

曹旺,李霞,刘彩霞,等. 家兔颈总动脉血管内膜增生模型的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 1-8.
Cao W, Li X, Liu CX, et al. A model of vascular intimal hyperplasia of the common carotid artery in rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 1-8.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.001

家兔颈总动脉血管内膜增生模型的探讨

曹 旺,李 霞,刘彩霞,邓常清*

(湖南中医药大学中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室,长沙 410208)

【摘要】 目的 探讨家兔颈总动脉血管内膜增生模型的建立方法及影响因素。**方法** 30只新西兰大白兔,雌雄各半,随机分为假手术组、高脂+单侧套管组(按造模时间分为2周、3周亚组)、高脂+双侧套管组(按造模时间分为2周、3周亚组)。单侧套管组在左侧颈总动脉外侧置一硅橡胶管(长度20 mm,内径1.0 mm)包裹血管并固定,双侧套管组在双侧颈总动脉外侧分别置一硅橡胶管包裹血管并固定。两组均于术后次日给予2%胆固醇饲料连续喂养2~3周。假手术组只行手术分离颈总动脉,不进行血管套管术,并饲喂普通饲料。分别于手术后第2周、第3周取损伤段颈总动脉观察病理形态学改变,采用形态计量学方法测定血管内膜增生指标,免疫组化法测定增生内膜中 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、I型胶原(Col-I)、炎症反应因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。**结果** 高脂+颈总动脉硅橡胶管套管干预2周、3周后,颈总动脉出现明显的血管内膜增生,内膜面积(IA)、内膜厚度(IT)、内膜面积增生率(HRIA)、内膜厚度增生率(HRIT)均显著增加,其中双侧套管的内膜增生较单侧明显,干预3周内膜增生较2周严重。在双侧套管3周,血管内膜 α -SMA表达显著降低,OPN、Col-I、IL-1 β 、TNF- α 表达显著增高。**结论** 应用高脂+颈总动脉硅橡胶管套管法可成功建立血管内膜增生模型,以双侧颈总动脉套管干预3周以上为宜。

【关键词】 血管内膜增生;血管狭窄;兔;动物模型;高血脂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0001-08

A model of vascular intimal hyperplasia of the common carotid artery in rabbits

CAO Wang, LI Xia, LIU Caixia, DENG Changqing*

(Key Laboratory of Hunan Province for Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardiocerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

【Abstract】 Objective To explore an establishment method and influencing factors of an intimal hyperplasia model of common carotid artery in rabbits. **Methods** Thirty New Zealand white rabbits, half male and half female, were randomly divided into a sham operation group, high fat + unilateral cannula group (divided into 2- and 3-week subgroups in accordance with the modeling time), and hyperlipidemia + bilateral cannula group (divided into 2- and 3-week subgroups in accordance with the modeling time). In the unilateral cannula group, a silicone tube (20 mm in length and inner diameter of 1 mm) was placed on the lateral side of the left common carotid artery and fixed, whereas in the bilateral cannula group, a silicone tube was placed on the lateral side of the bilateral common carotid artery and fixed. Both groups were fed a 2% cholesterol diet for 2-3 weeks starting from the day after the operation. In the sham operation group, the

【基金项目】 国家自然科学基金(81874406);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2019ZXYJH10)。

【作者简介】 曹旺(1993—),男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合心脑血管疾病防治。E-mail:294092838@qq.com

【通信作者】 邓常清(1963—),男,博士生导师,教授,研究方向:中西医结合心脑血管疾病防治。E-mail:dchangq@sohu.com

common carotid artery was separated, no vascular cannula was performed, and the rabbits were fed a regular diet. At 2 and 3 weeks after the operation, pathomorphological changes of the injured common carotid artery were observed, the index of intimal hyperplasia was measured by morphometry, and expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), osteopontin (OPN), type I collagen (Col-I), inflammatory response factor interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in intimal hyperplasia was determined by immunohistochemistry. **Results** After treatment with high fat and the silicone tube for 2 or 3 weeks, intimal hyperplasia was found in the common carotid artery. The intimal area, intimal thickness, intimal area proliferation rate, and intimal thickness were increased significantly. Intimal hyperplasia in the bilateral cannula was more obvious than that in the unilateral side, and intimal hyperplasia at 3 weeks was more serious than that at 2 weeks. After 3 weeks of the bilateral cannula, expression of α -SMA in the vascular intima was reduced significantly and expression of OPN, Col-I, IL-1 β , and TNF- α was increased significantly. **Conclusions** A model of intimal hyperplasia can be successfully established using high fat and a common carotid artery silicone cannula, and the bilateral common carotid artery cannula should be applied for more than 3 weeks.

【Keywords】 intimal hyperplasia; vascular stenosis; rabbit; animal model; hyperlipidemia

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary heart disease, CHD) 是严重危害人类健康的心血管疾病。经皮冠状动脉介入术 (percutaneous coronary intervention, PCI) 治疗可以很好地实现冠脉血运重建, 改善患者的生存质量, 明显降低患者的死亡率, 但术后由于血管内膜损伤后引起的血管再狭窄是困扰介入治疗的难题, 也是影响患者预后和再发缺血性心脏病的重要原因。众所周知, 血管再狭窄的基本病理特征是血管内膜增生, 在 PCI 术后, 由于血管内膜损伤, 导致内膜下血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 迁移至内膜并发生增殖, 使血管内膜增厚而致血管再狭窄的发生^[1-3]。因此, 防治 PCI 术后血管内膜增生引起的血管再狭窄是当前迫切需要解决的问题。而建立动物血管内膜增生模型是其防治研究的前提。目前, 血管内膜增生模型的建立方法主要有球囊导管损伤血管内膜引起内膜增生和高脂喂养引起动脉粥样硬化血管内膜增生等方法^[4-6]。球囊导管可损伤血管内皮, 引起内膜增生, 可用于大鼠、家兔等内膜增生模型的建立, 但手术操作复杂, 动物存活率较低, 引起病变的程度变异较大, 不利于防治方法的评价。动脉粥样硬化模型主要用于小鼠和家兔, 可在一定程度上引起血管内膜增生, 但实验周期长, 病变部位难以控制^[7-10]。家兔是动脉粥样硬化的易感动物, 高脂高胆固醇饲料喂养可以形成类似人动脉粥样硬化的病变, 而单纯用高脂高胆固醇喂养虽然可诱发动脉粥样硬化病变, 但血管内膜增生病变不典型, 实验周期长。因此, 建立一种病变明确、操作简单的血管内膜增生模型是研究其病理生理和防治的重要前提。本实验采用家兔高胆固醇饲料喂养联合硅橡胶管颈总动脉套管术使颈总动脉狭窄的

方法, 建立了一种颈总动脉血管内膜增生模型, 为血管内膜增生病理生理和防治方法的研究提供了有效手段。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级新西兰种大白兔雌雄各 15 只, 10 周龄体重 1.8~2.0 kg, 均购于湖南太平生物科技有限公司 [SCXK(湘)2015-0004]。实验在湖南省中医药研究院动物中心进行 [SYXK(湘)2015-0008], 动物实验得到湖南中医药大学医学动物实验伦理委员会批准 (2019-0027), 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

改良 Masson 三色染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 20190613); 二步法免疫组化法检测试剂盒 (北京中杉金桥, 批号 2015G0115); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥, 批号 K196721D); 小鼠抗 α -smooth muscle actin (α -SMA) 单克隆抗体 (abcam, 批号 GR3257713-3); 小鼠抗 Osteopontin (OPN) 单克隆抗体 (NOVUS, 批号 NB110-89062); 兔抗 TNF α 多克隆抗体 (Bioss, 批号 bs-2150R); 兔抗 IL-1 β 多克隆抗体 (Bioss, 批号 bs-0812R); 兔抗 Collagen 1 (Col-1) 多克隆抗体 (Bioss, 批号 bs-0578R)。石蜡切片机 (英国 Shadco 公司, HM325); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司, BA410E)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理

实验前适应性饲养 1 周, 饲养于普通级动物实验室, 室温 25 $^{\circ}$ C、湿度 45%~65%, 喂食标准饲料, 自由摄食和水。将家兔随机分为假手术组 (A 组), 高

脂+单侧套管组(B组,按造模时间分为B1、B2亚组),高脂+双侧套管组(C组,按造模时间分为C1、C2亚组),每组6只,雌雄各3只排除性别干扰。按颈总动脉套管法改良制作颈总动脉血管内膜增生模型^[11]:动物术前12h禁食不禁水,耳缘静脉注射2.5%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉后仰卧固定,颈部正中切口,分离两侧颈总动脉。高脂+单侧套管组将一个无活性的柔软的硅橡胶管(长度20 mm,内径1.0 mm)沿长轴剪开后,套在分离的左侧颈总动脉外面,用丝线结扎固定。高脂+双侧套管组将两个硅橡胶管分别套在分离的左右侧颈总动脉外面,用丝线结扎固定。术后第1天起连续喂养高脂饲料(2%胆固醇+3%橄榄油+95%普通饲料)。假手术组只进行手术操作分离颈总动脉,不进行血管套管,从术后第1天起连续喂养普通饲料。术中A组、B1组、C1组麻醉意外死亡1只,各组术后肌注青霉素7d抗感染,术后未有动物死亡。分别于术后2周、3周处死动物检测,取材时硅橡胶管脱落者即为造模不成功,其中B2组1只,C1组1只,C2组2只。

1.3.2 检测指标

血管内膜增生形态学计量分析:取损伤段颈总动脉,在PBS缓冲液中将血管剥离干净,放入4%多聚甲醛固定7d,乙醇梯度脱水,石蜡垂直定向包埋,每段血管间断均匀切取8片后按试剂盒说明行Masson染色,以病理图像分析系统测定中膜面积(media area, MA),内膜面积(intimal area, IA)、内膜中线周长、中膜中线周长,计算中膜厚度(media thickness, MT)、内膜厚度(intimal thickness, IT)、内膜面积增生比率(hyperplasia ratio of intimal area, HRIA)、内膜厚度增生比率(hyperplasia ratio of intimal thickness, HRIT),以评价血管内膜增生程度。计算公式如下:

$$MA = (\text{外弹力膜内面积} - \text{内弹力膜内面积})$$

$$IA = (\text{内弹力膜内面积} - \text{管腔面积})$$

$$MT = \sqrt{\frac{\text{外弹力膜内面积}}{\pi}} - \sqrt{\frac{\text{内弹力膜内面积}}{\pi}}$$

$$IT = \sqrt{\frac{\text{外弹力膜内面积}}{\pi}} - \sqrt{\frac{\text{管腔面积}}{\pi}}$$

$$HRIA = [(\text{内膜面积}) / (\text{内膜面积} + \text{中膜面积}) \times 100\%]$$

$$HRIT = [(\text{内膜厚度}) / (\text{内膜厚度} + \text{中膜厚度}) \times 100\%]$$

免疫组化法测定损伤段颈总动脉增生内膜中 α -SMA、OPN、TNF- α 、1L-1 β 、Col-1蛋白表达:按照免疫组化试剂盒说明书操作:将损伤段血管组织置4%多聚甲醛固定7d,乙醇梯度脱水,石蜡垂直定向包埋,石蜡切片机均匀切片,每厚约4 μ m;60 $^{\circ}$ C烤片过夜;脱蜡水化;微波抗原修复;冷却至室温后每张切片滴加一抗50 μ L(小鼠抗 α -SMA单克隆抗体,稀释浓度1:2000,小鼠抗OPN单克隆抗体,稀释浓度1:200,兔抗TNF- α 多克隆抗体,稀释浓度1:200,兔抗1L-1 β 多克隆抗体,稀释浓度1:200,兔抗Col-I多克隆抗体,稀释浓度1:200),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;然后按PV-9000二步法检测试剂盒滴加二抗,37 $^{\circ}$ C温育30 min;DAB显色,苏木素复染,脱水与透明后封片。光镜下可见阳性表达呈棕黄色点状或纤维状染色,每张切片选择5个不同视野进行拍照,用Image-Pro Plus6.0图像分析软件测量阳性染色积分光密度(integrated optical density, IOD)值以及阳性染色面积,并计算出平均IOD值以反映目的蛋白的表达强度。平均积分光密度值=IOD Sum/Area Sum (μ m²)。

1.4 统计学方法

实验数据采用平均数 \pm 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,运用SPSS 23.0统计软件进行统计分析。先将各组数据进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者用LSD检验;方差不齐者用Dunnett's T3检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管内膜病理形态学改变

Masson染色显示,假手术组血管内膜内弹力膜完整,呈单层,未见明显增生。各实验组血管内膜呈均一或不均一增生,大量VSMC增生,细胞排列紊乱,内膜增生明显,向血管管腔呈向心性或偏心性增厚。其中单侧套管组术后2周和3周内膜均呈局限性增生,术后3周的增生程度大于2周。双侧套管组内膜多呈向心性增厚,术后2周增生程度较轻,术后3周见明显的内膜增生,血管管腔狭窄明显(图1)。

2.2 各组增生内膜形态计量学指标的比较

假手术组血管内膜无明显增生。与假手术组比较,单侧套管2周组HRIA、HRIT显著增加($P < 0.05$),单侧套管3周组IA、IT、HRIA、HRIT均显著增加($P < 0.05$);单侧套管3周组与2周组比较,IA、

IT、HRIA、HRIT 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。双侧套管 2 周组、3 周组 IA、IT、HRIA、HRIT 均较假手术组显著升高 ($P < 0.01$); 双侧套管 3 周组与 2 周组比较, IA、IT、HRIA、HRIT 均显著升高 ($P < 0.05 - 0.01$)。双侧套管 2 周组与单侧套管 2 周组比较, IA、IT、HRIA、HRIT 均显著升高 ($P < 0.05$), 双侧套管 3 周组与单侧套管 3 周组比 IA、IT、HRIA、HRIT 均显著增加 ($P < 0.01$)。(表 1)

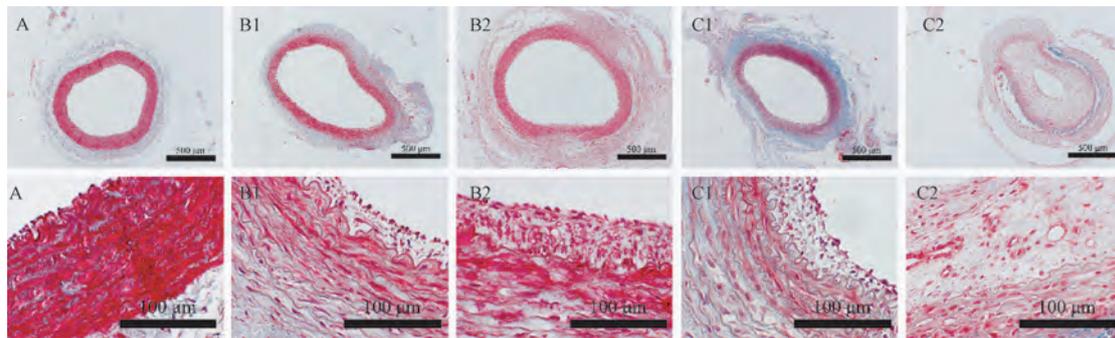
2.3 各组增生血管内膜中 α -SMA、OPN、TNF α 、IL-1 β 、Col-1 表达的比较

与假手术组比较, 单侧套管 2 周组、3 周组和双侧套管 2 周组增生内膜中血管平滑肌细胞收缩表型标志蛋白 α -SMA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 双侧套管 3 周组增生血管内膜中 α -SMA 表达显著降低 ($P < 0.05$)。(图 2) 与假手术组比较, 单侧套管 2 周组、3 周组和双侧套管 2 周组、3 周组增生内膜中血管平滑肌细胞合成表型(去分化型)标志物蛋白 OPN、细胞外基质成分 Col-1、炎症反应因子 IL-1 β 、TNF- α 表达显著增高 ($P < 0.05$)。(图 3、

图 4、图 5、图 6)

3 讨论

目前采用套管制作血管狭窄模型有两种方法, 一种是在血管外包裹硅橡胶圈, 血管套管可使颈总动脉狭窄, 造成局部血流动力学变化, 同时动脉套管的机械刺激可诱导血管局部特别是血管外膜的炎症反应, 从而促进动脉内膜增生^[12]。但单纯的血管套管法造成血管狭窄的时间较长, 且病变不稳定。另一种方法是在血管套管的基础上加高脂饲养^[13-14]。家兔属于动脉粥样硬化易感动物, 与啮齿类动物相比, 由于啮齿类动物缺乏胆固醇酯转移酶, 仅给予高脂饲料无法引起明显的动脉粥样硬化斑块, 因此, 啮齿类动物不容易发生动脉粥样硬化性病变, 而兔体内存在胆固醇酯转移酶, 给予高脂饲料可引起脂质在内膜沉积, 因此高脂饲料可诱发家兔动脉粥样硬化^[15]。但单纯高脂饮食饲养往往实验周期较长, 且病变部位难以控制, 故可在高脂基础上施以损伤血管及其他干预手段, 诱导内膜出



注: A: 假手术组; B1: 单侧套管 2 周; B2: 单侧套管 3 周; C1: 双侧套管 2 周; C2: 双侧套管 3 周。

图 1 颈总动脉 Masson 染色

Note. A, Sham operation group. B1, Unilateral cannula for 2 weeks. B2, Unilateral cannula for 3 weeks. C1, Bilateral cannula for 2 weeks. C2, Bilateral cannula for 3 weeks.

Figure 1 Masson staining of common carotid artery

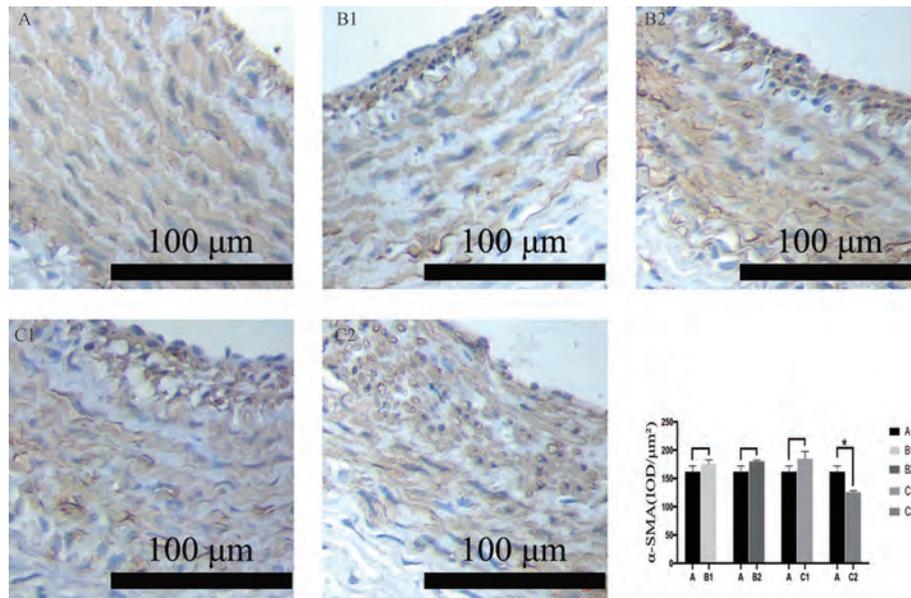
表 1 各组血管形态学计量指标的比较 ($\bar{x} \pm s \bar{x}$)

Table 1 Comparison of blood vessel morphology measurement indexes in each group

组别 Groups	样本数 Number of samples	MT (μm)	MT (μm)	IA (μm^2)	IT (μm)	HRIA (%)	HRIT (%)
A	5	126188.50 \pm 8359.12	53.37 \pm 3.87	17330.00 \pm 1302.05	8.83 \pm 0.60	12.15 \pm 0.91	14.26 \pm 0.74
B1	5	98511.40 \pm 8249.99	46.56 \pm 4.12	28397.20 \pm 8183.88	15.49 \pm 3.89	22.00 \pm 5.40*	24.74 \pm 5.37*
B2	5	132937.40 \pm 9779.20	49.92 \pm 2.34	39637.40 \pm 5450.12*	16.96 \pm 0.52*	22.71 \pm 1.47*	25.51 \pm 1.43*
C1	4	106725.40 \pm 11931.04	42.04 \pm 2.51	62069.60 \pm 8655.39** $\Delta\Delta$	27.98 \pm 2.95** $\Delta\Delta$	36.57 \pm 3.13** $\Delta\Delta$	39.73 \pm 3.19** $\Delta\Delta$
C2	4	108896.00 \pm 7438.70	42.78 \pm 1.79	100494.00 \pm 5161.38** $\nabla\nabla\Delta\Delta$	44.86 \pm 2.25** $\nabla\nabla\Delta\Delta$	48.08 \pm 1.67** $\nabla\Delta\Delta$	51.14 \pm 1.67** $\nabla\Delta\Delta$

注: A: 假手术组; B1: 单侧套管 2 周; B2: 单侧套管 3 周; C1: 双侧套管 2 周; C2: 双侧套管 3 周。与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 2 周比较, $\nabla P < 0.05$, $\nabla\nabla P < 0.01$; 与同时间单侧比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. A, Sham operation group. B1, Unilateral cannula for 2 weeks. B2, Unilateral cannula for 3 weeks. C1, Bilateral cannula for 2 weeks. C2, Bilateral cannula for 3 weeks. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with 2 weeks, $\nabla P < 0.05$, $\nabla\nabla P < 0.01$. Compared with the same time, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.



注:A:假手术组;B1:单侧套管 2 周;B2:单侧套管 3 周;C1:双侧套管 2 周;C2:双侧套管 3 周。与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。下同。

图 2 α-SMA 免疫组化染色

Note. A, Sham operation group. B1, Unilateral cannula for 2 weeks. B2, Unilateral cannula for 3 weeks. C1, Bilateral cannula for 2 weeks. C2, Bilateral cannula for 3 weeks. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The same as below.

Figure 2 Immunohistochemical staining of α-SMA

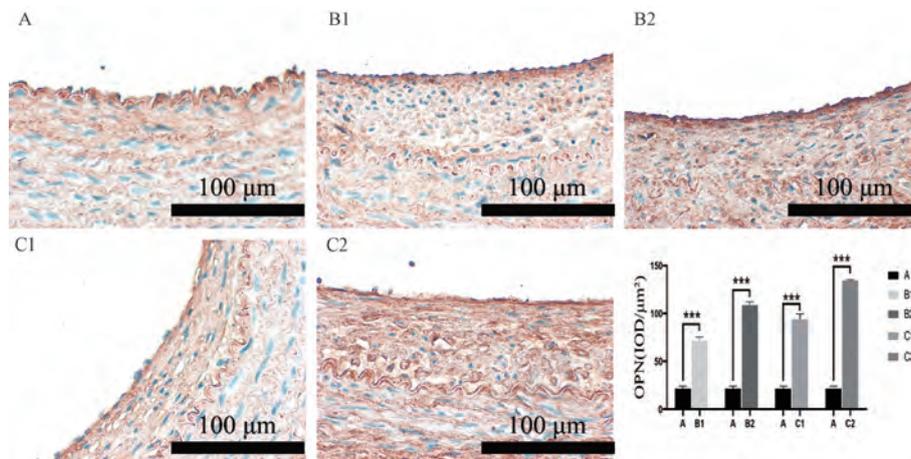


图 3 OPN 免疫组化染色

Figure 3 Immunohistochemical staining of OPN

现动脉粥样硬化性改变而出现血管内膜增生。因此,本实验采用血管套管法加高脂饲料喂养,目的是促进动脉粥样硬化和血管狭窄,使病变固定在某个部位,便于对血管狭窄病理生理机制和防治方法的研究。实验证明,无论是单侧还是双侧颈总动脉套管加高脂喂养,均可诱导血管内膜增生,且随着时间的延长,病变逐渐加重,并且双侧血管套管诱导的病变较单侧套管法更重。说明采用硅橡胶圈血管套管加高脂喂养法能诱导明显的血管狭窄,可

缩短血管狭窄形成时间,并使血管狭窄局限发生在颈总动脉,从而为特定目的的研究提供合适的动物模型。这种方法引起的血管狭窄与人类动脉粥样硬化引起的血管狭窄近似,由于套管和高脂刺激,使血管内皮细胞损伤,产生血管炎症反应,诱导血管平滑肌细胞迁移、增殖,导致内膜增生而产生血管狭窄。该方法保存了血管内膜的完整性,对血管的损伤小,具有成模时间短、病变固定等优点。

血管内膜增生发生机制十分复杂,目前认为与

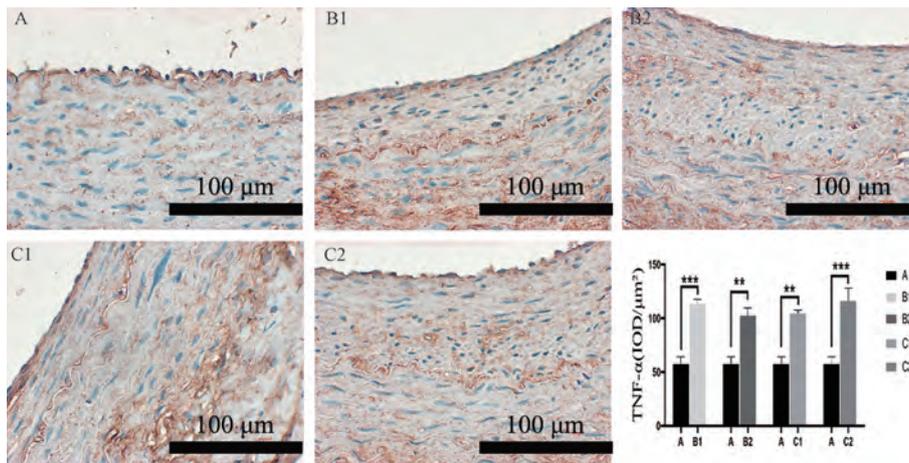


图 4 TNF-α 免疫组化染色

Figure 4 Immunohistochemical staining of TNF-α

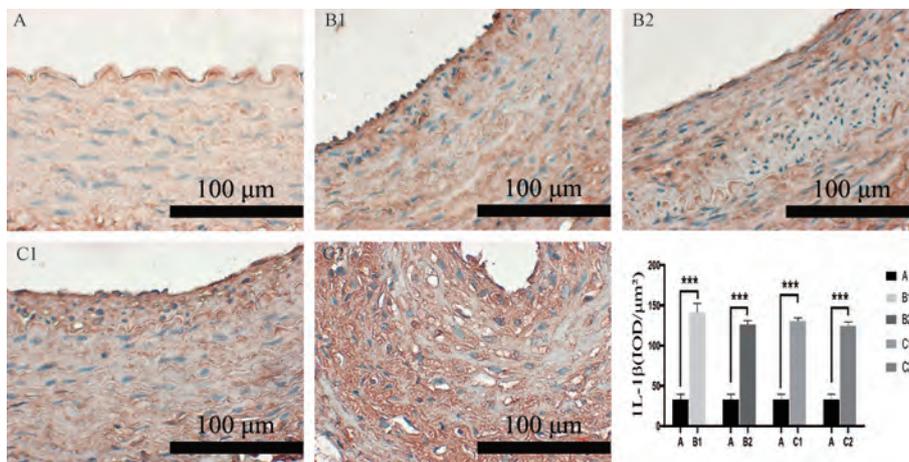


图 5 IL-1β 免疫组化染色

Figure 5 Immunohistochemical staining of IL-1β

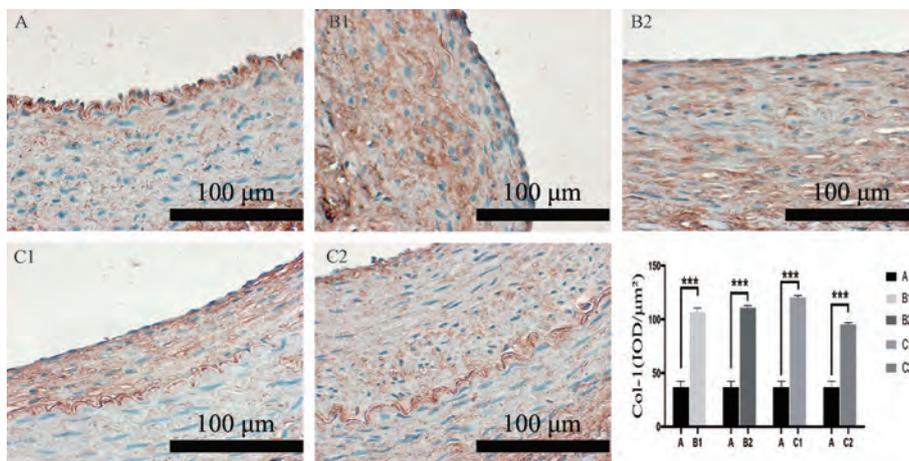


图 6 Col-1 免疫组化染色

Figure 6 Immunohistochemical staining of Col-1

内皮功能障碍与损伤、血小板聚集与血栓形成、血管平滑肌细胞向内膜迁移、增殖、炎症反应及合成大量细胞外基质等多种因素有关^[16-17]。正常情况下,血管壁自内向外依次分为内膜、中膜、外膜。内膜主要由内皮细胞和内皮下成分组成;中膜主要由血管平滑肌细胞与胶原纤维构成;外膜由疏松结缔组织组成,细胞成分以外膜成纤维细胞为主。本研究表明,在血管套管后不同时间,出现明显的内膜增生,新生内膜中血管平滑肌细胞数量明显增多,排列紊乱,增生内膜中细胞外基质沉积明显增多,局部增生的内膜中炎症反应显著增强,表明在炎症反应下中膜 VSMC 向内膜迁移、增生并合成大量细胞外基质诱导了血管内膜增生。

VSMC 增殖是血管内膜增生的中心环节。VSMC 增生的前提是其发生了表型转化。在成熟的血管中,VSMC 呈现“收缩”或分化的表型,其特征是可见到 VSMC 特异性收缩标志物如 α -SMA、平滑肌 22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α) 的表达,它们在收缩调节中起重要作用^[18-19]。当血管损伤后,VSMC 去分化并重新进入细胞周期,发生细胞增殖,表达 OPN 等特异性合成表型(去分化型)标志物。这种去分化表型在动脉粥样硬化、PCI 术后再狭窄以及高血压血管重构的发生发展中具有重要的病理生理意义^[20]。有研究发现,在大鼠血管损伤模型,增生内膜中 α -SMA 表达下调,表明血管受损后 VSMC 发生了由分化型向去分化型的表型转化。血管损伤后局部炎症反应可以诱发全身的慢性炎症反应,进而促进 VSMC 迁移与增殖引起内膜增生。血管中膜的 VSMC 增殖并迁移至内膜后合成大量细胞外基质并在血管壁沉积,从而进一步促进内膜的增生。我们的研究也发现,在双侧套管 3 周,增生血管内膜中 VSMC 收缩型标志物 α -SMA 表达显著降低,合成表型标志物 OPN 表达显著增高,细胞外基质成分 Col- I 表达显著增高,炎症反应因子 IL-1 β 、TNF- α 表达显著增高,提示在这种模型的血管内膜增生中,VSMC 由收缩表型转化成合成表型,使 VSMC 自血管中膜向内膜迁徙,发生过度增殖,并合成和分泌多种生物活性物质和细胞外基质,导致血管内膜增生。

此外,我们在实验中还发现,在血管套管后,如果硅橡胶管套管与血管贴合不紧密,可能导致套管脱落,导致造模失败。因此,在血管套管时,可以采用多重丝线结扎的方法,使血管套管能紧密地贴合

血管,这样可保证血管狭的形成并且可以保证模型的一致性。

总之,本文采用颈总动脉血管套管加高脂喂养的方法,可以造成明显的颈总动脉局部血管内膜增生,使血管腔狭窄。而且,在使用这种方法时,双侧颈总动脉套管比单侧的成模效果好,套管后 3 周血管狭窄的程度更明显。因此,在应用这种方法造模时,建议采用双侧血管套管加高脂喂养,造模时间以 3 周以上为宜。

参考文献:

- [1] Canfield J, Totary-Jain H. 40 years of percutaneous coronary intervention: History and future directions [J]. J Pers Med, 2018, 8(4): 33.
- [2] Jun MY, Karki R, Paudel KR, et al. Alkaloid rich fraction from *Nelumbo nucifera* targets VSMC proliferation and migration to suppress restenosis in balloon-injured rat carotid artery [J]. Atherosclerosis, 2016, 248: 179-189.
- [3] Jukema JW, Verschuren JJ, Ahmed TA, et al. Restenosis after PCI. Part 1: pathophysiology and risk factors [J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 9(1): 53-62.
- [4] 彭熙炜, 邓常清. 建立大鼠胸腹主动脉损伤后血管再狭窄模型的实验研究 [J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(5): 150-152.
- [5] 马飞, 孙洪胜. 大鼠动脉粥样硬化模型研究进展 [J]. 药学研究, 2014, 33(4): 222-223, 229.
- [6] 陈纪猛, 陈天宝, 谢金东, 等. 新西兰兔髂动脉血管球囊导管损伤后内膜肥厚模型的建立 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(2): 26-28.
- [7] 张军平, 许颖智, 李良军, 等. 实验性动脉粥样硬化模型复合建模的方法及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(1): 41-45, 79.
- [8] 毕延发, 柳英侠, 郭丹, 等. 兔定位性髂动脉粥样硬化狭窄模型的复制 [J]. 中国实验动物学杂志, 1992, 2(3-4): 131-133.
- [9] 董政军, 谈红, 吴晓晴, 等. 高胆固醇血症对兔肾动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(3): 37.
- [10] 李贵才, 刘占军, 徐德铨, 等. 家兔动脉粥样硬化模型稳定性的观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(5): 42-45.
- [11] Chan EC, Datla SR, Dille R, et al. Adventitial application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin *in vivo* reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(4): 710-718.
- [12] 王琮, 陈筱雪, 杨少玲, 等. 套环法和空气干燥法建立兔颈动脉粥样硬化斑块模型比较分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(3): 208-212.
- [13] 刘恒方, 李新华, 杨期东, 等. 改良硅橡胶圈加高胆固醇喂养诱导颈动脉狭窄兔模型的建立 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10(1): 17-19.
- [14] 宋喜明, 刘恒方, 齐尚书, 等. 颈动脉狭窄兔模型的 DSA 与 CTA 评价 [J]. 现代医用影像学, 2009, 18(6): 361-366.

- [15] Fan J, Kitajima S, Watanabe T. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146: 104-119.
- [16] Yan H, Peng X, Xu H, et al. Inhibition of aortic intimal hyperplasia and vascular smooth muscle proliferation and extracellular matrix protein expressions by astragalus-angelica combination [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 1508637.
- [17] 彭熙炜, 阎卉芳, 黄娟, 等. 黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型炎症反应的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(2): 580-584.
- [18] Dong LH, Wen JK, Liu G, et al. Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22 alpha-mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4): 683-691.
- [19] Frisantiene A, Philippova M, Erne P, et al. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity [J]. *Cell Signal*, 2018, 52: 48-64.
- [20] Rzućidlo EM. Signaling pathways regulating vascular smooth muscle cell differentiation [J]. *Vascular*, 2009, 17(1): S15-S20.

[收稿日期]2020-09-11

中国医学科学院首次建立新冠肺炎恒河猴模型,当选“中国生命科学十大进展”

SARS-CoV-2 引起的 COVID-19 暴发,对全球构成了重大公共卫生威胁。动物模型对于阐明病毒感染与发病机制、传播途径以及药物和疫苗评价十分关键,是国务院联防联控机制科研攻关组部署的五大主攻方向之一。中国医学科学院医学实验动物研究所秦川团队率先建立了 COVID-19 的转基因小鼠模型和恒河猴模型,并于 2020 年 2 月 18 日通过科技部组织的新冠动物模型鉴定。这两种动物模型首次阐明了 SARS-CoV-2 感染的致病性,加深了对 COVID-19 病因学和病理学的认知,促进了抗病毒药物和疫苗研发。

该项研究作为知识创新类项目“新冠肺炎动物模型的构建”,于 2021 年 1 月 13 日当选中国科协生命科学学会联合体评选的 2020 年度中国生命科学十大进展,对防控当前全球面临的新冠肺炎疫情有重大意义。其中,恒河猴新冠肺炎模型研究,由秦川团队联合中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、中国医学科学院病原生物学研究所、首都医科大学的研究团队进行,研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Model & Experimental Medicine*, 2020, 3: 93-97)。

该模型是国际上第一个构建的新冠病毒恒河猴模型,其研制方法和标准已提供给世界卫生组织(WHO),供国际研究使用。

付信靖,张钰,郭建国,等. PM_{2.5}通过增加海马神经炎症引起小鼠的认知障碍 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 9-14.
Fu XJ, Zhang Y, Guo JG, et al. Particulate matter 2.5 aggravates cognitive impairment in mice via hippocampal neuroinflammation [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 9-14.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.002

PM_{2.5}通过增加海马神经炎症引起小鼠的认知障碍

付信靖,张钰,郭建国,张玲*,秦川

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,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)

【摘要】 目的 空气细颗粒物 PM_{2.5} 是空气污染物的重要组成部分,能通过多种途径引起呼吸系统及各个器官系统疾病。值得注意的是,PM_{2.5} 可引起认知减退,其具体机制尚不明确。本研究旨在探索空气污染物 PM_{2.5} 的环境暴露影响动物认知功能的机制。**方法** 本研究采用狭缝分离式 PM_{2.5} 在线浓缩富集系统进行小鼠的 PM_{2.5} 富集与暴露造模,选用 C57BL/6 小鼠,进行每天 4 h、每周 5 d、共 15 周的 PM_{2.5} 暴露,建立小鼠的 PM_{2.5} 呼吸暴露模型。造模成功后,分别检测动物的行为学症状、病理学变化、以及相关分子机制。**结果** 实验结果表明,PM_{2.5} 暴露可造成小鼠肺组织的病理改变,引起小鼠的认知障碍症状,免疫组织化学染色检测到小鼠中枢神经系统海马脑区出现小胶质细胞的激活,小鼠中枢神经系统 IL-6 含量增加。另外,PM_{2.5} 暴露未造成小鼠其他主要脏器损伤。**结论** 本研究表明,空气细颗粒物 PM_{2.5} 可导致中枢神经系统炎症,促进小胶质细胞激活,从而引起 C57BL/6 小鼠的认知障碍。

【关键词】 空气细颗粒物;认知障碍;神经炎症;小胶质细胞;IL-6

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0009-06

Particulate matter 2.5 aggravates cognitive impairment in mice via hippocampal neuroinflammation

FU Xinjing, ZHANG Yu, GUO Jianguo, ZHANG Ling*, QIN Chuan

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

【Abstract】 Objective Particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) is an important source of air pollution and can cause respiratory and other systemic diseases. Additionally, PM_{2.5} can cause cognitive decline, though the exact mechanism is not clear. This study aimed to explore the mechanism by which exposure to environmental PM_{2.5} via air pollution induces cognitive impairment. **Methods** This study used the PM_{2.5} online collection and exposure system on C57BL/6 mice to make a PM_{2.5} exposure mouse model. Mice were exposed for 4 h per day, 5 days per week, for 15 weeks. After the model was established, mouse behavioral symptoms, pathological features and related molecular mechanisms were examined in each group. **Results** PM_{2.5} exposure resulted in pathological changes in lung tissue in mice and exacerbated their cognitive impairment. Immunohistochemical staining of the central nervous system detected microglial cell activation. The

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31970510,81941012);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-006,2016-I2M-1-010)。

【作者简介】 付信靖(1991—),硕士研究生,研究方向:神经系统疾病动物模型和病理学研究。E-mail:alvinxfu@163.com

【通信作者】 张玲(1986—),女,博士,研究方向:人类疾病实验动物模型创制和病理生理学机制研究。E-mail:zhangling@cnilas.org

level of IL-6 also increased in the central nervous system of exposed mice compared with control mice. PM2.5 exposure did not cause damage to other major organs in the mice. **Conclusions** The result suggest that PM2.5 induced neuroinflammation and promoted the activation of microglial cells in the hippocampus, thus aggravating cognitive impairment in mice.

【Keywords】 PM2.5; cognitive impairment; neuroinflammation; microglia; IL-6

伴随着现代社会的工业化进程的加速,空气污染日益严重,已成为当代的一个全球化问题^[1]。空气污染物由若干种组分组成,其中包括细颗粒物(PM 2.5)、超细颗粒物(UFPM)、毒性气体、有机化合物和金属颗粒等,其重要来源是与交通相关的空气污染物,主要是柴油机废气(DE)^[2]。细颗粒物又称细粒、细颗粒、PM2.5(particulate matter 2.5, PM 2.5),指环境空气中空气动力学当量直径小于等于 2.5 μm 的颗粒物。它能较长时间悬浮于空气中,其在空气中含量浓度越高,就代表空气污染越严重。随着研究进展,细颗粒物 PM2.5 对人体健康的影响也日益凸显^[3]。

PM2.5 对人体的危害首先表现在呼吸系统。除呼吸系统外,空气中的细颗粒物 PM2.5 吸入后对其他器官和系统产生负面作用,如心血管系统、生殖系统、神经系统和免疫系统等^[4]。大规模的流行病学研究发现,空气污染组分细颗粒物(PM)对人类认知功能产生负面影响。近来公认的一种机制是 PM2.5 可以直接损伤中枢神经系统,同时污染物引起呼吸系统和免疫系统产生有害因子,通过外周循环到达大脑,导致大脑的神经炎症和氧化应激等反应,损伤神经细胞的结构和功能。

本项目对 PM2.5 呼吸暴露的病理生理机制理论进行更深层次的探索,探究空气中细颗粒物 PM2.5 对小鼠认知功能的影响,及发生病理改变的分子机制。有研究提示,PM2.5 暴露可导致小鼠产生认知症状,而具体机制尚不明确^[5]。本研究是宏观环境因素与微观分子机制相结合的机制探索研究,有助于加深环境因素、空气污染影响人体健康的具体分子机制的理解,为环境与健康的相关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究选用 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 12 只,购于南京模式生物研究所[SCXK(苏)2018-0008],体重(21±2)g。所有小鼠均为 SPF 级,饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所、北京协和医学院

比较医学中心南院屏障环境中[SYXK(京)-2018-009]。环境温度 24℃~26℃,光照 14 h,黑暗 10 h,小鼠均自由饮水取食。本实验中动物的使用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(IACUC)批准(ILAS-QC-2017-002)。本次实验所有的动物实验操作过程严格按照实验动物使用的 3R 原则和伦理的相关规定进行。

1.2 主要试剂与仪器

狭缝分离式 PM2.5 在线浓缩富集系统购自北京慧荣和科技有限公司;行为学设备为 Ethovision XT 软件监测系统,购自荷兰 Noldus 公司;HE 以及免疫组化染色试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Grp I Panel 23-plex 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;磷酸缓冲液(PBS)购自美国 Gibco 公司;lba-1(货号 ab178847)购自美国 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠的空气细颗粒物 PM2.5 暴露模型的建立

本实验选取 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠共 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,分别进行含有高浓度的细颗粒物 PM2.5 的空气暴露或对照组屏障环境内的清洁空气的暴露。暴露时间为 2018 年北京冬春季,于 PM2.5 污染较严重时,将室外空气经 PM2.5 在线浓缩富集系统进行实时收集、浓缩富集,细颗粒物富集至浓度 100~800 μg/m³。小鼠置于 PM2.5 在线浓缩富集系统内自由活动,每日固定暴露 4 h,每周暴露 5 d,共持续 15 周。

1.3.2 小鼠新物体识别实验

新物体识别实验(novel object recognition test)是一种评价认知功能的实验方法,主要被用于评价认知和短期记忆功能等。实验箱为长 50 cm、宽 50 cm、高 30 cm 的区域,四周均不透明。实验室保持安静,室内温度保持恒定,光线保持均匀。每次每只小鼠实验前后均用 75%乙醇喷洒、擦拭实验箱和实验用积木,防止每只动物之间气味干扰。

新物体识别实验过程共 2 d,分为第 1 天适应期

(blank): 动物对行为箱适应 5 min, 第 2 天熟悉期 (sample) 和测试期 (test), 熟悉期将两块相同的红色圆柱体积木 (直径 3 cm) 分别放在盒子内左右两侧, 距离箱体侧壁 8 cm, 小鼠自由嗅探积木 5 min。1 h 后为测试期: 将箱内一个物体换成蓝色正方体积木 (边长 3 cm), 位置不变, 将小鼠放入箱内同一位置, 记录小鼠在 5 min 内对新旧两个不同实验积木的探索时间, 即 TN (time of new object) 和 TF (time of familiar object)。实验结果以识别指数 (discrimination index, DI) 表示, 计算公式为: $DI = (TN - TF / TN + TF) \times 100\%$ [6-7]。

1.3.3 病理学检测

将小鼠进行病理取材, 各器官于福尔马林溶液中固定, 石蜡包埋, 切取厚度为 5 μm 的石蜡切片, 常温保存并用于病理学检测, 分别进行 HE 染色或 DAB 染色等。随后用 NanoZoomer Digital Pathology Image 软件获取图像, Image J 分析阳性区域面积和阳性斑块数目。

1.3.4 炎症多因子检测

炎症多因子检测是利用 Luminex 悬浮芯片技术进行多个细胞炎症因子检测的方法, 也称为液相芯片技术。它是一种基于 xMAP (flexible multi analyte profiling) 技术的新型生物芯片技术平台, 它在不同荧光编码的微球上进行抗原抗体、酶底物、配体受体的结合反应及核酸杂交反应, 通过红、绿两束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的。一个反应孔内可以完成多种不同的生物学反应。本实验使用脑组织裂解液上清制备样品, 经过样品孵育、抗体显色等步骤, 通过 Luminex200 检测取得数值。

1.4 统计学方法

所有数据若无说明均采用平均数 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示。采用统计软件 SPSS 20.0 进行统计分析。结果采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA)、T 检验分析组间差异是否显著, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的空气细颗粒物 PM2.5 暴露模型验证

实验动物随机为 2 组, 各组 $n = 6$, 分别命名为 C57BL/6+PM2.5 (eC57, 后文简称为“暴露组”), C57BL/6+CONTROL (C57, 后文简称为“对照组”)。各组小鼠造模成功后, 检测行为学症状、病理学表

征、以及相关分子机制研究 (图 1)。

为了验证 PM2.5 暴露或清洁空气暴露是否可以引起小鼠肺的病理变化, 我们对各组小鼠进行了肺取材和病理检测。小鼠肺 HE 染色发现, 吸入 PM2.5 空气后, 暴露组小鼠与清洁空气对照组相比, 肺可见明显的病理结构改变, 肺泡结构破坏, 肺泡间隔增宽, 大量炎性细胞局部浸润 (图 2)。结果提示, PM2.5 的暴露浓度和时长适量, 成功建立了小鼠的 PM2.5 暴露模型, 引起了肺部病变。

2.2 小鼠空气细颗粒物 PM2.5 暴露后工作记忆能力下降

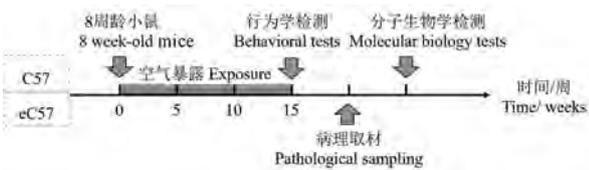
为了检测小鼠进行 PM2.5 空气暴露后, 是否出现认知行为改变, 我们进行了小鼠的认知能力检测, 以新物体识别实验检测小鼠的认知能力和工作记忆能力, 暴露后进行行为学实验时小鼠大约为 6 月龄。结果表明, C57 小鼠 PM2.5 暴露后出现明显的工作记忆能力下降 (图 3)。新物体识别实验利用小鼠对新物体的天然偏好, 以鉴别指数 (discrimination index) 为指标, 检测小鼠的工作记忆, 若认知和短期记忆能力受损, 则无法区分实验中哪个物块为新物体, 结果表现为暴露组小鼠出现新物体识别能力降低、鉴别指数降低。对照组 (37.93 ± 3.143), 暴露组 (20.57 ± 5.098), $P = 0.0159$ 。

2.3 小鼠中枢神经系统出现小胶质细胞激活

为了进一步研究 PM2.5 暴露导致小鼠认知受损的机制, 我们对各组小鼠中枢神经系统小胶质细胞的激活状态进行了 Iba-1 免疫组织化学染色。结果显示 C57BL/6 小鼠在 PM2.5 暴露后出现了海马部位 Iba-1 的表达增加, 提示 PM2.5 暴露后小鼠中枢神经系统小胶质细胞的激活 (图 4)。对各组小鼠海马的 Iba-1 表达进行统计分析, C57BL/6 小鼠在 PM2.5 暴露后均出现 Iba-1 表达的显著增加 (图 5), 对照组 (0.1533 ± 0.01856), 暴露组 (0.5033 ± 0.04096), $P = 0.0015$ 。这一结果提示, C57BL/6 小鼠暴露 PM2.5 后的认知受损可能由神经系统局部炎症增加造成。

2.4 小鼠中枢系统海马炎症因子含量增加

为进一步确认各组小鼠进行空气暴露后是否出现炎症反应, 我们对小鼠中枢神经系统取材进行炎症因子检测, 采用炎症多因子检测芯片, 测定脑组织样品的炎症因子浓度。结果表明, 暴露 PM2.5 后, 小鼠中枢神经系统出现炎症因子 IL-6 的增加

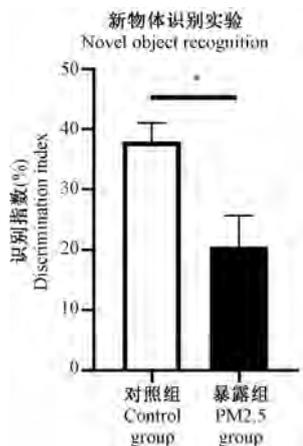


注:小鼠分组进行空气暴露后依次进行行为学检测、病理取材,分别进行病理学检测、分子生物学检测等。

图 1 实验流程示意图

Note. After air exposure, the mice in each group were subjected to behavioral tests, pathological sampling, pathological tests and molecular biological tests, respectively.

Figure 1 Schematic diagram of experimental design



注:在新物体识别实验中,暴露组较对照组小鼠的新物体识别指数显著降低,即暴露组小鼠探索新物体的时间显著缩短。对照组与暴露组相比,* $P < 0.05$ 。

图 3 新物体识别实验各组小鼠暴露后认知能力下降($n = 6$)

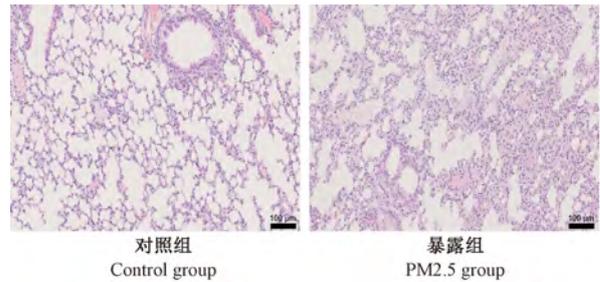
Note. In the new object recognition experiment, the discrimination index of PM2.5 group was significantly lower than that in the Control group. The time of mice's exploring new object in exposure group was significantly shortened. Control group compared with PM2.5 group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Cognitive decline in new object recognition experiment after PM2.5 exposure

(图 6)。对照组 0.9467 ± 0.08950 , 暴露组 1.263 ± 0.04807 , $P = 0.0356$ 。这一结果与小胶质细胞结果一致,提示 C57BL/6 小鼠暴露 PM2.5 后的认知受损可能由神经系统局部炎症增加造成。

2.5 PM2.5 暴露未造成小鼠其他主要脏器损伤

为了排除 PM2.5 暴露模型对小鼠认知功能产生影响不是由其他组织器官的病理损伤引起,我们对各组动物主要脏器进行病理学切片检测。结果表明,PM2.5 暴露对小鼠肝、心脏、肾和大脑的组织结构均未造成明显病理损伤。提示 PM2.5 对认知的调控作用并非由其他组织器官损伤造成(图 7)。

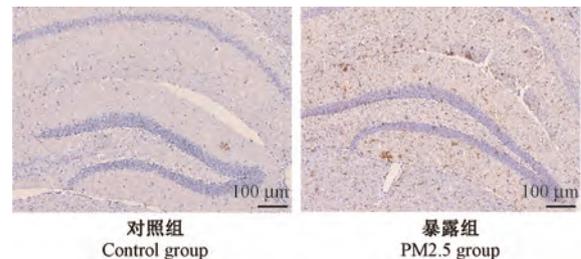


注:小鼠肺 HE 染色结果表明,PM2.5 暴露组小鼠与对照组相比可见肺泡隔增宽,炎性细胞浸润,提示肺部病理改变,PM2.5 暴露小鼠造模成功。

图 2 造模后小鼠出现肺部的病理改变

Note. The results of lung HE staining in mice showed that compared with the control group, alveolar septa were broadened and inflammatory cells were infiltrated in the PM2.5 group, suggesting significant pathological changes in lung. Model of PM2.5 exposure mice was successfully built up.

Figure 2 Pulmonary pathological changes in mice after modeling



注:各组小鼠海马 Iba-1 免疫组化染色可见 PM2.5 暴露组小鼠的中枢神经系统海马脑区出现 Iba1 表达增加,小胶质细胞激活。

图 4 PM2.5 暴露增加小鼠海马小胶质细胞激活($n = 3$)

Note. Immunohistochemical staining in the hippocampus of mice in each group showed increased Iba-1 expression (microglia activation) in the hippocampus of the central nervous system after PM2.5 exposure.

Figure 4 PM2.5 exposure increased the activation of hippocampal microglia cells in mice

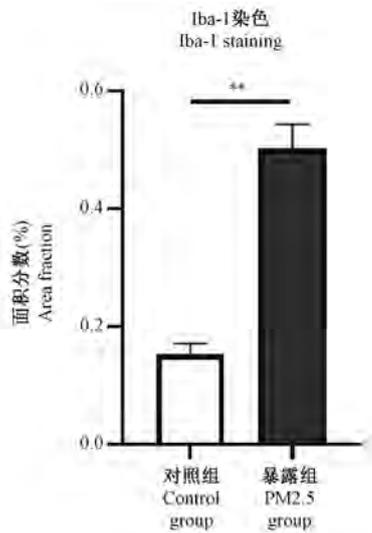
3 讨论

目前已有多项研究证实,空气污染与多种类型的认知功能呈负相关关系^[8]。已有报道 PM2.5 暴露后,PM2.5 颗粒上附着的金属颗粒可对机体造成持续性伤害,在包括脑组织的众多组织中均发现了金属颗粒沉积^[9]。越来越多证据提示暴露在金属颗粒中,可对生长期的动物产生神经毒害作用,并可导致神经炎症^[10]。我们采用的 PM2.5 浓缩富集系统可保留大气中 PM2.5 颗粒上附着的有害物质,真实地模拟动物在高浓度 PM2.5 天气下暴露状态。通过高浓度 PM2.5 暴露小鼠 15 周,实验结束后我们发现暴露后

的小鼠肺泡隔增宽、炎性细胞浸润,表明小鼠 PM2.5 暴露模型建立成功,为后续研究创造了基础。

PM2.5 影响中枢神经系统的机制可能是由于 PM2.5 活化小胶质细胞,产生神经炎症,从而损伤

神经元和突触功能^[11]。PM2.5 通过鼻部嗅球粘膜迁移或经摄取后进入循环系统的迁移,已通过工业纳米颗粒在啮齿类实验动物的实验研究中得以证实^[12]。啮齿类动物暴露于高浓度 PM2.5 和柴油发

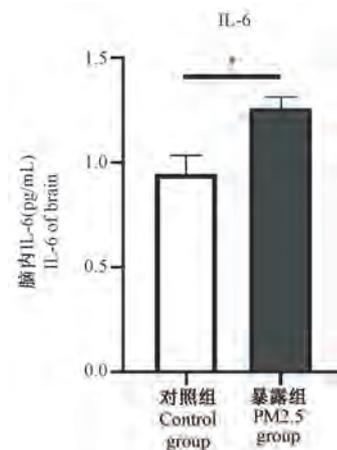


注:对各组小鼠海马区域 Iba-1 表达进行统计分析,结果表明,暴露组与对照组相比出现海马区明显的 Iba-1 表达增加。对照组与暴露组相比, ** $P < 0.005$ 。

图 5 PM2.5 暴露导致小鼠海马 Iba-1 表达增加 ($n=3$)

Note. Statistical analysis of Iba-1 expression in the hippocampal region of mice in each group showed that the PM2.5 group had significantly increased Iba-1 expression in the hippocampal region compared with the control group. Control group compared with PM2.5 group, ** $P < 0.005$.

Figure 5 Increased expression of Iba-1 in hippocampus of mice caused by PM2.5 exposure

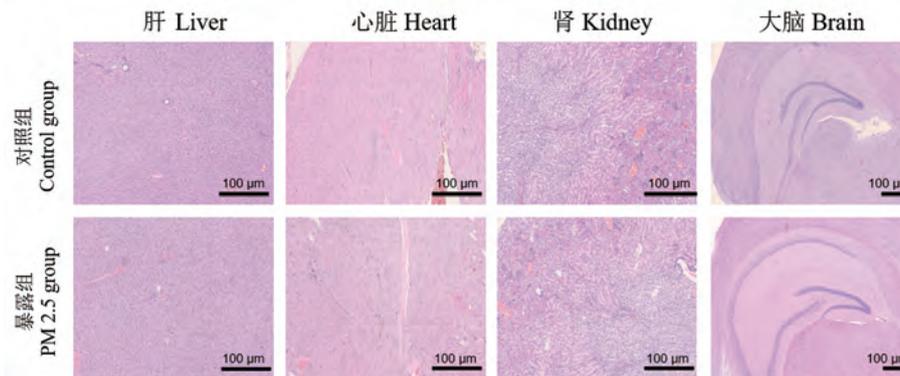


注:对各组小鼠中枢神经系统样品的 IL-6 含量进行统计分析,结果表明,暴露组与对照组相比出现中枢神经系统明显的 IL-6 含量增加。对照组与暴露组相比, $P < 0.05$ 。

图 6 PM2.5 暴露导致脑内炎症因子 IL-6 含量增加 ($n=3$)

Note. Statistical analysis of IL-6 expression in mice brain in each group showed that the PM2.5 group had significantly increased IL-6 expression in mice brain. Control group compared with PM2.5 group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Increased expression of IL-6 in mice brain caused by PM2.5 exposure



注:对小鼠除肺外的其他主要脏器进行 HE 染色和病理学分析,结果表明各组小鼠肝、心脏、肾以及大脑组织,细胞形态和结构规则、完整,提示各个重要组织器官病理学未见明显异常。

图 7 各组小鼠 PM2.5 暴露后肝、心脏、肾及大脑组织未见异常 ($n=3$)

Note. HE staining and pathological analysis were carried out on other major organs of mice. The results showed that the morphology and structure of liver, heart, kidney and brain tissues of mice in each group were regular and complete, suggesting no obvious pathological abnormalities in each important tissue and organ.

Figure 7 No pathological abnormalities were observed in the liver, heart, kidney and brain tissues of mice exposed to PM2.5

动机尾气中,大脑中观察到了严重的炎症反应^[13]。小胶质细胞暴露于 PM2.5 后出现形态变化,表明小胶质可能参与 PM2.5 诱导的神经元损伤^[14]。体外实验表明,PM2.5 以剂量依赖方式的降低神经元细胞生存率,导致小胶质细胞活化和神经元损伤^[15]。此外,经 PM2.5 刺激的小胶质细胞可释放更多的促炎性细胞因子,如 IL-1 β 和 TNF- α ^[16]。而 TNF- α 作为一种关键的促炎性细胞因子,已被认为可导致轴突变性,影响神经突触的形成^[17]。也有研究证明,PM2.5 暴露诱导的小胶质细胞激活可被吡格列酮等抗炎药抑制^[18]。这表示小胶质细胞在作为 PM2.5 诱导神经炎症的中介上起到了关键作用。在我们的实验中,对中枢神经系统海马的小胶质细胞进行免疫组织化学染色和分析,也发现小鼠可出现中枢神经系统的小胶质细胞激活,诱发了神经炎症状态。

综上所述,本研究对小鼠成功建立了 PM2.5 暴露模型,结合动物行为学、病理学、分子生物学等方法,初步探究了空气细颗粒物 PM2.5 引起小鼠的认知症状的神经炎症机制,为后续的 PM2.5 对健康的危害研究提供参考。

参考文献:

- [1] Clifford A, Lang L, Chen R, et al. Exposure to air pollution and cognitive functioning across the life course--A systematic literature review [J]. *Environ Res*, 2016, 147: 383-398.
- [2] Fricker M, Oliva-Martin MJ, Brown GC. Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or A β is dependent on calreticulin/LRP phagocytic signalling [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 196.
- [3] Choi J, Oh JY, Lee YS, et al. Harmful impact of air pollution on severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; particulate matter is hazardous [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13: 1053-1059.
- [4] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM2.5 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.
- [5] Hullmann M, Albrecht C, van Berlo D, et al. Diesel engine exhaust accelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2017, 14(1): 35.
- [6] Rogó \acute{z} Z, Kamińska K. The effect of combined treatment with escitalopram and risperidone on the MK-801-induced changes in the object recognition test in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(1): 116-120.
- [7] 宋广青, 孙秀萍, 刘新民. 大鼠物体识别实验方法综述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(7): 55-60, 67.
- [8] Taylor CA, Greenlund SF, McGuire LC, et al. Deaths from Alzheimer's disease - United States, 1999-2014 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2017, 66(20): 521-526.
- [9] Ku T, Zhang Y, Ji X, et al. PM-bound metal metabolic distribution and coupled lipid abnormality at different developmental windows [J]. *Environ Pollut*, 2017, 228: 354-362.
- [10] Karri V, Schuhmacher M, Kumar V. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 48: 203-213.
- [11] Spangenberg EE, Green KN. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 61: 1-11.
- [12] Garcia GJ, Schroeter JD, Kimbell JS. Olfactory deposition of inhaled nanoparticles in humans [J]. *Inhal Toxicol*, 2015, 27(8): 394-403.
- [13] Patchin ES, Anderson DS, Silva RM, et al. Size-dependent deposition, translocation, and microglial activation of inhaled silver nanoparticles in the rodent nose and brain [J]. *Environ Health Perspect*, 2016, 124(12): 1870-1875.
- [14] Bai KJ, Chuang KJ, Chen CL, et al. Microglial activation and inflammation caused by traffic-related particulate matter [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 311: 108762.
- [15] Roqué PJ, Dao K, Costa LG. Microglia mediate diesel exhaust particle-induced cerebellar neuronal toxicity through neuroinflammatory mechanisms [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 56: 204-214.
- [16] Sama P, Long TC, Hester S, et al. The cellular and genomic response of an immortalized microglia cell line (BV2) to concentrated ambient particulate matter [J]. *Inhal Toxicol*, 2007, 19(13): 1079-1087.
- [17] Cheng H, Davis DA, Hasheminassab S, et al. Urban traffic-derived nanoparticulate matter reduces neurite outgrowth via TNF α *in vitro* [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 19.
- [18] Coburn JL, Cole TB, Dao KT, et al. Acute exposure to diesel exhaust impairs adult neurogenesis in mice; prominence in males and protective effect of pioglitazone [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(5): 1815-1829.

[收稿日期]2020-12-01

杨波,王孟孟,孙林,等.扶肾方对尿毒症腹膜透析大鼠腹膜功能及 VEGF、TNF- α 、IL-12、IFN- γ 的影响 [J].中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 15-20.

Yang B, Wang MM, Sun L, et al. Effect of Fushen recipe on peritoneal function and VEGF, TNF- α , IL-12, IFN- γ in uremic peritoneal dialysis rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 15-20.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.003

扶肾方对尿毒症腹膜透析大鼠腹膜功能及 VEGF、TNF- α 、IL-12、IFN- γ 的影响

杨波¹,王孟孟²,孙林¹,李洁¹,乔延恒¹,杨洪涛^{1*}

(1.天津中医药大学第一附属医院肾病科,天津 300381; 2.安徽省阜阳市第四人民医院内分泌科,安徽 阜阳 236021)

【摘要】 目的 观察扶肾方对尿毒症腹膜透析大鼠的腹膜功能及腹膜组织 VEGF、TNF- α 、IL-12、IFN- γ 的影响。**方法** 50 只雄性 SD 大鼠,按随机数字表法分为 5 组:正常对照组,模型组(尿毒症腹膜透析),模型+扶肾方低剂量干预组,模型+扶肾方高剂量干预组,模型+塞来昔布干预组。采用 5/6 肾切除法建立尿毒症模型,腹腔注射腹膜透析液建立腹膜透析模型。连续给药 4 周后留取各组大鼠腹膜组织。HE 染色观察腹膜组织形态学变化,腹膜平衡试验检测腹膜转运功能,液相芯片法检测腹膜组织 VEGF、TNF- α 、IL-12 和 IFN- γ 的含量。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠腹膜组织 VEGF、TNF- α 表达上调,IL-12、IFN- γ 的表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,扶肾方低剂量组 VEGF、TNF- α 表达下调,IL-12、IFN- γ 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);扶肾方高剂量组和塞来昔布组 VEGF 表达下调,IL-12、IFN- γ 表达上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 扶肾方可减轻尿毒症腹膜透析大鼠腹膜损伤、改善腹膜超滤功能,该作用可能与下调腹膜组织血管生成促进因子 VEGF、TNF- α 的表达,上调血管生成抑制因子 IL-12、IFN- γ 的表达有关。

【关键词】 腹膜透析;尿毒症;扶肾方;VEGF;TNF- α ;IL-12;IFN- γ ;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0015-06

Effect of Fushen recipe on peritoneal function and VEGF, TNF- α , IL-12, IFN- γ in uremic peritoneal dialysis rats

YANG Bo¹, WANG Mengmeng², SUN Lin¹, LI Jie¹, QIAO Yanheng¹, YANG Hongtao^{1*}

(1. Department of Nephrology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China. 2. Department of Endocrinology, the Fourth People's Hospital, Fuyang 236021)

【Abstract】 Objective To observe the effect of Fushen recipe on peritoneal function and on peritoneal levels of VEGF, TNF- α , IL-12, and IFN- γ in uremic peritoneal dialysis rats. **Methods** Fifty male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups according to random number table method: normal control, model (uremic peritoneal dialysis), model + low-dose Fushen recipe intervention, model + high-dose Fushen recipe intervention, and model + celecoxib

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81774065);国家自然科学基金青年基金(81303092)。

【作者简介】 杨波(1982—),男,副主任医师,研究方向:中西医结合防治慢性肾脏病,中医药提高肾透析患者生存质量。

E-mail: yb8203@126.com

【通信作者】 杨洪涛(1963—),男,教授,主任医师,研究方向:中西医结合防治慢性肾脏病,中医药提高肾透析患者生存质量。

E-mail: jtcmht@126.com

intervention. A model of uremia was established by 5/6 nephrectomy and a peritoneal dialysis model was established by intraperitoneal injection of peritoneal dialysis solution. Peritoneal tissues of rats in each group were collected after continuous administration for 4 weeks. Hematoxylin and eosin staining was used to observe morphological changes of peritoneal tissues, a peritoneal balance test was used to detect peritoneal transport function, and a liquid chip method was used to detect the levels of VEGF, TNF- α , IL-12 and IFN- γ in peritoneal tissues. **Results** Compared to normal controls, the expression of VEGF and TNF- α in peritoneal tissue of model group rats was up-regulated, and the expression of IL-12 and IFN- γ was down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Compared to normal controls, the expression of VEGF and TNF- α was down-regulated and the expression of IL-12 and IFN- γ was up-regulated in the low-dose Fushen recipe group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). The expression of VEGF, IL-12, and IFN- γ in the high-dose group and the celecoxib group was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusions** Fushen recipe can alleviate peritoneal injury and improve peritoneal ultrafiltration function in uremic peritoneal dialysis rats, which may be related to down-regulation of VEGF and TNF- α , and up-regulation of IL-12 and IFN- γ , which are angiogenesis promoting factors in peritoneal tissue.

【Keywords】 peritoneal dialysis; uremia; Fushen recipe; VEGF; TNF- α ; IL-12; IFN- γ ; rat

腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)作为主要的肾替代治疗方法之一,极大的提高了终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)患者的生存质量。但是由于患者长期使用生物不相容性的腹膜透析液,腹膜的超滤功能逐渐减退,终致超滤衰竭,将迫使患者退出腹膜透析治疗^[1]。研究表明,腹膜血管新生是导致超滤衰竭的主要原因之一^[2]。因此,采取有效策略抑制腹膜血管新生,维持腹膜有效超滤是保证 PD 患者长期存活的关键。中药复方因其多靶点调节的特点,在抑制腹膜血管新生方面具有较好前景^[3],扶肾方(院内制剂:津药制字 Z20130941)由生黄芪、当归、陈皮、半夏、丹参、鬼箭羽、熟军、仙灵脾组方,具有健脾益肾、通腑降浊的功效。本研究利用 5/6 肾切除尿毒症大鼠 PD 模型,模拟人体内 PD 过程,观察扶肾方对尿毒症大鼠腹膜形态、腹膜功能及腹膜组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-12(interleukin-12, IL-12)及干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的影响,为扶肾方防治 PD 超滤衰竭提供新的思路与方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,鼠龄 6~8 周,体重 200~250 g,购自北京维通利华实验技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。饲养于天津中医药大学动物房内[SYXK(津)2018-0002]。本研究经天津中医药大学动物实验伦理委员会批准(TCM-LAEC2019067),在整个实验过程中依照“3R”原则给予实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

1.5%及 4.25% 双联腹膜透析液,广州百特医疗用品有限公司;扶肾方饮片购于天津中医药大学第一附属医院;塞来昔布(批号:J20140072),美国辉瑞制药有限公司;尿素氮(BUN)(C013-2)和肌酐(Cr)(C011-2)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;HE 染色试剂盒(G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖检测试剂盒购自上海荣盛生物医药有限公司;液相芯片试剂盒(RECYTMAG-56 K)购自美国 MILLIPORE 公司。Luminex 200 液相芯片分析仪(美国 Luminex 公司);紫外可见分光光度计(T6 新世纪),北京普析通用仪器有限责任公司;-80℃超低温冰箱(BCD-215KS),青岛海尔股份有限公司;7100 型日立全自动生化分析仪购自日本日立公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

50 只 SD 大鼠常规饲养,适应环境 1 周后,按随机数字表法随机分为正常对照组(Control)、模型组(Model)、扶肾方低剂量组(FSF-L)、扶肾方高剂量组(FSF-H)、塞来昔布组(Cel),每组 10 只。

1.3.2 扶肾方制备

扶肾方组成:陈皮 10 g、半夏 15 g、黄芪 15 g、当归 10 g、仙灵脾 15 g、丹参 30 g、熟军 10 g、鬼箭羽 30 g。扶肾方以中药饮片为原料,经过提取、分离、浓缩、干燥、制粒而成。按照药物人和大鼠体表面积计算方法,折算系数为 0.018。扶肾方颗粒成人服用剂量为每次 18 g,按照折算系数计算出大鼠等效剂量为 0.324 g,每日 2 次。

1.3.3 动物造模与给药

正常对照组大鼠不进行任何处理,其余各组大

鼠行 5/6 肾切除术,术后 1 周检测肾功能。各组肾功能达标后,腹腔注射 1.5% 腹膜透析液,按每日 100 mL/kg,以大鼠右下腹靠近腹股沟中点为穿刺注射部位,各组所注射液均腹腔内保留,不抽出。模型组在规律腹腔注射腹膜透析液同时每日生理盐水 2 mL 灌胃,连续 4 周;扶肾方低剂量组在规律腹腔注射腹膜透析液同时每日扶肾方 324 mg/mL, 2 mL/d 灌胃,连续 4 周;扶肾方高剂量组在规律腹腔注射腹膜透析液同时每日扶肾方 648 mg/mL, 2 mL/d 灌胃,连续 4 周;塞来昔布组在规律腹腔注射腹膜透析液同时每日塞来昔布溶液 1.8 mg/mL, 每天灌胃 2 mL, 连续 4 周;正常对照组予每日生理盐水 2 mL 灌胃,连续 4 周。

1.3.4 大鼠血清肌酐和尿素氮水平的检测

在右肾切除术后第 4 周从大鼠眶后静脉丛取血,低温高速离心机 3500 r/min 离心 10 min,留取上清液,应用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清肌酐和尿素氮的水平。

1.3.5 各组大鼠腹膜组织 HE 染色

取大鼠壁层腹膜组织,常规固定、脱水、石蜡包埋、切片后,行苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察大鼠腹膜形态学变化。

1.3.6 各组大鼠腹膜功能检测

行腹膜平衡实验,检测大鼠腹膜转运功能,方法:各组大鼠杀检前,每只大鼠腹腔注射 4.25% 腹膜透析液 25 mL,4 h 后麻醉大鼠,抽取腹腔液体量,打开腹腔,将干纱布消毒,称重后置入腹腔,以吸取未抽净的腹透液,后再称取纱布质量。同时分别留取腹透液标本,1500 r/min 离心 5 min,留取上清液,紫外分光光度计检测每组腹膜透析液的葡萄糖浓度,根据检测结果计算超滤量和葡萄糖转运量。超滤量=(纱布吸水后的质量-纱布的质量)×1 mL/g+引流量-腹腔注射量;葡萄糖转运量(mmol/kg)=(透析液初始葡萄糖浓度×注入透析液体积)-(透析液末葡萄糖浓度×终末透析液出量)。

1.3.7 大鼠腹膜组织 VEGF、TNF- α 、IL-12 和 IFN- γ 含量检测

适量腹膜组织进行匀浆后,取上清液,采用 Luminex200 液相芯片分析仪进行 VEGF、TNF- α 、IL-12、IFN- γ 检测。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

不符合正态分布的资料用中位数(四分位数间距)表示,多组比较采用单因素方差分析,以 Levene 法进行方差齐性检验,若方差齐,采用 LSD-*t* 法,若方差不齐,采用 Games-Howell 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立大鼠尿毒症模型

尿毒症组大鼠血清肌酐和尿素氮浓度为正常对照组的 2~3 倍,表明大鼠尿毒症模型造模成功^[4-5]。见表 1。

2.2 各组大鼠腹膜组织 HE 染色

正常对照组大鼠腹膜组织较连续和完整,腹膜间皮细胞呈扁平状态,模型组腹膜组织明显增厚,部分呈柱形,还可见到间皮细胞的脱落,炎细胞浸润等病理变化。扶肾方及塞来昔布干预后,炎性细胞浸润、腹膜增厚较模型组减轻。见图 1。

2.3 各组大鼠腹膜功能

腹膜平衡实验结果,与正常对照组比较,模型组、扶肾方低剂量组、扶肾方高剂量组及塞来昔布组超滤量均明显下降,模型组、扶肾方低剂量组葡萄糖转运量均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,扶肾方高剂量组超滤量明显增加,扶肾方高剂量组及塞来昔布组葡萄糖转运量明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 扶肾方对各组大鼠腹膜组织 VEGF、TNF- α 、IL-12 和 IFN- γ 含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠腹膜组织 VEGF、TNF- α 表达上调,IL-12、IFN- γ 的表达下调,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,扶肾方低剂量组 VEGF、TNF- α 表达下调,IL-12、IFN- γ 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);扶肾方高剂量组和塞来昔布组 VEGF 表达下调,IL-12、IFN- γ 表达上调,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

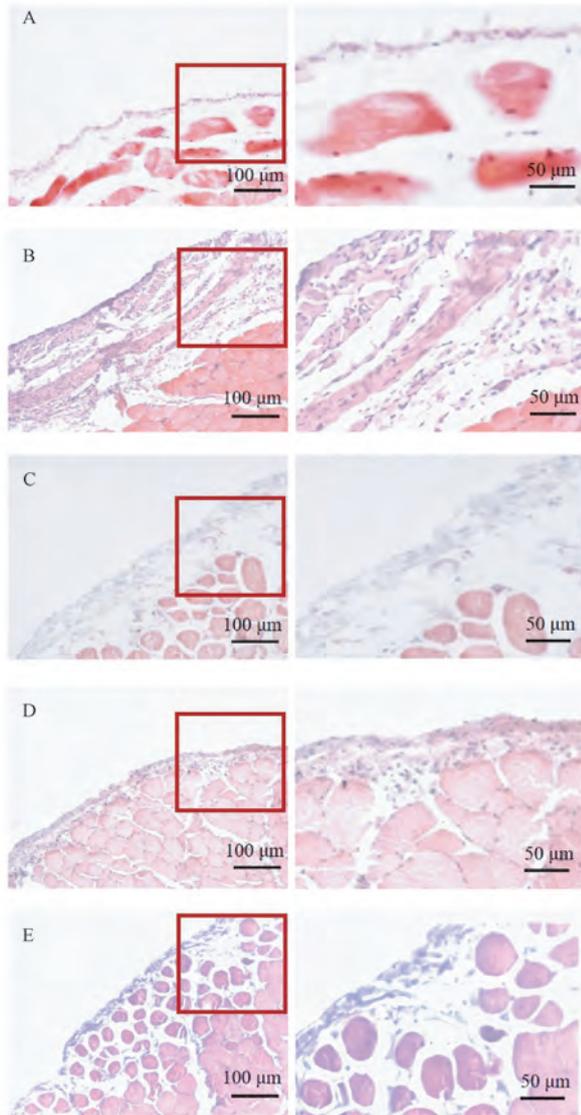
表 1 正常对照组与尿毒症组大鼠肾功能比较

Table 1 Comparison of renal function between normal control group and uremic group rats

分组 Groups	例数 Number	肌酐 Scr ($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮 BUN (mmol/L)
正常对照组 Control group	10	37.90±3.15	2.99±0.55
尿毒症组 Uremia group	40	95.72±8.78 [#]	7.49±0.96 [#]

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, [#] $P < 0.05$.



注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: 扶肾方低剂量组; D: 扶肾方高剂量组; E: 塞来昔布组。

图 1 各组大鼠腹膜组织 HE 染色

Note. A, Control group. B, Model group. C, FSF-L group. D, FSF-H group. E, Cel group.

Figure 1 HE staining of peritoneal tissues of rats in each group

表 2 各组大鼠超滤量、葡萄糖转运量的变化

Table 2 Changes in ultrafiltration volume and glucose transport of rats in each group

分组 Groups	超滤量 (mL) Ultrafiltration	葡萄糖转运量 (mmol/kg) Glucose transport
正常对照组 Control group	3.37±0.62	14.60±0.47
模型组 Model group	-19.36±0.92 [#]	18.20±0.62 [#]
扶肾方低剂量组 FSF-L group	-18.46±0.69 [#]	17.21±0.52 [#]
扶肾方高剂量组 FSF-H group	-15.92±1.69 ^{#*}	15.45±0.91 [*]
塞来昔布组 Cel group	-16.90±1.34 [#]	15.61±0.74 [*]

注: 与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

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

3 讨论

腹膜透析是终末期肾病患者肾替代治疗的主要方式之一,但 PD 相关的腹膜超滤衰竭是长程 PD 患者面临的严峻问题。其中腹膜血管新生是引起超滤衰竭的重要原因,新生的腹膜血管增加了腹膜毛细血管交换面积,造成小分子溶质高转运,葡萄糖快速被腹膜吸收,腹腔的渗透浓度梯度快速消失,从而出现腹膜超滤减少,患者体内水分和尿毒素不能有效清除,极易出现心脏超负荷,终致患者退出 PD,甚则危及生命。有研究表明^[6],抑制腹膜血管新生,有助于减少腹膜粘连、延缓腹膜纤维化进程,其保护腹膜功能的作用比抑制腹膜纤维化更强。腹膜血管新生发生的原因和机制复杂,受非生物相容性腹透液和炎症状态等因素影响。现代医学主要采用改善腹透液生物相容性、预防腹膜炎等手段抑制腹膜血管新生,防治腹膜超滤衰竭。部分单味及复方中药具有抑制腹膜血管新生、抗腹膜纤维化的作用,中医药减轻腹膜血管新生,防治腹膜超滤衰竭备受研究者的关注。研究表明,黄芪甲苷、丹参酮、大黄素、肾康注射液等可改善由高糖腹透液诱导的大鼠腹膜功能减退,防治腹膜纤维化^[7]。

Hanahan 等^[8]在上世纪九十年代提出了血管生成与血管生成促进因子和血管生成抑制因子的表达有关,也就是有关血管生成的开关平衡假说,即血管稳态的维持,需要血管生成促进因子和抑制因子的共同调控,若两种因子的表达失衡,就可能诱发血管新生化,引起病理性的血管新生。VEGF 是内皮细胞最具特异性的生长因子,主要功能是诱导内皮细胞增殖、分化和迁移,是血管新生的标志性指标^[9]。有研究表明^[10],在尿毒症和高糖腹透液的刺激下,腹膜组织高表达血管生成促进因子 VEGF,并和腹膜血管新生程度呈正相关;应用血管生成抑制剂可使 VEGF 表达下调,减轻腹膜血管新生。TNF- α 是由一种活化的单核细胞、巨噬细胞合成和分泌的、最重要的炎症因子之一。研究发现 TNF- α 可以促进血管内皮细胞的增殖,与 VEGF 同样都具有促进血管生成的作用^[11-12],IL-12 是由抗原提呈细胞和 B 细胞产生,是一种异源二聚体形式的前炎症细胞因子,并以这种形式分泌到细胞外。IL-12 能诱导 IFN- γ 产生,在体内免疫应答中它也是 IFN- γ 产生所必需。研究表明,IL-12 与 IFN- γ 都具有抑制

表 3 扶肾方对各组大鼠腹膜组织 VEGF、TNF- α 、IL-12 和 IFN- γ 含量的影响
Table 3 Effect of FSF on VEGF, TNF- α , IL-12 and IFN- γ contents in peritoneal tissue of rats in each group

分组 Groups	VEGF (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
正常对照组 Control group	40.01 \pm 14.19	1.40 \pm 0.26	217.46 \pm 63.66	9.26 \pm 3.29
模型组 Model group	70.62 \pm 12.58 ^{##}	2.70 \pm 1.37 [#]	126.31 \pm 19.09 ^{##}	2.23 \pm 1.06 ^{##}
扶肾方低剂量组 FSF-L group	44.09 \pm 14.40 ^{**}	1.28 \pm 0.45 [*]	214.86 \pm 90.98 [*]	6.65 \pm 2.28 ^{**}
扶肾方高剂量组 FSF-H group	48.92 \pm 7.72 ^{**}	1.51 \pm 0.54	172.63 \pm 31.55 ^{**}	12.58 \pm 1.85 ^{**}
塞来昔布组 Cel group	49.29 \pm 6.10 ^{**}	1.95 \pm 0.74	264.72 \pm 94.27 ^{**}	7.19 \pm 2.69 ^{**}

注:与正常对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

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

血管生成的作用,IL-12 与 IFN- γ 表达上调,能够减少 VEGF 的生成,发挥抑制血管新生的作用^[13-14]。塞来昔布是一种环氧化酶-2 抑制剂,可特异性抑制环氧化酶-2,减少 VEGF 的生成,从而抑制腹膜血管新生,目前在实验研究中得到广泛应用^[15-16]。笔者课题组前期研究发现,扶肾方可通过调节尿毒症腹膜透析大鼠腹膜组织 TGF- β R I、TGF- β R II 的表达抑制腹膜间皮细胞 EMT,改善腹膜纤维化及腹膜超滤功能^[17]。

本研究采用大鼠 5/6 肾切除建立尿毒症模型后,进行腹腔注射腹膜透析液,成功复制尿毒症腹膜透析大鼠模型,并观察了扶肾方对尿毒症腹膜透析大鼠腹膜组织的形态学、腹膜的超滤功能及葡萄糖转运功能,以及腹膜组织血管生成促进因子和血管生成抑制因子 VEGF、TNF- α 、IL-12、IFN- γ 表达的影响。研究显示,模型组腹膜组织明显增厚,部分呈柱形,还可见到间皮细胞的脱落,炎细胞浸润等病理变化。扶肾方及塞来昔布干预后,炎性细胞浸润、腹膜增厚较模型组减轻。腹膜平衡实验结果表明,与模型组比较,扶肾方高剂量组超滤量明显增加,扶肾方高剂量组及塞来昔布组葡萄糖转运量明显下降,差异有统计学意义。与正常对照组比较,尿毒症腹膜透析模型组大鼠腹膜组织中 VEGF、TNF- α 的表达明显上调,IL-12、IFN- γ 的表达明显下调;与模型组比较,扶肾方低剂量组、扶肾方高剂量组和塞来昔布组均能下调 VEGF、TNF- α 表达,上调 IL-12、IFN- γ 的表达。扶肾方的作用与塞来昔布类似。笔者推测在 5/6 肾切除大鼠尿毒症腹膜透析模型中,扶肾方可改善腹膜组织形态学变化,并通过下调腹膜组织中血管生成促进因子 VEGF、TNF- α 的表达,上调血管生成抑制因子 IL-12、IFN- γ 的表

达,达到改善腹膜功能,防治超滤衰竭的作用。

中医学认为,本虚标实为尿毒症的基本病机,本虚主要为脾肾亏虚,标实表现为湿浊、瘀血,浊、瘀主要由脾肾亏虚导致。患者行 PD 治疗后,仍不失尿毒症病机关键,故脾肾亏虚、湿浊瘀血内蕴为 PD 相关腹膜超滤衰竭的主要病机。扶肾方是根据以上病机关键而组成的临床效方,由黄芪、当归、陈皮、半夏、淫羊藿、熟军、丹参、鬼箭羽组成,主要功效为“健脾益肾,化瘀降浊”,组方融中医“补、和、消”三法于一体,前期临床及基础研究表明,该方能显著改善尿毒症 PD 大鼠肾功能,延缓 PD 腹膜纤维化,改善腹膜超滤衰竭^[17-18],但其具体作用机制尚不明确。

综上所述,本研究从动物实验初步证实,扶肾方具有减轻尿毒症腹膜透析大鼠腹膜损伤、改善腹膜超滤衰竭的作用,该作用可能与下调腹膜组织血管生成促进因子 VEGF、TNF- α 的表达,上调血管生成抑制因子 IL-12、IFN- γ 的表达有关,但扶肾方调控腹膜血管新生的具体作用机制还需进一步深入探索。

参考文献:

- [1] Yang CY, Chau YP, Chen A, et al. Targeting cannabinoid signaling for peritoneal dialysis induced oxidative stress and fibrosis [J]. World J Nephrol, 2017, 6(3): 111-118.
- [2] Li Z, Yan H, Yuan J, et al. Pharmacological inhibition of heparin-binding EGF-like growth factor promotes peritoneal angiogenesis in a peritoneal dialysis rat model [J]. Clin Exp Nephrol, 2018, 22(2): 257-265.
- [3] 杨洪涛,尚懿纯,曹式丽,等. 肾疏宁抑制腹膜透析腹膜纤维化大鼠基质及新生血管的实验研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(4): 294-298.
- [4] 潘卉萱,程骏章,姜鸿,等. 肾大部切除大鼠肾衰模型制备

- 方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5): 70-71.
- [5] 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.
- [6] Margetts PJ, Gyorffy S, Kolb M, et al. Antiangiogenic and antifibrotic gene therapy in a chronic infusion model of peritoneal dialysis in rats [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3): 721-728.
- [7] 高新, 乔冬雪, 王孟孟, 等. 中医药防治腹膜间皮细胞发生上皮细胞-间质转化的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(11): 2457-2460.
- [8] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [9] Hermann DM, Zechariah A. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(10): 1620-1643.
- [10] 赵占正, 刘鑫鑫, 李真珍, 等. 可溶性 Tie2 融合蛋白对尿毒症腹膜透析大鼠血管新生的影响 [J]. 中华肾脏病杂志, 2011, 27(9): 662-666.
- [11] 付凌云, 杨红, 林丹, 等. EOFAZ 抑制 TNF- α 诱导的血管新生和炎症损伤 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11): 1594-1599.
- [12] Kumar A, Sumita P, Jha S, et al. Daphnetin inhibits TNF- α and VEGF-induced angiogenesis through inhibition of the IKKs/I κ B α /NF- κ B, Src/FAK/ERK1/2 and Akt signalling pathways [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(10): 939-950.
- [13] Ali M, Mali V, Haddock S, et al. Essential role of IL-12 in angiogenesis in type 2 diabetes [J]. Am J Pathol, 2017, 187(11): 2590-2601.
- [14] George J, Banik NL, Ray SK. Combination of hTERT knockdown and IFN-gamma treatment inhibited angiogenesis and tumor progression in glioblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(23): 7186-7195.
- [15] Zhang Z, Jiang N, Ni Z. Strategies for preventing peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis patients: new insights based on peritoneal inflammation and angiogenesis [J]. Front Med, 2017, 11(3): 349-358.
- [16] Fabbrini P, Schilte MN, Zareie M, et al. Celecoxib treatment reduces peritoneal fibrosis and angiogenesis and prevents ultrafiltration failure in experimental peritoneal dialysis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(12): 3669-3676.
- [17] 雷洋洋, 杨波, 王孟孟, 等. 扶肾方对大鼠腹膜间皮细胞转分化的影响及机制探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(7), 1500-1503.
- [18] 杨洪涛, 张建朋, 赵菁莉, 等. 扶肾颗粒对腹膜透析相关性腹膜纤维化的影响及其作用机制的实验研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6): 482-486.

