

高源,揭育祯,马天龙,等. miR-488-3p 靶向调控 RAP1A 在同型半胱氨酸介导肝细胞自噬的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 1-9.

Gao Y, Jie YZ, Ma TL, et al. Role of miR-488-3p targeting regulation of RAP1A in homocysteine-mediated hepatocyte autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.001

miR-488-3p 靶向调控 RAP1A 在同型半胱氨酸介导肝细胞自噬的作用研究

高源^{2,3#}, 揭育祯^{1,3#}, 马天龙^{2,3}, 汪乐新^{1,3}, 杨慧霞^{1,3}, 周瑜瑾^{2,3}, 焦运^{3,4},
卢冠军^{3,4}, 马胜超^{2,3*}

(1.宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004; 2.宁夏医科大学基础医学院, 银川 750004;
3.国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室(宁夏医科大学), 银川 750004;
4.宁夏医科大学总医院, 银川 750004)

【摘要】 目的 探讨微小 RNA(miR-488-3p)通过靶向调控 RAS 癌基因家族成员 RAP1A 在同型半胱氨酸介导肝细胞自噬中的作用。方法 体外常规培养人正常肝细胞(HL-7702),并给予 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预 24 h,采用 Western blot 检测肝细胞自噬相关蛋白 LC3、p62 和 RAP1A 的表达水平,qRT-PCR 检测肝细胞中 miR-488-3p 和 RAP1A 的表达;转染 miR-488-3p inhibitor 和 mimics 后,qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 miR-488-3p 的转染效率及其对 LC3 和 p62 蛋白表达的影响;TargetScan 预测 miR-488-3p 与 RAP1A 基因相关性,Western blot 检测 miR-488-3p 下游潜在靶蛋白(RAP1A)的表达改变;Pearson 相关系数对肝细胞中 miR-488-3p 表达水平与自噬相关蛋白水平进行相关性分析。结果 与 Control 组相比,Hcy 组肝细胞自噬相关蛋白 LC3、RAP1A 和 miR-488-3p 的表达水平升高($P<0.01$),而 p62 表达明显降低($P<0.01$);同时,转染 miR-488-3p inhibitor 和 mimics 后,与 NC-inhibitor 组比较,miR-488-3p inhibitor 组中 LC3 和 RAP1A 蛋白的表达水平显著降低($P<0.01$),p62 表达明显升高($P<0.01$);而与 NC-mimics 组相比,miR-488-3p mimics 组中 LC3 和 RAP1A 蛋白表达水平明显增加($P<0.01$),p62 表达降低($P<0.01$);进一步机制研究表明 RAP1A 是 miR-488-3p 的下游靶基因并受其正向调控。Pearson 相关性分析发现,miR-488-3p 的表达水平与 LC3($r=0.9329, P=0.0002$)蛋白表达呈正相关,而与 p62($r=-0.8086, P=0.0083$)表达则呈负相关。结论 miR-488-3p 在 Hcy 介导的肝细胞中高表达,可通过靶向调控 RAP1A 的表达促进肝细胞自噬。

【关键词】 同型半胱氨酸;miR-488-3p;肝细胞;RAP1A;自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0001-09

Role of miR-488-3p targeting regulation of RAP1A in homocysteine-mediated hepatocyte autophagy

GAO Yuan^{2,3#}, JIE Yuzhen^{1,3#}, MA Tianlong^{2,3}, WANG Lexin^{1,3}, YANG Huixia^{1,3},
ZHOU Yujin^{2,3}, JIAO Yun^{3,4}, LU Guanjin^{3,4}, MA Shengchao^{2,3*}

【基金项目】 国家自然科学基金地区项目(82060110,81760139);国家自然科学基金青年项目(81900273);宁夏回族自治区重点研发计划一般项目(2020BEG03005)。

【作者简介】 揭育祯(1995—),男,研究方向:肾损伤的分子机制。E-mail: 1512445204@qq.com

高源(1977—),女,副教授,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail: 330311280@qq.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 马胜超(1985—),男,副教授,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail: solarmsc@163.com

- (1. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China. 2. School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 3. Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, National Health Commission (Ningxia Medical University), Yinchuan 750004.
4. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

【Abstract】 Objective To investigate the role of the microRNA miR-488-3p in homocysteine-mediated hepatocyte autophagy through targeted regulation of the RAS oncogene family member RAP1A. **Methods** Human normal hepatocytes (HL-7702) were routinely cultured *in vitro* and administered 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy for 24 h. Western blot was used to detect expression levels of autophagy-related proteins LC3, p62 and RAP1A in hepatocytes, whereas qRT-PCR was used to detect the expression of miR-488-3p and RAP1A in these cells. Following transfection of miR-488-3p inhibitor and mimics, qRT-PCR and western blot were used to detect the transfection efficiency of miR-488-3p and its effect on LC3 and p62 protein expression. TargetScan was used to predict the correlation between miR-488-3p and RAP1A genes, whereas western blotting was used to detect changes in the expression of RAP1A, a potential downstream target protein of miR-488-3p. Pearson's correlation coefficient was used to evaluate potential correlations between expression levels of miR-488-3p and autophagy-related proteins in hepatocytes. **Results** Compared with the control group, expression levels of autophagy-related proteins LC3, RAP1A and miR-488-3p in the Hcy group were increased ($P < 0.01$), whereas expression of p62 was significantly decreased ($P < 0.01$). Following administration of miR-488-3p inhibitor and mimics, expression levels of LC3 and RAP1A proteins in the miR-488-3p inhibitor group were significantly decreased ($P < 0.01$) and expression of p62 was significantly increased ($P < 0.01$) compared with the NC-inhibitor group. Compared with the NC-mimics group, expression levels of LC3 and RAP1A proteins in the miR-488-3p mimics group were significantly increased ($P < 0.01$), and expression of p62 was significantly decreased ($P < 0.01$). Further mechanistic studies showed that RAP1A is a downstream target gene of miR-488-3p that is positively regulated by this miRNA. Pearson's correlation analysis indicated that the expression level of miR-488-3p was positively correlated with protein expression of LC3 ($r = 0.9329$, $P = 0.0002$), but negatively correlated with p62 protein expression ($r = -0.8086$, $P = 0.0083$). **Conclusions** miR-488-3p is highly expressed in Hcy-mediated hepatocytes and can promote their autophagy by targeting expression of RAP1A.

