

刘名,王蔚,侯玉明,等. 齿科研磨粉尘致大鼠肺组织损伤的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 1-8.  
Liu M, Wang W, Hou YM, et al. Experimental study on lung tissue injury induced by dental grinding dust in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 1-8.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.001

# 齿科研磨粉尘致大鼠肺组织损伤的实验研究

刘名<sup>1</sup>, 王蔚<sup>1\*</sup>, 侯玉明<sup>2</sup>, 艾红军<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学口腔医学院 附属口腔医院, 辽宁省口腔疾病重点实验室, 沈阳 110002;  
2. 绍兴市中心医院, 浙江 绍兴 312000)

**【摘要】** 目的 评价钴铬钼金属(商品名:维他灵)、二氧化锆瓷、聚甲基丙烯酸甲酯树脂三种齿科研磨粉尘对大鼠肺组织损伤的影响。**方法** 应用扫描电镜及激光粒度分析仪检测三种齿科粉尘的表面形态及粒径大小,并建立大鼠染尘动物模型;用吉姆萨染色及酶联免疫吸附测定法检测大鼠支气管肺泡灌洗液中白细胞总数、巨噬细胞数及白细胞介素-6及白细胞介素-16的含量;应用HE染色观察肺组织切片病理学变化。**结果** 三种齿科研磨粉尘颗粒的表面形态及粒径分布不同,精细研磨后粉尘粒径明显变小;与对照组相比,各染尘组白细胞数、巨噬细胞数以及白细胞介素-6、白细胞介素-16含量均明显增加,大鼠肺组织炎细胞浸润明显,肺组织结构破坏并纤维化;与未精细研磨组相比,维他灵及二氧化锆粉尘精细研磨组炎症细胞及炎症因子增加明显。**结论** 三种齿科粉尘研磨前后,均能引起染尘大鼠肺组织炎性损伤及早期纤维化改变,且维他灵及二氧化锆粉尘精细研磨后较研磨前,对大鼠肺组织炎性损伤增强。

**【关键词】** 齿科研磨粉;大鼠;肺组织损伤

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)07-0001-08

## Experimental study on lung tissue injury induced by dental grinding dust in rats

LIU Ming<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1\*</sup>, HOU Yuming<sup>2</sup>, AI Hongjun<sup>1</sup>

(1. School and Hospital of Stomatology, China Medical University, Liaoning Provincial Key Laboratory of Oral Diseases, Shenyang 110002, China. 2. Shaoxing Central Hospital, Shaoxing 312000)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effects of vitallium metal, ZrO<sub>2</sub> ceramic and PMMA resin grinding dust on rat lung tissue. **Methods** The surface morphology and particle size distribution of three kinds of dental grinding dust were detected using a scanning electron microscope and laser particle size analyzer. Following exposure of established animal models to the above grinding dust, the total number of white blood cells and macrophages and the interleukin IL-6 and IL-16 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid were detected by Giemsa staining and enzyme-linked immunosorbent assay; HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue slices. **Results** Compared with the control group, the number of white blood cells and macrophages and the IL-6 and IL-16 concentrations in the dust-exposed groups were significantly increased, the infiltration of inflammatory cells was more obvious, and the lung tissue was structurally damaged and fibrotic. Compared with the non-finely ground group, the inflammatory cells and factors in the finely ground

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81970980);辽宁省高等学校基本科研项目(LFWK201717);中国医科大学“十三五”第二批医学教育科学研究立项课题(YDJK2018017);辽宁省重点研究计划指导计划项目(2018225078);辽宁省自然科学基金指导项目(2019-ZD-0749);沈阳市重大科技创新研发计划(19-112-4-027)。

**【作者简介】** 刘名(1989—),女,硕士研究生,研究方向:口腔修复临床。E-mail:308782160@qq.com

**【通信作者】** 王蔚(1975—),女,博士研究生,研究方向:口腔生物材料的研发。E-mail:wwang75@cmu.edu.cn

groups of vitallium metal and  $ZrO_2$  ceramic were significantly increased. **Conclusions** Three kinds of dental grinding dusts can cause inflammatory injury and early fibrosis of rat lung tissue, and vitallium and  $ZrO_2$  dusts after fine grinding exacerbate the inflammatory damage compared with the group of non-fine grinding.

**【Keywords】** dental grinding dust; rat; lung tissue injury

近年来粉尘污染越来越引起人们的关注,长期接触粉尘的作业人员,当吸入的粉尘量达到一定数量时即可引发尘肺病、鼻炎、咽炎、支气管炎、皮疹、眼结膜损害等<sup>[1-2]</sup>。粉尘污染同时也存在于口腔行业,诊疗过程中牙体组织的切除、修复材料的调磨,气枪、水枪、高速手机及低速手机产生的气雾、飞沫、尘埃等均会对周围环境造成污染<sup>[3]</sup>。

钴铬钼合金(商品名:维他灵 Vitallium)、二氧化锆( $ZrO_2$ )全瓷、PMMA (polymethyl methacrylate)树脂等修复材料在口腔领域广泛应用,Vitallium 主要应用于可摘局部义齿金属支架, $ZrO_2$  全瓷主要应用于单冠、嵌体冠及固定桥的修复,而 PMMA 树脂为全口义齿及基托的重要组成部分,修复体材料在制作及调磨过程中会产生不同形状及大小的粉尘。Vitallium 粉尘颗粒主要由钴、铬、钼、铁组成,其中钴铬钼的合金含量高达 97% 以上,研究表明,长期的钴铬钼暴露会引起以化痰、流涕为主的呼吸道疾病及肺组织损伤甚至肺纤维化<sup>[4-6]</sup>。 $ZrO_2$  组粉尘颗粒的主要元素为硅、氧、钾、铝、钠,主要成分为二氧化硅,长期吸入二氧化硅粉尘会引起肺部组织的慢性疾病,有研究表明口腔修复诊室中饰面瓷粉尘的时间加权平均容许浓度为  $0.393 \text{ mg}/\text{m}^3$ ,超出国家安全范围<sup>[2]</sup>;且已有齿科二氧化硅致矽肺、肺部多发性肉芽肿伴淀粉样沉积的病例报道<sup>[7-9]</sup>。PMMA 组的粉尘颗粒主要元素为碳和氧,为有机粉尘,长期暴露于 PMMA 环境下可导致机体产生皮肤炎症、刺激眼睛或粘膜、过敏性皮炎、哮喘、中枢和周围神经系统疾病及过敏性肺炎等呼吸系统损伤<sup>[10-12]</sup>。

目前关于齿科研磨粉尘对健康影响的研究多局限于病例报道及流行病学调查,针对口腔修复诊室,调磨、修改义齿过程中产生的粉尘污染问题研究较少,尚缺乏建立统一的动物模型进行系统的定性定量的分析研究,本研究使用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)及激光粒度分析仪(particulate size description analyser, PSDA)作为检测手段分析齿科研磨粉尘及精细研磨粉尘颗粒的表面形态及粒径大小,通过非暴露式气管染尘法建立齿科粉尘大鼠染尘模型,用吉姆萨染色(Giemsa)

及酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测染尘大鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中炎症细胞的数量变化及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),白细胞介素-16(interleukin-16, IL-16)水平的变化,同时应用 HE 染色观察肺组织切片病理改变,旨在探讨齿科粉尘对大鼠肺组织是否产生潜在影响,为今后进一步研究齿科粉尘暴露对机体健康影响提供理论基础,同时也为齿科临床防尘保护提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,8 周龄,63 只,体重( $250 \pm 10$ ) g,由沈阳陆军总院实验动物中心提供[SCXK(辽)2015-0001],饲养于沈阳陆军总院实验动物中心[SYXK(辽)2018-0008],实验研究过程遵守“3R”原则,并通过沈阳军区总医院实验动物伦理委员会伦理审查(2015 042)。

### 1.2 主要试剂与仪器

甲苯(国药公司,中国);苏木精(国药公司,中国);曙红 Y,醇溶(国药公司,中国);大鼠白介素酶联免疫分析试剂盒(上海卧宏,中国)。II 型自凝模型粉及义齿基托树脂液剂(上海珊瑚齿科材料有限公司,中国);Vitallium 金属(登氏柏公司,美国); $ZrO_2$  体瓷(VITA 公司,德国);SSX-550 扫描电子显微镜(岛津公司,日本);电子显微镜(LUMPUS 公司,日本);能量分散光谱仪(岛津公司,日本);Master sizer Macro 激光粒度分析仪(Malvern 公司,英国); $-30^\circ\text{C}$  恒冷低温切片机(Cleica,德国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 齿科研磨粉尘的制备

将 Vitallium 金属、 $ZrO_2$  体瓷、PMMA 树脂制备成  $14 \text{ mm} \times 14 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$  的实验模块,用金刚砂车针调磨处理,收集调磨后的粉尘颗粒各 10 g,平均分为两组,随机选取其中一组粉尘,分别在玛瑙研钵中研磨 2 h 致粉尘颗粒变小。

#### 1.3.2 扫描电子显微镜观察

取齿科研磨粉尘颗粒各样本,分别固定于载物台上真空中喷镀金膜,应用 SEM 对各组样本进行观

察检测。

### 1.3.3 激光粒度分析仪检测

取齿科研磨粉尘颗粒各样本,分别置于激光粒度分析仪的样品槽内,在网兜处加入钢球后进行 PSDA 测量分析。

### 1.3.4 实验动物分组

将大鼠随机分成 7 组,每组又分为三个时间点共 9 只:对照组(N,不染尘,生理盐水组)、实验组齿科材料颗粒未研磨 PMMA 组(A1)、未研磨 Vitallium 组(B1)、未研磨 ZrO<sub>2</sub> 组(C1)、和精细研磨 PMMA 组(A2)、精细研磨 Vitallium 组(B2)、精细研磨 ZrO<sub>2</sub> 组(C2),每组的实验周期均为 3 周、6 周、12 周。

### 1.3.5 实验大鼠非暴露式气管染尘

将未研磨组与精细研磨组粉尘,分别溶于生理盐水中配成浓度 5 g/100 mL 悬液,高温高压灭菌,加入 800000 U 青霉素备用。将大鼠麻醉、固定、气管插管,插入穿刺针至主支气管上方约 1 cm 处,回抽注射器可见气泡且回抽时无阻力,确认已插入气管内,将 1 mL 实验组悬液及对照组不染尘生理盐水分别打进大鼠双肺中,染尘后的大鼠,应尽快从染尘架上取下来,并给予心肺复苏。

### 1.3.6 实验大鼠肺泡灌洗液收集及细胞计数

分别于术后 3 周、6 周、12 周,大鼠进行麻醉处死,分离气管至肺组织完全暴露,在气管离心端做一横行切口,用注射器吸取 2 mL 预冷的生理盐水,通过导管以较小的压力将盐水缓慢注入肺内,见肺逐渐膨隆、苍白,立即缓慢回抽灌洗液,再将所得液体缓缓注回肺内,反复 2 次,置于离心管中冷冻离心 2000 r/min 10 min,分离上清液和细胞,使用 0.1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞,吹匀后,吸取 10 μL 细胞悬液,滴加在细胞计数板上,显微镜下行白细胞总数计数;另吸取 10 μL 细胞悬液,制成细胞涂片,甲醇固定后进行 Giemsa 液染色,显微镜下观察细胞形态,并进行细胞分类计数。

### 1.3.7 ELISA 检测肺泡灌洗液中 IL-6、IL-16 浓度

按照 ELISA 试剂盒说明书,依次梯度稀释标准品蛋白,并进行加样、温育、洗涤、加酶、再次温育、洗涤、显色、终止,最后在 450 nm 波长测定各孔吸光度(OD 值),并用空白孔调零,以标准品的浓度为横坐标,调零后的 OD 值为纵坐标,绘制标准曲线,由标准曲线计算出待测样品浓度。

### 1.3.8 肺组织 HE 染色

打开大鼠胸腔,将大鼠全肺取出将肺剔除气

管、支气管结缔组织及心脏,在生理盐水中漂洗 1 次,用滤纸吸干。将整个肺用 10% 中性缓冲福尔马林液固定,石蜡包埋,切片厚度为 5 μm,HE 染色,普通光镜下观察肺组织病理变化。

## 1.4 统计学方法

实验数据应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,数据以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。

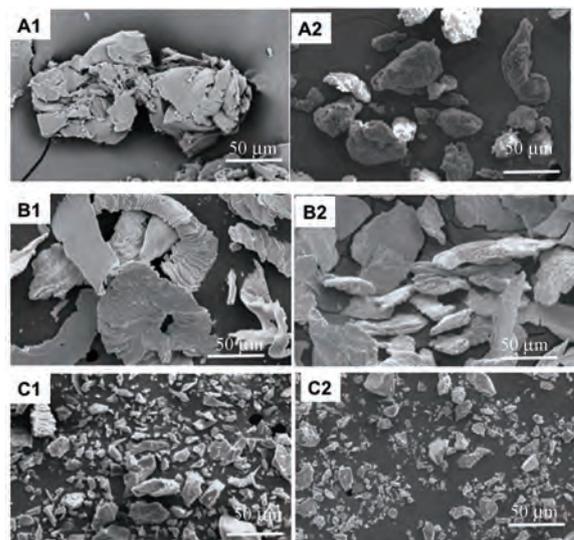
## 2 结果

### 2.1 SEM 观察结果

六组不同齿科粉尘颗粒的表面形态有明显差异(图 1),PMMA 组(图 1A1、A2)颗粒呈团块状,大小不一,尺寸相差较大,表面形态不规则;Vitallium 组(图 1B1、B2)颗粒较大,形状不规则,呈薄片状、卷曲波纹状结构;ZrO<sub>2</sub> 组(图 1C1、C2)粉尘颗粒相对较小,边缘锐利,呈团块状不规则结构。精细研磨后粉尘颗粒明显变小,除 PMMA 精细研磨组(图 1A2)粉尘表面圆钝外其余两组形态无明显改变。

### 2.2 激光粒度分析结果

三组不同齿科材料及精细研磨后粉尘颗粒的



注:A1: PMMA 未研磨组; A2: PMMA 精细研磨组; B1: Vitallium 未研磨组; B2: Vitallium 精细研磨组; C1: ZrO<sub>2</sub> 未研磨组; C2: ZrO<sub>2</sub> 精细研磨组。

图 1 齿科材料研磨粉尘颗粒的 SEM 观察

Note. A1, PMMA non-grinding group. A2, PMMA fine grinding group. B1, Vitallium non-grinding group. B2, Vitallium fine grinding group. C1, ZrO<sub>2</sub> non-grinding group. C2, ZrO<sub>2</sub> fine grinding group.

Figure 1 SEM observation of dental dust particles

粒径分布结果(表 1、图 2),三种齿科研磨粉尘的粒径分布均不同,且分布范围较为广泛,精细研磨后粉尘粒径不同程度减小。

### 2.3 支气管肺泡灌洗液的炎症细胞染色图片及计数

#### 2.3.1 大鼠 BALF 中炎症细胞 Giemsa 染色图片

如图 3 所示,红色箭头所示为中性粒细胞,其特点为细胞圆形,胞浆粉红色,核形不一,细胞核常染成深紫红色;绿色箭头所示为巨噬细胞,其特点为胞体圆形,胞质疏松、淡染,呈淡蓝色;黄色箭头所示为淋巴细胞,其特点为细胞核占细胞体积大且致

表 1 未研磨及精细研磨后粉尘颗粒的粒径分布(%)

Table 1 Particle size distribution of non-grinding dust and fine grinding dust

分组 Groups	<1.95 $\mu\text{m}$	1.95~ 4.88 $\mu\text{m}$	4.88~ 10.48 $\mu\text{m}$	10.48~ 30.53 $\mu\text{m}$	>30.53 $\mu\text{m}$
A1	2.95	1.24	1.57	16.22	78.02
A2	4.50	3.73	4.30	15.65	71.82
B1	0.00	0.08	0.62	10.17	89.13
B2	0.00	1.03	2.37	11.77	84.83
C1	4.16	8.63	12.74	31.30	43.17
C2	13.85	7.20	21.25	31.45	16.25

注:A1:PMMA 未研磨组;A2:PMMA 精细研磨组;B1:Vitallium 未研磨组;B2:Vitallium 精细研磨组;C1:ZrO<sub>2</sub> 未研磨组;C2:ZrO<sub>2</sub> 精细研磨组。

Note. A1, PMMA non-grinding group. A2, PMMA fine grinding group. B1, Vitallium non-grinding group. B2, Vitallium fine grinding group. C1, ZrO<sub>2</sub> non-grinding group. C2, ZrO<sub>2</sub> fine grinding group.

密,胞浆极少,常染成深蓝色至蓝色。与不染尘生理盐水的对照组相比,未研磨及精细研磨染尘组在 3 周、6 周、12 周的 BALF 中白细胞总数均明显增高,且随染尘时间的延长,细胞数量的增加越明显。

#### 2.3.2 大鼠 BALF 中白细胞总数的改变

将 Giemsa 染色结果进行白细胞总数计数后,如图 4 所示,与不染尘生理盐水的对照组比,未研磨及精细研磨染尘组在 3 周、6 周、12 周的 BALF 中白细胞总数均明显增高,并具有统计学意义( $P<0.05$ ),且随染尘时间的延长,细胞数量的增加越明显;与未研磨组比,从第 6 周起,除 12 周 C2 组外其余各精细研磨组白细胞数量均明显高于未研磨组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

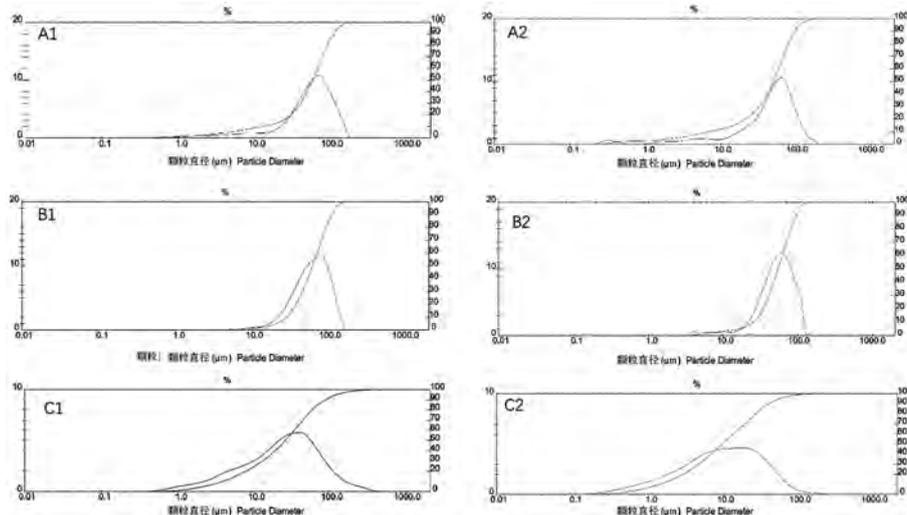
#### 2.3.3 大鼠 BALF 中巨噬细胞数量改变

将 Giemsa 染色结果进行巨噬细胞计数后,如图 5 所示,与对照组相比,研磨及精细研磨染尘组在 3 周、6 周、12 周的 BALF 中巨噬细胞数量明显增高,并具有统计学意义( $P<0.05$ );与未研磨组相比,从第 6 周开始,除 12 周 C2 组外其余各精细研磨组巨噬细胞数量均明显高于未研磨组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.4 支气管肺泡灌洗液中 IL-6、IL-16 含量

#### 2.4.1 大鼠 BALF 中 IL-6 含量

如图 6 所示,与对照组相比,染尘组 BALF 中

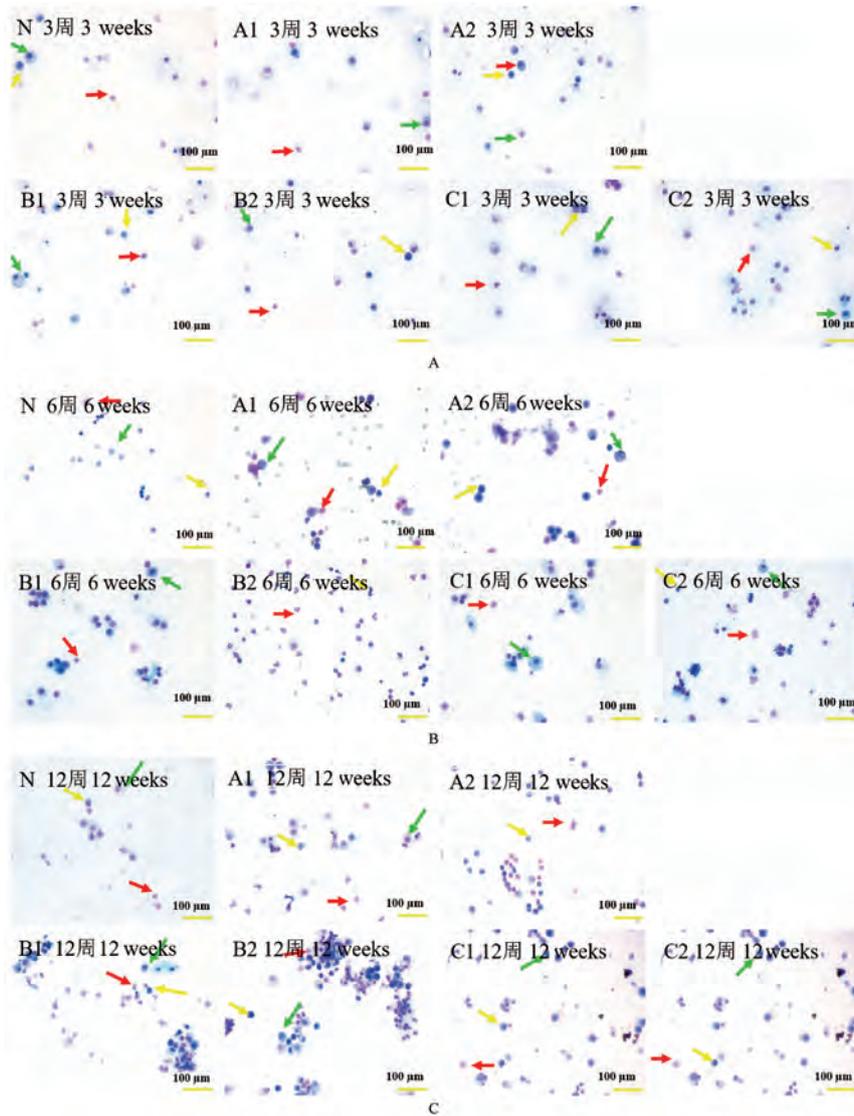


注:A1:PMMA 未研磨组;A2:PMMA 精细研磨组;B1:Vitallium 未研磨组;B2:Vitallium 精细研磨组;C1:ZrO<sub>2</sub> 未研磨组;C2:ZrO<sub>2</sub> 精细研磨组。

图 2 未研磨及精细研磨后粉尘颗粒的粒径分布曲线

Note. A1, PMMA non-grinding group. A2, PMMA fine grinding group. B1, Vitallium non-grinding group. B2, Vitallium fine grinding group. C1, ZrO<sub>2</sub> non-grinding group. C2, ZrO<sub>2</sub> fine grinding group.

Figure 2 Particle size distribution curves of non-grinding dust and fine grinding dust



注: N: 对照组; A1: PMMA 未研磨组; A2: PMMA 精细研磨组; B1: Vitallium 未研磨组; B2: Vitallium 精细研磨组; C1: ZrO<sub>2</sub> 未研磨组; C2: ZrO<sub>2</sub> 精细研磨组。红色箭头: 中性粒细胞; 绿色箭头: 巨噬细胞; 黄色箭头: 淋巴细胞。

图 3 不同观察时点各染尘组及对照组 Giemsa 染色图

Note. N, Control group. A1, PMMA non-grinding group. A2, PMMA fine grinding group. B1, Vitallium non-grinding group. B2, Vitallium fine grinding group. C1, ZrO<sub>2</sub> non-grinding group. C2, ZrO<sub>2</sub> fine grinding group. Red arrow, Neutrophil. Green arrow, macrophage. Yellow arrow, lymphocyte.

Figure 3 Giemsa staining in dust exposed group and control group at different observation time points

IL-6 含量均增高, 12 周时明显增高, 除 6 周 A1, A2 组外, 其余组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与未研磨组相比, 精细研磨组在各时间点 BALF 中 IL-6 含量均增高, 12 周时 B2 组相比于 B1 组, C2 组相比于 C1 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.4.2 大鼠 BALF 中 IL-16 含量

如图 7 所示, 与对照组相比, 染尘组 BALF 中 IL-16 含量均增高, 除 6 周 A1, A2 组外, 其余组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与未研磨组相比, 精细研磨组在各时间点 BALF 中 IL-16 含量均增高, 12

周时 B2 组相比于 B1 组, C2 组相比于 C1 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

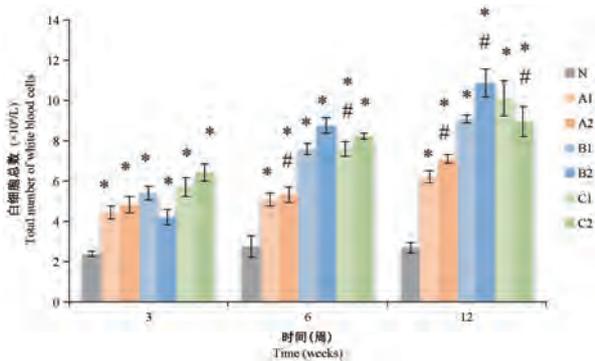
#### 2.5 肺组织切片病理变化

HE 染色结果如图 8 所示, 对照组 (图 8A) 肺组织 3 周时有少量炎细胞浸润, 结构无明显改变, 6 周及 12 周肺组织结构完整, 清晰, 肺泡壁连续。而各染尘组 (图 8B、8C、8D) 3 周时可见少量炎细胞浸润, 6 周炎细胞浸润增多, 肺泡间隔增宽, 肺泡壁被破坏, 12 周肺组织破坏明显, 肺泡结构紊乱, 肺泡腔及间质内大量炎性细胞浸润, 纤维化形成; 其中, C2

组在 6 周即出现纤维样改变。

### 3 讨论

不同粒径的粉尘引发的机体生物学毒性差异显著,粉尘粒径大小决定了其在人体呼吸系统内沉积的位置及对人体健康的危害程度<sup>[13-14]</sup>。研究表明,大于 10  $\mu\text{m}$  的粉尘可沉积在鼻咽和气管支气管的呼吸道区域,10~0.1  $\mu\text{m}$  的粉尘有 90% 可沉积于人体呼吸道和肺泡上,5~0.5  $\mu\text{m}$  的粉尘沉积率随粒径的减小而逐渐降低,而 0.4  $\mu\text{m}$  以下的粉尘随



注:N:对照组;A1:PMMA 未研磨组;A2:PMMA 精细研磨组;B1:Vitallium 未研磨组;B2:Vitallium 精细研磨组;C1:ZrO<sub>2</sub> 未研磨组;C2:ZrO<sub>2</sub> 精细研磨组。各实验组与对照组比较,\* $P<0.05$ ;精细研磨组与未研磨组比较,# $P<0.05$ 。下图同。

图 4 各组大鼠 BALF 白细胞总数变化情况

Note. N, Control group. A1, PMMA non-grinding group. A2, PMMA fine grinding group. B1, Vitallium non-grinding group. B2, Vitallium fine grinding group. C1, ZrO<sub>2</sub> non-grinding group. C2, ZrO<sub>2</sub> fine grinding group. Dust group compared with the control group, \* $P<0.05$ . Fine grinding group compared with the non grinding group, # $P<0.05$ . The same as below.

Figure 4 Total number of white blood cells in BALF of rats in each group

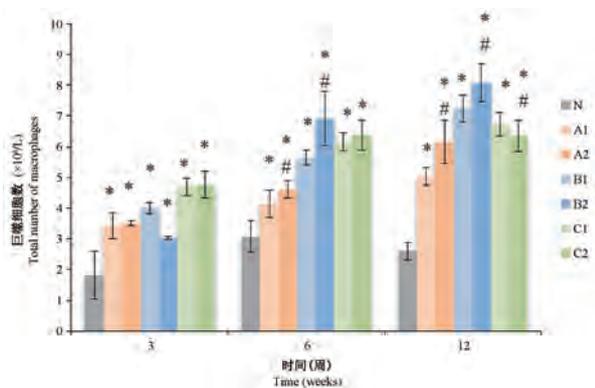


图 5 各组大鼠 BALF 巨噬细胞总数变化情况

Figure 5 Total number of macrophages in BALF of rats in each group

粒径减小沉积率增大,其中粒径小于 2.5  $\mu\text{m}$  的粉尘主要沉积在肺泡,更易导致机体的损伤<sup>[15-16]</sup>。鉴于粉尘收集过程中环境无法达到绝对密闭,打磨过程中产生的小粒径粉尘,易悬浮在空气中无法收集,且悬浮于空气中的小粒径粉尘颗粒更易被吸入,故本实验采用研磨精细研磨收集的粉尘,以模拟临床上产生的小粒径粉尘,本实验结果也表明,精细研磨后 Vitallium 及 ZrO<sub>2</sub> 粉尘较研磨前,对大鼠肺组织炎性损伤更强。

中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等炎症细胞的迁移和活化为肺部损伤的主要炎症性免疫反应,支气管肺泡灌洗液中粒细胞的增多,被认为与肺纤维化密切相关,它的大量出现是肺细胞损伤的标志<sup>[17-19]</sup>,巨噬细胞是粉尘作用的主要靶细胞,巨噬细胞的活跃在肺损伤以及纤维化过程中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。本实验中大鼠染尘后白细胞及巨噬细胞数量高于对照组( $P<0.05$ ),除了 12 周 C2 组外,从 6 周开始精细研磨组的白细胞及巨噬细胞含量均高于未研磨组,其中 12 周 B2 组炎症反应最为明显,说明 Vitallium 粉尘研磨后致炎作用更强,而 C2 组白

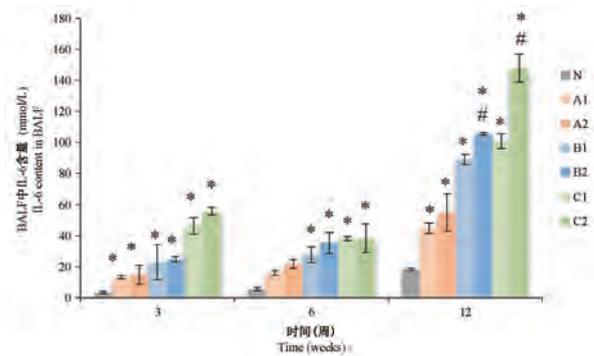


图 6 各组大鼠 BALF 中 IL-6 含量

Figure 6 IL-6 content in BALF of rats in each group

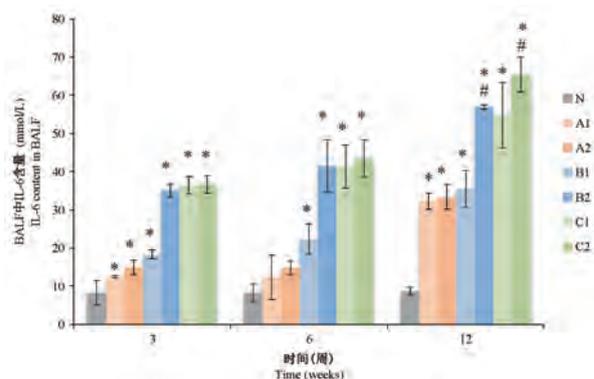
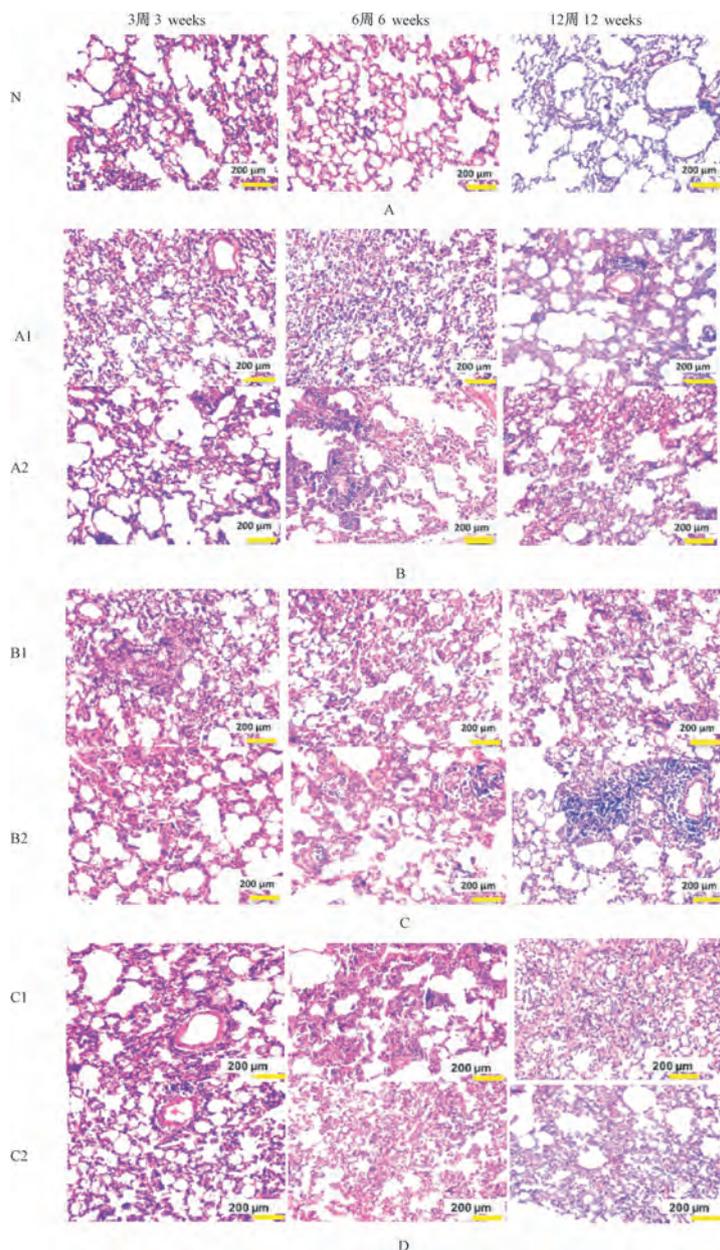


图 7 各组大鼠 BALF 中 IL-16 含量

Figure 7 IL-16 content in BALF of rats in each group



注:A:N:对照组;B:A1:PMMA 未研磨组;A2:PMMA 精细研磨组;C:B1:Vitallium 未研磨组;B2: Vitallium 精细研磨组;D:C1:ZrO<sub>2</sub> 未研磨组;C2:ZrO<sub>2</sub> 精细研磨组。

图 8 不同观察时点各染尘组及对照组肺组织变化

Note. A, N, Control group. B, A1, PMMA non-grinding group. A2, PMMA fine grinding group. C, B1, Vitallium non-grinding group. B2, Vitallium fine grinding group. D, C1, ZrO<sub>2</sub> non-grinding group. C2, ZrO<sub>2</sub> fine grinding group.

Figure 8 Changes of lung tissue in dust exposed group and control group at different observation time points

细胞及巨噬细胞数量在 6 周时明显高于 C1 组,但 12 周时低于 C1 组,表明 C2 组染尘后期炎细胞表达有所降低,可能与其早期就有纤维化的形成有关,本实验结果与 HE 染色中 C2 组(图 7)在早期就观察到纤维组织形成结果一致,并提示精细研磨后 ZrO<sub>2</sub> 粉尘对大鼠肺组织早期炎性作用明显。

随着炎症的发展,巨噬细胞吞噬粉尘颗粒,细胞活化并产生大量炎性因子,白介素作为一种重要

的细胞因子,在调控尘肺炎症和纤维化过程中发挥了重要的作用,其中 IL-6 能促使黏附分子浸润到肺中,诱导胶原的合成,抑制胶原的降解<sup>[21]</sup>,研究发现,细胞因子 IL-6 在患有肺纤维化的小鼠和人类中明显升高<sup>[22]</sup>,IL-6 等促炎细胞因子的增加以及中性粒细胞内流是肺囊性纤维化炎症的显著早期特征<sup>[23]</sup>。IL-16 又称淋巴细胞趋化因子,Zhou 等<sup>[24]</sup>发现 IL-16 在小鼠肺损伤及纤维化过程中明显增高,

Glass 等<sup>[25]</sup>发现,在博来霉素引起的大鼠肺纤维化中 IL-16 发挥了重要作用,可以作为一种肺纤维化的候选指标。本实验中染尘大鼠 BALF 中 IL-6 与 IL-16 含量变化趋势一致,各染尘组 12 周 IL-6 与 IL-16 的含量较 3 周、6 周时增加更明显,可能与 12 周时,肺组织结构逐渐纤维化有关<sup>[23-25]</sup>,IL-6 与 IL-16 的变化说明 3 种齿科粉尘对大鼠肺组织均有损伤,可导致大鼠早期肺炎反应及早期纤维化改变,与 HE 染色结果相符。12 周时 Vitallium 及 ZrO<sub>2</sub> 粉尘精细研磨组与未研磨组相比,IL-6 与 IL-16 含量存在统计学差异,说明 Vitallium 及 ZrO<sub>2</sub> 粉尘经精细研磨后对大鼠肺组织的损伤作用及早期纤维化作用增强。

综上所述,Vitallium 金属、ZrO<sub>2</sub> 全瓷、PMMA 树脂 3 种齿科粉尘研磨前后,均能引起染尘大鼠肺组织炎性损伤,齿科临床医师长期暴露于齿科粉尘颗粒环境下可能会引起肺组织炎症甚至损伤,金属及瓷粉粉尘粒径越小其致病力可能越强,具体损伤机制及程度,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Laney AS, Weissman DN. Respiratory diseases caused by coal mine dust [J]. *J Occup Environ Med*, 2014, 56(10): 18-22.
- [ 2 ] 杨翔文,朱操云,钱亮,等.口腔修复科 5 种常见粉尘的分析与防治 [J]. *上海口腔医学*, 2017, 26(5): 484-487.
- [ 3 ] Kuehn B. Dentists at risk of lung disease? [J]. *JAMA*, 2018, 319(16): 1650.
- [ 4 ] Kahraman H, Köksal N, Cinkara M, et al. Pneumoconiosis in dental technicians: HRCT and pulmonary function findings [J]. *Occup Med (Lond)*, 2014, 64(6): 442-447.
- [ 5 ] Hirano T, Numakura T, Moriyama H, et al. The first case of multiple pulmonary granulomas with amyloid deposition in a dental technician; a rare manifestation as an occupational lung disease [J]. *BMC Pulm Med*, 2018, 18(1): 77.
- [ 6 ] Alici NŞ, Beyan AC, Demiral Y, et al. Dental technicians' pneumoconiosis; illness behind a healthy smile—case series of a reference center in turkey indian [J]. *Indian J Occup Environ Med*, 2018, 22(1): 35-39.
- [ 7 ] Tan HL, Faisal M, Soo CI, et al. Dental technician pneumoconiosis mimicking pulmonary tuberculosis; a case report [J]. *BMC Pulm Med*, 2016, 16(1): 131.
- [ 8 ] Kahraman H, Cinkara M, Köksal N, et al. The prevalence of silicosis in dental prosthetic technicians working in Kahramanmras city [J]. *Eur Respir J*, 2012, 40 (56): 4022.
- [ 9 ] Mohamed SH, El-Ansary AL, El-Aziz EMA. Determination of crystalline silica in respirable dust upon occupational exposure for Egyptian workers [J]. *Ind Health*, 2018, 56(3): 255-263.
- [ 10 ] Goenharto S, Sudiana IK, Salim S, et al. Inflammation in the lungs of mice due to methyl methacrylate exposure [J]. *Vet World*, 2020, 13(2): 256-260.
- [ 11 ] Bishop S, Roberts H. Methacrylate perspective in current dental practice [J]. *J Esthet Restor Dent*, 2020, 32(7): 673-680.
- [ 12 ] Wang W, Li T, Luo X, et al. Cytotoxic effects of dental prosthesis grinding dust on RAW264.7 cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14364.
- [ 13 ] 王蔚,侯玉明,刘名,等.齿科材料研磨粉尘粒径尺寸的相关研究 [J]. *中国美容医学*, 2014, 23(5): 376-378.
- [ 14 ] Deng Q, Deng L, Miao Y, et al. Particle deposition in the human lung: Health implications of particulate matter from different sources [J]. *Environ Res*, 2019, 169: 237-245.
- [ 15 ] Meza-Figueroa D, Barboza-Flores M, Romero FM, et al. Metal bioaccessibility, particle size distribution and polydispersity of playground dust in synthetic lysosomal fluids [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 713: 136481.
- [ 16 ] Doyi INY, Strezov V, Isley CF, et al. The relevance of particle size distribution and bioaccessibility on human health risk assessment for trace elements measured in indoor dust [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 733: 137931.
- [ 17 ] Marinova M, Solopov P, Dimitropoulou C, et al. Acute exposure of mice to hydrochloric acid leads to the development of chronic lung injury and pulmonary fibrosis [J]. *Inhal Toxicol*, 2019, 31(4): 147-160.
- [ 18 ] Laskin DL, Malaviya R, Laskin JD. Role of macrophages in acute lung injury and chronic fibrosis induced by pulmonary toxicants [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 68(2): 287-301.
- [ 19 ] 张毅,程晨,苏景超,等.急性肺损伤大鼠模型制备及不同时段肺损伤比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 27-34.
- [ 20 ] Borthwick LA, Barron L, Hart KM, et al. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(1): 38-55.
- [ 21 ] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(10): a016295.
- [ 22 ] Shieh JM, Tseng HY, Jung F, et al. Elevation of IL-6 and IL-33 levels in serum associated with lung fibrosis and skeletal muscle wasting in a bleomycin-induced lung injury mouse model [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 7947596.
- [ 23 ] Eckrich J, Zissler UM, Serve F, et al. Airway inflammation in mild cystic fibrosis [J]. *J Cyst Fibros*, 2017, 16(1): 107-115.
- [ 24 ] Zhou Q, Chen T, Bozkanat M, et al. Intratracheal instillation of high dose adenoviral vectors is sufficient to induce lung injury and fibrosis in mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e116142.
- [ 25 ] Glass WG, Argentieri RL, Bracht M, et al. Generation of bleomycin-induced lung fibrosis is independent of IL-16 [J]. *Cytokine*, 2009, 46(1): 17-23.

[收稿日期]2020-09-16

朱景茹,洪银洁,黄婉仪,等. 柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 9-14.

Zhu JR, Hong YJ, Huang WY, et al. Effects of Chaishao LiuJun decoction on gastric mucosal cell proliferation and apoptosis factors in rats with chronic atrophic gastritis of liver depression and spleen deficiency [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 9-14.

doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 002

## 柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的影响

朱景茹<sup>1</sup>,洪银洁<sup>1</sup>,黄婉仪<sup>2</sup>,张 斐<sup>1</sup>,涂文玲<sup>1</sup>,杨宗保<sup>3</sup>,甘慧娟<sup>1\*</sup>

(1.福建中医药大学中医证基地,福州 350122;2.福建中医药大学针灸学院,福州 350122;  
3.厦门大学中医系,福建 厦门 361102)

**【摘要】** 目的 探讨柴芍六君汤对肝郁脾虚型慢性萎缩性胃炎(CAG)模型大鼠胃黏膜细胞增殖和凋亡因子的作用机制。**方法** 26只雌雄各半SD大鼠根据Excel随机生成数字分为正常组6只和造模组20只,造模组采用复合因素造模法建立肝郁脾虚型CAG大鼠模型并评价,成模后随机分为模型组、维酶素组、柴芍六君汤组,每组6只,正常组不予处理。干预过程中,柴芍六君汤组予柴芍六君汤5.1 g/(kg·d),维酶素组予维酶素混悬液240 mg/(kg·d),正常组和模型组予灭菌饮用水,分别灌胃4周。HE染色观察胃黏膜组织病理改变,qPCR法检测胃黏膜细胞凋亡基因c-myc和p53的表达,IHC法检测增殖因子PCNA和Ag-NOR含量,TUNEL法检测胃黏膜细胞凋亡指数。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠活动度减少,病理显示胃黏膜固有腺体萎缩、炎性细胞浸润,胃黏膜c-myc、p53、PCNA、Ag-NOR表达以及凋亡指数均升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,维酶素组和柴芍六君汤组大鼠活动度增加,胃黏膜病理萎缩均有一定程度改善、炎性细胞浸润减少;柴芍六君汤组大鼠胃黏膜c-myc、p53、PCNA、Ag-NOR表达以及凋亡指数均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );维酶素组大鼠胃黏膜c-myc、p53表达均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),PCNA、Ag-NOR蛋白表达及凋亡指数下降,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与维酶素组比较,柴芍六君汤组大鼠一般情况及胃黏膜组织形态改善更明显,胃黏膜c-myc、p53 mRNA表达上升,PCNA、Ag-NOR蛋白表达及凋亡指数下降,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 胃黏膜细胞增殖凋亡与CAG的发展演化关系密切,柴芍六君汤对肝郁脾虚型CAG大鼠胃黏膜具有良好的保护和修复作用,其作用机制可能与抑制c-myc、p53、PCNA以及Ag-NOR等表达,从而调节胃黏膜细胞过度增殖凋亡有关。

**【关键词】** 慢性萎缩性胃炎;柴芍六君汤;肝郁脾虚;大鼠模型;增殖凋亡

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0009-06

## Effects of Chaishao LiuJun decoction on gastric mucosal cell proliferation and apoptosis factors in rats with chronic atrophic gastritis of liver depression and spleen deficiency

ZHU Jingru<sup>1</sup>, HONG Yinjie<sup>1</sup>, HUANG Wanyi<sup>2</sup>, ZHANG Fei<sup>1</sup>, TU Wenling<sup>1</sup>, YANG Zongbao<sup>3</sup>, GAN Huijuan<sup>1\*</sup>

(1. Research Base of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.

2. School of Acupuncture and Moxibustion, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122.

3. Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81873237);福建省自然科学基金项目(2018J01889);福建省大学生创新创业训练项目(202010393025);福建中医药大学校管课题(X2020012)。

**【作者简介】** 朱景茹(1991—),女,硕士研究生,主要从事中医辨治消化性疾病的理论与临床研究。E-mail: zjr19910520@163.com

**【通信作者】** 甘慧娟(1973—),女,教授,博士生导师,主要从事中医证的理论与临床研究。E-mail: hjganzz@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanism of Chaishao Liuju decoction on gastric mucosal cell proliferation and apoptosis in rats with chronic atrophic gastritis (CAG) of liver depression and spleen deficiency. **Methods** Twenty-six Sprague Dawley rats (male=13) were randomly divided into normal ( $n=6$ ) and model groups ( $n=20$ ). CAG rat models of liver depression and spleen deficiency were established and evaluated by the compound factor modeling method. After modeling, they were randomly divided into CAG, vitamin (VI group), and Chaishao Liuju decoction (CS group) groups, with six rats in each group. The normal group was not treated. During the intervention process, the CS group was administered Chaishao Liuju decoction  $5.1 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , the VI group was given vitamin suspension  $240 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , and the normal and CAG groups were given sterilized drinking water for 4 weeks. HE staining was used to observe pathological changes in the gastric mucosa. Quantitative real-time PCR was used to detect the expression of apoptosis genes *c-myc* and *p53* and Immunohistochemistry was performed to detect PCNA and Ag-NOR. TdT-mediated dUTP nick end labeling staining was undertaken to detect the apoptosis index of the gastric mucosa. **Results** Compared with the normal group, the activity of the rats in the CAG group was decreased, and the pathological changes showed atrophy of the inherent glands in the gastric mucosa, infiltration of inflammatory cells, and increased expression of *c-myc*, *p53*, PCNA, Ag-NOR and the apoptosis index in the gastric mucosa ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with the CAG group, the activity of rats increased, the pathological atrophy of gastric mucosa improved to a certain extent, and the infiltration of inflammatory cells decreased in the VI and CS groups. The expression of *c-myc*, *p53*, PCNA, Ag-NOR and the apoptosis index in the gastric mucosa of rats in CS group was decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the expression of *c-myc* and *p53* in the gastric mucosa of rats in the VI group decreased ( $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively), and the expression of PCNA, Ag-NOR, and the apoptosis index was decreased, with no significant difference ( $P>0.05$ ). Compared with the VI group, the general condition and gastric mucosa morphology of the CS group were more significantly improved, *c-myc* and *p53* mRNA expression was increased in the gastric mucosal, and the expression of PCNA and Ag-NOR and the apoptosis index were decreased, but the differences were not statistically significant ( $P>0.05$ ). **Conclusions** The proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells are closely related to the development and evolution of CAG. Chaishao Liuju decoction has good therapeutic and repair effects on CAG rats with liver depression and spleen deficiency. The mechanism of action may be related to the inhibition of *c-myc*, *p53*, PCNA and Ag-NOR expression, regulating the excessive proliferation and apoptosis of gastric mucosal cells.

**【Keywords】** chronic atrophic gastritis; Chaishao Liuju decoction; liver depression and spleen deficiency; rat model; proliferation and apoptosis

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是临床常见的胃癌前期疾病, 可见胃黏膜组织病理萎缩、变薄, 是“炎癌转化”的关键环节<sup>[1]</sup>。大量临床研究证实, 柴芍六君汤对 CAG 患者有显著疗效, 可以确切改善胃脘部不适症状, 逆转病理萎缩, 促进疾病向愈<sup>[2-4]</sup>。然而, 柴芍六君汤防治 CAG 的整体调节机制尚未得到充分揭示, 因此, 有必要从分子生物学角度深入研究柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞增殖、凋亡的影响, 为中药防治 CAG、阻断其向胃癌进展的临床应用提供科学实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠, 8 周龄, 26 只, 雌雄各半, 体重 ( $200 \pm 20$ ) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK(沪) 2019-0005]。大鼠群养于垫玉米芯

的饲料笼中, 垫料 4 d 更换 1 次, 雌雄分笼饲养, 控制室温  $21^{\circ}\text{C} \sim 23^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 50%, 自由摄食饮水, 在厦门大学动物实验中心 [SYXK(闽) 2018-0009] 适应性喂养 7 d 后进行分组实验。本实验经厦门大学实验动物管理伦理委员会批准 (XMULAC20190142), 实验过程严格遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

脱氧胆酸钠 (批号: 20190901, 北京奥博星生物技术); 25%~28% 氨水 (批号: C10586777, 上海百舜生物科技); 维酶素片 (批号: 20190405, 乐普恒久远药业); HE 染色试剂盒 (批号: J19S11Y125305, 上海源叶生物科技); 逆转录试剂盒 (批号: AJ52623A, 日本 TaKaRa 公司); PCNA 抗体 (货号: 24036, 美国 Proteintech 公司); Ag-NOR 染色液 (货号: G2015, 北京索莱宝科技); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (货号: C1088, 上海碧云天生物技术); 基因扩增仪、荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 正

置荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);半自动切片机(德国 Leica 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 药物制备

维酶素混悬液:给药前用蒸馏水配制混悬液,按照大鼠是人常规剂量的 6 倍计算<sup>[5]</sup>,给药量为 240 mg/(kg·d)。柴芍六君汤出自《医宗金鉴》,组方:北柴胡 6 g,人参 9 g,白芍 4.5 g,白术 9 g,茯苓 9 g,法半夏 4.5 g,制陈皮 6 g,炙甘草 3 g,饮片由闽侯上街致诚医药商店提供,经鉴定为质量合格的中药饮片。常规煎煮 2 次后混匀,浓缩成含生药量 0.51 g/mL 中药汤剂,无菌纱布过滤后分装入瓶,4℃冰箱储存。

#### 1.3.2 分组、造模与处理

26 只大鼠根据 Excel 随机生成数字分为 2 组,即正常组 6 只和造模组 20 只。正常组不予处理,造模组采用复合因素造模法<sup>[6-7]</sup>建立肝郁脾虚型 CAG 大鼠模型:大鼠予每日现配的 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液和 0.1% 氨水溶液交替自由饮用,配合 2 d 足食、1 d 禁食的饥饱失常法,每日夹尾激惹 1 h,造模 10 周。造模组每 5 周随机抽取 1 只大鼠进行造模评价,取材胃黏膜组织观察形态色泽、皱壁厚薄及病理形态,结合大便性状、毛发色泽、精神状况及强迫游泳实验等结果综合判断。将成模大鼠随机分为 3 组,即模型组、维酶素组和柴芍六君汤组,每组 6 只。柴芍六君汤组予柴芍六君汤 5.1 g/(kg·d),维酶素组予维酶素混悬液 240 mg/(kg·d),正常组和模型组予灭菌饮用水,按体重 10 mL/kg 灌胃,干预 4 周后取材。修剪胃黏膜组织周边多余脂肪,生理盐水漂洗后观察胃黏膜形态色泽、皱壁厚薄,取胃窦部固定于 4% 多聚甲醛溶液中 24 h,胃体部冻存-80℃冰箱备用。

#### 1.3.3 胃黏膜组织形态学观察

胃黏膜组织经流水冲洗 6 h 后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋后切片,切片厚度约 4 μm,63℃ 烘片机烤片 4 h,脱蜡后行 HE 染色,显微镜观察胃黏膜组织病理结构变化。

#### 1.3.4 qPCR 法检测胃黏膜凋亡基因 c-myc 和 p53 mRNA 水平

引物序列 5'-3': c-myc: F-TCTCCGTCCTATG TTGCG, R-GGCTGGTGCTGTCTTTTC; p53: F-GCGTT GCTCGATGCTGA, R-CAGCGTGATGATGTAAGG; β-actin: F-CTGGCTCCTAGCACCATGAA, R-AAAACGC

AGCTCAGTAACAGTC。引物由上海百赛生物技术有限公司设计合成。TRIzol 法提取胃黏膜组织总 RNA 并进行浓度测试,逆转录成 cDNA 后按照说明书配制反应体系,放入荧光定量 PCR 仪进行 qPCR 反应,记录各组 CT 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算方法进行统计分析。

#### 1.3.5 IHC 法检测 PCNA 和 Ag-NOR 含量

胃黏膜组织切片、脱蜡、水化后进行热抗原修复,10% 山羊血清室温封闭 1 h,一抗 37℃ 孵育 1 h, PBS 漂洗 4 次,加入二抗 37℃ 孵育 1 h, PBS 漂洗 10 次, DAB 显色,苏木素复染后流水冲洗 30 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片后显微镜观察。运用软件 Image J v1.8.0 进行平均光密度 (IOD/area) 分析。

#### 1.3.6 TUNEL 法检测胃黏膜细胞凋亡指数

胃黏膜组织脱蜡,蛋白酶 K 消化,按照说明书配制 TUNEL 试剂,加检测液 37℃ 避光孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次,用抗荧光淬灭的封片液封片,绿色荧光发射波长为 515 ~ 565 nm,显微镜下计数阳性细胞个数。

### 1.4 统计学方法

运用软件 SPSS 23.0 进行统计分析,计量资料属正态分布用平均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,反之则用  $M(P_{25}, P_{75})$  表示。多组比较符合正态分布采用单因素方差分析,组间比较不符合正态分布用秩和检验。按  $\alpha = 0.05$  检验水准,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 模型评价

正常组大鼠活泼喜动,好奇心强,毛发洁白光泽,大便色褐且无明显臭味;胃黏膜组织形态正常,上皮细胞完整无缺损,固有腺体整齐规则。造模组大鼠毛发淡黄质硬,神态疲倦,大便味臭,溏结不调;胃黏膜组织固有腺体萎缩,炎性细胞浸润,主细胞和壁细胞减少;强迫游泳静止时间较正常组明显延长 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

### 2.2 大鼠一般情况比较

正常组大鼠毛发洁白光泽,活跃好奇,精力充沛,灌胃抵抗较明显;模型组大鼠毛发蓬松无光泽,色淡黄质硬,神态仍稍疲惫,偶见安静扎堆,反应较迟钝,灌胃时温顺不抵抗;维酶素组大鼠毛发蓬松,少有光泽,活泼警惕,灌胃偶有抵抗;柴芍六君汤组

大鼠毛发淡黄质硬,稍有光泽,活泼好动,灌胃抵抗。

### 2.3 大鼠胃黏膜组织形态学比较

正常组大鼠胃黏膜组织颜色鲜红,色泽光亮,黏膜皱襞丰富充盈,形态正常;光镜下可见组织结构完整,细胞排列紧密整齐,未见细胞坏死。模型组大鼠胃黏膜组织颜色稍灰暗,厚度变薄,色泽较差,皱襞减少甚至消失;固有腺体萎缩,炎性细胞浸润,部分细胞脱落、坏死,排列紊乱。维酶素组大鼠胃黏膜组织色泽鲜红,胃黏膜厚度较模型组增厚,黏膜皱襞增加;胃黏膜形态较模型组改善,炎性细胞浸润减轻,腺腔仍较大,细胞排列较整齐。柴芍六君汤组大鼠胃黏膜形态趋向于正常组,胃黏膜未见充血水肿,黏膜皱襞明显增多,厚度较厚;固有腺体萎缩改善,黏膜层连续完整,腺腔体积小,少量炎性细胞浸润。见图 1。

### 2.4 大鼠胃黏膜凋亡基因 c-myc 和 p53 比较

与正常组比,模型组大鼠胃黏膜 c-myc、p53 mRNA 表达均显著上升( $P<0.01$ );维酶素组和柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 p53 mRNA 表达上升( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),c-myc mRNA 表达较正常组均有上升趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比,维酶素组和柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 c-myc、p53 mRNA 表达均下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与维酶素组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 c-myc、p53 mRNA 表达均有上升趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这说明柴芍六君汤和维酶素均能抑制肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度凋亡且作用基本一致。见表 2,图 2。

### 2.5 大鼠胃黏膜增殖因子 PCNA 和 Ag-NOR 比较

与正常组比,模型组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达均上升( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),维酶素组大鼠胃黏膜 PCNA 蛋白表达显著上升( $P<0.01$ ),柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达均有上升趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达均上升( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),维酶素组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 蛋白表达较模型组有下降趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与维酶素组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、Ag-NOR 表达均有下降趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这提示柴芍六君汤在抑制肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度增殖方面的效果要

优于维酶素。见表 3,图 3。

表 1 两组大鼠强迫游泳静止时间比较 M( $P_{25}$ , $P_{75}$ )

Table 1 Comparison of static time in forced swimming of rats in two groups M( $P_{25}$ , $P_{75}$ )

组别 Groups	静止时间(s) Immobile time
正常组 Normal group	45.74(39.45,60.81)
造模组 Model group	80.17(64.81,169.76) <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, <sup>b</sup> $P<0.01$ .

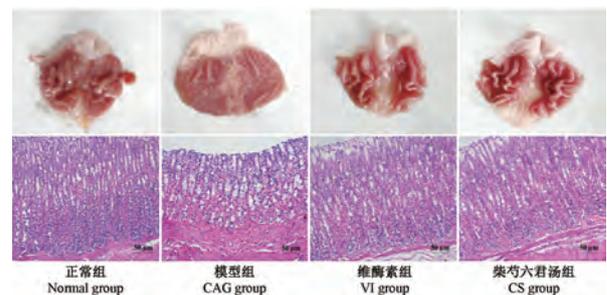


图 1 大鼠胃黏膜组织直观图与组织病理图(HE 染色)

Figure 1 Visual and histopathological images of gastric mucosa in rats (HE staining)

表 2 大鼠胃黏膜细胞凋亡基因 c-myc 和 p53 比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Table 2 Comparison of apoptosis genes c-myc and p53 in gastric mucosa of rats

组别 Groups	c-myc	p53
正常组 Normal group	1.06±0.36	1.06±0.38
模型组 CAG group	11.42±3.21 <sup>b</sup>	17.26±6.28 <sup>b</sup>
维酶素组 VI group	3.44±1.62 <sup>d</sup>	5.80±1.85 <sup>bc</sup>
柴芍六君汤组 CS group	4.08±2.58 <sup>d</sup>	7.43±2.85 <sup>ac</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ . Compared with the CAG group, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ .

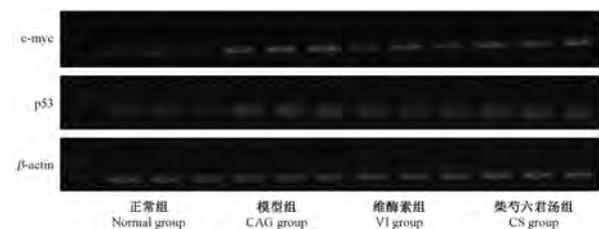


图 2 大鼠胃黏膜细胞凋亡基因 c-myc 及 p53 电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of apoptosis genes c-myc and p53 in rat gastric mucosa

### 2.6 大鼠胃黏膜凋亡指数比较

与正常组比,模型组大鼠胃黏膜凋亡指数上升( $P<0.05$ )。与模型组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜凋亡指数下降( $P<0.05$ ),维酶素组大鼠胃黏膜凋亡指数较模型组有下降趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与维酶素组比,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜凋亡指数有下降趋势,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这表明柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度凋亡具有抑制作用。见表 4,图 4。

### 3 讨论

胃癌发病率和死亡率均居我国恶性肿瘤第 3 位,严重威胁人类生命健康,CAG 是由于多种致病因素关联作用于机体后出现胃黏膜侵袭与防御因

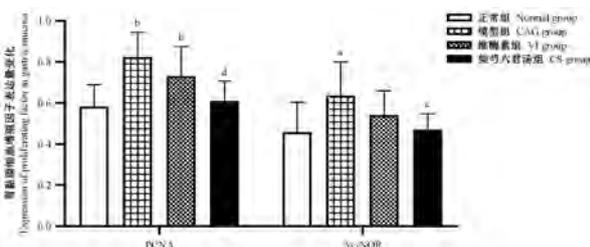
表 3 大鼠胃黏膜细胞增殖因子 PCNA 和 Ag-NOR 表达量比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Comparison of PCNA and Ag-NOR expression in gastric mucosa of rats

组别 Groups	PCNA	Ag-NOR
正常组 Normal group	0.58±0.10	0.46±0.14
模型组 CAG group	0.83±0.12 <sup>b</sup>	0.64±0.16 <sup>a</sup>
维酶素组 VI group	0.73±0.14 <sup>b</sup>	0.54±0.12
柴芍六君汤组 CS group	0.61±0.77 <sup>d</sup>	0.47±0.77 <sup>c</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ . Compared with the CAG group, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ .



注:PCNA:增殖细胞核抗原;Ag-NOR:核仁组成区嗜银蛋白。与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

图 3 大鼠胃黏膜 PCNA 和 Ag-NOR 表达量

Note. PCNA, Proliferating cell nuclear antigen. Ag-NOR, Argyrophilic nucleolar organizer region protein. Compared with the normal group, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ . Compared with the CAG group, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ .

Figure 3 Expression of PCNA and Ag-NOR in gastric mucosa of rats

素失衡的胃黏膜损伤性疾病,与胃癌的发病率呈正相关<sup>[8-10]</sup>,因此,对 CAG 采取早期干预措施,防止甚至逆转肠化生与上皮内瘤变的发生,是阻断胃癌进展的重要手段。中医认为脾胃虚弱是 CAG 的发病基础,气滞亦为本病核心,课题组前期研究表明,肝郁脾虚是 CAG 重要病理特点,二者常相互影响导致 CAG 的发病,又因气滞不行或脾虚不运,妨碍津液正常运行,以致痰聚湿阻,日久易致癌变<sup>[11]</sup>。肝郁脾虚型证结合动物模型一直是中医药基础研究的热点和特色理论,有学者从宏观表征、行为学以及理化指标方面进行模型评价<sup>[12]</sup>。本实验造模结束后,造模组大鼠病理可见胃黏膜固有腺体萎缩,明显炎性细胞浸润;一般行为观察出现毛发色黄质硬,神态疲倦,大便溏结不调,安静扎堆,行为抑郁,强迫游泳静止时间明显延长,上述表现较符合肝郁脾虚型 CAG 的生物学特征,提示模型成功建立。柴芍六君汤是临床治疗肝郁脾虚型 CAG 的经典方剂,具有疏肝健脾化痰的作用,经本方治疗后,模型大鼠可见精神状态好转,活动度增加,胃黏膜皱襞明显增多、固有腺体萎缩改善、少量炎性细胞浸润。本实验结果提示,柴芍六君汤能够明显改善肝郁脾虚型 CAG 大鼠的精神及活动状态,促进胃黏膜组织损伤修复。

CAG 发生发展过程中涉及胃黏膜细胞信号转导紊乱和多基因表达异常,细胞增殖、凋亡失衡是 CAG

表 4 大鼠胃黏膜凋亡指数比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Comparison of gastric mucosal apoptosis index in rats

组别 Groups	凋亡指数(%) Apoptosis index
正常组 Normal group	0.19±0.07
模型组 CAG group	0.64±0.21 <sup>a</sup>
维酶素组 VI group	0.39±0.16
柴芍六君汤组 CS group	0.19±0.51 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, <sup>a</sup> $P<0.05$ . Compared with the CAG group, <sup>b</sup> $P<0.05$ .

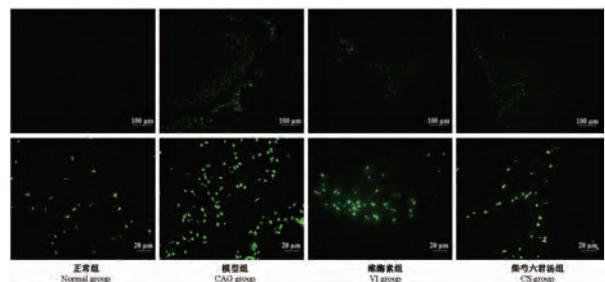


图 4 大鼠胃黏膜凋亡情况

Figure 4 Apoptosis of gastric mucosa in rats

发生的关键因素之一,有研究指出,促凋亡基因 *c-myc* 和 *p53* 等异常表达均可能参与癌变的某个环节<sup>[13-14]</sup>。*c-myc* 作为原癌基因磷酸化蛋白质,能够直接控制 DNA 的合成,在细胞凋亡、分化、黏附以及细胞周期调控中发挥重要作用,可以维持胃癌细胞的恶性表型,在 CAG 甚至胃癌中存在过表达情况<sup>[15]</sup>。*p53* 是肿瘤抑制基因,能够监护细胞基因的完整性,其蛋白活化水平的增加可降低细胞发生凋亡反应的阈值,癌组织分化越差,*p53* 异常表达的分布就越广泛<sup>[16]</sup>。本实验结果显示,模型组大鼠存在胃黏膜细胞过度凋亡的表现,凋亡基因 *c-myc*、*p53* 以及凋亡指数表达均升高,经药物干预后,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 表达和凋亡指数均下降,维酶素组大鼠胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 表达下降,凋亡指数有下降趋势但无统计学差异,提示柴芍六君汤和维酶素都能够有效抑制 CAG 大鼠胃黏膜细胞的过度凋亡,下调胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 表达水平,从而起到治疗肝郁脾虚型 CAG 的作用。

PCNA 主要参与细胞 DNA 复制、修复及细胞周期调控等多个重要环节,其含量反映出细胞的生长速度及状态,对胃癌癌前病变的诊断、分级、指导治疗、预后转归具有实用性价值,是具有代表性的细胞增殖标记物<sup>[17]</sup>。*Ag-NOR* 含量取决于转录活动的水平和染色体组中携带 *NOR* 染色体的数量,细胞增殖活跃导致 *Ag-NOR* 大量增加,细胞中 *Ag-NOR* 的含量对胃黏膜变异程度研究有着重要意义<sup>[18]</sup>。IHC 检测结果证实,模型组大鼠胃黏膜 PCNA、*Ag-NOR* 蛋白存在高表达,经药物干预后,柴芍六君汤组大鼠胃黏膜 PCNA、*Ag-NOR* 蛋白表达水平均出现不同程度的下降,维酶素组大鼠胃黏膜 PCNA、*Ag-NOR* 蛋白表达有下降趋势但无统计学差异,表明柴芍六君汤能够对肝郁脾虚型 CAG 大鼠胃黏膜细胞的过度增殖起抑制作用,且相较于阳性药物维酶素具有更大的治疗优势。

综上所述,柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠精神状态和病理形态具有明显改善作用,且能够下调胃黏膜 *c-myc*、*p53* mRNA 和 PCNA、*Ag-NOR* 蛋白表达水平,抑制胃黏膜细胞过度增殖、凋亡。因此认为,柴芍六君汤对肝郁脾虚型 CAG 大鼠的整体治疗作用可能与调控胃黏膜细胞过度增殖、凋亡,从而使其增殖、凋亡水平趋向于平衡状态有关。此外,是否还涉及其他更多增殖凋亡基因参与或者信号转导通路的影响,还需要进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] 于春月,李依聪,苏泽琦,等.慢病消对慢性萎缩性胃炎大鼠血清炎症指标 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(5):1979-1983.
- [2] 刘丽,韩远峰,郭益湘.柴芍六君汤合丹参饮加减治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察[J].实用中医药杂志,2017,33(2):123-124.
- [3] 马立华,蔡柏.柴芍六君加味方抑制慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜腺体萎缩及机制研究[J].西部中医药,2019,32(7):80-82.
- [4] 洪婷,黄青,彭胜男,等.加味柴芍六君汤治疗慢性非萎缩性胃炎(脾虚肝郁型)60例[J].江西中医药,2014,45(6):24-26.
- [5] 邵义祥.医学实验动物学教程[M].南京:东南大学出版社,2016.
- [6] Liu Y, Li X, Qin X. Saccharum Granorum ameliorated mitochondrial dysfunction in chronic atrophic gastritis rats using organelle-specific metabolomics and network pharmacology approaches[J]. Food Res Int, 2020, 136 :109503.
- [7] 严茂祥.大鼠胃黏膜癌变模型的建立[J].浙江中医学院学报,2008,22(2):3-5.
- [8] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [9] 房静远,杜奕奇,刘文忠,等.中国慢性胃炎共识意见(2017年,上海)[J].胃肠病学,2017,22(11):670-687.
- [10] 纪润壁,马吉春,闻向梅,等.大鼠胃炎癌转化模型建立与早期诊断方法探索[J].中国实验动物学报,2018,26(4):444-447.
- [11] 甘慧娟,梁丽丽,韩木龙,等.慢性胃炎的证素分布特征及与性别关系的研究[J].中华中医药杂志,2015,30(7):2456-2459.
- [12] 刘佳,许可,张兰.肝郁脾虚证动物模型评价方法[J].中医药导报,2019,25(23):120-122.
- [13] Wei W, Li L, Wang X, et al. Overexpression of caudal type homeobox transcription factor 2 inhibits the growth of the MGC803 human gastric cancer cell line *in vivo* [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1):905-912.
- [14] 杨宗保,王亚东,常小荣,等.电针抑制慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡的作用机制研究[J].中华中医药杂志,2016,31(8):3005-3008.
- [15] 魏玥,杨晋翔,王再见,等.益气化痰解毒法对慢性萎缩性胃炎伴异型增生大鼠 *c-myc* 的影响[J].北京中医药大学学报(中医临床版),2013,20(1):12-15.
- [16] 陈华,吴小红,谢忠忱,等. *C-myc*、*p53* 基因和 AFP 在家兔诱发性肝癌及癌旁组织中的表达[J].中国实验动物学报,2004(4):231-234.
- [17] 陆喜荣,陶鸣浩,杨炜,等.健脾理气、活血化痰促进慢性萎缩性胃炎大鼠胃腺体增殖的作用机制[J].中医药导报,2020,26(15):33-35,39.
- [18] 杨宗保,王晨光,陈娇龙,等.艾灸对慢性萎缩性胃炎癌前病变大鼠胃黏膜细胞增殖因子的影响[J].中国针灸,2015,35(12):1269-1273.

[收稿日期]2020-08-10

田全发,郑卫华,王子航,等. 肝双重动脉血供模型的建立与理论应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 15-20.  
Tian QF, Zheng WH, Wang ZH, et al. Establishment and theoretical application of a liver double artery blood supply model [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 15-20.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.003

## 肝双重动脉血供模型的建立与理论应用

田全发<sup>1,2</sup>, 郑卫华<sup>1</sup>, 王子航<sup>1</sup>, 李朋飞<sup>1</sup>, 张俊晶<sup>1,3\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学附属医院肝胆外科, 呼和浩特 010030; 2. 山西省汾阳医院泌尿男科, 山西 汾阳 032200;  
3. 呼和浩特市第一医院肝胆外科, 呼和浩特 010030)

**【摘要】** 目的 建立稳定、成功率高的显微镜下大鼠70%肝切除+肝双重动脉血供的动物模型。方法 纳入研究大鼠76只,分训练组40只、造模组36只。训练组模拟手术操作,优化围术期管理;模型组行显微镜下制备大鼠70%肝切除(肝左叶和中叶)+肝双重动脉血供手术,术后观察大鼠一般情况,计算造模成功率和1周存活率。结果 通过训练组模拟操作,渡过学习曲线。造模组手术时间为(65.3±6.56) min,血管吻合时间(11.1±2.53) min。术中无明显副损伤,出血量(0.6±0.21) mL。1周后造模成功率88.9%(32/36);造模成功,大鼠术后状态良好。结论 显微镜下制备大鼠70%肝切除+LDABS模型操作较为复杂,但通过一定时间显微技能训练后,通过对术式,特别是血管吻合及围手术期护理的改良及创新,使得该模型成功率高、可重复性强,为进一步研究其在肝再生、急性肝功能衰竭和肝移植等中应用奠定基础。

**【关键词】** 门静脉动脉化;肝双重动脉血供;围手术期;血管吻合;肝切除

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0015-06

## Establishment and theoretical application of a liver double artery blood supply model

TIAN Quanfa<sup>1,2</sup>, ZHENG Weihua<sup>1</sup>, WANG Zihang<sup>1</sup>, LI Pengfei<sup>1</sup>, ZHANG Junjing<sup>1,3\*</sup>

(1. Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China.  
2. Andrology of Urology, Fenyang Hospital of Shanxi Province, Fenyang 032200.  
3. Hepatobiliary Surgery, Huhhot First Hospital, Hohhot 010030)

**【Abstract】** **Objective** An animal model of 70% partial hepatectomy + liver dual arterial blood supply (LDABS) was established. **Methods** Seventy-six rats were divided into a training group ( $n=40$ ) and a model group ( $n=36$ ). In the model group, 70% partial hepatectomy (left lobe and middle lobe of liver) + double artery blood supply surgery of the liver was performed under a microscope. The general status of rats was observed after surgery, and the success and 1 week survival rates were calculated. **Results** Through simulated surgery in the training group, the learning curve was crossed. The surgery duration of the model group was (65.3 ± 6.56) min, and the vascular anastomosis time was (11.1 ± 2.53) min. During the surgery, there were no obvious side injuries and less bleeding, of no more than 0.8 mL, was observed. One week later, the modeling success rate was 88.9% (32/36), and the rats were in good condition. **Conclusions** Surgery consisting of 70% hepatectomy + LDABS in rats under a microscope is relatively complicated. However, after a

**【基金项目】**国家自然科学基金(81560113);内蒙古自然科学基金重大项目(2015ZD(LH)01);内蒙古自然科学基金(2014MS0850);内蒙古自治区高等学校青年科技领军人才支持计划(NJYT-17-A15)。

**【作者简介】**田全发(1986—),男,主治医师,研究方向:泌尿男科。E-mail:137646675@qq.com

**【通信作者】**张俊晶(1978—),男,教授,主任医师,博士研究生。研究方向:肝胆胰疾病的基础与临床研究。E-mail:zhang.jj@vip.163.com

period of microsurgery training, the improvements and innovation of the surgical mode, especially vascular anastomosis and perioperative nursing, resulted in a high success rate and strong repeatability of the model, laying the foundation for further research on its application in liver regeneration, acute liver failure, and liver transplantation.

**【Keywords】** portal vein arterialization; liver double artery blood supply; perioperative period; vascular anastomosis; partial hepatectomy

正常肝由门静脉和肝动脉双重血液供应。将肝动脉血保持不变,门静脉血完全或部分被动脉血替代灌注入肝称之为肝双重动脉血供(liver double artery blood supply, LDABS)。此术式是门静脉动脉化的一个分支(portal vein arterialization, PVA),最早由 Qiao 等<sup>[1]</sup>提出。LDABS 目前主要应用于急性肝功能衰竭、原位肝移植以及辅助肝移植前后的门静脉血栓形成等<sup>[2-4]</sup>,已显示较好的效果,且可维持肝功能和形态<sup>[5-7]</sup>。但 LDABS 毕竟改变了正常的生理解剖关系,特殊情况下应用产生的良好效果是否说明该技术可常规应用于此类患者,需要临床前的深入研究<sup>[8-9]</sup>。因此,建立适宜的动物模型,对于解决上述问题具有重要的意义。目前有关 LDABS 模型制备方法少有系统文献阐述,尤其在模型中涉及血流控制、血管吻合等问题更是让研究者望而却步。本研究旨在建立一种成熟稳定、易于操作的 LDABS 动物模型,在此基础上,探讨其理论应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 76 只,体重 300~330 g,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。本课题组适应性饲养,无菌手术在上海懿贝瑞生物医药科技有限公司中心屏障动物实验设施进行[SYXK(沪)2017-0014],饲养环境:温度 21℃~24℃,湿度 40%~50%,光照:12 h/12 h 明暗交替,噪声<50 dB,IVC 笼内饲养,自由饮食。实验过程中按“3R”原则给予人道的关怀。手术显微镜(Leica M 525 F20)双人配合完成,本实验研究通过内蒙古医科大学伦理审查(YKD2015102)。

### 1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液,山东齐都药业有限公司;碳酸氢钠注射液,山西省芮城科龙兽药有限公司;肝素钠,上海化学试剂厂;低分子肝素钙,兆科药业(合肥)有限公司;5%葡萄糖注射液,广东圣戈生物科技有限公司;异氟烷,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;注射用青霉素钠,华北制药股份有限公司;

10-0\6-0\4-0 缝合线,宁波医用缝线有限公司;医用纱布敷料,南昌市恩惠医用卫生材料有限公司;医用棉签,湖南永康医疗器械有限公司;M525F20 莱卡显微镜,长沙医疗器械厂;小动物气体麻醉呼吸机,上海玉研科学仪器有限公司;显微镊、显微血管夹,上海医疗器械(集团)有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 手术步骤

(1)100% O<sub>2</sub> 2~4 L/min 混合异氟烷吸入麻醉,浓度 3.5%~5%诱导,1.5%~2.5%吸入维持。麻醉成功后取仰卧位,将大鼠四肢固定于自制固定板,术野常规脱毛消毒处理。采用腹正中切口,逐层进腹,自制拉钩暴露手术视野。

(2)血管夹阻断门静脉 2 min,4-0 线结扎肝左外叶及中叶,开放门静脉,可见剩余肝叶充血性改变(图 1A),沿结扎线切除肝左外叶、中叶(图 1B),可见残腹腔(图 1C)。

(3)下腔静脉下方作隧道放 4-0 线预防出血。剥除下腔静脉与门静脉外膜,分离右肾动脉(图 1D),斜形半剪开右肾动脉(图 1E),插入聚乙烯管(管内充满肝素水,长度 23 mm,内直径 0.5 mm)后再离断右肾动脉,6-0 线固定管。

(4)将门静脉骨骼化(图 1F),冲洗腹腔。显微镊夹闭门静脉远端,调整脾静脉端在显微镊最里侧,定为“0”点。斜形 45°半剪开门静脉(图 2A),插入聚乙烯管另一端,6-0 线绑定,再离断门静脉。门静脉开放过程不超过 1 s。

(5)4-0 线阻断下腔静脉两端。显微镊尖端提起下腔静脉,剪成鱼口状,修剪鱼状口直径与门静脉斜形断端直径大致相等,肝素水冲洗断端。可将门静脉近脾静脉端、下腔静脉近心端定为 0 点,门静脉远离脾静脉端、下腔静脉远心端定位为 6 点。“米”字形八个点使用找中点法按门静脉定点 9-10.5-7.5-6-0-3-1.5-4.5 顺序依次缝合(图 2B)。每一针按“血管外-里-里-外”用 10-0 线与相对点缝合,“0”“6”两点拐角位置,采用拐角水平褥式缝合(图 2C)。拐角即血管吻合形成折角的位置。缝合最后一针前短暂开放门静脉使高凝血

流出,再大量肝素水冲洗管腔,在肝素水里缝合最后一针。开放下腔静脉两端及门静脉,观察吻合口是否漏血及狭窄(图 2D)。

(6) 术毕检验聚乙烯管是否通畅。一是观察肝颜色判断管是否通畅,如肝颜色鲜红则通。如肝发黄或暗黄难判定时,显微镊从远心端朝近心端夹闭并擗、刮聚乙烯管,人为制造小气泡观察管是否通畅(图 2E)。如通,小气泡被快速推走,如不通,小气泡在原处。

(7) 观察如无活动性出血,6-0 连续缝合肌肉层连同腹膜,4-0 间断缝合大鼠皮层,动物模型成功。

### 1.3.2 围手术期处理

术前 12 h 禁食,不限饮水。术前 1 h 称重,低分子肝素钙 100 U/kg 皮下注射,阿托品 0.03 mg/kg 肌注,同时颈部皮下注射生理盐水、5%葡萄糖及 5%碳酸氢钠共 4 mL(比例 3:3:1 配置)。术中根据大鼠呼吸频率判断麻醉深度以便调节异氟烷浓度,术毕停止吸入麻醉药,大鼠在术后 4 min 内苏醒,可翻身活动。术后暖光照射 1 h,自由进水,术后第 1 天给食。术后前 3 d 青霉素肌注 10000 U/100(g·d),皮下注射低分子肝素钙 100 u/kg,q12 h。

### 1.4 观察内容

记录手术时间,计算造模成功率,观察大鼠术后一般情况,包括毛发、色泽、尿液颜色、体重、肝体积变化及色泽改变。术后 24 h 采用 Vero 2100 超高分辨率小动物超声影像系统(加拿大 Visual Sonics)检测大鼠门静脉静脉及吻合口血流情况。

## 2 结果

共纳入 76 只大鼠,40 只作为训练组,36 只大鼠作为模型组。训练组动物术中门静脉出血 3 只,吻合口缝合完有渗血数量为 10 只;术后死亡尸检出血 8 只,肺栓塞 10 只,肝坏死 4 只,肠坏死 5 只。模型组大鼠死亡 4 只,尸检:肺栓塞 2 只,肝坏死 1 只,肠道坏死 1 只。模型组手术时间为(65.3±6.56)min,血管吻合时间(11.1±2.53)min。术中无明显副损伤,出血量(0.6±0.21)mL,术后存活超过 24 h 标志造模成功,成功率 100%(36/36),相关并发症发生率为 0%。大鼠术后能自由进食水,警觉,活动如常,毛发光泽略暗。术后 24 h 尿液呈淡红色,48~72 h 后尿液颜色恢复正常色泽。术后 24 h 超声检测门静脉血流(5.8±1.5)mL/(min·g)肝重(与原门静脉

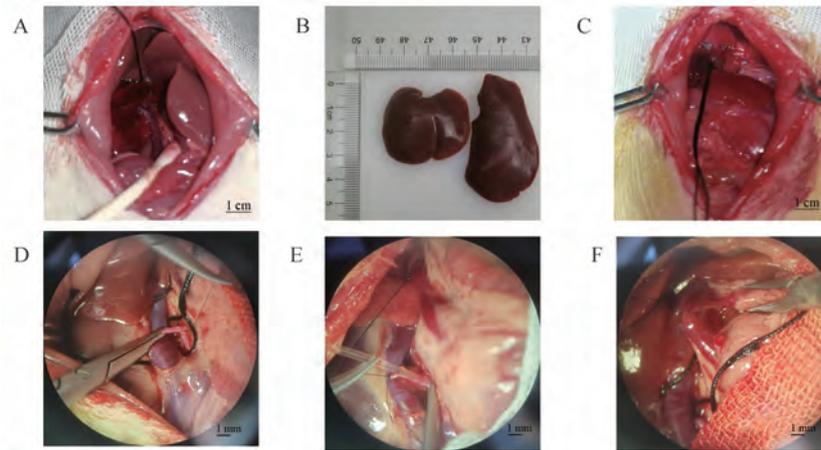
血流量相似),吻合口血流通畅,无明显狭窄。1 周后造模成功率 88.9%(32/36),相关并发症发生率为 11.1%。1 周后大鼠取材,剖腹探查发现肝呈鲜红色色泽改变,肝体积饱满及增大明显,右肾实质发黄萎缩,吻合口愈合良好,通畅无狭窄(图 2F)。

## 3 讨论

### 3.1 手术操作技巧及改进

此模型术式主要包括三个步骤:肝切除、门腔静脉吻合及门静脉动脉化。70%肝切除是经典肝再生研究模型,其手术技巧大多文献谈及<sup>[10]</sup>。此不再赘述,但得需注意以下问题:在结扎肝叶前阻断门静脉 2 min,可使血量丢失更少。结扎位置较深肝叶时,避免撕扯、牵拉肝组织。打结时尽量靠近被切除的肝叶,避免结扎下腔静脉。门静脉动脉化指将门静脉改道,门静脉远端注入下腔静脉,近端引入右肾动脉血。

血管吻合口漏血及狭窄是主要并发症<sup>[11-13]</sup>,这也是早期模拟训练需解决的主要问题之一。因门静脉及腔静脉位置固定、内径小、壁薄、位置深,门腔吻合在技术上更具有挑战性。吻合方式方法有多种,但至今没有一个理想的方法可供借鉴,完美的微血管缝合技术应具备吻合方式易操作、血管缺血时间短、血管壁损伤小及最佳的近远期通畅率等优点。陈永亮等<sup>[14]</sup>运用缝合的方式,将门静脉端侧与肝动脉吻合,侧侧吻合连接下腔静脉与门静脉制作完全门静脉动脉化(CPVA)大鼠模型。此方法对于外科手术者操作要求较高且稳定性较差,手术时间长,血液形成逆流,易致大量血栓形成,且创伤大。陈鹏等<sup>[15]</sup>通过切除左肾,利用同种异体材料作为套管,将左肾动脉与原有门静脉血共同汇入门静脉制作门静脉动脉化,优点是术式简单,手术时间短。但缺点也明显:门静脉属支有发生回流受阻的可能,易形成免疫反应,术后随时间推移发生血管扭转,引起狭窄的可能性较传统术式高。基于文献和课题组前期的工作基础<sup>[16-17]</sup>,针对门腔静脉解剖特点,课题组再次对血管吻合进行了改进与创新。吻合口修剪为鱼口状,以脾静脉汇合处作为参照,按照特定的顺序进行(图 2B),特定顺序能够在不必牵引血管情况下,保证外翻缝合。Qiao 等<sup>[17]</sup>多采用定点缝合,反复牵引、调整位置用来保证外翻缝合,增加了血管壁损伤的概率,牵引张力不均匀亦出现针距的不均匀。而本研究提出的“米”吻合顺

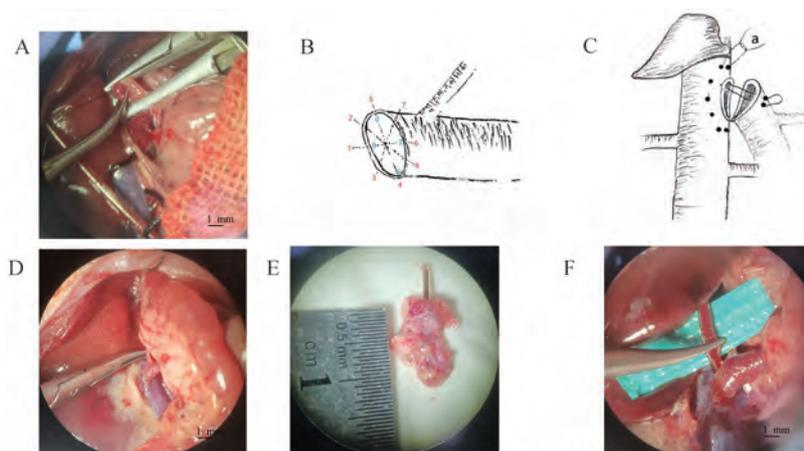


注:A:右叶、乳头状叶、尾叶充血性改变;B:切除的肝组织;C:肝切除后的腹腔;D:分离右肾动脉;E:右肾动脉插管;F:门静脉骨骼化。

图1 肝双重动脉血供手术步骤

Note. A, Results showed that the right lobe, papillary lobe and caudate lobe were congestive. B, Liver tissue removed. C, Abdominal cavity after partial hepatectomy. D, Separation of right renal artery. E, Catheterization of right renal artery. F, Skeletonization of portal vein.

Figure 1 Operative steps for the liver arterial blood supply



注:A:斜45°半剪开门静脉;B:斜形45°剪开门静脉,圆圈内数字代表钟表的时间,管壁外数字表示缝合顺序;C:门腔静脉吻合示意图,a:拐角两点水平褥式缝合;D:门静脉下腔静脉吻合口(0 h);E:取材吻合口通畅(168 h);F:人为制造小气泡观察管是否通畅。

图2 肝双重动脉血供手术步骤及手术技巧简图

Note. A, Oblique 45° half cut open-door vein. B, Oblique 45° cut open-door vein, the circle is the cross-section of blood vessel. The number in the tube wall represents the time of the clock and the number outside the tube wall indicates the suture sequence. C, Schematic diagram of portal vein anastomosis. a, Horizontal mattress suture at two points at the corner. D, Portal vena cava anastomosis (0 h). E, Unobstructed anastomosis (168 h). F, Artificially made small bubbles to observe whether the tube is unobstructed.