[收稿日期] 2020-06-22

刘梦迪,董伟,张旭,等. Prpf40b 基因缺失诱发大鼠心脏结构异常 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 21-26.
Liu MD, Dong W, Zhang X, et al. Prpf40b deletion causes cardiac structural abnormalities in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 21-26.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.004

Prpf40b 基因缺失诱发大鼠心脏结构异常

刘梦迪¹, 董伟², 张旭¹, 陈炜¹, 高翔², 高珊², 张连峰², 吕丹^{1*}

(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, 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; 2. 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)

【摘要】 目的 构建 Prpf40b 基因敲除大鼠, 为该基因的生物学研究建立工具动物, 同时初步探究该基因缺失后对心脏发育的影响。方法 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Prpf40b 基因敲除大鼠, 测序及 PCR 技术鉴定敲除大鼠构建成功及后代大鼠基因型。通过超声影像技术分析敲除大鼠心脏结构形态和功能改变, 随后通过病理组织学观察分析该基因敲除后对大鼠心肌显微形态的组织学影响。结果 经 PCR 鉴定和测序比对, 确认 Prpf40b 基因敲除大鼠构建成功。经超声影像学分析, 与同窝阴性大鼠相比 2 月龄敲除大鼠心脏结构形态未见明显异常, 而 12 月龄敲除大鼠收缩期及舒张期时心室腔内径及容积显著减小, 同时射血分数显著减小。经病理组织学分析, 与同窝阴性大鼠相比 12 月龄敲除大鼠心肌出现排列不齐, 心肌纤维粗细不均及肌浆网扩张等现象。结论 Prpf40b 基因缺失可诱发大鼠心脏整体结构形态改变及心肌组织学异常。

【关键词】 Prpf40b; 敲除; 心脏; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0021-06

Prpf40b deletion causes cardiac structural abnormalities in rats

LIU Mengdi¹, DONG Wei², ZHANG Xu¹, CHEN Wei¹, GAO Xiang², GAO Shan², ZHANG Lianfeng², LYU Dan^{1*}

(1. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China.
2. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To establish Prpf40b knockout rats for biological research of the gene and explore the effect of gene deletion on development of the heart. **Methods** Prpf40b knockout rats were established by CRISPR/Cas9 technology. The genotypes of the founder rats and offspring were identified by sequencing and PCR. The cardiac structure and function of knockout rats were analyzed by ultrasound imaging technology. The microscopic morphology of the rat myocardium was analyzed by histopathological observation. **Results** PCR and sequencing confirmed successful establishment of Prpf40b gene knockout rats. Compared with the wt rats, ultrasound imaging analysis showed that the cardiac structure and morphology of 2-month-old knockout rats were not significantly abnormal; whereas the ventricular cavity diameter and volume of 12-month-old knockout rats decreased significantly in the systole and diastole, and the ejection fraction decreased significantly. Histopathological analysis showed that the myocardium of 12-month-old knockout

[基金项目] 国家自然科学基金(31872314)。

[作者简介] 刘梦迪(1994—), 女, 硕士, 研究方向: 心血管疾病相关动物模型创制。E-mail: liumengdi@cnilas.org

[通信作者] 吕丹(1980—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事心血管相关动物模型创制, 发病机制及基因功能分析。

E-mail: lvd@cnilas.org

rats was arranged irregularly, the thickness of myocardial fibers was uneven, and the sarcoplasmic reticulum was dilated.

Conclusions Deletion of the Prpf40b gene induces changes in the overall structure and morphology of the rat heart and abnormal myocardial histology.

【Keywords】 Prpf40b; knockout; heart; rat

剪接体在真核细胞新生 RNA 转录物的加工中起重要作用。剪接体是小核 RNA 和蛋白质的复合物,可从初级转录本(pre-mRNA)中去除(剪接)内含子和非常规外显子,从而将识别的外显子组装(剪接)成成熟的 mRNA。它主要是基因特异性的,并且是由于顺式调控序列中的突变指导了外显子的剪接识别^[1]。但是,已知有越来越多的突变靶向剪接体的组分,因此潜在地产生了全局而非基因特异性的 RNA 剪接变化。剪接位点的识别可以通过跨越内含子以及跨越外显子两种机制进行,该方式可极大的增加蛋白质的多样性和基因表达的复杂程度^[2-3]。

近十年来,已有多篇研究报道剪接复合体相关基因突变与多种临床疾病相关^[4-5]。而 PRPF40B 是已发现的编码剪接体化合物的基因之一,该类基因还包括, SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2, SF1, SF3A1 及 U2AF2。前 mRNA 加工因子(Pre-mRNA processing factor, PRPF)是研究发现的一种参与前 mRNA 剪接的蛋白质。人 PRPF 基因编码一个 1007 个氨基酸的蛋白质,包含一个 N-末端 340 个氨基酸的富含 Arg/Ser 的结构域,该结构域通常存在于前 mRNA 剪接因子中。PRPF 的催化结构域与细胞周期蛋白依赖性激酶和丝裂原活化蛋白激酶具有同源性^[6]。

PRPF40B 属于 U2 核糖核蛋白体依赖型剪接复合体相关基因,目前,已有研究表明 PRPF40B 基因突变,与骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS),慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)和急性粒细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)有关^[7-10]。在患有骨髓恶性肿瘤的患者中,已经描述了八个核心剪接体基因中的体细胞突变-SF3B1, SRSF2, U2AF35 (U2AF1), ZRSR2, SF3A1, PRPF40B, U2AF65 (U2AF2),其中 PRPF40B 的突变发生频率为 1%左右^[1,11-12]。此外,有研究表明 PRPF40B 基因突变还与多种实体肿瘤发生相关,包括乳腺癌,肝癌,胰腺癌和黑色素瘤等^[2,13]。

所以,为深入研究剪接复合体相关基因 PRPF40B 的生物学作用,动物模型是重要的工具,

本实验室依托研究所和基因工程技术平台,利用 CRISPR/Cas9 技术首次构建了 PRPF40B 基因敲除大鼠模型,为开展该基因的生物学功能研究,以及其在多种疾病病理进程中所扮演角色的深入研究,提供了体内动物模型工具。并且在初步的研究分析中,发现该基因敲除可诱发心脏结构形态异常改变。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12 月龄雄性 SPF 级 Prpf40b 基因敲除 SD 大鼠及同窝对照大鼠各 6 只,体重 550~720 g,由中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心建立及培育,同时敲除大鼠培育过程中使用的 SD 大鼠,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2019-0011]。大鼠饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房[SYXK(京)2019-0014],同时动物饲养间采用 12 h 交替明暗照明,动物自由饮水摄食。同时,动物实验中涉及的动物操作程序已得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用及管理委员会(IACUC)的批准(ZLF18003),实验过程中遵循了 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

PCR 引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成;4%甲醛溶液购自北京益利精细化学品有限公司;DNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;琼脂糖购自西班牙 Biowest Agarose 公司;凝胶电泳仪购自美国伯乐公司;组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机购自德国徕卡公司;PCR 仪购自美国伯乐公司;气体麻醉机购自英国斯特普科技有限公司;病理切片扫描机购自德国徕卡公司;小动物成像系统 Vevo3100 购自加拿大 VisualSonics 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 载体构建及基因型鉴定(vector construction and genotyping)

利用本实验室已经建立的成熟的 CRISPR/Cas9 技术操作平台^[14],构建 Prpf40b 基因敲除大鼠。首先研究人员依据 Prpf40b 基因第二外显子,设计

sgRNA, 并利用 MEGAshortscript T7 转录试剂盒 (AM1354, Ambion, 美国)。将 Cas9 蛋白 (30 ng/ μ L) 和 sgRNA (皆 10 ng/ μ L) 混合后, 经显微注射到受精卵、移植至假孕母子宫内, 手术完成后常规饲养。

对出生后仔鼠, 制备组织基因组, 经 PCR 鉴定其基因型, PCR 引物: 5' TCCTCGACAGCCACA TACTCAG3' 及 5' GTCITTCACCTTCGACCTGGTTCA G3'。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环。野生条带和敲除条带分别是 1890 bp 和 809 bp。

1.3.2 超声影像分析技术 (echocardiography analysis)

大鼠经异氟烷 (1.5% ~ 2.5%) 麻醉, 胸前区脱毛, 仰卧位固定于加热板上, 保持体温恒定, 同时四肢固定, 待呼吸平稳后, 利用 16 兆赫兹探头 (Vevo3100, 加拿大), 经胸前区长轴和短轴两个切面, 采集 B-mode 和 M-mode 信号, 经 3100 信号及数据分析系统, 导出超声参数, 包括左室收缩末期内径 (LVESD, left ventricular (LV) end-systole diameter); 左室舒张末期内径 (LVEDD, left ventricular(LV) end-diastole diameter); 左室收缩末期容积 (LVESV, left ventricular (LV) end-systole

volume); 左室舒张末期容积 (LVEDV, left ventricular(LV) end-diastole volume); 每搏输出量 (SV, stroke volume) 等。

1.3.3 病理组织学分析 (histological analysis)

大鼠经安乐死后, 摘取心脏, 经生理盐水清洗后, 固定于 4% 甲醛中固定 48 h。随后经脱水后的心脏组织经智能石蜡包埋机包埋制备成蜡块, 推拉式切片机进行切片 (切片厚度 4 μ m), 恒温烤箱将切片烤干后, 经全自动染色机完成 HE (hematoxylin-eosin stain) 染色, 自动封片机完成封片。切片扫描 (徕卡 TCS SP2, 德国) 后经 Aperio ImageScope v8.2.5 软件分析并导出病理图片。

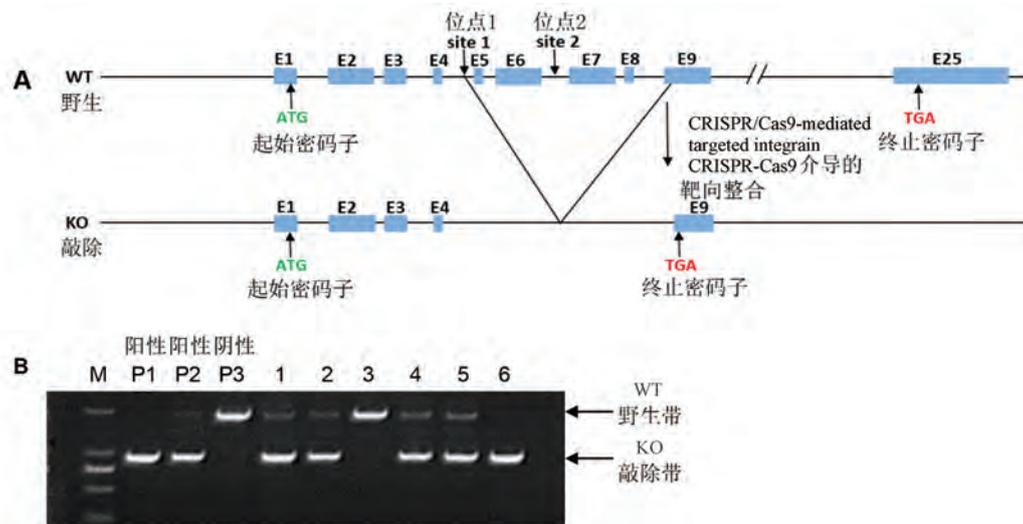
1.4 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 7 统计软件处理, 数据以平均数 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 来表示, 均数间采用 Student's *t*-tests 分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 Prpf40b 基因敲除大鼠的建立及繁育

利用 CRISPR/Cas9 技术, 建立 Prpf40b 基因敲除大鼠, 经测序及 PCR 技术鉴定, 敲除大鼠第 5、6、7、8 以及部分第 9 外显子已敲除, 构建示意图见图 1A。



注: A: 利用 CRISPR/Cas9 技术, Prpf40b 基因敲除大鼠构建示意图, site1、site2: 靶点设计位置。B: Prpf40b 基因敲除大鼠基因型 PCR 鉴定电泳凝胶图像, P1~P3 分别是敲除纯合子, 杂合子及同窝野生型对照孔; 1、2、4、5: 敲除杂合子大鼠基因型条带; 3: 同窝野生型基因型条带; 6: 敲除纯合子大鼠基因型条带。

图 1 Prpf40b 基因敲除大鼠构建及鉴定

Note. A, Schematic diagram of Prpf40b knockout rat with CRISPR/Cas9 technology. site1/site2, target design sites. B, Genotyping identification of Prpf40b knockout rat through PCR. P1~P3, Sample for reference of homozygosis, heterozygosis and wild-type. 1, 2, 4 and 5, Heterozygosis band. 3, Wild-type band. 6, Homozygosis band.

Figure 1 Establishment and genotyping of Prpf40b knockout rat

将首建鼠与野生型 SD 大鼠进行杂交,PCR 技术鉴定仔代鼠基因型,仔代敲除杂合子大鼠间再进行第二轮杂交,仔代大鼠即可获得敲除纯合子,PCR 鉴定示意图见图 1B。

观察至 12 月龄时,Prpf40b 基因敲除杂合子和纯合子大鼠外观形态及体重等,未见明显异常。随后的心脏超声影像学及病理组织学实验,皆选取 Prpf40b 基因敲除纯合子大鼠及同窝阴性大鼠进行观察及分析。

2.2 Prpf40b 基因敲除大鼠心脏结构及功能分析

经基因型鉴定后,选用 2 月龄 Prpf40b 基因敲除大鼠和同窝阴性对照大鼠,进行心脏超声影像学分析,结果显示,与同窝阴性大鼠相比,敲除大鼠心脏结构及形态各参数未见明显异常(数据未列出)。

随后选用 12 月龄敲除大鼠和同窝阴性对照大鼠,进行心脏超声影像学分析,同时采集 B-mode 和 M-mode 影像。通过 M-mode 影像观察,12 月龄敲除大鼠,左室内径明显减小(图 2)。

随后通过 Veov3100 分析系统分析并导出各超声参数,结果显示,左室舒张末期内径(LVEDD, left ventricular(LV) end-diastole diameter)显著变小,减少了 15.6%(图 3A, $P=0.0069$);左室收缩末期内径(LVESD, left ventricular(LV) end-systole diameter)显著变小,减少了 22.2%(图 3B, $P=0.0134$);左室舒张末期容积(LVEDV, left ventricular(LV) end-diastole volume)显著降低,降低了 31.5%(图 3C, $P=0.0068$);左室收缩末期容积(LVESV, left ventricular(LV) end-systole volume)显著降低,降低了 44.1%(图 3D, $P=0.0057$);同时,

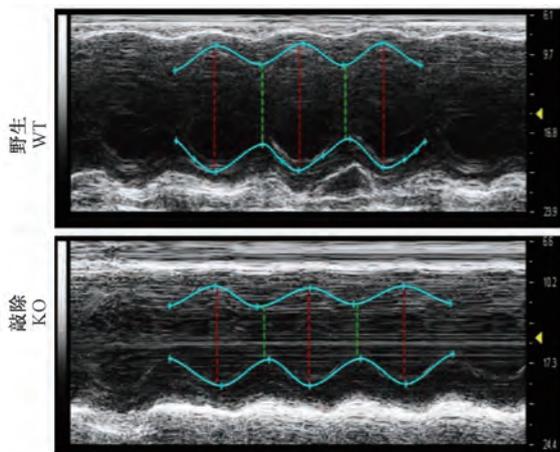


图 2 Prpf40b 基因敲除大鼠超声影像分析 M-mode 截图

Figure 2 M-mode screenshot from echographic analysis in Prpf40b knockout rat

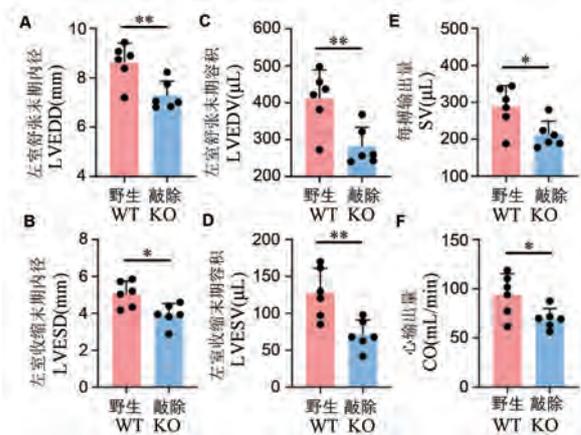
每搏输出量(SV, stroke volume)和心输出量(CO, cardiac output)显著降低,分别降低了 26.1%(图 3E, $P=0.0229$)和 25.9%(图 3F, $P=0.0306$)。

2.3 Prpf40b 基因敲除大鼠心肌组织学观察

通过超声影像分析,12 月龄 Prpf40b 基因敲除大鼠心脏结构形态出现异常,随后我们选取 12 月龄敲除大鼠,经摘取心脏,常规固定并制备心肌组织石蜡切片,随后进行 HE 染色,切片扫描后经 Aperio 分析心肌组织学改变。

与同窝阴性对照大鼠相比,敲除大鼠心脏整体变小,心室腔变小(图 4A),这与敲除大鼠通过超声影像学观察到的结果一致。在显微水平,与同窝阴性对照大鼠相比,敲除大鼠心肌纤维出现排列不齐,心肌纤维粗细不均一,同时,心肌纤维间肌浆网明显扩张,以及心肌纤维染色着色不均一等现象(图 4B)。

同时,我们通过统计 12 月龄敲除大鼠心脏湿重与体重比值,即心重体重比(HW/BW, heart weight/body weight),进一步确认心脏形态学改变。结果我们发现,敲除大鼠心重体重比显著下降,下降了 15.6%(图 4C, $P=0.0348$),与超声影像学及病理组织学观察结果一致。

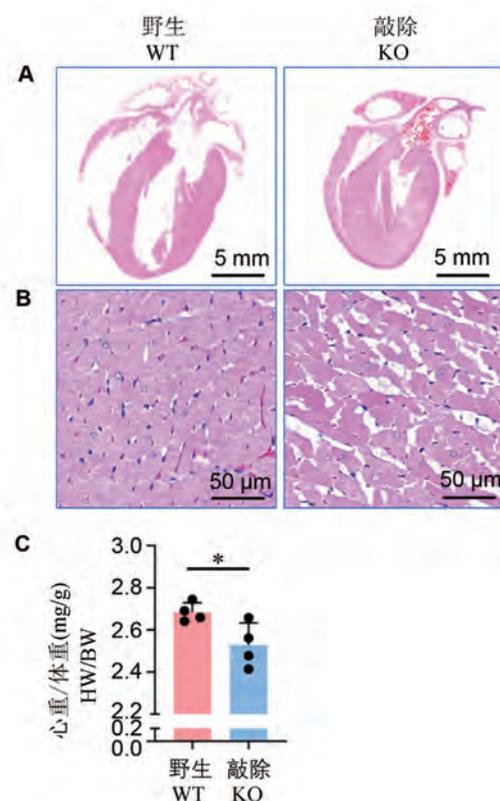


注:A:LVEDD,左室舒张末期内径;B:LVESD,左室收缩末期内径;C:LVEDV,左室舒张末期容积;D:LVESV,左室收缩末期容积;E:SV,每搏输出量;F:CO,心输出量。与野生对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 3 Prpf40b 基因敲除大鼠超声影像参数分析

Note. A, LVEDD, left ventricular(LV) end-diastole diameter. B, LVESD, left ventricular(LV) end-systole diameter. C, LVEDV, left ventricular(LV) end-diastole volume. D, LVESV, left ventricular(LV) end-systole volume. E, SV, stroke volume. F, CO, Cardiac output. Compared with wild type rats, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Echography parameter analysis in Prpf40b knockout rat



注:A:12月龄 Prpf40b 敲除大鼠心脏长轴整体切片 HE 染色;B:敲除大鼠心脏长轴整体切片 HE 染色高倍截图;C:敲除大鼠心脏重量比。与野生对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 Prpf40b 基因敲除大鼠病理组织学分析

Note. A, The whole-heart longitudinal sections with HE staining from Prpf40b knockout rat at 12 months old. B, Magnification of the whole-heart longitudinal sections with HE staining from Prpf40b knockout rat. C, Ratio of heart weight/body weight. Compared with wild type rats, * $P < 0.05$.

Figure 4 Histological analysis in myocardial of Prpf40b knockout rat

3 讨论

酵母剪接因子 Prp40 是一种必需的 U1-snRNP 相关蛋白,作为支架参与剪接体复合物形成的早期步骤。Prp40 的两种哺乳动物同源基因包括 PRPF40A,也被称为 HYPA(亨廷顿相互作用蛋白 A)或 FBP11(formin-binding protein 11)和 PRPF40B,即已知的 HYPC(亨廷顿相互作用蛋白 C)^[15]。

研究表明 PRPF40A 和 PRPF40B 参与剪接体的早期组装,但功能尚不清楚。PRPF40B 与神经系统疾病的发病机制有关,包括亨廷顿病和 Rett 综合征。此外,近几年骨髓增生异常综合征

(myelodysplastic syndromes, MDS) 中检测到参与剪接位点识别的剪接体成分的突变^[16]。PRPF40B 是剪接体突变检测到的靶点之一,在整个开放阅读框架中,PRPF40B 的变化以错义突变的形式出现,提示这些突变可能导致功能丧失。PRPF40B 定位于富含剪接因子的核斑点,结合 SF1 和 U2AF65,并在体内调节多种剪接事件。研究显示 PRPF40B 缺失增加了 Fas/CD95 受体数量和细胞凋亡,表明 PRPF40B 能够改变关键凋亡基因的选择性剪接来调节细胞存活。这些结果支持了 PRPF40B 在导致外显子选择性剪接的早期事件中的作用,并可能为 PRPF40B 相关疾病的分子机制提供重要参考^[17]。

以往的研究表明,PRPF 的突变导致细胞周期中前 mRNA 的积累和 G1/S 转换受损。PRPF 对激酶、转录因子、染色质重塑因子、纺锤体检查点蛋白和癌细胞生长具有不同的作用。PRPF 被证明是 U5 snRNP 相关激酶,PRPF 与 BRG1 和 N-CoR 相互作用,这是核激素共激活和共抑制复合物的两个组成部分。PRPF 与 U5-snRNP 和 N-CoR 脱乙酰酶复合物相关,被认为可以协调转录调控中的前 mRNA 剪接和染色质重塑事件^[18-20]。PRPF 可触发上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),降低 HCT116、PC3、B16-F10 黑色素瘤细胞的侵袭性。PRPF 可通过激活细胞生存信号通路、重新排列肌动蛋白骨架和诱导 EMT 来阻断白藜芦醇的凋亡作用。

PRPF40B 可抑制髓系细胞缺氧,其低表达可能导致白血病的发生^[21]。目前已有报道 PRP6、SWAP 和 PNN 与 PRPF 相互作用,并且 PRPF 被证明是 U5 snRNP 相关激酶。特别是,小核糖核蛋白复合物的成员 PRPF6 被证明能促进结肠癌的增殖。最近的研究表明,各种选择性剪接事件模式的改变在结肠癌的发生和发展中起着重要的作用^[6]。

Prp40 蛋白结构与人类中相对少量的蛋白(包括 PRPF40A、PRPF40B 和 hTCERG1)共有,它们均参与剪接和转录延伸的偶联。最接近的人类直系同源物 PRPF40A 的功能与酵母 Prp40 类似。PRPF40A 的 WW 域对于其定位到核斑点至关重要。PRPF40A 与 SF1 和 U2AF 相互作用,它存在于剪接体复合体 A 和 B 中,但不存在于 C 中,这与 Prp40 在早期剪接体组装中的作用一致。PRPF40A 与 U2-snRNP 和参与转录延伸的蛋白质可发生免疫共沉淀。

PRPF40A 和 PRPF40B 都通过 Pol II CTD 与延伸复合物相互作用调节共转录剪接,并且都与亨廷顿氏病大脑中扩展的亨廷顿多谷氨酰胺束结合,并参与其他神经退行性综合征。即使 PRPF40B 不具有任何 RNA 识别基序(RRM),它也可能通过桥接 5's 的 U1 和与 BPS 结合的 SF1 来调节 AS。此外,PRPF40B 控制重要凋亡基因(例如 Fas)的其他剪接位点的选择。PRPF40B KO 上调了低氧信号,再加上其在 AML 中的低表达,提示该 SF 在髓样白血病中的作用。在 Akt/MAPK 通路中发现了 PRPF40B 调控的酶的 PPI 聚集,这是已知的相互调节缺氧的途径^[21]。

在本研究中我们发现 PRPF40B 基因敲除可诱发模型大鼠心脏结构形态的改变,包括整体结构形态及显微形态的改变,其机制可能与该基因控制重要凋亡基因相关,但具体的诱导机制,还需要后续深入的分子机制研究。同时本文建立的 PRPF40B 基因敲除大鼠为该基因参与多种疾病病理进程调控的作用研究,提供了体内工具动物,为剪接复合体相关基因的功能研究提供了实验基础。

参考文献:

- [1] Larsson CA, Cote G, Quintás-Cardama A. The changing mutational landscape of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(8): 815-827.
- [2] 宋伟. U2 依赖型 mRNA 剪接复合体相关基因多态与原发肝癌发生风险的关联研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
- [3] Visconte V, Makishima H, Maciejewski JP, et al. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders [J]. *Leukemia*, 2012, 26(12): 2447-2454.
- [4] Padgett RA. New connections between splicing and human disease [J]. *Trends Genet*, 2012, 28(4): 147-154.
- [5] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia [J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 64-69.
- [6] Islam SU, Shehzad A, Sonn JK, et al. PRPF overexpression induces drug resistance through actin cytoskeleton rearrangement and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 56659-56671.
- [7] 黄林娜, 刘鹏琴, 代国知. 骨髓增生异常综合征剪接体突变的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(19): 1000-1004.
- [8] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Abstract 5119: Frequent splicing pathway mutations and aberrant RNA splicing in myelodysplasia [J]. *Canc Res*, 2012, 72(8): 5119.
- [9] Gentien D, Kosmider O, Nguyen-Khac F, et al. A common alternative splicing signature is associated with SF3B1 mutations in malignancies from different cell lineages [J]. *Leukemia*, 2014, 28(6): 1355-1357.
- [10] Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 65(26): 2497-2506.
- [11] Webb TR, Joyner AS, Potter PM. The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(1-2): 43-49.
- [12] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia [J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 64-69.
- [13] Tian J, Liu Y, Zhu B, et al. SF3A1 and pancreatic cancer: new evidence for the association of the spliceosome and cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37750-37757.
- [14] Ma Y, Zhang X, Shen B, et al. Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9 [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 122-125.
- [15] Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, et al. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(9): 1463-1474.
- [16] Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Nat Genet*, 2011, 44(1): 47-52.
- [17] Becerra S, Montes M, Hernández-Munain C, et al. Prp40 pre-mRNA processing factor 40 homolog B (PRPF40B) associates with SF1 and U2AF65 and modulates alternative pre-mRNA splicing *in vivo* [J]. *RNA*, 2015, 21(3): 438-457.
- [18] Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing [J]. *J Pathol*, 2010, 220(2): 152-163.
- [19] Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 701-718.
- [20] Will CL, Lührmann R. Protein functions in pre-mRNA splicing [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(3): 320-328.
- [21] Lorenzini PA, Chew RSE, Tan CW, et al. Human PRPF40B regulates hundreds of alternative splicing targets and represses a hypoxia expression signature [J]. *RNA*, 2019, 25(8): 905-920.

[收稿日期] 2021-01-25

左旺盛,张钰,张玲,等. 丁苯酞通过调节海马突触相关蛋白表达和线粒体结构改善 db/db 小鼠认知功能障碍 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 27-32.

Zuo WS, Zhang Y, Zhang L, et al. N-butylphthalide ameliorates cognitive dysfunction in db/db mice by regulating hippocampal synapse-associated protein expression and mitochondrial structure [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 27-32.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.005

丁苯酞通过调节海马突触相关蛋白表达和线粒体结构改善 db/db 小鼠认知功能障碍

左旺盛,张钰,张玲,秦川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

【摘要】 目的 观察不同剂量丁苯酞(N-butylphthalide, NBP)对 db/db 小鼠认知功能及海马区突触素(synaptophysin, SYN)、突触后致密物 95(postsynaptic density-95 protein, PSD-95)的表达以及线粒体结构的影响。方法 实验共分 5 组,将 20 只 db/db 小鼠随机分 4 组,模型组、低、中、高剂量治疗组,每组 5 只,同窝正常 db/m 小鼠 5 只作为对照组。在 6 周龄时,分别给予 db/db 小鼠腹腔注射低、中、高剂量(20、40、60 mg/kg)的丁苯酞注射液,对照组和模型组均给予等体积的生理盐水腹腔注射,每日 1 次,连续 6 周。每周监测体重与空腹血糖水平,运用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的空间学习记忆能力,Western blot 技术检测小鼠海马区 SYN、PSD-95 表达,电镜观察海马区线粒体的结构。结果 与模型组相比,各治疗组对小鼠的体重及血糖影响无显著差异,但水迷宫探索期逃避潜伏时间减少($P < 0.05$),测试期跨越平台次数增加($P < 0.01$),海马区 SYN、PSD-95 蛋白表达量均升高($P < 0.05$),且认知改善和蛋白表达增加呈剂量依赖关系;电镜下正常组的线粒体结构正常,嵴结构清晰并且排列紧密,膜结构完整;模型组线粒体受损,嵴结构稀疏,融合,逐渐空泡化;各剂量治疗组海马区线粒体大部分结构完整,嵴结构有少量破坏,膜结构也相对完整。结论 丁苯酞可能通过调节海马突触相关蛋白 SYN、PSD-95 的表达和线粒体结构改善 db/db 小鼠的认知功能障碍,高剂量治疗效果优于低剂量与中剂量组。

【关键词】 丁苯酞;糖尿病;突触素;突触后致密蛋白 95;认知;线粒体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0027-06

N-butylphthalide ameliorates cognitive dysfunction in db/db mice by regulating hippocampal synapse-associated protein expression and mitochondrial structure

ZUO Wangsheng, ZHANG Yu, ZHANG Ling, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences;
Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective In this study, we aimed to investigate the effects of different doses of n-butylphthalide (NBP) on cognitive function in db/db mice, the expression of synaptophysin (SYN) and post-synaptic density-95 (PSD-95) proteins in the hippocampus, as well as mitochondrial structure in the hippocampus. **Methods** A total of 20 db/db mice were randomly divided into four groups: model group, and low, medium and high-dose treatment groups (five mice in

[基金项目]国家自然科学基金项目(31970510,81941012);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-2-006,2016-I2M-1-010)。

[作者简介]左旺盛,在读硕士研究生,研究方向:神经系统疾病动物模型和病理学研究。E-mail:1264681540@qq.com

[通信作者]秦川,女,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病实验动物模型创制和病理生理学机制研究。E-mail:qinchuan@pumc.edu.cn

each group). In addition, five normal db/m mice from the same litter were used as the control group. At the age of 6 weeks, db/db mice in the low, medium and high-dose groups were intraperitoneally injected with NBP at a concentration of 20, 40 and 60 mg/kg, respectively, while the control group and the model group were given the same volume of normal saline. Injections were given once a day for 6 weeks. Body weight and fasting blood glucose level were monitored weekly. Morris water maze was used to assess spatial learning and memory abilities. Western blot was used to detect the expression of SYN and PSD-95 in the hippocampus, and the structure of hippocampal mitochondria was observed by electron microscopy. **Results** Compared with the model group, there was no significant difference in body weight or blood glucose in any treatment group. However, during the water maze exploration period, escape latency was reduced ($P < 0.05$), the number of platform crossings was increased ($P < 0.01$), protein expression levels of SYN and PSD-95 in the hippocampus were increased ($P < 0.05$), and there was a positive relationship between cognitive improvement and protein expression. Under the electron microscope, mitochondrial structure in the control group was normal, the ridge structure was clear and tightly arranged, and the membrane structure was intact. In the model group, mitochondria were damaged, and cristae were sparse, fused and vacuolated. In the treatment groups, most of the mitochondria in the hippocampus were intact, while cristae structure was slightly perturbed, and membrane structure was relatively intact. **Conclusions** NBP alleviates cognitive dysfunction in db/db mice by regulating the expression of the hippocampal synaptic proteins SYN and PSD-95, and by improving mitochondrial structure. The therapeutic effect in the high dose group was better than that in the low and medium-dose groups.

【Keywords】 3-n-butylphthalide; diabetes; synaptophysin; postsynaptic density 95; cognitive; mitochondria

糖尿病作为一种慢性疾病可以引起多器官的损伤,主要是影响肾、视网膜以及周围神经系统^[1]。如果对糖尿病不进行干预,长久以往可能会导致神经系统损伤,出现认知功能损害,临床主要表现为学习、记忆功能下降,最终导致痴呆。有研究显示糖尿病的认知障碍原因是由于脑海马区的线粒体功能失调导致脑部能量供应障碍^[2],也有研究是由于突触相关的信号传导障碍,导致认知问题的出现^[3]。目前对于糖尿病认知障碍没有理想的治疗方法。丁苯酞(N-butylphthalide, NBP)具有多靶点的保护作用,如线粒体保护作用、抗神经细胞凋亡等,目前是神经内科的一线用药,主要用于中风的临床治疗^[4]。突触素(synaptophysin, SYN)是一种特异性钙结合蛋白,通过调节突触的分化和生长影响突触结构,是影响突触功能的重要指标^[5]。突触后致密物 95 (postsynaptic density 95, PSD-95)是突触后膜致密区上一种支架蛋白,能激发突触的活性,参与突触的连接和维持,增强突触重塑^[6];研究显示,抑制小鼠 PSD-95 的表达会出现学习障碍,突触缺失^[7]。线粒体是人体能量的生产工厂,海马线粒体结构的大量损坏会影响大脑的能量供应,对认知功能有着一定的影响,认知障碍的小鼠线粒体内容物以及嵴结构不清,线粒体形态改变以及裂变增多^[8]。本研究采用 db/db 小鼠作为糖尿病模型,旨在探讨 NBP 对糖尿病小鼠海马线粒体结构,SYN、PSD-95 表达量以及认知功能的影响。

我们在 13 周龄时检测到糖尿病小鼠认知障碍,从上述各指标的检测结果显示,NBP 通过缓解了海马突触相关蛋白 SYN、PSD-95 的表达下降和改善线粒体结构从而达到治疗 db/db 小鼠的认知功能障碍的效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

db/db 小鼠(C57BL/KsJ)是 Leptin 受体点突变的 II 型糖尿病小鼠,出生后 6 周即可出现明显的肥胖和高血糖等糖尿病症状,8~12 周时最明显,并可出现糖尿病肾病等并发症。本研究采用了 20 只 5 周龄 SPF 级雄性糖尿病模型 db/db 小鼠体重 40~43 g,以及 5 只同窝出生 db/m 雄性小鼠 23~25 g,均购自江苏集萃药康生物科技有限公司[SCXK(苏)2018-0008],饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所动物房[SYXK(京)2019-0014]。饲养期间自由饮水饮食,温度(24±1)℃,(12/12)h(光照/黑暗)常规饲养。所有动物实验均经中国医学科学院医学实验动物研究所动物实验伦理委员会审核并批准(IACUC-QC19024)遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

NBP 注射液浓度 5 mg/mL(石药集团恩必普药业有限公司);兔单克隆抗体 SYN、兔多克隆抗体 PSD-95、 β -actin(美国 abcam 公司,货号分别为 ab32127、ab18258、ab21058);二抗羊抗兔(中国中杉

金桥公司, ZB-2301)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及给药处理

将 20 只 db/db 小鼠采用随机数字表法分为模型组、低、中、高剂量 NBP 治疗组, 以上每组数量均为 5 只。适应性喂养一周后, NBP 注射液按照 20、40、60 mg/(kg·d) 分别注射给低、中、高剂量治疗组; 同窝对照组 5 只(正常组)和模型组给予同等体积的生理盐水腹腔注射, 以上各组处理均为 6 周。每周进行一次体重测量以及空腹尾静脉血糖测量。

1.3.2 小鼠学习和空间记忆能力检测

Morris 水迷宫实验测试期: 将小鼠分别从三个象限头朝池壁放入水迷宫, 自由游行, 计时 60 s, 期间找到平台时追踪器自动停止计时, 记录时间为逃逸潜伏期, 超过 60 s 的记录为 60 s, 将小鼠引导至平台停留 15 s; 每个象限实验间隔 20 min 后再进行下一个象限, 共训练 5 d; 探索期: 第 6 天撤除平台, 将四小鼠从第二象限放入池中, 记录 60 s 小鼠穿越平台区的次数^[9]。

1.3.3 实验取材

水迷宫实验结束后解剖取材, 每组选取 3 只小鼠迅速剪下头颅, 迅速取出海马置于冻存管于液氮中, 置于-80℃冰箱中冻存。两只小鼠用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)灌注, 多聚甲醛灌注后取出海马置于 4% 多聚甲醛, 用于电镜观察。

1.3.4 Western blot 检测小鼠海马组织 SYN、PSD-95 蛋白表达量

取出冻存海马称量, 提取总蛋白; BCA 试剂盒测量蛋白浓度, 配平后在沸水中煮 5 min; 取 20 μg 的蛋白进行凝胶电泳, 湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上; 配 5% 的奶粉封闭 1 h 后, 分别加 SYN、

PSD-95, β-tubulin 一抗 4℃ 过夜; 羊抗兔二抗孵育 1 h; 加 ECL 发光液后于凝胶成像, 检测条带灰度值并分析。

1.3.5 透射电镜观察海马区线粒体结构变化

将剥离出的海马组织置于 4% 多聚甲醛, 其后标本采用不同浓度梯度乙醇进行脱水处理, 经环氧树脂包埋后修块, 采用柠檬酸铅染色制片后于透射电镜下观察^[10]。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 计量数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较行双因素方差分析, 两两比较应用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

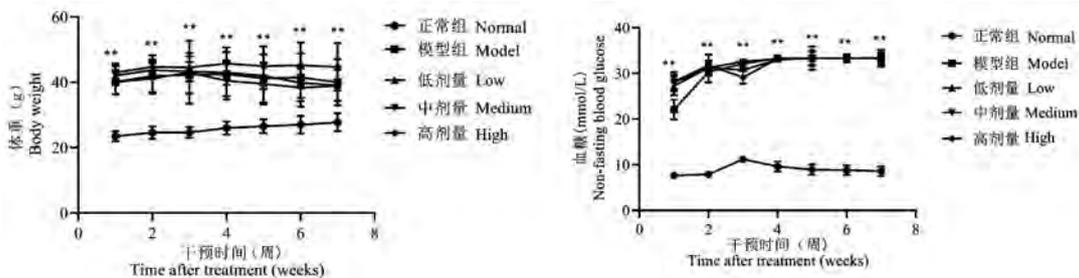
2 结果

2.1 NBP 对 db/db 小鼠体重和血糖变化无显著差异

各组与正常组相比, 模型组和各个治疗组小鼠血糖及体重明显升高, 差异有统计学意义(*P*<0.01); 模型组与各个治疗组以及组间体重跟血糖比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。(图 1)

2.2 NBP 改善了 db/db 小鼠空间学习与记忆能力的障碍

模型组与正常组相比, 水迷宫逃逸潜伏时间显著增加, 穿越平台次数显著减少, *P*<0.01, 说明 13 周龄时 db/db 小鼠相对于正常组小鼠已经出现严重认知障碍, 糖尿病认知障碍模型造模成功; 各剂量 NBP 治疗组与模型组相比, 低剂量治疗组逃逸潜伏时间下降, 穿越平台的次数提高, *P*<0.05; 中剂量治疗组小鼠逃逸潜伏期相对与模型组有改善, *P*<0.05, 且改善效果比低剂量要好; 高剂量治疗组相对于模型组小鼠逃逸潜伏期下降, *P*<0.05, 且效果



注: 与正常组相比, ** *P*<0.01; 与模型组相比, 各治疗组, *P*>0.05。

图 1 各组小鼠体重(a)、血糖(b)比较($\bar{x} \pm s$)

Note. Compared to the normal group, ** *P*<0.01. Compared with model group, each treatment group, *P*>0.05.

Figure 1 Comparison of body weight (a) and blood glucose (b) in each group

优于低剂量和中剂量治疗组。(图 2)

2.3 NBP 缓解了 db/db 小鼠海马组织中 SYN、PSD-95 蛋白表达量的下降

模型组与正常组相比,海马中 SYN 与 PSD-95 蛋白相对表达含量显著降低($P < 0.01$);各治疗组与模型组相比,海马中 SYN 与 PSD-95 蛋白相对表达含量均有所提高($P < 0.05$),且高剂量 NBP 治疗组效果较低剂量组、中剂量组好。(图 3)

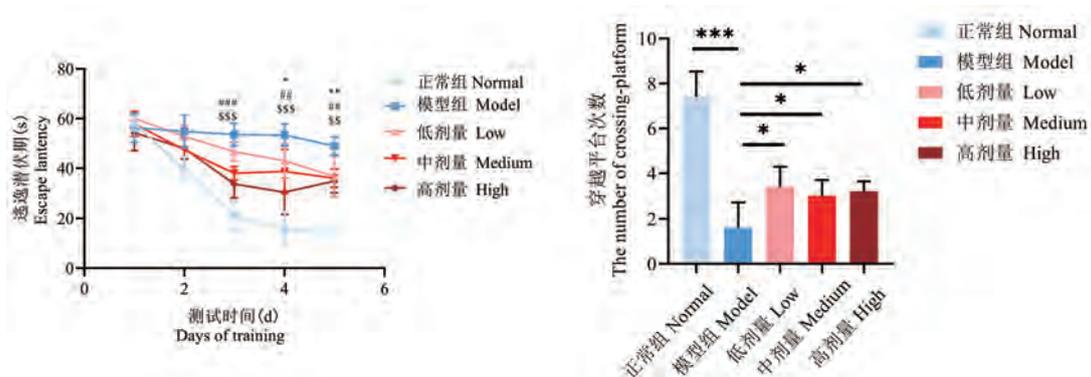
2.4 NBP 降低了 db/db 小鼠海马区线粒体结构的损伤

正常组的线粒体结构正常,多呈椭圆形,嵴结构清晰并且排列紧密,膜结构完整;模型组线粒体受损,嵴结构稀疏,融合,膜结构损坏,逐渐空泡化,

且体积在同样倍数下显著增大;各剂量治疗组海马线粒体大部分结构完整,嵴结构有少量破坏,但相对与模型组要正常,膜结构也相对组完整。(图 4)

3 讨论

2017 年我国糖尿病患者已达到 1.14 亿,成为全球患病人数最多的国家^[11]。糖尿病并发症影响肾、视网膜、神经和心血管系统,是糖尿病发病和死亡的主要原因^[12]。然而糖尿病发展到后期,患者不只是会出现以上并发症,也会产生认知功能的损伤,主要表现在学习记忆能力的下降^[13]。目前临床治疗糖尿病措施主要是胰岛素注射和口服降糖药,不能解决糖尿病患者后期出现的认知功能损伤。

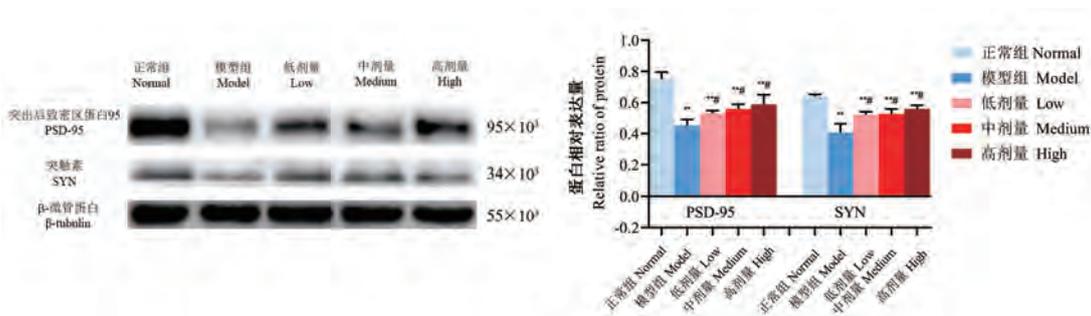


注:a;逃逸潜伏期。与模型组相比,低剂量组 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;中剂量组, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;高剂量组, §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$ 。b;穿台次数。与正常组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠水迷宫实验学习记忆成绩比较 ($\bar{x} \pm s$)

Note. a, Escape latency. Compared with Model group, Low group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Medium group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. High group, §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$. b, The number of crossing-platform. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 Results of learning and memory in water maze experiment were compared among all groups

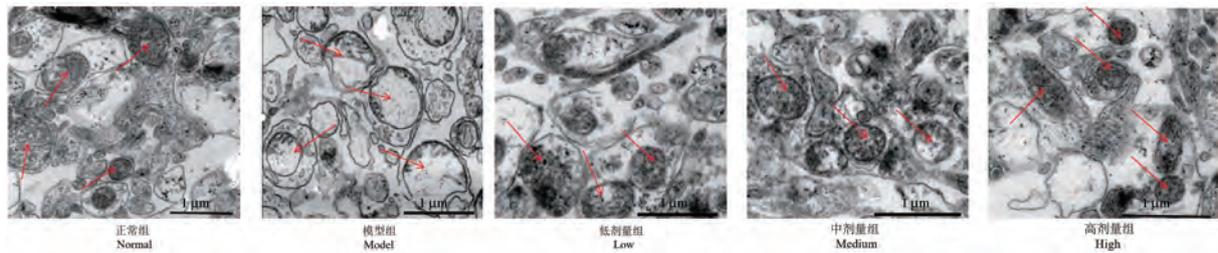


注:与正常组相比, ** $P < 0.01$;与模型组相比,各治疗组, # $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠海马 PSD-95、SYN 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Note. Compared with normal group ** $P < 0.01$. Compared with model group, each treatment group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Comparison of the expressions of PSD-95 and SYN in the hippocampus of mice in each group



注:红色箭头表示线粒体结构。

图 4 各组小鼠海马线粒体结构电镜图

Note. The red arrows indicate the mitochondrial structure.

Figure 4 Electron micrograph of mitochondrial structure in hippocampus of mice of each group

NBP 是我国已批准用于治疗缺血性脑卒中的合成化合物,主要从芹菜籽中提取。它具有多种生物学作用,最主要是临床上用于改善脑梗死的预后^[14],有研究表明 NBP 能抑制神经元凋亡,具有神经保护作用^[15],具有抗氧化和减轻线粒体功能障碍的神经保护作用^[16]。本研究发现 db/db 小鼠在第 13 周检测时认知功能已经严重受损,表现为 db/db 小鼠与对照组相比,水迷宫潜伏明显延长,测试期穿越平台次数显著下降。

SYN、PSD-95 能影响突触的结构和功能,是研究突触的重要指标^[17],PSD-95 作为重要的骨架蛋白,是突触敏感的结构指标^[18],PSD-95 的表达减少说明突出后致密物质变薄,突触活性降低,最终导致突触传导发生障碍^[19]。SYN 是突触小泡上的膜蛋白,与神经递质的释放,突触形成及突触小泡上离子通道密切相关,是突触功能的标志蛋白^[20]。SYN 可以通过调节轴突和树突的分化和生长,影响突触结构^[13],SYN 常用来检测突触的密度和分布,其数量减少表明突触数量减少,囊泡减少,从而影响神经递质的释放,影响信号传导^[21]。突触承担了传递信号的重要作用,认知障碍可能是由突触功能障碍引起的,神经退行性变的认知障碍会发生明显的广泛突触丢失^[22],SYN、PSD-95 能显著影响突触的结构和功能,故本研究检测 SYN、PSD-95 的表达情况来观察糖尿病认知障碍是否与突触相关蛋白有联系。实验检测发现模型组 SYN、PSD-95 的表达量相对于正常组严重降低,而 NBP 治疗组相对于模型组蛋白表达量的下降有所改善。

线粒体是体内最重要的能源中心,90%的三磷酸腺苷(ATP)由线粒体提供^[23]。线粒体结构和功能的改变,是细胞程序化死亡的关键性环节。糖尿病小鼠体内由于长期的高血糖而产生氧化损伤,导致线粒体结构的氧化损伤,膜结构破坏,线粒体

DNA 破坏,进而造成线粒体功能异常,ATP 含量降低^[24]。有研究表明线粒体内产生的 ROS 增多可将自身作为首要靶目标导致线粒体损伤,包括对呼吸链及内外膜及基质蛋白的影响,导致 ROS 产生更多,ATP 合成减少,进而线粒体膜通透性改变启动线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡的发生^[25]。动物实验发现,NBP 能显著提高 Na^+/K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性,保证正常的线粒体膜电位,从而维持线粒体的结构和功能^[26],NBP 通过增强线粒体膜电位和增加线粒体呼吸链复合体 I-IV 和 ATPase 的活性来减轻线粒体功能障碍,NBP 改变了调节线粒体融合和分裂的蛋白质平衡^[16]。

本研究发现模型组以及给药组 db/db 小鼠的体重和血糖一直保持很高的水平,符合糖尿病指标。三个剂量的 NBP 治疗组对于 db/db 小鼠的血糖和体重无改善作用,原因可能是由于 NBP 不参与小鼠体内的糖代谢和脂代谢的过程。NBP 对于海马线粒体结构损伤有着很大的改善,对于海马 SYN、PSD-95 的表达降低有提高作用,NBP 可能通过改善线粒体结构损伤,从而改善脑部的能量供应,减少神经细胞的凋亡方面起作用,改善海马突触的神经递质释放以及传导功能等方面改善 db/db 小鼠的认知障碍,且不同剂量的 NBP 对 db/db 小鼠的认知改善效果不同,本研究区间内高剂量治疗组的改善效果优于低剂量跟中剂量组。

综上所述,我们的结果提示丁苯酞可能通过提高糖尿病小鼠海马内 SYN、PSD-95 的表达,改善海马突触的功能以及线粒体功能,从而改善了 db/db 小鼠的认知功能障碍。因此,本研究为丁苯酞改善糖尿病相关的认知功能损害提供了参考,可作为潜在治疗策略。

参考文献:

[1] Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications

- and therapeutics [J]. *Med Sci Monit*, 2006, 12(7): RA130-RA147.
- [2] Ma H, Jiang T, Tang W, et al. Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(16): 2161-2175.
- [3] Tian Z, Wang J, Xu M, et al. Resveratrol improves cognitive impairment by regulating apoptosis and synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1670-1677.
- [4] Wang S, Ma F, Huang L, et al. DL-3-n-butylphthalide (NBP): a promising therapeutic agent for ischemic stroke [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(5): 338-347.
- [5] 刘静. 针刺“长强”穴对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区突触素蛋白表达及神经元超微结构的影响 [D]. 福州:福建中医药大学, 2012.
- [6] 辛鑫. NMDA 受体 2B 亚型与 PSD-95 相关机制在伤害性刺激对小鼠认知功能影响中的作用研究 [D]. 北京:北京协和医学院, 2014.
- [7] 钱冰, 楼佳庆, 李斌斌, 等. AD 样大鼠模型海马内 PSD-95 表达与学习记忆变化的研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 2016, 32(2): 217-222.
- [8] 王嫚诗, 张玲, 秦川, 等. α -突触核蛋白 A53T 突变损伤小鼠认知功能 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 7-13.
- [9] 何磊, 陈军, 陈丽莉, 等. 应用 Morris 水迷宫实验评估银屑病对小鼠模型认知功能的影响 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2019, 52(11): 836-839.
- [10] 杨洋, 吴振宇, 林夏妃, 等. 七氟烷对衰老模型大鼠认知功能及海马超微结构的影响 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2019, 50(5): 689-694.
- [11] 中国糖尿病前期临床干预专家组. 中国糖尿病前期临床干预专家共识(征求意见稿) [J]. *药品评价*, 2019, 16(7): 3-12, 16.
- [12] Dahlström E, Sandholm N. Progress in defining the genetic basis of diabetic complications [J]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17(9): 80.
- [13] Black S, Kraemer K, Shah A, et al. Diabetes, depression, and cognition: a recursive cycle of cognitive dysfunction and glycemic dysregulation [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(11): 118.
- [14] 谢昊霖, 王莉梅, 韩铭, 等. 丁苯酞注射液对急性缺血性脑梗死患者神经功能影响的 Meta 分析 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 35(7): 492-498.
- [15] Chen J, Liu N, Wang X, et al. DL-3-n-butylphthalide inhibits phenytoin-induced neuronal apoptosis in rat hippocampus and cerebellum [J]. *J Integr Neurosci*, 2019, 18(3): 277-283.
- [16] Chen N, Zhou Z, Li J, et al. 3-n-butylphthalide exerts neuroprotective effects by enhancing anti-oxidation and attenuating mitochondrial dysfunction in an *in vitro* model of ischemic stroke [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4261-4271.
- [17] Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, et al. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses [J]. *J Neurocytol*, 1996, 25(12): 821-828.
- [18] Ferreira A, Chin LS, Li L, et al. Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development [J]. *Mol Med*, 1998, 4(1): 22-28.
- [19] Farias GG, Alfaro IE, Cerpa W, et al. Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(23): 15857-15866.
- [20] Cove J, Blinder P, Baranes D. Contacts among non-sister dendritic branches at bifurcations shape neighboring dendrites and pattern their synaptic inputs [J]. *Brain Res*, 2009, 1251: 30-41.
- [21] Xian X, Liu T, Yu J, et al. Presynaptic defects underlying impaired learning and memory function in lipoprotein lipase-deficient mice [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(14): 4681-4685.
- [22] Skaper SD, Faccil, Zusso M, et al. Synaptic plasticity, dementia and Alzheimer disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(3): 220-233.
- [23] Koch RE, Josefson CC, Hill GE. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2017, 92(3): 1459-1474.
- [24] 余玲玲. HSP22 抑制线粒体活性氧合成对抗高糖诱导内皮细胞损伤的机制研究 [D]. 南昌:南昌大学, 2019.
- [25] 张涛. SIRT1/PGC-1 α 对糖尿病小鼠足细胞线粒体氧化损伤与凋亡的影响及白藜芦醇的干预研究 [D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.
- [26] 董高翔, 冯亦璞. 丁基苯酞对局部脑缺血再灌注大鼠脑线粒体 ATPase, 抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响 [J]. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(1): 93-97.

[收稿日期] 2020-12-27

罗嘉慧,卢秋翰,李国萃,等. 保存条件对恒河猴 CD8⁺ T 细胞活性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 33-37.
Luo JH, Lu QH, Li GC, et al. Effects of storage conditions on the activity of CD8⁺ T cells in rhesus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 33-37.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.006

保存条件对恒河猴 CD8⁺ T 细胞活性的影响

罗嘉慧,卢秋翰,李国萃,张京京,丛喆*,魏强*

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

【摘要】 目的 通过细胞内细胞因子染色(intracellular cytokine staining, ICS)检测 CD8⁺ T 细胞反应强度,探究不同保存条件对 CD8⁺ T 细胞活性影响。方法 采集 9 只恒河猴外周血,分离外周血单个核细胞(PBMC),一部分新鲜细胞直接用于检测,剩余细胞冻存至-80℃和液氮,冻存 1 周和 1 年再用于检测,检测时用阳性刺激物进行刺激,流式分析活细胞比例,MIP-1β、TNF-α、IL-2、IFN-γ 四种细胞因子分泌情况和细胞脱粒标志物 CD107a 的表达情况。结果 随着冻存时间的增加,细胞存活率降低,且液氮冻存比-80℃冻存有更高的存活率。在细胞因子分泌和细胞脱粒标志物 CD107a 的表达情况中,冻存一年的细胞 MIP-1β、TNF-α 分泌量显著高于正常细胞,细胞状态发生了改变,冻存一周的细胞与新鲜细胞状态更为相近。结论 想要保持低的细胞死亡率和正常的 CD8⁺ T 细胞反应,应使用新鲜细胞或短期冻存的细胞进行测量 CD8⁺ T 细胞反应水平的实验。

【关键词】 细胞内细胞因子染色;CD8⁺T 细胞;细胞活性;恒河猴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0033-05

Effects of storage conditions on the activity of CD8⁺ T cells in rhesus monkeys

LUO Jiahui, LU Qiuhan, LI Guocui, ZHANG Jingjing, CONG Zhe*, WEI Qiang*

(Comparative Medicine Center, Peking Union College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Remerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To use intracellular cytokine staining to detect the intensity of the CD8⁺ T cell response and explore the effects of different storage conditions on CD8⁺ T cell activity. **Methods** Rhesus macaque peripheral blood was collected and peripheral blood mononuclear cells were separated. Some fresh cells were used directly for analysis and the remaining cells were frozen at -80℃ or in liquid nitrogen and used for analysis after 1 week or 1 year. A positive stimulus was applied and flow cytometry was used to analyze the proportion of living cells, secretion of MIP-1β, TNF-α, IL-2, and IFN-γ, and expression of cell degranulation marker CD107a. **Results** As the storage time was increased, the

【基金项目】 国家自然科学基金(81971944);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(2017-12M-1-014);十三五传染病科技重大专项(2017ZX10304402,2018ZX10101001,2018ZX10301103);基础医学学科建设项目——病原生物学。

【作者简介】 罗嘉慧(1995—),女,硕士研究生,研究方向:艾滋病潜伏库。E-mail:luojiahuilaw@163.com

【通信作者】 丛喆(1972—),女,副主任技师,研究方向:实验动物病毒学和模型研究。E-mail:congze@cnilas.org

魏强(1964—),男,研究员,博士生导师。研究方向:实验动物病毒学。E-mail:weiqiang0430@cnilas.org

* 共同通信作者

cell survival rate decreased, and liquid nitrogen freezing had a higher survival rate than freezing at -80°C . Secretion of MIP-1 β and TNF- α from cells cryopreserved for 1 year was significantly higher than that from normal cells and the cell status had changed. The status of cells frozen for 1 week was more similar to fresh cells. **Conclusions** To maintain low cell death and a normal CD8 $^{+}$ T cell response, fresh cells or short-term frozen cells should be used for experiments to measure the level of the CD8 $^{+}$ T cell response.

【Keywords】 CD8 $^{+}$ T cells; intracellular cytokine staining; cell viability; rhesus monkeys

CD8 $^{+}$ T 细胞在多种病毒感染性疾病的免疫控制中起着至关重要的作用,一般认为对病毒复制有更好控制能力的患者拥有更强的特异性 T 细胞应答,其 CD8 $^{+}$ T 细胞也具有更高的细胞因子生产能力^[1-4],但仍需要更多的相关研究来支持。CD8 $^{+}$ T 细胞活性测定对细胞功能评定直接相关。由于实验条件限定,通常情况下细胞及组织常冷冻(-80°C 、液氮等)保存^[5-6],冻存会对细胞的部分理化状态造成影响^[7],但在多大程度上影响细胞活性,缺乏实验依据。因此,通过实际样本测定,了解冻存对其活性的影响,有重要的实际应用意义,也为今后的细胞内细胞因子染色实验提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验动物

9 只 SPF 级中国恒河猴,4 只雌性,5 只雄性,年龄为 3~6 岁,体重约 4~5 kg,均购自北京协尔鑫生物资源研究所[SCXK(京)2015-0011]。实验前通过免疫荧光法筛查,排除猴疱疹病毒,猴逆转录 D 型病毒,猴免疫缺陷病毒及猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒。实验动物的饲养及实验操作在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全三级实验室进行[SYXK(京)2017-0027],实验进程遵循 3R 原则。本实验使用的实验动物程序通过了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(IACUC)的批准(XJ19006)。

1.2 主要试剂与仪器

Cell Stimulation Cocktail(500 \times)(Cat.00-4975)购自 eBioscience 公司;BD HorizonTM BV605 Mouse Anti-Human CD3 (Cat. 562994)、BD PharmingenTM FITC Mouse Anti-Human CD8 (Cat. 557085)、BD HorizonTM BV421 Mouse Anti-Human MIP-1 β (Cat. 562900)、BD HorizonTM PE-CF594 Mouse Anti-Human CD107a (Cat. 562628)、BD Cytotfix/CytopermTM BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (with BD GolgiStop) (Cat. 554715) 购自 BD Pharmingen 公司;Brilliant Violet 421TM anti-human IL-2 Antibody (Cat. 500328)、PE

anti-human TNF- α Antibody (Cat. 502909)、Zombie NIRTM Fixable Viability Kit (Cat.423106)、Brefeldin A (Cat. 420601)、Brilliant Violet 510TM anti-human IFN- γ Antibody (Cat. 502544) 购自 BioLegend 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样本采集和外周血单个核细胞制备

使用乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)采血管采集猴抗凝全血,使用 FicolI 淋巴细胞分离液分离外周血单核淋巴细胞,一部分新鲜细胞直接用于检测。一部分使用加入了 10% DMSO 的胎牛血清作为冻存液冻存于 -80°C 和液氮中。

1.3.2 细胞内细胞因子染色

淋巴细胞悬液加入 48 孔板中,每孔 1 mL,设阳性刺激组和阴性对照组。阳性刺激组加入 1 \times 阳性刺激物,阴性对照组只加培养基。1 h 后加入布雷菲德菌素 A (Brefeldin A),GolgiStop 和 CD107a 抗体,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中继续培养 5 h,收细胞进行流式数据分析^[8-12]。

收取细胞,使用细胞死活染料(Zombie NIRTM Fixable Viability Kit)将细胞在室温下染色 20 min。然后洗涤细胞并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用表面染色混合物染色 30 min。随后将 PBMC 洗涤 2 次,然后用固定/透化溶液 Fixation/Permeabilization solution 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定并透化 20 min。随后将细胞在用 1:10 稀释的 Perm/WashTM Buffer 中洗涤两次。然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用胞内染色混合物染色 30 min。洗涤后将细胞重悬于 1%多聚甲醛中,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下在黑暗中储存不超过 24 h 直至分析。

1.4 统计学方法

数据由 BD Arial II 流式细胞仪收集,从每个样品收集 30000 个淋巴细胞。采用 FlowJo 10 对多色流式细胞仪上机结果进行分析,使用 Graphpad 8 软件进行作图和统计分析,不同组数据间进行 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异界限。

2 结果

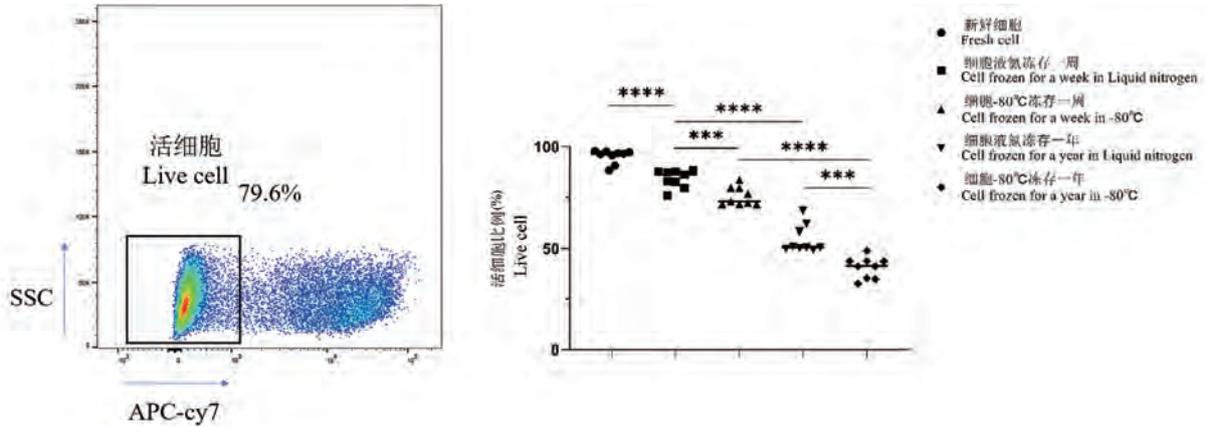
2.1 不同保存条件下细胞存活率

保存条件对细胞状态影响较大。新鲜分离的

PBMC 中活细胞占 (95.19±3.37)%，而经液氮冻存 1 周后，活细胞比例为 (84.23±4.35)%，冻存 1 年后，活细胞占 (54.43±6.79)%，显著低于经液氮冻存 1 周后的细胞 ($P<0.0001$)。-80℃ 冻存 1 周后活细胞比例为 (75.46±4.50)%，冻存 1 年后活细胞只占 (40.63±5.26)%，显著低于 -80℃ 冻存 1 周后的细胞 ($P<0.0001$) (图 1)。

2.2 阳性刺激物刺激淋巴细胞分泌细胞因子流式结果

以 CD8⁺ T 淋巴细胞群做为目的细胞，以同型对照为基准划十字门。使用 PMA 和离子霉素 Inomycin 做为阳性刺激物刺激培养新鲜细胞 6 h 后，细胞高表达 MIP-1β、IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 CD107a。见图 2。



注：与新鲜细胞比较，**** $P<0.0001$ ；与细胞液氮冻存一周比较，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ；与细胞 -80℃ 冻存一周比较，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ；与细胞液氮冻存一年比较，*** $P<0.001$ 。

图 1 不同保存条件下 PBMC 的存活率

Note. Comparing to fresh cells, **** $P<0.0001$. Comparing to cell frozen for a week in liquid nitrogen, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Comparing to cell frozen for a week in -80℃, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Comparing to cell frozen for a year in liquid nitrogen, *** $P<0.001$.

Figure 1 Survival rate of PBMC under different storage conditions

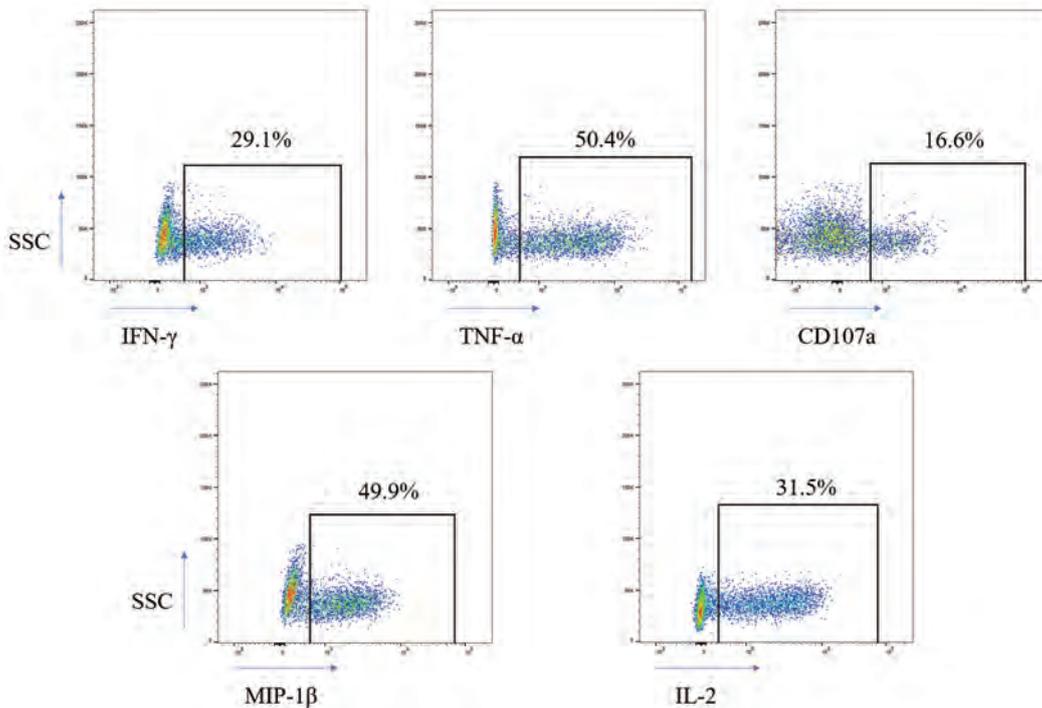


图 2 流式分析 CD8⁺ T 淋巴细胞胞内细胞因子表达情况

Figure 2 Flow cytometric analysis of intracellular cytokine expression in CD8⁺ T lymphocytes

2.3 不同保存条件下胞内细胞因子及细胞脱粒标志物表达结果

PMA 和离子霉素 Inomycin 做为阳性刺激物培养 PBMC 6 h 后,不同保存条件下胞内细胞因子及细胞脱粒标志物表达量如表 1 所示,在 MIP-1β 的表达中,新鲜细胞与冻存一周的细胞没有显著差异,但液氮冻存超过一年的细胞的表达量显著高于新鲜细胞($P<0.001$),液氮冻存一周的细胞与 80℃ 冻存一周的细胞没有显著差异,液氮冻存超过一年的细胞与 80℃ 冻存超过一年的细胞没有显著差异。在 IL-2 的表达中,各组别均无显著差异。在 IFN-γ 的表达中,新鲜细胞的表达量显著高于液氮冻存一

周的细胞($P<0.0001$),新鲜细胞与液氮冻存超过一年的细胞没有显著差异,液氮冻存一周的细胞与 80℃ 冻存一周的细胞没有显著差异,液氮冻存超过一年的细胞与 80℃ 冻存超过一年的细胞没有显著差异。在 TNF-α 的表达中,新鲜细胞与冻存一周的细胞没有显著差异,但液氮冻存超过一年的细胞的表达量显著高于新鲜细胞($P<0.0001$),液氮冻存一周的细胞与 80℃ 冻存一周的细胞没有显著差异,液氮冻存超过一年的细胞与 80℃ 冻存超过一年的细胞没有显著差异。在 CD107a 的表达中,各组别均无显著差异。(图 3)

表 1 不同保存条件下胞内细胞因子及细胞脱粒标志物表达量

Table 1 Expression of intracellular cytokines and cell degranulation markers under different storage conditions

细胞保存条件 Cell storage conditions	MIP-1β 表达量 (%) Expression of MIP-1β	IL-2 表达量 (%) Expression of IL-2	IFN-γ 表达量 (%) Expression of IFN-γ	TNF-α 表达量 (%) Expression of TNF-α	CD107a 表达量 (%) Expression of CD107a
新鲜细胞 Fresh cell	32.08±10.82	20.81±2.34	32.27±6.15	50.21±9.48	5.66±4.28
细胞液氮冻存 1 周 Cell frozen for a week in liquid nitrogen	27.00±4.15	24.96±6.37	22.13±1.57	46.89±5.30	4.30±2.09
细胞-80℃ 冻存 1 周 Cell frozen for a week in -80℃	35.31±10.64	24.34±6.52	24.07±2.88	50.89±13.00	4.34±1.15
细胞液氮冻存 1 年 Cell frozen for a year in Liquid nitrogen	60.24±14.72	21.90±8.31	30.72±8.71	76.01±9.26	3.33±1.49
细胞-80℃ 冻存 1 年 Cell frozen for a year in -80℃	60.20±15.93	18.98±7.88	25.87±6.33	79.61±8.98	2.47±0.70

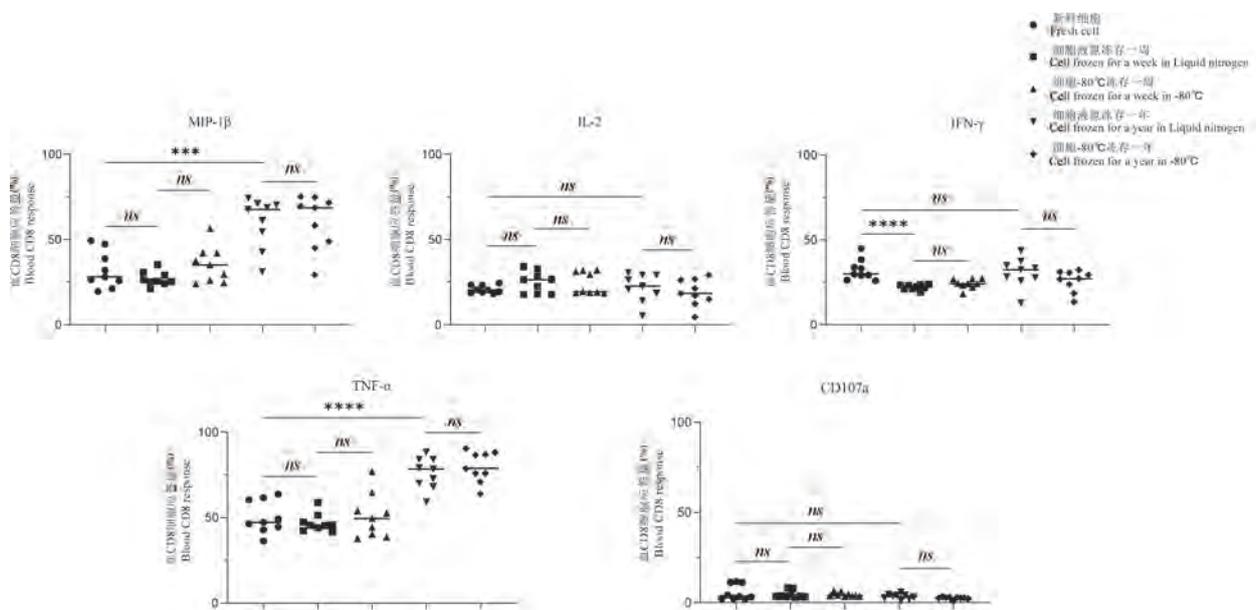


图 3 不同保存条件下胞内细胞因子及细胞脱粒标志物表达情况分析

Figure 3 Analysis of the expression of intracellular cytokines and cell degranulation markers under different storage conditions

3 讨论

近年来,越来越多的研究支持血液 CD8⁺ T 细胞反应与多种病毒感染性疾病控制有着密切的关系, CD8⁺ T 细胞主要通过分泌细胞毒性颗粒和细胞因子来发挥其效应功能,因此同时选取 CD8⁺ T 细胞的细胞脱粒标志物及 4 种细胞因子(CD107a, IFN- γ , MIP-1 β , TNF- α 和 IL-2)的分泌量来评估 CD8⁺ T 细胞反应的水平,是现在较多采用的一种方法^[2-13]。现今部分测量 CD8⁺ T 细胞反应水平的实验使用新鲜的细胞^[14-15],但是由于实验安排的不同,大部分测量 CD8⁺ T 细胞反应水平的实验都需要用到冻存细胞^[11],但是,在不同条件下,冻存会多大程度上影响细胞活性,缺乏确切的实验依据,实验样本的冻存条件对实验结果的影响尚未得到评估。

本实验在保证冻存液的成分,血细胞的分离条件、细胞复苏的过程等变量条件一致的情况下,探究冻存条件对恒河猴 CD8⁺ T 细胞活性的影响。结果发现不同冻存条件对细胞存活率影响较大,细胞存活率因冻存而衰减,冻存时间越长,冻存温度越高,细胞死亡率越高。不同冻存条件的细胞因子及细胞脱粒标志物的表达量也不同,总体来说,短时间冻存的细胞反应水平与新鲜细胞最为接近,而长时间冻存的细胞,在 MIP-1 β 和 TNF- α 的表达量上与新鲜细胞有显著的差异。由于本实验采集自恒河猴实验样本,数量受限,未做样本差异分析,条件允许时,尽量采集足量样本,并排除因样本差异造成可能的影响。因此为了保持正常的 CD8⁺ T 细胞反应和高的细胞存活率,应使用新鲜细胞或短期冻存的细胞进行测量 CD8⁺ T 细胞反应水平的实验,而在测定长期保存标本中,也应充分了解活性因冻存而有所变化。

参考文献:

- [1] Collins DR, Gaiha GD, Walker BD. CD8⁺ T cells in HIV control, cure and prevention [J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(8): 471-482.
- [2] Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells [J]. Blood, 2006, 107(12): 4781-4789.
- [3] O'Connell KA, Bailey JR, Blankson JN. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV - 1 infection [J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(12): 631-637.
- [4] Mylvaganam G, Yanez AG, Maus M, et al. Toward T cell mediated control or elimination of HIV reservoirs: lessons from cancer immunology [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2109.
- [5] Rezazadeh H, Astaneh M, Tehrani M, et al. Blockade of PD-1 and TIM-3 immune checkpoints fails to restore the function of exhausted CD8⁺ T cells in early clinical stages of chronic lymphocytic leukemia [J]. Immunol Res, 2020, 68(5): 269-279.
- [6] Kiniry BE, Hunt PW, Hecht FM, et al. Differential expression of CD8⁺ T cell cytotoxic effector molecules in blood and gastrointestinal mucosa in HIV - 1 Infection [J]. J Immunol, 2018, 200(5): 1876-1888.
- [7] 魏天雪, 于鸿, 何春莹, 等. 流式细胞术分析比较癌症患者新鲜和冻存复苏后外周血淋巴细胞亚群的实验研究[J]. 中国现代医生, 2015, 53(29): 29-31, 35.
- [8] Shacklett BL, Critchfield JW, Lemongello D. Isolating mucosal lymphocytes from biopsy tissue for cellular immunology assays [J]. Methods Mol Biol, 2009, 485: 347-356.
- [9] Payne TL, Blackinton J, Frisbee A, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of cytokine gene expression in HIV-1 antigen-specific CD8⁺ T cells that mediate virus inhibition [J]. J Virol, 2014, 88(17): 9514-9528.
- [10] Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, et al. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control [J]. Blood, 2009, 113(17): 3978-3989.
- [11] Nguyen S, Deleage C, Darko S, et al. Elite control of HIV is associated with distinct functional and transcriptional signatures in lymphoid tissue CD8⁺ T cells [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(523): 4077.
- [12] 吴芳新, 王卫, 丛喆, 等. 艾滋病猴特异性细胞免疫的胞内细胞因子检测方法优化与应用 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1): 18-23.
- [13] Wu CS, Chyuan IT, Chiu YL, et al. Preserved specific anti-viral T-cell response but associated with decreased lupus activity in SLE patients with cytomegalovirus infection [J]. Rheumatology (Oxford), 2020, 59(11): 3340-3349.
- [14] Hersperger AR, Martin JN, Shin LY, et al. Increased HIV-specific CD8⁺ T cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression [J]. Blood, 2011, 117(14): 3799-3808.
- [15] Côté SC, Burke Schinkel SC, Berthoud TK, et al. IL-7 induces sCD127 release and mCD127 downregulation in human CD8⁺ T cells by distinct yet overlapping mechanisms, both of which are impaired in HIV infection [J]. Eur J Immunol, 2020, 50(10): 1537-1549.

[收稿日期]2021-01-08

王奕丹,张磊,王建楠,等. FTY720对卒中后抑郁大鼠单胺类神经递质影响的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 38-43.

Wang YD, Zhang L, Wang JN, et al. Effects of FTY720 on monoamine neurotransmitters in rats with post-stroke depression [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 38-43.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.007

FTY720对卒中后抑郁大鼠单胺类神经递质影响的实验研究

王奕丹¹, 张磊², 王建楠¹, 伍慧茹¹, 张玲¹, 杨洋¹, 隋汝波^{1*}

(1. 锦州医科大学附属第一医院神经内科, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州医科大学护理学院, 辽宁 锦州 121000)

【摘要】 目的 探究芬戈莫德(Fingolimod, FTY720)对卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)大鼠行为学及单胺类神经递质的干预作用。方法 50只雄性SD大鼠随机分为假手术组、卒中组、PSD组、氟西汀(Fluoxetine, FLU)组及FLU联合FTY720治疗组。采取大脑中动脉线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,联合慢性不可预见的温和性应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)及孤养法制备PSD大鼠模型。在应激第1、8、15、22、29天评估各组大鼠行为学指标,第29天处死大鼠,测定各组大鼠海马中单胺类神经递质的含量及单胺类神经递质合成限速酶的表达。结果 与假手术组及卒中组比较,PSD组大鼠同一时间点旷野实验得分、蔗糖水消耗比例显著减少($P < 0.05$);海马中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、多巴胺(dopamine, DA)含量显著降低($P < 0.05$);色氨酸羟化酶2(tryptophan hydroxylase2, TPH2)mRNA、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)mRNA的表达下降($P < 0.05$)。与PSD组比较,氟西汀组及联合治疗组大鼠同一时间点旷野实验得分、蔗糖水消耗比例升高($P < 0.05$);海马中5-HT、NE、DA含量升高($P < 0.05$);TPH2 mRNA、TH mRNA的表达上调($P < 0.05$)。两组间进一步比较发现联合治疗组治疗效果更为显著,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 FTY720对PSD大鼠的抑郁样行为具有改善作用,而这种作用与提高单胺类神经递质的水平有关。

【关键词】 卒中后抑郁;芬戈莫德;单胺类神经递质;海马

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0038-06

Effects of FTY720 on monoamine neurotransmitters in rats with post-stroke depression

WANG Yidan¹, ZHANG Lei², WANG Jiannan¹, WU Huiru¹, ZHANG Ling¹, YANG Yang¹, SUI Rubo^{1*}

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China.

2. Department of Nursing, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of FTY720 on the behavior and monoamine neurotransmitters of post-stroke depression rats. **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into sham operation, stroke, PSD, FLU, and FLU+FTY720 groups ($n = 10$ each). The middle cerebral artery thread embolization method was used to establish a focal

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81371461, 81241050);辽宁省教育厅科技项目(JYTJCZR201903);辽宁省科学技术计划项目(2019-ZD-0802)。

【作者简介】 王奕丹(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:脑卒中与卒中后抑郁的临床及基础研究。E-mail:952478216@qq.com

【通信作者】 隋汝波(1971—),男,教授,博士,博士研究生导师,研究方向:脑血管疾病及其并发症的临床与基础研究。

E-mail:srb0416@163.com

cerebral ischemia rat model. The PSD rat model was established by combining chronic unpredictable mild stress and isolation method. At 1, 8, 15, 22, and 29 days of stimulation, the behavioral indexes of rats in each group were evaluated. The rats were sacrificed on day 29 and the content of monoamine neurotransmitters and expression of the rate-limiting enzyme of monoamine neurotransmitter synthesis in the hippocampus of rats in each group were analyzed. **Results** Compared with sham operation and stroke groups, the open field test score and volume ratio of sucrose water consumption of the PSD group were significantly reduced at the same time points ($P < 0.05$). Levels of 5-HT, NE, and DA were significantly reduced in the hippocampus ($P < 0.05$). Expression of TPH2 and TH mRNAs was decreased in the hippocampus ($P < 0.05$). Compared with the PSD group, the open field test score and volume ratio of sucrose water consumption of FLU and FLU+FTY720 groups were increased at the same time points ($P < 0.05$). Levels of 5-HT, NE, and DA were increased in the hippocampus ($P < 0.05$). Expression of TPH2 and TH mRNAs was upregulated in hippocampus ($P < 0.05$). **Conclusions** FTY720 improves the depression-like behavior of PSD rats and its effect is related to increasing the levels of monoamine neurotransmitters.

【Keywords】 post-stroke depression; fingolimod; monoamine neurotransmitters; hippocampus

PSD 是脑卒中后出现的一类情感障碍性疾病,增加了患者的致残率及死亡率^[1-2]。然而,其发病机制尚不明,有多种学说并存^[3],其中单胺类神经递质学说最具代表性。然而,目前单纯补充单胺类神经递质的药物(如选择性 5-HT 再摄取抑制剂,SSRIs)对 PSD 患者疗效欠佳,且存在起效慢、毒副作用大、复发率高等问题^[4],因此为 PSD 寻找新的治疗药物势在必行。

经临床观察发现,患有风湿类疾病的 PSD 患者在应用免疫抑制剂后可改善 PSD 样表现。并且有研究显示,卒中后激活的免疫炎症反应使吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)和下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA)过度表达^[5],最终导致单胺类神经递质的耗竭^[6]。因此可以猜测,抗炎可能会提高单胺类神经递质的水平,进而改善 PSD 样表现。为此本实验选用免疫抑制剂 FTY720 进行干预,采用行为学、分子学及基因学等实验方法证实 FTY720 可改善 PSD 大鼠的抑郁行为,提高单胺类神经递质的水平。本研究将为 PSD 的治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,雄性,6~7 周龄,体重(200 ± 20)g,购自锦州医科大学动物实验中心[SCXK(辽)2017-0006]。饲养于锦州医科大学 SPF 动物实验中心[SYXK(辽)2019-0007]。动物实验研究由锦州医科大学审批(IACUC 2019007),按照实验动物使用的 3R 原则予以人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

FTY720 源自美国 Sigma 公司,CAS:162359-56

-0;盐酸氟西汀胶囊,礼来(苏州)制药有限公司,国药准字 J20170022;ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司,5-HT 批号:L190408615,NE 批号:L190501419,DA 批号:L190402208);酶标仪(批号:ELX-800,美国 BIOTEK 公司);荧光定量 PCR 仪(批号:Exicycler 96,韩国 BIONEER 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型建立

大鼠适应性饲养 1 周后行旷野实验,选取评分相近的 60 只大鼠随机分为假手术组($n=10$)和模型组($n=50$)。假手术组除颈总动脉不插入栓线外,余操作相同。模型组大鼠参照 Zealanga 线栓法^[7]制备大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。术后 24 h 行 Zealanga 神经行为学评分,选取评分 1~3 分的大鼠入组^[7-8]。将 MCAO 模型制备成功的大鼠再随机分为卒中组($n=10$)、PSD 组($n=10$)、FLU 组($n=10$)及联合治疗组($n=10$)。其中 PSD 组、FLU 组及联合治疗组大鼠在 MCAO 术后第 3 天单笼饲养并加以 Willner 等^[9]和 Katz 等^[10]方法改良的慢性不可预知的温和性刺激(CUMS),包括:①禁食禁水 20 h;②禁水 17 h;③潮湿垫料 21 h;④45°倾斜鼠笼 17 h;⑤行为限制 2 h;⑥持续照明 17 h;⑦4℃冰浴游泳 5 min;⑧水平震荡鼠笼 5 min;⑨夹尾 1 min,每日随机采取一种刺激方式,持续 28 d。

1.3.2 给药剂量及方法

治疗组于慢性应激刺激第 1 天时腹腔注射给药。FLU 组:盐酸氟西汀溶液(5 mg/kg),联合治疗组:盐酸氟西汀溶液(5 mg/kg)+FTY720(1 mg/kg)。假手术组、卒中组、PSD 组予等体积去离子水。

1.3.3 行为学指标测定

(1)旷野实验:参照 Papp 等方法^[11]制黑壁白底 80 cm×80 cm×50 cm 无盖纸箱,底部分为 25 个等格,将大鼠置于中央格内,待大鼠从中央格启动后记录,以穿越底面格数为水平运动得分,1 格计 1 分,以直立次数为垂直运动得分,动物双足离开底面,无论站立多长时间直至双足放下计 1 分,每次记录 5 min。

(2)蔗糖水消耗实验:参照 Willner 等方法^[9],实验前训练大鼠饮用 1%蔗糖水。大鼠禁食水 20 h 后,给予 1 瓶 1%蔗糖水和 1 瓶蒸馏水,1 h 后取出,测定大鼠蔗糖水消耗量与总液体消耗量比值。

1.3.4 ELISA 法检测大鼠海马中 5-HT、NE、DA 含量

大鼠于末次行为学指标测定后断头取脑,冰上分离海马组织,放入匀浆器中,加入生理盐水在冰浴中磨成匀浆液,离心 20 min 后取上清。按 ELISA 试剂盒说明书操作,测定 5-HT、NE、DA 含量。

1.3.5 Real-time PCR 法检测大鼠海马中 TPH2 mRNA、TH mRNA 的表达

取适量海马组织根据试剂盒说明书提取样本 RNA,进行逆转录得到 cDNA 样本后用 TPH、TH 的特异性引物进行荧光定量 PCR 扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行荧光定量分析。引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 20.0 进行分析。计量资料符合正态性分布和方差齐性,不同组别间对比采用方差分析,同时分析时间和组别关系时采用重复测量方差分析,两两对比采用 LSD-*t* 检验,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 旷野实验

(1)水平运动得分

第 1 天时,造模的四组大鼠与假手术组大鼠相比水平运动次数减少($P < 0.05$)。第 15、22、29 天时,与假手术组、卒中组比较,PSD 组大鼠水平运动次数逐渐减少($P < 0.05$);与 PSD 组比,FLU 组与联合治疗组大鼠水平运动次数显著增加($P < 0.05$);二者组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$) (见表 2)。

(2)垂直运动得分

第 1 天时,造模的四组大鼠与假手术组大鼠相比垂直运动次数减少($P < 0.05$)。第 15、22、29 天时,与假手术组、卒中组比较,PSD 组大鼠垂直运动次数明显减少($P < 0.05$);与 PSD 组比较,FLU 组与联合治疗组大鼠垂直运动次数增加($P < 0.05$);二者组间比较差异显著($P < 0.05$) (见表 3)。

(3)中央格停留时间

第 1 天时,各组大鼠中央格停留时间无统计学差异($P > 0.05$)。第 8、15、22、29 天时,与假手术组、卒中组比较,PSD 组大鼠中央格停留时间逐渐延长($P < 0.05$);与 PSD 组比较,FLU 组与联合治疗组大鼠中央格停留时间缩短($P < 0.05$);二者组间比较差异显著($P < 0.05$) (见表 4)。

2.2 蔗糖水消耗实验

第 1 天时,造模的四组大鼠与假手术组大鼠相比蔗糖水消耗比例降低($P < 0.05$)。第 8、15、22、29 天时,与假手术组、卒中组比较,PSD 组大鼠蔗糖水

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

基因 Genes	上游引物(5'-3') Upstream primers	下游引物(5'-3') Downstream primers
TPH2	GGAGCAGGGTTACTTTCC	AGGTGCTGATTAGGCATT
TH	CAGTCTCCAGGACATTG	GCACCATAAGCCTTCAGC

表 2 各组大鼠水平运动得分比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Comparisons of horizontal movement scores of rats in each group

组别 Groups	水平运动得分(分) Horizontal movement score(score)				
	1 天 1 d	8 天 8 d	15 天 15 d	22 天 22 d	29 天 29 d
假手术组 Sham operation group	45±4.4	50.3±5.79	63.2±6.09	68±4.67	72.1±6.01
卒中组 Stroke group	39.1±4.77*	48±5.46	60.3±3.77	65.8±5.61	70±5.25
PSD 组 PSD group	38±4.32*	35.1±4.82**	31.8±5.81**	28.2±5.27**	25±4.85**
氟西汀组 Fluoxetine group	38.2±3.82*	44.8±2.53●	51.9±4.48●	57.7±5.93●	60.9±4.7●
联合治疗组 FLU+FTY720 group	38.1±4.51*	45.1±2.47●	56.5±3.14●△	65±5.08●△	67.1±4.86●△

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与卒中组比较,# $P < 0.05$;与 PSD 组比较,● $P < 0.05$;与 FLU 组比较,△ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the stroke group, # $P < 0.05$. Compared with the PSD group, ● $P < 0.05$. Compared with the FLU group, △ $P < 0.05$.

消耗比例明显下降 ($P < 0.05$); 与 PSD 组比较, FLU 组与联合治疗组大鼠蔗糖水消耗比例升高 ($P < 0.05$); 二者组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 5)。

2.3 海马中 5-HT、NE、DA 含量

与假手术组、卒中组比较, PSD 组大鼠海马中 5-HT、NE、DA 的含量显著降低 ($P < 0.05$); 与 PSD 组比较, FLU 组与联合治疗组大鼠海马中 5-HT、NE、DA 的含量升高 ($P < 0.05$); 二者组间比较差异显著 ($P < 0.05$) (见图 1)。

2.4 海马中 TPH2 mRNA、TH mRNA 表达

与假手术组、卒中组比较, PSD 组大鼠海马中 TPH2 mRNA、TH mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 PSD 组比较, FLU 组与联合治疗组大鼠海马中 TPH mRNA、TH mRNA 的表达量均升高 ($P < 0.05$); 二者组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2)。

3 讨论

PSD 是脑卒中后最常见的情绪障碍, 是危害社会和公共卫生的严重问题。然而目前针对 PSD 的治疗药物较少且具有局限性, 因此为 PSD 探索新的治疗途径至关重要。

表 3 各组大鼠垂直运动得分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Comparisons of vertical movement scores of rats in each group

组别 Groups	垂直运动得分(分) Vertical movement score(score)				
	1 天 1 d	8 天 8 d	15 天 15 d	22 天 22 d	29 天 29 d
	假手术组 Sham operation group	12.1 ± 3.73	14.1 ± 3.64	16.1 ± 2.92	17 ± 2.79
卒中组 Stroke group	8.5 ± 2.84*	13 ± 3.3	14.9 ± 3.25	15.6 ± 3.1	16.1 ± 2.69
PSD 组 PSD group	8 ± 1.94*	7.6 ± 2.55*#	7 ± 2.31*#	6 ± 2.36*#	5.2 ± 1.87*#
氟西汀组 Fluoxetine group	8.2 ± 1.93*	11.1 ± 1.91●	12 ± 2.58●	12.5 ± 2.59●	13.5 ± 2.64●
联合治疗组 FLU+FTY720 group	8.1 ± 2.03*	11.3 ± 2.21●	14.5 ± 1.43●△	15.0 ± 2.31●△	16.4 ± 3.72●△

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与卒中组比较, # $P < 0.05$; 与 PSD 组比较, ● $P < 0.05$; 与 FLU 组比较, △ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the stroke group, # $P < 0.05$. Compared with the PSD group, ● $P < 0.05$. Compared with the FLU group, △ $P < 0.05$.

