主运化功能失司,体内的蛋白质等精微物质不能正常转输,大量的蛋白质积于内质网内^[27],则相关转运蛋白和蛋白激酶含量发生改变。脾阴虚常与糖尿病、痴呆和消化系统疾病(胃炎、消化不良、厌食、便秘等),根据不同病症,针对性检测血糖、脑源性因子和 MMC 含量(见表 3)。

3.4 药物反证

四君子汤为补益剂,具有补气,益气健脾之功效。主治脾胃气虚证,,脾虚动物模型病理学观察到脾、空肠、回肠粘膜破损、脱落,等现象,经四君子颗粒治疗后,肠组织病理形态恢复正常,对脾虚证的蛋白质代谢系统有复健作用^[28],可使“脾虚证”模型复健,对其有反证效果。

4 胃阴虚

4.1 造模方法

选择燥热耗阴中药草乌连续灌胃复制胃阴虚症,每天用燥热耗阴中药草乌水煎浓缩煎剂灌胃 1 次,连续至 7 d^[36]。

4.2 一般状态观察

躁动不安、小便黄、饥不欲食、大便干燥。

4.3 检测指标

胃阴虚在临床上常表现为胃炎相关疾病,胃部有炎症反应,产生溃疡,故炎症相关因子水平升高,出现出血症状,红细胞数量减少体积增大,又因为炎症细胞侵蚀胃黏膜则粘膜层变薄(见表 4)。

表 2 肺阴虚检测指标

Table 2 Detection index of lung yin deficiency

指标 Indicators	结果(与正常组比较) Results(Compared with normal group)
血浆环磷酸腺苷 cAMP ^[20]	升高 Increase
血清三碘甲腺原氨酸 T3 ^[21]	升高 Increase
血清四碘甲腺原氨酸 T4	升高 Increase
血清肿瘤坏死因子- α TNF- α ^[22]	升高 Increase
血清白介素-1 IL-1	升高 Increase
血清甘油三酯 TG ^[23]	升高 Increase
血清总胆固醇 TC	升高 Increase
血清白蛋白 ALB ^[25]	下降 Decline
血清总蛋白 TP	下降 Decline
血清尿素 UR	升高 Increase
肺系数、心系数、肝系数、脾系数、肾系数 Lung, heart, liver, spleen, kidney ^[26]	升高 Increase

表 3 脾阴虚检测指标

Table 3 Detection index of spleen yin deficiency

指标 Indicators	结果(与正常组比较) Results(Compared with normal group)
海马脑源性神经营养因子 BDNF ^[29]	下降 Decline
海马脑源性神经生长因子 NGF ^[30]	下降 Decline
大鼠空肠肥大细胞 MMC 值 MMC Value ^[31]	升高 Increase
MMC 释放的介质 MMC Released media ^[32]	下降 Decline
回肠 AQP4 mRNA 及蛋白表达量 AQP4mRNA and protein expression ^[33]	下降 Decline
回肠蛋白激酶 CPKC 活性 PKC Activity ^[34]	升高 Increase
空肠空肠葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)	下降 Decline
空肠葡萄糖转运蛋白 5 (GLUT5) mRNA ^[35]	下降 Decline

4.4 药物反证

胃阴虚者,养阴生津降逆,宜清补,如麦冬、沙参、杏仁、白芍、石斛、茯神、粳米、麻仁、白扁豆等。已有研究证明沙参麦冬汤可改善患者血气指标(对照检测指标中的红细胞计数与红细胞体积)^[36]。

5 肝阴虚

5.1 造模方法

在四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤的基础上,结合温热中药灌胃制作大鼠肝阴虚证动物模型,也有研究结合长期激怒法制造肝肾阴虚动物模型^[32],所造模型更接近临床人为影响因素较少。

5.2 一般状态观察

形体消瘦、身热、饮水增多、饮食减少、大便干硬、小便黄(反应精液损伤情况)、毛发干枯、烦躁易怒、行动迟缓、反应迟钝、舌红少津。

5.3 检测指标:

肝阴虚患者肾素-血管紧张素系统功能增强,故醛固酮含量升高^[37],李莉等^[36]研究结果表明肝阴虚患者存在 TXB2 水平显著增高,6-Keto-PGF1 α 水平显著降低,在动物实验中仍有体现(见表 5)。

5.4 药物反证

采用滋补肝肾中药,能减轻肝组织的炎症程度(IL-6、IL-10、TNF- α 水平降低)和纤维化程度,对于阴虚证相关的表征有一定的改善作用^[44]。

表 4 胃阴虚检测指标
Table 4 Detection index of stomach yin deficiency

指标 Indicators	结果(与正常组比较) Results(Compared with normal group)
红细胞计数 ^[38] Red blood cell count	降低 Decline
平均红细胞体积 Average erythrocyte volume	升高 Increase
胃出血溃疡数 ^[39] Number of gastric bleeding ulcers	升高 Increase
胃粘膜层均数 Mean gastric mucosa	降低 Decline
胃液分泌量 Gastric fluid secretion	降低 Decline
小肠推进率 ^[40] Small bowel propulsion rate	降低 Decline
血清胃泌素 GAS ^[41]	降低 Decline
血清白介素-6 IL-6 ^[42]	升高 Increase
血清肿瘤坏死因子- α TNF- α	升高 Increase

表 5 肝阴虚检测指标
Table 5 Detection index of liver yin deficiency

指标 Indicators	结果(与正常组比较) Results(Compared with normal group)
血清中丙氨酸氨基转移酶 ALT ^[43]	升高 Increase
血清睾酮含量 T Content ^[44]	下降 Decline
血清 E2/T 的百分值 E2/T Percentages	升高 Increase
血清醛固酮 ALD ^[45]	升高 Increase
肝组织中羟脯氨酸 HYP ^[46]	升高 Increase
肝组织中丙二醛 MDA	升高 Increase
血清 6-酮-前列腺素 6-Keto-PGF1 α ^[47]	降低 Decline
血浆血栓素 B2 TXB2	升高 Increase
血清白介素-6 IL-6 ^[48]	升高 Increase
血清肿瘤坏死因子- α TNF- α	升高 Increase

6 讨论

动物模型是动物实验的基础,随着中医药研究的发展,中医证候动物模型的制备越来越受关注,如何判定造模成功与否也成为了大家思考的问题,通过查阅现有阴虚证动物实验的文献发现:阴虚证动物模型的一般状态主要包括体征和状态,这在模型评价中是很重要的一部分,动物的表现往往与中医临床所对应,例如:动物体重减轻相当于患者形体消瘦,爪和尾的颜色(红色程度)相当于患者五心烦热,饮水量与大小便情况反映出津液损伤等。动物的表现指征与人的中医证的表现相对应,为判断造模是否成功提供重要依据。但也存在各脏腑的表现区别不大,特异性不明显的缺点,应根据不同病症部位再深入挖掘研究^[49]。

在检测指标中,环核苷酸参与调节不同的生化代谢和生理功能,且在病理反应过程中也起介导作用,对细胞功能处于稳定状态具有双向控制调节作用^[50],有研究证明阴虚时血浆 cAMP 升高, cAMP/cGMP 比值无明显变化,临床上患者也出现这种现象^[51],这一指标常用来作为判定是否阴虚的依据,但也有实验证明脾阴虚、肝阴虚时血浆 cAMP 含量下降,故单用这一指标证明脾阴虚、肝阴虚是否造模成功是存在争议的,而肾阴虚和肺阴虚相关研究血浆 cAMP 均为升高,除此之外,肾阴虚、肺阴虚模型血清 T₃、T₄ 也均为升高与两种疾病都能引起甲状腺功能亢奋相一致。肺阴虚、脾阴虚、肝阴虚都检测了炎症因子的含量,结果均为升高,与临床三种疾病都伴有炎症反应相一致。检测指标应根据不同的脏腑或其相联系部位检测相关指标的变化从而反应病理变化,例如临床上肾阴虚与下丘脑-垂体-靶腺轴的功能亢进有关,反应在动物实验中也会出现甲状腺、肾上腺指标的改变;肺阴虚常伴随炎症反应,肺阴虚动物模型中炎症因子表达水平也会出现升高;中医上脾主运化,临床上脾阴虚患者体内的蛋白质等物质不能正常转运,大量的蛋白质积于内质网内,实验中脾阴虚动物也会伴随相关转运蛋白和蛋白激酶含量发生改变;胃阴虚患者在西医临床上常表现为胃炎、胃溃疡等,在胃阴虚实验中,动物胃部也会出现溃疡和炎症反应与临床相对应;肝阴虚患者肾素-血管紧张素系统功能增强,醛固酮增多,肝阴虚动物模型也会出现这种症状。心阴虚的研究较少本文并没有进行总结,日后有待

加强相关研究。本文针对每种虚证总结有效治疗药物,通过药物反证,观察表征是否得到改善,检测指标是否回归正常,也可以在一定程度上判断造模成功与否,为评价动物模型提供新的思路。

由于造模后疾病会自然演化和环境因素的影响,可能出现两种或者两种以上证候交叠或前后出现的情况,导致证候区分不明确,在指标检测中,不同脏腑的虚证没有明确的某一指标作为依据来判断造模成功,所以建立各个证型的动物宏观表现和客观的理化指标公认评价标准是迫切之需^[52]。

参考文献:

- [1] 白茹,刘欣欣,李凤金,等. 阴虚证动物模型的造模方法[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(2): 69-71.
- [2] 郑绍勇,丁成华. 阴虚证中医临床疾病分布的文献研究[J]. 中医临床研究, 2017, 9(6): 88-90.
- [3] 胡正远,孟艳梅,周雪梅. 中医实验动物阴虚证造模方法研究[J]. 中医临床杂志, 2015, 27(10): 1395-1397.
- [4] 梁汝圣,徐宗佩. 大鼠肾阴阳虚模型建立方法[J]. 吉林中医药, 2008(9): 685-687.
- [5] Wang P, Sun H, Lv H, et al. Thyroxine and reserpine-induced changes in metabolic profiles of rat urine and the therapeutic effect of Liu Wei Di Huang Wan detected by UPLC-HDMS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(3): 631-645.
- [6] 戴冰,张嘉妮,杨梦琳,等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [7] 段晓红,黄建华,孙伟,等. 糖皮质激素肾阴虚模型相应激素受体的表达及滋肾阴方的干预研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(9): 2116-2119.
- [8] 张凡,徐珊,刘蓬蓬,等. 黄柏不同炮制品对甲亢型肾阴虚模型大鼠甲状腺和肾上腺皮质功能的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(1): 27-30.
- [9] 夏炳江,童培建,孙燕,等. 骨质疏松肾阴虚型小鼠病证结合模型建立的实验研究[J]. 中国中医急症, 2013, 22(7): 1083-1086.
- [10] 黄江荣,李祥华,张家均,等. 六味地黄丸对甲状腺功能亢进肾阴虚型小鼠基础代谢的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(5): 1-3.
- [11] 邹海森,张彪,孙伟,等. 肾阴虚证生化指标的现代研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3607-3610.
- [12] 潘向军,楼百层,朱延涛. 肾阴虚模型制备方法及其肾阴虚证研究进展[J]. 新中医, 2019, 51(3): 23-27.
- [13] 王洪玉,陈平平,董婉茹,等. 阿霉素诱发肾性水肿病症大鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 5-9.
- [14] 夏炳江,童培建,孙燕,等. 骨质疏松肾阴虚型小鼠病证结合模型建立的实验研究[J]. 中国中医急症, 2013, 22(7): 1083-1086.