Figure 2 Schematic diagram of the operative steps and surgical technique for the liver dual arterial blood supply

序无需反复翻转血管牵引缝合,可以避免上述情况发生。门腔静脉吻合时需将系膜组织以及肠管整体向左侧翻转,血管吻合时存在一定的张力,“米”顺序吻合时“0”“6”两点拐角位置尤为明显,当恢复正常解剖位置时,容易渗、出血。前期训练组常规方法吻合拐角,有渗血数量为10只,需用压迫3 min;术后出血死亡数为8只,尸检发现大部分是因两拐角出现问题,这种现象与门腔静脉血管解剖位置、吻合手法技巧有关。在此,笔者课题组创新

性采用拐角两点水平褥式缝合法,既有利于外翻缝合,又让拐角结合处受力均匀,避免血管牵张力不均而形成漏,又使吻合口出血极少。36只模型组大鼠使用拐角两点水平褥式缝合法后实现了术中吻合口出血极少,术后出血死亡数为零。但需注意水平褥式缝合时缘距及针距不可过大,否则易狭窄。

门静脉动脉化时,因动脉壁厚且直径小,静脉壁薄且直径大,如直接吻合并发症多,且不易控制血流量。既往文献研究证实,门静脉压力过高过低

都会抑制肝再生<sup>[18-20]</sup>。本研究借助内径 0.5 mm 聚乙烯管将右肾动脉血液引入门静脉,形成肝双重动脉血供。此管内径出血量与门静脉原有血流量相似,且可避免血管吻合所带来并发症。门静脉血流通畅是保证模型成功的基础,既往有文献报道,门静脉动脉化后肝萎缩,考虑与门静脉架桥血流不通畅有关<sup>[18]</sup>。架桥血管是否通畅,包含肾动脉侧因素、架桥血管因素以及门静脉侧因素。肾动脉侧需注意假道,肾动脉插入聚乙烯管时易把动脉内膜或肌层强推到管径内人为造成堵塞。此时手法技巧很重要,本研究首次使用斜形半剪开肾动脉后,镊子轻提肾动脉断端的全层,管旋转插入可避免。

门静脉侧置管,是本研究的创新点之一,本研究首次提出利用自身牵引法,斜形 45°半剪开门静脉方法(图 2A 注意角度及位置)置管,然后离断,避免了门静脉回缩。45°斜切可使吻合口面积扩大 2 倍,不至于产生吻合口狭窄。此外,还需观察右肾动脉血液流出情况。可以短暂开放右肾动脉,如血流速度快,呈喷射状,可以置入;如血流速度较慢,注意观察右肾动脉有无分支。如有,需结扎肾动脉分支,否则会影响血流速度。操作过程中,保持肝素水不定时冲洗聚乙烯管腔,防止血栓形成。

### 3.2 并发症的预防

血管吻合前已述及,是模型制备的关键,而由血管吻合导致的并发症发生率可以通过大量的模拟训练降低或避免。除此而外,其他并发症亦影响模型制备的效果和成功率,如模型操作过程中脏器功能保护、麻醉护理等等。通过前期模拟操作后,造模组仍有 4 只大鼠死亡,其原因考虑如下。

#### 3.2.1 出血

分术中出血及术后出血,术后出血在门腔静脉吻合处已经谈及,此处不再赘述。术中出血多发生在门静脉骨骼化过程中,由于门静脉解剖结构复杂,门静脉下方紧贴肝固有动脉,左侧有脾动静脉分支,且无明显分离界限,由纤维组织缠绕相连。因此,术中动作尽量轻柔,必要时可用显微剪刀剪断纤维组织,不可强撕扯,易造成血管壁破裂。本组没有术中出血导致的死亡,但术中出血影响术后存活。

#### 3.2.2 肺栓塞

为最严重及最常见的并发症之一。熟练显微操作,缩短手术阻断时间是关键因素之一,同时皮下注射低分子肝素钙<sup>[21]</sup>。及时清理吻合口周围微

小杂物,缝合完毕前肝素水多次冲洗管腔。在吻合最后一针前,短暂开放门静脉释放淤阻的高凝血液与血凝块。通过改进,造模组此并发症大大减少,但仍有 2 只动物因此而死亡。

#### 3.2.3 肝坏死

尸检时发现肝土黄色改变,肝表面有散在出血点。前已述及,结扎肝蒂时线尽量靠近预切除的肝叶,同时注意不能结扎了肝叶后方的下腔静脉。本组有 1 例动物肝坏死死亡,考虑与此有关。

#### 3.2.4 肠道坏死

避免肠管长时间受到压力,暴露视野时,可暂将肠道置于腹腔外。每隔 3 min 暴露的肠管上滴加生理盐水,肠管放回原位时,采用棉签轻拨、动作轻柔,避免肠道折叠甚至打结造成肠梗阻。吻合口狭窄、血栓形成也是肠道坏死的重要原因,术后第 1 天内禁食,可预防急性胃肠扩张。通过模拟训练,此种情况在后期较为少见。

#### 3.2.5 感染

由于实验环境在相对无菌条件下进行,加之术中及术后 3 d 常规应用青霉素肌注,同时注意术中严格按照无菌操作进行。本组大鼠均未因感染而死亡。

围术期护理方面:(1)吸入性麻醉剂异氟烷在肝代谢率低,肝毒性小,对胃肠道机能影响小,是理想的麻醉剂<sup>[22]</sup>。术中麻醉剂摄入量越小,副作用越小。当术中调整至浓度 1.5% 甚至更低时,此时应密切注意大鼠呼吸频率及幅度。当在大鼠出现首次惊厥,或呼吸频率急促,表示大鼠即将苏醒,说明给的剂量低,大鼠会在 3~5 min 内恢复意识。需立即调高流量 0.3%~0.5% 剂量。(2)术前肌注阿托品,可减少呼吸道分泌物、防止窒息等并发症。(3)因门腔静脉吻合时需阻断门静脉、下腔静脉血液回流,时间过长易致缺氧性酸中毒,适当的补充碳酸氢钠则可改善肠道缺血缺氧再灌注损伤形成的酸中毒。(4)皮下注射低分子肝素钙可预防长时间血流阻断,细小血凝块析出致肺栓塞发生的几率。(5)术后 24 h 内需禁食,进食可能因手术、麻醉等致胃肠蠕动功能降低,有可能导致急性胃肠扩张,必要时可行胃插管进行胃肠减压对症治疗,可建议给予颈部皮下注射生理盐水、5% 葡萄糖及 5% 碳酸氢钠共 4 mL(比例 3:3:1 配置)进行基础能量补充。术后第 1 天再给予鼠粮进食。

综上所述,多种因素都能影响 LDABS 动物模型

的存活。因此,必须重视操作中所有细节。熟练进行显微外科手术,精准手术是缩短操作过程及减少手术并发症的前提;良好的麻醉控制,稳定的血流动力学及术后围手术期精心护理等才能够使手术成功率大大提高。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Qiao J, Han C, Zhang J, et al. A new rat model of auxiliary partial heterotopic liver transplantation with liver dual arterial blood supply [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(2): 367-371.
- [ 2 ] Matzander U. First experiences with liver arterialization following portacaval anastomosis [J]. *Langenbecks Arch Chir*, 1969, 325: 1134-1139.
- [ 3 ] Li J, Zhang Y, Ren J, et al. Improved donor liver position selection and revascularization for heterotopic auxiliary liver transplantation with portal vein arterialization [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18638-18646.
- [ 4 ] Yoshiya S, Yoshizumi T, Iseda N, et al. Anastomosis of the common hepatic artery and round ligament as portal vein arterialization for hepatic artery occlusion after deceased donor liver transplantation: a case report [J]. *Transplant Proc*, 2020, 52(2): 641-643.
- [ 5 ] Ashour MT, Elsebae M, Ezzat H, et al. Partial portal vein arterialization maintains regeneration after critical major hepatectomy: experimental study [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2015, 45(1): 167-175.
- [ 6 ] Qiao JL, Sun J, Li J, et al. Liver dual arterial blood supply maintains liver regeneration: Analysis of signaling pathways in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 979-987.
- [ 7 ] Cheng Y, Chen Y, Jiang Y, et al. Ten-year survival after portal vein arterialization in liver transplantation [J]. *Ann Palliat Med*, 2019, 8(5): 790-792.
- [ 8 ] Au KP, Chok KSH, Sin SL, et al. Partial portal vein arterialization using right gastroepiploic artery: A novel solution for portal hypoperfusion [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018, 17(4): 367-370.
- [ 9 ] Fernández-Rodríguez OM, Ríos A, Palenciano C, et al. A hemodynamic, metabolic and histopathological study of a heterotopic auxiliary swine liver graft with portal vein arterialization [J]. *Cir Esp*, 2016, 94(2): 77-85.
- [ 10 ] 吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 小鼠实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 107-113.
- [ 11 ] Ferede AA, Walsh AL, Davis NF, et al. Warm ischemia time at vascular anastomosis is an independent predictor for delayed graft function in kidney transplant recipients [J]. *Exp Clin Transplant*, 2020, 18(1): 13-18.
- [ 12 ] Batra K, Chamrathy MR, Reddick M, et al. Diagnosis and interventions of vascular complications in lung transplant [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2018, 8(3): 378-386.
- [ 13 ] 苏卓经, 黄海龙. 小型猪头颈部动脉血管的解剖结构与三维建模 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(5): 95-99.
- [ 14 ] 陈永亮, 黄志强, 王迎宾. 门静脉动脉化对实验性梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡的影响 [J]. *中华普通外科杂志*, 2000, 15(6): 348.
- [ 15 ] 陈鹏, 江艺, 张小进. 门静脉动脉化治疗大鼠急性肝衰竭 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(12): 1895-1901.
- [ 16 ] 梁东彦, 岳中瑾, 郭庆华, 等. 硬膜外导管在大鼠肾移植血管吻合中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(9): 19-21.
- [ 17 ] Qiao JL, Wang ZY, Zhang JJ, et al. Assisting suspension triangulated continuous suture technique for microvascular anastomosis in rat portocaval shunt [J]. *Microsurgery*, 2015, 35(2): 166-167.
- [ 18 ] Müller V, Brummer D, Kissler H, et al. Effects of portal vein arterialization on regeneration and morphology in liver transplantation: investigations using the rat model [J]. *Transplantation*, 2004, 78(8): 1159-1165.
- [ 19 ] Zhang JJ, Niu JX, Dong C, et al. Portal vein arterialization used in partial hepatectomy maintains liver regeneration [J]. *Sci Res Essays*, 2011, 6(30): 6325-6330.
- [ 20 ] Schleimer K, Stippel DL, Kasper HU, et al. Portal vein arterialization increases hepatocellular Apoptosis and inhibits liver regeneration [J]. *J Surg Res*, 2008, 149(2): 250-258.
- [ 21 ] 金大鹏, 王文丰, 赵秀娟, 等. 低分子肝素钙改良皮下注射抗血栓的临床效果 [J]. *中国医药导报*, 2017, 14(28): 65-68.
- [ 22 ] 孙安会, 谷捷, 吴涛, 等. 四种常用实验麻醉药物对大鼠心血管系统的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2): 120-126.

[ 收稿日期 ] 2020-08-13

吕晗莹,宋翼升,王汉波,等. 去壁灵芝孢子粉幼龄大鼠安全性评价研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 21-30.  
Lyu HY, Song YS, Wang HB, et al. Safety evaluation of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder in juvenile rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 21-30.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.004

## 去壁灵芝孢子粉幼龄大鼠安全性评价研究

吕晗莹<sup>1</sup>,宋翼升<sup>1</sup>,王汉波<sup>2</sup>,李振皓<sup>2</sup>,徐靖<sup>2</sup>,张城达<sup>1</sup>,杨倩<sup>1</sup>,  
刘靖<sup>1</sup>,谢锋<sup>1</sup>,黄敏聪<sup>1</sup>,陈云祥<sup>1</sup>,张立将<sup>1\*</sup>

(1.杭州医学院(浙江省医学科学院)安全性评价研究中心,杭州 310053;2.金华寿仙谷药业有限公司,浙江 金华 321299)

**【摘要】** 目的 研究去壁灵芝孢子粉6周重复给药对幼龄大鼠各系统发育的影响及其毒性反应。方法 24日龄(postnatal day, PND24)幼龄SD(Sprague-Dawley)大鼠128只,采用体重均衡法分为溶媒对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组32只,雌雄各半,经口灌胃分别给予纯水、去壁灵芝孢子粉0.8、1.8和4.0 g/kg剂量,给药体积均为10 mL/kg,每天给药1次,连续给药6周(42 d),于停药次日、停药4周分别剖检每组雌雄大鼠10/16只、6/16只;检测常规毒性指标和生长发育、骨骼发育、行为学、性激素、免疫系统发育等指标。结果 去壁灵芝孢子粉各剂量对幼龄SD大鼠临床症状、体重、摄食、性征发育、行为学、血液学、血清生化学、眼科、生长激素、性激素、骨骼系统发育、免疫学、组织病理学等指标均未见明显毒性影响;仅出现以高剂量为主的雌雄大鼠部分尿液指标可逆性异常(停药4周后恢复正常),考虑与供试品成分或其代谢产物经尿液排泄有关;各剂量组水迷宫实验中潜伏期时间减少、空间探索测定目标象限内时间百分比增加,提示学习记忆能力增强,考虑不排除可能与其药理学作用有关。结论 去壁灵芝孢子粉对幼龄SD大鼠未见明显毒性反应,未观察到不良反应剂量(no-observed adverse effect level, NOAEL)为4.0 g/kg。

**【关键词】** 去壁灵芝孢子粉;儿科药物;幼龄动物试验;重复给药毒性

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0021-10

## Safety evaluation of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder in juvenile rats

LYU Hanying<sup>1</sup>, SONG Yisheng<sup>1</sup>, WANG Hanbo<sup>2</sup>, LI Zhenhao<sup>2</sup>, XU Jing<sup>2</sup>, ZHANG Chengda<sup>1</sup>, YANG Qian<sup>1</sup>,  
LIU Jing<sup>1</sup>, XIE Feng<sup>1</sup>, HUANG Mincong<sup>1</sup>, CHEN Yunxiang<sup>1</sup>, ZHANG Lijiang<sup>1\*</sup>

(1. Center of Safety Evaluation, Hangzhou Medical College (Zhejiang Academy of Medical Sciences), Hangzhou 310053, China.  
2. Jinhua Shouxian Valley Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 321299)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects and toxicity of repeated administration of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder for 6 weeks on the development of various systems in juvenile rats. **Methods** One hundred twenty-eight juvenile SD rats aged 24 days (postnatal day, PND24) were divided into vehicle control, low-dose, medium-dose and high-dose groups by the weight balance method. Each group was composed of 32 rats (half male and half female), and received pure water or wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder 0.8, 1.8 and 4.0 g/kg doses by gavage, respectively, each in a volume of 10 mL/kg, once a day for 6 consecutive weeks (42 d). The day after drug withdrawal and 4 weeks after drug withdrawal, 10/16 and 6/16 rats in each group were necropsied, and routine toxicity indicators and

**【基金项目】**浙江省重点研发计划项目(2020C03053,2021C03077);浙江省基础公益研究计划项目(LGF18H310004);浙江省实验动物科技计划项目(2018C37127)。

**【作者简介】**吕晗莹(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:幼龄动物毒理学。E-mail: 15168236539@163.com

**【通信作者】**张立将(1981—),男,博士,研究员,研究方向:药物毒理学研究和评价。E-mail: zhanglj127@163.com

indicators of growth and development, bone development, behavior, sex hormones, immune system development, and other indicators were detected. **Results** Each dose of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder had no significant toxic effects on the clinical symptoms, weight, food intake, sexual development, behavior, hematology, serum biochemistry, ophthalmology, growth hormones, sex hormones, skeletal system development, immunology, histopathology, or other indicators of juvenile SD rats. However, the rats in the high-dose group had reversible abnormalities in some urine indicators (all returned to normal after 4 weeks of drug withdrawal), which was considered to be related to the urine excretion of the test product components or their metabolites. In the water maze test of each dose group, the incubation period decreased, and the percentage of time in the target quadrant, as measured by space exploration, increased, suggesting that the learning and memory ability was enhanced, which may be related to its pharmacological effects. **Conclusions** Wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder has no obvious toxic effects in juvenile SD rats, and the NOAEL was 4.0 g/kg.

**【Keywords】** wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder; pediatric drugs; juvenile animal study (JAS); repeated dose toxicity

灵芝孢子粉是灵芝生长后期从其菌褶中生长的微小卵形生殖细胞,即灵芝的种子,其在生物学上也被称为“担孢子”<sup>[1]</sup>。灵芝孢子粉的化学成分主要包括多糖类、三萜类、蛋白质、甾醇类、核苷类、微量元素等,其中总三萜、总多糖被认为是主要的活性成分<sup>[2]</sup>。已有大量研究表明,灵芝孢子粉具有提高免疫<sup>[3-4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5-6]</sup>、护肝<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>等功效。灵芝孢子壁主要由几丁质等成分构成,不易消化;为提高生物利用度,发展了灵芝孢子破壁技术,其药效也明显提高,但目前国内外的破壁技术不能去除残留的孢子壁,其有效成分含量并没有显著提高<sup>[9]</sup>。而新兴的去壁技术能将非药用、约占孢子粉 2/3 重量的孢子壁有效分离,获得的去壁灵芝孢子粉活性物质大幅度提高<sup>[4,10]</sup>。

目前尚未见灵芝孢子粉在儿童及幼龄动物安全性方面的相关报道,为了推广去壁灵芝孢子粉的应用范围、增加儿童适用人群,考察评估去壁灵芝孢子粉在儿童应用中的安全性,作者开展了幼龄大鼠安全性评价试验。通过考察连续给予幼龄 SD 大鼠去壁灵芝孢子粉 6 周(停药恢复 4 周)可能产生的不良反应以及对幼龄动物的性发育、行为学(学习记忆)、骨骼发育等影响,确定未观察到不良反应剂量,判断“去壁灵芝孢子粉”对幼龄大鼠重复给药的毒性靶器官或靶组织,为儿科用药的临床试验及临床应用提供参考数据,并提示临床中可能需重点监测的指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 128 只, PND24, 雌雄各半, 雄鼠重 34.1~48.8 g, 雌鼠重 35.2~46.5 g, 购于浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-

0001], 动物饲养于浙江省医学科学院安全性评价研究中心屏障系统动物房[SYXK(浙)2017-0010]。本试验通过实验动物管理和使用委员会(IACUC)审核动物伦理(GLP-2020-035),符合 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

去壁灵芝孢子粉(金华寿仙谷药业有限公司,批号:20200301,含量:粗多糖(以葡萄糖计)21.4 g/100 g,总三萜(以齐墩果酸计)5.7 g/100 g),棕褐色粉末,溶于水,临用前用纯水配制成给药浓度。

生化检测试剂(德国 DiaSys Diagnostic Systems GmbH);血液学检测试剂(Siemens);大鼠生长激素、大鼠睾酮、大鼠雌二醇 ELISA 试剂盒(Elabscience)。

Top Scan 动物行为分析系统(CSI 公司);CA-1500 全自动血凝分析仪(日本 Sysmex);7100 全自动生化分析仪(日本日立);N-600 尿液分析仪(长春迪瑞);ADVIA2120 全自动血细胞分析仪(美国 Bayer);Welch Allyn 12500-YD 双目间接检眼镜(美国伟伦)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组和剂量设计

采用体重均衡法随机将大鼠分为溶媒对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 32 只,♀♂各半,分别经口灌胃给予纯水、去壁灵芝孢子粉 0.8、1.8 和 4.0 g/kg,给药体积均为 10 mL/kg, PND24 开始给药,每天给药 1 次,连续给药 6 周,停药后恢复观察 4 周。

#### 1.3.2 检测指标

试验期间每天观察大鼠的一般情况;大鼠摄食量和体重在给药期间称量 2 次/周,恢复期称量 1 次/周;雄鼠和雌鼠分别于 PND39~PND46 和 PND28~PND36,每天进行性征发育观察(龟头包皮分离/阴道张开情况);停药检查和恢复期结束检查

分别进行行为学评价(全部大鼠)、水迷宫实验(6 只/性别/组);停药检查和恢复期结束时分别随机抽 80 只(每组 20 只, ♀ ♂ 各半)和 48 只(每组 12 只, ♀ ♂ 各半),并进行常规重复给药毒性指标以及生长发育相关毒性指标检查,主要包括一般反应(外观体征、行为活动、粪尿性状、死亡情况等),生长发育指标(体重、摄食量、性征发育),行为学(一般行为学评价;改良 Irwin's 行为学评价方法;学习记忆能力:Morris 水迷宫实验),血液学,凝血指标,血清生化学,尿液指标,眼科检查指标,激素相关指标(生长激素、雌二醇、睾酮),骨骼检查指标,组织病理学(心脏、脾、肺、肝、肾、肠道、脑(大脑、小脑、脑干)、垂体、胸腺等 40 种脏器组织)。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 进行统计学分析,计量资料采用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )描述,选用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性分析;计数资料选用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验)进行显著性分析;显著性检验水准  $\alpha$  为 0.05。

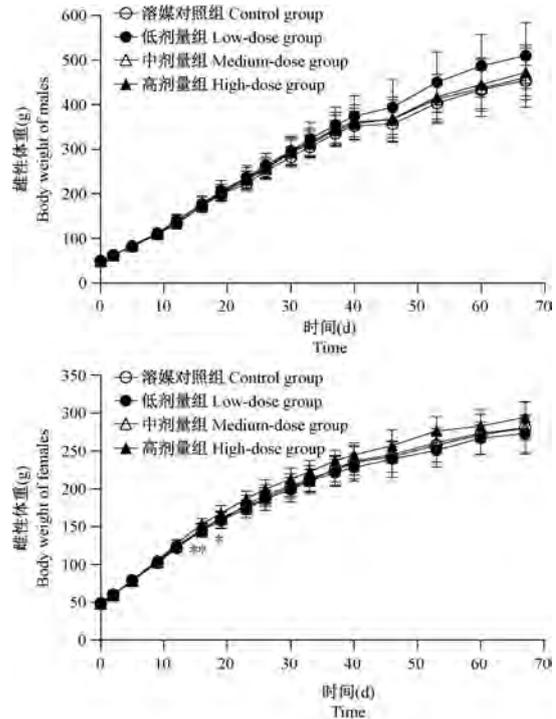
2 结果

2.1 一般情况、体重和摄食量

整个实验期间,各组雌雄大鼠均未见明显异常反应,未出现动物死亡或濒死。各剂量组雌雄大鼠体重及摄食量均未见明显毒性影响,仅高剂量组雌鼠给药第 16、19 天的体重、高剂量雄鼠第 4 天、低剂量组雄鼠第 45 天的摄食量高于溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其余给药时期和恢复期各组雌雄大鼠的体重、摄食量均未见明显变化 ( $P > 0.05$ ),如图 1 和图 2 所示。上述体重、摄食量变化幅度较小,无明显剂量-时效关系,且体重和摄食量增加一般均非毒性表现,结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据、长期研究经验等其他各方面因素,故考虑为无明显毒理学意义。

2.2 血液学

各剂量去壁灵芝孢子粉对雌雄大鼠的血液学指标均未见明显毒性影响。仅出现个别指标的波动:停药时,中剂量组雌鼠的活化部分凝血酶时间低于相应时间的溶媒对照组 ( $P < 0.01$ );恢复期结束时,低剂量组雄鼠的凝血酶原时间和高剂量组雌鼠的平均血小板体积高于相应时间的溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),低剂量组雌鼠的纤维蛋白原和高剂量组雄鼠的红细胞体积分布宽度低于相应时间



注:与溶媒对照组比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。下同。  
 Figure 1 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on body weight of juvenile SD rats  
 Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . The same as below.

Figure 1 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on body weight of juvenile SD rats

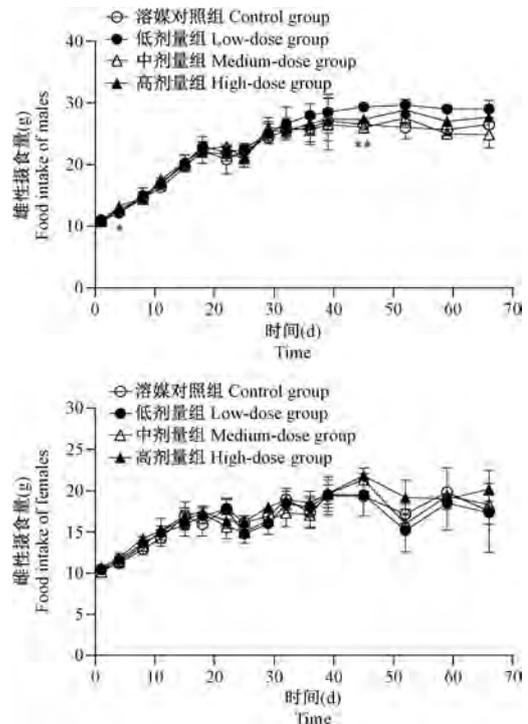


Figure 2 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on food intake of juvenile SD rats

的溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 如表 1 所示。但上述异常指标的波动幅度小, 无明显剂量反应关系, 且与凝血、红细胞相关的其他指标均未见显著性异常, 结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据等各方面因素, 考虑无毒理学意义。

### 2.3 血清生化学

各剂量去壁灵芝孢子粉对雌雄大鼠血液学指标均未见明显毒性影响。仅出现个别指标的波动: 停药时, 高剂量组雄鼠的  $\text{Na}^+$ 、雌鼠的  $\text{Cl}^-$  和中剂量组雌鼠的  $\text{Cl}^-$  高于相应时间的溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 中剂量组雌鼠的肌酐和高剂量组雌鼠的肌酐、肌酸磷酸激酶低于相应时间的溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 如表 2 所示。但上述异常指标的波动幅度较小, 且无明显的剂量-反应关系, 结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据等各方面因素, 考虑无毒理学意义。

### 2.4 尿液、眼科检查

去壁灵芝孢子粉对停药检查时各剂量组雌雄

大鼠尿液指标有一定的异常影响: 停药时, 高剂量组雌雄大鼠的尿胆原、胆红素、蛋白质、酮体、比重、维生素 C、微白蛋白和中剂量组大鼠的微白蛋白、白细胞高于相应时间的溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 低、中、高剂量组雌雄大鼠的 pH 值均低于相应时间的溶媒对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 恢复期结束时, 各组上述指标均恢复至正常, 如表 3 所示。上述尿液指标存在剂量-反应关系, 但在停药后均可恢复至正常, 考虑可能与服用大量高浓度的去壁灵芝孢子粉后随尿液排出的药物原型或代谢产物的理化性质有关, 结合肾功能相关血清生化指标和肾组织病理学检查结果未见明显异常, 且上述异常波动范围较小, 结合统计学结果和生物学/临床意义、长期研究经验等其他各方面因素, 故综合考虑其无明显的毒理学/临床意义。

眼科检查未见与去壁灵芝孢子粉相关的明显异常影响。

表 1 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠血液学的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on hematology in juvenile rats

检测阶段 Detection phase	检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
停药检查 Drug withdrawal period	活化部分凝血酶时间(s)	♂	15.7±1.2	15.3±0.5	15.5±0.9	16.1±1.1
	APTT	♀	17.6±0.7	17.3±0.8	16.2±0.9**	16.9±0.8
	红细胞体积分布宽度(%)	♂	12.1±0.5	11.7±0.4	11.6±0.5	11.3±0.4**
	RDW	♀	11.2±0.1	11.0±0.1	11.2±0.3	11.1±0.2
恢复期结束检查 End of recovery period	平均血小板体积(fL)	♂	9.5±0.7	9.5±0.4	9.0±0.6	9.6±0.2
	MPV	♀	9.0±0.6	9.4±0.3	8.9±0.3	9.7±0.4*
	凝血酶原时间(s)	♂	10.8±0.5	11.7±0.9*	11.1±0.5	10.6±0.4
	PT	♀	9.1±0.6	9.5±0.4	9.9±0.7	9.1±0.3
	纤维蛋白原(g/L)	♂	2.1±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1	2.0±0.1
	Fbg	♀	1.9±0.0	1.6±0.1*	1.7±0.1	1.8±0.1

注:  $n=10$  (停药期),  $n=6$  (恢复期结束)。与溶媒对照组比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note.  $n=10$  (Drug withdrawal period),  $n=6$  (End of recovery period). Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表 2 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠血清生化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on serum biochemistry in juvenile rats

检测阶段 Detection phase	检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
停药检查 Drug withdrawal period	肌酐( $\mu\text{mol/L}$ )	♂	41.8±2.4	39.7±2.5	38.6±3.3	38.1±6.0
	Crea	♀	43.5±3.2	42.7±5.2	38.9±3.1*	39.3±3.5*
	肌酸磷酸激酶(IU/L)	♂	817.6±125.4	772.8±240.3	694.8±201.8	614.7±183.3
	CK	♀	605.0±210.5	526.1±154.5	520.5±102.6	385.7±111.6**
	钠离子(mmol/L)	♂	145.8±1.5	147.0±0.9	147.3±0.8	148.2±1.0**
	$\text{Na}^+$	♀	146.4±1.2	147.3±0.7	147.4±1.3	147.8±1.2
	氯离子(mmol/L)	♂	107.8±1.9	108.2±1.2	108.6±1.2	109.1±1.4
	$\text{Cl}^-$	♀	108.2±1.0	109.1±1.1	109.3±1.5*	109.8±1.0**

注: 与溶媒对照组比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。下表同。

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . The same as below.

**表 3** 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠尿液指标的影响(停药检查期)( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
**Table 3** Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on urine indexes of juvenile rats (Drug withdrawal period)

检测指标 Test items	结果等级 Results classification	各等级比例(%) Ratio of each grade							
		溶媒对照组 Control group		低剂量组 Low-dose group		中剂量组 Medium-dose group		高剂量组 High-dose group	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
尿胆原(μmol/L) URO	Normal	100	100	100	100	80	100	40**	100
	1+	0	0	0	0	20	0	60	0
胆红素(μmol/L) BIL	Neg	100	100	100	100	90	100	40**	100
	1+	0	0	0	0	10	0	60	0
蛋白质(g/L) Protein	Neg	90	100	30	80	30	80	0**	40*
	Trace	10	0	40	20	20	20	20	60
	1+	0	0	20	0	50	0	70	0
酮体(mmol/L) KET	2+	0	0	10	0	0	0	10	0
	Neg	20	100	10	80	10	70	0	30**
	+-	80	0	60	20	60	30	80	70
白细胞(Leuko/μL) LEU	1+	0	0	30	0	30	0	20	0
	Neg	0	70	0	30	0	10*	0	20
	+-	60	30	20	60	30	70	20	80
比重 SG	1+	40	0	40	10	50	20	70	0
	2+	0	0	40	0	20	0	10	0
	<= 1.005	20	80	0	10	20	50	0*	0**
	1.01	50	0	20	0	0	10	0	10
	1.015	20	20	20	40	10	10	10	0
	1.02	10	0	30	40	10	20	0	10
pH	1.025	0	0	30	10	40	0	20	50
	>= 1.030	0	0	0	0	20	10	70	30
	5.5	0	0	0	20*	10*	0	20**	30**
	6	10	0	20	60	60	20	70	60
	6.5	10	20	20	0	20	10	0	10
	7	40	40	30	10	0	30	0	0
维生素 C(mmol/L) VC	7.5	40	30	30	10	10	40	0	0
	8	0	10	0	0	0	0	10	0
	0	100	100	70	40	80	70	10**	20**
	0.6	0	0	30	50	10	20	70	60
微白蛋白(g/L) MALB	1.4	0	0	0	10	10	0	10	0
	2.8	0	0	0	0	0	10	10	20
	Neg	0	70	0	10	0	20	0	0

### 2.5 生长发育、激素及骨骼系统发育

去壁灵芝孢子粉各剂量组所有雄鼠龟皮分离完成的时间段为 PND39~PND46, 所有雌鼠阴道张开完成的时间段为 PND28~PND36, 与溶媒对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ), 如表 4 所示。各剂量去壁灵芝孢子粉对雄鼠龟皮分离完成的时间、雌雄大鼠的生长激素、性激素(睾酮、雌二醇)指标均未见明显毒性影响; 对雌雄大鼠的骨骼系统发育指标(股骨长、骨密度)也未见明显毒性影响。

骨骼发育指标显示, 除恢复期结束时高剂量组雌鼠的股骨骨密度高于溶媒对照组( $P < 0.01$ )外, 其余各剂量组雌雄大鼠的骨骼系统发育指标与溶媒

对照组均无显著性差异( $P > 0.05$ )。上述异常指标波动幅度较小, 且一般情况下骨密度小幅升高非毒性表现, 故考虑无明显毒理学意义。

激素检测结果显示, 仅停药时低、中剂量组雄鼠的血清雌二醇水平高于溶媒对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 如表 5 所示, 其余停药及恢复期各剂量组雌雄大鼠的睾酮、雌二醇及生长激素水平与溶媒对照组比较均无显著性差异( $P > 0.05$ )。上述异常指标的波动无明显剂量-反应关系, 且波动幅度较小, 结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据、长期研究经验等其他各方面因素, 考虑为无毒理学意义的个体波动。

## 2.6 去壁灵芝孢子粉对行为学的影响

改良 Irwin's 行为学评价结果显示(如表 6 所示):给药中期检查的低剂量组“应激性发声”(20/32 只)、高剂量组“应激性发声”(19/32 只)的发生率高于溶媒对照组(7/32 只)( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );给药中期各剂量组其他指标,以及停药及恢复期结束时各剂量组所有指标均与溶媒对照组无显著性差异( $P > 0.05$ )。上述异常可能与试验前期幼龄大鼠年龄小及对灌胃给药不适应引起的应激反应,且无明显剂量-反应关系,考虑为无毒理学意义。

Morris 水迷宫实验结果显示(如表 7 所示),与溶媒对照组相比,恢复期中、高剂量组雄鼠训练第 2 天的潜伏期时间缩短( $P < 0.05$ ),低、中、高剂量组雄鼠及低、中剂量组雌鼠空间探索测定中目标象限内时间百分比升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );停药及恢复期结束时其余各剂量组雌雄鼠的潜伏期时间和空间探索测定指标无明显变化。上述结果提示各剂量组大鼠可以用更短的时间找到平台或在目标象限内的活动时间更多,可能为学习记忆能力增强而非毒性表现;鉴于有明显的剂量-反应关系,考虑可能为灵芝孢子粉的药理学作用表现。

## 2.7 对脏器重量和系数及组织病理学

如表 8 所示,停药时,高剂量组雌鼠的心脏、肝重量高于溶媒对照组;恢复期结束时,低、中剂量组雄鼠的胸腺重量及系数高于溶媒对照组,但波动幅度均较小,且无明显剂量-反应关系,并未见相应的病理学改变,故考虑无明显毒理学意义;各剂量组雌雄鼠其余的脏器重量和系数未见明显变化。

病理学镜检结果显示,各组各脏器均未发现与去壁灵芝孢子粉相关的组织病理学改变(主要脏器见图 3)。

表 6 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠改良 Irwin's 行为指数的影响(发生次数/总数)( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 32$ )

Table 6 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on the modified Irwin's behavior index in juvenile rats (Number of occurrences/total number)

检测指标 Test items	分类 Classification	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
发声 Vocalisation	未发现 Not found	25/32	12/32*	21/32	13/32**
	应激性发声 Stress vocalization	7/32	20/32	11/32	19/32
应激行为 Stress behavior	未发现 Not found	32/32	30/32	32/32	31/32
	排尿 Urination	0/32	2/32	0/32	1/32
排粪 Defecation	未发现 Not found	32/32	29/32	30/32	31/32
	应激性排便 Stress defecation	0/32	3/32	2/32	1/32

## 3 讨论

儿童被认为容易受环境中药物或化学物质的毒性影响,这是由于儿童机体的各器官系统仍处于发育阶段,导致对药物的吸收、分布、代谢、排泄等方面与成人不同,因而在计算儿童药量时不能简单的在成人用药基础上推算,容易造成儿童用药错误<sup>[11-12]</sup>,医学史上也多次出现儿科用药不良反应<sup>[13-15]</sup>,对此

表 4 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠性发育的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 16$ )

Table 4 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on sexual development of juvenile rats

检测指标 Test items	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
阴道张开 Vaginal opening (PND)	32.7±1.4	31.9±1.7	32.3±1.0	31.6±1.8
包皮分离 Foreskin separation (PND)	41.3±1.8	41.6±1.9	41.3±1.3	41.9±1.8

表 5 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠性激素的影响(停药检查期)( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 5 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on the sex hormones of juvenile rats (Drug withdrawal period)

检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
雌二醇 E2	♂	4.06±0.93	5.22±0.39**	5.00±0.22*	4.53±0.33
	♀	5.47±1.28	5.00±0.43	5.22±0.52	4.81±0.35
睾酮 T	♂	2.63±1.84	3.00±1.67	2.41±0.89	3.53±1.58
	♀	0.90±0.16	0.94±0.07	0.99±0.15	0.83±0.10

有必要开展幼龄动物非临床安全性评价。幼龄动物重复给药毒性实验是用于评价药物非临床安全性的重要手段之一,对评估药物应用于临床后儿科用药人群的不良反具有重要意义<sup>[12,16]</sup>。幼龄动

物实验已广泛应用于化学药物<sup>[17]</sup>、癌症药物<sup>[18]</sup>、环境毒物<sup>[19]</sup>及各类中药<sup>[20-21]</sup>等。灵芝孢子粉已在大量研究中被证实,具有提高免疫、抗肿瘤、护肝、抗氧化等功效<sup>[3-4]</sup>,在成人中已有很广泛的应用。鉴

表 7 去壁灵芝孢子粉对幼年大鼠水迷宫实验的影响(恢复期结束)( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 7 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on water maze test in juvenile rats (End of recovery period)

检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High dose group
潜伏期 Incubation period	训练第 1 天潜伏期(s) Training day 1	♂ 30.23±33.38	♂ 22.49±20.49	♂ 35.06±35.96	♂ 25.89±18.92
	♀ 27.90±24.89	♀ 27.34±27.28	♀ 12.44±11.68	♀ 24.30±21.69	
	训练第 2 天潜伏期(s) Training day 2	♂ 30.82±31.12	♂ 15.25±15.39	♂ 9.51±9.06*	♂ 11.66±13.11*
	♀ 24.22±26.56	♀ 19.54±19.68	♀ 15.36±19.73	♀ 21.11±20.08	
	训练第 3 天潜伏期(s) Training day 3	♂ 21.20±28.81	♂ 20.99±24.72	♂ 15.49±14.42	♂ 15.71±15.59
	♀ 24.12±24.68	♀ 17.49±18.17	♀ 11.98±18.51	♀ 19.51±18.97	
空间探索 Space exploration	经过平台次数 Number of platform passes	♂ 2.00±1.41	♂ 3.33±2.42	♂ 4.83±2.86	♂ 4.83±1.72
	♀ 5.17±2.32	♀ 4.67±1.21	♀ 3.67±2.66	♀ 3.33±1.75	
	第一次经过平台的时间(s) Time to first pass the platform	♂ 42.19±39.17	♂ 18.36±22.24	♂ 12.24±10.67	♂ 20.70±25.02
	♀ 22.82±20.95	♀ 19.43±16.15	♀ 41.48±37.35	♀ 21.94±9.13	
目标象限内时间百分比(%) Percentage of time in target quadrant	♂ 26.40±7.01	♂ 40.17±14.69*	♂ 42.67±6.86*	♂ 45.93±12.63**	
♀ 30.32±9.67	♀ 48.33±11.27	♀ 49.88±12.43	♀ 41.63±14.59		

表 8 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠器官重量和系数的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 8 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on organ weight and coefficient of juvenile rats

检测阶段 Detection phase	检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group	
停药检查 Drug withdrawal period	心脏重量(g) Heart weight	♂ ♀	♂ 1.305±0.084 ♀ 0.890±0.077	♂ 1.319±0.097 ♀ 0.915±0.093	♂ 1.295±0.107 ♀ 0.915±0.067	♂ 1.294±0.123 ♀ 0.998±0.086**	
	心脏系数(%) Heart coefficient	♂ ♀	♂ 0.376±0.021 ♀ 0.391±0.025	♂ 0.368±0.029 ♀ 0.412±0.028	♂ 0.364±0.031 ♀ 0.397±0.025	♂ 0.371±0.021 ♀ 0.418±0.036	
	肝重量(g) Liver weight	♂ ♀	♂ 11.034±1.491 ♀ 7.519±0.712	♂ 11.642±1.910 ♀ 7.218±0.476	♂ 11.989±1.802 ♀ 7.330±0.672	♂ 11.535±1.275 ♀ 8.241±0.601*	
	肝系数(%) Liver coefficient	♂ ♀	♂ 3.161±0.235 ♀ 3.298±0.198	♂ 3.218±0.234 ♀ 3.258±0.173	♂ 3.357±0.308 ♀ 3.179±0.219	♂ 3.306±0.140 ♀ 3.446±0.181	
	脾重量(g) Spleen weight	♂ ♀	♂ 0.766±0.109 ♀ 0.611±0.111	♂ 0.794±0.081 ♀ 0.563±0.058	♂ 0.800±0.095 ♀ 0.609±0.066	♂ 0.779±0.073 ♀ 0.617±0.052	
	脾系数(%) Spleen coefficient	♂ ♀	♂ 0.220±0.025 ♀ 0.267±0.040	♂ 0.221±0.020 ♀ 0.253±0.017	♂ 0.225±0.020 ♀ 0.264±0.024	♂ 0.225±0.025 ♀ 0.258±0.025	
	肾重量(g) Kidney weight	♂ ♀	♂ 2.872±0.227 ♀ 1.939±0.212	♂ 3.073±0.404 ♀ 1.977±0.132	♂ 3.073±0.307 ♀ 2.082±0.149	♂ 3.058±0.261 ♀ 2.128±0.192	
	肾系数(%) Kidney coefficient	♂ ♀	♂ 0.826±0.046 ♀ 0.849±0.047	♂ 0.853±0.066 ♀ 0.892±0.043	♂ 0.863±0.041 ♀ 0.904±0.066	♂ 0.879±0.063 ♀ 0.889±0.062	
	恢复期结束检查 End of recovery period	心脏重量(g) Heart weight	♂ ♀	♂ 1.151±0.093 ♀ 0.975±0.056	♂ 1.627±0.240 ♀ 1.159±0.236	♂ 1.500±0.077 ♀ 0.971±0.064	♂ 1.555±0.180 ♀ 1.102±0.120
		心脏系数(%) Heart coefficient	♂ ♀	♂ 0.356±0.018 ♀ 0.368±0.027	♂ 0.350±0.046 ♀ 0.449±0.110	♂ 0.352±0.050 ♀ 0.366±0.019	♂ 0.352±0.018 ♀ 0.399±0.031
		肝重量(g) Liver weight	♂ ♀	♂ 11.665±1.460 ♀ 7.905±1.123	♂ 12.982±2.520 ♀ 7.842±0.705	♂ 11.596±1.648 ♀ 7.847±0.662	♂ 12.701±1.879 ♀ 8.519±0.624
		肝系数(%) Liver coefficient	♂ ♀	♂ 2.727±0.142 ♀ 2.961±0.217	♂ 2.772±0.349 ♀ 3.019±0.262	♂ 2.687±0.144 ♀ 2.957±0.147	♂ 2.865±0.104 ♀ 3.083±0.134
		脾重量(g) Spleen weight	♂ ♀	♂ 0.790±0.115 ♀ 0.622±0.049	♂ 0.876±0.135 ♀ 0.629±0.067	♂ 0.795±0.072 ♀ 0.625±0.111	♂ 0.784±0.117 ♀ 0.663±0.104
		脾系数(%) Spleen coefficient	♂ ♀	♂ 0.185±0.016 ♀ 0.236±0.032	♂ 0.188±0.022 ♀ 0.242±0.021	♂ 0.188±0.035 ♀ 0.236±0.038	♂ 0.177±0.017 ♀ 0.239±0.026
肾重量(g) Kidney weight		♂ ♀	♂ 3.143±0.353 ♀ 2.017±0.269	♂ 3.407±0.593 ♀ 2.024±0.181	♂ 3.183±0.299 ♀ 2.109±0.158	♂ 3.252±0.401 ♀ 2.180±0.154	
肾系数(%) Kidney coefficient		♂ ♀	♂ 0.735±0.033 ♀ 0.755±0.027	♂ 0.731±0.118 ♀ 0.778±0.033	♂ 0.742±0.066 ♀ 0.796±0.050	♂ 0.735±0.025 ♀ 0.790±0.053	
胸腺重量(g) Thymus weight		♂ ♀	♂ 0.350±0.052 ♀ 0.394±0.077	♂ 0.529±0.066** ♀ 0.406±0.069	♂ 0.503±0.099** ♀ 0.394±0.105	♂ 0.434±0.067 ♀ 0.420±0.089	
胸腺系数(%) Thymus coefficient		♂ ♀	♂ 0.082±0.015 ♀ 0.149±0.030	♂ 0.115±0.025* ♀ 0.156±0.021	♂ 0.118±0.028* ♀ 0.148±0.037	♂ 0.100±0.022 ♀ 0.152±0.028	

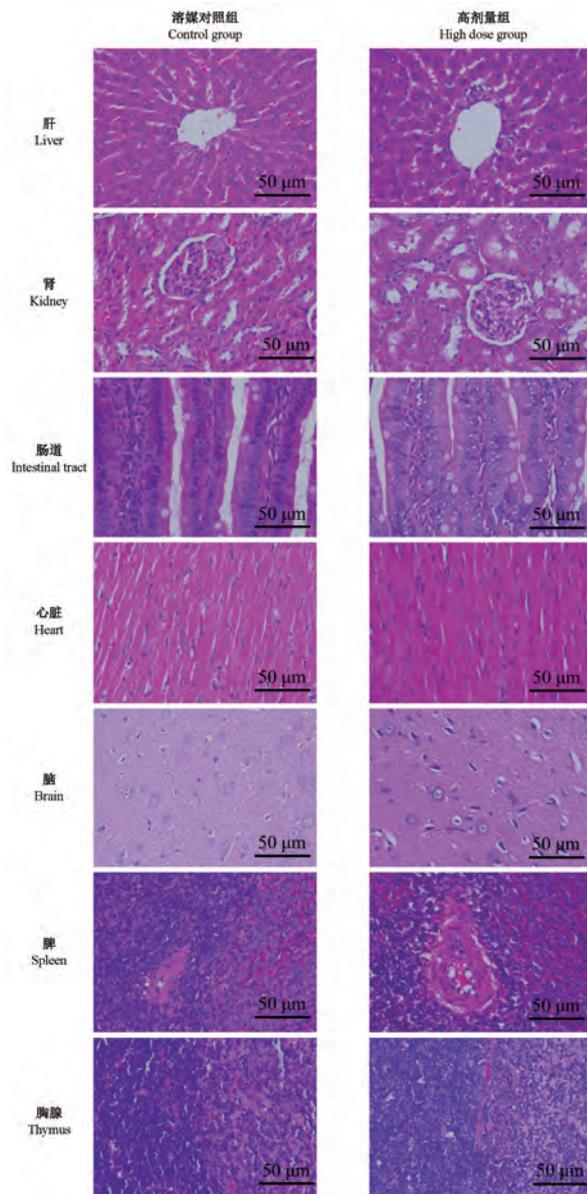


图3 停药检查时溶剂对照组和高剂量组幼龄大鼠各重要脏器病理学图片(HE染色)

Figure 3 Histopathological images of important organs of juvenile SD rats in control group and high-dose group at the time of drug withdrawal(HE staining)

于目前尚未见灵芝孢子粉在儿童及幼龄动物安全性方面的相关报道,本研究考察评估了去壁灵芝孢子粉对幼龄动物的重复给药毒性及发育相关性,为临床用于儿童提供安全性参考依据。

近年来,欧美国家开展不断完善相关指导原则,推动了儿科药物的开发<sup>[22]</sup>,如国际人用药品注册技术协调委员会(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)于2020年3月

31日颁布了《ICH S11协调指导原则:支持儿科药物开发的非临床安全性评价》<sup>[23]</sup>。在幼龄动物试验中,需要关注特殊的靶器官和指标,包括中枢神经系统、生殖功能、性发育标志等<sup>[24]</sup>。与化学药相比,中药非临床安全性评价中,应针对适应症及其处方组成和特性进行设计,加强激素水平检测,采用已知的临床提示指标并开展毒代动力学研究<sup>[24]</sup>。同时,在选择实验动物种属时还应考虑到发育毒性研究中所关注的机体器官系统与目标儿科人群经历同一阶段或相似的发育过程<sup>[25-26]</sup>,根据ICH S11指导原则,一般首选啮齿类动物(多选用大鼠)<sup>[27]</sup>。此外,非临床安全性评价可评估儿科药物对实验动物毒性反应(发育毒性)、剂量与毒性效应的关系、主要毒性靶器官、毒性反应是否可逆、能否很好地预测药物对人体的不良反应等,为临床安全用药的剂量设计提供参考依据,对开展相应临床研究具有一定的风险提示<sup>[28]</sup>。

在幼龄动物毒性实验设计中,幼龄动物的起始给药年龄及给药期限的选择需满足支持评估相应临床应用的儿童年龄范围及治疗周期。本实验主要为了预测2岁以上儿童服用去壁灵芝孢子粉可能产生的不良反应,基于各主要系统发育阶段的跨种属年龄对比,大鼠PND21~45d相当于人类的儿童期(2~12岁)<sup>[25]</sup>,故本研究幼龄大鼠选择PND24(约对应2岁儿童)开始给药至PND65(相当于已成年),此年龄段的大鼠发育阶段覆盖2岁儿童至成年的发育阶段,足以支持2岁以上儿童的临床实验及临床应用。根据临床拟用剂量为每人每次2克,用Meeh-Rubner体表面积计算公式进行剂量换算(以2岁儿童12kg体重、幼龄大鼠80g体重计),幼龄大鼠等效剂量约为0.76g/kg,故取整以0.8g/kg作为本试验的低剂量,即相当于幼龄大鼠的临床等效剂量;高剂量选择最大合适给药浓度0.4g/mL及最大给药体积10mL/kg,即4.0g/kg;而中剂量等比设置1.8g/kg。

本实验结果显示,幼龄SD大鼠(PND24)连续4周(PND24~PND65)重复经口给予去壁灵芝孢子粉(最高达4.0g/kg)后,一般反应(临床症状)、体重、摄食、性征发育、行为学、血液学、血清生化学、眼科、生长激素、性激素、骨骼系统发育、免疫学、组织病理学等指标均未见明显毒性影响,提示预测去壁灵芝孢子粉在儿童中应用无明显安全性担忧。

实验中行为学检测是为了评价给药后潜在的中枢神经系统发育影响及长期神经毒性<sup>[24]</sup>。Morris

水迷宫是应用最广泛的研究和评价动物空间学习记忆能力的经典行为学实验<sup>[29]</sup>;在 5 种迷宫中 (Morris 水迷宫、Y 迷宫、八臂迷宫、T 迷宫、Barnes 迷宫), Morris 水迷宫准确性更高<sup>[30]</sup>,且已被应用于药物毒理学<sup>[31]</sup>和药物对学习记忆障碍的改善研究<sup>[32-33]</sup>以及对啮齿类动物神经认知疾病模型的验证和神经认知治疗可行性的评估<sup>[34]</sup>等。在本研究 Morris 水迷宫试验结果显示,停药 4 周后各剂量组大鼠可以用更短的时间找到平台或在目标象限内的活动时间更多,提示学习记忆能力增强,并且有明显的剂量-反应关系,考虑不排除可能为灵芝孢子粉的药理学作用表现。

综上所述,幼龄 SD 大鼠连续 4 周 (PND24 ~ PND65) 重复经口给药毒性试验中,去壁灵芝孢子粉对幼龄 SD 大鼠未见明显一般毒性及发育毒性影响,NOAEL 确定为 4.0 g/kg (相当于 80 g 幼龄大鼠临床等效剂量的 5 倍,200 g 大鼠等效剂量的 6.6 倍),提示预测去壁灵芝孢子粉在儿童应用中无明显安全性担忧,为去壁灵芝孢子粉应用于儿科提供科学参考依据;同时本试验提示去壁灵芝孢子粉可能具有提高学习记忆能力作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 刘艳荣, 黄厚今. 灵芝孢子粉功能作用的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2016, 22(4): 65-69.
- [ 2 ] 李静静, 胡晓琴, 张新风, 等. 赤芝孢子粉和子实体主要化学成分变异规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4246-4251.
- [ 3 ] 宋柏捷, 朱孝娟, 魏丽娜. 灵芝孢子粉对小鼠的免疫调节及抑瘤作用研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(5): 464-466.
- [ 4 ] Wang PY, Zhu XL, Lin ZB. Antitumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from broken-spore of ganoderma lucidum [J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 135.
- [ 5 ] 闫征, 王宏旭, 刘莉莹, 等. 灵芝三萜类化合物的体外抗肿瘤活性研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(5): 633-634, 637.
- [ 6 ] Fukuzawa M, Yamaguchi R, Hide I, et al. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of ganoderma lucidum (reishi houshi) to its anti-tumor activity [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(10): 1933-1937.
- [ 7 ] 甄作均, 王峰杰, 计勇, 等. 灵芝孢子对原发性肝癌术后肝功能影响的研究 [J]. 中华普通外科学文献 (电子版), 2012, 6(3): 219-222.
- [ 8 ] 陈宝田, 龙亚秋, 李华, 等. 灵芝孢子粉的药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1439-1440.
- [ 9 ] 赵洁胜, 魏联, 虞燕萍, 等. 灵芝孢子粉破壁率的检验方法研究进展 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(5): 431-434.
- [ 10 ] Li Z, Shi Y, Zhang X, et al. Ganoderma lucidumscreening immunoactive compounds of spores by mass spectrometry molecular networking combined with zebrafish assays [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 287.
- [ 11 ] 黄芳华, 王庆利, Jim Ridings, 等. 对儿科药物开发的非临床安全性评价的考虑 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(18): 2052-2058.
- [ 12 ] 杨阳, 崇立明, 侯祎雯, 等. 刚离乳大鼠给予百蕊草浸膏粉的重复给药毒性评价方法探索 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 1841-1848.
- [ 13 ] Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, et al. Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review [J]. Neurology, 1987, 37(3): 379-385.
- [ 14 ] Weiss CF, Glazko AJ, Weston JK. Chloramphenicol in the newborn infant. A physiologic explanation of its toxicity when given in excessive doses [J]. N Engl J Med, 1960, 262: 787-794.
- [ 15 ] Gunter JB. Benefit and risks of local anesthetics in infants and children [J]. Paediatr Drugs, 2002, 4(10): 649-672.
- [ 16 ] 黄芳华, 朱飞鹏, 笪红远, 等. 中药儿科用药非临床安全性评价的一般考虑 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(24): 2779-2781.
- [ 17 ] 刘晓岩, 孙曼琴, 候杰. 环丙沙星对幼龄大鼠软骨的影响 [J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(6): 457-461.
- [ 18 ] Duarte DM. Use of juvenile animal studies to support oncology medicine development in children [J]. Reprod Toxicol, 2015, 56: 97-104.
- [ 19 ] Brent RL. Utilization of juvenile animal studies to determine the human effects and risks of environmental toxicants during postnatal developmental stages [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2004, 71(5): 303-320.
- [ 20 ] 罗娜, 唐怡. 升麻柴胡复方对幼龄雌性小鼠性成熟的影响 [J]. 中药与临床, 2016, 7(3): 50-52.
- [ 21 ] 周晓冰, 郭隽, 曹兆军, 等. 热炎宁合剂的非临床幼年动物毒理学研究 [J]. 中国药事, 2020, 34(9): 1040-1046.
- [ 22 ] 井潇, 高杰, 吴纯启, 等. 儿童药物安全性评价研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(4): 608-614.
- [ 23 ] 周莉, 郭隽, 孙祖越. 儿科用中药发育毒理学研究及评价进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(8): 568-574.
- [ 24 ] 周莉, 孙祖越. 儿科用药发育毒性研究指标设定及中药安全性评价的特别关注点 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 21-28.
- [ 25 ] 孙祖越, 周莉, 韩玲. 儿科用药非临床安全性评价要则及中药评价的特殊性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 13-20.
- [ 26 ] 黄芳华, 王庆利, Jim Ridings, 等. 幼龄动物毒理学研究: 试验设计、实施和结果分析 [J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 151-161.
- [ 27 ] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals S11 [EB/OL]. (2020-04-14), [https://database.ich.org/sites/default/files/S11\\_Step4\\_FinalGuideline\\_2020\\_0310.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/S11_Step4_FinalGuideline_2020_0310.pdf).
- [ 28 ] 杨娜, 韩玲. 儿科中药新药临床研究安全性考虑 [J]. 中国药

- 理学与毒理学杂志, 2020, 34(11): 811-816.
- [29] 武海霞, 吴志刚, 刘红彬, 等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用 [J]. 神经药理学报, 2014, 4(5): 30-35.
- [30] 杨玉洁, 李玉姣, 李杉杉, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 129-134.
- [31] 田栋, 徐晓虹, 洪星, 等. 成年期双酚 A 暴露对小鼠行为的影响 [J]. 心理学报, 2011, 43(5): 534-543.
- [32] Malm T, Koistinaho J, Kanninen K, et al. Utilization of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic mice in research of alzheimer's disease: focus on gene therapy and cell-based therapy applications [J]. Int J Alzheimers Dis, 2011, 2011: 517160.
- [33] 刘卓, 金英, 刘婉珠, 等. 知母皂苷对脂多糖引起的大鼠学习记忆障碍和炎症反应的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10): 1362-1366.
- [34] 陆彩霞, 罕园园, 全品芬, 等. 水迷宫实验中不同性别树鼩学习记忆能力的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 74-76, 79.
- [收稿日期] 2021-03-04

## 临床前研究中的癌症模型: 癌症研究进展回顾

癌症是当今威胁人类健康最可怕疾病之一, 每年在全球范围内造成近 800 万人死亡。最新统计数据显示恶性肿瘤已成为世界上主要的致死性疾病之一。可靠且具有代表性的癌症模型在肿瘤学研究中起着关键性作用。然而, 癌症并不是具有单一特征性疾病, 而是一种具有遗传异质性的系统性疾病。如何选择反映肿瘤系统的最优模型一直是肿瘤研究所要面对的主要困难之一。

目前科学家们对癌症模型进行了大量研究, 以进一步了解癌症的扩散、发展等机制和早期检测方法。这些模型为深入研究肿瘤的病因学、分子基础、与宿主相互作用、微环境对肿瘤的影响以及肿瘤的异质性在肿瘤转移中的作用提供了帮助。这些模型也被用于预测新的癌症标记物、靶向治疗以及药物研发。来自巴基斯坦真纳大学的 Muhammad Zia 团队在综述中探讨了癌症模型在药物筛选和治疗方法研究中的重要作用, 癌症模型的建立为癌症治疗带来了更光明的前景。

本文介绍了不同种类的癌症模型, 例如增殖快、易于监控的癌细胞系, 可以模拟体内微环境和肿瘤异质性类器官癌症模型、人源化肿瘤异体移植小鼠模型 (patient-derived xenografts, PDXs)、基因编辑小鼠模型 (genetically engineered mouse models, GEMMs) 果蝇模型、猪模型、斑马鱼模型和以基因组学为基础的计算模型等。

本文同时讨论了现有癌症模型的不足: 细胞系难以模仿真实的体内环境; PDX 模型由于使用免疫缺陷小鼠, 不能研究免疫调控对肿瘤的影响; GEMM 模型价格昂贵, 同时难以分析复杂基因调控的肿瘤影响; 其他动物模型也存在着饲养困难、与人类存在解剖学差异等问题; 现有的计算模型也不足以完全模拟复杂肿瘤的发生发展过程。

这些体内、体外和计算模型能够帮助研究人员搜集分析相关数据, 为癌症研究提供帮助。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学〈英文〉》期刊 (*Animal Model & Experimental Medicine*, 2021, 4: 87-103.)

卞艳丽,张春瑞,宋书波,等. 干扰 FUT8 的表达抑制结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的作用及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 31-36.

Bian YL, Zhang CR, Song SB, et al. Effect and mechanism of FUT8 expression on inhibition of colorectal cancer cell proliferation and invasion [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 31-36.

doi: 10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 005

## 干扰 FUT8 的表达抑制结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的作用及机制

卞艳丽<sup>1</sup>,张春瑞<sup>1\*</sup>,宋书波<sup>2</sup>,张体鹏<sup>1</sup>

(1.郑州澍青医学高等专科学校临床医学,郑州 450000; 2.河南省人民医院心血管外科,郑州 450000)

**【摘要】** 目的 研究岩藻糖基转移酶 8 (fucosyltransferase 8, FUT8) 对结直肠癌细胞增殖和转移能力的影响,并探讨其发挥作用的分子机制。**方法** 采用基因表达谱数据动态分析(GEPIA)数据库分析 FUT8 在结直肠癌组织中的表达水平;常规培养结直肠癌细胞系 SW480,分为 si-NC 组和 si-FUT8 组,分别转染 NC siRNA 和 FUT8 siRNA;Western blot 检测 FUT8 siRNA 干扰效果;CCK8 检测干扰 FUT8 对 SW480 细胞增殖能力的影响;Boyden 小室检测干扰 FUT8 对 SW480 细胞侵袭能力的影响;Akt 信号通路激活剂 SC79 分别处理 si-NC 组和 si-FUT8 组 SW480 细胞,分为 si-NC 组、si-FUT8 组、si-NC+SC79 组和 si-FUT8+SC79 组,CCK8 和 Boyden 小室分别检测各组细胞的增殖和侵袭能力;Western blot 检测各组细胞中 AKT、pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达。**结果** GEPIA 数据库分析结果显示 FUT8 在结直肠癌组织中的表达显著高于在正常结直肠组织中的表达。与 si-NC 组相比,si-FUT8 组细胞中 FUT8 的表达降低( $P<0.05$ )。与 si-NC 组和 si-NC+SC79 组相比,si-FUT8 组和 si-NC+SC79 组细胞的增殖和侵袭能力均降低,细胞中 pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达减少;与 si-FUT8 组相比,si-NC+SC79 组细胞的增殖和侵袭能力均增加,细胞中 pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达增加。**结论** 干扰 FUT8 可能通过调控 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制结直肠癌细胞增殖和侵袭能力。

**【关键词】** 结直肠癌;岩藻糖基转移酶 8;增殖;侵袭;AKT/ $\beta$ -catenin

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0031-06

## Effect and mechanism of FUT8 expression on inhibition of colorectal cancer cell proliferation and invasion

BIAN Yanli<sup>1</sup>, ZHANG Chunrui<sup>1\*</sup>, SONG Shubo<sup>2</sup>, ZHANG Tipeng<sup>1</sup>

(1. Clinical Medicine, Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450000, China.

2. Cardiovascular Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000)

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of fucosyltransferase 8 (FUT8) expression on the proliferation and invasion ability of colorectal cancer cells, and to explore the molecular mechanism of its function. **Methods** The Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) database was used to analyze the expression levels of FUT8 in colorectal cancer tissues. SW480 colorectal cancer cells were routinely cultured and divided into a si-NC group and a si-FUT8 group that were transfected with NC siRNA and FUT8 siRNA, respectively. FUT8 knockdown was detected by Western blot.

**【基金项目】**河南省科技发展计划项目(182102510114)。

**【作者简介】**卞艳丽(1982—),女,本科,高校实验师,研究方向:临床医学外科学。E-mail:loo99k@163.com

**【通信作者】**张春瑞(1984—),男,本科,高校讲师,研究方向:临床医学内科学。E-mail:403775073@qq.com

SW480 cells in the si-NC and si-FUT8 groups were treated with the AKT signaling activator SC79, and then divided into si-NC, si-FUT8, si-NC+SC79, and si-FUT8+SC79 groups. CCK8 and Boyden chamber assays were performed to detect the cell proliferation and invasion of each group. Western blot was used to detect the expression of AKT, pAKT, and  $\beta$ -catenin.

**Results** The GEPIA database analysis showed that the expression of FUT8 in colorectal cancer tissue was significantly higher than that in normal colorectal tissue. Compared with the si-NC group, the expression of FUT8 in the cells of the si-FUT8 group was reduced ( $P < 0.05$ ), while compared with the si-NC and si-NC+SC79 groups, the proliferation and invasion of si-FUT8 group and si-NC+SC79 group cells were reduced, and pAKT and  $\beta$ -catenin expression was decreased. The proliferation and invasion of the si-NC+SC79 group cells were increased compared with the si-FUT8 group, and pAKT and  $\beta$ -catenin expression was increased. **Conclusions** Knockdown of FUT8 may inhibit the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by regulating the AKT/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**[Keywords]** colorectal cancer; fucosyltransferase 8; proliferation; invasion; AKT/ $\beta$ -catenin

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,是发达国家与肿瘤相关死亡的第二大常见原因。世界卫生组织统计数据显示,2018 年全球结直肠癌病例 180 万例,约有 88 万例结直肠癌死亡病例,已成为世界范围内的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。尽管结直肠癌在诊断和治疗方面取得了显著的进步,但是患者的存活率仍然较差<sup>[2]</sup>。结直肠癌的发生和发展是一个多因素及复杂的过程,与其它类型肿瘤一样,几种关键信号通路中的驱动程序突变会促进结直肠癌的发生发展<sup>[3]</sup>。异常糖基化被视为肿瘤的标志,涉及细胞信号传导、免疫调节和肿瘤增殖、侵袭等过程<sup>[4]</sup>。岩藻糖基转移酶 8 (fucosyltransferase 8, FUT8) 催化  $\alpha$ -1,6-键的岩藻糖转移到最内层 N-乙酰氨基葡萄糖中,完成核心岩藻糖基化<sup>[5]</sup>。FUT8 异常表达促进乳腺癌、非小细胞肺癌和肝细胞肝癌等恶性肿瘤的增殖、侵袭和耐药等肿瘤的恶性生物学特性<sup>[6-8]</sup>。Noda 等<sup>[9]</sup> 研究报道 FUT8 蛋白的表达可能成为 II 期和 III 期结直肠癌患者预后的生物标志物。但是 FUT8 在结直肠癌中发挥的具体作用未知,因此本文研究了 FUT8 对结直肠癌细胞增殖和侵袭的影响及作用机制,旨在获得 FUT8 作为结直肠癌新型治疗靶点的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

结直肠癌细胞 SW480 购自上海中国科学院细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

L15 细胞培养基、胎牛血清和胰酶购自美国 Hyclone 公司;FUT8 siRNA 购自上海生工生物技术有限公司;脂质体 2000 购自美国 Invitrogen 试剂公司;蛋白裂解液购自北京索莱宝试剂公司;BCA 检

测试剂盒购自美国 Thermo 公司;5 $\times$ 蛋白上样缓冲液和 ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天科技有限公司;PVDF 膜购自迈博瑞生物膜技术有限公司;CCK8 试剂购自日本同仁化工试剂有限公司;Boyden 小室购自美国 BD 公司;FUT8、AKT、pAKT 和  $\beta$ -catenin 抗体购自美国 proteintech 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 基因表达谱数据动态分析(GEPIA)数据库分析结直肠癌组织中 FUT8 的表达水平

于 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>) 中“表达”菜单中输入 FUT8 基因,选择结直肠癌进行分析。

#### 1.3.2 细胞培养和细胞转染

SW480 细胞从液氮复苏后重悬至含有 10% 胎牛血清的 L15 细胞培养基中,放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的全湿度培养箱中培养。SW480 细胞呈对数生长时,采用胰酶收集细胞进行计数,接种至 6 孔板中,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞,分为 si-NC 组和 si-FUT8 组。培养箱中培养 12 h 后,将脂质体 2000 与 NC siRNA 混合后转染至 si-NC 组细胞中,脂质体 2000 与 FUT8 siRNA 混合后转染至 si-FUT8 组细胞中。8 h 后更换新鲜培养基,放置培养箱中继续培养进行后续实验。

#### 1.3.3 Western blot 检测蛋白表达

胰酶消化收集细胞,PBS 洗 3 次,加入适量蛋白裂解液吹打细胞。超声裂解细胞 30 min,4 $^{\circ}$ C、14000 r/min 离心 30 min,弃掉细胞沉淀,吸取液体移至新的 EP 管中。按照 BCA 试剂盒说明书检测细胞蛋白浓度,并加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混匀后沸水煮 5 min。SDS-PAGE 凝胶电泳 80 V 电泳 120 min,100 V 湿转 100 min。5% BSA 常温孵育 PVDF 膜 1 h,目的一抗稀释液(FUT8、AKT、pAKT 和  $\beta$ -catenin

抗体稀释比均为 1:500)4℃ 孵育过夜。TBST 洗 3 次,兔二抗稀释液(1:10000)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后,加 ECL 发光液进行曝光。

#### 1.3.4 CCK8 实验检测细胞增殖

在待测样品 96 孔中加入 10  $\mu$ L CCK8 试剂,培养箱中继续孵育 1 h。酶标仪 450 nm 波长处检测每个样品孔的吸光度值(OD 值)。

#### 1.3.5 Boyden 实验检测细胞侵袭

胰酶消化收集待测细胞,无血清培养基将胰酶和血清洗去后进行计数,接种至 Boyden 小室的上室中,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞。将 Boyden 小室放入含有 10% 胎牛血清的 500  $\mu$ L 细胞培养基的 24 孔板中,作为 Boyden 小室的下室,放置培养箱中培养。培养 16 h 左右,细胞由上室穿入下室时,终止培养。将 Boyden 小室上未穿过的细胞采用 PBS 洗去,甲醇固定,结晶紫染色。显微镜下拍照,计数穿膜细胞的个数。

#### 1.3.6 SC79 处理回复实验

SW480 细胞呈对数生长时,采用胰酶收集细胞进行计数,接种至 6 孔板中,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞,分为 si-NC 组、si-FUT8 组、si-NC+SC79 组和 si-FUT8+SC79 组。si-NC 组和 si-FUT8 组分别转染 NC siRNA 和 FUT8 siRNA, si-NC+SC79 组和 si-FUT8+SC79 组分别转染 NC siRNA 和 FUT8 siRNA 的同时加入 SC79 试剂,处理 48 h 后进行后续实验。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据均以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间的统计学差异采用独立样本 *t* 检验比较。两组以上的统计学差异采用方差分析比较,两两间的比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 FUT8 在结直肠癌组织中的表达水平

采用 GEPIA 数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>)分析 FUT8 在结直肠癌组织中的表达水平,结果显示 FUT8 mRNA 在结直肠癌组织中的表达水平显著高于其在正常结直肠组织中的表达水平, $P < 0.05$ ,见图 1。

### 2.2 FUT8 siRNA 敲减效果

结直肠癌细胞系 SW480 感染 FUT8 siRNA,采用 Western blot 检测 FUT8 siRNA 干扰效果,结果显示 si-NC 组 SW480 细胞中 FUT8 的相对表达量为

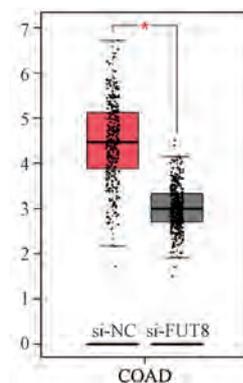
( $0.35 \pm 0.05$ ), si-FUT8 组 SW480 细胞中 FUT8 相对表达量为( $0.08 \pm 0.02$ )。si-FUT8 组中 FUT8 相对表达量显著低于 si-NC 组( $t = 8.132, P = 0.001$ ),见图 2。

### 2.3 敲低 FUT8 对结直肠癌细胞增殖能力的影响

采用 CCK8 实验检测 FUT8 对结直肠癌细胞增殖能力的影响,结果显示与 si-NC 组 SW480 细胞相比, si-FUT8 组 SW480 细胞增殖能力显著降低, $P < 0.05$ ,见图 3。

### 2.4 敲低 FUT8 对结直肠癌细胞侵袭能力的影响

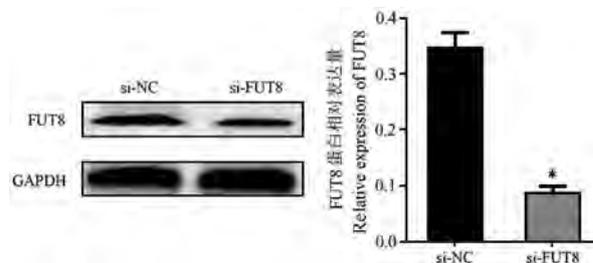
采用 Boyden 实验检测 FUT8 对结直肠癌细胞侵袭能力的影响,结果显示 si-NC 组 SW480 细胞中 FUT8 的相对表达量为( $52.67 \pm 4.72$ ), si-FUT8 组 SW480 细胞中 FUT8 相对表达量为( $25.00 \pm 4.58$ ),与 si-NC 组 SW480 细胞相比, si-FUT8 组 SW480 细胞侵袭能力显著降低( $t = 7.280, P = 0.002$ ),见图 4。



注:与正常结直肠组织相比, \* $P < 0.05$ 。

图 1 TCGA 数据库分析 FUT8 在结直肠癌中的表达  
Note. Compared with normal colorectal tissues, \* $P < 0.05$ .

Figure 1 TCGA database analyzed the expression of FUT8 in colorectal cancer



注:与 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 2 Western blot 检测 FUT8 siRNA 转染效果  
Note. Compared with si-NC group, \* $P < 0.05$ .

Figure 2 Western blot detected the transfection effect of FUT8 siRNA

### 2.5 SC79 对转染 FUT8 siRNA 的结直肠癌细胞增殖能力的影响

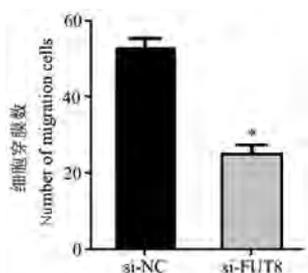
采用 CCK8 实验检测 SC79 对转染 FUT8 siRNA 的结直肠癌细胞增殖能力的影响,结果显示 si-NC 组和 si-NC+SC79 组 SW480 细胞增殖能力无差异,与 si-NC 组和 si-NC+SC79 组相比,si-FUT8 组和 si-FUT8 组+SC79 组细胞增殖能力降低,但是与 si-FUT8 组相比,si-NC+SC79 组细胞增殖能力增加。 $P < 0.05$ ,见图 5。

### 2.6 SC79 对转染 FUT8 siRNA 的结直肠癌细胞侵袭能力的影响

采用 Boyden 实验检测 SC79 对转染 FUT8 siRNA 的结直肠癌细胞侵袭能力的影响,结果显示 si-NC 组、si-NC+SC79 组、si-FUT8 组和 si-FUT8 组+SC79 组 SW480 细胞穿膜细胞数为  $(56.67 \pm 7.09)$  个、 $(25.33 \pm 1.53)$  个、 $(59.00 \pm 3.61)$  个和  $(33.33 \pm 3.79)$  个。si-NC 组和 si-NC+SC79 组 SW480 细胞侵袭能力无差异,与 si-NC 组和 si-NC+SC79 组相比,si-FUT8 组和 si-FUT8 组+SC79 组细胞侵袭能力降低,但是与 si-FUT8 组相比,si-NC+SC79 组细胞侵袭能力增加。 $P < 0.05$ ,见图 6。

### 2.7 Western blot 实验检测 FUT8 对 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响

采用 Western blot 实验检测 FUT8 对结直肠癌细胞 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响,结果显示 si-NC 组和 si-NC+SC79 组 SW480 细胞中 pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达无显著性差异,与 si-NC 组和 si-NC+SC79 组相比,si-FUT8 组和 si-FUT8 组+SC79 组细胞中 pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达降低,但是与 si-FUT8 组相比,si-NC+SC79 组细胞中 pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的表达增加。 $P < 0.05$ ,见图 7。

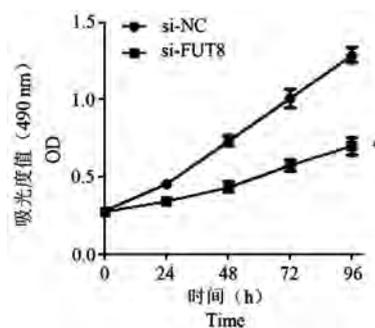


注:与 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 3 CCK8 检测结直肠癌细胞 SW480 增殖能力

Note. Compared with si-NC group, \* $P < 0.05$ .

Figure 3 CCK8 detected the proliferation ability of colorectal cancer cells SW480

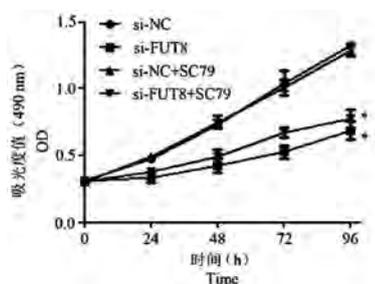


注:与 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 4 Boyden 实验检测结直肠癌细胞 SW480 侵袭能力

Note. Compared with si-NC group, \* $P < 0.05$ .

Figure 4 Boyden experiment detected the metastasis of colorectal cancer cells SW480



注:与 si-NC+SC79 组比较, \* $P < 0.05$ ;与 si-FUT8 组比较, # $P < 0.05$ 。下同。

图 5 CCK8 实验检测 SC79 对转染 FUT8 siRNA 的结直肠癌细胞能力的影响

Note. Compared with si-NC+SC79 group, \* $P < 0.05$ . Compared with si-FUT8 group, # $P < 0.05$ . The same as below.

Figure 5 CCK8 experiment detected the effect of SC79 on the ability of colorectal cancer cells transfected with siRNA of FUT8

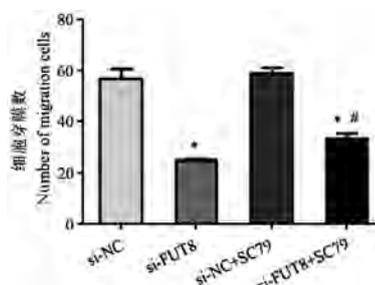


图 6 Boyden 实验检测 SC79 对转染 FUT8 siRNA 的结直肠癌细胞侵袭能力的影响

Figure 6 Boyden experiment detected the effect of SC79 on the invasion ability of colorectal cancer cells transfected with FUT8 siRNA

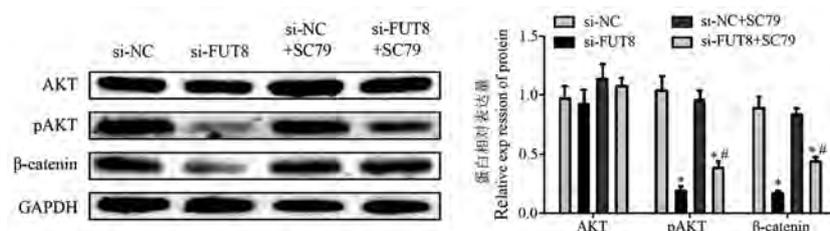


图 7 Western blot 实验检测 FUT8 对 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响

Figure 7 Western blot experiment detected the effect of FUT8 on AKT/ $\beta$ -catenin signaling pathway

### 3 讨论

结直肠癌是男性和女性中常见的消化系统恶性肿瘤,严重威胁着人类的健康<sup>[10]</sup>。随着结肠镜检查的普及,结直肠癌的发病率和死亡率在过去的几十年中虽然有所下降,但是由于初次诊断时患者已处于晚期,手术切除、化学治疗、放射治疗和分子靶向等治疗对其疗效有限,导致结直肠癌患者的预后仍然很差<sup>[11]</sup>。结直肠是由癌基因、抑癌基因和与 DNA 修复机制相关的基因突变引起的<sup>[3]</sup>。转移和复发的频率高是导致结直肠癌患者死亡的主要原因<sup>[12-13]</sup>。因此研究结直肠癌细胞增殖和侵袭的分子机制对探索治疗结直肠癌新的分子靶点非常重要。

糖基化是寡糖链与蛋白质或脂质共价连接的过程,其在包括细胞生长、分化和转化等许多生理和病理变化中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。岩藻糖基化是肿瘤中最重要的糖基化类型之一,与肿瘤的恶性转化、侵袭和转移有关。岩藻糖基化是由 FUTs 家族将岩藻糖转移到糖蛋白和糖脂中合成的,FUTs 表达失调引起岩藻糖基异常化涉及肿瘤发生的各种基本细胞生物学过程<sup>[14]</sup>。FUTs 家族包括 13 种成员,其中由 FUT8 编码的  $\alpha$ 1,6-岩藻糖基转移酶是唯一负责核心岩藻糖基化的酶,而核心岩藻糖基化对粘附分子和生长因子受体具有重要的调节功能,因此 FUT8 密切参与肿瘤细胞的恶性增殖和侵袭过程<sup>[15]</sup>。同时研究报道 FUT8 与实体肿瘤患者的预后相关,胰腺导管癌组织中高表达的 FUT8 蛋白与患者淋巴结转移和无复发生存率显著相关<sup>[16]</sup>。在结直肠癌组织中 FUT8 的表达对患者预后的影响与 p53 的状态有关,在 p53 阴性的晚期结直肠癌患者中 FUT8 蛋白的阳性表达与患者更好的无疾病进展生存期显著相关<sup>[9]</sup>。但是 FUT8 在结直肠癌中发挥的功能仍然未知。本文采用 GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) 数据库分析

显示 FUT8 在结直肠癌组织中的表达水平显著高于其在正常结直肠组织中的表达水平,提示 FUT8 在结直肠癌中发挥癌基因的作用,与 FUT8 在其它肿瘤中的表达情况具有一致性<sup>[6-8]</sup>。

本文采用 siRNA 转染结直肠癌细胞抑制 FUT8 的表达后,CCK8 和 Boyden 实验检测结直肠癌细胞的增殖和侵袭能力,结果显示干扰 FUT8 的表达抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭能力,表明 FUT8 在结直肠癌中高表达促进其增殖和侵袭。Tu 等<sup>[6]</sup>报道抑制 FUT8 的表达则抑制了高侵袭性乳腺癌细胞的侵袭性。癌症相关成纤维细胞中 FUT8 的表达促进非小细胞肺癌的增殖和侵袭能力<sup>[17]</sup>。与本文中观察到 FUT8 的生物学功能一致。在乳腺癌中 FUT8 可能通过岩藻糖基化 TGF- $\beta$  受体复合物,以促进 TGF- $\beta$  结合并增强下游信号传导发挥促癌作用<sup>[6]</sup>。AKT、WNT 和 KRAS 等信号途径的改变导致结直肠癌细胞增殖和迁移增加<sup>[18-19]</sup>。而在肝细胞肝癌中表达上调的 FUT8 通过激活 PI3K-AKT-NF- $\kappa$ B 信号传导促进肝细胞肝癌细胞的增殖能力<sup>[8]</sup>。FUT8 缺乏可以通过减少核  $\beta$ -catenin 蛋白的积累抑制乳腺癌细胞的粘附、迁移和侵袭<sup>[20]</sup>。FUT8 是否可以调控 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路促进结直肠癌的进展,本文采用一种可以增加 AKT 磷酸化水平的小分子化合物 SC79 处理 FUT8 siRNA 转染的结直肠癌细胞,功能实验检测 SC79 和 FUT8 siRNA 共同作用对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的影响,结果显示 si-NC 组与 si-NC 和 SC79 共同处理组细胞的增殖和侵袭能力无差异,表明在 si-NC 组细胞中 AKT 信号通路均为激活状态。而与 si-NC 组相比,si-FUT8 和 SC79 处理组细胞的增殖和侵袭能力降低,但是高于 si-FUT8 组细胞的增殖和侵袭能力,表明在 si-FUT8 组细胞中 AKT 信号通路活性被抑制,且 SC79 仅能部分恢复 AKT 信号通路的活性。同时 Western blot 同样发现 SC79 可以减弱 FUT8 siRNA 对结直肠癌细胞中 pAKT 和  $\beta$ -catenin 蛋白的抑制

作用,表明 FUT8 通过调控 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路促进结直肠癌细胞增殖和侵袭能力。

综上所述,FUT8 siRNA 可能通过调控 AKT/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭能力,是结直肠癌候选癌基因,可能是治疗结直肠癌新的分子靶点。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [ 2 ] Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2): 79-92.
- [ 3 ] Huang D, Sun W, Zhou Y, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2018, 37(1): 173-187.
- [ 4 ] 路佩佩, 刘风玲. 肿瘤糖基化在肿瘤免疫逃避中的意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2020, 26(5): 371-375.
- [ 5 ] Agrawal P, Fontanals-Cirera B, Sokolova E, et al. A systems biology approach identifies FUT8 as a driver of melanoma metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(6): 804-819.
- [ 6 ] Tu CF, Wu MY, Lin YC, et al. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- $\beta$  receptor core fucosylation [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 111.
- [ 7 ] Li F, Zhao S, Cui Y, et al.  $\alpha$ 1,6-Fucosyltransferase (FUT8) regulates the cancer-promoting capacity of cancer-associated fibroblasts (CAFs) by modifying EGFR core fucosylation (CF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(3): 816-837.
- [ 8 ] Li S, Liu XY, Pan Q, et al. Hepatitis C virus-induced fut8 causes 5-FU drug resistance in human hepatoma huh7.5.1 Cells [J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 378.
- [ 9 ] Noda M, Okayama H, Kofunato Y, et al. Prognostic role of FUT8 expression in relation to p53 status in stage II and III colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200315.
- [ 10 ] 武雪亮, 王立坤, 黄先涛, 等. 结直肠癌流行病学特征回顾性研究 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16(20): 60-63, 75.
- [ 11 ] Geng F, Wang Z, Yin H, et al. Molecular targeted drugs and treatment of colorectal cancer: recent progress and future perspectives [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2017, 32(5): 149-160.
- [ 12 ] 朱刚, 董科显, 张春玉, 等. 结直肠癌恶性表型相关转录因子的研究进展 [J]. *国际遗传学杂志*, 2020, 43(1): 33-39.
- [ 13 ] Hsieh MH, Kung PT, Kuo WY, et al. Recurrence, death risk, and related factors in patients with stage 0 colorectal cancer: A nationwide population-based study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(36): e21688.
- [ 14 ] Shan M, Yang D, Dou H, et al. Fucosylation in cancer biology and its clinical applications [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162(1): 93-119.
- [ 15 ] Yu M, Cui X, Wang H, et al. FUT8 drives the proliferation and invasion of trophoblastic cells via IGF-1/IGF-1R signaling pathway [J]. *Placenta*, 2019, 75(1): 45-53.
- [ 16 ] Tada K, Ohta M, Hidano S, et al. Fucosyltransferase 8 plays a crucial role in the invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Surg Today*, 2020, 50(7): 767-777.
- [ 17 ] Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, et al. Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers [J]. *Oncology*, 2015, 88(5): 298-308.
- [ 18 ] Bahrami A, Khazaei M, Hasanzadeh M, et al. Therapeutic potential of targeting PI3K/AKT pathway in treatment of colorectal cancer: rational and progress [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(3): 2460-2469.
- [ 19 ] Jacobsen A, Bosch LJW, Martens-de Kemp SR, et al. Aurora kinase A (AURKA) interaction with Wnt and Ras-MAPK signalling pathways in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7522.
- [ 20 ] Liu D, Gao Z, Yue L. Fucosyltransferase 8 deficiency suppresses breast cancer cell migration by interference of the FAK/integrin pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2019, 25(4): 303-311.

[收稿日期]2020-08-27

索红亮,孙治霞,曾垂义,等. 五参顺脉胶囊通过自噬改善心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 37-43.  
Suo HL, Sun ZX, Zeng CY, et al. Wushen-Shunmai capsule improves myocardial ischemia-reperfusion injury through autophagy [J].  
Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 37-43.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.006

## 五参顺脉胶囊通过自噬改善心肌缺血再灌注损伤

索红亮<sup>1\*</sup>, 孙治霞<sup>2</sup>, 曾垂义<sup>1</sup>, 张文宗<sup>1</sup>, 毛德西<sup>3</sup>

(1.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)心病科,郑州 450002;  
2.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)重症医学科,郑州 450002;  
3.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)名医堂,郑州 450002)

**【摘要】** 目的 探讨自噬在五参顺脉胶囊改善大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。方法 建立心肌缺血再灌注损伤模型,随机法,将其分为假手术组、模型组、五参顺脉胶囊组、自噬抑制剂组(五参顺脉胶囊+LY294002),每组15只。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清心肌肌钙蛋白I(cTnI)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)浓度,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色测定心肌梗死体积,原位末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞凋亡,电镜下计数大鼠心肌细胞自噬体数量,Western blot检测总PI3K、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及其磷酸化蛋白表达,自噬标记物微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠血清cTnI、CK-MB浓度、心肌梗死区比例、凋亡指数、自噬体数量、心肌组织LC3-II/LC3-I、caspase3、Bax增加( $P<0.05$ ),心肌组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、Bcl2水平降低( $P<0.05$ );与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠血清cTnI、CK-MB浓度、心肌梗死区比例、凋亡指数、自噬体数量、心肌组织LC3-II/LC3-I、caspase3、Bax降低( $P<0.05$ ),心肌组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、Bcl2水平增加( $P<0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠血清cTnI、CK-MB浓度、心肌梗死区比例、凋亡指数、自噬体数量、心肌组织LC3-II/LC3-I、caspase3、Bax增加( $P<0.05$ ),心肌组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、Bcl2水平降低( $P<0.05$ )。**结论** 五参顺脉胶囊抑制心肌细胞过度自噬,对心肌缺血再灌注损伤大鼠发挥保护作用。

**【关键词】** 五参顺脉胶囊;心肌缺血再灌注损伤;大鼠;磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B通路;自噬  
**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)07-0037-07

## Wushen-Shunmai capsule improves myocardial ischemia-reperfusion injury through autophagy

SUO Hongliang<sup>1\*</sup>, SUN Zhixia<sup>2</sup>, ZENG Chuiyi<sup>1</sup>, ZHANG Wenzong<sup>1</sup>, MAO Dexi<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, Henan Province Hospital of TCM (the Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM), Zhengzhou 450002, China. 2. Department of Critical Medicine, Henan Province Hospital of TCM (the Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM), Zhengzhou 450002. 3. Famous Doctor Hall, Henan Province Hospital of TCM (the Second Affiliated Hospital of Henan University of TCM), Zhengzhou 450002)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of autophagy in the improvement of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by Wushen-Shunmai capsule. **Methods** Following establishment of a myocardial ischemia-reperfusion injury

**【基金项目】** 全国名中医传承工作室建设项目(国中医药办人教函[2018]119号);河南省中医药科学研究专项(2019JDZX093);河南省2017年科技发展计划(172102310538)。

**【作者简介】** 索红亮(1978—),男,主治医师,博士,研究方向:中西医结合临床、心血管疾病。E-mail: hlzz78@163.com

model, rats were randomly divided into sham, model, Wushen-Shunmai capsule, and autophagy inhibitor (Wushen-Shunmai capsule+LY294002) groups, with 15 rats in each group. The concentrations of serum cardiac troponin I (cTnI) and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Myocardial infarction volume was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, and cardiomyocyte apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The number of autophagy events was counted under electron microscope, while the expression of total PI3K, Akt, mammalian rapamycin target protein (mTOR) and its phosphorylated protein, and autophagy marker microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3) was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham group, serum cTnI, CK-MB concentration, myocardial infarction area ratio, apoptosis index, autophagy number, myocardial LC3-II/LC3-I, caspase 3, and Bax were significantly higher in the model group ( $P<0.05$ ), and the levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, and Bcl2 were significantly lower ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, serum cTnI, CK-MB concentration, myocardial infarction area ratio, apoptosis index, autophagy number, myocardial LC3-II/LC3-I, caspase 3, and Bax were significantly lower in the Wushen-Shunmai capsule group ( $P<0.05$ ), and the levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR, and Bcl2 were significantly higher ( $P<0.05$ ). Compared with the Wushen-Shunmai capsule group, serum cTnI, CK-MB concentration, myocardial infarction area ratio, apoptosis index, autophagy number, myocardial LC3-II/LC3-I, caspase 3, and Bax were significantly higher in the autophagy inhibitor group ( $P<0.05$ ), and the levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR and Bcl2 were significantly lower ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Wushen-Shunmai capsule inhibits excessive autophagy of myocardial cells and plays a protective role in myocardial ischemia-reperfusion injury.