表 4 各组大鼠中央格停留时间比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Comparisons of central grid stay time of rats in each group

组别 Groups	中央格停留时间(s) Central grid stay time				
	1 天 1 d	8 天 8 d	15 天 15 d	22 天 22 d	29 天 29 d
	假手术组 Sham operation group	0.81 ± 0.47	1.02 ± 0.36	1.81 ± 0.4	4.52 ± 0.56
卒中组 Stroke group	0.81 ± 0.42	0.93 ± 0.38	1.93 ± 0.65	5.2 ± 0.58	7 ± 1.06
PSD 组 PSD group	0.9 ± 0.37	4.02 ± 0.8*#	7.07 ± 0.89*#	12.18 ± 0.93*#	14.03 ± 1.17*#
氟西汀组 Fluoxetine group	0.89 ± 0.37	2.4 ± 0.65●	4.5 ± 0.78●	8.82 ± 0.91●	11.05 ± 1.11●
联合治疗组 FLU+FTY720 group	0.81 ± 0.43	0.95 ± 0.38●△	2 ± 0.65●△	5.71 ± 0.82●△	8.5 ± 0.97●△

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与卒中组比较, # $P < 0.05$; 与 PSD 组比较, ● $P < 0.05$; 与 FLU 组比较, △ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the stroke group, # $P < 0.05$. Compared with the PSD group, ● $P < 0.05$. Compared with the FLU group, △ $P < 0.05$.

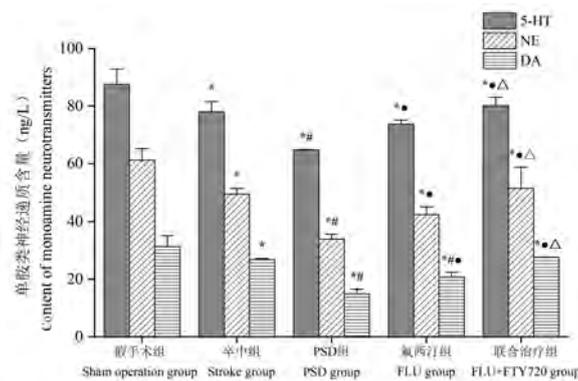
表 5 各组大鼠蔗糖水消耗比例比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Comparisons of volume ratio of sucrose water consumption of rats in each group

组别 Groups	蔗糖水消耗比例(%) Volume ratio of sucrose water consumption				
	1 天 1 d	8 天 8 d	15 天 15 d	22 天 22 d	29 天 29 d
	假手术组 Sham operation group	66 ± 13.78	69.6 ± 10.56	75.3 ± 12.53	84.3 ± 15.71
卒中组 Stroke group	53.7 ± 10.14*	63.3 ± 13.38	69.6 ± 12.15	79.5 ± 14.85	83.7 ± 14.24
PSD 组 PSD group	52.5 ± 11.94*	46.5 ± 12.43*#	42.6 ± 8.46*#	36.9 ± 8.95*#	31.2 ± 8.85*#
氟西汀组 Fluoxetine group	51 ± 12.33*	57 ± 10.77●	61.5 ± 11.94●	65.4 ± 14.82●	69 ± 17.49●
联合治疗组 FLU+FTY720 group	54 ± 13.42*	67.5 ± 5.52●△	72.3 ± 11.53●△	78 ± 10.95●△	82.5 ± 13.87●△

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与卒中组比较, # $P < 0.05$; 与 PSD 组比较, ● $P < 0.05$; 与 FLU 组比较, △ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the stroke group, # $P < 0.05$. Compared with the PSD group, ● $P < 0.05$. Compared with the FLU group, △ $P < 0.05$.

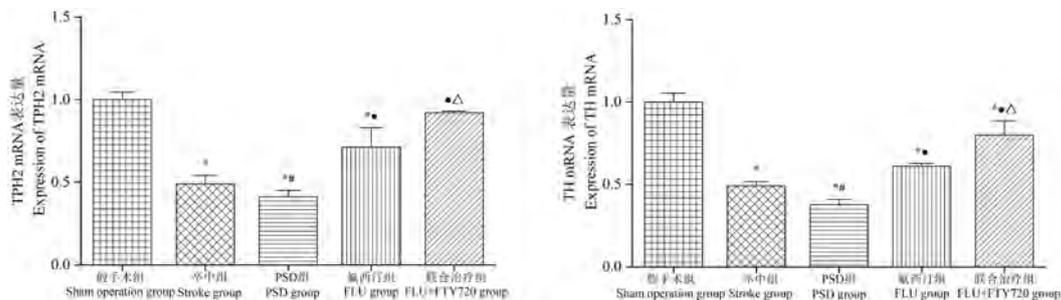


注:与假手术组比较, * $P < 0.05$;与卒中组比较, # $P < 0.05$;与 PSD 组比较, ● $P < 0.05$;与 FLU 组比较, △ $P < 0.05$ 。

图 1 大鼠海马中单胺类神经递质含量比较

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the stroke group, # $P < 0.05$. Compared with the PSD group, ● $P < 0.05$. Compared with the FLU group, △ $P < 0.05$.

Figure 1 Comparison of the content of monoamine neurotransmitters in the hippocampus of rats



注:与假手术组比较, * $P < 0.05$;与卒中组比较, # $P < 0.05$;与 PSD 组比较, ● $P < 0.05$;与 FLU 组比较, △ $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠海马中单胺类神经递质合成限速酶表达量比较

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with the stroke group, # $P < 0.05$. Compared with the PSD group, ● $P < 0.05$. Compared with the FLU group, △ $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of the expression levels of rate-limiting enzymes in the synthesis of monoamine neurotransmitters in the hippocampus of rats

本实验在应用线栓法制备 MCAO 模型的基础上加用 CUMS 法结合孤养法制备 PSD 大鼠模型。该模型的制备原理是锯齿类动物经过 CUMS 应激之后出现活动能力下降、兴趣丧失、缺乏探索等一系列抑郁样表现^[12-13],较好的模拟了临床上 PSD 的核心症状。同时孤养法也模拟了病人患病后住院时的孤独状态,因此该模型在 PSD 的相关研究中广泛应用^[14]。

实验大鼠模型的成功制备是相关行为学指标测定的前提。旷野实验水平运动反映大鼠的运动活动性水平;垂直运动反映大鼠对新鲜环境的好奇程度^[15];中央格停留时间反映大鼠启动活动的潜伏期^[16];蔗糖水消耗实验反映了大鼠对奖赏后的快感反应^[17]。本实验结果显示,与假手术组、卒中组比较,PSD 组大鼠旷野实验得分及蔗糖水消耗比例明显下降,提示 PSD 模型造模成功。与 PSD 组比较,FLU 组及联合治疗组大鼠行为学得分升高,二者进

一步比较发现联合治疗组疗效更显著,证实 FTY720 可明显改善 PSD 大鼠的抑郁样行为。目前免疫抑制剂在治疗 PSD 方面的研究较少,有少量报道显示 FTY720 可以改善单纯抑郁样行为^[18],PSD 作为一种特殊的抑郁类型,本实验已证实 FTY720 对 PSD 同样具有确切的疗效,为 PSD 的治疗提供新思路。

前文已证实 FTY720 对 PSD 大鼠的抑郁样行为具有改善作用,本研究的另一核心是进一步观察这种改善作用是否与单胺类神经递质有关。结果发现,PSD 组大鼠海马中 5-HT、NE、DA 含量明显降低,FLU 组与联合治疗组大鼠海马中 5-HT、NE、DA 的含量升高,进一步比较发现,联合治疗组大鼠海马中 5-HT、NE、DA 的含量升高更显著,证实 FTY720 对 PSD 大鼠行为学的改善作用是通过提高单胺类神经递质水平实现的。单胺类神经递质是一类具有广泛生物学活性的物质,其中 5-HT、NE、

DA 与抑郁症关系最为密切。目前有理论研究表明,卒中后中枢及外周发生的炎症反应将继发一系列改变^[19-20],不仅过度激活 IDO 酶,导致色氨酸(5-HT 的前体)被降解,分解成的喹啉酸及犬尿酸抑制 DA 的释放^[21],而且会过度激活 HPA 轴,使皮质醇过量分泌^[5,22],进一步诱导降解酪氨酸(NE 的前体)^[23]。由此可见单胺类神经递质减少的根源在于炎症反应的激活,本次研究也通过动物实验证实抗炎后可以提高单胺类神经递质的含量,为上述理论研究提供了可行性。

为了进一步探究 FTY720 提高单胺类神经递质含量的机制,本次实验还发现 FTY720 可以调控单胺类神经递质合成限速酶的表达。结果提示,PSD 组大鼠海马中 THP2 及 TH mRNA 表达量显著下降,与 PSD 组比较,FLU 组及联合治疗组大鼠海马中 THP2 及 TH mRNA 表达量升高,二者进一步比较发现,联合治疗组大鼠海马中 THP2 及 TH mRNA 表达升高更显著。TPH2 与 TH 属芳香族氨基酸羟化酶家族,分别负责 5-HT 及儿茶酚胺类神经递质(NE、DA)合成的最初步骤^[24],是催化 5-HT、NE、DA 合成的限速酶。目前国内在 FTY720 对单胺类神经递质合成限速酶表达方面的作用尚无报道,本实验证实了 FTY720 在调控单胺类神经递质合成限速酶表达方面的有效性,进而也证实了 FTY720 可通过此途径来提升单胺类神经递质的水平。

综上所述,FTY720 对 PSD 大鼠的抑郁样行为具有明显改善作用,其作用机制为通过调控海马组织中单胺类神经递质合成限速酶的表达来提高单胺类神经递质的水平,进而改达到治疗效果。本次研究不仅为 PSD 的治疗提供了新的方向,也为单胺类神经递质学说提供了重要的补充。

参考文献:

- [1] 罗琳, 邓叔华, 易健, 等. 脑卒中后抑郁大鼠行为学的动态变化及中药补阳还五汤的干预作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 8-13.
- [2] Williams LS, Ofner S, Yu Z, et al. Pre-post evaluation of automated reminders may improve detection and management of post-stroke depression [J]. J Gen Inter Med, 2011, 26(8): 852-857.
- [3] 李晶雪, 王天俊. 卒中后抑郁发病机制及治疗研究进展 [J]. 临床荟萃, 2019, 34(6): 572-576.
- [4] Baker C, Worrall L, Rose M, et al. A systematic review of rehabilitation interventions to prevent and treat depression in post-stroke aphasia [J]. Disabil Rehabil, 2018, 40(16): 1870-1892.
- [5] Robinson RG, Jorge RE. Post-stroke depression: a review [J]. Am J Psychiatry, 2016, 173(3): 221-231.
- [6] 李爱平, 田静, 周芝文, 等. 氟西汀对卒中后抑郁模型大鼠的行为及海马神经元新生的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 41-47.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 郑建峰. 缺血性脑卒中相关大脑中动脉梗阻模型制备的研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [9] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. Psychopharmacology (Berl), 1987, 93(3): 358-364.
- [10] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 247-251.
- [11] Papp M, Nalepa I, Antkiewicz-Michaluk L, et al. Behavioural and biochemical studies of citalopram and WAY 100635 in rat chronic mild stress model [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 72(1-2): 465-474.
- [12] Tao X, Yang W, Zhu S, et al. Models of poststroke depression and assessments of core depressive symptoms in rodents: How to choose? [J]. Exp Neurol, 2019, 322: 113060.
- [13] Kim YR, Kim HN, Pak ME, et al. Studies on the animal model of post-stroke depression and application of antipsychotic aripiprazole [J]. Behav Brain Res, 2015, 287: 294-303.
- [14] 孙奕, 张志珺, 王少华, 等. 卒中后抑郁大鼠模型的建立及评估 [J]. 中国卒中杂志, 2007, 2(11): 891-894.
- [15] 薛涛, 邹丽莎, 刘新民, 等. 抑郁动物模型及评价方法研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 321-326.
- [16] 裘涛, 陈眉, 代建峰, 等. 脑卒中后抑郁动物模型的建立与评价 [J]. 中国行为医学科学, 2006, 15(1): 12-13.
- [17] 孙秀萍, 王琼, 石哲, 等. 动物行为实验方法学研究的回顾与展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3): 1-7.
- [18] 舒亚桥. FTY720 改善慢性温和不可预知应激诱导的小鼠抑郁样行为的作用及机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [19] Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression [J]. Biol Psychiatry, 2009, 65(9): 732-741.
- [20] 胡昊天, 施福东. 卒中与免疫 [J]. 中国卒中杂志, 2020, 15(1): 18-21.
- [21] Kim JM, Stewart R, Kim SW, et al. Associations of cytokine gene polymorphisms with post-stroke depression [J]. World J Biol Psychiatry, 2012, 13(8): 579-587.
- [22] Tsao CW, Lin YS, Chen CC, et al. Cytokines and serotonin transporter in patients with major depression [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2006, 30(5): 899-905.
- [23] Wang Z, Shi Y, Liu F, et al. Diversiform etiologies for post-stroke depression [J]. Front Psychiatry, 2019, 9: 761.
- [24] Roberts KM, Fitzpatrick PF. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase [J]. IUBMB Life, 2013, 65(4): 350-357.

[收稿日期] 2020-08-03

李清韵, 谢慧, 李宇思, 等. 基于网络药理学和分子对接技术研究柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 44-54.

Li QY, Xie H, Li YS, et al. Mechanism of bupleurum-scutellaria baicalensis in the treatment of sinusitis based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 44-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.008

基于网络药理学和分子对接技术研究柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的作用机制

李清韵¹, 谢慧^{2*}, 李宇思¹, 王露¹

(1. 成都中医药大学, 成都 610072; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

【摘要】 **目的** 基于网络药理学和分子对接技术研究柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的作用机制。**方法** 通过TCMSP数据库筛选出柴胡-黄芩药对中的化学成分及其对应靶点, 将UniProt数据库筛选的相关药物靶点和Genecards数据库筛选的鼻窦炎疾病靶点相交集; 运用STRING平台构建靶蛋白相互作用(PPI)网络; 采用Metascape平台对靶点进行GO富集分析, 并借助DAVID数据库对靶点进行KEGG富集分析。利用Cytoscape 3.8.0软件构成分-靶点-通路网络图, 最后使用Autodock软件对关键靶点及化合物进行分子对接, 选择最佳的结合靶点。**结果** 筛选出相关化合物39个, 成分靶点与疾病靶点相交得出92个靶标。其主要活性成分为槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、黄芩素、刺槐素、 β -谷甾醇这六种。其核心基因为TP53, AKT1, MAPK1, PIK3CG, PTGS2, HSP90AA1等六个。在分子对接中, 其主要活性成分与关键靶点对接结果能量均低于-5 kJ/mol。**结论** 通过网络药理学和分子对接系统研究了柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的潜在有效成分和作用机制, 为今后进行深入机制研究提供了依据。

【关键词】 网络药理学; 柴胡; 黄芩; 鼻窦炎; 作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0044-11

Mechanism of bupleurum-scutellaria baicalensis in the treatment of sinusitis based on network pharmacology and molecular docking technology

LI Qingyun¹, XIE hui^{2*}, LI Yungsi¹, WANG Lu¹

(1. Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China. 2. the Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075)

【Abstract】 **Objective** To explore the mechanism of bupleurum and scutellaria herb pairs and their effective active compounds and targets in the treatment of sinusitis. **Methods** The chemical components and their corresponding targets in the bupleurum-scutellaria drug pair were screened through the TCMSP database, and the relevant drug targets screened in the UniProt database and sinusitis disease targets screened in the Genecards database were intersected. The STRING platform was used to construct a target protein interaction action network. The Metascape platform was used to perform GO enrichment analysis and DAVID was used to perform KEGG enrichment analysis. Cytoscape 3.8.0 software was used to construct a component-target pathway network diagram and Autodock software was used for molecular docking of key targets and compounds to select the best binding target. **Results** Thirty-nine related compounds were screened out and the component and disease targets were intersected to obtain 92 targets. The main active components were quercetin,

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目(81403440); 四川省中医药管理局中医药专项(CJJ2015021); 四川省教育厅项目(CTYX12)。

【作者简介】 李清韵(1993—), 女, 硕士, 研究方向: 中医药防治耳鼻咽喉疾病的临床研究。E-mail: 296205725@qq.com

【通信作者】 谢慧(1977—), 女, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治耳鼻咽喉疾病。E-mail: wangxie-ctu@163.com

kaempferol, wogonin, baicalein, acacetin, and sitosterol. The core genes were TP53, AKT1, MAPK1, PIK3CG, PTGS2, HSP90AA1, and six others. In molecular docking, the energy of the main active components and major targets was lower than -5 kcal/mol. **Conclusions** Through network pharmacology and the molecular docking system, the potential effective components and mechanism of *bupleurum-scutellaria baicalensis* for treatment of sinusitis were identified, which provides a basis for future in-depth research of the mechanism.

【Keywords】 network pharmacology; *bupleurum*; *scutellaria*; sinusitis; mechanism of action

鼻窦炎是由于多种因素导致的鼻腔及鼻粘膜的炎症性疾病^[1]。临床以鼻塞、流脓涕、头痛及嗅觉减退为主要症状,分为急性和慢性,前者病程短,起病急,头痛或面痛为甚,伴有发热,涕中带血等不适,后者病程长,易复发、缠绵难愈,鼻涕色白粘而量多,同时可伴有精神不振、倦怠乏力、记忆力下降等全身症状^[2]。属于中医学的“鼻渊”、“头风”、“脑漏”等范畴。“鼻渊”最早的记载见于黄帝内经的《素问·气厥论》,曰:“胆移热于脑,则辛頞鼻渊。鼻渊者,浊涕下不止也”^[3]。鼻窦炎在各个年龄阶段均有产生,在中年及青少年较为多见,儿童也是主要群体^[4-5]。鼻窦炎在我国的患病率约为 8%^[6],在欧美等其他国家的发病率约为 12%^[7-8]。其病因可能包括病原体感染、过敏反应,免疫功能障碍、环境因素、遗传因素等多种因素^[9-12],鼻窦炎严重影响了人民的生活质量和工作效率,在国内外都引起了很大的重视与关注。

在东汉张仲景所著的《伤寒论》小柴胡汤中首次记载了柴胡黄芩药对的配伍^[13],小柴胡汤为和解剂,主治伤寒少阳病证,具有和解少阳之功效。柴胡苦凉而气轻清,性主升散,善于疏散少阳之邪,开气分之结,解表而和里;黄芩苦寒,善清气分之热,清泄少阳郁火。二药配伍,疏散与清泄并施,则少阳之邪,内外分消,枢机因而和畅^[14]。两者配伍是和解少阳的基本结构。

中医药经过几千年的发展,积累了丰富的临床经验,形成了一个完整而独特的医学体系。尽管由于历史原因,中医药的科学基础有待进一步巩固,但新的证据已经开始表明中医药是医学再发现的一个重要领域^[15]。中医网络药理学就是建立网络分子靶点与中医证候疾病模式之间的联系^[16]。因此,建立中药成分-靶向药物网络方法,研究中药、成分、靶点与药物之间的关系,具有十分重要的意义^[17]。本研究借助网络药理学对柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的作用机制进行了整体研究,为其进一步药理作用研究和临床应用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

通过 TCMSP 数据库 (<https://tcmspw.com/tcmsp.php>) 获取柴胡-黄芩药对的成分与靶点,根据 uniprot (<https://www.uniprot.org>) 数据库中的靶点信息作为统一标准,从 genecard 数据库 (<https://www.genecards.org>) 获取鼻窦炎疾病靶点,运用 string (<https://string-db.org/>) 平台制作蛋白相互作用 (PPI) 网络;使用 Metascape 平台 (<http://metascape.org/>) 对靶点进行 GO 富集分析,DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对靶点进行 KEGG 富集分析。利用 Cytoscape (版本号:3.8.0) 软件构建网络图,从 PDB (<http://www.rcsb.org>) 网站获取分子对接蛋白构象。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选柴胡-黄芩药对的有效成分及靶点

通过中药系统药理数据库和分析平台 (TCMSP) (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 收集柴胡和黄芩的所有化学成分,选取口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件筛选活性成分,并收集活性成分的作用靶点。并用 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 提取相关靶点基因。

1.2.2 筛选疾病靶点

在 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中查找,以“Sinusitis”为检索词,检索鼻窦炎相关靶点,建立疾病靶点数据集。本研究筛选 Score ≥ 3 分的基因。

1.2.3 “药物-成分-靶点”网络构建

将柴胡-黄芩药对的靶点基因与疾病的基因取交集,利用在线工具 Draw Venn Diagram 绘制韦恩图。再将药物和疾病映射的共同靶点与药物的有效活性成分运用 Cytoscape3.8.0 软件绘制“药物-成分-靶点”网络图。

1.2.4 构建 PPI 及其核心网络

利用 String 平台 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络图。并利用 Cytoscape v3.8.0 软件的在线

工具 Network Analyzer 进行参数设置,构建核心网络。

1.2.5 GO 富集分析与 KEGG 通路分析

分别使用 DAVID 和 metascape 在线平台对上述获得的相关核心靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。运用在线绘图平台绘制 GO 及 KEGG 富集分析的气泡图、柱状图,再利用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点-通路”网络图。

1.2.6 分子对接验证

通过 TCMSp 数据库获得活性成分 mol2 格式化学结构,利用 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取相应的靶点蛋白,然后利用 Auto Dock 软件进行分子对接。

2 结果

2.1 柴胡-黄芩药对的主要活性化合物及鼻窦炎作用靶点

柴胡-黄芩活性成分靶点通过 TCMSp 筛选得到,柴胡化合物 13 个,靶点目标 348 个,黄芩化合物 32 个,靶点目标 507 个,筛选出相关化合物 44 个(一个重合)、对应的作用靶点 225 个(删除重复),应用 Uniprot 数据库查询与靶点蛋白相对应的人类基因名称。柴胡-黄芩药对的活性化合物如表 1。

2.2 疾病靶点的筛选

通过 Genecards 数据库筛选出鼻窦炎相关靶蛋白 2510 个,筛选 score ≥ 3 的基因,共有 1246 个疾病靶点,将柴胡-黄芩靶点与疾病靶点信息输入在线工具 Draw Venn Diagram 进行 Venn 分析,其中两组靶点重叠部分共有 92 个靶点,如图 1。

2.3 药物-成分-靶点网络

柴胡-黄芩药对中与鼻窦炎相关的活性成分有 39 个,交集靶点有 92 个,运用 Cytoscape 3.8.0 绘制“药物-成分-靶点”网络图。该图共有 133 个节点,376 条边。计算图中每个节点的连接度(degree)。其程度越高,成分或靶点在网络中发挥的作用就越关键。排名前六的活性成分为 quercetin(槲皮素)、kaempferol(山奈酚)、wogonin(汉黄芩素)、baicalein(黄芩素)、acacetin(刺槐素)、beta-sitosterol(β -谷甾醇)。如图 2。

2.4 构建 PPI 网络关键靶点基因

通过 STRING 数据库分析 92 个药物-疾病交集靶点的相互作用,设置置信度(≥ 0.4)并隐藏孤立靶点,共得到 92 个靶点 1797 条相互作用连线的 PPI 网络(图 3A)。使用 Network Analyzer 筛选核心

靶点,通过 cetscape 2.2 插件设置连接度、介度、紧密度,通过分析筛选出柴胡-黄芩治疗鼻窦炎的关键靶点基因为 TP53、AKT1、CASP3、JUN、IL6、VEGFA、MAPK1、MYC、TNF、CXCL8、EGF、PTGS2、CCND1、EGFR、MMP9 等 15 个。(图 3B)

2.5 GO 富集分析

为阐明柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎靶点参与的生命过程,该研究使用 metascape 在线工具对 92 个靶点进行 GO 富集分析,GO 富集分析由细胞组成(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)三部分组成,以 $P < 0.05$ 为筛选条件获得 BP, MF, CC 富集条目分别为 269, 87, 111 条,将排名前十的生物过程、细胞组成和分子功能利用微生信在线平台绘制成柱状图及气泡图,见图 4、图 5。

2.6 KEGG 富集分析

利用 DAVID 在线工具对 92 个靶点进行 KEGG 富集分析分析结果显示共富集在 104 条通路上以 $P < 0.05$ 为阈值筛选排名前 20 的 KEGG 分析结果(P -value < 0.01 、基因频率 $> 0.05\%$),其结果涉及 Pathways in cancer(癌症的途径)、TNF signaling pathway(TNF 信号通路)、Apoptosis(细胞凋亡)、p53 signaling pathway(p53 信号通路)、NF-kappa B signaling pathway(NF- κ B 信号通路)、PI3K-Akt signaling pathway(PI3K-Akt 信号通路) HIF-1 signaling pathway(HIF-1 信号通路)、MAPK signaling pathway(MAPK 信号通路) Toll-like receptor signaling pathway(Toll 样受体信号通路)等通路。根据 P 值选取排名 Top10 的通路,利用 Omicsshare 在线平台绘制气泡图(图 5)。

运用 CytoScape3.8.0 构建成分-靶点-通路网络图,见图 6。通过 CytoScape3.8.0 内置的 NetworkAnalyzer 分析柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎疾病网络拓扑学参数,根据拓扑学指标 Degree 值大小,进行重要成分及重要作用靶点的筛选^[18]。Cytoscape 网络分析表明,槲皮素连接度(degree)为 61,介度(betweenness centrality)为 0.2692,紧密度(closeness centrality)为 0.6243,预测槲皮素为柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的主要成分,其次为汉黄芩素、山奈酚、黄芩素、刺槐素,见表 2。PTGS2 在网络中的连接度为 42,介度为 0.1789,紧密度为 0.5517,预测 PTGS2 为柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的主要靶点。HSP90AA1、PIK3CG、PRSS1、NOS2、RELA、AKT1、TP53、MAPK1 亦为相对重要的靶点,见表 3。

表 1 柴胡-黄芩活性化合物的基本信息
Table 1 Basic information of Bupleurum-Scutellaria active compound

成份 ID Ingredient ID	化合物 Chemical compound	口服生物利用度 OB(%)	类药性 DL	药物名称 Medicine name
MOL001645	乙酸亚油醇酯 Linoleyl acetate	42.1	0.2	柴胡 Bupleurum
MOL002776	黄芩苷 Baicalin	40.12	0.75	柴胡 Bupleurum
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	49.6	0.31	柴胡 Bupleurum
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	41.88	0.24	柴胡 Bupleurum
MOL004598	3,5,6,7-四甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)色酮 3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	31.97	0.59	柴胡 Bupleurum
MOL004609	茵陈黄酮 Areapillin	48.96	0.41	柴胡 Bupleurum
MOL013187	葎澄茄素 Cubebin	57.13	0.64	柴胡 Bupleurum
MOL004624	长栲利素 Longikaurin A	47.72	0.53	柴胡 Bupleurum
MOL004653	白芷灵 Anomalin	46.06	0.66	柴胡 Bupleurum
MOL004718	α -菠菜甾醇 α -spinasterol	42.98	0.76	柴胡 Bupleurum
MOL000490	矮牵牛素 Petunidin	30.05	0.31	柴胡 Bupleurum
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	柴胡 Bupleurum
MOL001689	刺槐素 Acacetin	34.97	0.24	黄芩 Scutellaria
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	30.68	0.23	黄芩 Scutellaria
MOL000228	(2R)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯基苯并吡喃-4-酮 (2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.2	黄芩 Scutellaria
MOL002714	黄芩素 Baicalein	33.52	0.21	黄芩 Scutellaria
MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮 5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	33.82	0.45	黄芩 Scutellaria
MOL002910	红花素 Carthamidin	41.15	0.24	黄芩 Scutellaria
MOL002913	二氢黄芩苷 Dihydrobaicalin	40.04	0.21	黄芩 Scutellaria
MOL002914	黄烷酮 Eriodyctiol (flavanone)	41.35	0.24	黄芩 Scutellaria
MOL002915	三裂尾草素 Salvigenin	49.07	0.33	黄芩 Scutellaria
MOL002917	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮 5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	45.05	0.33	黄芩 Scutellaria
MOL002925	5,7,2',6'-四羟基黄酮 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	37.01	0.24	黄芩 Scutellaria
MOL002927	黄芩黄酮 II Skullcapflavone II	69.51	0.44	黄芩 Scutellaria
MOL002928	木蝴蝶素 Oroxylin a	41.37	0.23	黄芩 Scutellaria
MOL002932	二甲氧基黄酮 Panicolin	76.26	0.29	黄芩 Scutellaria
MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	36.56	0.27	黄芩 Scutellaria
MOL002934	黄芩新素 Neobaicalein	104.34	0.44	黄芩 Scutellaria
MOL002937	二氢木蝴蝶素 Dihydrooroxylin	66.06	0.23	黄芩 Scutellaria
MOL000358	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	36.91	0.75	黄芩 Scutellaria
MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75	黄芩 Scutellaria
MOL000525	去甲汉黄芩素 Norwogonin	39.4	0.21	黄芩 Scutellaria
MOL000552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮 5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	31.71	0.35	黄芩 Scutellaria
MOL000073	表儿茶素 Ent-Epicatchin	48.96	0.24	黄芩 Scutellaria
MOL001458	黄连碱 Coptisine	30.67	0.86	黄芩 Scutellaria
MOL001490	双[(2S)-2-乙基己基]苯-1,2-二甲酸酯 Bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	43.59	0.35	黄芩 Scutellaria
MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯 Diisooctyl phthalate	43.59	0.39	黄芩 Scutellaria
MOL002897	表小檗碱 Epiberberine	43.09	0.78	黄芩 Scutellaria
MOL008206	芥苣黄酮 Moslosooflavone	44.09	0.25	黄芩 Scutellaria
MOL010415	11,13-二十二碳二烯酸甲酯 11,13-eicosadienoic acid, methyl ester	39.28	0.23	黄芩 Scutellaria
MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	36.63	0.27	黄芩 Scutellaria
MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.24	0.26	黄芩 Scutellaria
MOL012266	半枝莲种素 Rivularin	37.94	0.37	黄芩 Scutellaria
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76	柴胡、黄芩 Bupleurum, Scutellaria

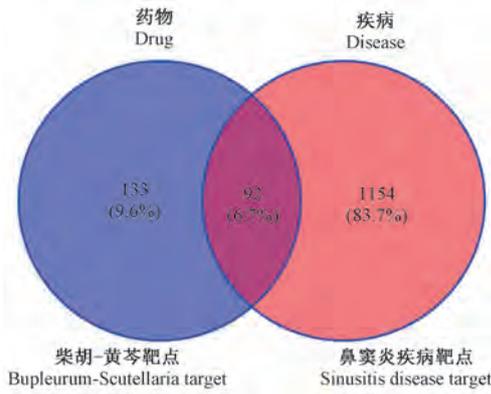


图 1 鼻窦炎疾病靶点与柴胡-黄芩靶点的韦恩图
Figure 1 Venn diagram of Sinusitis disease target and Bupleurum-Scutellaria target

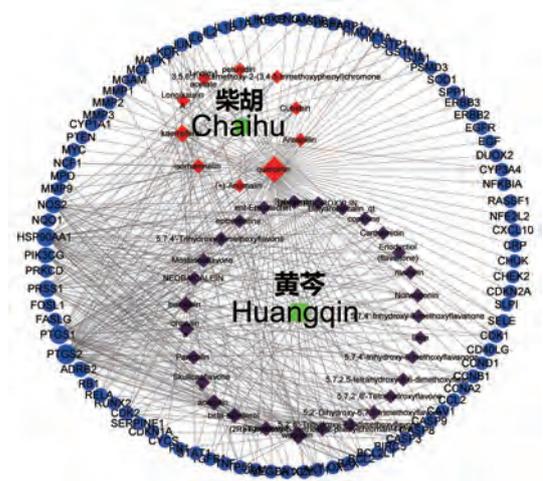


图 2 柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎疾病的药物-成分-靶点网络
Figure 2 Bupleurum-Scutellaria baicalensis's drug for the treatment of sinusitis disease-component-target network

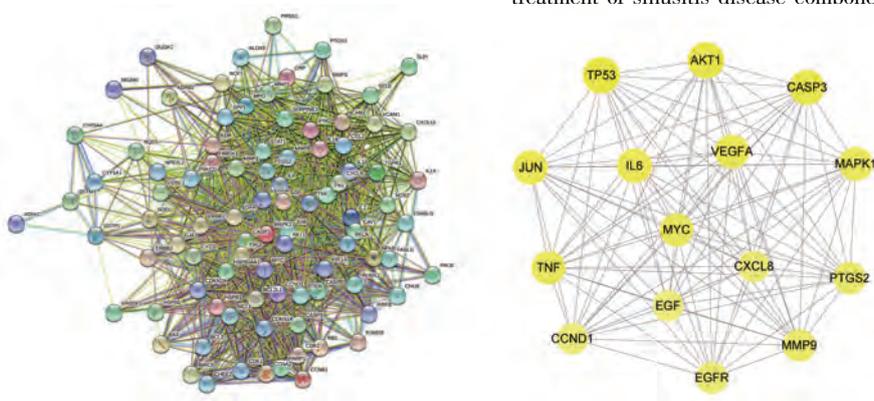


图 3 柴胡-黄芩治疗鼻窦炎疾病的靶点 PPI 网络及其关键靶点网络
Figure 3 Target PPI network of Bupleurum-Scutellaria in the treatment of sinusitis and its key target network

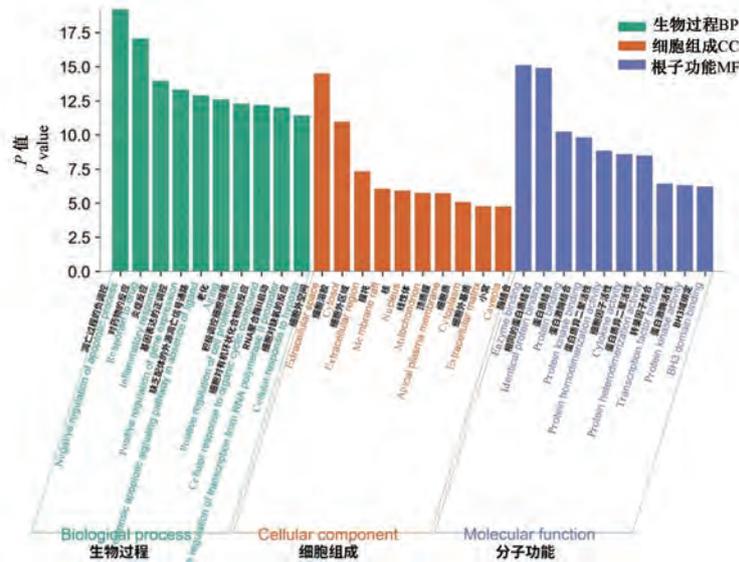


图 4 柴胡-黄芩治疗鼻窦炎疾病的靶点 GO 柱状图
Figure 4 Target GO histogram of Bupleurum-Scutellaria in the treatment of sinusitis

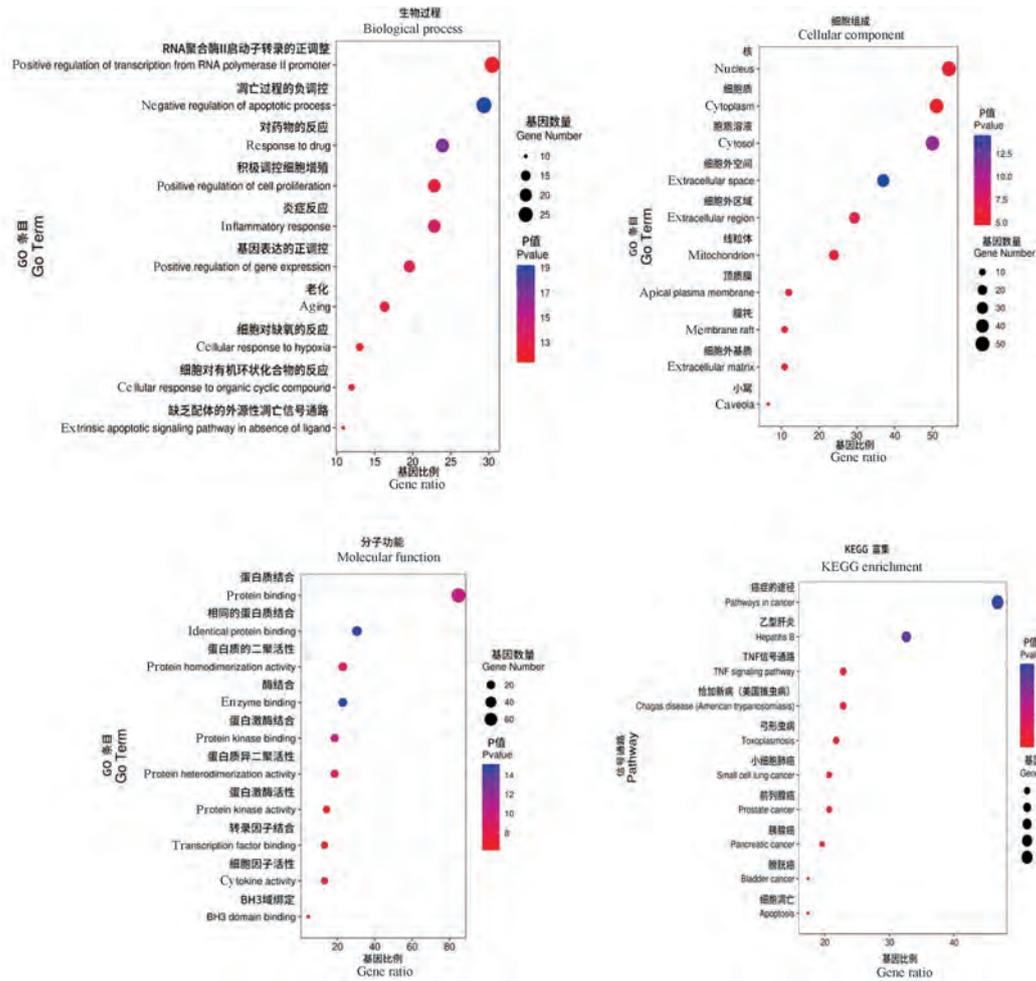


图 5 柴胡-黄芩治疗鼻窦炎疾病潜在治疗靶点的富集分析

Figure 5 Enrichment analysis of potential therapeutic targets of Bupleurum-Scutellaria in the treatment of sinusitis

2.7 分子对接结果

根据分析结果,结合 PPI 中的关键基因和“成分-靶点-通路”网络的主要基因为 *TP53*, *AKT1*, *MAPK1*, *PIK3CG*, *PTGS2*, *HSP90AA1* 这六个核心靶点基因,与活性成分中有效靶点个数最多的成分进行分子对接,活性成分为 *quercetin* (槲皮素)、*kaempferol* (山奈酚)、*wogonin* (汉黄芩素)、*baicalein* (黄芩素)、*acacetin* (刺槐素)、*beta-sitosterol* (β -谷甾醇),结果显示这六种成分与 *TP53*, *AKT1*, *MAPK1*, *PTGS2*, *HSP90AA1*, *PIK3CG* 对接能量均小于 -5kcal/mol , *beta-sitosterol* 与 *PTGS2* 和 *MAPK1* 对接结果小于 -10 kJ/mol , *beta-sitosterol* 与 *AKT1* 和 *HSP90AA1* 对接结果小于 -9 kJ/mol , *HSP90AA1* 与黄芩素和刺槐素对接结果小于 -8.5 kJ/mol 。分子对接结果见表 4,关键靶点与活性成分的最佳复合结构见图 7。

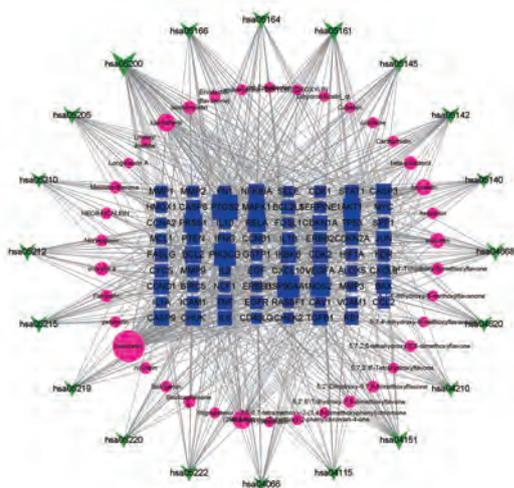


图 6 柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎疾病的成分-靶点-通路网络图

Figure 6 The composition-target-pathway network diagram of Bupleurum-Scutellaria baicalensis for the treatment of sinusitis

3 讨论

通过我们的研究发现,柴胡-黄芩药对的主要核心成分为槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、黄芩素、刺槐素、 β -谷甾醇这六种。槲皮素具有抗肿瘤,抗病毒,抗炎,降低血脂等多种药理作用^[19],槲皮素可通过对 TLR 的负调节而抑制脂多糖诱导膜表面黏附分子和炎症因子的表达,达到抗炎作用,可降低的炎症因子为 IL-1、IL-6、IL-10 等^[20-21]。山奈酚能明显的抑制炎症及其炎性细胞浸润^[22]。研究表明,山奈酚可显著抑制 LPS 诱导的 MDC、IP-10、IL-8 的产生^[23]。谷甾醇具有抗氧化、降低胆固醇、抗炎、免疫调节、抗肿瘤和中枢神经系统等作用^[24]。Choi 等^[25]人研究发现 β -谷甾醇抗炎作用机制是通过减少 NO 的合成,抑制巨噬细胞 IL-6 活性,减少 IL-1、TNF-等炎症因子的分泌。汉黄芩素、黄芩素和刺槐素都可通过抑制相关促炎细胞因子的表达,来减轻炎症的发生^[26-29]。由图 2 可知,槲皮素、山奈酚、汉黄芩素、黄芩素、刺槐素、 β -谷甾醇均存在于柴胡-黄芩治疗鼻炎疾病的有效成份当中,由此提示柴胡-黄芩药效的发挥可能是多种化学成分量的积累作用的结果。

本次研究中,筛选出柴胡-黄芩治疗鼻窦炎的关键靶点基因为 TP53、AKT1、MAPK1、PIK3CG、PTGS2、HSP90AA1,这些靶点蛋白都与炎症反应和免疫应答密切相关。Tp53 通过调控许多 miRNAs 的表达,诱导细胞分化、凋亡和衰老,调节细胞周期,抑制肿瘤发生等^[30-31]。AKT1 是丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)中的其中一个亚型,通过磷酸化其下游底物来促进细胞生长、代谢、凋亡等重要的细胞生物学过程^[32-33]。MAPK1 又称细胞外信号调节激酶 2,是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的 C 族亚族中的一个基因^[34-35]。MAPK1 途径可通过磷酸化转录因子改变基因表达,促进炎症因子产生巨噬细胞,并参与鼻窦炎的产生与发展过程^[36-37]。PTGS2 即为环氧合酶 2(COX-2)的别称,有研究对 COX-2 表达上调,发现与 p38MAPK、NF- κ B 等信号转导通路在上皮细胞具有较强表达,表明其炎性反应机制在鼻窦炎中的作用^[38-39]。且本研究还发现,多个化学成分可作用到一个靶点,如儿茶素、黄连素、汉黄芩素均可以作用到 ESR1 靶点;而一个化学成分也可以作用到多个靶点,如槲皮素能够作用到 TP53、C-JUN、PPARG、ST1AT1 等多个靶点。

表 2 主要活性成分网络节点特征参数

Table 2 Network node characteristic parameters of main active ingredients

成份 ID Ingredient ID	化合物 Chemical compound	连接度 Degree	介度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality
MOL000098	槲皮素 Quercetin	61	0.269251807	0.624390244
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	24	0.04133878	0.458781362
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	22	0.036419779	0.45229682
MOL002714	黄芩素 Baicalein	17	0.026434036	0.436860068
MOL001689	刺槐素 Acacetin	14	0.011937919	0.428093645

表 3 主要靶点网络节点特征参数

Table 3 Characteristic parameters of main target network nodes

靶点 Target	连接度 Degree	介度 Betweenness centrality	紧密度 Closeness centrality
PTGS2	42	0.17894201	0.551724138
HSP90AA1	34	0.103307027	0.520325203
PIK3CG	32	0.069606752	0.512
PRSS1	23	0.054101493	0.47761194
NOS2	22	0.021106201	0.474074074
RELA	21	0.017293745	0.470588235
AKT1	26	0.046756307	0.463768116
TP53	17	0.012186774	0.457142857
MAPK1	17	0.011995655	0.453900709

表 4 分子对接结果
Table 4 Molecular docking results

受体 Receptor	配体 Ligand	化学式 Chemical formula	相对分子质量(g/mol) Relative molecular mass	结合能(kJ/mol) Binding energy
TP53	槲皮素 Quercetin	C15H1007	302.25	-6.38
TP53	山柰酚 Kaempferol	C15H1006	286.25	-5.83
TP53	汉黄芩素 Wogonin	C16H1205	284.28	-5.74
TP53	黄芩素 Baicalein	C15H1005	270.25	-5.55
TP53	刺槐素 Acacetin	C16H1205	284.28	-5.88
TP53	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C29H500	414.79	-7.24
AKT1	槲皮素 Quercetin	C15H1007	302.25	-7.12
AKT1	山柰酚 Kaempferol	C15H1006	286.25	-6.77
AKT1	汉黄芩素 Wogonin	C16H1205	284.28	-7.26
AKT1	黄芩素 Baicalein	C15H1005	270.25	-7.23
AKT1	刺槐素 Acacetin	C16H1205	284.28	-6.77
AKT1	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C29H500	414.79	-9.56
MAPK1	槲皮素 Quercetin	C15H1007	302.25	-6.63
MAPK1	山柰酚 Kaempferol	C15H1006	286.25	-6.85
MAPK1	汉黄芩素 Wogonin	C16H1205	284.28	-6.61
MAPK1	黄芩素 Baicalein	C15H1005	270.25	-6.9
MAPK1	刺槐素 Acacetin	C16H1205	284.28	-6.95
MAPK1	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C29H500	414.79	-10.2
PIK3CG	槲皮素 Quercetin	C15H1007	302.25	-6.11
PIK3CG	山柰酚 Kaempferol	C15H1006	286.25	-5.97
PIK3CG	汉黄芩素 Wogonin	C16H1205	284.28	-7.93
PIK3CG	黄芩素 Baicalein	C15H1005	270.25	-7.8
PIK3CG	刺槐素 Acacetin	C16H1205	284.28	-8.11
PIK3CG	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C29H500	414.79	-8.37
PTGS2	槲皮素 Quercetin	C15H1007	302.25	-6.42
PTGS2	山柰酚 Kaempferol	C15H1006	286.25	-7.12
PTGS2	汉黄芩素 Wogonin	C16H1205	284.28	-8.15
PTGS2	黄芩素 Baicalein	C15H1005	270.25	-8.5
PTGS2	刺槐素 Acacetin	C16H1205	284.28	-8.44
PTGS2	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C29H500	414.79	-10.41
HSP90AA1	槲皮素 Quercetin	C15H1007	302.25	-7.37
HSP90AA1	山柰酚 Kaempferol	C15H1006	286.25	-7.71
HSP90AA1	汉黄芩素 Wogonin	C16H1205	284.28	-7.58
HSP90AA1	黄芩素 Baicalein	C15H1005	270.25	-8.7
HSP90AA1	刺槐素 Acacetin	C16H1205	284.28	-8.87
HSP90AA1	β -谷甾醇 Beta-sitosterol	C29H500	414.79	-9.58

通过 GO 富集分析可知,柴胡-黄芩治疗鼻窦炎的基因功能主要体现在对调节细胞代谢、对氧化应激的反应、生物调节和刺激反应循环系统过程等。KEGG 通路富集分析显示了柴胡-黄芩治疗鼻窦炎的主要信号通路。在 TNF 信号通路中, TNF- α 上调能促进粘附分子(ICAM-1、VCAM-1 等)和相关炎症因子(IL-1、IL-6、IL-12 等)在鼻窦炎中的表达^[40-42]。NF- κ B 信号通路可双向调控炎症和免疫相关的细胞因子表达,在与鼻窦炎有关的炎症反应中有的重要调节作用^[43-45]。国内外大量研究表明 Toll 样受体通路(TLR 信号通路)可调节并影响 Th1 /Th2 细胞因子的平衡^[46],从而介入鼻窦炎的发病过程^[47]。

PI3K/AKT 信号通路有效抑制嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的活化,是治疗相关鼻窦炎疾病的一种新途径^[48-49]。MAPK 信号通路参与细胞的增殖、分化、调亡等生理病理过程。有研究通过抑制 p38MAPK 信号通路的磷酸化可减少黏膜下炎细胞浸润,减轻鼻黏膜炎症反应,以维持鼻窦免疫机制平衡^[50-51]。

分子对接分析主要用于研究分子间(如配体和受体)的相互作用,配体与受体的结合构象越稳定,则表示结合性越强,能量越低^[52-54]。本研究以原配体作为分数对象,显示化学成分与靶点对接分数都接近或小于原配体得分。通过关键靶点与活性成

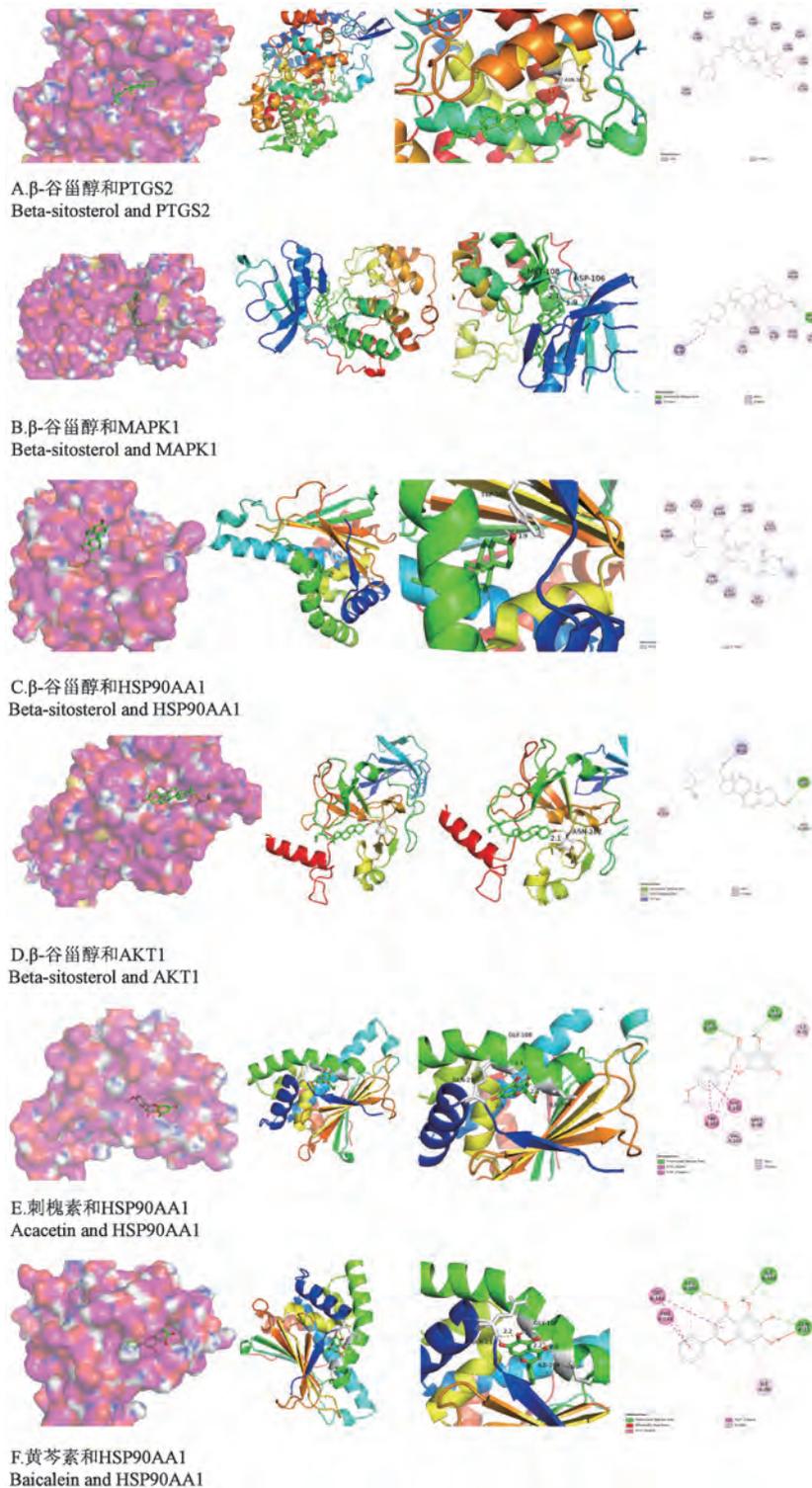


图7 关键靶点与活性成分的最佳复合结构

Figure 7 The optimal composite structure of key targets and active

分的最佳复合结构发现, β -谷甾醇和PTGS2、 β -谷甾醇和MAPK1、 β -谷甾醇和HSP90AA1、 β -谷甾醇和AKT1、刺槐素和HSP90AA1、黄芩素和HSP90AA1均有较好的结合,因此提示柴胡-黄芩药对的关键化

学成分与关键蛋白具有较好的结合活性,也进一步佐证了基于网络药理学辨识有效成分的可靠性。

本研究利用网络药理学和分子对接技术初步分析了柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的作用机制。但

研究仍存在一些不足之处:①本研究所用数据库的准确性与可靠性仍有待进一步考证,不同的数据库获得的数据与研究结果可能存在一定差异,后期还需开展多数据的研究。②本研究所构建生物网络数据均为定性数据,而中药复方内部成分复杂,相互作用关系复杂,相对于定量数据而言,本研究结论的准确性尚有待进一步提高。③本研究尚未涉及柴胡-黄芩药对的剂量、煎煮方法、服用方法等对鼻炎疾病治疗的实际效果,且目前临床上也未有柴胡-黄芩药对的动物实验与人体实验,后期还应该结合体内外实验进一步验证柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎疾病的分子机制。

总而言之,中药具有多组分、多靶点、多通路、协同作用的特点,本文利用网络药理学对柴胡-黄芩构建网络模型,识别潜在和活性成分,构建药物靶点网络和靶病网络,分析其中药理论研究和药理作用。本文的研究数据有一定的预测性和客观性,可通过设计柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的动物实验研究进一步证实其作用机制。

参考文献:

- [1] Bruaene NV, Bachert C. Tissue remodeling in chronic rhinosinusitis [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011, 11 (1): 8-11.
- [2] 任雪坤,李霞.导师李霞治疗鼻窦炎的临床经验总结 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(96): 246-248.
- [3] 忻耀杰,滕磊,高旭青.《内经》“胆移热于脑,则辛頞鼻渊”的再认识 [J]. *四川中医*, 2014, 32(1): 29-30.
- [4] Benninger MS, Ferguson BJ, Hadley JA, et al. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, 129 (3): 1-32.
- [5] Anamika A, Chakravarti A, Kumar R. Atopy and quality of life in pediatric chronic rhinosinusitis [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2019, 33(5): 586-590.
- [6] Shi JB, Fu QL, Zhang H, et al. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: results from a cross-sectional survey in seven Chinese cities [J]. *Allergy*, 2015, 70(5): 533-539.
- [7] Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists [J]. *Rhinology*, 2012, 50 (1): 1-12.
- [8] Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 152(2): S1- S39.
- [9] van Drunen CM, Mjösberg JM, Segboer CL, et al. Role of innate immunity in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis: progress and new avenues [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2012, 12(2): 120-126.
- [10] Li C, Shi L, Yan Y, et al. Gene Expression signatures: a new approach to understanding the pathophysiology of chronic rhinosinusitis [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013, 13(2): 209-217.
- [11] Toppila-Salmi S, van Drunen CM, Fokkens WJ, et al. Molecular mechanisms of nasal epithelium in rhinitis and rhinosinusitis [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(2): 495.
- [12] Sundaresan AS, Hirsch AG, Storm M, et al. Occupational and environmental risk factors for chronic rhinosinusitis: a systematic review [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2015, 5(11): 996-1003.
- [13] 李春红. 试论少阳病临证辨识 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(12): 5835-5836.
- [14] 张智华.《伤寒论》柴胡药对探析 [J]. *湖北中医杂志*, 2014, 36(1): 47-48.
- [15] 苑婕,胡静,贺虹,等.网络药理学在中医药现代化研究中的进展 [J]. *海南医学*, 2020, 31(20): 2688-2691.
- [16] 解静,高杉,李琳,等.网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [17] Liu CX, Liu R, Fan HR, et al. Network pharmacology bridges traditional application and modern development of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(1): 3-17.
- [18] 李筱楠,雍淇文,张铭,等.基于网络药理学的栀子-川芎药对抗抑郁实验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 47-53.
- [19] 彭炜,王为,赵艾君,等.槲皮素对大鼠变应性鼻炎血清 Th1/Th2 细胞因子表达的影响 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2018, 24(6): 557-560.
- [20] Byun EB, Yang MS, Choi HG, et al. Quercetin negatively regulates TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide through Tollip expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(4): 698-705.
- [21] 周霄楠,韩超,宋鹏琰,等.木犀草素和槲皮素体外抗炎作用研究 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(10): 56-61.
- [22] Oh HA, Han NR, Kim MJ, et al. Evaluation of the effect of kaempferol in a murine allergic rhinitis model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718(1-3): 48-56.
- [23] Huang CH, Jan RL, Kuo CH, et al. Natural flavone kaempferol suppresses chemokines expression in human monocyte THP-1 cells through MAPK pathways [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(8): H254-H259.
- [24] 刘威良,姬昱,黄艾祥.β-谷甾醇的研究及开发进展 [J]. *农产品加工*, 2019, 1: 77-79, 82.
- [25] Choi JN, Choi YH, Lee JM, et al. Anti-inflammatory effects of β-sitosterol-β-D-glucoside from *Trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(24): 2340-2343.
- [26] Ryu NH, Shin JM, Um JY, et al. Wogonin inhibits transforming growth factor β1-induced extracellular matrix production via the p38/activator protein 1 signaling pathway in nasal polyp-derived

- fibroblasts [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2016, 30(4): 128–133.
- [27] Zhi HJ, Zhu HY, Zhang YY, et al. *In vivo* effect of quantified flavonoids-enriched extract of *Scutellaria baicalensis* root on acute lung injury induced by influenza A virus [J]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 105–116.
- [28] Chi DS, Lin TC, Hall K, et al. Enhanced effects of cigarette smoke extract on inflammatory cytokine expression in IL-1 β -activated human mast cells were inhibited by Baicalein via regulation of the NF- κ B pathway [J]. *Clin Mol Allergy*, 2012, 10: 3.
- [29] Huang WC, Liou CJ. Dietary acacetin reduces airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration by modulating eotaxin-1 and Th2 cytokines in a mouse model of asthma [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 910520.
- [30] He L, He X, Lowe SW, et al. microRNAs join the p53 network --another piece in the tumour-suppression puzzle [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11): 819–822.
- [31] Hermeking H. p53 enters the microRNA world [J]. *Cancer cell*, 2007, 12(5): 414–418.
- [32] Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20): 10983–10985.
- [33] 徐碧云. Akt 抑制剂的研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(2): 250–255.
- [34] Kumar S, Principe DR, Singh SK, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibitors and t-cell-dependent immunotherapy in cancer [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(1): 9.
- [35] Bai F, Matton DP. The arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20 (MKKK20) C-terminal domain interacts with MKK3 and harbors a typical DEF mammalian MAP kinase docking site [J]. *Plant Signal Behav*, 2018, 13(8): e1503498.
- [36] 刘兆芳, 范洪江, 逢明杰. p38 MAPK 与变应性鼻炎的研究进展 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2015, 29(23): 2094–2098.
- [37] Chuang HC, Tan TH. MAP4K family kinases and DUSP family phosphatases in T-Cell signaling and systemic lupus erythematosus [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1433.
- [38] Newton R, Holden N. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase: potential as anti-inflammatory agents in asthma? [J]. *BioDrugs*, 2003, 17(2): 113–129.
- [39] Chang MS, Chen BC, Yu MT, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF- κ B, but not p38 MAPK, pathways [J]. *Cell Signal*, 2005, 17(3): 299–310.
- [40] Chen T, Zhang X, Zhu G, et al. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway *in vitro* [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(38): e22241.
- [41] Jia Z, Nallasamy P, Liu D, et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF- α -induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKK α /NF- κ B signaling pathway [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(3): 293–302.
- [42] Fan B, Dun SH, Gu JQ, et al. Pycnogenol attenuates the release of proinflammatory cytokines and expression of perilipin 2 in lipopolysaccharide-stimulated microglia in part via inhibition of NF- κ B and AP-1 activation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e137837.
- [43] Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(2): 72–79.
- [44] Wang W, Zheng M. Mucin 5 subtype AC expression and upregulation in the nasal mucosa of allergic rhinitis rats [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, 147(6): 1012–1019.
- [45] Poynter ME, Cloots R, van Woerkom T, et al. NF- κ B activation in airways modulates allergic inflammation but not hyperresponsiveness [J]. *J Immunol*, 2004, 173(11): 7003–7009.
- [46] 刘颖, 郑春泉, 余洪猛, 等. Toll 样受体 2 及 Toll 样受体 4 在大鼠实验性变应性鼻炎中的表达 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(1): 36–39.
- [47] Park SK, Jin SY, Yeon SH, et al. Role of Toll-like receptor 9 signaling on activation of nasal polyp-derived fibroblasts and its association with nasal polypogenesis [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2018, 8(9): 1001–1012.
- [48] Sarkar A, Hellberg L, Bhattacharyya A, et al. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF- κ B survival pathways in neutrophil granulocytes [J]. *Infect Immun*, 2012, 80(4): 1615–1623.
- [49] Park WS, Jung WK, Park SK, et al. Expression of galectin-9 by IFN- γ stimulated human nasal polyp fibroblasts through MAPK, PI3K, and JAK/STAT signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2): 259–264.
- [50] 王彤, 臧洪瑞, 李云川, 等. MAPK 信号通路在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉和不伴鼻息肉的黏膜上皮修复机制中的作用 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 32(21): 1618–1622.
- [51] Simsek F, Eren E, Bahceci S, et al. High PI3K/mTOR and low MAPK/JNK activity results in decreased apoptosis and autophagy in nasal polyposis [J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2020, 15: S1808.
- [52] 郑雅, 刘志强, 朱晓芹, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨血必净注射液治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的作用机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(7): 57–64.
- [53] Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2008, 8(1): 1–8.
- [54] Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.

黎劭学,肖晓岚,尹雷,等. 栀子苷对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤氧化应激的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 55-62.

Li SX, Xiao XL, Yin L, et al. Geniposide protects against oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 55-62.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.009

栀子苷对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤 氧化应激的保护作用

黎劭学¹,肖晓岚²,尹雷¹,孟苗苗³,岑学程¹,蔡军¹,杭春华^{4*}

(1.广州中医药大学第二附属医院 脑病中心,广州 510120; 2.广州中医药大学第二附属医院 儿科,广州 510120; 3.广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120; 4.南京大学医学院附属鼓楼医院 神经外科,南京 210008)

【摘要】 目的 本研究探讨栀子苷(GNP)对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后早期脑损伤(EBI)氧化应激的保护作用。方法 采用视交叉前池注血法制备蛛网膜下腔出血大鼠模型,将雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、GNP低、高剂量组,造模后一次腹腔内注射。24 h后进行蛛网膜下腔出血量评分及死亡率计算;免疫荧光染色检测颞叶皮层脑组织核因子2相关因子2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)表达情况;Western blot测定颞叶皮层血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)、醌氧化还原酶-1(NADPH quinone reductase-1, NQO-1)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)蛋白含量;TBA比色法检测颞叶皮层中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,TUNEL染色法检测神经细胞凋亡情况。结果 与假手术组比较,模型组大鼠死亡率百分比增加;颞叶皮层 Nrf2 阳性细胞数目、HO-1、NQO-1、GST 蛋白水平略有增加;MDA 水平显著升高、大量细胞发生凋亡($P < 0.05$)。与模型组比较,GNP 两剂量组大鼠颞叶皮层 Nrf2 阳性细胞数目、HO-1、NQO-1、GST 蛋白水平均显著增加($P < 0.05$),MDA 水平,细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$);其中高剂量组死亡率百分比并出现下降。结论 本研究发现 GNP 对大鼠 SAH 后 EBI 具有一定保护作用,其作用机制可能与通过激活内源性抗氧化系统 Nrf2 通路,上调下游抗氧化酶发挥对神经细胞的保护作用密切相关。

【关键词】 栀子苷;蛛网膜下腔出血;早期脑损伤;抗氧化;Nrf2

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0055-08

Geniposide protects against oxidative stress in early brain injury after subarachnoid hemorrhage

LI Shaoxue¹, XIAO Xiaolan², YIN Lei¹, Meng Miaomiao³, CEN Xuecheng¹, CAI Jun¹, HANG Chunhua^{4*}

(1. Diagnosis and Treatment Center of Encephalopathy, the 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China. 2. Department of Pediatrics, the 2nd Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120. 3. the Second Clinical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120. 4. Department of Neurosurgery, Nanjing Drum Tower Hospital, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210008)

【基金项目】广东省中医药局科研项目(20192028)。

【作者简介】黎劭学(1985—),男,博士,主治医师,研究方向:脑血管病的中西医结合治疗。E-mail: ouka@163.com

【通信作者】杭春华(1964—),男,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:脑血管病的外科治疗。E-mail: hang_neurosurgery@163.com

【Abstract】 Objective This study aimed to test the hypothesis that geniposide (GNP) protects against oxidative stress in early brain injury (EBI) after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Male Wistar rats ($n=48$) were randomly allocated to four groups, including the sham+vehicle group, SAH+vehicle group, SAH+GNP low dose group, and SAH+GNP high dose group. The experimental SAH model was established by injecting blood into the prechiasmatic cistern and treatments were then administered. Outcomes were measured at 24 hours after treatment. The SAH score and mortality rate were calculated. Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) expression in the temporal cortex was detected by immunofluorescence staining. Heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), and glutathione S-transferase (GST) protein expression in the temporal cortex was determined by western blotting. Malondialdehyde (MDA) levels in the temporal cortex were detected by the thiobarbituric acid method. Apoptosis of nerve cells was determined using TUNEL staining. **Results** In the SAH+vehicle group, MDA levels and the rate of cellular apoptosis were significantly higher compared with those in the sham+vehicle group (both $P<0.05$). The number of Nrf2-positive cells and HO-1, NQO-1, and GST expression were significantly higher in the SAH+vehicle group compared with the sham+vehicle group (all $P<0.05$). Compared with the SAH+vehicle group, treatment of either a high or low dose of GNP resulted in a higher number of Nrf2-positive cells and higher HO-1, NQO-1, and GST expression, and lower MDA levels and cellular apoptosis rate (all $P<0.05$). In addition, lower mortality was also observed in the SAH+GNP high dose group. **Conclusions** GNP exerts a protective effect against oxidative stress in EBI after SAH. This effect is probably mediated by activating the Nrf2 pathway and upregulating the downstream of pathway—antioxidants.

【Keywords】 geniposide; subarachnoid hemorrhage; early brain injury; antioxidant; Nrf2

动脉瘤性蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是一种致死致残率甚高的脑血管危急重症^[1]。SAH 后早期脑组织损伤 (early brain injury, EBI) 覆盖了从初次出血到血管痉挛发生前 72 h 内, 脑组织的一系列重要病理损伤改变, 是导致 SAH 高致残致死率的主要机制^[2-4]。而氧化损伤导致的神经细胞凋亡是其中的一个重要环节。

核因子相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是参与调节细胞抗氧化应激反应的重要转录因子^[5]。在氧化应激状态下, Nrf2 会激活并启动下游的基因转录, 通过上调多种抗氧化酶的表达, 以提高细胞的抗氧化能力^[6]。栀子苷 (geniposide, GNP) 属于环烯醚萜苷类化合物, 是茜草科植物山栀 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 果实中的其中一种主要活性成分。GNP 的药理作用相当广泛, 具有抗炎、抗氧化应激、调节血糖、抗肿瘤等多种功效^[7-11]。近年研究发现, GNP 在缺血及出血性脑血管病细胞及动物实验模型中, 均表现出一定的神经保护作用, 但其相关作用通路及分子机制尚不完全明确, 可能与抗氧化应激、抗炎、线粒体保护等多个机制存在密切关系^[12-13]。有关 GNP 对 SAH 后 EBI 的作用鲜有研究, 为了探讨相关机制, 本研究对大鼠蛛网膜下腔出血模型进行 GNP 后处理, 通过观察 Nrf2 通路相关抗氧化损伤蛋白表达的变化及神经细胞凋亡情况探讨其可能的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 12~13 周龄, 重量约 280~330 g, 由扬州大学比较医学中心提供 [SCXK(苏)2017-0007], 饲养于南京市鼓楼医院动物实验中心 [SYXK(苏)2018-0020]。饲养环境温度 (22±2)℃, 具有 12 h 光照循环, 动物自由饮食。本实验经南京市鼓楼医院实验动物伦理委员会审批 (IACUC 2018020003), 并在实验过程中严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

栀子苷 (购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC ≥ 9899.3%, 货号: 24512-63-8); 戊二醛 (MDA) 试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所, A003-1); Nrf2 抗体 (批号 AF7603)、NQO-1 抗体 (批号 AF7614)、HO-1 抗体 (批号 AF1333)、GST 抗体 (批号 AF2299)、GAPDH 抗体 (批号 AF5009)、TUNEL 试剂盒 (批号 C1089) 购自碧云天生物科技有限公司。

5024R 低温高速离心机 (德国 eppendorf 公司); FLX800 荧光酶标仪 (美国 BioTek 公司); IX51 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); XO-400S 超声波细胞破碎仪 (中国南京先欧公司); Western blot 转印电泳仪器 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon5200 化学发光成

像分析系统(中国上海天能科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药方法

Wister 大鼠经适应性喂养 3 d 后,随机分为 4 组:假手术组、模型组,GNP 低剂量组(50 mg/kg),GNP 高剂量组(100 mg/kg),每组 12 只。药物处理的两组大鼠在造模后 30 min 给予 GNP 不同剂量一次腹腔内注射处理。模型组和假手术组以等量生理盐水代替药物注入。

1.3.2 大鼠蛛网膜下腔出血模型制作

本研究选用视交叉前池注血模型,操作步骤与在既往报道上进一步改进^[14]:取俯卧位,将动物固定颅顶水平位,于冠状缝前 8.0 mm 处钻孔。解剖右侧股动脉并抽取自体动脉血 350 μ L。立即将注射器以 30°方向,插入穿刺孔 10 mm,即达视交叉前池,维持 20 s 将自体血注射完毕。骨蜡封闭骨孔缝合头皮,头低位 30 min,饲养同术前。在建模过程中,如大鼠造模失败或 24 h 内死亡,则取用备用大鼠补齐每组存活 12 只。假手术组接受相同的 SAH 造模流程,但视交叉前池仅注入相应等量的生理盐水,其它步骤不变。

1.3.3 脑组织取材及处理

在造模后第 24 h 处死大鼠,分别以冰冻生理盐水灌注后取全脑并根据 Sugawara 评分标准^[15]进行蛛网膜下腔出血评分(图 1)。其后取颞叶皮层进行 MDA 含量测定及 Western blot 实验操作。另用生理盐水灌注后再使用多聚甲醛灌注固定并制石蜡切片,备免疫荧光法检测 Nrf2 的细胞表达情况,以及 TUNEL 荧光染色观察细胞凋亡情况。

1.3.4 免疫荧光标记染色检测颞叶皮层 Nrf2 表达情况

石蜡切片脱蜡、热修复,加入 3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶。加入兔抗 Nrf2(1:200)4℃ 孵育过夜,加入荧光二抗 37℃ 孵育 90 min。复染后在荧光显微镜下观察阳性表达情况。

1.3.5 颞叶皮层组织 MDA 含量测定

提取部分适量颞叶皮层组织,在冰浴中按照 1:9(W/V)加入生理盐水制成 10% 脑组织匀浆,离心后取上清液,按照试剂盒说明进行操作测定 MDA 含量。

1.3.6 Western blot 检测 HO-1、NQO-1、GST 蛋白表达

提取颞叶皮层脑组织,10% 聚丙烯酰胺凝胶电

泳分离蛋白,转膜后分别加稀释的一抗 NQO-1、HO-1、GST 及 β -actin 4℃ 孵育过夜。加二抗室温孵育 2 h,洗膜后显影成像。采用 Quantity One 软件分别计算各条带灰度值的百分比,以分析各组蛋白表达量。

1.3.7 TUNEL 检测神经细胞凋亡情况

按照试剂盒说明步骤进行检测,室温下,PBS 溶液清洗、TrixonX-100 处理后,滴加 TdT 酶荧光标记液避光孵育,4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染液进行核染色,孵育并再次 PBS 溶液清洗后,用抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜观察并拍照。随机选取切片 5 个区域,通过计数总细胞数和凋亡细胞数,计算细胞凋亡率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学分析软件建立数据库,数据均以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对组间数据的比较统计采用单因素方差分析(Oneway ANOVA),组间行 *turkey* 检验,死亡率比较采用 Fisher's 精确概率检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

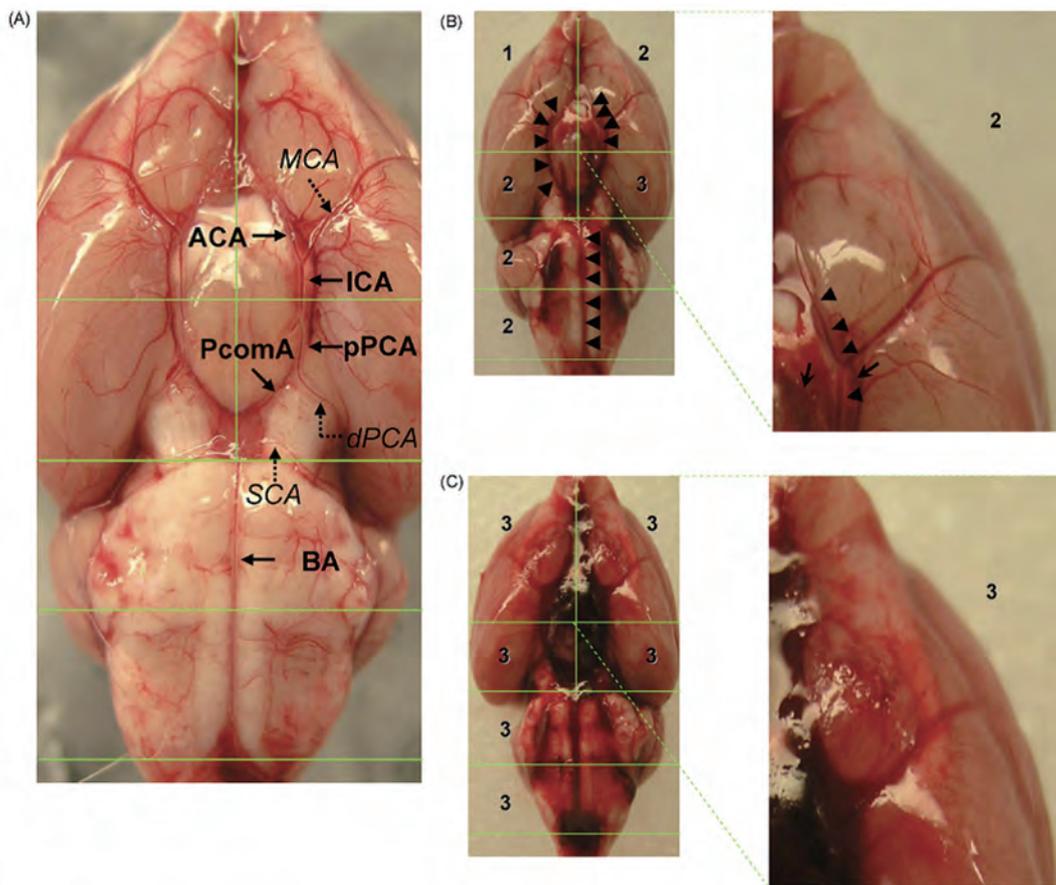
2.1 各组大鼠死亡率及蛛网膜下腔出血情况评分

在造模后至处死前 24 h 内,假手术组、模型组、GNP 低剂量组、GNP 高剂量组的死亡率及存活情况分别为 0% ($n = 0/12$)、20% ($n = 3/15$)、20% ($n = 3/15$) 和 7.7% ($n = 1/13$)。虽然 GNP 高剂量组死亡率百分比比较模型组及低剂量组有所下降,但各组间死亡率并无显著统计学差异($P > 0.05$)。

对于大鼠而言,24 h 后蛛网膜下腔出血即被迅速清除^[16]。本实验根据 Sugawara 评分标准^[15],在 24 h 观察点对实验大鼠蛛网膜下腔出血量进行评分,结果示假手术组的大鼠脑组织未见出血,评分为 0 分。而模型组、GNP 低剂量组、GNP 高剂量组在 24 h 的脑组织腹侧可见蛛网膜下腔不同程度的积血和血凝块,如图 2 所示。四组的 SAH 出血量评分分别为 0、(15.17 \pm 0.48)、(14.26 \pm 0.61)、(14.35 \pm 0.77)。虽然药物处理的两组大鼠术后 24 h SAH 出血量明显高于假手术组,但与模型组相比,评分并无显著性差异($P > 0.05, n = 6$)。

2.2 GNP 对 SAH 大鼠模型颞叶皮层 Nrf2 表达的影响

免疫荧光标记染色结果显示,假手术组大鼠大颞叶皮层组织偶见微弱荧光染色,Nrf2 阳性百分率

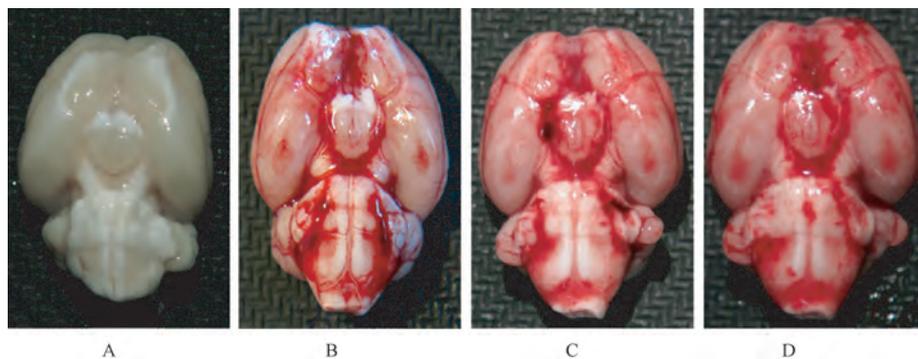


注:(A):腹侧 6 分区,6 个部位分数相加得出总的评分以评估大鼠蛛网膜下腔出血情况,最低分 0 分,最高分 18 分。0 分:未见出血;(B):中度蛛网膜下腔出血,1 分:极少量血凝块;2 分:中等量蛛网膜下腔出血,但仍可看清血管;(C):重度蛛网膜下腔出血,3 分:大量出血,该部分血管难以辨认。

图 1 蛛网膜下腔出血 Sugawara 评分

Note. (A), Six segments of the basal cistern. The subarachnoid blood clots are assessed in each of these segments to allot a score from 0 to 18. 0, No blood. (B), Moderate SAH. 1, Minimal subarachnoid blood. 2, Moderate blood clot with recognizable arteries. (C), Severe SAH. 3, Blood clot obliterating all arteries within the segment.

Figure 1 Subarachnoid hemorrhage grading



注:A:假手术组;B:模型组;C:GNP 低剂量组;D:GNP 高剂量组。

图 2 造模后 24 h 实验大鼠全脑蛛网膜下腔出血情况

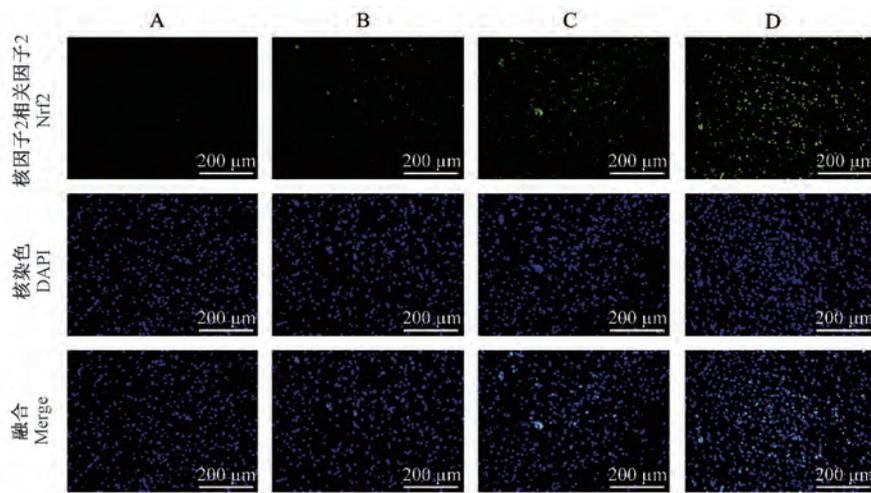
Note. A, Sham+vehicle group. B, SAH+vehicle group. C, SAH+GNP low dose group. D, SAH+GNP high dose group.

Figure 2 The whole brain of SAH rat model at 24 h

为(0.028 ± 0.031)%。与假手术组相比,模型组大鼠颞叶皮层 Nrf2 阳性细胞数目略有增多,阳性百分率为(21.014 ± 1.828)%,两者有统计学差异($P < 0.05$)。与模型组相比,经 GNP 干预后 Nrf2 阳性细胞数目进一步增加($P < 0.05$),低剂量组为(47.750 ± 4.176)%,高剂量组的增加更为显著,为(76.733 ± 2.949)%。提示 GNP 能促进 SAH 后 Nrf2 的激活(图 3)。

2.3 GNP 对 SAH 大鼠模型颞叶皮层 MDA 含量的影响

与假手术组相比,模型组大鼠颞叶皮层 MDA 含量显著增高。药物干预组亦有升高,但较模型组有所降低($P < 0.05$),且高剂量组升高较少。提示 GNP 能显著减轻 SAH 后由 MDA 的升高,抑制细胞的氧化损伤(图 4)。



注:A:假手术组;B:模型组;C:GNP 低剂量组;D:GNP 高剂量组。

图 3 GNP 对 SAH 大鼠模型颞叶皮层 Nrf2 表达的影响($n = 6$)

Note. A, Sham+vehicle group. B, SAH+vehicle group. C, SAH+GNP low dose group. D, SAH+GNP high dose group.

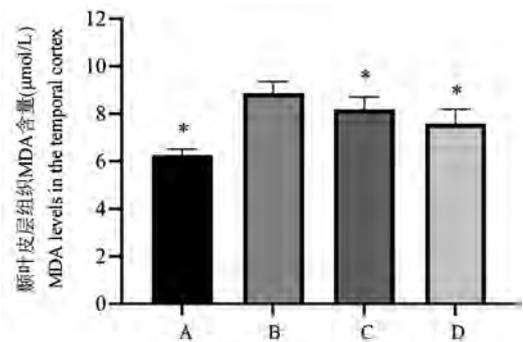
Figure 3 Effects of GNP on Nrf2 expression in the temporal cortex of the SAH rat model

2.4 GNP 对 SAH 大鼠模型颞叶皮层 HO-1、NQO-1、GST 蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组的 HO-1、NQO-1、GST 蛋白表达均有明显升高($P < 0.05$)。与模型组相比,经 GNP 处理后 HO-1、NQO-1、GST 蛋白的表达进一步增加($P < 0.05$)。提示 GNP 能显著增强 SAH 后由 Nrf2 诱导的下游抗氧化酶 HO-1、NQO-1、GST 的表达,提高细胞的抗氧化能力(图 5)。

2.5 GNP 对 SAH 大鼠模型颞叶皮层神经细胞凋亡的影响

造模后 24 h,模型组 TUNEL 阳性细胞比例明显上升,凋亡率为(50.88 ± 6.22)%,较假手术组(0.00 ± 0.02)%有显著性差异($P < 0.05$)。而 GNP 处理的两组 TUNEL 阳性细胞比例较模型组明显下降,且 GNP 高剂量组细胞凋亡率为(28.76 ± 7.37)%,低于 GNP 低剂量组(39.86 ± 8.57)%($P < 0.05$)。提示高剂量 GNP 能够显著改善 SAH 造模后 24 h 的神经细胞凋亡(图 6)。

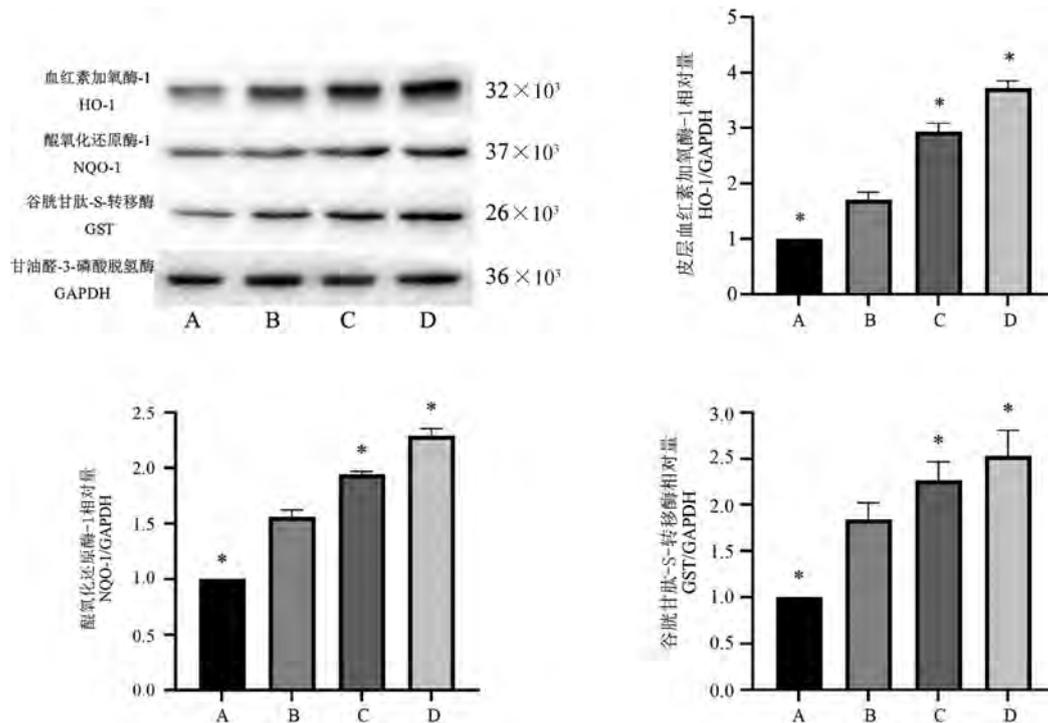


注:A:假手术组;B:模型组;C:GNP 低剂量组;D:GNP 高剂量组。与模型组相比,* $P < 0.05$ 。

图 4 GNP 对 SAH 大鼠颞叶皮层丙二醛(MDA)含量的影响($n = 6$)

Note. A, Sham+vehicle group. B, SAH+vehicle group. C, SAH+GNP low dose group. D, SAH+GNP high dose group. Compared with model group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Effects of GNP on malondialdehyde (MDA) contents in the temporal cortex of the SAH rat model

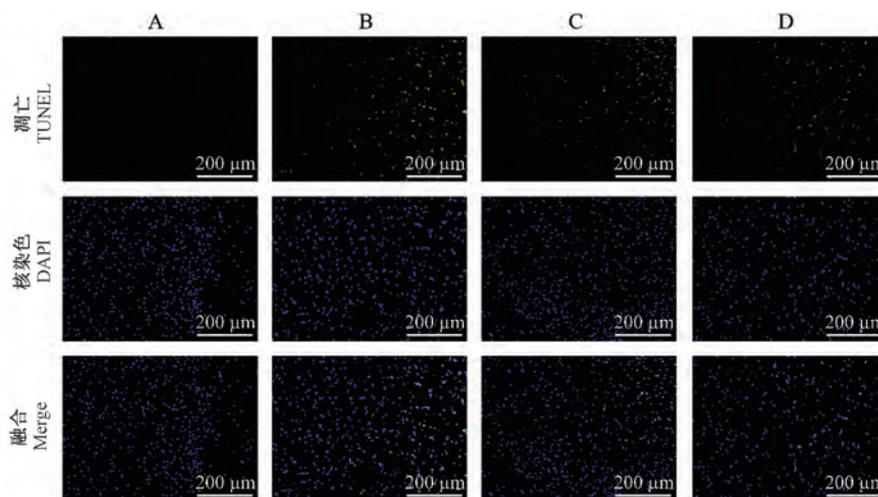


注: A:假手术组; B:模型组; C:GNP 低剂量组; D:GNP 高剂量组。与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 SAH 大鼠模型颞叶皮层组织中 HO-1、NQO-1、GST 蛋白表达的相对强度 ($n=6$)

Note. A, Sham+vehicle group. B, SAH+vehicle group. C, SAH+GNP low dose group. D, SAH+GNP high dose group. Compared with model group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Relative intensity of HO-1、NQO-1、GST protein expressions of temporal cortex of the SAH rat model



注: A:假手术组; B:模型组; C:GNP 低剂量组; D:GNP 高剂量组。与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 GNP 对 SAH 大鼠模型颞叶皮层神经细胞凋亡的影响 ($n=6$)

Note. A, Sham+vehicle group. B, SAH+vehicle group. C, SAH+GNP low dose group. D, SAH+GNP high dose group. Compared with model group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Effects of GNP on TUNEL positive nerve cells in the temporal cortex of the SAH rat model

3 讨论

在 EBI 的一系列病理改变中,氧化应激损伤是

其中一个重要环节^[3]。在这一阶段,高氧饱和度的动脉血进入蛛网膜下腔刺激脑组织并产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS),造成一系列细

胞内容物的严重损伤。除了造成出血部位邻近脑组织损伤外,还可以引起远隔部位微循环障碍^[17],导致全脑细胞缺血缺氧及广泛的神经元去极化损害^[18-19]。该过程中,神经细胞坏死及凋亡会造成血脑屏障的破坏并形成恶性循环,最终导致不可逆的脑组织坏死^[20-21]。另一方面,在各种损伤因素的作用下,作为内源性抗氧化系统的核心调控枢纽,Nrf2 通路会被激活并启动下游基因转录,上调多种抗氧化酶的表达,通过负反馈以减轻氧化应激导致的细胞损伤和凋亡^[22]。

GNP 是近年被筛选鉴定出来的一种新的胰高血糖素样肽-1 受体 (glucagon-like peptide 1 receptor, GLP-1R) 激动剂,具有与 GLP-1R 激动剂类似的神经营养和神经保护功能^[7]。并在抗氧化应激、抗内质网应激、抗炎、修复受损的神经细胞、促进神经生长等多个方面表现出良好的疗效^[23]。其作用机制与 Nrf2 通路的激活及下游抗氧化物质的表达上调密切相关^[9]。在本研究中,给药时间为造模后 30 min 给药,目的是研究 GNP 对 SH 的早期保护效果和机制。在模型死亡率及神经细胞凋亡情况方面,本研究证实了 GNP 虽然不能减少蛛网膜下腔出血的吸收,但可有效减轻 SAH 后 EBI 情况。研究并通过检测各组大鼠颞叶皮层组织中 MDA 水平,Nrf2 及下游抗氧化酶 HO-1、NQO-1、GST 的蛋白表达情况,进一步推测 GNP 对 SAH 后 EBI 的神经保护作用是通过 Nrf2 通路来进行调节的。

MDA 是作为脂质过氧化后的重要产物,可以反映体内脂质过氧化的程度,间接反映了细胞氧化损伤程度^[24]。本研究中,模型组大鼠颞叶皮层中 MDA 含量明显增加,符合 SAH 后 EBI 改变;但 GNP 干预后 MDA 的含量均有所下降,且 GNP 高剂量组下降更为明显,提示 GNP 能够减轻 SAH 造成的颞叶皮层的氧化损伤。

正常情况下,Nrf2 定位于细胞质中,与胞质结合蛋白(Keap1) 相互结合;当机体处于各种应激状态时,Nrf2 与 Keap1 解离,转移到细胞核,与 Maf 蛋白形成异二聚体;然后该异二聚体再与抗氧化应答元件(ARE) 结合,调控 II 相解毒酶和抗氧化酶基因的转录活性,产生直接或间接抗氧化作用^[5, 25-26]。HO-1 是热休克蛋白中的一种,在正常组织中呈低表达,但在氧化应激状态下会被大量诱导表达,以增加机体抗氧化能力^[6]。NQO1 是一种调节细胞内物质处于氧化还原状态的黄素酶,以 NAD(P)H 为受

体,对各种代谢引起的氧化应激反应均具有一定的保护作用^[27]。GST 属于超级 II 相解毒酶的基因家族,其催化谷胱甘肽 (glutathione hormone, GSH) 与底物之间的相互作用,清除有害化学物质并进行解毒,在防治组织损伤方面作用显著^[28]。本研究中,两种剂量的 GNP 虽然均不能减少蛛网膜下腔出血的吸收,但都可激活颞叶皮层神经细胞的 Nrf2 通路并明显上调下游抗氧化酶 HO-1、NQO-1、GST 的蛋白表达,最终减轻神经细胞的凋亡,提示 GNP 对 SAH 后神经细胞的保护作用与 Nrf2 通路的激活存在密切关系。低剂量的 GNP 虽然能减轻细胞凋亡,但并不能减少 SAH 对动物模型造成的死亡,仅高剂量治疗能够降低其死亡率百分比,提示 GNP 对 SAH 的治疗作用存在一定的剂量依赖效应。

由于动物来源及条件限制,本研究未能扩展 GNP 剂量及时间分层并在 Nrf2 基因敲除动物模型中验证 GNP 对 SAH 的神经保护作用,存在一定的不足。另外,本研究虽然观察到 GNP 高剂量组死亡率百分比有所下降,但并未能得出统计学差异,考虑与实验纳入样本量不足所致。

综上所述,本研究表明,GNP 50 mg/kg 及 100 mg/kg 两种治疗剂量在大鼠 SAH 造模后 24 h 可抑制颞叶皮层的神经细胞凋亡,该效应存在一定的剂量依赖,高剂量治疗并能进一步下降实验动物死亡率,其作用机制可能与通过激活内源性抗氧化系统 Nrf2 通路,上调下游抗氧化酶发挥对神经细胞的保护作用密切相关。

参考文献:

- [1] Chen S, Feng H, Sherchan P, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2014, 115: 64-91.
- [2] Cahill WJ, Calvert JH, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26: 1341-1353.
- [3] Sehba FA, Hou J, Pluta RM, et al. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Prog Neurobiol, 2012, 97: 14-37.
- [4] Savarraj J, Parsha K, Hergenroeder G, et al. Early brain injury associated with systemic inflammation after subarachnoid hemorrhage [J]. Neurocrit Care, 2018, 28: 203-211.
- [5] 林晓萍, 李雯, 沈华浩. 抗氧化应激转录因子-Nrf2 的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27: 1234-1239.
- [6] 王甜甜, 陈淳媛, 杨雷, 等. Nrf2/HO-1 信号轴在氧化应激性疾病中的机制 [J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44: 74-80.