- [15] 王德秀, 胡旭光, 臧建伟, 等. 六味地黄汤生物制剂对肾阴虚小鼠 HPA 轴的调节作用研究 [J]. 陕西中医, 2008, 29(3): 374-375.
- [16] 杨正标, 苏洁, 陈素红, 等. 女贞子不同提取部位对肾阴虚大鼠内分泌系统的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 168-170.
- [17] 石菊, 高陆, 许艳茹, 等. 标准化六味地黄胶囊药效学研究 [J]. 通化师范学院学报, 2019, 40(10): 39-43.
- [18] 洪素兰, 陈玉龙, 邵雷, 等. 沙参麦冬汤对肺阴虚型慢性支气管炎模型大鼠 SIgA 与 IL-1、IL-6、TNF- α 的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(12): 948-949.
- [19] 方慧, 吕圭源, 陈素红, 等. 三味辛凉归肺经中药对肺阴虚模型小鼠的影响 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(5): 11-14.
- [20] 牟秀华, 吕圭源, 陈素红, 等. 三味甘凉归肺经中药水提物对肺阴虚模型大鼠体征及脏器系数的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(3): 303-308.
- [21] 苏洁, 陈素红, 吕圭源, 等. 菊花不同提取部位对肺阴虚模型大鼠的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(3): 70-73, 82.
- [22] 蔓素云. 脾虚证动物模型造模研究方法及治疗概述 [J]. 辽宁中医学院学报, 2002(4): 257-258.
- [23] 占阮娟, 陈素红, 吕圭源, 等. 三味甘凉归肺经中药对肺阴虚模型大鼠 cAMP、cGMP 的影响 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 85-87.
- [24] 易杰, 李德新. 脾气虚与脾阴虚大鼠肝、脾组织蛋白激酶 C 活性变化的比较研究 [J]. 中医杂志, 2003, 44(11): 851-853.
- [25] 李浩, 侯辉, 高雪, 等. 肺阴虚证小鼠上下呼吸道病理变化观察 [J]. 中医药信息, 2000, (6): 46-47.
- [26] 董海军, 吴雷涛, 杨倩倩, 等. 中医阴虚证动物模型制备方法概述 [J]. 山东中医杂志, 2015, 34(1): 74-76.
- [27] 梁丽娜, 战丽彬, 胡守玉, 等. 糖尿病脾阴虚大鼠下丘脑内质网应激及滋补脾阴方药调节作用研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 519-523.
- [28] 赵宁, 贾红伟, 张皖东, 等. 四君子汤和理中丸对脾虚证影响的研究 [J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(2): 66-68.
- [29] 侯永春, 严孜. 参苓散对脾阴虚痴呆模型大鼠海马区 BDNF、NGF 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(3): 728-730.
- [30] 蔓素云. 脾虚证动物模型造模研究方法及治疗概述 [J]. 辽宁中医学院学报, 2002, 4(4): 257-258.
- [31] 曲长江, 刘劲, 夏淑杰, 等. 番泻叶泻下与劳倦过度单、复因素脾虚模型的免疫学研究 [J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1999, 7(4): 212-213.
- [32] 余华, 张安仁, 张月娥, 等. 麦粒灸对实验性脾虚泄泻证大鼠空肠肥大细胞的影响 [J]. 针刺研究, 2000, 25(1): 31-33.
- [33] 于漫, 王彩霞, 宋雪娇. 理脾阴正方对脾阴虚大鼠回肠水道蛋白 4 表达及分布的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(10): 3298-3301.
- [34] 孙晓霞, 战丽彬, 侯圣林, 等. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠空肠葡萄糖转运蛋白 1、葡萄糖转运蛋白 5 表达的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(5): 660-665.
- [35] 宋雪娇, 王彩霞. 脾阴虚模型大鼠回肠的蛋白质组学差异性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(10): 2363-2365, 后插 3.
- [36] 蒋梦霞, 李伟林, 张君利. 沙参麦冬汤改善激素治疗后慢性阻塞性肺疾病肺胃阴虚证 31 例观察 [J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(6): 410-411.
- [37] 欧阳取长, 石林阶. 肝阴虚证大鼠模型的初步研究 [J]. 湖南中医学院学报, 1999, 19(2): 26-28, 72.
- [38] 李莉, 王晓东, 李波, 等. 玉女煎对大鼠胃热阴虚型血热证候的疗效作用机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 16-19.
- [39] 徐晓, 沈洪. 脏腑辨证治疗反流性食管炎阴虚证 [J]. 环球中医药, 2019, 12(9): 1385-1387.
- [40] 邵长乐, 陈婉珍, 朱方石. 从胃阴虚论治胃癌前病变的机制探讨 [J]. 现代中医临床, 2019, 26(3): 67-70.
- [41] 王立明, 徐建华, 陈立钻, 等. 铁皮枫斗晶对实验性胃阴虚证的药效学研究 [J]. 中成药, 2002, 24(10): 803-805.
- [42] 欧阳一鸣, 凌平, 李临海, 等. 铁皮石斛多糖对慢性萎缩性胃炎大鼠的作用及其分子机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 67-72, 78.
- [43] 樊蔚蔚, 岳广欣, 李素香, 等. 长期激怒致肝肾阴虚证动物模型研制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(9): 67-69.
- [44] 易少凌, 朱翠霞, 余泽君, 等. 护肝片及其拆方对慢性肝损伤肝阴虚证大鼠模型的影响 [J]. 药学研究, 2016, 35(5): 257-259, 279.
- [45] 刘文兰, 油红捷, 赵青舟, 等. 肝纤维化大鼠阴虚证表征的观察及一贯煎的干预作用 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(7): 7-10, 18.
- [46] 石林阶, 陈昌华, 陈国林, 等. 肝阴虚证患者血浆血栓素 A₂、前列环素 I₂ 水平研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2001, 21(2): 9-10.
- [47] 梁增荣, 龙梓, 陈少锐, 等. 护肝片对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤肝阴虚证的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 137-141.
- [48] 贾岚, 王蕾蕾, 孟靓, 等. 白芍总苷对大鼠化学性肝损伤与肝阴虚证结合模型的影响和机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1885-1892.
- [49] 卢文丽, 方肇勤. 阳虚证动物模型诊断指标与评析 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(4): 42-46.
- [50] 张红英, 郑绍琴, 苏颖杭, 等. 连梅颗粒对肾阴虚型糖尿病大鼠的降糖作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(11): 1291-1295.
- [51] 肖子曾, 戴冰, 黄开颜, 等. 六味地黄汤对小鼠血浆中环核苷酸的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 44-46.
- [52] 周方圆, 杨宇峰, 石岩. 2 型糖尿病病证结合动物模型研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(8): 93-95.

[收稿日期] 2020-06-05

吉琳,申琪,郭向东. 阳虚动物模型及检测指标的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 138-145.

Ji L, Shen Q, Guo XD. Research progress in developing an animal model and detection index for yang deficiency [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 138-145.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.021

阳虚动物模型及检测指标的研究进展

吉琳¹, 申琪^{2*}, 郭向东²

(1.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院耳鼻喉科, 郑州 450000)

【摘要】 阳虚证是中医临床常见证候之一, 涉及许多疾病, 阳虚体质者也越来越多, 大多疾病的晚期均会不同程度地出现阳虚证。目前关于阳虚动物模型主要从模拟中医病因、西医病理、病证结合三方面建立, 集中在脾、肾二脏。关于阳虚的本质及物质基础的研究从生理生化及分子生物学两大方面的指标检测展开研究, 主要包括内分泌、免疫、血液流变学、能量代谢、自由基、微量元素和整体水平上的基因、蛋白质、代谢组学。通过对以上研究分析探讨, 有助于了解阳虚及其相关疾病的发病机制, 完善不同脏腑阳虚证的诊断标准, 为临床辨证论治的规范统一奠定基础。

【关键词】 阳虚; 模型; 生理生化; 分子生物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0138-08

Research progress in developing an animal model and detection index for yang deficiency

Ji Lin¹, SHEN Qi^{2*}, GUO Xiangdong²

(1. First Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Yang deficiency is a common clinical syndrome in traditional Chinese medicine and is involved in many diseases, such as yang deficiency constitution, which is becoming more common. Furthermore, most late-stage disease will involve varying degrees of yang deficiency syndrome. Animal models of yang deficiency are mainly established according to three aspects: simulating the etiology of traditional Chinese medicine; western medicine pathology; and combining disease and syndrome, focusing on the spleen and kidney viscera. Studies of the essence and material basis of yang deficiency are performed according to two aspects: 1. physiological, biochemical, and molecular biology, including endocrine, immune, hemorheology, energy metabolism, free radicals, and trace elements; and 2. the level of genes, proteins, and metabolomics. These studies and method help us understand the pathogenesis of yang deficiency and its related diseases, perfect the diagnostic criteria of yang deficiency in different zang-fu viscera, and lay a foundation for the standardization of clinical treatment according to syndrome differentiation.

【Keywords】 yang deficiency; model; physiology and biochemistry; molecular biology

【基金项目】 河南省重点研发与推广专项项目(202102310174)。

【作者简介】 吉琳(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合临床耳科疾病的防治与研究。E-mail: 846662485@qq.com

【通信作者】 申琪(1971—), 女, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 耳病的中医防治研究。E-mail: 1543040814@qq.com

阳气的生长、充盛至衰竭的过程贯穿着人体的整个生命历程,阳气对维持人体各项生理机能发挥着不可或缺的重要作用。阳虚证是指人体阳气亏损,其温养、推动等功能减退,以畏寒肢冷为主要表现得虚寒证^[1]。为了更好的认识和了解阳虚本质,研究阳虚的病理生理机制、诊断、治疗等,复制稳定并与临床症状或机制相似的阳虚动物模型尤为重要。随着研究的不断进展,国内外学者尝试了多种有效的造模方法并制定了相应的检测指标。本文对当前阳虚动物模型的多种造模方法及检测指标进行归纳及综述,从不同角度揭示阳虚的发病机制,为今后寻求有效诊断方法,提高阳虚及阳虚相关疾病的诊治率,发展有效的临床治疗方案提供思路。

1 阳虚动物模型的建立

目前,建立阳虚实验动物模型的思路分别从模拟中医病因、西医病理、病证结合三个方面造模(见表1)。

1.1 模拟中医病因

此类模型按照中医病因学说,使动物在人为制造的特定致病环境中出现相应的疾病,建立与临床上某种证型表现相似的模型^[2]。模拟中医病因建立阳虚模型的方法目前包括劳倦过度,房事不节;惊恐伤肾;苦寒泻下;寒湿困脾等。

模拟中医病因建立的阳虚动物模型多以脾肾两脏为主,并且多为复合因素建模。李震等^[3]将雄雌鼠同笼喂养,雄鼠每天游泳至无力下沉时捞出,用4周时间建立以“劳倦过度、房室不节”为病因的肾阳虚动物模型。杜维祥等^[4]通过猫吓鼠的方式建立肾阳虚模型,此法虽然遵循中医“恐伤肾”理论,但不符合实验动物伦理,且一般实验室猫、鼠共同饲养也较难实现,对实验资源有很大的浪费。对于这一局限性,有一项研究通过避水应激建立阳虚型肠易激综合征(IBS)动物模型,利用大鼠对水的天生恐惧感模拟“恐伤肾”病因,又可诱导IBS内脏高敏感^[5]。自然衰老也是造模的方法之一,但是此法虽然和人类阳虚发展过程最相似,但是造模时间至少1年以上,成本大,可操作性不高^[6]。苦寒泻下法多用于建立脾阳虚,或苦寒泻下和氢化可的松结合建立脾肾阳虚模型,大黄或番泻叶为常用药物。滕培颖等^[7]就是通过此方法每天按照0.25 mL/100 g肌注氢化可的松注射液,同时以1 mL/100 g灌胃大黄水煎液,连续

17 d建立了脾肾阳虚动物模型。寒易伤阳,湿为阴邪,阻遏气机,损伤阳气,根据这一理论,章敏等^[8]的研究将大鼠放在温度区间(6 ± 2)℃,湿度区间(90 ± 4)%的寒湿环境中,每天放置8 h,持续30 d,大鼠出现脾阳虚症状。

1.2 模拟西医病理

病理模型是运用现代实验技术在动物身上造成特定病理过程以模拟人的病理过程的一种模型。模拟西医病理建立阳虚模型的方法包括糖皮质激素如氢化可的松;抗甲状腺素药物如他巴唑、丙硫氧嘧啶;甲状腺切除;肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)切除术;其他药物如腺嘌呤,羟基脲等以及衰老。

首先,下丘脑-垂体-靶腺轴功能紊乱是肾阳虚的病理机制之一,现代研究多通过干扰该轴的功能而建立肾阳虚动物模型。氢化可的松是糖皮质激素,可以使下丘脑-垂体-肾上腺功能减退,抑制促肾上腺皮质激素(ACTH)的释放,邝安堃等^[9]在20世纪60年代通过“氢化可的松”首次建立了肾阳虚动物模型,动物出现畏寒肢冷,腰膝酸软,精神不振,性功能低下,被毛疏松、失去光泽等“耗竭”现象,是最常用的肾阳虚动物模型。但有报道表明,糖皮质激素不同种类、剂量、制剂、给药方式所引起的造模结果是不同的,秦文艳等^[10]的研究采用灌胃、腹腔注射及皮下注射的方式给予小鼠不同剂量(12.5、25、50 mg/kg 体重)氢化可的松注射液9 d,结果表明灌胃给药25 mg/kg 剂量组成模率较其他组高,且各项指标均可呈现出肾阳虚的症状和体征,是比较可靠的肾阳虚造模方法。也有研究认为所谓的“耗竭现象”有可能是外源性糖皮质激素在体内蓄积造成机体代谢紊乱的毒性作用,所以氢化可的松等糖皮质激素具体的造模方法值得商榷。范景等^[11]利用使用性腺轴功能紊乱的方法制造肾阳虚模型,对雄性小鼠按0.1 mL/10 g腹腔注射苯甲酸雌二醇(E2)大豆油稀释液,1 d1次,连续15 d。裴妙荣等^[12]和欧阳轶强等^[13]分别使用抗甲状腺药丙硫氧嘧啶和他巴唑制造甲状腺功能降低的大鼠肾阳虚模型。

通过手术方式也是建立阳虚模型的方法之一,如甲状腺切除术、BAT切除术等。徐敏等^[14]通过手术切除甲状腺的方法复制“甲低”病理模型,发现实验大鼠存在与临床相同的病理改变及常见的证候表现,并且文章中首次报导阳虚主症畏寒喜暖的定

量检测装置,认为此检测方法比现在已有的耐冻实验和冰水游泳实验更能鉴别阳虚证型。BAT 通过产热维持体温,而动物切除肩胛间 BAT 后产热减少,利用这一原理韦祎等^[15]通过 BAT 切除术建立阳虚动物模型,结果显示动物模型效能产热温度峰值下降和产热体温曲线下面积减小,体重增长率降低,有能量代谢衰减的表现。