**【Keywords】** Wushen-Shunmai capsule; myocardial ischemia-reperfusion injury model; rat; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathway; autophagy

经皮冠状动脉(冠脉)支架术是治疗冠心病的有效手段,但近来研究发现,患者术后血心肌酶谱,如心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)等可出现显著升高,表明冠脉侵入性治疗可造成心肌损伤,即冠脉侵入性损伤,而心肌缺血再灌注模型可以模拟冠脉侵入性损伤情况<sup>[1-2]</sup>,因此采用心肌缺血再灌注模型模拟冠脉侵入性损伤,深入探究其发生机理,对寻找有效途径以改善患者预后至关重要。五参顺脉胶囊(Wushen-Shunmai capsule)可显著改善心肌梗死及心绞痛等症状,本课题组前期大鼠实验研究证实,五参顺脉胶囊用于改善心肌缺血再灌注损伤的作用较明显,可能与内质网应激介导的细胞凋亡有关<sup>[3]</sup>。而磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路作为抗凋亡中经典通路之一,其下游分子-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)则为调节自噬的关键蛋白,研究显示,自噬性细胞死亡在缺血再灌注导致的心肌损伤中亦发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>。因此,本研究拟通过心肌缺血再灌注损伤模型,基于 PI3K/Akt 介导的自噬信号通路,进一步深入探究五参顺脉胶囊对模型大鼠改善的作用机

制,以期为其临床合理应用予以依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

60 只雄性,6 周龄 SPF 级 SD 大鼠,体重(200±20)g,购自斯莱克实验动物有限公司(上海)[SCXK(沪)2017-0005],在河南省中医院实验室饲养[SYXK(豫)2016-0009]。整个实验饲养条件为自由采食及饮水,12 h/12 h 光照/黑暗条件下正常饲养,温度约 25℃,相对湿度 45%~65%。本研究的动物实验经河南省中医院动物伦理委员会批准(IACUC-20190417),并遵守审批内容实施,实验符合 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

五参顺脉胶囊购自河南省中医院,丢弃胶囊壳,药物取出后用羧甲基纤维素钠制成含生药 100 g/L 混悬液使用。抑制剂 LY294002(货号:L9908)购自美国 Sigma 公司;大鼠 cTnI ELISA 试剂盒(货号:ab246529)、CK-MB ELISA 试剂盒(货号:ab193696)、兔源一抗 anti-微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)(货号:ab192890)、anti-PI3K(货号:ab32089)、anti-p-PI3K(货号:ab182651)、anti-AKT(货号:

ab235958)、anti-p-AKT(货号:ab38449)、anti-mTOR(货号:ab109268)、anti-p-mTOR(货号:ab2732)、anti-天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(cysteine aspartase-3, caspase3)(货号:ab13847)、anti-Bcl2 相关 X 蛋白(Bcl2 associated X protein, Bax)(货号:ab32503)、anti-B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl2)(货号:ab182858)、anti- $\beta$ -actin(货号:ab8227)、二抗羊抗兔 IgG(货号:ab6721)均购自英国 Abcam 公司;FC 型酶标仪、Themis 透射电子显微镜均购自美国 ThermoFisher 公司等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 模型制备

参考文献<sup>[6]</sup>制备心肌缺血再灌注损伤大鼠模型,SD 大鼠术前腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,固定于手术台,腹部常规消毒后,打开胸腔,暴露心脏,于冠状动脉左前降支分支处穿入结扎线并套入一塑料管进行冠脉结扎,缺血 30 min,心脏血液再灌注 180 min,之后关闭胸腔、逐层缝合。

#### 1.3.2 动物分组及给药

成模 SD 大鼠随机分为模型组、五参顺脉胶囊组、自噬抑制剂组(五参顺脉胶囊+LY294002 组),每组 15 只,另取 15 只为假手术组(Sham 组),处理方法与模型组相同,但不进行冠脉结扎。五参顺脉胶囊组灌胃 0.9 g/kg 五参顺脉胶囊<sup>[3]</sup>,自噬抑制剂组于尾静脉注射 LY294002 0.3 mg/kg 联合灌胃 0.9 g/kg 五参顺脉胶囊,假手术组与模型组均灌胃等量羧甲基纤维素钠溶剂,每天 1 次,连续 2 周。

#### 1.3.3 血清 cTnI、CK-MB 蛋白浓度检测

给药结束后,尾静脉采血,离心后取上清。血清 cTnI、CK-MB 蛋白浓度以酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测,具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。

#### 1.3.4 心肌梗死体积测定

各组 5 只大鼠处死,暴露心脏,取梗死区心肌组织以 0.5 m 厚度进行冰冻切片,置于预热的 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶液中,37℃ 孵育 20 min 至梗死区呈红色,弃去 TTC 溶液,添加 4% 多聚甲醛固定,拍照,以梗死区/危险区 $\times 100\%$ 记为梗死区比例(%)。

#### 1.3.5 电镜观察心肌组织细胞自噬体形成数量

另取部分心肌组织,采用戊二醛-锇酸法双重固定,制备超薄切片,进行醋酸双氧铀-枸橼酸铅双染,透射电镜下观察心肌细胞中自噬体结构及数

量,每个样本计数最终自噬体形成数量为 3 个铜网孔(每孔约 30000 平方微米)内自噬体数量平均值。

#### 1.3.6 心肌组织中 LC3、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、caspase3、Bax、Bcl2 蛋白表达水平检测

提取心肌组织总蛋白并测定蛋白浓度,随后行 SDS-PAGE 电泳分离,转膜、室温封闭、一抗孵育,再分别添加 anti-LC3(1:2000)、anti-PI3K(1:1000)、anti-p-PI3K(1:1000)、anti-Akt(1:1000)、anti-p-Akt(1:1000)、anti-mTOR(1:2000)、anti-p-mTOR(1:1000)、caspase3(1:1000)、Bax(1:2000)、Bcl2(1:1000)、anti- $\beta$ -actin(1:5000)4℃ 孵育过夜,二抗 IgG(1:5000)37℃ 孵育 1 h,洗膜后显色、拍照并观察各蛋白条带灰度值。

#### 1.3.7 心肌细胞凋亡检测

各组另取 10 只大鼠处死,固定部分心肌梗死组织,石蜡包埋后切片。原位末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色,各项步骤均具体操作严格按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒附带说明书进行,最后进行 DAB 显色,苏木素复染、透明、封片。若呈棕褐色则为阳性凋亡细胞,呈蓝紫色为未凋亡细胞。每张切片于高倍镜下随机选取 10 个视野进行阳性细胞计数,凋亡指数(%)为阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

### 1.4 统计学方法

SPSS 25.0 统计分析。所得结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较单因素方差(one-way ANOVA)分析,两两间比较 SNK-*q* 分析,若  $P < 0.05$  则表明差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠血清心肌酶谱水平比较

与假手术组比,模型组大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度降低( $P < 0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度增加( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 各组大鼠心肌梗死区比例及自噬体数量比较

假手术组形态正常,未见线粒体肿胀;模型组线粒体肿胀明显、自噬泡数量增多;五参顺脉胶囊组出现部分线粒体肿胀现象、可观察到自噬泡;自噬抑制剂组与模型组类似。与假手术组比较,模型组大鼠心肌梗死区比例、自噬体数量增加( $P <$

0.05);与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠心肌梗死区比例、自噬体数量降低( $P<0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠心肌梗死区比例、自噬体数量增加( $P<0.05$ )。见图 1、图 2、表 2。

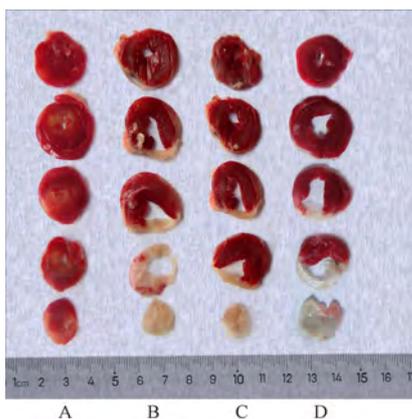
表 1 各组大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=15$ )

Table 1 Comparison of serum cTnI and CK-MB in rats of each group

组别 Groups	cTnI (ng/mL)	CK-MB (U/L)
假手术组 Sham group	0.18±0.02	716.84±142.39
模型组 Model group	0.76±0.08*	2069.75±196.58*
五参顺脉胶囊组 Wushen-Shunmai capsule group	0.51±0.04#	1132.46±163.32#
自噬抑制剂组 Autophagy inhibitor group	0.63±0.07&	1892.91±178.21&

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与五参顺脉胶囊组比较,& $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with model group, # $P<0.05$ . Compared with Wushen-Shunmai capsule group, & $P<0.05$ .



注:A:假手术组;B:模型组;C:五参顺脉胶囊组;D:自噬抑制剂组。

图 1 各组大鼠心肌梗死区情况

Note. A, Sham group. B, Model group. C, Wushen-Shunmai capsule group. D, Autophagy inhibitor group.

Figure 1 Situation of myocardial infarction area in each group of rats

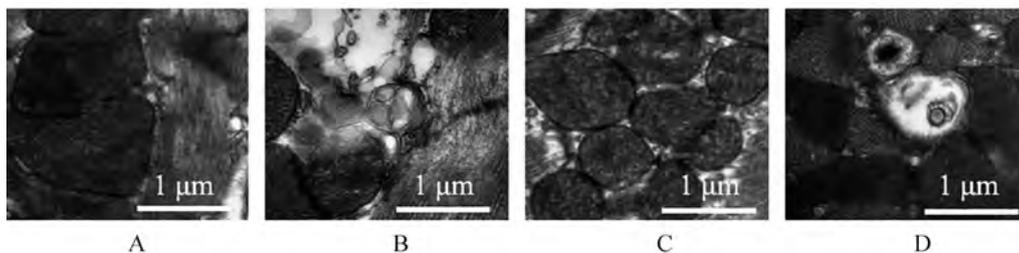


图 2 各组大鼠心肌细胞自噬体情况

Figure 2 Autophagosomes of rat cardiomyocytes in each group

## 2.3 各组大鼠心肌组织 LC3 蛋白表达水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织 LC3-II/LC3-I 增加( $P<0.05$ );与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠心肌组织 LC3-II/LC3-I 降低( $P<0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠心肌组织 LC3-II/LC3-I 增加( $P<0.05$ )。见图 3。

## 2.4 各组大鼠心肌组织 PI3K、Akt、mTOR 及其磷酸化蛋白表达水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 水平降低( $P<0.05$ );与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠心肌组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 水平增加( $P<0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠心肌组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 水平降低( $P<0.05$ )。见图 4。

## 2.5 各组大鼠心肌组织 caspase3、Bax、Bcl2 蛋白表达水平比较

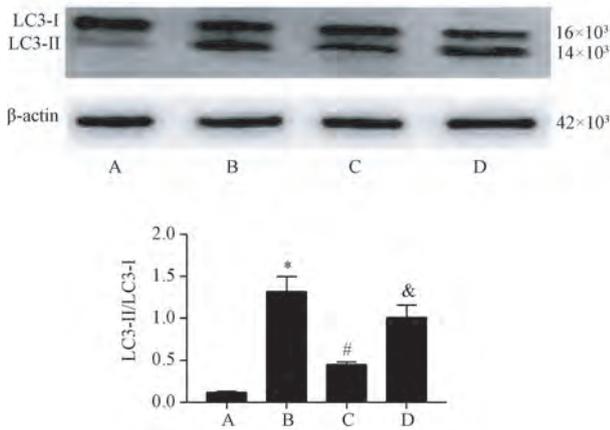
与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织 caspase3、Bax 水平升高,Bcl2 水平降低( $P<0.05$ );与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠心肌组织 caspase3、Bax 水平降低,Bcl2 水平升高( $P<0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠心肌组织 caspase3、Bax 水平升高,Bcl2 水平降低( $P<0.05$ )。见图 5。

## 2.6 各组大鼠凋亡情况比较

与假手术组比较,模型组大鼠凋亡指数增加( $P<0.05$ );与模型组比较,五参顺脉胶囊组大鼠凋亡指数降低( $P<0.05$ );与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠凋亡指数增加( $P<0.05$ )。见图 6。

## 3 讨论

多项研究显示,冠脉介入手术亦存在风险,可损伤血管内皮,造成炎症的发生,甚至导致心肌缺血再灌注损伤<sup>[7-8]</sup>。本研究造模后显示,与假手术



注:A:假手术组;B:模型组;C:五参顺脉胶囊组;D:自噬抑制剂组。与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与五参顺脉胶囊组比较,& $P<0.05$ 。

图3 各组大鼠心肌组织 LC3 蛋白表达水平比较

Note. A, Sham group. B, Model group. C, Wushen-Shunmai capsule group. D, Autophagy inhibitor group. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with model group, # $P<0.05$ . Compared with Wushen-Shunmai capsule group, & $P<0.05$ .

Figure 3 Comparison of LC3 protein expression in myocardium of rats in each group

表2 各组大鼠心肌梗死区比例及自噬体数量比较( $\bar{x}\pm s$ )

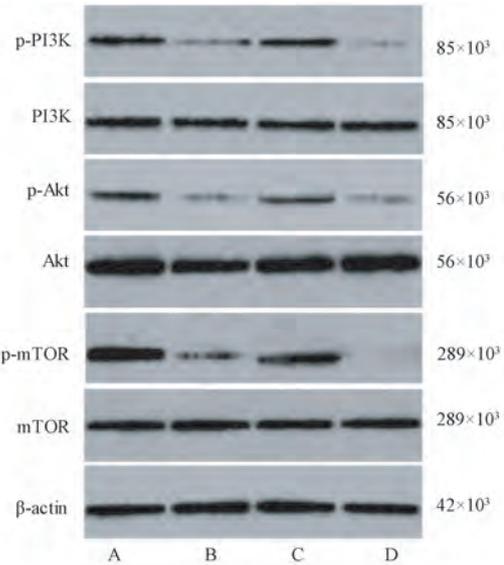
Table 2 Comparison of myocardial infarction area proportion and cardiomyocytes number of rats in each group

组别 Groups	梗死区比例(%) (n=5) Proportion of infarct area	自噬体数量(个) (n=10) Number of autophagosomes
假手术组 Sham group	0.13±0.02	7.14±1.42
模型组 Model group	39.75±2.86*	24.67±4.18*
五参顺脉胶囊组 Wushen-Shunmai capsule group	15.24±2.01#	12.36±2.25#
自噬抑制剂组 Autophagy inhibitor group	27.96±2.85&	18.86±3.47&

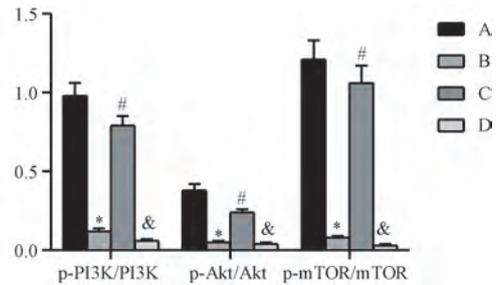
注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ;与五参顺脉胶囊组比较,& $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with model group, # $P<0.05$ . Compared with Wushen-Shunmai capsule group, & $P<0.05$ .

组比较,模型组大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度、心肌梗死区比例均增加,心肌细胞受损时可导致心肌酶释放入血,血清 cTnI、CK-MB 浓度是反映心肌损伤的标志性酶<sup>[9]</sup>,心肌梗死区比例则可直观评价心肌损伤,提示模型制备成功。五参顺脉胶囊最早由全国名老中医毛德西教授创立,该方以益气养阴为基础,兼有活血、理气、化湿、安神等功效,以原方或加



PI3K、Akt、mTOR及其磷酸化蛋白表达



注:A:假手术组;B:模型组;C:五参顺脉胶囊组;D:自噬抑制剂组。下同。

图4 各组大鼠心肌组织 PI3K、Akt、mTOR 及其磷酸化蛋白表达

Note. A, Sham group. B, Model group. C, Wushen-Shunmai capsule group. D, Autophagy inhibitor group. The same as below.

Figure 4 Expression of PI3K, Akt, mTOR and their phosphorylated proteins in myocardium of rats in each group

减方治疗各证型冠心病效果显著<sup>[10]</sup>,已有报道五参顺脉胶囊可强心、扩冠、抗凝、调整血脂和纠正心律失常等<sup>[11-12]</sup>。本研究结果亦发现,五参顺脉胶囊可降低心肌损伤大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度及心肌梗死区比例,提示五参顺脉胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有一定改善作用。

自噬是实现细胞及细胞器分解、代谢、再利用的一种维持细胞代谢平衡的生理现象,缺血/再灌注、缺氧/复氧等条件下,适度自噬可一定程度保护细胞免于坏死和凋亡,而随着疾病进展,细胞内会产生过度自噬,造成细胞内环境紊乱,引发自噬性

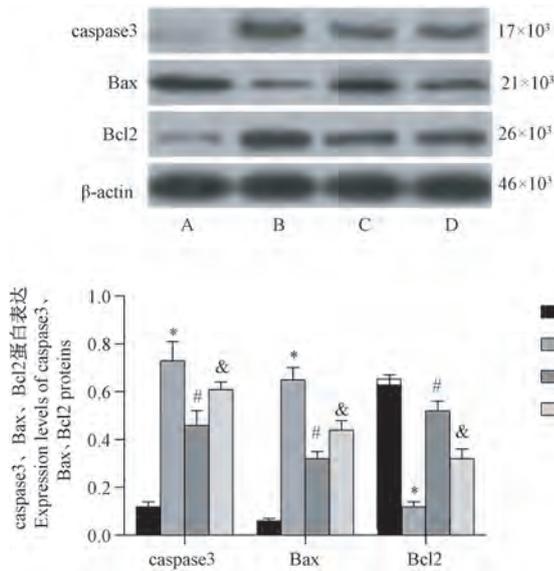


图 5 各组大鼠心肌组织 caspase3、Bax、Bcl2 蛋白表达

Figure 5 Expression of caspase3、Bax、Bcl2 proteins in myocardium of rats in each group

死亡<sup>[13]</sup>。有研究报道,靶向调控自噬性死亡可能是治疗心肌缺血再灌注损伤的新策略,在心肌缺血再灌注中存在过度自噬现象,减轻自噬作用可缓解疾病<sup>[14-15]</sup>。本研究结果发现,与假手术组比较,模型组大鼠心肌梗死区自噬体数量增加,自噬标志性蛋白 LC3-II/LC3-I 亦增加,心肌细胞达到过度自噬水平,从而加重疾病进程。而五参顺脉胶囊可减少心肌梗死区自噬水平,降低 LC3-II/LC3-I,提示五参顺脉胶囊通过减轻自噬对心肌缺血再灌注损伤大鼠起保护作用。

调控自噬的信号通路很多,其中以 PI3K/Akt/mTOR 通路研究最为广泛,PI3K/Akt 是一种经典抗凋亡通路,该通路激活可导致 Akt 活化,Akt 磷酸化水平与该通路活化程度密切相关。mTOR 对吞噬泡形成及成熟起抑制作用,是调控自噬的关键蛋白,抑制 mTOR 表达后可直接抑制自噬<sup>[16-17]</sup>。多项研究表明,PI3K/Akt/mTOR 通路介导的自噬与缺血再灌注引起的心肌损伤严重程度密切相关,激活该通路可抑制过度自噬、减轻心肌细胞损伤<sup>[18-20]</sup>。本研究结果发现,与模型组比较,五参顺脉胶囊可增加心肌组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 水平,提示五参顺脉胶囊亦可能通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对侵入性损伤大鼠发挥保护作用。为了进一步验证五参顺脉胶囊是否通过 PI3K/Akt 介导的自噬通路发挥保护作用,本研究采用自噬抑制剂 LY294002 与五参顺脉胶囊共同给药,结果

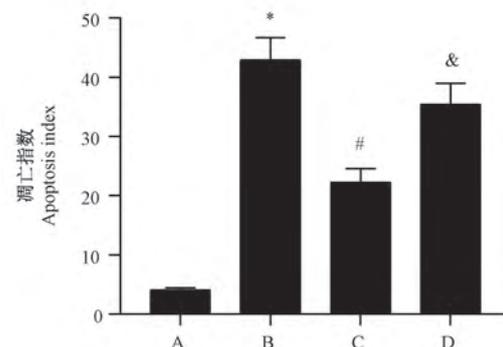
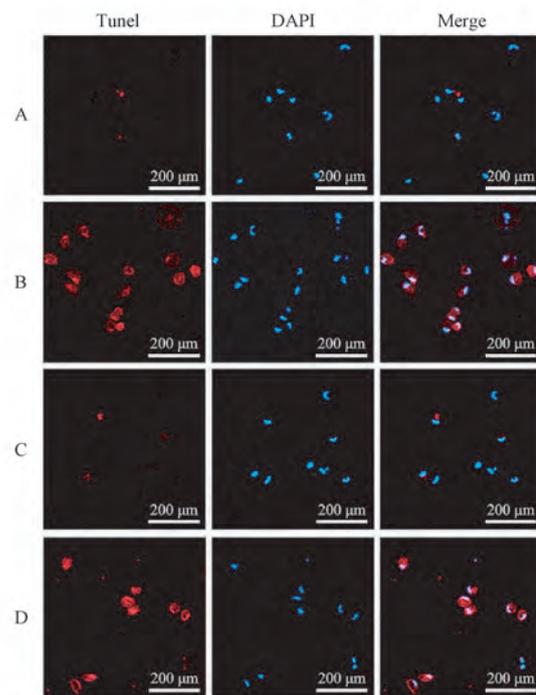


图 6 各组大鼠心肌梗死区凋亡情况

Figure 6 Apoptosis in myocardial infarction area of rats in each group

发现,与五参顺脉胶囊组比较,自噬抑制剂组大鼠血清 cTnI、CK-MB 浓度、心肌梗死区比例、凋亡指数、凋亡蛋白 caspase3、Bax、自噬体数量及 LC3-II/LC3-I 均增加,抗凋亡蛋白 Bcl2 水平降低,提示五参顺脉胶囊抑制心肌细胞过度自噬,发挥抗心肌梗死、心肌细胞凋亡作用,从而改善缺血再灌注损伤。

综上所述,五参顺脉胶囊抑制心肌细胞过度自噬,对心肌缺血再灌注损伤大鼠发挥保护作用。本研究进一步丰富与完善了五参顺脉胶囊减轻心肌缺血再灌注损伤的作用机制,对其临床应用具有进一步参考价值。

## 参考文献:

- [ 1 ] Lönborg J, Engström T, Ahtarovski KA, et al. Myocardial damage in patients with deferred stenting after STEMI: A DANAMI-3-DEFER substudy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(23): 2794–2804.
- [ 2 ] Verdoia M, Ceccon C, Nardin M, et al. Vitamin D deficiency and periprocedural myocardial infarction in patients undergoing percutaneous coronary interventions [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2018, 19(7): 744–750.
- [ 3 ] 孙治霞, 索红亮, 王丽辉, 等. 五参顺脉胶囊通过抑制内质网应激诱导的凋亡减轻大鼠冠脉侵入性损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(10): 1790–1795.
- [ 4 ] Li X, Hu X, Wang J, et al. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1917–1924.
- [ 5 ] Jiang T, Zhang L, Ding M, et al. Protective effect of vasicine against myocardial infarction in rats via modulation of oxidative stress, inflammation, and the PI3K/Akt pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3773–3784.
- [ 6 ] Xie Y, Ge CL, Zhang ZY, et al. Oxycodone inhibits myocardial cell apoptosis after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via RhoA/ROCK1 signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6371–6379.
- [ 7 ] Vidal-Perez R, Abou JCC, Agra-Bermejo RM, et al. Myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries: A comprehensive review and future research directions [J]. *World J Cardiol*, 2019, 11(12): 305–315.
- [ 8 ] 赵雨薇, 付建华, 李磊, 等. 双参宁心胶囊通过调控线粒体 ATP 敏感性钾通道减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13): 104–110.
- [ 9 ] Xie J, Zhang L, Fan X, et al. MicroRNA-146a improves sepsis-induced cardiomyopathy by regulating the TLR-4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 779–785.
- [ 10 ] 曾垂义, 毛德西. 毛德西辨治冠心病经验 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(10): 1408–1409.
- [ 11 ] 黄斌, 王辉, 王振涛. 五参顺脉胶囊联合胺碘酮对阵发性心房颤动复律后维持窦性心律及左心室功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13): 269–272.
- [ 12 ] 黄斌, 王辉, 陈江涛. 五参顺脉胶囊对急性心肌梗死介入治疗后左室功能和 QT 间期离散度的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1): 183–186.
- [ 13 ] Bian A, Shi M, Flores B, et al. Downregulation of autophagy is associated with severe ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury in overexpressing C-reactive protein mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0181848.
- [ 14 ] Aghaei M, Motallebnezhad M, Ghorghanlu S, et al. Targeting autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury: A novel therapeutic strategy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 16768–16778.
- [ 15 ] 闫清支, 麻春杰, 郝蔷薇, 等. 蒙药额尔敦-乌日勒预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织自噬相关蛋白表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(4): 68–73.
- [ 16 ] Li Y, Lu L, Luo N, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway protects against d-galactosamine/lipoplysaccharide-induced acute liver failure by chaperone-mediated autophagy in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 544–553.
- [ 17 ] Zou Y, Ge M, Wang X. Targeting PI3K-AKT-mTOR by LY3023414 inhibits human skin squamous cell carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 385–392.
- [ 18 ] Li Q, Shen L, Wang Z, et al. Tanshinone IIA protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 106–114.
- [ 19 ] 余弘吉, 杨爱东, 李小茜, 等. 宣肺方对内毒素诱导大鼠急性肺损伤 mTOR/S6K1 信号通路的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(4): 431–436.
- [ 20 ] Zhu MJ, Liu BY, Shi L, et al. mTOR-autophagy promotes pulmonary senescence through IMP1 in chronic toxicity of methamphetamine [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20): 12082–12093.

[收稿日期] 2020-08-11

郑二来,陈金锋,陈进军,等. 基于包埋技术的小型猪心冠状动脉铸型三维建模及价值应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 44-48.

Zheng EL, Chen JF, Chen JJ, et al. Three dimensional modeling and value application of coronary artery casting in miniature pig heart based on embedding technology [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 44-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.007

# 基于包埋技术的小型猪心冠状动脉铸型三维建模及价值应用

郑二来<sup>1</sup>, 陈金锋<sup>1\*</sup>, 陈进军<sup>2</sup>, 黄海龙<sup>1</sup>, 陈小宇<sup>2</sup>, 邓健全<sup>1</sup>

(1.肇庆医学高等专科学校基础医学部, 广东 肇庆 526020; 2.肇庆市中医院影像科, 广东 肇庆 526020)

**【摘要】** **目的** 探讨小型猪心冠状动脉解剖结构的立体构筑及其保存应用。**方法** 选取5个完整的新鲜广西巴马小型猪心脏作为实验对象,经灌注、腐蚀等制作小型猪心冠状动脉铸型标本,并探索采用水晶滴胶包埋和三维重建技术构筑小型猪心冠状动脉铸型模型及其三维立体模型的制作流程。**结果** 小型猪心冠状动脉铸型包埋模型透亮度高,可清晰观察到小型猪心冠状动脉血管走行及分支分布,并且无铸型支断裂;其三维模型构筑了小型猪心冠状动脉解剖结构,立体感强,无伪影,可在三维空间内任意角度旋转及分割。**结论** 水晶包埋铸型模型可以有效地保护小型猪心冠状动脉铸型标本,其三维模型也可为动物模型的血管三维虚拟仿真研究提供技术及经验基础。

**【关键词】** 心冠状动脉铸型;三维重建;水晶包埋;铸型标本;小型猪

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0044-05

## Three dimensional modeling and value application of coronary artery casting in miniature pig heart based on embedding technology

ZHENG Erlai<sup>1</sup>, CHEN Jinfeng<sup>1\*</sup>, CHEN Jinjun<sup>2</sup>, HUANG Hailong<sup>1</sup>, CHEN Xiaoyu<sup>2</sup>, DENG Jianquan<sup>1</sup>

(1.Ministry of Basic Medicine, Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526020, China.

2. Department of Imaging, Zhaoqing Hospital of TCM, Zhaoqing 526020)

**【Abstract】 Objective** This study aimed to investigate the stereoscopic structure of the coronary artery in miniature pig heart and its application in preservation. **Methods** Five intact hearts from Guangxi Bama miniature pigs were selected as the experimental objects. Coronary artery casting specimens of the small pig hearts were made by perfusion and corrosion to explore the fabrication process of the small pig coronary artery casting model and three-dimensional (3D) model by using crystal-gutta percha embedding and 3D reconstruction technology. **Results** The result showed that, the model of small pig heart coronary artery cast embedding had high transparency, which could clearly observe the course and branch distribution of small pig heart coronary artery, and no cast branch was broken. The three-dimensional model constructs the anatomical structure of coronary artery in miniature pig heart, which has strong stereoscopic sense, no artifacts, and can be rotated and segmented at any angle in three-dimensional space. **Conclusions** The crystal embedded

**【基金项目】**广东省医学科研基金项目(B2021408)。

**【作者简介】**郑二来(1976—),男,本科,高级实验师,研究方向:人体解剖实验技术与教学,血管铸型与三维模型。

E-mail: zel138138@126.com

**【通信作者】**陈金锋(1980—),男,本科,副教授,研究方向:人体解剖实验技术与教学。E-mail: chenjinfeng1218@sina.com

cast model can effectively protect the coronary artery cast specimens of miniature pigs, the 3D model can also provide a technical and empirical basis for 3D virtual simulation of animal models.

**【Keywords】** coronary artery casting; three-dimensional reconstruction; crystal embedding; casting specimens; miniature pig

心脏相关疾病因其复杂性及患病人群的普遍性一直都受到国内外研究员和临床医生的普遍关注。猪的心脏解剖结构与人较为接近,更适合构建心血管动物研究模型<sup>[1-2]</sup>。目前,猪心冠状动脉铸型标本制作已有相关文献报道<sup>[3-4]</sup>,而有关小型猪心冠状动脉铸型标本保存处理及其三维建模的研究报道甚少。为此,本研究在采用水晶滴胶包埋和三维重建技术构筑小型猪心冠状动脉铸型模型及其三维立体模型,旨在为实验动物血管铸型的后期保存方式及其三维模型构建提供一条可参考制作方法。现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

普通级广西巴马小型猪 5 只,6 月龄,体重为 15~20 kg,雌性 2 只,雄性 3 只,并分别选取其完整新鲜猪心 5 个(外科实验不超过 1 h),猪心外观及主动脉近心端完整,左、右冠状动脉管道通畅,本项目实验动物由南方医科大学动物实验中心 [SCXK(粤)2016-0167] 提供,饲养于肇庆医学高等专科学校动物实验中心普通级实验室 [SYXK(粤)2016-0013],本研究经肇庆医学高等专科学校动物实验中心伦理委员会审核及批准实施((肇医专)2019-D07-04),所有实验操作均遵循实验动物 3R 原则,符合动物伦理学要求。

### 1.2 主要试剂与仪器

E-51 型环氧树脂、RF-400 型环氧树脂增韧改性剂、DMP-30、2、4、6 三(二甲氨基甲基)苯酚、ZY-1618 型改性脂环胺环氧树脂固化剂、环氧树脂消泡剂、氧化铅金属造影粉末、马利牌油画颜料、自制塑料插管、OS-810 型水晶 AB 胶(深圳市欧斯邦新材料有限公司);亚克力板;0.074 mm 直径鱼线;50 mL 注射器;DJ1C-100W 增力电动搅拌器, DB-S001 打磨机,320 #~10000 # 鹰斧牌水磨砂纸,0.5 w 油溶性钻石研磨膏。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小型猪心冠状动脉铸型包埋标本制作

用自制塑料插管于猪心主动脉近心端插管,并用 50 mL 一次性塑料注射器不断抽取 5% 普通肝素

生理盐水对插管内冠状动脉进行推注冲洗,待上腔静脉近心端流出无色液体为止,后采用环氧树脂-混合金属氧化铅(填充剂与造影剂比例为 10 mL:11.3 g)方式进行灌注<sup>[5]</sup>,观察到小型猪心左、右冠状动脉各级分支清晰可见红色填充剂后即可停止,静置标本 7~12 h,待填充剂完全硬化后放入 37% 盐酸腐蚀,3~6 d 后将标本取出将标本放到 5%~10% 过氧化氢水溶液内漂白 12 h,再用自来水反复冲洗干净,得到小型猪心冠状动脉铸型。再根据小型猪心冠状动脉铸型标本的比例制作包埋模具及推算所需水晶 A 胶和 B 胶的量(A 胶:B 胶比例为 2.5 mL:1 mL),用工业搅拌机将水晶 A 胶和水晶 B 胶反复搅拌至两种胶体充分混合,再利用水晶凝胶包埋小型猪心冠状动脉铸型标本(采用最细鱼线悬吊在模具正中),常温静置小型猪心冠状动脉铸型包埋模型 48 h,待水晶凝胶固化后拆除亚克力板模具,最后利用打磨机及钻石研磨膏对小型猪心冠状动脉铸型包埋模型局部凹凸的缺陷分别打磨、抛光,得到小型猪心冠状动脉铸型包埋标本。

#### 1.3.2 CT 扫描及三维重建

将小型猪心冠状动脉铸型包埋标本利用 64 排 128 层 CT 进行薄层扫描(扫描参数:管电压 120 kV,管电流 250 mA,旋转时间每圈 0.5 s,准直宽度 64×0.55 mm,层厚 0.6 mm,层距 0.6 mm,螺距 0.55 mm,视野 350 mm,矩阵 512×512。)得到的数据以 DICOM 格式保存。后将小型猪心冠状动脉铸型包埋标本数据行三维重建,三维重建方式分别为:(1)将标本数据导入 Syngo.via 工作站后,用层厚 10 mm 重建出小型猪心冠状动脉铸型包埋标本的 MIP 三维图像,采用调整窗位窗宽技术进行观察三维图像;(2)将标本数据导入 Mimics 19.0 软件进行动脉血管重建与分割,获取不同阈值的小型猪心冠状动脉铸型包埋标本三维可视化模型。

## 2 结果

### 2.1 小型猪心冠状动脉铸型包埋模型构筑

小型猪心冠状动脉铸型标本动脉走行分明、各分支分布明确,毗邻关系明了,解剖结构形态饱满(图 1)。小型猪心冠状动脉铸型包埋模型构筑整体

无明显色变及波纹等现象,表面较为光滑,具有耐水、耐摔、保存时间长等特点。而且透亮度高,水晶包埋仍可观察到小型猪心冠状动脉血管毗邻关系(图 2)。小型猪心冠状动脉铸型分支延续良好,无断落铸型分支,水晶包埋可较好保护小型猪心冠状动脉铸型标本。

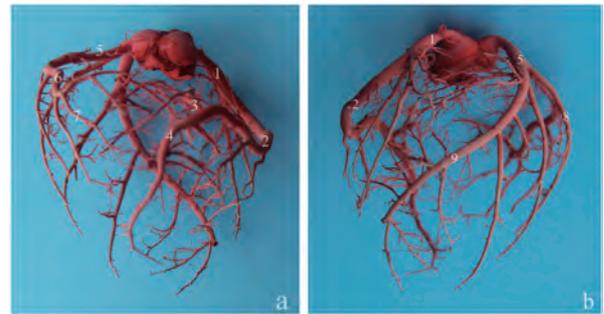
## 2.2 小型猪心冠状动脉铸型包埋三维可视化模型构建

小型猪心冠状动脉铸型包埋标本利用 CT 后处理工作站对小型猪心冠状动脉进行最大密度投影(MIP)三维重建,小型猪冠状动脉的血管走行可透过 MIP 图像清晰辨别(图 3a、3b)小型猪心冠状动脉主干血管分布及分支走行。MIP 重建图像可在三维操作系统内进行旋转及不同角度观测,亦可通过对重建条件的调整选择改变显影方式,得到不同的观察视效。而利用 Mimics 19.0 软件构建的小型猪心冠状动脉铸型包埋三维可视化模型清晰逼真、立体感强、管道饱满、效果逼真,其最大特点在于可利用其软件功能行阈值分割及虚拟操作构建出不同的三维重建模型,通过调整阈值获取不同阈值的小型猪心冠状动脉铸型包埋标本三维可视化模型(图 3c~3f)可在三维操作系统行任意角度旋转及比例缩放,当阈值范围调整为 427~2808HU,可构筑小型猪心冠状动脉整体结构(图 3c、3d),能清晰地显示各分支的走行及分布,由粗至细逐渐至分支末端,当阈值范围调整为 2527~3071 HU,可观察到由左冠状动脉发出对角支、左后降支、左旋支、左室间支;由左冠状动脉发出的右旋支、右后降支。部分分支消失,此时小型猪心冠状动脉铸型包埋三维模型稀疏有度、边缘光滑,更容易观察动脉主干走行。以上两种三维重建方式都清晰显示了的小型猪心冠状动脉血管形态结构的分布及走行,观察的结果均与小型猪心冠状动脉铸型包埋模型相一致。

## 3 讨论

### 3.1 动物血管铸型模型包埋技术改进

动物血管铸型作为解剖标本制作及观测结构形态的手段,常规利用 5% 甲醇溶液混合蒸馏水营造湿性环境保存血管铸型,易导致铸型枝折断,不利于铸型标本的血管网保存及临床教学<sup>[6-7]</sup>,而利用水晶包埋技术对血管铸型标本进行保护性处理,得到铸型包埋标本,可较好地保存原始完整动物血



注:a:小型猪心冠状动脉铸型标本前面观;b:小型猪心冠状动脉铸型标本背面观。1:右冠状动脉;2:右旋支;3:右房室结动脉;4:右后降支;5:左冠状动脉;6:左旋支;7:左后降支;8:对角支;9:左室间支。

图 1 小型猪心冠状动脉铸型

Note. a, Anterior aspect view of coronary artery casting in miniature pig heart. b, Posterior aspect view of coronary artery casting in miniature pig heart. 1, Right coronary artery. 2, Right circumflex artery. 3, Right atrioventricular nodal artery. 4, Right post descending branch. 5, Left coronary artery. 6, Left circumflex artery. 7, Left post descending branch. 8, Diagonal branches. 9, Left interventricular branch.

Figure 1 Coronary artery casting of miniature pig heart

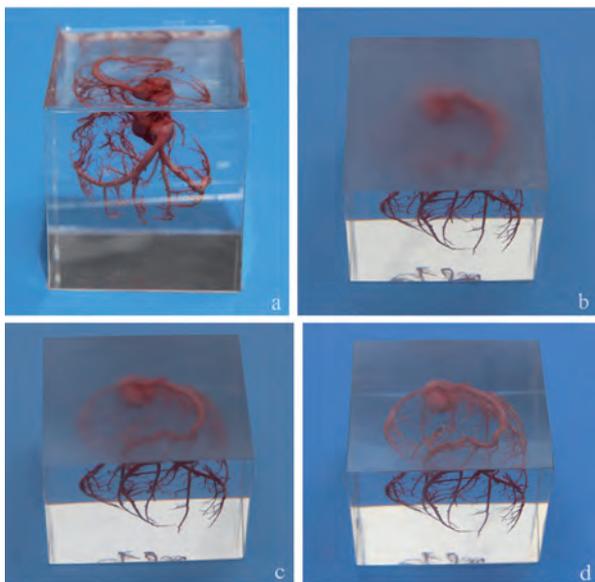
管铸型标本。目前,李长征等<sup>[8]</sup>报道水晶包埋人体器官血管铸型,从图片整体上观察效果比较好,清晰度较好,但是介绍制作过程描述过于简单化,不利于研究者学习。由于每一件动物血管铸型标本尺寸大小不一,必须个性化定制模具。因此,制作模具成本及后续打磨抛光难易度是包埋血管铸型需要考虑重要因素。本研究团队在参考其基础上进行细节改进<sup>[9]</sup>,具体为:(1)模具选择,采用内外层相结合定制模具,内层采用 1 cm 厚 PVC 薄板,外层采用 2.8 cm 厚铝塑板,其优点:①成本低廉,制作小包埋标本(如小型猪心冠状动脉铸型)模具成本在 1.5~2.5 元,而同规格 1 cm 厚有机玻璃模具成本需 10~12 元。如制作包埋中大血管铸型标本(如小型猪肝血管或头颈部等),本研究模具只需扩大表面积成本,增加费用不明显,而需要采用更大厚度有机玻璃封装,厚度越大其成本越昂贵。②制作简便,本研究模具内外层只需要普通美工刀切割和热熔胶黏板只可以,而有机玻璃模具厚度越大,则需要精密机器切割和封装,操作相对复杂。③密封安全性好,在灌胶过程中,即使内层随灌胶量增多,底部压力增大发生小口侧漏,外层是最好固定屏障,保障包埋血管铸型制作不失败。而有机玻璃一旦漏胶,则无法补救,这也是本研究模具独特优势所在。④标本大小不限制,由于有机玻璃承压能力有

限,不适合制作动物全身血管铸型等标本包埋,而本模具非常灵活操作,只需要在外层多处加上固定钳就可以稳固,是本研究模具最大优势。⑤脱模方便,待灌胶固化后撕掉内层就可以,外层在没有损坏情况下可以重复使用,比一次性有机玻璃模具较大地节省制作成本和重复制作工序。(2)包埋标本固定,将标本置于模具正中央位置是最佳的,而在实际灌胶过程中往往出现标本上浮(肺支气管等)或下沉(肝内管道等),均影响包埋后标本观察效果及后续打磨抛光处理。本研究采用最细鱼线悬吊标本于模具正中,模具尺寸一般为标本直径 1.25 倍,这样既能展示包埋标本美观大方,又能为后续精磨抛光留有足够厚度凝胶。(3)精打细磨,是衡量制作动物血管铸型包埋标本质量效果好坏最后工序,根据脱模后模型情况,选择不同型号磨砂纸(400#-8000#)进行研磨,采取“先机后人”、“先粗后细”原则,若模型部分边界成型后表面凹凸不平明显先采用打磨机砂带磨削(<2000#),待模型表面平整后,再采用 2500#以上砂纸进行人工细磨,直至标本透亮度清晰可见,最后再使用散粒抛光膏对死

角划痕纹理持续抛光处理即可。

### 3.2 基于铸型包埋技术下构筑小型猪心冠状动脉三维模型的优势

随着现代医学技术的进步,心血管疾病的术前治疗方案也逐渐多样,术前规划与治疗效果的科学预测在心血管手术中显得尤为重要,目前术前规划方案数据的获取多依赖于医学图像的获取和三维重建,对冠状动脉血管的三维重建及分割算法的研究也成为了数字可视化领域热点<sup>[10-13]</sup>。目前,邓健

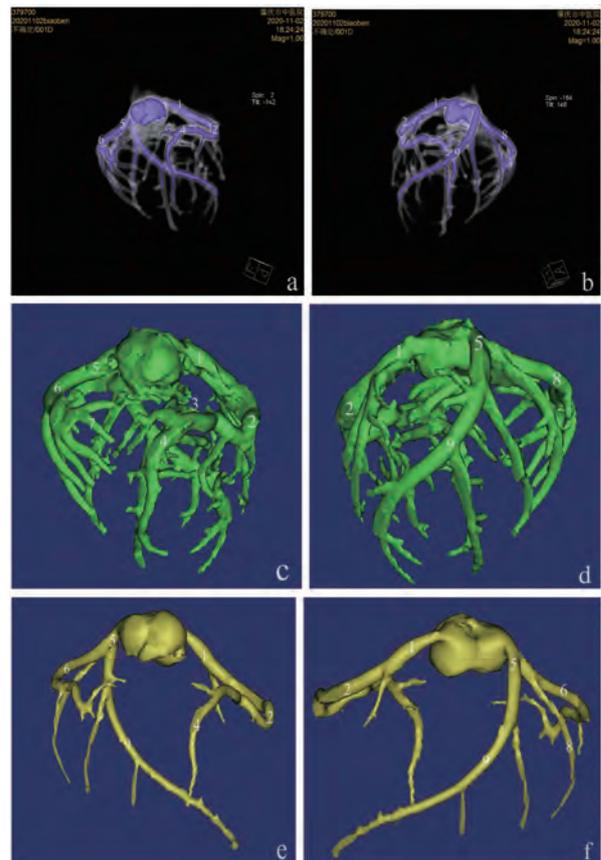


注:a:未打磨包埋模型;b:400#水磨砂纸打磨包埋模型;c:7000#水磨砂纸打磨包埋模型;d:小型猪心冠状动脉铸型包埋模型成品。

图 2 包埋后小型猪心冠状动脉铸型

Note. a, Unsalted Crystal embedding model. b, Crystal embedding model with Frosted Paper 400#. c, Crystal embedding model with Frosted Paper 7000#. d, Coronary artery casting in miniature pig heart based on embedding technology.

Figure 2 Coronary artery casting of miniature pig heart after embedding



注:a:MIP 三维重建模型前面观;b:MIP 三维重建模型背面观;c、d:mimics 阈值为 427~2808HU 的三维重建模型;e、f:mimics 阈值为 2527~3071HU 的三维重建模型。1:右冠状动脉;2:右旋支;3:右房室结动脉;4:右后降支;5:左冠状动脉;6:左旋支;7:左后降支;8:对角支;9:左室间支。

图 3 小型猪心冠状动脉铸型三维可视化模型

Note. a, Anterior aspect view of MIP reconstruction model. b, Posterior aspect view of MIP reconstruction model. c/d, Mimics threshold value of 427~2808HU. e/f, Mimics threshold value of 2527~3071 HU. 1, Right coronary artery. 2, Right circumflex artery. 3, Right atrioventricular nodal artery. 4, Right post descending branch. 5, Left coronary artery. 6, Left circumflex artery. 7, Left post descending branch. 8, Diagonal branches. 9, Left interventricular branch.

Figure 3 Three dimensional visualization model of coronary artery casting in miniature pig heart

全等<sup>[14]</sup>利用氧化铅造影填充剂制作小型猪心冠状动脉铸型,后经 CT 扫描及 Mimics 软件成功构建小型猪心冠状动脉三维模型,实现了由二维图像到三维立体模型的转变,直观、立体观察小型猪心冠状动脉血管分布及走行,对了解小型猪心冠状动脉结构有较大的优势。本研究在其研究基础上则利用水晶滴胶包埋技术、血管铸型技术及三维重建技术构建构筑小型猪心冠状动脉三维模型,与国内动物研究文献<sup>[15-17]</sup>相比较,具有以下优势:(1)血管铸型标本保护性强,小型猪心冠状动脉细小分支多且易折断,频繁翻动观察容易损坏其分支血管,而血管铸型标本经过水晶包埋后,具有耐磨损、防酸碱、携带方便及任意角度旋转观摩等特点,非常适合临床现场标本示教和生命科学馆展示。(2)构筑三维模型清晰度高,根据计算机图像处理原理<sup>[18]</sup>,水晶滴胶主要是环氧树脂固化物,阈值为 0,即是水晶滴胶包埋前后基于 CT 扫描数据构筑小型猪心冠状动脉三维模型效果一样,建立三维模型清晰度无差别。(3)封装成本低廉,保存周期长。采用水晶滴胶包埋血管铸型标本封装成本明显低于常规有机玻璃盒,封装血管铸型标本越大,成本性价比越明显。并且克服有机玻璃盒定期更换保存液及日常维护等缺点,性价比高。

综上所述,通过水晶滴胶包埋技术、血管铸型技术及三维重建技术三者融合一体构筑小型猪心冠状动脉三维模型,可以直观显示虚拟和真实小型猪心冠状动脉的三维立体状态,为今后数字化实验动物血管研究及人体数字标本三维模型建立提供创新性思维方法。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 陈雨荣,安星兰,汪正铸,等.猪作为人类疾病模型的研究进展[J].中国比较医学杂志,2020,30(7):110-119.
- [ 2 ] 赵玉,李静淑,杨桂芝,等.小猪冠状动脉支架植入模型的建立[J].哈尔滨医科大学学报,2014,48(6):468-471.
- [ 3 ] 那顺巴雅尔,吴清洪,陈丽,等.西藏小型猪部分脏器血管

铸型标本制作[J].中国比较医学杂志,2008,18(10):48-51,90.

- [ 4 ] 杨德猛,锥国胜,马建军,等.家猪心脏动脉铸型标本的设计制作[J].新乡医学院学报,2007,24(3):250-251,256.
- [ 5 ] Huang HL, Chen JJ, Wang Y, et al. Study on multi-density contrast agent fillers of duct casting based on ct three-dimensional reconstruction [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2017, 37(2): 300-306.
- [ 6 ] 马玉祥,周晓辉,于翠萍,等.人体解剖特殊标本制作技术及研究进展分析[J].中国卫生产业,2018,15(15):195-196.
- [ 7 ] 张旭晨.浅议人体解剖标本的制作保存和发展方向[J].科技风,2016,10(16):291-292.
- [ 8 ] 李长征,谢永财,王志福.水晶胶包埋保存铸型标本的方法[J].解剖学杂志,2018,41(4):476-478.
- [ 9 ] 钱柏宇,关望,黄海龙,等.水晶包埋法在胎儿脏器管道铸型标本中的应用[J].局解手术学杂志,2020,29(9):760-762.
- [ 10 ] 张志强,周树礼,程志兵,等.琥珀的特性及价值[J].超硬材料工程,2012,24(6):46-51.
- [ 11 ] 曹雪,丁金立,刘有军.虚拟心脏搭桥手术模型雕塑系统的研究[J].医用生物力学,2012,27(6):593-597.
- [ 12 ] 李越,蒋路茸,童基均.心血管造影图像分割方法综述[J].计算机系统应用,2020,29(9):1-15.
- [ 13 ] 刘玉倩,蔺嫦燕.基于图像融合的冠状动脉三维重建方法的研究进展[J].北京生物医学工程,2019,38(4):427-433.
- [ 14 ] 邓健全,黄海龙,陈小宇.小型猪冠状动脉的三维建模与 3D 打印研究[J].局解手术学杂志,2018,27(12):849-853.
- [ 15 ] 江汉臣.冠状动脉应用解剖与三维重建[D].长沙:湖南师范大学,2016.
- [ 16 ] 侯洁,肖俊睿,孙玉,等.次全结扎冠状动脉法构建巴马小型猪心肌缺血模型[J].中国介入影像与治疗学,2018,15(9):561-565.
- [ 17 ] 马昌榕,刘燕,蒋桔泉.改良法制作兔右冠状动脉缺血再灌注损伤模型[J].中国临床解剖学杂志,2020,38(3):351-354,358.
- [ 18 ] Zeng N, Tao H, Fang C, et al. Individualized preoperative planning using three-dimensional modeling for Bismuth and Corlette type III hilar cholangiocarcinoma [J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): 44.

[收稿日期]2020-12-18

王萍,方晓艳,苗明三. 基于数据挖掘的便秘动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 49-54.  
Wang P, Fang XY, Miao MS. Application analysis of constipation animal models using data mining [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 49-54.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.008

## 基于数据挖掘的便秘动物模型应用分析

王萍,方晓艳\*,苗明三\*

(河南中医药大学,郑州 450046)

**【摘要】** 目的 研究便秘动物模型造模特点,为提高造模成功率提供参考。方法 以“便秘”和“动物模型”为主题词,检索中国知网、万方和维普数据库中2015年1月~2020年7月之间的全部实验性期刊文献。归纳实验动物种类、造模方式、造模方法、造模时间、检测指标等,进行归纳分析。结果 纳入符合标准的期刊文献142篇,以采用雌雄各半的SD大鼠和KM小鼠复制便秘动物模型为主,复方地芬诺酯和洛哌丁胺灌胃法为最常见的造模方法;造模时间多为7d和14d,最长为慢传输型便秘120d,指标检测侧重于炭墨推进率、排便功能、结肠组织免疫组化及血清中生化指标。结论 现有的动物模型常以药物诱导法单因素建模,缺乏多因素建模评价体系,如限水控食法和低纤维饮食法虽较符合真实便秘的致病因素,但目前相关研究较少,目前便秘模型研究多倾向于肠道排便功能、结肠组织病理结构和血清中生化指标等来评价受试药物。随着便秘研究的深入,脑-肠轴交互作用为便秘研究提供了新的思路,可在今后便秘实验中增加相关实验研究。

**【关键词】** 便秘;动物模型;数据挖掘;造模特点;应用分析

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)07-0049-06

## Application analysis of constipation animal models using data mining

WANG Ping, FANG Xiaoyan\*, MIAO Mingsan\*

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

**【Abstract】 Objective** Research on the modeling points of constipation animal models to provide reference for improving the success rate of modeling. **Methods** Using “secret” and “animal models” as the subject terms, all experimental journal articles from January 2015 to July 2020 in the databases of China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang, and Weipu were searched. Summarize the types of experimental animals, modeling methods, modeling methods, modeling time, testing indicators, etc., and conduct a summary analysis. **Results** One hundred forty-two journal articles that met the criteria were included. Sprague Dawley (SD) rats and Kunming (KM) mice were mainly used to replicate animal models of constipation. Compound diphenoxylate and loperamide were the most common method of modeling. The modeling time was mostly 7 d and 14 d, and the longest was slow transit constipation of 120 d. The index detection focused on the carbon ink advancement rate, defecation function, colon tissue immunohistochemistry, and serum biochemical indicators. **Conclusions** Existing animal models often use drug-induced single-factor modeling and lack a multi-factor modeling evaluation system. For example, the water-restricted food control method and the low-fiber diet method are more in line with the real pathogenic factors of constipation, but there are currently few related studies. At

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

[作者简介] 王萍(1994—),女,硕士研究生,药理学专业,研究方向:药理学。E-mail: wangpingping0511@163.com

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

方晓艳(1974—),女,博士,教授,从事中药药理的教学与研究。E-mail: fxylele@yeah.net

\* 共同通信作者

present, research on constipation models tends to evaluate test drugs by intestinal defecation function, colonic histopathological structure, and serum biochemical indicators. With the advancement of constipation research, brain-gut axis interactions provide new ideas for constipation research, and related experimental research can be explored in future constipation experiments.

**【Keywords】** constipation; animal model; data mining; modeling site; application analysis

便秘是一种功能性胃肠道 (GI) 疾病<sup>[1]</sup>, 在我国发病率为 6.07%, 2016 年最新版的罗马 IV 标准 (Rome IV criteria) 将其更加全面的定义为以排便困难、排便次数减少或除腹泻型肠道应激综合征 (IBS-D) 外引起的排便不尽感为主的症状<sup>[2]</sup>; 长期便秘可继发痔疮, 诱发心脑血管疾病, 增加肠癌等的患病风险等<sup>[3]</sup>, 由于饮食结构改变、生活节奏加快和社会心理因素等影响, 便秘患者逐渐增多, 严重影响患者的生活质量<sup>[4]</sup>。便秘的相关研究越来越受到医学界的重视和关注。可通过建立与临床高度吻合的便秘动物模型, 从而促进便秘病因病机、新药筛选等方面的研究。笔者通过归纳分析近 5 年便秘动物模型特点, 以期今后便秘实验研究提供参考。

## 1 资料和方法

### 1.1 数据来源

以“便秘”和“动物模型”为主题, 在中国知网、万方和维普数据库中检索 2015 年 1 月~2020 年 7 月全部实验性期刊文献。

### 1.2 归纳标准

选用便秘动物实验研究的全部动物; 会议、硕博论文等不作为纳入的范畴; 排除综述类和资料不全的文献。共筛选出符合纳入标准的文献 142 篇。

### 1.3 数据处理

实验动物名称、种类等均参照《实验动物和动物实验技术》<sup>[5]</sup>进行规范总结。

### 1.4 统计学方法

将实验动物种类、阳性药、造模给药方式、造模方法、检测指标等录入 Excel 2013 进行统计和分析。

## 2 结果

### 2.1 实验动物选择

将选用的 142 篇实验文献中的全部实验动物种类进行统计<sup>[6-22]</sup>, 共有 7 类实验动物, 累积频率 142 次。实验动物多选择: SD 大鼠, 雌雄各半, 体重以 (200±20) g 为主; KM 小鼠, 雌雄各半, 以 (20±2) g 为主。便秘实验动物种类、性别、体重分布情况详情见表 1。

### 2.2 造模方式

将 142 篇实验文献所采用的造模给药方式进行分类共包括了 3 种造模方式。以灌胃 (128 次, 90.1%) 为主。便秘造模方式分布见图 1。

### 2.3 造模方法

经分析, 142 篇便秘实验文章共包括了 12 种造模方法。其中复方地芬诺酯法 (57 次, 40.1%) 和洛哌丁胺法 (34 次, 24.0%) 使用较多。便秘造模方法统计见表 2。

### 2.4 阳性药

统计得出, 便秘动物实验多选择麻仁丸、麻仁软胶囊和枸橼酸莫沙必利片作为阳性对照药物, 其次为西沙比利片、琥珀酸普芦卡必利片、常通舒颗粒、优乐多益生元和酚酞片等。

### 2.5 建模周期

统计结果显示, 便秘动物模型建模周期大多以 7 d 和 14 d 为主, 慢传输型便秘时间最长为 120 d, 详情见表 3。

### 2.6 实验相关指标

统计结果得出, 便秘实验相关指标可细分为 15 类, 见表 4。如果同一组织被划分为不同的检测指标, 需分开统计, 如同一实验中结肠组织既要做病理又要做免疫组化; 如果同一组织被同时检测多个同类型指标, 归纳为一类<sup>[6]</sup>。如血清中血清 P 物质 (SP)、血管活性肠肽 (VIP)、肠神经递质 5 羟色胺 (5-HT)、NO 等, 则把这些指标统称为血清指标, 同一实验只计入一次。

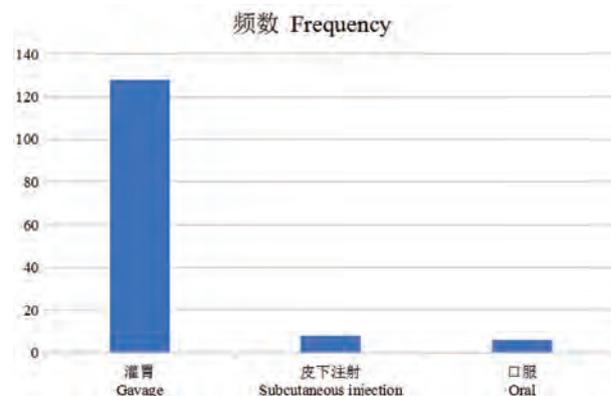


图 1 便秘造模方式分布

Figure 1 Distribution of constipation models

### 3 讨论

现代研究表明,长期服用泻药、不良的生活习惯、影响结直肠功能的疾病以及自身心理因素均可诱发便秘。便秘的发病机制与结肠动力异常、结肠平滑肌异常、肠神经系统(ENS)及肠神经递质或胃肠激素异常、结肠 Cajal 间质细胞(ICC)功能异常、水通道蛋白(AQPs)表达异常等有关<sup>[23-27]</sup>。中医学认为,便秘的发生,病位在大肠,且与肺、脾、胃、肝、肾关系密切<sup>[28]</sup>。《医贯》指出:"大肠者,传导之腑,以通为顺",故大肠传导功能失常,或热,或气郁,或气血亏虚,或寒凝,均可导致大肠传导失职,肠腑不通而成便秘<sup>[29]</sup>。

便秘发病率呈上升趋势,单纯的西药治疗方法包括润滑剂、泻药、改善肠道动力药物等,疗效不理想<sup>[30]</sup>;中医临床常采用内治法、外治法、针灸疗法、按摩疗法等来治疗便秘,体现了中医辨证论治的基本特点,效果显著,不良反应小<sup>[31]</sup>。但尚未找到能够根治的治疗方法,仍需进一步增加动物实验研究,为今后便秘发病机制、新药筛选等方面提供更好的研究基础。目前尚未有与人类完全相同的动物自发性便秘模型,仍需要人工加以复制,常用于建立便秘模型的动物为 SD 大鼠和 KM 小鼠,均具有易得、经济的优点<sup>[32]</sup>。目前我国最常用于便秘研究的大鼠为 SD 大鼠,本文所统计得出结果也印证了这一说法。小鼠耐受力不及大鼠,不适宜长期造模给药。小鼠多用于观察排便试验,大鼠多用于观察肠道水吸收试验,观察胃肠运动则大、小

鼠均可<sup>[33]</sup>。此外,经统计分析还发现在动物性别选择上,大多实验文章选择雌雄各半分配动物,这样可以减少仅用雌鼠分泌较多炎性因子对检测指标造成误差。

表 1 便秘实验动物种类分布

Table 1 Types distribution of experimental animals for constipation

动物种类 Animal species	性别 Gender	频数 Frequency	百分比 Percentage	体重 Body weight
SD 大鼠 SD rats	雄性 Male	19	13.4%	以(200±20)g 为主 Mainly (200±20) g
	雌性 Female	4	2.8%	
	雌雄各半 Male and female	49	34.5%	
KM 小鼠 KM mouse	雄性 Male	11	7.7%	以(20±2)g 为主 Mainly (20±2) g
	雌性 Female	3	2.1%	
	雌雄各半 Male and female	31	21.8%	
Wistar 大鼠 Wistar rats	雄性 Male	5	3.5%	以(200±20)g 为主 Mainly (200±20) g
	雌性 Female	0	-	
	雌雄各半 Male and female	6	4.2%	
ICR 小鼠 ICR mouse	雄性 Male	4	2.8%	以(20±2)g 为主 Mainly (20±2) g
	雌性 Female	2	1.4%	
	雌雄各半 Male and female	3	2.1%	
Balb/c 小鼠 Balb/c mouse	雄性 Male	3	2.1%	以(20±2)g 为主 Mainly (20±2) g
	雌性 Female	0	-	
	雌雄各半 Male and female	0	-	
KM 大鼠 KM rats	雄性 Male	0	-	(200±10)g
	雌性 Female	0	-	
	雌雄各半 Male and female	1	0.7%	
NIH 小鼠 NIH mouse	雄性 Male	0	-	(20±2)g
	雌性 Female	0	-	
	雌雄各半 Male and female	1	0.7%	

表 2 便秘造模方法统计表

Table 2 Statistical table of constipation modeling methods

造模方法 Method	频数 Frequency	造模方法 Method	频数 Frequency
复方地芬诺酯 Compound diphenoxylate	57	冰水 Ice water	5
洛哌丁胺 Loperamide	34	白醋+0℃活性炭冰水+复方地芬诺酯 White vinegar + 0℃ activated carbon ice water + compound diphenoxylate	5
泻剂结肠法 Laxative colon method	11	硫糖铝 Sucralfate	4
复方地芬诺酯+乙酰苯肼+环磷酰胺 Compound diphenoxylate + acetophenazine + cyclophosphamide	7	低纤维饲料 Low-fiber feed	2
限水控食 Limit water and food	8	复方苯已哌啶 Compound benhexidine	1
盐酸吗啡 Morphine hydrochloride	6	洛哌丁胺+乙酰苯肼+环磷酰胺 Loperamide + acetophenazine + cyclophosphamide	1
		甲状腺素+利血平 Thyroxine + reserpine	1

本文统计发现使用最多的造模方式为灌胃,在全部实验文章的给药方式中占比 90.1%。目前有多种便秘模型制备方法,如可通过药物诱导(复方地芬诺酯、洛哌丁胺、吗啡、大黄等)、物理刺激(冰水灌胃、限水限食等)、手术、低纤维饮食等方法建立<sup>[34]</sup>。对其进行分析评价,均有其局限性,复方地芬诺酯法与临床症状相似,操作简单,有利于快速筛选具有潜在通便药效的物质。是目前运用较多的制备方法之一,但给药剂量多样,无确切的量化标准,实验前应做预实验;洛哌丁胺法有助于探讨抗便秘药物的作用机制<sup>[35]</sup>,同时洛哌丁胺可联合(慢性失血、甲状腺素、冰水刺激)复制血虚便秘、阴

表 3 便秘建模周期统计表

**Table 3** Statistical table of constipation modeling cycle

建模周期	频数	百分比	建模周期	频数	百分比
Modeling cycle	Frequency	Percentage	Modeling cycle	Frequency	Percentage
30 min	4	2.81%	28 d	11	7.75%
3 d	8	5.63%	30 d	6	4.23%
5 d	3	2.11%	40 d	1	0.70%
7 d	38	26.76%	42 d	6	4.23%
9 d	3	2.11%	45 d	5	3.52%
14 d	35	24.65%	103 d	5	3.52%
18 d	1	0.70%	115 d	4	2.81%
20 d	2	1.41%	120 d	1	0.70%
21 d	9	6.34%	/	/	/

表 4 便秘实验检测指标分类

Table 4 Classification of constipation test indicators

指标分类	频数	百分比	检测指标
Index classification	Frequency	Percentage	Measurements
肠道推进功能 Bowel propulsion function	89	62.7%	炭墨推进率 Carbon ink advance rate
排便功能 Bowel function	81	57.0%	首粒黑便排出时间、6 h 内大便粒数、大便湿重、大便干重、大便含水量等 Time to discharge the first black stool, number of stools in 6 h, wet stool weight, dry stool weight, stool water content, etc
结肠组织免疫组化 Colon tissue immunohistochemistry	57	40.1%	生长抑素(SS)、AChE、SP、MTL、5-HT、PI3K、AKT、AQP3、AQP4、NO、eNOS 及 Cajal 间质细胞(ICC)蛋白表达水平等 Somatostatin(SS), AChE, SP, MTL, 5-HT, PI3K, AKT, AQP3, AQP4, NO, eNOS, and Cajal interstitial cell(ICC) protein expression levels, etc
血清中生化指标 Biochemical indicators in serum	49	34.5%	ELISA 法检测 P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、一氧化氮(NO)、5-羟色胺(5-HT)、MOT、CGRP 及超氧化物歧化酶(SOD)活力等 ELISA method to detect substance P(SP), vasoactive intestinal peptide(VIP), nitric oxide(NO), serotonin(5-HT), MOT, CGRP and superoxide dismutase(SOD) activity, etc
常规指标 Conventional indicators	39	27.5%	体重、活动状态、毛色、口、鼻、唇、尾颜色、有无死亡等 Body weight, activity status, coat color, mouth, nose, lips, tail color, death, etc
结肠组织蛋白免疫印迹法 Western blot of colon tissue protein	37	26.1%	AQP3、AQP9、AQP8 及 mRNA 等蛋白水平表达 AQP3, AQP9, AQP8 and mRNA level expression
结肠组织病理 Colonic histopathology	26	18.3%	苏木精-伊红(HE)染色法,观察结肠组织结构形态变化 Hematoxylin-Eosin(HE) staining method to observe changes in colon tissue structure
荧光定量聚合酶链式反应检测 Real-time PCR	18	12.7%	结肠蛋白激酶 A(PKA)、速激肽受体 1(NK-1) mRNA 的表达 Expression of colonic protein kinase A(PKA) and tachykinin receptor 1(NK-1) mRNA
结肠黏液分泌功能 Colonic mucus secretion function	6	4.2%	光镜下观察粘液分泌情况 Observe mucus secretion under light microscope
肠道酶活性 Intestinal enzyme activity	2	1.4%	二硝基水杨酸比色法对纤维素酶和木聚糖酶等活性 Dinitrosalicylic acid colorimetric method for cellulase and xylanase activities
胃肠激素含量 Gastrointestinal hormone content	3	2.1%	胃动素 Motilin、VIP
肠道菌群 Intestinal flora	3	2.1%	采用传统平板计数法测定粪便中大肠杆菌、乳酸杆菌、双歧杆菌变化等 Measure the changes of <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> in stool by traditional plate counting method
盲肠细菌代谢产物 Cecal bacterial metabolites	1	0.7%	短链脂肪酸 SCFAs

虚便秘、阳虚便秘大鼠模型,目前可用于开展虚症便秘的基础研究<sup>[36]</sup>;复方苯己哌啶法可用于制备慢传输型便秘,但该法建模周期长,应用不多;限水控食法适用于功能性便秘的发生机制和通便药物的治疗作用研究<sup>[37]</sup>,但建模周期长,稳定性差,由于长时间缺水,模型组可能会出现无便现象,治疗组开始给药时正常饮水,对模型组的影响还需进一步深究;泻剂结肠法适用于临床因长期服用泻剂导致结肠型便秘机制的研究,造模时间长,且长期服用大黄可导致结肠神经系统病变<sup>[34]</sup>;复方地芬诺酯+乙酰苯胺+环磷酰胺法可用于血虚型便秘的研究,与临床中真实生理特征相符度低,过程复杂;食醋+活性炭冰水法制备的模型症状与临床阳虚便秘证有一定的相似度,该模型稳定性较差,模型动物的排便时间和排便粒数受环境温度的影响较大<sup>[38]</sup>,应严格控制活性炭浓度及冰水温度,且小鼠较大鼠耐受性差,此法常用大鼠作为建模对象;蔗糖铝法与吗啡法可用于制备药物依赖性模型;饥饿失常+过度疲劳+缺水燥结法可用于制备脾虚型便秘模型。便秘动物模型建模时间以 7 d 和 14 d 为主,通常慢传输型便秘模型建模时间较长,小鼠耐药性较大鼠差,多选择大鼠为建模对象。便秘动物模型的特征可以在炭墨推进率、排便功能、血清中生化指标和结肠组织免疫组化等指标中体现。经本文统计发现,142 篇实验文献中所测得指标较多的为:(1) 常规指标表现:毛发状况、体重、摄食饮水量、尿量、排便次数等;(2) 排便功能:6 h 内粪便粒数、粪便重量、粪便含水率以及首次排便时间;(3) 生化指标:肠神经递质 5-羟色胺(5-HT)、一氧化氮(NO)、肠内 P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、水通道蛋白 3(AQP3)、水通道蛋白 4(AQP4)、水通道蛋白 8(AQP8)及其 mRNA 的含量、血清中 AVP 和 cAMP 的含量、肠道 Cajal 细胞阳性表达面积以及结肠 c-kit mRNA 阳性表达率等,这些指标通过免疫组化、蛋白免疫印迹法及病理学观察测定<sup>[39-41]</sup>,可以有效评价便秘的程度。

综上所述,在复制便秘动物模型时常选择雌雄各半的 SD 大鼠和 KM 小鼠,采用复方地芬诺酯或洛哌丁胺灌胃法来造模,现有的动物模型常以药物诱导法单因素建模,缺乏多因素建模评价体系,如限水控食法和低纤维饮食法虽较符合真实便秘的致病因素,但目前相关研究较少,便秘模型研究多倾向于肠道排便功能、结肠组织病理结构和血清中生

化指标等来评价受试药物。便秘的发病机制仍需进一步探寻,有研究学者提出“脑-肠轴”与便秘密切相关,即大脑可通过脑-肠轴将信号冲动下传来调控胃肠道功能,胃肠道功能异常也会影响大脑功能<sup>[42]</sup>,其中脑肠肽对胃肠运动起着关键作用,如便秘动物模型常检测的指标 VIP、P 物质、5-HT、生长抑素、NO、胃动素等脑肠肽,既存在于胃肠道也存在于脑组织中,享有神经递质和神经激素双重身份,是脑-肠轴双向调节的媒介<sup>[43]</sup>,研究表明,便秘患者肠道菌群紊乱,肠道菌群的变化,可促使微生物代谢产物发生改变,进而改变肠道运动,诱发便秘<sup>[44]</sup>,但在现有的动物模型检测指标中对肠道菌群的检测占比较少,且目前脑-肠相互作用机制尚不明确,可在今后便秘动物实验中继续完善指标,增加相关机制研究。

#### 参考文献:

- [1] 李海波,石宇,张虹玺. 助阳通便膏对大鼠便秘的肠道菌群及屏障功能的调节作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1714-1717.
- [2] 王海播,王靓,张红梅. 便秘症状自评工具的研究进展[J]. 中国临床护理, 2019, 11(5): 452-456.
- [3] 郭海霞,钱海华,张丹,等. 慢性传输型便秘“肠病及肺”相关机制实验研究[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(7): 15-19.
- [4] 蒋峰,周锦勇,刘明浩,等. 养阴润肠方对便秘小鼠结肠水通道蛋白 3/9 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 114-120.
- [5] 苗明三. 常用医药研究动物模型[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007.
- [6] 卢晓明,田霁昕,李宁阳,等. 大蒜对便秘模型小鼠的润肠通便功能[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 39-43.
- [7] 齐丽娟,聂燕敏,张维,等. 小鼠低纤维膳食便秘模型的初步研究[J]. 毒理学杂志, 2019, 33(5): 357-360.
- [8] 陈显韬,杜位良. 补肺汤对慢传输型便秘模型大鼠结肠内 5-HT 和 SP 的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2019, 25(5): 664-668.
- [9] 吴本升,王晓鹏,孙明明,等. 基于慢传输型便秘大鼠结肠 ICC 及 AQP3 变化的温阳益气方改善便秘的作用机制探讨[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2360-2365.
- [10] 张微,李瑛,刘丽莎,等. 电针大肠俞募穴对功能性便秘小鼠结肠内 GDNFmRNA、RaimRNA 表达影响的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(11): 1522-1524, 1551.
- [11] 张桢,贺平. 从多项行为学测评分析慢传输型便秘大鼠的精神心理异常及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(33): 1914-1919.
- [12] Zhu X, Liu Z, Qu H. The effect and mechanism of electroacupuncture at LI11 and ST37 on constipation in a rat

- model [J]. *Acupunct Med*, 2016, 34(3): 194-200.
- [13] 岳灵, 李颖, 高蕊, 等. 基于 BDNF 蛋白表达研究电针俞募穴对便秘大鼠脑肠交互作用的影响机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(10): 2438-2441.
- [14] 邓永丽, 何洁, 马丽花, 等. 雪莲果糖浆促进便秘小鼠排便作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(10): 84.
- [15] Liang C, Wang K, Xu B, et al. Electroacupuncture at acupoint ST 37 (Shangjuxu) improves function of the enteric nervous system in a novel mouse constipation model [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 392.
- [16] 涂星, 柴玉娜, 唐洪梅, 等. 肝郁脾虚型肠易激综合征便秘大鼠模型的建立和评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 30-34.
- [17] 杜丽东, 雒军, 吴国泰, 等. 当归对血虚便秘模型小鼠结肠水通道蛋白 4 表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 103-107.
- [18] 李燕, 彦培傲, 赵梦杰, 等. 附子总生物碱在阳虚便秘模型大鼠体内的整合药理学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(1): 79-84.
- [19] Shin DH, Lee MJ, Jiao HY, et al. Regulatory roles of endogenous mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases in the pacemaker activity of colonic interstitial cells of cajal [J]. *Pharmacology*, 2015, 96(1-2): 16-24.
- [20] 周永学, 王郁金, 闫曙光, 等. 硝菴通结方对功能性便秘大鼠结肠组织中 VIP-cAMP-PKA-AQP3 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24): 99-104.
- [21] 杜丽娟, 吴至久, 唐学贵, 等. 便秘通合剂对便秘模型大鼠 PGP9.5 及 SS 在结肠组织中表达的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2015, 23(9): 604-607.
- [22] 姚一博, 王迪, 王钱陶, 等. 盐酸洛哌丁胺诱导的小鼠慢传输型便秘模型的实验研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 370-375.
- [23] 杜丽东, 吴国泰, 牛亭惠, 等. 当归“润肠通便”功效物质基础的实验研究 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2018, 35(3): 11-16.
- [24] 孔凡彪, 邓巧明, 邓洪强, 等. 六磨汤高位灌肠联合生物反馈治疗混合型功能性便秘 45 例临床观察 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(19): 1654-1657.
- [25] 段鑫鑫. 慢传输型便秘中医综合治疗研究进展 [J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(5): 152-153.
- [26] 徐可, 翟春宝, 田利军, 等. 慢传输型便秘发病机制研究进展 [J]. *山西医药杂志*, 2015, 44(14): 1634-1636.
- [27] 汪红兵, 陈剑明, 张声生. 老年功能性便秘中医病机规律临床流行病学调查 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(12): 21-23.
- [28] 梁星琛, 周永学, 张小波. 基于“肾主水司二便”探讨硝菴通结方对功能性便秘大鼠水通道蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(1): 57-60.
- [29] 时岱, 姜莉云. 老年功能性便秘的中医研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2016, 25(18): 37-39, 42.
- [30] 马剑海. 中药膏方配合生物反馈治疗慢传输型功能性便秘的疗效及对生活质量的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(11): 1153-1156, 1161.
- [31] 杨园, 胡晓玉, 桑秋, 等. 含臭参复方对实验性便秘的影响及作用机制研究 [J]. *云南中医学院学报*, 2017, 40(5): 18-22.
- [32] 辛玉, 张红星, 周利. 功能性便秘大鼠模型的研究进展 [J]. *湖北中医杂志*, 2014, 36(3): 74-76.
- [33] 王岚, 彭成. 便秘动物模型的研究进展 [J]. *广州中医药大学学报*, 2007, 24(2): 174-176.
- [34] 许明敏, 张微, 王路, 等. 功能性便秘动物模型评价的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1): 315-318.
- [35] 谢建超, 吴国泰, 牛亭惠, 等. 便秘动物模型的复制概况及评价 [J]. *实验动物科学*, 2016, 33(5): 64-67, 70.
- [36] 杜丽东, 任远, 牛亭惠, 等. 3 种模拟中医体证的体虚便秘大鼠模型建立及效果观察 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(2): 140-145.
- [37] 郑倩, 徐华. 便秘动物模型的研究进展 [J]. *临床消化病杂志*, 2012, 24(3): 189-191.
- [38] 彭成, 王岚, 赵小梅. SD 大鼠阳虚便秘模型的建立及评价 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(3): 407-409.
- [39] 吴本升, 周青, 颜帅, 等. 温阳益气方对便秘模型大鼠结肠水通道蛋白 3.8 表达及肠道动力的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2018, 35(1): 112-117.
- [40] 刘海华, 郑保平, 林唐唐, 等. 茶油清润合剂治疗小鼠便秘疗效观察及作用机制研究 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2019, 17(9): 101-104.
- [41] 陈思敏, 关丽娜, 庞峻, 等. 生白术对慢传输型便秘模型大鼠结肠水通道蛋白表达影响的研究 [J]. *新中医*, 2019, 51(6): 12-16.
- [42] 徐敏. 基于“脑-肠轴”理论探讨老年慢性便秘患者睡眠障碍与焦虑抑郁和生活质量相关性 [J]. *世界华人消化杂志*, 2020, 28(4): 129-134.
- [43] 周肫, 钱海华, 张丹, 等. 基于肠道菌群与脑肠轴的相互作用机理探讨中医脑肠学说 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 119-122.
- [44] 刘鹏林, 乔翠霞, 尤雯丽, 等. 基于肠道菌群探讨功能性便秘从脾论治的机理 [J]. *中国肛肠病杂志*, 2020, 40(12): 64-66.

[收稿日期]2020-08-11

苏红见, 乔亚红, 安云霞, 等. 二甲双胍调控 miR-34a 对慢阻肺大鼠气道炎症的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 55-61.

Su HJ, Qiao YH, An YX, et al. Effect of metformin on airway inflammation in COPD rats by regulating miR-34a [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 55-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.009

## 二甲双胍调控 miR-34a 对慢阻肺大鼠气道炎症的影响研究

苏红见<sup>1</sup>, 乔亚红<sup>1\*</sup>, 安云霞<sup>2</sup>, 韩利<sup>1</sup>

(1. 河南省胸科医院呼吸与危重症二病区, 郑州 450003;

2. 河南省人民医院呼吸内科, 郑州 450003)

**【摘要】** 目的 探讨二甲双胍(Met)调控微小RNA(miR)-34a对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠气道炎症的影响。方法 每天烟熏30 min,持续30 d,并在第1、14、28天经气道滴注2 mL脂多糖(LPS)溶液制备COPD大鼠模型,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测Met对肺组织中miR-34a水平的影响;支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞计数和wright染色分类检测Met对其影响;苏木精-伊红(HE)检测Met对肺组织形态影响;酶联免疫吸附(ELISA)检测Met对血清中白介素IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平的影响;蛋白免疫印迹检测Met对肺组织中sirt1蛋白水平的影响;TargetScan查找sirt1 mRNA的3'UTR与miR-34a结合位点,并经双荧光素酶报告基因检测试剂盒鉴定。结果 与对照组相比,模型组肺组织中sirt1蛋白水平,单核-巨噬细胞比例降低( $P < 0.05$ ),miR-34a水平、BALF中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例,血清中IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平升高( $P < 0.05$ );添加Met后可缓解肺组织中sirt1蛋白水平,单核-巨噬细胞比例降低,miR-34a水平、BALF中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例,血清中IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平升高现象( $P < 0.05$ );升高miR-34a水平逆转Met对COPD大鼠的影响。并经双荧光素酶验证,miR-34a与sirt1存在靶向关系。结论 Met可下调miR-34a从而上调sirt1实现对COPD气道炎症的缓解,为临床上Met治疗COPD提供一定的实验基础和依据。

**【关键词】** 二甲双胍;微小RNA-34a;慢性阻塞性肺疾病;气道炎症;大鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)07-0055-07

### Effect of metformin on airway inflammation in COPD rats by regulating miR-34a

SU Hongjian<sup>1</sup>, QIAO Yahong<sup>1\*</sup>, AN Yunxia<sup>2</sup>, HAN Li<sup>1</sup>

(1. Respiratory and Critical Care Unit 2, Henan Province Chest Hospital, Zhengzhou 450003, China.

2. Department of Respiratory Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of metformin (Met) on airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by regulating microRNA (miR) - 34a. **Methods** The COPD rat model was established by fumigation for 30 min daily for 30 d and instillation of 2 mL lipopolysaccharide (LPS) solution through the

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190753)。

[作者简介] 苏红见(1984—),女,硕士,主治医师,研究方向:慢性阻塞性肺疾病。E-mail: suhjm@163.com

[通信作者] 乔亚红(1971—),女,硕士,主任医师,研究方向:胸腔积液。E-mail: qyh13598037502@163.com

airway on days 1, 14 and 28. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was performed to detect the effect of Met on the miR-34a level in lung tissue; white blood cell count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and wright staining were used to detect the effect of Met; hematoxylin-eosin (HE) was used to detect the effect of Met on lung morphology; the serum interleukin IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; Western blot was used to detect the effect of Met on the sirt1 protein level in lung tissue; TargetScan was applied to determine the 3'UTR and miR-34a binding sites of sirt1 mRNA, and was identified by the dual luciferase reporter gene detection kit. **Results** Compared with the control group, in the model group the sirt1 protein level and the proportion of monocytes to macrophages in lung tissue were decreased ( $P < 0.05$ ), whereas the miR-34a level, the number of white blood cells in BALF, the proportions of neutrophils, eosinophils and lymphocytes, and the serum IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels were increased ( $P < 0.05$ ). Met in the COPD animals alleviated the reduced sirt1 protein level in lung tissues, the reduced proportion of monocytes to macrophages, and the increased miR-34a levels, number of white blood cells in BALF, proportions of neutrophils, eosinophils and lymphocytes, and the serum IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels ( $P < 0.05$ ). An increase of the miR-34a level reversed the effect of Met on COPD rats. Dual luciferase verified that miR-34a and sirt1 had a targeting relationship. **Conclusions** Met down-regulated miR-34a and thereby up-regulated sirt1 to relieve airway inflammation in COPD, which provides an experimental basis for the potential clinical treatment of COPD with Met.

**[Keywords]** metformin; miRNA-34a; chronic obstructive pulmonary disease; airway inflammation; rat

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种气流受限疾病, 表现为气流受阻不可逆, 并呈进行性变化, 且肺、气管、支气管因有害物质导致的慢性炎症疾病<sup>[1]</sup>。吸烟是 COPD 发生的最主要原因, 生物燃料的大量采集和消耗亦促进 COPD 发生<sup>[2]</sup>。目前尚无根治 COPD 的有效方法, 二甲双胍 (metformin, Met) 作为经典的降压药, 是临床上 2 型糖尿病的首选药物<sup>[3]</sup>; 随着研究深入, Met 还有抗炎、抗氧化、保护心血管系统等功效, 在多发硬化症中能够降低炎症因子白介素-6 的表达<sup>[4]</sup>; 在 COPD 中能减轻肺部炎症反应及氧化应激, 从而改善肺功能<sup>[5]</sup>, 但针对其具体作用机制尚不清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 可影响其他物质水平而发挥抗氧化和抗炎作用, 已成为临床上最具潜力的生物标志物<sup>[6]</sup>, 且 Met 能够调控 miRNA 的表达从而影响多囊卵巢综合症患者卵丘颗粒细胞增殖和凋亡, 从而影响疾病<sup>[7]</sup>。推测 Met 可能影响 miRNA 水平而影响疾病。本文建立 COPD 大鼠模型, Met 处理观察对 COPD 的影响, 并观察 miR-34a 高表达是否影响其作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

54 只 SPF 级 SD 大鼠, 雄性、9 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2018-0021], 在河南省中医药研究院实验动物中心暂养

并进行实验 [SYXK (豫) 2019-0001], 体重 (250  $\pm$  10) g。将动物置于温度 (24.5  $\pm$  0.5)  $^{\circ}$ C、湿度 (50  $\pm$  5) %、12 h 光照/12 h 黑暗环境中饲养, 正常饮食, 通风良好。本实验经本院伦理委员会审核并通过 (20190017), 实验符合 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 试剂盒 (Solarbio 公司, 货号分别为: L8880-10 mg, L9406); 盐酸 Met 片 (悦康药业集团股份有限公司, 批准文号: 国药准字 H-20184075); agomir NC、miR-34a agomir 均购自广州锐博生物科技公司; 引物由茎环法+染料法设计、上海生工生物工程有限公司合成; wright 染色试剂盒 (北京雷根生物技术有限公司, 货号: DM0004); 大鼠白介素 (interleukin, IL)-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、一抗兔抗沉默信息调节因子 1 (sirtuin 1, sirt1) (英国 abcam 公司, 货号分别为: ab213777、ab108869、ab188865、ab263899、ab110304)。实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪 (赛默飞世尔, 型号: PikoREAL); 蛋白凝胶成像仪 (美国 Bio-Bad 公司, 型号: 170-8200)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物建模及分组

参照文献<sup>[8]</sup>制备 COPD 模型: 将 44 只大鼠放置在点燃 8 支香烟的烟熏箱中烟熏, 每天烟熏 30 min,

持续 30 d,并在第 1、14、28 天经气道滴注 2 mL LPS 溶液(盐水溶解为 1 g/L LPS),气道滴注当日不进行烟熏。造模过程中死亡 4 只,其余 40 只大鼠随机分为模型(model)组、Met 组、Met+阴性对照(Met+agomir NC)组、Met+miR-34a 高表达(Met+miR-34a agomir)组,每组 10 只。另取 10 只大鼠在第 1、14、28 天经气道滴注 2 mL 生理盐水为对照(control)组。模型处理后第 2 天 Met 组每天灌胃 230 mg/kg Met<sup>[5]</sup>,Met+阴性对照组灌胃 230 mg/kg Met、尾静脉注射 1  $\mu$ mol/L agomir NC, Met+miR-34a 高表达组灌胃 230 mg/kg Met、尾静脉注射 1  $\mu$ mol/L miR-34a agomir,每天 1 次、连续 2 周。

### 1.3.2 样品收集

实验前、实验结束后对所有大鼠称重,观察大鼠情况。麻醉大鼠切开胸腔,暴露出心脏,心脏取血约 5 mL;右主支气管结扎,套管针在隆突后穿刺进入左肺,2 mL 生理盐水灌洗左肺,缓慢回抽,每次回抽约 1.5 mL 液体,反复灌洗 3 次,对支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)细胞计数。取右肺,部分置于 4%多聚甲醛中固定;部分置于-80℃冰箱保存待检。

### 1.3.3 qRT-PCR 检测肺组织中 miR-34a 水平

-80℃取部分肺组织, RNA 提取试剂盒提取总 RNA、cDNA 合成试剂盒合成第一条链 cDNA, qRT-PCR 仪对 miR-34a、U6 扩增。引物序列 miR-34a F: 5'-TGCCAGTGTCTTAGCTGGTTG-3', R: 5'-GGCAGTATACTTGCTGATTGCTT-3'; U6 F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACAC-3', R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。上样体系 20  $\mu$ L: cDNA(50 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, F/R(10  $\mu$ mol/L)(0.5/0.5)  $\mu$ L, 2 $\times$ Hi SYBR Green QPCR Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.0  $\mu$ L。反应条件:95℃、5 min;94℃、50 s, 55.6℃、40 s, 40 个循环。2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算肺组织中 miR-34a 水平。

### 1.3.4 BALF 细胞计数和分类

4℃、1200 r/min 离心 BALF 10 min,离心后取细胞沉渣, PBS 重悬后检测白细胞总数。取部分细胞沉渣,调整浓度后 wright 染色,计数每 200 个白细胞中的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核-巨噬细胞、淋巴细胞比例。

### 1.3.5 HE 检测肺组织形态

4%多聚甲醛中固定的肺组织,脱水后石蜡包埋,切片(厚度:6  $\mu$ m)。经苏木精染色、伊红复染后显微镜下观察肺组织形态。

### 1.3.6 ELISA 检测血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平

心脏血室温静置 2 h, 3000 r/min 室温离心 10 min,取血清, ELISA 试剂盒检测血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平。

### 1.3.7 Western blot 检测肺组织中 sirt1 蛋白水平

-80℃冰箱中取部分肺组织,冰上研磨并裂解,4℃、16000 r/min 离心 20 min,上清为总蛋白,凝胶电泳分离蛋白、PVDF 膜转膜;5%脱脂奶粉室温封闭 2 h;对应加入一抗 sirt1、GAPDH,4℃孵育过夜;加入对应二抗,室温孵育 2 h。蛋白凝胶成像仪拍照和灰度分析。

### 1.3.8 双荧光素酶鉴定 miR-34a 与 sirt1 的靶向关系

TargetScan 查找 sirt1 mRNA 的 3'UTR 与 miR-34a 结合位点。设计合成 sirt1 的野生型(sirt1 3'UTR WT)和突变型(sirt1 3'UTR MUT),分别与 miR-34a mimic 或 miR-34a mimic NC 共转染至 293 T 细胞,双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组荧光素酶活性。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量数据均采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Met 对大鼠一般情况影响

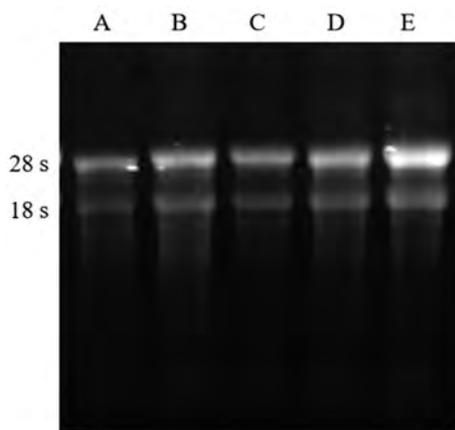
实验前,对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组体重分别为(246.16 $\pm$ 8.16)g、(245.76 $\pm$ 6.97)g、(246.58 $\pm$ 7.43)g、(251.16 $\pm$ 7.91)g、(247.33 $\pm$ 6.93)g,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。实验结束后,对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组体重分别为(316.15 $\pm$ 16.59)g、(271.19 $\pm$ 19.45)g、(306.11 $\pm$ 11.36)g、(305.91 $\pm$ 10.67)g、(284.73 $\pm$ 9.73)g,与对照组比,模型组体重降低( $P<0.05$ );与模型组相比, Met 组、Met+阴性对照组体重升高( $P<0.05$ );分别与 Met 组、Met+阴性对照组比, Met+miR-34a 高表达组体重降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

对照组大鼠饮食饮水正常,毛发润泽、色泽度好,无口鼻分泌物、无咳嗽现象,且反应敏捷、呼吸平稳;模型组大鼠饮食饮水减少,毛色干枯、缺少光

泽,有口鼻分泌物、咳嗽出现,反应迟钝、呼吸急促;Met 组和 Met+阴性对照组大鼠饮食饮水量相较于模型组增加,口鼻分泌物减少、咳嗽减轻,反应欠敏感,呼吸出现急促现象但不明显;Met+miR-34a 高表达组状况介于模型组和 Met 组之间。

## 2.2 Met 对大鼠肺组织中 miR-34a 的影响

RNA 鉴定结果见图 1。对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组肺组织中 miR-34a 水平分别为  $1.01 \pm 0.13$ 、 $2.49 \pm 0.06$ 、 $1.46 \pm 0.15$ 、 $1.84 \pm 0.16$ 、 $2.15 \pm 0.21$ ,与对照组比,模型组肺组织中 miR-34a 水平升高( $P < 0.05$ );与模型组比,Met 组、Met+阴性对照组肺组织中 miR-34a 水平降低( $P < 0.05$ );分别与 Met 组、Met+阴性对照组比,Met+miR-34a 高表达组肺组织中 miR-34a 水平升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注:A:对照组;B:模型组;C:Met 组;D:Met+阴性对照组;E:Met+miR-34a 高表达组。(下同)

图 1 5 组大鼠肺组织 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳  
Note. A, Control group. B, Model group. C, Met group. D, Met+agomir NC group. E, Met+miR-34a agomir group. (The same as below)

Figure 1 Lung tissue RNA 1% agarose gel electrophoresis of 5 groups of rats

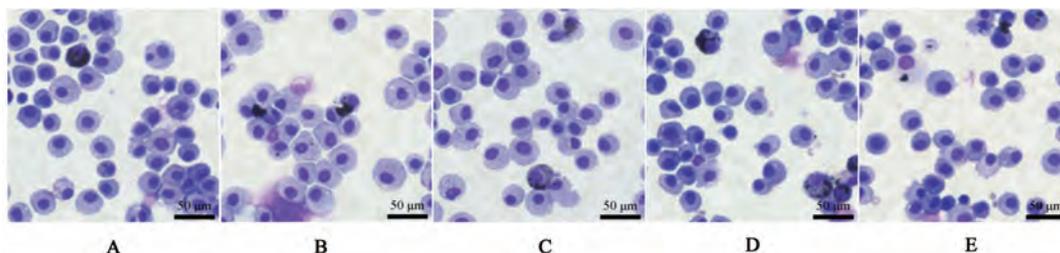


图 2 5 组大鼠 BALF 中 wright 染色结果

Figure 2 Wright staining results in BALF of 5 groups of rats

## 2.3 Met 对大鼠 BALF 中细胞计数的影响

与对照组相比,模型组 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例升高,单核-巨噬细胞比例降低( $P < 0.05$ );与模型组相比,Met 组、Met+阴性对照组 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例降低,单核-巨噬细胞比例升高( $P < 0.05$ );分别与 Met 组、Met+阴性对照组相比,Met+miR-34a 高表达组 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例升高,单核-巨噬细胞比例降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2、图 3。

## 2.4 Met 对大鼠肺组织形态影响

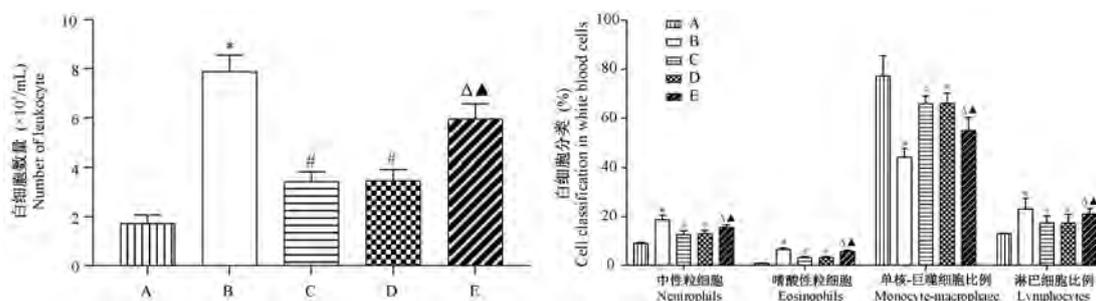
对照组肺组织结构完整,肺泡排列整齐均匀,无明显间隔破坏。模型组大鼠肺组织气管及支气管粘液腺增多,腺管扩张,气道平滑肌肥大,支气管黏膜上皮细胞纤毛粘连,小气道平滑肌增生及纤维化,管腔内可见不同程度粘液栓及大量炎性细胞,肺泡管、肺泡囊、肺泡膨胀,肺泡融合,肺泡简单化,形成肺大泡。Met 组与 Met+阴性对照组类似,肺泡结构有所缓解,炎症现象不明显;Met+miR-34a 高表达组肺泡结构与模型组类似。见图 4。

## 2.5 Met 对大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平的影响

与对照组相比,模型组血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高( $P < 0.05$ );与模型组相比,Met 组、Met+阴性对照组血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P < 0.05$ );分别与 Met 组、Met+阴性对照组相比,Met+miR-34a 高表达组血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

## 2.6 Met 对大鼠肺组织中 sirt1 蛋白的影响

对照组、模型组、Met 组、Met+阴性对照组、Met+miR-34a 高表达组肺组织中 sirt1 水平分别为  $1.16 \pm$



注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ ;与 Met 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;与 Met+阴性对照组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图 3 5 组大鼠 BALF 中细胞计数比较

Note. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group, # $P < 0.05$ . Compared with Met group,  $\Delta P < 0.05$ . Compared with Met+antagonistic NC group,  $\blacktriangle P < 0.05$ .