【Keywords】 homocysteine; miR-488-3p; hepatocytes; RAP1A; autophagy

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种由体内甲硫氨酸代谢循环产生的非蛋白原性含巯基氨基酸,为半胱氨酸的同系物。Hcy 的浓度受两个关键途径的调节:再甲基化回蛋氨酸或转硫成半胱氨酸,同时产生硫化氢(H_2S)^[1]。研究数据表明,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)被认为是动脉粥样硬化血栓形成和肝疾病发展的独立危险因素^[2-3]。自噬是细胞将自身损伤的蛋白质或细胞器降解加以循环利用的过程,在细胞新陈代谢和内环境稳态调节中发挥重要作用。目前自噬在肝疾病发展的作用机制尚不明确^[4]。MicroRNAs (miRNAs)是一类长度为 20~22 nt 的高度保守的非编码 RNA,研究已证实 miRNAs 作为自噬活性的新型有效调节剂,可以通过与靶 mRNAs 的碱基对结合在转录后调控生物学过程和细胞信号通路,在功能上参与了肝细胞中细胞应激、炎症和纤维化的激活^[5]。其中,miR-488-3p 已被证实在多种癌症中是一种肿瘤抑制因子,但 miR-488-3p 在肝细胞损伤中的具体作用机制尚不清楚。生物信息学分析结果

显示 RAS 癌基因家族成员 RAP1A (Ras-associated protein 1, RAP1A)可能是 miR-488-3p 的靶基因。研究表明,在外界各种因子刺激下, RAP1A 可与细胞膜上的受体结合,对细胞增殖、自噬和分化等多种生物学过程进行调控,已成为疾病防治的新靶标^[6]。本研究以正常人源肝细胞(HL-7702)为研究对象,给予 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预 24 h,探讨 miR-488-3p 在 Hcy 诱导的肝细胞自噬中的关键作用及其可能的分子机制,分析了 miR-488-3p 与 RAP1A 在肝细胞中的表达情况,探究二者之间的靶向关系,为后续肝损伤的靶向治疗和预防提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

正常人源肝细胞(HL-7702),购自上海名劲生物科技有限公司 ATCC 细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

Hcy 购自 Sigma 公司;胎牛血清(foetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司;青

霉素-链霉素双抗和胰蛋白酶购自北京碧云天生物技术公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂(货号 11668019)购自 ThermoFisher 公司;总 RNA 提取试剂盒(货号 DP419)购自天根生化科技(北京)有限公司;全蛋白提取试剂盒(货号 KGP2100)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;反转录和荧光定量 PCR 试剂盒(货号 D7168)购自日本 TaKaRa 公司;兔抗 LC3(货号 ab192890)单克隆抗体和兔抗 p62(货号 ab109012)单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;鼠抗 RAP1A(货号 ab175329)抗体购自美国 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗(货号 ZB-2306)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;miR-488-3p 引物由广州锐博生物科技有限公司合成;miR-488-3p 抑制物和模拟物(miR-488-3p inhibitor 和 mimics)、miR-488-3p 阴性对照(miR-NC)购自上海吉玛制药有限公司。荧光定量 PCR 仪购自德国 Analytik Jena AG 公司;超净工作台(SJ-CJ-1FD)购自中国苏州安泰技术有限公司;5415D 型微量台式离心机购自德国 Eppendorf 公司;Bio-Rad 凝胶成像系统显影(货号 MG8600)购自 Thmorgan 公司;酶标仪购自美国 Bio-TEK 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

采用含有 10%胎牛血清、1%双抗的 RPMI 1640 培养基于 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养正常人源肝细胞(HL-7702),每 2 d 换液 1 次,当细胞密度达 90%,即可用胰蛋白酶消化进行细胞传代,继续培养。取对数生长期 HL-7702 细胞,待细胞生长至 70%融合度时将培养基更换为含胎牛血清 7%,分别用终浓度为 0 μmol/L Hcy 和 100 μmol/L Hcy 干预,其中 0 μmol/L Hcy 为对照组(Control),100 μmol/L Hcy 为同型半胱氨酸组(Hcy),处理肝细胞 24 h 后,收集细胞进行后续实验。

1.3.2 细胞转染及分组

利用 Lipofectamine™ 2000 将 NC-inhibitor、NC-mimics、miR-488-3p inhibitor 和 miR-488-3p mimics 转染至肝细胞,选择生长状态良好的肝细胞进行培养。按照每孔 2×10^5 个细胞数接种于 6 孔板,待肝细胞生长密度达到 70%时,用无 RNA 酶枪头对细胞进行转染,在 125 μL 无血清培养液中加入 5 μL Lipofectamine™ 2000 此为 A 液,室温下孵育 5 min;再在 125 μL 无血清培养液中加入 2.5 μL 待转染序列此为 B 液;将 A 液与 B 液混合,轻轻震荡混匀后

孵育 20 min。弃去旧培养基用 PBS 清洗后再将 A、B 混合液加入到培养板中,并每孔补加培养液至 1 mL,6 h 后换成 7% FBS 的培养基,并加入 100 μmol/L Hcy 干预,继续培养 24 h 后收集细胞进行后续实验,每组设 3 个复孔。

实验分组:肝细胞转染 NC-inhibitor 和 NC-mimics 分别作为 miR-488-3p 干扰对照组和过表达对照组,同型半胱氨酸+干扰对照组(Hcy+NC-inhibitor),同型半胱氨酸+miR-488-3p 干扰组(Hcy+miR-488-3p inhibitor),同型半胱氨酸+过表达对照组(Hcy+NC-mimics),同型半胱氨酸+miR-488-3p 过表达组(Hcy+miR-488-3p mimics),同时设 miR-NC 为 miR-488-3p 阴性对照组。

1.3.3 Western blot 检测肝细胞中 LC3、p62 蛋白的表达水平

收集实验各组肝细胞,根据全蛋白提取试剂盒说明书于冰上提取全细胞蛋白,将裂解的细胞样品转移至 1.5 mL 离心管中,5000 r/min 离心 5 min,取上清;用 BCA 法测定蛋白浓度后加入蛋白上样缓冲液(5×)于金属浴中 99℃煮沸 5 min 使蛋白变性,上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后 0.3 A 恒电流转 2 h 将蛋白转至 PVDF 膜,接着 5%脱脂牛奶室温封闭 4 h,PBST 洗涤 3 次后分别加入 1:1000 稀释比例配制的 LC3、p62 和 RAP1A 特异性一抗,4℃摇床孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,使用稀释比例 1:5000 的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温置于摇床上孵育 2 h,PBST 洗膜 3 次;最后加入显影剂在 Bio-Rad 凝胶成像分析仪上成像分析,以 β-actin 为内参,采用 Image J 软件进行分析 LC3II/β-actin、p62/β-actin 及 RAP1A/β-actin 的灰度值,计算目的蛋白相对表达水平。

1.3.4 qRT-PCR 检测 miR-488-3p 和 RAP1A mRNA 的表达

根据总 RNA 提取试剂盒说明书,采用 TRIzol 法提取各组肝细胞总 RNA;以 miR-488-3p 特异性逆转录试剂盒和 PCR 引物进行逆转录及 qRT-PCR 检测 miR-488-3p 的表达,miR-488-3p 引物由广州锐博生物科技有限公司合成;运用 GeneBank 数据库查询 RAP1A 基因序列并设计引物。RAP1A:上游引物:5'-ACGGGTAAAGACACAGAAGATGTTCC-3';下游引物 5'-CTGTCTTGCTAAATTCTGGCCTTGTTTC-3';U6 上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATAT ACT-3',下游引物:5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT

GTC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-ATTCCACCCATGGC AAATTCC-3', 下游引物: 5'-GACTCCACGACGTAC TCAGC-3'。PCR 反应体系为: TB Green™ Premix Ex Taq™ II 10 μL, 10 μmol/L 上游引物和下游引物各 0.8 μL, ddH₂O 6.4 μL, cDNA 模板 2 μL。其中总的反应体系为 20 μL。PCR 扩增的程序为: 95℃ 10 min, 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 70℃ 10 s, 共 45 个循环, 设置空白对照和内参 (miR-488-3p 内参为 U6; RAP1A 内参为 GAPDH) 对照同体系扩增。根据扩增曲线数据, 按照计算公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 miR-488-3p 和 RAP1A 的含量并进行归一化。公式如下: $2^{-\Delta\Delta Ct} = [Ct(\text{Sample}) (\text{待测样本}) - Ct(\text{内参}) (\text{待测样本})] - [Ct(\text{GI}) (\text{校正样本}) Ct(\text{内参}) (\text{校正样本})]$, 实验重复 3 次。

1.3.5 miR-488-3p 靶基因的预测分析

运用在线生物信息学软件 StarBase v3.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 分析预测 miR-488-3p 与 RAP1A 的结合位点。

1.4 统计学方法

上述实验结果均为计量资料, 采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件对实验数据进行统计分析, 符合正态分布的计量资料采用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数间结果的比较采取 Student's *t* 检验, 多个样本之间比较采用 One-way ANOVA 检验, 再进行组内两两比较。两变量之间相关性分析采用

Pearson 相关系数, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 对肝细胞自噬水平的影响

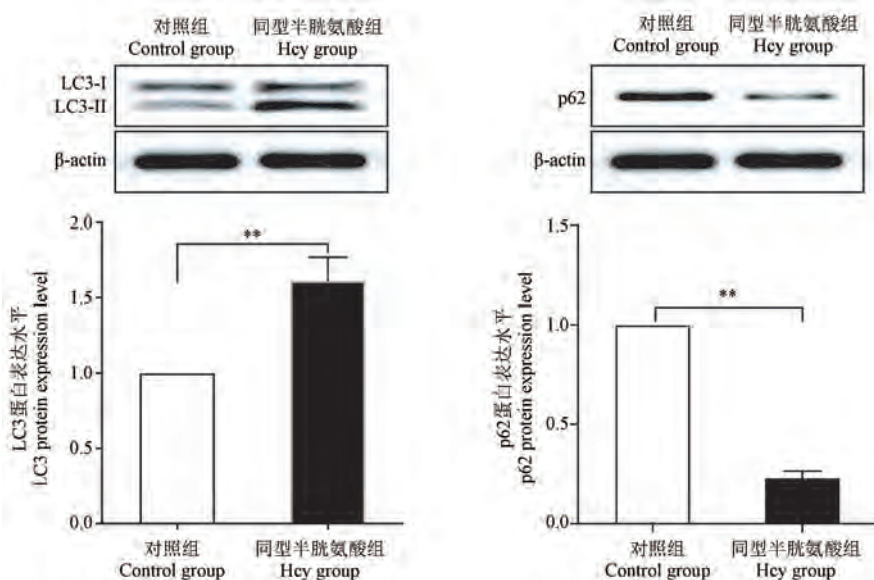
为验证细胞自噬在 Hcy 致肝损伤过程中的变化, Western blot 检测肝细胞中自噬相关蛋白 LC3 与 p62 的表达水平, 结果显示, 与 Control 组相比, Hcy 组中自噬相关基因 LC3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), p62 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), 见图 1。

2.2 Hcy 对 miR-488-3p 表达的影响

qRT-PCR 检测肝细胞中 miR-488-3p 的表达, 结果显示, 与 Control 组相比, Hcy 组中 miR-488-3p 的表达升高 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.3 干扰和过表达 miR-488-3p 在肝细胞中对自身表达的影响

为了明确 miR-488-3p 在 Hcy 诱导肝细胞自噬中的作用, 肝细胞分别转染 miR-488-3p 干扰 (miR-488-3p inhibitor) 和 miR-488-3p 过表达 (miR-488-3p mimics)。采用 qRT-PCR 检测 miR-488-3p 的表达, 结果显示, 与 NC-inhibitor 组相比, miR-488-3p inhibitor 组中 miR-488-3p 的表达显著降低 ($P < 0.01$); 而与 NC-mimics 组相比, miR-488-3p mimics 组中 miR-488-3p 的表达明显升高 ($P < 0.01$); 表明 miR-488-3p 干扰和过表达片段转染成功, 并能在肝细胞中稳定的表达, 见图 3。



注: 与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 1 Hcy 对肝细胞自噬水平的影响

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

Figure 1 Effect of Hcy on the level of hepatocyte autophagy

2.4 miR-488-3p 对 Hcy 诱导的肝细胞自噬的影响

为了进一步探讨 miR-488-3p 对 Hcy 诱导的肝细胞自噬的作用,肝细胞转染 miR-488-3p inhibitor 及 NC-inhibitor 后,同时给予 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预 24 h,采用 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的表达,结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-488-3p inhibitor 组中 LC3 的蛋白表达水平显著降低,而 p62 的蛋白表达明显升高 ($P<0.01$);与 Hcy+NC-inhibitor 组相比,Hcy+miR-488-3p inhibitor 组的结果一致 ($P<0.01$),见图 4A 和 4B。同时,将 miR-488-3p mimics 及 NC-mimics 转染肝细胞后,Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达的变化,结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-488-3p mimics 组中 LC3 的蛋白表达水平升高,而 p62 的蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$);与 Hcy+NC-mimics 组相比,Hcy+miR-488-3p mimics 组 LC3 的蛋白表达显著增加,而 p62 的蛋白表达降低 ($P<0.01$),见图 4C 和 4D。

2.5 Hcy 促进肝细胞中 RAP1A 的表达

为了阐明 miR-488-3p 的作用机制,通过生物信息学 TargetScan 在线软件 (http://www.Targetscan.org/vert_72/) 预测了 miR-488-3p 的潜在靶基因,结果发现 RAP1A 的 3' UTR 与 miR-488-3p 存在潜在结合关系(图 5A)。首先采用 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预肝细胞 24 h 后,qRT-PCR 及 Western blot 检测 RAP1A mRNA 和蛋白的表达水平。结果显示,与 Control 组相比,Hcy 组肝细胞中 RAP1A 的表达显著升高 ($P<0.01$, $P<0.01$),见图 5B 和 5C。