- [7] 郑礼胜, 倪娜, 刘向前, 等. 京尼平苷和京尼平研究及应用现状 [J]. 药物评价研究, 2012, 35: 289-298.
- [8] Zhao C, Lv C, Li H, et al. Geniposide protects primary cortical neurons against oligomeric A β 1-42-induced neurotoxicity through a mitochondrial pathway [J]. PLoS One, 2016, 11: e0152551.
- [9] Fu Y, Liu B, Liu J, et al. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14: 792-798.
- [10] Zhou YX, Zhang RQ, Rahman K, et al. Diverse pharmacological activities and potential medicinal benefits of geniposide [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 4925682.
- [11] Nam KN, Choi YS, Jung HJ, et al. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10: 493-499.
- [12] 王云, 李东影, 林凡凯, 等. 栀子治疗脑缺血的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25: 226-234.
- [13] Yuan J, Zhang J, Cao J, et al. Geniposide alleviates traumatic brain injury in rats via anti-inflammatory effect and MAPK/NF- κ B inhibition [J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40: 511-520.
- [14] Li S, Xiao X, Ni X, et al. Tetramethylpyrazine protects against early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by affecting mitochondrial-dependent caspase-3 apoptotic pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 3514914.
- [15] Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, et al. A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model [J]. J Neurosci Methods, 2008, 167: 327-334.
- [16] Thal SC, Sporer S, Klopotoski M, et al. Brain edema formation and neurological impairment after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. J Neurosurg, 2009, 111: 988-994.
- [17] Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, et al. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery [J]. Nat Med, 2009, 15: 1031-1037.
- [18] Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease [J]. Nat Med, 2011, 17: 439-447.
- [19] Fan L, He PY, Peng YC, et al. Mdivi-1 ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via the suppression of inflammation-related blood-brain barrier disruption and endoplasmic reticulum stress-based apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 112: 336-349.
- [20] Pang J, Chen Y, Kuai L, et al. Inhibition of blood-brain barrier disruption by an apolipoprotein E-mimetic peptide ameliorates early brain injury in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Transl Stroke Res, 2017, 8: 257-272.
- [21] Li J, Chen J, Mo H, et al. Minocycline protects against NLRP3 inflammasome-induced inflammation and P53-associated apoptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53: 2668-2678.
- [22] Chen G, Fang Q, Zhang J, et al. Role of the Nrf2-ARE pathway in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosci Res, 2011, 89: 515-523.
- [23] Zhou YX, Zhang RQ, Rahman K, et al. Diverse pharmacological activities and potential medicinal benefits of geniposide [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 4925682.
- [24] 张秋萍, 吴霞红, 郑剑恒, 等. 生物样本中丙二醛测定方法的研究进展 [J]. 理化检验(化学分册), 2016, 52: 979-985.
- [25] Tanaka N, Ikeda Y, Ohta Y, et al. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion [J]. Brain Res, 2011, 1370: 246-253.
- [26] Dang J, Brandenburg LO, Rosen C, et al. Nrf2 expression by neurons, astroglia, and microglia in the cerebral cortical penumbra of ischemic rats [J]. J Mol Neurosci, 2012, 46: 578-584.
- [27] 胡跃强, 唐农, 王启芝, 等. 实验性脑缺血损伤大鼠 Nrf2/ARE 信号通路相关基因 NQO1, GCLC 和 GCLM 表达的变化 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36: 873-876.
- [28] 李慧, 杨林. Nrf2 抗氧化的分子调控机制 [J]. 生物信息学, 2018, 16: 1-6.

[收稿日期] 2020-07-30

岳凌峰,马敬,王宁. 松果菊苷对大鼠抑郁模型线粒体损伤的修复作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 63-69.
Yue LF, Ma J, Wang N. Effect of echinacoside on mitochondrial damage in a rat model of depression [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 63-69.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.010

松果菊苷对大鼠抑郁模型线粒体损伤的修复作用

岳凌峰¹, 马敬^{2*}, 王宁³

(1. 新乡医学院第二附属医院精神四科, 河南 新乡 453002; 2. 新乡医学院第二附属医院心境障碍科, 河南 新乡 453002; 3. 新乡医学院第二附属医院精神三科, 河南 新乡 453002)

【摘要】 目的 本研究旨在探索松果菊苷(EA)对抑郁症模型大鼠线粒体损伤的影响。方法 斯普拉格-杜勒鼠(SD)大鼠随机分为5组:对照组、单纯EA组、模型组、治疗组和氟西汀组。采用实施慢性不可预知的轻度压力(CUMS)构建大鼠抑郁症模型。治疗组大鼠腹腔内注射EA 30 mg/(kg·d),记录大鼠体重、检测大鼠糖水偏好指数评估大鼠行为。HE染色检测脑组织损伤情况;TUNEL检测脑组织细胞凋亡情况;JC-1法检测线粒体膜电位;ELISA检测炎症因子血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和IL-10水平;Western blot检测胞质内磷酸化线粒体动力相关蛋白(p-Drp1)蛋白的表达;试剂盒检测氧化应激标记物SOD、MDA和LDH的含量。结果 与对照组相比,单纯EA组的各项检测指标差异无统计学意义。而与对照组相比,模型组大鼠表现出体重降低($P < 0.01$);糖水偏好降低($P < 0.01$);血清促炎症因子IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平增加;脑组织损伤加重;p-Drp1表达减少($P < 0.01$);脑组织氧化应激水平增加($P < 0.01$);而治疗组表现出治疗作用,能回救CUMS造成的上述病理损伤。结论 松果菊苷可减轻CUMS抑郁症模型大鼠线粒体损伤。

【关键词】 抑郁症;CUMS;松果菊苷;线粒体损伤;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0063-07

Effect of echinacoside on mitochondrial damage in a rat model of depression

YUE Lingfeng¹, MA Jing^{2*}, WANG Ning³

(1. the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, 4th Department, Xinxiang 453002, China.
2. the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Department of Mood Disorder, Xinxiang 453002.
3. the Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, 3th Department, Xinxiang 453002)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of echinacoside (EA) on mitochondrial injury in rats with depression. **Methods** Sprague-Dawley rats were divided into five groups of control, EA, model, treatment, and fluoxetine groups. A rat model of depression was constructed with chronic unpredictable mild stress (CUMS). Rats in the treatment group were intraperitoneally injected with EA mg/(kg·d). The weight of the rats was recorded, and the sugar water preference index was detected to evaluate the behavior of the rats. Hematoxylin and eosin staining was used to detect damage of brain tissue. Apoptosis of brain cells was detected by TUNEL assay. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 method. Serum interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α , and IL-10 (inflammatory cytokines) levels were detected by ELISA. Expression of phosphorylated mitochondrial dynamic associated protein (p-Drp1) in the cytoplasm was detected by Western blot. The content of superoxide dismutase, malondialdehyde, and lactate dehydrogenase, which

[基金项目]河南省科技攻关项目(182102310242)。

[作者简介]岳凌峰(1984—),女,硕士,医师,研究方向:精神病学与精神卫生。E-mail: vmiv03617@sina.cn

[通信作者]马敬(1982—),男,硕士,副主任医师,研究方向:西医精神病学。E-mail: mj49363412@163.com

are markers of oxidative stress, was detected by kits. **Results** There were no significant differences in the detection index in the EA group compared with the control group. The model group showed weight loss compared with the control group ($P < 0.01$). Sugar water preference was lower ($P < 0.01$), serum levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α were higher, and levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were lower in the EA group than in the control group (all $P < 0.01$). Brain tissue injury was aggravated, p-Drp1 expression was lower ($P < 0.01$), and oxidative stress in brain tissue was higher in the EA group than in the control group (all $P < 0.01$). However, the treatment group showed therapeutic effects and the above-mentioned pathological injuries caused by CUMS recovered. **Conclusions** EA can alleviate mitochondrial injury in rats with CUMS.

【Keywords】 depression; chronic unpredictable mild stress(CUMS); echinacoside; mitochondrial damage; rat

目前,随着中国老年人口数量日益突出,人们的健康问题已经从传染性疾病逐渐转变为慢性疾病,如高血压、糖尿病和抑郁症等^[1]。抑郁症是一个重要的公共卫生问题,它会增加其他疾病的发病率、自杀风险增加、身体、认知和社会功能下降,最后增加死亡率^[2]。目前抗抑郁药临床上已应用很多,如抗惊厥药、神经阻滞剂、单胺氧化酶抑制剂等,但这些药物容易对人体产生副作用^[3]。因此迫切需要寻找疗效确切,毒副作用小的抗抑郁药物。松果菊苷(echinacoside, EA),又名淫羊藿苷,从肉苁蓉中分离出的一种活性物质,化学成分是苯乙烷苷。松果菊苷具有广泛的生物活性,如清除自由基、抗氧化和抗炎作用^[4]。研究表明,松果菊苷可改善 5-Fu 抑制的小鼠的骨髓造血功能^[5];松果菊苷可以改善心肌细胞缺氧/复氧损伤^[6];松果菊苷通过抑制淀粉样蛋白沉积,改善淀粉样 β 肽引起的记忆障碍和胆碱能缺陷^[7];基于胃肠道代谢,松果菊苷具有改善抑郁症症状的作用^[8]。但松果菊苷对抑郁症的具体作用机制还未见报道。本文旨在研究松果菊苷对抑郁症模型大鼠的影响,以期松果菊苷临床应用治疗抑郁症提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

50 只 4~6 周龄清洁级雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠,140~150 g,购自中国科学院实验动物中心[SCXK(沪)2015-0004]。实验前一周,大鼠可以自由获得食物和水来适应环境。均饲养于新乡医学院第二附属医院动物中心 SPF 环境[SYXK(豫)2018-0014],饲养环境保持在温度 22℃左右,相对湿度约 55%~60%,12 h 昼夜交替。本研究通过新乡医学院第二附属医院动物伦理委员会动物伦理审查(IACUC-20190205-03),实验过程中依照 3R 原则给予所有动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

EA(货号:S3783)购自 Selleck chem,母液用 DMSO 配制,使用时用生理盐水稀释;聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒(货号:CUS531)、PVDF 膜(货号:ISEQ00010)和 ECL 化学发光试剂盒(货号:WBKLS0500)购自美国 Millipore 公司;氟西汀购自美国 Sigma-Aldrich;膜蛋白、核蛋白和胞质蛋白抽提试剂盒(货号:NO.C510002)购自上海生工生物工程公司;Drp1(货号:ab56788)、p-Drp1(货号:ab193216)兔多克隆抗体购自英国 ABCAM 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(货号:sc-2004)购自美国 Santa Cruz 公司;大鼠 IL-6(货号:D6050)、IL-1 β (货号:201-LB-005)、TNF- α (货号:210-TA-005)和 IL-10(货号:M1000B)ELISA 试剂盒购自美国 R&D Systems 公司;丙二醛(Malondialdehyde,MDA)(货号:A003-1-2)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)(货号:A020-2-2)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)(货号:A001-3-2)试剂盒购自南京建成生物技术研究所;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号:C1091)购自上海碧云天生物技术公司;Multiskan™ FC 酶标仪(货号:1410101)购自美国 Thermo Fisher 公司;BX43 显微镜购自日本 Olympus;Chemidoc MP 化学发光成像系统(货号:1708280)购自美国 Biorad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型制备

50 只大鼠首先在笼子里饲养,(5 只大鼠/笼)可自由取食物和水 3 d,以适应昼夜节律。将大鼠随机平均分为对照组和抑郁模型组。对照组大鼠正常饲养,密度为 5 只/笼。抑郁模型组大鼠饲养密度为 1 只/笼,采用 Willner 报道的方法构建抑郁模型^[9]。模型组的大鼠受到 14 类型的不同刺激,包括颠倒白天/黑夜(24 和 48 h),重复 45 度倾斜鼠笼(每隔 4、12 和 24 h),断水(6~12 h),缺食物(12~24 h),噪音(金属冲突 2 h 和大鼠大声叫嚷 2 h),湿

垫,外来异物,无垫(6 h),尾巴夹紧(轻微),同笼,水平振动,笼子交换和喂养环境变化。每只大鼠每天接受一种方法的刺激,且第 2 天不重复,并在笼子里单独饲养 35 d。从第 4 周开始,观察总指标(体重、饮料量和食物量)和糖水摄入量百分比。将 20 只对照组大鼠随机分成对照组和单纯 EA 组;腹腔内注射 EA 30 mg/(kg·d),连续 35 d;将 30 只模型组大鼠随机分成模型组、治疗组和氟西汀组;治疗组腹腔内注射 EA 30 mg/(kg·d),氟西汀组灌胃氟西汀 20 mg/(kg·d)^[10],连续 35 d;对照组和模型组注射等量的 DMSO。

1.3.2 糖水偏好实验(Sucrose preference test, SPT)

让大鼠习惯于饮用两瓶 1%蔗糖溶液 24 h,第 2 天用清水更换其中 1 瓶蔗糖溶液。经过 24 h 后禁食、禁水后,允许大鼠饮用 1%的蔗糖溶液(100 mL)和等量的水 3 h。糖水偏好指数% = 蔗糖水消耗量/(纯水消耗量+蔗糖水消耗量)×100%。

1.3.3 ELISA

取各组大鼠血清,96 孔板布局,绘制标准曲线。标准浓度是以 1:3 稀释的最高标准。用标准曲线测定样品浓度。根据说明书操作步骤,反应孔加入样品 50 μL,37℃ 孵育 40 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 2 min,然后加入生物素标记的抗体 37℃ 避光孵育 30 min,洗涤 3 次后加入链霉亲和素混匀,37℃ 避光孵育 30 min,最后加入显色剂避光显色 15 min,加入终止液终止反应,终止反应后于酶标仪 450 nm 处检测 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 IL-10 吸光值。

1.3.4 HE 染色

将各组大鼠脑海马区组织进行石蜡切片,厚度为 4 mm,用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素染色,水洗,盐酸乙醇分化,水洗蓝化,伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在显微镜下观察组织并拍照。

1.3.5 TUNEL 染色

将各组大鼠脑海马区组织切片进行脱蜡、水合、透明处理,在标本上分别加入 TUNEL 反应混合液,加入盖玻片反应 1 h,随后用 PBS 溶液漂洗 3 次,加入 DAB 底物反应 10 min 后漂洗 3 次后用荧光显微镜观察凋亡细胞形态。TUNEL 阳性细胞核在镜下呈现棕色,正常细胞为蓝色。于荧光显微镜下随机选取 5 个视野统计 TUNEL 阳性细胞及细胞总数,细胞凋亡率(%) = TUNEL 阳性细胞/总细胞数×100%。

1.3.6 流式分选检测线粒体膜电位

将各组大鼠脑组织细胞接种于 6 孔板后用 PBS

清洗 3 次,孵育 24 h,加入 JC-1(5 μg/mL)室温避光反应 30 min。用流式分选仪检测,记录红色和绿色荧光强度。

1.3.7 Western blot

根据说明书,提取脑组织中细胞质蛋白;200 mg 脑组织剪切成小块,加入适量的冰冷 PBS 洗涤两次后,4℃ 离心 3000 r/min,3 min,弃上清;收集的组织的加入 1000 μL 预冷的溶液 A(使用前每 1 mL 溶液 A 加入 1 μL DTT,10 μL PMSF,1 μL 蛋白酶抑制剂和 5 μL 磷酸酶抑制剂),研磨组织;涡旋震荡 10 s,冰上放置 20 min,期间取出震荡 3~5 次,于 4℃ 下 12000 r/min 离心 10 min,上清为胞质蛋白部分。取等量胞质蛋白与适量 Loading buffer 混合,100℃ 水浴 10 min;经 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭后,采用一抗 anti-P-Drp1 进行孵育,4℃ 过夜,TBST 溶液洗涤 3 次后采用标记 HRP 的二抗进行孵育,1.5 h 后加入发光液,显色处理,并统计灰度值,计算相应蛋白表达量,实验重复 3 次。

1.3.8 氧化应激检测

取各组大鼠脑组织,用商业化试剂盒根据说明书检测 MDA、LDH 和 SOD 的浓度。

1.4 统计学方法

本文所有对比实验数据用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较用独立的 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 松果菊苷增加抑郁症大鼠体重增长和糖水偏嗜度

与对照组(179±19)g 相比,模型组(90±18)g 大鼠建模 2 个月后平均增加体重远低于对照组,大约减少 89.0 g;且模型组大鼠糖水偏嗜度减少,约减少 33.3%。同时用松果菊苷处理治疗组表现出增加模型大鼠增重和糖水偏嗜度(见图 1),与模型组相比,治疗组(149±14)g 大鼠体重平均增加 59.5 g,糖水偏嗜度平均增加 24.2%,氟西汀组大鼠平均体重增加 70.5 g,糖水偏嗜度平均增加 28.1%。

2.2 松果菊苷降低抑郁症大鼠炎症细胞因子

单纯 EA 组与对照组细胞因子浓度差异无统计学意义;与对照组相比,模型组促炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平增加(*F* = 64.51、25.87、3.989,*P*<0.01),抗炎因子 IL-10 水平差异无统计学意义;与模型组相比较,治疗组和氟西汀组促炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平下降(*t* =

2.526、2.391、8.283 和 1.792、1.943、7.839, $P < 0.01$), 抗炎因子 IL-10 水平增加 ($F = 3.000$ 、3.667, $P < 0.01$)。见图 2。

2.3 松果菊苷改善抑郁症大鼠脑损伤, 减少脑组织细胞凋亡

单纯 EA 组与对照组脑损伤差异无统计学意义, 说明 EA 对正常大鼠无细胞毒性。模型组相较于对照组大鼠脑海马区组织出现大量空泡、染色质浓缩、边缘化, 细胞凋亡率升高 ($F = 92.84$, $P < 0.01$); 与模型组相比较治疗组和氟西汀组大鼠脑海马区组织损伤程度减轻, 空泡减少, 细胞凋亡率降低 ($t = 2.034$ 、1.933, $P < 0.01$)。见图 3。

2.4 松果菊苷降低抑郁症大鼠脑线粒体膜电位

通过流式分选检测细胞线粒体膜电位的变化, 与对照组相比, 模型组线粒体膜电位升高 ($F = 202.03$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 治疗组和氟西汀组线粒体膜电位降低 ($t = 3.486$ 、2.074, $P < 0.01$)。见图 4。

2.5 松果菊苷改善抑郁症大鼠脑线粒体损伤

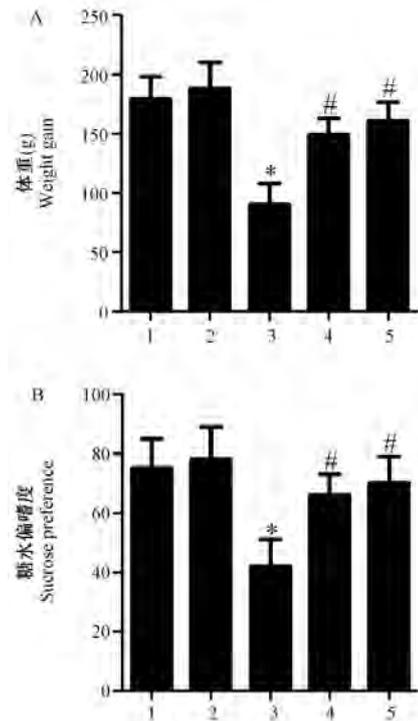
通过 Western blot 检测线粒体损伤标志物表达情况, 与对照组相比, 模型组胞质内磷酸化线粒体动力相关蛋白 (p-Drp1 蛋白) 表达水平降低 ($F = 94.82$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 治疗组和氟西汀组 p-Drp1 蛋白提高 ($t = 1.200$ 、1.188, $P < 0.01$)。见图 5。

2.6 松果菊苷改善抑郁症大鼠脑氧化应激损伤

与对照组相比, 模型组胞质内乳酸脱氢酶 (LDH) 和丙二醛 (MDA) 水平增加 ($F = 15.93$ 、66.01, $P < 0.01$), 超氧化物歧化酶 (SOD) 水平降低 ($F = 4.503$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 治疗组和氟西汀组 LDH 和 MDA 水平下降 ($t = 5.154$ 、3.815 和 4.778、3.952, $P < 0.01$), SOD 水平提高 ($t = 6.133$ 、6.500, $P < 0.01$)。见图 6。

3 讨论

抑郁症是一种慢性情绪障碍疾病。抑郁症的形成原因多种多样, 比如压力和创伤、吸烟、饮食不规律、缺乏锻炼、睡眠状况、牙周疾病以及糖尿病等^[11]。CUMS 是其中一种抑郁症动物模型, 即低水平的慢性性和不可预测的应激源, 类似于人类在日常生活中可能经历的刺激, 会在脆弱的个体中诱发抑郁^[9]。CUMS 会导致一系列行为缺陷, 包括蔗糖偏好降低、奖励刺激动机减少、性行为以及攻击性增加、焦虑样行为和睡眠模式改变。研究表明, CUMS 在雄性和雌性大鼠中均诱导了类似抑郁的表型^[12]。

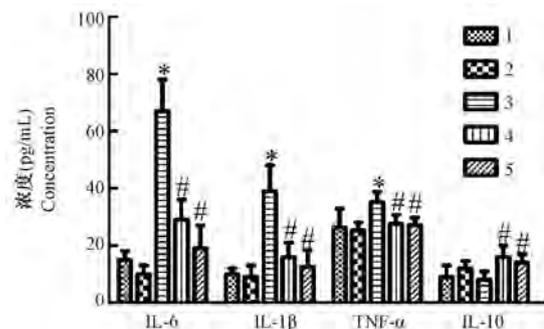


注: A: 各组大鼠体重增长直方图; B: 各组大鼠糖水偏嗜度直方图。1: 对照组; 2: 单纯 EA 组; 3: 模型组; 4: 治疗组; 5: 氟西汀组。与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

图 1 松果菊苷增加抑郁症大鼠体重增长和糖水偏嗜度

Note. A, Weight gain histogram of rats in each group. B, Histogram of sugar water preference of rats in each group. 1, Control group. 2, Simple EA group. 3, Model group. 4, Treatment group. 5, Fluoxetine group. Compared with Control group, * $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.01$.

Figure 1 EA increased weight gain and sugar water preference in depressed rats

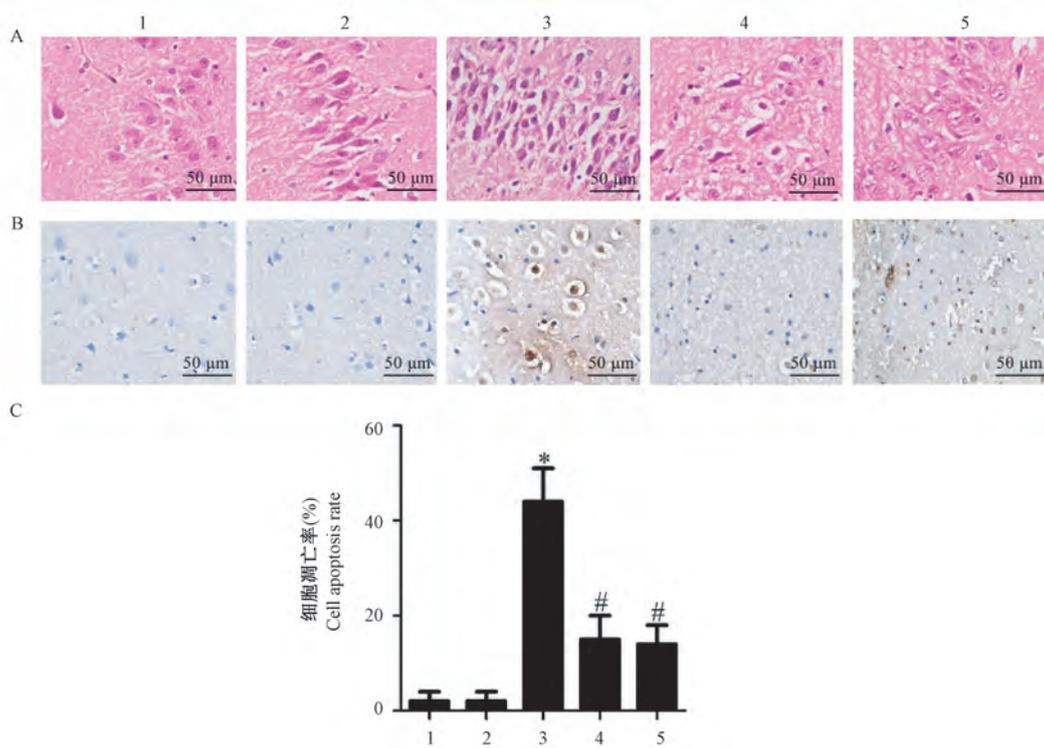


注: 1: 对照组; 2: 单纯 EA 组; 3: 模型组; 4: 治疗组; 5: 氟西汀组。与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

图 2 松果菊苷对抑郁症大鼠炎症细胞因子 IL-6、IL-1β、TNF-α、IL-10 水平的影响

Note. 1, Control group. 2, Simple EA group. 3, Model group. 4, Treatment group. 5, Fluoxetine group. Compared with Control group, * $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.01$.

Figure 2 EA Effects of EA on levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1β, TNF-α and IL-10 in depressed rats

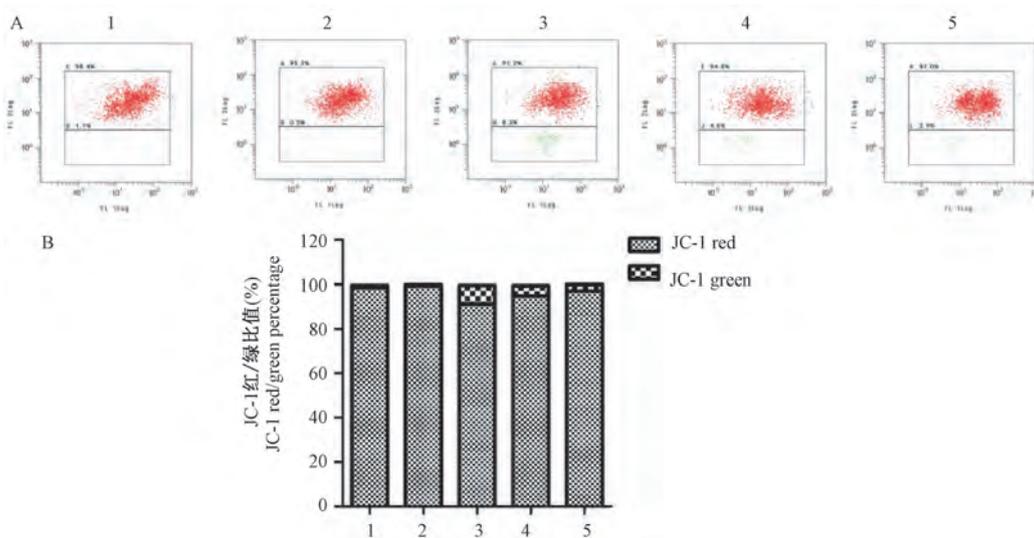


注:A:HE染色检测各组大鼠脑组织损伤;B:TUNEL染色检测各组大鼠脑组织细胞凋亡;C:各组大鼠脑组织细胞凋亡率直方图。1:对照组;2:单纯EA组;3:模型组;4:治疗组;5:氟西汀组。与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$ 。

图3 松果菊苷改善抑郁症大鼠脑损伤

Note. A, He staining was used to detect brain tissue damage in each group. B, TUNEL staining was used to detect the apoptosis of brain tissue cells in each group. C, Histogram of apoptosis rate in brain groups of rats. 1, Control group. 2, Simple EA group. 3, Model group. 4, Treatment group. 5, Fluoxetine group. Compared with Control group, * $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.01$.

Figure 3 EA improves brain damage in depressed rats

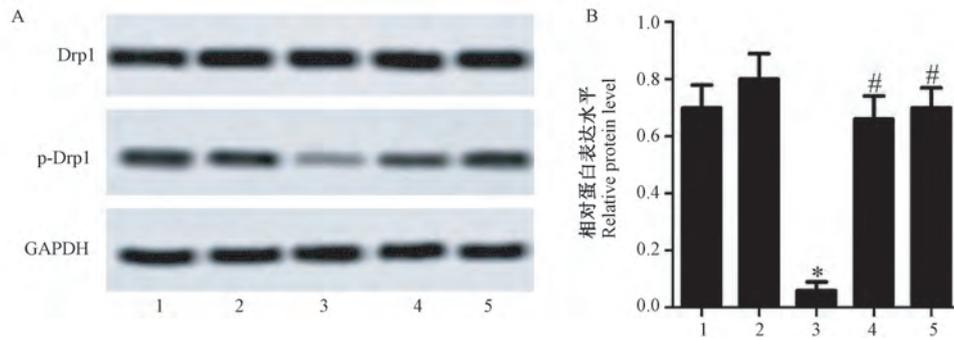


注:A:流式分选检测各组大鼠线粒体膜电位的变化;B:各组大鼠JC-1红/绿比值。1:对照组;2:单纯EA组;3:模型组;4:治疗组;5:氟西汀组。与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$ 。

图4 松果菊苷降低抑郁症大鼠脑线粒体膜电位

Note. A, The changes of mitochondrial membrane potential in each group were detected by flow sorting. B, Red/green ratio of JC-1 in each group. 1, Control group. 2, Simple EA group. 3, Model group. 4, Treatment group. 5, Fluoxetine group. Compared with Control group, * $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.01$.

Figure 4 EA decreased mitochondrial membrane potential in depressed rats

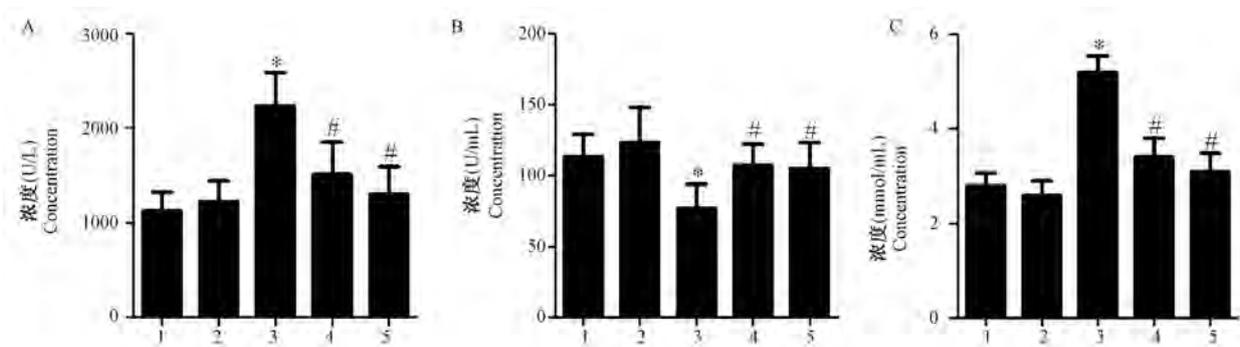


注:A:Western blot 检测线粒体损伤标志物表达;B:p-Drp1 蛋白表达直方图。1:对照组;2:单纯 EA 组;3:模型组;4:治疗组;5:氟西汀组。与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

图 5 松果菊苷改善抑郁症大鼠脑线粒体损伤

Note. A, The expression of mitochondrial injury markers was detected by Western blot. B, Histogram of p-Drp1 protein expression. 1, Control group. 2, Simple EA group. 3, Model group. 4, Treatment group. 5, Fluoxetine group. Compared with Control group, * $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.01$.

Figure 5 EA reduced mitochondrial injury in depressed rats



注:A:各组大鼠 LDH 水平直方图;B:各组大鼠 SOD 水平直方图;C:各组大鼠 MDA 水平直方图。1:对照组;2:单纯 EA 组;3:模型组;4:治疗组;5:氟西汀组。与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.01$ 。

图 6 松果菊苷改善抑郁症大鼠脑氧化应激损伤

Note. A, Histogram of LDH level in each group. B, histogram of SOD level of rats in each group. C, Histogram of MDA level in each group. 1, Control group. 2, Simple EA group. 3, Model group. 4, Treatment group. 5, Fluoxetine group. Compared with Control group, * $P < 0.01$. Compared with Model group, # $P < 0.01$.

Figure 6 EA reduced oxidative stress injury in depressed rats

本研究采用了 14 种不同类型的轻度刺激,诱导了成年雄性大鼠抑郁模型。结果表明,模型大鼠体重减少,蔗糖偏好降低。

松果菊苷已经被证明具有增强肾功能、治疗血栓、阳痿、早泄和男性不育症,且有助于减轻老年人便秘^[13]。炎症是抑郁症的重要病因之一,抑郁症患者具有炎症反应的所有主要特征,包括促炎症细胞因子及其受体的表达增加以及急性期反应物、趋化因子和可溶性粘附分子在外周血和脑脊液中的水平增加^[14]。

冯磊等^[15]研究发现抑郁症患者血浆 BDNF 降低,IL-6、IL-1 抑上升,参与抑郁症的发生发展过程。IL-10 是 Th2 细胞分泌的一种多功能性细胞因子,起

免疫抑制作用^[16]。本文研究表明,松果菊苷具有治疗抑郁症的潜力。研究表明松果菊苷可以减轻炎症,从而减轻脂多糖诱导的急性肝损伤和肠炎^[17-18]。与上述文献一致,本研究也证实了松果菊苷抗炎的特性。实验证明松果菊苷可以降低炎症因子如 IL-6、IL-1 水平,增加抗炎细胞因子 IL-10 水平,说明松果菊苷可能通过减少炎症反应缓解大鼠抑郁症。

线粒体异常是抑郁症的常见发病机制,线粒体在能量代谢中起着重要作用^[19]。众所周知,线粒体氧化磷酸化系统产生自由基,电子传递链本身易受到自由基的损伤^[20]。由于线粒体 DNA 不受组蛋白的保护,线粒体在 ATP 合成过程中产生活性氧,因而容易发生氧化损伤^[21]。线粒体损伤是由生化级

联的改变引起的,电子传递链的损伤被认为是一系列精神障碍的重要因素,如重度抑郁障碍(MDD)^[22-23]。LDH、MDA 和 SOD 是氧化应激的标志物,含量高低可反映细胞氧化应激损伤程度^[24]。发动蛋白相关蛋白 1 (dynammin-related protein 1, Drp1) 在细胞新陈代谢、凋亡和线粒体自噬中发挥重要作用,当神经元线粒体功能异常,导致神经元损伤和突触联系建立异常^[25]。研究表明,松果菊苷可以减少 ROS 的产生来保护 PC12 细胞中由 6-羟多巴胺引起的线粒体功能障碍和炎症反应^[26]。本文研究表明,松果菊苷可以降低抑郁症大鼠线粒体膜电位、氧化应激水平和线粒体损伤,体现在松果菊苷抑制 MDA 和 LDH,增加 SOD 和 p-Drp1 蛋白。

综上所述,松果菊苷可以减少炎症反应、降低抑郁症大鼠氧化应激水平和线粒体损伤,从而缓解大鼠抑郁症。本研究表明松果菊苷可能成为抗抑郁的潜在药物。

参考文献:

- [1] 杨展,刘银,张文婕,等.中老年视力障碍患者抑郁症状及其影响因素研究[J].四川大学学报(医学版),2018,49(1):81-86.
- [2] 王爱华,王娟,甘博文.抑郁症的中医药治疗研究进展[J].解放军医药杂志,2019,31(6):112-116.
- [3] 赵铁梅,陈静,徐海涛.老年抑郁症常用治疗药物研究进展[J].解放军医药杂志,2018,30(8):113-116.
- [4] 郑若梅,夏良斌,汪晶,等.松果菊苷促进卵巢癌模型裸鼠存活,降低肿瘤增殖和转移[J].医学分子生物学杂志,2019,16(2):157-162.
- [5] Wang S, Zheng G, Tian S, et al. Echinacoside improves hematopoietic function in 5-flu-induced myelosuppression mice [J]. Life Sci, 2015, 123: 86-92.
- [6] Chen M, Wang X, Hu B, et al. Protective effects of echinacoside against anoxia/reperfusion injury in H9c2 cells via up-regulating p-AKT and SLC8A3 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 52-59.
- [7] Shiao YJ, Su MH, Lin HC, et al. Echinacoside ameliorates the memory impairment and cholinergic deficit induced by amyloid beta peptides via the inhibition of amyloid deposition and toxicology [J]. Food Funct, 2017, 8(6): 2283-2294.
- [8] 彭颖,李瑒,李晓波.肉苁蓉的抗抑郁活性及体内外代谢[J].世界科学技术-中医药现代化,2018,20(8):1351-1356.
- [9] Willner P. Chronic mild stress (cms) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of cms [J]. Neuropsychobiology, 2005, 52(2): 90-110.
- [10] 邓海峰,孙纛利,陈浩,等.毛蕊花糖苷对抑郁症大鼠行为学和前额叶皮层内质网应激的影响[J].中国病理生理杂志,2018,34(1):101-106.
- [11] 岳凌峰,仲照希,马敬,等.奥氮平通过抑制 NLRP3 炎症小体激活对抑郁症模型大鼠海马神经元的保护作用[J].四川大学学报(医学版),2019,50(5):672-678.
- [12] Grippo AJ, Sullivan NR, Damjanoska KJ, et al. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1a receptor function, in male and cycling female rats [J]. Psychopharmacology (Berl), 2005, 179(4): 769-780.
- [13] 胡凤霞,孙元平,刘雅芳,等.松果菊苷对链脲佐菌素所致糖尿病肾病模型大鼠肾脏的保护作用[J].国际中医中药杂志,2020,42(9):876-881.
- [14] Chen MH, Li CT, Lin WC, et al. Rapid inflammation modulation and antidepressant efficacy of a low-dose ketamine infusion in treatment-resistant depression: A randomized, double-blind control study [J]. Psychiatry Res, 2018, 269: 207-211.
- [15] 冯磊,邵明阳,胡屹伟.血浆 BDNF、IL-6 及 IL-1 水平与抑郁症的相关性研究[J].临床误诊误治,2020,33(1):92-95.
- [16] 张韶斌,陈斯亮,符青松,等.25-羟维生素 D3 与 IL-10 在系统性红斑狼疮中的临床应用研究[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(3):180-183,195.
- [17] Li L, Wan G, Han B, et al. Echinacoside alleviated lps-induced cell apoptosis and inflammation in rat intestine epithelial cells by inhibiting the mtor/stat3 pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 622-628.
- [18] Li X, Gou C, Yang H, et al. Echinacoside ameliorates D-galactosamine plus lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis and inflammation [J]. Scand J Gastroenterol, 2014, 49(8): 993-1000.
- [19] 陈杰,佟玲,朱亦峰.龙胆苦苷对卵巢癌细胞株 SKOV3 氧化应激损伤和细胞凋亡的影响及机制研究[J].医学分子生物学杂志,2019,16(2):125-130.
- [20] Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(2): C670-C686.
- [21] Yamada S, Nomoto S, Fujii T, et al. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma [J]. Eur J Surg Oncol, 2006, 32(3): 303-307.
- [22] Fattal O, Budur K, Vaughan AJ, et al. Review of the literature on major mental disorders in adult patients with mitochondrial diseases [J]. Psychosomatics, 2006, 47(1): 1-7.
- [23] Bahar S, Fayuk D, Somjen GG, et al. Mitochondrial and intrinsic optical signals imaged during hypoxia and spreading depression in rat hippocampal slices [J]. J Neurophysiol, 2000, 84(1): 311-324.
- [24] 王彦利,李纪明,罗进光.miR-137 靶向下调 SETD7 表达对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激的影响研究[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(6):462-467.
- [25] 郝希纯,王东明.Drp1 蛋白调节线粒体分裂机制及其在疾病中的作用[J].广东医学,2011,32(8):1066-1069.
- [26] Wang YH, Xuan ZH, Tian S, et al. Echinacoside protects against 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial dysfunction and inflammatory responses in pc12 cells via reducing ros production [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 189239.

[收稿日期]2020-03-26

陈琳,周知,马宁,等. mmu-miR-672-5p 调控大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 70-76.

Chen L, Zhou Z, Ma N, et al. Mechanism of mmu-miR-672-5p in regulating apoptosis of placental chorionic trophoblast cells in rat [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 70-76.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.011

mmu-miR-672-5p 调控大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞 凋亡的机制

陈琳*, 周知, 马宁, 周璟

(海南省妇女儿童医学中心生殖医学中心, 海口 570206)

【摘要】 目的 探讨 mmu-miR-672-5p 调控大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡的分子机制。方法 过表达或敲低 mmu-miR-672-5p 后,检测大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平。过表达或敲低 mmu-miR-672-5p 后,通过 RNA-seq 检测 mmu-miR-672-5p 调控的基因。设定阈值后,通过 siRNA 敲低相关基因后,检测大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平。通过荧光素酶报告实验验证 mmu-miR-672-5p 是否靶向此基因。过表达此基因后,通过免疫印迹检测 CLEAVED-CAS3 的表达水平,以及大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平。结果 过表达 mmu-miR-672-5p 后,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平下降($P<0.05$);敲低 mmu-miR-672-5p 后,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平上升($P<0.05$)。分别敲低和过表达 mmu-miR-672-5p 后,高通量测序发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞中多种基因的表达被调节,包括 *Zfp229*、*Zfp503*、*Slc4a5*、*Stk24*、*Tmem106b*、*Bax*、*Adgrb3*、*Tmem63b*、*Pmp22*、*Mroh2a*、*Dsn1*、*Pramef25*、*Naaladl2*、*Clk2*、*Stx16*、*Usp28*、*Clint1*、*Jph4*、*Msl2*、*Krtap8-1*、*Pkp2*、*Mllt3*、*Rai14*。敲低上述基因后,发现仅敲低 *Bax* 时,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平下降($P<0.05$)。过表达 *Bax* 后, CLEAVED-CAS3 的表达水平上升,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平上升($P<0.05$)。过表达 mmu-miR-672-5p 后, *Bax* 的 mRNA 和蛋白水平均下降($P<0.05$);敲低 mmu-miR-672-5p 后, *Bax* 的 mRNA 和蛋白水平均上升($P<0.05$)。此外, mmu-miR-672-5p 靶向 *Bax* 的 3 端非编码区($P<0.05$)。同时过表达 mmu-miR-672-5p 和 *Bax* 后,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平无显著变化($P>0.05$);同时敲低 mmu-miR-672-5p 和 *Bax* 后,发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平无显著变化($P>0.05$)。结论 mmu-miR-672-5p 通过靶向 *Bax* 的 3 端非编码区,降低了 *Bax* 的表达水平,随后抑制了大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡。

【关键词】 mmu-miR-672-5p; *Bax*; 大鼠; 胎盘绒毛膜滋养层细胞; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0070-07

Mechanism of mmu-miR-672-5p in regulating apoptosis of placental chorionic trophoblast cells in rat

CHEN Lin*, ZHOU Zhi, MA Ning, ZHOU Jing

(Hainan Provincial Medical Center for Women and Children Reproductive Medicine, Haikou 570206, China)

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism of mmu-miR-672-5p in regulating apoptosis of placental chorionic trophoblast cells in rat. **Methods** Apoptosis of placental chorionic trophoblast cells was detected after overexpression or knockdown of mmu-miR-672-5p. After overexpression or knockdown of mmu-miR-672-5p, the expression

[基金项目] 海南省重点研发计划(ZDYF2017086)。

[作者简介] 陈琳(1986—),女,主治医师,研究方向:生殖内分泌。E-mail: guoisour@163.com

of genes regulated by mmu-miR-672-5p was detected by RNA-seq. After setting the threshold and knocking down relevant genes by siRNA, the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis was determined. mmu-miR-672-5p targeting particular genes was verified by luciferase reporter assays. After overexpression of the gene of interest, the expression level of cleaved caspase 3 and the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis was determined by western blotting.

Results After overexpression of mmu-miR-672-5p, the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis decreased ($P < 0.05$). After mmu-miR-672-5p was knocked down, the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis was increased ($P < 0.05$). After knockdown or overexpression of mmu-miR-672-5p, high-throughput sequencing revealed the differential regulation of multiple genes in placental chorionic trophoblast cells, including *Zfp229*, *Zfp503*, *Slc4a5*, *Stk24*, *Tmem106b*, *Bax*, *Adgrb3*, *Tmem63b*, *Pmp22*, *Mroh2a*, *Dsn1*, *Pramef25*, *Naaladl2*, *Clk2*, *Stx16*, *Usp28*, *Clint1*, *Jph4*, *Msl2*, *Krtap8-1*, *Pkp2*, *Mllt3*, *Rai14*. After knocking down the above genes, only knockdown of Bax caused a decrease in the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis ($P < 0.05$). After overexpression of Bax, the level of cleaved caspase 3 and the level of the placental chorionic trophoblast cell apoptosis increased ($P < 0.05$). After overexpression of mmu-miR-672-5p, both the mRNA and protein levels of Bax decreased ($P < 0.05$). After mmu-miR-672-5p was knocked down, both mRNA and protein levels of Bax increased ($P < 0.05$). In addition, mmu-miR-672-5p targeted the 3'-non-coding region of Bax ($P < 0.05$). After simultaneous overexpression of mmu-miR-672-5p and Bax, there was no significant change in the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis ($P > 0.05$). After simultaneously knocking down mmu-miR-672-5p and Bax, there was no significant change in the level of placental chorionic trophoblast cell apoptosis ($P > 0.05$).

Conclusions mmu-miR-672-5p decreased Bax expression by targeting its 3'-non-coding region, and subsequently inhibited the apoptosis of placental chorionic trophoblast cells.

【Keywords】 mmu-miR-672-5p; Bax; rat; placental chorionic trophoblast cells in rat; apoptosis

胎盘的形成为哺乳动物怀孕至关重要,其形成需要对滋养细胞的精确调控^[1]。子宫内膜中的滋养层细胞经历母体蜕膜和子宫螺旋动脉的增殖,分化,凋亡和侵袭,从而参与血管重塑^[2]。滋养层细胞功能异常与不良妊娠并发症密切相关,包括先兆子痫,其特征是出现高血压,蛋白尿和水肿,这将会严重损害孕产妇的健康和胎儿的成长^[3]。因此,滋养层细胞功能的精确调节对于维持正常胎盘至关重要。有证据表明胎盘 miRNA 的异常表达与先兆子痫相关^[4]。miRNA 是小的非编码 RNA,主要在转录后水平上对靶基因的表达产生负调控^[5]。miRNA 在许多病理和生理过程(例如细胞生长和凋亡,器官发生和发育)中起重要作用^[6]。Pineles 等^[7]发现子痫前期患者胎盘中 miR-672-5p 表达异常。但是 miR-672-5p 的生理学功能仍然未知,其是否与细胞凋亡相关值得探索。基于此,本研究使用大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞作为研究对象,旨在探讨 mmu-miR-672-5p 调控大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞购自 procell(货号:CP-R182;批号:OI2HO3)。

1.2 主要试剂与仪器

Lipofectamine 3000 购自北京科博晟创生物技术有限公司(货号:L3000008;批号:367H-TCSE9P0);大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞完全培养基购自 procell(货号:CM-R182;批号:ZDJH23);pmir-glo utr1 质粒购自广州基旦生物科技有限公司(货号:JD190929001M;批号:C6XHL7QALI);mmu-miR-672-5p inhibitor、mmu-miR-672-5p mimics 均购自北京擎科合成;*Zfp229*、*Zfp503*、*Slc4a5*、*Stk24*、*Tmem106b*、*Bax*、*Adgrb3*、*Tmem63b*、*Pmp22*、*Mroh2a*、*Dsn1*、*Pramef25*、*Naaladl2*、*Clk2*、*Stx16*、*Usp28*、*Clint1*、*Jph4*、*Msl2*、*Krtap8-1*、*Pkp2*、*Mllt3*、*Rai14* 的 siRNA 均由吉凯基因合成;Bax 过表达质粒通过大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的 cDNA 克隆至 pCDNA3.1 表达载体上。逆转录试剂盒购自昆明皇宝商贸有限公司(货号:218161;批号:3YR6CWE7);2×SDS 蛋白电泳上样缓冲液购自武汉洁洋盛科技有限公司(货号:M337-5ML;批号:NH4KPG2DH6);双荧光素酶报告基因试剂盒购自武汉纯度生物科技有限公司(货号:CDLG-4997;批号:UJV93S3Z27);荧光定量 PCR 试剂盒购自上海兢蔚生物科技有限公司(货号:BL705A;批号:1VG4GA2N);TRIzol 试剂购自四川爱奇生物科技有限公司(货号:15596-026;批号:MA6-WP6CZCW8);Bax、GAPDH、CLEAVED-CAS3 的抗体购自 abcam(货号:ab32503、ab9482、ab2302;

批号: PNCER6SXJ5T58BC8、YN1J21A4YKBMXT07、ODQ7K45D03FMO7IC);二抗购自北京海科鸿创生物科技有限公司(货号:Y2011);ECL 化学发光系统 ChemiDoc™ XRS + 购自 Bio-rad 公司(型号:1708265);CFX96 Touch 荧光定量 PCR 检测系统购自 Bio-rad 公司(型号:1845096)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与转染

使用大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞完全培养基在 37°C, 5% CO₂ 的培养箱中培养大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞。每 2 d 更换一次培养基。将转染试剂与 mmu-miR-672-5p inhibitor、mmu-miR-672-5p mimics、Bax 质粒、siRNA (*Zfp229*、*Zfp503*、*Slc4a5*、*Stk24*、*Tmem106b*、*Bax*、*Adgrb3*、*Tmem63b*、*Pmp22*、*Mroh2a*、*Dsn1*、*Pramef25*、*Naaladl2*、*Clk2*、*Stx16*、*Usp28*、*Clint1*、*Jph4*、*Msl2*、*Krtap8-1*、*Plp2*、*Mllt3*、*Rai14*) 混合后在室温下孵育 15 min 后, 缓缓滴入大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞中。

1.3.2 免疫印迹

通过蛋白质印迹检测 BAX 和 CLEAVED-CAS3 的丰度。使用放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液裂解细胞。用 SDS-PAGE 分离总蛋白(30 μg), 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜与抗 BAX(1:1000 稀释), 抗 CLEAVED-CAS3(1:1000 稀释)或抗 GAPDH(1:1000 稀释)在 4°C 孵育过夜。然后将膜用 TBST 洗涤 3 次, 并与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:5000 稀释)孵育 1 h。使用增强的化学发光(ECL)试剂可视化蛋白质丰度。

1.3.3 荧光素酶报告实验

将 Bax 的 3 端非编码区克隆至 pmir-glo utr1 载体上, 作为 pmir-glo utr1-Bax-WT。将 Bax 的 3' 端非编码区做 G→C 突变后, 克隆至 pmir-glo utr1 载体上, 作为 pmir-glo utr1-Bax-MT。将大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞与 pmir-glo utr1-Bax-MT(800 ng)、pmir-glo utr1-Bax-WT(800 ng)、对照载体(800 ng)、TK Renilla 报告基因(8 ng)根据试剂盒说明, 使用 Lipofectamine 3000 进行转染。转染 48 h 后, 裂解了总细胞蛋白, 并使用双重荧光素酶测定系统检测了荧光素酶活性(萤火虫和海肾)。

1.3.4 Annexin-V 染色

经过不同处理后, 收集在 6 孔板上生长的漂浮大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞和胰蛋白酶分离的细胞, 并用 4°C 预冷的 1×PBS 洗涤。然后将细胞沉淀物用结合缓冲液重悬, 并根据试剂盒方案用 Annexin-V 染色。荧光显微镜观察。将实验组中凋

亡细胞的百分比与对照转染组进行比较。所有样品一式三份测量。

1.3.5 RNA-Seq

分别敲低和过表达 mmu-miR-672-5p 后, 抽取大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的总 RNA。RNA 样品被送到北京基因组研究所(中国深圳)进行商业性 RNA-Seq 服务和数据分析。使用 SOAPaligner/SOAP2 不匹配, 将干净的读段映射到 mouse 数据库。计算每个基因的纯净读数, 然后将其标准化为每百万分之一读数(kbKM), 该读数将读数与基因表达水平相关。利用 log₂ 比率来确定基因调控。选择 log₂ 比率为 -1 或 log₂ 比率为 1 的免疫基因进行进一步分析。

1.3.6 RNA 抽取与实时荧光定量 PCR

使用逆转录定量 PCR 对 mmu-miR-672-5p 和 Bax 的 mRNA 丰度进行定量。根据生产商的说明, 使用总 RNA 分离试剂从大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞中分离总 RNA。使用 Prime Script RT Master Mix 在 20 μL 反应中将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA。根据制造商的说明, 使用 cDNA 作为模板和 StepOne Plus 进行定量 PCR。使用针对 mmu-miR-672-5p 和 Bax 设计的引物扩增 10 μL 反应体积中的 1 μL cDNA。所有 mRNA 反应的 PCR 条件是: 在 95°C 初始变性 30 s、在 95°C 进行 5 s、在 62°C 进行 30 s 和 40 个循环。扩增方案后进行熔解曲线分析。将每个 mRNA 的丰度相对于每个样品中的 GAPDH 标准化。

1.4 统计学方法

所有统计分析均使用 SPSS 软件 20.0, 数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素组间比较采用单因素方差分析, 方差齐者采用 LSD 法比较, 方差不齐者采用 Tamhane' T2 法比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mmu-miR-672-5p 抑制大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡

如图 1 所示, 转染 mmu-miR-672-5p mimics 过表达 mmu-miR-672-5p 后, 发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平下降($P < 0.05$); 转染 mmu-miR-672-5p inhibitor 敲低 mmu-miR-672-5p 后, 发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平上升($P < 0.05$)。

2.2 mmu-miR-672-5p 在大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞调控多种基因表达

如图 2 所示, 分别敲低和过表达 mmu-miR-672-

5p 后,通过高通量测序发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞中多种基因的表达被调节,以 mmu-miR-672-5p inhibitor/mmu-miR-672-5p mimics Ratio 等于 2 为阈值,大于阈值的基因有 23 个,分别为 *Zfp229*、*Zfp503*、*Slc4a5*、*Stk24*、*Tmem106b*、*Bax*、*Adgrb3*、*Tmem63b*、*Pmp22*、*Mroh2a*、*Dsn1*、*Pramef25*、*Naaladl2*、*Clk2*、*Stx16*、*Usp28*、*Clint1*、*Jph4*、*Msl2*、*Krtap8-1*、*Pkp2*、*Mllt3*、*Rai14*。

2.3 Bax 促进大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡

通过 siRNA 敲低上述 23 个基因,发现当敲低 *Zfp229*、*Zfp503*、*Slc4a5*、*Stk24*、*Tmem106b*、*Bax*、*Adgrb3*、*Tmem63b*、*Pmp22*、*Mroh2a*、*Dsn1*、*Pramef25*、*Naaladl2*、*Clk2*、*Stx16*、*Usp28*、*Clint1*、*Jph4*、*Msl2*、*Krtap8-1*、*Pkp2*、*Mllt3*、*Rai14* 时,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平差异无显著性($P>0.05$);当敲低 Bax 时,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平下降($P<0.05$),见图 3。通过转染 Bax 质粒过表达 Bax,发现 CLEAVED-CAS3 的表达水平上升(图 4),大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平上升($P<0.05$)(图 4)。

2.4 mmu-miR-672-5p 靶向 Bax 的 3' 端非编码区

转染 mmu-miR-672-5p mimics 过表达 mmu-miR-672-5p 后,发现 Bax 的 mRNA 和蛋白水平均下降($P<0.05$);转染 mmu-miR-672-5p inhibitor 敲低 mmu-miR-672-5p 后,发现 Bax 的 mRNA 和蛋白水平均上升($P<0.05$),见图 5。通过荧光素酶报告系统,发现 mmu-miR-672-5p 靶向 Bax 的 3' 端非编码区($P<0.05$),见图 5。

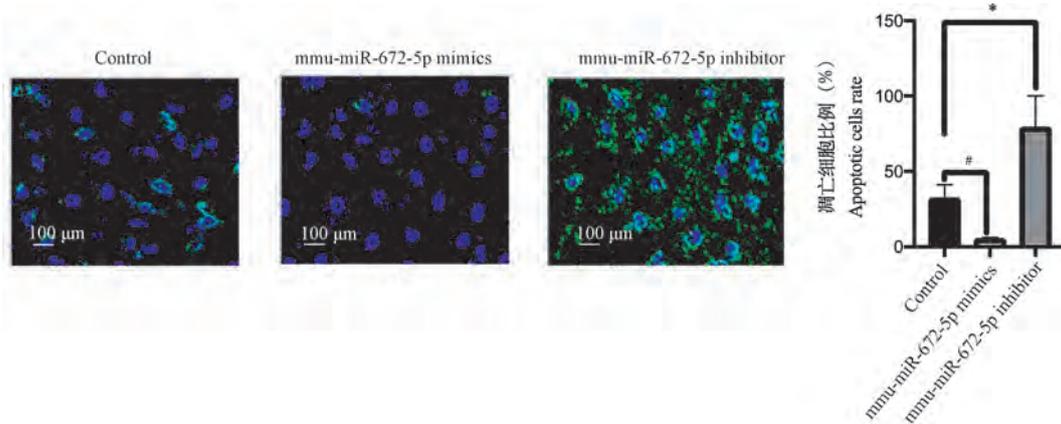
2.5 mmu-miR-672-5p/Bax 回补实验

同时过表达 mmu-miR-672-5p 和 Bax 后,发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平无显著变化($P>0.05$),见图 6;同时敲低 mmu-miR-672-5p 和 Bax 后,发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平无显著变化($P>0.05$),见图 6。

3 讨论

本研究通过过表达或敲低 mmu-miR-672-5p 体外培养的大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞,发现 mmu-miR-672-5p 抑制大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡。并通过 RNA-seq 和 RNAi 的方法发现 mmu-miR-672-5p 靶向 Bax 的 3' 端非编码区后,抑制了大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡。本研究发现了大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡的新机制,为治疗子痫前期患者提供了理论基础。

子痫前期是一种主要针对孕妇的主要高血压疾病,是全球孕产妇发病的主要原因^[8]。它的特征是新高高血压,以及妊娠 20 周后的蛋白尿^[9]。该病的原因可能与母亲、胎盘和/或胎儿相关,并且可能包括许多因素,例如免疫调节异常,内皮细胞损伤,遗传因素和营养因素^[10]。然而,没有任何一个因素可以令人满意地解释其原因和机制子痫前期。一些研究报道^[11],滋养层细胞凋亡发生在子痫前期中,并可能在疾病过程中起关键作用。提示人体内 mmu-miR-672-5p 的同源 miR-672-5p 可能在子痫前期中表达失调,并且在子痫前期的发生发展中起重要作用,但这需要进一步的验证。然而,miRNA 在



注:绿色染料:Annexin-V 阳性细胞的凋亡细胞;蓝色染料:dsDNA 阳性的细胞;mmu-miR-672-5p mimics 组与 Control 组比较, # $P<0.05$; mmu-miR-672-5p inhibitor 组与 Control 组比较, * $P<0.05$ 。

图 1 mmu-miR-672-5p 促进大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡

Note. Green dye, Annexin-V positive apoptotic cells. Blue dye, dsDNA cells. Comparison between the mmu-miR-672-5p Mimics group and the control group, # $P<0.05$. Comparison of mmu-miR-672-5p inhibitor group and control group, * $P<0.05$.

Figure 1 mmu-miR-672-5p promotes apoptosis of placental trophoblast cells in rats

子痫前期患者的滋养层细胞凋亡是否发挥主要的作用仍然值得进一步探究。

miRNA 是小的非编码 RNA 分子 (19~22 nt), 参与靶标 mRNA 的转录后调控^[12]。先前的研究表明^[13], miRNA 与许多生物学和病理学过程密切相关, 包括细胞增殖, 凋亡, 肿瘤发生, 以及多种疾病。越来越多的证据表明^[14], 有许多 miRNA 参与了子痫前期。目前^[15], 已知至少有 500 种不同的 miRNA 在胎盘滋养细胞中表达。越来越多的证据表明^[16], miRNA 在子痫前胎盘中表达异常, 并与子痫前期密切相关。在这项研究中, 过表达 mmu-miR-672-5p 后, 大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平下降 ($P < 0.05$); 敲低 mmu-miR-672-5p 后, 大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平上升 ($P < 0.05$)。Pineles 等^[7] 发现子痫前期患者胎盘中 miR-672-5p 表达异常。因此, mmu-miR-672-5p 同源 miRNA miR-672-5p 的异常表达可能是使子痫前期滋养层细胞凋亡的关键分子。分别敲低和过表达 mmu-miR-672-5p 后, 高通量测序发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞中多种基因的表达被调节, 包括 *Zfp229*、*Zfp503*、*Slc4a5*、*Stk24*、*Tmem106b*、*Bax*、*Adgrb3*、*Tmem63b*、*Pmp22*、*Mroh2a*、*Dsn1*、*Pramef25*、*Naaladl2*、*Clk2*、*Stx16*、*Usp28*、*Clint1*、*Jph4*、*Msl2*、*Krtap8-1*、*Pkp2*、*Mllt3*、*Rai14*。敲低上述基因后, 发现仅在敲低 *Bax* 时, 大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平下降 ($P < 0.05$)。但是, 除了 *Bax* 基因, 其他潜在受 mmu-miR-672-5p 调控的基因是否在子痫前期发生进展中发挥其他的作用仍值得进一步探究, 包括细胞生长、器官发生和发育。同时, 本研究只选取了 mmu-miR-672-5p inhibitor/mmu-miR-672-5p mimics Ratio

大于 2 的基因来进行凋亡相关作用的研究, 至于其他被 Ratio 的基因是否在细胞凋亡中发挥作用值得进一步探讨。此外, mmu-miR-672-5p 靶向 *Bax* 的 3 端非编码区 ($P < 0.05$)。过表达 mmu-miR-672-5p 后, *Bax* 的 mRNA 和蛋白水平均下降 ($P < 0.05$); 敲低 mmu-miR-672-5p 后, *Bax* 的 mRNA 和蛋白水平均上升 ($P < 0.05$)。因此, mmu-miR-672-5p 通过与 *Bax* 的 mRNA 形成双链 RNA 后, *Bax* 的 mRNA 被降解, 随后 *Bax* 蛋白的表达水平下降。

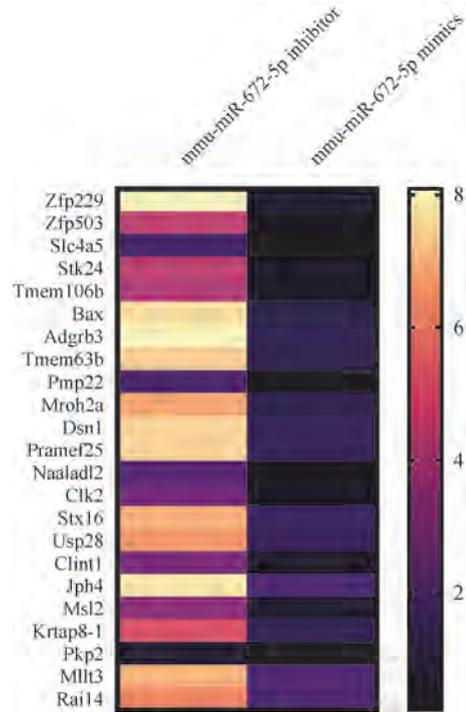
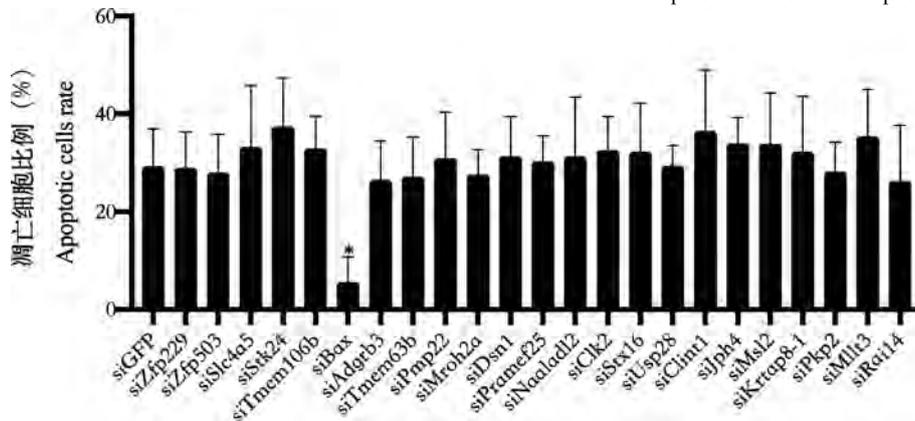


图 2 mmu-miR-672-5p 在大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞调控多种基因于表达

Figure 2 Expression based regulation of mmu-miR-672-5p in rat placental chorionic trophoblasts

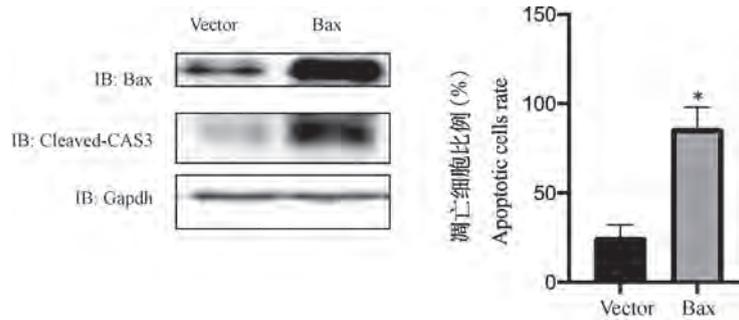


注: siBax 组与 siGFP 比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 敲低相关基因后, 大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平

Note. Comparison between siBax group and siGFP group, * $P < 0.05$.

Figure 3 apoptosis level of trophoblast cells in placenta of rats after knockdown of related genes

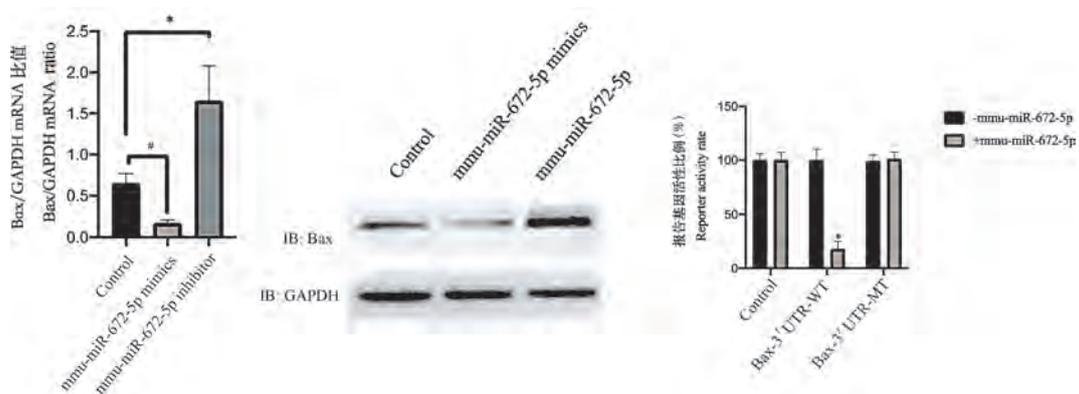


注: Bax 组与 Vector 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 Bax 促进大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡

Note. Comparison between Bax group and Vector group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Bax promotes apoptosis of trophoblast cells in placenta of rats

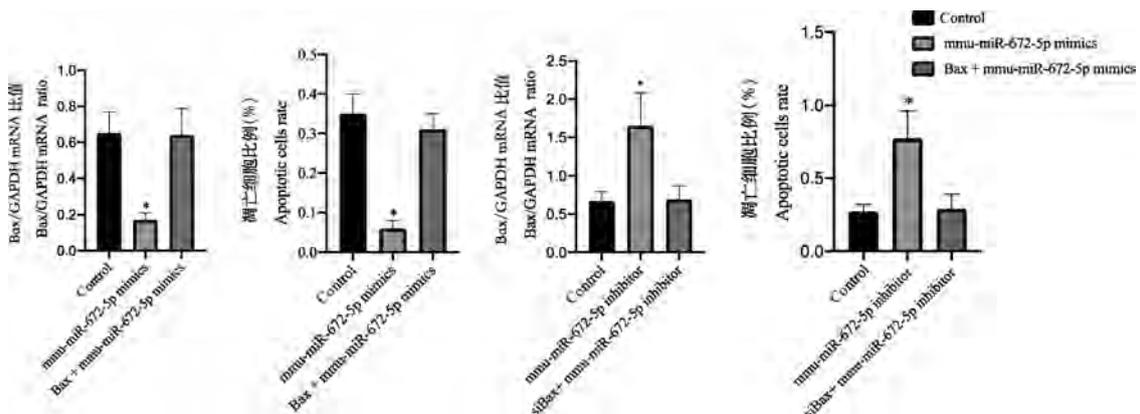


注: mmu-miR-672-5p mimics 组与 control 组比较, # $P < 0.05$; mmu-miR-672-5p inhibitor 组与 control 组比较, * $P < 0.05$; Bax-3' UTR-WT 组与 control 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 mmu-miR-672-5p 靶向 Bax 的 3 端非编码区

Note. Comparison between the mmu-miR-672-5p Mimics group and the control group, # $P < 0.05$. Comparison between mmu-miR-672-5p inhibitor group and control group, * $P < 0.05$. Comparison between Bax-3' UTR-WT group and control group, * $P < 0.05$.

Figure 5 3-terminal noncoding region of mmu-miR-672-5p targeting Bax



注: mmu-miR-672-5p mimics 组与 control 组比较, * $P < 0.05$; mmu-miR-672-5p inhibitor 组与 control 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 6 同时过表达 Bax 和 mmu-miR-672-5p 后大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平

Note. Comparison between the mmu-miR-672-5p mimics group and the control group, * $P < 0.05$. Comparison between mmu-miR-672-5p inhibitor group and control group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Apoptosis level of placental trophoblast cells in rats after simultaneous overexpression of Bax and mmu-miR-672-5p

Bax 编码的蛋白质属于 BCL2 蛋白质家族^[17]。BCL2 家族成员形成异二聚体或同二聚体,并作为抗凋亡或促凋亡调节剂,参与多种细胞活动^[18]。Bax 与 BCL2 形成异二聚体,并起凋亡激活剂的作用^[19]。过表达 Bax 后,CLEAVED-CAS3 的表达水平上升,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平上升($P < 0.05$)。BAX 与 BCL2 的关联和比例也决定了细胞凋亡后细胞的存活或死亡^[20]。据报道^[21],Bax 与线粒体电压依赖性阴离子通道(VDAC)相互作用并增加其开放性,从而导致膜电位的丧失和细胞色素 c 的释放。同时,caspase3 被切割形成 CLEAVED-CAS3,随后引起细胞的凋亡。同时过表达 mmu-miR-672-5p 和 Bax 后,大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平无显著变化($P > 0.05$);同时敲低 mmu-miR-672-5p 和 Bax 后,发现大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡水平无显著变化($P > 0.05$)。因此,mmu-miR-672-5p 是 Bax 引起凋亡的上游,并且 Bax 是 miR-672-5p 下游中引起大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞凋亡的关键分子。

综上所述,mmu-miR-672-5p 通过靶向 Bax 的 3 端非编码区,降低了 Bax 的表达水平,随后抑制了大鼠胎盘绒毛膜滋养层细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] de Goffau MC, Lager S, Sovio U, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens [J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 329-334.
- [2] Babic I, Mejia A, Wroblewski JA, et al. Intraplacental villous artery doppler as an independent predictor for placenta-mediated disease and its comparison with uterine artery doppler and/or placental biochemical markers in predictive models: a prospective cohort study [J]. *Fetal Diagn Ther*, 2020, 47(4): 292-300.
- [3] Panaiotova J, Tokunaka M, Krajewska K, et al. Screening for morbidly adherent placenta in early pregnancy [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2019, 53(1): 101-106.
- [4] Herrero T, Srinivasan S, Treacy R, et al. 512: discovery and verification of maternal serum miRNA biomarkers predictive of preeclampsia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2019, 220(1): s344.
- [5] Wang Z, Wang P, Wang Z, et al. miRNA-548c-5p downregulates inflammatory response in preeclampsia via targeting PTPRO [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11149-11155.
- [6] Rokni M, Salimi S, Sohrabi T, et al. Association between miRNA-152 polymorphism and risk of preeclampsia susceptibility [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(2): 475-480.
- [7] Pineles BL, Romero R, Montenegro D, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2007, 196(3): e1-e6.
- [8] Zhong Y, Zhu F, Ding Y. Differential microRNA expression profile in the plasma of preeclampsia and normal pregnancies [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 826-832.
- [9] Rezaei M, Eskandari F, Mohammadpour-Gharehbagh A, et al. Hypomethylation of the miRNA-34a gene promoter is associated with severe preeclampsia [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2018, 20: 1-5.
- [10] Skalis G, Katsi V, Miliou A, et al. MicroRNAs in preeclampsia [J]. *Microna*, 2019, 8(1): 28-35.
- [11] Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, et al. Preeclampsia: the interplay between oxygen-sensitive mirnas and erythropoietin [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): 574.
- [12] Gunel T, Kamali N, Hosseini M K, et al. Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2020, 33(6): 901-908.
- [13] Awamleh Z, Gloor GB, Han VKM. Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: potential impact on gene expression and pathophysiology [J]. *BMC Med Genomics*, 2019, 12(1): 91.
- [14] Huang X, Li Z, Lei J, et al. Genetic polymorphism in DGCR8 is associated with late onset of preeclampsia [J]. *BMC Med Genet*, 2019, 20(1): 151.
- [15] Hu S, Li J, Tong M, et al. MicroRNA1443p may participate in the pathogenesis of preeclampsia by targeting Cox2 [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 4655-4662.
- [16] He X, Zhao L, Yue L, et al. The relationship between IGF1 and the expression spectrum of miRNA in the placenta of preeclampsia patients [J]. *Ginek Pol*, 2019, 90(10): 596-603.
- [17] Maes ME, Grosser JA, Fehrman RL, et al. Completion of BAX recruitment correlates with mitochondrial fission during apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16565.
- [18] Légiot A, Céré C, Dupouiron T, et al. Mitochondria-associated membranes (MAMs) are involved in Bax mitochondrial localization and cytochrome c release [J]. *Microb Cell*, 2019, 6(5): 257-266.
- [19] Huang K, O'Neill KL, Li J, et al. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis [J]. *Cell Res*, 2019, 29(11): 942-952.
- [20] Heimer S, Knoll G, Schulze-Osthoff K, et al. Raptinal bypasses BAX, BAK, and BOK for mitochondrial outer membrane permeabilization and intrinsic apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 556.
- [21] Guha P, Gardell J, Darpolor J, et al. STAT3 inhibition induces Bax-dependent apoptosis in liver tumor myeloid-derived suppressor cells [J]. *Oncogene*, 2019, 38(4): 533-548.

[收稿日期] 2020-06-18

李杉杉,刘新民,王琼. 基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发抑郁症动物模型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 77-83.

Li SS, Liu XM, Wang Q. Research on animal model of depression induced by chronic unpredictable mild stress based on literature database [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 77-83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.012

基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发 抑郁症动物模型研究

李杉杉^{1,2}, 刘新民^{1,2*}, 王 琼^{1,3*}

(1.西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心/药学院,四川 泸州 646000; 2.中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193; 3.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193)

【摘要】 目的 综述 CUMS 模型常用的刺激因子、造模时长以及主要的行为学评价方法,为 CUMS 模型在抑郁症研究中的应用提供参考。**方法** 查阅 10 年来中国知网和 PubMed 中与 CUMS 相关的文献,并对其按一定标准筛选后整理归纳 CUMS 造模动物、刺激因子、造模时长。**结果** 雄性大鼠的使用频率高;实验宜选择 7~9 种刺激因子且 3~7 d 内不重复,刺激因子中推荐禁食禁水、潮湿垫料、冰水游泳、笼倾斜、光照节律改变;造模时长建议 3~4 周;最后行为学评价方法宜采用糖水偏好实验、旷场实验、强迫游泳实验。**结论** 本文通过综述 CUMS 模型中的造模动物、刺激因子、造模时长等方面,为 CUMS 模型在抑郁症研究中的应用提供有益参考。

【关键词】 慢性不可预见性温和应激;抑郁症;大鼠;小鼠;刺激因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0077-07

Research on animal model of depression induced by chronic unpredictable mild stress based on literature database

LI Shanshan^{1,2}, LIU Xinmin^{1,2*}, WANG Qiong^{1,3*}

(1. Affiliated TCM Hospital, Sino-Portugal TCM International Cooperation Center/School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 3. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

【Abstract】 Objective To summarize popular stimulation factors, model duration, and main behavioral tests used in the chronic unpredicted mild stress (CUMS) model of depression, so as to provide a reference for the use of CUMS in depression research. **Methods** Literature related to CUMS models from the past 10 years was searched for in PubMed databases and screened according to certain criteria. The animals, stressors, and duration of CUMS models were summarized. **Results** Male rats are most often used in CUMS models. Seven to nine stressors should be chosen for an experiment and should not be repeated within 3-7 days. Among the stimulation factors, deprivation of food or water, damp

【基金项目】四川省国际科技创新合作/港澳台科技创新合作项目(2019YFH0023);航天医学基础与应用国家重点实验室开放基金资助项目(SMFA18K06);泸州市高端人才引进项目(刘新民团队),(泸州-医科大)科技战略合作项目(2018LZXNYD-ZK32)。

【作者简介】李杉杉(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:1281564812@qq.com

【通信作者】王琼(1975—),女,医学博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:wqimplad@126.com
刘新民(1962—),男,医学博士,研究员,博士生导师,研究方向:神经精神药理及实验方法学研究。

E-mail: liuxinmin@hotmail.com * 共同通信作者

bedding, cold water swimming, tilt cages, and changes in light rhythm are recommended. Three to four weeks are recommended for the model duration. Behavioral tests included sucrose preference test, open field test and force swimming test. **Conclusions** This study provides a useful reference for the use of CUMS in models of depression regarding the animals, stimulation factors, and model duration.

[Keywords] chronic unpredicted mild stress; depression; rat; mice; stimulation factors

抑郁症是一种复杂的疾病,临床表现为多系统损伤症状,涉及多种身心症状^[1],严重影响患者的健康。而高达三分之一的抑郁症患者对传统抗抑郁药^[2]反应不良。因此,迫切需要开发更安全、更有效的抑郁症治疗方法,而动物模型是进行发病机制研究及药物开发的基础手段。

慢性不可预见性温和应激(chronic unpredicted mild stress, CUMS)模型是常见的研究抑郁症的模型,其理论依据为动物处于不适宜生存的环境时会出现紧张、焦虑和抑郁等症状,而长期、慢性、不可预计的刺激可以加快抑郁症的发展。最初的形式是慢性不可预见性应激(chronic unpredicted stress, CUS),由 Katz 等^[3]在 20 世纪 80 年代初对此模型进行了一系列研究,后来 Willner 等^[4]在此基础上发展了慢性不可预见性温和应激模型(CUMS)。CUMS 抑郁模型具有高度的有效性,并可持续几个月,基本符合抑郁模型的要求,是目前国内外文献中广泛使用的模型^[5-6]。在临床前研究中也得到了广泛的应用,有良好的表现、结果和预测效度,具有模拟病因的有效性。本文通过查阅 CNKI 和 PubMed 两大常用数据库的相关文献资料,对 10 年来慢性不可预见性温和应激进行了归纳和整理,从造模动物、CUMS 模型刺激因子、造模时长等方面进行总结,为 CUMS 模型在抑郁症研究中的使用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

使用 CNKI 和 PubMed 两大常用数据库进行文献检索。

1.2 实验方法

CUMS 相关文章发表的研究调查利用 CNKI 的中国学术文献网络出版总库进行文献检索。点击“高级搜索”,在“主题搜索”中输入“CUMS”,同时应用“并含”输入“大鼠”,时间设定为 2010 年 1 月 1 日-2020 年 4 月 30 日,检索有关大鼠慢性不可预见性温和应激方面的中文文献;同样的在“主题搜索”中输入“CUMS”,同时应用“并含”输入“小鼠”,检

索有关小鼠慢性不可预见性温和应激方面的中文文献。用 PubMed 以“CUMS”为关键词进行文献检索,检索同样时间段的慢性不可预见性温和应激相关的英文文献。当研究符合以下纳入标准时被计为有效文献:(1)以原始文章的形式发表的期刊,会议文章、综述剔除;(2)实验中有空白组和模型组,并且模型组只使用了 CUMS 模型;(3)造模时长以及刺激因子描述完整;(4)使用了行为学检测,并且有行为学结果;(5)动物品系、雌雄描述清楚,使用未转基因或未接受产前应激或绝育的啮齿动物。

1.3 统计学方法

通过汇总所有纳入研究的文献,全文阅读审查所要研究的数据,统计相关的文献数并计算占比。图形由 GraphPad Prism 5, GraphPad Software 提供。

2 结果

2.1 CUMS 相关文献发表情况

获得 CUMS 相关的中英文文献共有 1755 篇,其中有关慢性不可预见性温和应激方面的中文文献共有 1076 篇(大鼠 788 篇,小鼠 288 篇),有关慢性不可预见性温和应激相关的英文文献共有 679 篇。对这 1755 篇论文进行全文评估后,发现有效文献共有 679 篇,其中英文文献有 424 篇,中文文献有 255 篇。有效文献中 CUMS 大鼠模型 492 篇, CUMS 小鼠模型 187 篇。有效文献中进行药效学研究的有 420 篇,其中 CUMS 大鼠模型 292 篇, CUMS 小鼠模型 128 篇。具体分布情况如图 1。可见每年发表文献逐年上升,其中 2018 年及 2019 年发表文献最多。

2.2 CUMS 模型建立的调查结果

2.2.1 CUMS 模型动物的选择

从图 2A 可见,95.3%的 CUMS 造模都选择雄性大鼠。有文献报道雄性大鼠对慢性应激更敏感^[7],但也有文献认为慢性应激更易致雌性大鼠产生抑郁样行为^[8],同时还有文献报道慢性应激对不同性别的大鼠所致的抑郁样行为没有差异^[9]。

关于大小鼠的选择,84.4%的研究选择了大鼠,选择小鼠的只有 15.6%。对于大鼠,除了个别实验使用到 Charles-Foster、Long-Evans 和 GK 大鼠,大部

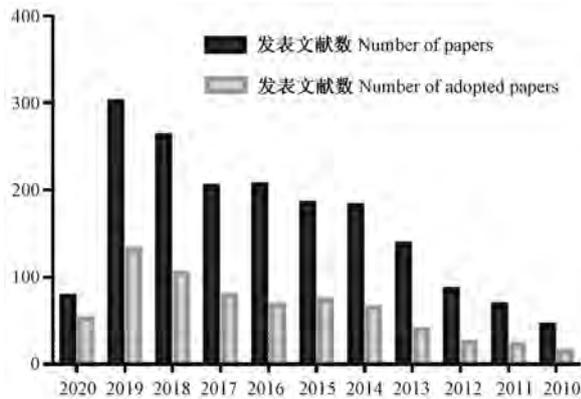


图 1 CUMS 相关文献按年份的分布情况

Figure 1 Distribution of CUMS related literature by year

分使用了 SD、Wistar 大鼠 (图 2B), 而有文献称 Wistar 大鼠较 SD 大鼠更敏感^[10]。对于小鼠, 除了个别实验使用到 NMRI 和 CD-1 小鼠, 大部分使用了 C57BL/6、昆明、ICR、BALB/c、Swiss 小鼠 (图 2C)。其中, BALB/c 小鼠属于敏感小鼠, C57BL/6 属于不敏感小鼠^[10]。

2.2.2 CUMS 刺激因子的选择与使用情况

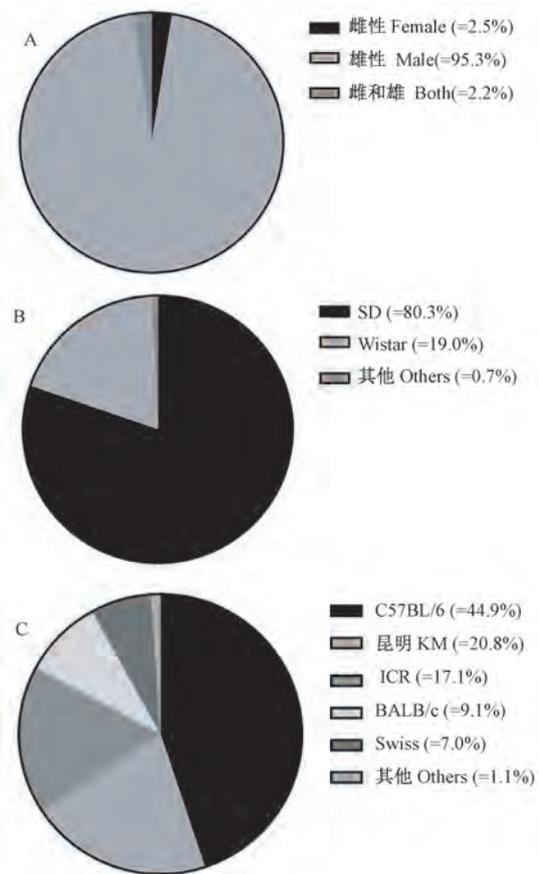
在 CUMS 造模过程中, 刺激因子的多变性、不可预见性是模型成功的关键, 单独使用一种刺激不能产生理想的效果, 每种刺激因子应间隔 3~7 d^[11]。具体的 CUMS 造模中刺激因子及其使用情况如图 3 所示。

从图 3A 可见, 68.5% 的 CUMS 造模过程都选择了 7~9 种刺激因子, 只有少数实验选择了 ≥ 12 或 ≤ 6 种的刺激因子, 最少的用了 5 种^[12], 最多的用了 15 种^[13]。

从图 3B 可见, 使用频率排前十的刺激因子依次为禁水、禁食、潮湿垫料、冰水游泳、笼倾斜、夹尾、束缚、昼夜颠倒、持续照明、水平振荡。大小鼠使用频率排前十的刺激因子是一样的, 只是排序有差异。图 3B 罗列的是使用频率大于 10% 的刺激因子, 图 3C 罗列的是使用频率小于 10% 的刺激因子。除此之外, 还有部分少见的刺激因子, 如腹腔注射生理盐水、从高处落下、高台刺激、白光照射、交换鼠笼、强光照射等。

(1) 饮食和饮水供应的调整

禁食、禁水是最常见的刺激因子, 因其操作简单而刺激强度较大。实验中的禁食有三种类型: 单独禁食 (77.6%)、禁食禁水同时进行 (20.7%)、禁食后限制进食 (1.7%); 禁水也有三种类型: 单独禁水 (75.4%)、禁食禁水同时进行 (20.5%)、禁水后



注: A: 动物性别使用占比; B: 大鼠品系使用占比; C: 小鼠品系使用占比。

图 2 CUMS 模型中动物的性别、品系使用情况

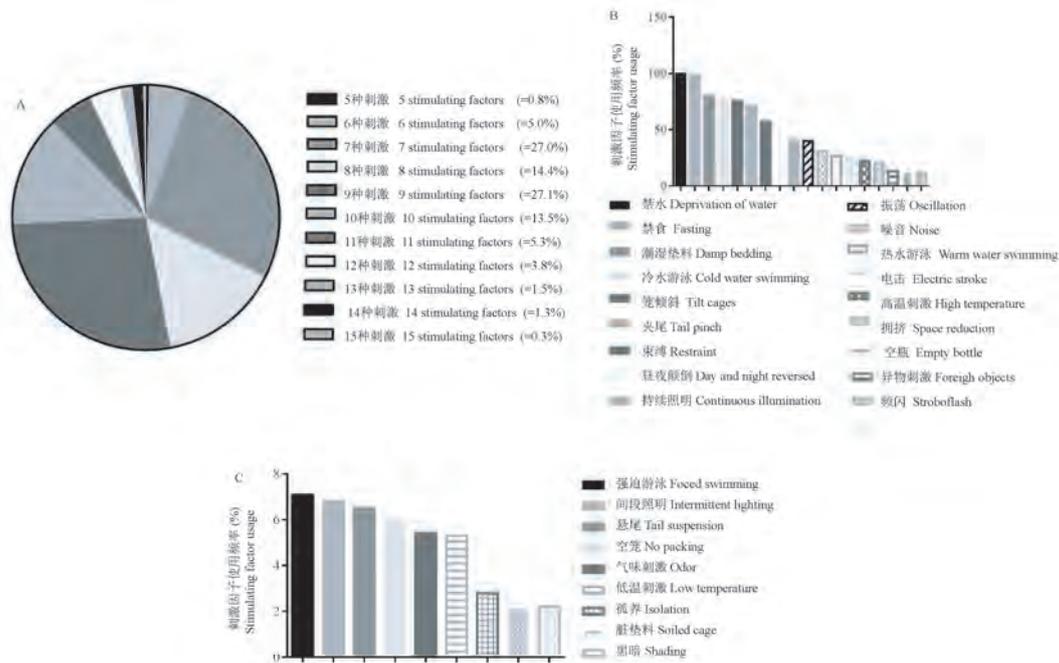
Note. A, The usage proportion of animal sex, B, The usage proportion of rat strain, C, The usage proportion of mouse strain.