Figure 3 Comparison of cell counts in BALF of 5 groups of rats

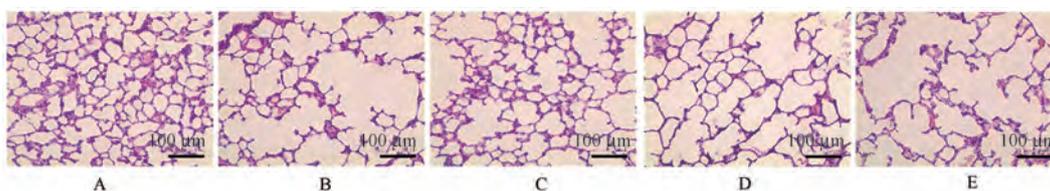


图 4 5 组大鼠肺组织形态学情况

Figure 4 Morphology of the lung tissues of the 5 groups of rats

表 1 5 组大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平比较 (pg/mL)

Table 1 Comparison of serum levels of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the 5 groups of rats

组别 Groups	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
对照组 Control group	109.68 $\pm$ 4.67	236.26 $\pm$ 6.16	86.58 $\pm$ 9.15	269.12 $\pm$ 11.16
模型组 Model group	358.68 $\pm$ 31.35*	469.15 $\pm$ 47.36*	343.16 $\pm$ 36.63*	695.15 $\pm$ 23.18*
Met 组 Met group	260.72 $\pm$ 27.41#	298.65 $\pm$ 31.18#	186.56 $\pm$ 20.19#	416.56 $\pm$ 39.85#
Met+阴性对照组 Met+agomir NC group	263.16 $\pm$ 29.62#	305.19 $\pm$ 33.46#	179.32 $\pm$ 18.48#	409.89 $\pm$ 41.36#
Met+miR-34a 高表达组 Met+miR-34a agomir group	309.65 $\pm$ 26.65 $\Delta$ $\blacktriangle$	369.45 $\pm$ 23.52 $\Delta$ $\blacktriangle$	268.91 $\pm$ 27.33 $\Delta$ $\blacktriangle$	597.15 $\pm$ 36.43 $\Delta$ $\blacktriangle$

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ ;与 Met 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;与 Met+阴性对照组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model group, # $P < 0.05$ . Compared with Met group,  $\Delta P < 0.05$ . Compared with Met+antagonistic NC group,  $\blacktriangle P < 0.05$ .

0.21、0.11 $\pm$ 0.02、0.86 $\pm$ 0.06、0.84 $\pm$ 0.08、0.36 $\pm$ 0.04,与对照组相比,模型组肺组织中 sirt1 蛋白水平降低( $P < 0.05$ );与模型组相比, Met 组、Met+阴性对照组肺组织中 sirt1 蛋白水平升高( $P < 0.05$ );分别与 Met 组、Met+阴性对照组相比, Met+miR-34a 高表达组肺组织中 sirt1 蛋白水平降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 5。

### 2.7 双荧光素酶验证 miR-34a 与 sirt1 的靶向关系

Targetscan 预测结果显示, sirt1 基因 3'UTR 区

存在与 miR-34a 结合位点,见图 6。荧光素酶实验验证二者的靶向关系。miR-34a NC + 3' UTR-WT、miR-34a mimic + 3' UTR-WT、miR-34a NC + 3' UTR-MUT、miR-34a mimic + 3' UTR-MUT 的荧光素酶相对活性分别为 1.02 $\pm$ 0.11、0.43 $\pm$ 0.04、0.98 $\pm$ 0.08、0.99 $\pm$ 0.08,与 miR-34a NC + 3' UTR-WT 组相比, miR-34a + 3' UTR-WT 组细胞荧光素酶相对活性下降( $P < 0.05$ )。

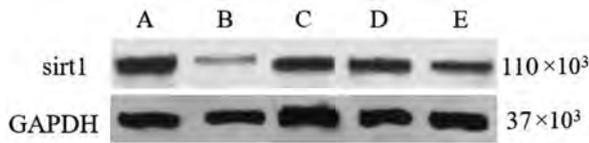


图 5 5 组大鼠肺组织中 sirt1 蛋白表达情况

Figure 5 Protein expression of sirt1 in the lung tissues of the 5 groups of rats

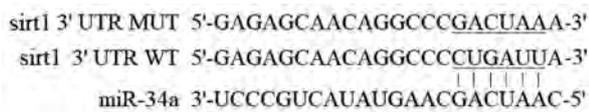


图 6 sirt1 与 miR-34a 结合位点预测

Figure 6 Prediction of the binding site of sirt1 and miR-34a

### 3 讨论

COPD 会造成大鼠体重减轻、饮食饮水减少,毛色干枯,口鼻中出现分泌物、出现咳嗽等现象,鉴定 BALF,发现 BALF 中白细胞数量,中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞比例升高,单核-巨噬细胞比例降低;提示 COPD 中出现明显的炎症现象。COPD 长期慢性炎症可影响肺实质和周围呼吸道,炎症主要特征为肺泡巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T 淋巴细胞等淋巴样细胞数量增加,促进分泌多种促炎性介质,包括细胞因子、趋化因子、生长因子和脂质介质的分泌,从而加速 DNA 损伤、促进细胞衰老,加重疾病<sup>[9-10]</sup>。而 Met 具有抗炎作用,在百草枯诱发的急性肺损伤中可降低血浆及肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平,并减轻肺组织病理损伤<sup>[11]</sup>。本研究中使用 Met 后可缓解肺组织气管及支气管粘液腺增多、炎性细胞过多现象,从而减轻肺泡管、肺泡囊、肺泡膨胀,肺泡逐渐恢复。但具体作用机制尚不清楚。

miRNA 可普遍存在于真核细胞中,进化上高度保守,具有组织和时序特异性,在慢性气道炎症性疾病哮喘中参与气道炎症调节,与基质金属蛋白酶、炎症反应、一系列信号通路关系密切,且通过改变 miRNA 在动物体内的表达水平可改变气道嗜酸性粒细胞、气道黏液分泌、Th1/Th2 细胞相关因子的表达情况,从而影响疾病<sup>[12]</sup>。miR-29b 通过靶向溴结构域蛋白 4 可调节香烟提取物诱导的 IL-8 表达,从而参与 COPD 的气道炎症,且血浆 miR-29b 可以作为 COPD 疾病严重程度的生物标志物<sup>[13]</sup>。miR-34 包括 miR-34a、miR-34b、miR-34c,与肺的发生发展关系密切,与肺支气管发育不良、COPD、肺癌、肺动脉高压等肺部疾病关系密切<sup>[14]</sup>,上调 miR-34c-5p

可降低动态肺顺应性和降低由于 COPD 升高引起的呼吸频率及气道阻力以及 BALF 中 IL-8 和 TNF- $\alpha$  的水平升高现象,从而缓解炎性细胞浸润、肺泡破裂、肺泡腔扩大和胶原纤维沉积增加,平均线性截距增加和平均肺泡数降低现象<sup>[15]</sup>。在本研究中模型组肺组织中 miR-34a 水平上调,miR-34a 在 COPD 中表达上调,与肺功能关系密切,可能是肺功能损伤的直接指标<sup>[16]</sup>。miR-34a 与氧化应激损伤、炎症反应关系密切,miR-34a 水平升高明显加重机体氧化应激损伤、促进炎症反应<sup>[17]</sup>。miR-34a 需要调控靶基因发挥生物学作用,研究发现,在溃疡性结肠炎中 miR-34a 水平升高可抑制靶基因 sirt1 的表达从而加重氧化应激、促进炎症损伤<sup>[18]</sup>。sirt1 被称为长寿基因,在吸烟者体中 sirt1 水平降低可诱导金属蛋白酶抑制剂-1 乙酰化进而加重肺损伤<sup>[19]</sup>。上调 sirt1 的表达来减轻香烟烟雾引起的内质网应激和细胞凋亡,从而预防 COPD<sup>[20-21]</sup>。表明在 COPD 中烟熏可诱导 miR-34a 上调,促进分泌多种促炎性介质,包括 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等的分泌从而加重炎症细胞浸润、肺泡破裂、肺泡腔扩大和胶原纤维沉积增加现象,从而加重疾病。而使用 Met 后炎症因子水平降低,肺泡破裂、肺泡腔扩大现象得以缓解。添加 miR-34a 逆转 Met 作用,提示 Met 可能通过下调 miR-34a 表达轻炎症水平,实现对 COPD 大鼠的保护。进一步研究发现,miR-34a 与 sirt1 存在靶向关系,提示 Met 下调 miR-34a 的表达,从而促进 sirt1 的表达,进而减轻因香烟烟雾引起的内质网应激和细胞凋亡,减缓疾病。

综上所述,Met 通过下调 miR-34a 实现对 COPD 气道炎症的缓解,本文首次验证了 COPD 中 Met 与 miR-34a 的关系。但 miR-34a 靶基因较多,亦可能影响别的靶基因发挥作用,也将成为进一步研究重点。

### 参考文献:

- [1] 贾敏,樊文花,秦巧红,等. 香烟烟雾颗粒经鼻腔滴入建立小鼠 COPD 肺功能损伤模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(10): 1915-1920.
- [2] Jolly MK, Ward C, Eapen MS, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease [J]. Dev Dyn, 2018, 247(3): 346-358.
- [3] Frias JP. Fixed-dose combination of ertugliflozin and metformin hydrochloride for the treatment of type 2 diabetes [J]. Expert Rev Endocrinol Metab, 2019, 14(2): 75-83.

- [ 4 ] Negrotto L, Farez MF, Correale J. Immunologic effects of metformin and pioglitazone treatment on metabolic syndrome and multiple sclerosis [J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(5): 520-528.
- [ 5 ] 彭强. 二甲双胍对 COPD 大鼠炎症反应和氧化应激的影响及其机制 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [ 6 ] Su X, Zhang J, Wang H, et al. Phenolic acid profiling, antioxidant, and anti-inflammatory activities, and miRNA regulation in the polyphenols of 16 blueberry samples from China [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 312-321.
- [ 7 ] 宋霁. 二甲双胍调控 miRNA-133b 对多囊卵巢综合征患者卵丘颗粒细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 广州: 广州医科大学, 2017.
- [ 8 ] 张迪, 夏艺, 范丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 230-235.
- [ 9 ] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 16-27.
- [ 10 ] Uddin M, Watz H, Malmgren A, et al. NETopathic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and severe asthma [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 47.
- [ 11 ] 吴潦章, 岑遗芳, 冯梦龙, 等. 二甲双胍对百草枯中毒大鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(10): 1019-1024.
- [ 12 ] 李雪静, 张园园. miRNA 调控支气管哮喘研究进展 [J]. *临床儿科杂志*, 2019, 37(6): 466-469.
- [ 13 ] Tang K, Zhao JP, Xie JG, et al. Decreased miR-29b expression is associated with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(4): L621-L629.
- [ 14 ] 刘敏. 微小 RNA-34 家族与肺部疾病的研究进展 [J]. *国际儿科学杂志*, 2018, 45(2): 96-99.
- [ 15 ] Gao HX, Su Y, Zhang AL, et al. MiR-34c-5p plays a protective role in chronic obstructive pulmonary disease via targeting CCL22 [J]. *Exp Lung Res*, 2019, 45(1-2): 1-12.
- [ 16 ] 徐小峰, 戴宏宇, 夏春伟, 等. 吸烟的稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血清微小 RNA-34a 的表达及临床意义 [J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(8): 539-542.
- [ 17 ] Long YJ, Liu XP, Chen SS, et al. miR-34a is involved in CSE-induced apoptosis of human pulmonary microvascular endothelial cells by targeting Notch-1 receptor protein [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 21-26.
- [ 18 ] 江巧丽, 朱佳杰, 戴蕾, 等. 基于 miR-34a/SIRT1 轴探讨奥沙利铂治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. *浙江医学*, 2019, 41(23): 2486-2491, 前插 2.
- [ 19 ] Quan MX, Lv YN, Dai Y, et al. Tanshinone IIA protects against lipopolysaccharide-induced lung injury through targeting Sirt1 [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(7): 1142-1151.
- [ 20 ] He B, Zhang WX, Qiao J, et al. Melatonin protects against COPD by attenuating apoptosis and endoplasmic reticulum stress via upregulating SIRT1 expression in rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97(5): 386-391.
- [ 21 ] Tang F, Ling C. Curcumin ameliorates chronic obstructive pulmonary disease by modulating autophagy and endoplasmic reticulum stress through regulation of SIRT1 in a rat model [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(10): 4764-4774.

[ 收稿日期 ] 2020-09-02

史许锋,刘侃,王莉,等. 葫芦巴碱的预防性使用可减轻妊高症大鼠模型的症状并保护胎儿生长和血管内皮功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 62-70.

Shi XF, Liu K, Wang L, et al. The preventive use of trigonelline can alleviate symptoms in a rat model of pregnancy-induced hypertension and protect fetal growth [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 62-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.010

## 葫芦巴碱的预防性使用可减轻妊高症大鼠模型的症状并保护胎儿生长和血管内皮功能

史许锋,刘侃,王莉,王焕萍,张敬丽,武海英\*

(河南省人民医院产科,郑州 450003)

**【摘要】** 目的 旨在确定妊娠早期使用葫芦巴碱对于一氧化氮合酶拮抗剂 N-硝基-1-精氨酸甲酯(LNAME)诱导的PE大鼠的治疗作用。方法 在妊娠第0天,将28只Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为4组,怀孕对照组,LNAME诱导的PE组和预防性使用葫芦巴碱的小剂量组和大剂量组;测量孕鼠血压和蛋白尿并通过股动脉超声评估孕鼠内皮功能,通过ELISA检测炎症因子和内皮相关因子的表达,最后收获孕鼠胎盘和肾进行免疫组化分析,同时通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分析炎症相关通路状态。结果 预防性给予小剂量和高剂量葫芦巴碱可改善LNAME引起的高血压、蛋白尿、孕期大鼠体重减轻、胎儿生长受限和血流介导的扩张,而葫芦巴碱可能通过途径 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ 而平衡内皮相关因子并减轻胎盘和肾组织中的炎症活化。结论 葫芦巴碱在LNAME诱导的PE样大鼠模型中的预防性使用可减轻PE症状,促进胎儿生长,保护内皮功能并减少炎症。

**【关键词】** 葫芦巴碱;先兆子痫;内皮功能;蛋白尿;妊娠早期

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)07-0062-09

## The preventive use of trigonelline can alleviate symptoms in a rat model of pregnancy-induced hypertension and protect fetal growth

SHI Xufeng, LIU Kan, WANG Li, WANG Huanping, ZHANG Jingli, WU Haiying\*

(Department of Obstetrics, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

**【Abstract】 Objective** To determine the therapeutic effect of trigonelline in early pregnancy on rats with preeclampsia (PE) induced by the nitric oxide synthase antagonist N-nitro-1-arginine methyl ester (LNAME). **Methods** On day zero of pregnancy, 28 Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: pregnancy control group, LNAME-induced PE group, and prophylactic use of trigonelline small dose group and high-dose group. Blood pressure and proteinuria of the pregnant rats were measured, endothelial function of pregnant rats was evaluated by femoral artery ultrasound, and the expression of inflammatory factors and endothelial-related factors were detected by ELISA. Finally, the placenta and kidney of pregnant rats were harvested for immunohistochemical analysis and to analyze the status of inflammation-related pathways by Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. **Results** Prophylactic administration of low-dose or high-dose trigonelline improved hypertension, proteinuria, and weight loss during pregnancy,

[基金项目]河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020417)。

[作者简介]史许锋(1984—),女,硕士,研究方向:产科。E-mail: yhfeng99@126.com

[通信作者]武海英(1968—),女,硕士,研究方向:产科重症、胎儿医学。E-mail: degeuliu@163.com

fetal growth restriction and blood flow-mediated dilation caused by LNAME. Trigonelline may act through the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway, balance endothelium-related factors and reduce inflammation activation in placenta and kidney tissues.

**Conclusions** The preventive use of trigonelline in a PE-like rat model induced by LNAME can reduce PE symptoms, promote fetal growth, protect endothelial function and reduce inflammation.

**【Keywords】** trigonelline; preeclampsia; endothelial function; proteinuria; early pregnancy

子痫前期 (preeclampsia, PE) 是一种严重的母体炎症性疾病,具有内皮细胞功能障碍,尚缺乏有效的治疗和预防方法。子痫前期是一种妊娠特异性综合征,全球发病率在 2%~8% 之间,是导致早产、孕产妇死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。PE 定义为妊娠 20 周或之后伴有新发蛋白尿,子宫胎盘功能障碍或其他母体器官功能障碍的妊娠高血压<sup>[3]</sup>。除终止妊娠外,尚无有效的 PE 治疗方法,对 PE 高风险孕妇的预防措施也有限<sup>[4]</sup>。此外,有 PE 病史的女性患心血管疾病的风险更高<sup>[5]</sup>。因此,预防 PE 对预防女性心血管疾病具有重要意义。

PE 的发病机制仍不清楚,有证据表明它与局部和全身性血管内皮损伤以及炎症的过度活化有关<sup>[6]</sup>。PE 患者胎盘中抗血管生成分子和炎症因子分泌明显增加,从而导致内皮表面分子模式的急剧变化,并导致全身性内皮功能障碍、血管收缩和随后的高血压<sup>[7]</sup>。因此,调节抗血管生成因子的平衡,减少过度的炎症激活以及保护内皮功能是治疗和预防 PE 的关键目标。葫芦巴碱 (trigonelline) 为传统中药益母草的有效成分,具有抗氧化、保护心肾、提高生育等作用,以往研究指出,葫芦巴碱的使用可以通过 JAK/Stat3 等信号通路而抑制炎症机制的过度激活,促进血管新生,并通过 NO-cGMP 途径起血管舒张作用,最终发挥血管保护作用<sup>[8]</sup>。此外,在异氟醚麻醉的小鼠模型中,葫芦巴碱的预防性使用可以抑制异氟醚麻醉诱导的心肌凋亡<sup>[9]</sup>。然而,预防性使用葫芦巴碱对于 PE 症状的治疗作用尚未见报道,因此,本研究旨在确定妊娠早期使用葫芦巴碱对于一氧化氮合酶拮抗剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (LNAME) 诱导的 PE 大鼠的治疗作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 28 只,8~10 周龄,体重 200~220 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2016-0006],将大鼠饲养于郑州大学动物实验中心 [SYXK(豫)2019-00013]。温度控制在 (23±3) °C,湿度 (50±10)% 和光照-黑暗周期

(12 h:12 h) 的条件下,自由进食和饮水。本实验的研究过程遵循实验动物 3R 原则。本研究经我院医学伦理委员会批准 (2019) 伦审第 (38) 号。

### 1.2 主要试剂与仪器

LNAME (江蓝纯生物试剂有限公司,中国); 葫芦巴碱 (安诺伦生物科技有限公司,中国); CMC (安诺伦生物科技有限公司,中国); 高碘酸席夫 (Schiff, 美国); PrimeScript RT 试剂盒 (成都灵动生物技术有限公司,中国); TB Green Premix Ex Taq II (Takara Biotechnology, 日本); 总蛋白提取试剂 (维润赛润生物试剂有限公司,中国); 聚偏二氟乙烯膜 (Millipore, 美国); HPR 偶联的二抗 (博拓生物科技股份有限公司,中国); sFlt-1 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒、PlGF ELISA 试剂盒、NO ELISA 试剂盒、eNOS ELISA 试剂盒、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒和 IL-6 ELISA 试剂盒 (试剂盒均购置于利翰生物科技有限公司,中国); 光学显微镜 (Leica Microsystems, 德国); MS550D 换能器和 Visual Sonic 超声系统 (Visual Sonic, 美国); ABI Prism 7300 系统 (Applied Biosystems, 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 治疗方法

将雌性大鼠与雄性大鼠 (2:1) 交配,并且检测到阴栓时记为妊娠日 GD 0,然后将雌性大鼠从 GD 0 随机分为四组,每组 7 只。对照组:GD 9-20 时通过经口管饲法给予 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC); LNAME 组:GD 9-20 时皮下注射 75 mg/(kg·d) 的 LNAME<sup>[10]</sup>; 低剂量葫芦巴碱组 (LT 组,  $n = 7$ ): GD 9-20 时皮下注射 75 mg/(kg·d) 的 LNAME,并以 2 mg/(kg·d) 的剂量经口管饲法给予葫芦巴碱-20 溶于 CMC; (4) 高剂量葫芦巴碱组 (HT 组): GD 9-20 时皮下注射 75 mg/(kg·d) 的 LNAME,并以 10 mg/(kg·d) 的剂量经口管饲法给予葫芦巴碱-20 (溶于 CMC)。

LNAME 是一种一氧化氮合成酶抑制剂,孕鼠注射 LNAME 可产生与人类 PE 类似的表型,主要表现在高血压和蛋白尿,通过上述可以判断 PE 模型的情况。

### 1.3.2 血压测量

使用无创自动血压分析仪(第一三共株式会社,日本)通过尾袖法<sup>[11]</sup>在有意识大鼠中测量收缩压(SBP),舒张压(DBP)和平均动脉压(MAP)。

### 1.3.3 蛋白尿监测

在 GD 0 和 GD 18 时采用代谢笼收集 24 h 的尿液,将样品储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 并进行分析以评估蛋白质浓度(Thermo Scientific,美国)。

### 1.3.4 高频超声成像

在 GD 19 时使用高频超声成像检测母体血流介导的股动脉扩张(FDM)和股动脉壁切应力(WSS),使用 MS550 D 换能器和 Visual Sonic 超声系统获得图像,测量值(静态图像和视频剪辑/电影循环)以数字方式存储,用于脱机分析血流介导的扩张<sup>[12]</sup>。

### 1.3.5 组织取样

在 GD 20 时脱颈处死检查子宫的胎盘和胎儿的重量和长度,同时切除母鼠肾,将胎盘和肾转移到液氮中,并保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 进行 Western blot 印迹或聚合酶链反应(PCR)分析,或保存在 4%多聚甲醛中进行组织学检查。

### 1.3.6 组织学和免疫组化

将胎盘组织样品在 4%多聚甲醛中固定 48 h,包埋在石蜡中,切成 5  $\mu\text{m}$  厚的切片,并用苏木精和曙红染色;将肾组织切成 3  $\mu\text{m}$  厚的切片,用高碘酸席夫染色后评估肾小球硬化指数<sup>[13]</sup>。

对于免疫组织化学,将切片与抗大鼠抗 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65(Abcam,英国,1:500)抗体一起孵育,使用光学显微镜进行显微镜分析,通过 Image J 对结果进行定量分析。

### 1.3.7 sFlt-1、PlGF、NO、eNOS、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 激活测定

在 GD 20 时从主动脉收集血液到抗凝管中,以 2000 r/min 离心 15 min 分离血浆,根据制造商的说明,使用 sFlt-1 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、PlGF ELISA 试剂盒、NO ELISA 试剂盒、eNOS ELISA 试剂盒、

TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒和 IL-6 ELISA 试剂盒测量 sFlt-1、PlGF、NO、eNOS、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的血浆浓度。

### 1.3.8 实时定量 PCR

按照制造商的说明使用 TRIzol 提取组织总 RNA,通过 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 的完整性,使用 PrimeScript RT 试剂盒从等量的不同样品 RNA 中合成 cDNA,并使用 TB Green Premix Ex Taq II 用于进行 PCR 反应,以 GAPDH 用作内部对照,通过 ABI Prism 7300 系统测量 TNF- $\alpha$ 、IL-6、NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 GAPDH 的表达。引物组的序列列于表 1。

### 1.3.9 蛋白质印迹分析

按照制造商的说明使用总蛋白提取试剂提取组织总蛋白,在  $100^{\circ}\text{C}$  下加热 5 min,将蛋白质裂解物(35 mg)在 Tris-甘氨酸缓冲的 10% SDS-PAGE 上通过电泳分级分离,并将印迹转移到聚偏二氟乙烯膜上,将膜在室温下封闭 2 h,然后与 p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 、I $\kappa\text{B}\alpha$ 、p-NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 NF- $\kappa\text{B}$  p65 的相应一抗孵育过夜,随后将膜与 HRP 偶联的二抗在室温下孵育 1 h,将蛋白质表达标准化为 GAPDH 的表达,使用增强化学发光法(ECL,Keygen)检测蛋白信号,并使用 Image J 2x 软件分析条带。

## 1.4 统计学方法

数据分析使用 SPSS 24.0(美国 SPSS Inc.)进行,结果表示为平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )。如果数据呈正态分布且具有均一的方差,则使用  $t$  方差单向分析后通过最低显著性差异(LSD)进行  $t$  检验,以计算各个研究组之间的差异;方差不一致时,则使用 Dunnett T3 分析组之间的差异。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 葫芦巴碱可预防 PE 大鼠的妊娠高血压,蛋白尿,低母体体重和胎鼠生长受限

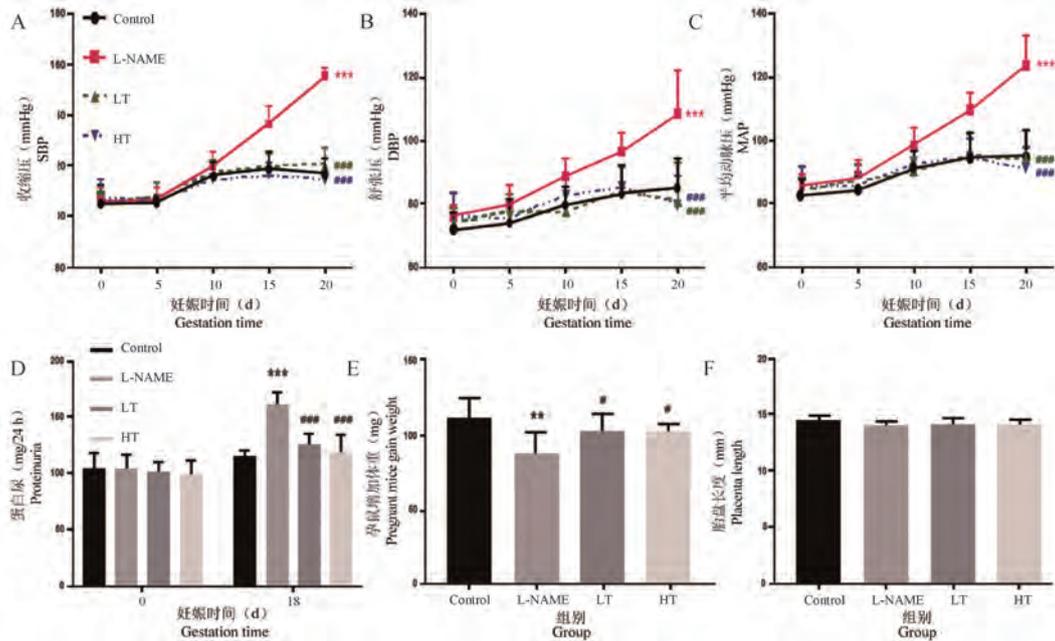
妊娠初期四组血压无明显差异,在 GD10 时,LT 和 HT 组的血压显著低于 LNAME 组的血压,且 LT

表 1 PCR 所用引物序列  
Table 1 Primer sequences for PCR

基因 Gene	正向引物(5'-3') Positive primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
TNF- $\alpha$	GACTGTGTTACCGTCATGGC	ACTTGGTTTTTCATAACAGCGGA
NF- $\kappa\text{B}$ p65	AGTTGAGGGGATTTCCCAGG	TCAACTCCCCTGAAAGGGCC
IL-6	AGTGTGGTGAGTGCCAA	GCACCATCATTCCAGGAC
GAPDH	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTACGACGACGAT

和 HT 组的血压在整个怀孕期间仍与对照组相似( $P > 0.05$ ,图 1A、1B、1C);此外,GD 0 时四组蛋白尿之间无显著差异( $P > 0.05$ ),而在 GD18 上,LT 和 HT

组的蛋白尿明显低于 LNAME 组 ( $P < 0.001$ ), LNAME 组的蛋白尿明显高于对照组 ( $P < 0.001$ ), LT,HT 和对照组之间则无显著差异 ( $P > 0.05$ ,图

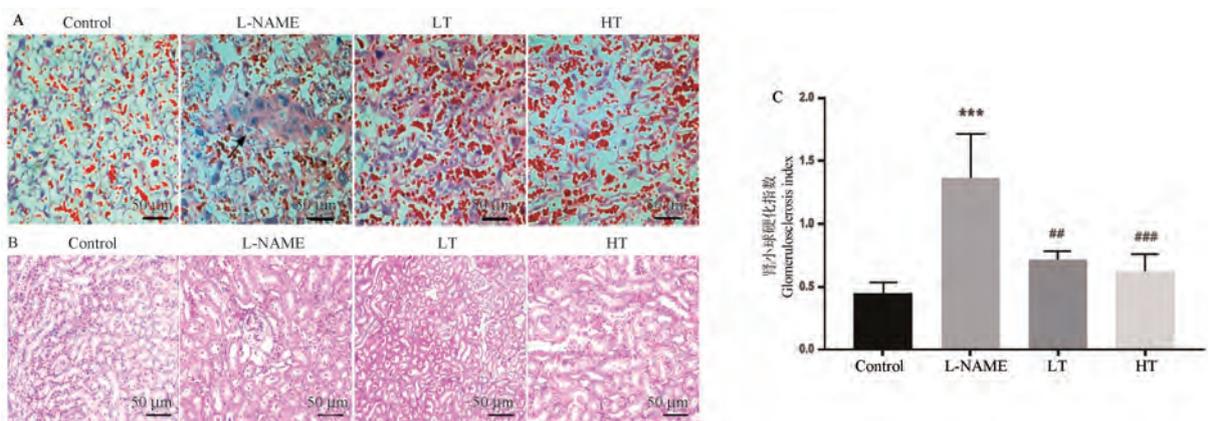


注:A~C:四组妊娠大鼠的血压;D:蛋白尿;E:妊娠大鼠增加体重;F:胎盘长度。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与 LNAME 组相比, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ 。

图 1 葫芦巴碱对子痫前期症状的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A~C, Blood pressure in four groups of pregnant rats. D, Proteinuria. E, Weight gain in pregnant rats. F, Placental length. Compared with control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with LNAME group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ .

Figure 1 Effect of Trigonelline on preeclampsia

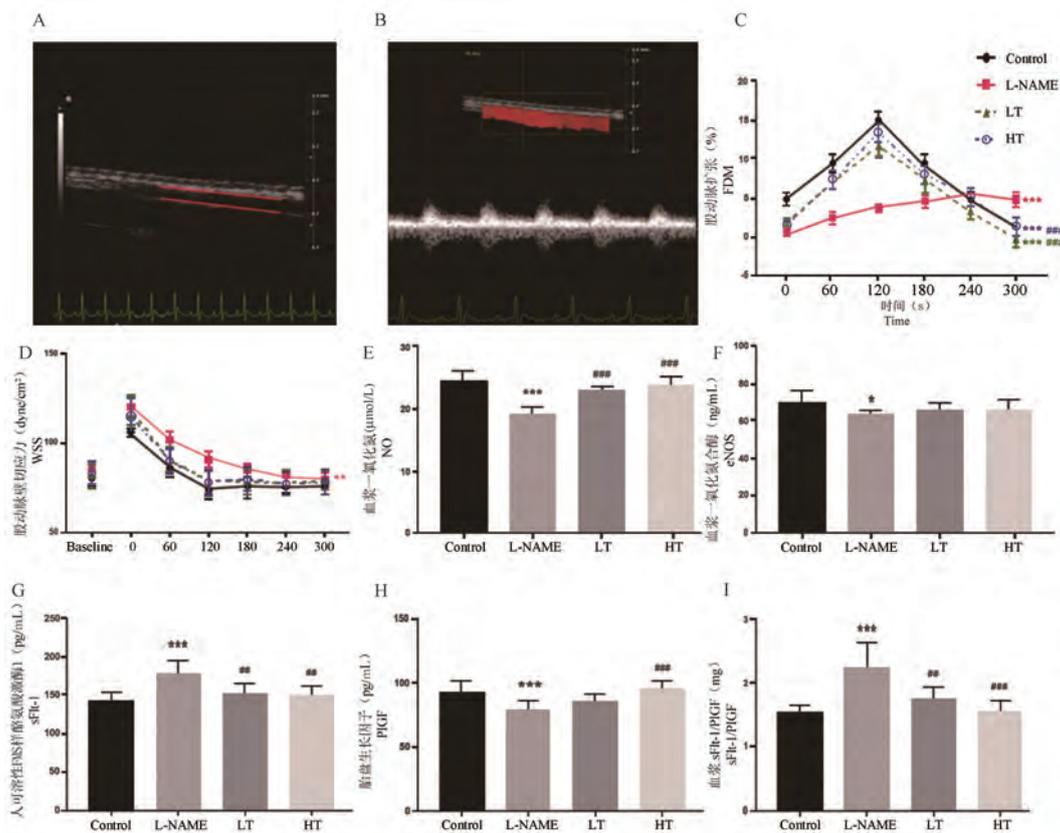


注:A:胎盘的 HE 染色图像( $n=4$ ,合胞性结节用箭头标记);B:肾的 PAS 染色图像(肾小球硬化用箭头标记; $n=3$ );C:各组大鼠的肾小球硬化指数( $n=3$ )。与对照组相比, \*\*\* $P < 0.001$ ;与 LNAME 组相比, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。

图 2 葫芦巴碱减轻 LNAME 诱发的先兆子痫样大鼠的胎盘和肾的形态损伤 ( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A, HE staining images of placenta ( $n=4$ , Keywords syncytial nodules marked with arrows). B, PAS staining images of the kidneys (Glomerular sclerosis marked with arrows,  $n=3$ ). C, Glomerular sclerosis index ( $n=3$ ). Compared with control group, \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with LNAME group, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ .

Figure 2 Trigonelline attenuates LNAME induced morphological damage to the placenta and kidneys in preeclampsia rats



注:A:四组大鼠股动脉直径;B:脉冲波多普勒图像;C:血流介导的扩张作用;D:壁切应力;E:血浆中 NO;F:eNOS;G:sFlt-1;H:PlGF;I:sFlt-1/PlGF 比值。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与 LNAME 组相比,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ 。

图 3 葫芦巴碱对内皮功能和血管生成因子的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A, Femoral artery diameter in four groups of rats. B, Pulse Doppler images. C, Blood flow-mediated dilation. D, Wall shear stress. E, NO in plasma. F, eNOS. G, sFlt-1. H, PlGF. I, sFlt-1/PlGF ratios. Compared with control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with LNAME group, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ .

Figure 3 Effects of Trigonelline on endothelial function and angiogenic factors

1D)。Control 组胎儿数量 ( $11.5 \pm 1.7$ ) 与 L-NAME 组 ( $12.4 \pm 0.8$ )、LT 组 ( $11.8 \pm 2.1$ )、HT 组 ( $12.6 \pm 1.6$ ) 之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。LNAME 组的体重降低,胎儿身长 ( $P < 0.001$ ) 和体重 ( $P < 0.01$ ) 显著低于其他组,而 LT 和 HT 组母体体重和胎鼠生长被明显保护(图 1E、1H、1I),四组胎盘直径或重量无显著差异 ( $P > 0.05$ ,图 1F)

## 2.2 葫芦巴碱可以缓解 PE 样大鼠的胎盘和肾组织学损伤

对照组的胎盘迷路区规则且血液丰富,而 LNAME 组大鼠胎盘迷路区混乱并存在合胞性结节,这些结节可能阻碍胎盘的血液供应并降低胎盘的功能,在预防性使用葫芦巴碱后,大鼠胎盘迷路区显示出明显的改善,结节数量明显减少(图 2A,  $P < 0.001$ ),此外,LNAME 组的肾小球硬化指数显著高于对照组,与 LNAME 组相比,LT 和 HT

组的肾小球硬化指数被明显改善 ( $P < 0.01$ ,图 2B、2C)。

## 2.3 葫芦巴碱可改善 PE 大鼠血浆中的内皮依赖性血管舒张,内皮功能生物标志物和平衡的血管生成分子

四组大鼠基线股动脉直径差异无统计学意义(图 3A、3B,  $P > 0.05$ ),缺血 5 min 后,对照组,LT 组和 HT 组的 FMD 随时间逐渐增加,在 120 s 达到峰值,LNAME 组在 240 s 达到峰值,LNAME 组的 FMD 峰值显著低于对照组,LT 和 HT 组(图 3C);此外,四组之间基线 WSS 没有显著差异,缺血后四组 WSS 随时间变化,与 LNAME 组相比,葫芦巴碱使 LT 和 HT 组的 WSS 明显降低(图 3D)。

与 LNAME 组相比,LT 和 HT 组的血浆 NO 恢复到正常水平,与对照组相似(图 3E,  $P > 0.05$ ),血浆 eNOS 水平得到改善(图 3F,  $P < 0.001$ ),与

LNAME 组相比,LT 和 HT 组的血浆 sFlt-1 水平显著降低(图 3G),HT 组的血浆 PlGF 值恢复至与对照组相似的水平(图 3H, $P>0.05$ ),同时,LT 和 HT 组的 sFlt-1/PlGF 比率明显低于 LNAME 组的比率(图 3I, $P<0.001$ )。

#### 2.4 葫芦巴碱可以抑制 PE 样大鼠血浆和组织中炎症细胞因子的释放

LNAME 诱导的大鼠的血浆 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著高于对照组( $P<0.01$ ),而 LT 和 HT 组的血浆水平显著降低( $P<0.01$ ,图 4A、4B),与对照组相比,LNAME 组血浆与肾中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 水平显著增加( $P<0.001$ ),而 LT 和 HT 组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 mRNA 水平明显降低,且 HT 组的表现优于 LT 组(图 4C、4D、4E、4F)。

#### 2.5 葫芦巴碱可抑制 PE 大鼠胎盘中的炎症

免疫组织化学分析显示,LT 和 HT 组的胎盘中 p-NF- $\kappa$ B 水平明显低于 LNAME 组( $P<0.001$ ),NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达明显降低( $P<0.001$ ),而 HT 组的表现优于 LT 组(图 5A、5B、5C),此外,与 LNAME 组相比,葫芦巴碱组中 p-I $\kappa$ B $\alpha$  与 I $\kappa$ B $\alpha$  的比率以及 NF- $\kappa$ B 与 p-NF- $\kappa$ B 的比率显著降低(图 5D、5E、5F、5G, $P<0.001$ ),这些数据表明葫芦巴碱抑制 LNAME 诱导的 PE 样大鼠胎盘中的炎症可能与 I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

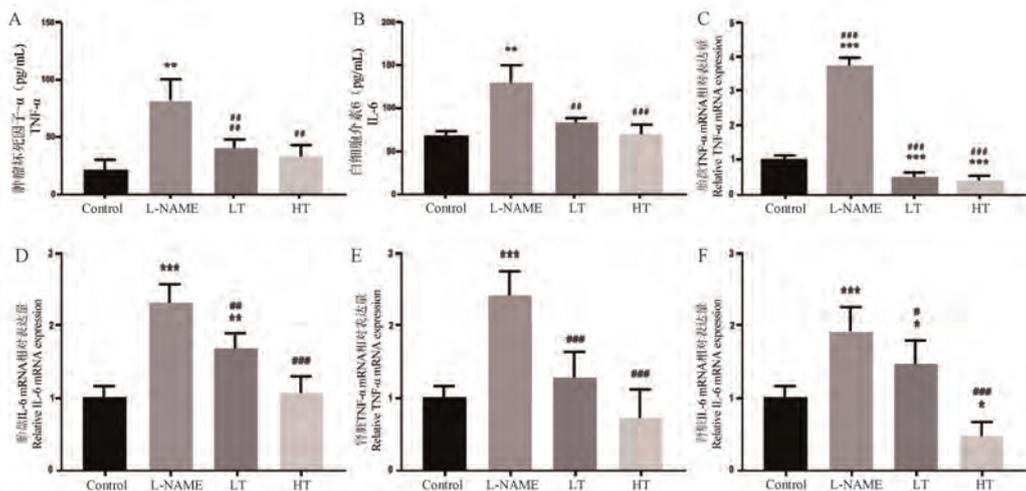
#### 2.6 葫芦巴碱可以抑制 PE 大鼠肾的炎症

免疫组织化学分析显示,LT 和 HT 组的肾中 p-NF- $\kappa$ B 与 NF- $\kappa$ B 的 mRNA 水平明显低于 LNAME 组( $P<0.01$ ),而 HT 组的表现优于 LT 组(图 6A、6B、6C),此外,与 LNAME 组相比,葫芦巴碱组中 p-I $\kappa$ B $\alpha$  与 I $\kappa$ B $\alpha$  的比率以及 NF- $\kappa$ B 与 p-NF- $\kappa$ B 的比率显著降低(图 6D、6E、6F、6G, $P<0.01$ )。这些数据表明葫芦巴碱抑制 LNAME 诱导的 PE 样大鼠肾的炎症可能与 I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

### 3 讨论

由于妊娠期间宫内暴露于高血压,妊娠高血压的母亲及其后代都有长期的心血管后遗症,因此,患有 PE 高危因素的孕妇的患者应进行预防性干预<sup>[14-15]</sup>。但是,预防 PE 的措施是有限的,而阿司匹林是唯一具有可靠预防 PE 的药物<sup>[16]</sup>。研究表明<sup>[17]</sup>,PE 与炎症反应和内皮功能障碍有关,葫芦巴碱可以通过抑制炎症舒张血管平滑肌而发挥内皮功能保护作用。因此,在这项研究中,我们使用葫芦巴碱进行 PE 的预防性治疗。

葫芦巴碱的预防性给药可预防 LNAME 诱导的 PE 样妊娠大鼠的高血压,同时降低孕鼠尿蛋白,将胎盘的长度和重量恢复至正常水平,此外,由于葫芦巴碱可以缓解胎儿生长限制,孕期孕鼠的体重增

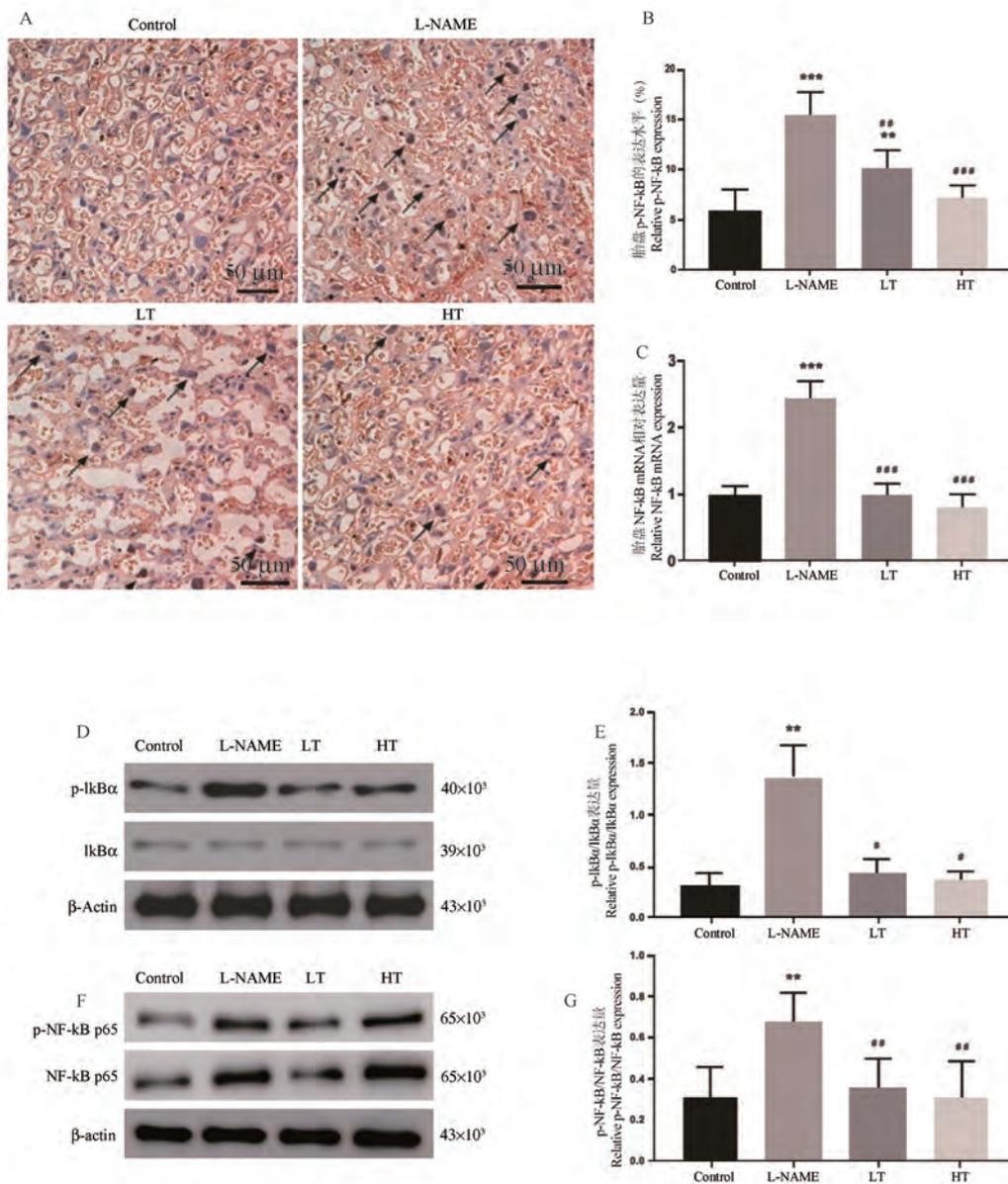


注: A~B: 四组大鼠血浆中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平; C~D: 四组大鼠胎盘 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达; E~F: 四组大鼠肾中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达。与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; 与 LNAME 组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ 。

图 4 葫芦巴碱的预防性给药可以下调血浆, 胎盘和肾中的炎症细胞因子 ( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A/B, Levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in plasma of four groups of rats. C/D, Expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA in rat placenta of four groups. E/F, TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression in the kidney of four groups of rats. Compared with control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . Compared with LNAME group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ .

Figure 4 Prophylactic administration of Trigonelline can downregulate inflammatory cytokines in plasma, placenta and kidney



注:A:四组大鼠胎盘组织 p-NF-κB 的免疫组织化学染色;B:胎盘中 p-NF-κB 的表达;C:NF-κB 的 mRNA 水平;D:p-IκBα 和 IκBα 的蛋白质印迹图片;E:p-IκBα 与 IκBα 的比率;F:p-NF-κB 与 NF-κB 的蛋白质印迹图片;G:p-NF-κB 与 NF-κB 的比率。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与 LNAME 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。

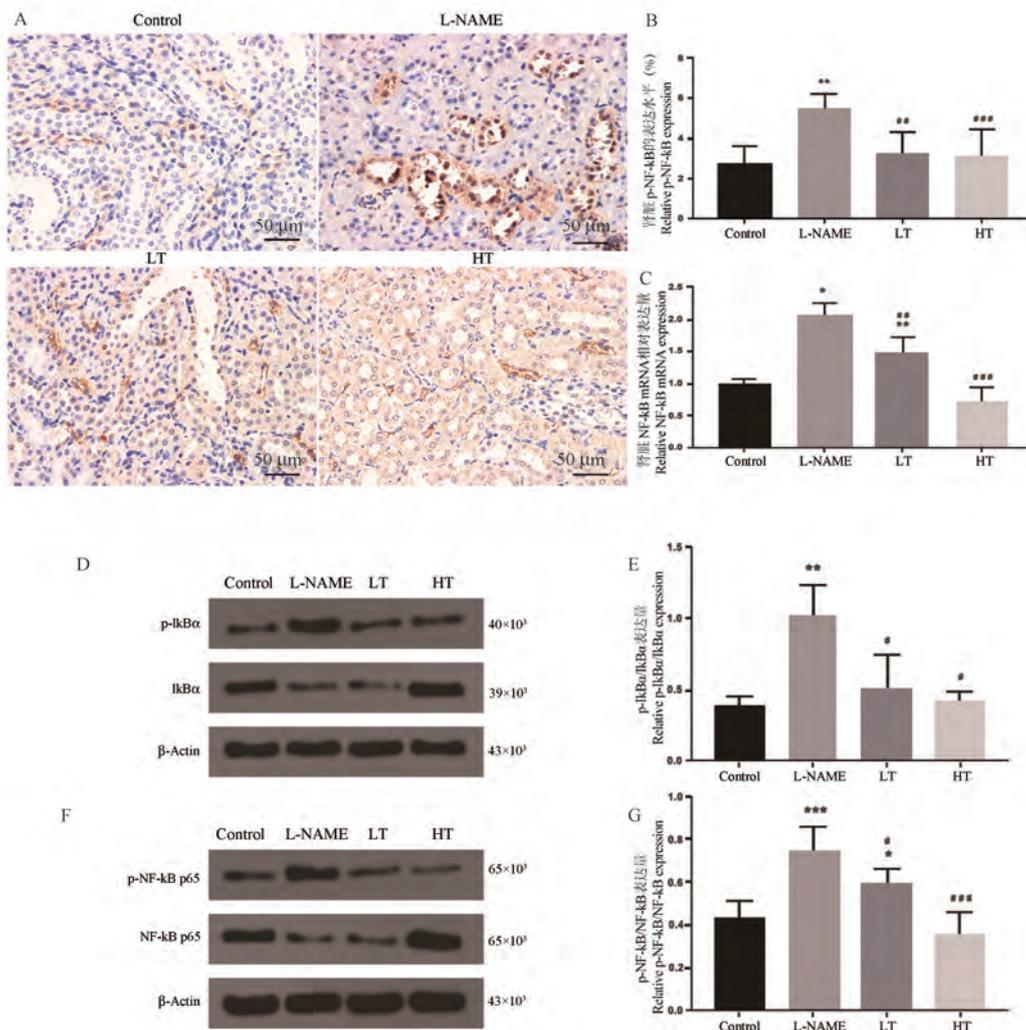
图 5 葫芦巴碱抑制 PE 大鼠胎盘中的 IκBα/NF-κB 信号通路( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A, Immunohistochemical staining of placental tissue p-NF-κB in four groups of rats. B, p-NF-κB expression in the placenta. C, NF-κB mRNA level. D, Western blot images of p-NF-κB and IκBα. E, Ratio of p-NF-κB to IκBα. F, Western blot images of p-NF-κB and NF-κB. G, Ratio of p-NF-κB to NF-κB. Compared with control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with LNAME group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ .

Figure 5 Inhibition of IκBα/NF-κB signaling pathway in PE rat placenta by Trigonelline

加相应增加,此外,在妊娠早期服用葫芦巴碱时,血压不低于正常水平,这表明葫芦巴碱不会因降低血压而降低母体灌注。最后,胎盘和肾的组织学检查表明葫芦巴碱起保护作用,而蛋白印迹和 PCR 分析提示葫芦巴碱的保护作用与 IκBα/NF-κB 途径抑制相关。

葫芦巴碱的预防性给药可预防 LNAME 诱导的 PE 样妊娠大鼠模型中血流介导的 FMD 峰值明显较低,而 FMD 是一种通过测量短暂性脑缺血后动脉直径的变化来评估内皮功能的技术,与使用内皮素,一氧化氮和其他生物标记物相比,FMD 具有无创,可靠且具有系列特征的特点,被广泛用于评估内皮



注: A: 四组大鼠肾组织 p-NF-κB 的免疫组织化学染色; B: 肾中 p-NF-κB 的表达; C: NF-κB 的 mRNA 水平; D: p-IκBα 和 IκBα 的蛋白质印迹图片; E: p-IκBα 与 IκBα 的比率; F: p-NF-κB 与 NF-κB 的蛋白质印迹图片; G: p-NF-κB 与 NF-κB 的比率。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 LNAME 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。

图 6 葫芦巴碱抑制 PE 大鼠肾中的 IκBα/NF-κB 信号通路( $\bar{x} \pm s$ )

Note. A, Immunohistochemical staining p-NF-κB renal tissue in four groups of rats. B, p-NF-κB expression in the kidneys. C, NF-κB mRNA level. D, Western blot images of p-NF-κB and IκBα. E, Ratio of p-IκBα to IκBα. F, Western blot images of p-NF-κB and NF-κB. G, Ratio of p-NF-κB to NF-κB. Compared with control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared to the LNAME group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ .

Figure 6 Inhibition of IκBα/NF-κB signaling pathway in PE rat kidney by Trigonelline

功能,或者怀孕期间的心血管风险<sup>[18]</sup>。葫芦巴碱改善可以内皮舒张功能从而表现为 FMD 峰值的增加,同时降低血管壁的切应力,并恢复 NO 和 eNOS 的血浆水平,改善由 LNAME 诱导的 PE 样大鼠的内皮功能障碍。PE 的病理机制与异常循环血管生成因子有关,可溶性酪氨酸激酶-1 (sFlt-1) 与循环的 PlGF 和 VEGF 结合,从而降低其在子宫胎盘和母体循环中的水平,导致内皮功能障碍,血管收缩和高血压<sup>[19-20]</sup>。本研究的结果显示,葫芦巴碱改善孕鼠 sFlt-1 和 PlGF 的平衡,并降低了 sFlt-1/PlGF,表明

葫芦巴碱可以保护 LNAME 诱导的 PE 样大鼠的内皮功能。与健康对照组孕妇和非孕妇相比,PE 妇女的 TNF-α 和 IL-6 水平显著升高,并导致内皮功能障碍<sup>[20]</sup>。近期文献报道<sup>[21]</sup>,甲醛吸入可引起小鼠肺和全身损伤,而葫芦巴碱的给药可降低血浆中的 TNF-α, IL-6 和 KC/GRO 水平,并降低胎盘中 TNF-α 的表达。我们的数据表明,葫芦巴碱的预防性给药可降低血浆中 TNF-α 和 IL-6 的水平,同时抑制 LNAME 诱导的 PE 样大鼠模型的胎盘和肾脏中 TNF-α 和 IL-6 的表达,这表明葫芦巴碱可降

低 LNAME 诱导的 PE 模型中的炎性细胞因子。NF- $\kappa$ B 是调节炎症的重要因素,它在炎症反应的激活中起着关键作用,而炎症反应涉及许多重要的人类疾病<sup>[22]</sup>,例如心血管疾病和 PE,此外,研究表明<sup>[23]</sup>,NF- $\kappa$ B 信号的激活加剧妊娠孕妇的内皮功能障碍。本研究的结果指出,葫芦巴碱对胎盘和肾的保护作用可能与 I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路有关,通过抑制其表达和激活而降低胎盘和肾的炎症状态。

总之,本研究的结果表明,葫芦巴碱在 LNAME 诱导的 PE 样大鼠模型中的预防性使用可减轻 PE 症状,促进胎儿生长,保护内皮功能并抑制 I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 途径以减少炎症反应。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Sen P, Ghosh D, Sarkar C. Erythrocytic membrane anionic charge, sialic acid content, and their correlations with urinary glycosaminoglycans in preeclampsia and eclampsia [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2020, 80(4): 343-347.
- [ 2 ] Tong J, Niu Y, Chen ZJ, et al. Comparison of the transcriptional profile in the decidua of early - onset and late - onset pre - eclampsia [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46(7): 1055-1066.
- [ 3 ] Rajakumar A, Kane MA, Yu J, et al. Aberrant retinoic acid production in the decidua: Implications for pre-eclampsia [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46(7): 1007-1016.
- [ 4 ] 吴鹏,陶婷,施芳,等. 孕期胎盘生长因子动态检测联合高危因素对子痫前期的预测价值 [J]. 中南医学科学杂志, 2020, 48(4): 399-402.
- [ 5 ] 于雅卉,冯欣. 药物基因组学在妊娠期高血压疾病中的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(12): 1726-1728, 1732.
- [ 6 ] 陈小燕,陈翔宇,周静. 肾功能损害相关指标、生长因子及 Th1/Th2 细胞因子相关水平与妊娠期高血压综合征的相关性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(10): 1213-1215.
- [ 7 ] 程惠,周曙光. PLGF、IL-6 与妊娠期高血压病情程度及母婴结局的相关性 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(5): 674-677.
- [ 8 ] Sathiyaseelan A, Saravanakumar K, Jayalakshmi J, et al. Trigonelline-loaded chitosan nanoparticles prompted antitumor activity on glioma cells and biocompatibility with pheochromocytoma cells [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 163: 36-43.
- [ 9 ] 殷姜文,葛明月,李燕,等. TGF- $\beta$ /SMAD/JNK 通路参与异氟醚后处理减轻大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤 [J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36(6): 574-578.
- [ 9 ] Sasaki M, Nonoshita Y, Kajiya T, et al. Characteristic analysis of trigonelline contained in raphanus sativus cv. sakurajima daikon and results from the first trial examining its vasodilator properties in humans [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1872.
- [ 10 ] 杜梦繁,张光远,王志玮,等. 基于 LNAME 诱导的高血压小鼠血清代谢组学研究 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(12): 1775-1776.
- [ 11 ] 何英姿,黄承飞. 葛根素对妊娠高血压模型大鼠血管活性物质及胎盘组织的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(14): 2042-2044.
- [ 12 ] 姚媛媛,张杰. 血栓弹力图在妊娠期高血压疾病中的应用价值 [J]. 血栓与止血学, 2020, 26(4): 592-593, 595.
- [ 13 ] 保莉,王妍,刘冉冉,等. 血管紧张素转化酶抑制剂对嘌呤霉素肾炎模型治疗及预防肾小球硬化的作用 [J]. 宁夏医学杂志, 2015, 37(3): 197-199, 192.
- [ 14 ] 杨娟娟,韩冰. 硫酸镁负荷疗法对中重度妊娠高血压综合征的疗效 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 30(12): 130-131.
- [ 15 ] 彭凯欣. 围生期保健及补钙预防妊娠高血压综合征的临床效果 [J]. 中国当代医药, 2020, 27(13): 71-73.
- [ 16 ] 关晶,何琼,王晓侠. 妊娠高血压孕妇补充钙剂、铁剂对妊娠结局及胎儿生长受限的预防作用 [J]. 现代实用医学, 2020, 32(4): 535-537.
- [ 17 ] 杨玲,马玉静,肖定福,等. 葫芦巴生物学功能研究进展及其应用 [J]. 动物营养学报, 2020, 32(1): 62-70.
- [ 18 ] 方砚,王效浣,郭朝霞. 血流介导性血管扩张评价心血管病患者肱动脉内皮功能的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2019, 40(5): 793-796.
- [ 19 ] Manley CN, Deepak V, Ravikumar N, et al. Transcription factor AP2A affects sFLT1 expression and decidualization in decidual stromal cells: Implications to preeclampsia pathology [J]. Pregnancy Hypertens, 2020, 21: 152-158.
- [ 20 ] 朱宇,王素萍,史彦涛. 血清炎症因子在子痫前期病人发病中的作用机制及与氧化应激因子的相关性 [J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(6): 799-802.
- [ 21 ] 代良萍,谢晓芳,熊亮,等. 益母草注射液水溶性生物碱——胆碱和葫芦巴碱对子宫收缩活动的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2328-2331.
- [ 22 ] 林培红. HSP70、NF- $\kappa$ B 与子痫前期发病的关系 [J]. 中国当代医药, 2015, 22(31): 13-15, 20.
- [ 23 ] 陈芳荣,龚护民,茹美艳,等. 子痫前期患者胎盘 NF- $\kappa$ B 的表达及其与细胞因子变化的相关性 [J]. 海南医学, 2014, 25(4): 483-486.

[ 收稿日期 ] 2020-08-10

朱晓芹,裴志斐,严石焕,等. 基于入血成分和网络药理学研究桂枝茯苓胶囊抗乳腺增生症的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 71-77.

Zhu XQ, Pei ZF, Yan SH, et al. Mechanism of Guizhi Fuling Capsule constituents migrating to blood in the treatment of mammary gland hyperplasia by network pharmacology [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 71-77.

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 011

## 基于入血成分和网络药理学研究桂枝茯苓胶囊 抗乳腺增生症的作用机制

朱晓芹<sup>1</sup>,裴志斐<sup>2</sup>,严石焕<sup>3</sup>,覃 杨<sup>3</sup>,蓝慧琴<sup>3</sup>,王博龙<sup>1</sup>,朱 丹<sup>3\*</sup>

(1.宜春学院化学与生物工程学院,江西 宜春 336000;2.宜春市第二人民医院,江西 宜春 336000;  
3.广西医科大学药学院,南宁 530021)

**【摘要】** 目的 利用网络药理学方法,研究桂枝茯苓胶囊入血成分治疗乳腺增生症的作用机制。方法 运用 PharmMapper、GeneCards、PubMed、GenCLIP 3 及 STRING 平台,筛选入血成分抗乳腺增生症靶点,构建靶蛋白相互作用(PPI)网络并导入 CytoNCA 插件,计算 PPI 网络的重要拓扑参数筛选关键靶点;利用 ClueGO 插件进行关键靶点 GO 生物过程分析;通过 DAVID 数据库进行关键靶点 KEGG 通路富集。结果 桂枝茯苓胶囊 12 种入血成分作用于 197 个乳腺增生症靶点,其中包括转录及凋亡蛋白 AKT1、MAPK1、CASP3、MAPK8、BCL2L1、MDM2、STAT1;信号传导蛋白 SRC、HRAS、HSP90AA1、MAPK14、PIK3R1、MAP2K1、PTPN11 等;血管生成蛋白 EGFR、MMP2、KDR、NOS3 等;激素相关受体 IGF1、ESR1、AR、IGF1R;炎症因子 IL2;氧化还原酶 CAT 等。参与肌醇脂质介导的信号转导、乳腺上皮细胞发育、细胞对活性氧的反应、一氧化氮合酶生物合成过程的正调控、T 细胞共刺激、VEGF 受体信号通路等 14 大类生物过程,调节雌激素、催乳素、凋亡、PI3K-Akt、VEGF、T 细胞受体、TNF、MAPK 等信号通路。结论 桂枝茯苓胶囊主要通过恢复性激素平衡、促进乳腺细胞凋亡,以及抗炎、抗氧化、抗血管生成等药理作用来治疗乳腺增生症。

**【关键词】** 桂枝茯苓胶囊;入血成分;乳腺增生症;网络药理学

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0071-07

### Mechanism of Guizhi Fuling Capsule constituents migrating to blood in the treatment of mammary gland hyperplasia by network pharmacology

ZHU Xiaojin<sup>1</sup>, PEI Zhifei<sup>2</sup>, YAN Shihuan<sup>3</sup>, QIN Yang<sup>3</sup>, LAN Huiqin<sup>3</sup>, WANG Bolong<sup>1</sup>, ZHU Dan<sup>3\*</sup>

(1. School of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China.  
2. the Second People's Hospital of Yichun City, Yichun 336000. 3. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

**【Abstract】** **Objective** To study the mechanism of Guizhi Fuling Capsule treating in mammary gland hyperplasia by network pharmacology. **Methods** Using PharmMapper, GeneCards, PubMed, GenCLIP 3, and STRING platform to screen mammary gland hyperplasia targets of constituents migrating to blood, we constructed a protein-protein interaction (PPI) network. These targets were imported into the CytoNCA plug-in to calculate the important topological parameters of

**【基金项目】**广西自然科学基金青年基金项目(2013GXNSFBA019150);广西高校中青年教师基础能力提升项目(2018KY0136);广西一流学科(药学)建设项目(GXFCDP-PS-2018)。

**【作者简介】**朱晓芹(1993—),女,硕士研究生,从事临床药学、药理学等研究。E-mail: 1468448165@qq.com

**【通信作者】**朱丹(1980—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中药质量评价及中药药理学。E-mail: zdgxm2006@163.com

the PPI network to screen key targets. The ClueGO plug-in was used to analyze the biological process of these key targets, and the DAVID database was used to analyze KEGG pathway enrichment. **Results** Twelve constituents of constituents migrating to blood of Guizhi Fuling Capsule acted on 197 targets in mammary gland hyperplasia, which included 31 key targets, such as transcriptional and apoptotic proteins AKT1, MAPK1, CASP3, MAPK8, BCL2L1, MDM2, and STAT1, signal transduction proteins SRC, HRAS, HSP90AA1, MAPK14, PIK3R1, MAP2K1, and PTPN11, angiogenesis-related targets EGFR, MMP2, KDR, and NOS3, hormone-related receptors IGF1, ESR1, AR, and IGF1R, inflammatory factor IL2, and oxidoreductase CAT. These targets were enriched in 14 different biological processes, including inositol lipid-mediated signaling, mammary gland epithelium development, cellular response to reactive oxygen species, positive regulation of nitric-oxide synthase biosynthesis, T cell co-stimulation, and VEGF receptor signaling pathway, and regulate signaling pathways such as estrogen, prolactin, apoptosis, PI3K-Akt, VEGF, T cell receptors, TNF, and MAPK. **Conclusions** Guizhi Fuling Capsule is mainly used for the treatment of mammary gland hyperplasia by restoring the balance of sex hormones and promoting the apoptosis of mammary gland cells, as well as having anti-inflammatory, anti-oxidation, anti-angiogenesis, and other pharmacological effects.

**【 Keywords 】** Guizhi Fuling Capsule; constituents migrating to blood; mammary gland hyperplasia; network pharmacology

桂枝茯苓丸出自东汉医圣张仲景的《金匮要略》一书,由桂枝、茯苓、芍药(白芍)、牡丹皮、桃仁组成,是活血化瘀消癥的经典名方。桂枝茯苓胶囊是其现代制剂,具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、调节平滑肌、调节内分泌等药理作用,在临床上广泛应用于乳腺增生症、原发性痛经、子宫肌瘤、盆腔炎、多囊卵巢综合征等妇科疾病治疗<sup>[1]</sup>。临床及实验研究发现其治疗乳腺增生症的疗效优于乳宁片<sup>[2]</sup>、乳癖消片<sup>[3]</sup>、小金丸<sup>[4]</sup>等,且毒副作用小,具有较高的应用价值。由于桂枝茯苓胶囊是多成分、多靶点的复方中药,其治疗乳腺增生症的药效物质及分子机理尚不明确。

网络药理学可挖掘数据库的海量资源,全面研究复方中药的药效物质及作用机理。然而,大多数网络药理学研究,主要根据 OB、DL 等参数来筛选复方中药的药效物质。而血清药物化学认为口服药物的药效物质必须进入血液循环才能发挥药理作用,故以入血成分作为药效物质进行网络药理学研究将会更加客观、严谨。尹权微等<sup>[5]</sup>通过血清药物化学研究发现了芍药内酯苷、芍药苷、苦杏仁苷(代谢产物为野樱苷)、没食子酸、没食子酸乙酯等 12 种桂枝茯苓胶囊入血成分,为其药理研究奠定了物质基础。本研究基于桂枝茯苓胶囊 12 种入血成分,通过网络药理学挖掘它们抗乳腺增生症的作用靶点、生物过程及信号通路,进而揭示其作用机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 入血成分抗乳腺增生症靶点预测

在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站下载桂枝茯苓胶囊 12 种入血成分的 3D 结构,运用 ChemBioOffice 2014 软件对 3D 结构进行 MM2 能量最小化并保存为 mol2 格式,通过 PharmMapper 服务器在 Targetbank、Drugbank、Binding DB、PDTD 数据库中自动匹配潜在靶蛋白。最后运用 UniProt 数据库统一上述靶蛋白。再在 GeneCards、PubMed、GenCLIP 3 数据库中,检索"hyperplasia of mammary glands"以挖掘乳腺增生症靶点。最后将入血成分靶点与乳腺增生症靶点输入 Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)网站,定义重合靶点为桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症的靶点。

**1.2 入血成分-靶点网络构建**

利用 Cytoscape 软件构建 12 种入血成分及其抗乳腺增生症靶点网络,以节点度(degree)表示入血成分作用的靶点个数,分析桂枝茯苓胶囊入血成分、抗乳腺增生症靶点的内在关联。

### 1.3 蛋白互作网络构建及关键靶点的筛选

将桂枝茯苓胶囊抗乳腺增生症的入血成分及对应靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>),设置物种为"Homo sapiens",最低相互作用阈值为 0.4,其他参数保持默认值,以构建蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI)。

再利用 CytoNCA 插件计算 PPI 网络的自由度中心性(degree centrality, DC)、介度中心性(betweenness centrality, BC)、接近中心性(closeness centrality, CC)、特征向量中心性(eigenvector centrality, EC)、网络中心性(network centrality, NC)和局部边连通性(local average connectivity,

LAC)等参数。筛选标准:①DC 值大于所有节点 DC 值中位数 2 倍;②其他 5 个参数均大于所有节点中位数,即得到关键靶点。

### 1.4 关键靶点的 GO 生物过程分析

利用 Cytoscape 软件中"ClueGO"插件进行关键靶点的 GO 富集分析,分析条件为 Min Lever=3, Max Lever=8; Number of Genes=3, Min Percentage=4.0; Kappa Score=0.4;其余选项选择默认。

### 1.5 关键靶点的 KEGG 通路分析

利用 DAVID 数据库进行关键靶点 KEGG 富集分析,物种与背景设置均为"Homo sapiens";并通过 Omicshare 软件 (<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>)对富集结果进行可视化展示。

## 2 结果

### 2.1 入血成分抗乳腺增生症靶点筛选

表 1 为 12 种入血成分的基本信息。通过 PharmMapper 服务器分别得到 287、287、291、289、53、171、289、244、92、289、282、289 个靶点,合并去重后确定了入血成分的 421 个靶点。从 GeneCards、PubMed、GenCLip 3 数据库检索得到乳腺增生症靶点 2005 个,映射得到入血成分抗乳腺增生症靶点

197 个,并以此作为桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症的靶点。

### 2.2 入血成分-乳腺增生症靶点网络的构建

图 1 是桂枝茯苓胶囊入血成分及其抗乳腺增生症靶点网络,中间的 12 个六边形节点代表入血成分,外周 197 个圆形节点为抗乳腺增生症靶点,1468 条连线表示入血成分对靶点的作用,由图可见桂枝茯苓胶囊能够多成分、多靶点治疗乳腺增生症。

### 2.3 蛋白互作网络分析

图 2 为蛋白互作网络,其包括 197 个节点(所有靶蛋白均参与)和 2580 条连线。采用 CytoNCA 插件分析网络节点的拓扑属性,进而获得 31 个关键靶点,见图 3、表 2。31 个关键靶点包括转录及凋亡蛋白 AKT1、MAPK1、CASP3、MAPK8、BCL2L1、MDM2、STAT1;信号传导蛋白 SRC、HRAS、HSP90AA1、MAPK14、PIK3R1、MAP2K1、PTPN11;血管生成相关靶点 EGFR、MMP2、KDR、NOS3;激素相关受体 IGF1、ESR1、AR、IGF1R;炎症因子 IL2;氧化还原酶 CAT 和其他,说明桂枝茯苓胶囊可能是通过调节以上受体、酶、转录凋亡蛋白、信号传导蛋白、炎症因子,发挥治疗乳腺增生症的作用。

表 1 入血成分反向对接基本信息

Table 1 Basic information of reverse molecular docking of constituents migrating to blood

成分编号 PubChem ID	入血成分 Constituents migrating to blood	分子式 Molecular formula	靶点数目 Number of target	相关中药 Related Chinese medicine
51346141	芍药内酯苷 Albiflorin	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	287	白芍 Paeoniae Radix Alba
442534	芍药苷 Paeoniflorin	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	287	白芍 Paeoniae Radix Alba
656516	苦杏仁苷 Amygdalin	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>11</sub>	291	桃仁 Peach kernel
13250	没食子酸乙酯 Ethyl gallate	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	289	白芍 Paeoniae Radix Alba
243	苯甲酸 Benzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	53	白芍、桂枝、牡丹皮 Paeoniae Radix Alba, Cinnamomum cassia, Paeonia suffruticosa
11092	丹皮酚 Paeonol	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	171	白芍、牡丹皮 Paeoniae Radix Alba, Paeonia suffruticosa
21631106	苯甲酰芍药苷 Benzoylpaeoniflorin	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	289	白芍、牡丹皮 Paeoniae Radix Alba, Paeonia suffruticosa
370	没食子酸 Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	244	白芍、牡丹皮 Paeoniae Radix Alba, Paeonia suffruticosa
444539	肉桂酸 Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	92	桂枝 Cinnamomum cassia
5471851	茯苓新酸 Poricoic acid A (F)	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	289	茯苓 Poria Cocos
10494	齐墩果酸 Oleanic acid	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	282	白芍、牡丹皮 Paeoniae Radix Alba, Paeonia suffruticosa
65238	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose	C <sub>41</sub> H <sub>32</sub> O <sub>26</sub>	289	白芍、牡丹皮 Paeoniae Radix Alba, Paeonia suffruticosa

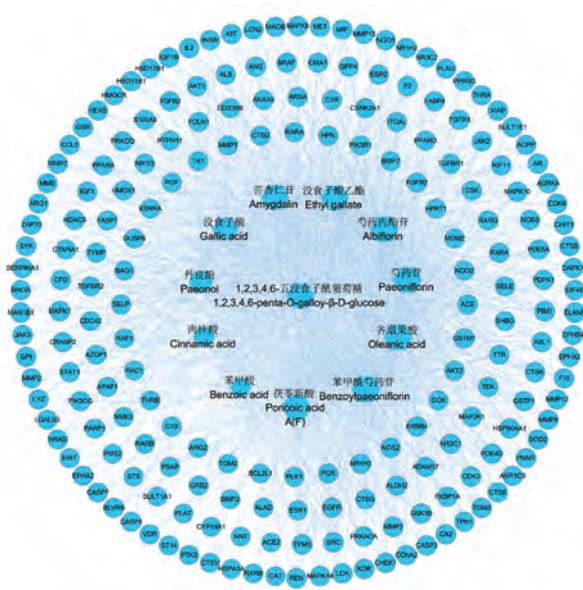


图 1 桂枝茯苓胶囊入血成分-靶点网络  
Figure 1 Constituents migrating to blood-targets network of Guizhi Fuling Capsule

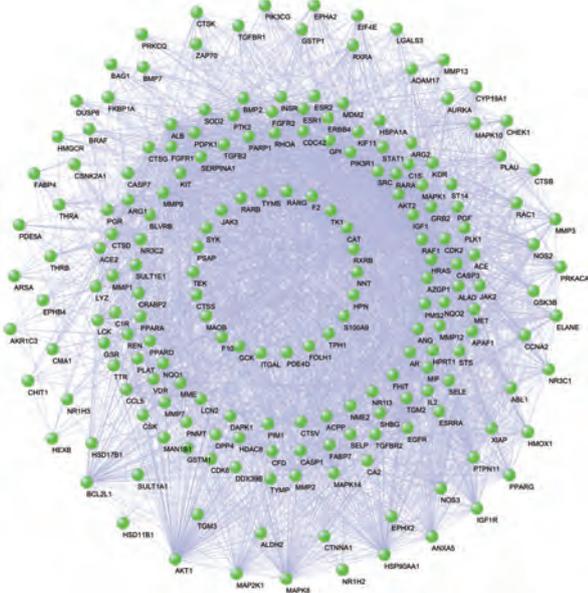


图 2 桂枝茯苓胶囊靶蛋白 PPI 网络  
Figure 2 PPI network of target protein of Guizhi Fuling Capsule

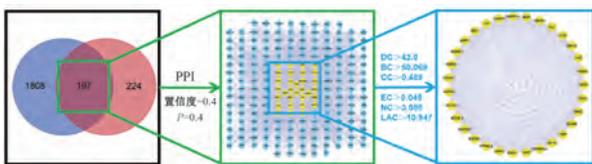


图 3 关键靶点的筛选策略图  
Figure 3 Screening strategy for key targets

2.4 GO 生物过程富集分析

如图 4 所示,关键靶点的 GO 生物过程富集分析得到 142 条信息,主要为肌醇脂质介导的信号传导、乳腺上皮细胞发育、细胞对活性氧的反应、蛋白质在细胞外周定位的调控、ERBB 信号通路、磷脂酰肌醇信号、一氧化氮合酶生物合成过程的正调控、T 细胞共刺激、血管内皮生长因子受体信号通路,共计 14 大类,说明桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症可能与乳腺细胞增生、氧化反应、细胞免疫、血管生成等生物过程有关。

2.5 KEGG 通路分析

如图 5 所示,根据  $P < 0.01$ ,筛得与乳腺增生症发生、发展密切相关的信号通路共 15 条,分别为激素相关的雌激素信号通路、催乳素信号通路、促性腺激素释放激素信号通路、甲状腺激素信号通路;血管生成相关的 VEGF 信号通路、低氧诱导因子-1 信号通路;免疫相关的 T 细胞受体信号通路、趋化因子信号通路;炎症相关的 TNF 信号通路、MAPK 信号通路;细胞凋亡相关的凋亡通路、PI3K-Akt 信号通路。其中富集因子 (richfactor) 最大的是催乳素信号通路,富集靶点数最多的是 PI3K-Akt 信号通路。

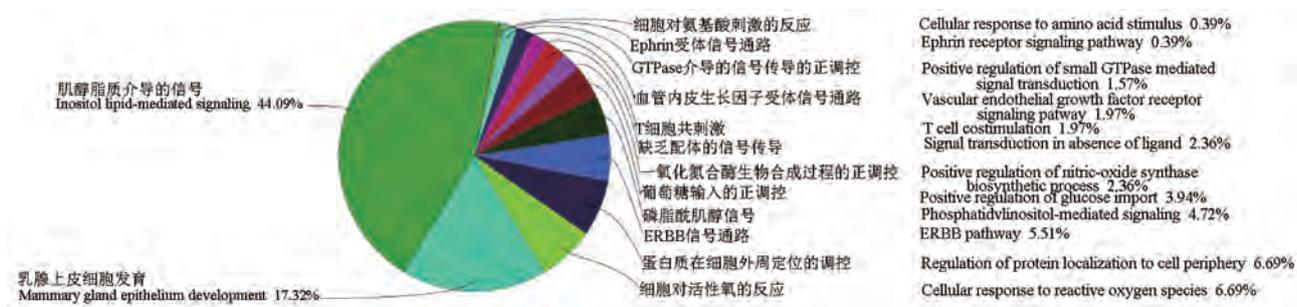
3 讨论

乳腺增生症是最为常见的女性乳腺疾病,好发于 25~45 岁中青年女性,临床以疼痛和肿块为主要症状。现代医学认为体内雌、孕激素分泌失调及雌激素持续刺激,导致乳腺组织增生而又复旧不全,是乳腺增生症发病的主要原因<sup>[6-7]</sup>。临床治疗以抗雌激素药物为主,但此类药物存在月经紊乱、闭经等多种不良反应<sup>[8-9]</sup>。

本研究利用网络药理学方法,明确了桂枝茯苓胶囊 12 种入血成分治疗乳腺增生症的 197 个靶点,依据 PPI 网络中的 6 个重要拓扑参数,筛选出 31 个关键靶点,并富集这些关键靶点的 GO 生物过程及 KEGG 通路。其中激素方面的关键靶点有雌激素受体  $\alpha$  (ESR1)、雄激素受体 (AR)、胰岛素样生长因子 1 型受体 (IGF1R) 及其配体 IGF1;相关的 KEGG 通路有雌激素信号通路、催乳素信号通路、促性腺激素释放激素 (GnRH) 信号通路等,且催乳素信号通路是所有通路中富集因子最大的。生理情况下,雌激素调控乳管及管周组织生长;乳腺小叶及腺泡组织发育为孕激素调节;而催乳素则发挥协同作用。

**表 2** 关键靶点及其拓扑参数  
**Table 2** Key targets and their topological parameters

靶点 Target	自由度中心性 Degree centrality	介度中心性 Betweenness centrality	接近中心性 Closeness centrality	特征向量中心性 Eigenvector centrality	网络中心性 Network centrality	局部边连通性 Local average connectivity	蛋白分类 Functional protein classification
AKT1	118.0	3115.500	0.713	0.199	97.155	28.814	转录及凋亡蛋白 Transcriptional and apoptotic proteins
MAPK1	100.0	2125.923	0.667	0.181	78.638	28.880	
CASP3	87.0	987.036	0.636	0.172	66.325	30.506	
MAPK8	81.0	706.978	0.628	0.167	59.863	30.321	
9BCL2L1	65.0	568.028	0.592	0.140	45.286	27.785	
MDM2	57.0	427.931	0.573	0.118	36.731	23.228	
STAT1	50.0	412.920	0.560	0.111	29.638	22.240	
SRC	92.0	1375.367	0.647	0.176	71.175	29.567	信号传导蛋白 Signaling proteins
HRAS	83.0	874.110	0.626	0.164	64.639	29.470	
HSP90AA1	81.0	1496.954	0.626	0.156	59.188	27.556	
MAPK14	67.0	861.352	0.594	0.142	44.338	26.627	
PIK3R1	54.0	270.083	0.547	0.111	35.263	23.111	
MAP2K1	51.0	131.540	0.566	0.125	36.187	28.471	
PTPN11	45.0	103.395	0.528	0.101	30.604	23.289	
EGFR	96.0	1603.267	0.653	0.176	73.932	28.229	血管生成相关靶点 Targets associated with angiogenesis
MMP2	64.0	376.641	0.587	0.133	43.938	26.219	
KDR	55.0	242.193	0.565	0.122	35.940	24.945	
NOS3	50.0	405.211	0.563	0.102	29.281	19.920	
IGF1	88.0	1278.165	0.641	0.170	66.980	29.250	激素相关受体 Hormone-associated receptors
ESR1	81.0	2116.018	0.624	0.153	56.083	26.049	
AR	52.0	522.717	0.563	0.111	31.005	21.654	
IGF1R	48.0	153.444	0.560	0.116	32.008	26.000	
CAT	56.0	1171.747	0.573	0.106	33.693	19.786	氧化还原酶 Xidoreductase
IL2	52.0	295.794	0.560	0.113	32.080	22.538	炎症因子 Inflammatory cytokines
ALB	114.0	4167.043	0.705	0.183	93.478	26.649	其他 Other functional proteins
MMP9	86.0	1448.716	0.634	0.157	64.256	26.884	
RHOA	63.0	345.256	0.580	0.137	44.550	27.460	
ANXA5	58.0	274.893	0.580	0.132	39.329	27.655	
CDC42	52.0	167.235	0.558	0.121	36.070	26.346	
GRB2	51.0	197.862	0.555	0.116	36.406	26.157	
JAK2	47.0	132.031	0.551	0.113	30.621	24.936	



**图 4** GO 生物过程注释饼状图  
**Figure 4** Pie diagram of GO biological process

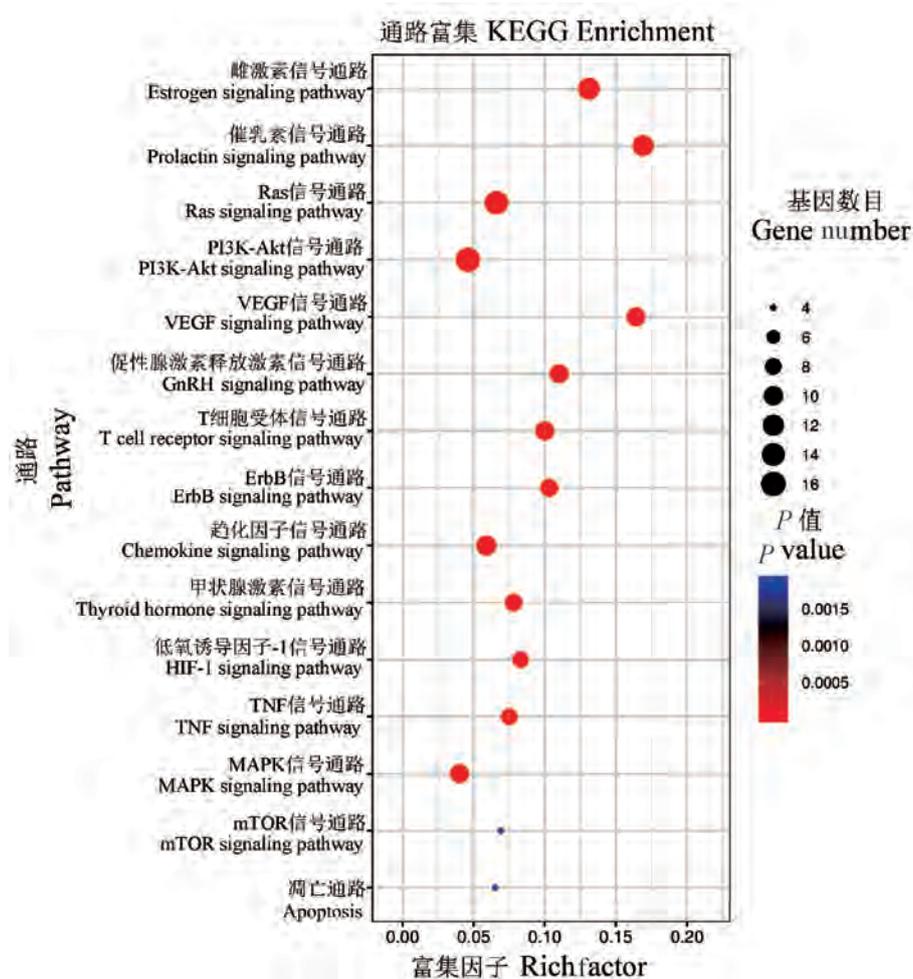


图 5 KEGG 信号通路富集分析

Figure 5 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway

乳腺组织在各激素的共同作用下发生周期性变化。当下丘脑-垂体-卵巢内分泌轴失衡,患者体内雌激素分泌增多,而孕激素分泌不足;同时患者体内泌乳素水平升高,其不仅直接刺激乳腺组织,还可抑制黄体期孕酮的分泌,促进雌二醇的合成,从而导致雌孕激素比例失调,在雌激素持续刺激下最终造成乳腺增生症<sup>[10]</sup>。而动物及人体研究均已证实桂枝茯苓胶囊不仅能够降低乳腺增生大鼠的雌激素,升高其孕激素,进而抑制乳腺增生,还可有效调节性激素水平,降低多发乳腺纤维瘤患者的术后复发率<sup>[11-12]</sup>。以上结果说明,不同于西药抗雌激素药物的单纯拮抗,桂枝茯苓胶囊主要影响多种性激素的水平或者它们与其受体的作用,通过纠正下丘脑-垂体-卵巢内分泌轴的失衡而抗乳腺增生症。

近年研究还认为乳腺增生症的发生、加重、甚至癌变的过程,就是乳腺上皮细胞增殖过度以及凋亡减弱的结果<sup>[13]</sup>。我们的预测分析显示,桂枝茯苓

胶囊抗乳腺增生症的关键靶点中就包含 AKT1、CASP3、BCL2L1、MAPK1、MAPK8、STAT1 等多个重要的凋亡调控蛋白,涉及的通路有凋亡通路、PI3K-Akt 信号通路等,且多数关键靶点富集在 PI3K-Akt 信号通路。明松林等<sup>[14]</sup>的实验证实桂枝茯苓汤可以降低 Bcl-2 蛋白的表达,促进 Bax、Caspase-3/9 以及 Bid 蛋白的表达,诱导乳腺癌细胞凋亡。吴代陆等<sup>[15]</sup>则发现 PI3K-Akt 通路跟乳腺增生症的发生发展密切相关,其激活后会直接磷酸化下游的 mTOR,产生抗凋亡效应,促进乳腺细胞增殖;而阻断该通路则可促进乳腺细胞凋亡,发挥抑制乳腺增生的作用。还有研究表明,胰岛素生长因子 1(IGF1)、表皮生长因子(EGF)和性激素可通过 mTOR 通路调节乳腺上皮细胞的自噬,使乳腺上皮细胞的增殖与凋亡达到动态平衡,而本文桂枝茯苓胶囊抗乳腺增生症的关键靶点就含有 IGF1,以及 EGF 与性激素的受体<sup>[16]</sup>。由此可见,调控凋亡相关蛋白及通路,促进

乳腺细胞凋亡是桂枝茯苓胶囊抗乳腺增生症的另一主要机理。

此外,增生的乳腺组织常伴有新生血管、氧自由基增多,新生血管越丰富,乳腺增生就越严重;而过多的氧自由基使得生物膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,可促进炎症细胞因子释放,导致乳腺细胞损伤、增生甚至癌变等<sup>[17-19]</sup>。我们预测的桂枝茯苓胶囊抗乳腺增生症关键靶点还包括血管生成相关的 EGFR、MMP2、KDR、NOS3;以及炎症因子 IL2、氧化还原酶 CAT 等,涉及 VEGF、HIF-1、TNF 等信号通路,与乳腺上皮细胞发育、细胞对活性氧的反应、一氧化氮合酶生物合成过程的正调控、T 细胞共刺激等生物过程相呼应。张珍珍等<sup>[20]</sup>发现桂枝茯苓胶囊可抑制炎症反应及细胞因子合成。肖新春等<sup>[21]</sup>则证实桂枝茯苓胶囊可降低 VEGF 表达,抑制血管增生。所以,除了调节性激素平衡,促进乳腺细胞凋亡外,桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症机制还可能与抗炎、抗氧化、抗血管生成有关。

总之,本研究基于桂枝茯苓胶囊的入血成分,通过网络药理学方法预测了其抗乳腺增生症的作用靶点、生物过程、信号通路,为实验验证桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症的药理机制指明了方向。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 仲云熙,孙建国,王广基. 桂枝茯苓胶囊药理作用与临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3115-3120.
- [ 2 ] 杨秀清. 桂枝茯苓胶囊治疗女性乳腺囊性增生病的疗效观察 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(32): 512.
- [ 3 ] 宋洁. 分析桂枝茯苓汤加味治疗乳腺增生的临床疗效 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(56): 178.
- [ 4 ] 朱月琴. 小金丸联合桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症的疗效分析 [J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2019, 6(30): 89-90.
- [ 5 ] 尹权微,李家春,秦建平,等. UPLC/Q-TOF-MS 快速分析桂枝茯苓胶囊的入血成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 83-86.
- [ 6 ] 王振强. 乳腺增生症不同中医辨证分型的靶靶及 MRI 影像学观察 [D]. 泰山: 泰山医学院, 2013.
- [ 7 ] 王瑞琼,吴国泰,刘峰林,等. 心理应激致孕鼠乳腺发育不良及雌/孕激素和受体水平异常 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 272-277.
- [ 8 ] 白晓黎. 乳腺增生的常用药物及不良反应分析 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(28): 170-171.
- [ 9 ] Teoh DC, Aw DC, Jaffar H, et al. Tamoxifen-induced eccrine squamous syringometaplasia [J]. J Cutan Pathol, 2012, 39(5): 554-557.
- [ 10 ] 叶志雄,陈泳晖,肖柳英. 乳康汤含药血清对大鼠乳腺增生组织 ER 和 PR 表达及细胞凋亡的实验研究 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2013, 10(4): 55-59.
- [ 11 ] 常秀娟,周军,张帅,等. 桂枝茯苓胶囊对乳腺增生大鼠性激素水平和乳腺组织的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4139-4142.
- [ 12 ] 周用,罗保平. 桂枝茯苓胶囊联合手术治疗对多发乳腺纤维瘤患者疗效及性激素水平影响分析 [J]. 贵州医药, 2019, 43(9): 1440-1442.
- [ 13 ] 王莘,李丽,张婷婷. 加味当归芍药散对乳腺增生大鼠乳腺上皮细胞凋亡和 Bcl-2 表达的影响 [J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(6): 23-25.
- [ 14 ] 明松林,刘燕,杨铁柱,等. 桂枝茯苓汤对乳腺癌细胞株线粒体凋亡途径相关蛋白和细胞周期的影响 [J]. 中医药导报, 2015, 21(17): 23-26.
- [ 15 ] 吴代陆,麦喆研,陈怡,等. 基于网络药理学的“柴胡-白术”药对治疗乳腺增生的作用机制探讨 [J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2525-2531.
- [ 16 ] Sobolewska A, Gajewska M, Zarzyńska J, et al. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway [J]. Eur J Cell Biol, 2009, 88(2): 117-130.
- [ 17 ] Li X, Xin P, Wang C, et al. Mechanisms of traditional chinese medicine in the treatment of mammary gland hyperplasia [J]. Am J Chin Med, 2017, 45(3): 443-458.
- [ 18 ] Shan B, Li W, Yang SY, et al. Estrogen up-regulates MMP2/9 expression in endometrial epithelial cell via VEGF-ERK1/2 pathway [J]. Asian Pac J Trop Med, 2013, 6(10): 826-830.
- [ 19 ] 连小龙. 西黄丸抗乳腺增生作用机制研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [ 20 ] 张珍珍,张新庄,李娜,等. 桂枝茯苓胶囊及其活性成分组合物抗炎作用与机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 993-998.
- [ 21 ] 肖新春,李海燕,李昕芹. 桂枝茯苓胶囊对 EM 模型大鼠异位内膜细胞凋亡、VEGF 及血清雌孕激素的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(1): 68-72.