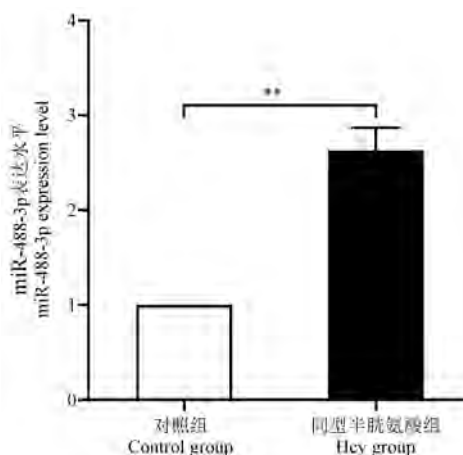
2.6 miR-488-3p 靶向调控肝细胞中 RAP1A 的表达

接下来进一步探讨 miR-488-3p 对 RAP1A 的靶向调控作用,将 miR-488-3p inhibitor 及 NC-inhibitor 转染肝细胞,Hcy (100 $\mu\text{mol/L}$) 干预 24 h 后,采用 Western blot 检测干扰 miR-488-3p 后肝细胞中 RAP1A 蛋白的表达变化,结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-488-3p inhibitor 组中 RAP1A 蛋白的表达水平显著降低 ($P<0.01$);与 Hcy+NC-inhibitor 组相比,Hcy+miR-488-3p inhibitor 组的结果一致 ($P<0.01$),见图 6A。其次,为了进一步的验证 miR-488-3p 调控 RAP1A 介导肝细胞的自噬,将 miR-488-3p mimics 及 NC-mimics 转染肝细胞,同时给予 Hcy 干预 24 h,Western blot 检测过表达 miR-488-3p 后肝细胞中 RAP1A 蛋白表达的改变,结果与之相反,与 miR-NC 组或 Hcy+NC-mimics 组相比,miR-488-3p

mimics 组中 RAP1A 蛋白的表达水平明显升高 ($P<0.01$, $P<0.01$),见图 6B。

2.7 肝细胞中 miR-488-3p 的表达与 LC3 和 p62 蛋白表达的相关性分析

为了明确肝细胞中 miR-488-3p 的表达水平与细胞自噬之间的关系,利用 Pearson 相关系数对

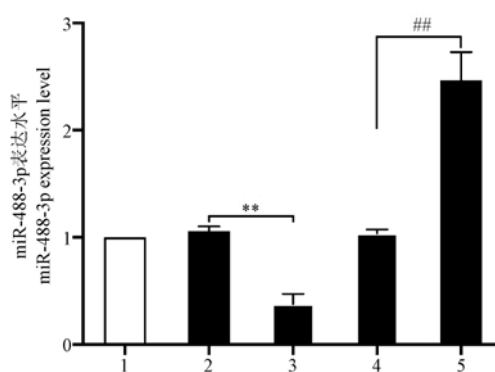


注:与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 qRT-PCR 检测 Hcy 干预肝细胞后 miR-488-3p 的表达

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

Figure 2 qRT-PCR to detect the expression of miR-488-3p after Hcy intervention in hepatocytes

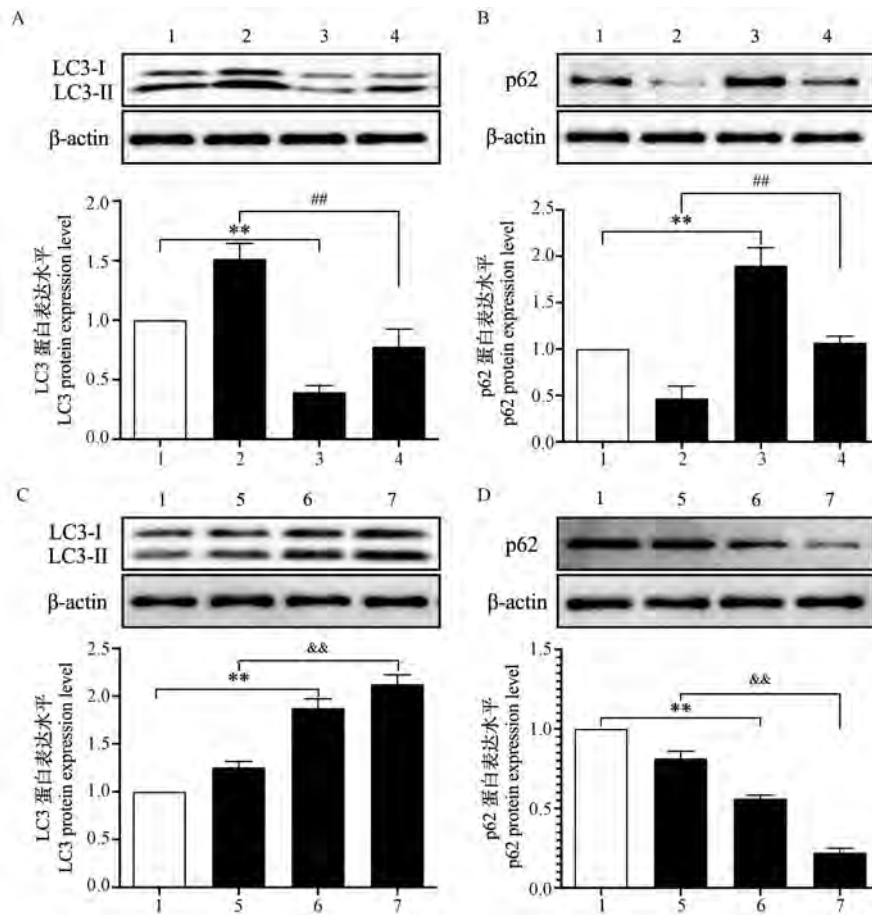


注:1:对照组;2:干扰对照组;3:miR-488-3p 干扰组;4:过表达对照组;5:miR-488-3p 过表达组。与干扰对照组相比, ** $P<0.01$;与过表达对照组相比, ## $P<0.01$ 。

图 3 转染 miR-488-3p 干扰和过表达片段后,qRT-PCR 验证肝细胞中 miR-488-3p 的表达

Note. 1, Control group. 2, NC-inhibitor group. 3, miR-488-3p inhibitor group. 4, NC-mimics group. 5, miR-488-3p mimics group. Compared with NC-inhibitor group, ** $P<0.01$. Compared with NC-mimics group, ## $P<0.01$.

Figure 3 After transfection of miR-488-3p interference and overexpression fragments, the expression of miR-488-3p in hepatocytes was verified by qRT-PCR



注:1:阴性对照组;2:同型半胱氨酸+干扰对照组;3:miR-488-3p 干扰组;4:同型半胱氨酸+miR-488-3p 干扰组;5:同型半胱氨酸+过表达对照组;6:miR-488-3p 过表达组;7:同型半胱氨酸+miR-488-3p 过表达组。A、B:干扰 miR-488-3p 表达后,Western blot 检测肝细胞自噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达的改变;C、D:过表达 miR-488-3p 后,Western blot 检测肝细胞自噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达的变化。与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$;与同型半胱氨酸+干扰对照组相比, ## $P < 0.01$;与同型半胱氨酸+过表达对照组相比, && $P < 0.01$ 。

图 4 干扰和过表达 miR-488-3p 后检测肝细胞自噬水平的变化

Note. 1, miR-NC group. 2, Hcy+NC-inhibitor group. 3, miR-488-3p inhibitor group. 4, Hcy+miR-488-3p inhibitor group. 5, Hcy+NC-mimics group. 6, miR-488-3p mimics group. 7, Hcy+miR-488-3p mimics group. A, B, After disturbing the expression of miR-488-3p, Western blot was used to detect the changes in the expression of autophagy-related proteins LC3 and p62 in hepatocytes. C, D, After overexpression of miR-488-3p, Western blot was used to detect the changes in the expression of autophagy-related proteins LC3 and p62 in hepatocytes. Compared with miR-NC group, ** $P < 0.01$. Compared with Hcy+NC-inhibitor group, ## $P < 0.01$. Compared with Hcy+NC-mimics group, && $P < 0.01$.