Figure 2 The usage of animal sex and strain in CUMS model

空瓶 (4.1%)。禁食的刺激时长 85.5% 为 24 h^[14], 8.1% 为 12 h^[13], 8.1% 为 48 h^[15]。禁水的刺激时长 80.5% 为 24 h^[14], 8.2% 为 12 h^[15], 值得注意的是禁水与潮湿垫料一般不同时进行, 因为潮湿垫料中有水。禁食禁水的刺激时长一般为 24 h^[16], 而禁食禁水后控制饮食时长一般为禁食或禁水 23 h 后限制进食或空瓶 1 h^[17]。空瓶刺激是一种将水倒掉只留瓶子在鼠笼上的一种应激方式, 在使动物体感饥渴的同时, 更能使动物焦虑, 约 80% 的刺激时长为 1 h^[18]。

(2) 居住环境的改变

居住环境改变常见的有配对、拥挤、鼠笼倾斜、潮湿垫料, 少见的有单笼饲养^[17]和空笼^[14]。在配对或拥挤刺激中, 常见的是将两只原本单笼饲养的动物放置在同一个鼠笼中, 也有实验者将多于 2 只动物放置在一个笼子, 刺激时长一般为 12 h^[19] 或



注: A: CUMS 模型中刺激因子使用量; B: 常见的刺激因子 (使用频率 10%~100%); C: 常见的刺激因子 (使用频率 1%~10%)。

图 3 CUMS 模型中刺激因子的使用情况

Note. A, The number of stimulating factors in CUMS model. B, Popular stimulation factors (frequency 10%~100%). C, Popular stimulation factors (frequency 1%~10%).

Figure 3 Usage of stimulating factors in CUMS model

24 h^[13]。鼠笼倾斜的角度一般为 45°, 也有少数实验中选择 30°^[20] 或 60°^[21]。对于倾斜 45° 而言, 刺激时长多数为 24 h^[14], 少数为 12 h^[17]。潮湿垫料的一般操作方式为, 将 200 mL 水倒入装有 100 g 垫料的鼠笼中, 约 60% 的刺激时长为 24 h^[13], 少数为 12 h^[19]。另外, 笼倾斜与潮湿垫料常被运用到同一个实验内, 有时甚至同时应用^[22]。

(3) 昼夜节律的重新调整及光照性质改变

常见的有昼夜颠倒、持续照明、频闪, 少见的有间歇光照、黑暗应激^[20] 和白光照射^[20]。频闪频率一般为 60~150 次/分^[17], 时长一般为 12 h^[23] 并且在夜间进行。昼夜颠倒操作即为白天关灯 12 h, 夜晚开灯 12 h^[14]。持续照明多数为通宵持续照明^[16]。间歇照明较少见, 一般持续 10~24 h, 大部分是以 2~3 h 为一个循环^[23], 少数是以 1 h 为一个循环^[13]。

(4) 游泳

游泳一般有冷水游泳, 热水游泳, 强迫游泳三种应激方式。冷水游泳主要是使实验鼠接受冷的刺激, 大部分为在 4°C~6°C 的水中游泳 5 min^[13]。热水游泳主要是使实验鼠接受热的刺激, 大部分为在 40°C~45°C 的水中游泳 5 min^[13]。而单纯的强迫

游泳主要是使动物疲劳, 一般为在 20°C~25°C^[24] 水中游泳几分钟至 1 h 不等。实验中常用的应激因子是前两种。

(5) 温度调整

温度变化一般分为高温刺激或低温刺激。高温环境刺激是将实验鼠移至温度比较高的房间或烘箱中, 温度一般为 42°C~50°C, 刺激时长一般为 5~15 min^[19]。值得注意的是高温环境刺激与热水游泳一般不在实验中同时出现。低温刺激即将房间温度调至 0°C~5°C, 刺激时间一般为 1~2 h^[19]。

(6) 其余应激方式

夹尾是将夹子夹在实验鼠尾巴上使其疼痛的一种应激方式, 多数实验选择夹在距离尾根 1 cm 处, 应激时长一般为 1~3 min^[16]。束缚是限制动物活动的一种应激方式。应激时长一般为 1~6 h, 44.2% 的实验束缚 2 h^[14]。水平振荡是将动物放置在鼠笼中, 使用手动或机器的方式使其在水平面高速振荡的一种应激方式。刺激时间多为 5~15 min, 频率在 60~160 rpm 之间^[14-15]。噪音干扰一般有 4 种: 捕食者声音, 一般使用时间为 30 min^[25]; 超声^[26] 应激时长为 1~24 h 不等; 白色噪音, 分贝一般在 60~120 dB^[17], 使用时间一般为 1~12 h; 以及实

验鼠尖叫声^[20]。前三者较常见,而最后一种刺激少见。电击常用短时间电击足底^[26]、少数采用电击耳朵^[22]。常用的强度为 1~15 mA,60~70 V,一般每次电击 5~10 s,间隔 10~50 s,共 15~30 次。陌生异常物体如塑料杯、勺子、碎布片等在鼠笼中放置,会使动物产生焦虑和恐惧,应激时长一般为 24 h^[24]。悬尾刺激是使动物处于倒悬位的一种刺激方式,应激时长一般为 1~5 min^[24]。气味刺激的应激时长一般为 1~3 h^[16,27]。

2.2.3 CUMS 造模时长及每日刺激次数的使用情况

如图 4A 所示,造模 3~4 周占大部分(58.8%),造模时间最短为 11 d,每天给予 2 种刺激因子^[28],造模时间最长为 14 周,每天给予一种刺激因子^[29],还有少数为分段造模^[18]。从图 4B 可见,95.5%的 CUMS 造模过程,每天都只安排 1~2 种刺激因子^[23],少数实验者采用每天 3~4 种刺激因子^[19]。造模时长为 3~4 周的实验中,81.8%每天给予 1 种刺激因子,2.6%每天给予 3~4 种刺激因子;造模时长为 5~8 周的实验中,60.5%每天给予 1 种刺激因子,9.2%每天给予 3~4 种刺激因子。

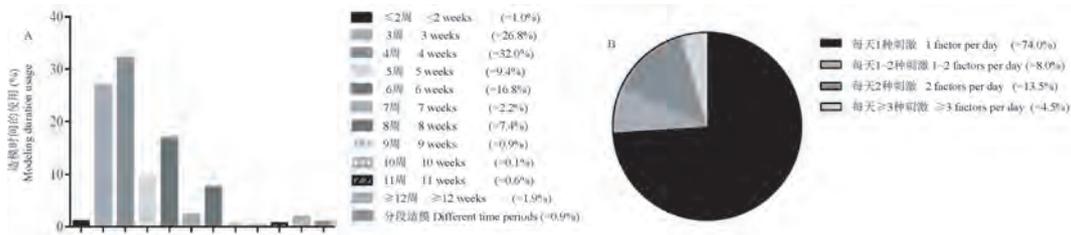
对于造模后,研究抑郁状态的持续时长的文

章,统计发现共有 66 篇。其中研究造模 3 周后抑郁持续时间的文章最多,共 31 篇,4 周的次之,有 20 篇。给予刺激因子 3~4 周后,撤出刺激因子后抑郁可以持续 3~4 周^[14,30],有些甚至持续 5 周^[31]。可见撤出刺激因子后抑郁状态持续时长可与刺激时长持平,甚至长于刺激时长。

2.3 CUMS 行为学检测的研究调查

图 5 是大小鼠都会使用到的行为学检测的使用频次排序。我们可以看出,在实验中用到糖水偏好实验(SPT)的频率最高,其次有旷场实验(OFT)、强迫游泳实验(FST)、悬尾实验(TST)、水迷宫实验(MWM)、高架十字迷宫实验(EPM)、新奇抑制摄食实验(NSFT)等行为学检测。除此之外,少数小鼠用到辐射臂迷宫实验、嗅觉鉴别实验、嗅觉灵敏度实验、巴恩斯迷宫、高架零迷宫测验、社会交互实验等行为学测试。少数大鼠用到机械痛觉过敏实验、热痛觉过敏实验、被动回避实验、热板实验、跳台实验等行为学测试。

CUMS 抑郁模型主要模拟了人类抑郁的核心症状——快感缺失。统计发现在大小鼠中最常用的行为学检测都是糖水偏好实验,糖水偏爱指数作为测量 CUMS 抑郁模型快感缺乏的有效客观指标。强



注:A:CUMS 造模时长分布图;B:每日刺激数使用占比。

图 4 CUMS 模型中造模强度使用情况

Note. A, Distribution of modeling duration in CUMS model, B, Usage proportion of daily stimulating factors.

Figure 4 Usage of modeling strength in CUMS model



图 5 CUMS 模型中行为学测试使用频率分布图

Figure 5 Frequency distribution of behavioral tests in CUMS model

迫游泳实验和悬尾实验既是应激性抑郁动物模型的造模方法,也是抑郁动物模型常用的检测方法;而旷场实验可用于评价各类应激性抑郁动物模型的自主运动行为、探究行为和紧张度,从而反映抑郁程度。此 4 种行为学检测使用频率都大于 10%。值得注意的是悬尾实验共使用了 141 次,其中小鼠 108 次(在小鼠中使用频率为 57.8%)、大鼠 33 次(在大鼠中使用频率为 6.7%)。而运用到强迫游泳实验的实验中,只有 3.0% 使用到了强迫游泳这种刺激因素。CUMS 不仅可以导致抑郁,也可导致认知障碍与焦虑,所以部分实验也用到了水迷宫实验与高架十字迷宫实验。

不同的行为学检测出现显著性差异的时间不同。糖水偏爱实验^[32]和旷场实验^[32]最早为 1 周,强迫游泳实验^[33]、悬尾实验^[33]与高架十字迷宫实验^[34]最早为 2 周,水迷宫实验^[19]与新奇抑制摄食实验^[25]最早为 3 周。

3 讨论

长期不良事件刺激与抑郁症的发生有明确关系,且不良事件越多,抑郁症的发生率越高^[35]。CUMS 模型可以模拟生活中的不同应激源,使得动物产生抑郁症状,与人类患抑郁症的历程有相似性。本文综述了造模动物、CUMS 模型刺激因子、造模时长,希望为今后 CUMS 造模提供一些参考:(1) 雄性大鼠的使用频率较高,若无特殊要求可以选择雄性大鼠;(2) 为了使动物不可预知刺激,刺激因子选择 7~9 种比较合适,3~7 d 内不重复,但如果实验条件允许,也可以选择更多的刺激因子;(3) 几乎实验中都会出现禁食禁水、冰水游泳、潮湿垫料、笼倾斜、光照节律改变,再搭配一些其他刺激因子;(4) 建议每天选择 1~2 种刺激因子;(5) 造模长度选择 3~4 周比较合适,如果是先造模后给药,可以采用造模与给药时间等同;(6) 大小鼠都可以使用糖水偏好实验、旷场实验、强迫游泳实验,如果是小鼠也可以使用悬尾实验,而进行认知与焦虑方面的研究可以考虑水迷宫实验、高架十字迷宫实验。

参考文献:

- [1] First MB. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edition, and clinical utility [J]. J Nerv Ment Dis, 2013, 201(9): 727-729.
- [2] Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR * D: implications for clinical practice [J]. Am J Psychiatry, 2006, 163(1): 28-40.
- [3] Katz RJ, Hersh S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 265-271.
- [4] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. Psychopharmacology (Berl), 1987, 93(3): 358-364.
- [5] Reid I, Forbes N, Stewart C, et al. Chronic mild stress and depressive disorder: a useful new model? [J]. Psychopharmacology (Berl), 1997, 134(4): 365-377.
- [6] De Vry J, Schreiber R. The chronic mild stress depression model: future developments from a drug discovery perspective [J]. Psychopharmacology (Berl), 1997, 134(4): 349-350.
- [7] Kikusui T, Nakamura K, Mori Y. A review of the behavioral and neurochemical consequences of early weaning in rodents [J]. Appl Anim Behav Sci, 2008, 110(1): 73-83.
- [8] 宋茜. mGluRs 在产前应激对子代大鼠抑郁样行为的作用及其调节机制研究 [D]. 西安: 西北大学, 2011.
- [9] 张丽, 朱熊兆, 白玫, 等. 不同应激方式引发的抑郁大鼠行为特征比较 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2012, 21(3): 212-215.
- [10] Papp M. Models of affective illness: chronic mild stress in the rat [J]. Curr Protoc Pharmacol, 2012, 5: 5.
- [11] Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS [J]. Neuropsychobiology, 2005, 52(2): 90-110.
- [12] 王世达, 张亮, 赵云, 等. 复合 B 族维生素对大鼠应激性认知功能障碍发生中的保护性作用 [J]. 营养学报, 2018, 40(2): 152-157.
- [13] He LW, Zeng L, Tian N, et al. Optimization of food deprivation and sucrose preference test in SD rat model undergoing chronic unpredictable mild stress [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 69-78.
- [14] Zhao YN, Cao YF, Zhang YH, et al. Nelumbo nucifera gaertn stems (hegeng) improved depression behavior in CUMS mice by regulating NCAM and GAP-43 expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 3056954.
- [15] Zhao J, Gao X, Wang A, et al. Depression comorbid with hyperalgesia: Different roles of neuroinflammation induced by chronic stress and hypercortisolism [J]. J Affect Disord, 2019, 256: 117-124.
- [16] Li Y, Yan J, Zhu X, et al. Increased hippocampal fissure width is a sensitive indicator of rat hippocampal atrophy [J]. Brain Res Bull, 2018, 137: 91-97.
- [17] Wang C, Gan D, Wu J, et al. Honokiol exerts antidepressant effects in rats exposed to chronic unpredictable mild stress by regulating brain derived neurotrophic factor level and hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity [J]. Neurochem Res, 2018, 43(8): 1519-1528.
- [18] Li XJ, Qiu WQ, Da XL, et al. A combination of depression and

- liver Qi stagnation and spleen deficiency syndrome using a rat model [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2020, 303(8): 2154–2167.
- [19] Ning LN, Zhang T, Chu J, et al. Gender-related hippocampal proteomics study from young rats after chronic unpredicted mild stress exposure [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(1): 835–850.
- [20] Yuan Q, Li Y, Deng X, et al. Effects of Xingpi Kaiyu Fang on ATP, Na/K-ATPase, and respiratory chain complexes of hippocampus and gastrocnemius muscle in depressed rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 6054926.
- [21] Guo J, Zhang F, Gao J, et al. Proteomics-based screening of the target proteins associated with antidepressant-like effect and mechanism of Saikosaponin A [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 174–188.
- [22] 宋美卿, 马澜, 贾力莉, 等. 对药香椽佛手对抑郁大鼠 HPT 轴和 HPA 轴功能的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(10): 4633–4636.
- [23] Li K, Yan L, Zhang Y, et al. Seahorse treatment improves depression-like behavior in mice exposed to CUMS through reducing inflammation/oxidants and restoring neurotransmitter and neurotrophin function [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112487.
- [24] Li Q, Qu FL, Gao Y, et al. Piper sarmentosum Roxb. produces antidepressant-like effects in rodents, associated with activation of the CREB-BDNF-ERK signaling pathway and reversal of HPA axis hyperactivity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 199: 9–19.
- [25] Zhang MD, Tao X, Pan RL, et al. Antidepressant-like effects of cajanin stilbene acid and its related mechanisms in mice [J]. *Fitoterapia*, 2020, 141: 104450.
- [26] Xu J, Wang R, Liu Y, et al. Short- and long-term alterations of FKBP5-GR and specific microRNAs in the prefrontal cortex and hippocampus of male rats induced by adolescent stress contribute to depression susceptibility [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 101: 204–215.
- [27] Tunc-Ozcan E, Peng CY, Zhu Y, et al. Activating newborn neurons suppresses depression and anxiety-like behaviors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3768.
- [28] Zhou JJ, Gao Y, Zhang X, et al. Enhanced hypothalamic NMDA receptor activity contributes to hyperactivity of hpa axis in chronic stress in male rats [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(3): 1537–1546.
- [29] Xia J, Lu Z, Feng S, et al. Different effects of immune stimulation on chronic unpredictable mild stress-induced anxiety- and depression-like behaviors depending on timing of stimulation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 58: 48–56.
- [30] 张天艺, 董宪喆, 冯霞, 等. 定志小丸调控氧化还原系统干预 5-羟色胺水平的研究 [J]. *中国药物应用与监测*, 2018, 15(3): 140–144.
- [31] 侯鹏, 谢丹庶. 穴位注射一氧化氮供体对慢性应激抑郁模型小鼠的影响 [J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(18): 2194–2195, 2198.
- [32] Hong M, Zheng J, Ding ZY, et al. Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2013, 20(1): 39–50.
- [33] Ashraf A, Mahmoud PA, Reda H, et al. Silymarin and silymarin nanoparticles guard against chronic unpredictable mild stress induced depressive-like behavior in mice: involvement of neurogenesis and NLRP3 inflammasome [J]. *J Psychopharmacol*, 2019, 33(5): 615–631.
- [34] Chen Y, Zhao Y, Luo DN, et al. Electroacupuncture regulates disorders of gut-brain interaction by decreasing corticotropin-releasing factor in a rat model of IBS [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2019, 2019: 1759842.
- [35] 李林艳, 徐建. 抑郁症治疗进展 [J]. *河南中医*, 2012, 32(12): 1720–1722.

[收稿日期] 2020-07-01

吴军,关涛,田峰,等. 瑞香素对脊髓损伤大鼠运动功能改善作用的 TRL4/NF- κ B 信号通路机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 84-90.

Wu J, Guan T, Tian F, et al. Effects of daphnetin on motor function of spinal cord injury based on the TRL4/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 84-90.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.013

瑞香素对脊髓损伤大鼠运动功能改善作用的 TRL4/NF- κ B 信号通路机制研究

吴 军,关 涛,田 峰,刘学起,马 剑,王庆峰,赵芬芬*

(宁夏回族自治区人民医院骨科,银川 750021)

【摘要】 目的 探讨瑞香素激活 Toll 样受体 4/核转录因子 kappa B(Toll like receptor 4/NF- κ B, TRL4/NF- κ B)信号通路对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后神经再生及功能恢复的影响,为促进 SCI 的分子机制研究提供依据。方法 建立脊髓损伤实验大鼠模型,并分别于术后 1 d、8 d、14 d、21 d 和 30 d,采用 Basso Beattie Bresnahan(BBB)运动功能评分和联合行为评分法(combine behavioral score, CBS)评分测试评价各组 SCI 大鼠治疗后的神经功能;采用相关试剂盒检测脊髓组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性及丙二醛(maleicdialdehyde, MDA)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)、白介素-10(interleukin 10, IL-10)的表达量变化;并采用蛋白质印迹法(Western blot)检测术后各组脊髓组织中对实验大鼠脊髓组织中 BCL2-Associated X 的蛋白质(BCL2-Associated X Protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Caspase-3、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-c)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)、磷酸化酪氨酸激酶受体 B(phospho-tyrosine kinase receptor B, p-TrkB)、TOLL 样受体 4 重组蛋白(recombinant toll like receptor 4, TRL4)和核因子- κ B p65(nuclear factor-kappa b p65, NF- κ B p65)水平的影响。结果 瑞香素能够显著改善实验大鼠 BBB 评分和 CBS 评分结果,且联合用药治疗组效果优于单一药物的疗效。此外,瑞香素能够改善实验大鼠脊髓组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量,能够降低脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 含量;Western blot 实验结果表明瑞香素对脊髓损伤诱发的凋亡相关蛋白异常表达具有显著的调节作用,并能够显著性调节 BDNF/TrkB 信号通路和 TRL4/NF- κ B 信号通路。结论 瑞香素改善脊髓损伤的作用机制与是激活 TRL4/NF- κ B 信号密切相关。

【关键词】 脊髓损伤;瑞香素;TRL4/NF- κ B 信号通路;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0084-07

Effects of daphnetin on motor function of spinal cord injury based on the TRL4/NF- κ B signaling pathway in rats

WU Jun, Guan Tao, TIAN Feng, LIU Xueqi, MA Jian, WANG Qingfeng, ZHAO Fenfen*

(Department of Orthopedics, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750021, China)

【基金项目】 宁夏回族自治区重点研发项目(2018BEG03046)。

【作者简介】 吴军(1980—),男,副主任医师,研究方向:脊柱脊髓损伤。E-mail:chiyue7624328070@163.com

【通信作者】 赵芬芬(1980—),女,主治医师,研究方向:脊柱脊髓损伤。E-mail:dugaishi592@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of daphnetin on the TRL4/NF- κ B signaling pathway involved in nerve regeneration and functional recovery after spinal cord injury (SCI) in rats. This study aimed to provide a basis for study of the molecular mechanism of SCI. **Methods** A laminectomy was performed at the T9 level and the exposed dorsal surface of the spinal cord was subjected to a contusion injury as established a spinal cord injury model. On the 1st, 8th, 14th, 21st, and 30th days after the operation, the Basso Beattie Bresnahan motor function score and combine behavioral score were used to evaluate neurological function of rats with SCI in each group. The activity of SOD, CAT, and GSH PX enzymes, and MDA, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 expression were detected by kits. Western blotting was used to determine protein levels of Bax, Bcl-2, caspase-3, Cyt-C, BDNF, TrkB, and p-TrkB in the spinal cord tissue of experimental rats. **Results** The BBB and CBS scores were significantly improved by daphnetin ($P < 0.05$), and the effect of the high daphnetin group was better than that in the low daphnetin group. Additionally, daphnetin improved the activity of SOD, CAT, and GSH PX and MDA levels in the spinal cord of experimental rats ($P < 0.05$), and reduced TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 levels in the spinal cord ($P < 0.05$). Western blot showed that daphnetin significantly regulated abnormal expression of apoptosis-related proteins and the BDNF/TrkB signaling pathway. **Conclusions** Daphnetin may play a role in spinal cord injury by activating TRL4/NF- κ B signaling.

【Keywords】 spinal cord injury; daphnetin; TRL4/NF- κ B signaling pathway; inflammation

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是由外力导致的中枢神经系统疾病,会导致运动功能障碍与慢性疼痛综合征等^[1-2]。近年来 WHO 数据表明脊髓损伤呈现高发趋势,全世界每年大约有 25000 ~ 50000 名脊髓损伤患者^[3]。依据脊髓损伤的发病原因、病理变化过程和特征等特点,可将其分为原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤。研究认为,脊髓损伤诱发的神经功能缺损不仅是由于初始的实质性损伤,而是损伤后的一系列级联分子反应,导致神经元受损。继发性脊髓损伤是一种机体在细胞和分子水平的主动调控过程,包括一系列的病理性生理变化,如脊髓组织发生的自噬、炎症、氧化损伤、凋亡、坏死和水肿等,都会严重影响神经功能、胶质细胞活化与白质恢复等。多种因素的联合作用进而诱发永久的病理生理性改变,最终导致肢体运动功能和感觉能力丧失等^[4-7]。

TRL4/NF- κ B 信号通路广泛参与调控机体多种生理和病理变化过程,与机体免疫调节和炎症反应具有密切关系。当机体脊髓组织受到损伤后诱发机体炎症反应,诱导 TRL4 激活 NF- κ B 信号通路,介导下游炎症因子的释放和表达。瑞香素 (daphnetin, DAP) 是从瑞香科类中草药中提取的香豆素类活性成分。既往研究表明,瑞香素具有抗氧化、抗癌、抗炎和神经保护等多种药理活性,能够通过抑制机体炎症和氧化应激损伤进而改善机体损伤^[8-9]。因此,本研究采用脊髓损伤大鼠模型,以探究瑞香素对脊髓损伤模型大鼠的氧化应激损伤、炎症水平及 TRL4/NF- κ B 信号通路的调节作用,并探究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究选择 75 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,8 周龄,均购买自宁夏医科大学实验动物中心 [SCXK (宁)2016-0003],动物饲养于宁夏回族自治区人民医院动物实验室 [SYXK (宁)2016-0012],体重为 (180 \pm 20) g,均饲养恒温 (25 $^{\circ}$ C)、恒湿 (50 \pm 5)% 条件下,并保持饲养间长期保持通风、干燥和安静的环境,以 12 h 的昼夜循环。本研究经宁夏回族自治区人民医院动物伦理委员会批准 (IACUC-NY2018AC04)。本实验的所有动物实验操作均遵循 3R 原则,以最大程度保证实验福利。

1.2 主要试剂与仪器

瑞香素购买自上海吉至生化科技有限公司 (纯度 $\geq 97\%$,批号:SIG-D5564,上海,中国);SOD (批号:A001-3-2)、CAT (批号:A007-1-1)、GSH-Px (批号:A005-1-2)、MDA (批号:A003-1-2) 均购买自南京建成生物工程研究所 (南京,中国);TNF- α (批号:TNA-H82E3)、IL-1 β (批号:IL2-H4256)、IL-6 (批号:CD6-H82E8)、IL-10 (批号:TRL-H5259) 均购买自 ACRO Biosystems 公司 (美国);Bax (批号:5023S)、Bcl-2 (批号:3498S)、Caspase-3 (批号:14220S)、Cyt-c (批号:11940S)、BDNF (批号:47808S)、TrkB (批号:4603S) 和 *p-TrkB* (批号:4619S) 一抗、荧光二抗 (批号:5366) 均购买自 Cell Signaling Technology (US);BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号:A045-4-2) 购买自南京建成生物工程研究所 (南京,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 给药及分组和实验大鼠模型的制备

各组实验用大鼠均需在适应一周后开始进行以下试验。脊髓损伤模型的建立:采用电磁力驱动冲击器(10 g, 12.5 mm)进行 T10 挫伤性脊髓损伤;而空白组则只接受椎板切除术。术后各实验鼠在加热垫灯下维持体温在 36℃~37℃,直至其完全苏醒^[1-2,5]。术后给予大鼠相应剂量的镇痛(50 mg/kg Temgesic, 皮下)和生理盐水(0.5 mL, 皮下)以防止疼痛和脱水,然后在饮用水中加入抗生素使其接受抗生素 1 周。创伤后 6 h 进行 BBB 运动功能评分和 CBS 评分测试,并将 75 只大鼠随机均分为 5 组($n=15$):空白组(Sham),模型组(Model),瑞香素低剂量组(30 mg/kg)、中剂量组(60 mg/kg)和高剂量组(90 mg/kg);术后第 4 天开始连续给予瑞香素,连续给药 4 周。

1.3.2 运动功能评价

采用 BBB 评分法和 CBS 评分法以评价各组试验大鼠的脊髓功能的恢复情况。在造模前 1 d、造模后第 1、8、15、22 和 30 天对各组实验大鼠分别进行 BBB 评分和 CBS 评分,以评价各组实验大鼠后肢的运动功能状况。在 BBB 评分中分为 0~21 分:其中,0 分表示后肢完全无运动能力,21 分为后肢能力完全正常;若 BBB 评分在 5 分以下则表示脊髓损伤大鼠造模成功。在 CBS 评分中分为 0~100 分:其中,正常为 0 分,全瘫为 100 分。

1.3.3 各组实验大鼠脊髓组织中氧化应激相关酶与细胞因子的测定

大鼠分组和处理同上。各组大鼠连续给药 4 周后,经腹腔注射戊巴比妥钠(40~60 mg/kg)麻醉后,处死,快速抽取脊髓组织样本,然后采用冷生理盐水进行冲洗,以后续实验。在脊髓组织中加入适量的 PNS 缓冲液,采用液氮进行研磨、匀浆,在 4℃、3500 r/min 条件下离心 15 min 后取上清。所有实验操作均严格按照相应试剂盒说明书进行,检测 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性及 MDA 含量,以及细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 的表达量。

1.3.4 Western blot 检测炎症相关蛋白的表达量

大鼠分组和处理同上。将实验大鼠麻醉、处死后迅速抽取各组实验大鼠的脊髓组织样本,采用液氮猝灭并在液氮条件下进行研磨成粉末状,再加入适量的 RIPA 裂解液使得蛋白组织充分裂解后,在冰浴条件下放置 1h,并且在此期间对样本溶液进行适当的震

荡、摇匀;然后在 4℃ 条件下,以 12000 r/min 离心 15 min 后取上清。然后使用 BCA 试剂盒法测定其上清液中的总蛋白浓度。在 10% SDS-PAGE 上分离提取的蛋白,并转移到 PVDF 膜上,37℃ 条件下封闭 1h。然后加入相应的一抗在 4℃ 条件下孵育过夜,后将其在 TBST 中洗涤 3 次。然后加入二抗,在 37℃ 条件下孵育 1h 后进行洗膜。以 β -actin 为内参。凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值。

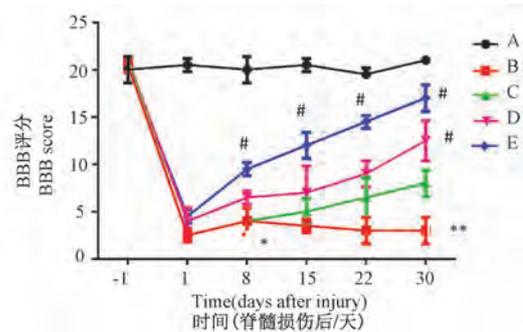
1.4 统计学方法

本实验中实验数据的统计分析采用 SPSS 26.0 软件,图表的制作采用 GraphPad 5.0 软件,计量数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;实验数据中多组间实验数据的比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 认为具有显著性统计学差异;BBB 评分和 CBS 评分等实验数据的分析则采用方差分析进行比较。

2 结果

2.1 SCI 大鼠 BBB 评分

BBB 评分结果如图 1 所示;造模前各组实验大鼠的 BBB 评分无统计学差异,表明各组实验大鼠的运动功能均无障碍。然而,当实验大鼠开始接受脊髓损伤后,各模型大鼠的运动功能均明显降低,表明造模成功。假手术组中各实验大鼠的 BBB 评分在术前、术后均无显著性差异($P>0.05$),表明手术对实验大鼠的活动并无明显影响。当给予瑞香素



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型(SCI)组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

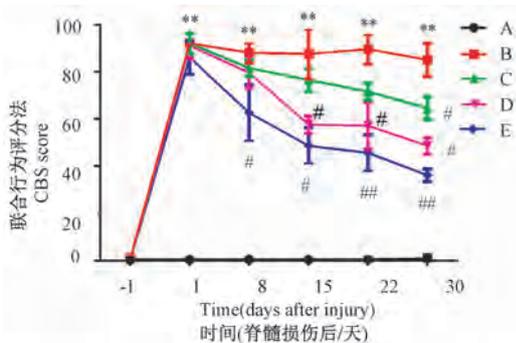
图 1 给予治疗后 SCI 大鼠在造模前、造模后的 BBB 评分图
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with SCI group, # $P<0.05$, ## $P<0.05$.

Figure 1 BBB score map of SCI rats before and after treatment

30 d 后,实验大鼠的下肢运动功能得到了明显得到提升,其 BBB 评分也得到显著性升高 ($P < 0.05$), 呈现剂量-时间依赖性关系。

2.2 Combine behavioral score (CBS) 评分

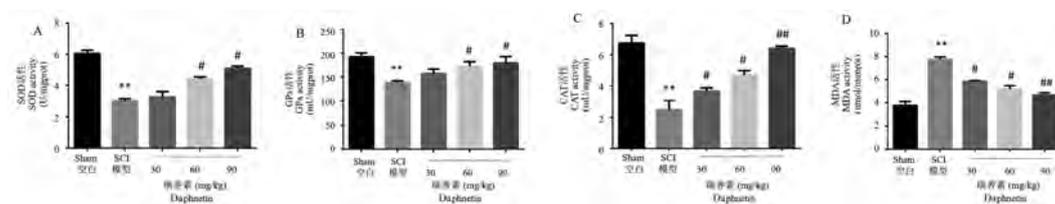
CBS 评分结果如图 2 所示;造模前各组实验大鼠的 CBS 评分无统计学差异,表明各组实验大鼠的运动功能均无障碍。然而,当实验大鼠开始接受脊髓损伤后,各模型大鼠的运动功能均明显降低。当大鼠接受脊髓损伤后 1 d,模型组与空白组出现显著性差异 ($P < 0.05$),表明模型建立成功,当模型大鼠各给药组给予相应药物治疗后,各给药组实验大鼠的 CBS 评分较模型组实验大鼠的 CBS 评分均明显降低 ($P < 0.05$),表明瑞香素对于实验大鼠的脊髓损伤均具有一定的改善作用,且高剂量治疗组效果优于低剂量组的治疗效果。



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型(SCI)组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 给予治疗后 SCI 大鼠在造模前、造模后的 CBS 评分图
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SCI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.05$.

Figure 2 CBS score map of SCI rats before and after treatment



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型(SCI)组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓中 SOD(A)、GSH-Px(B)、CAT(C)活性和 MDA(D)含量的影响
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SCI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of daphnetin on the activity of SOD (A), GSH-Px (B), CAT (C) and MDA (D) in spinal cord of rats were affected by treatment

2.3 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓组织氧化应激状态的影响

机体氧化应激水平严重影响脊髓损伤后恢复。本研究结果显示,与假手术组实验大鼠相比,模型组实验大鼠脊髓组织中 SOD(图 3A)、GSH-Px(图 3B)与 CAT(图 3C)活性较空白实验大鼠显著性降低 ($P < 0.05$),MDA(图 3D)含量显著性升高;然而,当给予实验大鼠相应剂量的瑞香素治疗之后,其脊髓组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量均有显著性回调,表明给予药物治疗后脊髓损伤大鼠的氧化应激状态具有显著的改善作用。其中,高剂量组的治疗效果优于低剂量组的疗效。

2.4 瑞香素对 GM1 对 SCI 大鼠脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 含量的影响

炎症在脊髓损伤的发生、发展过程中也具有重要作用。因此,本研究测定了各组实验大鼠脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 炎症因子水平的变化,具体如下图所示。与假手术组实验大鼠相比,模型组实验大鼠脊髓组织中 TNF- α (图 4A)、IL-1 β (图 4B)、IL-10(图 4C)和 IL-6(图 4D)含量均显著性升高 ($P < 0.05$),表明机体处于过炎症状态。当给予药物治疗后,机体内细胞因子水平均有所回调 ($P < 0.05$),表明瑞香素对脊髓损伤诱发的机体炎症具有显著性的调节作用。

2.5 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓组织中凋亡信号通路的影响

如图 5 所示,与假手术组相比较,模型组的 Bax/Bcl-2(图 5A、5B)、Caspase-3(图 5C、5D)和 Cyt-c(图 5E、5F)含量均显著性升高,表明脊髓损伤导致了大鼠脊髓组织促凋亡相关蛋白显著性增加;当给予瑞香素后,其 Bax/Bcl-2(图 5A、5B)、Caspase-3(图 5C、5D)和 Cyt-c(图 5E、5F)含量的变化均发生

显著性回调,表明瑞香素对脊髓损伤诱发的凋亡相关蛋白异常表达具有显著的调节作用,且高剂量组治疗效果优于低剂量组。

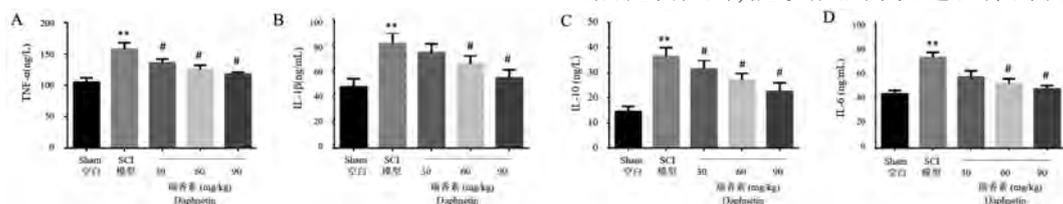
2.6 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓组织中 BDNF/TrkB 和 TRL4/NF- κ B 信号通路的影响

如图 6 所示,与假手术组相比较,模型组的 BDNF(图 6A、6B)、TrkB(图 6C、6D)、p-TrkB(图 6E、6F)、TRL4(G/H)和 NF- κ B p65(I/K)含量均显著性升高,表明脊髓损伤导致了大鼠脊髓组织 BDNF/TrkB 信号通路和 TRL4/NF- κ B 信号通路相关蛋白异常表达;当给予瑞香素后,其 BDNF(图 6A、6B)、TrkB(图 6C、6D)、p-TrkB(图 6E、6F)、TRL4(G/H)和 NF- κ B p65(I/K)含量的变化均发生显著性回调,且呈现剂量依赖性,表明瑞香素能够显著性调节 BDNF/TrkB 信号通路和 TRL4/NF- κ B 信号通路。

3 讨论

脊髓损伤是由脊柱损伤后诱发的严重并发症之一,包括原发性脊髓损伤与继发性脊髓损伤。其中继发性脊髓损伤是损伤后机体细胞和分子水平的一种主动调节过程,具有可逆性和可控性;这也是目前脊髓损伤治疗的主要阶段^[10-11]。目前,药物治疗是降低脊髓损害程度最为快捷和有效的方法之一。然而,目前临床治疗中,尚无一种安全有效的药物。因此,寻找一种安全、有效、多靶点的抗脊髓损伤药物,已成为脊髓损伤相关疾病及其药物研发的新热点和难点。

大量研究表明,脊髓损伤过程中伴随着氧化应激损伤^[12-13]。抗氧化剂能够有效降低损伤脊髓组织中乳酸脱氢酶活性,减少超氧阴离子对机体的损害和继发性水肿,继而达到治疗 SCI 的目的。瑞香素是一种天然抗氧化剂,能够激活并促进机体内抗氧化酶活

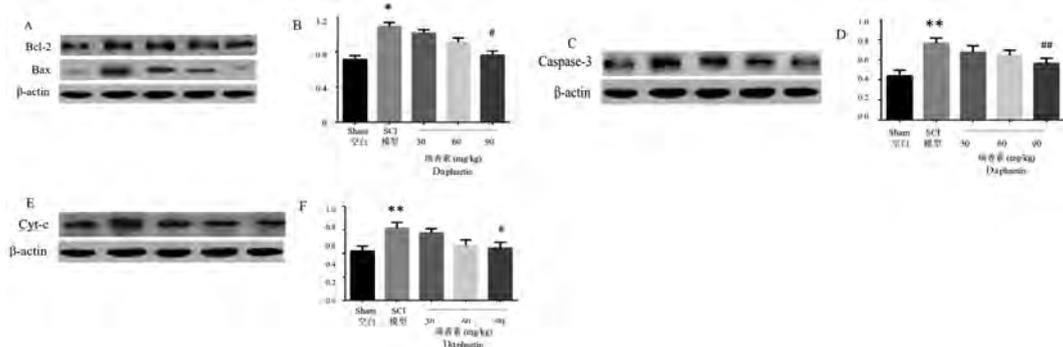


注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * P <0.05, ** P <0.01。与模型(SCI)组相比, # P <0.05, ## P <0.01。

图 4 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓中 TNF- α (A)、IL-1 β (B)、IL-10 (C) 和 IL-6 (D) 含量的影响

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * P <0.05, ** P <0.01. Compared with SCI group, # P <0.05, ## P <0.05.

Figure 4 Effect of daphnetin on the contents of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-10 (C) and IL-6 (D) in spinal cord of SCI rats

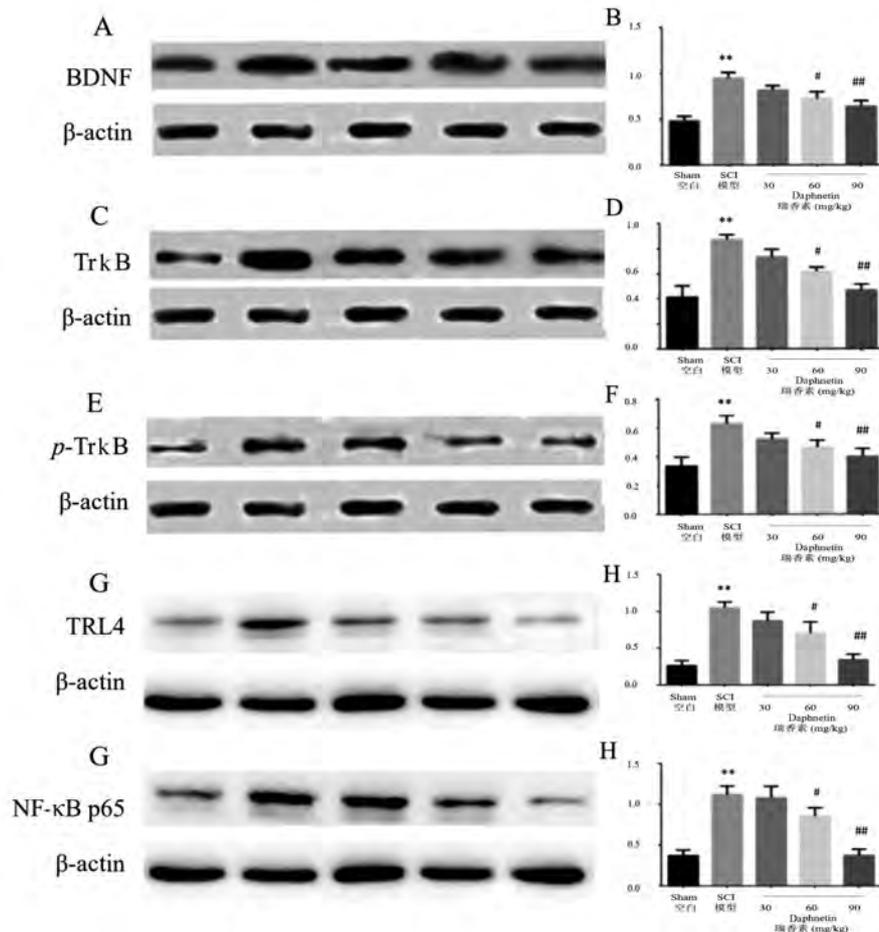


注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * P <0.05, ** P <0.01。与模型(SCI)组相比, # P <0.05, ## P <0.01。

图 5 瑞香素对实验大鼠脊髓组织中 Bax/Bcl-2 (A/B)、Caspase-3 (C/D) 和 Cyt-c (E/F) 水平的影响

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * P <0.05, ** P <0.01. Compared with SCI group, # P <0.05, ## P <0.05.

Figure 5 Effect of daphnetin on Bax/Bcl-2 (A/B), Caspase-3 (C/D) and Cyt-C (E/F) levels in spinal cord tissue of experimental rats



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型(SCI)组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 瑞香素对实验大鼠脊髓组织中 BDNF (A/B)、TrkB (C/D)、p-TrkB (E/F)、TRL4 (G/H) 和 NF-κB p65 (I/K) 水平的影响
 Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SCI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.05$.

Figure 6 Effect of daphnetin on the levels of BDNF (A/B), TrkB (C/D), p-TrkB (E/F), TRL4 (G/H) and NF-κB p65 (I/K) in spinal cord tissue of experimental rats

性,对自由基有着高效的清除作用^[14-16]。此外,脊髓损伤过程中伴随着炎症反应的发生。TNF-α 是炎症早期机体释放的促炎因子,其表达水平的变化与机体的损伤程度密切相关。IL-1β 参与机体脊髓损伤的过程可能与其能够损伤血脑屏障的完整性密切相关。脊髓损伤诱发大量炎症因子产生,最终导致机体组织处于过度炎症反应和损伤状态^[17-19]。本研究结果显示,瑞香素能够抑制 IL-1β 分泌,减少由 IL-1β 刺激成骨细胞所产生的 NO、PGE2 含量,进而抑制 TNF-α 含量,进而发挥抗炎作用。

神经元细胞凋亡程序的启动对继发性脊髓损伤有直接的促进作用,Bax 蛋白具有促进细胞凋亡,并拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡作用,并能够激活 Caspase 蛋白酶家族,最终加速细胞凋亡。Caspase-3 是评价细胞凋亡的重要指标之一,可介导多种细胞凋亡途

径。此外,TNF-α 又可激活凋亡相关蛋白 Caspase-3 的活化,进而促进机体细胞凋亡^[20-23]。为了进一步探究瑞香素对脊髓损伤诱发的凋亡作用的改善作用,本实验检测了瑞香素对脊髓组织的凋亡蛋白表达的改善作用,结果显示,瑞香素能够降低脊髓组织中 Bax、Caspase-3、Cyt-c 凋亡蛋白的表达,进而减少或抑制脊髓神经元细胞凋亡,修复中枢神经系统,并发挥神经保护作用。

研究表明,脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)可诱导和促进多种神经元的存活和分化,并能够改善受损神经元的修复作用。然而,当机体脊髓组织发生损伤后,可诱导 BDNF 活化,并促进其与高亲和力酪氨酸蛋白激酶受体 B (tyrosine kinase B, TrkB) 相互作用并发生结合,促进机体受损神经细胞的生存和发育,进而发

挥神经保护作用,有效促进机体脊髓组织损伤后的轴突修复和肢体运动功能的恢复等作用^[24],在调节神经节生长和神经再生过程中起着至关重要的作用。TLR4 信号转导通路是目前发现的重要的炎性通路之一,TLR4 高表达时,激活 NF- κ B,进而启动细胞因子 TNF- α 、IL-6 激活 TLR4,最终引起级联反应^[25-26]。此外,NF- κ B 的活化还可进一步激活 Caspase-3 信号通路介导细胞凋亡。细胞异常凋亡在继发性脊髓损伤过程中起着重要作用。本研究发现,瑞香素能够调节模型大鼠凋亡相关蛋白的异常表达,这一作用可能与其能够抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化有关。因此,TLR4/NF- κ B 信号通路同脊髓损伤后的恢复具有密切关系。

综上所述,瑞香素能够改善 SCI 大鼠的运动功能,减轻 SCI 大鼠的氧化应激损伤和炎症水平,并能够抑制脊髓组织的凋亡,进而改善脊髓损伤,其作用机制可能是通过调节 TLR4/NF- κ B 信号通路来发挥作用的。

参考文献:

- [1] Emon ST, Uslu S, Aydinlar EI, et al. Effects of ozone on spinal cord recovery via the wnt/ β -catenin pathway following spinal cord injury in rats [J]. *Turk Neurosurg*, 2017, 27(6): 946-951.
- [2] Bezdudnaya T, Hornigo KM, Marchenko V, et al. Spontaneous respiratory plasticity following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats [J]. *Exp Neurol*, 2018, 305: 56-65.
- [3] Spejo AB, Lawrence DF. An intriguing way to enhance rehabilitation of grasping in rats after spinal cord injury [J]. *Brain*, 2018, 141(7): 1888-1899.
- [4] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic spinal cord injury repair and regeneration [J]. *Neurosurgery*, 2017, 80(3S): S9-S22.
- [5] Elmelund M, Klarskov N, Biering-Sørensen F, et al. Fecal incontinence and neurogenic bowel dysfunction in women with traumatic and nontraumatic spinal cord injury [J]. *Dis Colon Rectum*, 2019, 62(9): 1095-1104.
- [6] Karsy M, Hawryluk G. Modern medical management of spinal cord injury [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(9): 65.
- [7] Assinck P, Duncan GJ, Hilton BJ, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(5): 637-647.
- [8] Chen X, Kuang N, Zeng X, et al. Effects of daphnetin combined with Bcl2-siRNA on antiapoptotic genes in synovial fibroblasts of rats with collagen-induced arthritis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 884-890.
- [9] Zhi J, Duan B, Pei J, et al. Daphnetin protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4132-4139.
- [10] Zhu Y, Zhang L, Fu R, et al. The change tendency of endoplasmic reticulum stress associated proteins in rats with spinal cord injury [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 1938-1947.
- [11] Yildirim T, Okutan O, Akpınar E, et al. Neuroprotective effects of high-dose human albumin against traumatic spinal cord injury in rats [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2018, 119(2): 86-91.
- [12] Torres-Espín A, Forero J, Fenrich KK, et al. Eliciting inflammation enables successful rehabilitative training in chronic spinal cord injury [J]. *Brain*, 2018, 141(7): 1946-1962.
- [13] Pal A, Kumar S, Jain S, et al. Neuroregenerative effects of electromagnetic field and magnetic nanoparticles on spinal cord injury in rats [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2018, 18(10): 6756-6764.
- [14] Zhi J, Duan B, Pei J, et al. Daphnetin protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4132-4139.
- [15] Witaicenis A, Seito LN, da Silveira Chagas A, et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(3): 240-246.
- [16] Shao J, Xu R, Li M, et al. Glucocorticoid receptor inhibit the activity of NF- κ B through p38 signaling pathway in spinal cord in the spared nerve injury rats [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 268-275.
- [17] Lv R, Du L, Zhang L, et al. Polydatin attenuates spinal cord injury in rats by inhibiting oxidative stress and microglia apoptosis via Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 217: 119-127.
- [18] Bi J, Chen C, Sun P, et al. Neuroprotective effect of omega-3 fatty acids on spinal cord injury induced rats [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(8): e01339.
- [19] Li Y, Gu R, Zhu Q, et al. Changes of spinal edema and expression of aquaporin 4 in methylprednisolone-treated rats with spinal cord injury [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(4): 453-459.
- [20] Gouriou Y, Demaurex N, Bijlenga P, et al. Mitochondrial calcium handling during ischemia-induced cell death in neurons [J]. *Biochimie*, 2011, 93(12): 2060-2067.
- [21] Yang R, Cai X, Li J, et al. Protective effects of mir-129-5p on acute spinal cord injury rats [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8281-8288.
- [22] Chen XG, Chen LH, Xu RX, et al. Effect evaluation of methylprednisolone plus mitochondrial division inhibitor-1 on spinal cord injury rats [J]. *Childs Nerv Syst*, 2018, 34(8): 1479-1487.
- [23] Tian ZR, Yao M, Zhou LY, et al. Effect of docosahexaenoic acid on the recovery of motor function in rats with spinal cord injury: a meta-analysis [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(3): 537-547.
- [24] Yuan B, Liu D, Liu X. Spinal cord stimulation exerts analgesia effects in chronic constriction injury rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 581: 63-68.
- [25] Kang N, Hai Y, Yang J, et al. Hyperbaric oxygen intervention reduces secondary spinal cord injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1141-1153.
- [26] Jia H, Ma H, Li Z, et al. Downregulation of lncRNA TUG1 inhibited TLR4 signaling pathway-mediated inflammatory damage after spinal cord ischemia reperfusion in rats via suppressing TRIL expression [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2019, 78(3): 268-282.

[收稿日期] 2020-08-20

李国祥,潘玥,胡鹏,等. 新生乳鼠侧脑室注射 rAAV2/9 递送 SNCA 构建全脑转基因鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 91-98.

Li GX, Pan Y, Hu P, et al. Neonatal rAAV2/9 delivery of SNCA to generate whole-brain transgenic mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 91-98.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.014

新生乳鼠侧脑室注射 rAAV2/9 递送 SNCA 构建全脑转基因鼠

李国祥¹, 潘玥¹, 胡鹏¹, 杜廷福^{1,2}, 马开利^{1,2*}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所 药物安全性评价研究中心, 昆明 650118;
2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学灵长类研究中心 & 神经科学中心, 北京 100005)

【摘要】 目的 快速高效地构建一种人源 SNCA (hSNCA) 的全脑转基因鼠, 并初步探究 α -突触核蛋白过表达对小鼠中枢神经系统的影响。方法 对新生乳鼠进行双侧侧脑室 (intracerebroventricular, ICV) 注射携带人源 SNCA-EGFP 或 EGFP 的重组腺相关病毒 2/9 (recombinant adeno-associated virus 2/9, rAAV2/9) (1.5×10^{13} genome copies (GC)/mL), 在 2 周和 3 个月龄用免疫荧光及 Western blot 检测 α -突触核蛋白的表达模式及亚细胞定位, 并用免疫荧光及免疫组化探究星形胶质细胞、小胶质细胞及病理性 α -突触核蛋白的变化。结果 用 rAAV2/9 侧脑室注射的方式成功构建了 hSNCA 全脑转基因鼠, α -突触核蛋白在整个脑中广泛表达, 且趋向于在嗅球、皮层、海马、间脑及中脑中高表达。进一步研究发现, 在嗅球、皮层、海马的 CA2/3 区及小脑的浦肯野细胞中观测到 α -突触核蛋白在神经元胞核中表达的现象, α -突触核蛋白过表达引起了胶质增生。此外, 在嗅球及大脑皮层检测到 α -突触核蛋白 Ser129 磷酸化 (pS129) 及聚集。结论 快速成功地构建了一种 hSNCA 全脑转基因小鼠模型, 其 α -突触核蛋白持久地高表达, 并出现胶质增生和病理性 α -突触核蛋白表达的现象, 为研究 α -突触核蛋白的生理功能及其在帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 中的作用奠定一定的基础。

【关键词】 α -突触核蛋白; 转基因; 乳鼠注射; 胶质增生

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0091-08

Neonatal rAAV2/9 delivery of SNCA to generate whole-brain transgenic mice

LI Guoxiang¹, PAN Yue¹, HU Peng¹, DU Tingfu^{1,2}, MA Kaili^{1,2*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China. 2. Medical Primate Research Center & Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005)

【Abstract】 **Objective** To establish a human SNCA whole-brain transgenic mouse model, and to obtain preliminarily data on the role of α -synuclein in the central nervous system. **Methods** rAAV2/9 (1×10^{13} genome copies (GC)/mL) carrying either human SNCA-EGFP or EGFP was bilaterally injected intracerebroventricularly in mice at postnatal day 0. The expression pattern and subcellular localization of α -synuclein was examined at 2 weeks and 3 months of

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2016-I2M-2-001; 2016-I2M-1-004)。

【作者简介】 李国祥 (1994—), 男, 在读硕士, 研究方向: 药理学。E-mail: ligx@student.pumc.edu.cn

【通信作者】 马开利 (1981—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 药理学和毒理学。E-mail: makaili@imbcams.com

age by immunofluorescence and Western blot. Glial profile and pathological changes were analyzed by immunofluorescence and immunohistochemical staining. **Results** hSNCA transgenic mice were successfully constructed, and α -synuclein was widely expressed throughout the brain, with high expression in the olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampus, interbrain and midbrain. Furthermore, nuclear α -synuclein was detected in the olfactory bulb, cerebral cortex, CA2/3 of the hippocampus and Purkinje cells of the cerebellum. Overexpression of α -synuclein caused the proliferation of astrocytes and microglia. In addition, pS129 and aggregation of α -synuclein were observed in the olfactory bulb and cerebral cortex. **Conclusions** hSNCA whole-brain transgenic mouse model was established successfully, with high long-term expression of α -synuclein and enhanced gliosis and α -synuclein pathology. This model should be useful for studying the physiological function of α -synuclein and its role in Parkinson's disease.

【Keywords】 alpha-synuclein; transgene; neonatal injection; gliosis

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是第二大常见神经系统退行性疾病,其主要特征是中脑黑质多巴胺能神经元的死亡及 α -突触核蛋白的聚集^[1]。然而, α -突触核蛋白在 PD 中确切的功能尚未完全研究清楚。动物模型无疑是研究蛋白质功能及 PD 发病机理的一个重要工具,目前迫切地需要一些动物模型去探究 α -突触核蛋白确切的生理功能及进行药物研发的评估。尽管已经开发出许多模型,如毒素模型和转基因动物模型,部分能表现出黑质及纹状体多巴胺能神经元减少或多巴胺(dopamine, DA)水平降低以及行为障碍^[2-6],表明 α -突触核蛋白的积累可以显著影响 DA 能神经元的功能,但在大多数小鼠中都没有发现明显的黑质及纹状体变性^[7-9],不能完美地再现 PD 的病理特征^[10],给 PD 的研究带来了困扰。

在最近的研究中,有学者尝试用 rAAV 在成年鼠中以脑立体定位注射的方式构建 α -突触核蛋白局部过表达动物模型,能初步重现 PD 的原发性运动障碍及部分多巴胺能神经元损伤^[11-14],表明 rAAV 可以作为一种快速靶向的动物模型建立的工具,然而靶向和局部 α -突触核蛋白过表达有一定的局限性,局部注射的 rAAV 只在部分脑区传导表达,而 PD 的发生发展可能由多个脑区的共同参与。最近研究表明,可以通过向胎鼠或乳鼠脑室内注射 rAAV 来实现整个中枢神经系统的基因表达^[15-18],与成年鼠注射病毒相比,这种方法可实现更有效的扩散和感染,且表达在注射后数天内开始,并持续于动物的整个生命周期^[19-21]。且有报道称 rAAV2/9 能跨越血脑屏障,表现出在中枢神经系统广泛传导的能力^[22],并能感染新生神经元^[21,23]。此外,人源 SNCA(hSNCA)转基因小鼠模型已经被广泛应用和认可,人源 α -突触核蛋白在小鼠中并不会引起强

烈的免疫排斥反应而被清除,可长期表达存在^[5-6,24]。因此,本文旨在通过对新生乳鼠 ICV 注射携带人源的 SNCA-EGFP 基因或 EGFP 的 rAAV2/9,快速高效地构建脑中广泛表达 α -突触核蛋白的转基因模型,并初步探究 α -突触核蛋白过表达对小鼠脑的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 30 只,8 周龄,体重 20~22 g,雌雄 2:1,由中国医学科学院医学生物学研究所小动物部提供[SCXK(滇)K2019-0002]。动物饲养在中国医学科学院医学生物学研究所药物安全性评价研究中心 20℃~24℃ 的屏障环境中[SYXK(滇)K2018-0006],自由饮水和进食,采用昼夜 12 h 间断照明。在实验前以雌雄 2:1 的比例合笼,见栓后把母鼠分离单独饲养。给予充足的食物和水源,在母鼠妊娠后第 1 天(postnatal day, P0)进行病毒注射并标记后继续给予充足的食物和水源饲养。实验经本单位伦理委员会审核批准(DWSP202012008),实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

无内毒素质粒小提取试剂盒(货号: CW2106S)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: CW0014S)购自康为科技有限公司;只与人源 α -突触核蛋白反应的兔多克隆抗体 α -synuclein(MJFR1)(货号: ab138501)、NeuN 鼠单克隆抗体(货号: ab104224)、DAPI(货号: ab104139)购自英国 abcam;GFAP 鼠单克隆抗体(货号: Cat# G3893)及固绿(货号: F7252)购自美国 Sigma;Iba 1 兔多克隆抗体(货号: 016-20001)购自日本 wako;抗聚集性 α -synuclein(5G4)

单克隆抗体(货号:MABN389)购自美国 Merck; 鼠 α -synuclein 单克隆抗体(货号:610786)购自美国 BD; 兔来源 TH 多克隆抗体(货号:PA5-85167)购自美国 Invitrogen; GAPDH 单克隆抗体(货号:60004-1)购自美国 Proteintech; 594 波长免疫荧光兔二抗(货号:A11012)及 488 波长鼠二抗(货号:A11001)购自美国 Invitrogen; Western blot 兔源荧光二抗(货号:926-32211)及鼠源荧光二抗(货号:926-32210)购自美国 Li-cor; 免疫组化试剂盒(货号:GK5000705)购自上海基因科技; 微量注射器购自瑞士 Hamilton。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建及病毒包装

pAAV-hSyn-EGFP、pAAV-hSyn-SNCA-PGK-EGFP 质粒由本实验室构建和保存。两种质粒在大肠杆菌中扩增后用质粒小提试剂盒提取质粒 DNA 并鉴定。携带人源 SNCA-EGFP 及 EGFP 的重组腺相关病毒 rAAV2/9 由泰尔图公司包装并纯化,其病毒滴度约为 1.5×10^{13} GC/mL,冻存在 -80°C 冰箱中待用。

1.3.2 新生乳鼠侧脑室注射

在注射前把注射针头、镊子和剪刀高压灭菌。取 $1.5 \mu\text{L}$ 病毒与 $0.5 \mu\text{L}$ 的固绿混合,充分混匀并置于冰上,固绿用于标记注射位点。出生后第 1 天(P0)的乳鼠与母鼠分离,置于冰上 2~3 min 充分麻醉,用 $5 \mu\text{L}$ Hamilton 微量注射器注射小鼠侧脑室,进针深度为 3 mm,注射速度约为 $1 \mu\text{L}/\text{min}$,每侧注射 $1 \mu\text{L}$,注射后留针 1 min。注射结束时擦拭 75% 乙醇并标记后放入笼中继续饲养 2 周或 3 个月进行解剖检测。

1.3.3 Western blot

处死小鼠取脑并分离各个脑区置于冰冷的 EP 管中,加入适量的 RIPA 裂解后,取上清用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,之后加 5 \times 上样缓冲液进行煮沸 5 min 待用。配置 SDS-PAGE 胶,上样,85 V 电压跑胶 120 min 后,用半干转仪进行转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 45 min 后,抗体孵育 4°C 过夜,TBS 洗膜 5 min \times 3 次后,用羊抗鼠或抗兔的 Western blot 荧光二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,Odysey 红外激光扫描系统进行显影拍照。

1.3.4 免疫荧光

用多聚甲醛对 2 周或 3 个月的 rAAV2/9 ICV 注射小鼠进行灌注,取脑后用多聚甲醛固定 24~36 h,

脱水机脱水处理,包埋后切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。切好的片子 65°C 孵箱烤片,常规脱蜡水化,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,Tris-EDTA 缓冲液微波炉煮沸进行抗原修复 15 min,蒸馏水浸泡 5 min,正常山羊血清室温封闭 1 h 后,滴加相应稀释好的一抗 4°C 过夜,PBS 洗 5 min \times 3 次,后滴加鼠或者兔来源的荧光二抗,DAPI 封片后用 Panoramic MIDI 获取图片。

1.3.5 免疫组化

多聚甲醛对 2 周或 3 个月的 rAAV2/9 ICV 注射小鼠进行灌注,取脑后用甲醛固定 24~36 h,脱水机脱水处理,包埋后切片厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。切好的片子 65°C 孵箱烤片,常规脱蜡水化,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,用 Tris-EDTA 缓冲液微波炉煮沸进行抗原修复 15 min,蒸馏水浸泡 5 min,3% 过氧化氢孵育 30 min 去除内源性过氧化氢酶,正常山羊血清室温封闭 1 h 后,滴加抗 α -synuclein (MJFR1) 兔多克隆抗体及 Iba 1 兔多克隆抗体, 4°C 过夜。PBS 洗 5 min \times 3 次,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1.5 h,PBS 洗 5 min \times 3 次,新鲜配置的 DAB 显色液。苏木素复染 3 min,盐酸乙醇脱色,氨水返蓝,梯度乙醇及二甲苯脱水,树胶封片,用 Panoramic MIDI 获取图片。

2 结果

2.1 新生乳鼠侧脑室 rAAV2/9 注射构建 hSNCA 转基因模型

为了高效构建一种 hSNCA 转基因鼠模型,我们按照如图 1A 上所示方法对新生乳鼠侧脑室注射 rAAV2/9。在注射后,病毒扩散到各个脑室中(图 1A 下),表明注射位点是准确的。两周后,用只与人源 α -突触核蛋白反应的 Anti- α -synuclein (MJFR1) 抗体进行免疫荧光染色检测 α -突触核蛋白在整个脑区的表达水平。结果如图 1B 所示,在对照组 AAV-EGFP 中,未出现 α -突触核蛋白阳性染色,表明抗体的特异性良好,不会与鼠源 α -突触核蛋白发生交叉反应,而在实验组 AAV-SNCA 中,检测到 α -突触核蛋白广泛表达在转基因鼠的各个脑区。为了验证这个结果,采用 Western blot 分别检测 2 周(图 1C)及 3 个月(图 1D)年龄的鼠嗅球 (olfactory bulb, OB)、皮层 (cerebral cortex, CTX)、海马 (hippocampus, hip)、间脑 (interbrain, IB)、中脑 (middle brain, Mid)、小脑 (cerebellum, CB)、后脑

(hindbrain, HB) 中 α -突触核蛋白的表达,结果显示 α -突触核蛋白在各个脑区中均表达,其中在小脑中表达量稍低,与免疫荧光结果一致。这些结果表明转基因鼠构建成功,且 α -突触核蛋白广泛持久地表达(2周~3个月),人源 α -突触核蛋白并未发生强烈的免疫排斥反应而被清除。

2.2 ICV 注射 rAAV2/9 后 α -突触核蛋白在全脑广泛表达

为了进一步探究转基因鼠中 α -突触核蛋白的表达模式,用 α -突触核蛋白特异性抗体的免疫组织化学染色检测 2 周龄鼠嗅球 (olfactory bulb, OB)、皮层 (cerebral cortex, CTX)、海马 (hippocampus, Hip)、间脑 (interbrain, IB)、中脑 (middle brain, Mid) 和小脑 (cerebellum, CB) 中 α -突触核蛋白的表达。结果显示, α -突触核蛋白在嗅球中高表达 (图 2A), 少部分分布在胞核中。在大脑皮层处 (图 2B), α -突触核蛋白高表达并主要分布在胞质中,而在海马的 CA2/3 区 (图 2C), α -突触核蛋白广泛分布在颗粒细胞层的胞质及胞核中。在间脑中 (图 2D), α -突触核蛋白广泛分布在丘脑及下丘脑中。在中脑 (图 2E) 中, α -突触核蛋白亦高表达,并主要在胞质中。有趣

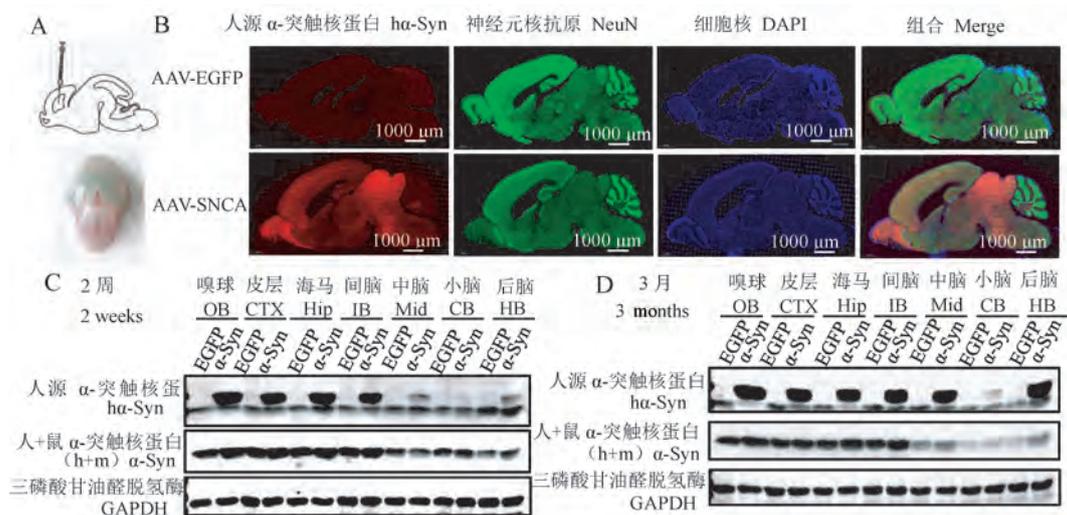
的是, α -突触核蛋白特异性地表达在小脑的浦肯野细胞中 (图 2F)。

2.3 ICV 注射 rAAV2/9 后 α -突触核蛋白的表达定位

蛋白质的表达定位往往与其特定的功能相关,我们通过免疫荧光检测 2 周龄鼠中人源 α -突触核蛋白的亚细胞定位。结果显示,在多巴胺能神经元 (TH⁺神经元) 中, α -突触核蛋白高表达,且其主要表达于神经元胞质中 (图 3A)。在其它脑区,如图 3B 所示,嗅球及皮层中有少部分 α -突触核蛋白表达在胞核中,而在海马的 CA2/3 区,少数颗粒细胞的胞核中出现 α -突触核蛋白核定位的现象,在小脑处, α -突触核蛋白在浦肯野细胞核中高表达,其结果与图 2F 一致。

2.4 ICV 注射 rAAV2/9 后诱导胶质细胞增生

大量的研究表明 PD 的发生可能与神经炎症密切相关。于是,通过免疫荧光检测 3 月龄转基因鼠脑中星形胶质细胞的数量 (GFAP⁺细胞),如图 4A 所示,在黑质 (Substantia nigra, SN) 中, α -突触核蛋白广泛表达的区域出现星形胶质增生的现象,而在海马中 (图 4B) 得到了同样的结果,GFAP⁺胶质细

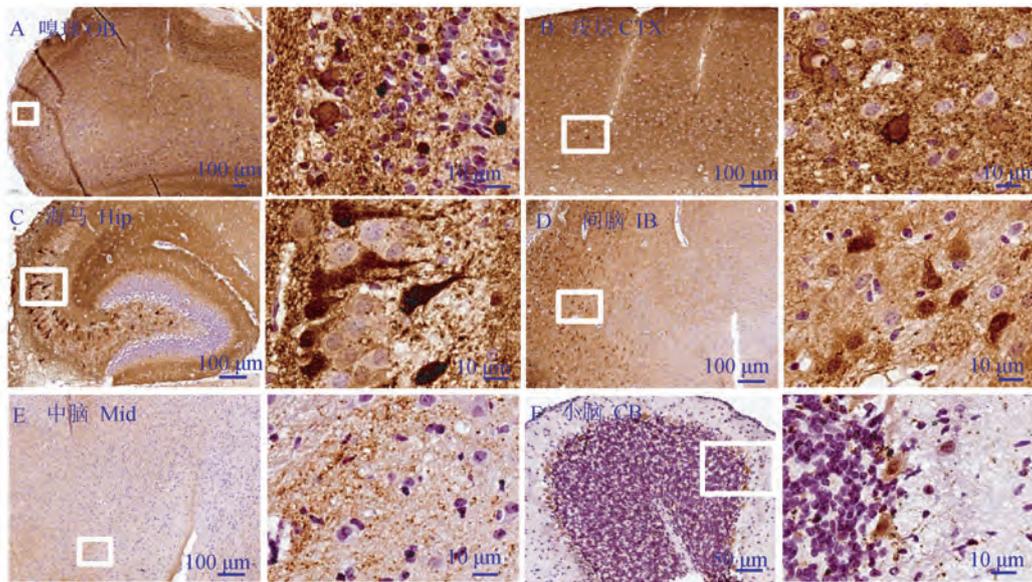


注:A:新生乳鼠注射方式模式图;B:2周龄鼠 α -突触核蛋白的免疫荧光染色;C:Western blot 检测 2 周龄鼠脑中人源及总的 α -突触核蛋白 (人+鼠) 在对照及转基因小鼠各个脑区的表达;D:Western blot 检测 3 月龄鼠脑中人源及总的 α -突触核蛋白 (人+鼠) 在对照及转基因小鼠各个脑区的表达。GAPDH 作为内参。

图 1 SNCA 转基因鼠的构建

Note. A, Cartoon describes the surgical approach for ICV injection in neonatal mouse brains. B, Immunofluorescence stain reveals the expression of α -synuclein in the whole brain at 2 weeks. C, Level of human and total α -synuclein expression in the transgene was assessed by Western blot at 2 weeks. D, Level of human and total α -synuclein expression in the transgene was assessed by Western blot at 3 months. GAPDH was used as an internal control.

Figure 1 Construction of SNCA transgenic mice



注:免疫组化分析 2 周龄鼠人源 α -突触核蛋白在各个脑区中的表达。A:嗅球(OB);B:皮层(CTX);C:海马(Hip);D:间脑(IB);E:中脑(Mid);F:小脑(CB)。后图为局部放大图。

图 2 转基因鼠中 α -突触核蛋白在各个脑区中广泛表达

Note. Level and distribution of human α -synuclein expression were evaluated histologically. A, Olfactory bulb(OB). B, Cerebral cortex(CTX). C, Hippocampus(Hip). D, Interbrain(IB). E, Middle brain(Mid). F, CB Cerebellum(CB). A partial enlarged view is attached after the figure.

Figure 2 Widespread α -synuclein expression of the transgene throughout the mice brain

胞也显著地增生。此外,免疫组化染色检测的小胶质细胞在海马(图 4C)及皮层(图 4D)也显著增生。

2.5 ICV 注射 rAAV2/9 后出现病理性 α -突触核蛋白

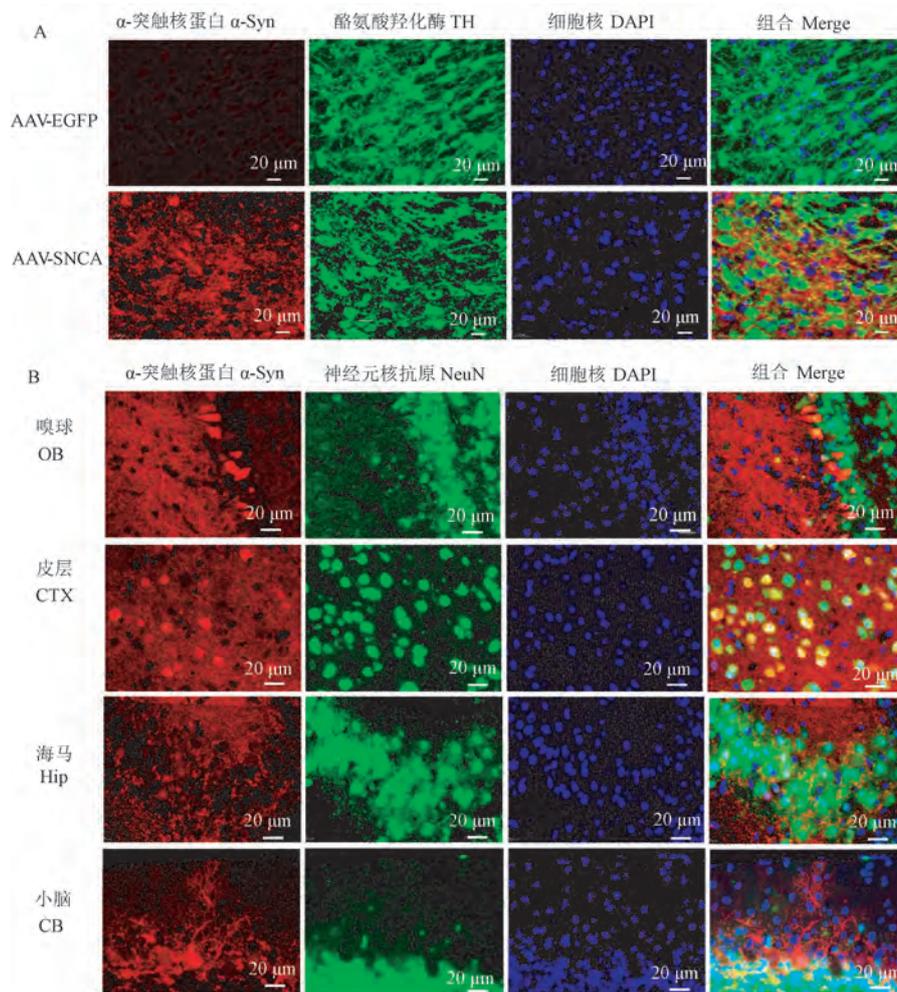
在 PD 中,第 129 位丝氨酸磷酸化(pS129)及聚集形式的 α -突触核蛋白常被检测到,被认为是 PD 的标志之一。在转基因鼠中,我们通过免疫组化检测表明,pS129 在 3 月龄小鼠嗅球及皮层中(图 5A)均出现,且在嗅球的神经元中强阳性染色。进一步用抗聚集形式的 α -突触核蛋白单克隆抗体(α -synuclein 5G4)检测其表达时(图 5B),发现其在嗅球和皮层亦出现阳性染色,表达模式与 pS129 一致。

3 讨论

rAAV 的研究及广泛应用,为我们高效地基因传递提供了非常快速有效的工具,先前多项研究通过靶向小鼠黑质、纹状体及嗅球构建 α -突触核蛋白局部过表达小鼠模型,极大地促进人们对 PD 发病机理的认识,然而由于靶向定点脑区注射后蛋白质过表达的区域局限性,所以在该研究中,基于 rAAV2/9 在神经系统中的高效的传递效率^[21-22],我

们通过新生乳鼠侧脑室注射携带人源 *SNCA-EGFP* 或 *EGFP* 的 rAAV2/9,构建了全脑人源 α -突触核蛋白高表达的转基因鼠。在注射 rAAV2/9 后立即解剖乳鼠脑,发现固绿染色的病毒液在大脑各脑室之间扩散,表明注射位点的准确性。前期的研究表明注射的时间点影响注射效率^[15],于是在本实验中严格控制注射时间在出生后 12 个小时之内。

在小鼠成长到 2 周或 3 个月后,用免疫荧光和 Western blot 实验检测到了 2 周及 3 个月龄 α -突触核蛋白在全脑中广泛的表达(图 1 所示),这表明通过乳鼠侧脑室注射的方式在注射后早期 α -突触核蛋白便能高表达,提示可以用此模型探究 α -突触核蛋白在小鼠出生后脑发育过程中的作用。此外,Western blot、免疫荧光及免疫组化实验表明, α -突触核蛋白趋向于在小鼠嗅球、皮层、海马、间脑中高表达,而在小脑中表达量稍低,这可能与病毒感染的细胞偏好性或者 α -突触核蛋白表达的细胞偏好性有关,其具体的机理仍然需要进一步研究。此外,进一步通过免疫荧光探究 α -突触核蛋白的亚细胞定位,发现在嗅球、皮层、海马及小脑中, α -突触核蛋白有胞核定位的现象,而之前的研究结果表



注:A:α-突触核蛋白在中脑黑质(SN)中表达,TH:多巴胺能神经元标志物;B:α-突触核蛋白在各脑区的表达及定位。

图3 α-突触核蛋白在转基因鼠中的表达及亚细胞定位

Note. A, α-synuclein is expression in the Substantia Nigra(SN). TH, The marker of dopaminergic neuron. B, Expression and subcellular localization of α-synuclein in different brain regions.

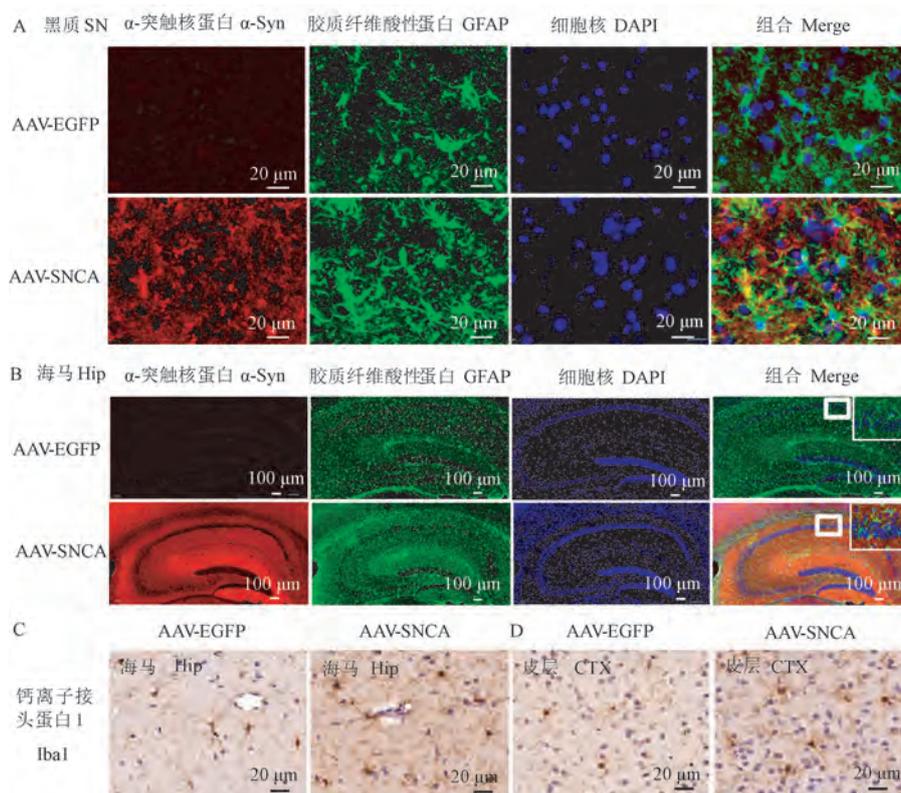
Figure 3 Expression and subcellular localization of α-synuclein throughout the whole mice brain

明,α-突触核蛋白核易位与细胞毒性相关^[25-26],提示这几个脑区的α-突触核蛋白可能产生细胞毒性。有趣的是,α-突触核蛋白在小脑浦肯野细胞中高表达,这提示α-突触核蛋白可能在小鼠的浦肯野细胞中发挥特定未知的功能。免疫荧光结果表明,α-突触核蛋白在多巴胺能神经元中高表达,这为之后研究α-突触核蛋白参与PD发生的机理奠定基础。

之前的研究认为,星形胶质细胞及小胶质细胞参与的神经炎症与PD的发生发展密切相关^[27-28],于是我们检测转基因小鼠中星形胶质细胞及小胶质细胞的变化,有趣的是,在转基因小鼠中星形胶质细胞及小胶质细胞严重增生,这进一步提示α-突

触核蛋白诱导的神经炎症可能参与到PD的发生发展中。最重要的是,在PD患者的尸脑组织中,常检测到α-突触核蛋白pS129及聚集的现象^[29-31],而在通过rAAV2/9构建的转基因鼠的嗅球及皮层中均检测到pS129及聚集的现象,且在嗅球处高表达,这提示嗅球及皮层与PD的发生发展密切相关。

总之,我们成功用携带人源SNCA的rAAV2/9构建了α-突触核蛋白的全脑转基因鼠,α-突触核蛋白在整个脑中广泛表达,并出现了胶质增生及病理性α-突触核蛋白表达的现象。该转基因模型的成功建立,将为探究α-突触核蛋白的生理作用及其在PD中的作用提供一定的基础。

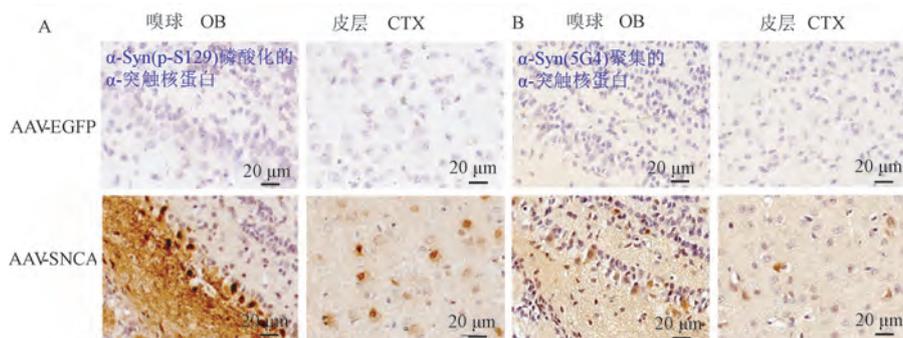


注:A:过表达 α -突触核蛋白引起黑质(SN)的星形胶质细胞增生;B:过表达 α -突触核蛋白引起海马(Hip)的星形胶质细胞增生;C:过表达 α -突触核蛋白引起海马(Hip)的小胶质细胞增生;D:过表达 α -突触核蛋白引起皮层(CTX)的小胶质细胞增生。GFAP:星形胶质细胞标志物;Iba1:小胶质细胞标志物。

图 4 α -突触核蛋白过表达引起胶质细胞增生

Note. A, Overexpression of α -synuclein increase astrogliosis in Substantia nigra. B, Overexpression of α -synuclein increase astrogliosis in Hippocampus. C, Overexpression of α -synuclein increase microgliosis in Hippocampus. D, Overexpression of α -synuclein increase microgliosis in Cerebral cortex. GFAP, The marker of astrocyte. Iba 1, The marker of microglia.

Figure 4 Overexpression of α -synuclein associated with astrogliosis and microgliosis



注:A:免疫组化检测嗅球(OB)和皮层(CTX)中 α -突触核蛋白 pS129 的表达分布;B:免疫组化染色检测嗅球(OB)和皮层(CTX)中聚集形式的 α -突触核蛋白的表达分布。

图 5 病理性的 α -突触核蛋白的检测

Note. A, pS129 was detected within the neuronal soma in the olfactory bulb(OB) and cerebral cortex(CTX). B, Aggregated α -synuclein was detected within the neuronal soma in the olfactory bulb(OB) and cerebral cortex(CTX).

Figure 5 Detection of α -synuclein-associated pathology

参考文献:

- [1] Du XY, Xie XX, Liu RT. The role of α -synuclein oligomers in Parkinson's disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8645.
- [2] Taguchi T, Ikuno M, Hondo M, et al. α -synuclein BAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model [J]. Brain, 2020, 143(1): 249-265.
- [3] Rajsombath MM, Nam AY, Ericsson M, et al. Female sex and brain-selective estrogen benefit α -synuclein tetramerization and the PD-like motor syndrome in 3K transgenic mice [J]. J Neurosci, 2019, 39(38): 7628-7640.
- [4] Butkovich LM, Houser MC, Chalermpanupap T, et al. Transgenic mice expressing human α -synuclein in noradrenergic neurons develop locus ceruleus pathology and nonmotor features of Parkinson's disease [J]. J Neurosci, 2020, 40(39): 7559-7576.
- [5] 高宁, 全雄志, 陈炜, 等. 帕金森病 α -synuclein 转基因小鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 5(18): 28-31, 36, 83.
- [6] 张丽, 陈炜, 张旭, 等. 携带 A53T 突变人 α 突触核蛋白转基因帕金森病大鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10): 1-6, 79-80.
- [7] Fernagut PO, Chesselet MF. Alpha-synuclein and transgenic mouse models [J]. Neurobiol Dis, 2004, 17(2): 123-130.
- [8] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders [J]. Science, 2000, 287(5456): 1265-1269.
- [9] Gómez-Benito M, Granado N, García-Sanz P, et al. Modeling Parkinson's disease with the α -synuclein protein [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 356.
- [10] Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability [J]. Front Neuroanat, 2014, 8: 155.
- [11] von Hövel FF, Rumpel R, Ratzka A, et al. AAV2/DJ-mediated alpha-synuclein overexpression in the rat substantia nigra as early stage model of Parkinson's disease [J]. Cell Tissue Res, 2019, 378(1): 1-14.
- [12] Faustini G, Longhena F, Varanita T, et al. Synapsin III deficiency hampers α -synuclein aggregation, striatal synaptic damage and nigral cell loss in an AAV-based mouse model of Parkinson's disease [J]. Acta Neuropathol, 2018, 136(4): 621-639.
- [13] Recasens A, Ulusoy A, Kahle PJ, et al. *In vivo* models of α -synuclein transmission and propagation [J]. Cell Tissue Res, 2018, 373(1): 183-193.
- [14] Albert K, Voutilainen MH, Domanskyi A, et al. AAV vector-mediated gene delivery to substantia nigra dopamine neurons: implications for gene therapy and disease models [J]. Genes (Basel), 2017, 8(2): 63.
- [15] Chakrabarty P, Rosario A, Cruz P, et al. Capsid serotype and timing of injection determines AAV transduction in the neonatal mice brain [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67680.
- [16] Chansel-Debordeaux L, Bourdenx M, Dovero S, et al. In utero delivery of rAAV2/9 induces neuronal expression of the transgene in the brain: towards new models of Parkinson's disease [J]. Gene Ther, 2017, 24(12): 801-809.
- [17] Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, et al. Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system [J]. J Gene Med, 2004, 6(1): S212-S222.
- [18] Passini MA, Wolfe JH. Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector [J]. J Virol, 2001, 75(24): 12382-12392.
- [19] Kim JY, Ash RT, Ceballos-Diaz C, et al. Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualising and manipulating neuronal circuits *in vivo* [J]. Eur J Neurosci, 2013, 37(8): 1203-1220.
- [20] Gholizadeh S, Tharmalingam S, Macaladaz ME, et al. Transduction of the central nervous system after intracerebroventricular injection of adeno-associated viral vectors in neonatal and juvenile mice [J]. Hum Gene Ther Methods, 2013, 24(4): 205-213.
- [21] Zhang H, Yang B, Mu X, et al. Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system [J]. Mol Ther, 2011, 19(8): 1440-1448.
- [22] Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection [J]. Mol Ther, 2008, 16(6): 1073-1080.
- [23] Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes [J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(1): 59-65.
- [24] Cannon JR, Gekhman KD, Tapias V, et al. Expression of human E46K-mutated α -synuclein in BAC-transgenic rats replicates early-stage Parkinson's disease features and enhances vulnerability to mitochondrial impairment [J]. Exp Neurol, 2013, 240: 44-56.
- [25] Ma KL, Song LK, Yuan YH, et al. The nuclear accumulation of alpha-synuclein is mediated by importin alpha and promotes neurotoxicity by accelerating the cell cycle [J]. Neuropharmacology, 2014, 82: 132-142.
- [26] Pinho R, Paiva I, Jercic KG, et al. Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of alpha-synuclein [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(1): 31-50.
- [27] Bartels T, De Schepper S, Hong S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Science, 2020, 370(6512): 66-69.
- [28] Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(6): 358-370.
- [29] Xu Y, Deng Y, Qing H. The phosphorylation of α -synuclein: development and implication for the mechanism and therapy of the Parkinson's disease [J]. J Neurochem, 2015, 135(1): 4-18.
- [30] Ghosh D, Mehra S, Sahay S, et al. α -synuclein aggregation and its modulation [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 100: 37-54.
- [31] Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell biology and pathophysiology of α -synuclein [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8(3): a024091.