此外,还有通过破坏肾组织、影响肾组织能量代谢,抑制 DNA 合成以及诱导衰老达到造模目的的。有研究表明高浓度的腺嘌呤代谢产物沉积于肾小管,会因机械性阻塞肾小管和毒性作用,抑制肾组织中与物质代谢有关的酶活性,从而影响肾组织能量的代谢,造成肾功能衰竭^[16]。林海雄等^[17]选用雄性 SD 大鼠,皮下注射未提纯腺嘌呤,大鼠出现疲倦,饮水量减少,体重减轻等症状,以此建立大鼠阳虚模型。邵命海等^[18]比较腺嘌呤与氢化可的松两种造模方法,结果表明模型组睾酮(T)水平偏低,E2 水平偏高,前列腺腺体萎缩与精囊萎缩状态都更加明显,在体征与性激素指标方面更符合肾阳虚表现。且有研究表明,腺嘌呤模型较氢化可的松模型阳虚症状持续时间更长,且有肾损伤,更符合理想的阳虚动物模型,腺嘌呤浓度的控制是成功构建该模型的关键^[19]。羟基脲是核苷酸还原酶抑制剂,可以抑制 DNA 合成,刘福春等^[20]运用不同剂量的羟基脲喂雄性小鼠,通过观察出现“阳虚”症状及死亡率,得出每只 7.5 mg 的剂量最为合适。肖凌等^[21]建立 D-半乳糖诱导衰老动物模,结果表明其热休克蛋白 HSP70 表达下降,超氧化物歧化酶(SOD)活性下降,且与阳虚证的表现相符。

1.3 病证结合

病证结合动物模型以中医理论为指导,以西医复制疾病模型为基础,与某些致病因素相结合,建立具备西医疾病和中医证候的动物模型。西医疾病多采用阳虚证型为主的疾病,如肾病,慢性心衰,哮喘,骨质疏松(OP),便秘,腹泻型肠易激综合征(IBS-D)等。

中医认为脾肾阳虚是微小病变肾病之本,而阿霉素(ADR)肾病模型是此病典型的动物模型,鲁艳芳等^[22]仿照 Bertani 等^[23]方法,大鼠尾静脉一次性注射 ADR 5.5 mg/kg,结果表明模型组的病理改变与临床微小病变肾病相似,症状及微观指标也与阳虚表现相符。

ADR 不仅用于建立肾病模型,有研究表明 ADR 由于对心肌组织的亲和力高故其心脏毒性高于其他组织^[24],童妍等^[25]采用大鼠腹腔注射 ADR 4 mg/kg 的方法建立心阳虚型慢性心力衰竭模型,每周 1 次,共 6 周,此模型符合心阳虚的症候群,可能与 ADR 诱导氧化应激有关。除了通过药物建立阳虚型慢性心衰模型,还有通过手术结扎动脉的方式,如侯衍豹等^[26]利用冠脉结扎结合一氧化氮合酶抑制剂建模,杨喆等^[27]利用腹主动脉结扎结合寒冷刺激建模。

子病及母,肺肾为母子关系,故肾虚日久可累及于肺。陈博武等^[28]在已有哮喘大鼠肾阳虚病证结合模型基础上进行了改进^[29],以 1.5 mL/100 g 灌胃地塞米松混悬液联合 2% 卵蛋白雾化吸入建立哮喘肾阳虚模型,并通过大鼠四诊信息评价建模是否成功。

陈剑磨等^[30]等选用雌性 KM 小鼠,应用去卵巢法构建 OP 模型,按 25 mg/kg 的剂量皮下注射氢化可的松诱导肾阳虚模型,该研究耗时 8 周成功构建 OP 肾阳虚病证结合模型,但该法只模拟了绝经后女性人群,因而研究范围比较局限。

肾主一身阴阳,开窍于二阴,主司二便,肾中元阳对脾的运化及大肠的传导功能起着推动、温煦作用,胃肠疾病与阳虚关系密切,临床研究也表明阳虚患者易患消化系统疾病^[31]。岳奇等^[32]利用中医“味过于酸,脾气乃绝”理论,在以往建立阳虚便秘模型(食用白醋加活性炭冰水)文献的基础上进行了改进,即 4℃ 食用白醋加活性炭冰水再加止泻药物复方地芬诺酯,比未改进前病理变化更明显。韩博宇等^[33]在建立脾肾阳虚型 IBS-D 动物模型时,比较了三种 IBS-D 造模方法(母子分离、直肠扩张、避水应激^[34])联合番泻叶灌胃以及番泻叶灌胃剂量和观察周期的不同对造模结果的影响,实验结果显示,高剂量(10 g/(kg·d))组番泻叶灌胃 6 周联合直肠扩张组复制的病证结合模型最好,体现在体重、进食、握力、负重游泳时间、肛温;血清和尿液激素水平;代谢水平和粪便菌群的指标。

2 生理生化指标检测

目前关于阳虚的研究主要从内分泌、免疫、血液流变学、能量代谢、自由基、微量元素等方面着手,为阳虚的深入研究提供一定的参考依据。

表 1 常用肾阳虚动物模型建立方法
Table 1 Method of establishment of kidney-yang deficiency animal model

模型种类 Type of model	造模方法 Molding method	造模时间 Molding time
劳倦过度、房室不节型 Excessive fatigue, atrioventricular disjunction type	采用雄雌鼠比例 1:6 同笼喂养和 雄鼠每日游泳至无力下沉时捞出 The ratio of male to female rats 1:6 were fed in the same cage and the male rats were fished out after swimming until they were unable to sink	28 d
自然衰老型 Natural aging type	大鼠自然饲养 Natural rearing of rats	1 年以上 More than 1 year
惊恐伤肾型 Panic attacks the kidneys type	将鼠均置于猫笼之下, 与猫仅隔笼网, 使得猫与鼠 24 h 共处而进行恐吓, 此外, 每天早晚各拿一只活鼠喂猫示众 The rats were placed under the cat cage and separated from the cat only by the cage net, so that the cat and the rat lived 24 hours a day to intimidate, in addition, every morning and evening a live rat to feed the cat to the public	7 d
	以 25 mg/kg 体重灌胃给药 The drug was administered intragastrically with a body weight of 25 mg/kg	9 d
	以 25 mg/kg 体重肌注给药 The drug was injected intramuscularly with 25 mg/kg body weight	7 d、10 d、12 d
氢化可的松型 Hydrocortisone type	以 30 mg/kg 体重肌注给药 The drug was injected intramuscularly with 30 mg/kg body weight	9 d、14 d
	以 10 mg/kg 体重腹腔注射给药 The drug was administered intraperitoneally with a body weight of 10 mg/kg	20 d
	以 25 mg/kg 体重皮下注射给药 The drug was administered subcutaneously with a body weight of 25 mg/kg	7 d
腺嘌呤型 Adenine type	2% 腺嘌呤混悬液 2 mL 灌胃给药 2 ml 2% adenine suspension was administered intragastrically	28 d
性激素型 Sex hormones type	苯甲酸雌二醇大豆油稀释液腹腔注射给药 Intraperitoneal injection of estradiol benzoate soybean oil diluent	15 d
抗甲状腺素型 Antithyroidin type	以 1 mL/100 g 体重 0.1% 灌胃给药丙基硫氧嘧啶 0.1% Propylthiouracil was intragastrically with a body weight of 1 mL/100 g 灌胃他巴唑 30 mg/kg/周 Methimazole was intragastrically with a body weight of 30 mg/1kg/1week	42 d 21 d
羟基脲型 Hydroxyurea type	7.5 mg 羟基脲腹腔注射给药 Intraperitoneal injection of 7.5 mg hydroxyurea	7~15 d 不等, 以出现“阳虚”症状为度 Ranging from 7 to 15 days, in order to appear “Yang deficiency” symptoms for degrees
手术法 operation	甲状腺切除、卵巢切除、睾丸切除、肾上腺切除 Thyroidectomy, ovariectomy, orchiectomy, adrenalectomy	20 d 左右

2.1 阳虚与内分泌

上文中已经提到过, 邝安堃通过实验研究说明阳虚与内分泌功能密切相关。沈自尹^[35]在此基础上进行了临床验证, 结果表明肾阳虚患者 24 h 尿 17 羟皮质类固醇含量普遍低于正常值, 48 例肾阳虚患者中有 20 例丘脑-垂体-肾上腺皮质功能异常, 而 30 例正常人中仅 1 例。沈自尹^[35]认为肾阳虚患者存在垂体-肾上腺、甲状腺、性腺功能紊乱。这一结论得到了很多研究者的验证。戴冰等^[36]的研究结果显示, “氢化可的松”肾阳虚模型小鼠与对照组相比, 血清 ACTH、血清皮质醇 (Cor.)、促甲状腺激素、三碘甲腺原氨酸 (T₃)、甲状腺素 (T₄) 水平降低, 血清促卵泡素 (FSH)、E₂、T 水平升高, 并认为 Cor. 的水平高低作为反映肾上腺皮质功能的重要指标, 可用于评价肾虚模型建立的成功与否, 尤其是对于采用糖皮质激素法建立的肾虚模型。杨宏杰等^[37]和凌昌全等^[38]的研究均认为, 阳虚患者肾上腺皮质功能低下是由于糖皮质激素受体数量或活性的下降。刘旭光等^[39]通过比较正常和“氢化可的松”阳虚大鼠血中 ACTH 与 Cor. 含量的昼夜变动情况, 发现正常大鼠血中 ACTH、Cor. 均有明显昼夜节律变化, 而阳虚大鼠此昼夜节律变化消失, 且振幅、中值减小。

以上研究以从现象到原因、从静态到动态的角度说明了阳虚患者内分泌功能低下。

2.2 阳虚与免疫系统

脾阳虚时免疫功能低下可体现在免疫细胞因子的变化, 韦玮等^[15]在比较通过 BAT 切除术及术后给予高脂饲料建立的脾阳虚动物模型组与对照组免疫功能的研究中, 发现模型组胸腺指数, 脾指数, 白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 均显著降低, 表明模型组大鼠免疫功能低下。

2.3 阳虚与血液流变学

阳虚证可由气虚发展而来, 故有“气虚者阳虚之渐, 阳虚者气虚之甚”的说法。气能生血, 又能行血, 气虚不仅能引起血液虚少, 虚者无不滞者, 还能因为气虚推动乏力导致血瘀, “阳虚则寒”, 寒则气血凝滞, 血流缓慢, 是造成血液流变异常的主要原因。李学玉等^[40]的研究表明, 阳虚患者全血粘度、血浆粘度、红细胞压积、纤维蛋白原明显高于对照组。也有研究表明, 阴虚、阳虚都存在血液流变学的异常。刘素蓉等^[41]的研究对比了阴虚、阳虚、正

常人血流变学方面的差异, 实验结果显示阴虚、阳虚两证与正常人相比均有血液粘度增高, 红细胞电泳时间延长, 血小板聚集率高的表现, 说明两证均表现出血液在血管内失去了“如水之流”的生理状态, 形成血瘀。

2.4 阳虚与能量代谢

阳虚与机体能量代谢关系密切, 阳虚的症状表现与基础代谢率低、能量代谢水平下降、产热不足的表现相似。唐汉庆^[42]的研究探讨了 BAT 切除术、(高脂饮食) 和隔日寒冷环境刺激制备的脾阳虚大鼠与正常大鼠能量代谢的差异, 实验表明, 脾阳虚证大鼠能量代谢水平下降, 血糖和甘油三酯减少, 三磷酸腺苷减少, 体温下降。

Na⁺-K⁺-ATP 酶在人体正常代谢中具有非常重要的作用, 是存在于细胞膜上的一种特殊蛋白质, 通过分解 ATP 维持细胞内外液的渗透压, 酶活性升高, ATP 消耗也增加, 体内能量消耗和产热也增强, 反之则越低^[43]。滕培颖等^[7]对比了“氢化可的松”阳虚动物模型与正常动物多个脏器组织能量代谢水平, 结果表明模型组肝、心、肾、小肠组织的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性均较正常组显著降低, 表明阳虚动物模型以上组织的能量代谢水平均降低。

2.5 阳虚与自由基

SOD 是存在于生物体内的一种抗氧化金属酶, 可延缓由于过量的自由基对细胞结构和功能产生的损害, 修复受损细胞。何晓红等^[44]观察“氢化可的松”大鼠模型组与对照组氧化相关指标含量的变化, 结果表明, 模型组红细胞 SOD 及血浆中谷胱甘肽过氧化物酶明显低于对照组, 而组织中的单胺氧化酶与过氧化脂质 (LPO) 高于对照组。王钰霞等^[45]在观察“氢化可的松”阳虚小鼠自由基代谢情况的研究中发现, 阳虚小鼠血中 SOD 活力下降, 丙二醛 (MDA) 含量升高。以上研究表明机体在阳虚时自由基产生与清除失衡, 过剩的自由基引起细胞膜的脂类过氧化, 膜脂过氧化的产物如 LPO、MDA 等明显升高, 导致组织细胞损伤。

2.6 阳虚与微量元素

锌、镁、铜等微量元素对于机体很多酶活性的发挥具有重要作用, 锌是核酸蛋白合成所必需的微量元素^[46], 阳虚症状与微量元素的代谢紊乱具有相关性。

吴瑞艳等^[47]研究表明, 30~60 岁肾阳虚伴夜尿

频多、尿急、尿失禁等排尿异常的患者体中的锌、镁、铜含量水平较正常人偏低,且补充锌、镁、铜后可改善患者排尿异常的症状。马威等^[48]对比了使用右归丸治疗“羟基脲”肾阳虚动物模型前后家兔血中微量元素的代谢情况,发现家兔模型全血铜、锌、铁含量与造模前相比显著降低,治疗后全血铜、锌、铁元素含量比治疗前显著升高,表明右归丸可以使“羟基脲”肾阳虚动物模型微量元素的含量恢复正常水平。以上研究说明,阳虚患者存在锌、铜、铁、镁等微量元素代谢紊乱。