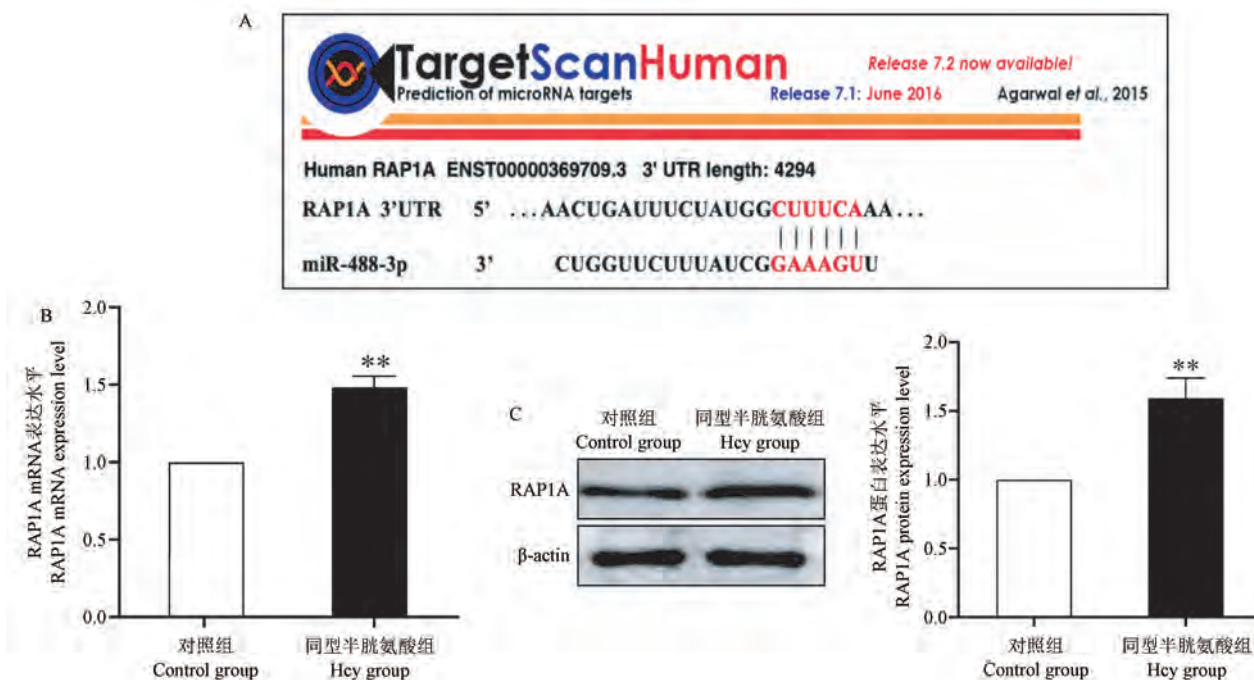
Figure 4 Effect of interference and overexpression with miR-488-3p on the autophagy level of hepatocytes

miR-488-3p 的表达水平与自噬相关蛋白的表达水平分别进行了相关性分析。结果显示,miR-488-3p 的表达水平与 LC3 ($r = 0.9329$, $P = 0.0002$) 蛋白表达呈正相关,而与 p62 ($r = -0.8086$, $P = 0.0083$) 表达则呈负相关,见图 7。

3 讨论

同型半胱氨酸(Hcy)是一种非必需的含巯基氨基酸,为蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中产生的重要中间产物,主要发生在肝^[7]。蛋氨酸代谢失调导致释放到血浆中的 Hcy 升高,进而引起肝损伤。自噬是一种进化上保守的过程,已成为一种关键的细胞

内降解途径,它通过营养物质的循环利用和受损或老化的细胞质细胞器的降解来维持细胞功能和存活^[8]。LC3 是细胞自噬的经典标志物,其中 LC3II 为胞浆型,不具有自噬活性,而 LC3I 为膜型,是自噬激活的标志,当细胞发生自噬时 LC3I 向 LC3II 进行转化,是目前公认较成熟的自噬标志物^[9-10];p62 可作为将要被自噬作用降解的小泡的受体,也可作为要被清除的泛素化蛋白聚集物的受体。p62 蛋白可结合泛素,也可与 LC3 结合,从而靶向自噬体并促进泛素化蛋白的清除^[11]。自噬被认为是一把“双刃剑”,肝细胞的自噬功能障碍被认为是肝损伤的重

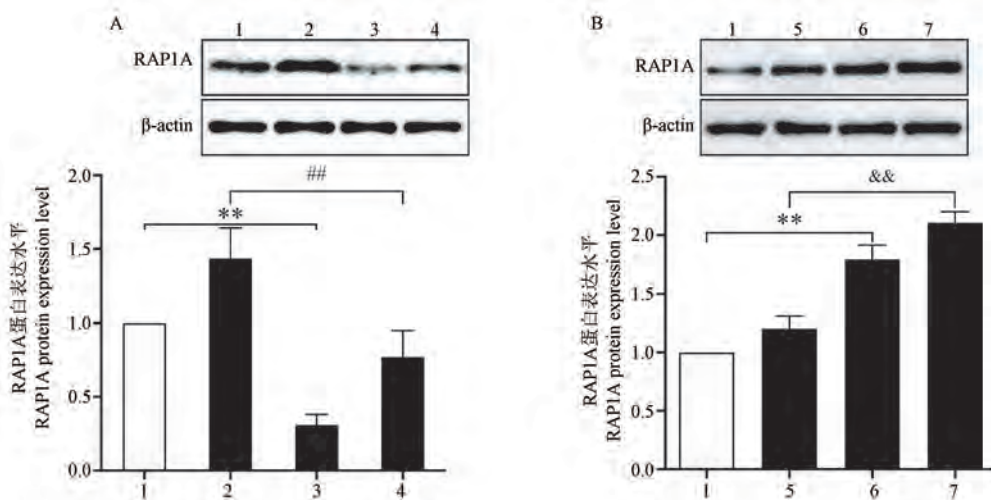


注:A;TargetScan 查询显示 RAP1A 可能为 miR-488-3p 的潜在靶基因;B;qRT-PCR 检测 Hcy 干预肝细胞后 RAP1A mRNA 的表达;C;Western blot 检测 Hcy 干预肝细胞后 RAP1A 的蛋白表达水平。与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 5 Hcy 促进肝细胞中 RAP1A 的表达

Note. A, TargetScan query showed that RAP1A may be a potential target gene of miR-488-3p. B, qRT-PCR detection of RAP1A mRNA expression after Hcy intervention in hepatocytes. C, Western blot detection of RAP1A protein expression after Hcy intervention in hepatocytes Level. Compared with Control group, ** $P<0.01$.