[收稿日期] 2020-11-24

姬桂青,邱天,景瑾,等. B6-Co小鼠眼睑成纤维细胞生长曲线及HSP70表达研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 99-106.

Ji GQ, Qiu T, Jing J, et al. Growth curve and HSP70 expression of eyelid fibroblasts in B6-Co mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 99-106.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.015

B6-Co小鼠眼睑成纤维细胞生长曲线及HSP70表达研究

姬桂青^{1,3}, 邱天², 景瑾³, 朱顺星³, 邵义祥^{3*}

(1.南通大学神经再生重点实验室,江苏南通 226001; 2.华东师范大学第二附属中学,上海 201203;
3.南通大学比较医学研究所,江苏南通 226001)

【摘要】 目的 探索 B6-Co 小鼠与正常 C57BL/6 小鼠眼睑成纤维细胞增殖能力与 HSP70 蛋白表达的差异。方法 C57BL/6(B6)小鼠按雌雄小鼠 2:1 的比例配种获取孕鼠;B6-Co 小鼠按 B6(雄)×B6-Co(雌)=1:2 或 B6(雌)×B6-Co(雄)=2:1 比例配种获得孕鼠,取 18.5 d 的孕鼠腹中胚胎,再取胚胎眼睑组织培养小鼠眼睑成纤维细胞;用免疫荧光、HE 染色鉴定原代细胞、观察成纤维细胞形态。根据血球计数板直接计数法观察两种细胞生长曲线的差异,用 Real-time PCR 和 Western blot 检测两种细胞中 HSP70 的表达量。体外构建 HSP70 基因 siRNA 干扰载体, Lipofectamin2000 转染 B6 小鼠眼睑成纤维细胞;Real-time PCR 和 Western blot 实验从 mRNA 和蛋白水平分别检测 HSP70 的相对表达量,测定其干扰效率;Transwell 实验检测 B6 小鼠眼睑成纤维细胞的迁移能力。**结果** 小鼠眼睑成纤维细胞生长曲线结果表明,B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞增殖速度慢于 B6 小鼠眼睑成纤维细胞($P < 0.01$)。B6-Co 小鼠成纤维细胞中 HSP70 表达量远远低于 B6 小鼠成纤维细胞,具有显著性差异。B6 小鼠眼睑成纤维细胞转染 HSP70 siRNA 干扰载体后,siRNA-HSP70-3 干扰效率最强,mRNA 和蛋白水平均被有效抑制,干扰效率高达 70% ($P < 0.05$);siRNA-HSP70 组在迁移能力上亦显著低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** HSP70 基因及蛋白表达下调影响 B6-Co 的成纤维细胞生长曲线,构建的 siRNA-HSP70-3 干扰载体能够有效抑制 B6 小鼠眼睑成纤维细胞中 HSP70 基因的表达,并显著抑制细胞迁移。HSP70 可能参与成纤维细胞胚胎期发育的调控,是造成其 EOB 表型的重要原因之一。

【关键词】 眼睑成纤维细胞;HSP70;C57BL/6;B6-Co;迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0099-08

Growth curve and HSP70 expression of eyelid fibroblasts in B6-Co mice

Ji Guiqing^{1,3}, Qiu Tian², Jing Jin³, Zhu Shunxing³, Shao Yixiang^{3*}

(1. Key Laboratory of Nerve Regeneration, Nantong University, Nantong 226001, China.

2. NO.2 High School of East China Normal University, Shanghai 201203.

3. Institute of Comparative Medicine, Nantong University, Nantong 226001)

【Abstract】 **Objective** To examine the mechanism of the eye-open at birth (EOB) phenotype in B6-Co mice at birth. **Methods** C57BL/6 (B6) mice were bred at a ratio of male to female mice of 2:1 to obtain pregnant mice. B6-Co

【作者简介】 姬桂青(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:1337729738@qq.com

【通信作者】 邵义祥(1956—),男,博士,教授,研究方向:实验动物培育与应用,人类疾病动物模型。E-mail:shaoyx@ntu.edu.cn

mice were bred by B6 (male) mice with B6-Co (female) mice at a ratio of 1:2 or B6 (female) mice with B6-Co (male) mice at a ratio of 2:1 hybridization to obtain pregnant mice. We selected 18.5-day embryos of pregnant mice and then collected embryonic eyelid tissue to culture mouse eyelid fibroblasts. We used immunofluorescence and hematoxylin and eosin staining to identify primary cells and observe morphology of fibroblasts. The difference in growth curves between two cell types was observed using the direct counting method with a hemocytometer. Real-time PCR and Western blot were used to detect HSP70 expression in the two cell types. Lipofectamin2000 was used to transfect the fibroblasts. The HSP70 gene mRNA and protein expression levels were detected by Real-Time PCR and Western blot to determine the interference efficiency. The migration ability of fibroblasts was detected by Transwell experiment. **Results** The growth curve of eyelid fibroblasts showed that B6-Co mouse eyelid fibroblasts proliferated more slowly than B6 mouse eyelid fibroblasts ($P < 0.01$). However, HSP70 expression levels in B6-Co mouse fibroblasts were significantly lower than those in B6 mouse fibroblasts. After the fibroblasts were transfected with HSP70 siRNA interference vector, the expression levels of HSP70 gene on mRNA and protein were effectively inhibited. Among them, siRNA-HSP70-3 has the strongest interference efficiency, and the interference efficiency was up to 70% ($P < 0.05$). The migration abilities of fibroblasts in the siRNA-HSP70 group were significantly lower ($P < 0.05$) than those in the siRNA-NC group. **Conclusions** Downregulation of HSP70 gene and protein expression affects the growth curve of fibroblasts in B6-Co mice and may be involved in regulation of embryonic development of fibroblasts. The constructed siRNA-HSP70-3 interference vector can effectively inhibit the expression of target gene HSP70 on fibroblasts, and can significantly inhibit the cell migration. This could be one of the important reasons for the EOB phenotype of B6-Co mice.

【Keywords】 eyelid fibroblasts; HSP70; C57BL/6; B6-Co; migration

先天性的角膜混浊 (congenital corneal opacities, CCO) 在新生儿中患病率只有 1.4%, 虽然罕见但患病严重易致盲, 如不能得到诊治, 将会导致弱视, 影响新生儿的视觉发育, 或者波及其全身发育 (引发生长迟缓等)^[1]。因此能够及早发现并治疗 CCO, 具有重要意义。一般研究认为常见的 CCO 病因主要有两种: 一是外胚叶发育障碍性的角膜混浊, 由于外胚叶的晶状体和囊泡不能正常地分离外胚叶; 二是炎症引起角膜混浊 (母体内血液或羊水感染)^[2]。前一种发育障碍主要是常染色体显性遗传因素导致, 但深入机制尚不明确, 这与先天性眼睑闭合不全 (eyelid open at birth, EOB) 模型鼠^[3] 的现象极为相似。

EOB 小鼠在出生时眼睑开放, 这种异常现象可能是导致后代小鼠眼部疾患的重要原因^[4]。有研究发现通过 ENU 诱变建立的 B6-Co 突变系小鼠即具有 EOB 特征^[5-7]。两种小鼠角膜组织全蛋白二维凝胶电泳结果显示, 相比 C57BL/6 小鼠 (以下简称: B6 小鼠), B6-Co 小鼠电泳结果发现蛋白质点显著上调的有 6 个, 显著下调的蛋白质点有 13 个, 其中 HSP70 下调最为显著^[8]。热休克蛋白 70 (HSP70) 是热休克蛋白家族中被研究最多的一种, 尤其是对 HSP70 家族的结构、功能以及表达调控机理的研究较多^[9-10], HSP70 在细胞的周期调控^[11]、胚胎发育^[12-14]、衰老中具有重要的生物学功能^[15]。

而前期实验^[8] 检测两种老鼠眼睑组织内 HSP70 蛋白表达差异性显著, 所以 HSP70 与 B6-Co 小鼠 EOB 表型出现可能存在联系。

因此, 本实验选取从突变系 B6-Co 小鼠和正常 B6 小鼠 (取 18.5 d 孕鼠腹中胚胎) 中取材培养的成纤维细胞^[16-20], 验证 HSP70 在两种细胞中的含量是否存在差异, 通过小干扰敲低 B6 成纤维细胞 HSP70 表达, 检测其迁移能力变化。为体外验证 HSP70 的表达能否调控两种细胞的生物学行为提供前期基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用 SPF 级 C57BL/6 小鼠雌鼠 20 只、雄鼠 10 只 (18~22 g, 误差小于 10%) 以及其突变系 B6-Co 小鼠 (SPF 级, 18~22 g 误差小于 10%) 雌鼠 10 只、雄鼠 5 只, 选用小鼠均为 8 周龄, 均由南通大学实验动物中心提供 [SCXK (苏) 2019-0001]。前期实验取材于南通大学实验动物中心 [SYXK (苏) 2017-0045] 完成。实验鼠饲养于 SPF 级屏障动物房内, 室内温度 (21 ± 1) °C, 相对湿度 (55 ± 5) %, 自由采食和自由饮水, 昼夜明暗交替时间 12 h/12 h, 定期更换笼具、垫料, 实验过程中所有操作符合实验动物福利要求, 获得南通大学实验动物伦理委员会批准 (IACUC: 20180808-001)。B6 雄性与 B6

雌性小鼠以 1:2 比例配对,共 5 笼;B6-Co 雄性小鼠与 B6 雌性或 B6 雄性与 B6-Co 雌性小鼠以 1:2 比例配对,共 5 笼。每天早上 8 点前检栓,见栓当日胎龄记为 0.5 d。

1.2 主要试剂与仪器

CO₂ 细胞培养箱 (Thermo); 倒置相差显微镜 (Leica); Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, REF: 04897030001); 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA) (Hyclone)、总 RNA 提取试剂 (TRIzol) (生工, Lot: FB06KB3578); SDS - PAGE Preparation kit 凝胶试剂盒 (生工, C631100-0200); GAPDH 一抗 (Abcam, ab9485); HSP70 一抗 (Abcam, ab2787); lysis buffer (生工, G301DB0009); 胎牛血清, FBS (Gibico, 美国); DMEM 高糖培养基 (Gibico, 美国)

1.3 实验方法

1.3.1 分离和培养小鼠眼睑成纤维细胞

取妊娠期 18.5 d 的孕鼠麻醉消毒,剖腹取胎鼠 (观察 B6-Co 胎鼠的眼睑部开闭,眼睑开启则为 EOB 表型小鼠,眼睑关闭则舍弃, B6 孕鼠腹中胎鼠则全部可用) 的眼睑组织剪碎,胰酶消化,100 目、40 目网筛梯度过滤,离心,完全培养基重悬,放于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养;24 h 后换新鲜完全培养基。细胞按照 1:3 传代,传代 3 次以上待用。

1.3.2 小鼠眼睑成纤维细胞的观察

将细胞传代培养到第 3 代时,将细胞接种于圆玻片上,进行细胞爬片;待细胞密度约 80%,弃去培养基,PBS 洗涤,70%乙醇固定过夜,PBS 轻洗细胞;苏木素染色 20 min,自来水清洗。伊红染色 2 s,自来水清洗。乙醇梯度脱水透明,滴加中性树胶盖玻片,拍照。

1.3.3 小鼠眼睑成纤维细胞的鉴定

将细胞传代培养到第 3 代时,将细胞接种于圆玻片上,进行细胞爬片;待细胞密度约 80%,弃去培养基,PBS 洗涤细胞,进行固定、通透、封闭等常规细胞免疫荧光染色步骤,在荧光显微镜下观察拍照。

1.3.4 检测小鼠眼睑成纤维细胞的生长曲线

取对数生长期细胞,每孔种 2×10⁴ 个细胞。将接种好的细胞培养板放入培养箱中培养过夜,每组设 3 个复孔取均值,实验重复 3 次。在培养 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d 后直接血球计数板进行细胞计数。

1.3.5 两种成纤维细胞内 HSP70 mRNA 含量检测

从 18.5 d 的孕鼠体内获取 B6-Co 和 B6 胎鼠,从其眼睑部位取材培养成纤维细胞待其传代 3 次之后种六孔板,重复 3 次。通过常规方法提取 RNA、逆转录和 Real-time PCR (目的基因以内参基因的 GAPDH 进行校正,每个样本 3 次重复。根据 HSP70 基因 mRNA 设计 RT-PCR 反应引物:GAPDH:Primer-F:5'-GGAGCGAGACCCCACTAAC-3'; Primer-R:5'-GGCGGAGATGATGACCCT-3'。HSP70:Primer-F:5'-CCAAGGTGCAGGTGAAC TACAAGG-3'; Primer-R:5'-GCCGCTGAGAGTTCGTTGAAGTAG-3'.) 使用 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量分析。

1.3.6 Western blot 检测眼睑成纤维细胞内 HSP70 蛋白相对表达量

在两种细胞培养至第 3 代后,接种细胞,收集 3 次样本,提取两种细胞的全蛋白、电泳 (80 V, 120 V)、转膜 (300 mA, 90 min),室温封闭 2 h。一抗 4℃ 孵育过夜 (1/1000),PBST 洗 3 × 10 min。二抗室温孵育 2 h (1/1000),PBS 洗 3 × 20 min,显影。

1.3.7 siRNA-HSP70 的设计与合成

在 NCBI 数据库查询小鼠 HSP70 基因序列 (Accession Number: NM_010478.2),最终设计 3 条 siRNA 序列、1 条 NC 序列进行合成,见表 1。siRNA-HSP70 的合成委托上海吉玛制药技术有限公司。

1.3.8 siRNA-HSP70 转染 B6 小鼠眼睑成纤维细胞

B6 小鼠眼睑成纤维细胞种于 12 孔板中,待密度达到 50% ~ 60% 时,取 2 μL siRNA-HSP70 溶于 100 μL Opti-MEM 基培中,再取 2 μL Lipofectamin2000 溶于 100 μL Opti-MEM 基培中,混匀后,室温各孵育 5 min;再将两者混匀,室温孵育

表 1 根据 HSP70 基因设计 siRNA 序列
Table 1 Design siRNA sequence based on HSP70 gene

基因 Gene	正义链 Sense	反义链 Antisense
阴性对照 Negative control	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
小干扰 RNA-HSP70-1 siRNA-HSP70-1	5'-GAAGACAUUAUGUCUAGCUTT-3'	5'-AGCUAGACUAUAUGUCUUCTT-3'
小干扰 RNA-HSP70-2 siRNA-HSP70-2	5'-CGAUUACUGUCAAGGUUAUTT-3'	5'-AUAACCUUGACAGUAAUCGTT-3'
小干扰 RNA-HSP70-3 siRNA-HSP70-3	5'-CCUCCUGCAUACAUGUCUTT-3'	5'-AGACAUGUAUGCAGGAAGTT-3'

20 min; 成纤维细胞换液, 更换成基础培养液 800 μL ; 混合液加入 12 孔板中, 混匀, 细胞 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 6 h 后更换成完全培养液。细胞转染后 48 h 提取总 RNA、72 h 提取总蛋白。

1.3.9 Transwell 检测眼睑成纤维细胞迁移能力的变化

本实验选用直径 6.5 mm, 孔径 8 μm 的 Transwell 小室; 0.25% 胰酶将转染的细胞消化, 以 DMEM 基础培养基重悬并调整细胞浓度至每毫升 5×10^5 个细胞; 加 100 μL 细胞悬液至 Transwell 上室, 加入 500 μL DMEM 培养基 (含 5% 胎牛血清) 至 Transwell 下室, 于 CO_2 培养箱中培养 24 h; 取出 Transwell 小室, 吸尽培养基, PBS 清洗 3 次; 放入 4% 多聚甲醛中固定 20 min; 弃固定液, PBS 摇床洗 10 min; 放入结晶紫中室温染色 10 min; PBS 轻洗 2 次, 每次 5 min; 用脱脂棉擦去小室上表面细胞, 显微镜下取 5 个视野拍照计数, 以备后续统计、分析。

1.4 统计学方法

采用 STATA V16.1 统计学软件进行数据处理, 用 GraphPad Prism 8 软件进行统计作图。数据结果用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 获得数据分析为正态性分布, 采用配对 t 检验, 当 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成纤维细胞形态

使用倒置相差显微镜观察从 B6 和 B6-Co 小鼠眼睑取出的成纤维细胞, 在 400 倍镜下可以看出两种成纤维细胞都呈现梭形、星型、多角型。但是 B6 小鼠的成纤维细胞更为舒展, 且胞体较大; 而 B6-Co 小鼠的眼睑成纤维细胞在 400 倍镜下发现其边缘较为粗糙, 形态与 B6 相比更为狭小, 见图 1。

2.2 通过免疫荧光法鉴定 B6 和 B6-Co 小鼠成纤维细胞

使用免疫荧光技术鉴定原代取材的细胞, 根据文献查阅发现: 使用眼睑部位皮肤进行原代取材一般存在两种细胞: 成纤维细胞与角质形成细胞。因此使用 Vimentin (波形蛋白) 和 Cytokeratin (细胞角蛋白) 进行免疫荧光染色 (图 2、图 3), 因为波形蛋白是成纤维细胞的标志性蛋白, 而细胞角蛋白是角质形成细胞的标志性蛋白。所以从图 2、图 3 中发现, 在 B6 与 B6-Co 两种成纤维细胞中的细胞质里, 发现被染色的波形蛋白, 而没有出现细胞角蛋白,

说明成纤维细胞纯度达到 100%。因此, 可以证明原代取材 B6 和 B6-Co 小鼠眼睑部位成纤维细胞成功。

2.3 通过 HE 染色观察 B6 和 B6-Co 小鼠成纤维细胞

HE 染色方法主要是用苏木素染核呈蓝色, 而伊红染色主要是染细胞胞浆。从图 4 可以发现, 绝大多数细胞呈长梭形, 胞浆为红色, 细胞核被染成蓝色, 符合成纤维细胞特征。B6 和 B6-Co 小鼠成纤维细胞在 HE 染色上没有显著性差别。

2.4 通过血球计数板法检测 B6 和 B6-Co 小鼠成纤维细胞生长

通过血球计数板计数法, 原代取材培养三代以后, 胰酶消化后离心弃上清, 重悬沉淀, 人工计数, 种板——每孔约 2×10^4 个。之后 7 d 定时通过数值统计, 得出图 5 的两种细胞生长曲线。可以发现两种细胞都呈现增殖趋势, 但在第 7 天略微下降, 细胞长满进入平台期。而 B6 小鼠成纤维细胞数量统计每天都略高于 B6-Co 小鼠成纤维细胞数量, B6 小鼠成纤维细胞第 1 天后即进入指数增长期, B6-Co 则在第 2 天进入指数增长期, 因此由图 5 可以判定, B6-Co 小鼠成纤维细胞增殖速度显著低于 B6 正常成纤维细胞增殖速度 ($P < 0.01$)。

2.5 通过 Real-time PCR 法检测 B6-Co 和 B6 小鼠成纤维细胞内 HSP70 mRNA 的表达

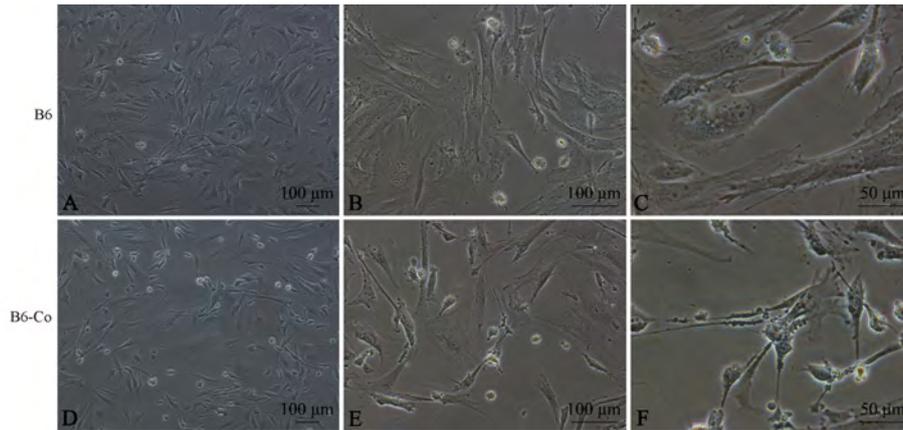
通过常规方法提取 RNA 进行 Real-time PCR 实验, 从图中发现, B6-Co 小鼠眼睑部位成纤维细胞 HSP70 mRNA 表达量低于 B6 小鼠眼睑成纤维细胞, 且二者具有显著性差异 (图 6)。

2.6 通过 Western blot 检测 B6-Co 和 B6 小鼠成纤维细胞内 HSP70 蛋白表达量

通过 Western blot 实验发现, B6-Co 小鼠眼睑部位成纤维细胞的 HSP70 蛋白表达量低于 B6 小鼠成纤维细胞, 且二者具有显著性差异 (图 7)。

2.7 siRNA-HSP70 对 HSP70 基因的干扰效率

在转染 48 h 后, 通过 Real-time PCR 验证 HSP70 基因 mRNA 水平的干扰效率; 在转染 72 h 后, 通过 Western blot 验证 HSP70 基因蛋白水平的干扰效率。结果表明 (图 8): 各组均能对靶基因的 mRNA 及蛋白表达产生抑制作用, siRNA-HSP70-3 组较其他组抑制作用最强, B6 小鼠眼睑成纤维细胞 HSP70 基因的表达量下降最为显著, 干扰效率高达 70% 以上 ($P < 0.01$), 以上结果表明 siRNA-HSP70-

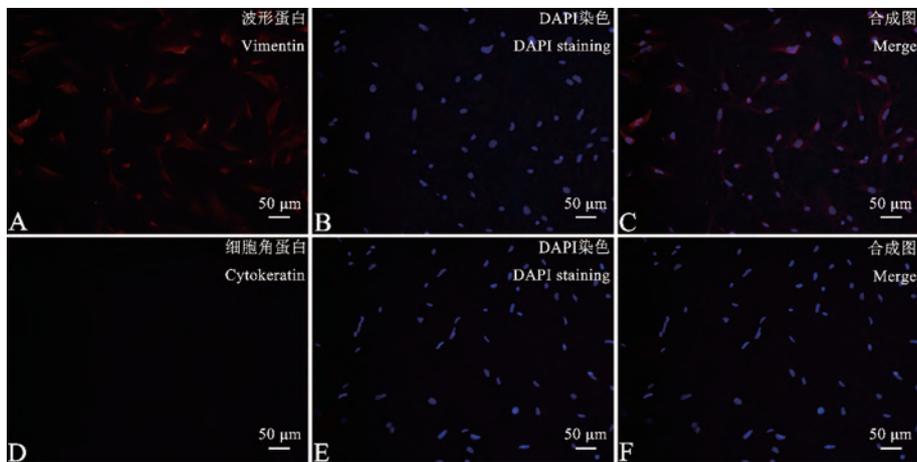


注: A、B、C: B6 小鼠眼睑成纤维细胞; D、E、F: B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞。

图 1 B6、B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞形态图

Note. A/B/C, B6 mouse orbital fibroblasts. D/E/F, B6-Co mouse orbital fibroblasts.

Figure 1 Morphology of orbital fibroblasts in B6 and B6-Co mice

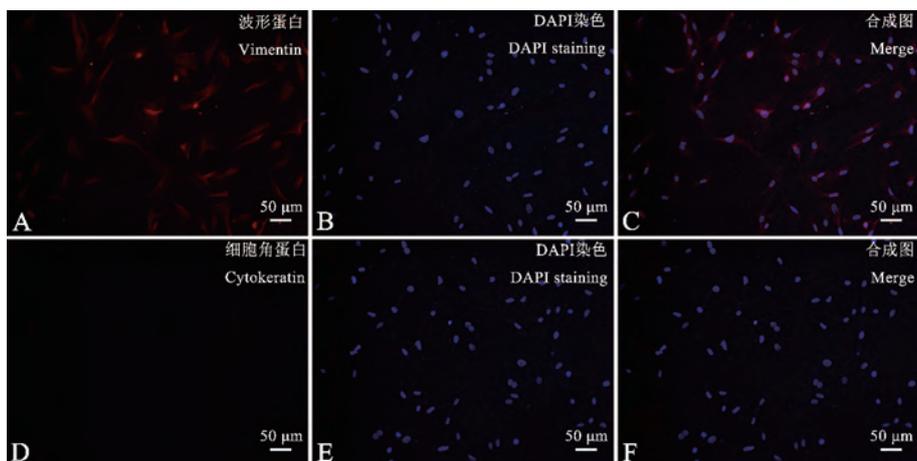


注: A: 波形蛋白; D: 细胞角蛋白; B、E: DAPI 染色; C、F: 合成图。

图 2 免疫荧光鉴定 B6 小鼠的眼睑成纤维细胞

Note. A, Vimentin. D, Cytokeratin. B/E, DAPI staining. C/F, Merge.

Figure 2 Immunofluorescence identification of orbital fibroblasts from B6 mice

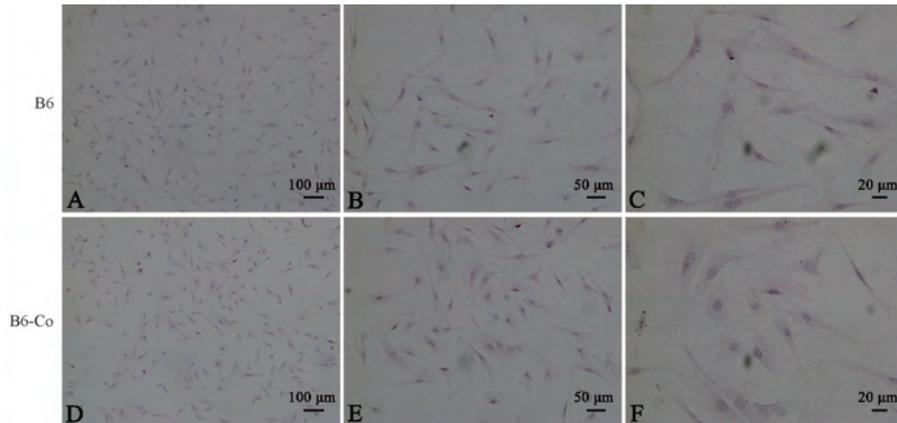


注: A: 波形蛋白; D: 细胞角蛋白; B、E: DAPI 染色; C、F: 合成图。

图 3 免疫荧光鉴定 B6-Co 小鼠的眼睑成纤维细胞

Note. A, Vimentin. D, Cytokeratin. B/E, DAPI staining. C/F, Merge.

Figure 3 Immunofluorescence identification of orbital fibroblasts from B6-Co mice

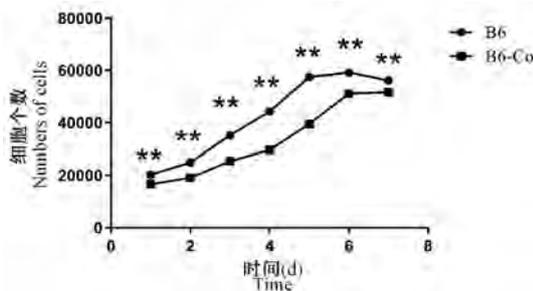


注:A/B/C;B6 小鼠眼睑成纤维细胞;D/E/F;B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞。

图 4 HE 染色鉴定 B6 与 B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞

Note. A/B/C, B6 mouse orbital fibroblasts. D/E/F, B6-Co mouse orbital fibroblasts.

Figure 4 HE staining of B6 and B6-Co mouse orbital fibroblasts

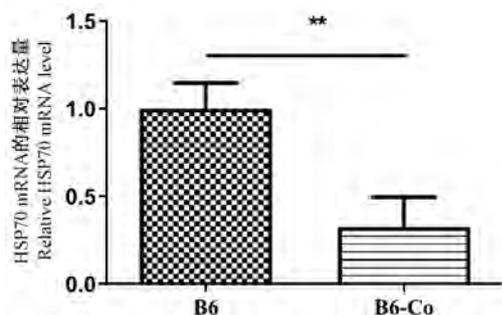


注:血球计数板计数 B6 和 B6-Co 小鼠成纤维细胞个数,与 B6 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 5 B6 和 B6-Co 小鼠成纤维细胞生长曲线

Note. The number of fibroblasts in B6 and B6-Co mice was counted by blood cell counting plate. Compared with the B6 group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Growth curve of fibroblasts in B6 and B6-Co mice



注:Real-time PCR 检测 B6-Co 和 B6 小鼠成纤维细胞内 HSP70 mRNA 表达量。与 B6 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 6 B6-Co 和 B6 小鼠成纤维细胞内 HSP70 mRNA 表达量对比

Note. The expression of HSP70 mRNA in B6-Co and B6 mouse fibroblasts was detected by Real-time PCR. Compared with the B6 group, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Comparison of HSP70 mRNA expression in fibroblasts of B6-Co and B6 mice

3 能够有效靶向抑制 HSP70 基因的表达,保证后续实验的有效开展。

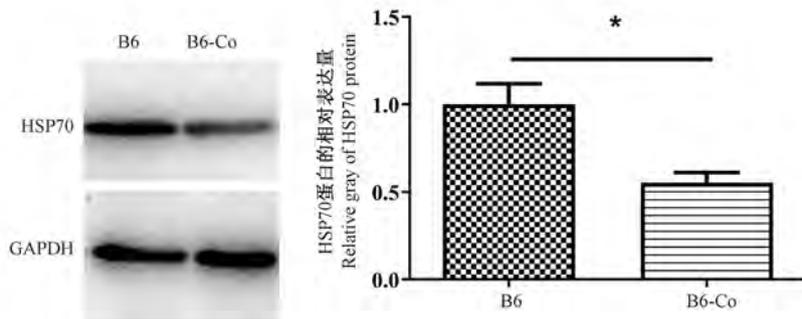
2.8 siRNA-HSP70 对 B6 成纤维细胞迁移能力的影响

通过 Transwell 迁移实验检测 HSP70 基因下调后成纤维细胞的体外迁移能力,由实验结果(图 9)可知,siRNA-HSP70 组的成纤维细胞,在 Transwell 小室接种培养 24 h 后,其穿过小室的细胞数量极显著低于 siRNA-NC 组($P < 0.01$),这表明敲低 HSP70 基因能够显著降低 B6 成纤维细胞的体外迁移能力。

3 讨论

先天性角膜混浊 (congenital corneal opacities, CCO) 是一种较为罕见的遗传性疾病,目前对于 CCO 的诊断治疗仍在不断探索之中,而对发育障碍引发的角膜混浊一直广受眼科学研究者关注。

发育障碍引发角膜混浊主要由遗传因素导致,这与 EOB 模型鼠的现象类似。人类胚胎时期眼睛的发育过程一般有几个过程:眼睑生长——覆盖眼球——全部融合——重新打开(出生后)^[16]。在小鼠胚胎期眼睛发育过程中,同样经历上下眼睑生长——覆盖眼球——全部融合——重新打开的过程^[4],与人类不同的是正常小鼠出生时闭眼,至出生后 12~14 d 才睁眼。而 EOB 表型的小鼠在出生时即睁眼,这种异常现象是导致后代小鼠眼部患病的重要原因之一。B6-Co 突变系小鼠出生时眼睑即张开,使得幼年期眼部易受病原体感染^[5],不能保护小鼠眼睛的正常发育,从而易患角膜炎,进而逐步发展为角膜混浊,与人类角膜混浊的发病机制极为相似,是研究人类 CCO 的良好疾病动物模型。

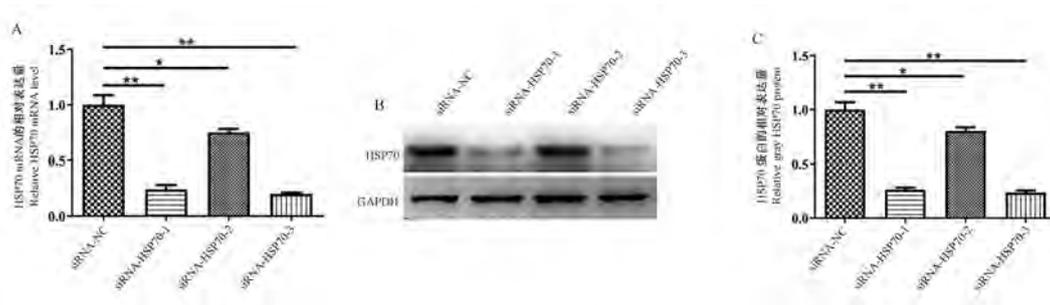


注: Western blot 检测 B6-Co 和 B6 小鼠眼睑成纤维细胞内 HSP70 蛋白表达及其统计图。与 B6 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 7 B6-Co 和 B6 小鼠眼睑成纤维细胞内 HSP70 蛋白表达量对比

Note. Western blot was used to detect the expression of HSP70 protein in B6-Co and B6 mouse eyelid fibroblasts and its statistical diagram. Compared with the B6 group, * $P < 0.05$.

Figure 7 Comparison of HSP70 protein expression in fibroblasts of B6-Co and B6 mice

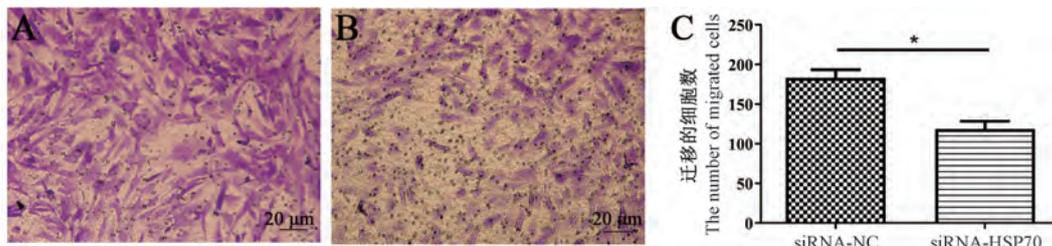


注:A: Real-time PCR 检测成纤维细胞在转染 siRNA-HSP70 后 HSP70 mRNA 的相对表达量; B: Western blot 检测 HSP70 蛋白的表达量; C: B 的统计结果。与 siRNA-NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 8 siRNA-HSP70 对 HSP70 基因的干扰效率

Note. A, Real-time PCR was used to detect the relative expression of HSP70 mRNA in fibroblasts after transfection with siRNA-HSP70. B, Western blot to detect HSP70 protein expression. C, B statistical results. Compared with the siRNA-NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 8 The interference efficiency of siRNA-HSP70 on HSP70 gene



注:A: siRNA-NC 组穿过 Transwell 小室的成纤维细胞; B: siRNA-HSP70 组穿过 Transwell 小室的成纤维细胞; C: A、B 的统计图。与 siRNA-NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 9 siRNA-HSP70 对成纤维细胞迁移能力的影响

Note. A, Fibroblasts passing through Transwell chamber in siRNA-NC group. B, Fibroblasts passing through Transwell chamber in siRNA-HSP70 group. C, Statistical charts for A and B. Compared with the siRNA-NC group, * $P < 0.05$.

Figure 9 Effect of siRNA-HSP70 on migration ability of fibroblasts

HSP70 蛋白是热休克蛋白家族中被研究较多的一种蛋白,大多数研究者关注在 HSP70 家族的结构、功能以及表达调控机理方面的研究^[11-14]。在前期实验中通过比较两种小鼠角膜组织蛋白分析发现突变系 B6-Co 小鼠中 HSP70 基因的表达量显著下调^[8],所以 B6-Co 小鼠体内 HSP70 表达量的进一步降低可能影响了眼睑成纤维细胞增殖迁移^[16]能力,导致其胚胎期上下缘眼睑无法正常生长融合,

导致该小鼠出生时的 EOB 表型。有研究表明, HSP70 在细胞内的含量可能与胚胎发育中保护与被保护有关^[21],细胞内 HSP70 的表达量的高低可能影响成纤维细胞在胚胎期发育^[22-27]。眼睑边缘部位细胞迁移障碍是引发 B6-Co 出现 EOB 表型的重要原因,因而成纤维细胞的迁移运动能力强弱是小鼠出生前眼睑愈合重要因素。而实验(图 9)通过小干扰实验敲低 B6 小鼠成纤维细胞 HSP70 的表

达,使用 Transwell 检测细胞迁移能力,发现成纤维细胞的迁移能力被显著性降低($P < 0.05$)。

本实验结果表明,B6 和 B6-Co 小鼠胚胎期眼睑成纤维细胞内 HSP70 的 mRNA 表达量和蛋白表达量存在显著差异,与两种小鼠角膜组织蛋白二维凝胶电泳的结果一致。说明 HSP70 基因及蛋白表达下调影响了 B6-Co 的成纤维细胞生长曲线,同时下调 HSP70 表达降低了成 B6 纤维细胞迁移能力。因此 HSP70 基因可能参与成纤维细胞胚胎期发育的调控,最终造成 B6-Co 小鼠 EOB 表型。HSP70 基因如何调控成纤维细胞的增殖、迁移和凋亡? 其他相关基因又是如何影响成纤维细胞的生长发育? 眼睑、眼附属器以及眼角膜等胚胎发育过程中的协调机制又是如何实现的? 这一系列问题均有待于持续深入研究才能阐明,而 B6-Co 小鼠将来能否作为眼病研究的动物模型还需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 苗森, 蔺琪, 孙亚杰, 等. 先天性角膜混浊患儿的临床特征分析 [J]. 眼科新进展, 2020, 40(2): 180-183.
- [2] 王铮华, 石珍荣, 孙为荣, 等. 先天性角膜混浊 [J]. 青岛医学院学报, 1989, 25(4): 317-319.
- [3] Zhang L, Wang W, Hayashi Y, et al. A role for MEK kinase 1 in TGF-beta/activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure [J]. EMBO J, 2003, 22(17): 4443-4454.
- [4] 王旭, 吴刘成, 刘春, 等. B6-Co 与 B6 小鼠眼睑胚胎发育的形态观察 [J]. 交通医学, 2012, 26(5): 404-406.
- [5] Wu LC, Liu C, Jiang MR, et al. Defective eyelid leading edge cell migration in C57BL/6-corneal opacity mice with an "eye open at birth" phenotype [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(3): 1-15.
- [6] 朱顺星, 孙丽, 刘春, 等. 遗传性角膜病小鼠生物学特性观察 [J]. 南通医学院学报, 2009, 29(2): 79-83, 91.
- [7] 缪进, 王生存, 刘春, 等. B6-Co 小鼠眼睑体外培养的形态学研究 [J]. 交通医学, 2011, 25(5): 437-438, 442.
- [8] 管程齐, 蒋康伦, 吴刘成, 等. B6-Co 突变系小鼠混浊角膜组织蛋白的二维凝胶电泳分析 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(46): 8680-8684.
- [9] 杜立银, 田文儒, 曹荣峰. 哺乳动物热休克蛋白 70 表达的基因调控与生物学功能 [J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(11): 18-20.
- [10] Boroughs LK, Antonyak MA, Johnson JL, et al. A unique role for heat shock protein 70 and its binding partner tissue transglutaminase in cancer cell migration [J]. J Biol Chem, 2011, 286(43): 37094-37107.
- [11] Jagadish N, Agarwal S, Gupta N, et al. Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) overexpression in breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 150.
- [12] Gao J, Zhang W, Dang W, et al. Heat shock protein expression enhances heat tolerance of reptile embryos [J]. Proc Biol Sci, 2014, 281(1791): 20141135.
- [13] Li XH, Pang HQ, Qin L, et al. HSP70 overexpression may play a protective role in the mouse embryos stimulated by CUMS [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13: 125.
- [14] 李小红, 罗珊, 樊伟, 等. HSP70 在不同应激程度 CUMS 昆明小鼠胚胎中的表达及作用 [J]. 四川大学学报(医学版), 2017, 48(4): 515-519.
- [15] Simard JP, Reynolds DN, Kraguljac AP, et al. Overexpression of HSP70 inhibits cofilin phosphorylation and promotes lymphocyte migration in heat-stressed cells [J]. J Cell Sci, 2011, 124(14): 2367-2374.
- [16] Cagianut B, Molz G, Theiler K. Ocular and general abnormalities in classical trisomy [J]. Bull Mem Soc Fr Ophthalmol, 1972, 85: 45-51.
- [17] 王超, 赵传超, 施忠秋, 等. 热应激对小鼠器官指数、小肠损伤及胃 HSP70 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 63-66, 10.
- [18] 缪进, 李瑶, 刘春, 等. TGF α /EGFR 通路相关蛋白在 B6-Co 小鼠眼睑中的表达 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(1): 28-31.
- [19] 王英, 刘石磊, 刘振伟, 等. ICR 胎鼠成纤维细胞培养方法的优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8): 48-50, 55, 86.
- [20] 卢泽艳, 郑良凤, 李瑶, 等. B6-Co 与 B6 小鼠眼角膜形成细胞的原代无血清培养及比较研究 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(2): 393-397.
- [21] Garg M, Kanojia D, Seth A, et al. Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(1): 207-215.
- [22] Jiang T, Wang X, Wu W, et al. Let-7c miRNA Inhibits the proliferation and migration of heat-denatured dermal fibroblasts through down-regulating HSP70 [J]. Mol Cells, 2016, 39(4): 345-351.
- [23] 李妍, 吴晓岚, 刘利, 等. HSP70 对大鼠 TNF- α 性发热及下丘脑中 PGE-2 含量的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(4): 223-225, 229.
- [24] Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5238-5247.
- [25] Nigro A, Mauro L, Giordano F, et al. Recombinant arabidopsis HSP70 sustains cell survival and metastatic potential of breast cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2016, 15(5): 1063-1073.
- [26] Dix DJ, Garges JB, Hong RL. Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic [J]. Mol Reprod Dev, 1998, 51(4): 373-380.
- [27] Simoniello P, Esposito MG, Trinchella F, et al. Alterations in brain morphology and HSP70 expression in lizard embryos exposed to thermal stress [J]. C R Biol, 2016, 339(9-10): 380-390.

[收稿日期] 2020-08-19

张雪,金美玉,于洋,等. 小鼠生殖细胞特异性转录因子 NOBOX 调控初级卵泡发育机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 107-114.

Zhang X, Jin MY, Yu Y, et al. Study of the mechanism by which the mouse germ cell-specific transcription factor NOBOX regulates primary follicle development [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 107-114.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.016

小鼠生殖细胞特异性转录因子 NOBOX 调控初级 卵泡发育机制的研究

张 雪^{1,2}, 金美玉^{1,2}, 于 洋^{1,2}, 郑志红^{1,2*}

(1. 中国医科大学实验动物部, 沈阳 110000; 2. 辽宁省转基因动物研究重点实验室, 沈阳 110000)

【摘要】 目的 NOBOX 是在原始卵泡激活过程中起关键作用的转录因子,可直接调控 *Gdf9* 转录,并参与 GDF9/SMAD 通路影响颗粒细胞增殖分化,但其在初级卵泡及之后的具体调控机制并不清楚。*Kit* 作为影响卵泡发育的重要基因,其启动子存在多个 NOBOX 结合位点。本研究拟探索在初级卵泡发育阶段,转录因子 NOBOX 对 *Kit* 的转录调控作用,以及通过 GDF9/SMAD 通路对卵泡发育的影响。**方法** 体外培养初级卵泡统计发育时间;qRT-PCR 检测显微注射 *Nobox*-siRNA 的初级卵泡中 *Nobox*、*Kit*、*Kitl*、*Gdf9* 的 mRNA 表达变化;Western blot 检测显微注射 *Nobox*-siRNA 的初级卵泡中 NOBOX、KIT、P-SMAD 的蛋白表达变化;ChIP 实验验证转录因子 NOBOX 在 *Kit* 基因启动子上的结合位点。**结果** 初级卵泡在体外培养第 5 天可发育为次级卵泡,注射 *Nobox*-siRNA 的初级卵泡延缓 2 d 发育至次级;初级卵泡中注射 *Nobox*-siRNA 后,卵泡中 *Nobox*、*Kit*、*Kitl*、*Gdf9* mRNA 表达显著下调,NOBOX、KIT、P-SMAD2/3 蛋白表达量降低;转录因子 NOBOX 可以结合于 *Kit* 基因启动子。**结论** NOBOX 是小鼠初级卵泡发育至次级卵泡的关键基因,NOBOX 可直接结合 *Kit* 基因启动子,且影响初级卵泡中 KITL/KIT 和 GDF9/SMAD 通路。

【关键词】 初级卵泡;NOBOX;ChIP;*Kit*

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0107-08

Study of the mechanism by which the mouse germ cell-specific transcription factor NOBOX regulates primary follicle development

ZHANG Xue^{1,2}, JIN Meiyu^{1,2}, YU Yang^{1,2}, ZHENG Zhihong^{1,2*}

(1. Department of Laboratory Animal Science, China Medical University, Shenyang 110000, China.

2. Key Laboratory of Transgenic Animal Research, Liaoning Province, Shenyang 110000)

【Abstract】 Objective NOBOX is a transcription factor that plays a key role in the activation of primary follicles. It directly regulates the transcription of *Gdf9* and participates in the GDF9/SMAD pathway to affect the proliferation and differentiation of granulosa cells. *Kit*, an important gene affecting follicular development, has multiple NOBOX binding sites in its promoter. In this study, we aimed to investigate the transcriptional regulation of *Kit* by the transcription factor NOBOX in the primary follicular development stage as well as the influence of the GDF9/SMAD pathway on follicular development. **Methods** The development time of primary follicles *in vitro* was measured. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression changes of *Nobox*, *Kit*, *Kitl* and *Gdf9* in primary follicles injected with *Nobox*-siRNA. Western blot was used to

[作者简介]张雪(1994—),女,硕士,研究方向:小鼠生殖遗传学。E-mail: zhangxue99248@163.com

[通信作者]郑志红(1969—),女,教授,研究方向:实验动物转基因及基因敲除动物。E-mail: zhihongzheng@163.com

measure protein expression changes for NOBOX, KIT and P-SMAD in primary follicles injected with *Nobox*-siRNA. ChIP assay was used to identify the binding site of NOBOX on the *Kit* gene promoter. **Results** Primary follicles developed into secondary follicles on the 5th day *in vitro*. Injection of *Nobox*-siRNA into primary follicles delayed their development into secondary follicles by 2 days. After *Nobox*-siRNA injection into primary follicles, the expression of *Nobox*, *Kit*, *Kitl* and *Gdf9* mRNAs in follicles was significantly downregulated, and the expression levels of NOBOX, KIT and P-SMAD2/3 proteins were decreased. NOBOX showed binding to the *Kit* gene promoter. **Conclusions** NOBOX is a key gene in the development of primary follicles to secondary follicles in mice. NOBOX directly binds to the *Kit* gene promoter and affects the KITL/KIT and GDF9/SMAD pathways in primary follicles.

【Keywords】 primary follicle; NOBOX; ChIP; *Kit*

卵泡发育是一个复杂而又精密的调控过程^[1],从原始生殖细胞分化为卵原细胞,再到原始卵泡发育为成熟卵泡,经历了一系列特定基因的程序性表达^[2]。*Nobox* 是小鼠生殖细胞特异性表达基因,编码一个转录因子,主要表达于卵巢组织,其基因敲除小鼠显示卵巢早衰^[3-5],雌鼠无生育能力^[6-7]。*Nobox* 在整个卵泡发育阶段均有表达,参与原始卵泡的形成及激活。由于卵泡发育是连续动态的过程,生殖细胞特异性基因具有阶段性特征,有必要分阶段对转录因子的作用进行研究。目前广泛性敲除 *Nobox* 只能探究其在原始卵泡中的作用机制,其在初级卵泡及之后的作用尚未有人研究。*Kit* 作为广泛性表达基因,在生殖细胞中也发挥着重要的作用。*Kit* 表达于卵泡发育的所有阶段,贯穿整个卵子发生过程,影响 PGCs 的增殖和分化,可参与 PI3K/AKT 和 KITL/KIT 通路影响卵泡发育^[8-9]。在原始卵泡激活过程中,生殖细胞特异性转录因子 SOHLH1 可直接转录激活 *Kit* 表达,并通过 PI3K/AKT 通路参与原始卵泡激活^[8, 10-11]。与 NOBOX 表达模式不同,SOHLH1 只表达于卵原细胞、原始卵泡,在初级卵泡中表达逐渐消失,而在次级卵泡和其之后的阶段不再表达^[12-13]。当原始卵泡发育为初级卵泡后,SOHLH1 表达逐渐消失,*Kit* 仍持续大量表达,此时 *Kit* 还应受到其他转录因子调控。作为生殖细胞特异性转录因子,NOBOX 在卵泡整个发育阶段均有表达,通过软件分析发现 *Kit* 启动子存在多个 NOBOX 结合位点(NBE),存在转录调控的可能性。此外,在初级卵泡发育至次级卵泡过程中,TGF- β /SMADs 信号通路作为卵母细胞与颗粒细胞沟通的标志性通路开始调控卵泡发育^[14-17]。生长因子 GDF9 作为 TGF- β 超级家族的成员,在初级卵泡中开始表达,已有研究表明 NOBOX 可直接转录调控 *Gdf9*^[18],并参与 GDF9/SMAD 通路影响颗粒细胞增殖分化。本研究拟探索在初级卵泡发育阶

段,转录因子 NOBOX 对 *Kit* 的转录调控作用,以及通过 GDF9/SMAD 通路对卵泡发育的影响,完善转录因子 NOBOX 在卵泡发育过程中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验中共使用 20 只 20 d 日龄及 9 只 6 周龄的 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠(三次重复实验),体重分别约 9~12 g 及 16~18 g(误差不大于 10%),来源于中国医科大学实验动物部[SCXK(辽)2018-0004],取材在中国医科大学实验动物科学部屏障动物实验设施进行[SYXK(辽)2018-0008],取材过程按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。本实验经过中国医科大学实验动物福利与伦理委员会及实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)审查通过(2019260)。

1.2 主要试剂与仪器

M2 培养基(Cat#M7167, Sigma); α -MEM(Cat#32571036, Gibco); FBS(Cat#FB15011, CLARK); ITS(Cat#I3146, Sigma); 谷氨酸盐(Cat#25030-801, Gibco); 矿物油(Cat#M8410, Sigma); *Nobox*-siRNA(上海吉玛制药技术有限公司,中国); LipofectamineTM 3000(Cat#L3000015, Invitrogen); MinuteTM 蛋白提取试剂盒(Cat#SD001/SN-002, Invent); Anti-NOBOX(Cat#sc-514178, Santa); Anti-KIT(Cat#3074 s, Cell Signal Technology); Anti-Phospho-SMAD2/SMAD3(Cat#8828 s, Cell Signal Technology); Anti-GAPDH(Cat#YM3029, Immunoway); mirVanaTM miRNA Isolation Kit(Cat#AM1561, Invitrogen); EZ-ChIPTM - Chromatin Immunoprecipitation Kit(Cat#17-371, Millipore); 体式显微镜(麦克奥迪电器股份有限公司,中国); 显微操纵器(Eppendorf, 德国); 微量注射仪

(Eppendorf, 德国); 拉针仪 (Sutter, 美国); 显微镜热台 (东海, 日本); Western blot 电泳仪及转膜仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 初级卵泡分离、体外培养及显微注射

培养基准备:(1)体外分离 M2 培养基(2)卵泡培养基: α -MEM+20% FBS+1×ITS+1×谷氨酸盐+1% 青链霉素, 分别将两种培养基于 6 cm 培养皿中滴好若干于 5 μ L 微滴, 覆盖矿物油, 提前 2 h 置于培养箱平衡。

无菌条件下取 5 只 20 d 日龄 C57BL/6J 雌鼠卵巢置于 4℃ 预冷的 PBS 中, 剥去周围脂肪及结缔组织后, 转移至 M2 液滴中, 刺破卵巢释放卵泡并通过自制卵泡口吸管收集初级卵泡。通过卵泡直径及形态区分各级卵泡: 原始卵泡直径小于 40 μ m, 卵母细胞周围由单层扁平颗粒细胞包裹; 初级卵泡直径约 40~100 μ m, 卵母细胞由单层立方状颗粒细胞包裹; 次级卵泡直径约 100~200 μ m, 由两层以上颗粒细胞包裹。第一组吸取 100 个初级卵泡直接转移至卵泡培养基液滴中作为空白对照, 即不加任何处理因素 (每个液滴中培养 1 个初级卵泡); 第二组吸取 100 个初级卵泡转移至 M2 液滴中, 注射 10 pL 缓冲液 (DEPC 水) 至卵母细胞后, 再将卵泡转移至卵泡培养基作为阴性对照; 第三组吸取 100 个初级卵泡转移至 M2 液滴中, 注射 10 pL *Nobox*-siRNA 至卵母细胞后, 再将卵泡转移至卵泡培养基作为注射 siRNA 组, 三组卵泡均置于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养数日, 隔天换液, 每 24 h 观察并记录三组初级卵泡发育情况及发育至次级卵泡时间。

1.3.2 qRT-PCR 检测注射 *Nobox*-siRNA 后相关基因 mRNA 表达变化

37℃, 5% CO₂ 条件下分别培养①空白对照组 (未注射组, 不加任何处理因素) ②阴性对照组 (注射 DEPC 水) ③实验组 (注射 *Nobox*-siRNA) 三组初级卵泡, 每组 200 个初级卵泡, 24 h 后收集, 采用 mirVana™ miRNA Isolation Kit 试剂盒分别提取三组的初级卵泡 RNA 并反转录为 cDNA, qRT-PCR 检测相关基因表达变化, 引物序列如下: *Nobox* F: 5'-GGCACTAGTATCGCCTCACC-3', *Nobox* R: 5'-CATTGAGCTTGGGATGGGGT-3'; *Kitl* F: 5'-GATGGTGGGAATGGGTCAGA-3', *Kitl* R: 5'-TCCATGTCGTCCAGTTGCT-3'; *Gdf9* F: 5'-GTCACCTCTACAATACCGTCCG-3', *Gdf9* R: 5'-

CACCCGGTCCAGGTTAAACA-3'; *Kitl* F: 5'-TCTGCGGGAATCCTGTGACT-3', *Kitl* R: 5'-CGGCGACATAGTTGAGGGTTAT-3'; β -*actin* F: 5'-GATGGTGGGAATGGGTCAGA-3', β -*actin* R: 5'-TCCATGTCGTCCAGTTGCT-3'。

1.3.3 Western blot 检测注射 *Nobox*-siRNA 后相关基因蛋白表达变化

37℃, 5% CO₂ 条件下分别培养①阴性对照组 (注射 DEPC 水) ②实验组 (注射 *Nobox*-siRNA) 的两组初级卵泡, 每组 100 个初级卵泡, 24 h 后收集, 采用 Minute™ 蛋白提取试剂盒分别提取各组初级卵泡蛋白 (检测 Phospho-SMAD2/3 提取核蛋白), 100℃ 煮沸 5 min 变性。SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭。Anti-NOBOX 抗体以 1:100 比例稀释; Anti-KIT 抗体以 1:1000 比例稀释; Anti-Phospho-SMAD2/3 抗体以 1:1000 比例稀释; Anti-GAPDH 抗体以 1:5000 比例稀释, 4℃ 摇床孵育过夜。次日去除一抗孵育二抗 (1:5000) 滴加 ECL 发光液使用化学发光分析仪采集信息, 并拍照记录。

1.3.4 染色质免疫沉淀 (ChIP) 验证 NOBOX 与 *Kit* 基因启动子的结合情况

取 6 对 6 周龄 C57BL/6J 小鼠卵巢, 按照 EZ-ChIP™ - Chromatin Immunoprecipitation Kit 试剂盒说明书提取 NOBOX 抗体结合的 DNA 片段。针对 *Kit* 转录起始位点上游 -6177 bp ~ -5218 bp、-4092 bp ~ -2228 bp 序列 (此区域为 *Kit* 启动子有效启动区域^[19]) 使用 JASPAR 软件预测转录因子 NOBOX 特异性结合位点 NBE, 在 *Kit* 基因启动子中查找转录因子 NOBOX 评分较高的 5 个结合位点 NBE (图 1), 并设计 ChIP-PCR 引物验证。ChIP 引物序列如下: *Chip-Kit*-960-1F: 5'-ATGAGGTGCCCTTGTGAG-3', *Chip-Kit*-960-1R: 5'-TCCAGACCGGAAGTGTTTC-3'; *Chip-Kit*-960-2F: 5'-CTCCGTTGAGCAGGGTTA-3', *Chip-Kit*-960-2R: 5'-CCTGGGAAGGAAAAGTCC-3'; *Chip-Kit*-1865-1F: 5'-GGTTCATTCCCATAGCCC-3', *Chip-Kit*-1865-1R: 5'-ACCCACCTCACATCTCCTTA-3'; *Chip-Kit*-1865-2F: 5'-TGTCTCAGGAGTGGGTTG-3', *Chip-Kit*-1865-2R: 5'-CGTTCTGATAAGAGGCAAT-3'; *Chip-Kit*-1865-3F: 5'-TGCCTCTTATCAGAACGG-3', *Chip-Kit*-1865-3R: 5'-CCCAGGACTTGCCAGTAG-3'。PCR 扩增转录因子 NOBOX 结合区域, 验证在 *Kit* 基因启动子上的结合位点。

1.4 统计学方法

三组初级卵泡培养过程中发育为次级卵泡所占比例及卵泡存活率通过 ANOVA 检验组间差异是否具有统计学意义。

检测目的基因 mRNA 表达变化时,每个目的基因重复 3 次 qRT-PCR 实验,内参基因为 β -actin, Δ Ct 值为目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值, $\Delta\Delta$ Ct 值为注射 Nobox-siRNA 组目的基因的 Δ Ct 值-阴性对照组目的基因的 Δ Ct 值。将阴性对照组的基因表达量设为 1,计算注射 Nobox-siRNA 组目的基因表达量相对对照组目的基因表达量的比值 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$),实验数据均使用 GraphPad 软件进行数据处理,以平

均数 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著有统计学意义。

2 结果

2.1 初级卵泡体外培养及显微注射

由于无法保证分离的单个初级卵泡处于统一发育状态,因此已通过预实验分离出 480 个初级卵泡(图 2A),转移至 96 孔板每孔单独培养,观察并记录 480 个初级卵泡发育至次级卵泡所需时间及所占比例。结果显示,体外培养初级卵泡发育至次级卵泡的最短时间为 2 d,最长为 7 d,第 5 天时,初级卵泡发育至次级的比例最高(图 2B),因此体外培养

A *Kit* 基因起始位点上游-6177~-5218 bp 评分较高 NBE
NBE with high score of -6177~-5218 bp upstream of the starting site of *Kit* gene

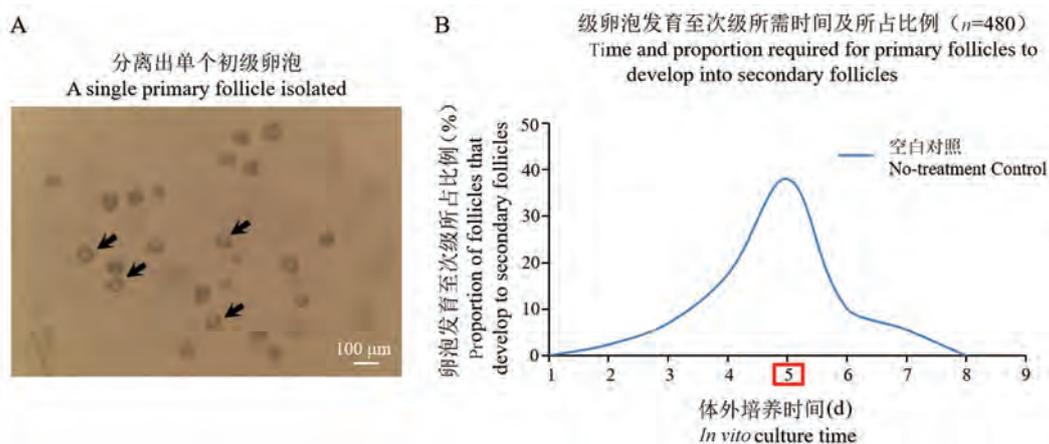
Matrix ID 载体ID	Name 名称	Score 评分	Relative score 相对分数	Sequence ID 序列ID	Start 起点	End 终点	Strand 链	Predicted sequence 预测序列
MA0125.1	Nobox	10.8539	0.983209236575	NC_000071.6:75568810-75569769	746	753	-	TAATTAGT
MA0125.1	Nobox	7.68518	0.878707625765	NC_000071.6:75568810-75569769	540	547	+	TAAGTGGC

B *Kit* 基因起始位点上游-4092~-2228 bp 评分较高 NBE
NBE with a high score of -4092~-2228 bp upstream of the starting site of *Kit* gene

Matrix ID 载体ID	Name 名称	Score 评分	Relative score 相对分数	Sequence ID 序列ID	Start 起点	End 终点	Strand 链	Predicted sequence 预测序列
MA0125.1	Nobox	10.8338	0.982548341383	NC_000071.6:75570895-75572759	1160	1167	+	TAATTGCT
MA0125.1	Nobox	8.15133	0.894081136792	NC_000071.6:75570895-75572759	1417	1424	+	TAATTTGT
MA0125.1	Nobox	7.68518	0.878707625765	NC_000071.6:75570895-75572759	1219	1226	-	TAAGTGGC

图 1 *Kit* 转录起始位点上游评分较高 NBE

Figure 1 NBE with higher score upstream of *Kit* transcription initiation site



注:A:图中均为体外成功分离的单个初级卵泡,如箭头所示。

图 2 预实验分离出单个初级卵泡及卵泡发育时间统计

Note. A, These are all single primary follicles successfully isolated *in vitro*, as shown by the arrows.

Figure 2 Statistics of single primary follicle and follicle development time isolated in the preliminary experiment

初级卵泡发育至次级卵泡的时间为 5 d。

37℃, 5% CO₂ 条件下分别培养①空白对照组 (未注射组, 不加任何处理因素) ②阴性对照组 (注射 DEPC 水) ③实验组 (注射 Nobox-siRNA) 三组初级卵泡, 每 24 h 拍照记录卵泡发育情况并进行比较。三组初级卵泡培养过程中的存活及死亡情况见图 3, 比较三组卵泡存活率, 统计学分析均显示无统计学差异 ($P>0.05$), 结果表明体外分离及显微注射等操作未对初级卵泡存活造成影响。

观察并记录三组初级卵泡发育至次级卵泡所需时间及所占比例, 结果显示, 空白对照组与阴性对照组均第 2 天开始逐渐发生形态学变化, 第 5 天发育至次级卵泡 (卵泡直径大于 100 μm) (图 4A、

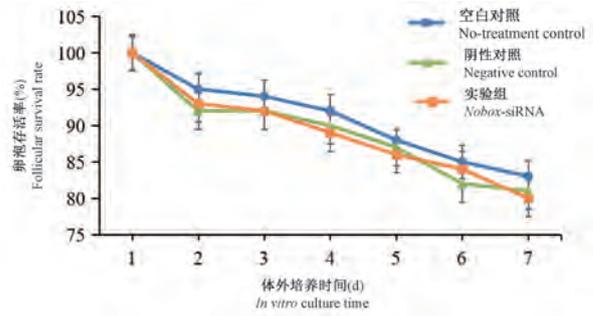
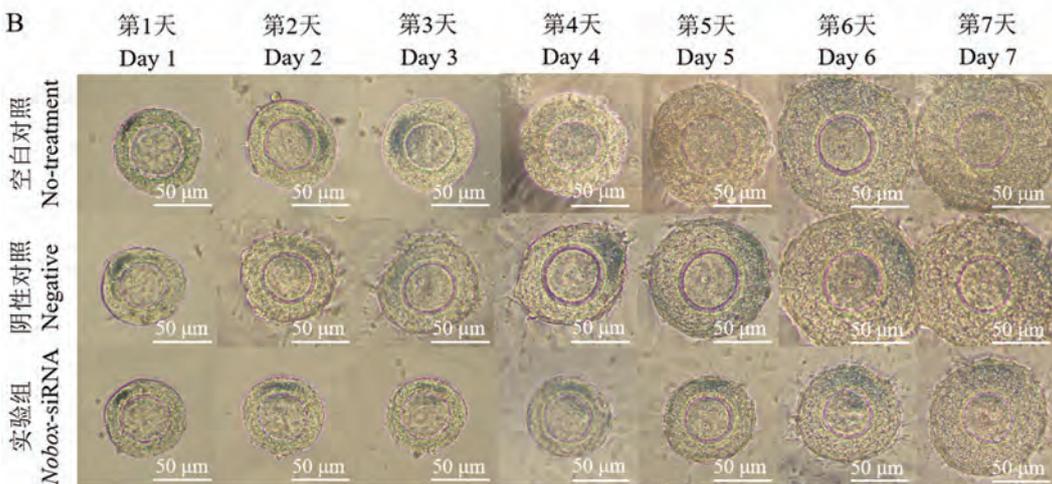
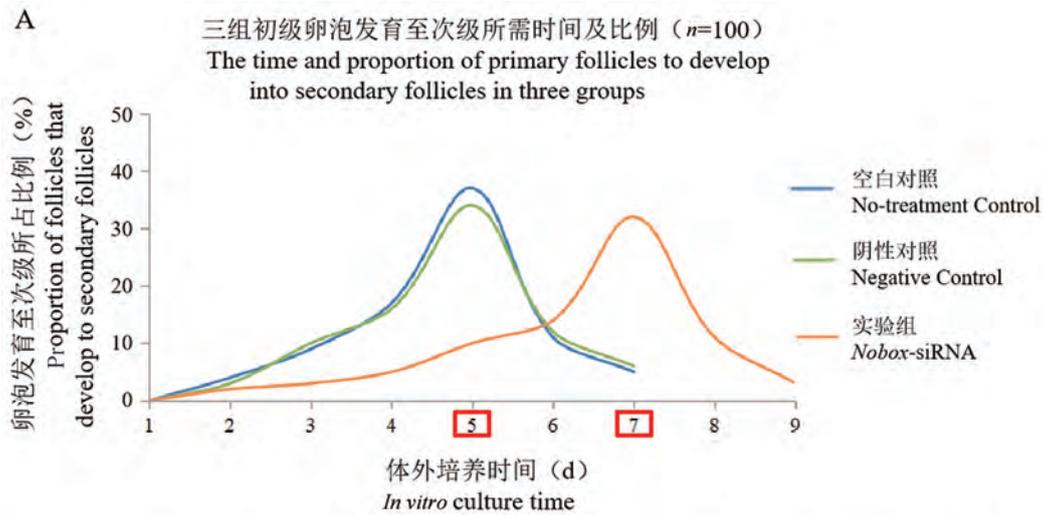


图 3 三组初级卵泡体外培养不同天数存活率 ($n=100$)

Figure 3 The survival rate of three groups of primary follicles was different *in vitro*

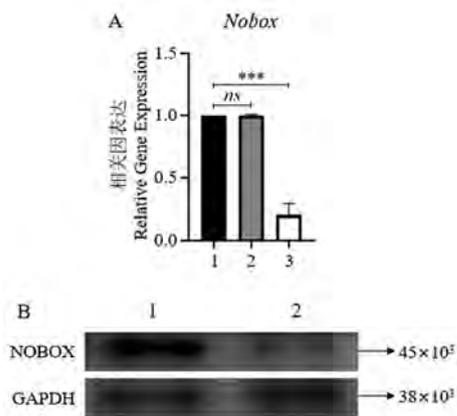


注: B: 显微镜下观察三组初级卵泡体外培养 7 d 的发育情况。

图 4 体外培养三组初级卵泡发育至次级卵泡的发育时间及存活率

Note. B, The development of primary follicles in three groups cultured for 7 d *in vitro* was observed under microscope.

Figure 4 Development time and survival rate of primary follicles to secondary follicles in three groups cultured *in vitro*



注:A:误差线代表三次重复实验的平均数±标准误差;1:阴性对照组(注射 DEPC 水);2:空白对照组(未注射组);3:实验组(注射 *Nobox*-siRNA)。与阴性对照组比较, *ns*, $P > 0.05$, *** $P < 0.001$ 。B:1:阴性对照组(注射 DEPC 水);2:实验组(注射 *Nobox*-siRNA)。

图 5 *Nobox*-siRNA 干扰后初级卵泡中 *Nobox* mRNA 及蛋白表达情况

Note. A, Error bars represent the mean ± standard error of three replicate experiments. 1, Negative control group (injected DEPC water); 2, No-treatment control group (no injection group); 3, Experimental group (*Nobox*-siRNA injection). Compared with the negative control group, *ns*, $P > 0.05$, *** $P < 0.001$. B, 1, Negative control group (injected DEPC water); 2, Experimental group (injection of *Nobox*-siRNA).

Figure 5 Expression of *Nobox* mRNA and protein in primary follicles after *Nobox*-siRNA interference

4B);注射 *Nobox*-siRNA 组与阴性对照组相比:阴性对照组的初级卵泡从第 2 天开始逐渐发生形态学变化,第 5 天可发育至次级;而注射 *Nobox*-siRNA 组的初级卵泡 1~4 d 无明显形态学变化,卵泡直径无明显增长,第 5 天开始逐渐发育,颗粒细胞增厚,卵泡体积增大,第 7 天可发育为次级卵泡。结果表明,*Nobox*-siRNA 干扰初级卵泡后,卵泡暂时停止发育,颗粒细胞增殖停滞,初级卵泡延缓 2 d 发育至次级(图 4A、4B)。

2.2 初级卵泡中注射 *Nobox*-siRNA 后 *Nobox* mRNA 及蛋白表达情况

37℃,5% CO₂ 条件下分别培养①空白对照组(未注射组, No-treatment Control)②阴性对照组(注射 DEPC 水, Negative Control)③实验组(注射 *Nobox*-siRNA)的三组初级卵泡,每组 300 个,24 h 后提取其中 200 个初级卵泡 RNA,反转为 cDNA,经 qRT-PCR 发现,空白对照组与阴性对照组相比数据

无显著性差异, $P > 0.05$,显微注射操作不影响初级卵泡中 *Nobox* 表达;注射 *Nobox*-siRNA 组与阴性对照组相比,*Nobox* mRNA 表达水平显著下调,差异极显著, $P < 0.001$ (图 5A)。分别提取阴性对照组与注射 *Nobox*-siRNA 组的 100 个初级卵泡蛋白,经 Western blot 发现,注射 *Nobox*-siRNA 组与阴性对照组相比,NOBOX 蛋白表达明显减少(图 5B)。结果表明,在初级卵泡卵母细胞中显微注射 *Nobox*-siRNA 可有效导致初级卵泡中 *Nobox* 基因沉默。

2.3 初级卵泡中 *Nobox* 干扰后相关基因 mRNA 及蛋白表达变化

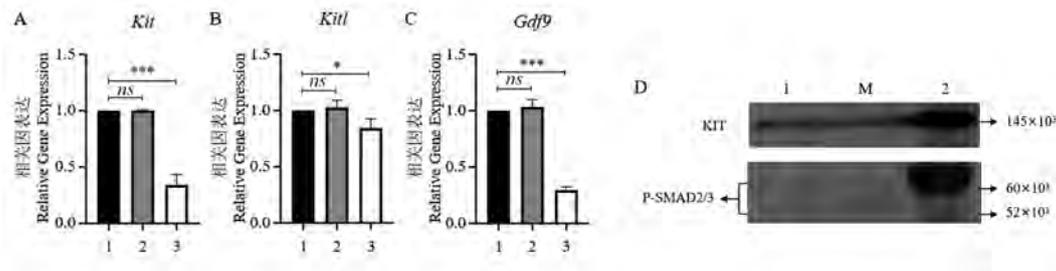
37℃,5% CO₂ 条件下分别培养①空白对照组(未注射组, No-treatment Control)②阴性对照组(注射 DEPC 水, Negative Control)③实验组(注射 *Nobox*-siRNA)的三组初级卵泡,cDNA 模板与结果 2.2 为同一批反转录产物;24 h 后提取阴性对照组与注射 *Nobox*-siRNA 组的 100 个初级卵泡蛋白。通过 qRT-PCR 实验发现,空白对照组与阴性对照组相比数据无显著性差异, $P > 0.05$,显微注射操作不影响初级卵泡中 *Kit*、*Kitl*、*Gdf9* mRNA 表达;注射 *Nobox*-siRNA 组与阴性对照组相比,初级卵泡卵母细胞中的 *Kit*、*Kitl*、*Gdf9* 基因 mRNA 表达水平显著下调, $P < 0.001$ (图 6A-6C),经 Western blot 发现,注射 *Nobox*-siRNA 后初级卵泡中 KIT、P-SMAD2 / SMAD3 蛋白表达量明显降低(图 6D)。结果表明,NOBOX 在初级卵泡发育至次级卵泡阶段可能经 KITL/KIT 及 GDF9/SMAD 通路影响卵泡发育。

2.4 染色质免疫沉淀(ChIP)验证 NOBOX 与 *Kit* 启动子结合区域

ChIP 实验中与 NOBOX 抗体结合的 DNA 片段洗脱纯化后进行 PCR 检测。将产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示为单一目的条带,未见其他杂带,转录因子 NOBOX 在 *Kit* 启动子(-2933 bp ~ -2926 bp)、(-2874 bp ~ -2867 bp)和(-2676 bp ~ -2669 bp)位点能够结合(图 7A, a-c),在 *Kit* 启动子(-5638 bp ~ -5634 bp)及(-5432 bp ~ -5425 bp)位点无法结合(图 7A, d-e),表明转录因子 NOBOX 在雌性小鼠卵巢中可直接结合 *Kit* 基因启动子。

3 讨论

卵巢中 SOHLH1、SOHLH2、NOBOX 等多种生殖细胞特异性转录因子,在卵泡发育不同阶段发挥着不同的作用。SOHLH1/2、NOBOX 均参与原始卵泡形成及激活过程,不同的是,转录因子 SOHLH1/2

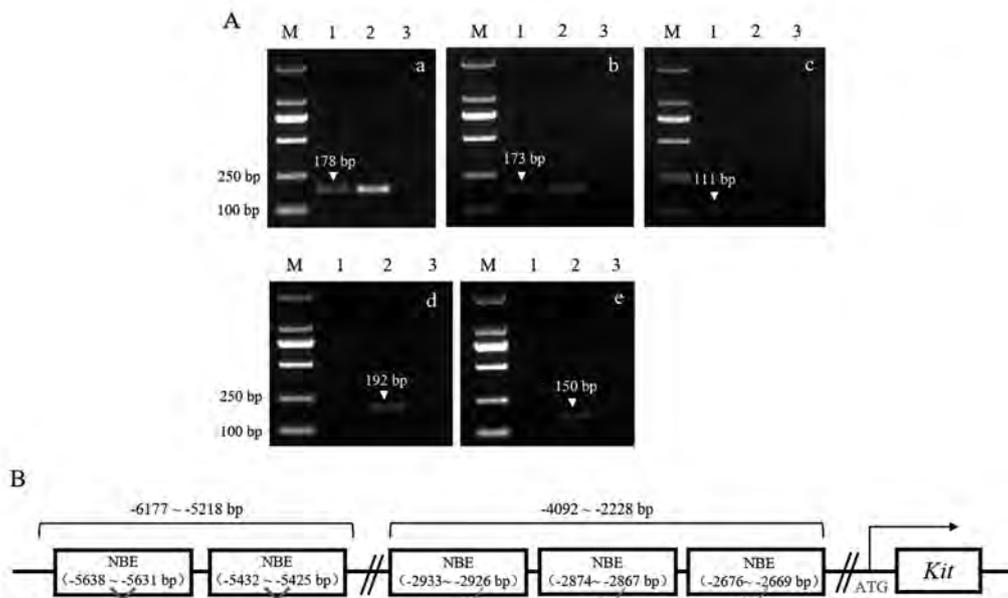


注: A-C: 误差线代表三次重复实验的平均数±标准误差; 1: 阴性对照组 (注射 DEPC 水); 2: 空白对照组 (未注射组); 3: 实验组 (注射 *Nobox*-siRNA)。与阴性对照组比较, *ns*: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。D: M: 蛋白 Marker; 1: 实验组 (注射 *Nobox*-siRNA); 2: 阴性对照组 (注射 DEPC 水)。

图 6 *Nobox*-siRNA 干扰后初级卵泡中相关基因 mRNA 及蛋白表达情况

Note. A-C, Error bars represent the mean ± standard error of three replicate experiments. Compared with the no-treatment control group, 1, Negative control group (injected DEPC water); 2, No-treatment control group (no injection group); 3, Experimental group (*Nobox*-siRNA injection). Compared with the negative control group, *ns*: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. D, M, Protein Marker; 1, Experimental group (injection of *Nobox*-siRNA); 2, Negative control group (injected DEPC water).

Figure 6 mRNA and protein expressions of related genes in primary follicles after *Nobox*-siRNA interference



注: A 图中, a-c 代表 NOBOX 可与 *Kit* 启动子 (-2933 bp~-2926 bp)、(-2874 bp~-2867 bp) 和 (-2676 bp~-2669 bp) 位点结合; d-e 表示 NOBOX 在 *Kit* 启动子 (-5638 bp~-5634 bp) 和 (-5432 bp~-5425 bp) 位点无结合作用; M: TaKaRa DL2000 Marker; 1: NOBOX-*Kit*; 2: Input; 3: 阴性对照。B: 转录因子 NOBOX 与 *Kit* 启动子 -6177 bp~-5218 bp 区域和 -4092 bp~-2228 bp 区域结合位点示意图。

图 7 转录因子 NOBOX 与 *Kit* 启动子结合情况

Note. In Figure A, a~c means that NOBOX can bind to *Kit* promoter (-2933 bp~-2926 bp), (-2874 bp~-2867 bp) and (-2676 bp~-2669 bp) sites; d~e shows that NOBOX has no binding effect at the *Kit* promoter sites (-5638 bp~-5634 bp) and (-5432 bp~-5425 bp); M: TAKARA DL2000 Marker; 1: NOBOX-*Kit*; 2: Input; 3: Negative control. B: Schematic diagram of binding sites between transcription factor NOBOX and *Kit* promoter -6177 bp~-5218 bp region and -4092 bp~-2228 bp region.

Figure 7 Binding of transcription factor NOBOX to *Kit* promoter

只在卵原细胞和原始卵泡中表达, 初级卵泡表达较少, 次级卵泡及之后无表达, 而 NOBOX 的表达贯穿整个卵泡发育阶段。当原始卵泡激活为初级卵泡后, SOHLH1/2 的表达逐渐消失, 对于 SOHLH1/2 直接调控的 *Kit* 等基因来说, 还应受到其他转录因子的调控, 有必要分阶段对转录因子的作用进行研

究。本研究选择卵泡发育过程中初级卵泡发育至次级卵泡的阶段, 在小鼠初级卵泡中显微注射 *Nobox*-siRNA, 通过体外培养初级卵泡, 观察到注射 *Nobox*-siRNA 的初级卵泡颗粒细胞增殖停滞, 延迟 2 d 发育至次级, 说明 *Nobox* 是初级卵泡发育至次级卵泡的关键基因; 通过检测 *Kit*、*Gdf9*、*Kitl*、P-SMAD

的表达变化,说明初级卵泡中 *Nobox* 基因沉默对卵母细胞与颗粒细胞间的 KITL/KIT 及 TGF- β /SMAD 通路有抑制作用;通过 ChIP 实验发现转录因子 NOBOX 可直接结合于 *Kit* 基因转录起始位点上游 (-2933 bp~-2926 bp)、(-2874 bp~-2867 bp) 和 (-2676 bp~-2669 bp) 的 NBE 位点,推测 NOBOX 可直接转录调控 *Kit* 基因的表达。

表达于卵泡颗粒细胞中的 KITL,包含可溶性蛋白 KITL1 和膜结合蛋白 KITL2 两种转录产物,两者虽功能相近,但是稍有不同,KITL1 主要促进早期卵泡发育,而 KITL2 对卵泡生长发育起调控作用^[20]。除实验验证的 KITL/KIT 和 GDF9/SMAD 通路外,本研究检测到注射 *Nobox*-siRNA 的初级卵泡中 *Kitl2* 显著下调,提示转录因子 NOBOX 在初级卵泡发育至次级卵泡阶段,也可能通过 TGF- β /SMAD/KITL 通路且主要通过 KITL2 影响卵泡发育,其具体机制尚待深入开展。

综上所述,本研究证明 NOBOX 是小鼠初级卵泡发育至次级卵泡的关键基因,首次发现转录因子 NOBOX 在小鼠卵巢中可直接结合 *Kit* 基因启动子,且影响初级卵泡中 KITL/KIT 和 GDF9/SMAD 通路,完善转录因子 NOBOX 在卵泡发育过程中的作用机制。

参考文献:

- [1] 乔延召,刘国乾,陶剑,等.生殖细胞特异性基因 SOHLH1 与 SOHLH2 的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(2): 7-11.
- [2] Pan L, Gong W, Zhou Y, et al. A comprehensive transcriptomic analysis of infant and adult mouse ovary [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2014, 12(5): 239-248.
- [3] Bouilly J, Roucher-Boulez F, Gompel A, et al. New NOBOX mutations identified in a large cohort of women with primary ovarian insufficiency decrease KIT-L expression [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(3): 994-1001.
- [4] Ferrari I, Bouilly J, Beau I, et al. Impaired protein stability and nuclear localization of NOBOX variants associated with premature ovarian insufficiency [J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(23): 5223-5233.
- [5] 张华,代燕丽,张佳伟.原始卵泡的激活与临床应用 [J]. 山东大学学报(医学版), 2018, 56(4): 8-17.
- [6] 周国利,武青华,宋雨霏.NOBOX 和 FIGLA 基因调控卵子发生的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 7: 82-84.
- [7] Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, et al. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression [J]. Science, 2004, 305(5687): 1157-1159.
- [8] Liu G, Li Y, Du B, et al. Primordial follicle activation is affected by the absence of *Sohlh1* in mice [J]. Mol Reprod Dev, 2019, 86(1): 20-31.
- [9] Mahakali Zama A, Hudson FP 3rd, Bedell MA. Analysis of hypomorphic *KitlSl* mutants suggests different requirements for KITL in proliferation and migration of mouse primordial germ cells [J]. Biol Reprod, 2005, 73(4): 639-647.
- [10] Toyoda S, Miyazaki T, Miyazaki S, et al. *Sohlh2* affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia [J]. Dev Biol, 2009, 325(1): 238-248.
- [11] Jasmi VK, Samadi F, Eimani H, et al. Follicle development in grafted mouse ovaries after vitrification processes under static magnetic field [J]. Cryo Letters, 2017, 38(3): 166-177.
- [12] Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, et al. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(21): 8090-8095.
- [13] Toyoda S, Yoshimura T, Mizuta J, et al. Auto-regulation of the *Sohlh1* gene by the SOHLH2/SOHLH1/SP1 complex: implications for early spermatogenesis and oogenesis [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101681.
- [14] Reader KL, Mottershead DG, Martin GA, et al. Signalling pathways involved in the synergistic effects of human growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 [J]. Reprod Fertil Dev, 2016, 28(4): 491-498.
- [15] Ernst EH, Nielsen J, Ipsen MB, et al. Transcriptome analysis of long non-coding RNAs and genes encoding paraspeckle proteins during human ovarian follicle development [J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 78.
- [16] Salomon AK, Leon K, Campbell MM, et al. Folliculogenic factors in photoregressed ovaries: Differences in mRNA expression in early compared to late follicle development [J]. Gen Comp Endocrinol, 2018, 260: 90-99.
- [17] Bernabé BP, Woodruff T, Broadbelt LJ, et al. Ligands, receptors, and transcription factors that mediate inter-cellular and intra-cellular communication during ovarian follicle development [J]. Reprod Sci, 2020, 27(2): 690-703.
- [18] Choi Y, Rajkovic A. Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of *Gdf9* and *Pou5f1* promoters [J]. J Biol Chem, 2006, 281(47): 35747-35756.
- [19] Qin Y, Choi Y, Zhao H, et al. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure [J]. Am J Hum Genet, 2007, 81(3): 576-581.
- [20] Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, et al. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors [J]. Endocrinology, 2005, 146(2): 941-949.

[收稿日期]2020-07-07

宋建敏,陈灿,宋波. 沙库巴曲缬沙坦通过调控心力衰竭大鼠 TGF- β 1/Smad3 和 NF- κ B 信号通路抑制心肌损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 115-122.

Song JM, Chen C, Song B. TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B signaling pathways in rats with heart failure [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 115-122.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.017

沙库巴曲缬沙坦通过调控心力衰竭大鼠 TGF- β 1/Smad3 和 NF- κ B 信号通路抑制心肌损伤

宋建敏¹, 陈 灿^{2*}, 宋 波¹

(1.湖北医药学院附属随州医院心血管内科,湖北 随州 441300; 2.湖北医药学院附属随州医院心胸血管外科,湖北 随州 441300)

【摘要】 目的 研究沙库巴曲缬沙坦对心力衰竭大鼠心肌损伤和心脏重构的影响,并探讨其对 TGF- β 1/Smad3 和 NF- κ B 信号通路的调控作用。**方法** 通过结扎大鼠左前降支冠状动脉(LAD)诱发心力衰竭动物模型。建模后每天用 10 mg/kg 的沙库巴曲缬沙坦治疗大鼠(沙库巴曲缬沙坦组, $n=15$)。假手术组($n=15$)和模型组($n=15$)大鼠用等体积的生理盐水处理。共治疗 4 周。通过超声心动图和组织学检查分别评估大鼠心脏功能和纤维化。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、磷酸化 Smad3(p-Smad3)、磷酸化 Smad7(p-Smad7)、胶原蛋白 I(Collagen I)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、核因子 κ B(NF- κ B)和磷酸化的 κ B α (p-I κ B α)的蛋白水平用 Western blot 分析法测定。**结果** 与模型组相比,沙库巴曲缬沙坦组的左心室射血分数(EF)和左心室缩短分数(FS)显著升高,而 LVIDs 和 LVIDd 显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,沙库巴曲缬沙坦组 Collagen I 的表达显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,沙库巴曲缬沙坦组 TGF- β 1 的蛋白表达以及 Smad3 的磷酸化水平显著降低,而 Smad7 的磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,沙库巴曲缬沙坦组 TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,沙库巴曲缬沙坦组 NF- κ Bp65 和 p-I κ B α 的蛋白表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 沙库巴曲缬沙坦通过抑制心力衰竭大鼠 TGF- β 1/smad3 和 NF- κ B 信号通路来抑制心肌纤维化和炎症反应。

【关键词】 沙库巴曲缬沙坦;心力衰竭;心肌纤维化;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0115-08

Sacubitril/valsartan inhibits myocardial injury by regulating TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B signaling pathways in rats with heart failure

SONG Jianmin¹, CHEN Can^{2*}, SONG Bo¹

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Suizhou 441300, China.
2. Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Suizhou 441300)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sacubitril/valsartan on myocardial injury and cardiac remodeling in rats with heart failure, and to investigate its regulatory effect on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smad3 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathways. **Methods** An animal model of heart failure was induced by

[作者简介] 宋建敏(1980—),女,硕士,主治医师,主要从事急性冠脉综合征及心力衰竭的临床研究。E-mail:6302016@qq.com

[通信作者] 陈灿(1980—),男,硕士,副主任医师,主要从事常见心血管疾病及胸外科疾病的微创化治疗。E-mail:16233751@qq.com

ligation of the left anterior descending coronary artery in rats. After modelling, rats were treated daily with sacubitril/valsartan at 10 mg/kg (sacubitril/valsartan group, $n=15$). Rats in the sham group ($n=15$) and the model group ($n=15$) were treated with an equal volume of normal saline. Rats were treated for 4 weeks. Echocardiography and histology were used to assess heart function and fibrosis, respectively. Protein levels of TGF- β 1, phosphorylated Smad3, phosphorylated Smad7, collagen I, alpha smooth muscle actin, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, NF- κ B, and phosphorylated κ B α were determined by western blot analysis. **Results** Left ventricular ejection fraction (EF) and left ventricular fraction shortening (FS) in the sacubitril/valsartan group were significantly higher, while LVIDs and LVIDd in the sacubitril/valsartan group were significantly lower compared with those in the model group ($P<0.05$). Collagen I expression was significantly reduced in the sacubitril/valsartan group compared with the model group ($P<0.05$). TGF- β 1 protein expression and Smad3 phosphorylation levels in the sacubitril/valsartan group were significantly lower, while Smad7 phosphorylation levels were significantly higher compared with the model group (all $P<0.05$). Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 protein expression was significantly reduced in the sacubitril/valsartan group compared with the model group (both $P<0.05$). NF- κ Bp65 and phosphorylated κ B α protein expression was significantly reduced in the sacubitril/valsartan group compared with the model group (both $P<0.05$). **Conclusions** Sacubitril/valsartan inhibits myocardial fibrosis and the inflammatory response by inhibiting TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B signaling pathways in rats with heart failure.