[收稿日期] 2020-08-27

程洁,张成香,孙杰,等. 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊的功效成分测定与其对 CI/F1 小鼠免疫功能的调节作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 78-84.

Cheng J, Zhang CX, Sun J, et al. Determination of functional components of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule and study on its immune function in CI/F1 mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 78-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.012

## 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊的功效成分测定与其对 CI/F1 小鼠免疫功能的调节作用研究

程洁<sup>2</sup>,张成香<sup>1,2</sup>,孙杰<sup>1,2</sup>,李世芬<sup>1,2</sup>,王玉邦<sup>1,2</sup>,环飞<sup>1,2\*</sup>

(1.江苏省医药农药兽药安全性评价与研究中心,南京 211166;2.南京医科大学公共卫生学院,南京 211166)

**【摘要】** 目的 测定石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊中功效成分人参皂甙、多糖和腺苷的含量,研究石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对 CI/F1 (BALB/c×ICR) 雌性小鼠的免疫调节作用。方法 采用比色法测定人参皂甙和多糖,采用液相色谱法 (HPLC) 测定腺苷;采用小鼠经口灌胃分别给予 260、530、1580 mg/kg 的石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊 30 d 后,观察其体重,测定其免疫器官指数、脾淋巴细胞增殖能力、小鼠迟发型变态反应,血清溶血素、自然杀伤细胞 (NK 细胞) 活性、抗体生成细胞水平及腹腔巨噬细胞吞噬功能的变化。结果 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊中功效成分的含量分别为人参皂甙:1.495 g/100 g、多糖:12.90 g/100 g 和腺苷:73.8 mg/100 g;1580 mg/kg 组可增强细胞免疫功能(脾淋巴细胞增殖能力和小鼠迟发型变态反应增强)、提高抗体生成细胞水平、提高小鼠巨噬细胞吞噬活性。结论 在本实验条件下,石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊有增强小鼠免疫功能的作用。

**【关键词】** 皂甙;多糖;腺苷;免疫功能;小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0078-07

### Determination of functional components of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule and study on its immune function in CI/F1 mice

CHENG Jie<sup>2</sup>, ZHANG Chengxiang<sup>1,2</sup>, SUN Jie<sup>1,2</sup>, LI Shifen<sup>1,2</sup>, WANG Yubang<sup>1,2</sup>, HUAN Fei<sup>1,2\*</sup>

(1. the Safety Assessment and Research Center for Drugs of Jiangsu Province, Nanjing 211166, China.

2. School of Public Health Nanjing Medical University, Nanjing 211166 )

**【Abstract】 Objective** The ginsenosides, polysaccharides and adenosine contents in the Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule were determined. To study the immune function effect of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule in CI/F1 (BALB/c×ICR) female mice. **Methods** Ginsenoside and polysaccharide were determined by colorimetric method and adenosine was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule in distilled water was administered by oral gavage to female mice at a dose of 260, 530 or 1580 mg/kg. After 30 d, the bodyweight, immune organ index, spleen lymphocyte proliferation ability, delayed type hypersensitivity, serum hemolysin, natural killer (NK) cell activity, antibody generation cellular level and the changes of macrophage phagocytic function in the abdominal cavity were evaluated for 10 female

**【基金项目】**江苏高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发[2018]87号)。

**【作者简介】**程洁(1978—),女,硕士,高级实验师,研究方向:卫生毒理学。E-mail: chengjie@njmu.edu.cn

**【通信作者】**环飞(1977—),男,硕士,高级实验师,研究方向:卫生毒理学。E-mail: huanfei@njmu.edu.cn

animals in each group at the end of the study. **Results** The ginsenoside, polysaccharide and adenosine contents in *Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger* Capsule were 1.495 g/100 g, 12.90 g/100 g and 73.8 mg/100 g, respectively. In the 1580 mg/kg group, the cellular immune function (spleen lymphocyte proliferation and delayed type hypersensitivity reaction) in the mice were enhanced, the level of antibody generation was elevated and the macrophage cellular and phagocytic activities were increased. **Conclusions** Under the conditions of this experiment, the *Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger* Capsule enhanced the immune function in mice.

**【Keywords】** saponin; polysaccharide; adenosine; immune function; mouse

铁皮石斛主要成分有大量多糖、生物碱、氨基酸、微量元素等,其主要药理作用有提高免疫力,降血糖、降血脂、降血压、抗肿瘤、抗氧化、延缓衰老、抗疲劳<sup>[1]</sup>。蝙蝠蛾拟青霉菌从冬虫夏草中分离纯化后所得麦角菌科蝙蝠蛾拟青霉菌株,研究表明其具有提高免疫活性和抗疲劳作用<sup>[2-3]</sup>。人参提取物中的主要功效成分为人参皂甙、多糖,还含有少量黄酮、多肽、甾醇、氨基酸、蛋白质、生物碱、有机酸以及木质素等多种化学成分。人参具有增强免疫力、改善记忆力、改善心血管功能、抗肿瘤和延缓衰老等药理作用<sup>[4-5]</sup>。干姜作为传统常用药食同源的中药材,其性热味辛,功效为温中散寒,回阳通脉,温肺化痰<sup>[6]</sup>,干姜理化作用为解热、镇痛、抗炎、抑菌、改善心血管功能,还具有保护胃黏膜、抗溃疡以及保肝利胆等作用<sup>[7]</sup>。

干姜和铁皮石斛作为“药食同源”的中药材,本身食用安全,研究表明铁皮石斛、人参、蝙蝠蛾拟青霉菌及其制剂均未发现毒性、食用安全,可进一步开发利用复配成具保健功能的食品<sup>[8-12]</sup>。不同植物多糖对免疫调节功效不同<sup>[13]</sup>,同时根据健康需求和药性配伍不同的中药材,达到协同作用,提高保健食品的功效,将铁皮石斛和人参提取物,并辅以蝙蝠蛾拟青霉菌粉、干姜提取物为原料配伍制成石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊。本实验对石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊的功效成分测定及其对小鼠免疫系统影响的研究,旨在为进一步开发利用铁皮石斛、人参提取物、蝙蝠蛾拟青霉菌粉、干姜提取物复方的保健功能提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选择 8~10 周龄(体重为 19.0~21.7 g)的 SPF 级雌性小鼠 200 只,品系为 CI/F1 (BALB/c 与 ICR 杂交一代),由上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [SCXK(沪)2018-0006] 提供。动物饲养于南京医科大学卫生分析检测中心屏障系统 [SYXK(苏)

2020-0006],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,伦理审批经南京医科大学卫生分析检测中心实验动物伦理委员会审核通过 (GZ01020160063-3)。

### 1.2 主要试剂与仪器

石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊由某公司提供,主要成分包括铁皮石斛 133 g、人参提取物 45 g、蝙蝠蛾拟青霉菌粉 111 g、干姜提取物 24 g、微晶纤维素 32 g 和二氧化硅 5 g 按比例混后制成胶囊,人体推荐剂量为每人每天 3.15 g。

培养基 (RPMI1640, Gibco 公司,美国);刀豆蛋白 A (ConA, Sigma 公司,美国);胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司);吩嗪二甲酯硫酸盐 (NP40, Fluka 公司,美国);2,4-二硝基氟苯 (DNFB, 医药集团(上海)化学试剂公司);四甲基偶氮哇 (MTT, Amresco 公司,美国);印度墨汁 (北京笃信精细制剂厂);无菌脱纤维羊血 (SRBC, 江苏博达生物工程有限公司);鸡红细胞悬液为实验室自制。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 功能成分含量测定

##### (1) 人参皂甙

供试品采用水超声 30 min,定容后摇匀,放置后吸取上清液备用进行柱层析<sup>[14]</sup>。采用 3 cm 的 Amberlite-XAD-2 大孔树脂和 1 cm 中性氧化铝作为层析柱,先后用 70%乙醇与水洗柱,弃去洗脱液,加入 1 mL 已处理好的实验溶液,先用 25 mL 水洗柱,弃去洗脱液,再用 25 mL 70%乙醇洗脱人参皂甙,收集洗脱液,60℃ 挥干;加入 0.2 mL 5%香草醛冰乙酸溶解,再加 0.8 mL 高氯酸,混匀后 60℃ 水浴 10 min,冷却后加入冰乙酸 5 mL 摇匀,采用分光光度计于 560 nm 波长处与标准管一起进行比色测定,以人参皂甙 Re 为对照品。

##### (2) 多糖测定

供试品采用水加热回流 2 h<sup>[15]</sup>,定容,混匀,滤过;取滤液 2 mL,加入无水乙醇定容至 10 mL,摇匀,冷藏 1 h 后离心 (4000 r/min, 20 min),弃去上清液,

沉淀加 80%乙醇洗涤 2 次,离心,弃去上清液,沉淀加热水溶解,冷却,定容后待测备用;取 1 mL 待测溶液后加入 5%苯酚溶液 1 mL,摇匀、加硫酸 5 mL 后摇匀、置沸水浴中加热 20 min,冷却后采用分光光度计于 488 nm 波长处与标准管一起进行比色测定,以无水葡萄糖为对照品。

### (3)腺苷测定

供试品采用水超声提取 10 min 后<sup>[14]</sup>,定容混匀后离心(3000 r/min, 3 min),经 0.45 μm 滤膜过滤后采用液相色谱测定,色谱柱为 C18 柱,以 1 mol/L 磷酸二氢钾:甲醇=90:10 为流动相,流量 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm。

### 1.3.2 小鼠调节免疫功能实验

设定小鼠剂量分别为 260 mg/kg、530 mg/kg 和 1580 mg/kg 3 个剂量组<sup>[13]</sup>,根据体表面积将小鼠剂量换算为人体等效剂量分别为 21.1 mg/kg、43.1 mg/kg、128.4 mg/kg;阴性对照组(0 mg/kg, 无菌水)。200 只小鼠根据初始体重随机分组,先分成 5 个大组,再按受试物给予剂量分成 4 个组,总计 20 组,每组 10 只小鼠。各免疫功能实验分组情况见表 1。

每天同一时间段给予受试物,连续 30 d,各组小鼠按 10 mL/kg 灌胃给予受试物,30 d 后测定调节免疫的各项指标。

#### (1)体重和免疫器官相对重量

连续给予受试物 30 d 后,取用于小鼠碳廓清实验(第 4 大组)的 40 只小鼠,称量终末体重,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下摘取脾和胸腺,并称量脏器重量,按公式:相对重量=脏器绝对重量(mg)/

小鼠体重(g),计算各自免疫器官相对重量。

#### (2)小鼠淋巴细胞增殖实验(ConA 诱导的脾淋巴细胞转化实验)及 NK 细胞活性测定

连续给予受试物 30 d 后,取第 1 大组的 40 只小鼠,称量终末体重,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下摘取脾,研磨脾,无菌细胞筛网过滤,用 Hank's 液洗 2 次,每次离心 10 min(1000 r/min),制成单个细胞悬液,取部分细胞用 RPMI1640 培养液将调整浓度,24 孔培养板加入 1 mL 浓度为每毫升  $3 \times 10^6$  个细胞悬液,平行两孔,一孔加浓度为 100 μg/mL 的 ConA 溶液 75 μL,另一孔细胞作为对照,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h。培养结束前 4 h,吸去上清液 0.7 mL,加入 0.7 mL 不含胎牛血清的培养液,每孔加入 50 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后每孔加入 1 mL 酸性异丙醇,混匀,使紫色结晶溶解,将溶解液转移至 96 孔培养板测定各孔光密度值,酶标仪测定波长为 570 nm,按公式:淋巴细胞增殖能力=含有 ConA 的组光密度值-无 ConA 的组光密度值。

取小鼠淋巴细胞增殖实验中制成的单个细胞悬液,离心 10 min(1000 r/min)弃上清后加入灭菌水裂解红细胞 20 s,加入 Hank's 液混匀后离心,弃上清用含 10%胎牛血清完全培养液调整细胞浓度。取浓度为每毫升  $2 \times 10^7$  个的脾细胞悬液 100 μL 和浓度为每毫升  $4 \times 10^5$  个的 YAC-1 细胞悬液 100 μL 加入 96 孔培养板(U 型),混匀后置于 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 的条件下培养 4 h,离心,取上清液 100 μL 转移至 96 孔培养板(平底)中,与 100 μL 的 LDH 基质液反

表 1 分组表  
Table 1 Grouping table

组别 Groups	免疫调节功能实验 Immune function test	各剂量组动物数 Number of animals in each dose group			
		0 mg/kg	260 mg/kg	530 mg/kg	1580 mg/kg
第 1 大组 1 group	淋巴细胞增殖实验 Lymphocyte proliferation test	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female
	NK 细胞活性实验 NK cell activity test				
第 2 大组 2 group	迟发型变态反应实验 Delayed type hypersensitivity	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female
	抗体生成细胞 Antibody generation cellular				
第 3 大组 3 group	半数溶血值(HC <sub>50</sub> )实验 Serum hemolysin test	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female
	碳廓清实验 Engulfing carbon granula test				
第 4 大组 4 group	碳廓清实验 Engulfing carbon granula test	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female
	腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验 Phagocytic function of macrophages in abdominal cavity	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female	10 只/雌 10/female

应 10 min,加终止液 30 μL(1 mol/L 的 HCl)后测定各孔光密度值,酶标仪测定波长为 490 nm,按公式: NK 细胞活性(%)=(反应孔 OD 值-自然释放孔 OD 值)/(最大释放孔 OD 值-自然释放孔 OD 值)×100,计算 NK 细胞活性。

(3)DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应(DTH)

连续给予受试物 30 d 后,取第 2 大组的 40 只小鼠腹部去毛,范围约 3 cm×3 cm,用浓度 10 mg/mL DNFB 溶液 50 μL 均匀涂抹诱导致敏,5 d 后于小鼠右耳双面涂均匀抹 10 μL 激发,激发后 24 h 颈椎脱臼法处死小鼠,左右耳各剪下直径为 8 mm 的圆形耳片,称重。按公式:耳重差(mg)=右耳重(mg)-左耳重(mg),计算右耳肿胀程度,以反映受试物对 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应影响程度。

(4)抗体生成细胞检测和血清溶血素测定

连续给予受试物 30 d 后,取第 3 大组的 40 只小鼠腹腔注射 0.2 mL 的 2% 压积 SRBC 悬液,4 d 后所有小鼠从眼内眦静脉丛采集血液并离心血清备用(用于溶血素测定)。颈椎脱臼法处死小鼠,摘取脾,研磨脾,无菌细胞筛网过滤,用 Hank's 液洗 2 次,每次离心 10 min(1000 r/min),制成单个细胞悬液备用。将表层培养基加热溶解后与等量 2 倍浓度的 Hank's 液混匀,按每管 0.5 mL 分装,再向管内加 50 μL 的 10% 压积 SRBC,25 μL 的脾细胞悬液,混匀后倒在已刷琼脂糖薄层的玻片上,5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养 1.5 h,然后加入补体,继续培养 1.5 h 后,计数溶血形成的空斑数。用缓冲液 1:200 稀释已离心好的血清,常规方法测定 SRBC 半数溶血时的光密度值,酶标仪测定波长为 540 nm。按公式:半数溶血值 HC<sub>50</sub>=样品光密度值/SRBC 半数溶血时的光密度值×稀释倍数,计算半数溶血值。

(5)小鼠碳廓清实验

连续给予受试物 30 d 后,取第 4 大组的 40 只小鼠尾静脉注入印度墨汁,2 min 和 10 min 后取血,用 0.1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液稀释 100 倍,于 600 nm 波长处测光密度值,取肝、脾、胸腺并称重,通过光密度值、肝、脾重量计算吞噬指数 a。公式如下:

$$\text{吞噬指数 } a = \frac{\text{体重}}{\text{肝重} + \text{脾重}} \times K^{1/3} \quad K = \frac{\lg OD_1 - \lg OD_2}{t_2 - t_1}$$

(6)小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞实验

连续给予受试物 30 d 后,取第 5 大组的 40 只小鼠。处死动物前 4 d 给每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 的 2% 压积 SRBC,激活小鼠巨噬细胞。颈椎脱

臼法处死小鼠,每只小鼠腹腔注射加 4 mL 含胎牛血清的 Hank's 液,按揉腹部 20 次洗出腹腔巨噬细胞,吸取腹腔洗液 0.5 mL 与 0.5 mL 1% 鸡红细胞悬液混匀。取 0.5 mL 混合液,加有玻片的琼脂圈内。放置孵箱内 37℃ 孵育 20 min。孵育结束用生理盐清洗,常规固定与 Giemsa 染色,镜检。按公式:吞噬百分率(%)=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/计数的巨噬细胞数×100,吞噬指数=被吞噬的鸡红细胞总数/计数的巨噬细胞数,计算数吞噬率和吞噬指数。

1.4 统计学方法

所有实验结果采用 SPSS 22.0 软件计算与分析,小鼠各周体重、免疫器官相对重量、淋巴细胞增殖能力、耳壳增重、溶血空斑数、血清半数溶血值等指标采用 SPSS 软件对各实验组原始数据进行方差齐性检验,符合方差齐的要求的数据资料用单因素方差分析方法中多个实验组与一个对照组间均数的两两比较方法进行统计处理;对方差不齐的数据采用秩和检验进行统计处理;对并将吞噬百分率和 NK 细胞活性需经 sin<sup>-1</sup>P<sup>1/2</sup>(P 表示为吞噬百分率或 NK 细胞活性,将百分率转化成小数表示)转化,符合方差齐的要求后进行统计处理。检验水准 α=0.05,P<0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 功能成分含量测定

石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊的功效成分人参皂甙、多糖和腺苷的含量测定结果见表 2。

2.2 小鼠调节免疫功能实验

2.2.1 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠各周及终末体重和免疫器官相对重量的影响

石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊各剂量组的小鼠各周及终末体重与阴性对照组比无显著差异;免疫器官相对重量与阴性对照组比无显著性差异(表 3)。

表 2 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊功效成分测定结果  
Table 2 Determination results of effective components in Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule

功效成分 Effective components	批次 1 Batch1	批次 2 Batch2	批次 3 Batch3	平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )
人参皂甙(g/100 g) Ginsenoside	1.502	1.488	1.495	1.495±0.007
多糖(g/100 g) Polysaccharide	13.00	12.52	13.19	12.90±0.35
腺苷(mg/100 g) Adenosine	74.3	74.1	73.0	73.8±0.7

### 2.2.2 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠脾淋巴细胞增殖能力、右耳肿胀程度的影响

由表 4 结果可见,1580 mg/(kg·d)组中含有 ConA 小鼠脾淋巴细胞孔光密度值与无 ConA 孔的差值高于 0 mg/(kg·d)组,比较有显著差异( $P < 0.05$ ),显示石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对 ConA 诱导的脾淋巴细胞转化有增加作用,提高脾淋巴细胞增殖能力;1580 mg/(kg·d)组耳重差增重高于 0 mg/(kg·d)组,比较有显著差异( $P < 0.05$ ),显示石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对 DNFB 诱导小鼠耳肿胀程度明显增强,反映小鼠迟发型变态反应增强。脾淋巴细胞增殖能力增加和迟发型变态反应增强均反映石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠细胞免疫功能、特异性免疫功能有增强作用。

### 2.2.3 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠抗体生成细胞水平和半数溶血值的影响

由表 5 结果可见,1580 mg/(kg·d)组小鼠溶血形成的空斑数高于 0 mg/(kg·d)组,比较有显著差异( $P < 0.05$ ),显示石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对促进小鼠抗体生成细胞水平升高。260 mg/(kg·d)、530 mg/(kg·d)、1580 mg/(kg·d)组小鼠  $HC_{50}$  与 0 mg/(kg·d)组比较无显著性差异( $P < 0.05$ )。虽然石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对  $HC_{50}$  升高影响没有显著

性差异,结合溶血空斑数的升高,表明石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊可在一定程度上增强小鼠的体液免疫功能。

### 2.2.4 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠单核/巨噬细胞吞噬能力的影响

由表 6 结果可见,1580 mg/(kg·d)组的吞噬指数 a 高于 0 mg/(kg·d)组,比较有显著差异( $P < 0.05$ );1580 mg/(kg·d)组的吞噬百分率及吞噬指数均高于 0 mg/(kg·d)组,比较有显著差异( $P < 0.05$ );吞噬指数 a 升高表明石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠单核细胞吞噬能力(即碳廓清的能力)有增强作用,吞噬百分率及吞噬指数的升高表明石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对增强小鼠巨噬细胞吞噬能力有增强作用,单核/巨噬细胞吞噬能力增强反映石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊具有增强小鼠非特异性免疫功能。

### 2.2.5 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠 NK 细胞活性的影响

由表 7 结果可见,260 mg/(kg·d)、530 mg/(kg·d)、1580 mg/(kg·d)组小鼠 NK 细胞活性与 0 mg/(kg·d)组比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。表明石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对 NK 细胞活性没有调节作用。

**表 3** 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠胸腺和脾相对重量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 3** Effects of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule on relative weight of thymus and spleen in mice

剂量(mg/kg) Dose	胸腺/体重(%) Thymus gland/body weight	脾/体重(%) Spleen/body weight
0	0.192±0.021	0.385±0.025
260	0.197±0.020	0.390±0.038
530	0.208±0.032	0.396±0.039
1580	0.191±0.021	0.381±0.018

**表 5** 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠抗体生成细胞水平和半数溶血值的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 5** Effects of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule on antibody producing cells and half hemolytic value of mice

剂量(mg/kg) Dose	溶血空斑数 ( $10^3$ 个/全脾细胞) Number of hemolytic plaque ( $10^3$ /whole spleen cells)	$HC_{50}$
0	11.8±1.6	78±19
260	12.9±1.5	78±27
530	13.7±2.7	77±15
1580	14.8±2.2*	91±20

**表 4** 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对脾淋巴细胞增殖能力、右耳肿胀程度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 4** Effects of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule on spleen lymphocyte proliferation and right ear swelling

剂量 (mg/kg) Dose	加 ConA 孔与不加 ConA 孔吸光度的差值 Difference of absorbance between hole with and without ConA	耳重差(mg) Ear weight difference
0	0.095±0.039	10.9±1.7
260	0.109±0.031	11.6±3.2
530	0.117±0.041	13.0±2.2
1580	0.148±0.066*	13.7±1.3*

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。下同。

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . The same as below.

**表 6** 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠单核-巨噬功能的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 6** Effects of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule on mononuclear and megaphagocytic function in mice

剂量 (mg/kg) Group	吞噬指数 a Phagocytic index a	吞噬百分率(%) Phagocytosis percentage	吞噬指数 Phagocytic index
0	5.68±0.74	22.5±3.5	0.28±0.04
260	5.58±0.84	24.7±4.1	0.30±0.04
530	5.61±1.03	24.7±4.1	0.31±0.05
1580	6.70±0.92*	26.5±2.4*	0.33±0.05*

表 7 石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠 NK 细胞活性的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )  
Table 7 Effects of Dendrobium-ginseng-paecilomyces batmoth-ginger Capsule on NK cell activity in mice

剂量(mg/kg) Group	NK 细胞活性(%) NK cell activity
0	32.9±7.6
260	31.0±5.9
530	37.6±8.4
1580	27.5±5.0

### 3 讨论

雄性小鼠好动,群养时的好斗习性容易影响实验结果,本研究仅选用雌性小鼠,符合保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)单一性别的要求,同时也满足了 3R 原则。本实验观察石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊对小鼠细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞功能三个方面均有明显作用。细胞免疫方面:石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊 1580 mg/kg 组可增强脾淋巴细胞增殖能力和增强 DNFB 诱导小鼠迟发型变态反应,均提示其具有明显的细胞免疫的功能;单核-巨噬细胞功能方面:石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊 1580 mg/kg 组小鼠碳廓清吞噬指数 a、小鼠腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬百分率及吞噬指数均有显著性增加,提示其具有增强单核巨噬细胞的吞噬能力;而且细胞免疫、单核巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的重要标准,石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊具有明显的增加机体非特异性免疫功能;体液免疫方面:石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊 1580 mg/kg 组的小鼠组抗体生成细胞水平有明显提高,该胶囊可在一定程度上调节小鼠体液免疫功能,属于特异性免疫功能增强。

石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊是铁皮石斛、人参提取物、蝙蝠蛾拟青霉菌粉、干姜提取物为主要原料所制成,调节免疫功能作用的功效成分主要为人参皂甙、多糖和腺苷,以上实验结果与文献报道一致,陈星星等<sup>[16]</sup>研究表明铁皮石斛能有效协同脂多糖(LPS)和刀豆蛋白(ConA)水平促进免疫抑制小鼠脾 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞增殖;Liu 等<sup>[17]</sup>对 BALB/c 小鼠口服不同剂量的铁皮石斛及其多糖对巨噬细胞的吞噬能力有显著增强;滕伟卓<sup>[3]</sup>研究表明蝙蝠蛾拟青霉菌粉可增强小鼠机体非特异性免疫功能和使迟发型超敏反应加剧,使淋巴细胞转化率增加;人参皂苷 Rg1 及其代谢产物可在体内直接激活 T 细胞增殖、抑制活化状态的 T 细胞,并提高

巨噬细胞吞噬及释放 NO 的能力<sup>[18]</sup>;王华庆等<sup>[19]</sup>研究发现人参皂苷 Rg3 不仅能明显促进淋巴细胞的增殖,还可以提高自然杀伤细胞活性和 T 细胞亚群的活性水平<sup>[16]</sup>;人参多糖能够促进 T、B 淋巴细胞增殖,激活脾细胞<sup>[20]</sup>;有研究表明人参多糖除了能促进淋巴细胞增殖速度还能增强巨噬细胞的吞噬能力<sup>[21]</sup>;铁皮石斛、人参等复合配方产品的研究表明,其可提高机体的特异性和非特异性免疫功能<sup>[22-23]</sup>。

综上所述,石斛人参蝙蝠蛾姜胶囊具有免疫调节功能,主要功效与人参和铁皮石斛中的各种植物多糖、人参中皂甙、蝙蝠蛾拟青霉菌粉中腺苷有关。本次实验结果可为以后人参、铁皮石斛等中药材的开发和配方优化提供部分数据。

### 参考文献:

- [1] 肖开心,朱滢嘉,陈瑞,等. 田维毅铁皮石斛药理作用研究进展 [J]. 河南中医, 2020, 40(5): 788-792.
- [2] 许宇辉,梁慧春,杨征. 蝙蝠蛾拟青霉菌丝体抗小鼠力竭疲劳作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 351-357.
- [3] 滕伟卓. 蝙蝠蛾拟青霉菌株发酵工艺优化、菌粉质量标准及免疫活性研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2015.
- [4] 宋齐. 人参化学成分和药理作用研究进展 [J]. 人参研究, 2017, 29(2): 47-54.
- [5] 黄容容,钱颖,向明. 人参皂苷 Rh2 免疫调节作用研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(23): 2936-2939.
- [6] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版, 2015.
- [7] 亓雪,张颖颖. 干姜的化学、药理研究进展 [J]. 山东化工, 2018, 47(14): 41-42.
- [8] 钟礼云,林健,林蔚,等. 铁皮石斛西洋参软胶囊的遗传毒性研究 [J]. 海峡预防医学杂志, 2018, 24(5): 63-65.
- [9] 李志,黄俊明,杨颖,等. 人工蛹虫草子实体醇提物遗传毒性分析 [J]. 中国公共卫生, 2010, 26(9): 1168-1169.
- [10] 周博宇,孙兰,隋自洁,等. 蝙蝠蛾参鹿片亚急性毒性安全性评价 [J]. 医学动物防制, 2019, 35(4): 331-334, 338.
- [11] 周雯,唐慧,陈敏. 关于蝙蝠蛾拟青霉菌丝体安全性的实验研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(2): 420-421, 424.
- [12] 陈秀锦,黄佳宁,林蔚,等. 林云石斛西洋参含片的毒理学安全性研究 [J]. 海峡药学, 2018, 30(4): 34-37.
- [13] 孟庆龙,金莎,刘雅婧,等. 植物多糖药理功效研究进展 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 335-341.
- [14] 保健食品检验与评价技术规范(2003 年版) [M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2003.
- [15] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版, 2015.
- [16] 陈星星,李焰,杨小燕,等. 铁皮石斛对免疫抑制模型小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖的影响 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(4): 100-103.

- [17] Liu XF, Zhu J, Ge SY, et al. Orally administered *Dendrobium officinale* and its polysaccharides enhance immune functions in BALB/c mice [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(6): 867-870.
- [18] 王毅, 姜艳, 王本祥. 人参皂苷 Rg1 及其肠内菌代谢产物 Rh1 对小鼠免疫细胞功能的影响 [J]. *药学报*, 2002, 37(12): 927-929.
- [19] 王华庆, 张会来, 姚智, 等. 人参皂苷 Rg2 促进自体外周血干细胞移植后免疫重建的临床观察 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(6): 508-509.
- [20] Zhang SD, Yin YX, WEI Q. Immunopotential on murine spleen lymphocytes induced by polysaccharide fraction of *Panax ginseng* via upregulating calcineurin activity [J]. *APMIS*, 2010, 118(4): 288-296.
- [21] Ni W, Zhang X, Wang B, et al. Antitumor activities and immunomodulatory effects of ginseng neutral polysaccharides in combination with 5-fluorouracil [J]. *J Med Food*, 2010, 13(2): 270-277.
- [22] 邹思颖, 郑华, 黄聘和, 等. 铁皮石斛西洋参灵芝膏的免疫功能研究 [J]. *医学动物防制*, 2018, 34(6): 527-530.
- [23] 赵铮蓉, 吴月国, 滕士元, 等. 铁皮石斛复方制剂免疫调节作用的研究 [J]. *海峡药学*, 2017, 29(3): 47-48.

[收稿日期]2020-09-15

## 勘误声明

本刊对下述论文进行勘误:

出版信息	2021 年 31 卷 6 期, 页码为 83-89
论文标题	神曲消食口服液对功能性消化不良小鼠胃肠运动的影响及机制
稿次	<input type="checkbox"/> 录用定稿 <input type="checkbox"/> 排版定稿 <input type="checkbox"/> 整期定稿 <input checked="" type="checkbox"/> 印刷版 <input type="checkbox"/> 其它
作者	张丛敏, 朱晓静, 魏金铠, 李红亚, 李彩霞, 唐卉, 靳晨晨, 赵永才
DOI	10. 3969/ j. issn. 1671-7856. 2021. 06. 013
勘误内容	<p>文章引用处 原为: 张丛敏, 朱晓静, 魏金铠, 等. 神曲消食口服液对功能性消化不良小鼠胃肠运动的影响及机制 [J]. <i>中国比较医学杂志</i>, 2021, 31(6): 83-89. Zhang CM, Zhu XJ, Wei JK, et al. Effects and mechanism of Shenqu Xiaoshi oral liquid on gastrointestinal motility in mice with functional dyspepsia [J]. <i>Chin J Comp Med</i>, 2021, 31(6): 83-89.</p> <p>更改为: 张丛敏, 朱晓静, 魏金铠, 等. 神曲消食口服液对功能性消化不良小鼠胃肠运动的影响及机制 [J]. <i>中国比较医学杂志</i>, 2021, 31(6): 83-88. Zhang CM, Zhu XJ, Wei JK, et al. Effects and mechanism of Shenqu Xiaoshi oral liquid on gastrointestinal motility in mice with functional dyspepsia [J]. <i>Chin J Comp Med</i>, 2021, 31(6): 83-88.</p>
其他说明	

特此告知并诚挚地向读者致歉。

《中国比较医学杂志》编辑部  
日期: 2021 年 07 月 21 日

曹娟, 王士杰, 毕见龙. 白皮杉醇通过 MAPK/ERK 信号通路对急性重症一氧化碳中毒大鼠脑损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 85-92.

Cao J, Wang SJ, Bi JL. Role of the MAPK/ERK signaling pathway in the protective effect of piceatannol on rat brain damage by acute CO poisoning [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.013

## 白皮杉醇通过 MAPK/ERK 信号通路对急性重症 一氧化碳中毒大鼠脑损伤的保护作用

曹娟\*, 王士杰, 毕见龙

(北京大学国际医院急诊科, 北京 102206)

**【摘要】** **目的** 探究白皮杉醇通过调控 MAPK/ERK 信号通路对急性重症一氧化碳中毒大鼠脑损伤的作用机制。**方法** 取 100 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为四组, 其中三组于灌入 CO 气体处理箱中活动 1 h 制备急性 CO 中毒模型, 出箱后立即检测四组大鼠的 HbCO%, PIC 组采取 2 mL 200 mg/kg PIC 灌胃处理, PIC + ERK 组采取 2 mL 200 mg/kg PIC 和 0.2 mg/kg ERK 抑制剂 P-4313 共同处理, CO 组与 NC 组给予等体积生理盐水灌胃处理。分别于 1、7、14、21、28 d 后进行水迷宫实验, 实验结束后取四组大鼠脑组织进行 HE 染色观察、TUNEL 染色检测细胞凋亡情况、脑组织神经细胞超微结构观察、神经细胞线粒体膜电位检测、脑组织细胞氧化应激损伤指标检测、Western blot 检测 Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白的表达。**结果** 与 NC 组比较, CO 组和 PIC + ERK 组大鼠在水迷宫实验中学习和记忆表现下降, 脑组织细胞形态发生变化, 神经细胞超微结构受损, 凋亡细胞数目较多 ( $P < 0.001$ ), MFI 值明显下降 ( $P < 0.001$ ), ROS 含量增加 ( $P < 0.001$ ); 与 CO 组比较, PIC 组大鼠在行为实验中表现正常, 脑组织细胞形态未发生改变, 神经细胞超微结构完整, 凋亡细胞数目较少 ( $P < 0.001$ ), MFI 值与 ROS 含量较低 ( $P < 0.001$ ), Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白表达略增高。**结论** 白皮杉醇可能通过调控 MAPK/ERK 信号通路, 使 Nrf-2、Bcl-2 蛋白的表达量升高, 对急性 CO 中毒造成的脑损伤起到保护作用。

**【关键词】** 白皮杉醇; MAPK/ERK 信号通路; 急性一氧化碳中毒; 大鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0085-08

### Role of the MAPK/ERK signaling pathway in the protective effect of piceatannol on rat brain damage by acute CO poisoning

CAO Juan\*, WANG Shijie, BI Jianlong

(Department of Emergency Medicine, Peking University International Hospital, Beijing 102206, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of piceatannol (PIC) on rat brain damage caused by acute carbon monoxide (CO) poisoning through the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) pathway. **Methods** SPF male SD rats was randomly assigned to four groups (25 rats each group). Three groups were infused with CO gas for 1 hour to establish an acute CO poisoning model. The negative control (NC) group did not receive any CO. Following removal from the CO, the percent of carboxyhemoglobin (HbCO%) of the rats in all four groups was determined immediately. Subsequently, the PIC group received 2 mL 200 mg/kg PIC by intragastric administration, the PIC + ERK group was similarly treated with both 2 mL 200 mg/kg PIC and 0.2 mg/kg ERK inhibitor P-4313, and the CO and NC groups were treated with an equal volume of normal saline. A water maze experiment was performed after 1, 7, 14,

21 and 28 d. After completing this experiment, the brain tissues of all the animals were obtained for hematoxylin-eosin (HE) staining observation, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End labeling (TUNEL) staining to detect cell apoptosis, ultrastructure observation of neurons in brain tissue, detection of mitochondrial membrane potential, detection of the oxidative stress damage index of brain tissue cells, and Western blot detection of the nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf-2) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) proteins. **Results** In comparison with the NC group, rats in the CO and PIC + ERK groups displayed poorer learning and memory performance in the water maze experiment, the brain tissue cell morphology was changed, the ultrastructure of nerve cells was disrupted, the number of apoptotic cells was greater ( $P < 0.001$ ), the mean fluorescence intensity (MFI) value was significantly decreased ( $P < 0.001$ ) and the reactive oxygen species (ROS) content was elevated ( $P < 0.001$ ). In contrast with the CO group, rats in the PIC group were normal in the behavioral experiments and the brain tissue cell morphology did not change; furthermore, fewer apoptotic cells were found ( $P < 0.001$ ), the ultrastructure of nerve cells was intact, the MFI value and ROS content were lower ( $P < 0.001$ ), and the Nrf-2 and Bcl-2 protein expression were slightly increased. **Conclusions** PIC may increase Nrf-2 and Bcl-2 expression through the MAPK/ERK signaling pathway to protect against brain damage caused by acute carbon monoxide poisoning.

**【Keywords】** piceatannol; MAPK/ERK signaling pathway; acute carbon monoxide poisoning; rat

一氧化碳(carbon monoxide, CO)中毒是临床上常见的吸入性中毒事件之一<sup>[1]</sup>。CO中毒的致病机理是CO与血红蛋白结合,形成结构稳定的碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, HbCO),使血红蛋白无法结合氧分子,造成组织缺氧<sup>[2]</sup>。机体在短时间内吸入过量CO可致急性重症CO中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACOP),引起组织细胞损伤,其中对脑组织细胞的损害最严重<sup>[3]</sup>。它能引起多种严重并发症,尤其是急性脑损伤和迟发性脑病<sup>[4]</sup>。

丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是一个复杂的细胞内信号转导网络,参与调控细胞生长、分裂、分化、死亡等各个阶段的生理活动,对调节机体生理病理反应过程中起着重要作用<sup>[5]</sup>。其中细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路涉及生长和分化中不同受体的激活,参与细胞的增殖、分化、形态维持、骨架构建、细胞凋亡和癌变等多种生化反应<sup>[6-7]</sup>。然而,在已经不需要增殖和分化的成熟神经元细胞中仍有大量的ERK上游调控子和下游靶蛋白的存在,经研究发现,ERK与哺乳动物的学习和记忆过程有着紧密关系<sup>[8]</sup>。

白皮杉醇(piceatannol, PIC)也称比杉特醇,是一种多酚类化合物,化学名为3,3',4,5'-四羟基反式二丙烯,分子式为 $C_{14}H_{12}O_4$ 。PIC主要存在于葡萄、甘蔗、大黄、蓝莓及百香果等植物中<sup>[9]</sup>。PIC具有抗炎、抗氧化活性,清除自由基的作用<sup>[10]</sup>。根据已有研究报道<sup>[11]</sup>,PIC可抑制脑细胞凋亡发挥对缺血缺氧性脑组织损伤大鼠大脑具有保护作用。本研究旨在通过MAPK信号通路揭示PIC对一氧化碳中毒大鼠脑损伤的保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠100只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011],45周龄,体重为 $(220 \pm 20)$ g,饲养于本院动物实验中心[SYXK(京)2016-0044],饲养室保持良好通风,饲养环境温度 $(25 \pm 2)$ ℃,湿度 $(50 \pm 10)\%$ ,12h昼夜周期。正常饲养1周以适应环境,第2周开始进行实验,使用大鼠时严格按照3R原则给予人道关怀。动物实验按照本院动物管理委员会(IACUC2018001)的规定执行,并已通过北京大学国际医院实验动物伦理与管理委员会审批(20190508001)。

### 1.2 主要试剂与仪器

PIC购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(批号:10083-24-6);ERK1/2通路抑制剂 $(500 \mu\text{mol/L})$ 购自美国Sigma公司;HE染色试剂盒和TUNEL染色试剂盒购自南京凯基生物有限公司;ROS检测试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;Western blot试剂盒购自美国BD公司。

处理箱(订制90L容积的亚克力材质密封箱体,箱侧壁存在可密封的进气口和出气口,箱内装有CO检测仪);99.99%CO气体购自西南化工研究所;血气分析仪购自德国拜耳公司;Morris水迷宫及分析跟踪系统由首都医科大学宣武医院实验动物室提供;线粒体提取试剂盒及膜电位检测试剂盒购自北京Solatbio Sciences & Technology有限公司;光学显微镜;透射电子显微镜(日产JEM-1230)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组及急性 CO 中毒动物模型制备

饲养的第 8 天,将 100 只大鼠随机分为四组:空白对照组(NC 组)、ACOP 模型组(CO 组)、ACOP 模型采用 PIC 处理组(PIC 组)和 ACOP 模型采用 PIC 和 ERK 抑制剂同时处理组(PIC + ERK 组),每组各 25 只。除 NC 组外,其余各组大鼠根据文献<sup>[3]</sup>描述制备 ACOP 大鼠模型。将大鼠置于 90 L 的处理箱中,持续吸入浓度为 1000 ppm 的 CO 气体 20 min,CO 浓度升高至 2000 ppm,持续吸入 20 min,随后 CO 气体浓度升高至 3000 ppm,大鼠在箱中持续吸入气体 20 min 后,转移至箱外呼吸空气。NC 组大鼠在处理箱中持续吸入空气 60 min。制模过程中观察大鼠的行为状态,出箱后立即从大鼠左侧股动脉抽取 0.3 mL 的全血,使用血气分析仪采用微量定量法检测血液中碳氧血红蛋白浓度(CO<sub>Hb</sub>%)。

#### 1.3.2 给药方法

制备模型后,NC 组与 CO 组大鼠正常饲养;PIC 组大鼠给予 200 mg/kg PIC 灌胃,灌胃剂量 2 mL,每天 1 次,共 33 d;PIC + ERK 组大鼠给予 200 mg/kg PIC 和 0.2 mg/kg ERK 抑制剂灌胃,灌胃剂量 2 mL,每天 1 次,共 33 d;NC 组与 CO 组灌胃等量生理盐水。

#### 1.3.3 Morris 水迷宫实验

四组大鼠处理后于第 2 天进行 Morris 水迷宫实验,6 d 为一个实验周期,水迷宫实验包括定位航行和空间探索两个阶段<sup>[12-14]</sup>。定位航行实验共进行 5 次,每次 5 d,每天训练 4 次;每次更换入水点,大鼠找到平台后或 120 s 内找不到平台,拿上平台,休息 15 s 后进行下一次训练,记录四组大鼠逃避潜伏期,计算每组大鼠每次实验得到逃避潜伏期的平均值。空间探索实验在定位航行实验结束后 1 d 进行,撤去原平台,所有大鼠从同一入水点放入水中,记录大鼠在 120 s 内穿越平台次数。逃避潜伏期和穿越平台次数取一个实验周期内得到的平均值。

#### 1.3.4 脑组织标本制备

制备模型后 33 d,四组大鼠进行完空间探索实验后,每组大鼠随机取 10 只,其中每组 5 只用 4% 苯巴比妥钠深度麻醉后,从左心室灌注 200 mL 的生理盐水和 4% 多聚甲醛,取脑,放入 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 48 h,脱水,石蜡包埋,冠状位连续切片,厚度 6 μm,用于 HE 染色和 TUNEL 染色。剩余大鼠取

脑,冰面上分离海马区,-80℃ 保存,用于线粒体的提取、神经元超微结构观察、ROS 含量检测、Western blot 实验。

#### 1.3.5 HE 染色检测大鼠脑组织形态

将四组大鼠脑组织石蜡切片依次脱蜡,水化,经苏木素-伊红染色,脱水,二甲苯透明,干燥,中性树脂封片,光学显微镜下观察大鼠脑组织海马区细胞形态并拍摄照片。

#### 1.3.6 TUNEL 染色检测大鼠细胞凋亡

将四组大鼠脑组织石蜡切片脱蜡至水,加入蛋白酶 K 工作液,37℃ 孵育 20 min,加入 TUNEL 反应液湿盒 37℃ 避光孵育 1 h,PBS 洗涤,DAB 显色 10 min,苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片。每张切片随机选取互不重叠的 3 个视野,于 400 倍镜下通过 Lasersharp 2000 软件进行图像采集,颗粒状绿色深染的细胞为 TUNEL 阳性细胞,观察并记录图片中阳性细胞数。

#### 1.3.7 离体神经元超微结构观察

取四组大鼠海马区齿状回平面切组织块样本,放入 4% 的戊二醛溶液中固定,环氧乙烷处理,环氧树脂包埋,包埋的组织样本进行超薄切片,枸橼酸铅染液染色,水洗,通过透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)观察切片并拍摄照片。

#### 1.3.8 流式细胞仪检测线粒体膜电位

用线粒体提取液分离并纯化线粒体,然后添加 5 倍稀释的 JC-1 染料工作液,阴性对照切片以 PBS 代替荧光染料。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的变化采用流式细胞仪的 cflowplus 软件分析系统。每个实验重复 10 次,取每组所有样本 MMP 相对值的平均值,用平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)表示。

#### 1.3.9 活性氧试剂盒检测四组大鼠 ROS 水平

取 500 g 脑组织的细胞匀浆液,12000 r/min 离心 30 min,弃上清液,加入 10 μmol/L 的 DCFH-DA,移液枪吹打混匀,使细胞悬浮于 DCFH-DA 中,在 37℃ 的细胞培养箱内孵育 20 min,每 3 min 颠倒混匀,使试剂与细胞完全接触,无血清培养基洗涤 3 次后悬浮于 PBS 溶液中,使用流式细胞仪在 488 nm 激发波长,525 nm 处检测样品的荧光强度。

#### 1.3.10 Western blot 分析 Nrf-2 及 Bcl-2 蛋白表达

将海马区称重后加入 7 mL/g 脑组织的裂解液制备脑组织匀浆液,在 4℃ 下 1200 r/min 离心 30 min,

置于冰上裂解 30 min, 取上清液, 采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白定量检测, 加入样品得到 1X 蛋白上样缓冲液, 混匀, 95°C 下变性 10 min。按 Western blot 法<sup>[9]</sup>检测 Nrf-2、Bcl-2 蛋白表达水平, 加入待测样品进行电泳, 转膜, 封闭 1 h, 按照抗体说明书进行一抗孵育过夜, 加入二抗显色, 成像。采用 Image J 软件进行灰度值分析, 每一条蛋白条带以自身  $\beta$ -actin 作为内参进行灰度校正。

#### 1.4 统计学方法

用 Graphpad 5.0 软件分析实验数据, 定量数据用平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 实验数据进行正态性和方差性检验, 逃避潜伏期和穿越平台次数比较采用重复测量资料的方差分析, 海马区 Nrf-2、Bcl-2 的表达采用单因素方差分析进行组间比较, 两两比较采用 LSD 法,  $P<0.05$  表示差异显著, 结果具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠急性 CO 中毒模型制备后行为表现及血液 COHb% 检测结果

处理箱内 CO 浓度为 2000 ppm 条件下, CO 组、PIC 组和 PIC + ERK 组大鼠在 5~15 min 内表现为兴奋躁动, 15 min 后表现为呼吸急促。CO 浓度升高至 3000 ppm 后, 大鼠出现四肢抽搐, 大小便失禁, 口、鼻、耳、四肢及尾部皮肤呈现樱桃红色, 随后四肢无力甚至昏迷。昏迷大鼠出箱后吸入空气, 逐渐恢复活动, 制模过程无大鼠退出实验。处理后, CO 组、PIC 组和 PIC + ERK 组大鼠血液中 COHb% 均大于 40%, NC 组大鼠无上述表现, 血液中 COHb% 小于 5%, 表明 ACOP 大鼠模型制备成功, 四组大鼠 COHb% 的比较见图 1。

### 2.2 各组大鼠 Morris 水迷宫实验观察比较

处理后 1~6 d Morris 水迷宫实验结果无显著性差异; 处理后 14~33 d, 随着病程延长, CO 组和 PIC

+ ERK 组平均逃避潜伏期逐渐延长, 穿越平台次数逐渐减少, 与 NC 组比较有显著差异 ( $P<0.001$ )。处理后 14~33 d, PIC 组与同期 CO 组和 PIC + ERK 组比较, 平均逃避潜伏期缩短, 跨越平台次数明显增多 ( $P<0.001$ ), 与 NC 组比较, 21~28 d 定位航行实验差异显著 ( $P<0.05$ ), 空间探索实验无显著差异 ( $P>0.05$ )。结果见表 1、表 2。

### 2.3 PIC 对大鼠脑组织形态的影响

四组大鼠海马区脑组织 HE 染色观察结果如下: NC 组细胞形态结构正常; CO 组细胞结构疏松; PIC 组结构较紧密; PIC + ERK 组细胞形态与 CO 组相近。PIC 处理后, PIC 组大鼠的脑组织细胞的形态结构没有明显的病理性变化 (见图 2)。

### 2.4 大鼠脑组织神经细胞超微结构观察比较

四组大鼠脑组织神经细胞超微结构观察结果 (见图 3): NC 组, 大鼠脑组织的海马区神经细胞轮廓清晰, 染色质均匀分布, 胞质清晰, 双层细胞核膜清晰完整, 胞浆内线粒体结构完整, 数量较多, 未出现空泡。CO 组和 PIC + ERK 组细胞核出现固缩, 线粒体肿胀, 嵴断裂或者变少, 甚至细胞水肿出现空泡化。PIC 组细胞轮廓较为清晰, 染色质均一, 线粒体形态规则。

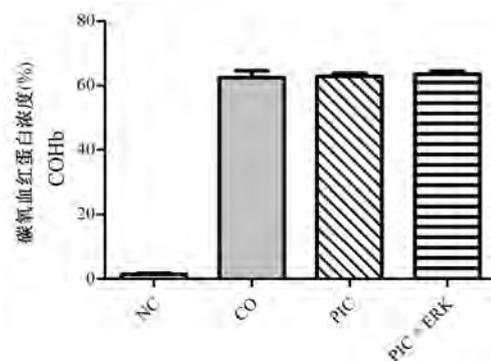


图 1 四组大鼠血液中 COHb% 比较 ( $n=25$ )

Figure 1 Comparison of COHb% in blood among four groups of rats

表 1 四组大鼠定位航行实验结果统计 ( $n=25$ )

Table 1 Statistics results of the place navigation experiments among four groups of rats

逃避潜伏期 (s) Escape latency	1~5 d	7~12 d	14~19 d	21~26 d	28~32 d
NC	12.37 $\pm$ 1.99	13.52 $\pm$ 3.31	12.21 $\pm$ 1.77	12.37 $\pm$ 1.92	12.17 $\pm$ 1.17
CO	15.44 $\pm$ 1.31	22.27 $\pm$ 2.80	59.01 $\pm$ 6.75 <sup>***</sup>	68.08 $\pm$ 3.05 <sup>***</sup>	79.24 $\pm$ 5.03 <sup>***</sup>
PIC	14.77 $\pm$ 1.54	18.27 $\pm$ 4.37	19.79 $\pm$ 3.65 <sup>###</sup>	23.08 $\pm$ 1.25 <sup>***</sup>	26.91 $\pm$ 1.37 <sup>**###</sup>
PIC + ERK	15.09 $\pm$ 1.16	21.95 $\pm$ 2.57	56.48 $\pm$ 5.99 <sup>***</sup>	68.85 $\pm$ 3.59 <sup>***</sup>	78.92 $\pm$ 6.17 <sup>***</sup>

注: 与 NC 组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; 与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ 。

Note. Compared with NC group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . Compared with CO group and PIC + ERK group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ .

表 2 四组大鼠空间探索实验结果统计( $n=25$ )

Table 2 Statistics results of the spatial probe experiments among four groups of rats

穿越平台次数(次) Crossing platform times	6 d	13 d	20 d	27 d	33 d
NC	41.50 ± 3.54	41.00 ± 2.83	40.00 ± 2.83	39.50 ± 2.12	40.50 ± 2.12
CO	24.50 ± 4.95*	23.50 ± 4.95**	16.00 ± 1.41***	11.00 ± 4.24***	9.50 ± 3.54***
PIC	30.50 ± 9.19	26.00 ± 5.66*	35.00 ± 8.49###	29.00 ± 5.66###	29.00 ± 4.24###
PIC + ERK	27.00 ± 7.07*	24.50 ± 4.95*	17.00 ± 1.41***	11.00 ± 2.83***	10.00 ± 4.24***

2.5 四组大鼠脑组织细胞凋亡情况比较

TUNEL 染色结果见图 4, NC 组 TUNEL 阳性细胞数量少, 而 CO 组和 PIC + ERK 组有大量绿染 TUNEL 阳性细胞, PIC 组有少量 TUNEL 阳性细胞。四组阳性细胞计数结果见表, CO 组和 PIC + ERK 组显著高于 NC 组和 PIC 组( $P < 0.001$ )。

2.6 四组大鼠脑组织海马区神经细胞线粒体膜电位改变

NC 组大鼠脑组织海马区中 MFI 值维持较高水平, 表明其神经细胞线粒体功能完整。CO 组和 PIC + ERK 组大鼠 MFI 值显著低于 NC 组, 差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ), 说明 CO 组和 PIC + ERK 组大鼠对的神经细胞中线粒体损伤严重。PIC 组大鼠 MFI 值较 CO 组和 PIC + ERK 组高, 且差异显著( $P < 0.001$ ), 低于 NC 组, 表明经过 PIC 对 CO 中毒后大鼠的神经细胞有一定程度的保护作用。见图 5。

2.7 四组大鼠海马区氧化应激损伤指标检测

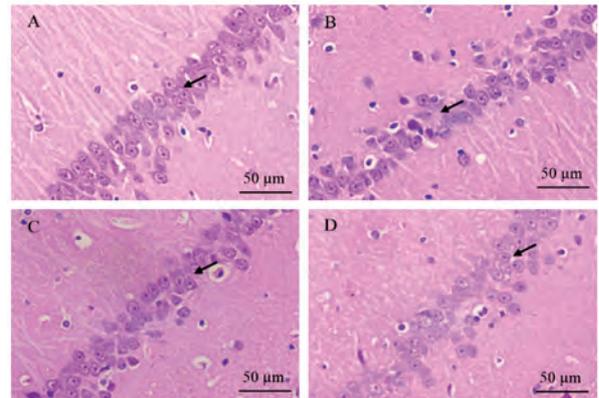
与 NC 组比较, CO 组和 PIC + ERK 组海马区 ROS 含量明显升高, 差异显著( $P < 0.01$ )。PIC + ERK 组的 ROS 含量与 CO 组接近, 差异不显著( $P > 0.05$ )。PIC 组与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ROS 含量下降, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 6。

2.8 Nrf-2 及 Bcl-2 蛋白在大鼠脑组织海马区中的表达变化

Western blot 结果显示, Nrf-2、Bcl-2 蛋白的表达在四组大鼠间无显著差异( $P > 0.05$ ), PIC 组相对于 NC 组、CO 组、PIC + ERK 组, 大鼠脑组织海马区中 Nrf-2、Bcl-2 蛋白的表达水平上升。见图 7。

3 讨论

ACOP 主要是由组织持续缺氧引发的<sup>[15]</sup>。在哺乳动物的各器官系统中, 以脑神经元细胞对缺氧最为敏感, 缺血缺氧都易造成脑损伤甚至细胞死亡, 从而引起机体出现学习、记忆机能减退等表现<sup>[16]</sup>。ACOP 造成脑损伤, 致死率高, 治疗难度大<sup>[17]</sup>。目前常用的治疗手段是高压氧治疗, 能有效改善急性期中毒患者组织缺氧的情况, 减轻中毒



注: A: NC 组; B: CO 组; C: PIC 组; D: PIC + ERK 组。下同。

图 2 四组大鼠脑组织 HE 染色形态观察结果( $n=25$ )

Note. A, NC group. B, CO group. C, PIC group. D, PIC + ERK group. The same as below.

Figure 2 Results of HE staining in brain tissues among four groups of rats

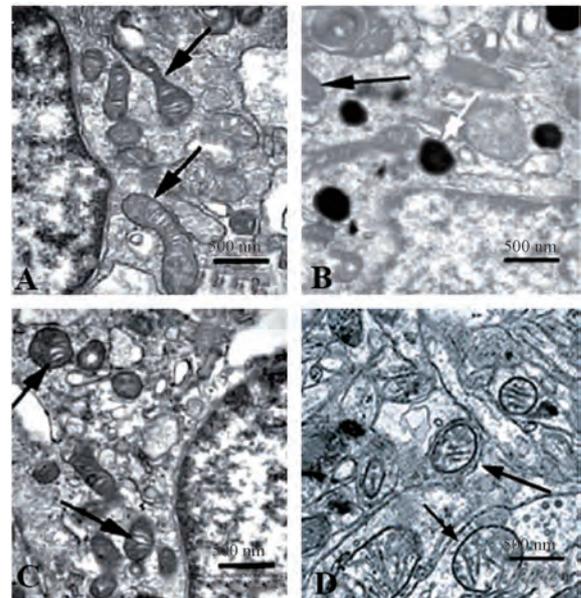
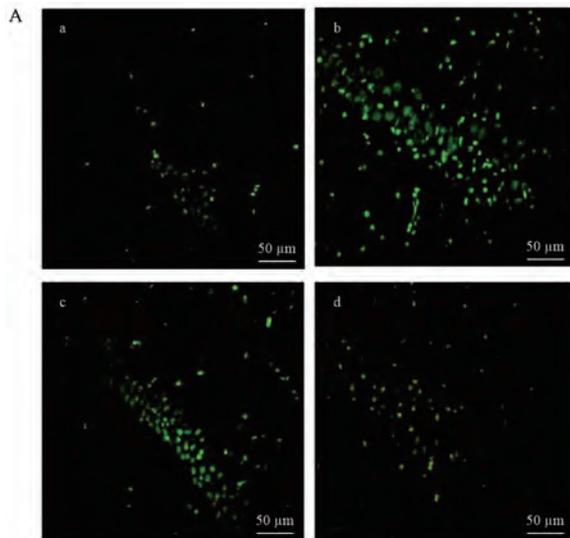


图 3 四组大鼠神经元细胞超微结构观察

Figure 3 Observation of ultra-structure of neuron among four groups of rats

症状。但是该疗法对重症患者和迟发性脑病患者的治疗效果有限<sup>[3]</sup>。寻找新的治疗手段是目前相关学者研究的重点。已有研究认为急性 CO 中毒引起脑损伤的机制有: (1) 血液和组织的缺氧性损伤



注:A:TUNEL 染色荧光检测 B:四组大鼠凋亡细胞结果统计柱形图。与 NC 组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ### $P < 0.001$ 。

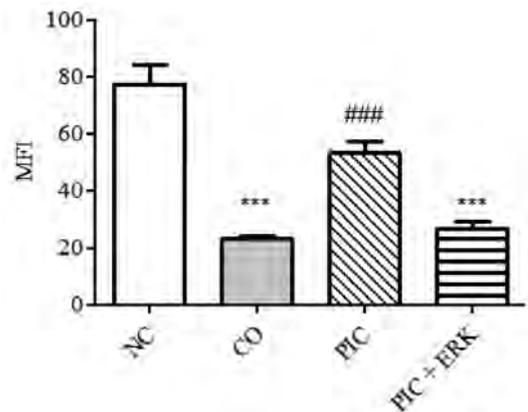
图 4 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况( $n = 25$ )

Note. A, Representative images from four groups of rats. B, Comparison of apoptotic cell among four groups of rats. Compared with NC group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with CO group and PIC + ERK group, ### $P < 0.001$ .

Figure 4 TUNEL staining in brain of rats

及随之产生的氧化应激反应<sup>[4,17-18]</sup>; (2) 神经炎症反应<sup>[15]</sup>; (3) 线粒体介导神经细胞凋亡<sup>[4]</sup>。而脑组织中海马区参与机体的学习和记忆过程,对空间定位起到了重要作用,并且对于组织缺氧造成的损伤十分敏感。已有研究表明, PIC 对于治疗神经细胞损伤有一定疗效<sup>[11]</sup>。Morris 水迷宫实验是国内外常用的检测大鼠空间学习记忆能力的实验<sup>[14]</sup>。

本研究对 CO 组、PIC 组和 PIC+ERK 组大鼠制备 ACOP 模型,结果显示三组大鼠血液中 COHb% 均  $> 40\%$ ,明显高于 NC 组大鼠,说明大鼠 ACOP 模型制备成功。随后进行 5 次 Morris 水迷宫实验检测



注:与 NC 组比较, \*\*\* $P < 0.001$ ;与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ### $P < 0.001$ 。

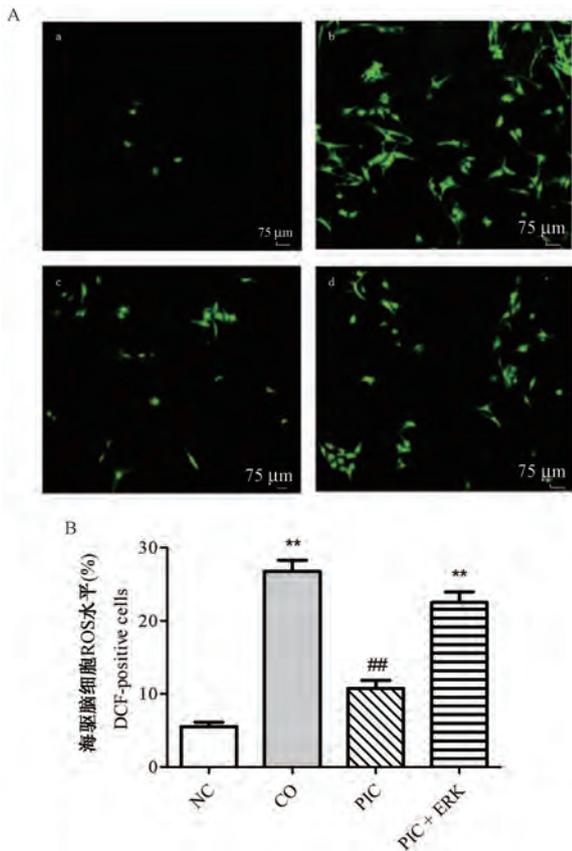
图 5 四组大鼠脑组织神经细胞 MFI 值比较( $n = 25$ )

Note. Compared with NC group, \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with CO group and PIC + ERK group, ### $P < 0.001$ .

Figure 5 Comparison of MFI value in neuron among four groups of rats

CO 的毒性对于大鼠学习记忆能力的影响,结果显示经过 PIC 治疗 14~33 d, PIC 组大鼠定位航行实验的平均逃避潜伏期明显低于 CO 组大鼠 ( $P < 0.05$ ),与 NC 组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );空间探索实验中 PIC 组大鼠跨越平台次数明显高于 CO 组大鼠 ( $P < 0.05$ ),与 NC 组无显著差异 ( $P > 0.05$ ),表明经过 PIC 处理的大鼠空间学习和记忆能力较未用药物处理的模型大鼠有明显恢复。王鲲鹏等<sup>[17]</sup> 研究结果显示进行 Morris 水迷宫实验 CO 中毒的模型组大鼠的逃避潜伏期较干预组和对照组明显延长,本研究结果与之相符。在行为实验观察结束后,对四组大鼠的脑组织细胞形态、凋亡情况等进行了观察,比较不同处理的大鼠脑组织细胞的生理结构变化,结果显示 PIC 处理的大鼠,脑细胞形态与对照组相近,无明显的病理结构变化,凋亡细胞数目明显少于 CO 组大鼠 ( $P < 0.05$ ),说明 PIC 对急性 CO 中毒大鼠的脑损伤情况起到了保护作用。本研究将进一步探讨 PIC 对于由 CO 中毒引起的脑损伤的保护机制。

线粒体膜在细胞凋亡的起始过程中起到重要作用<sup>[3,19]</sup>。线粒体膜电位的降低导致膜孔道的开放,使内膜及外膜的离子对流,造成呼吸链异常,进而使得线粒体功能受损<sup>[16]</sup>。线粒体功能障碍使得细胞中氧自由基增多,ROS 含量增加,形成氧自由基连锁反应,破坏生物膜及其功能,造成细胞损伤及凋亡<sup>[19]</sup>。线粒体介导的细胞凋亡在氧化应激的



注:A:ROS 荧光检测结果;B:四组大鼠海马区脑细胞 ROS 水平柱形图。与 NC 组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与 CO 组和 PIC + ERK 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 四组大鼠海马区氧化应激损伤 ( $n = 25$ )

Note. A, Fluorescence detecting results of ROS. B, Comparison of DCF-positive cells to show ROS level in hippocampus among four groups of rats. Compared with NC group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with CO group and PIC + ERK group, ## $P < 0.01$ .

Figure 6 Oxidative stress level detection in hippocampus among four groups of rats

生理过程中发挥着重要作用。本研究对四组大鼠神经元细胞超微结构的观察与线粒体膜电位的检测,可以看出未经药物处理的模型大鼠神经细胞中线粒体结构受到严重破坏,CO 组大鼠与 NC 组比较,线粒体膜电位明显下降,细胞中 ROS 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ),该结果与已有研究一致<sup>[3]</sup>。而采用 PIC 灌胃处理的大鼠,线粒体结构较为完整,与 CO 组比较,MMP 下降程度低,对线粒体功能影响较小,细胞中 ROS 含量较低 ( $P < 0.05$ ),说明 PIC 可能对于 CO 造成的线粒体结构损伤起到了保护作用。

Bcl-2 蛋白是目前最受关注的凋亡相关蛋白,分布于线粒体膜、内质网和核膜孔周围<sup>[16,20]</sup>。已有研究报道,细胞受损情况与细胞中 ERK 通路的激活情

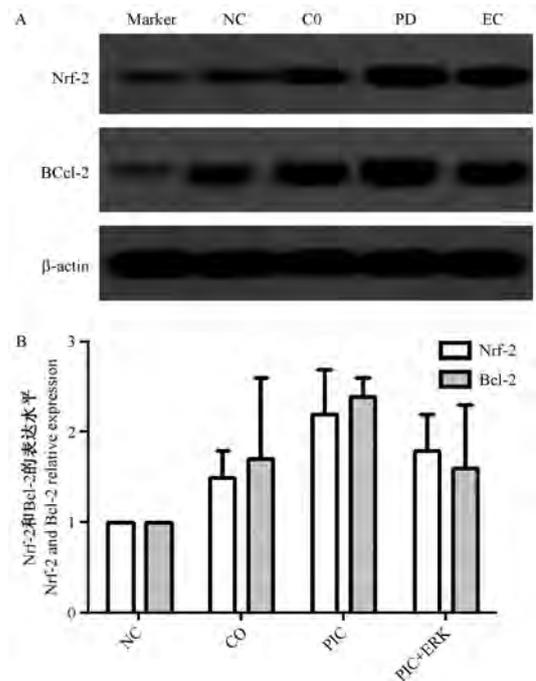


图 7 Western blot 检测 Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白表达水平 ( $n = 25$ )

Figure 7 Relative expression of Nrf-2 and Bcl-2 protein detected by Western blot in brain tissue among four groups of rats

况相关,通过激活 ERK 信号通路,能诱发下游细胞信号分子 Bcl-2 的表达,从而抑制细胞凋亡<sup>[5]</sup>。PIC 抑制细胞凋亡,减轻脑损伤与 MAPK/ERK 信号通路有关<sup>[10]</sup>。通过实验证明,激活 ERK 信号通路可以上调 Nrf-2 蛋白的表达<sup>[20-22]</sup>。根据研究报道,CO 中毒后,人为诱导 Nrf-2 过表达能发挥其抗氧化机制<sup>[3]</sup>。Nrf-2 能被多种外源物质诱导,是常用抗氧化应激治疗的靶向位点。PIC 已被证明通过上调 Nrf-2 蛋白的表达水平有助于缓解细胞的炎症反应和氧化应激反应,对组织损伤起到保护作用<sup>[9,23]</sup>。在本研究中,与 CO 组大鼠相比,PIC 处理的大鼠 Nrf-2 和 Bcl-2 的表达量增加 ( $P < 0.05$ ),同时采用 PIC 和 ERK 抑制剂处理模型大鼠相较于 NC 组大鼠,其学习记忆能力下降明显,脑组织细胞形态异常,神经细胞凋亡数目较多,超微结构受到损害,MMP 值显著下降,ROS 含量上升,Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白的表达下降 ( $P < 0.05$ ),说明 PIC 可能通过激活 ERK 信号通路,使 Nrf-2、Bcl-2 蛋白过表达,来保护线粒体结构的完整,抑制氧化应激反应。

基于以上结果推测,PIC 可能通过调控 MAPK/ERK 信号通路,上调 Nrf-2 和 Bcl-2 蛋白的表达,有效保护了大鼠脑组织,防止急性重症 CO 中毒引起的损害。

## 参考文献:

- [ 1 ] Li Q, Bi MJ, Bi WK, et al. Edaravone attenuates brain damage in rats after acute CO poisoning through inhibiting apoptosis and oxidative stress [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(3): 372-379.
- [ 2 ] Wang L, Xu JH, Guo DD, et al. Fasudil alleviates brain damage in rats after carbon monoxide poisoning through regulating neurite outgrowth inhibitor/oligodendrocyte myelin glycoprotein signalling pathway [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, 125(2): 152-165.
- [ 3 ] 周谓栋, 丁晓瑜, 王利, 等. 靶向调节 Nrf2 基因对急性重症一氧化碳中毒大鼠脑损伤的神经保护作用 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2018, 27(10): 870-876.
- [ 4 ] 丁晓瑜, 王利, 毕伟康, 等. 莱菔硫烷对急性一氧化碳中毒大鼠脑组织神经细胞线粒体损伤的治疗作用 [J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2018, 25(4): 213-219.
- [ 5 ] 李峥, 高项羽, 刘喆, 等. 丙泊酚通过 MAPK/ERK 信号通路对谷氨酸诱导的神经 PC12 细胞损伤的抑制作用 [J]. *中国药房*, 2016, 27(1): 61-63.
- [ 6 ] 薛战尤, 王安海, 赵元, 等. 芹芥酚通过 MAPK/ERK 信号通路对缺血再灌注后脑损伤大鼠的保护作用 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(23): 2473-2476.
- [ 7 ] 房祥杰, 张彬, 张德重, 等. 迷迭香酸通过 MAPK/ERK 信号通路对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(4): 306-310.
- [ 8 ] 郁迪, 莫绪明. PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路在缺血性脑损伤中的保护作用 [J]. *医学综述*, 2015, 21(2): 210-213.
- [ 9 ] 姚重阳. 白皮杉醇通过调控 Nrf2 抑制 NLRP3 炎性体激活减轻高糖诱导的足细胞损伤 [D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [ 10 ] 杜倩, 侯旭, 李剑波, 等. 白皮杉醇对青光眼大鼠视网膜神经节细胞的保护作用 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37(6): 527-530, 547.
- [ 11 ] 任应国, 张保朝, 贾东佩, 等. 白皮杉醇对急性脑出血大鼠的保护作用及其机制 [J]. *中华高血压杂志*, 2018, 26(3): 271-275.
- [ 12 ] 余群星. 基于 Morris 水迷宫学习记忆方法的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2015.
- [ 13 ] 杨玉洁, 李玉姣, 李杉杉, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12): 129-134.
- [ 14 ] 胡小东, 关浩, 杨立山. Morris 水迷宫在筛选急性 CO 中毒迟发性脑病模型中的应用 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(1): 25-29.
- [ 15 ] 雷蕊琦, 蒋力, 辜刚凤, 等. 虾青素对急性一氧化碳中毒大鼠海马 NF- $\kappa$ B 炎症信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(12): 1064-1069.
- [ 16 ] 胡尧. 红景天对缺氧脑损伤的保护作用及其神经元线粒体 MPTP 机制的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [ 17 ] 王鲲宇, 唐圣桃, 邱峰, 等. 正丁基苯酚对急性一氧化碳中毒大鼠脑组织氧化应激的调节及其机制的实验研究 [J]. *北京医学*, 2019, 41(5): 54-57.
- [ 18 ] 马竞, 何文龙, 高重阳, 等. 盐酸小檗碱对脂多糖诱导的大鼠急性脑损伤后脑组织形态学和 NF- $\kappa$ B 活性的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(21): 2582-2586.
- [ 19 ] 李梦. 3-巯基丙酮酸硫转移酶产生的 H<sub>2</sub>S 对大鼠脑血管张力和其内皮细胞缺氧性损伤的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [ 20 ] Bai ZF, Wang ZJ. Genistein protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity through Nrf-2/HO-1 signaling in mice model [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(5): 645-651.
- [ 21 ] 向绍通, 徐书雯, 肖豪, 等. 栀子苷通过 ERK1/2-Nrf2 通路发挥对 A $\beta$ 25-35 诱导的阿尔兹海默病大鼠模型的神经保护作用 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(1): 27-32, 37.
- [ 22 ] Yu Y, Shen Q, Lai Y, et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in microglial cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 386.
- [ 23 ] 赵伟, 李瑾, 朱向东, 等. 血红素氧合酶-1 在糖尿病大鼠视网膜中的表达及意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(20): 5035-5038.

[ 收稿日期 ] 2020-08-26

卓然然, 聂明朝, 李丽红, 等. 过氧化氢诱导大鼠离体子宫韧带成纤维细胞的相关变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 93-99.

Zhuo RR, Nie MC, Li LH, et al. Hydrogen peroxide induced changes of rat uterine ligament fibroblasts *in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 93-99.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.014

## 过氧化氢诱导大鼠离体子宫韧带成纤维细胞的相关变化

卓然然, 聂明朝\*, 李丽红, 李常虹, 张芳芳

(海南省妇女儿童医学中心(海南省妇幼保健院)妇产科, 海口 571100)

**【摘要】** **目的** 探讨氧化应激对子宫韧带成纤维细胞增殖、凋亡、胶原合成以及炎症因子表达的影响及可能机制。**方法** 将生长状况良好的第3代大鼠子宫韧带成纤维细胞分为低氧化应激组、高氧化应激组、对照组。选择0.2 mmol/L和0.8 mmol/L过氧化氢对子宫韧带成纤维细胞干预4 h, 建立细胞低水平和高水平的氧化应激模型, 对照组未进行任何干预。采用MTT法检测细胞增殖能力, Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡情况, Western blot法检测I型胶原、III型胶原、炎症因子、信号通路相关蛋白的表达的蛋白水平。**结果** 与对照组和低氧化应激组相比, 高氧化应激组细胞增殖能力下降( $P < 0.05$ ), 凋亡率上升( $P < 0.05$ ), I型胶原、III型胶原合成明显减少( $P < 0.05$ ), 白细胞介素 $1\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白细胞介素6的蛋白表达水平增加( $P < 0.05$ ); 与对照组和低氧化应激组相比, 高氧化应激组p-ERK1/2、p-Akt的表达明显降低( $P < 0.05$ ), 而总蛋白ERK1/2、Akt的表达基本保持不变。低氧化应激组上述指标与对照组无显著差异。**结论** 氧化应激微环境中较高浓度的过氧化氢通过抑制MAPK通路中ERK1/2表达和PI3K-Akt通路中Akt表达, 引起子宫韧带成纤维细胞的增殖、胶原合成能力下降, 凋亡细胞和炎症因子表达增多, 参与盆腔器官脱垂的发生发展。

**【关键词】** 盆腔器官脱垂; 氧化应激; 韧带; 成纤维细胞; 细胞凋亡; 胶原; 炎症因子; 大鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0093-07

### Hydrogen peroxide induced changes of rat uterine ligament fibroblasts *in vitro*

ZHUO Ranran, NIE Mingchao\*, LI Lihong, LI Changhong, ZHANG Fangfang

(Hainan Women and Children's Medical Center (Hainan Maternal and Child Health Hospital), Haikou 571100, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of oxidative stress on human uterine ligament fibroblast proliferation, apoptosis, collagen synthesis and expression of inflammatory factors. **Methods** Third generation rat uterine ligament fibroblasts were divided into low oxidative stress, high oxidative stress and control groups. Hydrogen peroxide at 0.2 mmol/L and 0.8 mmol/L was applied to uterine ligament fibroblasts for 4 h to establish low and high level oxidative stress models, respectively. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cell proliferation, the Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (V-FITC/PI) method was applied to detect apoptosis, and Western blot was used to detect the protein levels of type I collagen, type III collagen, inflammatory factors and signal pathway-related

[作者简介] 卓然然(1986—), 女, 主治医师, 研究方向: 妇科基础与临床方面的研究。E-mail: zrr13876246071@163.com

[通信作者] 聂明朝(1970—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 妇科基础与临床方面的研究。E-mail: niemc@163.com

proteins. **Results** Compared with the control and low oxidative stress groups, the proliferation ability of cells in the high oxidative stress group was decreased ( $P < 0.05$ ), the apoptosis rate was increased ( $P < 0.05$ ), the synthesis of type I and type III collagen was decreased ( $P < 0.05$ ), and the protein expression levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and IL-6 were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control and low oxidative stress groups, phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and phosphorylated-protein kinase B (Akt) expression in the high oxidative stress group was decreased ( $P < 0.05$ ), whereas the expression of total protein ERK1/2 and Akt remained almost unchanged. There were no significant difference between the low oxidative stress and control groups. **Conclusions** A high hydrogen peroxide concentration in an oxidative stress microenvironment can inhibit ERK1/2 expression in the MAPK pathway and Akt expression in the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway, **Results** in decreased uterine ligament fibroblast proliferation and collagen synthesis and increased expression of apoptotic cells and inflammatory factors, which may participate in the occurrence and development of pelvic organ prolapse.

**【Keywords】** pelvic organ prolapse; oxidative stress; ligament; fibroblast; apoptosis; collagen; inflammatory factors; rat

盆底功能障碍性疾病是中老年女性的常见病,主要是由于损伤、衰老等原因导致盆底组织结构发生病理改变,最终发生盆腔器官位置异常及相应器官功能障碍,是影响女性身心健康和生活质量的一个重要公共问题<sup>[1-2]</sup>。该病包括盆腔器官脱垂 (pelvic organ prolapse, POP) 和压力性尿失禁。女性盆腔器官和盆底组织处于妊娠、分娩等引起腹内压力变化的复杂生物力学环境中,容易损伤盆底肌肉筋膜及子宫韧带,或因其他原因导致其张力减低,支持功能薄弱,使腔内器官下降移位,即为盆底器官脱垂<sup>[3-4]</sup>。有研究显示,POP 的发生还与氧化应激相关<sup>[5]</sup>,Kim 等<sup>[6]</sup>对盆底组织基因组多态性的研究发现,氧化应激相关基因与 POP 相关。

成纤维细胞是子宫韧带的主要细胞,也是盆底韧带的主要受力细胞,主要功能是合成并分泌细胞外基质等,以此促进机体的新陈代谢,支持组织结构和功能<sup>[7]</sup>,其中 I 型胶原与支持作用有关,硬度较大,直径较粗,III 型胶原、弹性蛋白与组织的弹性有关,这些成分的变化导致弹性和拉伸强度降低,导致韧带、筋膜等支持结构松弛<sup>[8-9]</sup>。正常机体存在抗氧化系统,当活性氧生成过量和(或)机体抗氧化系统受损导致活性氧及其代谢产物过量聚集时,氧化还原平衡失调,大量的活性氧簇就会产生氧化应激反应。过氧化氢是活性氧簇的主要成员之一,可通过多种途径损害细胞,是一种比较常用的细胞氧化应激和细胞老化诱导剂<sup>[10-11]</sup>。本研究以子宫韧带成纤维细胞为干预对象,用不同浓度过氧化氢刺激模拟氧化应激微环境,观察氧化应激对大鼠子宫韧带成纤维细胞增殖、凋亡、胶原合成以及炎症因子表达的影响并探讨其相关分子机制,为 POP 疾病治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

4 周龄雌性 SD 大鼠 4 只,SPF 级,体重 70~80 g, 购买于湖南省斯莱克景达实验动物公司 [SCXK (湘)2019-0004], 饲养于海南省人民医院实验动物中心 [SYXK (琼)2019-0011], 所有动物实验程序均按国家标准进行并经海南省人民医院动物实验伦理委员会批准 (HNWCMC 伦审 2019 年第 [7] 号), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) (天津科密欧化学试剂有限公司); DMEM 培养基、胎牛血清、胶原酶 (Gibco, 美国); 4% 多聚甲醛、0.25% 胰蛋白酶 (Hyclone, 美国); MTT 试剂、二甲基亚砷 (上海碧云天生物有限公司); AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 波形蛋白单克隆抗体、角蛋白单克隆抗体、生物素化山羊抗大鼠 IgG、链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (武汉博士德生物工程有限公司); 细胞裂解液、BCA 蛋白含量检测试剂盒 (Sigma 公司, 美国); 抗 I 型胶原、III 型胶原、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 1 $\beta$ 、p-ERK1/2、ERK1/2、Akt、p-Akt、GAPDH 抗体、HRP 标记的兔抗羊二抗 (Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)。

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Thermo Fisher 公司, 美国); 倒置显微镜 (Olympus 公司, 日本); MK3 酶标仪 (Thermo 公司, 美国); 流式细胞仪 (BD 公司, 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 子宫韧带成纤维细胞培养

将 4 周龄雌性 SD 大鼠颈椎脱臼处死后, 无菌

条件下取出双侧子宫韧带组织, PBS 清洗 3~5 遍, 用剪刀剪成 1 mm×1 mm 左右的小块, 用含 0.25% 胰蛋白酶及 0.2% II 型胶原酶的混合液消化 2 h, 体积分数为 10% 胎牛血清终止消化, 1500 r/min 离心洗涤 5 min, 弃上清, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬, 接种于培养瓶中, 置于 37℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 每 2 d 换液 1 次, 待细胞生长达到 80%~90% 时按 1:2 比例进行传代, 取第 3~5 代细胞用于后续实验。

### 1.3.2 成纤维细胞鉴定

选取生长状况良好的第 3~5 代子宫韧带成纤维细胞, 制成每毫升  $2 \times 10^5$  个的细胞悬液, 以每孔 1 mL 接种于预先放有盖玻片的 6 孔培养板中, 倒置显微镜下观察盖玻片上的细胞增殖至 70%~80% 时进行检测。取出玻片, PBS 漂洗 3 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗 3 次×3 min; 体积分数为 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次×3 min; 10% 山羊血清封闭 20 min, 消除非特异性背景, 吸去多余液体, 不必清洗; 加入抗角蛋白、抗波形蛋白单克隆抗体, 4℃ 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次×3 min; 滴加生物素化山羊抗大鼠 IgG 二抗室温孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次×3 min; 然后加入链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物室温孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次×5 min; DAB 显色, 显微镜下掌握染色程度, 流水冲洗; 苏木精复染 1 min, 自来水冲洗返蓝, 镜下观察。

### 1.3.3 过氧化氢诱导子宫韧带成纤维细胞氧化应激模型建立

据前期参考文献<sup>[12]</sup>, 选择 0.2 mmol/L 和 0.8 mmol/L 过氧化氢对子宫韧带成纤维细胞干预 4 h, 建立细胞低水平和高水平的氧化应激模型, 以正常培养未进行任何干预的子宫韧带成纤维细胞作为对照组。

### 1.3.4 MTT 法检测细胞增殖能力

将第 3 代子宫韧带成纤维细胞悬液以每孔  $2 \times 10^5$  个的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 细胞分 3 组: 低氧化应激组用 0.2 mmol/L 过氧化氢干预 4 h, 高氧化应激组用 0.8 mmol/L 过氧化氢干预 4 h, 对照组单纯采用 DMEM 完全培养基孵育 4 h, 然后每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 g/L), 继续培养 4 h 后吸弃上清, 每孔加 150 μL DMSO 溶液, 振荡 10 min, 使用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度值。

### 1.3.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡情况

将第 3 代子宫韧带成纤维细胞悬液以每孔  $1 \times$

$10^5$  个细胞密度接种于 6 孔板, 培养 24 h 后细胞分 3 组: 低氧化应激组用 0.2 mmol/L 过氧化氢干预 4 h, 高氧化应激组用 0.8 mmol/L 过氧化氢干预 4 h, 对照组单纯采用 DMEM 完全培养基孵育 4 h, PBS 洗涤 2 次, 0.25% 胰酶消化, 离心收集细胞, 加入 500 μL Binding Buffer 结合缓冲液吹打混匀, 然后依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 室温避光孵育 20 min, 流式细胞仪上机检测。

### 1.3.6 Western blot 检测 I 型胶原、III 型胶原、炎症因子、信号通路相关蛋白的表达

按上述分组干预 4 h 后收集细胞, PBS 清洗 2 次, 按比例加入细胞裂解液, 研磨细胞, 12000 r/min 离心 8 min, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 方法检测蛋白浓度。取 20 μL 蛋白样品, 加入适量浓缩的蛋白上样缓冲液混合, 100℃ 水浴中煮沸 5 min 使蛋白变性, 冷却到室温后, 把蛋白样品直接上样到加样孔内, 100 V 电压下 SDS-PAGE 凝胶电泳分离 90 min; 然后将电泳分离的蛋白转移到 PVDF 膜上, 在 100 V 电压下转膜 1 h; 取出 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉封闭液放摇床上封闭 1~3 h; 加入一抗 (抗 I 型胶原、III 型胶原、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6、白细胞介素 1β、p-ERK1/2、ERK1/2、p-Akt、Akt、GAPDH 抗体) 室温孵育 1 h 后, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的兔抗羊二抗室温孵育 2 h, TBST 清洗 3 次, 加入 ECL 发光液反应 5 min, 曝光, 显影, 用 Image J 软件分析各组目的蛋白和内参蛋白条带的灰度值, 结果以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值表示。

## 1.4 统计学方法

各实验重复 3 次, 计量资料以平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 检测水平为  $\alpha = 0.05$ , 样本均数多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 子宫韧带成纤维细胞形态及鉴定结果

细胞形态以梭形、纺锤形为主, 胞体狭长, 胞核呈椭圆形, 胞浆丰富, 细胞排列有一定的方向性。免疫细胞化学染色显示: 波形蛋白染色阳性, 胞浆内见大量棕黄色颗粒, 角蛋白染色阴性, 符合成纤维细胞的细胞标记特征。见图 1。

## 2.2 氧化应激对子宫韧带成纤维细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测细胞增殖能力,高氧化应激组吸光度值显著低于低氧化应激组、对照组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),可见 0.8 mmol/L 过氧化氢干预 4 h 后,细胞增殖能力下降,而低氧化应激组吸光度值与对照组比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图 2。

## 2.3 氧化应激对子宫韧带成纤维细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测高氧化应激组细胞凋亡率  $[(39.6 \pm 4.4)\%]$  显著高于低氧化应激组、对照组  $[(18.45 \pm 1.61)\%, (12.12 \pm 1.06)\%]$ ,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),可见 0.8 mmol/L 过氧化氢干预 4 h 后,细胞凋亡率明显增高,而低氧化应激组细胞凋亡率与对照组比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图 3。

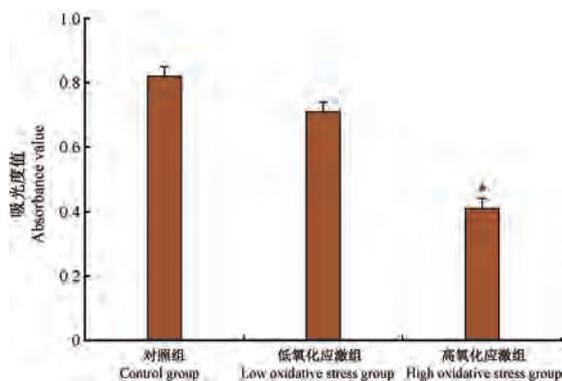


注:A:第 3 代子宫韧带成纤维细胞,为长梭形,细胞排列有一定的方向性;B:免疫细胞化学染色显示波形蛋白染色阳性;C:免疫细胞化学染色显示角蛋白染色阴性。

图 1 子宫韧带成纤维细胞形态及鉴定结果

Note. A, Fibroblasts of the third generation of uterine ligament were long spindle shaped. B, Immunocytochemical staining showed that vimentin staining was positive. C, Keratin staining was negative.

Figure 1 Morphology and identification results of fibroblasts from uterine ligament



注:与对照组和低氧化应激组相比, \*  $P < 0.05$ 。下同。

图 2 氧化应激对子宫韧带成纤维细胞增殖的影响

Note. Compared with the control group and low oxidative stress group, \*  $P < 0.05$ . The same as below.