Figure 5 Hcy promotes the expression of RAP1A in hepatocytes



注:1;阴性对照组;2;同型半胱氨酸+干扰对照组;3;miR-488-3p 干扰组;4;同型半胱氨酸+miR-488-3p 干扰组;5;同型半胱氨酸+过表达对照组;6;miR-488-3p 过表达组;7;同型半胱氨酸+miR-488-3p 过表达组。A;干扰 miR-488-3p 后,Western blot 检测 RAP1A 蛋白表达的变化;B;过表达 miR-488-3p 后,Western blot 检测 RAP1A 蛋白表达的改变。与阴性对照组相比, ** $P<0.01$;与同型半胱氨酸+干扰对照组相比, ## $P<0.01$;与同型半胱氨酸+过表达对照组相比, && $P<0.01$ 。

图 6 miR-488-3p 靶向调控肝细胞中 RAP1A 蛋白的表达

Note. 1, miR-NC group. 2, Hcy+NC-inhibitor group. 3, miR-488-3p inhibitor group. 4, Hcy+miR-488-3p inhibitor group. 5, Hcy+NC-mimics group. 6, miR-488-3p mimics group. 7, Hcy+miR-488-3p mimics group. A, After interfering with miR-488-3p, Western blot was used to detect the changes of RAP1A protein expression in hepatocytes. B, After overexpression of miR-488-3p, Western blot was used to detect the changes of RAP1A protein expression in hepatocytes. Compared with miR-NC group, ** $P<0.01$. Compared with Hcy+NC-inhibitor group, ## $P<0.01$. Compared with Hcy+NC-mimics group, && $P<0.01$.

Figure 6 miR-488-3p targets and regulates the expression of RAP1A protein in hepatocytes

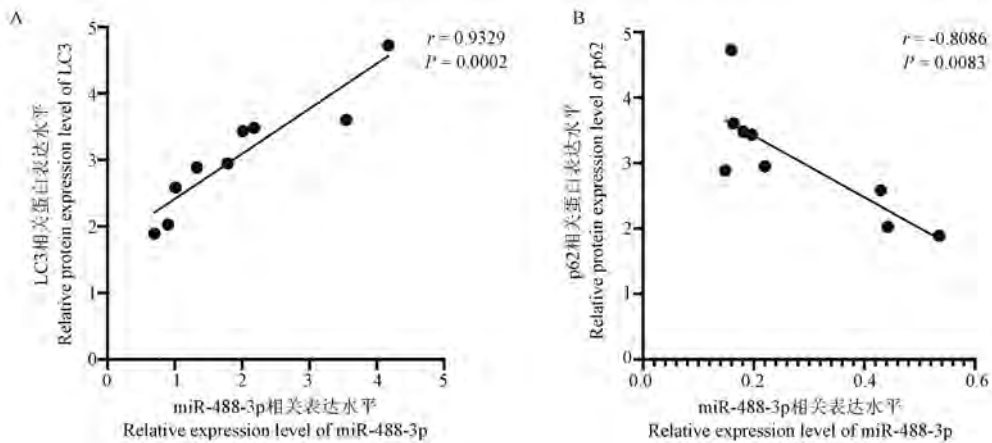


图 7 肝细胞中 miR-488-3p 的表达与 LC3 和 p62 蛋白表达的相关性分析

Figure 7 Correlation analysis between the expression of miR-488-3p in liver cells and the expression of LC3 and p62 proteins

要原因,并且已有观点提出细胞自噬来解释 Hcy 在肝损伤中的致病作用^[12-13]。最近的研究表明 miRNA 和自噬在肝损伤的发生进展中都发挥着重要作用,miRNA 靶向自噬相关基因并影响肝疾病的发生和发展^[14]。课题组前期的研究中,我们在给予高蛋白饮食的 *cbs*^{+/-} 小鼠肝中观察到了自噬现象,电镜下明显有自噬小体的形成。在本研究中,我们通过体外给予 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预肝细胞 24 h 也发现了类似的结果,与正常对照组相比,Hcy 组肝细胞中 LC3 蛋白表达水平明显升高,而 p62 蛋白表达下降;与之前的研究结果一致。以上提示 Hcy 可以促进细胞自噬进而诱导肝损伤^[15]。然而 Hcy 在调节肝细胞自噬的潜在机制目前仍不清楚。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长度为 18~22 nt 的小非编码 RNA,可在转录后水平调节基因表达,主要作用于识别靶基因 mRNA 上 3' UTR 序列,定向碱基对结合后抑制 mRNA 的转录和翻译过程,从而调节靶蛋白的生成^[16-17]。近年来多项研究发现 miRNAs 参与多种生物过程的调节,它们的缺失或表达改变与多种人类疾病(包括肝损伤)密切相关^[18]。其中,miRNA122 占肝表达的 miRNA 的一半以上,具有多种生理和病理功能,包括增强肝炎病毒复制、调节脂质代谢以及抑制肝癌细胞的增殖和侵袭。成熟的 miRNA 可以通过被动释放或掺入脂蛋白复合物或微泡进入血流,并且在个体中具有稳定和可重复的浓度^[19]。Long 等^[20] 研究表明敲除 miR-122 可通过上调 Sirt1 有效减轻过度的脂质产生并抑制游离脂肪酸(FFA)处理的 HepG2 和 Huh-7 细胞中脂肪生成基因的表达。miR-488-3p 作为一种新型的 miRNA,位于 1q25.2,由 1 个外显子组成。

据报道,除了在骨关节炎患者的软骨组织中发挥保护作用外,miR-488-3p 已被证实在食管鳞癌、胶质瘤、肝癌等恶性肿瘤中发挥抑癌基因作用^[21-22],此外,miR-488 还可通过激活真核翻译起始因子 3a (eukaryotic translation initiation factor 3a, EIF3a) 介导的核苷酸剪切修复 (nucleotide excision repair, NER) 信号通路,抑制非小细胞肺癌细胞的增殖,降低其铂敏感性^[23]。然而,miR-488-3p 的确切表达模式及其在 Hcy 诱导的肝细胞自噬中的作用背后的精确分子机制仍然很大程度上未知,需要进一步研究。

在本研究中,体外培养人的正常肝细胞,100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预 24 h 后,发现肝细胞中 miR-488-3p 和 RAP1A 的表达水平显著上调;为了明确 miR-488-3p 在 Hcy 诱导的肝细胞自噬中的作用,接下来将 miR-488-3p inhibitor 和 mimis 分别转染肝细胞后,采用 Western blot 分别检测肝细胞中 LC3 和 p62 蛋白表达的改变。结果显示,干扰 miR-488-3p 后 LC3 的表达含量显著减少,而 p62 蛋白表达减少;过表达 miR-488-3p 后可以明显促进 Hcy 诱导的肝细胞自噬的过程,提示 miR-488-3p 表达上调可促进 Hcy 介导的肝细胞自噬。这与 Wei 等^[24] 的研究结论一致。为了进一步探讨 miR-488-3p 对肝细胞自噬的潜在调控机制,利用生物信息网站 Starbase v3.0 软件在线预测发现 miR-488-3p 和 RAP1A 存在结合的互补碱基对。RAP1A 是 GTP 酶 Ras 蛋白家族的成员,是分子量为 21×10^3 的小 G 蛋白,可调节细胞分化、生长并维持细胞存活^[23]。本研究发现 RAP1A 是 miR-488-3p 的一个新靶点,接着对 miR-488-3p 过表达和沉默,同时 Hcy 处理肝细

胞 24 h 后,发现 miR-488-3p inhibitor 组肝细胞中 RAP1A 蛋白表达水平明显降低,而 miR-488-3p mimics 组则结果相反,提示 miR-488-3p 正向调控了 RAP1A 基因的表达参与了 Hcy 介导的肝细胞自噬。另外运用 Pearson 相关系数对 miR-488-3p 转录水平与自噬相关蛋白的表达水平分别进行了相关性分析,结果呈正性相关。