【Keywords】 sacubitril/valsartan; heart failure; myocardial fibrosis; inflammation

心肌梗死在全世界范围内具有较高的致残率和死亡率。尽管由于早期溶栓、经皮冠状动脉介入治疗或冠状动脉搭桥术明显降低了急性心肌梗死的死亡率,但幸存患者中仍会发生左心室(LV)重塑^[1]。心肌梗死后这种不良的心脏重塑可导致心室功能障碍和心力衰竭,从而导致预后不良和死亡率升高^[2]。心力衰竭是心肌梗死的主要并发症,其在心肌梗死患者死亡原因中位于第二位^[3]。因此,抑制心脏重塑是治疗心肌梗死后心力衰竭的主要策略。

心肌梗死后左心室间质纤维化和炎性细胞浸润是心脏重塑的常见病理特征。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)已被确认为心脏纤维化的关键调节剂,其可影响细胞生长、凋亡和分化、增加胶原蛋白和基质蛋白的产生、保持成纤维细胞的活力。心肌梗死动物模型的结果表明,心肌梗死中 TGF- β 1 的高表达以及使用 TGF- β 受体抑制剂阻断 TGF- β 途径可以减轻心肌梗死动物模型中的心脏纤维化^[4]。此外,核因子 κ B(NF- κ B)是心肌梗死后心脏重塑和心力衰竭发展的关键因素,并且在炎症和先天免疫中起着至关重要的作用^[5]。NF- κ B 家族成员 p65 形成同二聚体或异二聚体,这些同二聚体或异二聚体与细胞质中的 κ B(I κ B)蛋白抑制剂结合。I κ B 的降解会释放 NF- κ B 二聚体,并使 NF- κ B 易位进入细胞核,从而可以启动靶基因的转录。NF- κ B 的激活可诱导趋化因子(MCP-1)、细胞因子(TNF- α 、IL-6)和基质金属蛋白酶(MMPs)的转录,并进一步促进炎症和纤维化^[6]。多项研究表明抑制 NF- κ B 可抑制

炎症反应和心脏纤维化^[6]。因此,研究 TGF- β 1 和 NF- κ B 信号通路对于抑制心肌梗死后心力衰竭患者的心脏重塑具有巨大的潜在治疗价值。

沙库巴曲缬沙坦(sacubitril/valsartan)的商品名叫诺欣妥(entresto),是一种血管紧张素 II 受体及脑啡肽酶的双重抑制剂类药物,由血管紧张素 II 受体拮抗剂的缬沙坦及脑啡肽酶抑制剂前体 AHU377 组成^[7]。沙库巴曲缬沙坦于 2015 年获美国 FDA 批准上市,2016 年被推荐为心力衰竭指南的 I 类药物,并且取得了较好的疗效。然而,沙库巴曲缬沙坦对心脏重塑的作用机制尚不明确。因此,本研究建立了心肌梗死后心力衰竭模型,评估了沙库巴曲缬沙坦对心脏功能、心脏纤维化以及 TGF- β 1、p-Smads、collagen I、TNF- α 和 IL-6 的影响。并进一步探讨 TGF- β 1 和 NF- κ B 通路是否参与心脏重塑过程中沙库巴曲缬沙坦的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠(7 周龄,体重 220 ~ 250 g)由湖北省实验动物中心提供[SCXK(鄂)2019-0008],饲养于湖北医药学院屏障环境中[SYXK(鄂)2019-0031]。给动物饲喂标准饲料和水,并饲养在 12 h 光照和 12 h 黑暗、(20 \pm 2) $^{\circ}$ C 温度和(50 \pm 2)%湿度的环境中。所有动物实验方案均已获得湖北医药学院附属随州医院伦理审查委员会的批准(20180211),并符合实验室动物管理和使用规定,实验设计符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

沙库巴曲缬沙坦(诺新妥,国药准字 J20171054,Novatis Pharma Stein AG);Masson 三色染色剂染色(货号:G1340,北京索莱宝科技有限公司); α -SMA 一抗(免疫组化)(ab119952,英国 Abcam 公司);HRP-聚合物标记的抗兔 IgG 二抗(ab6721,英国 Abcam 公司);RIPA 裂解缓冲液(产品编号:P0013 K,碧云天生物技术研究);TGF- β 1 一抗(ab215715,英国 Abcam 公司);p-Smad3 和 Smad3 一抗(ab52903 和 ab40854,英国 Abcam 公司);p-Smad7 和 Smad7 一抗(ab227309 和 ab226872,英国 Abcam 公司);TNF- α 一抗(ab215188,英国 Abcam 公司);IL-6 一抗(1:1000, ab233706,英国 Abcam 公司);Collagen I 一抗(ab138492,英国 Abcam 公司); α -SMA 一抗(ab265588,英国 Abcam 公司);NF- κ Bp65 一抗(ab183559,英国 Abcam 公司);p-I κ B α 一抗(sc-8404,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);GAPDH 一抗(ab8245,英国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(ab205718,英国 Abcam 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 心肌梗死后心力衰竭动物模型

结扎左前降支冠状动脉(LAD)后由心肌梗死诱发心力衰竭。腹腔内注射 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,然后进行气管插管并连接呼吸机正压通气,术前记录 12 导联心电图。皮肤消毒后于胸腔开口,于左心耳根部下方 2 mm 结扎 LAD。假手术组的大鼠在不结扎 LAD 的情况下进行相同的手术操作。实验后记录十二导联心电图。将大鼠正常喂养 1 周。根据经胸超声心动图检查结果,当 LVEF 降低 45%时表示心力衰竭模型建模成功。

1.3.2 动物分组及给药

将存活大鼠随机分为以下组:假手术组($n=15$)、模型组($n=15$)和沙库巴曲缬沙坦组($n=15$)。沙库巴曲缬沙坦组大鼠每天一次通过管饲法给予沙库巴曲缬沙坦 10 mg/kg。共治疗 4 周。模型组和假手术组给予等体积的生理盐水。

1.3.3 经胸超声心动图检查

采用无创经胸超声心动图方法评估左心室的形态和功能。在麻醉动物中进行超声心动图检查。记录左心室收缩末期内径(LVIDs)和左心室舒张末期内径(LVIDd)以及左心室射血分数(EF)和左心

室缩短分数(FS)。

1.3.4 心肌纤维化的测量

给药 4 周后,收集大鼠心脏,并在磷酸盐缓冲液中洗涤,在 4%多聚甲醛中固定过夜,然后包埋在石蜡中。将每个石蜡包埋的心脏切成 4 μ m 厚的切片,并用 MASSON 三色染色剂染色。每个切片在尼康显微镜下成像,通过 Image J 软件计算纤维化程度。

1.3.5 免疫组织化学染色

通过免疫组织化学染色检测 α -SMA 蛋白的表达。将心脏组织切片放在烤箱中烤片 20 min,然后二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。使用 PH 9.0 的 Tris/EDTA 缓冲液进行抗原修复。在 3% H_2O_2 中孵育 10 min 来封闭内源性过氧化物酶。将切片在 1% PBS 中洗涤 3 次,每次 6 min,并在 4 $^{\circ}$ C 下与 1%牛血清白蛋白中的一抗(1:500 稀释)一起孵育过夜。将切片用 1% PBS 洗涤 3 次,每次 6 min。然后将切片与 HRP-聚合物标记的抗兔 IgG 二抗(1:500 稀释)室温孵育 1 h。将切片再次用 1%PBS 洗涤 3 次,每次 6 min,然后用苏木精复染 30 s。使用 OLYMPUS BX 50 数字显微镜。在 $\times 400$ 放大倍数下观察图像。随机选择 5 个视野进行阳性染色评分,阳性染色评分=阳性细胞计数评分 \times 染色强度评分。阳性细胞计数评分如下:<5%为 0 分,5~25%为 1 分,26~50%为 2 分,51~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度评分如下:未染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕色为 3 分。

1.3.6 蛋白质印迹分析

给药 4 周后,对所有动物实施安乐死,立即收获心脏并保存在液氮中。使用 RIPA 裂解缓冲液裂解组织。通过 BCA 法测定蛋白质浓度。蛋白质通过 10% SDS-PAGE 分离并转移到硝酸纤维素膜上,然后与以下一抗在 4 $^{\circ}$ C 下过夜孵育:TGF- β 1(1:500)、p-Smad3 和 Smad3(1:500)、p-Smad7 和 Smad7(1:500)、TNF- α (1:1000)、IL-6(1:1000)、Collagen I(1:1000)、 α SMA(1:500)、NF- κ Bp65(1:1000)、p-I κ B α (1:1000)和 GAPDH(1:1000)。将膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2000)在室温下孵育 2 h。GAPDH 作为内部对照。通过 ECL 法显影并使用 Gene Gnome 凝胶成像系统捕获生成的图像。

1.4 统计学方法

所有实验数据均表示为平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)。使用统计软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析

(ANOVA), 并通过 LSD 事后检验进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 沙库巴曲缬沙坦改善心力衰竭大鼠心脏结构和功能

通过超声心动图评估心力衰竭大鼠治疗后的的心脏功能。研究显示(图 1), 与假手术组相比, 模型组大鼠的 EF 和 FS 显著降低, 而 LVIDs 和 LVIDd 显著升高($P < 0.05$)。此外, 与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组的 EF 和 FS 显著升高, 而 LVIDs 和 LVIDd 显著降低($P < 0.05$)。

2.2 沙库巴曲缬沙坦减轻心力衰竭大鼠心肌纤维化

间质纤维化是心梗后心脏重塑的主要特征。通过 Masson 对间质纤维化进行的三色染色显示(图 2), 与假手术组相比, 心肌梗死组的左室壁结扎部分梗死区域边界出现明显的间质纤维化, 胶原蛋白染色区域显著增加($P < 0.05$)。此外, 与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组的胶原蛋白染色区域显著降低($P < 0.05$)。

图 3 和图 4 显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠心脏组织中肌成纤维细胞标志物 α -SMA 的表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组 α -SMA 的表达显著降低($P < 0.05$)。 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞可促进细胞外基质 (ECM) 的合成。本研究检测了 Collagen I 的表达, 这是心脏成纤维细胞产生的主要胶原蛋白亚型。研究显示(图 3), 与假手术组相比, 模型组的 Collagen I 表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组 Collagen I 的表达显著降低($P < 0.05$)。

2.3 沙库巴曲缬沙坦抑制心力衰竭大鼠心肌 TGF- β 1/ Smad3 信号通路

TGF- β 1/ Smad3 信号通过参与调控心肌梗死后心肌纤维化的原因, 本研究显示(图 5), 与假手术组相比, 模型组大鼠心脏组织中 TGF- β 1 的蛋白表达以及 Smad3 的磷酸化水平显著升高, 而 Smad7 的磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组 TGF- β 1 的蛋白表达以及 Smad3 的磷酸化水平显著降低, 而 Smad7 的磷酸化水平显著升高($P < 0.05$)。

2.4 沙库巴曲缬沙坦抑制心力衰竭大鼠细胞因子的表达

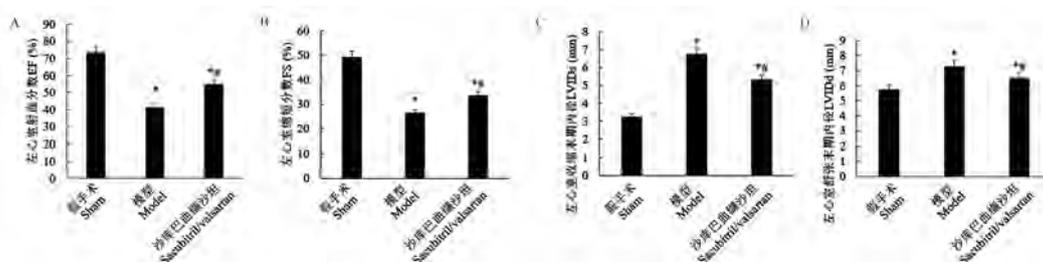
细胞因子 (TNF- α 和 IL-6) 的表达在心脏重塑和心力衰竭中起着关键作用。本研究显示(图 6), 与假手术组相比, 模型组 TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组 TNF- α 和 IL-6 的蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。

2.5 沙库巴曲缬沙坦抑制心力衰竭大鼠心肌 NF- κ B 信号通路

先前的研究表明, 促炎细胞因子诱导 I κ B 的磷酸化和降解, 然后诱导 NF- κ B 从抑制性信号小体中释放出来, 转移到细胞核并诱导许多基因的转录, 从而导致炎性因子如 TNF- α 和 IL-6 的表达。本研究显示(图 7), 与假手术组相比, 模型组 NF- κ Bp65 和 p-I κ B α 的蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, 沙库巴曲缬沙坦组 NF- κ Bp65 和 p-I κ B α 的蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论

心脏重塑是一个复杂的过程, 有许多连续和重

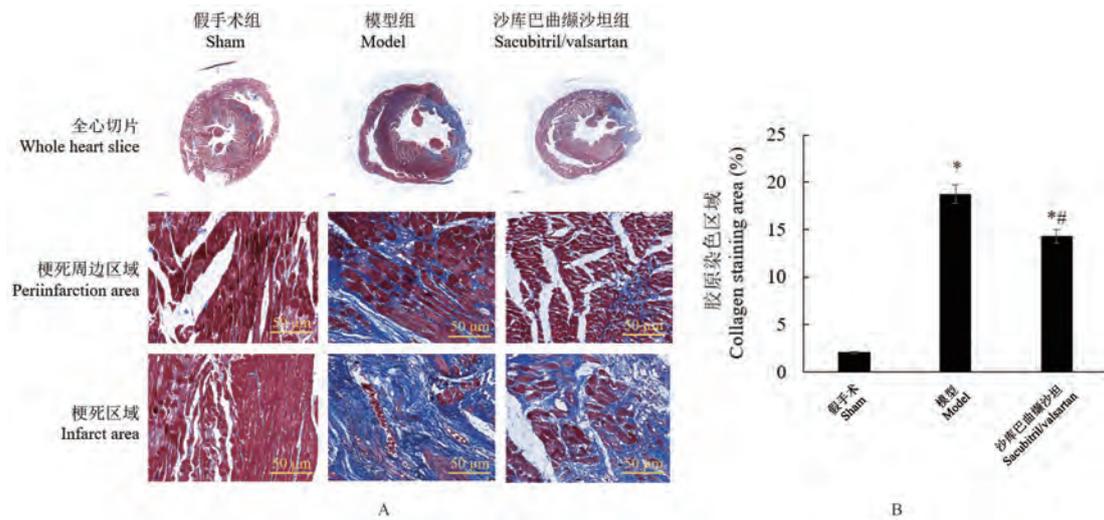


注: A-D: 依次为 EF、FS、LVIDs 和 LVIDd; 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠的 EF、FS、LVIDs 和 LVIDd

Note. A-D, EF, FS, LVIDs and LVIDd in sequence. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 1 EF, FS, LVIDs and LVIDd of each group of rats

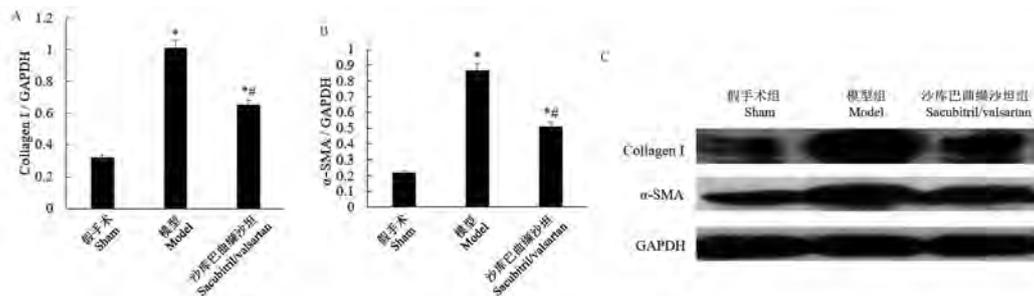


注:A:Masson 三色染色图像;B:胶原染色区域百分比;与假手术组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠心脏组织的 Masson 三色染色

Note, A, Masson three-color staining image. B, Percentage of collagen staining area. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Masson trichrome staining of rat heart tissue



注:A:Collagen I 的蛋白相对表达量;B: α -SMA 的蛋白相对表达量;C:Western blot 代表性条带;与假手术组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 Western blot 检测大鼠心脏组织 Collagen I 和 α -SMA 的蛋白表达

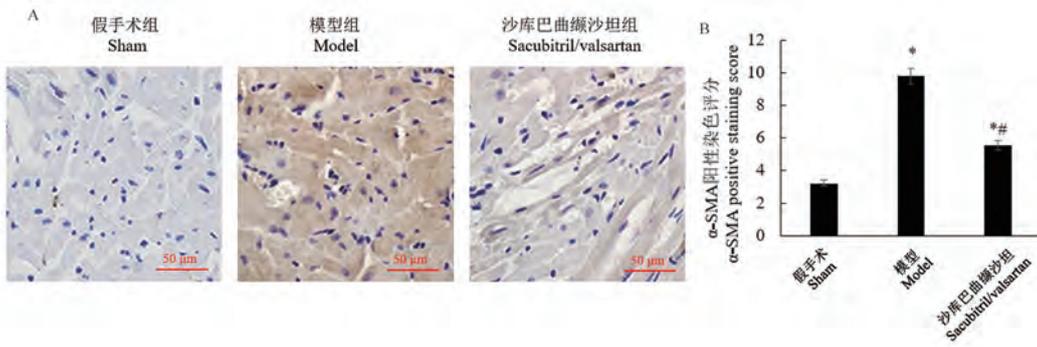
Note. A, Relative protein expression of Collagen I. B, Relative protein expression of α -SMA. C, Representative Western blot bands. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Western blot detection of collagen I and α -SMA protein expression in rat heart tissues

叠的生物过程^[8]。在早期阶段,心脏重塑是坏死区域纤维化修复并形成疤痕的结果。接下来,重塑过程由存活心肌的结构重排所驱动,包括心肌细胞肥大、心肌纤维化以及进行性左心室扩张。心肌梗死后的室扩张是心脏衰竭的代偿反应之一。但是,过度扩张会引起心室收缩和舒张功能障碍,从而导致心力衰竭。预防不良的心室重塑对于降低心肌梗死后心力衰竭的发病率和死亡率非常重要。已经证实,间质纤维化是心力衰竭后心脏重塑的典型特征,其特征在于细胞外基质(ECM)的过度积累^[9]。Collagen I 和 Collagen III 是最丰富的 ECM 成

分。在心脏纤维化模型中,Collagen I 比 Collagen III 表现出更强烈和更长时间的上调。活化的成纤维细胞是纤维化心脏中胶原蛋白的主要细胞来源。 α -SMA 表达已被广泛用作成纤维细胞分化成活化状态的肌成纤维细胞的标记物^[10]。在本研究中,我们观察到心肌梗死后心力衰竭大鼠心脏中 Collagen I 和 α -SMA 蛋白被上调,这两者均通过沙库巴曲缬沙坦治疗得以抑制,这表明沙库巴曲缬沙坦可能通过抑制成纤维细胞活化和胶原生成而具有抗纤维化作用。

TGF- β 1 是一种局部产生的细胞因子,也是组织

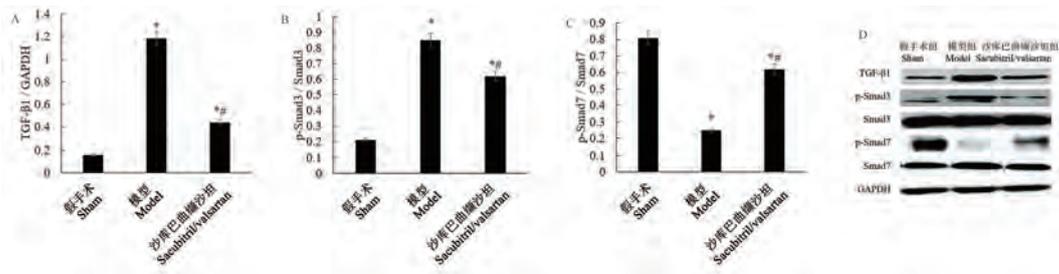


注:A:α-SMA 的免疫组化染色图像;B:α-SMA 的阳性染色评分;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图 4 大鼠心脏组织 α-SMA 的免疫组化染色

Note. A, immunohistochemical staining image of α-SMA. B, positive staining score of α-SMA. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 4 Immunohistochemical staining of α-SMA in rat heart tissue

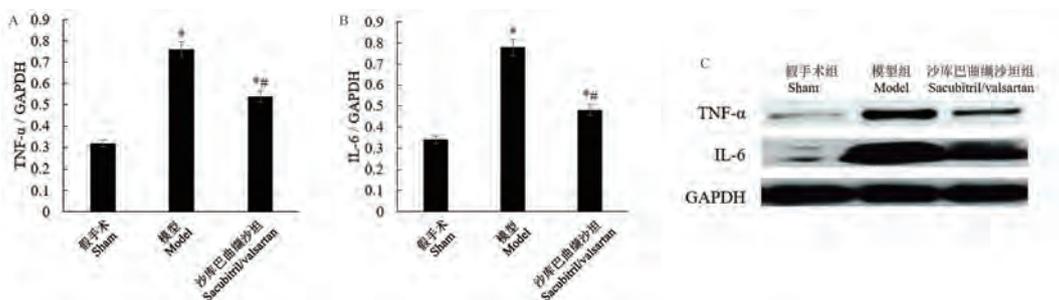


注:A:TGF-β1 的蛋白相对表达量;B:Smad3 的磷酸化水平;C:Smad7 的磷酸化水平;D:Western blot 代表性条带;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图 5 Western blot 检测大鼠心脏组织 TGF-β1 的蛋白表达以及 Smad3 和 Smad7 的磷酸化

Note. A, Relative protein expression of TGF-β1. B, phosphorylation levels of Smad3. C, Phosphorylation levels of Smad7. D, Representative Western blot bands. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 5 Western blot detection of TGF-β1 protein expression and phosphorylation of Smad3 and Smad7 in rat heart tissues

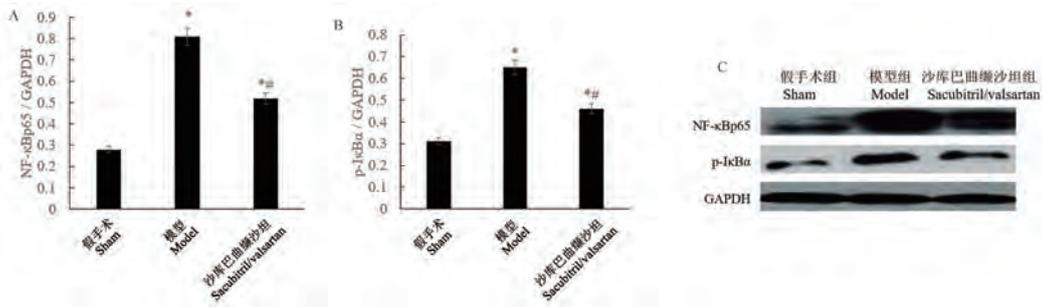


注:A:TNF-α 的蛋白相对表达量;B:IL-6 的蛋白相对表达量;C:Western blot 代表性条带;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

图 6 Western blot 检测大鼠心脏组织 TNF-α 和 IL-6 的蛋白表达

Note. A, Relative protein expression of TNF-α. B, Relative protein expression of IL-6. C, Representative Western blot bands. Compared with sham group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 6 Western blot detection of TNF-α and IL-6 protein expression in rat heart tissues



注:A: NF-κBp65 的蛋白相对表达量;B: p-IκBα 的蛋白相对表达量;C: Western blot 代表性条带;与假手术组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 7 Western blot 检测大鼠心脏组织 NF-κBp65 和 p-IκBα 的蛋白表达

Note. A, Relative protein expression of NF-κBp65. B, Relative protein expression of p-IκBα. C, Representative Western blot bands. Compared with sham group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 7 Western blot detection of NF-κBp65 and p-IκBα protein expression in rat heart tissues

纤维炎性变化的主要刺激因子。在心肌梗死后的大鼠心脏中观察到 TGF-β1 明显高表达,它与成纤维细胞向成肌纤维细胞的转化以及典型的 Smad 信号通路的激活有关^[11]。作为 TGF-β1 的主要下游信号转导子,Smad3 可被激活的 TGF-β1 的 I 型受体磷酸化,然后与 Smad4 形成复合物并易位进入细胞核,在其中它作为转录因子并促进靶基因的表达,包括 Collagen I 和 Collagen III。有研究表明,TGF-β 的大多数促纤维化活性是由 Smad3 介导的^[12-13]。Smad7 是一种抑制性 Smad 蛋白,能够与 Smad3 和 TGF-β 受体复合物 TGF-βRI 结合竞争,从而阻止随后的信号传导过程。外源性 Smad7 的高表达可以抑制 Smad3 的磷酸化^[14]。在本研究中,沙库巴曲缬沙坦均抑制了心力衰竭大鼠心脏中的 TGF-β1/ p-smad3 信号通路和下游 Collagen I 的表达。同时,在经沙库巴曲缬沙坦治疗的心力衰竭大鼠中,α-SMA 表达水平受到抑制。而 p-smad7 表达上调。这些结果表明,沙库巴曲缬沙坦通过上调 Smad7 的蛋白表达来抑制 TGF-β1/ Smad3 的信号通路,并进一步抑制成肌纤维细胞的增殖和 Collagen I 的上调。

尽管促炎性细胞因子的表达可能与心肌梗死后的伤口愈合有关,但即使在非梗死的心肌中,细胞因子的过表达也会损害心脏组织并引起纤维化成分的过量沉积。NF-κB 信号通路是炎症的“主要调控者”。它主要存在于与其抑制剂 IκB 蛋白结合的胞质溶胶中。受细胞因子或其他诱导物刺激后,IκB 蛋白被 IκB 激酶降解。IκB 降解后,NF-κB 易位至细胞核,并与促炎基因调控区域 κB 位点的 DNA

结合并促进其转录^[15-16]。活化的 NF-κB 会增加 TGF-β1、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的表达,从而激活胶原蛋白沉积和心肌纤维化,导致心肌重塑^[17-20]。NF-κB 在细胞因子和纤维化因子的协同反式激活中起着关键作用,这些因子与心力衰竭后法心肌损伤有关。在本研究中,沙库巴曲缬沙坦抑制了心力衰竭大鼠心脏中的 NF-κBp65、p-IκB 和下游 TGF-β1、TNF-α 和 IL-6 的表达。这些结果表明,沙库巴曲缬沙坦至少部分通过抑制 IκB 磷酸化来抑制 NF-κB 的信号通路并进一步抑制促炎细胞因子的表达。

总之,本研究发现沙库巴曲缬沙坦可预防心力衰竭过程总的心脏重塑。潜在的机制可能与沙库巴曲缬沙坦对心肌的抗纤维化和抗炎作用有关。沙库巴曲缬沙坦通过抑制胶原蛋白的产生、心脏成纤维细胞的活化和成纤维细胞的形成有效地减轻了心肌纤维化。沙库巴曲缬沙坦主要通过抑制 TGF-β1/ Smad3 信号传导途径来发挥其抗纤维化作用。另外,沙库巴曲缬沙坦可通过抑制 NF-κB 信号传导从而抑制促炎性细胞因子的过度表达。

参考文献:

[1] Farah E, Cogni AL, Minicucci MF, et al. Prevalence and predictors of ventricular remodeling after anterior myocardial infarction in the era of modern medical therapy [J]. Med Sci Monit, 2012, 18(5): CR276- CR281.
 [2] 赵磊, 张鹏飞, 张鹏翔, 等. 血浆 B 型脑钠肽在不同病因及类型心力衰竭中的变化及意义 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(12): 1079-1082.
 [3] Horiuchi Y, Tanimoto S, Aoki J, et al. Effects of β-blockers on left ventricular remodeling in patients with preserved ejection

- fraction after acute myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221: 765-769.
- [4] 石斌豪, 徐宗佩, 樊官伟. 基于 TGF- β 1 / Smads 信号通路治疗心肌梗死后心肌纤维化的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1): 5-8.
- [5] Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction [J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(9): 986-995.
- [6] Timmers L, van Keulen JK, Hoefler IE, et al. Targeted deletion of nuclear factor κ B p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2009, 104(5): 699-706.
- [7] Suematsu Y, Jing W, Nunes A, et al. LCZ696 (sacubitril/ valsartan), an angiotensin-receptor neprilysin inhibitor, attenuates cardiac hypertrophy, fibrosis, and vasculopathy in a rat model of chronic kidney disease [J]. *J Card Fail*, 2018, 24(4): 266-275.
- [8] Dixon JA, Spinale FG. Myocardial remodeling: cellular and extracellular events and targets [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 47-68.
- [9] Ghavami S, Cunnington RH, Gupta S, et al. Autophagy is a regulator of TGF- β 1-induced fibrogenesis in primary human atrial myofibroblasts [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(3): e1696.
- [10] 闫翠, 周政, 梁碧荣, 等. 养心康片调节自噬对慢性心力衰竭小鼠心肌纤维化的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 53-58.
- [11] Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF- β / Smad signaling in tissue fibrosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292: 76-83.
- [12] Yadav H, Devalaraja S, Chung ST, et al. TGF- β 1/Smad3 pathway targets PP2A-AMPK-FoxO1 signaling to regulate hepatic gluconeogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(8): 3420-3432.
- [13] Zhang M, Pan X, Zou Q, et al. Notch3 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction by inhibiting the TGF- β 1/Smad3 pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2016, 16(4): 316-324.
- [14] Wang X, Li X, Ye L, et al. Smad7 inhibits TGF- β 1-induced MCP-1 upregulation through a MAPK/p38 pathway in rat peritoneal mesothelial cells [J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45(3): 899-907.
- [15] Potoyan DA, Zheng W, Komives EA, et al. Molecular stripping in the NF- κ B/I κ B/DNA genetic regulatory network [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): 110-115.
- [16] Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(9): 545-558.
- [17] Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [18] Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(5): 309-324.
- [19] Tian B, Patrikeev I, Ochoa L, et al. NF- κ B mediates mesenchymal transition, remodeling, and pulmonary fibrosis in response to chronic inflammation by viral RNA patterns [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(4): 506-520.
- [20] Sun K, Xu L, Jing Y, et al. Autophagy-deficient Kupffer cells promote tumorigenesis by enhancing mtROS-NF- κ B-IL1 α / β -dependent inflammation and fibrosis during the preneoplastic stage of hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2017, 388: 198-207.

[收稿日期] 2020-07-16

刁元元,李玉梅,李晓文,等. 黄芪抗糖尿病并发症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 123-128.

Diao YY, Li YM, Li XW, et al. Review of Astragali radix for treating diabetic complications [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 123-128.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.018

黄芪抗糖尿病并发症的研究进展

刁元元,李玉梅*,李晓文,王楚盈*

(长春中医药大学 药学院,长春 130117)

【摘要】 糖尿病(diabetes mellitus,DM)是以高血糖为特征的代谢性疾病。糖尿病时长期存在的高血糖,导致各种组织,特别是眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害、功能障碍,这些并发症的发生常威胁着患者的生命。因此,迫切需要安全有效的药物来干预糖尿病并发症。黄芪是常见的补益中药,是众多抗糖尿病中药复方的关键组成之一,黄芪富含多糖(APS)、皂苷(ASS)、黄酮(ASF)等抗糖尿病成分,对糖尿病并发症有较好的作用。本文就近些年黄芪干预糖尿病并发症及作用机制进行文献综述,为黄芪干预糖尿病并发症研究提供参考。

【关键词】 黄芪;糖尿病神经病变;糖尿病心肌病;糖尿病肾病;糖尿病视网膜病变;糖尿病足

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0123-06

Review of Astragali radix for treating diabetic complications

DIAO Yuanyuan, LI Yumei*, LI Xiaowen, WANG Chuying*

(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Pharmacy College, Changchun 130117, China)

【Abstract】 Diabetes mellitus is a metabolic disease that is characterized by high blood sugar levels. Chronic hyperglycemia in diabetes leads to chronic damage and dysfunction of various tissues, especially the eyes, kidneys, heart, blood vessels, and nerves. These complications often threaten the life of patients. Therefore, there is an urgent requirement for safe and effective drugs to intervene in diabetic complications. Astragali radix is a common tonic in Chinese medicine and one of the main components of many anti-diabetes treatments using Chinese herbal compounds. Astragali radix is rich in polysaccharides (APS), saponins (ASS), flavones (ASF), and other anti-diabetes components, which have a good effect on the complications of diabetes. In this article, literature on the complications and mechanism of Astragali radix for intervention in diabetes in recent years is reviewed to provide a reference for future studies on complications of intervention by Astragali radix in diabetes.

【Keywords】 Astragali radix; diabetic neuropathy (DPN); diabetic cardiomyopathy (DCM); diabetic nephropathy (DN); diabetic retinopathy (DR); diabetic foot

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81173597);吉林省卫生计生青年科研课题(2014Q046);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190455KJ);吉林省卫生计生青年科技骨干培养计划项目(2016Q052);吉林省中医药科技项目(2017005);长春中医药大学“杏林学者工程”青年科学家计划项目。

【作者简介】 刁元元,女,硕士研究生。研究方向:中药复方药效作用物质基础及机理研究。E-mail: dyuan37@foxmail.com

【通信作者】 王楚盈(1982—),女,副教授,博士,研究方向:中药药性理论。E-mail: chuying820713@126.com

李玉梅(1985—),女,讲师,博士,研究方向:中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: liyumei_10@126.com

* 共同通信作者

糖尿病是继心血管疾病和癌症之后第三大主要的非传染性疾病,其伴随着心肌病变、糖尿病肾病、视网膜病变、神经病变、糖尿病足等并发症,严重危害患者的身心健康^[1]。根据卫计委统计,目前中国患有糖尿病的病人人数高达 1.164 亿;预估计至 2045 年中国糖尿病患者人数有可能增长到 1.472 亿,位居世界首位^[2-4]。中医认为,糖尿病是由于饮食不节,素体阴虚,劳倦伤气所致,而中药黄芪具有补气升阳,固表止汗,利水消肿的功效,不仅可以调节免疫功能,还具有抗氧化应激损伤、抗炎、促进血液循环、改善肾功能等作用^[5],黄芪和不同药物配伍对多种并发症均具有疗效。现本文对黄芪拮抗糖尿病并发症的作用及机制进行综述,希望有助于黄芪的研究探索与开发。

1 黄芪的化学研究

黄芪主要含的抗糖尿病化学成分为多糖,皂苷和黄酮。黄芪多糖(APS)分为葡聚糖和杂多糖,据报道,有 24 种多糖从黄芪的根中分离出来^[6]。最新报道,黄芪多糖能够改善糖尿病大鼠的肝损伤,APS 可能通过增加 Nrf2 表达并促进其活化而上调了糖尿病大鼠肝 HO-1 的表达,激活 Nrf2/HO-1 信号通路而发挥了肝保护作用^[7]。

黄芪皂苷(AMS)在黄芪中的种类较多,多达 40 多种的三萜皂苷类化合物已从黄芪分离得到^[8-9]。大量的实验研究和专业的分析检测可以去说明,黄芪中的三萜皂苷类化合物对人体健康具有生物活性。特别是黄芪甲苷 IV(AGS-IV)是一种 3-O-b-D-木吡喃糖基-6-O-b-D-吡喃葡萄糖基-环黄芪酮,属于三萜皂苷类,具有广泛的药理作用。黄春玲等^[10]研究表明,AGS-IV 作为黄芪药材质量的化学指标,在临床上可用于治疗糖尿病、血脂异常、动脉粥样硬化等心血管疾病。

黄芪黄酮类化合物(AFS)是一种重要的心血管活性成分,具有很好的清除自由基的能力,减少血浆脂质过氧化物酶的产物和总胆固醇^[11]。另外,黄芪黄酮类化合物还能维持细胞正常代谢,提高细胞 SOD 活性,调节免疫等药理作用。据报道,到目前为止,已分离出 6 大类化合物:12 种异黄酮,5 种黄酮类,4 种紫檀烷、檀香烯和二氢异黄酮。李瑞芬^[12]首次从蒙古黄芪中分离出 4,2',4'-三羟基查尔酮和 5,7,4'-三羟基异黄酮。Qi 等^[13]应用液质联用法对黄芪及其提取物进行分析和质量控制,结

果得到毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花黄素,这些化合物具有类似的结构。

2 黄芪抗糖尿病并发症的药理作用

2.1 黄芪与糖尿病周围神经病变

糖尿病神周围经病变(DPN)是糖尿病中常见的慢性并发症之一,疼痛的肢体和感觉的异常是它的表现形式,通常身体下肢较容易发生病变^[14]。现如今认为高血糖可通过激活多种生化途径导致糖尿病神经病变^[15],如神经元的氧化应激,刺激炎症因子和神经肽受体缺乏,作为周围神经系统的主要组成细胞,雪旺细胞在神经损伤后被激活^[16-17],黄芪多糖在一定程度上可以抑制高糖诱导雪旺细胞凋亡从而能抑制周围神经损伤^[18]。另外,不同剂量黄芪多糖灌胃 2 型糖尿病(T2DM)大鼠的研究发现,黄芪多糖灌胃后,大鼠某些脑神经生长因子 mRNA 水平下降,结果表明,黄芪多糖可使大鼠脑缺血再灌注损伤程度减轻,改善这些神经生长因子基因的表达^[19]。

黄芪甲苷 IV(AGS-IV)是从黄芪根中分离得到的一种新的环烷类三萜苷。具有强大的免疫刺激、抗炎和抗氧化作用。研究表明 AGS-IV 是自由基清除剂和醛糖还原酶抑制剂,AGS-IV 对甩尾阈值温度、生化指标、运动神经传导速度(MNCV)具有显著影响。AGS-IV 能抑制糖尿病大鼠有髓纤维面积的减少、有髓纤维直径的增加和节段性脱髓鞘的增加。AGS-IV 的保护机制是降低糖化血红蛋白水平,血糖浓度,血浆胰岛素水平升高。AGS-IV 可抑制红细胞醛糖还原酶活性,提高神经组织谷胱甘肽过氧化物酶活性,抑制红细胞醛糖还原酶活性,减少神经和红细胞糖基化终产物的积累。此外,AGS-IV 提高了糖尿病大鼠神经和红细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。上述研究说明,AGS-IV 对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠周围神经病变的进展具有保护作用,其作用原理和方法可能与多种因素有关^[20]。

2.2 黄芪与糖尿病心肌病

糖尿病心肌病(DCM)是一种糖尿病引发的特异性心肌病,和其他心脏病不同的是,它的心肌结构和功能的变化是比较明显的特征。研究表明显示炎症,心肌纤维化、糖和脂代谢紊乱,氧化应激,以及细胞凋亡在此类疾病中的发病机制中起重要作用^[21]。最近研究发现^[22],AGS-IV 能改善 T2DM

大鼠的心脏收缩和舒张功能,改善心脏组织病理学改变。此外,AGS-IV 显著改善了 T2DM 大鼠和高脂饮食(HFD)大鼠的循环 TC、TG、HDL 水平和心脏脂质积累。AGS-IV 能显著抑制 T2DM 大鼠 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达及心肌纤维化,其机制可能与改善心肌脂质代谢,最终改善心功能有关。该研究表明,AS-IV 对 T2DM 大鼠心肌损伤具有保护作用,其机制可能与改善脂质代谢有关。

杨靖宇等^[23]对糖尿病心肌病大鼠体内氧化应激的各项指标的测定,认为黄芪能降低糖尿病患者心肌氧化应激与纤维化,进一步恢复心肌功能。黄芪对心肌细胞的作用通过降低血清 IL-6 和 AngII 水平抑制细胞凋亡及 BNP 表达,增加 PGC-1 α 蛋白或调节 NRG-1/ErbB 信号通路^[24-26]。Chen 等^[27]认为黄芪多糖能改善心肌糖脂含量一定程度的代谢紊乱。陈添华等^[28]认为局部糜蛋白酶-血管紧张素 II 系统的过度激活在糖尿病心肌病中起主导作用,而 APS 能部分抑制心肌糜蛋白酶和血管紧张素的活性 II 糖尿病诱导的系统,对心肌细胞产生保护作用。黄芪多糖可抑制大鼠糖尿病性心肌病,通过抑制局部心肌凝乳酶 Ang II 系统,可降低心力衰竭等并发症的风险^[29]。

2.3 黄芪与糖尿病肾病

近年来,糖尿病肾病(DN)发病率逐年递增,这种疾病已经导致了許多糖尿病患者的死亡,其发病机制及病因复杂,包括血流动力学、糖代谢、遗传、肾功能等氧应激及其他因素^[30-31]。

黄芪可促进肝细胞合成白蛋白,升高血浆胶体渗透压,减少尿蛋白,减轻肾病浮肿等症状,其机制可能与抑制肿瘤坏死因子- β /Smad 信号通路有关^[32]。研究表明,肾脏是高耗能器官,线粒体作为主要供能细胞器发挥着重要的作用,APS 可使肾小管上皮细胞的生存率提高、维持线粒体功能并抑制线粒体途径介导的细胞凋亡,其机制可能为通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 途径发挥对线粒体的保护作用^[33]。氧化应激在 DN 发病机制中起到重要作用。氧化应激主要是通过损伤胰岛细胞与诱导胰岛素抵抗从而去诱发糖尿病。黄芪甲苷可以抑制高糖或者 H₂O₂ 诱导下人肾小球系膜细胞内活性氧(ROS)生成,提高细胞内 TRPC6 蛋白的表达,发挥对人肾小球系膜细胞(HMC)的保护作用^[34]。

有学者采用 ADME 评价法对 AGS-IV 进行评价,通过蛋白质相互作用(PPI)、疾病和通路网络分

析、基因本体(GO)富集分析,获得 AS-IV 治疗 DN 的特异性分子生物学过程和药理活性。同时,体内外实验均证实 AGS-IV 具有抗氧化、抗炎、抗上皮间质转化(EMT)作用,并能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,最终改善高糖所致的肾损伤^[35]。Lu 等^[36]认为黄芪多糖可能是治疗 2 型糖尿病及其肌营养不良并发症的潜伏着的胰岛素增敏剂和治疗剂。Li 等^[37]从黄芪根部分离得到了一个水溶性多糖,是一个 α -(1-4)-D-葡聚糖。24 h 尿蛋白定量及形态学观察显示黄芪多糖可显著降低阳离子牛血清白蛋白(C-BSA)诱导的肾小球肾炎大鼠蛋白尿及形态学改变,提示黄芪多糖可能具有治疗肾小球肾炎的潜力。王雅宁等^[38]认为 ASI 可减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤,其机制可能与减少细胞凋亡及抑制 TGF- β /Smad 信号通路活性有关。黄芪多糖可以调节胰岛素抵抗性骨骼肌中的部分胰岛素信号,黄芪多糖的抗萎缩和抗凋亡活性主要体现在 C₂C₁₂ 骨骼肌肌管和成肌细胞中^[39]。

2.4 黄芪与糖尿病视网膜病变

糖尿病性视网膜病变(DR)是一种常见由糖尿病引起的疾病,会使患者的双眼视力下降。糖尿病病人在眼底的微血管病变被发现之前,通常会在暗适应、对比敏感度和颜色感知方面出现功能缺陷。黄芪可以降低糖尿病大鼠视网膜病变的发生率,具有明显的抗氧化和自由基清除活性,可以降低 MDA 含量/SOD 活力,从而缓解了高糖环境对细胞膜完整性的破坏和微血管的损伤^[40]。黄芪还可通过抗炎影响 Akt-VEGF 信号通路,减少白细胞在糖尿病性视网膜病变的粘附,同时抑制视网膜外膜细胞凋亡和基底膜增厚^[41]。

另有研究探讨了黄芪多糖对代谢记忆诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞死亡的预防作用及其机制^[42],结果表明高糖暴露可诱导代谢记忆,并伴有 miR-204/SIRT1 轴持续失调,内质网络应激水平高,即使在正常葡萄糖替代后也可激活凋亡通路。黄芪多糖可逆转 miR-204 的表达,导致去抑制 SIRT1 和减轻内质网络应激诱导的凋亡,表现为降低 p-PERK、p-IRE-1、Bax、Caspase-12、Caspase-9、Caspase-3 水平,以及升高 Bcl-2 和未释放 PARP 水平。表明黄芪多糖通过调控 miR-204/SIRT1 轴来抑制内质网络应激和随后的细胞凋亡。

2.5 黄芪与糖尿病足

糖尿病足是由糖尿病血管病变、神经病变和感

染引起的疾病,其特征是感觉疼痛、麻木和异常以及溃疡和坏疽等,导致糖尿病患者足部或下肢组织的破坏,约 15% 的糖尿病患者在某一阶段出现了糖尿病足^[43]。近年研究提示黄芪可促进糖尿病足溃疡源性成纤维细胞增殖,延缓细胞衰老和促进效应,黄芪也可以促进胶原蛋白的合成,然而高浓度 (> 640 μg/mL) 的 APS 可产生抑制作用^[44-45]。黄芪多糖能有效降低糖尿病足溃疡源性成纤维细胞

的晚期糖基化终产物 (AGEs) 浓度和随机激活基因表达 (RAGE) m-RNA 表达,显著缩短糖尿病足溃疡患者肉芽组织出现和溃疡愈合的时间^[46]。近年来,APS 的联合使用成为一个热点研究课题。黄芪多糖与组织工程化皮肤 (TES) 的结合可以模拟细胞外基质的超微结构,恢复皮肤微循环,促进创面愈合^[47]。发现 APS 与内皮祖细胞 (EPCs) 联合可促进血管生成,其机制可能与 VEGF/VEGFR 及 Ang1/

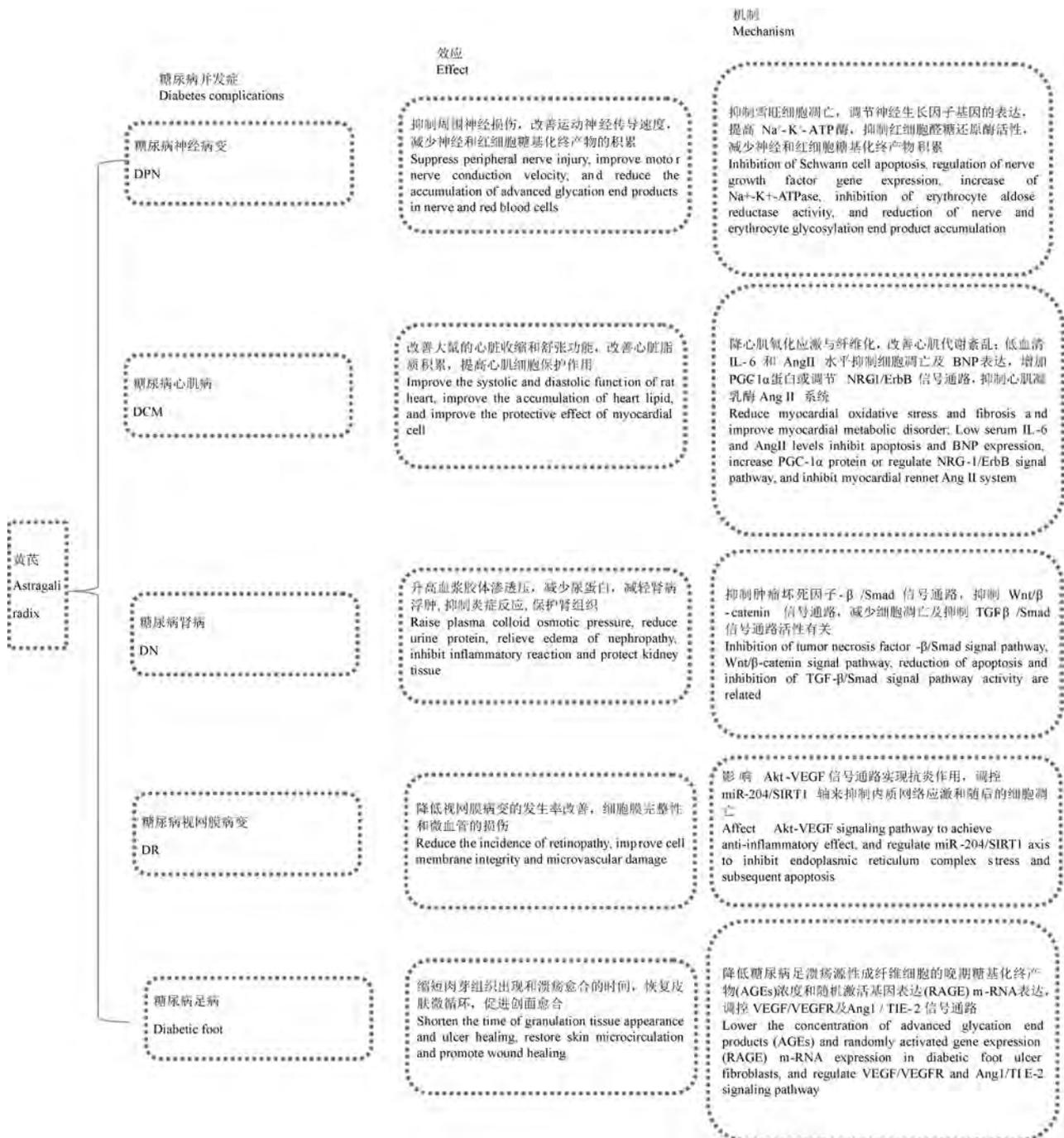


图 1 黄芪抗糖尿病并发症效应及机制

Figure 1 Anti-diabetic complications effect and mechanism of Astragalus

Tle-2 信号通路的调控有关。

综上所述,黄芪抗糖尿病并发症的相关机制与效应,见图 1。

3 小结与展望

糖尿病肾病、糖尿病心肌病等并发症多为糖脂代谢紊乱、血液流变性改变、免疫介导微炎症状态等诸多因素共同作用的结果,近些年许多研究人员已经确信,免疫介导微炎症状态在糖尿病并发症的发展过程中起着核心作用。微炎症状态是一种局部的、非显性的慢性低度炎症,此反应可引发一系列并发症,炎症因子可刺激血管活性物质释放,内皮细胞通透性增加;还可引发机体的氧化应激,损伤血管内皮,增加单核细胞对血管内皮的黏附和浸润,并进一步诱导单核细胞趋化和激活释放各种细胞因子,从而加重脏器损伤。迄今为止,研究已证实抗炎药物可以治疗糖尿病并发症,但还没有一种既定的药物能通过调节微炎症状态来改善糖尿病并发症^[48]。传统中医药表明黄芪可以补气固表,提高免疫力,针对糖尿病并发症气虚血瘀对因调节。现代研究表明黄芪中的活性成分黄芪多糖,黄芪皂苷和黄芪黄酮类化合物,可改善高糖状态下损伤的细胞以及基因的表达,调节氧化应激,抗炎,改善血管内皮功能,调节能力代谢等,针对糖尿病神经病变、糖尿病心肌病、糖尿病肾病、糖尿病足以及糖尿病视网膜病病症对症调节。中医基于“行气化痰”理论治疗气滞血瘀之症,现代医学表明糖尿病并发症的核心为血管微炎症病变。然“行气化痰”理论是否与调控血管微炎症状态相关?

值得关注的是,虽然我国使用黄芪治疗糖尿病并发症研究的发展态势良好,但是研究多以动物实验、有效成分为主,将黄芪用于临床治疗糖尿病的试验相对较少,分子机制探讨不足,建议在后期的研究中,要深入开展黄芪分子基础研究,并积极开展黄芪及相关复方治疗糖尿病并发症的新药研究。可以传统理论为指导,以现代研究为主线,从调控血管微炎症,血管内皮功能切入,进行糖尿病并发症的研究与治疗,以期为黄芪抗糖尿病并发症提供新的思路。

参考文献:

- [1] 郭明飞. 糖尿病并发症与中药治疗 [J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2012, 28(16): 49-50.
- [2] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes

in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.

- [3] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523.
- [4] Ma RCW, Tsoi KY, Tam WH, et al. Developmental origins of type 2 diabetes: perspective from China [J]. Eur J Clin Nutr, 2017, 71(7): 870-880.
- [5] 段炼, 李会军, 闻晓东, 等. 黄芪治疗糖尿病研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(7): 776-781, 792.
- [6] 夏新中, 夏洋, 肖静. 黄芪多糖治疗糖尿病的研究进展 [J]. 长江大学学报(自科版)医学卷, 2009, 6(4): 86-88.
- [7] 曲敬蓉, 张艳艳, 宿宏佳, 等. 黄芪多糖激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善模型大鼠糖尿病性肝损伤 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(10): 1422-1427.
- [8] 沈爱云. 黄芪、丹参中多种有效成分的制备和质量控制 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(12): 67-68.
- [9] 王艳, 胡娟妮, 赵勇, 等. UPLC-MS 法同时测定黄芪中黄芪皂苷 I、II、III 和 IV 的含量 [J]. 中南药学, 2013, 11(12): 925-928.
- [10] 黄春玲, 吕玉萍. 黄芪辅助治疗 2 型糖尿病对胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2003(10): 779-780.
- [11] 牟佳佳, 陈芳, 陈党辉, 等. 黄芪中 5 种黄酮类成分的含量测定及其指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(5): 900-906.
- [12] 李瑞芬. 蒙古黄芪干燥根的化学成分研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [13] Qi LW, Li P, Ren MT, et al. Application of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of Radix Astragali and its preparations [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2087-2097.
- [14] 唐汉平, 李宝华. 自拟益气通络方治疗糖尿病周围血管病变 30 例 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(4): 653-654.
- [15] 白先, 宋宗良. 糖尿病周围神经病变的中医药治疗研究进展 [J]. 中医临床杂志, 2019, 31(11): 2031-2034.
- [16] Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration [J]. J Peripher Nerv Syst, 2010, 15(2): 93-103.
- [17] Webber CA, Christie KJ, Cheng C, et al. Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the NetriN-1 receptors, DCC and Unc5H2 [J]. Glia, 2011, 59(10): 1503-1517.
- [18] 郑亚琳. 林兰教授辨治糖尿病周围神经病变的临床经验挖掘及相关机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [19] 刘洪凤, 宋高臣, 崔荣军, 等. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠 GLUT4 蛋白表达的影响 [J]. 中国食物与营养, 2011, 17(11): 70-72.
- [20] Yu J, Zhang Y, Sun S, et al. Inhibitory effects of astragaloside IV on diabetic peripheral neuropathy in rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2006, 84(6): 579-587.
- [21] 位晨晨, 钟明. 糖尿病心肌病的发病机制 [J]. 心血管病学进展, 2020, 41(2): 135-139.
- [22] Wang Z, Zhu Y, Zhang Y, et al. Protective effects of AS-IV on

- diabetic cardiomyopathy by improving myocardial lipid metabolism in rat models of T2DM [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110081.
- [23] 杨靖宇, 刘寅, 孙根义, 等. 黄芪多糖影响糖尿病大鼠心肌氧化应激损伤的分子机制 [J]. *临床心血管病杂志*, 2013, 29(8): 584-587.
- [24] 叶婷, 王磊, 陈晶, 等. 黄芪多糖对糖尿病心肌病防治机制的研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2018, 27(9): 1678-1680, 1687.
- [25] 陈红霞, 曹霞, 卢红, 等. 黄芪多糖对糖尿病心肌病大鼠的治疗作用及机制探讨 [J]. *山东医药*, 2016, 56(30): 17-19.
- [26] 于胜男. 黄芪多糖对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的影响 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2016.
- [27] Chen W, Xia YP, Chen WJ, et al. Improvement of myocardial glycolipid metabolic disorder in diabetic hamster with Astragalus polysaccharides treatment [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(7): 7609-7615.
- [28] 陈添华, 周萍萍, 李志樑. 黄芪多糖对血管紧张素 II 介导心肌细胞炎症因子的影响 [J]. *贵阳医学院学报*, 2016, 41(4): 446-449.
- [29] Chen W, Li YM, Yu MH. Astragalus polysaccharides inhibited diabetic cardiomyopathy in hamsters depending on suppression of heart chymase activation [J]. *J Diabetes Complications*, 2010, 24(3): 199-208.
- [30] Giacco F, Du X, D'Agati VD, et al. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice [J]. *Diabetes*, 2014, 63(1): 291-299.
- [31] Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(20): 1892-1903.
- [32] 邓海鸥, 林凯, 黎映兰, 等. 黄芪多糖对老年早期糖尿病肾病患者 TNF- α 、IL-6 和免疫功能的影响 [J]. *中药材*, 2014, 37(4): 713-716.
- [33] 徐雪垠. 黄芪多糖通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 途径对糖尿病肾病肾小管上皮细胞线粒体的影响 [J]. *山东医药*, 2020, 60(5): 33-37.
- [34] 熊莉, 李维组, 孙立, 等. 黄芪甲苷对高糖诱导人肾小球系膜细胞损伤的保护作用及其机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1274-1278.
- [35] Wang E, Wang L, Ding R, et al. Astragaloside IV acts through multi-scale mechanisms to effectively reduce diabetic nephropathy [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104831.
- [36] Lu L, Wang DT, Shi Y, et al. Astragalus polysaccharide improves muscle atrophy from dexamethasone- and peroxide induced injury *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 7-16.
- [37] Li SG, Zhang YQ. Characterization and renal protective effect of a polysaccharide from *Astragalus membranaceus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(2): 343-348.
- [38] 王雅宁, 张云芳, 刘云启, 等. 黄芪甲苷对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中国医师杂志*, 2018, 20(11): 1632-1636.
- [39] Liu M, Wu K, Mao X. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(1): 32-37.
- [40] 江红, 杨玉芝, 段滨红. 黄芪对糖尿病视网膜病变患者氧化应激水平的影响 [J]. *黑龙江医药*, 2011, 24(6): 960-962.
- [41] 刘俊辉, 李春江, 李玉涛. 黄芪多糖对糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用 [J]. *河北医科大学学报*, 2017, 38(7): 797-800.
- [42] Peng QH, Tong P, Gu LM, et al. Astragalus polysaccharide attenuates metabolic memory-triggered ER stress and apoptosis via regulation of miR-204/SIRT1 axis in retinal pigment epithelial cells [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(1): BSR20192121.
- [43] Peter-Riesch B. The diabetic foot: the never-ending challenge [J]. *Endocr Dev*, 2016, 31: 108-134.
- [44] 吴霞. 黄芪多糖对糖尿病足部溃疡部位成纤维细胞增殖功能的促进作用 [J]. *中国现代医生*, 2014, 52(15): 124-126.
- [45] 周倩, 肖正华, 陈定宇, 等. 糖尿病足截肢患者成纤维细胞生物学特性改变及黄芪多糖的影响 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(3): 185-188.
- [46] 邓来明, 肖正华, 陈定宇. 黄芪多糖对糖尿病足溃疡成纤维细胞 AGEs 及 RAGE mRNA 表达的影响 [J]. *今日药学*, 2014, 24(5): 313-315.
- [47] Yang Y, Wang F, Yin D, et al. Astragalus polysaccharide loaded fibrous mats promote the restoration of microcirculation in/around skin wounds to accelerate wound healing in a diabetic rat model [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 136: 111-118.
- [48] 郭传, 尹德海. 糖尿病肾病微炎症状态的中西医结合研究概况 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(2): 157-159.

[收稿日期] 2020-07-20

王丽群, 庞日朝, 胡晓敏, 等. 肠道菌群对色氨酸代谢的影响研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 129-136.
Wang LQ, Pang RZ, Hu XM, et al. Research progress on the effect of gut microbiota on tryptophan metabolism [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 129-136.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.019

肠道菌群对色氨酸代谢的影响研究进展

王丽群¹, 庞日朝², 胡晓敏¹, 叶佳美¹, 张安仁^{3*}

(1. 成都中医药大学养生康复学院, 成都 610075; 2. 西部战区总医院康复医学科, 成都 610083;
3. 同济大学附属上海市第四人民医院康复医学科, 上海 200434)

【摘要】 肠道菌群作为一个复杂的微生态系统, 与宿主建立了密切联系, 在调节与营养、免疫系统激活和宿主防御相关的生理功能中起着核心作用。肠道菌群与宿主之间相互作用的主要方式之一是通过代谢产物。色氨酸(tryptophan, TRP)作为一种必需氨基酸, 参与体内多种生理功能, 影响人体的生长和健康。TRP代谢的异常与许多疾病有关。肠道菌群产生的TRP分解代谢物是微生物群落以及宿主-微生物之间相互作用的重要信号分子, 在维持健康和疾病发病机理中具有重要作用。通过系统阐述肠道菌群的分类和功能, 肠道菌群对TRP代谢途径及其相关疾病影响的研究, 以及肠道菌群影响TRP代谢的潜在机制, 为疾病发病机制和治疗等临床研究提供新的视角。

【关键词】 肠道菌群; 色氨酸代谢; 犬尿氨酸; 5-羟色胺

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0129-08

Research progress on the effect of gut microbiota on tryptophan metabolism

WANG Liqun¹, PANG Rizhao², HU Xiaomin¹, YE Jiamei¹, ZHANG Anren^{3*}

(1. School of Health and Rehabilitation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China.
2. Department of Rehabilitation Medicine, the General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083.
3. Department of Rehabilitation Medicine, Shanghai Fourth People's Hospital Affiliated to Tongji University School of Medicine, Shanghai 200434)

【Abstract】 As a complex microecosystem, the gut microbiota has a close relationship with the host and plays a central role in regulating physiological functions related to nutrition, immune system activation and host defense. Tryptophan (TRP), an essential amino acid, must be obtained from the diet. TRP participates in a variety of physiological functions and affects the growth and health of the human body. Abnormal TRP metabolism has been associated with many diseases. One of the main ways in which the gut microbiota interacts with the host is through metabolites. Tryptophan catabolites produced by gut microbiota are important signaling molecules in the microbial community and in host-microbe crosstalk, and play an important role in physiological and pathological processes. This study describes research progress on the classification and function of gut microbiota, the influence of gut microbiota on TRP metabolic pathways and related diseases, and the potential mechanism of these effects, and discusses new clinical research for disease pathogenesis and treatments.

【Keywords】 gut microbiota; tryptophan metabolism; kynurenine; serotonin

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81973927)。

【作者简介】 王丽群(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 脊髓损伤康复的临床及基础研究。E-mail: 1184311372@qq.com

【通信作者】 张安仁(1964—), 男, 教授, 研究方向: 脊髓损伤康复的临床及基础研究。E-mail: 1518526780@qq.com

肠道是一个复杂的微生态系统,拥有一个密集而多样的微生物群落,称为肠道菌群,该菌群与宿主共同进化以建立相互关系。肠道菌群被认为是一种虚拟内分泌器官,产生的分子能够与宿主生理相互作用并触发局部和全身反应,宿主-微生物群生物串扰是疾病发病机理的主要因素^[1-2]。研究表明,大量的代谢物能够驱动宿主与其微生物组之间的串扰。色氨酸(tryptophan, TRP)是一种必需氨基酸,必须从饮食中获取。饮食中缺乏 TRP 会损害肠道免疫力并改变肠道微生物群落^[3],TRP 代谢对肠道菌群起着重要的调节作用,因此 TRP 作为宿主微生物串扰中的关键必需氨基酸,受到越来越多的关注。同时,肠道菌群也会对 TRP 的代谢产生重要影响,表明肠道菌群与 TRP 代谢之间的相互作用影响宿主的全身稳态。本文主要阐述了肠道菌群的分类和功能,肠道菌群对 TRP 代谢影响及相关疾病的研究,为疾病发病机制和治疗等临床研究提供新的视角。

1 肠道菌群的分类和功能

肠道菌群是个庞大复杂的群体,种类达 500 种,细菌总数达 100 万亿。肠道菌群主要是由厌氧兼性厌氧菌和需氧菌组成,其中厌氧菌占 99% 以上^[4]。在人体肠道微生物群落中,目前已发现的细菌有 9 个门,包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、蓝细菌(Cyanobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)和 VadinBE97 菌门,其中最主要的是厚壁菌门和拟杆菌门。肠道是细菌最佳的营养环境,正常情况下,肠道菌群、宿主与外部环境建立起一个动态平衡,肠道菌群的种类和数量是相对稳定的,但会受到年龄、性别、药物、饮食等多种因素的影响而发生改变,引起肠道菌群失调。肠道微生物群在免疫发育和活动、代谢和营养稳态、大脑功能和行为等多个方面对宿主具有重要意义^[5]。其中对胃肠道代谢物的合成、消化、发酵和次级代谢的调节是肠道微生物群的基本功能之一。大量与肠道微生物相关的胃肠道代谢物具有生物活性并影响宿主细胞的分化、迁移、增殖和凋亡过程,从而对宿主产生多种生理或病理作用,表明代谢物能够驱动宿主与其微生物组之间的串扰^[6]。目前研究主要涉及宿主-微生物群相互作用的代谢物有:

一,短链脂肪酸,由纤维发酵产生的细菌产生;二,胆汁酸,在影响宿主之前被肠道微生物转化;三,色氨酸代谢。其中色氨酸代谢是本文阐述的重点,色氨酸代谢产物胃肠道和外周中都发挥着重要作用,而肠道菌群影响着色氨酸代谢。

2 色氨酸的代谢途径

TRP 除了在体内被用于合成蛋白质之外,在胃肠道中主要遵循三种代谢途径:犬尿氨酸途径、5-羟色胺途径和微生物代谢途径。

2.1 犬尿氨酸途径

机体内约有 95% 的 TRP 通过犬尿氨酸途径被代谢为犬尿氨酸(kynurenine, KYN)^[7]。KYN 的产生依赖于肝细胞中的色氨酸 2,3-双加氧酶(tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO)和存在于其他细胞中的引哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)^[8]。TDO 可以由糖皮质激素或 TRP 本身诱导,而 IDO 受某些炎症因子刺激的影响,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素 g(interferon-g, IFN-g)、干扰素 γ (interferon gamma, IFN- γ),其中 IFN- γ 是最有效的诱导剂^[9]。KYN 一旦产生,便会通过两种不同的途径进一步代谢:犬尿酸途径和喹啉酸途径。KYN 在犬尿酸途径中被犬尿氨酸氨基转移酶催化转氨生成犬尿酸并随尿排出。在喹啉酸途径中,KYN 首先被犬尿氨酸羟化酶羟化生成 3-羟基犬尿氨酸,进而被 3-羟基邻氨基苯甲酸 3,4-双氧化酶催化形成喹啉酸或吡啶甲酸等代谢物^[10]。喹啉酸被认为是一种兴奋性 N-甲基 D-天冬氨酸(N-Methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体激动剂,具有神经毒性,而犬尿酸则是一种神经保护性 NMDA 拮抗剂和 $\alpha 7$ 烟碱胆碱能激动剂^[11]。

2.2 5-羟色胺途径

5-羟色胺(serotonin, 5-HT)又名血清素,因此 TRP 代谢的 5-羟色胺途径又被称为血清素途径。大约 1%~2% 的 TRP 在色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, TPH)的作用下被羟化生成 5-羟色氨酸(5-Hydroxytryptophan, 5-HTP)^[12],TPH 主要以两种亚型存在:色氨酸羟化酶 1(tryptophan hydroxylase 1, TPH1)和色氨酸羟化酶 2(tryptophan hydroxylase 2, TPH2),TPH1 主要存在于肠道肠嗜铬细胞、脾脏、松果体和胸腺中,TPH2 完全存在于神经元细胞中^[13]。5-HTP 进而在芳香羧酸脱羧酶的作用下脱

羧后形成 5-HT, 5-HT 通过单胺氧化酶和醛脱氢酶转化为最终产物 5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindolacetic acid, 5-HIAA), 可在尿液中迅速排出^[14]。5-HT 主要由胃肠道中的肠嗜铬细胞产生, 是一种重要的胃肠道信号分子, 它将信号从肠道传递到内在或外在的神经元, 并影响肠道蠕动和运动、分泌、血管扩张和营养物质的吸收^[15]。

2.3 微生物代谢途径

虽然大多数 TRP 都在小肠中被消化吸收, 但是部分 TRP 仍可以到达结肠, 并被结肠中的多种共生菌群降解。吲哚是 TRP 的主要细菌分解产物, 在色氨酸酶的分解下形成。色氨酸酶在大肠杆菌、梭状芽孢杆菌、霍乱弧菌、变形杆菌、志贺氏菌和粪肠球菌等多种肠道微生物中均有表达^[16]。吲哚吸收后被氧化成吲哚基, 与硫酸盐偶联形成吲哚酚硫酸盐, 并以尿的形式排出体外^[17]。肠道微生物通过其他各种途径将 TRP 转化色胺、吲哚-3-丙酸(indolepropionic-3- acid, IPA)、吲哚乳酸(indolelactic acid, ILA)、吲哚-3-乙酸(indoleacetic-3- acid, IAA)、吲哚-3-醛(indole-3-aldehyde, IAlD)、吲哚丙烯酸(indoleacrylic acid, IA)和粪臭素等。

3 肠道菌群对色氨酸代谢及其相关疾病的影响

3.1 犬尿氨酸途径

越来越多的研究报告了肠道菌群对色氨酸犬尿氨酸代谢途径及其相关疾病的影响。在没有肠道菌群或菌群失调的情况下, 血浆中 TRP 的浓度会增加, 犬尿氨酸途径代谢减少, 从而导致犬尿氨酸/色氨酸含量(KYN/TRP)比值降低, 但在菌群移植后会使得血浆中的 TRP 和犬尿氨酸途径的代谢正常化, 从而对各种疾病产生重要影响。

研究发现抑郁症患者的肠道菌群会发生改变, 血浆中 TRP 浓度降低, 这与 IDO 活性增强有关, 神经毒性喹啉酸增加和神经保护性犬尿酸减少, KYN/TRP 比值的增加, 而益生菌可重塑抑郁症患者的肠道菌群并影响犬尿氨酸代谢途径。Desbonnet 等^[18]使用婴儿双歧杆菌治疗抑郁症大鼠 14 d 后, 显著增加了血浆 TRP 浓度和犬尿酸/犬尿氨酸比值, 降低了 KYN/TRP 比值和 IDO 活性, 同时还导致额叶皮层中 5-HIAA 浓度的降低, 表明双歧杆菌使犬尿氨酸途径中 IDO 活性降低, 血浆 TRP 的可用性增加, 在该途径下游进一步产生神经保护性犬尿酸的趋势增加。最近, Rudzki 等^[19]将 60 名重度抑郁症患

者随机分配到一项干预 8 周的安慰剂对照试验中, 30 名患者接受益生菌植物乳杆菌 229v(LP299v)治疗, 另外 30 名患者接受安慰剂治疗, 结果显示益生菌 LP299v 降低了重度抑郁症患者血浆中的 KYN 浓度和增加了 3-羟基犬尿氨酸/犬尿氨酸比值, 并且益生菌 LP299v 改善了患者的认知能力。Kazemi 等^[20]对抑郁症患者进行益生菌(瑞士乳杆菌和长双歧杆菌)和安慰剂干预 8 周后也得到类似结果, 与安慰剂组相比, 益生菌组的 KYN/TRP 比值显著降低, 并且抑郁症状得到缓解。

神经退行性疾病中犬尿氨酸代谢途径的激活导致犬尿氨酸失衡, 进而产生神经毒性代谢产物, 神经毒性和神经变性的升高, 而肠道菌群会影响犬尿氨酸代谢途径。多发性硬化症(MS)是中枢神经系统的自身免疫性疾病, 与脱髓鞘和神经元丢失有关, 犬尿氨酸途径产生神经保护性和神经毒性代谢产物(如喹啉酸)可影响 MS。在 MS 研究进展中, 犬尿氨酸途径的激活很可能是由于促炎细胞因子(如 TNF- α 和 IFN-g)从而促进 IDO-1 表达。在 MS 的实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)模型中, 观察到大鼠血清中喹啉酸和 KYN/TRP 比值的水平显著升高, 并且这些水平与疾病严重程度的增加相关^[21]。阿尔茨海默氏病(AD)也与犬尿氨酸途径有关, 特别是与喹啉酸相关的炎症因子导致 IDO-1 和 TDO 的表达增加, 进而导致犬尿氨酸代谢途径激活和喹啉酸的积累^[22]。研究发现, 肠道微生物群可以影响神经细胞小胶质细胞以调节喹啉酸产生^[23], 喹啉酸是兴奋毒性 NMDA 受体激动剂, 而 NMDA 受体的表达也受肠道微生物群的调节, 表明肠道微生物群可能潜在地影响犬尿氨酸代谢途径并影响相关神经退行性疾病。

3.2 肠道菌群对 5-HT 途径的影响

肠道菌群对 5-HT 的 TRP 代谢也具有重要影响。很多细菌菌株都能在体外从 TRP 中产生 5-HT, 这些菌株包括大肠杆菌、植物乳杆菌(F18595)、嗜热链球菌、摩根杆菌、肺炎克雷伯氏菌和哈夫尼亚菌等^[24-25]。5-HT 主要在肠道中合成, 肠道微生物群是肠道 5-HT 产生的主要参与者, 这已在 GF 小鼠中得到证实, 与常规 SPF 小鼠相比, GF 小鼠的结肠和血清中的 5-HT 含量显著降低, 并且在整个远端结肠和近端结肠中均可观察到, 而在小肠中则没有, 这表明微生物群在调节结肠 5-HT 中具有特殊作用^[26]。同时, 5-HT 参与情绪、行为和认知功能的

调节。

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种慢性反复发作的肠道疾病,5-HT 在调节肠胃蠕动、分泌和感觉中起着关键作用,有证据表明,IBS 与肠道 5-羟色胺能神经元信号不足有关^[27]。Jalanka-Tuovinen 等^[28]研究表明 IBS 患者的肠道菌群多样性发生了改变,并显示出健康对照者和 IBS 患者之间以及 IBS 患者亚组之间的微生物群组成差异。尽管 IBS 的病因学尚不清楚,但至少在某些亚组患者中,怀疑致病菌肠道菌群在 IBS 发病机理中的作用。在中枢神经系统中,5-HT 参与情绪、行为和认知功能和精神疾病。使用急性色氨酸耗竭技术研究 5-HT 对情绪的影响,其中降低饮食中色氨酸的水平会导致脑部 5-HT 水平的降低,从而可以分析 5-HT 依赖性行为^[29]。同时,肠道菌群影响焦虑和抑郁相关的行为。Bravo 等^[30]研究发现,与对照喂养的小鼠相比,鼠李糖乳杆菌的慢性治疗诱导了皮质海马和杏仁核中 GABA 受体的改变,同时还降低了应激诱导的皮质酮水平以及与焦虑和抑郁相关的行为。肠道菌群对焦虑和抑郁相关行为的影响越来越明显,对 TRP 和 5-HT 代谢影响的也越来越重要,提示肠道菌群可能通过调节 TRP 和 5-HT 对焦虑和抑郁产生影响。

3.3 微生物代谢途径

肠道菌群能够直接代谢色氨酸并改变其宿主中色氨酸的可用性。肠道菌群可以将 TRP 直接代谢为色胺、粪臭素、IPA、IAA、IAc 和 ILA 等代谢产物,这些细菌色氨酸分解代谢物是芳香烃受体(AHR)的配体,AHR 与 AHR 配体结合可以刺激下游靶基因的表达,促使肠道菌群中的有益菌胜过致病菌,从而调节宿主肠内和全身稳态,进而对 MS 和炎性肠病等疾病产生影响。

Rothhammer 等^[31]在 MS 患者的中枢神经系统(central nervous system, CNS)病变中检测到了星形胶质细胞对 I 型干扰素(type I interferons, IFN-I)的转录反应,AHR 激动剂的循环水平降低。他们发现通过补充色氨酸代谢产物吲哚、硫酸吲哚酚、IPA 和 IAld,可减轻经抗生素治疗的 EAE 模型小鼠的 CNS 炎症。进一步研究发现星形胶质细胞中的 IFN-I 信号传导通过配体激活的转录因子 AHR 和细胞因子信号传导抑制因子减少炎症和 EAE 评分。这些发现表明,CNS 中产生的 IFN-I 与来自色氨酸的肠道菌群代谢产物结合,可以激活星形胶质细胞中的

AHR 信号传导并抑制 CNS 炎症。Lamas 等^[32]在患有炎性肠病的小鼠的微生物群中也观察到 AHR 配体数量降低,尤其是在缺乏炎性肠病易感基因 *CARD9* 的小鼠中。*CARD9* 通过增加炎症因子 IL-22 的产生来促进结肠炎的恢复,而 *Card9*^{-/-}小鼠更易患结肠炎。*Card9*^{-/-}小鼠中的微生物群发生了改变,并且微生物群从 *Card9*^{-/-}小鼠转移至野生型小鼠,*Card9*^{-/-}小鼠无法将色氨酸代谢为可充当 AHR 配体的代谢物。用能够代谢色氨酸的乳杆菌菌株或用 AHR 激动剂治疗小鼠后,肠道炎症减弱。

4 肠道菌群调节色氨酸代谢的潜在作用机制

4.1 肠道菌群通过影响 IDO 调节犬尿氨酸途径

虽然肠道菌群对色氨酸犬尿氨酸代谢途径机制尚不清楚,但肠微生物群主要是通过多种途径调节犬尿氨酸代谢中 IDO 的表达和活性。肠道菌群可以影响犬尿氨酸途径中酶的活性。相比于具有正常肠道菌群的小鼠,无菌(germ-free, GF)小鼠肠道的 IDO 表达不足^[33]。Harrington 等^[34]对 IFN- γ 基因敲除小鼠和 GF 小鼠的实验表明,IFN- γ 基因上调依赖于正常的共生菌群,由于 IFN- γ 是 IDO 最有效的诱导剂,因此在小鼠肠道菌群的定植后 IDO 表达的增加。Clarke 等^[35]发现 GF 小鼠的血浆中 KYN/TRP 比值降低,但是将断奶(3 周龄)后的 GF 小鼠从 GF 设施中移出,然后在饲养常规小鼠的笼子中生长至 8~9 周龄,以达到定植正常菌群的目的,结果发现菌群定植小鼠的 KYN/TRP 比值可恢复至正常水平。其他学者报道了小鼠菌群定植后的第 4 天和第 30 天血浆^[36] KYN 浓度和 KYN/TRP 比值都有相似程度的增加。然而,并非所有细菌均能促进 IDO 活性的活性。有研究团队对自发性自身免疫性糖尿病(BioBreeding diabetes-prone, BBDP)大鼠喂养约翰逊氏乳杆菌后发现,约翰逊氏乳杆菌抑制了 IDO 的活性,同时 BBDP 大鼠的血清 KYN 浓度降低,该研究团队认为约翰逊氏乳杆菌让回肠中过氧化氢(H₂O₂)浓度升高可能是抑制 IDO 活性的原因^[37]。这与 Gao 等人^[38]的报告一致,约翰逊氏菌定植后 IDO 活性降低的主要机制是回肠腔内 H₂O₂ 的产生增多,H₂O₂ 充当信号分子,并通过影响宿主-菌群共生相互作用来抑制 IDO 的活性。另一项研究^[39]发现 H₂O₂ 可以通过激活过氧化物酶以诱导蛋白质氧化并抑制 IDO 活性。Moloney 等^[40]通过比较常规小鼠、GF 小鼠和菌群移植小鼠海马体

中的 miRNA,显示微生物群调节与犬尿氨酸途径代谢相关的 miRNA 的表达,并证明肠道菌群调节海马体中犬尿氨酸途径基因的表达。REGA3 是胃肠道内的一种抗菌蛋白,它能够影响肠道菌群的组成,从而增加乳酸杆菌的数量。最近,有研究报道^[41],由 REGA3 增加的乳酸杆菌可能通过产生鸟氨酸上调肠道上皮细胞中的 IDO1 以产生 KYN。

4.2 肠道菌群通过影响 TPH 调节 5-HT 途径

研究报告了肠道微生物群调节 5-HT 的潜在机制,肠道菌群可能通过 TPH 影响 5-羟色胺途径。研究发现,相比于无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 小鼠,GF 小鼠的肠道肠嗜铬细胞在形态上更大,提示肠道微生物可能会影响肠嗜铬细胞的发育和功能^[42],而肠嗜铬细胞主要表达 TPH1,因此肠道菌群可能通过调节肠嗜铬细胞中 TPH1 的表达来响应细菌起源的各种生化物质,从而影响 5-HT 的合成。Sjögren 等^[43]发现,尽管结肠和血清中 5-HT 水平不足,但 GF 小鼠粪便和血清中的 TRP (TPH1 的底物) 水平显著增加,这表明宿主 TPH1 表达的中断导致了 TRP 的积累。Yano 等^[26]进一步研究发现,口服 TPH1 的产物 5-羟色氨酸 (5-HTP) 可充分缓解 GF 小鼠结肠和血清 5-HT 表达的不足,而补充 TPH1 的底物 TRP 则无恢复 5-HT 的表达,表明微生物群通过提高结肠肠嗜铬细胞中 TPH1 的表达来促进 5-HT 的合成。为进一步研究肠道菌群影响 5-HT 产生的机制,研究者将 GF 小鼠结肠中脱氧胆酸的腔内浓度提高到 SPF 小鼠的水平,发现可以增加结肠和血清中的 5-HT,因此他们认为肠道微生物通过将肝脏分泌的胆酸转化为脱氧胆酸进而促进 5-HT 的产生。此外,有研究报道^[44],TPH1 缺陷型 ($TPH1^{-/-}$) 小鼠肠道中的 5-HT 含量显著降低。Kwon 等人^[45]观察到同窝 $TPH1^{-/-}$ 和 $TPH1^{+/+}$ 小鼠之间的肠道微生物组成有显著差异,他们利用离体共生的体外系统评估发现,5-HT 在体外以浓度依赖性和物种特异性的方式直接调节共生细菌的生长。另一项研究^[46]通过实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹比较 GF 小鼠、常规饲养小鼠和定植了人类肠道菌群 (HM) 小鼠的近端结肠节段中 TPH1 mRNA 和蛋白的表达,发现 HM 小鼠的 TPH1 mRNA 和蛋白表达均明显高于 GF 小鼠,同时 GF 小鼠结肠中 5-HT 的含量显著低于 HM 小鼠。为了确定 TPH1 mRNA 和蛋白的表达是否对人类肠道菌群具有特异性,还评估了常规饲养小鼠 TPH1

mRNA 和蛋白的表达,发现其 TPH1 mRNA 表达的增加与 HM 小鼠类似。这些研究结果表明,微生物群的缺乏与结肠 TPH1 表达的降低有关,人体和小鼠肠道微生物群都可以影响 5-HT 的生物合成途径。该研究还在体外人肠嗜铬细胞模型中发现,由远端肠道微生物产生的短链脂肪酸(丁酸和乙酸)能显著提高 TPH1 mRNA 表达,提示肠道微生物通过短链脂肪酸影响肠嗜铬细胞和 TPH1,进而促进结肠中 5-HT 的产生。

肠道菌群还可能通过 5-羟色胺转运蛋白 (serotonin transporter, SERT) 影响 TRP 代谢产生 5-HT。SERT 可以促进 5-HT 被细胞内的单胺氧化酶降解,并维持在体内的正常水平,而在 $SERT^{-/-}$ 小鼠的血浆中缺乏 5-HT^[47]。最近, Singhal 等^[48]评估了 $SERT^{+/+}$ 和 $SERT^{-/-}$ 小鼠的粪便和盲肠微生物的组成,发现与 $SERT^{+/+}$ 小鼠相比, $SERT^{-/-}$ 小鼠的微生物群落结构发生了显著变化。 $SERT^{+/+}$ 小鼠具有更多的肠道微生物共存菌群网络,而 $SERT^{-/-}$ 小鼠的微生物组则由不连续的子网络组成,这表明 $SERT^{-/-}$ 小鼠的肠道细菌之间的相互作用丧失, SERT 缺乏改变了细菌群落结构。Golubeva 等^[49]评估了孤独症谱系障碍的 $BTBR$ 小鼠模型和 $C57BL/6$ 小鼠的结肠和回肠组织中 5-HT 的可用性,相比于 $C57BL/6$ 小鼠, $BTBR$ 小鼠结肠和回肠组织中的 5-HT 水平降低了 50%,且 $BTBR$ 小鼠的 TPH1 表达下调和 SERT 基因表达上调。由于 TPH 的活性决定了 TRP 产生的 5-HT 的量,而 SERT 基因控制着 5-HT 的摄取和分解,因此研究结果表明 5-HT 合成的减少和分解的增加,导致 $BTBR$ 小鼠结肠和回肠中 5-HT 的生物利用度降低。同时,他们发现 5-HT 在结肠和回肠组织中浓度和可用性与梭状芽孢杆菌属的相对丰度密切相关,而且芽孢杆菌属与 TPH1 和 SERT 基因表达水平之间也存在很强的相关性,这证实了梭状芽孢杆菌细菌在 TRP 产生 5-HT 中的重要性。

此外, Hata 等^[50]发现,在 GF 小鼠的盲肠和结肠腔内的 5-HT 水平显著低于 SPF 小鼠,而且在 SPF 小鼠中,大多数 5-HT 是非结合的游离形式,而在 GF 小鼠中,大约有 50% 的 5-HT 以葡萄糖醛酸结合形式存在,说明肠道菌群对葡萄糖醛酸结合的 5-HT 的去共轭过程可能有助于促进肠腔内游离 5-HT 的产生。另外有研究报道^[51],肠道菌群可以通过调节肌间神经丛中的神经元释放 5-HT 和激活 5-HT₄

受体。

4.3 肠道菌群直接代谢 TRP 并改变其宿主中 TRP 的可用性

研究表明,肠道菌群能够直接代谢 TRP 并改变其宿主中 TRP 的可用性。肠道菌群可以将 TRP 直接代谢为色胺、粪臭素、IPA、IAA、IAld 和 ILA 等代谢产物。研究发现,萎缩芽孢杆菌 C89 中非核糖体肽合成酶基因簇之后最下游的芳族 L-氨基酸脱羧酶与 TRP 脱羧形成色胺有关^[52]。同时,嗜线虫致病杆菌也能代谢 TRP 产生色胺^[53]。值得注意的是,Williams 等^[54]研究发现生孢梭菌能够通过特定的色氨酸脱羧酶将 TRP 脱羧成色胺。Wikoff 等^[55]研究发现生孢梭菌在培养物中可以产生 IPA,于是用生孢梭菌 ATCC15579 菌株对 GF 小鼠进行定植,并在定植后每隔一段时间采集血样。结果发现在引入微生物后不久的样品中未检测到 IPA,在定植后第 5 天首次在血清中观察到 IPA,在第 10 天达到与正常养殖小鼠相当的水平,这表明将体内能够产生 IPA 的生孢梭菌定植于胃肠道可以将 IPA 引入宿主的血液中。有学者进一步研究发现^[56],通过基因工程阻断生孢梭菌降解 TRP 的功能后,小鼠血液中的 IPA 水平降低。罗伊氏乳杆菌可以将 TRP 转化为 IAA^[57]。Wilck 等^[58]通过 16SrDNA 基因测序分析了来自正常盐饮食和高盐饮食喂养的小鼠的粪便,发现高盐饮食会改变小鼠的粪便微生物组并消耗乳酸杆菌,同时显著降低粪便中 IAA 和 ILA 的含量,而 IAld 的含量没有发生变化。他们进一步分离小鼠粪便发现上述乳酸杆菌为鼠李糖乳杆菌,并且在用鼠李糖乳杆菌分离物单克隆的小鼠粪便中检测到 ILA、IAA 和 IAld,而在 GF 小鼠粪便中则没有,表明鼠李糖乳杆菌具有产生 ILA、IAA 和 IAld 的能力。最初研究表明,肠道微生物(乳杆菌属、普雷沃菌属、梭菌属、放线菌属和巨球藻属等)能通过最接近粪臭素的前体 IAA 的脱羧作用进行合成粪臭素^[59]。随着研究的进一步深入,发现肠道微生物能够直接代谢 TRP 合成粪臭素。Whitehead 等^[60]在培养德雷克氏梭菌和粪味梭菌的常规培养基中补充 TRP,到 48 h 观察到粪臭素和 IAA 的产生,表明这两种细菌均可降解色氨酸形成 IAA 和粪臭素。

5 总结

肠道微生物群对 TRP 的犬尿氨酸、5-HT 和微生物代谢途径具有重要影响。越来越多的研究表

明的 TRP 代谢许多疾病有关,例如炎症性肠病、肠易激综合征、神经退行性疾病和精神障碍(焦虑、抑郁、孤独症等)^[61-62]。色氨酸代谢物是疾病病理的,因此可进一步开发相关药物,如使用抑制剂来阻止某些途径中的酶,降低神经毒性代谢物水平,同时提高神经保护性代谢产物,进而达到治疗相关疾病的作用。同时,肠道菌群在这些疾病中也具有重要作用,表明肠道微生物的作用可能部分地由 TRP 代谢介导。TRP 代谢物直接或间接地被肠道菌群控制,表明可以通过多种研究方法来帮助确定肠道菌群对各种疾病的影响,包括使用缺乏菌群的无菌动物、益生菌补充剂、抗生素管理和粪移植研究。通过益生菌影响肠道菌群的组成来调节 TRP 代谢可能是一种潜在和有效的治疗方法。因此,本文通过系统阐述肠道菌群对 TRP 代谢途径及其相关疾病的影响,可以对疾病发病机制和治疗等临床提供新的视角。然而,由于肠道微生物群-宿主之间相互作用的复杂性以及疾病和模型的复杂性,而且目前大多数研究都是基础研究,因此对肠道菌群通过 TRP 代谢影响宿主健康的研究仍需进一步深入。

参考文献:

- [1] Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4): 223-237.
- [2] Gheorghe CE, Martin JA, Manriquez FV, et al. Focus on the essentials: tryptophan metabolism and the microbiome-gut-brain axis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2019, 48: 137-145.
- [3] Borghi M, Puccetti M, Pariano M, et al. Tryptophan as a central hub for host/microbial symbiosis [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2020, 13: 1178646920919755.
- [4] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1915-1920.
- [5] Blacher E, Levy M, Tatirovsky E, et al. Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity [J]. *J Immunol*, 2017, 198(2): 572-580.
- [6] 王晓宇, 马富强, 张晓宁, 等. 不可预期应激刺激对大鼠消化道免疫和微生物菌群的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(8): 1-9.
- [7] Cervenka I, Agudelo LZ, Ruas JL, et al. Kynurenes: tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health [J]. *Science*, 2017, 357(6349): eaaf9794.
- [8] O' Mahony SM, Clarke G, Borre YE, et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 277: 32-48.
- [9] Dehghani M, Kazemi Shariat Panahi H, Guillemin GJ, et al. Microorganisms, Tryptophan metabolism, and kynurenine

- pathway: a complex interconnected loop influencing human health status [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2019, 12: 1178646919852996.
- [10] Badawy AA. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(5): e00261.
- [11] Castro-Portuguez R, Sutphin GL. Kynurenine pathway, NAD⁺ synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan [J]. *Exp Gerontol*, 2020, 132: 110841.
- [12] Yabut JM, Crane JD, Green AE, et al. Emerging roles for serotonin in regulating metabolism: new implications for an ancient molecule [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(4): 1092–1107.
- [13] Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform [J]. *Science*, 2003, 299(5603): 76.
- [14] Lesurtel M, Soll C, Graf R, et al. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(6): 940–952.
- [15] Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(8): 473–486.
- [16] Boon N, Kaur M, Aziz A, et al. The Signaling molecule indole inhibits induction of the ar2 acid resistance system in *Escherichia coli* [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 474.
- [17] Lee JH, Wood TK, Lee J, et al. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule [J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23(11): 707–718.
- [18] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat [J]. *J Psychiatr Res*, 2008, 43(2): 164–174.
- [19] Rudzki L, Ostrowska L, Pawlak D, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 100: 213–222.
- [20] Kazemi A, Noorbala AA, Azam K, et al. Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial [J]. *Clin Nutr*, 2019, 38(2): 522–528.
- [21] Flanagan EM, Erickson JB, Viveros OH, et al. Neurotoxin quinolinic acid is selectively elevated in spinal cords of rats with experimental allergic encephalomyelitis [J]. *J Neurochem*, 1995, 64(3): 1192–1196.
- [22] O' Farrell K, Harkin A. Stress-related regulation of the kynurenine pathway: Relevance to neuropsychiatric and degenerative disorders [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112: 307–323.
- [23] Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, et al. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112: 399–412.
- [24] Roshchina VV. New trends and perspectives in the evolution of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 874: 25–77.
- [25] Özoğul F, Kuley E, Özoğul Y, et al. The function of lactic acid bacteria on biogenic amines production by food-borne pathogens in arginine decarboxylase broth consequently, the function of LAB strains on ammonia (AMN) and BAs production by gram negative and positive FBP varied depending on [J]. *Food Sci Technol Res*, 2013, 18(6): 795–804.
- [26] Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis [J]. *Cell*, 2015, 161(2): 264–276.
- [27] Manocha M, Khan WI. Serotonin and GI disorders: an update on clinical and experimental studies [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2012, 3(4): e13.
- [28] Jalanka-Tuovinen J, Salojärvi J, Salonen A, et al. Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2014, 63: 1737–1745.
- [29] Young SN. Acute tryptophan depletion in humans: A review of theoretical, practical and ethical aspects [J]. *J Psychiatry Neurosci JPN*, 2013, 38(5): 294–305.
- [30] Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 16050–16055.
- [31] Rothhammer V, Maccanfroni ID, Bunse L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Nat Med*, 2016, 22(6): 586–597.
- [32] Lamas B, Richard ML, Leducq V, et al. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands [J]. *Nat Med*, 2016, 22(6): 598–605.
- [33] Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ, et al. Salmonella infection and the age-specific response to enteric expression of IFN- γ and its target genes developmentally regulated intestinal [J]. *J Immunol*, 2012, 175: 1127–1136.
- [34] Harrington L, Srikanth CV, Antony R, et al. Deficiency of indoleamine 2, 3-dioxygenase enhances commensal-induced antibody responses and protects against *Citrobacter rodentium*-induced colitis [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(7): 3045–3053.
- [35] Clarke G, Grenham S, Scully P, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner [J]. *Mol Psychiatry*, 2013, 18(6): 666–673.
- [36] El Aidy S, Kunze W, Bienenstock J, et al. The microbiota and the gut-brain axis: insights from the temporal and spatial mucosal alterations during colonisation of the germfree mouse intestine [J]. *Benef Microbes*, 2012, 3(4): 251–259.
- [37] Valladares R, Bojilova L, Potts AH, et al. *Lactobacillus johnsonii* inhibits indoleamine 2, 3-dioxygenase and alters

- tryptophan metabolite levels in BioBreeding rats [J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1711–1720.
- [38] Gao J, Xu K, Liu H, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 13.
- [39] Freewan M, Rees MD, Plaza TS, et al. Human indoleamine 2,3-dioxygenase is a catalyst of physiological heme peroxidase reactions; implications for the inhibition of dioxygenase activity by hydrogen peroxide [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(3): 1548–1567.
- [40] Moloney GM, O'Leary OF, Salvo-Romero E, et al. Microbial regulation of hippocampal miRNA expression; Implications for transcription of kynurenine pathway enzymes [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 334: 50–54.
- [41] Qi H, Li Y, Yun H, et al. *Lactobacillus* maintains healthy gut mucosa by producing L-Ornithine [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 171.
- [42] Uribe A, Alam M, Johansson O, et al. Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat [J]. *Gastroenterology*, 1994, 107: 1259–1269.
- [43] Sjögren K, Engdahl C, Henning P, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(6): 1357–1367.
- [44] Manocha M, Khan WI. Serotonin and GI disorders: an update on clinical and experimental studies [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2012, 3(4): e13.
- [45] Kwon YH, Wang H, Denou E, et al. Modulation of gut microbiota composition by serotonin signaling influences intestinal immune response and susceptibility to colitis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(4): 709–728.
- [46] Reigstad CS, Salmonson CE, Rainey JF, et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells [J]. *FASEB J*, 2015, 29(4): 1395–1403.
- [47] Greig CJ, Zhang L, Cowles RA. Potentiated serotonin signaling in serotonin re-uptake transporter knockout mice increases enterocyte mass and small intestinal absorptive function [J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(21): e14278.
- [48] Singhal M, Turturice BA, Manzella CR, et al. Serotonin transporter deficiency is associated with dysbiosis and changes in metabolic function of the mouse intestinal microbiome [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2138.
- [49] Golubeva AV, Joyce SA, Moloney G, et al. Microbiota-related changes in bile acid & tryptophan metabolism are associated with gastrointestinal dysfunction in a mouse model of autism [J]. *EbioMedicine*, 2017, 24: 166–178.
- [50] Hata T, Asano Y, Yoshihara K, et al. Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180745.
- [51] De Vadder F, Grasset E, Mannerås Holm L, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(25): 6458–6463.
- [52] Yuwen L, Zhang FL, Chen QH, et al. The role of aromatic L-amino acid decarboxylase in bacillamide C biosynthesis by *Bacillus atrophaeus* C89 [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1753.
- [53] Proschak A, Schultz K, Herrmann J, et al. Cytotoxic fatty acid amides from *Xenorhabdus* [J]. *Chembiochem*, 2011, 12(13): 2011–2015.
- [54] Williams BB, Van Benschoten AH, Cimermancic P, et al. Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(4): 495–503.
- [55] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(10): 3698–3703.
- [56] Dodd D, Spitzer MH, Van Treuren W, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 648–652.
- [57] Cervantes-Barragan L, Chai JN, Tianero MD, et al. *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4⁺ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ T cells [J]. *Science*, 2017, 357(6353): 806–810.
- [58] Wilck N, Matus MG, Kearney SM, et al. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 585–589.
- [59] Cook KL, Rothrock MJ, Loughrin JH, et al. Characterization of skatole-producing microbial populations in enriched swine lagoon slurry [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 60(2): 329–340.
- [60] Whitehead TR, Price NP, Drake HL, et al. Catabolic pathway for the production of skatole and indoleacetic acid by the acetogen *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, and swine manure [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(6): 1950–1953.
- [61] Bosi A, Banfi D, Bistoletti M, et al. Tryptophan metabolites along the microbiota-gut-brain axis: an interkingdom communication system influencing the gut in health and disease [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2020, 13: 1178646920928984.
- [62] Comai S, Bertazzo A, Brughera M, et al. Tryptophan in health and disease [J]. *Adv Clin Chem*, 2020, 95: 165–218.