3 分子生物学指标

从整体角度探析生物体内的动态变化的组学技术有蛋白组学、代谢组学、基因组学,与中医理论体系的“整体观”“动态观”相似,更深入地探讨阳虚证候的本质。

梁华等^[6]的研究以“自然衰老”的雄性小鼠为肾阳虚研究对象,比较与青年小鼠的相关差异蛋白的表达,并对比金匱肾气丸给药前后差异蛋白的表达,结果显示青年组与肾阳虚组、肾阳虚组与给药组分别鉴定出 995、674 个差异蛋白,79 个差异蛋白在金匱肾气丸给药后回调,研究表明金匱肾气丸可调整阳虚证相关的多个代谢通路中差异蛋白的变化,这些差异蛋白主要参与破骨细胞分化、糖脂代谢、细胞凋亡与自噬、氧化还原等生物功能,可初步推测肾阳虚证物质基础与此相关。詹正烜等^[49]的研究对比“甲状腺片混悬液”肾阴虚、“氢化可的松”肾阳虚模型大鼠股骨皮质骨差异蛋白的表达,结果表明,两证蛋白表达趋势相反的是 Colla I,肾阳虚组中主要与能量代谢有关的 Ltk、Pkm2、Atp5a 等蛋白表达下调,这可能是不同肾虚状态骨量下降程度差异的原因之一。

罗向霞等^[50]研究发现,代谢组指纹图谱的差异性在糖尿病视网膜病变(DR)阳虚患者与正常组之间显现,有机酸类和氨基酸类为两者潜在生物标记物,推断阳虚型 DR 病情进展与机体能量代谢相关。大量证据表明肾阳虚证与肠道菌群代谢紊乱有关,Chen 等^[51]的研究通过采用粪便代谢组学结合 16SrRNA 基因测序,分析正常组与“氢化可的松”肾阳虚组肠道菌群的差异,结果显示,肾阳虚证与三种肠道菌群和十一种相关代谢产物有关,这些代谢产物会介导代谢紊乱如氨基酸代谢、能量代谢、甲

胺代谢、胆汁酸代谢和尿素循环、短链脂肪酸代谢、神经、内分泌、免疫和消化系统、脂质代谢和碳水化合物代谢。

葛继荣等^[52]研究绝经后骨质疏松症肾阳虚证患者的基因表达谱,实验结果表明,与细胞信号转导有关的基因 *TRPC6*、*PRKG1*、*SDPR*、*CNKSR*、*DOK6*,与免疫功能有关的基因 *JAM3*、*TAL1*、*HPGD*、*Il5ra*,与钙离子活性有关的基因 *SLC24A3*、*ABLM3*、*LTBP1*、*PCSK6*,与神经内分泌有关的基因 *SERPINE2*、*PTPRN*,这些基因均呈下调趋势。李震等^[3]对比了“劳倦过度、房室不节”型肾阳虚小鼠模型与对照组的差异表达基因,结果显示,差异表达基因主要与生长激素、泌乳素、促性腺激素、炎症/免疫、促细胞凋亡以及影响多巴胺生成的限速酶、影响凝血纤溶机制和精子发育代谢的相关基因有关。

4 问题与展望

目前,学者们已经从动物模型、生理生化指标检测、分子生物学指标检测等多方面对阳虚开展了大量研究,取得了很多进展。

关于阳虚动物模型的研究通过多方面、多手段、多技术不断发展,比较常用的是糖皮质激素造模法,但此法多偏重肾阳虚,且有些文献存在不同脏腑阳虚症状相互混淆的现象,用同一种药物或造模方式建立的阳虚模型所属脏腑却不同,且外观和行为表现并没有客观量化的检测方法,判断方法较为主观。目前对于阳虚模型建立是否成功,尚没有规范的统一判断标准,验证模型是否成功主要从以下三个方面入手:外观及行为表现;实验室指标;药物反证。且由于证在疾病过程中是逐步演变的,甚至会从单一的证型向复合证型演变,因此,阳虚造模要密切观察时间、剂量可能引起的证的变化,以及造模成功比较明确的剂量和时间,根据不同的实验目的选择接近实验要求的动物模型进行研究。

不管哪种造模方式都只是在某个方面模拟阳虚临床证候,并不能与临床阳虚症状全部吻合。关于阳虚本质及物质基础的研究虽然包括很多指标,不同的方面,但特异性不高,且多为实验研究,与临床的诊断与治疗仍存在距离。因此,未来的研究需要更多的关注临床与基础的结合,以临床为切入点,进行大量关于阳虚患者具有特异性的检测指

标,将阳虚这一基础证型通过脏腑辨证更细化和全面,完善和规范不同脏腑阳虚证的诊断标准,更有利于动物模型制作方法的统一,也更有利于对阳虚本质的深入理解,为更具体的辨证论治及临床治疗提供相应的依据和参考价值。

参考文献:

- [1] 李灿东, 吴承玉. 中医诊断学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [2] 任汝静, 杜成成, 李晓强, 等. 中医证候模型的发展及意义 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(12): 8-10.
- [3] 李震, 贾素菊, 王华云, 等. 应用诱导劳倦过度、房事不节法建立肾阳虚模型的研究 [J]. 山东中医学院学报, 1994, 18(6): 418-419.
- [4] 杜维祥, 沈世林, 马玉清. 金锁二仙饮对雄性肾虚小鼠雄激素的调节作用 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(5): 393-394.
- [5] 朱佳杰, 苏晓兰, 刘珊, 等. 病证结合复制大鼠脾肾阳虚腹泻型肠易激综合征模型的探讨 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(9): 15-17, 35.
- [6] 梁华, 王燕, 朱明雪, 等. 基于方证相关探寻肾阳虚证物质基础的蛋白质组学研究 [J/OL]. 中华中医药学刊, [2020-06-16] (2020-07-07), <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=ZYHS2020061302T&v=nl9q84y1AN7IWNokhx0ZfaPjr3CgJyHeMdD7TToVV95WH80IKcMm65arhP11VWz>.
- [7] 滕培颖, 赵瑞芝, 徐福平, 等. 附子半夏汤对阳虚模型大鼠不同脏器能量代谢的影响 [J]. 新中医, 2017, 74(2): 4-6.
- [8] 章敏, 陈刚, 王勇, 等. 外湿致病动物模型研制探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 748-750.
- [9] 邝安堃. 某些助阳药对于大剂量皮质素所致耗竭现象的影响 [J]. 中华内科杂志, 1963, 11(2): 113-116.
- [10] 秦文艳, 陈贺, 朱竟赫, 等. 不同氢化可的松小鼠肾阳虚模型制备方法对比研究 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(4): 11-14.
- [11] 范景, 吕圭源, 李恒辉, 等. 杜仲提取物对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(1): 1-4.
- [12] 裴妙荣, 王晓英. 用甲状腺功能减退症大鼠确立脾肾阳虚证之病证结合模型的探讨 [J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(5): 299-301.
- [13] 欧阳轶强, 邹移海, 张薇, 等. 对大鼠他巴唑肾阳虚证动物模型下丘脑-垂体-靶腺轴几项指标的考察 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(9): 1658-1661.
- [14] 徐敏, 欧明, 丘和明, 等. 甲低“阳虚”兔模型畏寒主证的定量观测方法 [J]. 广州中医学院学报, 1988, 5(4): 219-222.
- [15] 韦祎, 唐汉庆, 李晓华, 等. 附子理中汤对脾阳虚证大鼠免疫细胞因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 179-182.
- [16] 肖静, 王毅兴, 高建东, 等. 肾阳虚证的研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(2): 73-76.
- [17] 林海雄, 王晓彤, 张韧. 肾阳虚模型对甘氨酸受体 mRNA 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1518-1520.
- [18] 邵命海, 肖静, 王毅兴, 等. 从“肾主生殖”角度评价腺嘌呤与氢化可的松诱导的肾阳虚模型 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(2): 57-59.
- [19] Ogirima T, Tano K, Kanehara M, et al. Sex difference in osteopenia induced by adenine in rats [J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2005, 22(3): 249-252.
- [20] 刘福春, 张家庆, 李菊仙, 等. 羟基脲制造“阳虚”动物模型的研究 [J]. 吉林中医药, 1984, (5): 31-33.
- [21] 肖凌, 王静芝, 翁鑫宇, 等. 衰老阳虚大鼠生化指标及 HSP70 表达的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 101-103.
- [22] 鲁艳芳, 黄琼霞, 袁军, 等. 阿霉素肾病模型与中医阳虚关系的探讨 [J]. 中国中医药科技, 2004, 11(5): 259-260.
- [23] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events [J]. Lab Invest, 1982, 46(1): 16-23.
- [24] 余薇, 吴基良, 汪晖. 阿霉素心脏毒性防治研究进展 [J]. 咸宁学院学报(医学版), 2008, 22(4): 351-354.
- [25] 童妍. 温补心阳法治疗心阳虚型慢性心力衰竭大鼠的分子机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [26] 侯衍豹, 尹翠翠, 高敏, 等. 基于呼吸代谢系统动态监测慢性心衰(心阳虚证)大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(8): 1335-1338.
- [27] 杨喆, 柴洪佳, 王大伟. 阳虚型慢性心力衰竭 SD 大鼠模型的制备及指标判定 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(14): 1593-1596.
- [28] 陈博武, 贾茹, 钱晨, 等. 基于中医四诊方法对哮喘大鼠肾阳虚证模型建立的评价研究 [J]. 中国中医药科技, 2017, 24(5): 537-539, 543.
- [29] Yilmaz O, Karaman M, Bagriyanik HA, et al. Comparison of TNF antagonism by etanercept and dexamethasone on airway epithelium and remodeling in an experimental model of asthma [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(3): 768-773.
- [30] 陈剑磨, 张胜军, 夏炳江. 骨质疏松肾阳虚病证结合模型构建的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(2): 201-203, 254.
- [31] Huang TG., Li QZ., Yin YQ, et al. Composition of intestinal microflora associated with Yang-deficiency [J]. J Tradit Chin Med Sci, 4(3): 254-260.
- [32] 岳奇, 刘聪, 王玉娥, 等. 阳虚便秘大鼠模型的建立及评价 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(45): 143-145, 153.
- [33] 韩博宇. 脾肾阳虚证 IBS-D 大鼠模型的建立与生物学基础的探索 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [34] Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral

- hyperalgesia [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(1): G42-G53.
- [35] 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(1): 50-52.
- [36] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [37] 杨宏杰, 郑敏. 阳虚患者糖皮质激素受体改变及意义 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 1081.
- [38] 凌昌全, 李敏, 朱德增, 等. 阴阳虚证与糖皮质激素受体关系的临床与实验研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2001, 11(9): 532-534.
- [39] 刘旭光, 宋开源, 余曙光, 等. 阴虚阳虚大鼠促肾上腺皮质激素及皮质酮昼夜节律的差异研究 [J]. 四川中医, 2002, 20(1): 6-8.
- [40] 李学玉, 张子贵. 中医阳虚证血液流变学观察 [J]. 微循环技术杂志, 1996, (2): 65, 103.
- [41] 刘素蓉, 杨世兴, 赵淑媛, 等. 阴虚阳虚证与血液流变学研究 [J]. 中国医药学报, 1989, 42: 12-14.
- [42] 唐汉庆. 脾阳虚证大鼠能量代谢和神经内分泌改变的实验研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [43] 潘承政, 韦袞政. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性与阳虚证的内在联系探讨 [J]. 环球中医药, 2013, 6(11): 851-853.
- [44] 何晓红, 韩信昌, 温富春, 等. 氢化考的松致大鼠“阳虚”动物模型 SOD、GSH-Px、MAO-B、LPO 的含量变化 [J]. 老年学杂志, 1992, (2): 116-117.
- [45] 王钰霞, 陈魁敏, 郝伟, 等. 真武汤对阳虚小鼠作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(1): 48-49.
- [46] 毕慧玲, 刘锦宏. 微量元素锌、硒、铅及生殖激素与生殖健康的关系 [J]. 中国卫生标准管理, 2017, 8(18): 29-31.
- [47] 吴瑞艳, 崔淑华, 张悦, 等. 肾阳虚证伴夜尿频多者微量元素中锌、铁、镁、铜值低于正常人水平 [J]. 系统医学, 2018, 3(15): 148-151.
- [48] 马威, 薛莎, 汤学军, 等. 右归丸对肾阳虚动物模型血液微量元素含量的影响 [J]. 中国中医药科技, 2000, 7(3): 168-169.
- [49] 詹正烜, 郑乃熙, 张英杰, 等. 肾阴虚、肾阳虚模型大鼠股骨皮质骨差异蛋白质表达的分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(10): 1242-1247.
- [50] 罗向霞, 段俊国, 李响. 糖尿病视网膜病变阳虚病机的代谢组学物质基础 [J]. 中国中医眼科杂志, 2013, 23(6): 394-397.
- [51] Chen R, Wang J, Zhan R, et al. Fecal metabonomics combined with 16S rRNA gene sequencing to analyze the changes of gut microbiota in rats with kidney-yang deficiency syndrome and the intervention effect of You-gui pill [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 244: 112139.
- [52] 葛继荣, 谢丽华, 陈可, 等. 绝经后骨质疏松症肾阳虚证差异表达基因分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(2): 134-138.