综上所述,本研究发现在 Hcy 诱导的肝细胞中 miR-488-3p 表达上调,且 miR-488-3p 可以通过靶向正性调控 RAP1A 基因的表达,从而促进 Hcy 介导的肝细胞自噬水平升高,对肝损伤的研究有一定的意义。但如何将 miR-488-3p 的靶向作用应用到临床对肝疾病的治疗中还仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Hermann A, Sitdikova G. Homocysteine: biochemistry, molecular biology and role in disease [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 737.
- [2] Al-Bayyari N, Hailat R, Subih H, et al. Vitamin D₃ reduces risk of cardiovascular and liver diseases by lowering homocysteine levels: double-blinded, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Br J Nutr*, 2021, 125(2): 139-146.
- [3] Jin P, Gao D, Cong G, et al. Role of PCSK₉ in homocysteine-accelerated lipid accumulation in macrophages and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 746989.
- [4] Zhang XW, Zhou JC, Peng D, et al. Disrupting the TRIB3-SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation [J]. *Autophagy*, 2020, 16(5): 782-796.
- [5] Cai Q, Chen F, Xu F, et al. Epigenetic silencing of microRNA-125b-5p promotes liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease via integrin α 8-mediated activation of RhoA signaling pathway [J]. *Metabolism*, 2020, 104: 154140.
- [6] Xu L, Zhang H, Wang Y, et al. FABP4 activates the JAK2/STAT2 pathway via Rap1a in the homocysteine-induced macrophage inflammatory response in ApoE^{-/-} mice atherosclerosis [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(1): 25-37.
- [7] Zhong G, Long H, Ma S, et al. miRNA-335-5p relieves chondrocyte inflammation by activating autophagy in osteoarthritis [J]. *Life Sci*, 2019, 226: 164-172.
- [8] Wang Z, Wu L, Pan B, et al. Interleukin 33 mediates hepatocyte autophagy and innate immune response in the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury [J]. *Toxicology*, 2021, 456: 152788.
- [9] Chen S, Dong Z, Cheng M, et al. Homocysteine exaggerates microglia activation and neuroinflammation through microglia localized STAT3 overactivation following ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 187.
- [10] 曹程浩, 韩丽华, 张会超. 基于 AMPK 介导的线粒体自噬分析温阳益气方改善大鼠梗死后心衰的药理机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(12): 39-44.
- [11] 王艳琼, 董利利, 李敏, 等. miR-27a 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路介导的自噬对肺炎链球菌诱导人肺泡上皮细胞损伤的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 27-34.
- [12] Ruat M, Chavarria L, Campreciós G, et al. Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3): 458-469.
- [13] 孟鑫, 李颖, 张宇, 等. 补肾温阳化瘀方对肾阳虚血瘀型子宫内膜异位症 FoxO1 介导的细胞自噬水平的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 417-427.
- [14] Lan T, Hu SY, Shen Z, et al. New insights into the interplay between miRNAs and autophagy in the aging of intervertebral discs [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65: 101227.
- [15] Yang A, Jiao Y, Yang S, et al. Homocysteine activates autophagy by inhibition of CFTR expression via interaction between DNA methylation and H3K27me3 in mouse liver [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 169.
- [16] Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 276.
- [17] 盛静宇, 朱海根, 王丽. miR-433-3p 通过调控 MAPK8 蛋白在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 63-70.
- [18] Conti I, Varano G, Simioni C, et al. MiRNAs as influencers of cell-cell communication in tumor microenvironment [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 220.
- [19] Wu J, Wu Y, Luo Y, et al. Circulating miRNA-199a and miRNA-122 levels as potential diagnostic and prognostic biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2020, 50(2): 219-227.
- [20] Long JK, Dai W, Zheng YW, et al. MiR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Mol Med*, 2019, 25(1): 26.
- [21] Yang Y, Li H, He Z, et al. MicroRNA-488-3p inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting ZBTB2 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 18702-18713.
- [22] Hu D, Shen D, Zhang M, et al. MiR-488 suppresses cell proliferation and invasion by targeting ADAM9 and lncRNA HULC in hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(10): 2070-2080.
- [23] Gu R, Shao K, Xu Q, et al. Circular RNA hsa_circ_0008003 facilitates tumorigenesis and development of non-small cell lung carcinoma via modulating miR-488/ZNF281 axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 26(6): 1754-1765.
- [24] Wei X, Yu L, Kong X. MiR-488 inhibits cell growth and metastasis in renal cell carcinoma by targeting HMG₅ [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 2205-2216.

[收稿日期]2022-01-17

张书萍,莫显刚,张诗悦,等. 达格列净对动脉粥样硬化的影响以及与钠氢交换体 1 相关机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 10-18.

Zhang SP, Mo XG, Zhang SY, et al. Effect of dapagliflozin on atherosclerosis and the mechanism related to sodium hydrogen exchanger 1 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 10-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.002

达格列净对动脉粥样硬化的影响以及与钠氢交换体 1 相关机制

张书萍¹,莫显刚^{1,2*},张诗悦¹,陈举海¹,王 兰²,杨 卉²,刘大男³

(1.贵州医科大学,贵阳 550004;2.贵州医科大学附属医院综合病房,贵阳 550004;
3.贵州医科大学附属医院心血管内科,贵阳 550004)

【摘要】 目的 探讨达格列净对载脂蛋白 E 敲除 ($ApoE^{-/-}$) 小鼠动脉粥样硬化 (AS) 形成的影响以及与钠氢交换体 1 (NHE1) 相关的机制。**方法** 6 周龄雄性 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 24 只,随机分为普通饮食组、高脂饮食组、高脂饮食+达格列净组 (10 mg/(kg·d)) 以及高脂饮食+格列美脲组 (0.5 mg/(kg·d))。8 周后,HE 染色检测小鼠主动脉的 AS 斑块情况,定量 PCR 及免疫印迹法检测主动脉葡萄糖协同转运蛋白 2 (SGLT2) 表达,免疫组化法检测主动脉 NHE1 表达。进而给予达格列净 (10 μ mol/L)、阿米洛利 (20 μ mol/L) 以及脂多糖 (100 ng/mL) 干预小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞处理 24 h,免疫印迹法检测 NHE1 蛋白表达以及 SNARF-1/AM 荧光法检测 NH_4Cl 诱导 pH 值回复率 (NHE1 活性);酶联免疫吸附法检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 分泌情况。**结果** 高脂饮食+达格列净组主动脉的 AS 斑块面积显著低于高脂饮食组 ($P<0.05$);各组主动脉斑块内均极低表达 SGLT2 ($P<0.05$);高脂饮食+达格列净组内斑块 NHE1 表达较高脂饮食组下降 ($P<0.05$)。LPS+达格列净组 RAW.7 细胞的 NHE1 蛋白水平明显低于 LPS 组 ($P<0.05$);SNARF-1 荧光法提示达格列净处理后细胞内 pH 值降低 ($P<0.05$),细胞 NHE1 活性显著降低 ($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+达格列净组细胞上清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著减少 ($P<0.05$),IL-10 含量显著增加 ($P<0.05$)。**结论** 达格列净通过抑制 NHE1 表达及其活性抑制 AS 斑块发展及细胞因子释放。