Figure 2 Effect of oxidative stress on proliferation of fibroblasts from uterine ligament

## 2.4 氧化应激对子宫韧带成纤维细胞胶原合成的影响

Western blot 检测高氧化应激组 I 型胶原、III 型胶原蛋白表达显著低于低氧化应激组、对照组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),可见 0.8 mmol/L 过氧化氢干预 4 h 后, I 型胶原、III 型胶原合成明显减少,而低氧化应激组 I 型胶原、III 型胶原蛋白表达与对照组比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图 4。

## 2.5 氧化应激对子宫韧带成纤维细胞炎症因子蛋白表达的影响

Western blot 检测高氧化应激组白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 的蛋白表达水平明显高于低氧化应激组、对照组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ );同时低氧化应激组白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 的蛋白表达水平也轻微提高,但与对照组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图 5。

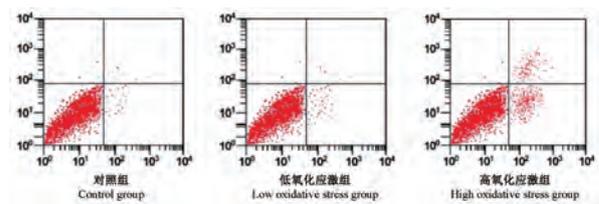


图 3 流式细胞术检测子宫韧带成纤维细胞凋亡率

Figure 3 Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of fibroblasts in uterine ligament

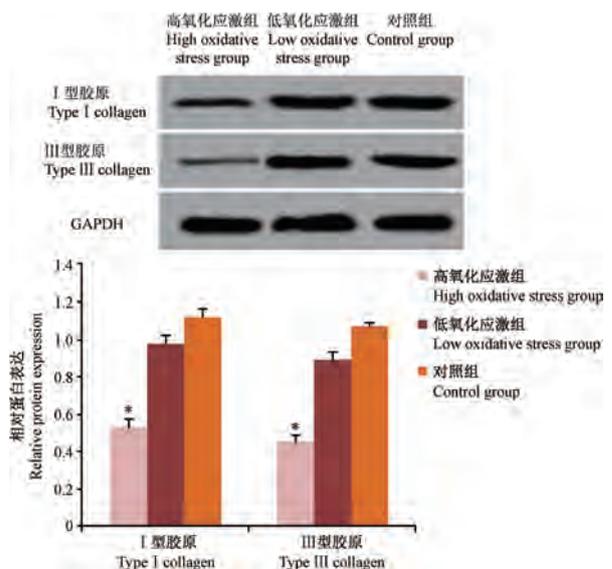


图 4 Western blot 检测各组子宫韧带成纤维细胞 I 型胶原、III 型胶原的表达

Figure 4 Western blot was used to detect the expression of type I collagen and type III collagen in uterine ligament fibroblasts

### 2.6 Western blot 检测通路相关蛋白的表达

采用 Western blot 检测 MEK-ERK1/2 与 PI3K-Akt 信号通路相关蛋白的表达,结果显示,与对照组和低氧化应激组相比,高氧化应激组 p-ERK1/2、p-Akt 的表达明显降低( $P < 0.05$ ),而总蛋白 ERK1/2、Akt 的表达基本保持不变。见图 6。

### 3 讨论

POP 是一类由盆底支持结构功能障碍而引起的盆腔正常器官(阴道壁、子宫、膀胱、直肠等)位置下移,从而严重影响人们的身体健康及生活质量的常见疾病。年龄、阴道分娩、慢性便秘、肥胖和激素水平下降是公认的危险因素,随着年龄的增长,分娩的影响逐渐降低,而衰老、激素水平改变的影响则明显增加<sup>[13-14]</sup>。根据衰老自由基理论<sup>[15]</sup>,细胞衰老在某种意义上是氧化损伤的结果。研究显示导致氧化应激损伤的活性氧不仅能诱导细胞发生凋亡,还能激活细胞使其具有表型转化的潜能<sup>[16-17]</sup>。过氧化氢是活性氧的一种,也是体内导致氧化应激损伤的主要效应分子,其参与调节新陈代谢、老年性疾病、凋亡和生长因子相关的信号通路,尽管其本身会迅速与信号分子反应而失活,但其造成级联反应能导致氧化应激持续存在,使其成为氧化应激研究的重要工具药<sup>[18]</sup>。过氧化氢介导的氧化应激在 POP 疾病进展过程中可能发挥着重要作用。

课题组前期用不同浓度过氧化氢干预后发现子宫旁韧带成纤维细胞内活性氧水平增高,使细胞处于氧化应激状态,且具有一定的剂量依赖性,认为 0.2 mmol/L 和 0.8 mmol/L 过氧化氢可导致细胞低水平氧化应激和高水平氧化应激<sup>[12]</sup>。在此基础上,该实验选取 0.2 mmol/L 和 0.8 mmol/L 过氧化氢诱导大鼠子宫韧带成纤维细胞氧化应激产生,初步观察不同程度氧化应激作用下大鼠子宫韧带成纤维细胞增殖、凋亡、胶原合成以及炎症因子表达并探讨其相关分子机制。本研究采用 MTT 法和 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞增殖、凋亡情况,结果显示:低水平氧化应激状态下细胞内活性氧虽有增多,细胞活力有所下降,细胞凋亡有所增加,但与对照组比较差异无显著性意义,说明其不足以影响细胞发挥正常功能;但随着活性氧产生继续增加,细胞氧化应激水平也增加,细胞活力明显下降,细胞凋亡进一步增加,与对照组和低氧化应激组比较差异有显著性意义,说明高浓度的过氧化氢能明显抑制子宫韧带成纤维细胞增殖,诱导细胞凋亡。

以往研究表明,以胶原合成减少为特征的细胞外基质代谢紊乱是 POP 的病理分子基础<sup>[19]</sup>。胶原蛋白是一组由多种糖分子组成的大家族,是细胞外基质的一种结构蛋白质。不同类型的胶原蛋白有着不同的化学结构,相应的具有不同功能和免疫学特性。盆底的筋膜和韧带胶原蛋白主要由 I 型和 III 型胶原构成, I 型胶原蛋白直径较粗,有很高的抗张强度,对盆腔器官起支持作用; III 型胶原蛋白直径较细,与弹性有关。Jackson 等<sup>[20]</sup>发现 POP 患者阴道组织胶原含量减少 20%; Lang 等<sup>[21]</sup>报道压

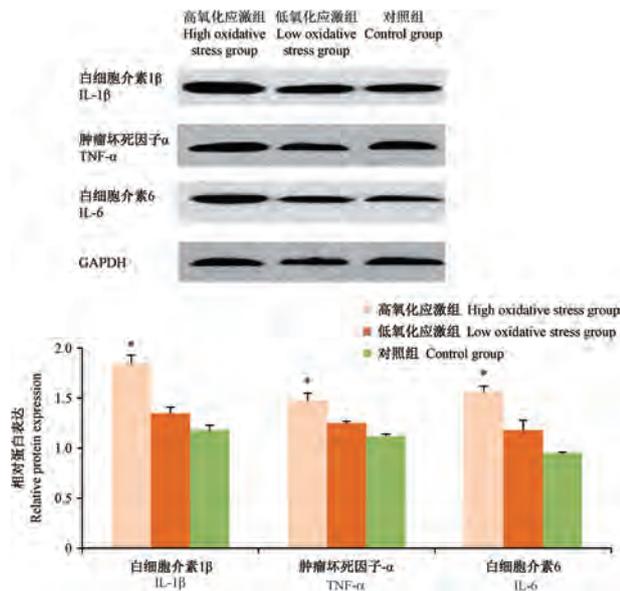


图 5 Western blot 检测各组子宫韧带成纤维细胞炎症因子蛋白的表达

Figure 5 Western blot was used to detect the expression of inflammatory factor protein in fibroblasts of uterine ligament

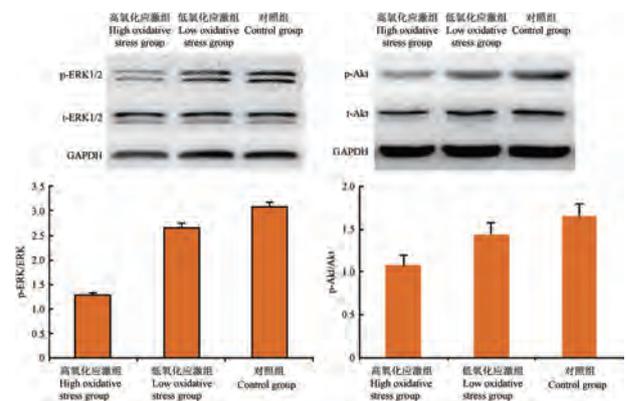


图 6 Western blot 检测各组子宫韧带成纤维细胞通路相关蛋白的表达

Figure 6 Western blot was used to detect the expression of fibroblast pathway related proteins in each group

力性尿失禁和 POP 患者子宫韧带胶原纤维直径明显大于对照组,这些韧带弹性较小,更容易断裂,以胶原降解占主导作用可能是发生压力性尿失禁和 POP 的原因之一;Han 等<sup>[22]</sup>研究发现 POP 伴或不伴压力性尿失禁患者子宫韧带 I、III 型胶原表达水平均显著低于对照组;Vulic 等<sup>[23]</sup>研究发现 POP 患者子宫韧带中基质金属蛋白酶 1 表达增加, I 型胶原表达降低,并认为子宫韧带中 I 型胶原和基质金属蛋白酶 1 的表达可能与 POP 有关。本研究结果显示外源性过氧化氢孵育 4 h 后,较低浓度的过氧化氢刺激对子宫韧带成纤维细胞胶原合成代谢与对照组无显著差异,而高浓度的过氧化氢促进 I 型、III 型胶原的分解代谢。因此,我们认为氧化应激是导致子宫韧带成纤维细胞胶原代谢紊乱的原因之一。Western blot 检测实验可知,高氧化应激组白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 的蛋白表达水平明显高于低氧化应激组、对照组;同时低氧化应激组也轻微提高白细胞介素 1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素 6 的蛋白表达水平,但与对照组比较无显著差异,说明这些炎症因子参与了过氧化氢诱导的子宫韧带组织炎症反应。

目前研究较广泛的与细胞增殖、凋亡发生过程相关的信号通路分子主要有 MEK-ERK1/2 与 PI3K-Akt 信号通路等<sup>[24-26]</sup>。ERK1/2 是 MAPK 通路中极其重要的组成部分之一,研究表明,ERK 活化后通过促进 Cyclin D1 表达以及其与 CDK4 结合而促进细胞周期进展,促进细胞增殖分化。ERK 持续激活可以阻止细胞凋亡的发生,抑制 ERK 的活化能够促进细胞凋亡的发生<sup>[27]</sup>。PI3K 是生长因子受体下游直接的信号传递分子,负责传递细胞内有丝分裂信号,对细胞的生存、增殖起重要作用<sup>[28-29]</sup>。本实验证实,对大鼠子宫韧带成纤维细胞进行低、高浓度过氧化氢干预 4 h 后,有效抑制 MAPK-ERK1/2、PI3K-Akt 信号通路的活化,与对照组和低氧化应激组相比,高氧化应激组 p-ERK1/2、p-Akt 的表达明显降低( $P < 0.05$ ),而总蛋白 ERK1/2、Akt 的表达基本保持不变,上述指标在对照组和低氧化应激组无显著差异。这些结果表明高浓度过氧化氢通过磷酸化 ERK1/2 和 Akt,抑制细胞增殖和促进细胞凋亡过程。总之,高浓度过氧化氢通过抑制 ERK1/2 信号通路,下调 I 型和 III 型胶原蛋白的表达,抑制子宫韧带成纤维细胞的增殖,研究表明参与盆腔功能障碍性疾病发生发展的分子机制十分复杂且涉及的

信号通路不止一种<sup>[30-32]</sup>,各个通路共同参与了盆腔功能障碍性疾病的发展,为解释盆腔功能障碍性疾病的相关作用机制提供更多的实验依据。

综上所述,氧化应激微环境中较高浓度的过氧化氢通过抑制 MAPK 通路中 ERK1/2 表达和 PI3K-Akt 通路中 Akt 表达,引起子宫韧带成纤维细胞的增殖能力下降,细胞凋亡增加,胶原合成受阻。另外,氧化应激导致炎症因子表达增加,对子宫韧带成纤维细胞的增殖、凋亡有一定影响,并进一步影响胶原合成,但其具体机制尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Frota IPR, Rocha ABO, Neto JAV, et al. Pelvic floor muscle function and quality of life in postmenopausal women with and without pelvic floor dysfunction [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2018, 97(5): 552-559.
- [2] Zhu Q, Shu H, Dai Z. Effect of pelvic floor dysfunction on sexual function and quality of life in Chinese women of different ages: An observational study [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2019, 19(4): 299-304.
- [3] DeLancey JO. What's new in the functional anatomy of pelvic organ prolapse [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28(5): 420-429.
- [4] Egorov V, Lucente V, VAN Raalte H, et al. Biomechanical mapping of the female pelvic floor: changes with age, parity and weight [J]. *Pelvipereology*, 2019, 38(1): 3-11.
- [5] Fang G, Hong L, Liu C, et al. Oxidative status of cardinal ligament in pelvic organ prolapse [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3293-3302.
- [6] Kim JY, Kim EJ, Jeon MJ, et al. Association between susceptibility to advanced pelvic organ prolapse and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 175: 205-208.
- [7] Yamamoto M, Akazawa K, Aoyagi M, et al. Changes in biological characteristics during the cellular aging of ligament fibroblasts derived from patients with prolapsus uteri [J]. *Mech Ageing Dev*, 2000, 115(3): 175-187.
- [8] Yamamoto M, Akazawa K, Aoyagi M, et al. Changes in elastin-binding protein in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri [J]. *Cell Biol Int*, 2002, 26(5): 441-449.
- [9] 汤剑明, 洪莉, 洪莎莎, 等. 机械力诱导氧化应激对子宫旁韧带成纤维细胞 I、III 型胶原表达的影响 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2016, 22(5): 357-364.
- [10] Huang B, Liang JJ, Zhuang X, et al. Intravitreal injection of hydrogen peroxide induces acute retinal degeneration, apoptosis, and oxidative stress in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 5489476.
- [11] 叶珏, 何阳阳, 颜艺, 等. 过氧化氢诱导人肺动脉内皮细胞损伤模型的建立及其氧化应激机制 [J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(7): 613-618.

- [12] 聂明朝, 王小花, 叶文娇. 氧化应激对宫旁韧带成纤维细胞弹性蛋白及转录因子 NF-E2 相关因子 2 表达的影响 [J]. 广东医学, 2018, 39(7): 991-994.
- [13] Weber AM, Buchsbaum GM, Chen B, et al. Basic science and translational research in female pelvic floor disorders: proceedings of an NIH-sponsored meeting [J]. *NeuroUrol Urodyn*, 2004, 23(4): 288-301.
- [14] Jelovsek JE, Maher C, Barber MD. Pelvic organ prolapse [J]. *Lancet*, 2007, 369(9566): 1027-1038.
- [15] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. *J Gerontol*, 1956, 11(3): 298-300.
- [16] 杜娜, 戴红良, 贾桂枝. ERK/CT-1 通路对氧化应激致 H9C2 细胞凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(9): 11-15.
- [17] 熊普熹. 过氧化氢介导的氧化应激损伤调控瓣膜纤维化钙化的分子机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [18] Xing Z, Ni Y, Zhao J, et al. hydrogen peroxide-induced secreted frizzled-related protein 1 gene demethylation contributes to hydrogen peroxide-induced apoptosis in human U251 glioma cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(5): 347-353.
- [19] Gong R, Xia Z. Collagen changes in pelvic support tissues in women with pelvic organ prolapse [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2019, 234: 185-189.
- [20] Jackson SR, Avery NC, Tarlton JF, et al. Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse [J]. *Lancet*, 1996, 347(9016): 1658-1661.
- [21] Lang J, Zhu L, Sun Z, et al. Clinical study on collagen and stress urinary incontinence [J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2002, 29(3): 180-182.
- [22] Han L, Wang L, Wang Q, et al. Association between pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence with collagen [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(5): 1337-1341.
- [23] Vulic M, Strinic T, Tomic S, et al. Difference in expression of collagen type I and matrix metalloproteinase - 1 in uterosacral ligaments of women with and without pelvic organ prolapse [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 155(2): 225-228.
- [24] 段鹏, 全超黄, 文婷, 等. PI3K-Akt/LKB1 - AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1 信号通路参与调节睾丸发育和精子发生的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(11): 1016-1020.
- [25] Eid AH, Gad AM, Fikry EM, et al. Venlafaxine and carvedilol ameliorate testicular impairment and disrupted spermatogenesis in rheumatoid arthritis by targeting AMPK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 364: 83-96.
- [26] Shati AA. Resveratrol improves sperm parameter and testicular apoptosis in cisplatin-treated rats: Effects on ERK1/2, JNK, and Akt pathways [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2019, 65(3): 236-249.
- [27] 周丽, 胡富勇, 徐新云. MAPK 信号调节通路及其在细胞凋亡中的研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(10): 2655-2657.
- [28] Yang N, Chen J, Zhang H, et al. LncRNA OIP5-AS1 loss-induced microRNA-410 accumulation regulates cell proliferation and apoptosis by targeting KLF10 via activating PTEN/PI3K/AKT pathway in multiple myeloma [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2975.
- [29] Qu Y, Hao C, Xu J, et al. ILK promotes cell proliferation in breast cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 5036-5042.
- [30] 王莹莹, 王君敏, 陈璐璐, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路及 WNK 1 基因在盆腔脏器脱垂发病机制中的作用 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2019, 11(5): 56-61.
- [31] Zhao X, Ma C, Li R, et al. Hypoxia induces apoptosis through HIF-1 $\alpha$  signaling pathway in human uterosacral ligaments of pelvic organ prolapse [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 8316094.
- [32] Chen YS, Wang XJ, Feng W, et al. Advanced glycation end products decrease collagen I levels in fibroblasts from the vaginal wall of patients with POP via the RAGE, MAPK and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 987-998.

[收稿日期]2020-09-03

陈绵雄,林慧,张菊云,等. VEGF-A 抑制剂 sFLT-1 改善 1 型糖尿病小鼠的肾功能的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (7): 100-105.

Chen MX, Lin H, Zhang JY, et al. Effect of the VEGF-A inhibitor sFLT-1 on renal function in type 1 diabetic mice [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 100-105.

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7856. 2021. 07. 015

## VEGF-A 抑制剂 sFLT-1 改善 1 型糖尿病小鼠的 肾功能的研究

陈绵雄,林 慧,张菊云,刘婷婷\*

(中南大学湘雅附属海口医院/海口市人民医院,内分泌科 海口 570208)

**【摘要】** 目的 研究 VEGF-A 抑制剂 sFLT-1 是否能够通过抑制血管内皮细胞的活化和炎症反应,进而逆转 1 型糖尿病小鼠肾功能损害。**方法** 将 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠分为 5 周:健康对照组( $n=5$ )、糖尿病组( $n=5$ )以及 15 周:健康对照组( $n=5$ )、糖尿病组( $n=5$ ),对照+sFLT-1 治疗组( $n=5$ ),糖尿病+sFLT-1 治疗组( $n=5$ ),通过腹腔注射链脲佐菌素(75 mg/kg)构建 1 型糖尿病模型,在建模后第 6 周开始进行 sFLT-1 的治疗。观察 sFLT-1 治疗前、后肾组织病理损伤、巨噬细胞浸润程度、肾小球内皮细胞活化程度以及炎症水平。**结果** 相比于模型组,转染 sFLT-1 可明显减少肾小球系膜基质含量(即肾小球 IV 型胶原蛋白水平)( $P<0.001$ )、肾小球巨噬细胞浸润( $P<0.001$ )、肾小球内皮细胞活化( $P<0.001$ )和肾小球肿瘤坏死因子- $\alpha$  水平( $P<0.001$ ),从而显著抑制糖尿病肾损伤,并且 sFLT-1 在体外可降低血管内皮生长因子-A 诱导的内皮细胞活化( $P<0.001$ )。**结论** sFLT-1 可能通过抑制 VEGF-A,从而减少内皮激活和肾小球炎症,最终逆转糖尿病相关的肾损害,是糖尿病肾病的新的治疗方向。

**【关键词】** 糖尿病肾病;肾功能;sFLT-1;血管内皮生长因子

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0100-06

### Effect of the VEGF-A inhibitor sFLT-1 on renal function in type 1 diabetic mice

CHEN Mianxiong, LIN Hui, ZHANG Juyun, LIU Tingting\*

(Department of Endocrinology, Haikou Hospital Affiliated to Xiangya, Central South University/Haikou  
People's Hospital, Haikou 570208, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate whether the vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) inhibitor sFLT-1 (soluble fms-like tyrosin kinase-1) can reverse renal dysfunction in type 1 diabetic mice by inhibiting vascular endothelial cell activation and inflammation. **Methods** Twenty-five eight-week-old C57BL/6 female mice were divided into two groups: two groups treated for 5 weeks: healthy control group ( $n=5$ ) and diabetic group ( $n=5$ ), and three groups for 15 weeks: healthy control group ( $n=5$ ), diabetic group ( $n=5$ ), control+sFLT-1 treatment group ( $n=5$ ), diabetic+sFLT-1 treatment group ( $n=5$ ). The model of type 1 diabetes was established by intraperitoneal streptozotocin (75 mg/kg) injection. The treated mice received sFLT-1 at the sixth week after the establishment of the model. Renal pathological damage, macrophage infiltration, glomerular endothelial cell activation and inflammation were observed before and after

[作者简介] 陈绵雄(1977—),男,主治医师,本科,研究方向:内分泌糖尿病。E-mail: ci982e2@163.com

[通信作者] 刘婷婷(1985—),女,博士,副主任医师,研究方向:内分泌科。E-mail: 15120014@qq.com

sFLT-1 treatment. **Results** Compared with the model group, sFLT-1 transfection significantly reduced the content of the glomerular mesangial matrix (glomerular type IV collagen) ( $P < 0.001$ ), glomerular macrophage infiltration ( $P < 0.001$ ), glomerular endothelial cell activation ( $P < 0.001$ ) and the glomerular tumor necrosis factor- $\alpha$  level ( $P < 0.001$ ), and thus significantly inhibited diabetic renal injury. Additionally, sFLT-1 reduced the activation of endothelial cells induced by VEGF-A in vitro ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** sFLT-1 may reduce endothelial activation and glomerular inflammation by inhibiting VEGF-A, and finally reverse diabetes-related renal damage, which is a new direction of treatment for diabetic nephropathy.

**【Keywords】** diabetic nephropathy; renal function; sFLT-1; VEGF-A

糖尿病肾病的主要特征表现为微血管系统的损伤和功能障碍,调控微血管系统的关键因素是血管内皮生长因子(VEGF-A),它通过调节内皮细胞的迁移、增殖和存活影响血管通透性<sup>[1]</sup>。在糖尿病肾病的动物模型中应用 VEGF-A 抗体能明显预防蛋白尿和肾小球肥大,证实抑制 VEGF-A 可能是糖尿病肾并发症的潜在治疗靶点<sup>[2]</sup>。除了维持血管内稳态,VEGF-A 还可以促进单核细胞和巨噬细胞的迁移<sup>[3]</sup>。研究发现:VEGF-A 通过结合细胞表面的 VEGF 受体(VEGFR,也称 FLT-1),促进单核细胞和巨噬细胞的迁移,在糖尿病肾病中发挥作用<sup>[4]</sup>。然而,在这些研究中均是在糖尿病肾病发生之前(即在蛋白尿、肾小球肥大和系膜扩张产生之前)抑制 VEGF-A,因此,目前尚不清楚该策略是否适用于已经发生糖尿病肾损害的临床患者。

本研究中,我们观察 VEGF-A 抑制剂可溶性 FLT-1(sFLT-1;也称可溶性 VEGFR-1)对 1 型糖尿病合并肾损伤小鼠的肾功能,包括蛋白尿和系膜基质扩张的治疗作用以及对血管内皮细胞活化和巨噬细胞浸润的调控,现将研究结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

本研究选用 8 周龄雌性,SPF 级 C57BL/6J 小鼠,体重(17.8±1.1)g,共 30 只,购自湘雅医学院实验动物中心[SCXK(湘)20180032],饲养于湘雅医学院实验动物中心[SYXK(湘)20180025],所有实验均按照中国国家“实验动物护理和使用指南”进行,全部实验内容遵循 3R 原则,经湖南省湘雅医学院伦理审批通过(2018HK0347)。小鼠置于单独通风的笼内,自由饮水和饮食。

#### 1.1.2 细胞

HEK293 细胞系和人脐静脉内皮细胞购买自美国 ATCC 生物公司。

### 1.2 主要试剂与仪器

链脉佐菌素购买自美国 Sigma 生物公司;DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司);TRIzol(Invitrogen 公司);Tris-EDTA 缓冲液、4%甲醛固定液和无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);30% $H_2O_2$ 溶液(北京中杉金桥有限公司);SYBR Green 酶(Qiagen 公司);pcDNA3.1 空载质粒(美国 invitrogen 公司);PECAM-1(美国 Santa Cruz Biotechnology);兔抗人 Wilms 瘤(WT)(美国 Santa Cruz Biotechnology);兔抗鼠 IV 型胶原(英国 Abcam),抗兔-HRP 偶联二抗(丹麦 DAKO 生物公司);兔抗鼠纤维连接蛋白 fibronectin(1:2400;美国 Sigma-Aldrich);鼠抗鼠 CD68(1:15;英国 Abcam);鼠抗鼠 VCAM-1(1:1400;美国 BD Pharmingen);鼠抗鼠 ICAM-1(1:200;美国 ATCC);兔抗鼠 TNF- $\alpha$ (1:100;英国 Abcam);兔 VSV(1:250;英国 Abcam)。

倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);5% $CO_2$  孵育箱(美国 Thermo Fisher 公司);微量孔板分光光度计(美国 BioTek 公司);低温离心机(德国 R&D 公司);URIT-150Vet 小动物尿液生化检测仪(中国常州锐品精密仪器有限公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Leica CM1860 组织冷冻切片机(德国 Leica 生物公司);蛋白免疫电泳仪(德国 Bio-Rad 生物公司);实时荧光定量 PCR 仪(ABI7500)(美国应用生物系统公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 糖尿病小鼠模型

模型组采用 75 mg/kg 剂量进行腹腔注射链脉佐菌素,对照组注射相同剂量生理盐水,每隔 2 d 注射 1 次,重复 3 次构建糖尿病小鼠模型。(1)在造模后 1 周、5 周测定血糖水平,血糖水平稳定在 15 mmol/L 或更高的小鼠被认为是糖尿病造模成功。将所有造模成功的小鼠随机分为六组:5 周:健康对照组( $n=5$ )、糖尿病组( $n=5$ );15 周:健康对照组( $n=5$ )、糖尿病组( $n=5$ ),对照+sFLT-1 治疗组( $n=$

5), 糖尿病+sFLT-1 治疗组 ( $n=5$ )。(2)造模后第 5 周处死一部分动物,获取肾组织及血清标本。(3)确认小鼠在 5 周内出现肾损伤后在造模后第 6 周,将 sFLT-1 质粒通过尾静脉注射方式转染剩下的小鼠。(4)同时间隔 2 周后通过小鼠腹腔注射荧光素检测转染效率。(5)糖尿病建模后 15 周处死剩下所有小鼠,获取相应肾和血清标本进行分析。(6)分别于第 5 周和第 15 周采集点状尿液分析尿蛋白排泄率。

### 1.3.2 质粒构建和转染

以 pcDNA3.1 为载体构建包含小鼠 sFLT-1-VSV 以及荧光素酶基因的巨细胞病毒启动子驱动的表达质粒。质粒在大肠杆菌中扩增,经纯化后溶解在 Tris-EDTA 缓冲液中。在造模后第 6 周,将 sFLT-1-vsv 和荧光素酶的表达质粒同时转染到小鼠的两条小腿肌肉中(各 20  $\mu\text{g}$ )。为了监测转染效率,注射 sFLT-1-vsv 和荧光素酶的表达质粒操作的 2 周后通过腹腔注射荧光素,生物荧光相机观察荧光素酶活性,质粒图谱见图 1。

### 1.3.3 血管形成实验

进一步通过血管形成实验,明确 sFLT-1 对血管结构的调控作用。将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)接种在 Matrigel 涂层的 96 孔板上。通过脂质体 Lipo3000 在 HEK293 细胞中转染 sFLT-1 质粒和荧光素酶的表达质粒,转染 2 d 后收集细胞培养上清,将收集的细胞培养上清孵育人脐静脉内皮细胞 6 h。同时向细胞培养基中加入或不加入 VEGF-A(10 ng/mL)。计数 5 个 400 倍视野内的管状分支数目。使用 Moticam 相机进行图像拍摄。

### 1.3.4 尿蛋白排泄率测定

分别于采集建模后的第 5 周健康对照组 ( $n=5$ )、糖尿病组 ( $n=5$ ) 和第 15 周的健康对照组 ( $n=5$ )、糖尿病组 ( $n=5$ ) 以及 sFLT-1 治疗组 ( $n=5$ ) 小鼠的点状尿液,用兔抗小鼠白蛋白免疫电泳法测定尿蛋白含量,以纯化的小鼠血清白蛋白作为对照。同时测定尿肌酐水平,计算尿液中的白蛋白/肌酐比值。

### 1.3.5 免疫组织化学染色

分别获取糖尿病组 ( $n=5$ ) 及 sFLT-1 治疗组 ( $n=5$ ) 小鼠的肾组织,进行石蜡包埋处理后切成 4  $\mu\text{m}$  的薄片。采用兔抗鼠血小板/内皮细胞粘附分子 1 (PECAM-1 1:400)、兔抗人 Wilms 瘤 (WT) (1:500) 和兔抗鼠 IV 型胶原 (1:200) 抗体进行免疫组化染

色,随后使用抗兔-HRP 偶联二抗(未稀释;DAKO)进行二抗染色。此外,分别获取糖尿病组 ( $n=5$ ) 及 sFLT-1 治疗组 ( $n=5$ ) 小鼠的冰冻肾组织切成 4  $\mu\text{m}$  薄片。兔抗鼠纤维连接蛋白 fibronectin、鼠抗鼠 CD68、鼠抗鼠 VCAM-1、鼠抗鼠 ICAM-1、兔抗鼠 TNF- $\alpha$  和兔 VSV 进行染色。

### 1.3.6 血管内皮细胞活性检测

HUVECs 细胞中加入 VEGF-A(20 ng/mL)孵育 2、4、6、8 h 后,加入 sFLT-1(0、10、100、1000 ng/mL)孵育 4 h,观察 sFLT-1 对 VEGF-A 诱导内皮细胞活化的影响。采用 TRIzol 从 HUVECs 中提取总 RNA,反转录成 cDNA 后,进行定量实时 PCR 检测目的基因的表达水平。涉及到的目的基因引物序列根据网络数据库 Primerbank 设计 (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) 如下: HPRT1: 正向: 5'-AGATGGTCAAGGTCGCAAGC-3'; 反向: 5'-TCAAGGGCATATCCTACAAAAC-3'; ICAM-1: 正向: 5'-CAGAGTTGAACCCACAGT-3'; 反向: 5'-CCTC TGGCTTCGTCAGAATC-3'; SELEE: 正向: 5'-AGCCAGAGCCTTCAGTGTA-3'; 反向: 5'-AACTGGGATTTGCTGTGTCC-3'。引物合成委托由生工生物有限公司进行。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 分析进行组间比较,  $P<0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外转染 sFLT-1 可减少血管的形成

通过血管形成实验,我们发现:在培养基中添加 VEGFA 后可导致血管形成增加(图 2),血管分支点的数量显著增加;而从转染 sFLT-1 质粒的 HEK293 细胞获得的培养基可显著抑制 VEGF-A 诱导的管形成,提示 sFLT-1 能够抑制了 VEGF-A 诱导的血管形成。

### 2.2 转染 sFlt 质粒后能明显缓解糖尿病小鼠的肾损伤

测定糖尿病建模 5 周后小鼠肾损伤情况,发现:糖尿病组小鼠肾小球系膜基质扩张的两个标志物-IV 型胶原和纤维连接蛋白的蛋白表达水平均高于对照组 ( $P<0.001$ ) (图 3A)。糖尿病模型组小鼠会

表现出明显的蛋白尿,白蛋白/肌酐比值(ACR)为(8.53±2.59) mg/mmol,显著高于对照组(3.06±0.98) mg/mmol,  $P < 0.001$ 。并且糖尿病模型组小鼠出现肾小球肥大( $P < 0.001$ ) (图 3B)。糖尿病小鼠和对照组小鼠的足细胞数量没有差异。

确认小鼠在 5 周内出现肾损伤后,我们在第 6 周进行 sFLT-1 转染,并在转染后 9 周对小鼠进行分析(即糖尿病建模后 15 周)。发现:sFLT-1 可以显著降低了糖尿病小鼠肾损害的所有指标,包括蛋白尿、肾小球肥大和系膜基质扩张( $P < 0.05$ ) (图 3)。

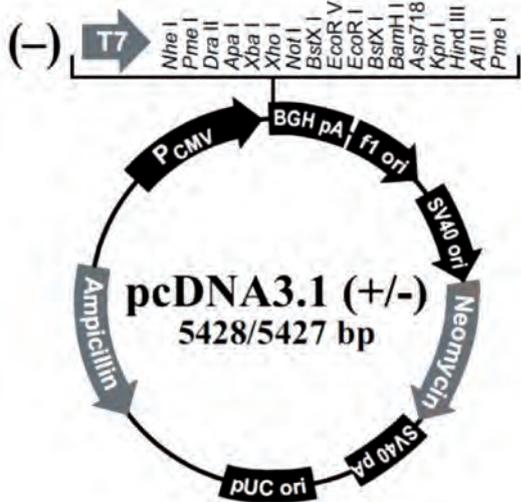
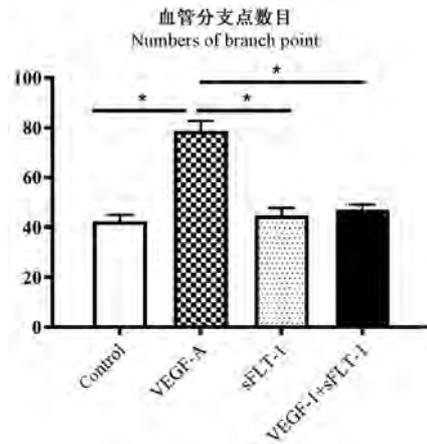


图 1 pcDNA3.1(-)空载质粒图谱 (Invitrogen, Carlsbad, CA)  
Figure 1 pcDNA3.1(-) empty plasmid mapping

与对照组相比,转染 sFLT-1 后的糖尿病小鼠足细胞明显减少( $P < 0.05$ )。并且与第 5 周的糖尿病小鼠相比,尿蛋白水平和 IV 型胶原表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),证实转染 sFLT-1 可以逆转肾功能的损害。

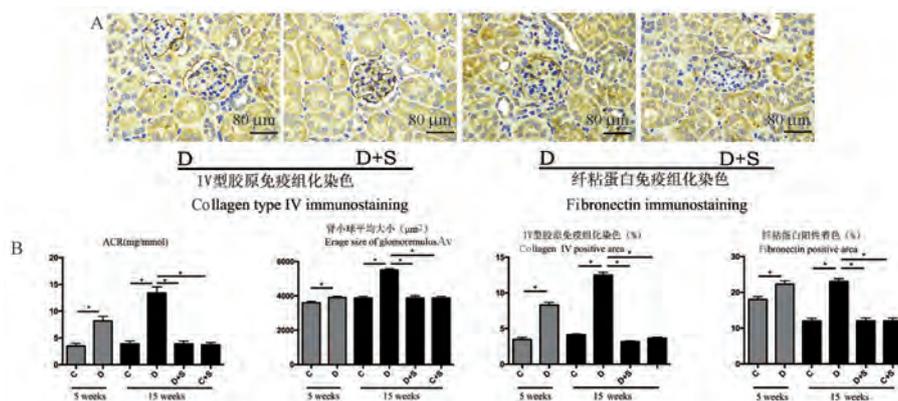


注:人脐静脉内皮细胞的培养基中添加 VEGF-A (10 ng/mL) 或 sFLT-1 进行孵育后,计数血管分支点的数目。与对照组相比,  $*P < 0.05$ ,  $n = 5$ 。

图 2 体外孵育 sFLT-1 可抑制 VEGF 诱导的微血管形成

Note. Number of vascular branching points was counted after incubation of human umbilical vein endothelial cells in medium supplemented with VEGF-A (10 ng/mL) or sFLT-1. Compared with control group,  $*P < 0.05$ ,  $n = 5$ .

Figure 2 Incubation of sFLT-1 *in vitro* inhibits VEGF-induced microvessel formation



注:A:第 15 周糖尿病组(D)和 sFLT-1 治疗组小鼠的 IV 型胶原及纤维连接蛋白的免疫组化染色图像;B:于 5 周和 15 周检测尿白蛋白(白蛋白/肌酐比值[ACR])、肾小球肥大、肾小球足细胞、IV 型胶原和纤维连接蛋白。与对照组相比,  $*P < 0.05$ ,  $n = 5$ 。

图 3 sFLT-1 可逆转糖尿病小鼠肾损害

Note. A, Immunohistochemical staining images of type IV collagen and fibronectin in diabetic group (D) and sFLT-1-treated mice at week 15. B, Detection of urinary albumin (albumin/creatinine ratio [ACR]), glomerular hypertrophy, glomerular podocytes, type IV collagen and fibronectin at 5 and 15 weeks. Compared with control group,  $*P < 0.05$ ,  $n = 5$ .

Figure 3 sFLT-1 reverses renal damage in diabetic mice

### 2.3 转染 sFLT-1 可降低糖尿病小鼠的内皮激活和炎症反应

与对照组相比,糖尿病小鼠肾小球内皮细胞活化明显增强,表现为 VCAM-1, ICAM-1 和 PECAM-1 表达水平升高( $P < 0.05$ ) (图 4)。并且 TNF- $\alpha$  水平增加( $P < 0.05$ ),肾小球巨噬细胞数增加( $P < 0.05$ )。在第 15 周,糖尿病组小鼠肾小球内皮细胞活化的三个标记物仍然增加明显( $P < 0.05$ )。15 周时,糖尿病组肾小球巨噬细胞浸润增多,肾小球 TNF- $\alpha$  水平升高,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。转染能显著降低了糖尿病小鼠肾小球内皮细胞激活和炎症相关指标( $P < 0.05$ )。与第 5 周糖尿病小鼠相比,第 15 周转染 sFLT-1 的糖尿病小鼠 ICAM-1 和 PECAM-1 水平显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.4 sFLT-1 以剂量依赖的方式降低血管内皮生长因子-A 诱导的内皮细胞激活

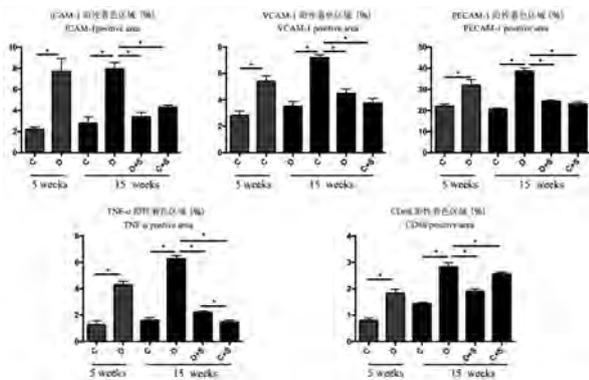
我们进一步在体外实验中研究 sFLT-1 对 VEGF-A 诱导的内皮细胞活化的影响。人脐静脉内皮细胞与 20 ng/mL 的 VEGF-A 共孵育后, E-选择素 (SELE) 和 VCAM-1 编码基因的表达显著增加, SELE 和 VCAM-1 的 RNA 水平分别在刺激后 6 h 和 4 h 达到峰值(图 5)。同时,我们发现不同浓度

的 sFLT-1 对血管内皮细胞活化的影响,发现 sFLT-1 以剂量依赖的方式显著降低了 VEGF-A 诱导的 VCAM-1 的上调( $P < 0.001$ ),但对 VEGF-A 诱导的 SELE 上调无明显影响。

### 3 讨论

在本研究中,我们证实在糖尿病小鼠中转染 sFLT-1 质粒能够显著改善肾功能及蛋白尿、肌酐水平和系膜基质含量来逆转高血糖造成的肾损害。同时 sFLT-1 可以降低肾小球内皮细胞中 TNF- $\alpha$  蛋白水平,抑制炎症反应和 VEGF-A 诱导的血管内皮细胞的激活。

糖尿病肾病动物模型肾小球 VEGF-A 水平升高,在糖尿病动物模型中抑制 VEGF-A 可以预防蛋白尿、肾小球肥大和足细胞丢失<sup>[5-6]</sup>。有研究报道,在足细胞中过表达 sFLT-1 可以减少糖尿病小鼠的系膜扩张和肾小球基底膜增厚,但该项研究没有阐明全身性应用 sFLT-1 对糖尿病肾病的治疗效

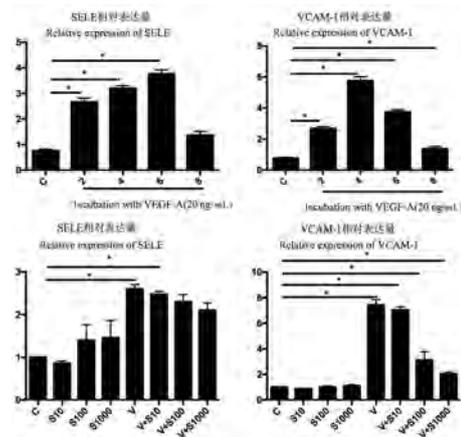


注:糖尿病建模后第 5、15 周时血管细胞黏附分子-1、细胞间黏附分子-1、血管内皮细胞黏附分子-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$  和肾小球巨噬细胞数。与对照组相比, \* $P < 0.05, n = 5$ 。

图 4 sFLT-1 可降低糖尿病小鼠肾小球内皮细胞活化、肾小球巨噬细胞数和肾小球炎症

Note. Vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, vascular endothelial cell adhesion molecule-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and glomerular macrophage count at weeks 5 and 15 after diabetic modeling. Compared with control group, \* $P < 0.05, n = 5$ .

Figure 4 sFLT-1 reduces glomerular endothelial cell activation, glomerular macrophage count, and glomerular inflammation in diabetic mice



注:SELE 和 VCAM-1 基因在 mRNA 水平的表达量测定。同时以 20 ng/mL 浓度的 VEGF-A 与 10、100、1000 ng/mL 浓度的 sFLT-1 共同孵育 HUVECs 细胞 4 h,检测 SELE 和 VCAM-1 在 mRNA 水平的表达量。C:未经 VEGF-A 或 sFlt-1 处理的细胞;V:经 VEGF-A 刺激但未经 sFlt-1 处理的细胞。与对照组相比, \* $P < 0.05, n = 5$ 。

图 5 体外实验中 sFLT-1 以剂量依赖的方式降低 VEGF-A 诱导的内皮细胞活化

Note. Expression of SELE and VCAM-1 genes at the mRNA level was determined. HUVECs cells were simultaneously incubated with VEGF-A at a concentration of 20 ng/ml and sFLT-1 at concentrations of 10, 100, and 1000 ng/mL for 4 h. SELE and VCAM-1 expression at the mRNA level was measured. C, Cells untreated with VEGF-A or sFlt-1. V, Cells stimulated with VEGF-A but not sFlt-1-treated cells. Compared with control group, \* $P < 0.05, n = 5$ .

Figure 5 *In vitro* experiments in which sFLT-1 reduced VEGF-A-induced endothelial cell activation in a dose-dependent manner

果<sup>[5-6]</sup>。相反,其他研究发现:抗 VEGF-A 治疗对早期肾病理没有作用<sup>[7-8]</sup>,但糖尿病小鼠足细胞特异性 VEGF-A 基因缺失会导致蛋白尿增加和肾损伤<sup>[9]</sup>。此外,另一项研究报道用 sFLT-1 治疗糖尿病小鼠可以减少蛋白尿,但它并没有减少肾小球基质沉积,并导致肾小管损伤增加<sup>[10]</sup>。这些相互矛盾的结果可能是多种因素造成的,包括开始治疗的时间,以及使用的抗 VEGF-A 治疗的剂量和类型所导致的。并且以上研究集中于糖尿病引起的肾损害的预防而不是治疗,因此,很难估计这些治疗对已经出现肾损害的糖尿病患者的效果。因此,我们研究了 VEGF-A 抑制剂 sFLT-1 对糖尿病小鼠肾损害(包括蛋白尿和系膜基质堆积)的治疗效果。发现,尽管转染 sFLT-1 不能使糖尿病小鼠的血糖水平恢复正常,但可以逆转肾损害,体现为蛋白尿和系膜基质沉积减少了。

此外,我们还发现与 VEGF-A 共同孵育 HUVECs 可增加内皮细胞的激活,而用 sFLT-1 处理 HUVECs 可逆转这一作用。并且转染 sFLT-1 可以使糖尿病小鼠肾小球巨噬细胞数量和肿瘤坏死因子- $\alpha$  水平正常化。综上所述,这些发现提示 VEGF-A 抑制剂 sFLT-1 减少了内皮激活和随后的巨噬细胞浸润。据报道,使用 sFLT-1 也可以应用于其他炎症相关疾病的治疗,包括关节炎、血管疾病、脓毒症和牛皮癣,表现为 sFLT-1 可以减少巨噬细胞的浸润和数量<sup>[11-14]</sup>。因此目前的结果表明,sFLT-1 可能是治疗糖尿病肾病以及炎症疾病的一种有价值的治疗方法。

综上所述,我们研究证实:以 sFLT-1 作为干预药物拮抗糖尿病小鼠体内 VEGF-A 水平的异常升高,可以减少内皮激活、肾小球巨噬细胞浸润和肾小球炎症,从而逆转肾损害,可能成为未来糖尿病肾病患者的可行方案。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 桑小溪. 糖尿病肾病发病机制的研究进展 [J]. 当代医学, 2019, 25(17): 193-194.
- [ 2 ] 何美艳, 林百润, 李远, 等. 血管内皮生长因子(VEGF)与 2 型糖尿病肾病相关性分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(69): 1-4.
- [ 3 ] 韩晨鹏, 徐清芳, 张美华, 等. 2 型糖尿病患者血清抵抗素、VEGF、糖化白蛋白联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的价值分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(2): 128-131, 151.
- [ 4 ] 崔艳, 李子玲. VEGF、25(OH) D3 与 2 型糖尿病肾病的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(72): 147-148.
- [ 5 ] Hernández-Arteaga K, Soto-Abraham V, Pérez-Navarro M, et al. Thrombotic microangiopathy in patients with diabetic nephropathy is associated with low VEGF expression and end-stage renal disease [J]. Clin Nephrol, 2018, 89(6): 429-437.
- [ 6 ] 李青, 曹卫娟, 周国艳, 等. 利拉鲁肽对早期糖尿病肾病的影响及与 VEGF、VEGF-A 变化的关系 [J]. 湘南学院学报(医学版), 2017, 19(4): 6-11.
- [ 7 ] 庞薇. SDF-1、TGF- $\beta$ 、VEGF、CTGF、FGF-2 与早期 2 型糖尿病肾病的研究及临床实用价值 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.
- [ 8 ] 廖涛生, 冯涛, 刘炳贤, 等. 肾小球滤过率与血清 VEGF、胆红素水平在糖尿病肾病中的关系研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(11): 1263-1268.
- [ 9 ] 宋怡夏, 李青, 曹卫娟, 等. 2 型糖尿病肾病 VEGF 与 VEGF-A 的表达及治疗后的变化 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2017, 14(1): 15-18.
- [ 10 ] Lin S, Teng J, Li J, et al. Association of chemerin and vascular endothelial growth factor (VEGF) with diabetic nephropathy [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 3209-3214.
- [ 11 ] 宣国红, 单平因, 卢志勇, 等. 外周血单个核细胞 VEGF 基因在糖尿病患者中的表达及其与糖尿病肾病进展的相关性 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(24): 4281-4282, 4285.
- [ 12 ] Zhao C, Zhang R, Luo Y, et al. Multimodal VEGF-targeted contrast-enhanced ultrasound and photoacoustic imaging of rats with inflammatory arthritis; using Dye-VEGF-Antibody-Loaded microbubbles [J]. Ultrasound Med Biol, 2020, 46(9): 2400-2411.
- [ 13 ] Malecic N, Young HS. Novel investigational vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor antagonists for psoriasis [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2016, 25(4): 455-462.
- [ 14 ] Flisiak I, Zaniewski P, Rogalska-Taranta M, et al. Effect of psoriasis therapy on VEGF and its soluble receptors serum concentrations [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012, 26(3): 302-307.

[收稿日期] 2020-09-08

赵聪慧,王妍,周禹,等. 使用一次性硬膜外麻醉导管进行无创小鼠气管插管的方法建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 106-111.

Zhao CH, Wang Y, Zhou Y, et al. A new method of intratracheal intubation in mice using an epidural anesthesia catheter [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 106-111.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.016

# 使用一次性硬膜外麻醉导管进行无创小鼠气管插管的方法建立

赵聪慧<sup>1</sup>,王妍<sup>2,3</sup>,周禹<sup>4</sup>,袁晓红<sup>1\*</sup>

(1.首都医科大学附属北京口腔医院病理科,北京 100050;2.山西医科大学第一医院,太原 030001;  
3.山西医科大学肝病与器官移植研究所,太原 030001;4.中国医学科学院药物研究所,北京 100050)

**【摘要】** 目的 建立一种操作简便,可靠,可准确判定插入气管的小鼠无创气管插管方法,用于各类小鼠肺部疾病模型造模以及药物干预。**方法** 使用雌性 C57BL/6 小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,将小鼠通过门齿悬挂。将硬膜外麻醉导管、1 mL 注射器、10  $\mu$ L 移液器枪头等组装为插管工具组合,双手分别持握工具和感知小鼠气管,经口腔进行无创气管插管,给予台盼蓝或者 PBS。插管给药结束后,染料组小鼠观察肺组织和胃中台盼蓝着色情况,PBS 组放回饲养环境继续饲养观察小鼠存活情况。**结果** 染料组小鼠肺组织存在着色,分布较为均匀,胃中无着色。PBS 组小鼠在麻醉恢复后持续生存,并无任何异常。**结论** 建立了应用硬膜外麻醉导管、1 mL 注射器、10  $\mu$ L 移液器枪头等工具组合,进行小鼠无创气管插管给药的方法。本方法简便、稳定,可准确判定插入气管,对动物创伤小,重复性强。

**【关键词】** 实验动物学;小鼠气管插管;无创伤;硬膜外麻醉导管;肺纤维化

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0106-06

## A new method of intratracheal intubation in mice using an epidural anesthesia catheter

ZHAO Conghui<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>2,3</sup>, ZHOU Yu<sup>4</sup>, YUAN Xiaohong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pathology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China.

2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001. 2. Institute of Liver Diseases and Organ

Transplantation, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001. 4. Institute of Materia Medica, Chinese

Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050 )

**【Abstract】 Objective** To establish a simple reliable and accurately method of non-invasive intratracheal intubation in mice. **Methods** Female C57BL/6 mice were used. Mice were anesthetized with pentobarbital sodium, then suspended via the upper incisors using surgical thread. An epidural anesthesia catheter, 1 mL syringe, 10  $\mu$ L pipet tip, were assembled as intratracheal intubation equipment. Using the non-dominant hand to feel the trachea, the dominant hand inserted the equipment into the mouth cavity to deliver the liquid. The mice were administered trypan blue or PBS. After intratracheal intubation, mice that received trypan blue were killed and the lungs were checked, while the mice that

[作者简介] 赵聪慧(1988—),女,住院医师,博士,研究方向:口腔及呼吸系统疾病病理学。E-mail: zhaconghuide@126.com

[通信作者] 袁晓红(1972—),女,主任医师,硕士,研究方向:口腔病理学。E-mail: yuanxiaohong@163.com

received PBS remained under observation for monitoring of survival. **Results** The lungs of mice that received trypan blue were dyed blue, while the stomach was not dyed. The mice that received PBS remained alive after recovering from the anesthesia. **Conclusions** Equipment comprising an epidural anesthesia catheter, a 1 mL syringe, a 10  $\mu$ L pipet tip, and ophthalmic forceps enable simple and accurate non-invasive intratracheal intubation.

**【Keywords】** experimental zoology; mice intratracheal intubation; non-invasive; epidural anesthesia catheter; pulmonary fibrosis

肺疾病为常见的呼吸系统疾病,极大损害了人类健康,对社会造成劳动力和医疗资源损失。通过构建动物肺部疾病模型,可以直观研究疾病发病机制,动态演变以及评估药物治疗效果。由于小鼠肺部疾病模型造模指向性强,需要直接将造模药物均匀输送到肺组织中。因此包括哮喘模型<sup>[1]</sup>,肺纤维化模型<sup>[2]</sup>,急性肺组织损伤模型<sup>[3]</sup>,病毒感染模型<sup>[4]</sup>等肺部疾病模型均使用气管插管法造模。小鼠体型较小,呼吸道狭窄,不易发现气管入口。雾化吸入是常用的方法之一,操作简便,可批量处理。但是,此方法存在药品消耗大,每只动物吸入剂量不可控等缺点。滴鼻法操作简便,但是药物部分进入食道,造成不同动物之间实际给药剂量差异。并且,研究表明经口鼻吸入法造模效果不及气管插管法<sup>[5]</sup>。目前为止,多种小鼠气管插管技术已被报道,可以归类为“有创法”、“无创直接法”和“无创辅助法”,这些方法各有优势,但仍存在不足。有创小鼠气管插管技术虽然经过优化将动物损伤降到最低,但是仍不利于小鼠长期生存和多次给药<sup>[6-8]</sup>;无创辅助法通过使用辅助工具,例如使用光源<sup>[9-12]</sup>或者光源和纤维引导丝组合<sup>[13]</sup>,从而直接可视化小鼠气管入口并将插管引入气管。但是,由于小鼠气管狭窄,入口仍然不便直接观察,且对于实验器材获取和实验人员经验技术要求较高;无创直接法也称为“盲插法”,此方法不使用任何辅助,直接经小鼠口腔插入气管,操作最为简便,但手法难以掌握,并且成功插入与否难以把控。

综合目前已经报道的小鼠气管插管技术,同时参考大鼠气管插管技术,结合实际在构建小鼠肺部疾病模型经验,我们建立了一套操作简单,成本低廉,重复性好,对操作要求较低的小鼠气管插管方法。并总结出本方法训练方法。本方法立足于无创“盲插”法,组装包括一次性硬膜外麻醉导管,1 mL注射器,10  $\mu$ L移液器枪头在内的常见实验耗材作为气管插管工具,并总结出插入气管的判断依据。使用本方法给药,过程舒缓程度可控,一名操作人员即可快速完成实验。本方法将有助于小鼠

肺部疾病模型的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF级C57BL/6小鼠,雌性,20只,6周龄,体重18~22 g。购于北京华阜康生物科技有限公司[SCXK(京)2019-0023],于中国医学科学院药物研究所动物房中饲养[SYXK(京)2019-0023],光照黑暗交替照明(12 h/12 h),自由饮水,进食,温度22℃左右,相对湿度50%左右。本实验已通过中国医学科学院药物研究所动物伦理委员会审批批准(00005199),实验过程中遵循3R原则并对动物给予人道主义关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

1%戊巴比妥钠;台盼蓝染液;1 mL注射器(BD);胰岛素注射针(BD);一次性硬膜外麻醉导管;10  $\mu$ L移液器枪头;缝合线;移液器架;眼科剪;眼科镊。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小鼠气管插管简易装置制作

小鼠气管插管简易装置组成如图1A所示,一次性硬膜外麻醉导管1支,10  $\mu$ L移液器枪头若干,1 mL注射器一支,胰岛素注射针1支。首先将硬膜外麻醉导管软管对折,从中间剪开,插管时使用其中一半即可,将其中一端侧面开口剪去(硬膜外麻醉导管的一端为侧面开口),改为顶端开口。将处理好的软管与进药装置组合,并旋紧螺丝扣。使用胰岛素注射针吸取给定剂量药物(此处为台盼蓝染液或PBS),将其通过进药装置注入软管内。需要说明的是,使用的胰岛素注射针与硬膜外麻醉导管的进药口必须紧密对接,并且该注射器没有死腔,有利于精确控制给药剂量。建议每次只吸取1只小鼠的剂量。将药物注入导管完毕后,使用1 mL注射器将针头弃去不用,将注射器调整至最大量程处,与进药口紧密对接,此处注射器当作“气筒”使用。小心调节注射器,观察软管中液平面,将其控制在距离软管出口处3~5 cm左右位置,以便于观察。

将软管出口处套入 10  $\mu\text{L}$  移液器枪头内,以液体不外露为准,如图 1B 所示。气管插管装置和药物准备完成。

### 1.3.2 实验动物准备

1%戊巴比妥钠深度麻醉小鼠,麻醉过浅在插管时会产生呕吐反射,不利于找到气管位置。小鼠以使用镊子夹住四肢无反应,双眼湿润,呼吸规律且较为深长为佳。使用缝合线,将小鼠悬挂于移液器架上。

### 1.3.3 小鼠气管插管过程

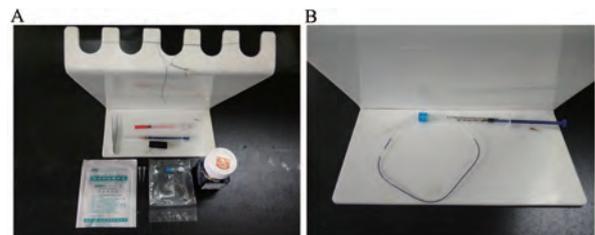
使用缝合线将小鼠悬空挂于移液器架上,高度以操作人员舒适为准。使用眼科镊小心将小鼠舌头拔出。如图 2 所示,左手大拇指放在小鼠颈前部,指肚紧贴小鼠颈部(重要),其余手指置于小鼠后颈部固定小鼠,以免摇晃。右手手持套入软管的移液器枪头,沿小鼠下颚,抵住小鼠舌头缓缓插入小鼠口中,在抵达小鼠会厌部时,会感受到阻力,这是小鼠会厌软骨所造成,此时不可用蛮力向下,以免伤及小鼠。将枪头稍稍回撤,而后将枪头下端向小鼠颈部腹侧反方向向下一小段距离(此时操作员面对小鼠,小鼠颈部腹侧正对操作员脸部),而后转向颈部腹侧表皮方向轻轻挑一下,同时将枪头向下,目的为挑过会厌软骨将枪头送入小鼠气管。当感觉枪头越过阻碍后,将枪头抵住左手拇指肚,轻柔地上下摩擦,注意动作轻柔。此时如果插入气管,应感觉到移液器枪头与气管软骨摩擦“一楞一楞”的感觉,这个感觉就是成功插入小鼠气道的判断依据,同时也是本技术的重点,如果插入食道则左手拇指肚感受到平滑感。此时观察软管中的液面,如果插入气管中,液面应该波动并向小鼠方向移动。当成功插入气管后,左手把住枪头,右手持注射器,缓慢推进,直至软管内液体全部进入后继续打入 0.5 mL 刻度的气体,迅速拔掉枪头。

小鼠悬挂 30 s 后即可取下。若插管成功,小鼠呼吸应该从麻醉的深长呼吸状态变为短促呼吸状态,此状态会维持数分钟,直至渐渐变为规律的深长呼吸,此时呼吸声音明显增加。

### 1.3.4 注意事项

(1)小鼠麻醉程度要控制得当,麻醉浅小鼠会出现挣扎情况,麻醉过深则容易窒息死亡;(2)给药体积控制在每只小鼠 30~50  $\mu\text{L}$ ,少于 30  $\mu\text{L}$  不利于药物均匀分布,多于 50  $\mu\text{L}$  则容易造成小鼠窒息死亡;(3)插管的深度不宜过深,应控制在气管中上部

分,不宜过度接近气管分支部分,以免造成药物偏向一侧肺组织;(4)气管插管过程中,由于小鼠个体差异和状态不同,不同小鼠插管的难易程度略有不同,建议连续 2~3 次插管不成功(遇到阻力,回撤再向下为一次)将小鼠取下休息一段时间,并且过程一定要轻柔,以免损伤小鼠或者造成窒息;(5)插管成功的依据是左手拇指有“一楞一楞”的感觉,因此应保持左手拇指的位置正确和敏感性,少部分情况即使成功插入气管,软管中液面的波动亦不明显;(6)此方法虽然简单,但是需要操作人员有一定的练习,可采用先将小鼠解剖,完全暴露小鼠颈部组织结构,体会枪头插入的位置和程度;(7)我们使用的是 10  $\mu\text{L}$  移液器枪头,这个部分可以换做任何可以与导管头接合的器具,以使用顺手为目的,原则是足够细,并且不会伤及小鼠;(8)推入液体时速度应保持中速和稳定,确定将液体全部推入后,应继续进气 0.5 mL 左右,以保证液体进入肺组织深部。有文章提出,补气有助于滴注物扩散,防止动物窒息,但由于小鼠肺总容量小,补气量为 0.6~0.8 mL<sup>[14]</sup>。



注:A:小鼠气管插管所使用的工具;B:组装起来的小鼠气管插管工具。

图 1 小鼠气管插管简易装置

Note. A, Tools for tracheal intubation. B, Assembled tracheal intubation tools for mice.

Figure 1 Simple tracheal intubation tools for mice



图 2 小鼠气管插管手法

Figure 2 Schematic diagrams of tracheal intubation by epidural anesthesia catheter

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,计数数据采用 Two-way ANOVA 检验,  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  以及  $P < 0.001$  为差异有统计学意义。

2 结果

如图 3 所示,通过气管插管给予小鼠台盼蓝染液,可见小鼠肺组织均匀蓝染,同时胃中没有蓝色,证明染液均匀分布于肺组织中。通过气管插管给予 PBS 组小鼠,在麻醉剂作用失效后,存活情况良好,无小鼠死亡。证明上述操作安全可靠。使用上文所述小鼠气管插管方法,我们已经完成多种、多次小鼠肺部疾病模型造模,包括 IL-33 诱导的小鼠

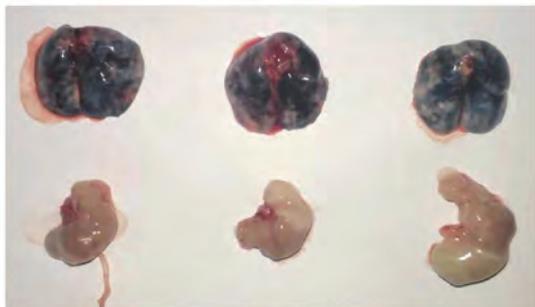
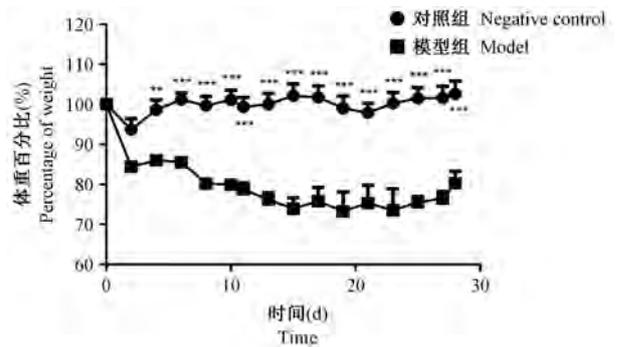


图 3 气管插管给予小鼠台盼蓝染液后,肺组织和胃染色情况  
Figure 3 Trypan blue staining of mouse lung and stomach after intratracheal intubation

哮喘模型,博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型,以及 LPS 引发的急性肺损伤模型。对于气管插管造模的成功率,我们以博来霉素诱导的肺纤维化为例,如图 4 所示。相比于对照组,模型组小鼠体重有显著下降,并且数据变异度小,证明模型发病率高,造模方法稳定。如图 5A 所示,使用此方法构建博来霉素诱导的肺纤维化模型 28 d 后,安乐死小鼠取肺组织,进行病理学分析,HE 染色显示对照组小鼠肺组织肺泡结构清晰,肺泡间无杂质,无炎症细胞浸润,模型组小鼠肺泡组织结构消失,原本肺泡组

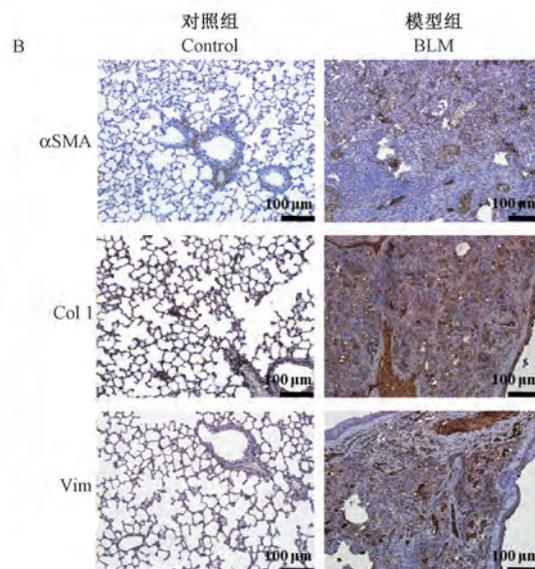
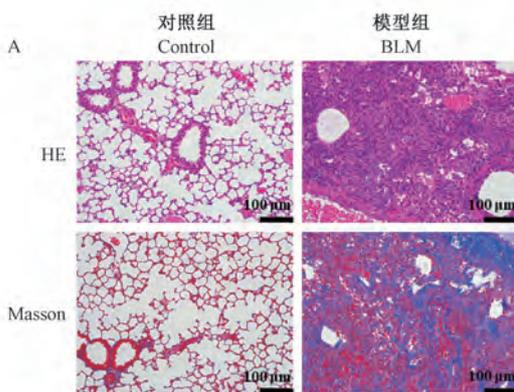


注:与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 经气管插管使用博来霉素小鼠肺纤维化造模后小鼠体重变化统计( $n = 7$ )

Note. Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 4 Body weights (%) of animals after bleomycin intratracheal intubating



注: A:HE 染色、Masson 染色; B:免疫组化分别对于  $\alpha$ SMA、Collagen I、Vimentin 进行染色。

图 5 使用经气管插管使用博来霉素造模 28 d 后,小鼠肺组织病理分析

Note. A, HE and Masson staining. B, Immunohistochemical staining of  $\alpha$ SMA, Collagen I and Vimentin.

Figure 5 Pathological analysis of mice lung tissue at 28 d after bleomycin intratracheal intubating

织被大量细胞外基质填充,可见炎性细胞浸润。Masson 染色显示相比对照组,模型组小鼠肺组织着色显著。同时如图 5B 所示,免疫组化染色表明,肺纤维化标志  $\alpha$ SMA、Collagen I 和 Vimentin 在模型组显著表达增高。综上,病理分析表明小鼠肺纤维化模型成功。

小鼠气管插管过程中,由于个别小鼠较为敏感或者手法问题,会出现小鼠因窒息死亡现象。具体表现为,小鼠眼球突出眼眶,出现身体蜷曲张口深大呼吸等呼吸困难表征,此为小鼠窒息前兆,如无此现象小鼠不会窒息死亡。通过手法逐渐熟练和给与的液体量减少,小鼠死亡现象显著下降。

### 3 讨论

小鼠肺部疾病模型需要将造模药物直接并且均匀输送到肺组织中,口服,静脉/腹腔/皮下注射等造模方式不能完全满足需求。张晓晔等<sup>[15]</sup>比较经尾静脉和经气管进行小鼠肺纤维化造模,结果表明动物肺纤维化程度尾静脉造模组低于气管造模组(但未见统计学差异),且小鼠肺组织病变部位二者存在显著差异。由于小鼠体积较小,口腔空间狭窄,导致难以准确找到气管开口位置。因此掌握成熟、稳定的气管插管技术就显得尤为重要。

由于大鼠也常被用于构建肺部疾病模型,因此大鼠的气管插管方法也可参考<sup>[16-17]</sup>。已报道的各类方法可分为“有创性插管”,“使用辅助工具无创性插管”和“无创性直接插管”(也被称作“盲插”)。有创性插管采用暴露部分气管,将药物注入动物气管内。此方法经过多次改良,力求尽可能减少对动物损伤,但是依旧易导致动物死亡,并且不利于多次干预。使用辅助工具无创性插管的改进在于使用光源,或光源与体视镜,导引丝结合,在无创条件下将气管入口可视化,提高插管成功率。有报道分别使用小鼠和大鼠比较了经口直视插管组和经颈透照直视插管的优劣,认为经颈透照直视插管可靠性更佳<sup>[18-19]</sup>。使用辅助工具无创性插管准确性高,对动物伤害小,但是仍有不足。一方面对于操作人员技术要求较高或者需要两人一起操作,另一方面需要购买或自制相关设备。相比之下“盲插”具有成本低廉,上手较快等优点。但是,此方法具

有无法准确判定是否进入气管,插管手法难以掌握这两大缺点。王凯等<sup>[20]</sup>在比较不同方法建立大鼠间质性肺炎模型中摸索出一套切实可用的大鼠气管“盲插”手法。但是提及的“轻微阻力”和“摩擦感”两个插入气管的特征,并不能准确判定工具进入气管。而且小鼠相比于大鼠,由于体积更小,气管更加狭窄,不利于插管。因此有必要改进“盲插”法以更好的适应小鼠实验。

本文立足于“盲插”法,使用硬膜外麻醉导管,移液器枪头,注射器等常用实验耗材,并通过手指的感觉确定进入气管,给药过程可控制速度,且药物可均匀分布到肺组织中。器材选用方面,已报道的方法多使用滞留针,穿刺针和移液器枪头等。相比于铁质针头,移液器枪头不易损伤组织。通过比较不同气管插管方法造小鼠肺纤维化模型的情况,提出插管深度对药物分散和造模效果直接相关<sup>[21]</sup>。10  $\mu$ L 移液器枪头可满足进入气管一定深度。连接硬膜外麻醉导管后,可将推注使用的移液器放置于合适位置,有助于控制推注过程。本方法操作手法需要一定的练习,可先在解剖条件下观察插管时枪头在小鼠咽喉部的位置,记住在何处有阻力,如何避开会厌软骨隔挡。在熟练掌握手法后,每只小鼠插管给药时间可控制在 1~2 min 内,并且在 50  $\mu$ L 以内的给药体积小鼠被直接呛死的比例小于 10%。使用本方法,我们已经建立了 IL-33 诱导的小鼠哮喘模型,LPS 诱导的小鼠急性肺损伤模型,博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型。模型成功率接近 100%,并且出模率稳定。通过更换所使用的工具,以相同的判定方式和手法,本方法也可适用于大鼠气管插管给药。

综上,我们在无创无可视辅助工具的条件下,经过改良和创新,建立了一套成本低廉,原料易得,上手容易,并且高效,稳定的小鼠气管插管方法,此方法将有助于更多小鼠肺组织疾病模型研究。

### 参考文献:

- [1] Debeuf N, Haspeslagh E, Helden MV, et al. Mouse models of asthma [J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2016, 6(2): 169-184.
- [2] Liu T, De Los Santos FG, Phan SH. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 27-42.
- [3] D'Alessio FR. Mouse models of acute lung injury and ARDS [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1809: 341-350.

- [ 4 ] Morales-Nebreda L, Chi M, Lecuona E, et al. Intratracheal administration of influenza virus is superior to intranasal administration as a model of acute lung injury [J]. *J Virol Methods*, 2014, 209: 116-120.
- [ 5 ] 邓华蓉, 龚财惠, 袁小平, 等. 气管插管和口咽吸入两种方法吸入二乙酰构建闭塞性细支气管炎小鼠模型比较研究 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2018, 39(4): 578-583.
- [ 6 ] Helms MN, Torres-Gonzalez E, Goodson P, et al. Direct tracheal instillation of solutes into mouse lung [J]. *J Vis Exp*, 2010, 42: 1941-1943.
- [ 7 ] 赵晓辉, 吴楠, 周健, 等. PTCA 导丝逆行引导小鼠气管插管术 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(6): 365-366.
- [ 8 ] 刘利辉, 叶玲玉, 谭渊明, 等. 一种简捷可靠的小鼠气管插管新方法 [J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(8): 1019-1020.
- [ 9 ] Lawrenz MB, Fodah RA, Gutierrez MG, et al. Intubation-mediated intratracheal (IMIT) instillation: a noninvasive, lung-specific delivery system [J]. *J Vis Exp*, 2014, 93: e52261.
- [ 10 ] Rayamajhi M, Redente EF, Condon TV, et al. Non-surgical intratracheal instillation of mice with analysis of lungs and lung draining lymph nodes by flow cytometry [J]. *J Vis Exp*, 2011, 51: 2702.
- [ 11 ] 曹婕, 高润娣, 李和权, 等. 在头戴式放大镜直视下小鼠气管插管方法的建立 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(5): 729-731.
- [ 12 ] 杨彪, 李新鸣, 严思远, 等. 应用冷光源内窥镜和点样吸头完成的新型小鼠气管滴注法 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(4): 585-587.
- [ 13 ] 魏稼黎, 袁李摇, 刘镭. 光纤引导直视下啮齿目动物气管插管的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(10): 69-70.
- [ 14 ] 贾晓峰, 郭新彪. 改进型快速小鼠气管滴注法——透射灯下经口直视滴注法研究 [J]. *环境与健康杂志*, 2012, 29(3): 217-219.
- [ 15 ] 张晓晔, 宁欣, 刘卫青, 等. 静脉注射和气管内滴入博来霉素诱导小鼠肺纤维化的差异 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(3): 176-178.
- [ 16 ] 卢记明, 张炳熙. 大鼠气管插管方法学概述 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(8): 76-80.
- [ 17 ] 孙刚强, 郭文俊. 大鼠气管插管方法研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(12): 116-121.
- [ 18 ] 徐幼年, 马璞, 张墨, 等. 直视下小鼠气管插管方法的比较 [J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(6): 740-742.
- [ 19 ] 叶明霞, 孔利佳. 直视下行大鼠气管插管的方法比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 49-52, 后插 4.
- [ 20 ] 王凯, 程路, 宋远园, 等. 不同气管插管方法建立大鼠间质性肺病模型比较 [J]. *徐州医学院学报*, 2016, 36(7): 455-458.
- [ 21 ] 王志超, 冯凡超, 武琦, 等. 三种方法气管灌注博来霉素诱导小鼠肺纤维化的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 51-57.

[ 收稿日期 ] 2020-11-12

毛玉宁,郭文文,赵菊梅,等. 基于动物模型筛选胃癌转移相关基因及鉴定方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 112-117.

Mao YN, Guo WW, Zhao JM, et al. Screening and identifying gastric cancer metastasis-related genes using animal models [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 112-117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.017

# 基于动物模型筛选胃癌转移相关基因及鉴定方法

毛玉宁<sup>1,2</sup>, 郭文文<sup>1,2</sup>, 赵菊梅<sup>1\*</sup>, 师长宏<sup>2\*</sup>

(1.延安大学医学院,陕西 延安 716000;2.空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

**【摘要】** 胃癌是全球危害最严重的恶性肿瘤之一,转移是造成其高致死率的主要原因。鉴定出胃癌转移相关基因,有助于理解胃癌转移发展机制,从而为胃癌的预防和靶向治疗研究奠定实验基础。本文就利用动物模型筛选胃癌转移相关基因及基因功能鉴定方法的最新研究进展进行综述,重点比较了不同转移模型的特征和体内体外评估转移相关基因功能的方法,以期为胃癌转移机制研究和筛选新的治疗靶点提供实验工具。

**【关键词】** 胃癌;转移基因;筛选模型;鉴定方法

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0112-06

## Screening and identifying gastric cancer metastasis-related genes using animal models

MAO Yuning<sup>1,2</sup>, GUO Wenwen<sup>1,2</sup>, ZHAO Jumei<sup>1\*</sup>, SHI Changhong<sup>2\*</sup>

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China.

2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

**【Abstract】** Gastric cancer is one of the most serious malignant tumors worldwide, and metastasis is the main cause of its high mortality. The identification of genes related to gastric cancer metastasis could help to understand the developmental mechanism of gastric cancer, which will provide a foundation for the prevention and targeted therapy of gastric cancer. In this paper, we review the latest research progress in the use of animal models to screen gastric cancer metastasis-related genes and to study gene function identification method. We focus on the characteristics of different metastasis models and the method for evaluating metastasis-related gene function *in vitro* and *in vivo*. This review aims to present the ideal experimental tools for the study of the mechanism of gastric cancer metastasis and the screening of new therapeutic targets.

**【Keywords】** gastric cancer; metastatic gene; screening model; identification method

全球每年新发胃癌人数约有 95 万,死亡近 70 万,是危害最严重的肿瘤之一<sup>[1]</sup>。胃癌发病早期临床症状不明显,就诊时可能已经发生转移,预后不

良,是造成胃癌死亡率高的的重要原因之一,因此在胃癌诊断和治疗中需要一些转移相关标志物,以提高诊断的精确性,指导针对性治疗。转移相关基因

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31772546)。

**【作者简介】** 毛玉宁(1998—),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。E-mail: yuningmao98@163.com

**【通信作者】** 师长宏(1973—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

赵菊梅(1970—),女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。E-mail: jzm2003.stu@163.com

\* 共同通信作者

在胃癌转移中发挥着重要作用,开展转移相关基因的研究有利于及时发现早期转移、筛选新的标志物和治疗靶点,从而提高患者的生存率。利用动物模型筛选胃癌转移相关基因,充分模拟体内肿瘤转移发生的过程,转移效率高,表型特征明确,具有较好的临床相似性。本文就筛选胃癌转移相关基因的动物模型、监测动物模型中肿瘤转移的方法及转移相关基因功能鉴定进行综述,以期对胃癌转移机制研究和筛选新的治疗靶点提供有效的实验工具。

## 1 基于动物模型筛选转移相关基因

### 1.1 利用细胞异种移植模型筛选转移相关基因

细胞异种移植 (cell line derived xenograft, CDX) 模型是指将培养的肿瘤细胞移植到免疫缺陷小鼠构建的肿瘤模型。CDX 模型所用细胞系是经过多代体外培养,其生物学特征变化明显,部分适应体外培养、具有转移潜能的肿瘤细胞系被筛选出来,易于获得转移模型。CDX 模型的建立可以通过皮下注射、腹腔注射、尾静脉注射等方式实现。Zhu 等<sup>[2]</sup>通过裸鼠后肢皮下注射胃癌细胞系 BGC-823 建立了异种移植模型,发现 miR-106a 有通过靶向 Smad7 促进肿瘤生长的潜力,同时发现 miR-106a 与胃癌发生腹膜转移相关。目前研究发现胃泌素水平与胃癌发展密切相关,Zu 等<sup>[3]</sup>通过裸鼠皮下注射人胃癌细胞系 SGC-7901 成功建立细胞异种移植模型,发现胃泌素可以通过激活 ERK-P65-miR23a/27a/24 轴抑制低分化胃癌细胞的增殖并增强顺铂对胃癌的抑制作用。建立 CDX 模型时也可使用带有生物酶标记的肿瘤细胞,有助于动态监测体内肿瘤转移情况,为转移相关基因的筛选提供便利。Miwa 等<sup>[4]</sup>用稳定表达荧光素酶的 MKN1 (MKN1-luc) 和 MKN45 (MKN45-luc) 胃癌细胞以及 N87、KATO III、NUGC4、OCUM-1 胃癌细胞注射裸鼠腹腔成功建立腹腔转移模型,通过将 MKN1-Luc 和 MKN45-Luc 直接注射到小鼠门静脉成功建立了肝转移模型。

由于建立 CDX 模型使用的是传代细胞系,缺乏人体内肿瘤生长的微环境,因此不能很好的模拟人体内肿瘤的生长及转移情况。患者源性肿瘤细胞 (patient-derived cell models, PDC) 模型其所用细胞是从患者腹水、胸腔积液等恶性积液中分离出的患者源性肿瘤细胞,因此更能反映患者的个体化特征,在肿瘤转移相关基因的筛选和临床药物筛选方面体现出独特优势。Lee 等<sup>[5]</sup>用从转移癌患者收集的细胞建立了 PDC 模型,研究发现原发肿瘤与子代

PDC 模型的基因组改变高度一致,平均变异等位基因频率相关性为 0.878,进一步比较了原发肿瘤 P0、P1、P2 细胞的基因组特征,发现三个样本 (P0、P1 和 P2 细胞) 高度相关,且该模型的药物反应体现了患者对靶向药物的临床反应。通过转移患者源性肿瘤细胞建立的 PDC 模型虽然能反映患者的个体化特征,但其是在体外培养,培养难度大且不能模拟体内肿瘤转移过程,因此用该模型筛选转移相关基因的使用受限。通过上述 CDX 模型和 PDC 模型筛选出的转移相关基因有利于发现促进胃癌转移的相关分子,为临床及早发现胃癌转移提供帮助。

### 1.2 利用患者源性异种移植模型筛选转移相关基因

患者源性异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型改善了 CDX 模型和 PDC 模型的不足,是目前筛选转移相关基因较好的模型。该模型是将临床新鲜的手术标本移植到免疫缺陷小鼠体内建立的异种移植模型,其保持了原发肿瘤生长的微环境,因此更能模拟体内肿瘤的生物行为。PDX 模型较好的保留了患者肿瘤的组织学、基因组、细胞异质性和药物反应特性,可以通过整合临床数据、基因组资料和药物反应性数据来指导靶向治疗,应用于个性化药物选择、生物标志物的开发以及转移相关基因的筛选<sup>[6]</sup>。PDX 模型较好地保留了患者肿瘤组织学及基因组特征,便于利用该类模型对胃癌发生发展过程进行分析研究。Choi 等<sup>[7]</sup>成功建立了 15 例胃癌 PDX 模型,结果发现肿瘤模型的组织学和遗传特征在随后的传代中保持稳定,并与原发肿瘤高度一致,这一发现使利用 PDX 模型进行胃癌发展机制的分子研究和个体化治疗成为可能。PDX 模型与原发肿瘤具有相对一致的基因组学特征,这非常有利于个体化转移相关基因的筛选。Zhang 等<sup>[8]</sup>成功建立了 32 个胃癌 PDX 模型,发现 FGFR2、MET、ERBB2 的基因扩增在 PDX 模型和它们的亲本肿瘤之间相似程度很高,PTEN 与 MET 蛋白表达也呈中度一致,这些数据为个体化治疗的体内测试和转移相关基因的筛选提供理论基础。建立 PDX 模型时组织移植的方法有很多,包括皮下移植、肾包膜移植、原位移植等,其中皮下移植是最常用的移植方式。Guo 等<sup>[9]</sup>通过皮下移植建立胃癌 PDX 模型,揭示了 ISL1 通过结合 ZEB1 启动子和辅助因子 SETD7 促进胃癌转移的分子机制,ISL1 可能是胃癌潜在的预后标志物。由于原位移植瘤所处的微环境更接近于人体环境,因此原位移植较皮下移植更能模拟人体内肿瘤的生长情况,更容易模拟

临床发生转移,有利于筛选转移相关基因。王洁等<sup>[10]</sup>通过皮下移植建立 14 例胃癌 PDX 模型,但均未发生转移,进一步原位移植成功建立 3 例胃癌 PDX 模型,其中 C19751 发生肝和肺的转移,通过 PCR-Array 分析显示与原发瘤比较有三个基因表达显著上调,包括趋化因子 CXCL12、胰岛素样生长因子 1 受体(IGF1R)和基质金属蛋白酶 2(MMP2)。PDX 模型含有的患者基质成分会随着传代数的增加而发生变化<sup>[11]</sup>,因此在利用 PDX 模型作为临床前研究模型时,低代次的 PDX 模型更能反映患者的个体化特征,更有利于转移相关基因的研究。总之,PDX 模型能较好的保留患者肿瘤的基因组特征,关键基因的表达与患者肿瘤较一致,为 PDX 模型筛选转移相关基因提供理论依据。

## 2 转移动物模型的检测

及时、准确的检测转移的发生对于肿瘤模型的研究非常重要,目前检测肿瘤转移的方法主要有 ALU-PCR、生物荧光成像的可视化患者来源原位移植转移瘤模型(imageable patient-derived orthotopic xenograft, iPDOX)、近红外荧光(near infrared fluorescence, NIRF)。ALU 的检测需要处死动物,而 NIRF 和 iPDOX 技术可以通过成像系统无损伤并动态的监测动物模型中肿瘤的转移情况。

ALU-PCR 是一种非常灵敏的检测技术,可以从不同来源基因组 DNA 样品中特异性的扩增出人的 ALU 基因序列。由于 ALU 家族是基因组中的一种重复序列且仅存于灵长类基因组,小鼠体内组织中并不存在,因此当动物肿瘤模型发生转移时可以通过 PCR 检测 ALU 基因表达情况,从而评估各组织脏器的转移程度。同时 ALU 在原发瘤和转移瘤中的表达也存在差异,Schneider 等<sup>[12]</sup>通过 ALU-PCR 检测发现在肺内转移的 6 例病例中,有 5 例(83%)发现了具有信息性的等位基因带型,而在肺外转移的 14 例病例中,有 9 例(64%)发现了等位基因带型,与正常肺组织或原发性肺肿瘤组织相比,转移瘤细胞中检测到了多种基因组变化。该方法评估转移具有创伤性,需要在处死荷瘤鼠后取其组织检测,因此使用受限。

iPDOX 是通过病人肿瘤组织建立的原位移植小鼠模型,该模型可以复制患者肿瘤生物学行为,包括转移、侵袭、凋亡等。iPDOX 可以通过活体荧光成像系统对原位移植瘤的生长、转移进行动态监测,实时动态的观察肿瘤的增殖以及转移情况。

Kawaguchi 等<sup>[13]</sup>在广泛表达红色荧光蛋白的转基因裸鼠中培养患者胃平滑肌肉瘤,以稳定标记肿瘤间质,建立了可成像的 PDOX(iPDOX)模型。虽然该模型可以直接观察到肿瘤的转移,但模型建立过程繁琐、需要特异性工具鼠、实验周期长、成本较高,目前在筛选转移相关基因方面应用较少。

聚甲基川菁染料是一类具有肿瘤靶向性的近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF)染料,该染料荧光背景低、组织穿透能力强,可用于肿瘤模型的活体成像。研究发现七甲川花菁类 NIRF 染料不仅具有成像功能还可以特异性的识别肿瘤细胞,这种识别与 HIF1 $\alpha$ /OATPs 信号分子的活化密切相关,因为大部分肿瘤组织内存在缺氧和 OATP 的高表达,所以该类染料可以在肿瘤细胞内特异性集聚,可用于监测体内肿瘤生长及转移情况<sup>[14]</sup>。赵宁宁等<sup>[15]</sup>研究发现 NIRF 染料 IR-783 可以特异性识别胃癌肿瘤细胞和胃癌 PDX 移植瘤,这使得动态监测胃癌 PDX 模型的转移成为可能,为通过 PDX 模型筛选转移相关基因提供技术支持。

## 3 筛选转移相关基因方法

成功建立动物模型并检测到转移后,提取原发瘤和转移瘤的 RNA 或者 DNA 进行转移相关基因的筛选。常用的筛选方式包括微阵列分析以及 PCR 阵列。微阵列分析可以同时大量探针固定于支持物上,一次性对样品大量序列进行检测,因此解决了传统核酸印迹杂交技术操作繁杂、检测序列数量少、检测效率低等问题,Wang 等<sup>[16]</sup>通过阵列分析发现有 28 个 miRNAs 在浸润型胃癌中有差异表达,在这 28 个 miRNA 中,miR-29b 是下调最显著的 miRNA 之一,miR-29b 通过与 MMP2 的 miRNA 反应元件(miRNA response element, MRE)结合负调控 MMP2,进而影响胃癌的发展。PCR Array(又称 PCR 阵列)是目前研究基因表达的首选技术,该技术在微阵列高通量的基础上结合 PCR 的高灵敏度和特异性,可以更加快速、准确的反映基因表达情况。Sandoval 等<sup>[17]</sup>对转染了 miR-335 的细胞进行 PCR 阵列检测,发现在参与胃癌转移和肿瘤侵袭的 62 个基因中,有 19 个(30.6%)的转录水平下降,进一步网络富集分析将这些基因缩小到 9 个(PLAUR、CDH11、COL4A2、CTGF、CTSK、MMP7、PDGFA、TIMP1、TIMP2)。

## 4 转移相关基因功能鉴定方法

筛选出胃癌转移相关基因后,可进一步通过体

内和体外实验来鉴定转移基因对于胃癌发生发展的影响。

#### 4.1 体内实验

胃癌转移相关基因体内鉴定实验主要是通过构建敲低或敲高目的基因的胃癌细胞株后,将其注射到小鼠体内建立 CDX 模型,观察目的基因的表达变化对于肿瘤的影响。Ding 等<sup>[18]</sup>将 CTHRC1 siRNA 转染人胃癌细胞株后,通过嘌呤霉素持续筛选稳定转染的细胞,发现 siRNA 降低 CTHRC1 表达后胃癌细胞的迁移和侵袭能力下降。Gao 等<sup>[19]</sup>为了探讨 NEAT1 在胃癌发生发展过程中的生物学作用,建立了 NEAT1 低表达和过表达胃癌细胞株,RT-qPCR 确认 si-NEAT1 加入后显著降低了胃癌细胞中 NEAT1 的表达,进一步研究发现 NEAT1 促进胃癌细胞迁移及侵袭,并与患者较差的生存率相关。已报道转移相关基因可以通过不同的途径影响胃癌细胞,主要包括上皮间质转化<sup>[20]</sup>、RUNX3<sup>[21]</sup>、C-MYC<sup>[22]</sup>信号通路等。上皮间质转化是影响胃癌发生发展的主要因素之一,Chen 等<sup>[23]</sup>通过研究发现异核核糖核酸蛋白 A1(hnRNPA1)在体内外均促进了胃癌细胞的上皮间质转化,将高表达 hnRNPA1 的细胞株经尾静脉注射到小鼠体内,发现 hnRNPA1 高表达可显著诱导小鼠体内肿瘤的生长,并促进肺转移。Zhang 等<sup>[24]</sup>通过小鼠腹腔注射转染过表达 SALL4(锌指转录因子)和沉默 SALL4 的稳定细胞株建立 CDX 模型,发现 SALL4 低表达抑制了体内肿瘤的生长,而 SALL4 的过表达促进体内肿瘤的生长,进一步研究发

现 SALL4 通过激活 TgF- akt /sMaD 信号通路,诱导上皮间质转化,从而促进胃癌转移。Runt 相关转录因子 3(RUNX3)与胃癌细胞的增殖和侵袭密切相关,Song 等<sup>[25]</sup>给胃癌荷瘤鼠分别注射 miR-17-5p 激动剂和拮抗剂,发现 miR-17-5p 激动剂可显著促进体内肿瘤的生长。C-MYC 和 TGF-CADT 信号通路与胃癌发生发展密切相关,Xu 等<sup>[26]</sup>将低表达环状 RNA CCDC66 的 SGC-7901 细胞皮下注射到小鼠体内,发现肿瘤生长缓慢,进一步研究发现环状 RNA CCDC66 通过调节 C-MYC 和 TGF-CADT 信号通路促进胃癌进展,并有可能成为胃癌转移的生物标志物。上述体内实验能较好的反映基因在体内对于肿瘤的影响,对于研究基因的功能非常必要(表 1)。

#### 4.2 体外实验

体外鉴定转移相关基因功能的实验主要包括伤口愈合实验、Transwell 实验、集落形成实验、细胞增殖实验、流式检测细胞周期及细胞凋亡实验等。伤口愈合和 Transwell 实验都可以检测细胞的迁移能力,后者也可检测细胞侵袭能力。Liu 等<sup>[27]</sup>通过伤口愈合实验和 Transwell 实验发现高表达 DCLK1 的胃癌细胞迁移和侵袭明显增强,SNHG1 通过 DCLK1 介导的 Notch1 通路增强胃癌细胞上皮间质转化过程,从而促进胃癌发展。已证实长链非编码 RNA 与肿瘤的发生发展密切相关,Shuai 等<sup>[28]</sup>通过伤口愈合和 Transwell 实验发现过表达 MNX1-AS1 可显著促进胃癌细胞的迁移和侵袭,而降低 MNX1-AS1 表达则产生相反的作用,进一步研究发现

表 1 影响胃癌转移的主要基因和信号通路举例(体内鉴定)

Table 1 Examples of major genes and signaling pathways that influence metastasis of gastric cancer (Identification *in vivo*)

相关基因 Related gene	靶向基因 Targeted gene	模型建立方法 Modeling method	选用细胞系 Selection of cell line	对胃癌的影响 Effects on gastric cancer	文献来源 References
HnRNPA1 高表达 HnRNPA1 high expression	上皮间质转化 Epithelial to mesenchymal transformation	慢病毒转染 CDX(BGC-823) Lentivirus transfection CDX(BGC-823)	AGS BGC-823	促进 Promotion	[23]
SALL4 高表达 SALL4 high expression	上皮间质转化 Epithelial to mesenchymal transformation	过表达 SALL4 质粒 沉默 SALL4 CDX(MGC-803) Overexpression of SALL4 plasmid Silence SALL4CDX(MGC-803)	MGC-803 HGC-27	促进 Promotion	[24]
MiR-17-5p	RUNX3	miR-17-5 激动剂 miR-17-5 拮抗剂 miR-17-5tagomir miR-17-5 antagomir	SGC-7901 MKN-45	促进 Promotion	[25]
环状 RNA CCDC66 Circular RNACCDC66	c-Myc TGF- akt	慢病毒转染 CDX(SGC-7901) Lentivirus transfection CDX(SGC-7901)	BGC-823 MGC-803 SGC-7901 HGC-27	促进 Promotion	[26]

**表 2** 影响胃癌转移的主要基因和信号通路举例(体外鉴定)  
**Table 2** Examples of major genes and signaling pathways affected by metastasis-related genes in gastric cancer  
 (Identification *in vitro*)

相关基因 Related gene	基因靶向 Targeted gene	选用细胞系 Selection of cell line	体外鉴定方法 <i>In vitro</i> identification method	对胃癌影响 Effects on gastric cancer	来源文献 References
LncRNA SNHG1	miR-15b/DCLK1/ Notch1	GES-1, SGC7901, MKN-28, N-87	Transwell, 划痕实验, 细胞增殖 实验 Transwell, Scratch assay, Cell proliferation assay	促进 Promotion	[27]
LncRNA MNX1-AS1	BTG2, BCL2	MGC803, SGC7901, BGC823, GES-1	细胞增殖实验, 流式细胞术, 集 落形成实验, Transwell, 划痕实验 Cell proliferation assay, Flow cytometry assay, Colony formation experiment, Transwell, Scratch assay	促进 Promotion	[28]
LncRNA HOXC-AS3	YBX1	SGC7901, BGC823, GES-1	细胞增殖实验, 流式细胞术, 集 落形成实验, Transwell Cell proliferation assay, Flow cytometry assay, Colony formation experiment, Transwell	促进 Promotion	[29]
MDGA2	DMAP1	AGS, BGC823, MKN-1	集落形成实验, 流式细胞术, 细 胞增殖实验 Colony formation experiment, Flow cytometry assay, Cell proliferation assay	抑制 Inhibition	[30]

MNX1-AS1 通过抑制 BTG2 和上调 BCL2 的表达促进胃癌发展。也有一些基因通过影响细胞周期及细胞凋亡进而影响肿瘤发生发展,因此通过流式分析细胞周期及凋亡可以验证转移基因功能。Zhang 等<sup>[29]</sup>发现在敲除 HOXC-AS3 基因后,胃癌细胞在 G1-G0 期显著停滞,下调 HOXC-AS3 后胃癌细胞凋亡明显增加,异常组蛋白修饰激活的 HOXC-AS3 在胃癌的发生过程中发挥了重要作用,并可能作为胃癌诊断和治疗的靶点。细胞增殖实验和集落形成实验可以检测肿瘤细胞的增殖能力,Wang 等<sup>[30]</sup>人发现 MDGA2 可以显著抑制胃癌细胞增殖及菌落形成,MDGA2 的抗肿瘤作用通过直接稳定 DNA 甲基转移酶相关蛋白 1(DMAP1)实现。上述体外实验周期短、操作简单、影响因素少,是转移基因功能鉴定中不可缺少的环节。但体外实验类型较多,在选择体外鉴定实验时应关注目的基因对于肿瘤细胞能力影响方面均选取相应的实验,例如,可分别选择增殖、凋亡、迁移和侵袭能力检测等(表 2)。

## 5 展望

成功建立高保真的 PDX 模型和 CDX 模型为胃癌转移相关基因的筛选奠定了良好基础,但如何模拟人体微环境促发肿瘤转移是急需解决的问题。

近年来,人源化小鼠模型和斑马鱼模型的开发为筛选胃癌转移相关基因增添了新的实验工具。通过重度联合免疫缺陷小鼠移植人的 PBMC 或 CD34<sup>+</sup>造血干细胞构建的人源化小鼠模型,可以更好的模拟在人体免疫系统存在下肿瘤细胞的迁移能力、侵袭能力、转移特性<sup>[31]</sup>,但该类模型构建周期长、实验过程繁琐、影响因素多,经济成本高。斑马鱼模型近年来也成为一种重要的肿瘤生物模型,斑马鱼在早期没有免疫力,移植入肿瘤细胞后成瘤性较好,转移性强,同时斑马鱼模型易于观察、实验周期短、费用较低。Wu 等<sup>[32]</sup>将两株人胃癌细胞(AGS 和 SGC-7901)以及 14 个人胃癌组织原代细胞异种移植到斑马鱼胚胎中,建立基于斑马鱼胚胎的异种移植模型,其中有 9 例移植成功,并在活胚胎中显示出增殖、血管生成和转移潜能,该模型有可能成为未来胃癌转移研究的潜在实验平台。总之,依据人体肿瘤转移模型筛选转移相关基因,能够有效加快人们对于胃癌转移分子机制的认识,便于发现更多转移标志物及治疗靶点,从而使大量的胃癌患者受益。

## 参考文献:

- [1] Van CE, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2016, 388: 2654-2664.
- [2] Zhu M, Zhang N, He S, et al. Exosomal miR-106a derived from

- gastric cancer promotes peritoneal metastasis via direct regulation of Smad7 [J]. *Cell cycle*, 2020, 19(10): 1200–1221.
- [ 3 ] Zu LD, Peng XC, Zeng Z, et al. Gastrin inhibits gastric cancer progression through activating the ERK-P65-miR23a/27a/24 axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 115.
- [ 4 ] Miwa T, Kanda M, Umeda S, et al. Establishment of peritoneal and hepatic metastasis mouse xenograft models using gastric cancer cell lines [J]. *In Vivo*, 2019, 33: 1785–1792.
- [ 5 ] Lee JY, Kim SY, Park C, et al. Patient-derived cell models as preclinical tools for genome-directed targeted therapy [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25619–25630.
- [ 6 ] Cho SY, Kang W, Han JY, et al. An integrative approach to precision cancer medicine using patient-derived xenografts [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(2): 77–86.
- [ 7 ] Choi YY, Lee JE, Kim H, et al. Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as paraclinical models for gastric cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22172.
- [ 8 ] Zhang T, Zhang L, Fan S, et al. Patient-derived gastric carcinoma xenograft mouse models faithfully represent human tumor molecular diversity [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134493.
- [ 9 ] Guo T, Wen XZ, Li ZY, et al. ISL1 predicts poor outcomes for patients with gastric cancer and drives tumor progression through binding to the ZEB1 promoter together with SETD7 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 33.
- [ 10 ] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 7–12.
- [ 11 ] Ji X, Chen S, Guo Y, et al. Establishment and evaluation of four different types of patient-derived xenograft models [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 122.
- [ 12 ] Schneider T, Osl F, Friess T, et al. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR-an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19(7): 571–582.
- [ 13 ] Kawaguchi K, Igarashi K, Murakami T, et al. Combination of gemcitabine and docetaxel regress both gastric leiomyosarcoma proliferation and invasion in an imageable patient-derived orthotopic xenograft (iPDOX) model [J]. *Cell Cycle*, 16(11): 1063–1069.
- [ 14 ] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 $\alpha$ /OATPs signaling axis [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(28): 8175–8185.
- [ 15 ] 赵宁宁, 张彩勤, 赵勇, 等. 近红外荧光染料对胃癌细胞的特异性识别 [J]. *科学技术与工程*, 2016, 16(17): 17–21.
- [ 16 ] Wang T, Hou JJ, Jian S, et al. miR-29b negatively regulates MMP2 to impact gastric cancer development by suppress gastric cancer cell migration and tumor growth [J]. *J Cancer*, 2018, 9(20): 3776–3786.
- [ 17 ] Sandoval B, Alejandra, Polakovicova I, et al. microRNA-335-5p is a potential suppressor of metastasis and invasion in gastric cancer [J]. *Clinical Epigenetics*, 2017, 9(1): 114.
- [ 18 ] Ding X, Huang R, Zhong Y, et al. CTHRC1 promotes gastric cancer metastasis via HIF-1 $\alpha$ /CXCR4 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109742.
- [ 19 ] Gao M, Liu L, Zhang D, et al. Long non-coding RNA NEAT1 serves as sponge for miR-365a-3p to promote gastric cancer progression via regulating ABCC4 [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 3977–3985.
- [ 20 ] Dong JQ, Wang R, Ren G, et al. HMGA2 – FOXL2 axis regulates metastases and epithelial-to-mesenchymal transition of chemoresistant gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3461–3473.
- [ 21 ] Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. *Cell*, 2002, 109(1): 113–124.
- [ 22 ] Wang S, Tang D, Wang W, et al. CircLMTK2 acts as a sponge of miR-150 – 5p and promotes proliferation and metastasis in gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 162.
- [ 23 ] Chen Y, Liu J, Wang W, et al. High expression of hnRNPA1 promotes cell invasion by inducing EMT in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4): 1693–1701.
- [ 24 ] Zhang X, Zhang P, Shao M, et al. SALL4 activates TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway to induce EMT and promote gastric cancer metastasis [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 4459–4470.
- [ 25 ] Song J, Liu Y, Wang T, et al. miR-17 – 5p promotes cellular proliferation and invasiveness by targeting RUNX3 in gastric cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110246.
- [ 26 ] Xu G, Chen Y, Fu M, et al. Circular RNA CCDC66 promotes gastric cancer progression by regulating c-Myc and TGF- $\beta$  signaling pathways [J]. *J Cancer*, 2020, 11(10): 2759–2768.
- [ 27 ] Liu ZQ, He WF, Wu YJ, et al. LncRNA SNHG1 promotes EMT process in gastric cancer cells through regulation of the miR-15b/DCLK1/Notch1 axis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1): 156.
- [ 28 ] Shuai Y, Ma ZH, Liu WT, et al. TEAD4 modulated LncRNA MNX1 – AS1 contributes to gastric cancer progression partly through suppressing BTG2 and activating BCL2 [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 6.
- [ 29 ] Zhang E, He XZ, Zhang CG, et al. A novel long noncoding RNA HOXC-AS3 mediates tumorigenesis of gastric cancer by binding to YBX1 [J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 154.
- [ 30 ] Wang K, Liang Q, Li X, et al. MDGA2 is a novel tumour suppressor cooperating with DMAP1 in gastric cancer and is associated with disease outcome [J]. *Gut*, 2016, 65(10): 1619–1631.
- [ 31 ] 郭文文, 乔天运, 张彩勤, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 98–104.
- [ 32 ] Wu JQ, Zhai J, Li CY, et al. Patient-derived xenograft in zebrafish embryos; a new platform for translational research in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 160.