[收稿日期] 2020-06-10

李雨真,金春晖. PDX 模型在胃癌研究方面的应用与挑战 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 146-150.

Li YZ, Jin CH. Application and challenges of a patient-derived xenograft model in the study of gastric cancer [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 146-150.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 01. 022

PDX 模型在胃癌研究方面的应用与挑战

李雨真,金春晖*

(南京中医药大学附属无锡医院,肿瘤科,江苏 无锡 214071)

【摘要】 在我国,胃癌发病率随着人口老龄化的越来越严重将成上升趋势,而它又是死亡率较高的恶性肿瘤。现如今,缺乏有效的抗肿瘤药物是关键因素,故临床前研究至关重要,动物模型与其密切相关。现代研究强调肿瘤的精准治疗,于是人源性异种移植模型(patient-derived xenograft,PDX)应运而生,它与病人原始肿瘤的生物特征有很高的一致性,弥补了传统细胞系模型的不足,为肿瘤研究提供了新的平台选择。本文综述了胃癌 PDX 模型的建立方法,归纳了近年来的研究应用,提出了建立胃癌 PDX 模型的挑战。

【关键词】 胃癌;PDX 模型;综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0146-05

Application and challenges of a patient-derived xenograft model in the study of gastric cancer

LI Yuzhen, JIN Chunhui*

(Wuxi Hospital affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Department of Oncology, Wuxi 214071, China)

【Abstract】 In China, the incidence of gastric cancer has increased with the aging population, and this is a malignant cancer with high mortality. Currently, the lack of effective anti-tumor drugs is a key concern; therefore, preclinical research is crucial, and animal models are important. Modern research emphasizes precise tumor treatment, and patient-derived xenografts (PDX) have emerged from related research. PDX are highly consistent with the biological characteristics of the original tumor, which addresses the deficiencies of the traditional cell line model and provides a new platform for tumor research. In this paper, we review the established method of PDX modelling for gastric cancer. We also summarize the related research and its application in recent years.

【Keywords】 gastric cancer; PDX model; review

在我国,胃癌(gastric cancer,GC)发病率随着人口老龄化的越来越严重将成上升趋势,而它又是死亡率较高的恶性肿瘤^[1-2]。现如今,缺乏有效的抗肿瘤药物是关键因素,故临床前研究至关重要,动物模型与其密切相关^[3]。

现代研究表明,癌症是一种高度异质性疾病,

是由细胞中基因组、表观基因和转录组改变的结合引起,即使源于同一器官的肿瘤也存在着很大的差异性,所以肿瘤的精准治疗尤为重要^[4]。精准肿瘤学是一种癌症治疗的策略,使用癌症的分子谱分析来对患者进行分层,寻找到疾病的原因和治疗的靶点,最终实现对于疾病和特定患者进行个性化精准

【基金项目】 无锡市卫健委精准医学专项项目(J201801)。

【作者简介】 李雨真(1997—),女,硕士研究生,专业:恶性肿瘤中西医结合治疗。E-mail:312576963@qq.com

【通信作者】 金春晖(1978—),男,博士,主任医师,专业:恶性肿瘤中西医结合防治。E-mail:jickim@163.com

治疗的目的^[5]。

传统的细胞系肿瘤模型 (cell line-derived xenograft, CDX) 是将人体肿瘤细胞体外培养、传代, 建立稳定的细胞系后再注入免疫缺陷小鼠体内, 然而该模型不能很好地保留原肿瘤的生物学特性^[6], 故实验数据缺乏真实性与可靠性, 无法提供肿瘤的精准化治疗策略。于是, 人源性异种移植模型 (patient-derived xenograft model, PDX) 应运而生, 它与病人原始肿瘤的生物特征有很高的一致性的, 比如, 方天等^[7]建立的肺癌 PDX 模型与患者原代肿瘤有相同的组织学特点和排列结构, 验证了在组织与基因水平上, PDXs 的患者肿瘤中有相当程度的肿瘤特征可以被保留; 再者, 有研究表明在人群水平上, PDXs 与人类癌症的基因组图谱非常相似, 更广泛地代表了患者间的多样性^[8-9]。总之, 它弥补了传统细胞系模型的不足, 为肿瘤研究提供了新的平台选择。本文总结了胃癌 PDX 模型的建立方法, 归纳了近年来的研究应用, 提出了建立胃癌 PDX 模型的挑战, 现综述如下。

1 胃癌 PDX 模型的建立方法

建立一个完整的 PDX 模型主要取决于三个关键要素它们分别是移植样本, 工具小鼠以及移植部位的选择。

1.1 移植样本的获取及保存

本文主要讨论的是胃癌 PDX 模型的建立, 所以移植样本自然是患者来源的胃肿瘤组织, 可以在手术过程中获得, 也可以直接在胃镜下活检取得。通常, 从切除到植入的最佳时限是 30 min~1 h^[10]。手术和活检样本应立即放入预先装有冷无菌培养基的收集管中, 或者盐水 (0.9% 氯化钠) 和标准组织培养基 (例如 RPMI 或 DMEM) 都是可以短期保存样本的培养基。但是, 如果无法在最佳时限内植入样本, 则应将其保存在已证明可长时间支持细胞生存能力的培养基中。有研究表明, Hypothermosol™ 有助于维护肿瘤细胞活力长达 48 h^[11]。值得一提的是, 在采集样本及处理样本时, 必须严格执行无菌操作, 以防止污染, 降低植入的失败率。

1.2 工具小鼠的选择

大量实验研究表明, 具有免疫缺陷的小鼠更易接收样本, 然而市面上有四种免疫缺陷小鼠系, 它们分别是裸鼠 (nude mice)、重度联合免疫缺陷小鼠 (severe combined immunodeficiency mice, SCID)、非

肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷小鼠 (non-obese diabetic mice/Severe combined immune deficiency mice, NOD/SCID) 以及 NOG 小鼠。有研究者开发了一种通过肿瘤植入指数 (tumor engraftment index, TEI) 定量评估各种小鼠免疫缺陷的方法, 用于帮助实验者们选择合适的研究模型, 其中, NOD-scid-IL2Rg^{-/-} (NSG) 的 TEI 得分最高, 即免疫缺陷程度最大, 适合作为多种人源肿瘤组织的移植宿主^[12], 而 NOD.Cg-Prkdc-scidIL2rgtm1Sug/JicCr1 (NOG) 小鼠的异种移植成功率高、生存时间长等特点也是异种移植良好的模型^[13]。

1.3 移植部位和方式的选择

距离成功的最后一步便是选择恰当的移植方式, 较常见的有皮下移植、肾包膜移植以及原位移植。皮下移植操作简便, 且易于观察和检测移植瘤的大小, 但移植失败率较高, 也无法适用于肿瘤转移的研究; 肾包膜移植操作难度较大但成瘤率较高, 现有研究表明七甲川菁染料 (heptamethine cyanine dyes) 具有肿瘤成像和靶分子的双重功能, 已经可以用于筛选多个不同类型的移植于肾包膜内的 PDX 模型, 包括胃癌、肝细胞癌 (hepatocellular, HCC) 和肾癌 (renal carcinoma, RCC) 等^[14]。原位移植因其容易发生转移的特性, 所以常常用于建立胃癌转移模型。王洁等^[15]利用临床肿瘤标本成功建立胃癌转移模型并验证了移植瘤组织结构与患者基本保持一致。

2 胃癌 PDX 模型的研究应用

2.1 个体化治疗

胃癌 PDX 模型已被证实其肿瘤在病理学特点、遗传表征及对药物反应方面均与原发瘤保持高度一致^[16], 于是, “小鼠替身” 的概念便被引入, 它们代替病人去测试不同药物方案的治疗效果, 从中筛选出最有效的治疗方案, 大大减少了患者因无效治疗而损失的时间及经济成本。众所周知, 曲妥珠单抗在改善 HER-2 阳性胃癌患者的治疗效果中发挥了重要作用。但是, 一旦疾病进展, 就缺乏二线治疗的证据。受此启发, Aguilar-Mahecha 等^[17]将一例 HER-2 阳性胃癌伴有肺肝转移的患者进行 “阿凡达” 试验, 以测试 T-DM1 能否作为该患者的二线治疗药物。其中治疗决策由 PDX 数据指导, 并用连续血液标本 ctDNA 标记监测治疗反应。研究结果表明, 在治疗选择有限的患者中, 使用 PDX 模型识别

个性化有效疗法是十分可行的,并且 ctDNA 的水平是反应和疾病进展的敏感预测指标,并且优于 CEA 测试。

2.2 潜在靶点的验证与靶向药物的研究

到目前为止,适用于胃癌患者的靶向治疗药物品种并不多,所以,潜在靶点的探索和新型靶向药物的研究至关重要。近几年来,PDX 模型为潜在靶点方面做出了不少的贡献。例如,Wang 等^[18]建立了 9 个 PDX 模型,验证了一些关键分子如 EGFR、HER-3、MET 和 PDL-1,并在其中的一个 PDX 模型中发现携带 c-Met 或 FGFR-2 基因扩增的大部分胃癌患者可以受益于 c-Met 或 FGFR-2 靶向治疗或联合靶向治疗。Zhu 等^[19]研究发现了抗 CLDN18.2 ADC 和抗 CLDN18.2 CD3 双特异性分子对已建立的胃和胰腺腺癌患者来源的肿瘤具有疗效,证实了 CLDN18.2 是治疗胃和胰腺腺癌的潜在药物靶标。Seo 等^[20]首次报告 GPR177 在胃癌患者中高表达,建立胃癌 PDX 模型表明 GPR177 可作为预后标志物的新型候选药物,也是胃癌患者有治疗希望的靶标。Zhang 等^[21]通过 PDX 模型验证了环状 RNA circNRIP1 的肿瘤促进剂作用,发现 circNRIP1 抑制剂可通过 AKT1/mTOR 信号传导途径阻断胃癌细胞的恶性行为,为 circNRIP1 抑制剂用于胃癌治疗提供了依据。Corso 等^[22]建立了一个包括 100 位患者来源的异种移植、原代细胞系和细胞质的广泛、多层次的胃癌模型平台。根据组织学、微卫星稳定性、Epstein-Barr 病毒(EBV)状态和分子结构对样本进行分类,从中鉴定了 micro satellite instability (MSI) 信号通路,并有助于进展期胃癌的精准治疗。

与此同时,一些新的生物标志物也在 PDX 模型中得到验证。例如,Li 等^[23]发现患者血浆 cfDNA 中羟甲基胞嘧啶(5-Hydroxymethylcytosine 5hmC)水平升高的基因富含 PDX 模型血浆 cfDNA 中 5hmC 水平较高的基因,验证了癌症患者血浆 cfDNA 与原发肿瘤的相关性,表明循环 cfDNA 的 5hmC 生物标志物对结直肠癌和胃癌的预测能力很强,优于传统生物标志物。近期的一项研究建立胃癌 PDX 模型验证了 TIR1 是胃癌的潜在识别生物标志物,并发现负载阿霉素的 HFn 纳米载体(doxorubicin HFn nanocarrier, HFn-Dox)对 GC-PDX 肿瘤具有优异的抗肿瘤作用,为疾病的诊断和治疗提供了新的方法^[24]。

PDX 模型在靶向药物研究方面也发挥了自身

的价值,例如,Chen 等^[25]采用分子谱清晰的 5 株人 GC 细胞系和 8 个患者源性异种移植瘤(PDX)模型评价阿法替尼的抗肿瘤活性和机制,发现阿法替尼对 EGFR/HER2 高扩增(拷贝数 26)或过表达(HC34)的 PDX 模型具有很强的抗肿瘤作用,为未来的临床开发阿法替尼作为单一疗法或联合治疗胃癌提供了强有力的证据。

2.3 人-鼠共临床试验

“共同临床试验”结合了 PDX 模型临床前实验和患者 I/II 期临床试验的一种研究,旨在开发个性化抗癌治疗的精密医学^[26]。一项奥拉帕利(olaparib)和替莫唑胺(temozolomide)联合治疗方案在复发性小细胞肺癌(small-cell lung cancer, SCLC)患者中的 I/II 期研究以及在患者源性异种移植瘤(PDXs)中进行生物标志物发现的联合临床试验研究中发现此方案在来自 4 名患者的 PDX 模型中的疗效与在现实中看到的情况相同,并且在 PDX 模型中对“OT”的敏感性和耐药性的候选生物标志物,也在患者样品中得到了验证^[27]。然而遗憾的是,关于胃癌的相关研究寥寥无几,可能与现在胃癌 PDX 库的 PDX 数量较少有关,所以,胃癌 PDX 模型还有很大的前景,等待更多的研究者们去探索和挖掘。

3 建立胃癌 PDX 模型的挑战

3.1 淋巴瘤的转化

与其他肿瘤 PDX 模型不同的是,胃癌 PDX 模型有着较高的淋巴瘤(lymph-gland, LT)发生率^[28]。对于形成这些 LT 的原因,不同的人有着不同的观点,一些人认为是来源于患者的肿瘤浸润淋巴细胞的被激活和过度生长^[29]。一些人认为,在人体内处于潜伏状态的 EBV 感染的 B 细胞,在被移植到缺乏功能性免疫细胞的小鼠后,活化形成了淋巴瘤^[22]。还有一些人认为,慢性炎症引起淋巴细胞浸润增加,而胃癌病例中的基底炎症发生率高,于是增加了胃癌 PDX LT 的形成率^[28-31]。目前,有研究表明,常规利妥昔单抗给药对减少肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和肝细胞癌 PDX 模型中淋巴瘤的产生效果显著,但尚无有效的方法来预防 EBV 相关的 B 细胞淋巴瘤^[32]。