[收稿日期]2020-09-10

李嘉慧,王欣佩,冷静. TLR4/NF- κ B 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 137-142.

Li JH, Wang XP, Leng J. The mechanism of TLR4/NF- κ B in atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 137-142. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.020

TLR4/NF- κ B 参与动脉粥样硬化发生发展机制的研究进展

李嘉慧¹,王欣佩³,冷静^{1,2*}

(1.广西医科大学基础医学院免疫学教研室,南宁 530021; 2.广西中医药大学,广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室,南宁 530200; 3.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,北京 100021)

【摘要】 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种以脂质沉积血管为主的慢性疾病,越来越多研究认为免疫介导的炎症反应在 AS 的发病机制中有着重要的作用。Toll 样受体 4(toll-like receptor4, TLR4)作为天然免疫模式识别受体家族中的一员,参与 AS 的发病各个阶段,因此成为了治疗 AS 的一个重要靶点。本文就 TLR4 与 AS 相关研究进展作一综述。

【关键词】 Toll 样受体 4;NF- κ B;炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2021) 04-0137-06

The mechanism of TLR4/NF- κ B in atherosclerosis

LI Jiahui¹, WANG Xinpei³, LENG Jing^{1,2*}

(1. Department of Immunology, Basic Medical College of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China. 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530200. 3. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021)

【Abstract】 Atherosclerosis (AS) is a chronic disease characterized by lipid deposits in blood vessels. An increasing number of studies suggest that immune-mediated inflammatory responses play an important role in the pathogenesis of AS. Toll-like receptor 4 (TLR4) participates in various stages of AS as a member of the natural immune pattern recognition receptor family, and thus has become an important target for the treatment of AS. This article reviews the progress in research regarding TLR4 and AS.

【Keywords】 toll-like receptor4(TLR4); NF- κ B; inflammation

心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)是世界范围内死亡的主要原因。据世界卫生组织(world health organization, WHO)统计,每年约有 1790 万的

人死于 CVD,占全球死亡人数的 31%,超过 75%的 CVD 发生在中低收入水平国家。致 CVD 的病因有多种,大多数 CVD 的根本原因是动脉粥样硬化

【基金项目】国家自然科学基金(31460243)。

【作者简介】李嘉慧(1996—),女,硕士研究生,主要从事基础免疫学研究。E-mail: 961681540@qq.com

【通信作者】冷静(1963—),女,博士,教授,博士生导师,主要从事天然免疫细胞和分子的研究。E-mail: lj986771558@163.com

(atherosclerosis, AS) 的发生^[1]。

AS 的发病机制尚不清楚,然而某些因素能够增加 AS 的发病概率,包括遗传、环境和个体习惯,如吸烟、肥胖、糖尿病、高血压等等^[2]。

血脂升高是 AS 发展的核心,近年来,越来越多的研究发现,慢性炎症在 AS 发病机制中起着重要的作用^[3-4]。这种炎症信号与天然免疫和适应性免疫均有联系^[5]。固有免疫作为机体抵抗外来病原菌的第一道防线,近年来较多的研究其在 AS 发病中的影响。Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR), TLR4 作为 TLR 家族中的一员,通过激活下游炎症因子的分泌参与 AS 从内膜脂质积聚到斑块破裂的各个阶段,因而被认为是影响 AS 发生发展的重要靶点之一。

1 TLR4 的概述

1.1 TLR4 分布及分子结构

TLR 是一种重要的模式识别受体,通过识别各种病原相关分子模式 (pathogen-associated molecule pattern, PAMP) 在天然免疫中发挥重要的作用^[6]。TLR4 是第一个发现的受体,分布于 B 细胞、单核/巨噬细胞、平滑肌细胞、树突状细胞等细胞表面,能够识别广泛的危险信号分子,包括微生物成分,如脂多糖 (LPS) 和经过内源性修饰的分子,如氧化低密度脂蛋白 (oxLDL)^[7]。

TLR4 是一型跨膜蛋白,由胞外域、胞浆区和跨膜区三部分组成。胞外域由亮氨酸富集的重复序列组成,参与对 PAMP 的识别,通过跨膜区将信号转入细胞内。胞浆区因与 IL-1R 家族成员的胞浆区高度同源,因此称为 Toll/IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, TIR) 结构域,用于募集含有 TIR 结构域的衔接蛋白,进行下游的信号转导^[8]。Toll 样受体识别 PAMP 在固有免疫中发挥作用,激活树突状细胞表达共刺激分子,将主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 二类分子携带的抗原表达于树突状细胞表面, T 细胞识别发挥适应性免疫应答,因此 Toll 样受体在固有免疫和适应性免疫应答中发挥桥梁作用^[9-10]。

1.2 TLR4 的两条信号传导通路

TLR4 识别配体发生在细胞表面,受体内化进行信号的传导。TLR4 是唯一可以激活两条信号通路的 TLR 受体: MyD88 依赖性信号通路和 MyD88 非依赖性信号通路^[11]。分别由 MyD88 和 TRIF 两种

衔接蛋白与受体结合激活下游信号,分别产生促炎细胞因子和干扰素,进而激活 T、B 淋巴细胞介导的适应性免疫应答,进一步杀伤入侵的病原微生物^[12]。

1.2.1 MyD88 依赖性信号通路

MyD88 依赖型信号通路是在质膜上介导除 TLR3 以外所有 TLR 的共同信号转导通路^[13]。髓样分化蛋白 88 (myeloid differential protein-88, MyD88) 是一种衔接蛋白,有两个特殊的结构域 N 端和 C 端。C 端含有 TLR 结构域,其作用是募集受体激活信号通路。N 端又称为死亡结构域,其与 IL-1R 相关激酶 4 (IL-1R related kinases-4, IRAK-4) 相互作用, IRAK-4 磷酸化 IRAK-1, IRAK-1 进一步激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor-associated factor 6, TRAF6)^[14]。TRAF6 是一种 E3 泛素连接酶, TRAF-6 与转化生长因子 β 活化激酶-1 (TAK1) 相互作用, TAK1 与 TAK1 结合蛋白 1 和 2 (TAB1 和 TAB2) 结合后。活化的 TAK1 进一步激活 NF- κ B 抑制蛋白激酶复合物 (IKK α , β , ϵ) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), 进而激活 NF- κ B 和 AP-1 蛋白, 激活后的转录因子进入细胞核, 产生各种细胞因子和趋化因子, 如白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 等^[15-17]。

1.2.2 MyD88 非依赖性信号通路

MyD88 非依赖性信号通路是内体发生的另一条信号转导通路。TLR4 通过衔接蛋白 TRAM 与 TRIF 结合后, 激活 TRIF, TRIF 与 TRAF3、TRAF6 以及受体相互作用蛋白 1 和 3 (RIP1、RIP3) 结合后, TRAF3 和 TRAF6 活化, 分别行使不同的激活通路^[18-19]。TRAF3 与 IKK ϵ 结合, 活化干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor3, IRF3), 一型干扰素 (interferon, IFN) 产生^[20]; TRAF6 在 RIP1 的作用下与 TAK1 结合, 激活 NF- κ B 和 MAPK 诱导细胞因子的产生^[12]。

2 TLR4/NF- κ B 在动脉粥样硬化发展中的作用

TLR4 作为天然免疫 TLR 家族中一员, 它的上调及其下游通路的激活在 AS 的发生中有着一定的地位。TLR4 在人和小鼠的 AS 过程中均有过表达,

主要在病变的巨噬细胞和内皮细胞内,参与 AS 的各个阶段^[21]。有研究发现,与 C57BL/6 小鼠相比,C3H/HeJ 小鼠在高胆固醇和饮食中具有抗 AS 的能力。这是由于 C3H/HeJ 小鼠在 TLR4 细胞质区存在点突变,导致 TLR4 无功能,因此 TLR4 可能是小鼠体内发生 AS 的一种重要因素^[22]。Michelsen 等^[23]人通过抑制 TLR4 和 MyD88 基因表达,显著降低 Apo-e^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化病变面积、斑块脂质含量、巨噬细胞浸润、内皮细胞对白细胞的黏附及循环促炎细胞因子,如 MCP-1、IL-12 等的循环水平。Edfeldt 等^[24]研究发现,TLR4 在人 AS 的内皮细胞、动脉粥样斑块上表达高度上调,因此 TLR4 在人 AS 的形成过程中有着重要的作用。

2.1 TLR4 在脂肪条纹形成中的作用

AS 是由于脂肪、血栓等在血管内皮沉积的一种慢性血管疾病。血管内皮具有抗炎、抗凝血的功能,在维持血管完整性方面有着重要的作用。脂质代谢障碍是 AS 的病变基础,它触发了由慢性炎症介导的免疫反应,导致血管内皮功能异常^[25]。

血脂中的低密度脂蛋白与内皮细胞相互作用是 AS 发生的开始。美国心脏协会将血脂中的 LDL 增加到 1.81~4.89 mmol/L 定义为高脂血症^[26]。由于血脂负荷,血脂中 LDL 增加后,LDL 被摄入内膜修饰为 ox-LDL。oxLDL 可激活 T 细胞,分泌细胞因子和黏附分子,使得单核细胞阻滞,与内皮细胞接触后形成巨噬细胞^[27]。oxLDL 的激活可促进巨噬细胞表面的 TLR4 表达上调,促炎巨噬细胞吞噬脂质形成泡沫细胞,泡沫细胞的积累形成了脂肪条纹,是 AS 的第一个标志。Howell 等^[28]人对 TLR4 活性和 TLR4 缺陷的 C3H/HeN 小鼠巨噬细胞体外进行 oxLDL 诱导后,TLR4 活性的小鼠巨噬细胞分化为泡沫细胞的比例出现上调,此外,研究者在给予 oxLDL 诱导前,用 TLR4 单克隆抗体预处理 C3H/HeN 小鼠巨噬细胞,巨噬细胞向泡沫细胞分化的比例从 29% 降到 13%,因此他们认为 TLR4 是 oxLDL 诱导巨噬细胞向泡沫细胞分化所必须的。然而 oxLDL 激活巨噬细胞表面 TLR4 和引发的炎症反应的确切机制尚不清楚。最新的一项研究表明髓样分化蛋白-2 (myeloid differentiation protein 2, MD2),巨噬细胞表面的一种受体,在 oxLDL 激活 TLR4 中发挥着重要的作用,oxLDL 可直接与 MD2 结合,诱导巨噬细胞 MD2/TLR4 复合物的形成和 TLR4/MyD88/NF- κ B 促炎级联而引起 TLR4 激活触

发炎症反应,并发现 MD2 缺乏或抑制可以阻止 AS 的发生^[29]。因此 MD2 的作用为 oxLDL 诱导炎症反应提供了机制基础。

单核细胞衍生的巨噬细胞是脂质斑块形成的主要细胞。Xu 等^[30]研究表明 TLR4 在人类和小鼠富含脂质的 AS 病变中优先在巨噬细胞表达。Stoletor 等^[31]给予斑马鱼高胆固醇饮食诱导血管脂质积累形成中,研究发现巨噬细胞摄取 LDL 需要 TLR4 参与。平滑肌细胞在 AS 形成的每一个阶段也起着重要的作用。Kiyani 等^[32]研究发现 oxLDL 通过与 TLR4 结合诱导平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 释放粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) 与粒-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF),提示 SMC 参与巨噬细胞的主动调节。Aviram 等^[33]研究发现 SMC 通过摄取 oxLDL,使其表面的 TLR4 上调,激活下游 NF- κ B 通路,并释放 IL-1 β 、TNF- α 等炎性细胞因子,促炎的 SMC 转化为泡沫细胞,加速脂肪条纹的形成。

2.2 TLR4 在动脉斑块形成中的作用

随着病变的发展,SMC 由静息状态迁移至内膜活化参与动脉斑块的形成,血管内膜发生增厚,SMC 是内膜增厚的主要类型细胞^[34]。有研究发现在 AS 脂质核心区 SMC 的 TLR4 表达上调,因此 TLR4 在动脉粥样斑块形成中起着重要的作用^[35]。

Michelsen 等^[23]用 Apo-E^{-/-}小鼠模型研究表明,TLR4 及其 MyD88 的缺失使得主动脉斑块的面积显著减小,降低了 AS 的严重程度。Björkbacka 等^[36]用 MyD88 缺失小鼠证明,TLR4 缺乏与冠状动脉斑块组成的改变有关,这种改变降低了促炎因子和趋化因子的表达。

2.3 TLR4 在 AS 病变后期的作用

在 AS 的病变后期,炎性细胞分泌的蛋白酶降解弹性蛋白、纤维蛋白、基质蛋白,斑块不稳定甚至发生破裂。基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在动脉粥样斑块不稳定和破裂过程中发挥重要的作用。oxLDL 通过 TLR4/NF- κ B 依赖途径促进巨噬细胞释放 IL-8、IL-1 β 、TNF- α ,上调 MMP-9,加速斑块的破裂^[3]。

临床研究表明,急性心肌梗塞 (acute myocardial infarction, AMI) 患者的破裂和易损斑块的巨噬细胞和淋巴细胞比稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SA) 患者的细胞高,提示免疫反应的激活与斑块破

裂和易损斑块进展有关。组织学研究表明 TLR4 在尸检获得的巨噬细胞浸润的冠状动脉斑块中高表达,表明 TLR4 参与动脉斑块的破裂过程^[37]。Yu 等^[38]通过抽取 AMI 患者破裂斑块局部标本,分离单核细胞,患者斑块周围浸润单核细胞的 TLR4 高于全身水平。说明 TLR4 在冠状动脉浸润性巨噬细胞中的表达可能是冠状动脉斑块失稳和破裂的重要因素。Montecucco 等^[39]给予 ApoE^{-/-}小鼠抗-apoA-1 抗体,研究发现该抗体通过 TLR4 途径导致中性粒细胞和 MMP-9 含量增加,胶原含量降低,进而增加动脉斑块的易损性,致小鼠的死亡率增加 23%。纤维连接蛋白含有的额外结构域 A (FN-EDA)作为 TLR4 的内源性配体,可激活 TLR4 通路。Doddapattar 等^[40]对 Apo^{-/-}小鼠的研究结果表明, FN-EDA 富集的微环境是通过 TLR4 途径诱导的动脉粥样斑块的不稳定。

2.4 NF-κB 在 AS 发病过程中的作用

炎症最重要的调节因子之一是转录因子 NF-κB。NF-κB 被认为是一种促 AS 的因子,它参与了 AS 形成过程中的多个病理过程^[41]。

人和动物模型的研究均表明了 NF-κB 参与了 AS 的病变过程。Methe 等^[42]发现急性冠脉综合征和不稳定型心绞痛患者的外周血单核细胞和巨噬细胞的 NF-κB 被激活,提示 NF-κB 的激活是免疫介导的 AS 进展的一种信号机制。Tang 等^[43]用 siRNA 敲低 Apo-E KO 小鼠的 TLR4 后,NF-κB 表达随之被抑制,同时血浆中 IL-1β、TNF-α 和 MCP-1 水平也显著降低。Wolfum 等^[44]用 NF-κB 抑制剂后,降低了 Apo-E^{-/-}小鼠主动脉根部动脉粥样硬化病变面积。

在 AS 病变的初期,oxLDL 激活内皮细胞发生炎症反应,NF-κB 参与激活内皮细胞粘附分子如 e-选择素、血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecules-1, VCAM - 1)、细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM - 1),内皮细胞粘附分子通过与单核细胞的粘附作用,促进了 AS 的发生^[45]。Plotkin 等^[46]人给 Apo-E^{-/-}小鼠应用 NF-κB 抑制剂后,减少了泡沫细胞的形成。

炎症介导的 VSMC 功能障碍导致动脉内膜增生是 AS 发生的关键一步。血管内皮损伤后,VSMC 由静息状态变为活化的过程中,NF-κB 家族成员 p50、p65、p52、c-rel 和 RelB 出现上调,抑制蛋白发生下调。并且在 VSMC 激活后,巨噬细胞浸润与 VCAM-1、MCP-1 表达平行,血管经过长时间的受损,腔面

SMC 继续高表达 VCAM-1 和 MCP-1,巨噬细胞持续增多,逐渐形成动脉斑块^[47]。在对颈动脉狭窄患者的动脉粥样斑块研究中,NF-κB 过度激活,FasL 表达,NF-κB 参与促凋亡蛋白 Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 的转录调控,因此 NF-κB/FasL 参与斑块不稳定的机制^[48]。

3 TLR4 作为靶点治疗 AS

AS 是作为一种其他心血管疾病的主要诱因,预防和治疗 AS 成为我们重点关注的问题。TLR4 因在 AS 的发生过程中有重要的作用,因此 TLR4 及其下游通路可作为潜在的治疗靶点。Shen 等^[49]研究发现,给予高脂饮食诱导的 AS 模型兔子相比于阿托伐他汀治疗组的 TLR4/NF-κB 表达明显升高,因此阿托伐他汀可能是通过抑制 TLR4/NF-κB 途径治疗 AS。Boekholdt 等^[50]对有冠状动脉粥样硬化的病人研究发现 TLR4Asp299Gly 多态性与疾病的发生有关。在使用普伐他汀治疗后,病人动脉内膜中膜厚度变薄,斑块减小;并且研究发现携带 TLR4Asp299Gly 基因的心血管事件风险低于非携带者,使携带该变异等位基因从普伐他汀的获益更多。有研究表明,联合使用阿托伐他汀和普罗布考对高脂饮食喂养的 Apo-E^{-/-}缺乏的小鼠 AS 作用比单独使用阿托伐他汀对 AS 的作用强,通过增加抑制 NF-κB 调节的 TLR4,对 AS 的恢复具有一定的意义^[51]。

4 讨论

TLR4/NF-κB 是固有免疫的一条重要通路,其介导的炎症反应在 AS 的形成、发展等各个阶段发挥重要的作用。近年来,越来越多的研究通过基因诱导、敲除等方法,证实了 TLR4 及其下游信号通路与 AS 发病的相关性,并且作为治疗 AS 的一个重要靶点。但目前还存在一些问题需要更深入研究:oxLDL/TLR4 通过上调巨噬细胞表面的 CD36 引起巨噬细胞的泡沫化,进而引起细胞因子的释放诱导炎症反应,但是并未有研究证实 TLR4 与细胞因子释放的直接作用机制,也未有研究表明 TLR4 在巨噬细胞脂质代谢中胆固醇蓄积中的作用;其次 TLR4 基因多态性与 AS 等心血管事件风险的发生关系存在着争议。有研究表明携带 TLR4Asp299Gly 患者给予他汀类药物药物治疗获益更多,因此 TLR4Asp299Gly 基因多态性对 AS 的发生有保护作用。

用,而也有研究发现 Asp299Gly 携带者男性患者心肌梗死风险是增加的,而女性无关联。因此需要更多的临床样本进一步阐明 TLR4 基因多态性与 AS 发生的关系。因此我们期望在今后的研究中,通过新发现为防治 AS 及 AS 的发生机制提供新见解。

参考文献:

- [1] Benziger CP, Roth GA, Moran AE. The global burden of disease study and the preventable burden of NCD [J]. *Glob Heart*, 2016, 11(4): 393-397.
- [2] Tang YP, Liu Y, Fan YJ, et al. To develop a novel animal model of myocardial infarction: A research imperative [J]. *Animal Model Exp Med*, 2018, 1(1): 36-39.
- [3] Taleb S. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2016, 109(12): 708-715.
- [4] Wu MY, Li CJ, Hou MF, et al. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2034.
- [5] Nasonov EL, Popkova TV. Atherosclerosis: perspectives of anti-inflammatory therapy [J]. *Ter Arkh*, 2018, 90(5): 4-12.
- [6] 张红利, 贾春新, 李海鸥, 等. 参芍口服液调控 TLR4/MyD88 通路改善糖尿病大鼠心肌炎症损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 28-33.
- [7] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(4): 317-337.
- [8] Crowley T, Fitzpatrick JM, Kuijper T, et al. Modulation of TLR3/TLR4 inflammatory signaling by the GABAB receptor agonist baclofen in glia and immune cells: relevance to therapeutic effects in multiple sclerosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 284.
- [9] Michaeli A, Mezan S, Kühbacher A, et al. Computationally designed bispecific MD2/CD14 binding peptides show TLR4 agonist activity [J]. *J Immunol*, 2018, 201(11): 3383-3391.
- [10] Li H, Wang X, Xu A. Effect of paclitaxel+hirudin on the TLR4-MyD88 signaling pathway during inflammatory activation of human coronary artery smooth muscle cells and mechanistic analysis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4): 1301-1317.
- [11] Li X, Li H, Dong X, et al. Expression of NF- κ B and TLR-4 is associated with the occurrence, progression and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(12): 5850-5859.
- [12] Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3): 557-581.
- [13] Zhu M, Yu K, Wang L, et al. Contribution of drugs acting on the TLRs/MyD88 signaling pathway on colitis-associated cancer [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(7): 363-368.
- [14] Guven-Maiorov E, Keskin O, Gursoy A, et al. The architecture of the TIR domain Signalosome in the Toll-like receptor-4 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13128.
- [15] Daniele SG, Béraud D, Davenport C, et al. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(376): 45.
- [16] Campolo M, Paterniti I, Siracusa R, et al. TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in Parkinson's diseases *in vivo* model [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76: 236-247.
- [17] Zhang H, Shan Y, Wu Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF-kappaB signaling pathway in RAW264.7 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 93-100.
- [18] Shim DW, Heo KH, Kim YK, et al. Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-dependent signaling pathway via inhibition of Toll-like receptor 4 endocytosis in lipopolysaccharide-stimulated macrophages [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126871.
- [19] Ewald SE, Lee BL, Lau L, et al. The ectodomain of toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor [J]. *Nature*, 2008, 456(7222): 658-662.
- [20] Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis [J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(4): 34.
- [21] Yang L, Gao C. MiR-590 inhibits endothelial cell apoptosis by inactivating the TLR4/NF- κ B pathway in atherosclerosis [J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(3): 298-307.
- [22] Poggi M, Bastelica D, Gual P, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(6): 1267-1276.
- [23] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(29): 10679-10684.
- [24] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1158-1161.
- [25] Kanai H, Tsuchida A, Yano S, et al. Intraplatelet and urinary serotonin concentrations in systemic lupus erythematosus with reference to its clinical manifestations [J]. *J Med*, 1989, 20(5-6): 371-390.
- [26] Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(25): 3024-3025.
- [27] 张良, 韩丹, 赵诗萌, 等. ox-LDL 与单核巨噬细胞相互作用

- 促进动脉粥样硬化形成 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 31-36.
- [28] Howell KW, Meng XZ, Fullerton DA, et al. Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells [J]. *J Surg Res*, 2011, 171(1): e27-e31.
- [29] Chen T, Huang W, Qian J, et al. Macrophage-derived myeloid differentiation protein 2 plays an essential role in ox-LDL-induced inflammation and atherosclerosis [J]. *EBioMedicine*, 2020, 53: 102706.
- [30] Xu XH, Shah PK, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL [J]. *Circulation*, 2001, 104(25): 3103-3108.
- [31] Stoletov K, Fang LH, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. *Circ Res*, 2009, 104(8): 952-960.
- [32] Kiyan Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, et al. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 66: 72-82.
- [33] Aviram M, Fuhrman B. LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 188(1-2): 149-159.
- [34] Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [35] Rice JB, Stoll LL, Li WG, et al. Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(9): 1576-1582.
- [36] Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways [J]. *Nat Med*, 2004, 10(4): 416-421.
- [37] Mauriello A, Sangiorgi G, Fratoni S, et al. Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree: a histopathologic study of patients dying of acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(10): 1585-1593.
- [38] Yu XH, Zheng XL, Tang CK. Nuclear factor-kappaB activation as a pathological mechanism of lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 70: 1-30.
- [39] Montecucco F, Braumersreuther V, Burger F, et al. Anti-apoA-1 auto-antibodies increase mouse atherosclerotic plaque vulnerability, myocardial necrosis and mortality triggering TLR2 and TLR4 [J]. *Thromb Haemost*, 2015, 114(2): 410-422.
- [40] Doddapattar P, Jain M, Dhanesha N, et al. Fibronectin containing extra domain a induces plaque destabilization in the innominate artery of aged apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 500-508.
- [41] Bowman JD, Surani S, Horseman MA. Endotoxin, Toll-like receptor-4, and atherosclerotic heart disease [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2017, 13(2): 86-93.
- [42] Methe H, Kim JO, Kofler S, et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome [J]. *Circulation*, 2005, 111(20): 2654-2661.
- [43] Tang YL, Jiang JH, Wang S, et al. TLR4/NF-κB signaling contributes to chronic unpredictable mild stress-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123685.
- [44] Wolfrum S, Teupser D, Tan M, et al. The protective effect of A20 on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is associated with reduced expression of NF-κB target genes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(47): 18601-18606.
- [45] Dimitriadis GK, Kaur J, Adya R, et al. Chemerin induces endothelial cell inflammation: activation of nuclear factor-kappa beta and monocyte-endothelial adhesion [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(24): 16678-16690.
- [46] Plotkin JD, Elias MG, Dellinger AL, et al. NF-κB inhibitors that prevent foam cell formation and atherosclerotic plaque accumulation [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(6): 2037-2048.
- [47] Landry DB, Couper LL, Bryant SR, et al. Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 [J]. *Am J Pathol*, 1997, 151(4): 1085-1095.
- [48] Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, et al. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability [J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 458-463.
- [49] Shen DZ, Xin SL, Chen C, et al. Effect of atorvastatin on expression of TLR4 and NF-κB p65 in atherosclerotic rabbits [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(6): 493-496.
- [50] Boekholdt SM, Agema W, Peters RJ, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events [J]. *Circulation*, 2003, 107(19): 2416-2421.
- [51] 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(26): 1445-1453.

[收稿日期]2020-11-09

王利然,杨丽红,宁文华,等. 长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 143-149.
Wang LR, Yang LH, Ning WH, et al. Research progress of long non-coding RNA involvement in angiogenesis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 143-149.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.021

长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展

王利然¹, 杨丽红^{1,3}, 宁文华¹, 秦懿因¹, 李晶^{2,3}, 杜元灏^{1,3*}

(1.天津中医药大学第一附属医院,天津 300381; 2.天津中医药大学第一附属医院针灸研究所,天津 300381;
3.国家中医针灸临床医学研究中心,天津 300381)

【摘要】 血管新生与许多疾病密切相关,对疾病的发展及预后起到至关重要的作用。lncRNA 是血管新生重要的调控分子,通过调控血管内皮细胞表型转变、血管内皮生长因子及 miRNA 的表达,参与缺血性脑卒中、肿瘤、动脉粥样硬化等疾病的病理恢复过程。文中综述了 lncRNA 的生物学功能及其在血管生成和血管疾病中的表达变化、调控作用的相关研究,以期为后续血管新生的机制研究及临床应用提供参考。

【关键词】 长链非编码 RNA;血管新生;血管内皮细胞;血管内皮生长因子;miRNA;信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)04-0143-07

Research progress of long non-coding RNA involvement in angiogenesis

WANG Liran¹, YANG Lihong^{1,3}, NING Wenhua¹, QIN Yinan¹, LI Jing^{2,3}, DU Yuanhao^{1,3*}

(1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China.
2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, the First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300381.
3. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381)

【Abstract】 Angiogenesis is closely related to many diseases and plays an important role in the development and prognosis of diseases. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are important regulatory molecules of angiogenesis that are involved in the pathological recovery process of ischemic stroke, tumor, atherosclerosis and other diseases by regulating the phenotypic transformation of vascular endothelial cells, angiogenic factors and miRNA expression. Here, we review the biological functions of lncRNAs, and describe their expression and regulatory effects in angiogenesis and vascular diseases to provide reference for ongoing research into lncRNA mechanisms of action and their clinical application in angiogenesis.

【Keywords】 lncRNA; angiogenesis; EC; VEGF; miRNA; signaling pathways

血管新生指在原有血管基础上通过内皮细胞增殖和迁移,以芽生或肠套叠的形式生成血管。血管新生与许多血管疾病密切相关,如肿瘤、心血管疾病、缺血性脑血管疾病和血管视网膜病变,对疾病的发展及预后起到至关重要的作用。

随着遗传学与基因学的发展,对基因的研究越

来越深入,非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA)在血管生成中的作用被逐渐验证。长链非编码 RNA^[1](long non-coding RNAs, lncRNA)是一类由 RNA 聚合酶 II 转录的转录本长度大于 200 个核苷酸的 RNA,缺乏明显的开放阅读框(open reading frames, ORFs),不编码蛋白,是一种调控性分子。

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目(81904292)。

【作者简介】 王利然(1990—),女,博士生,研究方向:针灸病谱,针灸治疗脑血管疾病的机制研究。E-mail:964716367@qq.com

【通信作者】 杜元灏(1964—),男,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:针灸病谱,针灸治疗脑血管疾病的机制研究。

E-mail:jpjs_cn@sina.com

lncRNA 发挥作用的功能广泛,涉及了基因表达调控的方方面面。国内外研究发现,lncRNA 是血管新生重要的调控分子,参与缺血性脑卒中、肿瘤、动脉粥样硬化等疾病的病理恢复过程,是近几年备受关注的潜在调控分子。本文综述了 lncRNA 的生物学功能及其在血管生成和血管疾病中的表达变化和调控作用的相关研究,以期为后续血管新生的机制研究及临床应用提供参考。

1 lncRNA 的生物学功能

lncRNA 主要分布在细胞核内,然而,有些也局限在细胞质中,或只在细胞质中发现。根据其亚细胞定位,lncRNA 具有调节基因转录(例如,表观遗传水平调控、转录水平调控、转录后水平调控)、调节蛋白翻译、染色质修饰及 miRNA 等生物学功能。

1.1 lncRNA 在细胞核中的功能机制

(1)lncRNA 作为诱饵调控蛋白与 DNA 或其他蛋白的结合。lncRNA-生长停滞特异性转录物 5 (growth arrest-specific transcript 5, GAS5)^[2]通过充当诱骗物,使糖皮质激素应答元件(glucocorticoid response element, GRE)与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的 DNA 结构域结合,从而与 DNA GREs 竞争与 GR 的结合。饥饿状态下,GAS5 作为 GR 的“核抑制因子”,通过调节 GR 的转录活性,影响细胞存活和代谢活动。(2)lncRNA 作为支架招募 RNA 结合蛋白,将不同的蛋白捆绑在一起形成大的复合物,调控染色质结构和基因表达。lncRNA-DKK1 的激活调节器(lncRNA-activating regulator of DKK1, LNCAROD)^[3]主要分布在细胞核内,与 Y-盒结合蛋白 1(Y-box-binding protein-1, YBX1)和热休克蛋白 70(heat shock protein, HSPA1A)蛋白结合。沉默 YBX1 或 HSPA1A 均不影响 LNCAROD 水平。然而,LNCAROD 的缺失导致 YBX1 蛋白半衰期缩短。过表达的细胞中 HSPA1A 的缺失导致 YBX1 蛋白的蛋白酶体降解加速。LNCAROD 作为 YBX1 和 HSPA1A 相互作用的支架,防止了 YBX1 在 HNSCC 细胞中的蛋白酶体降解,促进 HNSCC 细胞增殖和迁移。(3)lncRNA 调节选择性剪接。lncRNA 肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)^[4]与精氨酸和丝氨酸富集蛋白(serine/arginine-rich protein, SR proteins)剪接因子相互作用,改变其在核斑点区域的磷酸化状态和分布,进而调节选择性剪接。MALAT1 还可以通过调节 SRPK1 等剪切因子激酶

的定位和活性,或通过修改 SR 蛋白,调节 SR 蛋白磷酸化,影响选择性剪接的磷酸酶(PP1 或 PP2A)。(4)lncRNA 通过双向启动子或增强子转录,募集中介蛋白和/或染色质重塑酶来影响基因转录。基因组 DNA 的逆序和易位,可以改变基因组的三维构象,并导致致病的增强启动子接触重新布线。lncRNA-浆细胞瘤多样异位基因(plasmacytoma-variant translocation 1, PVT1)^[5]基因座含有几个基因内增强子,能通过染色体环化调控靶启动子的转录。PVT1 基因中的启动子是抑制 MYC 癌基因表达的肿瘤抑制 DNA 元件,顺式中的启动子竞争使 PVT1 启动子具有 DNA 边界元件的功能,阻止 MYC 癌基因接近细胞类型特异性增强子。

1.2 lncRNA 在细胞质中的功能机制

(1)lncRNA 同与 3'-端非翻译区(UTR)结合的蛋白相互作用,调控 mRNA 的稳定性。有机阴离子转运肽 1b1 (organic anion transporting polypeptide1B1, OATP1B1)是一种主要表达于人肝细胞基底外侧膜上的阴离子摄取转运体。lncRNA-HOX 转录反义 RNA (HOX transcription antisense intergenic RNA, HOTAIR)^[6]可以海绵化 miR-206/miR-613,打破 miR-206/miR-613 与 OATP1B1 mRNA 3'-UTR 的结合位点,消除 lncRNA HOTAIR 对 OATP1B1 的促进作用。miRNA 通过与目标 mRNA 的 3'-UTR 中完全或部分互补的碱基序列相互作用,下调目标基因的表达,并诱导其降解。(2)反义 lncRNA 通过与 mRNA 形成双链来调控 mRNA 的稳定性。lncRNA-β 分泌酶-1 的反义转录本(antisense transcript for βsecretase1, BACE1AS)^[7]形成了 RNA 双链,提高了 β 分泌酶-1 (β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1, BACE-1) mRNA 的稳定性。siRNA 介导的 lncRNA BACE1-AS 下调沉默,降低了抗衰老细胞模型 (SH-SY5Y) 细胞中 BACE1 对淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的切割能力,表明 BACE1 在 SH-SY5Y 细胞中的稳定性与 lncRNA BACE1-AS 的表达密切相关。(3)lncRNA 作为竞争性内源性 RNA (ceRNAs),可以隔离 miRNA,从而阻止其靶 mRNA 的抑制。lncRNA-瓢虫特异表达的影响同源框 2 反义 RNA 1 (dysregulated ladybird homeobox 2 antisense RNA 1, LBX2-AS1)^[8]通过 ceRNA 机制抑制 miR-4685-5p 释放 LBX2 表达。此外,LBX2 可以作为 LBX2-AS1 的转录激活因子。LBX2-AS1、miR-4685-5p 和 LBX2 形成正反馈环,调控疾病发展。(4)lncRNA 可以正向或负向调节蛋白翻译。Igf2r 反义

非蛋白编码 RNA (antisense of Igf2r non-protein coding RNA, Airn)^[9]是从父系染色体转录而来的印记基因。它是反义方向的印记, Airn 能直接与胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 2 (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2, Igf2bp2) 结合,通过 Igf2bp2 控制 mRNA 的翻译。Airn 的沉默导致 Igf2bp2 与其他 mRNA 的结合减少,导致 Igf2bp2 蛋白的翻译减少。(5) 某些 lncRNA 编码具有调控功能的微肽。已发现许多 lncRNA 包含短开放阅读框 (sORF), sORF 编码的小功能肽称为微肽。这些微肽可以协助多种过程,包括细胞分裂,转录调节和细胞信号传导。lncRNA-HOXB 簇反义 RNA 3 (HOXB cluster antisense RNA 3, HOXB-AS3)^[10] 编码一个影响克隆细胞代谢的 53 个氨基酸的微肽,通过竞争性结合 RNA 结合异质性胞核糖核蛋白 A1 (hnRNP A1) 抑制丙酮酸激酶 M (PK-M) 的剪接来抑制癌症进展。(6) lncRNA 还可以调控细胞质中的信号通路。Ras 同源基因家族成员 A (RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (ROCK) 信号的激活通常与肺动脉高压有关。沉默的 lncRNA-平滑肌细胞诱导性复制强化 (smooth muscle-induced lncRNA enhances replication, SMILR)^[11] 有效地提高了 miR-141 的表达,进而抑制 RhoA/ROCK 通路来调节血管重塑和降低血压。

2 LncRNA 对血管新生的调控作用

2.1 lncRNA 调控血管新生相关蛋白的表达

lncRNA 参与调控内皮细胞、血管内皮生成因子、miRNA 等生物分子的表达。在疾病中, lncRNA 表达与内皮细胞、血管生成因子的生成密切相关,对治疗性血管生成 (如缺血性脑卒中、心肌梗死) 和病理性血管生成 (如肿瘤、内膜异位增生) 均有调控作用。并且作为 miRNA 竞争内源性 RNA, 负向调控 miRNA 的表达及下游靶点基因, 从而根据 miRNA 的生物学作用调控血管生成。

2.1.1 调控血管内皮细胞

血管生成需要多种血管生长因子及细胞信号调节, 其中血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的增殖作用对新生血管的形成至关重要。一个 lncRNA 基因芯片检测在人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 和人真皮微血管内皮细胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HDMECs)^[12] 中鉴定了 116 个 ECs 富集的 lncRNA。目前已有多个 lncRNA 验证了在调控内皮细胞中的作用。

大量 lncRNA 在缺血性脑卒中后表达异常^[13], 介导缺血级联过程, 如兴奋性中毒, 氧化应激, 血管生成, 神经炎症等。在缺血性脑卒中后 lncRNA -G 蛋白偶联受体 137b - 假基因 (G protein-coupled receptor 137b-pseudogene, Gpr137b-ps)^[14] 表达显著上调, 促进 ECs 增殖、迁移、成管, 增加微血管密度 (microvascular density, MVD), 改善脑卒中后血流供应。低氧诱导因子 1 α 反义 RNA 2 (hypoxia-inducible factor 1 α -antisense RNA 2, HIF1A-AS2)^[15] 是一种反义 lncRNA, 来源于 HIF-1 α 的自然反义转录, 缺氧时 HIF1A-AS2 表达上调, 促进 HUVECs 的生存能力、迁移能力和管形成能力, 助于脑缺血后血管生成。在缺氧以及血管内皮生长因子的刺激下, MALAT1^[16] 沉默能抑制 ECs 增殖, 并促成迁移表型, 这种现象可能是通过调节细胞周期蛋白而实现的。

在病理性血管生成中, lncRNA 也起到显著的调节作用。lncRNA-泛素结合酶 E2C 假基因 3 (ubiquitin conjugating enzyme E2C pseudogene 3, UBE2CP3)^[17] 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 组织高表达, 能增强 ECs 的增殖、迁移和成管能力, 促进了肿瘤细胞诱导的血管生成, 敲除或沉默 UBE2CP3 的表达后则能抑制血管生成, 延缓肿瘤进展。长基因间非编码 RNA (LINC00) 284 (long intergenic noncoding RNA (LINC000) 284, LINC00284)^[18] 在卵巢癌 (ovarian cancer, OC) 组织和细胞中表达上调, 沉默 LINC00284 通过上调中胚层特异性转录本 (mesoderm-specific transcript, MEST) 和下调细胞核因子- κ B1 (Nuclear factor kappa B, NF- κ B1) 能抑制内皮细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成。因此, 沉默 LINC00284 的表达可能是 OC 潜在的治疗靶点。

此外, lncRNA 在与高血糖相关的内皮功能障碍和糖尿病血管并发症中被发现。通过微阵列分析^[19], 高糖暴露 24 h 后, 100 个 lncRNA 显著上调, 186 个显著下调。高糖条件下, lncRNA MALAT1^[20] 表达水平升高, 抑制或敲除 MALAT1 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进内皮细胞增殖、迁移和成管, 抑制内皮细胞凋亡。并且, 沉默 MALAT1^[21] 通过调控 mir-203-3p 的表达抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs) 迁移和成管, 视网膜血管化降低, 为糖尿病视网膜病变的治疗提供了一种可能的治疗方法。MALAT1^[22] 基因缺陷可抑制 VEGFR2 的表达, 减弱小鼠缺血后肢的血管生成、灌

注和功能恢复,抑制腓肠肌组织缺血后的血流恢复和毛细血管密度,表明 MALAT1 可以通过多条机制影响血管生成。lncRNA FENDRR^[23]下调后同样抑制的 HRMECs 增殖、迁移、毛细血管形态发生和 VEGF 的表达,提示了 lncRNA 在高糖疾病中异常表达,且参与调控内皮细胞功能,影响血管新生。

内皮功能障碍是血管疾病的初始阶段,并且是动脉粥样硬化性血管疾病的重要预后指标。Yin 等^[24]发现 lncRNA - 肝癌高表达转录本 (highly upregulated in liver cancer, HULC) 促进人微血管内皮 (human microvascular endothelial cells, HMECs) 细胞的迁移和成管,抑制细胞凋亡。心肌特异性的 lncRNA-AZIN2 剪接变体 (AZIN2 splice variant, AZIN2-sv)^[25]富含心脏内皮细胞,是内皮功能的负调控因子,抑制 HUVECs 迁移,机制上可能通过阻断 Akt 磷酸化以抑制血管生成。

2.1.2 调控血管内皮生成因子及其受体系统

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是内皮细胞特异性的促有丝分裂源,它通过与内皮细胞表面相应受体 VEGFR-1、VEGFR-2 结合,激活细胞内酪氨酸激酶,引发一系列的信号通路,调控血管生成过程。VEGF 在多种在体模型中强烈地促血管生成作用已经被多个实验证实,且 VEGF 的表达程度与组织中微血管的密度及新生血管数量密切相关。

氧 - 葡萄糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation /reoxygenation, OGD /R) 后,脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 中的 lncRNA-小核仁 RNA 宿主基因 (small nucleolar RNA host gene 1, SNHG1)^[26]及脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, bEnd3) 中的 lncRNA SNHG12^[27]水平均升高,通过调控 miR-199a 及 miR-150 的表达,增加缺氧诱导因子-1a (hypoxia inducible factor, HIF-1a) 和 VEGF 的表达,促进 OGD/R 处理后的血管生成。lncRNA-X-inactive 特异性转录体 (X-inactive specific transcript, XIST)^[28]的表达水平同样随着缺氧暴露时间的增加而升高,沉默 XIST 可显著降低缺氧时 VEGFR2 和 VEGF 水平,以及 ERK1/2 和 Akt 磷酸化水平,抑制血管生成。而 lncRNA-母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, Meg3) 是血管新生的负调控因子,敲除 lncRNA Meg3^[29]促使血管生成相关基因 VEGFA 和 VEGFR2 上调,增强内皮细胞迁移和管形成,增加缺血脑的毛细血管密度。

Qiu 等^[30]发现反义低氧诱导因子 (antisense hypoxia inducible factor, aHIF) 在异位子宫内膜间质组织中高表达,lncRNA aHIF 能促进血管生成相关基因 (VEGFA、VEGFD) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fabric growth factor, bFGF) 的表达,诱导血管生成。

在卵巢癌组织中,lncRNA-分化拮抗非蛋白编码 RNA (differentiation antagonizing non-protein coding RNA, DANCR)^[31]表达上调。DANCR 能促进 VEGF 表达,促进肿瘤血管生成。敲除 DANCR 基因通过抑制血管生成来抑制卵巢肿瘤的生长。lncRNA-嗅觉受体家族 3 亚家族 A 成员 4 (olfactory receptor family 3 subfamily A member 4, OR3A4)^[32]在肝癌 (HCC) 组织中上调,调控 VEGF、血管紧张素 (angiotensin, Ang1) 和纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factors 2, FGF2) 蛋白水平,高表达导致微血管密度 (microvascular density, MVD) 增高,表明 OR3A4 可能是 HCC 不良预后的新标志物,并与血管生成有关。lncRNA-酪氨酸激酶非受体 2 反义 RNA 1 (tyrosine kinase non receptor 2 antisense RNA 1, TNK2-AS1)^[33]在非小细胞肺癌中上调,能减少转导和转录激活因子 3 (STAT3) 介导的泛素化而增强其稳定性,从而增强 VEGFA 表达,形成 STAT3/VEGFA 信号通路,诱导血管生成。lncRNA-小泛素样修饰因子 1 假基因 (small ubiquitin-like modifier 1 pseudogene 3, SUMO1P3)^[34]在结肠癌组织中高表达,SUMO1P3 的下调抑制促血管生成生长因子 VEGFA 的分泌,减少血管生成。Yuan 等^[35]发现 lncRNA-印记基因 (imprinting gene, H19) 调控血管生长因子的表达,并且抑制内皮细胞凋亡,是人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 中促进血管生成的重要调控因子。

2.1.3 调控 miRNA

miRNA 与生物体的物质代谢、细胞周期、细胞分化、凋亡、个体形态形成和发育等一系列重要生命活动的调节息息相关,在机体多种生理过程发挥重要作用。研究发现,miRNA 形成的关键酶——Dicer 酶的缺失将导致严重的血管新生缺陷^[36],因此认为 miRNA 与血管新生关系密切,多个 miRNA 在促进及抑制血管新生调节中发挥重要作用。lncRNA 与 miRNA 结合,竞争性影响 miRNA 与靶基因的结合,调控靶基因的水平;也可通过调控 miRNA 的表达水平、成熟水平或稳定性,调控 miRNA 的水平,从而间接影响靶基因的表达。

TGF- β 家族信号转导 (DIGIT) 诱导 GSC 分化的 lncRNA (lncRNA divergent to GSC induced by TGF- β family signaling, DIGIT)^[37] 作为 miR-134 的分子海绵, 负调控 miR-134, DIGIT 沉默通过调控 miR-134 及其下游靶点 B 细胞特异性莫罗尼鼠科白血病病毒集成位点 (Bmi-1) 的表达, 减少 VEGF 等血管生长因子的表达, 抑制动脉粥样硬化后血管生成。lncRNA-尿路上皮癌相关基因 1 (urothelial carcinoma-associated 1, UCA1)^[38] 的沉默导致 miR-195 表达上调, 抑制丝裂原活化细胞外信号调节蛋白激酶 (mitogen-activated extracellular signal regulated kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和哺乳动物雷帕霉素靶体蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路激活, 影响 HMEC-1 细胞的生长和成管。Qin 等^[39] 发现沉默或下调 lncRNA-重编程调节物 (regulator of reprogramming) 可增强 miR-26 的表达, 从而抑制 NF- κ B 和 JAK1/STAT3 信号通路, 同样抑制了 HMEC-1 细胞的生长、迁移及毛细血管形成, 为动脉粥样硬化血管生成的靶向治疗提供新的思路。lncRNA TCONS_00024652^[40] 作为 miR-21 的竞争性内源 RNA, 降低其表达, 诱导 HUVECs 增殖和血管生成, 刺激动脉粥样硬化斑块的形成, 表明 TCONS_00024652 可能是一个重要的分子标记, 稳定动脉粥样硬化斑块和减缓动脉粥样硬化的进展。

在肝癌 (HCC)^[41] 及人乳腺癌 (BC)^[42] 组织中, 均可发现 lncRNA MALAT1 表达上调, 作为 miR-140 及 miR-145 的竞争性内源 RNA, 调控下游靶点 VEGF 及其受体的表达, 参与血管新生机制。Gao 等^[43] 发现敲除或沉默长基因间非编码 RNA (LINC00) 488 (long intergenic noncoding RNA (LINC00)488, LINC00488) 表达后, 通过竞争性内源作用调控 miRNA-330-5p 及其靶基因 TLN1 的表达, 导致体外增殖和体内肿瘤血管生成受到抑制, 延缓肝癌进展。

2.2 lncRNA 调控血管新生相关信号通路

血管生成依赖于促进和抑制信号通路之间的平衡。研究表明, 磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、MEK/ERK、Delta 样配体 4 (delta-like ligand, DLL4)/Notch、HIF-VEGF-Notch 等信号传导对于确保内皮细胞对促血管生成刺激的适当反应至关重要。lncRNA 通过调控相关信号通路的激活, 介导疾病后的血管新生。

lncRNA GAS5^[44] 能与 HUVECs 中的蛋白酪氨酸磷酸酶基因 (protein tyrosine phosphatase gene, PTEN) 竞争性结合 miRNA-29-3p, 继而上调 PTEN 的表达, 抑制 PI3K/AKT 的磷酸化, 阻碍 PI3K/AKT 通路的激活, 减少血管生成。此外, 过表达 GAS5^[45] 同样能抑制 Wnt/ β 连环蛋白信号通路的激活。表明 GAS5 参与调控多条信号通路介导血管新生。lncRNA PVT1^[46] 能促进肿瘤生长, 诱导肿瘤内血管生成。机制上, PVT1 与 STAT3 信号通路相互作用, 激活 STAT3 信号通路, 增加 VEGFA 表达, 诱导血管生成。此外, STAT3 反过来又刺激 PVT1 转录, 从而持续维持致癌效应。

在动脉粥样硬化疾病中, lncRNA-Alu 介导的 p21 转录调节因子 (Alu-mediated p21 transcriptional regulator, APTR)^[47] 可通过负调控 miR-126 激活 PI3K/AKT 和 MEK/ERK 信号通路, 从而促进细胞增殖、迁移和管道形成。Zhu 等^[48] 研究发现 lncRNA H19 过表达能通过下调 miR-181a 激活腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路, 发挥促血管生成作用。lncRNA-转化生长因子 β (transforming growth factor- β , ATB)^[49] 通过调控 miR-195 来激活 PI3K/AKT 和 MEK/ERK 通路, 调节内皮细胞的迁移和血管生成, 影响四肢动脉粥样硬化的进程。

在周围血管疾病中, lncRNA-Wilms 肿瘤 1 相关蛋白假基因 1 (Wilms Tumor 1 Associated Protein Pseudogene 1, WTAPP1)^[50] 作为 miRNA-3120-5p 的竞争性内源 RNA, 通过 PI3K/Akt 信号通路调控下游靶点基质金属蛋白酶-1 (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 的表达, 从而介导 EPCs 的细胞迁移和血管生成, 在外周血管疾病的发病机制中发挥重要作用。

3 小结与展望

近年来关于 lncRNA 调控基因表达、基因组印记、蛋白翻译以及染色质修饰、转录激活、转录干扰和核内运输等作用机制的研究取得较大进展。血管新生是许多疾病病理生理的关键环节, 不过关于 lncRNAs 调控血管新生的研究报道较少。现有的文献研究表明, lncRNA 通过直接调控相关蛋白或者 miRNA 的功能, 间接影响靶基因的水平, 从而影响血管内皮生长因子的表达、内皮细胞的表型转换、miRNA 的表达, 调控血管新生。表明 lncRNA 参与调控血管新生, 并在血管的发育过程中起重要作用。

但是, lncRNA 在血管新生过程中具体作用机制仍不完善, lncRNA 调控的下游基因及信号通路的分子机制尚不清晰。应尽快构建 lncRNA-mRNA-信号通路网及 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网, 明确 lncRNA 调控血管新生的机制, 为血管新生相关疾病提供明确的诊疗方法。并且, 后续如何干预 lncRNAs 的表达, 调节疾病发展过程, 应用于临床治疗, 也是研究的重点所在。

参考文献:

- [1] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15 (1): 7-21.
- [2] Kino T, Hurt DE, Ichijo T, et al. Noncoding RNA Gas5 is a growth arrest and starvation associated repressor of the glucocorticoid receptor [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(107): 8.
- [3] Ban Y, Tan P, Cai J, et al. LNCAROD is stabilized by m6A methylation and promotes cancer progression via forming a ternary complex with HSPA1A and YBX1 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(6): 1282-1296.
- [4] Romero-Barrios N, Legascue MF, Benhamed M, et al. Splicing regulation by long noncoding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 2169-2184.
- [5] Cho SW, Xu J, Sun R, et al. Promoter of lncRNA Gene PVT1 is a tumor-suppressor DNA boundary element [J]. *Cell*, 2018, 173 (6): 1398-1412.
- [6] Sun F, Wu K, Yao Z, et al. Long noncoding RNA LINC00963 induces NOP2 expression by sponging tumor suppressor miR-542-3p to promote metastasis in prostate cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(12): 11500-11516.
- [7] Liu T, Huang Y, Chen J, et al. Attenuated ability of BACE1 to cleave the amyloid precursor protein via silencing long noncoding RNA BACE1-AS expression [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(3): 1275-1281.
- [8] Li H, Zhang H, Wang G, et al. LncRNA LBX2-AS1 facilitates abdominal aortic aneurysm through miR4685-5p/LBX2 feedback loop [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 109904.
- [9] Hosen MR, Militello G, Weirick T, et al. Aim regulates Igf2bp2 translation in cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2018, 122(10): 1347-1353.
- [10] Huang JZ, Chen M, Chen D, et al. A peptide encoded by a putative lncRNA HOXB-AS3 suppresses colon cancer growth [J]. *Mol Cell*, 2017, 68(1): 171-184.
- [11] Lei S, Peng F, Li ML, et al. LncRNA-SMILR modulates RhoA/ROCK signaling by targeting miR2 141 to regulate vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319(2): H377-H391.
- [12] Man HSJ, Sukumar AN, Lam GC, et al. Angiogenic patterning by STEEL, an endothelial-enriched long noncoding RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(10): 2401-2406.
- [13] Yang J, Zhao J, Liu X, et al. LncRNAs a new target for post-stroke recovery [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(26): 3115-3121.
- [14] Wang C, Qu Y, Wang D, et al. The proangiogenic roles of long non-coding RNAs revealed by RNA sequencing following oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4): 708-727.
- [15] Li L, Wang M, Mei Z, et al. lncRNAs HIF1A-AS2 facilitates the up-regulation of HIF-1 α by sponging to miR-153-3p, whereby promoting angiogenesis in HUVECs in hypoxia [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 165-172.
- [16] Michalik KM, You X, Manavski Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth [J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1389-1397.
- [17] Lin J, Cao S, Wang Y, et al. Long non-coding RNA UBE2CP3 enhances HCC cell secretion of VEGFA and promotes angiogenesis by activating ERK1/2/HIF-1 α /VEGFA signalling in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 113.
- [18] Ruan Z, Zhao D. Long intergenic noncoding RNA LINC00284 knock down reduces angiogenesis in ovarian cancer cells via up-regulation of MEST through NF- κ B1 [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (11): 12047-12059.
- [19] Singh KK, Mantella LE, Pan Y, et al. A global profile of glucose-sensitive endothelial-expressed long non-coding RNAs [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(9): 1007-1014.
- [20] Zhang SH, Zhang SG, Zhou P, et al. LncRNA MALAT1 affects high glucose-induced endothelial cell proliferation, apoptosis, migration and angiogenesis by regulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8551-8559.
- [21] Yu L, Fu J, Yu N, et al. Long non-coding RNA MALAT1 participates in the pathological angiogenesis of diabetic retinopathy in oxygen-induced retinopathy mouse model by sponging miR-203a-3p [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2020, 98 (4): 219-227.
- [22] Zhang X, Tang X, Hamblin MH. Long non-coding RNA malat1 regulates angiogenesis in hindlimb ischemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1723.
- [23] Shi Y, Chen C, Xu Y, et al. LncRNA FENDRR promotes high-glucose-induced proliferation and angiogenesis of human retinal endothelial cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83 (5): 869-875.
- [24] Yin D, Li Y, Fu C, et al. Pro-Angiogenic Role of LncRNA HULC in Microvascular Endothelial Cells via Sequestering miR-124 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(6): 2188-2202.
- [25] Li X, Sun Y, Huang S, et al. Inhibition of AZIN2-sv induces neovascularization and improves prognosis after myocardial infarction by blocking ubiquitin-dependent talin1 degradation and activating the Akt pathway [J]. *EBio Medicine*, 2019, 39: 69-82.
- [26] Wang Z, Wang R, Wang K, et al. Upregulated long non-coding RNA Snhg1 promotes the angiogenesis of brain microvascular endothelial cells after oxygen-glucose deprivation treatment by

- targeting miR-199a [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(9): 909-915.
- [27] Zhao M, Wang J, Xi X, et al. SNHG12 Promotes angiogenesis following ischemic stroke via regulating miR-150/VEGF pathway [J]. *Neuroscience*, 2018, 390: 231-240.
- [28] Hu C, Bai X, Liu C, et al. Long noncoding RNA XIST participates hypoxia-induced angiogenesis in human brain microvascular endothelial cells through regulating miR-485/SOX7 axis [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(10): 6487-6497.
- [29] Shen J, Zhao Z, Shang W, et al. Fabrication of a nano polymer wrapping Meg3 ShRNA plasmid for the treatment of cerebral infarction [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(2): 894-903.
- [30] Qiu JJ, Lin XJ, Zheng TT, et al. The exosomal long noncoding RNA aHIF is upregulated in serum from patients with endometriosis and promotes angiogenesis in endometriosis [J]. *Reprod Sci*, 2019, 12(26): 1590-1602.
- [31] Lin X, Yang F, Qi X, et al. LncRNA DANCER promotes tumor growth and angiogenesis in ovarian cancer through direct targeting of miR-145 [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(12): 2286-2296.
- [32] Li W, Fu Q, Man W, et al. LncRNA OR3A4 participates in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma through modulating AGGF1/akt/mTOR pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 849: 106-114.
- [33] Wang Y, Han D, Pan L, et al. The positive feedback between lncRNA TNK2-AS1 and STAT3 enhances angiogenesis in non-small cell lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1-4): 185-192.
- [34] Zhang LM, Wang P, Liu XM, et al. LncRNA SUMO1P3 drives colon cancer growth, metastasis and angiogenesis [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5461-5472.
- [35] Yuan Z, Bian Y, Ma X, et al. LncRNA H19 knockdown in human amniotic mesenchymal stem cells suppresses angiogenesis by associating with EZH2 and activating VASH1 [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(12): 781-790.
- [36] Tang L, Yang M, Qin L, et al. Deficiency of DICER reduces the invasion ability of trophoblasts and impairs the pro-angiogenic effect of trophoblast-derived microvesicles [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 4915-4930.
- [37] Miao C, Cao H, Zhang Y, et al. LncRNA DIGIT accelerates tube formation of vascular endothelial cells by sponging miR-134 [J]. *Int Heart J*, 2018, 59(5): 1086-1095.
- [38] Yin D, Fu C, Sun D. Silence of lncRNA UCA1 represses the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through miR-195 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1499-1511.
- [39] Qin WW, Xin ZL, Wang HQ, et al. Inhibiting lncRNA ROR suppresses growth, migration and angiogenesis in microvascular endothelial cells by up-regulating miR-26 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7985-7993.
- [40] Halimulati M, Duman B, Nijati J, et al. Long noncoding RNA TCONS_00024652 regulates vascular endothelial cell proliferation and angiogenesis via microRNA21 [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3309-3316.
- [41] Hou ZH, Xu XW, Fu XY, et al. Long Non-coding RNA MALAT1 Promotes Angiogenesis and Immunosuppressive Properties of HCC Cells by sponging miR-140 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(3): 649-663.
- [42] Huang XJ, Xia Y, He GF, et al. MALAT1 promotes angiogenesis of breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(5): 2683-2689.
- [43] Gao J, Yin X, Yu X, et al. Long noncoding RNA LINC00488 functions as a ceRNA to regulate hepatocellular carcinoma cell growth and angiogenesis through miR-330-5 [J]. *Dig Liver Dis*, 2019, 51(7): 1050-1059.
- [44] Cheng Y, Dai X, Yang T, et al. Low long noncoding RNA growth arrest-specific transcript 5 expression in the exosomes of lung cancer cells promotes tumor angiogenesis [J]. *J Oncol*, 2019, 2019: 2476175.
- [45] Song J, Shu H, Zhang L, et al. Long noncoding RNA GAS5 inhibits angiogenesis and metastasis of colorectal cancer through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 22: 1-15.
- [46] Zhao J, Du P, Cui P, et al. LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/ VEGFA axis in gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2018, 37(30): 4094-4109.
- [47] Song A, Feng R, Gao J, et al. Long noncoding RNA Alu-mediated p21 transcriptional regulator promotes proliferation, migration, and pipe-formation of human microvascular endothelial cells by sponging miR-126 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(12): 19858-19867.
- [48] Zhu A, Chu L, Ma Q, et al. Long non-coding RNA H19 down-regulates miR-181a to facilitate endothelial angiogenic function [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2698-2705.
- [49] Zhu AD, Sun YY, Ma QJ, et al. lncRNA-ATB promotes viability, migration, and angiogenesis in human microvascular endothelial cells by sponging microRNA-195 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14360-14371.
- [50] Li WD, Zhou DM, Sun LL, et al. LncRNA WTAPP1 promotes migration and angiogenesis of endothelial progenitor cells via MMP1 through MicroRNA 3120 and Akt/PI3K/Autophagy pathways [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(12): 1863-1874.

[收稿日期]2020-07-22

刘鹏,王广新,苏国海.兔动脉粥样硬化模型建立方法的研究进展[J].中国比较医学杂志,2021,31(4):150-154.
Liu P, Wang GX, Su GH. Research progress of establishing atherosclerosis model in rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 150-154.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.04.022

兔动脉粥样硬化模型建立方法的研究进展

刘鹏,王广新,苏国海*

(山东第一医科大学附属中心医院心血管内科,济南 250013)

【摘要】兔与灵长类动物具有相似的进化历史,具有与人类相似的血管形态特征。另外,兔是对胆固醇超载十分敏感的动物物种,进食含高胆固醇饲料后,短时间内可形成高胆固醇血症,所以在快速、简洁地建立动脉粥样硬化(AS)模型方面,兔具有独特的优势。至今有多种建立兔AS动物模型的方法,除传统的高脂饲料喂养方法外,还包括股动脉球囊拉伤联合高脂饲料喂养以及CRISPR/Cas9基因编辑技术等新兴建模方法的出现。本文对近些年常用及新兴兔AS模型的建立方法及其优缺点进行综述。

【关键词】兔;动脉粥样硬化;高脂血症;动物模型

【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2021)04-0150-05

Research progress of establishing atherosclerosis model in rabbits

LIU Peng, WANG Guangxin, SU Guohai*

(Department of Cardiovascular Medicine, Shandong First Medical University Central Hospital, Jinan 250013, China)

【Abstract】Rabbits and primates have similar evolutionary history and vascular morphological characteristics similar to humans. In addition, rabbits are very sensitive to cholesterol overload. After eating a high cholesterol diet, hypercholesterolemia can be formed in a short time. Therefore, rabbits have unique advantages to establish atherosclerosis models rapidly and concisely. Many method establish rabbit as animal models, including the traditional high-fat diet feeding method, the femoral artery balloon injury combined with high-fat diet feeding, CRISPR/Cas9 gene editing technology and other emerging modeling method. In this paper, we review the establishment method and advantages and disadvantages of rabbit as models commonly used and emerging in recent years

【Keywords】rabbit; atherosclerosis; hyperlipidemia; animal model

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,是大多数心血管疾病的病理基础。而冠状动脉粥样硬化斑块的不稳定和破裂是发生急性冠状动脉事件和猝死的最重要原因,所以心血管疾病早已成为威胁人类健康的头号杀手^[1]。目前,AS的发生机制尚未完全阐明,为了更好地研究AS,需借助与临床相似的AS动物模型,以此来研究其

病理发生机制及诊疗等。以兔建立的AS模型,有助于进一步研究AS发病机制,也有助于研发治疗AS的新方法和新药物。

1 选择兔建立AS模型的优势及评价标准

利用动物模型来研究人类AS的机制已经有很长的历史。1908年,俄罗斯医生Ignatowski和实验

【基金项目】国家科技重大专项课题(2020ZX09201025)。

【作者简介】刘鹏,硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化。E-mail:1206014819@qq.com

【通信作者】苏国海,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:动脉粥样硬化。E-mail:suguohai65@163.com

病理学家 Anitschkow 用牛奶、肉和蛋等高胆固醇食物喂养兔子后,观察到主动脉内存在大量透明细胞(现在称为泡沫细胞)积聚的内膜损伤,这是最先建立的兔 AS 模型^[2]。历经一个多世纪的发展,越来越多的学者认为,建立一种与人类相似的实验性 AS 动物模型对 AS 的研究具有十分重要的作用。常用于构建 AS 模型的动物有小型猪、大鼠、小鼠、兔、非人灵长类动物等。兔有独特的脂质代谢系统,这有助于研究人的脂质代谢。其次,兔 AS 的病理演化,从早期病变到晚期病变与人类相似^[3]。与大鼠相比,兔具有与人类相似的脂肪蛋白特征,并表达血浆胆固醇酯转移蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)^[3]。可以增加 AS 易感性和循环游离脂肪酸,这也是兔是对胆固醇最敏感的原因^[4]。除此之外,成年兔的体重比成年大鼠重约 10 倍,因此兔子的脉管系统使得外科实验的研究成为可能。例如支架和导管等介入治疗研究^[5]中的冠状动脉插管以及结扎兔前降支结扎制备心肌梗死模型等。与猪相比,兔 AS 造模周期较短且花费较低,可选择性明显优于小型猪 AS 模型^[6]。

目前,一般选择血脂水平测定作为 AS 模型是否建立成功的指标,这些指标主要包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、极低密度脂蛋白(VLDL)等^[7]。病理形态学检查主要观察是否有内膜增厚及斑块表面纤维帽改变等。除此之外,多种成像系统(包括超声波、磁共振成像和正电子发射断层扫描)已被用于量化实验性 AS 的大小或表征病变成分。

2 用于建立 AS 模型的兔品种

目前用于建立兔 AS 模型的有日本大耳白兔、新西兰白兔、青紫蓝兔、中国本兔四个品种,均属于封闭群动物,其中,前两者常用于建立兔 AS 模型,后两者在文献中少有涉及^[8]。日本大耳兔的优点在于兔耳大,耳缘静脉血管清晰,便于重复取血及注射,如果采用小牛血清白蛋白或脂多糖等静脉注射法来建立兔 AS 模型,日本大耳兔是一种理想的实验用兔。新西兰白兔是目前用于心血管研究最常用的兔模型,与其它品系的兔相比,选育后的新西兰白兔具有生长速度快、饲料报酬高、繁殖性能优良、适应性能好、抗病力强、遗传性能稳定等特点。而青紫蓝兔和中国本兔因体型偏小、生长速度缓慢,可选择性较差。

3 兔 AS 模型的建立方法

3.1 喂养法建立兔 AS 模型

兔在脂肪代谢方面与人类有相似之处,且血浆中富含的 CETP 在 AS 发生和发展中起重要作用。兔可以在肝中只合成对外源性胆固醇加快转运的载脂蛋白 B,这就是兔可以短时间内仅通过单纯喂养高脂饲料就形成高胆固醇血症的最大优点,从而有利于兔 AS 模型的制备。

3.1.1 单纯高脂饲料喂养法兔

张梦云等^[9]选择高脂兔饲料(含 1%胆固醇,7.5%蛋黄粉,8%猪油,0.5%胆酸钠,0.1%丙硫氧嘧啶和 81%普通兔饲料)喂养 4 周后发现兔高脂喂养组 TC、LDL-C、HDL-C、VLDL 分别为对照组的 17.7、29.2、4.2、25.8 倍,病理显示 83%的兔模型存在早期 AS,证明造模成功。因为该方法造模操作过程简单,人工及外界因素干预少,而且成本相对低。近年来,有学者研究相关的非编码 RNA,均采用了单纯高脂饲养的办法进行兔 AS 造模。缺点:造模时间相对较长,一些不稳定因素容易干扰造模的结果^[10-12]。例如,兔的个体差异会影响到高脂的实际摄入量。另外,腹泻、食欲下降等个体因素可能会导致造模失败。

3.1.2 静脉注射脂多糖联合高脂饲料法

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分,也是内毒素的一种,是可以引起严重全身炎症反应的外源性物质之一,内皮细胞的损伤和 LPS 有着密切关系。而 AS 形成过程中的始动环节就是内皮细胞的损伤和功能的改变^[13]。王县委等^[14]采用静脉注射脂多糖联合高脂饲料的方法,在相同实验条件下,通过兔耳缘静脉注射不同剂量(100、200、1 000、2 000 ng/kg)的高纯级脂多糖引起发热性炎症反应,同时联合高脂饲料喂养建立兔 AS 模型。在造模的第 5 周时,血脂检测已达到高血脂水平,病理形态学显示有粥样坏死斑块形成,说明静脉注射 LPS 配合高脂饲料成功建立兔 AS 模型。Yang 等^[15]在研究药物抗动脉粥样硬化作用与降血脂、减少泡沫细胞数量和内皮细胞损伤中选择了该建模方法。这种利用炎症反应建立兔 AS 的优点在于:可以在较短时间内成功建立与人类 AS 病理形态学特点相似的兔 AS 模型,用于今后 AS 中炎症信号通路的研究。这种方法建立兔 AS 模型的缺点:容易在注射后引起兔的感染性休克,甚至导致死亡。

3.1.3 皮下注射 L-蛋氨酸法

由于高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 是 AS 形成的一个独立危险因素,因此高同型半胱氨酸所致的 AS 越来越受到重视^[16]。王晓萍等^[17]采用 L-蛋氨酸皮下注射法建立 HHcy 兔 AS 模型,结果发现 L-蛋氨酸皮下注射 80 mg/(kg·d)4 周可建立 HHcy 模型,12 周时动脉粥样硬化表现明显。本方法建立兔 AS 模型的最大优点:克服了单纯高脂喂养法建立 AS 动物模型的不稳定性及周期长的缺点,另外,相对于注射脂肪乳和 LPS,这种建立方法大大降低了因人工干预而导致的兔死亡率。整个操作过程简单,且 L-蛋氨酸相对容易获取,易于推广。皮下注射 L-蛋氨酸能建立特殊的兔 HHcy-AS 模型,对进一步探索 HHcy 与 AS 之间的联系,以及今后诊疗 AS 患者伴 HHcy 都能起到十分关键的作用。

3.1.4 静脉注射小牛血清白蛋白法

李琳等^[18]在喂养高脂饲料的基础上,喂养第 1 周初兔耳缘静脉一次性注射 250 mg/kg 的牛血清白蛋白,10 周后进行血脂水平的测定和标本的采集。结果发现模型兔 TC、TG、LDL 和 HDL 水平均明显升高,病理检查发现内膜增厚,纤维帽薄在斑块表面形成,斑块坏死,视野内平滑肌细胞稀少,呈现典型的动脉粥样硬化斑块,证明兔 AS 模型建立成功。近年来,唐云等^[19]在中医药在 AS 中的研究中均采用了此种建模方法,时间短、成活率高、模型稳定、可控性好是该方法建立 AS 模型的优点。

3.2 机械损伤建立兔 AS 模型

3.2.1 动脉球囊拉伤联合高脂喂养法

球囊拉伤加高脂饲料喂养建立颈、腹主、髂 AS 模型广泛应用于 AS 的研究,模型建立方法也日趋成熟。球囊拉伤建立过程:实验兔术前 12 h 禁食,不禁水。以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,从耳缘静脉给予肝素 200 U/kg,仰面固定^[20]。颈动脉球囊拉伤在正中切开皮肤 5.0 cm 左右,暴露右侧颈总动脉后,远心端结扎,近心端用线提起,距颈内外动脉分叉点 0.5 cm 约 45 度角 V 形剪开颈外动脉,逆行插入球囊(直径为 2.5 mm×1.0 mm)约 5 cm,再连接压力泵,注入肝素生理盐水,加压 2 个大气压,自近心端缓慢回拉,反复 3 次后撤出导管即可。股动脉拉伤是经右侧股动脉远端置入 2.5 mm×20.0 mm 球囊至股动脉近端,加压 8~10 个大气压,然后拉动球囊由近端向远端剥脱血管内皮,最后抽出球囊即可。球囊拉伤联合高脂饮食建立 AS 模型的优点:内皮细胞经外力损伤诱发的 AS 病变损伤接近于人 AS 病变的发生发展过程,易于确定损伤病变部位,方便取材,成为目前建立兔 AS 模型最常选用

的方法。缺点:血管内径与球囊内径较难匹配,兔血管直径相对较小,如多次穿刺失败容易导致血管痉挛或闭塞。

3.2.2 动脉球囊拉伤联合免疫注射法

兔的 AS 病变可以通过单独喂食高胆固醇饮食或结合动脉球囊损伤而容易诱发。与其他动物相比,兔对高胆固醇饮食敏感,可迅速发展为高胆固醇血症。张晓奇等^[21]通过超声结合病理,来评价斑块数量、大小、回声情况,以及制备病理切片,在 HE 染色及油红 O 染色下观察其组织形态学变化及脂肪浸润情况。发现高脂喂养加腹主动脉球囊拉伤术加注射小牛血清白蛋白比传统的高脂喂养加腹主动脉球囊拉伤所建立的 AS 模型,更稳定、更高效。这种方法最明显的优势在于:可以在相对短的时间内建立 AS 模型,形成腹主动脉的动脉粥样斑块。

3.2.3 机械损伤联合维生素 D 法

维生素 D 可通过损伤动脉壁来诱发 AS 形成,如平滑肌细胞增殖形成增生性纤维斑块。李跃华等^[22]运用球囊拉丝损伤腹主动脉内膜后,除每日的基础饲料外,再给实验兔每日每只加 1.5 g 胆固醇,到术后的第 11、12 周给实验兔皮下注射维生素 D50 万 IU/kg,术后 13 周取材,结果显示,皮下注射维生素 D 的实验兔 AS 病变脂质条纹面积和纤维斑块面积的百分比分别为 9.64% 和 1.56%,证明可成功建立 AS 斑块模型。机械损伤联合维生素 D 注射建立 AS 模型的优点:可以模拟人体病理状态下血管内钙化的病理生理改变,对于进一步研究药物治疗血管内钙化起到独特的优势。弊端是操作过程中,注射维生素 D 可能导致斑块内大范围、不均匀钙化,容易导致实验兔的死亡。

3.2.4 温控气体损伤与液氮冷冻损伤法

动脉粥样硬化易损斑块研究对急性心肌梗死、急性脑梗死等急性心脑血管疾病的治疗与预防都具有重要临床意义,但现今缺乏供研究的优质动物模型,但现在研究易损斑块的实验中,通常选用温控气体损伤法和液氮冷冻损伤两种办法。路怀志等^[23]利用恒定低温气体损伤兔颈动脉内膜,再结合高脂饮食 12 周后发现,温控气体损伤组取材后病理下可见薄的纤维帽,内膜有巨噬细胞及泡沫细胞浸润,斑块出现裂隙,局部小血栓形成,形成典型的易损斑块,说明利用温控气体造模可以形成 AS 模型。程卫平^[24]通过实施液氮冷冻损伤,然后饲养高脂饲料 8 周,再行液氮冻伤诱发斑块破裂试验后,病理下

发现兔子均有斑块或闭塞性血栓形成。李枚娟等^[25]等人进一步确定了兔 AS 易损斑块模型的建立方法,其优点在于:损伤血管可控,方法快速、廉价、可重复,而且大大降低了实验兔的死亡率,未来在 AS 易损斑块研究中必然起到十分重要的作用。

3.3 其它方法建立兔 AS 模型

3.3.1 空气干燥法

王琮等^[26]采用颈总动脉内膜空气干燥法建立 AS 模型,暴露右侧颈总动脉后,动脉夹夹闭血管近心端及远心端后,用 4 号头皮针沿血管长轴穿刺,生理盐水冲管后通气(120 mL/min)5 min,随后再次往管腔内注入生理盐水,松开动脉夹,按压止血。待出血停止后,缝合皮肤。4 周后实验病理结果显示颈动脉可见内膜不规则增厚,证明建模成功。上述方法建立兔 AS 模型的优点在于:可以在最短时间内、在指定部位明确预定的斑块,但是最大的缺点是:操作过程中,大大增加了实验兔的死亡率。

3.3.2 基因敲除法

兔的脂质代谢特点十分接近于人体,因兔体内低密度脂蛋白含量高,且兔的肝不能编码载脂蛋白 B48mRNA,只能合成载脂蛋白 B100,这些都成为选择建立兔 AS 基因模型的优势所在。因此选兔作为制作 ApoE^{-/-}动物 AS 模型的研究对象,也能更好地研究 Apo E 在 AS 中的作用^[27]。而利用基因编辑技术,敲除载脂蛋白 E (ApoE) 后,就可以建立稳定遗传的动物模型^[28]。现国内,袁婷婷等^[29]借助近几年新兴的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,编辑新西兰兔的 ApoE 基因,并经 PCR、TA 克隆、Sanger 测序、Western blot 和血脂检测鉴定 ApoE 靶向敲除验证,已经成功建立 F₀ 代 ApoE^{-/-}模型兔,且可稳定遗传。相对于传统的 ZENS、TALEN 等基因编辑技术,CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有操作简单、敲除效率高、多位点同时进行等优点^[30]。Yuan 等^[31]人利用多 sgRNAs 引导的 CRISPR/Cas9 系统对兔胚胎 LDLR 和 ApoE 基因进行编辑,成功建立了低密度脂蛋白受体 (LDLR) 和/或载脂蛋白 (ApoE) 基因大片段缺失的兔敲除 (KO) 模型。Lu 等^[32]利用 CRISPR/Cas9 系统编辑低密度脂蛋白受体 (LDLR) 外显子 7,成功建立了在正常饮食下自发地引起高胆固醇血症和动脉粥样硬化的 LDLR-KO 模型兔,这在将来研究 AS 以及家族性高脂血症都起到了十分重要的作用。

除了上述的基因编辑技术,渡边遗传性高胆固醇血症 (WHHL) 兔,现也常用于 AS 研究。WHHL 兔是 1973 年发现的一个突变体,现已证明,WHHL

兔体内 VLDL 残留物和 LDL 不会被肝中 LDLR 缺陷的肝细胞摄取,因此 WHHL 兔体内保持 LDL 等脂蛋白形式存在的高水平血浆胆固醇血症,且该品系相比日本大白兔的血清胆固醇和甘油三酯水平,升高约 8~14 倍,除此之外,通过近亲交配可以持续传代高脂血症性状的品系。随着科学的进步,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑建立的 LDLR-KO 以及 WHHL 兔会越来越多的应用到 AS 疾病研究中,将会在心脑血管疾病研究中大放光彩。

4 展望

目前可用于建立 AS 模型的动物主要有兔、鼠、猪和猴等,但没有任何一种动物模型是完美的。兔是草食性动物,因此通过高脂饲养形成的 AS 斑块纤维帽、脂质坏死核心等典型病理变化与人体存在一定的差异。但是凭借着对外源性胆固醇较高的吸收率,以及对高脂血症的较低清除力,学者们依旧偏向于选兔来建立 AS 模型。多年来,国内外报道了很多兔 AS 模型的建立方法,但大多数都是建立在高脂喂养和机械损伤的基础上。除此之外,还有静脉注射维生素 D、小牛血清白蛋白等方法。机械损伤联合高脂喂养建立 AS 模型虽然应用广泛,但可能会出现黄瘤病样斑块等问题。

随着基因编辑技术的崛起,相比鼠更接近与人类亲缘关系(基于 DNA 序列分析)的兔,相信也会越来越多的应用生物医学领域中。像 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术的慢慢兴起,可以对兔基因组进行更有效和精确的编辑,以复制人类疾病建立模型,加快心脑血管等疾病的研究,应用前景也更加广阔。

AS 的发病机制和病理生理尚未完全阐明,将动物模型的研究应用推广到人类自身仍有许多困难。人体 AS 斑块形成绝非炎症刺激、自身免疫反应等任何一种单一因素所导致。未来精准医学的道路上,应将遗传、饮食、外界刺激等影响因素结合起来,建立最接近人体病理生理演变的兔 AS 模型,并将兔 AS 模型建立与临床药物试验和治疗有机结合,才能对人类 AS 研究奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Bos D, Arshi B, van den Bouwhuisen QJA, et al. Atherosclerotic carotid plaque composition and incident stroke and coronary events [J]. J Am Coll Cardiol, 2021, 77(11): 1426-3145.
- [2] Fan J, Chen Y, Yan H, et al. Principles and applications of rabbit models for atherosclerosis research [J]. J Atheroscler Thromb, 2018, 25(3): 213-220.

- [3] Ference BA, Kastelein JJP, Ginsberg HN, et al. Association of genetic variants related to cetyl esters and statins with lipoprotein levels and cardiovascular risk [J]. JAMA, 2017, 318(10): 947-956.
- [4] Petheo GL, Kerekes A, Mihalfy M, et al. Disruption of the NADPH Oxidase 5 gene aggravates atherosclerosis in rabbits [J]. Circ Res, 2021, 120: 318611.
- [5] Kokozidou M, Katsargyris A, Verhoeven ELG, et al. Vascular access animal models used in research [J]. Ann Anat, 2019, 225: 65-75.
- [6] Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause: workshop report [J]. Menopause, 2000, 7(1): 14-24.
- [7] Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine [J]. Pharmacol Ther, 2015, 146: 104-119.
- [8] 曹媛, 贾连群, 宋囡, 等. 基于 PCR Array 技术探讨化痰祛瘀方对 AS 家兔小肠组织线粒体能量代谢相关基因的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(9): 4376-4379.
- [9] 张梦云, 严光, 方文祥, 等. 高脂饲养兔和豚鼠建立动脉粥样硬化模型比较 [J]. 中国临床保健杂志, 2015, 18(5): 503-506, 561.
- [10] Zhang F, Zhang R, Zhang X, et al. Comprehensive analysis of circRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of atherosclerosis in rabbits [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(9): 2266-2283.
- [11] Baumgartner C, Brandl J, Munch G, et al. Rabbit models to study atherosclerosis and its complications - Transgenic vascular protein expression *in vivo* [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2016, 121(2): 131-141.
- [12] Chung DJ, Wu YL, Yang MY, et al. Nelumbo nucifera leaf polyphenol extract and gallic acid inhibit TNF- α -induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration involving the regulation of miR-21, miR-143 and miR-145 [J]. Food Funct, 2020, 11(10): 8602-8611.
- [13] Yao Y, Li B, Liu C, et al. Reduced plasma kallistatin is associated with the severity of coronary artery disease, and kallistatin treatment attenuates atherosclerotic plaque formation in mice [J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(21): e009562.
- [14] 王县委, 桑文凤, 裴强, 等. 静脉注射脂多糖联合高脂饲料建立兔动脉粥样硬化模型 [J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(12): 948-950, 954.
- [15] Yang JX, Wu S, Huang XL, et al. Hypolipidemic activity and antiatherosclerotic effect of polysaccharide of polygonatum sibiricum in rabbit model and related cellular mechanisms [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 391065.
- [16] McCully KS. Homocysteine metabolism, atherosclerosis, and diseases of aging [J]. Compr Physiol, 2015, 6(1): 471-505.
- [17] 王晓萍, 周明旺, 颜春鲁, 等. 高同型半胱氨酸血症兔致动脉粥样硬化的实验研究 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46(12): 59-62.
- [18] 李琳, 窦健霖, 楚天舒, 等. 高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3690-3693.
- [19] 唐云, 张建影, 易琼, 等. 心痛泰对动脉粥样硬化兔血清 IL-1, TNF- α 及主动脉 MPO 表达的影响 [J]. 中医药导报, 2020, 26(14): 13-16.
- [20] 王萧, 董浩然, 麦细焕, 等. 主动脉瓣关闭不全法建立新西兰兔心衰模型 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 127-131.
- [21] 张晓奇, 孙月, 杨寒凝, 等. 超声结合病理评估多种制备兔腹主动脉粥样硬化斑块模型方法 [J]. 中国超声医学杂志, 2020, 36(1): 73-76.
- [22] 李跃华, 陆建平, 张亚明, 等. 兔动脉粥样硬化模型的建立及其 MR 检测 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2006, 4(1): 34-35, 51, 65.
- [23] 路怀志, 杜大勇, 柳杨, 等. 温控气体损伤建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(2): 132-136.
- [24] 程卫平. 兔颈动脉内膜剥脱术后动脉内膜修复的实验研究 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2014.
- [25] 李枚娟, 林杉懿, 王预立, 等. 应用液氮损伤建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型的研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2020, 12(3): 343-345.
- [26] 王琮, 陈筱雪, 杨少玲, 等. 套环法和空气干燥法建立兔颈动脉粥样硬化斑块模型的比较分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(3): 208-212.
- [27] Plazyo O, Hao W, Jin JP. The absence of calponin 2 in rabbits suggests caution in choosing animal models [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 42.
- [28] Yang D, Xu J, Zhu T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases [J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(1): 97-99.
- [29] 袁婷婷, 周敏雅, 卢瑶瑶, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术制备 ApoE^{-/-}兔 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(7): 658-665.
- [30] Song Y, Sui T, Zhang Y, et al. Genetic deletion of a short fragment of glucokinase in rabbit by CRISPR/Cas9 leading to hyperglycemia and other typical features seen in MODY-2 [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(16): 3265-3277.
- [31] Yuan T, Zhong Y, Wang Y, et al. Generation of hyperlipidemic rabbit models using multiple sgRNAs targeted CRISPR/Cas9 gene editing system [J]. Lipids Health Dis, 2019, 18(1): 69.
- [32] Lu R, Yuan T, Wang Y, et al. Spontaneous severe hypercholesterolemia and atherosclerosis lesions in rabbits with deficiency of low-density lipoprotein receptor (LDLR) on exon 7 [J]. EBioMedicine, 2018, 36: 29-38.

[收稿日期] 2020-09-09