桑亚洲,张艳,陈玉龙,等. JAK/STAT3介导肿瘤恶病质肌肉萎缩及药物干预研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 118-124.

Sang YZ, Zhang Y, Chen YL, et al. JAK/STAT3 mediated muscle atrophy in cancer cachexia and drug intervention [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 118-124.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.018

# JAK/STAT3介导肿瘤恶病质肌肉萎缩及药物干预研究进展

桑亚洲,张艳,陈玉龙,吴耀松\*

(河南中医药大学中医药科学研究院 河南省中医方证信号传导重点实验室/河南省中医方证信号传导国际联合重点实验室,郑州 450046)

**【摘要】** 肌肉萎缩是肿瘤恶病质患者最常见并发症,造成肿瘤患者严重的预后不良,多种针对肌肉萎缩的药物对缓解肿瘤恶病质状态具有一定作用,其中 JAK/STAT3 的调控作用引起人们的重视,近几年,针对 JAK/STAT3 信号通路调控肿瘤恶病质肌肉萎缩的作用机制及相关药物干预的基础研究和临床实验应运而生。总结发现 JAK/STAT3 信号通路可通过泛素蛋白酶体系统、自噬溶酶体系统、microRNA 以及肿瘤微环境调控肿瘤恶病质肌肉萎缩,相关的药物可通过干预 JAK/STAT3 信号通路有效缓解肿瘤恶病质肌肉萎缩进程。

**【关键词】** 肿瘤恶病质;JAK/STAT3;肌肉萎缩;泛素蛋白酶体系统;自噬溶酶体系统

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0118-07

## JAK/STAT3 mediated muscle atrophy in cancer cachexia and drug intervention

SANG Yazhou, ZHANG Yan, CHEN Yulong, WU Yaosong\*

(Henan Key Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling, Henan International Joint Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling, Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**【Abstract】** Muscle atrophy is the most common complication in cancer cachexia patients, resulting in a serious prognosis. Various drugs for muscle atrophy have effects on the remission of cancer cachexia. Among them, the regulatory role of JAK/STAT3 has attracted attention. In recent years, the mechanism of JAK/STAT3 signaling regulating sarcopenia in cancer cachexia and related drug intervention has been studied in basic research and clinical experiments. These studies concluded that the JAK/STAT3 signaling pathway can regulate muscle atrophy in cancer cachexia through the ubiquitin proteasome system, the autophagy lysosome system, microRNA and the tumor microenvironment. Specific drugs can effectively alleviate the process of cancer cachexia muscle atrophy by interfering with the JAK/STAT3 signaling pathway.

**【Keywords】** cancer cachexia; JAK/STAT3; muscle atrophy; ubiquitin proteasome system; autophagy lysosome system

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81503490);河南省科技攻关(192102310160);河南中医药大学研究生科研创新项目(2019KYCX049)。

**【作者简介】** 桑亚洲(1993—),男,硕士研究生,研究方向:分子生物学与中医肿瘤方证。E-mail: 767599402@qq.com

**【通信作者】** 吴耀松(1976—),女,教授,硕士,研究方向:分子生物学与中医肿瘤方证。E-mail: linawys@163.com

肿瘤恶病质是一种以体重减轻和肌肉萎缩为主要特征,伴随或不伴随脂肪减少,并且营养支持不能完全逆转,生理机能减退和功能出现障碍为主要特征的综合征<sup>[1]</sup>,这与机体代谢紊乱密切相关,至今尚无有效的药物干预措施可完全逆转恶病质状态<sup>[2-4]</sup>。恶病质的公认诊断标准以体重和体重指数 (body mass index, BMI) 为主要观察指标,即 6 个月内肿瘤患者非意愿性体重降低 >5%; 或 BMI < 20 kg/m<sup>2</sup> 伴体重降低 >2%; 或者四肢骨骼肌质量指数 (appendicular skeletal muscle index, ASMI) 小于 7.26 kg/m<sup>2</sup> (男) 或小于 5.45 kg/m<sup>2</sup> (女) 伴体重降低 >2%<sup>[5]</sup>。其病理生理学特征是食物摄入不足和代谢异常 (包括能量消耗, 过度的分解代谢和炎症) 引起的机体功能和器官严重衰退。大量文献表明, 多个器官参与晚期癌症患者的骨骼肌丢失, 如中枢神经系统调节<sup>[6]</sup>、白色脂肪组织损失<sup>[7]</sup>、胰腺功能障碍<sup>[8]</sup>、肝代谢失衡<sup>[9]</sup>、骨骼和肌肉的相互作用<sup>[10]</sup>、肠道菌群变化<sup>[11]</sup> 均可以诱发机体能量失衡和体重丢失, 导致严重的肿瘤恶病质肌肉萎缩, 已成为癌症相关恶病质发展的重要因素<sup>[12-13]</sup>。JAK/STAT3 信号通路是一条多种细胞因子共用的信号传导途径, 在调控细胞增殖、凋亡、血管新生等多个方面承担着关键作用, 在肿瘤恶病质的发生发展中也发挥重要的调节作用, 相关研究表明 JAK/STAT3 信号通路是引起肿瘤恶病质肌肉萎缩的关键环节, 现总结如下:

### 1 JAK/STAT3 信号通路介导的肿瘤恶病质肌肉萎缩机制

Janus 激酶 (Janus kinase, JAK), 是一个细胞内非受体酪氨酸激酶家族, 可介导细胞因子产生的信号, 并通过 JAK/信号传导及转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT) 信号通路传递。JAK/STAT 信号通路参与将信息从细胞外多肽信号传递到细胞核中的靶基因启动子。该途径是通过细胞因子配体与细胞表面细胞因子受体的结合而启动, 配体的结合触发 JAK 的活化, 而活化的 JAK 可以磷酸化受体上的关键酪氨酸残基, 从而通过其 SH2 结构域 (src homology 2, SH2) 募集特定的 STAT 形成二聚体, 并在输入蛋白  $\alpha$  (importin- $\alpha$ ) 的转运下进入细胞核与特定的 DNA 靶标结合进而发挥其调控细胞生长、分化、增殖, 凋亡等一系列生理病理作用<sup>[14-15]</sup>。STAT 有多个蛋白家族, 包括 (STAT1、STAT2、STAT3、STAT5A、STAT5B、

STAT6), 其中 STAT3 的蛋白和基因表达是造成肿瘤恶病质肌肉萎缩的关键。肿瘤恶病质相关的临床实验观察中发现一些炎症因子可以活化 JAK/STAT3 信号通路引起 STAT3 过表达, 相反的, 通过使用 JAK 或 STAT3 抑制剂可有效减缓肌肉萎缩进程<sup>[16]</sup>。在 C26 结肠癌肿瘤恶病质动物模型的骨骼肌中可发现 STAT3 磷酸化和其靶向核基因被激活, 通过激活 C2C12 成肌细胞中的 STAT3 表达可诱导肌纤维萎缩并加剧肌肉消耗<sup>[17]</sup>。

骨骼肌是高度可塑性的组织, 当有外源性或内源性刺激时, 其质量和代谢功能会发生改变, 这种改变是骨骼肌维持正常动态平衡的关键。骨骼肌的动态平衡主要通过分解代谢和合成代谢实现的。合成代谢平衡在生长因子, 营养物质利用和身体活动等作用下调节, 主要通过胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors-1, IGF1)/磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)/雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号传导途径和肌生长抑制素 (myostatin) - smad2/3 途径的激活来促进蛋白质的合成; 分解代谢平衡主要通过泛素蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 和自噬体溶酶体途径的激活来促进蛋白质降解导致骨骼肌质量损失<sup>[18-19]</sup>。在肿瘤恶病质的相关研究中, JAK/STAT3 信号通路对泛素蛋白酶体途径和自噬途径均有调控作用, 可通过降解机体内蛋白质造成骨骼肌大量丢失, 是造成肿瘤恶病质肌肉萎缩的两种关键途径。

#### 1.1 JAK/STAT3 激活可通过泛素蛋白酶体系统降解蛋白质加速骨骼肌萎缩

UPS 是细胞内蛋白质降解的主要途径, 参与细胞内 80% 以上蛋白质的降解。泛素化步骤主要为 E1 活化泛素分子, 活化的泛素分子转移至 E2, 在 E3 催化下活化的泛素羧基和靶蛋白赖氨酸侧链的氨基形成异肽键, 靶蛋白被泛素化、蛋白酶体识别并降解靶蛋白。其中, E3 催化泛素分子转移到靶蛋白上是 UPS 的限速步骤, 而肌肉萎缩基因 (muscle atrophy f-box, MAFbx/Atrogin-1) 和肌肉特异性环指基因 1 (muscle ring finger 1, MuRF1) 正是导致肌肉降解的 E3 酶<sup>[20]</sup>。在 C26 结肠癌与 C2C12 成肌细胞共培养中, C2C12 肌管中的 STAT3 (p-STAT3) 被激活, 且 p-STAT3 可诱导两种蛋白水解途径, 一种是通过 CAAT 区/增强子结合蛋白  $\delta$  (CAAT/

enhancer-binding protein  $\delta$ , C/EBP $\delta$ ) 激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase, caspase-3), 被激活的 caspase-3 不仅裂解肌动球蛋白, 为 UPS 降解提供底物, 还刺激 26 S 蛋白酶体(UPS 中关键蛋白酶)的蛋白质降解, 即与 UPS 相互作用以增加肌肉蛋白质的降解<sup>[21]</sup>; 另一种是 p-STAT3 对 UPS (MAFbx/Atrogin-1 和 MuRF-1) 的激活, 在体内外均发现, 当 STAT3 被磷酸化后激活刺激 MuRF-1 和 MAFbx/Atrogin-1 的基因和蛋白表达增加, 而抑制 STAT3 激活可有效减少蛋白水解, 增加肿瘤恶病质小鼠的体重、肌肉质量、肌肉抓力, 降低比目鱼肌和趾长肌肌肉中蛋白质的降解率<sup>[22]</sup>。另外, 一项针对 C26 小鼠腓肠肌萎缩和 C2C12 成肌细胞的实验发现, 通过抑制 STAT3 的活性可有效减缓 C26 小鼠的肌肉消耗以及 IL-6 诱导的 C2C12 肌管萎缩, 其机制可能是当 STAT3 被抑制后可降低 MAFbx/Atrogin-1 和 MuRF-1 的表达, 进而有效保持肌肉质量<sup>[23]</sup>。以上研究表明在肌肉蛋白质降解过程中 STAT3 介导的 UPS 发挥关键的作用。

## 1.2 JAK/STAT3 可通过激活自噬溶酶体系统调控自噬并引起肌肉萎缩

自噬的发生是自噬体与溶酶体的融合形成自噬溶酶体, 其作用是靶向清除蛋白质和受损细胞器等<sup>[24]</sup>。自噬主要有四个步骤: 包括诱导阶段、启动阶段、延长阶段、成熟降解阶段, 主要参与的分子有 Atg1/ULK1、Atg6/Beclin1、Atg8/LC3B、p62/SQSTM1。生理状态下, 自噬以一种低速率保持稳态, 以维持细胞正常的代谢需要和细胞器的更新, 但在不同的应激刺激下, 自噬对肌肉质量的保持是双向性的, 当自噬被长期抑制时, 可引起肌无力、肌萎缩; 当自噬过度激活可引起骨骼肌蛋白的水解加速, 进而引起肌肉萎缩<sup>[25-26]</sup>。

STAT3 对自噬的调控也是双向性的, 胞质中的 STAT3 单体在 Tyr705 上被 Src 或 JAK 激酶磷酸化, 然后形成 STAT3 二聚体, 入核与特定的 DNA 结合, 通过转录激活或抑制自噬相关靶基因, 例如 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, BCL2)、自噬基因 BECN1、低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 和 BCL2 和腺病毒 E1B19 $\times 10^3$  相互作用蛋白 3 (bcl2/adenovirus e1b interacting protein 3, BNIP3) 基因等, 并根据不同的环境刺激抑制或促进自噬。另外, 胞质中未磷酸化的 STAT3 可有效抑制真核翻译启动因子 2- $\alpha$  激酶 2 (eukaryotic translation

initiation factor 2- $\alpha$  kinase 2, EIF2 $\alpha$ K2)、叉头状转录因子 O1 (forkhead transcription factor O1, FoxO1) 和叉头状转录因子 O3 (forkhead transcription factor O3, FoxO3) 基因, 其中 EIF2AK 基因可通过磷酸化 EIF2A 来促进自噬; FOXO1 和 FOXO3 基因可通过转录激活一系列自噬相关基因来促进自噬<sup>[27]</sup>。在三种不同的癌症恶病质实验模型中, 通过评估自噬降解途径中具有代表性的标志物 BECLIN-1、LC3B、p62/SQSTM1 的蛋白和基因表达水平, 表明了肌肉萎缩与自噬激活的正相关<sup>[28]</sup>。通过分析食管癌恶病质患者肌肉中相关自噬基因 LC3B、p62/SQSTM1 的过表达, 说明自噬溶酶体可能通过激活蛋白水解系统参与人类癌症恶病质肌肉萎缩的发展<sup>[29]</sup>。另外, 在肿瘤的发生发展进程中自噬与凋亡也发生相互拮抗作用, 自噬通过为肿瘤细胞提供能量, 抑制其凋亡进程<sup>[30]</sup>。

## 1.3 JAK/STAT3 与 microRNA-17 的相互作用在肿瘤恶病质肌肉萎缩中的机制研究

MicroRNA (miRNA) 是细胞基因表达调节剂的一部分, 可以显著改变细胞的表型特征, 相关的动物研究通过筛选多种 microRNA 的功能及其在小鼠乳腺癌转移中发挥的作用, 表明 microRNA 在癌症转移中具有相关性<sup>[31]</sup>。相关 miRNA 和共调节因子可作为特定靶标, 激活 JAK/STAT3 诱导特定表型表达<sup>[32]</sup>, 在一项基于癌症恶病质肌肉消瘦研究的 miRNA 调控网络 Meta 分析表明 miR-17 与肌肉萎缩有关, 其机制是 miR-17 可通过抑制 STAT3 活性而发挥作用<sup>[33]</sup>。当 JAK/STAT3 信号通路受到抑制时, 可导致 miR-17 和 miR-20a 的过表达, 相关分析还表明 miR-17 与 JAK2 表达密切相关<sup>[34]</sup>。另外, STAT3 是 miR-17 的靶向分子, 经双荧光素酶报告系统实验发现, miR-17 的激活可以下调 STAT3, p-STAT3 和 BCL2 的表达而抑制人前列腺癌细胞 (LNCaP) 增殖并诱导细胞凋亡, 其机制可能是 miR-17 与 STAT3 mRNA 3'UTR 结合而抑制其表达<sup>[35]</sup>。另外, 有关 miR-17-92 簇干预骨骼肌分化的机制具有双向性, 其中 miR-17 和 miR-20a 可以有效促进 C2C12 成肌细胞和原代细胞的分化, 但 miR-18a 可能在 C2C12 细胞分化中起负作用<sup>[36]</sup>。因此, miR-17 对肿瘤恶病质肌肉萎缩有抑制作用, 其作用机制与抑制 JAK/STAT3 的表达密切相关。

## 1.4 JAK/STAT3 促进肿瘤微环境生成加速肿瘤恶病质形成

JAK/STAT3 信号传导对于微环境中的肿瘤-宿

主相互作用非常重要。目前普遍认为,肿瘤微环境对肿瘤的生长和侵袭作用是不可或缺的<sup>[37]</sup>。JAK/STAT 信号通路介导的 STAT3 激活在促进肿瘤细胞增殖分化和诱导侵袭中发挥重要作用,除充当信号传导和转录作用外,STAT3 还可以通过表观遗传来激活相关基因和蛋白表达,促进上皮间质转化,对肿瘤微环境的形成有促进作用<sup>[38-39]</sup>。JAK/STAT 信号通路参与机体免疫调节过程,比如 STAT1 和 STAT2 在抗肿瘤治疗中发挥重要的作用,其特异性表达可维持有效的免疫反应,但 STAT3 已被证实在肿瘤微环境中参与癌细胞存活,调控免疫抑制,促进炎症反应的作用<sup>[32,40]</sup>。在头颈癌中,IL-6 的过表达可通过激活 JAK/STAT3 介导上皮间质转化增加,导致细胞间连接和细胞极性的丧失,从而增加细胞迁移和侵袭性的可能性<sup>[41]</sup>。肿瘤的恶性程度与转移性病变的发展有关,涉及癌细胞从原发部位向远处器官扩散的复杂过程,肿瘤微环境(肿瘤细胞和周围组织)或大环境(包括循环中释放的肿瘤物质和其他组织分泌的促炎因子)在此期间发挥了关键作用,且这个发展过程会影响肿瘤相关恶病质进展<sup>[42]</sup>,IL-6 在肿瘤生长转移和恶病质的发展方面具有相关性,有研究者发现 IL-6/JAK/STAT3 前馈环驱动肿瘤发生和转移,调控肿瘤微环境的形成,并加速肿瘤恶病质的进程,尤其在肿瘤恶病质期间肌肉质量损失的调节<sup>[43-44]</sup>。由此可认为,JAK/STAT3 的激活还可能通过影响肿瘤微环境导致肿瘤恶病质的进一步恶化。

## 2 药物干预 JAK/STAT3 信号通路减少肿瘤恶病质肌肉萎缩机制研究进展

### 2.1 JAK/STAT3 相关抑制药物干预肿瘤恶病质肌肉萎缩机制研究

使用 STAT3-SH2 结构域模拟物抑制剂(SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase1, SPI)进行体外干预的实验表明,SPI 可特异性的阻断 STAT3 的磷酸化进程,降低 DNA 结合活性和转录功能,广泛引起人乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌和非小细胞肺癌的细胞产生形态变化,影响癌细胞的生存力和凋亡,并且该浓度下的 SPI 几乎不影响 STAT1、STAT5 或促丝裂原活化蛋白激酶途径的诱导和其它 pTyr 的形成,其机制可能是 SPI 充当 STAT3-SH2 结构域和 pTyr 相互作用的特异性抑制剂,同时 SPI 还破坏 STAT3 与 IL-6R/gp130 肽的结合<sup>[45]</sup>。鲁索替尼(ruxolitinib)磷酸盐是一种激酶抑制剂,可抑制

janus 相关激酶 JAK1 和 JAK2,是第一个获准的专门治疗骨髓纤维化的药物,经美国食品与药物管理局批准上市,临床研究表明 ruxolitinib 不仅可有效改善原发性骨髓纤维化患者的输血需求和脾肿大症状,还可以增加患者体重,有效减缓体重耗损,使恶病质状态得到恢复,整体生活质量得到显著改善<sup>[46]</sup>。全身系统性炎症在肿瘤恶病质中普遍存在,炎症因子 IL-6 可激活 UPS 和 JAK/STAT3 信号通路<sup>[47-48]</sup>,而 ruxolitinib 可能通过抑制炎症和 JAK 表达,进而干预肌肉萎缩进程<sup>[49]</sup>。舒尼替尼(sunitinib)是一类能够选择性地靶向多种受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)的新型药物,可用于治疗胃肠道基质肿瘤和转移性肾细胞癌,相关研究表明,sunitinib 能够抑制 STAT3 和 MuRF-1 信号通路的过度激活,有效减缓肿瘤恶病质期间肌肉蛋白质分解代谢进程,并延长肾癌小鼠的生存期<sup>[50]</sup>。在一项研究中,真核生物起始因子 4A(eukaryotic translation initiation factor 4A, eIF4A)抑制剂 hippuristanol(Hipp)可显著降低 IL-6 分泌,降低 p-STAT3 蛋白表达,而对 STAT3 mRNA 水平没有影响,说明该抑制剂可能通过抑制 eIF4A 活性影响 STAT3 的翻译进而防止细胞因子诱导的肌肉消瘦<sup>[51]</sup>。泮托拉唑(pantoprazole)被定义为一种抗酸及抗溃疡药,但在一项恶病质小鼠实验中,pantoprazole 以剂量依赖性方式降低血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平,表明 pantoprazole 减轻肿瘤恶病质所致肌肉萎缩的作用可能与其对炎症因子血清水平的调节有关,该实验还表明 pantoprazole 可作为 JAK/STAT3 途径的抑制剂,不仅有效降低 p-STAT3 表达水平,还通过抑制 UPS 降低 MuRF1 和 Fbx32 蛋白的表达,有效治疗肿瘤恶病质所致的肌肉萎缩和蛋白降解<sup>[52]</sup>。在患有胰腺癌的恶病质小鼠中,JAK2 抑制剂 AG490 可以抑制 JAK2 的磷酸化和 IL-6 的表达水平,有效减缓体重下降进程<sup>[53]</sup>。C188-9 是 STAT3 的小分子抑制剂,经 C188-9 治疗的 C26 肿瘤恶病质小鼠,抑制了 STAT3 的激活以及肌肉中 C/EBP $\delta$  和 UPS 的表达,导致蛋白质合成增加和蛋白质降解减少,并增加小鼠体重,阻止肌肉质量耗损和肌肉纤维的减少<sup>[22]</sup>。

### 2.2 中药有效成分干预 JAK/STAT3 信号通路防治肿瘤恶病质肌肉萎缩机制

欧前胡素(imperatorin, IMP)是当归的主要生物活性成分,具有多种药理作用,如抗结肠炎,抗关

节炎和抗肿瘤,研究表明,IMP 可降低 p-STAT3、MuRF1 和 Atrogin-1/MAFbx 蛋白表达,是治疗肿瘤恶病质肌肉萎缩的潜在药物,其机制可能是 IMP 与 STAT3 的 SH2 结构域结合,进而抑制 JAK/STAT3 和 UPS<sup>[54]</sup>。隐丹参酮是从丹参根中提取的主要亲脂性化合物,已被广泛用于治疗包括癌症在内的各种疾病,有数据显示,隐丹参酮可以抑制恶病质小鼠肌肉中 MuRF1 和 MAFbx/Atrogin-1 的表达,预防肿瘤恶病质体重减轻以及骨骼肌浪费,同时以剂量依赖性(2.5~10 μmol/L)降低了 C2C12 肌管中 MuRF1 和 MAFbx/Atrogin-1 的表达,抑制 STAT3 转录活性,改善肌管萎缩,表明隐丹参酮可通过体内外途径抑制 STAT3 来防止肿瘤恶病质中的肌肉消瘦<sup>[55]</sup>。大蒜是常用和用途广泛的草药之一,研究者在大蒜中发现的一种硫化合物-Z-阿霍烯,其可以通过抑制炎症反应和肌肉蛋白降解以及促进肌肉蛋白质合成来减轻肿瘤恶病质所引起的骨骼肌萎缩,其机制可能是通过抑制 JAK/STAT3 途径并激活 MAPK 途径<sup>[56]</sup>。汇总见表 1。

### 3 总结和讨论

综上所述,JAK/STAT3 信号通路可以从多个途

径介导肿瘤恶病质肌肉萎缩,如通过调控泛素蛋白酶体系统加速骨骼肌蛋白质降解;通过调控自噬溶酶体系统引起肌肉萎缩,另外 microRNA、肿瘤微环境与 JAK/STAT3 信号通路的相互作用可诱导肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭,加速肿瘤恶病质的发生发展。基于以上机制,本文还分析相关药物干预信号通路的临床和基础研究,结果表明 JAK/STAT3 相关抑制药物可在体内外抑制 JAK、STAT3、p-STAT3、IL-6 和 TNF-α 等的表达,并进一步抑制 UPS,相关的靶向干预在临床和基础研究中均有显著的作用,可有效抑制肌肉蛋白降解,减缓肌肉萎缩进程,保持体重,改善晚期肿瘤恶病质患者生活质量。另外一些中药有效成分如 IMP、隐丹参酮、Z-阿霍烯也可以通过干预 JAK/STAT3 信号通路防治肿瘤恶病质肌肉萎缩。

尽管大量的体内外实验和临床观察表明抑制 JAK/STAT3 信号通路可有效减缓肿瘤恶病质肌肉萎缩进程,然而目前仍没有一种专项治理肿瘤恶病质的药物批准上市,一些靶向抑制 JAK 的上市药物如 Ruxolitinib、Tofacitinib,其主要临床应用也并不是用于治疗肿瘤恶病质。另外造成肿瘤恶病质发生的因素除大量蛋白质耗损引起的骨骼肌萎缩外还

表 1 药物干预 JAK/STAT3 信号通路介导肿瘤恶病质肌肉萎缩作用机制

Table 1 Mechanism of drug intervention on JAK/STAT3 signaling pathway mediated muscle atrophy in cancer cachexia

药物 Drugs	分类 Category	靶点 Targets	对象 Objects	作用机制 Mechanism of action	参考文献 Reference
SH2 模拟物 SPI	抑制剂 Inhibitors	STAT3	癌细胞 Cancer cell	1. STAT3(↓), 2. DNA 活性(↓), 3. 癌细胞(↓) 2. DNA activity(↓), 3. Cancer cells(↓)	[45]
鲁索替尼 Ruxolitinib	替尼类抑制剂 Tib inhibitors	JAK	骨髓纤维化 Myelofibrosis	1. JAK(↓), 2. 体重(↑), 3. IL-6(↓) 2. Body weight(↑)	[46, 49]
舒尼替尼 Sunitinib	替尼类抑制剂 Tib inhibitors	RTKs	肾细胞癌 Renal cell carcinoma	1. STAT3(↓), 2. 蛋白质分解(↓) 2. Proteolysis(↓)	[50]
eIF4A 抑制剂 Hipp	抑制剂 Inhibitors	eIF4A	C26 小鼠/C2C12 细胞 C26 mice/C2C12 cells	1. p-STAT3(↓), 2. IL-6(↓)	[51]
JAK2 抑制剂 AG490	抑制剂 Inhibitors	JAK2	恶病质小鼠 Cachexia mice	1. p-JAK2(↓), 2. IL-6(↓), 3. 体重(↑) 3. Body weight(↑)	[53]
STAT3 抑制剂 C188-9	抑制剂 Inhibitors	STAT3	C26 小鼠 C26 mice	1. STAT3(↓), 2. UPS(↓), 3. C/EBPδ(↓) 4. 体重(↑), 5. 蛋白分解(↓), 6. 蛋白合成(↑) 4. Body weight(↑), 5. Proteolysis(↓) 6. Protein synthesis(↑)	[22]
欧前胡素 IMP	活性成分 Active ingredients	STAT3	C26 小鼠/C2C12 细胞 C26 mice/C2C12 cells	1. p-STAT3(↓), 2. UPS(↓)	[54]
隐丹参酮 Cryptotanshinone	活性成分 Active ingredient	STAT3	C2C12 细胞 C2C12 cells	1. STAT3(↓), 2. UPS(↓)	[55]
Z-阿霍烯 Z-ajoene	活性成分 Active ingredients	JAK/STAT3	C26 小鼠/C2C12 细胞 C26 mice/C2C12 cells	1. JAK(↓), 2. STAT3(↓) 3. MAPK(↑), 4. UPS(↓)	[56]

注: ↓: 表示药物通过抑制相关表达干预肿瘤恶病质肌肉萎缩; ↑: 表示药物通过促进相关表达干预肿瘤恶病质肌肉萎缩。

Note. ↓, Drug interferes with sarcopenia due to tumor cachexia by inhibiting the related expression. ↑, Drug interferes with tumor cachexia muscle atrophy by promoting the related expression.

与厌食症、中枢神经系统、脂肪代谢异常、线粒体能量代谢异常、肝代谢异常<sup>[13]</sup>密切相关,这使得该综合征具有复杂性和多样性,为治疗肿瘤恶病质肌肉萎缩增加更多的不确定因素。为了更好的认识肿瘤恶病质肌肉萎缩的机制,早日为肿瘤晚期恶病质患者保持体重、延长生存期提供有效药物,针对 JAK/STAT3 通路介导肿瘤恶病质肌肉萎缩机制仍需进一步研究同时应对现有的信号通路抑制剂在治疗肿瘤恶病质肌肉萎缩方面开展更多与药效、安全性相关的基础研究和临床观察。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Biswas AK, Acharyya S. Understanding cachexia in the context of metastatic progression [J]. 2020, 20(5): 274-284.
- [ 2 ] Onesti JK, Guttridge DC. Inflammation based regulation of cancer cachexia [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 168407.
- [ 3 ] Schcolnik-Cabrera A, Chávez-Blanco A, Domínguez-Gómez G, et al. Understanding tumor anabolism and patient catabolism in cancer-associated cachexia [J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(5): 1107-1135.
- [ 4 ] Petruzzelli M, Wagner EF. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia [J]. Genes Dev, 2016, 30(5): 489-501.
- [ 5 ] Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia; an international consensus [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.
- [ 6 ] Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia [J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 54: 42-52.
- [ 7 ] Kliewer KL, Ke JY, Tian M, et al. Adipose tissue lipolysis and energy metabolism in early cancer cachexia in mice [J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(6): 886-897.
- [ 8 ] Asp ML, Tian M, Wendel AA, et al. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice [J]. Int J Cancer, 2010, 126(3): 756-763.
- [ 9 ] Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, et al. Inter-tissue communication in cancer cachexia [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 15(1): 9-20.
- [ 10 ] Wanig DL, Guise TA. Molecular mechanisms of bone metastasis and associated muscle weakness [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(12): 3071-3077.
- [ 11 ] Bindels LB, Neyrinck AM, Loumaye A, et al. Increased gut permeability in cancer cachexia; mechanisms and clinical relevance [J]. Oncotarget, 2018, 9(26): 18224-18238.
- [ 12 ] Baracos VE, Martin L, Korc M, et al. Cancer-associated cachexia [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 17105.
- [ 13 ] Arends J, Strasser F, Gonella S, et al. Cancer cachexia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines [J]. ESMO Open, 2021, 6(3): 100092.
- [ 14 ] Mertens C, Darnell JE Jr. SnapShot: JAK-STAT signaling [J]. Cell, 2007, 131(3): 612.
- [ 15 ] Ma JF, Sanchez BJ, Hall DT, et al. STAT3 promotes IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -induced muscle wasting in an NF- $\kappa$ B-dependent and IL-6-independent manner [J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(5): 622-637.
- [ 16 ] Eskiler GG, Bezdegumeli E, Ozman Z, et al. IL-6 mediated JAK/STAT3 signaling pathway in cancer patients with cachexia [J]. Bratisl Lek Listy, 2019, 66(11): 819-826.
- [ 17 ] Bonetto A, Aydogdu T, Jin X, et al. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 303(3): E410-E421.
- [ 18 ] Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy [J]. FEBS J, 2013, 280(17): 4294-4314.
- [ 19 ] Bilodeau PA, Coyne ES, Wing SS. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle; roles and regulation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 311(3): C392-C403.
- [ 20 ] Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway [J]. N Engl J Med, 1996, 335(25): 1897-1905.
- [ 21 ] Du J, Wang X, Miereles C, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions [J]. J Clin Invest, 2004, 113(1): 115-123.
- [ 22 ] Silva KA, Dong J, Dong Y, et al. Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia [J]. J Biol Chem, 2015, 290(17): 11177-11187.
- [ 23 ] Cerquone Perpetuini A, Re Cecconi AD, Chiappa M, et al. Group I Paks support muscle regeneration and counteract cancer-associated muscle atrophy [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2018, 9(4): 727-746.
- [ 24 ] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.
- [ 25 ] Sandri M. Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 298(6): C1291-C1297.
- [ 26 ] Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A. Molecular mechanism of sarcopenia and cachexia; recent research advances [J]. Pflugers Arch, 2017, 469(5-6): 573-591.
- [ 27 ] You L, Wang Z, Li H, et al. The role of STAT3 in autophagy [J]. Autophagy, 2015, 11(5): 729-739.
- [ 28 ] Penna F, Costamagna D, Pin F, et al. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia [J]. Am J Pathol, 2013, 182(4): 1367-1378.
- [ 29 ] Tardif N, Klaude M, Lundell L, et al. Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients [J]. Am J Clin Nutr, 2013, 98(6): 1485-1492.

- [30] 阚月一, 王娅杰, 李琦, 等. 肿瘤发展过程中自噬与凋亡的相互作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 106-112.
- [31] 张丽, 李小颖, 孙彩显, 等. 抑制小鼠乳腺肿瘤转移 microRNA 的筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(3): 72-77, 87.
- [32] Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT signaling: a double-edged sword of immune regulation and cancer progression [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 2002.
- [33] Freire PP, Fernandez GJ, Cury SS. The pathway to cancer cachexia: microrna-regulated networks in muscle wasting based on integrative meta-analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1962.
- [34] Delen E, Doganlar O, Doganlar ZB, et al. Inhibition of the invasion of human glioblastoma U87 cell line by ruxolitinib: a molecular player of miR-17 and miR-20a regulating JAK/STAT pathway [J]. *Turk Neurosurg*, 2020, 30(2): 182-189.
- [35] Dai H, Wang C, Yu Z, et al. MiR-17 regulates prostate cancer cell proliferation and apoptosis through inhibiting JAK-STAT3 signaling pathway [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2018, 33(3): 103-109.
- [36] Kong D, He M, Yang L, et al. MiR-17 and miR-19 cooperatively promote skeletal muscle cell differentiation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(24): 5041-5054.
- [37] 李维莎, 刘宏飞, 严立波, 等. OGR1 与肿瘤微环境 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 96-101.
- [38] Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 451: 1-14.
- [39] Yu H, Lee H, Herrmann A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 736-746.
- [40] Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(3): 365-371.
- [41] Yadav A, Kumar B, Datta J, et al. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAI1 signaling pathway [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(12): 1658-1667.
- [42] Inácio Pinto N, Carnier J, Oyama LM, et al. Cancer as a proinflammatory environment: metastasis and cachexia [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 791060.
- [43] Chang Q, Bourmazou E, Sansone P, et al. The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(7): 848-862.
- [44] Hetzler KL, Hardee JP, Puppa MJ, et al. Sex differences in the relationship of IL-6 signaling to cancer cachexia progression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(5): 816-825.
- [45] Zhao W, Jaganathan S, Turkson J. A cell-permeable Stat3 SH2 domain mimetic inhibits Stat3 activation and induces antitumor cell effects *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(46): 35855-35865.
- [46] Cerchione C, Peluso I, Nappi D, et al. Ruxolitinib rechallenge in combination with hydroxyurea is effective in reverting cachexia and reducing blood transfusion demand and splenomegaly symptoms in a patient with primary myelofibrosis [J]. *Ann Hematol*, 2017, 96(4): 697-699.
- [47] An JM, Kang EA, Han YM, et al. Dietary intake of probiotic kimchi ameliorated IL-6-driven cancer cachexia [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2019, 65(2): 109-117.
- [48] Miller A, McLeod L, Alhayani S, et al. Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2017, 36(21): 3059-3066.
- [49] Jatoi A. Anti-inflammatory therapy: exploring exercise, serum-derived bovine immunoglobulin/protein isolates, and ruxolitinib for the cancer-associated weight loss syndrome [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2013, 7(4): 339-341.
- [50] Pretto F, Ghilardi C, Moschetta M, et al. Sunitinib prevents cachexia and prolongs survival of mice bearing renal cancer by restraining STAT3 and MuRF-1 activation in muscle [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3043-3054.
- [51] Cramer Z, Sadek J, Vazquez GG, et al. eIF4A inhibition prevents the onset of cytokine-induced muscle wasting by blocking the STAT3 and iNOS pathways [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8414.
- [52] Guo D, Wang C, Wang Q, et al. Pantoprazole blocks the JAK2/STAT3 pathway to alleviate skeletal muscle wasting in cancer cachexia by inhibiting inflammatory response [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 39640-39648.
- [53] Gilbert M, Calvo E, Airoidi A, et al. Pancreatic cancer-induced cachexia is Jak2-dependent in mice [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(10): 1437-1443.
- [54] Chen L, Xu W, Yang Q, et al. Imperatorin alleviates cancer cachexia and prevents muscle wasting via directly inhibiting STAT3 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104871.
- [55] Chen L, Yang Q, Zhang H, et al. Cryptotanshinone prevents muscle wasting in CT26-induced cancer cachexia through inhibiting STAT3 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113066.
- [56] Lee H, Heo JW, Kim AR, et al. Z-ajoene from crushed garlic alleviates cancer-induced skeletal muscle atrophy [J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2724.

[收稿日期]2020-09-03

郝瑞瑞, 庞菲, 靳洪涛. 过敏性疾病体内外模型构建研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 125-134.  
Hao RR, Pang F, Jin HT. Research progress on the construction of *in vivo* and *in vitro* models of allergic diseases [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 125-134.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.019

## 过敏性疾病体内外模型构建研究进展

郝瑞瑞<sup>1</sup>, 庞菲<sup>1</sup>, 靳洪涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国医学科学院药物研究所, 新药安全评价研究中心, 北京 100050;  
2. 北京协和建昊医药技术开发有限责任公司, 北京 100176)

**【摘要】** 过敏性疾病目前仍是困扰人类的一种常见疾病, 探索其发病机制以及有效治疗仍非常迫切, 过敏性疾病模型构建是一个关键因素, 本文按照机体不同系统常见过敏性疾病角度分类, 对现有过敏性疾病体内外模型构建进行汇总、分析, 比较各类模型的异同与优劣之处, 旨在对过敏性疾病模型构造与应用提供参考与启发。

**【关键词】** 超敏反应; 过敏反应; 过敏性疾病; 体内外模型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0125-10

### Research progress on the construction of *in vivo* and *in vitro* models of allergic diseases

HAO Ruirui<sup>1</sup>, PANG Fei<sup>1</sup>, JIN Hongtao<sup>1,2\*</sup>

(1. New Drug Safety Evaluation Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China. 2. Beijing Union-Genius Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Beijing 100050)

**【Abstract】** Allergic diseases are prevalent and they continue to affect human health. It is urgent to explore their pathogenesis and effective treatment method. In this process of exploration, the establishment of allergic disease models is a key factor. According to the classification of allergic diseases in different systems of the body, this article summarizes and analyzes the existing *in vivo* and *in vitro* models of allergic diseases, and compares the similarities, differences, advantages and disadvantages among them, aiming to provide information for the development and application of allergic disease models.

**【Keywords】** hypersensitivity; allergic reaction; allergic diseases; *in vivo* and *in vitro* models

过敏反应是一种 I 型变态反应, 就目前的认识而言, 其发生机制主要为两种, 一种是以 IgE 抗体为主参与的 IgE 依赖性过敏反应, 另一种是有 IgG 抗体参与的非 IgE 依赖性过敏反应<sup>[1-2]</sup>。IgE 依赖性过敏反应发生分为 2 个阶段, 致敏阶段: 抗原初次进入机体, 刺激机体产生免疫球蛋白 E

(Immunoglobulin E, IgE) 抗体, 与体内肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面 IgE 高亲和力 Fc 受体 (FcεRI) 结合; 激发阶段: 当致敏阶段相同的抗原再次刺激机体时, 抗原与 IgE 抗体的 Fab 段结合, 两个或两个以上 IgE 抗体交联, 进而 FcεRI 发生微集聚, 启动肥大细胞及嗜碱性粒细胞活化, 释放已储存与新合成

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (81773996); 中国毒理学会临床毒理专项资助课题 (CST2019CT105); 重大新药创制基金 (2018ZX09201-017-005; 2018ZX09711-001-002-001)。

**【作者简介】** 郝瑞瑞 (1995—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 免疫毒理学。E-mail: ruiruihao@imm.ac.cn

**【通信作者】** 靳洪涛 (1976—), 男, 博士生导师, 研究方向: 药物毒性机制与毒害干预研究。E-mail: jinhongtao@imm.ac.cn

的生物活性物质,这些生物活性物质会造成平滑肌收缩、腺体分泌增加、毛细血管扩张、通透性增加等一系列效应<sup>[3]</sup>。IgG 抗体引起的过敏反应与 IgE 引起的被动全身皮肤过敏反应(PSA)相似,主要是低温、血管扩张和心肺变化。其发生机制是在抗原进入机体后,刺激机体产生 IgG 抗体,IgG 抗体与嗜碱性细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞表面 IgG 高亲和力 Fc 受体(FcγR)形成交联,进而启动上述细胞活化,释放血小板活化因子(PAF)、半胱氨酰白三烯(CysLTs),进而引发全身过敏反应<sup>[1]</sup>。根据 2013 年世界变态反应组织白皮书<sup>[4]</sup>,全球过敏性疾病的患病率约为 10%~40%,其中有 3 亿支气管哮喘患者、4 亿过敏性鼻炎患者、1.5 亿药物过敏患者以及大量荨麻疹、湿疹、结膜炎、血管神经性水肿、昆虫过敏、结膜炎、过敏性休克患者。随着城市化、工业化进程的不断加快,过敏性疾病的发病率呈现上升趋势<sup>[5]</sup>,因此,过敏性疾病探索研究与有效治疗对于提高人类生存质量显得尤为重要。在过敏性疾病研究中,模型的构建极为重要。但当前对于过敏性疾病体内、体外模型构建进行系统的总结、评价性文章并不多见,因此,本文分别从皮肤、呼吸系统、消化系统、神经系统、药物过敏不同系统过敏性疾病以及体内外模型造模方式相结合的角度出发,分别阐述并评价目前研究中所应用的各种不同模型的构建方法、优势与不足,以期对过敏性疾病研究模型的构建提供一定的启发与帮助。

## 1 皮肤及其附件过敏性疾病模型

皮肤及其附件症状是机体发生过敏反应后最常见的表现之一,包括皮肤瘙痒、泛红、水肿、疼痛等炎症反应。皮肤过敏症状大多是由直接接触药物、粉尘等过敏原或紫外线照射等原因造成的,但也存在机体其他器官系统发生过敏反应后表现为皮肤症状<sup>[6-7]</sup>。皮肤及其附件的过敏症状原因不是单一的,在建模过程中,要根据实验目的选择最适模型。皮肤及其附件过敏型疾病模型主要分为两大类,一是通过注射变应原引起皮肤过敏反应的相关模型,二是变应原通过直接接触引起的皮肤过敏反应模型。

### 1.1 被动皮肤过敏反应模型

4-氨基吡啶(4-AP)致敏皮肤瘙痒模型<sup>[8]</sup>:KM 小鼠背部皮下注射 1 mL 4-AP(0.2 mg/kg),每隔 10 min 记录用药部位的舔舐频率,使用舔舐频率来

表示小鼠背部皮肤的瘙痒程度。组胺诱导足肿胀模型<sup>[8]</sup>:KM 小鼠右足皮下注射 20 μg/kg 组胺生理盐水(0.25 mg/kg),分别于注射 15 min 和 60 min 后用千分尺测定小鼠右足厚度,用注射组胺前后小鼠右足厚度差来表示肿胀度。角叉菜碱诱导小鼠皮下组织炎症反应<sup>[9]</sup>:将角叉菜碱(每爪 300 μg)注射到 ICR 小鼠右后爪的足底表面,使用机械撤退阈值反应皮下组织炎症严重程度。蝉幼虫提取物诱导绵羊耳部皮肤过敏模型<sup>[10]</sup>:雌性绵羊在蝉虫出没的天然草原牧场放牧,推测其已预先致敏,测量每只绵羊耳朵厚度,并在每只绵羊右耳上侧距耳缘 1 cm 处皮内注射蝉幼虫提取物制剂 0.1 mL。分别在接种后 1、6、24、48 和 72 h 用电子卡尺测量母羊个体耳厚。蝉幼虫提取物诱导 Nguni 牛皮肤超敏反应模型<sup>[11]</sup>:小牛提前 1 个月在已知有蝉虫出没的天然牧场上放牧。小牛左耳剃毛区域皮内注射蝉幼虫提取物,测量耳厚度。完全弗氏佐剂诱导大鼠后爪炎模型<sup>[12]</sup>:雌性 SD(Sprague-Dawley)大鼠左后爪皮下注射 50 μL 完全弗氏佐剂。通过爪式热刺激系统测定热敏性,从而判定炎症程度。

上述几种模型造模思路清晰简单,但是通过舔舐频率与耳足厚度来评估过敏反应严重程度只能简单定性,而无法精确定量反应过敏原所引起过敏反应程度,需要更加精确的定量模型。

耳被动皮肤过敏反应模型<sup>[8]</sup>:KM 小鼠双耳皮下注射 1:10 抗卵白蛋白血清(OVA)20 μL,72 h 后尾静脉注射含 OVA 的伊文思蓝溶液。30 min 后颈椎脱位法处死小鼠,剪下耳廓蓝色部分,加入 0.75 mL 1 N KOH 溶液,37℃ 过夜消化后加入 3.5 mL 0.6 N 磷酸溶液和丙酮混合物(按 5:13 比例混合),用涡旋机摇床提取,离心,并于 640 nm 处测定光密度。DNP-人血清白蛋白(DNP-HSA)诱导小鼠耳被动皮肤过敏模型<sup>[13]</sup>:5 周龄雌性 BALB/c 小鼠,DNP-IgE 皮内注射入耳致敏,24 h 后,DNP-HAS 的 0.5% 伊文思蓝溶液 100 μL 尾静脉注射激发。30 min 后,伊文思蓝染色程度表示小鼠耳部皮肤反应严重程度。甲酰胺 63℃ 隔夜孵育提取伊文思蓝,595 nm 处测定吸光度。抑制率=(对照组蓝斑直径-实验组蓝斑直径)/对照组蓝斑直径×100%。弗氏完全佐剂诱导小鼠背部皮肤过敏模型<sup>[14-15]</sup>:6~8 周龄 18~22 g 雌性 BALB/c 小鼠,第 1 天弗氏完全佐剂的生理盐水溶液(50%)100 μL 小鼠背部皮下注射,第 4、7、10 天在小鼠背部皮肤上涂抹 100 μL 弗

氏完全佐剂的生理盐水溶液(50%)继续致敏,攻击 3 d 后,所有小鼠  $\text{CO}_2$  安乐死,在无菌环境中采集血液和肾脏进行 HE 染色、免疫比浊法和 ELISA 检测血清 IL-6 含量。小鼠皮肤过敏评分为:0 分,完全正常;1 分,散发性红斑或轻度红肿;2 分,中度红肿或弥漫性红肿;3 分,重度红斑或红肿。将  $\geq 1$  评分定义为阳性致敏,计算致敏率。外源性低分子量化合物诱导小鼠超敏反应模型<sup>[16-17]</sup>:无特异性病原体(SPF)雌性 6~8 周龄 20~22 g BALB/c 小鼠,0.5 或 1 mg 绿原酸溶于生理盐水中皮下注射至小鼠右后足,颈椎脱位法处死小鼠,去除处理侧和未处理侧的小鼠腭窝淋巴结(PLN),放置于冰凉的 1% BSA 的 PBS 溶液中,切除多余脂肪组织后称重,采用流式细胞仪对每个分离的 PLN 细胞同时进行三色分析,制备 PLN 淋巴细胞缓冲液,进行酶联免疫吸附试验(ELISPOT)检测 IgM、IgG1、IgG2a 以及 IgE。

上述四种被动皮肤过敏反应模型区别之处在于选用了不同的变应原刺激小鼠,测定耳部蓝染的伊文思蓝含量,免疫比浊法、ELISA 法测定相关因子等都可以定量反映过敏严重程度,是较为精确的一种过敏反应模型,可应用于定量反应药物治疗皮肤过敏性疾病有效率。

## 1.2 皮肤及其附件接触性过敏反应模型

小鼠耳接触超敏反应模型<sup>[18]</sup>:6~8 周龄 BALB/cJ 小鼠,手术胶带去除小鼠耳垂绒毛,每隔 2 d 涂抹 1% 2,4-二硝基氯苯(DNCB),持续 1 个月。每次涂抹 DNCB 24 h 后测量耳厚度。ELISA 法进行血清 IgE 浓度测定,第 2 周末取小鼠尾静脉血使用 ELISA 试剂盒测定进行测定,稀释 200 倍后测定血清 IgE 浓度。小鼠耳部制成 6  $\mu\text{m}$  厚度切片,HE 染色进行组织学观察,显微镜下观察淋巴细胞浸润以及表皮增厚情况。制备单细胞悬液,分离总引流淋巴结细胞和  $\text{CD4}^+$ T 细胞,进行 RNA 提取及 RT-PCR 分析。2,4 二硝基氟苯(DNFB)诱导局部接触性过敏小鼠模型<sup>[19]</sup>:6~8 周龄雌性野生型 C57BL/6 小鼠,每只小鼠剃去腹部毛发,使用 0.5% 2,4-二硝基氟苯(DNFB)溶解于丙酮和橄榄油的混合物处理小鼠腹部皮肤。5 d 后用 0.2% DNFB 每耳 10  $\mu\text{L}$  刺激小鼠双耳前后部。刺激 48 h 后用测微仪测量小鼠耳厚,判断小鼠耳部局部接触性过敏反应严重程度,并进行细胞分离和流式细胞术分析树突细胞、T 细胞以及巨噬细胞等各类免疫细胞数

量在不同阶段的变化情况<sup>[20]</sup>。氢醌(HQ)接触性超敏反应小鼠模型<sup>[21]</sup>:将 1% 或更高浓度氢醌涂抹在小鼠耳廓上,第 7 天和第 14 天耳廓涂抹氢醌,可引起浓度依赖性耳肿胀。第二次刺激的接触性超敏反应较第一次明显更为严重,BALB/c 小鼠对氢醌的敏感性高于 C57BL/6 小鼠。偏苯三酸酐(TMA)诱导小鼠接触性皮肤过敏模型<sup>[22]</sup>:6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠,第 0 天,50  $\mu\text{L}$  10% TMA 剃毛致敏;第 5~10 天开始,每天用 20  $\mu\text{L}$  3% 小鼠左耳后部刺激;第 5~7 天,用数字千分尺测定耳廓肿胀度。通过左耳(过敏原激发)减去右耳(溶剂对照)来计算耳肿胀的净增加。邻苯二甲酸酐(PA)诱导小鼠特异性皮炎<sup>[23]</sup>:HR-1 小鼠,8 周龄,将 5% PA 溶液 100  $\mu\text{L}$  涂抹于小鼠耳背及背部皮肤,每周 3 次,持续 4 周。实验过程中,电子天平每周测量 1 次小鼠体重。4 周后处死小鼠,测定小鼠淋巴结重量,测厚仪测量耳厚,从而评估 PA 引起的过敏性皮肤炎症的严重程度。取小鼠耳背部皮肤,切片,甲苯胺蓝染色检测肥大细胞脱颗粒情况;ELISA 法测定血清 IgE 浓度、血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平。接触型超敏反应评价<sup>[24]</sup>:SPF 雄性 6~10 周龄 BALB/c(H-2)小鼠,腹部胸部剃毛,25  $\mu\text{L}$  0.5% 二硝基氯苯(丙酮:橄榄油=4:1)溶液涂抹,千分尺测量耳朵厚度,刺激 24 h 后再次测量。增加的耳朵厚度以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。测量耳重、血管通透性实验、耳提取物中干扰素- $\gamma$  体外测定、髓过氧化物酶(MPO)法间接定量嗜中性粒细胞等方式判定接触性超敏反应发生程度。

上述几种都是变应原直接涂抹于动物皮肤所构建的皮肤接触性过敏反应模型,小鼠耳部皮肤是观察皮肤反应的较为理想的位置,因此诱导皮肤接触性过敏反应多选取小鼠耳部皮肤,通过耳部皮肤的肿胀度或耳厚度来评估过敏反应的强烈程度,但耳肿胀度与耳厚度作为定量指标仍然不够严谨,同时可以通过采集模型动物血液、制备细胞悬液,制备切片等方式进行定量分析以及可视化观察,从而更加准确的评估模型动物反应程度。上述模型详细对比见表 1。

## 2 呼吸系统过敏性疾病模型

呼吸系统的过敏性疾病主要包括吸入过敏原引起的咳嗽、气道过敏以及哮喘等。柠檬酸诱导豚鼠咳嗽模型<sup>[25]</sup>:豚鼠暴露于柠檬酸环境下,0.5

mol/L 雾化吸入 10 min,豚鼠置于允许自由移动的室内,并配备内部麦克风和压力传感器测量咳嗽,用气速仪记录呼吸和咳嗽引起的气流变化,咳嗽声被放大并记录。雪松花粉诱导小鼠鼻内过敏<sup>[13]</sup>:日本雪松花粉粒(0.5 mg 悬浮于 20 mL PBS 中)鼻腔攻击小鼠 7 次,每天 1 次,计数打喷嚏的次数。大鼠气道超敏反应模型<sup>[26]</sup>:气管内滴注嗜酸性粒细胞颗粒或合成阳离子蛋白溶液 0.1 mL,使用全细胞穿孔膜片钳进行电生理记录,测定给予刺激后不同时刻膜电位的变化、动作电位数目、膜电位峰值以及电流变化。烟曲霉菌提取物蛋白诱导小鼠气道炎症模型<sup>[27]</sup>:RK 小鼠,5 月龄,采用 50 mg 烟曲霉菌

提取物蛋白加 2 mg 氢氧化铝稀释的烟曲霉 IgE 溶于 PBS 缓冲液中,分别于第 0 天和第 10 天皮下注射致敏 RK 小鼠。随后,小鼠在第 18 天至第 25 天暴露于烟曲霉菌孢子污染的环境中,第 25 天处死小鼠,取支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织进行组织学分析,建模过程如图 1 所示。热凝固蛋清(HEW)诱导小鼠晚期反应(LPR)模型<sup>[6,28]</sup>:6 周龄 BALB/c 小鼠,皮下注射 HEW(40 mg),14 d 后在足垫内注射 50  $\mu$ L 热聚卵白蛋白(20 mg/mL),立即出现以足垫肿胀和嗜酸性粒细胞浸润为特征的超敏反应。

表 1 皮肤及其附件过敏反应模型对比

Table 1 Comparison of allergic reaction models of skin and its accessories

模型 Model	动物 Animals	变应原 Allergen	检测指标 Detection indicator	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
小鼠耳接触超敏反应模型 Contact hypersensitivity model of mice ear	BALB/cJ 小鼠 BALB/cJ mice	DNCB	IgE 浓度、小鼠耳厚、耳部切片淋巴细胞浸润、RT-PCR 分析 Concentration of IgE, ear thickness of mice, lymphocyte infiltration in ear slices, RT-PCR analysis	小鼠耳厚、切片淋巴细胞浸润可以定性描述模型动物过敏程度,IgE 浓度可以精确定量描述和 RT-PCR 分析可以从基因层面分析模型动物过敏原因,作为传统检测指标的补充 Mouse ear thickness and lymphocyte infiltration in slices can qualitatively describe the degree of allergies in model animals. IgE concentration can accurately and quantitatively in describing and RT-PCR analysis can analyze the possible causes from the genetic level, as a supplement to traditional detection indicators	建模周期较长 Long molding cycle
2,4-二硝基氟苯诱导局部接触性过敏小鼠模型 DNFB-induced local contact allergy mouse model	C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	DNFB	小鼠耳厚、细胞分离、流式细胞术分析、免疫细胞数量变化 Mouse ear thickness, flow cytometry analysis, changes in the number of immune cells	检测指标重点在于流式细胞术分析,可以精确检测超敏反应发生不同阶段各类免疫细胞数量的变化情况 Focuses on flow cytometry analysis, which can accurately detect the changes in the number of various immune cells at different stages of hypersensitivity reactions	缺乏一些常用免疫细胞因子的检测 Lack of testing for some commonly used immune cytokines
邻苯二甲酸酐诱导小鼠特异性皮炎 PA-induced atopic dermatitis in mice	HR-1 小鼠 HR-1 mice	PA	小鼠淋巴结重量、耳厚、耳部切片染色观察肥大细胞脱颗粒、血清 IgE 浓度 Mouse lymph node weight, ear thickness, ear section staining to observe mast cell degranulation and serum IgE concentration	结合了定性定量指标,能较为全面的评估模型动物超敏反应程度 Combining qualitative and quantitative indicators, can comprehensively evaluate the degree of hypersensitivity in model animals	生化定量指标仅有 IgE 浓度 Only biochemical quantitative index is IgE concentration
接触性超敏反应评价 Evaluation of contact hypersensitivity	SPF BALB/c (H-2)d 小鼠 SPF BALB/c (H-2) mice	DNCB	小鼠耳厚、耳重、血管通透性、INF- $\gamma$ 浓度、MPO 浓度 Mouse ear thickness, ear weight, vascular permeability, INF- $\gamma$ concentration, MPO concentration	采用了 IFN- $\gamma$ 、MPO 浓度间接反映嗜中性粒细胞数量是本模型的特点 Using of IFN- $\gamma$ and MPO concentrations to indirectly reflect the number of neutrophils is the characteristic of this model	定量指标仅采用间接反映的方式测量了嗜中性粒细胞一项,缺乏一些常用的典型指标例如 IgE 浓度等 Quantitative indicators only measure neutrophils in an indirect way, some commonly used typical indicators such as IgE concentration, etc. were lacked

呼吸系统过敏性疾病模型构建主要通过吸入变应原或直接气管滴注的方式诱导动物发生呼吸系统过敏反应,取 BALF 和肺组织分析,测定咳嗽次数、气流变化以及电生理指标等多适用于呼吸系统模型,同时也可以通过 ELISA 法检测血清 IgE 浓度、各类细胞因子浓度等免疫相关指标,制备切片显微镜下观察,流式细胞仪分析淋巴细胞等定性定量评估模型动物过敏反应严重程度。

### 3 消化系统过敏性疾病模型

口服药物诱导大鼠胃肠超敏模型<sup>[29]</sup>: 5 周龄 Brown Norway 大鼠,将受试药物混悬液或溶媒(0.5% 甲基纤维素溶液)口服 28 d,每日给药量阿莫西林(AMX)和磺胺甲噁唑(SMX)为 500 mg/kg, D-青霉素胺(D-Pen)和磺胺甲噁唑(SMX)为 500 mg/kg、苯妥英钠(PHT)为 300 或 450 mg/kg,每周测量一次体重,每天记录 2 次动物临床体征,包括任何异常的外表或行为。大鼠安乐死,异氟醚吸入麻醉后腹主动脉采血,ELISA 法测量血清 IgE 浓度,并检测血液中白细胞、中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和大的未染色的细胞的数量,流式细胞仪对淋巴细胞进行分析;采血后,取脾、肠系膜淋巴结和小肠切片,苏木精伊红(HE)染色镜检。结肠过敏大鼠模型<sup>[30]</sup>: 250~350 g 雄性 SD 大鼠,腹腔注射 1 mL 溶有 10 μg 卵白蛋白(抗原)和 10 mg 氢氧化铝(佐剂)的生理盐水溶液。注射后第 3 天

至第 5 天,使用抗原液以 50 μL/min 进行大鼠结肠灌流 30 min,再使用 30 mm 级汞柱重复刺激大鼠结肠过敏 5 次,间隔为 3 min。抗原液由 10 μg/mL 卵白蛋白、40 mmol/L D-葡萄糖组成,与氯化钠等渗。对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导大鼠结肠炎模型<sup>[31]</sup>: 180~200 g 成年雄性 SD 大鼠,2% 异氟醚麻醉,将 TNBS(100 mg/kg)和 50% 乙醇(体积比 2:1)经直肠注入远端结肠腔(距肛门近端 7 cm)。通过对体重、大便稠度和肠出血评分(0~4 分),获得疾病活动指数(DAI)。所有动物在 TNBS 后第 7 天和第 14 天进行评估;为评价 TNBS 灌服引起的躯体痛觉过敏,于第 7 天和第 14 天测定大鼠的机械和热行为实验,使用机械拔爪(PWL)时间和热痛阈值来反应躯体痛觉过敏程度,从而反应内脏超敏程度。对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导小鼠结肠炎模型<sup>[32]</sup>: 雄性 18~20 g C57BL/6 小鼠,麻醉条件下将 TNBS(1.75 mg/只,含 50% 乙醇)经距肛门近端 4 cm 的细导管一次性注入结肠,诱导小鼠结肠炎模型。经 TNBS 处理后,小鼠倒立 5 min。对小鼠结肠组织进行髓过氧化物酶检测(MPO),并在诱导结肠炎后第 7 天取结肠组织进行 HE 染色。内脏超敏反应程度(内脏痛阈)利用腹壁退缩反射(AWR)程度来间接反映:肛门连接球囊扩张器,采用维持球囊扩张所需注气量(0.1~1.0 mL)来反应 AWR,即腹部离开平台时突然而持续的腹部肌肉收缩。铝诱导大鼠内脏超敏模型<sup>[33]</sup>: 大鼠口服 1.5 mg/kg 柠檬酸铝,

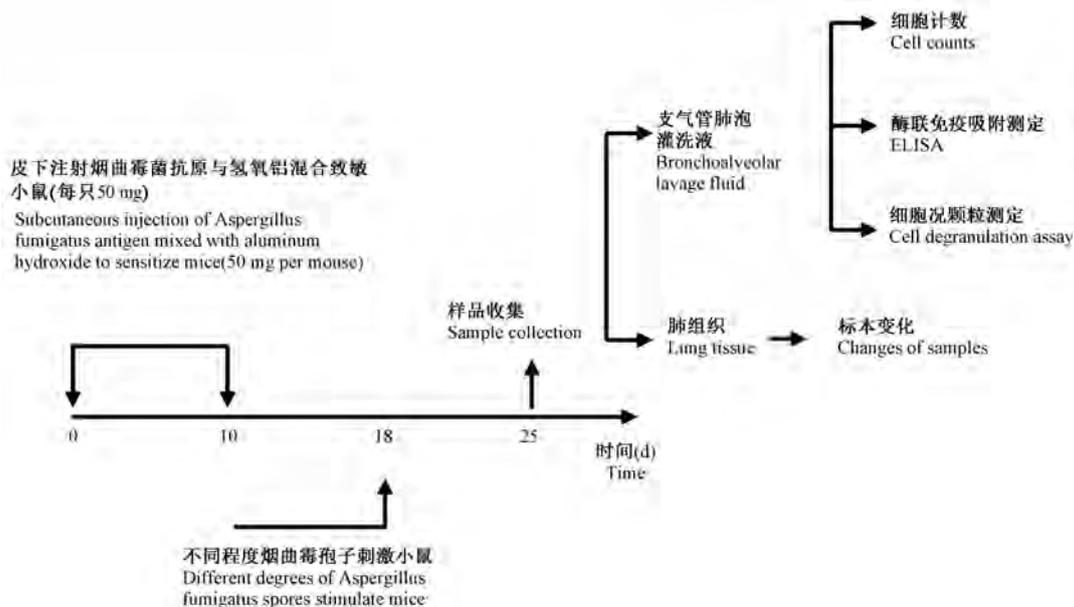


图 1 烟曲霉诱导小鼠气道炎症模型建模过程

Figure 1 Modeling process of *Aspergillus fumigatus*-induced airway inflammation model in mice

通过诱发痛觉过敏所需平均压力不同来反应内脏超敏反应严重程度。结直肠扩张 (CRD) 诱发大鼠内脏超敏模型<sup>[34]</sup>: 断奶前雄性 SD 大鼠 (小于 8 日龄), 与成年雌性大鼠共同饲养至 25 日龄, 体重到达 200~250 g 时分组, 新生 CRD 模型构建: 大鼠出生第 8、10、12 天使用插入降结肠和直肠上部的血管成形术球囊。球囊在 60 mmHg 压力下用 0.3 mL 水膨胀 1 min, 然后放气退出。间隔 30 min, 重复扩张两次。假手术组除不施加压力外, 处理方式与 CRD 置入组相似。成年 CRD 组不进行扩张, 8 周后, 将成年 CRD 应用于所有大鼠, 其中 80 mmHg (1 min) 扩张 2 次, 间隔 5 min。通过腹部戒断反射<sup>[35]</sup> (AWR) 评估大鼠膨胀痛阈值。将 30 日龄大鼠下丘脑组织切片进行免疫荧光标记。将下丘脑室旁核和垂体在 50 mmol/L 盐酸缓冲液 (pH=7.4) 中匀浆, 采取 ELISA 法测定促炎因子水平。

消化系统过敏性疾病造模主要通过腹腔注射、结肠灌流等方式诱导, 由于消化系统器官的特点, 无法直接观察其过敏反应程度, 需要一些间接的指标来反映, 上述几种消化系统过敏性疾病模型中, 可间接通过对内脏发生过敏反应后所产生痛觉的评估 (如: 机械拔爪时间、热痛阈值和腹壁退缩反射等) 或者疾病活动指数, 但这些间接指标仍无法精确定量, 定量检测仍需 ELISA 法检测血清 IgE 浓度<sup>[36]</sup>、各类细胞因子浓度等免疫相关指标, 流式细胞仪分析淋巴细胞等途径评估模型动物过敏反应严重程度, 随着动物成像技术的进步和设备的应用, 可以探索将成像技术用于消化系统病变的直接观察。

#### 4 神经系统过敏疾病模型

脂多糖 (LPS) 诱导小鼠疼痛过敏、脊髓炎症模型<sup>[37]</sup>: 5 日龄 SD 大鼠幼鼠腹腔注射 LPS (2 mg/kg), 注射 LPS 5 min 后, 注射总体积为 0.1 mL 含 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的无菌生理盐水溶液。注射后 24 h 测量体重并测试记录行为。每组 16 只幼鼠, 断头处死 8 只, 采集新鲜脊髓组织, 剩余 8 只经心脏灌注生理盐水, 制备脊髓切片进行免疫组化染色。采用冯弗雷纤维丝试验<sup>[38-39]</sup> (von fery filament test) 评估大鼠机械性痛觉。摇尾实验测定尾闪潜伏期平均值, 评估大鼠热伤害阈值。采用 ELISA 法检测大鼠脊髓中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、COX-2、CORT 和 PGE 浓度, 并将上述指标作为炎症反应

标记物。辣椒素诱导小鼠机械过敏模型<sup>[40]</sup>: 雄性 CD-1 小鼠, 6~8 周龄, 右后掌足底中部注射辣椒素增敏, 注射 15 min 后测定机械刺激的戒断潜伏期。同样采用冯弗雷纤维丝试验评估小鼠机械性痛觉。芬太尼诱导大鼠超敏模型<sup>[41]</sup>: 雄性 SD 大鼠, 50~100 g, 芬太尼 (60 mg/kg) 每隔 15 min 皮下注射, 共注射 4 次, 总剂量为 240 mg/kg (为模拟人类手术中使用的大剂量阿片类药物)。分别于给药后第 0、1、5、6、6.5、7、8 h, 以及给药后第 1、2、3、4、5 天测定机械刺激和热刺激的伤害性阈值。机械敏感性评估采用冯弗雷纤维丝试验; 采用 Hargreavs 法<sup>[42]</sup> 评估热敏感性, 即测量引起足底缩足所需的潜伏期 (以 s 为单位)。咖啡因诱导大鼠肾上腺素 (HPA) 轴超敏模型<sup>[43]</sup>: 无特定病原体 (SPF) Wistar 大鼠 (8 周龄雌性 200~240 g, 10 周龄雄性 260~300 g), 实验条件下适应一周, 大鼠从妊娠第 0 天 (GD) 至出生后 12 周 (PW) 的处理如图 2 所示。两只雌性大鼠与一只雄性大鼠过夜, 观察到交配证据 (即阴道栓或精细胞阴道图片) 的日期定位妊娠第 0 天 (GD 0), 从 GD 9~GD 20 对孕鼠进行灌胃咖啡因给药 120 mg/(kg·d)<sup>[44]</sup>; 16 只孕鼠在 GD 20 异氟醚麻醉下安乐死, 取出胎盘组织, 称量胎儿体重, 断头处死胎鼠, 取血离心备用, 在解剖学范围内解剖并收集胎鼠脑组织 (每性别 4 例) 进行免疫荧光分析; 其余孕鼠正常分娩, 标准化幼仔数量为 8 只, 出生后第 1 周 (PW 1) 称重, 评估幼鼠是否存在慢性应激; 对照组和模型组进行冰水游泳试验, 取脑组织进行免疫组织化学和免疫荧光分析, 血样进行血清 ACTH 和皮质酮 (CORT) 检测, 从而评估咖啡因对 HPA 轴活性产生的影响作用。白藜芦醇 (RTX) 诱导神经源性炎症导致小鼠足水肿模型<sup>[45]</sup>: 8 周龄雄性 ICR 小鼠, 腹腔注射 RTX 溶液, 1 小时后测量后爪厚度; 为消除测量偏差, 每隔 5 min 测量双侧后爪 3 次, 后爪厚度用 6 个测量值的平均值表示。部分坐骨神经结扎 (PSNL) 诱导小鼠机械超敏模型<sup>[46]</sup>: 雄性 DDY 小鼠, 25~35 g, 腹腔麻醉注射 0.4 mg/kg 美地托咪啶、2.0 mg/kg 咪达唑仑和 5.0 mg/kg 布托啡诺。根据 Stelzer 法<sup>[47]</sup>, 暴露左侧坐骨神经, 并用外壳缝线紧密结扎。同样采用冯弗雷纤维丝试验<sup>[36]</sup> 评估大鼠机械性痛觉。结果的反应评分为 0~3 分 (0: 无反应, 1: 后足抬起, 2: 后爪快速拔除。3: 后爪摇动和舔)。每次试验间隔至少 5~7 s 的七项试验总评分记录为疼痛评分<sup>[48]</sup>; 取出脑组织, 进行

免疫组化可视化切片进行观察。

上述神经系统过敏性疾病模型通过外源性药物、内毒素或手术进行诱导,评估过敏反应程度多采用痛觉指标,通过冯弗雷纤维丝试验评估机械刺激伤害阈值,通过 Hargreavs 法评估热刺激伤害阈值。由于神经系统的特殊性,想要通过模型定量精确评估过敏反应仍然存在一定的难度,动物模型与临床疾病的对应性也需要科研工作者们继续探索确证。

### 5 基因工程动物来源过敏性疾病模型

*Il-36r* 拮抗剂缺陷型 (*IL-36R antagonist-deficient, Il-36rn<sup>-/-</sup>*) 银屑病小鼠模型<sup>[49]</sup>:使用含咪喹莫特 (IMQ) 的乳膏局部涂抹 *Il-36r* 拮抗剂缺陷型 (*Il-36rn<sup>-/-</sup>*) 和 *Il-36r* 基因缺陷型 (*IL-36R-deficient, Il-36r<sup>-/-</sup>*) 小鼠耳部皮肤,两种小鼠进行对比;观察小鼠耳肿胀、棘皮病、红斑、皮肤剥落和角化过度;采用流式细胞术对炎症耳浸润进行定性与定量分析。基因敲除肥大细胞缺陷型小鼠模型<sup>[50]</sup>:6~8 周龄 C57BL/6 背景的 G 蛋白偶联受体 X2 (MRGPRB2) 基因敲除 (MUT) 小鼠,腹腔注射 70 mg/kg 戊巴比妥钠,实验前静脉注射 50  $\mu$ L 伊文思蓝染液 (12.5% 生理盐水, w/v),用游标卡尺测量足爪厚度,使用丙酮生理盐水提取伊文思蓝染料,于 620 nm 处测定 OD 值。体温试验:采用野生型 (WT) 或 *Mrgprb2* 基因敲除 (MUT) 6~8 周龄小鼠,用生物功能实验系统记录小鼠体温,并将探针插入小鼠肛门,得到直肠温度,3 min 测量 1 次,共持续 30 min。血管活性肠肽 (VIP) 基因缺乏小鼠后足超敏模型<sup>[51]</sup>:成年 C57BL/6 *Vip<sup>-/-</sup>* 小鼠, *Vip<sup>+/+</sup>* 作为对照,小鼠接受不同的神经损伤:备用神经损伤 (SNI)、正中神经损伤 (MNI),采用冯弗雷纤维丝试验评估小鼠机械伤害阈值,并进行后足触觉刺激;取脊髓进行促炎因子表达及淋巴细胞分析。不同基因缺陷小鼠脂质过氧化过敏模型<sup>[52]</sup>:野生型 (WT)、*Xpa<sup>-/-</sup>*、*Ercc 1-xpf* 内切酶复合物基因 (*Ercc*) 亚纯突变体 (*Ercc<sup>-/Δ</sup>*, 表达正常补体 *Ercc 1-xpf* 的 5%, 但 *Ercc<sup>-/-</sup>* 小鼠寿命仅 4 周, 而 *Ercc<sup>-/Δ</sup>* 小鼠寿命为 7 个月<sup>[53-57]</sup>, 小鼠皮下注射 0.5 mL/kg CCL<sub>4</sub>, 制成 1:1 橄榄油悬浮液, 每周 2 次, 共 5 周; 当小鼠被判定为晚期或自发活动减少时, 处死、分离组织进行组织学分析, 评估受试小鼠肝中脂质过氧化水平, 对小鼠肝、肾和胰腺切片并进行评分。2, 4, 6-三硝基氯苯 (TNCB) 诱导

*EomesGfp/tx Rorc(gt)-CreTg Rosa26RYfp/t* 小鼠接触性皮炎<sup>[58]</sup>:测定不同时间点耳肿胀反应、皮肤天然淋巴样细胞 (固有淋巴样细胞, ILCs) 数和细胞因子的产生;半抗原刺激小鼠诱导皮肤和耳部引流淋巴结中自然杀伤细胞的早期增加,分别与不同时间点耳部肿胀反应的峰值相对应。两条曲线对比从而反映小鼠过敏反应过程中 ILCs、细胞因子不同时刻的变化规律。

基因工程动物模型较之传统动物模型目的性与针对性更强,但仍然不能完全模仿人类过敏性疾病的病理生理过程,相较于人类,基因工程动物模型不具有免疫细胞和因子的系统性改变,疾病的靶基因也不一定具有特异性,只有不断期待基因工程技术的进步,争取早日构建出更加贴合人类过敏特性的基因工程动物模型<sup>[59]</sup>。

### 6 体外模型

大鼠嗜碱性白血病细胞系 (RBL-2H3 细胞) 模型<sup>[13]</sup>:10%胎牛血清培养基培养细胞,使用 1.0 ng/mL 抗二硝基苯酚 (DNP) 敏化 RBL-2H3 细胞,培养 8 h, PBS 去除未结合 IgE, 1.25 ng/ $\mu$ L DNP-BSA Tyrode's 缓冲液 (MT 缓冲液) 加入细胞培养孔,孵育 30 min,细胞经 4 $^{\circ}$ C 冷冻 10 min,离心收集上清液。裂解细胞使细胞释放组胺,使用组胺 EISA 试剂盒检测组胺含量,Wallac 1420 ARVOsx 多标签计数器测定 RBL-2H3 细胞脱颗粒后 Ca<sup>2+</sup> 内流情况,在 DNP-BSA 刺激下,每隔 1 min 测定 1 次,共 10 min。C48/80 诱导小鼠肿瘤细胞肥大细胞株 (P815 肥大细胞) 脱颗粒模型<sup>[60]</sup>:10%胎牛血清培养基培养细

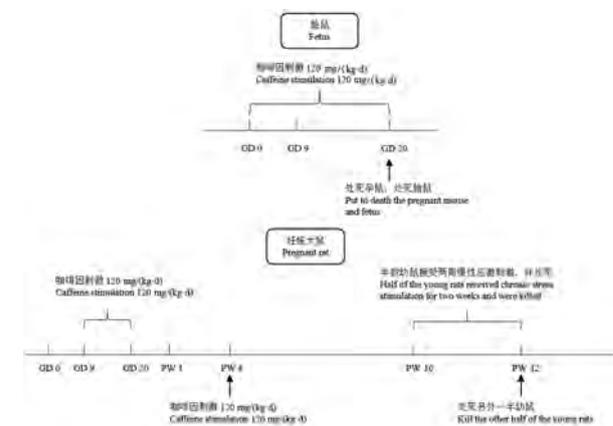


图 2 大鼠从妊娠第 0 天 (GD 0) 至出生后 12 周 (PW 12) 的处理过程

Figure 2 Treatment process of rats from the 0th day of pregnancy (GD 0) to 12 weeks after birth (PW 12)

胞 48 h, Tyrode's 缓冲液冲洗 3 次, 平衡 10 min。以 50  $\mu\text{L}$  C48/80 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行刺激, 45 min 后离心收集上清液和细胞, 测定生物活性介质。采用组胺 ELISA 试剂盒测定并分析上清液中组胺水平。测定  $\beta$ -氨基糖苷酶浓度、染色测定细胞脱颗粒率。氟喹诺酮类药物诱导人肥大细胞系 2 (LAD 2) 超敏模型<sup>[50]</sup>: 10% 胎牛血清培养基培养细胞, 以每毫升  $2 \times 10^6$  个细胞密度进行细胞培养, 并使用氟喹诺酮类药物孵育建立 LAD 2 细胞超敏模型, 进行细胞内钙动员实验、 $\beta$ -己糖苷酶释放实验、组胺释放实验、小干扰 RNA (siRNA) 转染实验, 从而判定 LAD2 细胞模型超敏反应程度。LPS 刺激小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 模型<sup>[18]</sup>: 使用添加 10% 胎牛血清改良和 100 U/mL 青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 10% 胎牛血清 Eagle's 培养基培养细胞适应一段时间后, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 刺激 8 h 进行分析。采用台盼蓝染色法进行细胞毒性试验, 通过流式细胞术分析细胞内 TNF- $\alpha$  水平。半抗原特异性 LN 细胞模型<sup>[61-62]</sup>: 加入 0.5 mmol/L DNBS 后培养 LN 细胞 72 h, 收集上清液进行 ELISA 检测, 采用流式细胞术分析细胞内 IL-36 $\alpha$  表达水平。烟曲霉菌可溶性蛋白诱导肥大细胞脱颗粒模型<sup>[27]</sup>: 3 月龄 SD 大鼠, 使用肝素化 Hank's 平衡盐溶液 10 mL 腹腔灌洗获得新鲜肥大细胞, 混合洗涤两次, 并在含 10% 胎牛血清的 RPIM-1640 培养基中以所需浓度悬浮, 加入烟曲霉菌可溶性蛋白孵育 15 min, 固定细胞后使用 0.1% 甲苯胺蓝染色测定肥大细胞脱颗粒百分率<sup>[63-64]</sup>。

过敏反应研究体外细胞模型大多使用肥大细胞模型, 也有巨噬细胞、RBL-2H3 细胞株等其他细胞模型, 肥大细胞脱颗粒模型是一种能较为直观反映细胞过敏程度的一种方法, P815 细胞相较于 RBL-2H3 细胞适合作为一种早期、稳定、敏感的肥大细胞脱颗粒体外检测模型<sup>[59]</sup>。

总体来讲, 体外细胞模型的构建思路主要为选择适宜的细胞株进行适应性培养后加入致敏原进行孵育, 进而再通过染色, 流式细胞术分析等检测手段分析模型细胞相关检测指标, 从而反映该模型过敏程度和过敏机制。

研究中常用的过敏性疾病体内外模型需要满足以下几点: ①模型构建尽可能贴合人类过敏性疾病发生发展病理生理过程。②满足研究所需的定性定量要求。③能够确定反应过敏性疾病的相关免疫指标, 并能够找到一定的方法精确、经济的测

量。④符合动物伦理、福利要求并进行评估。本文通过汇总、分析常用过敏性疾病研究模型, 通过分析各类模型的异同与优劣之处, 希望为研究者选择合适的过敏性疾病模型或者进行改进提供参考和启发。

#### 参考文献:

- [1] Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(2): 335-348.
- [2] Jiao D, Liu Y, Lu X, et al. Macrophages are the dominant effector cells responsible for IgG-mediated passive systemic anaphylaxis challenged by natural protein antigen in BALB/c and C57BL/6 mice [J]. *Cell Immunol*, 2014, 289(1-2): 97-105.
- [3] 曹雪涛. 医学免疫学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [4] Simons FER, Arduzzo LR, Dimov V, et al. World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 update of the evidence base [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2013, 162(3): 193-204.
- [5] D'amato G, Liccardi G, D'amato M, et al. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(9): 1113-1124.
- [6] Squaiella CC, Longhini AL, Braga EG, et al. Modulation of the type I hypersensitivity late phase reaction to OVA by *Propionibacterium acnes*-soluble polysaccharide [J]. *Immunol Lett*, 2008, 121(2): 157-166.
- [7] Lu SC, Chang YS, Kan HW, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediated pain hypersensitivity through Ret receptor in resiniferatoxin neuropathy [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(9): 494-502.
- [8] Li X, Wang J, Shi H, et al. Inhibition of three novel *Radix Scutellariae* extracts on immediate hypersensitivity [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(5): 54-60.
- [9] Goldoni FC, Barretta C, Nunes R, et al. Effects of *Eugenia umbelliflora* O. Berg (Myrtaceae)-leaf extract on inflammation and hypersensitivity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 244: 112133.
- [10] Dzama K, Cloete SWP, van Wyk JB, et al. Cutaneous hypersensitivity reactions against unfed tick larval extract of *Rhipicephalus evertsi* in South African Mutton Merino, Namaqua Afrikaner and Dorper sheep [J]. *Small Rumin Res*, 2018, 169(1): 113-117.
- [11] Marufu MC, Chimonyo M, Mans BJ, et al. Cutaneous hypersensitivity responses to *Rhipicephalus* tick larval antigens in pre-sensitized cattle [J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2013, 4(4): 311-316.
- [12] Chakrabarty A, Liao Z, Smith PG. Angiotensin II receptor type 2 activation is required for cutaneous sensory hyperinnervation and hypersensitivity in a rat hind paw model of inflammatory pain [J]. *J Pain*, 2013, 14(10): 1053-1065.