3.2 建模时间长

肿瘤异种移植通常需要漫长的 4~8 个月的等待,还需要产生足够的组织来试验药物疗效。而晚期患者并没有足够的时间也没有足够的金钱,所

以,缩短建模时间以及加快药物敏感性测试显得尤为重要。对于前者,有学者提出以斑马鱼胚胎作为受体构建胃癌 PDX 模型可相对节约时间成本^[33];对于后者,有研究者开发了一种 miniPDX 模型,将患者来源的肿瘤细胞注入中空纤维胶囊内,快速有效地检测药物敏感性的方法^[34]。此方法在一例 Mini-PDX 模型结合 DNA-WES/RNA 分析指导转移性十二指肠腺癌患者个体化治疗的研究中得到验证^[35]。

3.3 传代不稳定性

在连续传代过程中,人类基质逐渐被小鼠基质而取代,导致肿瘤的特殊调节机制以及诸如间质液压力等物理特性的改变,从而扰乱肿瘤微环境,使得相关药物的研究存在较大的误差^[36]。一项针对 24 种癌症的 1110 个 PDX 样本的研究发现,在 PDX 传代期间获得的拷贝数改变 (copy number alteration, CNA) 与患者肿瘤进展期间获得的拷贝数改变有所不同,于是基因组改变是否会对模型产生负面影响的问题也随之而来^[37]。

3.4 无法评估免疫疗法

如前所述,建立 PDX 模型的关键之一是使用免疫缺陷宿主菌株进行肿瘤植入和繁殖。因此无法准确评估免疫疗法,例如疫苗和免疫调节剂以及激活抗肿瘤免疫系统的药物疗效^[38]。Lin 等^[39]将人类 CD34 + HSPC 或 PBMC 移植到 CDX 或 PDX 小鼠模型中,成功建立了 PBMCs-CDXs, PBMCs-PDX 和 auto-PBMCs-PDX 人源化免疫重建小鼠系统模型,为药物开发,评估免疫疗法以及指导临床决策提供有希望的平台。

3.5 保存困难,耗费较大

为了 PDX 模型后续再移植效率的提高,实验室需要有长期的低温有效冷冻保存的条件。并且,以该类模型为基础的肿瘤精准医学研究需要研究者投入大量的人力物力财力。目前,全球已建成的 PDX 库包括美国国家癌症研究所 (NCI) 的患者模型存储库、异种移植公共存储库 (PRoXe)、欧洲 EuroPDX 资源等大规模 PDX 模型平台^[40],都是国家级多机构平台通过一系列复杂而困难的程序以确保实验方案的实施。而人源性类器官 (patient-derived organoids, PDOs) 是经过体外三维培养构建的多细胞团,不仅能够无限增值,还可以通过基因改造技术,实现疾病模型的建立,相对 PDX 模型来说可以节省大量的时间与资源^[41-42]。

4 总结

现如今,癌症的研究朝着精准医学发展,强调个体化治疗,但是在个性之中也别忽视了共性。目前已有多个胃癌 PDX 模型库,涵盖了常见的病理类型、甲胎蛋白 AFP 分泌型及 HER2 阳性型^[43],为精准医学提供了良好的研究平台,但是,库中模型数量还远远达不到临床试验的需求,因此,更大样本量的胃癌 PDX 库的建立需要后继者们共同来完成。与此同时,胃类器官及胃癌类器官与 PDX 互相补充,联合使用,进一步完善了肿瘤体外及体内的研究设计。相信在不久的将来,治疗手段的丰富应用,抗胃癌药物的大量研发会使胃癌病人对疾病不再恐惧。

参考文献:

- [1] 杨之洵. 中国胃癌发病趋势及预测 [J]. 中国肿瘤, 2019, 28 (5): 321-326.
- [2] 白慧霞. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(7): 192.
- [3] Choi YY, Lee JE, Kim H, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as preclinical models for gastric cancer [J]. Sci Rep, 2016, 6: 22172.
- [4] Cho SY. Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology [J]. Lab Anim Res, 2020, 36: 14.
- [5] Garraway LA, Verweij J, Ballman KV. Precision oncology: an overview [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(15): 1803-1805.
- [6] Kuwata T, Yanagihara K, Iino Y, et al. Establishment of novel gastric cancer patient-derived xenografts and cell lines: pathological comparison between primary tumor, patient-derived, and cell-line derived xenografts [J]. Cells, 2019, 8(6): 585.
- [7] 方天, 黄海荣, 程熙, 等. 肺癌人源性肿瘤组织异种移植模型的组织学变化及其 p63、napsin A 和 TTF-1 的表达差异 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 60-64.
- [8] Rosfjord E, Lucas J, Li G, et al. Advances in patient-derived tumor xenografts: from target identification to predicting clinical response rates in oncology [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 91 (2): 135-143.
- [9] Gao H, Korn JM, Ferretti S, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response [J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1318-1325.
- [10] Francesco G, Tabbò Fabrizio, Luca B, et al. The influence of tissue ischemia time on RNA integrity and patient-derived xenografts (PDX) engraftment rate in a non-small cell lung cancer (NSCLC) biobank [J]. PLoS One, 2016, 11 (1): e0145100.
- [11] Marissa M, McCarthy CR, Kulick AR, et al. Establishing and maintaining an extensive library of patient-derived xenograft models [J]. Front Oncol, 2018, 8: 19.
- [12] Ye W, Jiang Z, Li GX, et al. Quantitative evaluation of the

- immunodeficiency of a mouse strain by tumor engraftments [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 59.
- [13] 李媛, 闫平. 免疫缺陷小鼠平台上的人肿瘤异种移植研究进展 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2012, 33(1): 137-140.
- [14] 师长宏. 七甲川菁类化合物在肿瘤模型活体成像研究中的应用 [J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(5): 337-341.
- [15] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 7-12.
- [16] Choi YY, Lee JE, Kim H, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as preclinical models for gastric cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22172.
- [17] Aguilar-Mahecha A, Joseph S, Cavallone L, et al. Precision medicine tools to guide therapy and monitor response to treatment in a HER-2+ gastric cancer patient: Case report [J]. *Front Oncol*, 2019 (9): 698.
- [18] Wang H, Lu J, Tang J, et al. Establishment of patient-derived gastric cancer xenografts: a useful tool for preclinical evaluation of targeted therapies involving alterations in HER-2, MET and FGFR2 signaling pathways [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 191.
- [19] Zhu G, Foletti D, Liu X, et al. Targeting CLDN18. 2 by CD3 bispecific and ADC modalities for the treatments of gastric and pancreatic cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8420.
- [20] Seo J, Kee HJ, Choi HJ, et al. Inhibition of Wntless/GPR177 suppresses gastric tumorigenesis [J]. *BMB Reports*, 2018, 51(5): 255-260.
- [21] Zhang X, Wang S, Wang H, et al. Circular RNA circNRP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mTOR pathway [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 20.
- [22] Corso S, Isella C, Bellomo SE, et al. A comprehensive PDX gastric cancer collection captures cancer cell-intrinsic transcriptional MSI traits [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(22): 5884-5896.
- [23] Li W, Zhang X, Lu X, et al. 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers [J]. *Cell Res*, 2017, 27(10): 1243-1257.
- [24] Cheng X, Fan K, Wang L, et al. TIR1 binding with H-ferritin nanocarrier achieves prognostic diagnosis and enhances the therapeutic efficacy in clinical gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 92.
- [25] Chen Z, Liu Z, Zhang M, et al. EPHA2 blockade reverses acquired resistance to afatinib induced by EPHA2-mediated MAPK pathway activation in gastric cancer cells and avatars mice [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(9): 2440-2449.
- [26] Clohessy JG, Pandolfi PP. Mouse hospital and co-clinical trial project from bench to bedside [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(8): 491-498.
- [27] Farago AF, Drapkin BJ, Charles A, et al. Abstract CT048: Phase 1/2 study of olaparib tablets and temozolomide in patients with small cell lung cancer (SCLC) following failure of prior chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): CT048-CT048.
- [28] Zhang L, Liu Y, Wang X, et al. The extent of inflammatory infiltration in primary cancer tissues is associated with lymphomagenesis in immunodeficient mice [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9447.
- [29] Nelson, BH. CD20⁺ B cells: The other tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2010, 185(9): 4977-4982.
- [30] 师长宏. 肿瘤患者来源的异种移植 (PDX) 模型 [J]. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(3): 165-168.
- [31] Fujii E, Kato A, Chen YJ, et al. Characterization of EBV-related lymphoproliferative lesions arising in donor lymphocytes of transplanted human tumor tissues in the NOG mouse [J]. *Exp Anim*, 2014, 63(3): 289-296.
- [32] Leiting JL, Hernandez MC, Yang L, et al. Rituximab decreases lymphoproliferative tumor formation in hepatopancreaticobiliary and gastrointestinal cancer patient-derived xenografts [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5901.
- [33] Wu JQ, Zhai J, Li CY, et al. Patient-derived xenograft in zebrafish embryos: a new platform for translational research in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 160.
- [34] Zhang F, Wang W, Long Y, et al. Characterization of drug responses of mini patient-derived xenografts in mice for predicting cancer patient clinical therapeutic response [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 60.
- [35] Zhao P, Chen H, Wen D, et al. Personalized treatment based on mini patient-derived xenografts and WES/RNA sequencing in a patient with metastatic duodenal adenocarcinoma [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 54.
- [36] Junttila MR, Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response [J]. *Nature*, 2013, 501(7467): 346-354.
- [37] Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(11): 1567-1575.
- [38] Yoshida, GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 4.
- [39] Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. *MAbs*, 2018, 10(8): 1301-1311.
- [40] Byrne AT, Alferez DG, Amant F, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenograft [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 254-268.
- [41] 刘宏飞, 陈晓红, 黄志刚, 等. 类器官和人源性肿瘤组织异种移植模型在肿瘤研究中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(3): 103-108, 122.
- [42] 范圣先, 尹健一, 王萌, 等. 胃类器官及胃癌类器官的构建与应用 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2018, 21(11): 1315-1320.
- [43] 徐农, 徐馨, 毛晨宇, 等. 基于 PDX 模型的胃癌个体化治疗研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(18): 922-925.

[收稿日期] 2020-06-10

李爱民, 李晓娟, 李瑞生. 类风湿性关节炎大小鼠动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 151-156.

Li AM, Li XJ, Li RS. Research progress of small animal models of rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 151-156.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.023

类风湿性关节炎大小鼠动物模型的研究进展

李爱民^{1#}, 李晓娟^{2#}, 李瑞生^{2*}

(1. 青岛市第五人民医院, 风湿病科, 山东 青岛 266002; 2. 中国人民解放军总医院第五医学中心, 临床研究
管理中心, 北京 100039)

【摘要】 类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病, 致残率高, 其病理机制尚不明确。构建合适的尤其是与人 RA 发病相似的动物模型在研究 RA 的发病机制和临床治疗方面具有十分重要的意义。而所构建类风湿性关节炎模型所选择的大小鼠品系和方法很多, 各种动物模型都有其各自的侧重点。现针对所报道的 RA 有关的趋于成熟与稳定的大小鼠动物模型进行综述。

【关键词】 类风湿性关节炎; 自身免疫性疾病; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0151-06

Research progress of small animal models of rheumatoid arthritis

LI Aimin^{1#}, LI Xiaojuan^{2#}, LI Ruisheng^{2*}

(1. Department of Rheumatology and Immunology, Fifth Hospital of Qingdao City, Qingdao 266002, China.

2. Research Center for Clinical and Translational Medicine, Fifth Medical Center of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039)

【Abstract】 Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease with high disability, and its pathological mechanism is still unclear. Therefore, it is of great significance to construct appropriate animal models, especially those similar to human RA, in the study of the pathogenesis and clinical treatment of RA. There are many strains and method of rats and mice to construct the rheumatoid arthritis model. In this paper, we review the reported mature and stable rat and mouse models related to RA.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; autoimmune disease; animal model

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病, 主要以炎性滑膜炎为主, 多见于多关节性和对称性地侵袭手足小关节, 可造成关节结构的破坏, 出现关节畸形及功能丧失^[1]。同时 RA 还常累及关节外其他器官, 血清中类风湿因子呈阳性及各种细胞因子和抗体均会发生变化, 还会出现滑膜细胞增生及纤维化、血翳形成、骨和

软骨损害等一系列病理损伤过程^[2]。国内 RA 其成人的患病率为 0.32%~0.36%, 女性患者为男性患者的 2~4 倍^[3]。该病程较长, 如不及时治疗, 致残率也较高, 将会严重影响患者的生活质量。目前, 对于 RA 的发病原因和发病机制尚未完全明确, 还没有十分有效地靶向治疗药物。为了能够更好地了解 RA 的发病机制, 来建立与人类相似的 RA 动

【作者简介】 李爱民(1969—), 女, 主任医师, 主要从事临床风湿病研究。E-mail: lamfsk@163.com

李晓娟(1980—), 女, 硕士, 主要从事实验动物模型研究。E-mail: sxlily55@163.com。*共同第一作者

【通信作者】 李瑞生(1969—)男, 博士, 副研究员, 主要从事动物模型研究。E-mail: 314329216@qq.com

物模型进行药物筛选研究是非常关键的。因此许多学者对 RA 的动物模型进行了不断地探讨和研究,本文就目前比较成熟和稳定的 RA 大小鼠动物模型作以简介,为今后进一步研究 RA 疾病提供新的思路。

1 小鼠

1.1 诱导型小鼠模型

1.1.1 胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA)

CIA 模型是最广泛使用的 RA 小鼠模型之一。胶原蛋白是一类具有活跃生物功能的细胞外间质成分,其中Ⅱ型胶原(CⅡ)可诱导体内产生关节炎性质的自身免疫性反应^[4]。建模方法是将牛 CⅡ 和完全弗氏佐剂(CFA)乳化后,在小鼠尾根部进行免疫注射后会出现关节肿胀现象,一个多月后会达到高峰。最常用的小鼠为 DBA/1,张引红等^[5]采用 DBA/1J 小鼠,利用牛 CⅡ 诱导构建 RA 模型,发现补骨脂素通过调节 Th1/Th2 细胞平衡及抑制 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 起到免疫调节作用,从而缓解 RA 进程。而 C57BL/6 小鼠对牛 CⅡ 诱导的关节炎具有抵抗性,如果改用鸡的胶原蛋白即可。王宁等^[6]利用鸡 CⅡ 诱导构建 RA 模型,便证实了滤泡辅助 T 细胞(T_{fh} 细胞)与 RA 的发生和病情进展有密切关系。但此类模型与 RA 之间最显著的差异是不存在类风湿因子。

1.1.2 抗原诱导的关节炎 (antigen-induced arthritis, AIA)

AIA 模型首次在 1977 年构建,以研究诱导和持续性疾病中的体液和细胞免疫应答^[7]。目前基本是在此基础上进行了适当的改良。其造模方法是在股骨头对应的外部皮肤皮内注射 100 μ g 甲基化牛血清白蛋白(mBSA)和 CFA 混合液,并注入小鼠尾部和膝关节腔内,从第 1 天开始就会出现严重的关节炎症状,但持续 3 d 后症状会逐渐减轻。范凯健等^[8]利用 C57BL/6 小鼠将 CIA 和 AIA 造模情况进行了比较,发现 CIA 造模成功率不高且严重程度差异较大,AIA 造模成功率高但维持时间较短。

1.1.3 胶原抗体诱导的关节炎 (collagen antibody induced arthritis, CAIA)

CAIA 模型是给予内毒素(LPS)和单克隆抗体混合物诱导而成,广泛用于研究自身免疫性关节炎的发病机制和评估治疗^[9]。采用的单克隆抗体混

合物主要是由 3 个 IgG2a(A2-10、F10-21、D8-6)和 IgG2b(D1-2G)组成,通过识别位于 CⅡ 的 CB11 片段(CⅡ 124-402)来诱导 CAIA 的产生^[10]。研究表明 CAIA 的易感性与 MHC 不相关,但其发病率和严重程度均较低^[11]。此模型易感品系为 C57BL/6 小鼠,需用浓度为 10 mg/mL 的小鼠抗 CⅡ 诱导,可以在几天内诱导持续严重的关节炎^[12]。Hutamekalin 等^[13]发现,LPS 剂量降低,既能引发关节炎,又能降低 LPS 的毒性作用。该模型成模时间短且发病率高而被研究者广泛应用。

1.1.4 蛋白聚糖诱导的关节炎 (proteoglycan-induced arthritis, PGIA)

PGIA 模型是将蛋白聚糖(PG)腹腔注射于遗传易感性小鼠诱导产生严重的慢性关节炎^[14]。造模方法:采用佐剂将软骨蛋白多糖乳化后,分别在 0 d, 21 d, 42 d 对小鼠进行腹腔注射,4 周以后可诱导糜烂性关节炎^[14]。对于人 PG 易感的小鼠有 BALB/c、C3H 和 C57BL/6J 小鼠,雌性更敏感。虽然首选人 PG,但其提取和纯化过程比较复杂,还涉及伦理问题。因此 Ishikawa 等^[15]采用牛 PG 评估发现在雌性 BALB/c 小鼠中的关节炎发生率最高,但其发生率仍然低于人 PG 诱导的 RA 模型。

1.1.5 迟发性过敏性关节炎 (delayed-type hypersensitivity arthritis, DTHA)

DTHA 为近年来发展的关节炎模型,在 C57BL/6 小鼠中其发病率为 100%。Atkinson 等^[16]将 mBSA 与 CFA 的混合物和 CⅡ 抗体注射 C57BL/6 小鼠尾部,在第 4 天静脉注射 CⅡ 抗体和第 7 天皮下注射含有 mBSA 的 PBS 于右脚底部,再过 3~7 d,小鼠足爪迅速出现严重关节炎症状,约 14 d 后炎症消退。Tanaka 等^[17]将 mBSA 与低剂量的 CⅡ 联合皮下注射于 BALB/c 小鼠尾部,再用 mBSA 在足爪局部加强。具有发病率高和差异性小等优点,但 DTHA 模型属于自限性,与 RA 的慢性进展性特点不相符。

1.1.6 葡萄糖-6-磷酸异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase, GPI) 诱导关节炎

2001 年 SchaHer 等^[18]首次报道了 GPI 与 RA 有关。韩晓芳等^[19]在 DBA/1 小鼠体内使用 GPI 诱导 RA 模型,从第 35 天开始,足趾出现轻微的肿胀,关节红肿、畸形,并伴有活动障碍,为深入研究 GPI 在 RA 发生发展中的作用机制提供了实验平台。

1.1.7 莱姆病螺旋体诱导的关节炎

研究者从莱姆病螺旋体中分离出来的细菌经背部皮下注射于敏感的 C3H、C57BL/6 和 BALB/c 小鼠背部给予免疫,也可以建立 RA 小鼠动物模型。

1.1.8 链球菌细胞壁诱导的关节炎 (streptococcal cell wall-induced arthritis, SCWA)

SCW 可诱导急性的小鼠关节炎模型,一般注射几小时后,炎性因子就会出现高表达。在此基础上,研究者通过改进在小鼠关节腔进行一次或多次注射 SCW 片段 ($n \geq 3$),可诱导出慢性小鼠的关节炎^[20]。易感品系有: BALB/c、DBA/1 和 C3H 小鼠。而 C57BL/6 是抵抗品系。

1.2 转基因小鼠

研究报道白介素和 TNF (肿瘤坏死因子) 家族中的部分成员在 RA 炎症因子中发挥着重要的作用。因此除了诱导型小鼠 RA 模型,转基因型小鼠 RA 模型也多有报道。

1.2.1 K/BxN 小鼠 (K/BxN TCR-tg) 模型

K/BxN 小鼠是一种自发性关节炎,该小鼠在出生后 3~5 周即能自发产生关节炎^[20]。由于该小鼠具有与人类 RA 相似性高、发病率高和重复性好的特点,有望成为研究 RA 发病机制很好的动物模型^[21]。近年来研究者利用 K/BxN 小鼠诱导出 K/BxN STA 模型以研究 RA 发生的免疫机制。建模方法:在正常小鼠体内可注射 K/BxN 小鼠血清,就会出现一过性的关节炎临床症状,一般在 10~14 d 后会达到峰值,随后在几周内逐渐减退,可重复注射血清来维持模型的持久性和稳定性^[21]。

1.2.2 TNF- α 转基因小鼠模型

TNF- α 转基因小鼠是植入人的 TNF- α 的动物模型,在正常小鼠体内如植入从转基因小鼠提取的成纤维样滑膜,可高表达出人的 TNF- α ,呈现关节炎的临床特征。该小鼠模型开始先用 C57BL/6 $\times$ CBA 杂交,再与 DBA/1 回交,呈现出更明显的临床特征,说明 DBA/1 与 TNF- α 联合作用可加重 RA^[22-23]。该模型从 3~4 周龄开始便伴有踝关节肿胀,9 周左右出现关节破坏。该小鼠优点:具有遗传因素、病程进展呈慢性炎症、病情稳定。研究者利用本小鼠开展了中医药对关节炎的治疗以及比较本小鼠与 CIA 模型之间的差异等研究^[24-25]。

1.2.3 SKG 小鼠模型

SKG 小鼠依赖于 BALB/c 背景,其 ZAP-70 基因位点发生突变而培育出来的,是高度依赖 IL-17 及其它细胞因子的表达、具有隐形突变基因的自发性

关节炎模型^[26]。模型特点:与人类的 RA 相似、小关节对称性炎症、类风湿因子升高和进行性关节破坏等特点。该模型还呈现关节外病变如肺炎、皮炎等,而被广泛用来评估药物对 RA 中骨骼变化的作用。

1.2.4 IL-1 受体拮抗剂敲除小鼠模型

该小鼠一般在出生后 5~8 周会自发发展为关节炎。临床上常出现炎性浸润和生成血管翳等特点。该模型动物必须选用 BALB/c 小鼠,对于其他品系的小鼠复制不出来。

2 大鼠

RA 大鼠动物模型分为西医大鼠疾病动物模型和中医病证结合模型两大类。

2.1 RA 西医大鼠疾病动物模型

2.1.1 胶原诱导性关节炎 (CIA)

CIA 是构建大鼠 RA 模型中最常用的方法之一。造模方法:先用异种或同种 C II 与 IFA 多部位皮内注射,1 周后腹腔注射加强免疫^[27]。在致敏 7 d 后,踝关节会轻度肿胀和皮肤发红,3 周后症状加重,甚至皮肤发生溃疡;5~6 周后病理改变进一步加重,关节软骨及软骨下骨质均受血管翳的侵蚀和破坏^[28]。易感动物有 BB、DA、DR 和 LEW 大鼠。关丽等^[29]通过不同剂量阿司匹林预处理后再使用牛 C II 诱导 RA,发现高剂量阿司匹林处理后的大鼠肠道通透性比低剂量的高,且高剂量处理后更能诱发形成 RA。吴菁等^[30]同样使用牛 C II 建立的 CIA 模型,验证了无论在体内还是体外 DMY 均对脾脏中免疫相关 T 淋巴细胞具有免疫调节作用,进而对全身性炎症反应起到抑制作用。

2.1.2 佐剂诱导的关节炎 (adjuvant Arthritis, AA)

AA 模型是最广泛使用的大鼠 RA 模型,有 IFA 和 CFA 两种类型。首先对液体石蜡与无水羊毛脂按一定比例混合成的混合液进行高压灭菌,如果不加卡介苗的即为 IFA,加卡介苗的为 CFA^[31]。模型特点:造模方法简单易行,模型一般于致炎后 10~20 d 出现续发炎症性症状,约在 20 d 达到高峰。炎症表现以踝关节为重,可侵及足垫和全足。该模型的关节肿胀症状与临床 RA 患者具有相似性,但会出现免疫功能紊乱现象。AA 大鼠模型在我国被广泛用于 RA 的临床药物和治疗研究。田时志等^[32]用 Wistar 大鼠构建 AA 模型,验证了温针灸可有效减轻炎症反应,缓解大鼠后肢肿胀,可能与 IL-1、

TNF- α 和血清免疫球蛋白水平下降有关。王建等^[33]建立 SD 大鼠 AA 模型,验证了蓍草总倍半萜内酯具有较好的治疗大鼠 RA 作用,这可能与下调炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平有关。

2.1.3 二甲双十八烷基铵 (DDA) 诱导的关节炎 (DDA induced arthritis, DIA)

该模型多采用 Lewis 和 DA 大鼠,皮下注射 2 mg 溶于磷酸缓冲液的 DDA 溴化物时,可诱导轻度多关节炎;如混合 IFA 后注射,可复制重症关节炎。主要表现为发病关节滑膜充血、细胞浸润和软骨破坏等症状^[28]。此模型具有发病率低和炎症较轻的特点。

2.1.4 链球菌细胞壁诱导的关节炎 (SCWA)

SCWA 是将 A 群链球菌与其他细菌的肽聚糖-多聚糖混合液,注射于大鼠腹腔内,24 h 后即可出现明显的急性关节炎症状^[34]。常用雌性的 Lewis (LEW/N) 大鼠,诱导后期可演变成长期慢性关节炎^[34]。

2.1.5 矿物油诱导的关节炎 (oil induced arthritis, OIA)

OIA 是一种基因限制性、独特的大鼠关节炎。选择较敏感的 DA 大鼠于尾部皮下注射 IFA 形成的动物模型。一般于注射后 14 d 出现关节炎症状,关节肿胀较其他类型的关节炎轻^[35]。OIA 与 CIA 表现几乎相同,但不产生 CII 的抗体。同时还出现 IL-2、IFN- γ 及 TNF- α 高表达^[36]。

2.1.6 辅剂诱导的关节炎

诱导方法:将 IFA 结合灭活 Mtb 进行敏感大鼠尾部皮下注射,连续 14 d,一般在免疫后 8~12 d 出现关节炎症状,几周后疾病进展迅速,可发展为破坏性关节炎。最易感大鼠品系为 DA 或 LEW 大鼠。该模型与人类的 RA 比较相似。