- [13] Kamei R, Fujimura T, Matsuda M, et al. A flavanone derivative from the Asian medicinal herb (*Perilla frutescens*) potently suppresses IgE-mediated immediate hypersensitivity reactions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 674-679.
- [14] Wang F, Huang LP, Yang P, et al. Inflammatory kidney injury in trichloroethylene hypersensitivity syndrome mice; Possible role of C3a receptor in the accumulation of Th17 phenotype [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 186: 109772.
- [15] Wang F, Huang LP, Dai YY, et al. Terminal complement complex C5b-9 reduced megalin and cubilin-mediated tubule proteins uptake in a mouse model of trichloroethylene hypersensitivity syndrome [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 317: 110-119.
- [16] Liu Z, Liu Z, Shi Y, et al. Evaluation of the immunosensitizing potential of chlorogenic acid using a popliteal lymph node assay in BALB/c mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(4): 1059-1065.
- [17] Carey JB, Allshire A, van Pelt FN. Immune modulation by cadmium and lead in the acute reporter antigen-popliteal lymph node assay [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(1): 113-122.
- [18] Jash A, Kwon HK, Sahoo A, et al. Topical application of porcine placenta extract inhibits the progression of experimental contact hypersensitivity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2): 654-662.
- [19] Nagatake T, Shioyama Y, Inoue A, et al. The 17, 18-epoxyeicosatetraenoic acid-G protein-coupled receptor 40 axis ameliorates contact hypersensitivity by inhibiting neutrophil mobility in mice and cynomolgus macaques [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(2): 470-484.
- [20] Sawada Y, Honda T, Hanakawa S, et al. Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(11): 1921-1930.
- [21] Bando K, Tanaka Y, Kuroishi T, et al. Mouse model of hydroquinone hypersensitivity via innate and acquired immunity and its promotion by combined reagents [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(5): 1082-1093.
- [22] Nguyen TG. Immune-modulation via IgD B-cell receptor suppresses allergic skin inflammation in experimental contact hypersensitivity models despite of a Th2-favoured humoral response [J]. *Immunol Lett*, 2018, 203: 29-39.
- [23] Park JH, Yeo IJ, Han JH, et al. Anti-inflammatory effect of astaxanthin in phthalic anhydride-induced atopic dermatitis animal model [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(4): 378-385.
- [24] Zemelka-Wiącek M, Majewska-Szczepanik M, Pyrzak W, et al. Complementary methods for contact hypersensitivity (CHS) evaluation in mice [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 387(1-2): 270-275.
- [25] Nakaji H, Niimi A, Matsuoka H, et al. Airway remodeling associated with cough hypersensitivity as a consequence of persistent cough: An experimental study [J]. *Respir Investig*, 2016, 54(6): 419-427.
- [26] Lee LY, Gu Q, Lin AH, et al. Airway hypersensitivity induced by eosinophil granule-derived cationic proteins [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2019, 57: 101804.
- [27] Morán G, Uberti B, Orloff A, et al. *Aspergillus fumigatus*-sensitive IgE is associated with bronchial hypersensitivity in a murine model of neutrophilic airway inflammation [J]. *J Mycol Med*, 2018, 28(1): 128-136.
- [28] 湛孝东, 姜玉新, 李良悛, 等. 不同浓度卵蛋白变应原对小鼠哮喘模型建立的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(4): 16-20, 后插 4.
- [29] Tamura A, Miyawaki I, Yamada T, et al. Oral administration of drugs with hypersensitivity potential induces germinal center hyperplasia in secondary lymphoid organ/tissue in Brown Norway rats, and this histological lesion is a promising candidate as a predictive biomarker for drug hypersensitivity occurrence in humans [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 271(1): 30-40.
- [30] Cao B, Wang J, Mu L, et al. Impairment of decision making associated with disruption of phase-locking in the anterior cingulate cortex in viscerally hypersensitive rats [J]. *Exp Neurol*, 2016, 286: 21-31.
- [31] Wang YL, Su YS, He W, et al. Electroacupuncture relieved visceral and referred hindpaw hypersensitivity in colitis rats by inhibiting tyrosine hydroxylase expression in the sixth lumbar dorsal root ganglia [J]. *Neuropeptides*, 2019, 77: 101957.
- [32] Lu Y, Cao DL, Zhao LX, et al. MicroRNA-146a-5p attenuates visceral hypersensitivity through targeting chemokine CCL8 in the spinal cord in a mouse model of colitis [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 139: 235-242.
- [33] Esquerre N, Basso L, Dubuquoy C, et al. Aluminum ingestion promotes colorectal hypersensitivity in rodents [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7(1): 185-196.
- [34] Zhang G, Yu L, Chen ZY, et al. Activation of corticotropin-releasing factor neurons and microglia in paraventricular nucleus precipitates visceral hypersensitivity induced by colorectal distension in rats [J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 55: 93-104.
- [35] 张薇, 赵映, 郑倩华, 等. 肠易激综合征内脏高敏模型不同制作方法的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 503-509.
- [36] 费巧玲, 齐睿娟, 张小雨, 等. 经皮致敏小鼠肠道过敏模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 619-625.
- [37] Hsieh CT, Lee YJ, Lee JW, et al. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates the pain hypersensitivity, spinal inflammation and oxidative stress induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats [J]. *Neurochem Int*, 2020, 135: x104686.
- [38] Omori Y, Kagaya K, Enomoto R, et al. A mouse model of sural nerve injury-induced neuropathy: gabapentin inhibits pain-related behaviors and the hyperactivity of wide-dynamic range neurons in the dorsal horn [J]. *J Pharmacol Sci*, 109(4): 532-539.
- [39] 李明珠, 王文萍, 金圣博. 奥沙利铂诱导的神经病理性疼痛

- 大鼠模型研究及其在中医方面应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 278-285.
- [40] Brenchat A, Romero L, García M, et al. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice [J]. *Pain*, 2009, 141(3): 239-247.
- [41] Li Z, Yin P, Chen J, et al. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates fentanyl-induced hypersensitivity in rats [J]. *J Pain*, 2017, 18(2): 188-199.
- [42] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [43] Xu D, Zhang C, He X, et al. High expression of hippocampal glutamic acid decarboxylase 67 mediates hypersensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to prenatal caffeine exposure in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 283: 39-51.
- [44] Xu D, Wu Y, Liu F, et al. A hypothalamic-pituitary-adrenal axis-associated neuroendocrine metabolic programmed alteration in offspring rats of IUGR induced by prenatal caffeine ingestion [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(3): 395-403.
- [45] Lu SC, Chang YS, Kan HW, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated pain hypersensitivity through Ret receptor in resiniferatoxin neuropathy [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(9): 494-502.
- [46] Migita K, Nishimura A, Eto F, et al. Muscarinic M1 receptors stimulated by intracerebroventricular administration of McN-A-343 reduces the nerve injury-induced mechanical hypersensitivity via GABAB receptors rather than GABAA receptors in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 142(2): 50-59.
- [47] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury [J]. *Pain*, 1990, 43(2): 205-218.
- [48] Akimoto N, Honda K, Uta D, et al. CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(6): e679.
- [49] Tortola L, Rosenwald E, Abel B, et al. Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 3965-3976.
- [50] Liu R, Hu S, Zhang Y, et al. Mast cell-mediated hypersensitivity to fluoroquinolone is MRGPRX2 dependent [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 417-427.
- [51] Gallo A, Leerink M, Michot B, et al. Bilateral tactile hypersensitivity and neuroimmune responses after spared nerve injury in mice lacking vasoactive intestinal peptide [J]. *Exp Neurol*, 2017, 293: 62-73.
- [52] Czerwińska J, Nowak M, Wojteczak P, et al. ERCC1-deficient cells and mice are hypersensitive to lipid peroxidation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 124: 79-96.
- [53] Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, et al. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1038-1043.
- [54] Weeda G, Donker I, de Wit J, et al. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(6): 427-439.
- [53] Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(16): 5082-5092.
- [54] de Vries A, van Oostrom CT, Hofhuis FM, et al. Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA [J]. *Nature*, 1995, 377(6545): 169-173.
- [57] de Waard MC, van der Pluijm I, Zuiderveen Borgesius N, et al. Age-related motor neuron degeneration in DNA repair-deficient *Erc1* mice [J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 120(4): 461-475.
- [58] Rafei-Shamsabadi DA, van de Poel S, Dorn B, et al. Lack of type 2 innate lymphoid cells promotes a type 1-driven enhanced immune response in contact hypersensitivity [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(9): 1962-1972.
- [59] 郑海豪, 石臻睿, 王亮春. 角质形成细胞异常诱发银屑病: 基因工程动物模型的启示 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2018, 51(10): 720-722.
- [60] Hu X, Wen Y, Liu S, et al. Evaluation of the anaphylactoid potential of *Andrographis paniculata* extracts using the popliteal lymph node assay and P815 cell degranulation *in vitro* [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 121.
- [61] Takamori A, Nambu A, Sato K, et al. IL-31 is crucial for induction of pruritus, but not inflammation, in contact hypersensitivity [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6639.
- [62] Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(43): 18581-18586.
- [63] Astorquiza MI, Fernández S. Anaphylaxis inhibitory factor in IgE-dependent mast cell stimulation [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 1999, 9(5): 330-334.
- [64] Moran G, Folch H, Henriquez C, et al. Reaginic antibodies from horses with Recurrent Airway Obstruction produce mast cell stimulation [J]. *Vet Res Commun*, 2012, 36(4): 251-258.

[收稿日期]2020-09-03

刘宸,李超,方梦蝶,等. 睾丸中 BORIS 的表达和功能研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 135-139.  
Liu C, Li C, Fang MD, et al. BORIS expression and function in testis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 135-139.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.020

## 睾丸中 BORIS 的表达和功能研究进展

刘宸,李超,方梦蝶,任娟,徐昊,王孝举,张衍梅\*

(浙江省医学科学院分子医学中心,杭州 310012)

**【摘要】** 印记位点调节物兄弟因子 BORIS,在脊椎动物的进化过程中从羊膜动物开始出现。人正常生理状态下,该蛋白仅在男性睾丸中高表达。雄性小鼠中 BORIS 的表达时序与精子发生时序高度一致,BORIS 基因敲除小鼠雄性不育,而雌性生长发育正常。BORIS 诱导生殖细胞中特定基因的表达,在精子发生中起重要作用。BORIS 在正常生理条件下特异性地调控精子发生。本文在综述近年来 BORIS 转基因小鼠、BORIS 基因敲除小鼠、睾丸中 BORIS 的表达和机制研究的基础上,总结了 BORIS 的表达定位、BORIS 对精子发生的作用机制、BORIS 功能研究和靶向药物研究,为针对 BORIS 的分子靶向治疗提供新的参考依据。

**【关键词】** BORIS;CTCF;精子发生;雄性不育;分子靶向治疗;小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0135-05

### BORIS expression and function in testis

LIU Chen, LI Chao, FANG Mengdie, REN Juan, XU Hao, WANG Xiaojun, ZHANG Yanmei\*  
(Center for Molecular Medicine, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310012, China)

**【Abstract】** BORIS (brother of the regulator of imprinted sites) was first expressed in amniotes during the evolution of vertebrates. Under human physiological conditions, this protein is highly expressed in male testes only. The expression sequence of BORIS in male mice is highly consistent with the sequence of spermatogenesis. Male BORIS knockout mice are sterile, while females are normal. BORIS induces the expression of specific genes in germ cells and has an important role in spermatogenesis, specifically regulating spermatogenesis under normal physiological conditions. Referring to recent studies of BORIS transgenic mice, BORIS knockout mice, and BORIS expression in testis, this review summarizes the expression and localization of BORIS in testis, the mechanism of BORIS in spermatogenesis, and the functional research and drug screening of BORIS, providing a new reference for molecular targeted therapy.

**【Keywords】** BORIS; CTCF; spermatogenesis; male infertility; molecular targeted therapy; mice

印记位点调节物兄弟因子 (the brother of the regular of imprinted sites, BORIS), 是调控细胞核三维空间结构的因子 CTCF (CCCTC binding factor) 的唯一同源因子。BORIS 在生理状态下仅在健康人体睾丸中正常表达,但在多种癌症中发现 BORIS 在除睾丸外的癌组织中异常表达<sup>[1]</sup>,且 BORIS 高表达的

癌症患者的生存期相对较短,因此,BORIS 是潜在的肿瘤治疗靶标<sup>[2-3]</sup>。BORIS 在男性的睾丸中参与精子发生<sup>[4]</sup>,而女性体内几乎检测不到 BORIS。虽然 BORIS 敲除小鼠未发现生命周期和生存状态改变,在雌性表型和繁育能力均正常的情况下,BORIS 缺失导致雄性不育的问题仍将严重破坏种群繁衍。

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (31871393); 浙江省自然科学基金 (LQY18H300001, LQ18C070002); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2019RC030)。

**【作者简介】** 刘宸 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 转化分子医学。E-mail: sirius\_lc@163.com

**【通信作者】** 张衍梅 (1981—), 女, 副研究员, 研究方向: 分子医学。E-mail: yanmeizhang81@yahoo.com

本文综述了 BORIS 在正常睾丸中的表达, BORIS 基因敲除小鼠和转基因鼠的胚胎发育研究, BORIS 在睾丸中功能的研究, 对精子发生的调控作用, 以及细胞质定位 BORIS 的功能研究进展和影响 BORIS 通路的相关药物。我们希望在理解正常组织中在生理状态下 BORIS 的表达和功能的基础上更深入地解析和挖掘 BORIS 在癌细胞中的作用机制, 以及在此基础上筛选提高男性生育能力且无诱发癌症风险的生物活性药物。

### 1 BORIS 在健康睾丸中特异性高表达

BORIS 在健康雄性小鼠睾丸中高表达, 但并非在胚胎睾丸发育初始就表达, 为了验证其表达时序, Jelinic 等<sup>[5]</sup>利用免疫组化实验检测了小鼠胚胎中 BORIS 的表达时序。研究发现在胚胎发育 13.5 dpc(交配后天数)时未检测到 BORIS, 但在 14.5 dpc 胚胎的有丝分裂停滞的生殖细胞中观察到 BORIS 蛋白表达, 17.5 dpc 时位于生精小管中心的生殖细胞有 BORIS 的表达。而小鼠成熟精子中未发现有 BORIS<sup>[6]</sup>。与在机体内普遍表达的 CTCF 不同, BORIS 在生理条件下仅在雄性睾丸中高表达。Loukinov 等<sup>[7]</sup>于 2002 年发现 CTCF 和 BORIS 在睾丸中的分布存在是互斥的。精原细胞经过初级精母细胞, 次级精母细胞, 最后发育为精子细胞。Sleutels 等<sup>[6]</sup>以正常成年小鼠睾丸为实验材料, 他们分离出了完整的曲细精管, 发现 CTCF 在曲细精管精子发生的任何时期表达, 而 BORIS 仅在晚期精母细胞和线性前期的精原细胞中有表达, 且在精母细胞中 BORIS 在细胞质中的含量比细胞核更加丰富。但也有报道阐述在圆形精子中检测到了 BORIS 的 mRNA 的表达<sup>[8]</sup>。上述各项研究均指示 BORIS 在生精小管中的精母精原细胞区表达。

在健康小鼠中 BORIS 在精子发生阶段才开始出现, 并可能进一步影响精原和精母细胞的发育, 但随着精子的成熟 BORIS 的表达消失。因此 BORIS 的表达时序与精子发生时序高度一致, 这提示 BORIS 的表达和功能在健康雄性小鼠中有调控精子发生的专一性。

### 2 BORIS 的正常表达维持胚胎发育

BORIS 在胚胎发育中的具有重要作用。Sleutels 等<sup>[6]</sup>于 2012 年构建了 BORIS 基因敲除小鼠, 繁殖出杂合子 BORIS *del/+* 和纯合子 BORIS *del/del*

*del* 小鼠。基因敲除后的小鼠无任何表型及行为异常。实验证明, 无论纯合子还是杂合子均对雌性小鼠无生育影响。而在雄性小鼠中, 杂合子小鼠正常发育, 小鼠依然有预期生育率。而纯合子小鼠的生育率明显降低。称重 90 日龄的 BORIS 基因敲除小鼠的睾丸的重量, 纯合子的睾丸平均重量显著低于杂合子小鼠的睾丸, 且精子含量显著降低, 仅为杂合子的 15%<sup>[6]</sup>。上述研究表明, BORIS 基因缺失影响雄性动物的生育能力, 但不影响雌性动物的生长发育、生殖及哺育后代的能力。

BORIS 的异常表达影响胚胎的正常生长发育。Sati 等<sup>[9]</sup>构建了 BORIS 转基因小鼠, 并对新生转基因小鼠与野生型小鼠进行 BORIS 的表达对比。以 qRT-PCR 的方式检测肝、肺、肾、脑、眼和皮肤组织, 野生型小鼠中未发现 BORIS 表达, 而转基因小鼠的上述器官中均有不同程度的表达, 以肺和皮肤组织表达量最高。研究表明 BORIS 转基因小鼠出现了生长迟缓、眼睛畸形、多器官病变、血管缺陷和新生儿死亡等现象。该研究证明在胚胎早期发育时期出现 BORIS 的表达将显著影响机体的生长发育。

综合 BORIS 在健康小鼠睾丸发育时序中的表达以及 BORIS 敲除、转基因对小鼠的影响, BORIS 可能仅在健康哺乳动物睾丸发育过程中特异表达, 并专一调控精子发生。BORIS 的缺失虽然不影响动物个体的生命周期和生存状态, 但极大降低雄性动物的生育能力, 从而影响其种群的繁殖能力。

### 3 睾丸中 BORIS 通过竞争抑制调控精子发生

BORIS 与其旁系同源蛋白 CTCF 的位于中部的氨基酸序列为锌指结构区, 11 个高度同源的锌指区域使得二者识别相同的 DNA 簇。但 BORIS 和 CTCF 的氨基和羧基端差异较大, 差异区域占据各自蛋白质氨基酸序列全长近三分之二的区域<sup>[7]</sup>。BORIS 的氨基和羧基端可能与不同配体相互作用竞争 CTCF 的结合位点<sup>[10]</sup>。研究表明 BORIS 与 CTCF 不同, BORIS 识别 DNA 时并不依赖 DNA 甲基化的程度<sup>[11]</sup>。对基因的表达调控研究发现, BORIS 激活基因表达, 而 CTCF 抑制基因表达<sup>[12]</sup>。这些结果表明, CTCF 通常为抑制因子抑制基因转录, 而 BORIS 是激活因子促进基因转录<sup>[12]</sup>。

在分离的野生型小鼠睾丸细胞中利用 BORIS 和 CTCF 的抗体进行染色质免疫共沉淀(ChIP), 结果显示 BORIS 与 *Stra8* 和 *Prss50* 的启动子优先结

合,而 CTCF 与 *Vps18* 优先结合,该结果表明 BORIS 在睾丸中拥有和 CTCF 不同的功能<sup>[6]</sup>。*Stra8* 在 B 精原细胞发育至线性前期精母细胞瞬时表达,*Stra8* 的瞬时表达对于视黄酸诱导的减数分裂必需<sup>[13-14]</sup>。免疫组化结果显示 BORIS 的表达时序类似 *Stra8*,胚胎干细胞中 BORIS 的过表达研究显示 GFP-BORIS 在特定位点结合且诱导睾丸特异性基因表达<sup>[6]</sup>。ChIP 研究显示 GFP-BORIS 与 *Gal3st1*, *Stra8* 和 *Prss50* 的启动子结合,调控并诱导上述基因的表达<sup>[6]</sup>,其中 *Gal3st1* 对精子发生必需<sup>[8]</sup>。上述研究均表明睾丸中表达的 BORIS 与精子发生密切相关。

#### 4 BORIS 与睾丸特异性转录调节因子共同调控睾丸发育

BORIS 缺失小鼠会因睾丸变小、配子产生延迟而导致生育能力降低,研究发现受 BORIS 调控的 *Stra8* 和 *Prss50* 等基因调控下游基因的表达影响精子发生<sup>[6,15]</sup>,因此 BORIS 可能通过睾丸特异性转录因子级联影响睾丸的发育。Pugacheva 等<sup>[16]</sup>通过 ChIP 对小鼠睾丸中 BORIS 和 CTCF 的结合位点进行分析,发现存在 2 类 CTCF 家族因子结合位点: 1xCTSes(单一 motif)和 2xCTSes(重复 motif)。其中 CTCF 结合 1xCTSes,而 BORIS 结合 2xCTSes 或 BORIS 和 CTCF 共同结合 2xCTSes。相比于 CTCF 的结合位点 1xCTSes, BORIS 的结合位点 2xCTSes 可富集更多的转录相关因子 RNAP II, H3K27ac 和 H3K4me3<sup>[16]</sup>,表明 BORIS 更易富集转录因子、参与转录调控。

研究发现睾丸特异性转录调节因子(testis-specific transcriptional regulators, TSTRs)富集在 BORIS 在基因组上的结合位点,调控睾丸发育。通过 ChIP 分析数个 TSTR(*A-myb*, *Brd4*, *Dmrt1*, *Dmrt6*, *Taf7l*, *Rfx2*, *Trim33*)与 1xCTSes 或 2xCTSes 两类结合位点的相互作用,发现 TSTR 于 13.4% 的 BORIS 和 CTCF 共同的结合位点富集,于 44.2% 的 BORIS 单独结合位点富集,而 CTCF 单独结合位点几乎没有 TSTR 的富集<sup>[16]</sup>。在已确定的位点中,只有那些与 TSTR 相结合的 BORIS 结合位点才与成熟精子中鱼精蛋白的组蛋白保留区紧密相连<sup>[17]</sup>。精子中 TSTR 相关的 BORIS 结合位点,可通过促进精子中的高水平转录以及组织精子染色质来促进组蛋白在精子中的保留。组蛋白与精子分化为单倍体密切相关<sup>[18]</sup>,由此可知, TSTR 与 BORIS 在基因组上结合位点的相互作用对精子发生有重要影响。

#### 5 细胞质定位 BORIS 的功能及机制

在精子发生过程中,精原细胞的干细胞性特征和精母细胞的正常生长发育是非常关键的。已有研究表明 BORIS 和细胞凋亡、细胞周期、干细胞调节相关<sup>[1]</sup>。Zhang 等<sup>[19]</sup>研究发现细胞质定位的 BORIS 有明确的抑制细胞凋亡的功能。通过删除中部锌指结构域,构建了细胞质定位的 BORIS (BORIS-ZFdel),发现 BORIS-ZFdel 阻止细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质,同时 caspase3/7 活性减弱,确证了细胞质定位的 BORIS 有抑制细胞凋亡的功能。

此外, BORIS 调控细胞有丝分裂的细胞周期<sup>[20]</sup>。和其他细胞周期调节因子相似, BORIS 的过量表达影响了细胞周期的正常进行<sup>[21]</sup>, BORIS 调控细胞周期标志因子 PCNA and Cyclin A 的表达, BORIS 的过度表达引起细胞在 S 期的积累、细胞增大和多倍体细胞的出现,导致有丝分裂失败。BORIS 需要被进一步降解以利于细胞周期的顺利进行。去甲基化作用显著提高 BORIS 的表达量,因此 BORIS 在癌症中被激活<sup>[22]</sup>,去甲基酶脂肪团和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)基因敲除的小鼠出现小鼠精原细胞中染色体不稳定,以及将细胞阻滞于 G2/M 期<sup>[23]</sup>,睾丸中由于去甲基化程度影响的 BORIS 的表达水平可能调控精母精原细胞有丝分裂的细胞周期,进而影响精子发生<sup>[23-24]</sup>。

BORIS 亦参与调节干细胞。已有研究表明 BORIS 在癌症干细胞中表达,与特定的干细胞标记呈正相关(如 hTERT 端粒酶基因),因此被认定为是干细胞标记物的正向调节剂,并在维持干细胞中发挥作用<sup>[1]</sup>。BORIS 沉默后,干细胞标记因子如 ALDH1、NANOG、OCT4、SOX2 和 ABCG2 普遍下调, BORIS 可能通过诱导 hTERT 端粒酶表达,使干细胞获得自我更新和永生的能力<sup>[25]</sup>。

#### 6 基于 BORIS 为靶点的药物研究

Fang 等<sup>[26]</sup>利用 BORIS 表达干扰的 microarray 表达谱比对 CMap 数据库,从 1309 种药物处理 6 种细胞获得的 microarray 表达谱中比对获得了与 BORIS 表达干扰处理相似的药物苍术昔。*SEMA3A*、*XRCC4* 和 *PPLL6* 基因在苍术昔处理和 BORIS 表达干扰处理下表达均升高。苍术昔是苍耳子提取物,

研究表明苍术昔作用于线粒体<sup>[27]</sup>,导致线粒体通透性增强,提示 BORIS 可能作用在线粒体相关信号通路上。有研究证明,苍术昔有促进大鼠精子早期凋亡现象,且在苍术昔作用下,精子线粒体会出现融合、外膜破损、通透性增加和基质丢失等情况<sup>[27]</sup>,BORIS 敲除小鼠中也发现精原精母细胞大量凋亡的现象。BORIS 出现在精子发生早期,在细胞中起到抑制凋亡和促进增殖的作用。在早期精子中,苍术昔可能抑制 BORIS 的功能,导致大鼠精子出现了早期凋亡。

## 7 结语和展望

以往研究发现位于 Y 染色体的 *Usp9y*, X 染色体的 *Usp26*, 及常染色体的 *Sox30* 等都有调控精子发生的作用<sup>[28-30]</sup>,但特殊的是 BORIS 在生理状况下仅在人体睾丸中表达,且是调控精子发生的关键因子之一,但目前缺乏与男性不育症的相关研究。BORIS 基因敲除仅影响成年雄性的生育能力,但对幼龄和雌性个体无任何影响(包括行为、表型、生存周期和繁育能力),BORIS 失调将严重影响男性的生育能力进而影响种群的繁育<sup>[6]</sup>。BORIS 参与精子发生并对男性生育起重要作用,对于少精或精子发育异常的男性患者可考虑应用激活 BORIS 的治疗方法。此外,BORIS 在除睾丸外的其他器官中表达会导致胚胎发育异常和致死,而 BORIS 也被发现与多种肿瘤发生、耐药和癌症患者预后相关<sup>[31-32]</sup>。因此 BORIS 也是潜在的抗肿瘤作用靶点。由于目前世界范围内并未筛选出直接靶向 BORIS 的抗肿瘤生物活性抑制剂,考虑到 BORIS 在精子发生中的重要作用,靶向 BORIS 的肿瘤治疗药物的筛选应建立以精母精原细胞为对照的并行的肿瘤细胞药物筛选模型,以甄别有效抑制肿瘤且保护男性生育能力的 BORIS 靶向药物。综上所述,BORIS 与雄性哺乳动物的精子发生密切相关,对 BORIS 在睾丸中的功能研究将解析其作用机制,为靶向 BORIS 的药物筛选,建立保护 BORIS 活性的方法奠定基础。

### 参考文献:

- [ 1 ] Soltanian S, Dehghani H. BORIS: a key regulator of cancer stemness [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 154.
- [ 2 ] Loukinov D. Targeting CTCFL/BORIS for the immunotherapy of cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(12): 1955-1965.
- [ 3 ] Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11223-11237.
- [ 4 ] Jones TA, Ogunkolade BW, Szary J, et al. Widespread expression of BORIS/CTCFL in normal and cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22399.
- [ 5 ] Jelinic P, Stehle JC, Shaw P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(11): e355.
- [ 6 ] Sleutels F, Souchit W, Bartkuhn M, et al. The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2012, 5(1): 8.
- [ 7 ] Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, et al. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(10): 6806-6811.
- [ 8 ] Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Pack S, et al. Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(10): 2473-2484.
- [ 9 ] Sati L, Zeiss C, Yekkala K, et al. Expression of the CTCFL gene during mouse embryogenesis causes growth retardation, postnatal lethality, and dysregulation of the transforming growth factor beta pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(19): 3436-3445.
- [ 10 ] Nishana M, Ha C, Rodriguez-Hernandez J, et al. Defining the relative and combined contribution of CTCF and CTCFL to genomic regulation [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 108.
- [ 11 ] Nguyen P, Cui H, Bisht KS, et al. CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5546-5551.
- [ 12 ] Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, et al. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7763-7774.
- [ 13 ] Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, et al. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(39): 14976-14980.
- [ 14 ] Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, et al. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(19): 3233-3242.
- [ 15 ] D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N, et al. The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20): 5978-5986.
- [ 16 ] Pugacheva EM, Rivero-Hinojosa S, Espinoza CA, et al.

- Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions [J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 161.
- [17] Rivero-Hinojosa S, Kang S, Lobanenko VV, et al. Testis-specific transcriptional regulators selectively occupy BORIS-bound CTCF target regions in mouse male germ cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41279.
- [18] Erkek S, Hisano M, Liang CY, et al. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(7): 868–875.
- [19] Zhang Y, Fang M, Song Y, et al. Brother of Regulator of Imprinted Sites (BORIS) suppresses apoptosis in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40786.
- [20] Rosa-Garrido M, Ceballos L, Alonso-Lecue P, et al. A cell cycle role for the epigenetic factor CTCF-L/BORIS [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39371.
- [21] Murray AW. Recycling the cell cycle; cyclins revisited [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 221–234.
- [22] Link PA, Zhang W, Odunsi K, et al. BORIS/CTCF mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Immun*, 2013, 13: 6.
- [23] Huang T, Gao Q, Feng T, et al. FTO knockout causes chromosome instability and G2/M arrest in mouse GC-1 cells [J]. *Front Genet*, 2019, 9: 732.
- [24] He J, Huang Y, Liu Z, et al. Hypomethylation of BORIS is a promising prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2017, 629: 29–34.
- [25] Alberti L, Losi L, Leyvraz S, et al. Different effects of BORIS/CTCF on stemness gene expression, sphere formation and cell survival in epithelial cancer stem cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132977.
- [26] Fang M, Song Y, Ren J, et al. Atractyloside mimics BORIS knockdown to induce DNA damage in colorectal cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(7): 3286–3293.
- [27] 李莉, 吴德玲, 戴宁, 等. 苍术苷体外对大鼠精子线粒体膜电位及凋亡的影响 [J]. *中国药理学与临床*, 2019, 35(5): 25–30.
- [28] Li H, Liang Z, Yang J, et al. DAZL is a master translational regulator of murine spermatogenesis [J]. *Natl Sci Rev*, 2019, 6(3): 455–468.
- [29] Sakai K, Ito C, Wakabayashi M, et al. Usp26 mutation in mice leads to defective spermatogenesis depending on genetic background [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13757.
- [30] 齐婉婧, 孙奇, 李媛, 等. 小鼠生殖细胞特异性转录因子 SOHLH1 调控 Sox30 基因表达的机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(7): 36–41.
- [31] Dougherty CJ, Ichim TE, Liu L, et al. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(1): 109–112.
- [32] Debruyne DN, Dries R, Sengupta S, et al. BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells [J]. *Nature*, 2019, 572(7771): 676–680.

[收稿日期] 2020-09-15

宋韶鹤,苗晋鑫,王峥,等. 食管癌小鼠模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 140-146.

Song SH, Miao JX, Wang Z, et al. Advances in mouse models of esophageal cancer [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 140-146. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.021

## 食管癌小鼠模型研究进展

宋韶鹤<sup>1</sup>, 苗晋鑫<sup>2\*</sup>, 王 峥<sup>2</sup>, 张春歙<sup>3</sup>, 苗明三<sup>2\*</sup>

(1.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000;2.河南中医药大学,郑州 450046;  
3.郑州大学第一附属医院,郑州 450052)

**【摘要】** 食管癌是世界上消化道常见的恶性肿瘤之一,其发病率与死亡率呈逐年上升趋势,且趋于年轻化。食管癌的发病、转移和耐药机制尚未完全清楚。中药抗肿瘤和逆转耐药等作用日益受到关注。食管癌小鼠模型有益于分析人类食管癌发病机制与中医药防治肿瘤的研究策略。食管癌小鼠模型主要分为三大类,诱发性模型、移植性模型和基因工程模型。然而,尚没有一种模型能概括人类食管癌的所有特征,选择合适的食管癌小鼠模型来解决特定食管癌问题尤为重要。本文综合国内外研究文献,对目前常用的小鼠食管癌模型进行综述,归纳总结各类型食管癌小鼠模型制备方法及各模型优缺点与适用范围,以期对中医药防治食管癌的研究提供科学基础。

**【关键词】** 食管癌;小鼠模型;中药

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0140-07

## Advances in mouse models of esophageal cancer

SONG Shaohe<sup>1</sup>, MIAO Jinxin<sup>2\*</sup>, WANG Zheng<sup>2</sup>, ZHANG Chunyang<sup>3</sup>, MIAO Mingsan<sup>2\*</sup>

(1. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.  
2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046. 3. the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

**【Abstract】** Esophageal cancer is globally one of the most common malignant tumors of the digestive tract. Its morbidity and mortality are increasing annually, and it tends to affect more young people. The pathogenesis, metastasis, and drug resistance mechanisms of esophageal cancer are not fully understood. The anti-tumor role and reversal of drug resistance by traditional Chinese medicine have received increasing attention. The mouse model of esophageal cancer is helpful to analyze the pathogenesis of human esophageal cancer and the research strategy of traditional Chinese medicine on tumor prevention. Mouse models of esophageal cancer are mainly divided into three categories, induced models, transplanted models, and genetically engineered models. However, no model can represent all the characteristics of human esophageal cancer. It is particularly important to choose a suitable mouse model of esophageal cancer to solve specific esophageal cancer problems. This article summarizes the domestic and international research literature, reviews the current commonly used mouse esophageal cancer models, summarizes the preparation method of various types of esophageal cancer mouse models, and compares the advantages and disadvantages of each model and the scope of application, to provide a research basis for the prevention and treatment of esophageal cancer by traditional Chinese medicine.

**【Keywords】** esophageal cancer; mouse model; traditional Chinese medicine

**【基金项目】** 中国博士后科学基金特别资助(2021T140184);河南省高等学校重点科研项目(21A360021);河南省博士后科研启动项目(202001043);河南省医学科技攻关计划项目(2018020067)。

**【作者简介】** 宋韶鹤(1986—),女,本科,主管药师,主要从事中药药理及动物模型研究。E-mail: 359074172@qq.com

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

苗晋鑫(1986—),博士,助理研究员,主要从事动物模型及肿瘤防治研究。E-mail: jinxin.miao@yahoo.com

\* 共同通信作者

食管癌(esophageal cancer, EC)是消化道常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别居全球恶性肿瘤的第 8 位和第 6 位,且逐年上升和趋于年轻化<sup>[1]</sup>。我国是食管癌高发地区,食管癌发病率和死亡率均居世界首位,且新发病例占据世界新发食管癌病例一半以上<sup>[2]</sup>。食管癌主要有两种病理组织类型,食管腺癌(esophageal adeno-carcinoma, EAC)和食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)<sup>[3]</sup>,我国食管癌类型主要是食管鳞癌<sup>[4]</sup>。尽管现代治疗技术取得了新的进展,但是食管癌预后仍然很差,5 年生存率不足 20%<sup>[5-6]</sup>。现今,中药防治肿瘤受到更多关注,临床研究显示中药能显著提高食管癌患者免疫能力、逆转化疗药物的耐药性以及改善预后<sup>[7-8]</sup>。但是,中药防治食管癌的分子机制尚不完全清楚。因此,了解这些机制对中药改善食管癌患者的预后至关重要。食管癌小鼠模型是研究 EC 发生、发展、转移和治疗肿瘤策略进行临床前测试重要的实验工具。本文回顾了目前常用的 EC 小鼠模型,包括化学诱导性食管癌模型、移植性食管癌模型、基因工程小鼠模型。对每种 EC 小鼠模型的制备方法、模型特点及使用范围进行阐述和比较,为食管癌小鼠模型的发展和中医药防治食管癌的研究提供科学依据。

## 1 诱发性食管癌小鼠模型

诱发性食管癌小鼠模型多为致癌因素与动物的食管直接或间接接触,使食管发生癌变,形成食管癌动物模型。化学法是诱发动物的食管癌常用的方法之一,通过化学致癌物使小鼠致癌,建立化学诱导小鼠食管癌模型。化学致癌物的剂量、给药方案、小鼠品系和年龄等诸多因素影响化学致癌物诱发肿瘤发生率。亚硝胺类致癌物是食管癌诱发模型的诱癌剂,但是相关法律规定亚硝胺类化学物不在用于动物实验。本文重点介绍,4-硝基喹啉-N-氧化物(4-NQO)诱发小鼠食管癌以及致癌物结合转基因小鼠模型研究食管癌。

4-NQO 是一种水溶性的喹啉衍生物,在体内 4-NQO 主要在还原酶的作用下引起 DNA 单链断裂、碱基缺失和氧化碱基等 DNA 的损伤而产生癌变。由于食管分布较多的 4-NQO 还原酶,所以食管是 4-NQO 作用的主要靶器官之一。Tang 等<sup>[9]</sup>首先用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 4-NQO 放入水中,使 C57BL/6 或

CBA 小鼠自由饮水 16 周,然后用正常水继续喂养 12 周,28 周病理组织观察所有的小鼠食管出现扁平的鳞状异型增生,外生性乳头鳞状肿瘤和浸润性鳞状细胞癌等食管鳞癌特征。杜展等<sup>[10]</sup>用同样的方法建立食管癌模型,利用食管拉网的方法检测 12 周的小鼠食管,病理组织学发现食管上皮不典型增生,且分别在第 16、20 和 24 周观察到浸润性食管鳞癌的发生。研究人员利用复方化浊润燥降气方能有效减轻 4-NQO 诱导的小鼠食管癌前病变模型的病理损害程度,确定复方化浊润燥降气方能够预防和治疗小鼠食管癌前病变<sup>[11]</sup>。Zheng 等<sup>[12]</sup>在饮水中用 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  4-NQO 处理雌雄各 8 只 129J/C57B6/L 小鼠 8 周,然后换成常规饮用水处理 10 周,结果在第 18 周结束时,小鼠食管既有腺癌又有鳞状细胞癌两种类型,且雄性小鼠对 ESCC 的肿瘤发生更敏感。吕翠田等<sup>[13]</sup>利用六君子汤对 4-NQO 诱导的食管癌小鼠干预,六君子汤组小鼠活动较正常,体重下降不明显;与模型组相比,六君子汤组显著提高  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  T 细胞比例,提高 IL-10 等细胞因子水平提升机体免疫功能,纠正  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  T 细胞比例改善免疫功能失衡及免疫抑制。

许多基因工程小鼠对 4-NQO 诱导的食管癌变表现出更高的敏感性。王立群等<sup>[14]</sup>利用 4-NQO 诱导 *SLC39A5* 基因敲除的 C57BL/6 小鼠和野生 C57BL/6 小鼠食管癌模型的成瘤情况,*SLC39A5* 基因敲除小鼠诱导成瘤率低于野生小鼠,确定 *SLC39A5* 基因对食管癌发生有影响。另外,miR-31 过表达转基因小鼠模型和 *Cyclin D1* 过表达转基因小鼠,*Nrf2* 基因敲除小鼠模型和 *p53* 突变小鼠模型结合 4-NQO 饮水诱导更易于诱发食管鳞状细胞癌<sup>[15]</sup>。以上研究提示,诱发性食管癌模型制备方法稳定,致癌部位集中在上消化道,成模率高,模拟了食管癌动态发展过程,有助于食管癌变机制与形态学的研究。但是化学诱导的食管癌病变演变迅速和成瘤部位难确定,需要控制造模时间。

## 2 移植性食管癌小鼠模型

移植性食管癌小鼠模型是将食管癌组织或细胞系接种于小鼠体内形成食管癌动物模型。根据不同的移植部位,分为异位移植(皮下或腹腔)与原位移植(食管)<sup>[16-17]</sup>;根据不同的移植肿瘤处理方式,分为细胞移植和组织块移植。同种移植(动物

之间)模型在食管癌中研究很少,我们不做阐述。异种移植(人与动物之间)食管癌小鼠模型是目前应用最多的食管癌动物模型,主要将人食管癌细胞或人食管癌组织接种于免疫缺陷小鼠而建立的模型。本文主要介绍皮下异种移植瘤模型与原位异种移植瘤模型。

### 2.1 皮下异种移植瘤模型

皮下异种移植瘤是指将人的食管癌细胞系或患者食管癌组织接种于免疫缺陷小鼠的皮下,使免疫缺陷小鼠皮下形成肿瘤。多种人食管鳞癌细胞株 KYSE-270、KYSE-70、KYSE-30 以及食管腺癌细胞株 OACM5.1 和 SK-GT-4 等用于皮下细胞系异种移植(cell-line-derived xenograft, CDX)模型的建立<sup>[18]</sup>。彭海燕等<sup>[19]</sup>将食管鳞癌 Eca109 细胞接种裸鼠皮下,建立食管鳞癌移植瘤模型,体内评价槲寄生碱抑制食管癌移植瘤生长和延长荷瘤小鼠的生存期。利用 Eca109 建立裸鼠皮下异种移植瘤模型评价启膈化痰合剂对顺铂治疗小鼠有增效作用<sup>[20]</sup>。Crescenzi 等<sup>[21]</sup>将  $1 \times 10^6$  食管鳞癌 Kyse-30 细胞皮下接种重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠双背外侧,成功建立了 ESCC 皮下移植瘤模型。Ma 等<sup>[22]</sup>利用食管 Eca109 细胞皮下异种移植裸鼠建立食管癌小鼠模型,通过体内模型阐明双氢青蒿素(青蒿素衍生物)可能通过细胞阻滞诱导自噬。柏文等<sup>[23]</sup>利用绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶(Luc)双标记 ECA109 细胞建立光学 EC 肿瘤模型,动态观察 ECA109 食管癌细胞在裸鼠皮下生长过程。虽然远处转移是 EC 的常见现象,但是极少有研究报道食管癌皮下异种移植模型发生远端转移。Liu 等<sup>[24]</sup>比较了 8 种食管癌细胞分别接种 4 种不同类型的免疫缺陷小鼠,发现  $5 \times 10^6$  的食管腺癌 FLO-1 细胞皮下接种 12 只 NOD-SCID IL-2R $\gamma^{\text{KO}}$ (NSG)小鼠和 5 只 NOD-SCID 小鼠均能皮下成瘤,但只有 11 只 NSG 小鼠发生了肝转移。细胞系移植皮下肿瘤生长速度快且可以直接评估肿瘤的生长,但是细胞系缺乏肿瘤异质性,无法反应有限数量细胞引起的人类肿瘤发展等局限性。

由于皮下 CDX 移植模型的局限性,研究人员开发患者来源的异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型用于肿瘤的研究。Zou 等<sup>[25]</sup>利用 EC 患者手术切除的新鲜食管鳞癌组织皮下植于

SCID 小鼠,成功建立 ESCC PDX 移植小鼠模型,结果发现 ESCC PDX 在组织病理学特征和化学敏感性与原发性肿瘤高度吻合。PDX 保留了人类肿瘤的原始结构和基质成分,并保留了人肿瘤的异质性,产生 PDX 的原始组织可以在体内连续扩增等优势。但是较长的模型建立时间和需要免疫缺陷宿主限制了该动物模型的扩大应用。

### 2.2 原位异种移植瘤模型

皮下移植瘤模型不是自然形成的肿瘤,难以模拟人类食管癌原位生长的情况以及远处转移的特征,与皮下模型相比,原位移植模型是研究 EC 更好的选择。原位移植是在食管接种人的食管癌细胞或组织,数周后肿瘤形成并发生肿瘤侵袭及远处器官转移。Gros 等<sup>[26]</sup>利用质粒转染方法获得 GFP 稳定表达的人食管腺癌 PT1590 细胞,将 PT1590-GFP 细胞皮下注射裸鼠,肿瘤发生后无菌切除、破碎,通过手术将  $1 \text{ mm}^3$  的肿瘤块植入小鼠腹部食管腔,建立模拟 EAC 患者原发肿瘤生长以及肝、肺和淋巴结转移模型。另有研究利用荧光素酶标记人食管鳞癌 TE8 细胞,  $2 \times 10^6$  细胞注射裸鼠腹段食管,利用小动物活体成像发现 3 周开始出现食管肿瘤,表明成功建立了 ESCC 原位移植模型<sup>[27]</sup>。有报道利用生物发光成像技术建立 ESCC 原位移植模型,用于评价药物作用<sup>[28]</sup>。原位移植模型模拟了患者食管癌发生的局部和转移特征,且能够短期内检测药物的疗效及治疗策略。但是由于解剖部位特殊和移植手术的复杂,此模型应用受到限制。另外,由于是免疫缺陷小鼠,无法研究肿瘤与宿主相关因素。

## 3 基因工程食管癌小鼠模型

诱发性食管癌小鼠模型是研究环境因素的必要动物模型,而肿瘤的发生和发展还受体内多基因的变化和多因素的累积等综合影响。因此,需要基因工程小鼠模型的建立,该模型加强了对癌症生物学的理解,可用于明确基因功能以及鉴别新的癌症基因和肿瘤生物标志物在食管癌的作用,提高对食管癌发病机制的认识<sup>[29]</sup>。基因编辑技术可构建基因敲入和敲除以及条件/诱导动物模型<sup>[30-31]</sup>。本文主要阐述转基因食管癌小鼠模型和基因敲除食管癌小鼠模型(表 1)。

表 1 化学诱导和基因工程改造的食管癌小鼠模型  
Table 1 Comparison of mouse models of esophageal cancer

动物模型 Animal model	方法 Method	表型 Phenotype	文献 References
4-NQO 诱发模型 4-NQO induced model	饮用含 4-NQO 水 16 周, 然后恢复正常水 12 周 4-NQO water for 16 weeks, then return to normal water for 12 weeks	CBA 和 C57BL/6 小鼠发生乳头状瘤和浸润性 ESCC, 且发生率 100% CBA and C57BL/6 mice developed papilloma and invasive ESCC, 100% incidence	[9]
<i>ED-L2/Cyclin D1</i> ; <i>p53</i> <sup>-/-</sup>	<i>Cyclin D1</i> 过表达和 <i>p53</i> 缺失 <i>Cyclin D1</i> overexpression and <i>p53</i> deletion	12 个月的 <i>ED-L2/Cyclin D1</i> ; <i>p53</i> <sup>-/-</sup> 小鼠出现 ESCC; 25% 的 <i>ED-L2/Cyclin D1</i> ; <i>p53</i> <sup>+/-</sup> 小鼠发生淋巴结转移 12 months old <i>ED-L2/Cyclin D1</i> ; <i>p53</i> <sup>-/-</sup> mice have ESCC; 25% of <i>ED-L2/Cyclin D1</i> ; <i>p53</i> <sup>+/-</sup> mice have lymph node metastasis	[32]
<i>ED-L2/ Klf4</i>	<i>Klf4</i> 过表达 <i>Klf4</i> overexpression	6 个月的小鼠食管发生慢性炎症和发育不良; 20~24 个月发生 ESCC Chronic inflammation and dysplasia occurred in the esophagus of mice at 6 months; ESCC occurred at 20~24 months	[33]
<i>ED-L2/ IL-1β</i>	<i>IL-1β</i> 过表达 <i>IL-1β</i> overexpression	6 个月小鼠食管发生炎症; 12~15 个月小鼠出现严重的柱状化生; 20~22 个月小鼠发生严重不典型增生或食管腺癌 Inflammation of the esophagus occurred in 6 mice; severe columnar metaplasia occurred in mice at 12~15 months; severe dysplasia or esophageal adenocarcinoma occurred in mice at 20~22 months	[34]

### 3.1 转基因食管癌小鼠模型

不同组织和细胞的特异性启动子已被用于研究食管功能。疱疹病毒 (EBV) 的 *ED-L2* 启动子在上皮细胞中表达, 尤其在食管的基底层的分化细胞中更具活性。*ED-L2* 在转基因小鼠模型中靶向细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1), 导致食管鳞状细胞发育不良和食管的癌前病变<sup>[35]</sup>。此小鼠模型具有严重的不典型增生特点, 其核细胞质比例异常, 导致口腔和食道发育异常, 这是癌症的重要前兆。与 *p53* 基因缺失的小鼠杂交的 *ED-L2/Cyclin D1* 小鼠发生食管鳞癌, 其中约三分之一的小鼠发现淋巴结转移<sup>[32]</sup>。Tetreault 等<sup>[33]</sup> 采用 *ED-L2* 启动子在小鼠食管上皮细胞中过表达 Krüppel 样因子 4 (Klf4) 转录调节因子, 建立转基因食管癌小鼠模型。该小鼠模型出现食管鳞状上皮不典型增生和鳞状细胞癌。除了转基因 ESCC 小鼠模型, 研究人员还开发了转基因 EAC 小鼠模型。Quante 等<sup>[34]</sup> 构建 *ED-L2* 启动子驱动细胞因子 1β (IL-1β) 在食管过表达的转基因小鼠, 发现 *IL-1β* 过表达的小鼠在 6 个月时出现中度炎症, 在 12~15 个月时出现巴雷特化生, 到 20~22 个月时, 小鼠会发展为高度不典型增生或食管腺癌。这些转基因小鼠模型可以准确地概括人类肿瘤中发现的遗传改变, 并研究相关基因与食管癌发生的相互作用。

### 3.2 基因敲除食管癌小鼠模型

Stairs 等<sup>[35]</sup> 使用 *ED-L2* 启动子和条件性敲除

*p120-catenin* 基因的小鼠, 在 9~12 个月时会导致食管、前胃和口腔发生不典型增生和浸润性鳞状细胞癌的形成。最早在 *L2Cre; p120ctn*<sup>loxP/loxP</sup> 小鼠 4 月龄时, 即可发生食管癌浸润。*p120-catenin* 基因敲除小鼠模型概括了人类的 ESCC 特征, 同时验证了 *p120-catenin* 的抑癌作用。研究提示, 该模型为食管和口腔鳞状细胞癌早期诊断与治疗策略提供新的动物模型。

## 4 其他

食管癌转移动物模型报道数量有限。静脉内注射癌细胞是通常用于癌细胞进入远端器官的造模方法。Wang 等<sup>[36]</sup> 通过小鼠尾静脉注射  $1 \times 10^6$  食管鳞癌 KYSE150 细胞建立食管癌肺转移小鼠模型, 发现注射肿瘤细胞 35 d 后出现肺转移。在肺转移模型中, 云南藤黄提取的天然化合物 oblongifolin C 能有效抑制肺转移<sup>[36]</sup>。另一项研究将  $5 \times 10^6$  YES-2 食管鳞癌细胞腹腔注射 SCID 小鼠, 导致食管鳞癌细胞在腹腔中定植并产生血性腹水, 建立腹膜转移小鼠模型<sup>[37]</sup>。该模型用于评价三萜类化合物和抗癌药物的组合治疗效果, 结果表明三萜类化合物增强 5-氟尿嘧啶对食管癌的化疗作用。这些模型虽然不能模拟发生在患者上的完整转移过程和可能掩盖对转移生物学的理解, 但是可用于评价抗转移中药及其化学成分的验证。

## 5 结论与展望

中医药对改善食管癌患者生存质量,提高生存预后有良好的作用。食管癌小鼠模型对中医理论的实践和中药抗食管癌的评价至关重要。比较分析食管癌小鼠模型特征发现(表 2),诱发性食管癌小鼠模型能很好模拟人类食管癌发生和发展病理过程,是良好的食管癌及其癌前病变的诱发性食管癌模型,用于研究特定化学物对食管的致癌作用及

多种中医药(化浊润燥降气方、六君子汤)抗食管癌及癌前病变的研究<sup>[13,38]</sup>;移植性食管癌小鼠模型较好模拟食管癌的主要临床特征,可用于研究食管癌生长和转移研究以及为食管癌开发新的疗法,为临床实践做出贡献;基因工程食管癌小鼠模型可用于研究特定基因功能对食管癌的影响,以及食管癌发生的细胞与分子机制,有助于了解肿瘤生物学特性。移植性小鼠模型是肿瘤研究、开发和评价中医药抗肿瘤应用最多的动物模型<sup>[39-42]</sup>。皮下移植模

表 2 食管癌小鼠模型  
Table 2 Mouse models of esophageal cancer

模型类型 Model type	制备方法 Method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	应用范围 Applicable scope	文献 References
诱发型 Induced	致癌物处理 Carcinogen treatment	诱导癌变率高;模拟外环境等因素致食管癌 Induces highly rate of cancer; simulates the external environment factors to esophageal cancer	诱发周期长;小鼠背景影响造模;未有转移 Induction cycle is long; genetic background affects the mice modeling; no metastasis	研究形态学和化学物致癌机制 Study morphology, carcinogenic mechanism of chemicals	[9,14]
皮下异种移植模型 Subcutaneous xenograft model	CDX	易操作;成瘤率高;成本低 Simple operation; high tumor formation rate; low cost	生物学特征单一;无法研究肿瘤细胞与宿主免疫应答的相互作用;很少发生转移 Biological characteristics single; a large number of cells need to be injected; the interaction between tumor cells and the host immune response cannot be studied; rarely metastasis	研究食管癌机制和抗食管癌药物的筛选 Research on the mechanism of esophageal cancer and screening of anti-esophageal cancer drugs	[18]
	PDX	保留肿瘤异质性;组织和生物学特征相似 Preserving tumor heterogeneity; similar tissue and biological characteristics	无法研究肿瘤细胞与宿主免疫应答的相互作用;不能反映食管癌变的过程 Unable to study the interaction between tumor cells and the host immune response; unable to reflect the entire process of esophageal carcinogenesis	抗食管癌药物的筛选,食管癌基础及转化医学研究 Screening of anti-esophageal cancer drugs, esophageal cancer basic and translational medicine research	[25]
原位异种移植模型 Orthotopic xenograft model	人食管癌细胞植入小鼠食管壁 Human esophageal cancer cells implanted to mouse esophagus	与人类疾病的发展极为相似;简化候选基因的功能分析 Similar to the development of human diseases; simplifies the functional analysis of candidate genes	技术较难;模型制备较贵;确定治疗效果的终点更为复杂;发生转移 Technology difficult; model preparation is more expensive; determining the end point of treatment effect is more complicated; metastasis occurs	发病及转移机制研究,抗食管癌及食管癌转移药物的筛选 Research on the pathogenesis and metastasis mechanism, screening of anti-esophageal cancer and metastasis drugs	[26]
基因工程小鼠模型 Genetic engineered mice model	基因缺失或插入 Gene deletion or insertion	小鼠具有免疫能力;肿瘤自发生长和发展;致癌物可增强其表型 Immune mice; tumors grow and develop spontaneously; carcinogens can enhance their phenotypes	价格较贵;食管中特异表达基因的选择有限 Expensive; limited options for specifically expressed genes in the esophagus	明确新的癌症基因和肿瘤生物标志物在食管癌的作用;抗食管癌药物的筛选 Clarify new cancer genes and tumor biomarkers in esophageal cancer; screening of anti-esophageal cancer drugs	[32]

型易操作、成瘤快和成功率高,但较少的转移限制其应用;原位移植模型模拟食管癌体内发生发展及转移的过程,符合食管癌临床实际。以上常见的食管癌小鼠模型各具特色,应根据实验目的选择合适的小鼠模型。最大化的发挥食管癌小鼠模型的潜力,多种模型相结合,更好地了解食管癌发病机理及中药防治抗肿瘤的分子机制。随着对食管癌研究的不断深入和技术的进步,食管癌小鼠模型能更好的模拟人类患者食管癌,探索食管癌发病及中药治疗机制。为食管癌小鼠模型的开发及抗食管癌中药的评价提供理论基础和科学依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] World Health Organization. The international agency for research on cancer (2020) [N]. World Health Organization, 2020, <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>.
- [ 2 ] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [ 3 ] Zhang Z, Zhang C, Miao J, et al. A Tumor-targeted replicating oncolytic adenovirus Ad-TD-nsIL12 as a promising therapeutic agent for human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cells*, 2020, 9(11): E2438.
- [ 4 ] Bray F, Ferla J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [ 5 ] Li X, Francies HE, Secrier M, et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2983.
- [ 6 ] Huang FL, Yu SJ. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment [J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215.
- [ 7 ] 曹志秀,李厚华,李媛,等. 转基因天山雪莲类黄酮成分及抗肿瘤活性分析 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22): 133-139.
- [ 8 ] 王振祥,李志刚,王小伟,等. 散结通膈汤联合替吉奥治疗中晚期痰气互阻型食管癌的临床观察 [J]. *中医肿瘤学杂志*, 2020, 2(3): 31-35.
- [ 9 ] Tang XH, Knudsen B, Bemis D, et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1): 301-313.
- [ 10 ] 杜展,王超,张勇,等. C57BL/64 小鼠食管鳞状细胞癌早期病变的形态学改变 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(2): 116-121.
- [ 11 ] 范焕芳,单保恩,韩长辉. 复方化浊润燥降气方对小鼠食管癌前病变的干预作用 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2015, 7(6): 389-393.
- [ 12 ] Zheng D, Li Z. A sex-dimorphic mouse model of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(2): 429-433.
- [ 13 ] 吕翠田,董志斌,陈玉龙. 六君子汤对 4-硝基喹啉-1-氧化物诱导食管癌小鼠免疫调节的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(7): 2831-2834.
- [ 14 ] 王立群,靳晶,刘聪敏,等. 敲除 SLC39A5 基因对 4-NQO 诱发 C57BL/6 小鼠食管癌模型建立的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(2): 61-66.
- [ 15 ] Tseng SH, Yang CC, Yu EH, et al. K14-EGFP-miR-31 transgenic mice have high susceptibility to chemical-induced squamous cell tumorigenesis that is associating with Ku80 repression [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6): 1263-1275.
- [ 16 ] Lee NP, Chan CM, Tung LN, et al. Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 66-74.
- [ 17 ] Hassan MS, von Holzen U. Animal model: Xenograft mouse models in esophageal adenocarcinoma [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1756: 151-164.
- [ 18 ] Nair DV, Reddy AG. Laboratory animal models for esophageal cancer [J]. *Vet World*, 2016, 9(11): 1229-1232.
- [ 19 ] 彭海燕,章永红,韩英,等. 榭寄生碱抗肿瘤作用的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(5): 381-382, 387.
- [ 20 ] 周青,孙长侠,孙斐,等. 启膈化痰合剂对顺铂治疗小鼠食管癌的减毒增效作用 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(3): 283-287, 297.
- [ 21 ] Crescenzi M, Persano L, Esposito G, et al. Vandetanib improves anti-tumor effects of L19mTNFalpha in xenograft models of esophageal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(3): 447-458.
- [ 22 ] Ma Q, Liao H, Xu L, et al. Autophagy-dependent cell cycle arrest in esophageal cancer cells exposed to dihydroartemisinin [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 37.
- [ 23 ] 柏文,彭晓清,王佩文,等. GFP/Luc 双标食管癌细胞动物模型建立及其活体成像观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(11): 89-94.
- [ 24 ] Liu DS, Hoefnagel SJ, Fisher OM, et al. Novel metastatic models of esophageal adenocarcinoma derived from FLO-1 cells highlight the importance of E-cadherin in cancer metastasis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 83342-83358.
- [ 25 ] Zou J, Liu Y, Wang J, et al. Establishment and genomic characterizations of patient-derived esophageal squamous cell carcinoma xenograft models using biopsies for treatment optimization [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 15.
- [ 26 ] Gros SJ, Dohrmann T, Peldschus K, et al. Complementary use of fluorescence and magnetic resonance imaging of metastatic esophageal cancer in a novel orthotopic mouse model [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(11): 2671-2681.
- [ 27 ] Kuroda S, Fujiwara T, Shirakawa Y, et al. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9339-9348.
- [ 28 ] Ip JC, Ko JM, Yu VZ, et al. A versatile orthotopic nude mouse

- model for study of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 910715.
- [29] Zhu L, Xu Y, Chen X, et al. The establishment of esophageal precancerous lesion model by using *p53* conditional knockout mouse in esophageal epithelium [J]. *BioMed Res Int*, 2020, 2020: 4534289.
- [30] Khan SH. Genome-editing technologies; concept, pros, and cons of various genome-editing techniques and bioethical concerns for clinical application [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 326–334.
- [31] Li R, Miao JX, Fan ZQ, et al. Production of genetically engineered golden syrian hamsters by pronuclear injection of the CRISPR/Cas9 complex [J]. *J Vis Exp*, 2018, 131: 56263.
- [32] Opitz OG, Harada H, Suliman Y, et al. A mouse model of human oral-esophageal cancer [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(6): 761–769.
- [33] Tetreault MP, Wang ML, Yang Y, et al. *Klf4* overexpression activates epithelial cytokines and inflammation-mediated esophageal squamous cell cancer in mice [J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6): 2124–2134.
- [34] Quante M, Bhagat G, Abrams JA, et al. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(1): 36–51.
- [35] Stairs DB, Bayne LJ, Rhoades B, et al. Deletion of *p120*-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 470–483.
- [36] Wang X, Lao Y, Xu N, et al. Oblongifolin C inhibits metastasis by up-regulating keratin 18 and tubulins [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10293.
- [37] Yamai H, Sawada N, Yoshida T, et al. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells *in vitro* and suppress experimental metastasis *in vivo* [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(4): 952–960.
- [38] 范焕芳, 黄茂, 单保恩, 等. 小鼠食管癌前病变组织 P53 表达及化浊润燥降气方的干预作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(16): 3950–3951.
- [39] 崔清, 董响, 张铭, 等. 食道通结方对裸鼠食管癌移植瘤中 TE-1 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2016, 50(5): 65–69.
- [40] Chen Y, Huang K, Ding X, et al. Magnolol inhibits growth and induces apoptosis in esophagus cancer KYSE-150 cell lines via the MAP kinase pathway [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(7): 3030–3038.
- [41] 苗晋鑫, 宋韶鹤, 李秀敏. 结直肠癌小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 267–272.
- [42] 王峥, 苗晋鑫. 黑色素瘤小鼠模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 120–127.

[收稿日期]2020-08-28

李雅娟,孙皎皎,刘广益,等. 蛋白的酪氨酸磷酸化信号通路阿尔茨海默病的关系 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 147-152.

LI YJ, Sun JJ, Liu GY, et al. The relationship between the tyrosine phosphorylation signaling pathways and Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 147-152.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.022

## 蛋白的酪氨酸磷酸化信号通路 与阿尔茨海默病的关系

李雅娟<sup>1</sup>,孙皎皎<sup>2</sup>,刘广益<sup>2\*</sup>,于洋<sup>2\*</sup>

(1.重庆医科大学附属永川医院,重庆永川 402160;  
2.西南医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,四川泸州 646000)

**【摘要】** 蛋白酪氨酸磷酸化信号通路是广泛存在于细胞中的重要信号转导通路,其功能与细胞增值、分化、转化及凋亡密切相关。阿尔茨海默病是一种神经系统退行性疾病,与年龄相关,具有隐匿发病、进行发展的特点。其主要病理特征为 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein  $\beta$ , A $\beta$ )聚集,Tau蛋白异常磷酸化后形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)。酪氨酸激酶抑制剂治疗阿尔茨海默病已成为现代医学研究的一大热门,故对蛋白酪氨酸磷酸化信号通路阿尔茨海默病关系的基础研究进展作以下简要综述。

**【关键词】** 酪氨酸磷酸化;阿尔茨海默病;信号通路

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0147-06

## The relationship between the tyrosine phosphorylation signaling pathways and Alzheimer's disease

LI Yajuan<sup>1</sup>, SUN Jiaojiao<sup>2</sup>, LIU Guangyi<sup>2\*</sup>, YU Yang<sup>2\*</sup>

(1. Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Yongchuan 402160, China. 2. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000)

**【Abstract】** The protein tyrosine phosphorylation signal pathways are important signal transduction pathways, which are widely present in cells. Their function is closely related to cell proliferation, differentiation, transformation and apoptosis. Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease of the nervous system. Age is the greatest risk factor for AD, and the likelihood of suffering from AD is age dependent. The main pathological features are the aggregation of  $\beta$ -amyloid protein and abnormal phosphorylation of Tau protein. The treatment of AD with tyrosine kinase inhibitors has become a greatly discussed topic in modern medical research. Therefore, the basic research progress of the relationship between the protein tyrosine phosphorylation signaling pathways and AD is briefly reviewed in this paper.

**【Keywords】** tyrosine phosphorylation; Alzheimer's disease; signaling pathway

**【基金项目】**西南医科大学校级科研基金(01/00031766)。

**【作者简介】**李雅娟(1993—),女,硕士研究生,研究方向:脑损伤与保护。E-mail: 707745746@qq.com

**【通信作者】**刘广益(1963—),男,教授,硕士生导师,研究方向:脑损伤与保护。E-mail: lgy@swmu.edu.cn

于洋(1980—),女,博士,研究方向:阿尔茨海默病。E-mail: Yuyang80@swmu.edu.cn

\* 共同通信作者

### 1 蛋白酪氨酸磷酸化与阿尔茨海默病概述

酪氨酸激酶使蛋白酪氨酸磷酸化,催化磷酸基团从 ATP 转移到蛋白底物酪氨酸残基上使其磷酸化,酪氨酸激酶分两个亚组:受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTK)和非受体酪氨酸激酶(nonreceptor tyrosine kinases, NRTK),分别在细胞的不同位置,受体酪氨酸激酶是一种跨膜蛋白,而非受体酪氨酸激酶在细胞内,包括胞质酪氨酸激酶与核内酪氨酸激酶<sup>[1]</sup>。目前已发现有 50 多种不同的 RTKs,主要类型包括表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)受体、血小板生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)受体、胰岛素和胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)受体、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)受体、Eph 受体家族等。RTK 的结构基本相似,胞外一段糖基化肽链是与配体结合的结构域,通过疏水性的跨膜区与胞内含有的酪氨酸激酶活性端结合,这些膜结合受体被生长因子、细胞因子、激素等激活。RTK 激活后主要通过 PI3K/Akt, Ras/Raf/ERK1/2, STAT 途径将细胞外信号转导至胞质并进入细胞核,

从而对各种生物过程进行调控,例如细胞增殖分化、存活和细胞周期调节。非受体酪氨酸激酶(NRTK)有 Src 家族、Tec 家族、JAK 家族、Abl 家族等<sup>[2]</sup>。其中 Abl 和 Src 激酶具有十分重要的意义。Abl 蛋白激酶家族(Abl1, Abl2)将多种细胞外刺激与调控细胞生长、存活、侵袭、粘附和迁移的信号传导途径相联系<sup>[3]</sup>。Src 的一些家族成员普遍表达,例如 Src、Fyn,而其他家族成员更具组织特异性,例如 Lyn 在造血细胞表达,Lck 存在于免疫系统的特定细胞内,最常见于 T 细胞中<sup>[4]</sup>。酪氨酸激酶广泛分布在体内,其中一些对特定器官具有特异性,例如 EphA4 在海马组织中,c-Abl 在颞皮层结构中高度表达<sup>[5]</sup>。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经系统退行性疾病,具有隐匿发病、进行性发展的特点。年龄是 AD 的最大风险因素,随着年龄的增长,患有老年痴呆症的可能性也会增加。在临床上,它的特征是广泛的痴呆,例如记忆力减退,认知丧失,失语,判断力、执行功能障碍和行为改变,其病因尚不确定。疾病进程与 Aβ 聚集和 Tau 蛋白的异常磷酸化有关。它们与蛋白酪氨酸磷酸化信

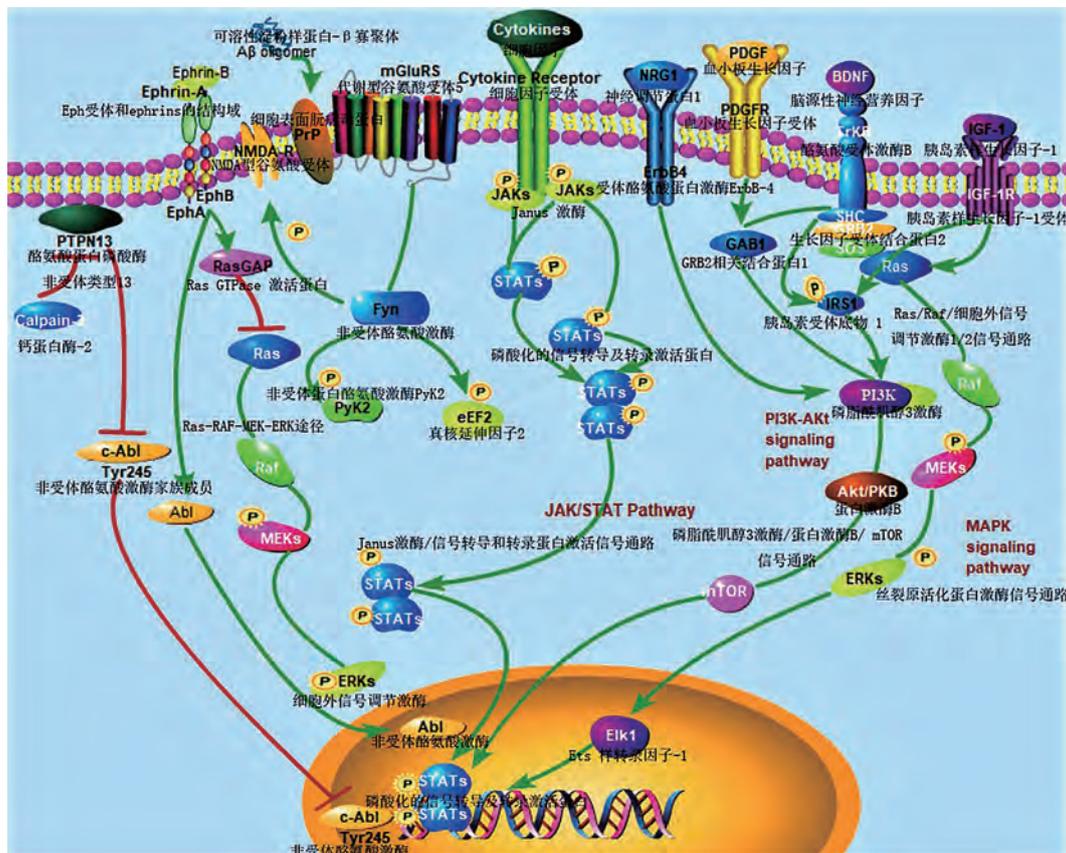


图 1 蛋白酪氨酸磷酸化信号通路

Figure 1 Protein tyrosine phosphorylation signaling pathways

号通路密切相关,酪氨酸磷酸化信号通路在 AD 的特征性病理改变中起着重要作用。研究多数集中在 PDGF 受体、IGF-1 受体、神经生长因子受体家族、Eph 家族等受体酪氨酸激酶和胞质酪氨酸激酶中的 JAK 家族、Src 家族的激酶 Fyn,以及核内的 Abl 激酶等非受体酪氨酸激酶。所以,在此对以上主要的蛋白酪氨酸磷酸化相关的信号通路及与 AD 的关系作简要综述。

## 2 蛋白酪氨酸磷酸化信号通路与 AD

### 2.1 NRG1/ErbB4 信号通路

神经调节蛋白 1 (neuregulin-1, NRG1) 及其受体 ErbB2/ErbB3 和 ErbB2/ErbB4 异二聚体或 ErbB4 同源二聚体介导神经发育的多种信号通路<sup>[6]</sup>。一些研究表明,通过调节 NRG1/ErbB4 信号可以减轻 AD 的病理生理学特征,改善 AD 动物模型中的认知缺陷,NRG1/ErbB4 信号传导与空间学习和空间记忆有关<sup>[7]</sup>。用 NRG1 处理 APP/PS1 转基因小鼠,通过激活 ErbB4 依赖性 PI3K/Akt 途径抑制 APP/PS1 转基因小鼠的神经细胞凋亡<sup>[6]</sup>,并通过激活 ErbB4 防止可溶性 A $\beta_{1-42}$  诱导的突触的长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 损伤<sup>[4]</sup>。慢病毒载体过表达全长 I 型或 III 型 NRG1 于 AD 小鼠的海马中,结果都改善了 Morris 水迷宫行为任务的缺陷,神经病理学也得到了显著改善,A $\beta$  肽和斑块的水平显著降低。此外,还发现 I 型和 III 型 NRG1 的可溶性胞外域显著增加了神经元培养物中 A $\beta$  降解酶脑啡肽酶 (neutral endopeptidase, NEP) 的表达<sup>[8]</sup>。还有报道在脑室内注射 NRG1 减轻了 13 个月大的 Tg2576 小鼠 (一种 AD 动物模型) 的认知障碍,NRG1 减轻了 Tg2576 小鼠脑中树突棘数量的减少,这一结果在 A $\beta_{1-42}$  诱导的大鼠原代海马神经元同样得到了证实<sup>[9]</sup>。NRG1 还可以保护神经元免受低氧损伤<sup>[10]</sup>。这些结果表明 NRG1 通过减轻 AD 脑中树突棘密度和神经发生的减少,从而具有治疗 AD 的潜力。

### 2.2 IR/IGF-1 信号通路

胰岛素和胰岛素样生长因子受体 1 型为四聚体糖蛋白,两个  $\alpha$  和两个  $\beta$  亚基构成,是跨膜酪氨酸激酶受体家族成员<sup>[11]</sup>。在大脑中,胰岛素样生长因子信号传导对于神经元生长,突触维持和神经保护是至关重要的<sup>[12]</sup>。生理条件下,胰岛素与其受体结合会触发胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 的磷酸化,从而激活 PI3K/Akt 通路,促进神经元生长,神经元存活,突触可塑性,学

习和记忆等。此外,活化的受体酪氨酸激酶使衔接蛋白 Shc 聚集,随后通过级联反应激活 ERK1/2, ERK 信号也参与学习和记忆<sup>[13]</sup>。在 AD 中,(1) IR 和 IGF-1 直接参与 A $\beta$  的代谢和清除,IR 可增加 A $\beta$  分泌,A $\beta$  寡聚体诱导 JNK 活化,导致衔接蛋白 IRS-1 的磷酸化和降解,IRS 缺乏导致胰岛素抵抗。(2) 胰岛素抵抗降低 A $\beta$  降解胰岛素降解酶 (insulin degradation enzyme, IDE) 的表达,降低的 IDE 进一步降低了 IDE 对 A $\beta$  降解,使 A $\beta$  累积增多。(3) IRS-1 (Ser 312 和 316) 的磷酸化抑制胰岛素对糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 活性的调节,这导致 Tau 的过度磷酸化进一步增加,增加了异常的 Tau 磷酸化<sup>[14]</sup>。最近研究表明,IGF-1 还可通过调节脉络丛血-脑界面的转运或产生 A $\beta$  载体来增强脑 A $\beta$  的清除<sup>[15]</sup>。

### 2.3 PDGF/PDGFR 信号通路

PDGF 是半胱氨酸结合型生长因子家族,在神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞中合成<sup>[16]</sup>。PDGF 家族包含五个功能性亚基,它们是 A-、B-、C- 和 D-多肽链的二硫键连接的同源或异源二聚体,即 PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC 和 PDGF-DD<sup>[17]</sup>。这些生长因子通过受体酪氨酸激酶与其同源受体 PDGFR- $\alpha$  和 PDGFR- $\beta$  结合,促进其在细胞上的生物学功能。PDGF 的结合刺激 PDGFR 二聚化,进一步启动细胞内信号传导。有研究报道,AD 患者血浆和脑脊液中 PDGF-BB 和可溶性 PDGFR- $\beta$  水平均升高,反映了 PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  轴功能障碍<sup>[18]</sup>。PDGF-BB 在调节神经祖细胞的增殖和分化中起着重要作用,而神经祖细胞在神经退行性疾病,例如 AD 的细胞替代治疗中具有巨大潜力<sup>[19]</sup>。近年来,PDGF-CC 也参与各种神经退行性疾病如 AD、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的治疗<sup>[20]</sup>。

### 2.4 BDNF/TrkB 信号通路

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是神经营养家族成员,属于支持神经元存活和发育的蛋白质家族<sup>[21]</sup>。该家族还包括神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3) 和神经营养因子-4/5 (neurotrophin-4/5, NT-4/5)<sup>[22]</sup>。BDNF 和 TrkB 受体通常在成年哺乳动物大脑中表达,其中 TrkB 主要在大脑皮层、嗅球、海马、丘脑、黑质、下丘脑、齿状回、纹状体中表达,海马和皮层含量很高。有研究报道 BDNF 在 AD 大脑中减少,而 BDNF 在

调节认知和记忆方面起着重要作用,可以增强突触的神经发生和神经传递,促进突触生长,并调节突触的可塑性,BDNF 还诱导海马长时程增强,这对记忆形成很重要<sup>[23]</sup>。BDNF 的受体包括低亲和力的 p75 和高亲和力的 TrkB 受体。BDNF 与 TrkB 受体特异性结合,一条路径通过激活细胞外 ERK1/2 信号通路,激活 PLC- $\gamma$ ,产生 DAG 和 IP3,激活 ERK,从而导致 Rsk2 或 Msk1 激酶活化,进一步使 CREB 磷酸化。另一路径激活 PI3K/AKT 信号通路,发挥其对神经细胞的保护作用<sup>[24-25]</sup>。抑制 BDNF/TrkB 通路会增加炎症细胞因子表达,并激活 JAK2/STAT3 通路,导致转录因子 C/EBP $\beta$  上调。这会导致  $\delta$ -分泌酶表达增加,导致 APP 和 Tau 被  $\delta$ -分泌酶断裂和神经元丢失<sup>[26]</sup>。因此,BDNF/TrkB 通路受到了研发人员的广泛关注,成为探索治疗 AD 的新希望。目前成功筛选出了靶向 TrkB 受体的候选药 BrAD-R13,相关研究证实,BrAD-R13 可以激活脑内 TrkB 及其下游信号通路,提高学习、记忆能力,有望成为延缓 AD 发病发展进程的新型药物。还有研发人员生成了淀粉样蛋白  $\beta$ -蛋白特异的 CD4 T 细胞(A $\beta$ -T 细胞),经过基因工程处理表达 BDNF,然后将其注射到 AD 的 5xFAD 小鼠模型中。结果发现分泌 BDNF 的 A $\beta$ -T 细胞有效迁移到淀粉样斑块,从而使皮质中的斑块显著降低,降低神经毒性炎症<sup>[27]</sup>。BDNF 缺乏与 AD 的进展有关,所以脑内递送 BDNF 是一种有前途的治疗方法。

## 2.5 Eph 信号通路

Eph 受体是脊椎动物最大的酪氨酸激酶家族,分为两个亚组:由 9 个成员组成的 EphA 受体(Aphrin A1-8 和 EphA10)和 5 个 EphB 受体(EphB1-4 和 EphB6),在成熟哺乳动物脑内大量表达,对成熟的神经元具有重要的调节作用<sup>[28-30]</sup>。研究表明,A $\beta$  可能会诱导 Eph 受体减少,重新获得 Eph 受体功能可以防止 A $\beta$  寡聚体引起的神经毒性,在 AD 发病机理中作为潜在的治疗靶标<sup>[31]</sup>。目前的研究主要集中在 EphA4 和 EphB2,突触丧失是 AD 的主要病理标志之一。酪氨酸激酶受体 EphA4 参与了树突棘形态发生,突触形成和成熟,对于突触功能至关重要<sup>[32]</sup>。Vargas 等<sup>[33]</sup>研究发现,暴露于 A $\beta$  寡聚体的神经元在培养中,EphA4 被过度激活并通过 c-Abl 激酶相关信号途径,使树突棘丢失和突触受损。EphB2 通过增加海马神经元的突触 NMDA 受体水平和下游 p38 MAPK 和 CREB 信号传导,保护海马神经元免受 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 寡聚物的毒性<sup>[31]</sup>。而敲低海马星形胶质细胞中 EphB2 可通过抑制

APP/PS1 小鼠中丝氨酸的分泌来改善突触功能<sup>[34]</sup>。可溶性 A $\beta$  寡聚体通过从神经元表面消耗 NMDA 型谷氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)来干扰突触功能,而受体酪氨酸激酶 EphB2 的过表达可以抵消该过程<sup>[35]</sup>。EphB 受体已被研究证实与阿尔茨海默病等神经系统疾病相关,因此可能会成为临床干预性的潜在治疗。

## 2.6 A $\beta$ -PrP<sup>C</sup>-mGluR5-Fyn 信号通路

可溶性淀粉样蛋白- $\beta$  寡聚体(A $\beta$ o)引发阿尔茨海默氏病,A $\beta$  寡聚体可通过与细胞表面朊病毒蛋白(prion protein, PrP<sup>C</sup>)结合,PrP<sup>C</sup> 在神经元突触后富集,只有共表达代谢型谷氨酸受体 mGluR5,才能使 PrP<sup>C</sup> 结合的 A $\beta$  激活 Fyn。Fyn 信号引起 mGluR5 的 NR2B 亚基的酪氨酸磷酸化,然后表面 NMDAR 损失,Pyk2 和 eEF2 持续激活。通过 A $\beta$ o-PrP<sup>C</sup>-mGluR5 复合物的信号转导导致树突棘损失,急性暴露于 A $\beta$ o 激活依赖 PrP<sup>C</sup>、mGluR5 和 Fyn 的神经元信号通路,破坏神经元功能<sup>[36-38]</sup>。Fyn 还可以促进 Tau 过度磷酸化,之前研究报道 AD 患者脑组织中 Fyn 蛋白水平升高,尤其是小脑和海马体中<sup>[39]</sup>。而 Fyn 激酶活性的抑制可使小鼠突触功能和记忆力的改善<sup>[40]</sup>。AZD0530 能有效抑制 Fyn 并阻止 A $\beta$  诱导的 Fyn 信号传导,靶向 Fyn 可以逆转 AD 小鼠模型中发现的记忆缺陷,并挽救突触密度的丧失<sup>[41]</sup>。因此,AZD0530 是一种有希望的候选药物,可能是治疗 AD 病理学的可行靶标。

## 2.7 JAK-STAT 信号通路

JAK-STAT 信号通路是细胞因子刺激的信号传导通路,参与许多重要的生物学过程,例如细胞增殖,分化,凋亡和免疫调节<sup>[42]</sup>。与其它信号通路相比,传递过程相对简单,主要由三个部分组成:酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT。JAK 是非跨膜的酪氨酸激酶,其家族由 4 个成员组成:JAK1、JAK2、JAK3 和 Tyk2。STAT 在信号转导和转录激活上起着重要作用。当前,已经发现 STAT 家族的六个成员,即 STAT1-STAT6。STAT 蛋白可以在结构上分为以下功能区段:N-端保守序列、DNA 结合区、SH3 结构域、SH2 结构域及 C-端的转录激活区<sup>[43]</sup>。结合临床数据,通过全基因组关联研究(Genome-Wide Association Studies, GWAS),最新研究表明 AD 的程度与 JAK-STAT 途径中的分子参与遗传关联的强度相关。使用四个独立的 RNA 表达数据集,找到了 AD 中 JAK-STAT 途径基因调节改变的证据<sup>[44]</sup>。还有研究发现在 5xFAD 小鼠脑中 A $\beta$  斑块沉积之前,小胶质细胞中有明显的炎性激

活,细胞因子水平发生改变,并且 JAK-STAT 通路相关蛋白质上调,可溶性 A $\beta$  水平显著增加<sup>[45]</sup>。这些结果表明 JAK-STAT 信号通路与 AD 有密切联系。

## 2.8 calpain-2-PTPN13/c-Abl 信号通路

calpain-2-PTPN13/c-Abl 途径,钙蛋白酶-2 (calpain-2) 激活通过 PTPN13/c-Abl 途径增加 Tau 磷酸化,最近发现大脑中的两种主要钙蛋白酶同种型,证据表明钙蛋白酶-1 (calpain-1) 和钙蛋白酶-2 (calpain-2) 在生理和病理条件下发挥相反的功能,这可能与它们不同的 C 末端 PDZ 结合序列有关。calpain-1 是诱导海马 LTP 和某些形式的学习记忆所必需的,而 calpain-2 激活限制了 LTP 和学习记忆<sup>[46-47]</sup>。有研究发现,反复脑震荡或 TBI 后促进缠结形成并加速 AD 病理学的发展。TBI 后,calpain-2 切割 PTPN13,激活 c-Abl 并触发 Tau 酪氨酸磷酸化和 Tau 寡聚体形成,TBI 后施用钙蛋白酶-2 选择性抑制剂减少 TBI 诱导的钙蛋白酶-2 激活,Tau 酪氨酸磷酸化和 Tau 寡聚体形成,最终减少 Tau 蛋白聚集和 AD 发病<sup>[48]</sup>。

## 3 小结与展望

AD 作为一种以认知学习障碍为主要临床特征的慢性神经退行性疾病,是老年痴呆的最主要病因,迄今为止没有有效的治愈方法。蛋白酪氨酸磷酸化信号通路作为调节神经元细胞丢失和凋亡的重要信号转导途径,可能是 AD 治疗的新方向。大量实验研究表明,异常的酪氨酸磷酸化信号通路在 AD 中造成的神经细胞损伤机制中起着重要作用。酪氨酸激酶抑制剂如达沙替尼阻断 Src 和 Lyn 和马赛替尼阻断 c-kit,可对 AD 所造成的细胞损伤进行修复并具有直接的神经保护作用,为治疗阿尔茨海默病提供了新的希望与方向<sup>[49-50]</sup>。

### 参考文献:

- [ 1 ] Gałaga I, Rusiecka I, Kocić I. Tyrosine kinase inhibitor as a new therapy for ischemic stroke and other neurologic diseases: is there any hope for a better outcome? [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(6): 836-844.
- [ 2 ] Siveen KS, Prabhu KS, Achkar IW, et al. Role of non receptor tyrosine kinases in hematological malignances and its targeting by natural products [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 31.
- [ 3 ] Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, et al. Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(8): 559-571.
- [ 4 ] Min SS, An J, Lee JH, et al. Neuregulin-1 prevents amyloid beta-induced impairment of long-term potentiation in hippocampal slices via ErbB4 [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 505(1): 6-9.
- [ 5 ] Chen L, Wang Z, Tang B, et al. Altered expression of c-Abl in patients with epilepsy and in a rat model [J]. *Synapse*, 2014, 68(7): 306-316.
- [ 6 ] Mei L, Nave KA. Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases [J]. *Neuron*, 2014, 83(1): 27-49.
- [ 7 ] Tian J, Geng F, Gao F, et al. Down-regulation of neuregulin1/ErbB4 signaling in the hippocampus is critical for learning and memory [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 3976-3987.
- [ 8 ] Xu J, de Winter F, Farrokhi C, et al. Neuregulin 1 improves cognitive deficits and neuropathology in an Alzheimer's disease model [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31692.
- [ 9 ] Ryu J, Hong BH, Kim YJ, et al. Neuregulin-1 attenuates cognitive function impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(2): e2117.
- [ 10 ] Yoo SY, Yoo JY, Kim HB, et al. Neuregulin-1 protects neuronal cells against damage due to CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia by suppressing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and P53 in SH-SY5Y cells [J]. *Int Neurol J*, 2019, 23(2): S111-S118.
- [ 11 ] Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 211-225.
- [ 12 ] Stockhorst U, de Fries D, Steingrueber HJ, et al. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans [J]. *Physiol Behav*, 2004, 83(1): 47-54.
- [ 13 ] Bedse G, Di Domenico F, Serviddio G, et al. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 204.
- [ 14 ] Ma QL, Yang F, Rosario ER, et al. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(28): 9078-9089.
- [ 15 ] Ashpole NM, Sanders JE, Hodges EL, et al. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 68: 76-81.
- [ 16 ] Sil S, Periyasamy P, Thangaraj A, et al. PDGF/PDGFR axis in the neural systems [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 62: 63-74.
- [ 17 ] Kazlauskas A. PDGFs and their receptors [J]. *Gene*, 2017, 614: 1-7.
- [ 18 ] Sagare AP, Sweeney MD, Makshano J, et al. Shedding of soluble platelet-derived growth factor receptor-beta from human brain pericytes [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 607: 97-101.
- [ 19 ] Chen Q, Song H, Liu C, et al. The interaction of EphA4 with PDGFR $\beta$  regulates proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells *in vitro* and promotes Neurogenesis *in vivo* [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 7.
- [ 20 ] Lee C, Zhang F, Tang Z, et al. PDGF-C: a new performer in the neurovascular interplay [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(8): 474-486.
- [ 21 ] Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, et al. BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1170.

- [22] Acheson A, Conover JC, Fandl JP, et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death [J]. *Nature*, 1995, 374(6521): 450-453.
- [23] Lu B, Nagappan G, Guan X, et al. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(6): 401-416.
- [24] Zhang Z, Fan J, Ren Y, et al. The release of glutamate from cortical neurons regulated by BDNF via the TrkB/Src/PLC- $\gamma$ 1 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(1): 144-151.
- [25] Szatmari E, Kalita KB, Kharebava G, et al. Role of kinase suppressor of Ras - 1 in neuronal survival signaling by extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(42): 11389-11400.
- [26] Wang ZH, Xiang J, Liu X, et al. Deficiency in BDNF/TrkB neurotrophic activity stimulates  $\delta$ -secretase by upregulating C/EBP $\beta$  in Alzheimer's disease [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(3): 655-669.
- [27] Eremenko E, Mittal K, Berner O, et al. BDNF-producing, amyloid beta-specific CD4 T cells as targeted drug-delivery vehicles in Alzheimer's disease [J]. *EBioMedicine*, 2019, 43: 424-434.
- [28] Darling TK, Lamb TJ. Emerging roles for Eph receptors and ephrin ligands in immunity [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1473.
- [29] Hruska M, Dalva MB. Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2012, 50(1): 35-44.
- [30] Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, et al. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(6): 1313-1326.
- [31] Dines M, Lamprecht R. The role of ephs and ephrins in memory formation [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(4): pyv106.
- [32] Chen Y, Fu AK, Ip NY. Eph receptors at synapses: implications in neurodegenerative diseases [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(3): 606-611.
- [33] Vargas LM, Leal N, Estrada LD, et al. EphA4 activation of c-Abl mediates synaptic loss and LTP blockade caused by amyloid- $\beta$  oligomers [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92309.
- [34] Qi L, Cui EH, Ji CM, et al. Specific knockdown of hippocampal astroglial EphB2 improves synaptic function via inhibition of D-serine secretion in APP/PS1 mice [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 1073-1083.
- [35] Cissé M, Halabisky B, Harris J, et al. Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model [J]. *Nature*, 2011, 469(7328): 47-52.
- [36] Yang K, Belrose J, Trepanier CH, et al. Fyn, a potential target for Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 27(2): 243-252.
- [37] Nygaard HB. Targeting fyn kinase in Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(4): 369-376.
- [38] Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, et al. Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(9): 1227-1235.
- [39] Zahratka JA, Shao Y, Shaw M, et al. Regulatory region genetic variation is associated with FYN expression in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 51: 43-53.
- [40] Kaufman AC, Salazar SV, Haas LT, et al. Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice [J]. *Ann Neurol*, 2015, 77(6): 953-971.
- [41] Cochran JN, Hall AM, Roberson ED. The dendritic hypothesis for Alzheimer's disease pathophysiology [J]. *Brain Res Bull*, 2014, 103: 18-28.
- [42] Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 58.
- [43] Walker DG, Whetzel AM, Lue LF. Expression of suppressor of cytokine signaling genes in human elderly and Alzheimer's disease brains and human microglia [J]. *Neuroscience*, 2015, 302: 121-137.
- [44] Nevado-Holgado AJ, Ribe E, Thei L, et al. Genetic and real-world clinical data, combined with empirical validation, nominate jak-stat signaling as a target for Alzheimer's disease therapeutic development [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 425.
- [45] Boza-Serrano A, Yang Y, Paulus A, et al. Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1550.
- [46] Wang Y, Zhu G, Briz V, et al. A molecular brake controls the magnitude of long-term potentiation [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3051.
- [47] Liu Y, Wang Y, Zhu G, et al. A calpain-2 selective inhibitor enhances learning & memory by prolonging ERK activation [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 471-477.
- [48] Wang Y, Hall RA, Lee M, et al. The tyrosine phosphatase PTPN13/FAP-1 links calpain-2, TBI and tau tyrosine phosphorylation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11771.
- [49] Dhawan G, Floden AM, Combs CK. Amyloid -  $\beta$  oligomers stimulate microglia through a tyrosine kinase dependent mechanism [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(10): 2247-2261.
- [50] Piette F, Belmin J, Vincent H, et al. Masitinib as an adjunct therapy for mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, placebo-controlled phase 2 trial [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2011, 3(2): 16.

[收稿日期]2020-08-14