2.1.7 Avridine 诱导的关节炎

研究者是将 Avridine 注射于 LEW 大鼠尾部所建立的大鼠关节炎模型。雌性大鼠较雄性的症状更明显更严重。研究表明裸鼠对 Avridine 诱导的关节炎有所抵抗^[37]。该模型主要用于辅剂或先天免疫方面的研究。

2.1.8 软骨低聚体基质蛋白 (COMP) 诱导的关节炎

COMP 可诱导严重的关节炎并出现对称性外周关节受累。造模方式:主要将等体积的 COMP 溶液与完全佐剂混合乳化后,皮内注射于敏感大鼠尾巴

根部。易感品系有 DA 和 LEW 大鼠。但该模型缺点是稳定性差^[38]。

2.1.9 朴日斯烷诱导的关节炎 (pristane-induced arthritis, PIA)

该模型是将朴日斯烷 (pristane) 300 μ L 皮下单独注射于敏感大鼠尾部,注射 2~3 周后,产生关节炎症状,该模型可持续数个月。易感大鼠为 DA 和 LEW 大鼠。疾病的发展可通过大体观察每个关节的肿胀程度来监测分析^[39]。

2.2 中医病证结合 RA 动物模型

中医称 RA 为“痹证”“历节”或“鹤膝风”^[40]。随着国内中医中药研究的不断发展,单纯西医疾病动物模型不能很好地模拟 RA 与中医证候间的关系,因此研究者在 CIA 和 AA 模型的基础上,加入中医致病因素,模拟 RA 的中医证候进行模型复制^[41]。这样可以弥补单纯西医疾病动物模型不能模拟中医证候与 RA 之间关系的缺点。

2.2.1 风湿热郁和风寒湿痹 RA 动物模型

中医认为 RA 发病的主要原因是外邪(风热与风寒),而易侵袭人体。熊艳杰等^[42]通过冷水冷风外加注射 CFA 建立风湿寒症型 RA 动物模型,发现滑膜区域有 T 淋巴细胞和巨噬细胞浸润,其中 T 淋巴细胞是主要免疫细胞,淋巴细胞与 RA 局部滑膜组织的损伤无关。

2.2.2 瘀血痹阻 RA 动物模型

瘀血痹阻是临床上 RA 患者的常见中医证型之一,血瘀常贯穿于 RA 发生发展的整个过程,患者常因血脉瘀阻、血行不畅而表现出疼痛位置固定、疼痛如针刺状、皮下见瘀点瘀斑,舌下络脉曲张等特点。研究者通过改变外在环境因素构建出血瘀证动物模型。李茜等^[43]选取 Wistar 大鼠经 5 $^{\circ}$ C~7 $^{\circ}$ C 水中游泳处理,同时在大鼠不同部位皮下注射 CII 醋酸和弗氏完全佐剂混合液,可建立血瘀证大鼠 RA 模型。李征等^[44]的大鼠模型实验证实了加 CPP 的佐剂混合组比不加 CPP 单纯组其自身抗体的含量会更高。

2.2.3 肾虚 RA 大鼠模型

该大鼠模型在临床上主要表现为骨骼和关节的损伤,该模型主要应用于以中医为主方式来探讨 RA 疾病的药物评价。王燕等^[45]通过实验证实了 SD 大鼠是最适合来制作肾虚型 RA 大鼠模型的动物。陶黎等^[46]采用去卵巢和 CII 免疫诱导的方法也建立了肾虚关节炎模型,证明了肾虚可加重关节

炎从而引起骨质疏松,使用中药益肾蠲痹丸可相应减轻关节炎及骨质破坏程度。

2.2.4 脾虚 RA 大鼠模型

脾是人体中非常重要的器官之一,脾虚则会出现气血不足,加重体内湿气,建立脾虚 RA 大鼠模型模拟人的脾虚症候来研究探讨其发病机制。杜中平等^[47]利用利血平和 CII 混合物所复制的脾虚 RA 大鼠模型,结果证实该模型可反映出脾虚证 RA 病人的发病特点,具有一定的可行性。

以上不同证型的 RA 中医动物模型是病证结合动物模型的探索和进步,既考虑了西医病因又具有中医症候和临床表现,在 RA 中西医结合研究和治疗过程中发挥着重要的作用^[48]。

3 总结与展望

近年来所建立的各种大小鼠 RA 动物模型,通过不断地优化和筛选也趋于稳定,其中以 CIA 小鼠模型和 AA 大鼠模型应用最为广泛。CIA 小鼠模型主要应用于 RA 治疗机制及免疫反应方面的研究,但纵观上述介绍的 RA 动物模型,均存在一定局限性,不能完全模拟人类的临床症状。中医病证结合动物模型也仅仅实现了“病”与“证”的简单叠加,无法复制出中医证候的复杂程度和具体特点,模型的可靠性和成功率极其不稳定^[49]。因此到目前为止还未有一种动物模型可以囊括人类 RA 发病的所有特征。

理想的 RA 模型应具有易操作性、稳定性、创伤性小、病死率低、模型成功率高以及术后不影响动物的运动功能等优点^[50]。研究者在探究 RA 发病相关机制和临床症状的同时,更需对 RA 模型从病理和免疫学方面进行全方位的评估,同时还应借助现代医学影像技术,提高观察的准确性和可靠性,为今后的 RA 动物模型的进一步探讨以及 RA 的临床治疗药物研究提供坚实的理论依据。

参考文献:

- [1] 王朴. 实验性类风湿性关节炎动物模型研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(2): 75-78.
- [2] Di Paola R, Cuzzocrea S. Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis [J]. Autoimmun Rev, 2008, 8(1): 73-75.
- [3] 范凯健, 吴菁, 李允武, 等. 诱导型与转基因型类风湿性关节炎模型的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21(6): 709-713.
- [4] 任妮娜, 凌益, 姚血明, 等. 类风湿关节炎动物模型研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2019, 8(10): 62-67.
- [5] 张引红, 李美宁, 王春芳, 等. 补骨脂素对类风湿性关节炎小鼠模型的免疫调节作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(2): 207-210.
- [6] 王宁, 胡志芳, 李爱连, 等. 胶原诱导性关节炎小鼠体内 Th 细胞及其相关免疫分子的表达 [J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(1): 26-31.
- [7] Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice [J]. Arthritis Rheum, 1977, 20(3): 841-850.
- [8] 范凯健, 吴菁, 王婷玉. 胶原诱导与抗原诱导 C57BL/6 小鼠类风湿性关节炎造模的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 31-35.
- [9] 杨亚旭, 邵丽娟, 黄小丽, 等. 类风湿关节炎常用动物造模方法的研究进展及评价标准比较 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(4): 62-66.
- [10] Brand DD, Marion TN, Myers LK, et al. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains [J]. J Immunol, 1996, 157(11): 5178-5184.
- [11] Redelinghuys P, Whitehead L, Augello A, et al. MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(7): 1386-1391.
- [12] Atkinson SM, Nansen A. Pharmacological value of murine delayed-type hypersensitivity arthritis: a robust mouse model of rheumatoid arthritis in C57BL/6 mice [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017, 120(2): 108-114.
- [13] Hutamekalin P, Saito T, Yamaki K, et al. Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies [J]. J Immunol Methods, 2009, 343(1): 49-55.
- [14] Hanyecz A, Berlo SE, Szántó S, et al. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype [J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(5): 1665-1676.
- [15] Ishikawa LL, Colavite PM, da Rosa LC, et al. Commercial bovine proteoglycan is highly arthritogenic and can be used as an alternative antigen source for PGIA model [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 148594.
- [16] Atkinson SM, Usher PA, Kvist PH, et al. Establishment and characterization of a sustained delayed-type hypersensitivity model with arthritic manifestations in C57BL/6J mice [J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(3): R134.
- [17] Tanaka D, Kagari T, Doi H, et al. Administration of anti-type II collagen antibody sustains footpad swelling of mice caused by a delayed-type hypersensitivity reaction and induces severe arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 2007, 148(2): 360-367.
- [18] Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease [J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 746-753.
- [19] 韩晓芳, 谭艳, 郑启炜, 等. 葡萄糖-6-磷酸异构酶 (GPI) 构建类风湿性关节炎小鼠模型的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2015, 17(6): 842-845.

- [20] Buttgeriet F, Zhou H, Kalak R, et al. Transgenic disruption of glucocorticoid signaling in mature osteoblasts and osteocytes attenuates K/BxN mouse serum-induced arthritis *in vivo* [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(7): 1998–2007.
- [21] Christensen AD, Haase C, Cook AD, et al. K/BxN serumtransfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 213.
- [22] Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2007, 25 (5 Suppl 46): S4–S11.
- [23] 王腾腾, 徐浩, 王拥军, 等. 以肿瘤坏死因子 α 转基因小鼠为类风湿关节炎模型的研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(11): 1869–1873.
- [24] 李金龙, 陈岩, 张利, 等. 加味牛蒡子汤对炎症性关节炎小鼠踝关节损伤的实验研究 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2015, 37(5): 18–22.
- [25] 叶秋莹, 李舸, 李锦灵, 等. 两种炎症性关节炎小鼠模型的比较 [J]. *广东药科大学学报*, 2017, 33(3): 366–370.
- [26] Zhao WM, Yamamoto K. Analysis of the change in clonotypes of T Cells accumulated in 4 feet joints of SKG mice [J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2004, 20(1): 70–72.
- [27] Seeuws S, Jacques P, Van Praet J, et al. A multiparameter approach to monitor disease activity in collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(4): R160.
- [28] 刘琼, 王晨瑶, 方剑乔. 类风湿性关节炎动物模型的研究进展 [J]. *医学综述*, 2006, 8(5): 313–316.
- [29] 关丽, 史冉庚, 毋丹丹, 等. 类风湿性关节炎动物模型的建立及其与肠道通透性的相关性研究 [J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2017, 57(3): 11–15.
- [30] 吴菁, 范凯健, 王婷玉. 二氢杨梅素对类风湿性关节炎大鼠脾脏免疫功能的调节作用 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(12): 1401–1407.
- [31] Hu Y, Cheng W, Cai W, et al. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2013, 32 (2): 161–165.
- [32] 田时志, 吴瑕, 周晓奇, 等. 温针灸对类风湿性关节炎大鼠血清免疫球蛋白、IL-1、TNF- α 的影响 [J]. *云南中医学院学报*, 2017, 40(6): 18–21.
- [33] 王建, 邱彦, 李克冉, 等. 薯蓣总倍半萜内酯对类风湿性关节炎模型大鼠保护作用的实验研究 [J]. *药学实践杂志*, 2018, 36(6): 529–532.
- [34] Perruche S, Saas P, Chen W. Apoptotic cell-mediated suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis is associated with alteration of macrophage function and local regulatory T-cell increase: a potential cell-based therapy [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(4): R104.
- [35] Jansson AM, Lorentzen JC, Bucht A, et al. CD8⁺ cells suppress oil-induced arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(3): 532–536.
- [36] Lorentzen JC, Flornes L, Eklöv C, et al. Association of arthritis with a gene complex encoding C-type lectin-like receptors [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(8): 2620–2632.
- [37] Vingsbo C, Jonsson R, Holmdahl R. Avridine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes [J]. *Clin Exp Immunol*, 1995, 99(3): 359–363.
- [38] 刘元刚, 刘树滔, 饶平凡. 类风湿性关节炎啮齿动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(6): 470–473.
- [39] Zhu W, Meng L, Jiang C, et al. Induction of toll-like receptor 2 positive antigen-presenting cells in spleen of pristane-induced arthritis in rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 10(3): 1–7.
- [40] 孙佳蕾, 武平, 陈白露, 等. 类风湿性关节炎动物模型在中医研究中的应用 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(4): 444–447.
- [41] 叶冠成, 陈光耀, 江雯欣, 等. 类风湿性关节炎动物模型研究进展 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2019, 38(5): 88–92.
- [42] 熊艳杰, 裴银辉, 朱玉芳, 等. 风湿寒症型类风湿性关节炎动物模型滑膜 CD3、CD21 和 CD68 的表达 [J]. *华北理工大学学报(医学版)*, 2016, 18(4): 259–263.
- [43] 李茜, 梁晓东, 曹永仓, 等. 类风湿关节炎血瘀证大鼠模型的制备及评价 [J]. *山东中医药大学学报*, 2017, 41(5): 476–481.
- [44] 李征, 胡荫奇. 早期类风湿性关节炎血瘀与自身免疫功能紊乱的相互关系 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2003, 10(6): 38–40.
- [45] 王燕. 肾虚痹证(类风湿性关节炎)病证结合动物模型制作方法研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2010.
- [46] 陶黎, 刘梅洁, 薛欣, 等. 益肾蠲痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59 (5): 420–426.
- [47] 杜中平, 赵宏艳, 肖诚, 等. 类风湿性关节炎脾虚证病证结合动物模型的建立 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2012, 14(2): 1384–1392.
- [48] 于宗良, 胡水寒, 付鹏宇, 等. 类风湿性关节炎病证结合动物模型的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19 (35): 118–119, 122.
- [49] 魏艳霞, 李鑫, 林也, 等. 类风湿性关节炎病证结合动物模型研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(10): 1485–1488.
- [50] Atkinson SM, Hoffmann U, Hamann A, et al. Depletion of regulatory T cells leads to an exacerbation of delayed-type hypersensitivity arthritis in C57BL/6 mice that can be counteracted by IL-17 blockade [J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9 (4): 427–440.

[收稿日期] 2020-05-25