【关键词】 动脉粥样硬化;钠-葡萄糖协同转运蛋白 2;达格列净;钠氢交换体 1;脂多糖; $ApoE^{-/-}$ 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0010-09

Effect of dapagliflozin on atherosclerosis and the mechanism related to sodium hydrogen exchanger 1

ZHANG Shuping¹, MO Xiangang^{1,2*}, ZHANG Shiyue¹, CHEN Juhai¹, WANG Lan², YANG Hui², LIU Danan³

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China. 2. Comprehensive Ward, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004. 3. Department of Cardiovascular Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of dapagliflozin on the formation of atherosclerosis (AS) in apolipoprotein E knockout ($ApoE^{-/-}$) mice and the mechanism associated with sodium-hydrogen exchanger 1 (NHE1). **Methods** 24 6-week-old male $ApoE^{-/-}$ mice were randomly divided into ordinary diet group, high-fat diet group, high-fat diet+dapagliflozin group (10 mg/(kg·d) gavage) and high-fat diet+glimepiride group (0.5 mg/(kg·d) gavage). AS plaques in mouse aorta was observed by using HE staining after 8 weeks. The expression of sodium-glucose cotransporter 2

[基金项目] 国家自然科学基金 (82160097,31660288)。

[作者简介] 张书萍 (1995—),女,硕士,研究方向:动脉粥样硬化。E-mail:1529834331@qq.com

[通信作者] 莫显刚 (1975—),男,教授,博士,博士生导师,研究方向:老年心血管疾病临床与基础研究。E-mail:moxiangang123@126.com

(SGLT2) in the aorta was measured by quantitative PCR and Western blot. NHE1 expression was detected by immunohistochemistry. Then, mouse macrophage cell line RAW 264.7 cells were treated with dapagliflozin (10 $\mu\text{mol/L}$), amiloride (20 $\mu\text{mol/L}$) and lipopolysaccharide (100 ng/mL) for 24 h. The expression of NHE1 protein was analyzed by Western blot. The recovery rate (NHE1 activity) from the NH_4Cl -induced acid load was assayed by SNARF-1/AM fluorescence method. $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-10 secretion were determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results The AS plaque area in the aorta of the high-fat diet+dapagliflozin group was significantly lower than that of the high-fat diet group ($P<0.05$). The expression of SGLT2 in the aortic plaques of each group was significantly decreased ($P<0.05$). The plaque NHE1 expression in the high-fat diet+dapagliflozin group was lower than that in the high-fat diet group ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the LPS+dapagliflozin group had a significantly lower NHE1 protein level in the RAW 264.7 cells ($P<0.05$). SNARF-1 fluorescence assay indicated dapagliflozin inhibited NHE1 activity with decreasing intracellular pH ($P<0.05$). ELISA showed that the contents of $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β and IL-6 in the cell supernatant were significantly decreased, whereas the content of IL-10 was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** Dapagliflozin inhibits AS plaque development and cytokine release by inhibiting NHE1 expression and its activity.

【Keywords】 atherosclerosis; sodium-glucose cotransporter 2; dapagliflozin; sodium hydrogen exchanger 1; lipopolysaccharide; *ApoE*^{-/-} mice

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是冠心病、脑卒中及外周动脉闭塞等血管疾病的病理基础。AS 斑块内炎症细胞代谢活跃,糖酵解增强,致斑块内 pH 值降低,后者常导致斑块不稳定及心血管事件发生。钠氢交换体 1 (sodium-hydrogen exchanger 1, NHE1) 是调节细胞及组织 pH 值最重要的分子之一^[1],且 NHE1 决定 AS 病灶的酸化状态并促进 AS 形成^[2]。钠葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) 抑制剂如达格列净、恩格列净等主要通过抑制肾小管上皮 SGLT2 而减少葡萄糖重吸收发挥降糖作用^[3],此外, SGLT2 抑制剂可改善心血管临床结局及减低死亡率^[4],而格列美脲等降糖药物却无此功能。SGLT2 抑制剂具有增加糖尿病 AS 斑块稳定性^[5],降低系统或斑块炎症,减少肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活及氧化应激,改善内皮功能等作用^[6],这一系列功能提示 SGLT2 抑制剂具有抗 AS 效应。另一方面, SGLT2 抑制剂恩格列净能降低心肌细胞 NHE1 80% 活性^[7]; SGLT2 抑制剂能减轻 NHE1 野生型小鼠心肌细胞凋亡而抗心衰,而在 NHE1 敲除小鼠中 SGLT2 抑制剂效应消失^[8]。综上, NHE1 促进 AS 斑块形成, SGLT2 抑制剂具有抗 AS 效应并能抑制 NHE1 活性,推测 SGLT2 抑制剂可能通过抑制 NHE1 活性而抗 AS,但类似报道鲜见。本研究采用 *ApoE*^{-/-} 小鼠为研究对象,高脂饮食喂养,制作动脉粥样硬化炎症模型^[9],拟观察 SGLT2 抑制剂达格列净对高脂饮食喂养 *ApoE*^{-/-} 小鼠 AS 斑块形成及 RAW264.7 巨噬细胞的影响,进而探讨是否与 NHE1 的相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 6 周龄 *ApoE*^{-/-} 小鼠 24 只,基因背景为 C57BL/6 小鼠,小鼠体重均为 (20 $\pm$ 2) g,购自北京维通利华公司 [SCXK (京) 2019-0010],饲养于贵州医科大学动物实验室 [SYXK (黔) 2018-0001],动物实验通过贵州医科大学动物福利伦理委员会批准 (2101044)。实验研究过程中遵循替代、减少、优化的 3R 原则。

1.1.2 细胞

小鼠单核细胞细胞系 RAW264.7 细胞购自中国医学科学院基础所细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗小鼠 NHE1 抗体 (英国 Abcam 公司, ab230449); 兔抗小鼠 SGLT2 抗体 (英国 Abcam 公司, ab37296); GAPDH 抗体 (美国 GeneTex 公司, GTX100118); HRP 标记的山羊抗兔二抗 (英国 abcam 公司, ab6721); ECL 化学发光试剂盒 (德国默克 Millipore 公司, 1925901); 胎牛血清 (美国 GIBCO 公司, B5M54371); EDTA 缓冲液 (武汉塞维尔, G1206); 胰酶 (以色列 BI 公司, 1552692); 青链霉素混合液 (以色列 BI 公司, 1823547); DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司, 8120425); 达格列净 (美国 Selleck 公司, S154806); 格列美脲 (美国 Selleck 公司, S134401); 阿米洛利 (美国 MCE 公司, 2016-88-8); 尼日利亚菌素 (nigericin) (美国 Selleck 公司, S665302); SNARF-1/AM (美国 Selleck 公司,

S897401);高脂饲料(北京 博爱港公司,1145NA);ELISA 试剂盒均由北京四正柏公司提供:TNF- α (20210930)、IL-1 β (20211024)、IL-6 (2021116)、IL-10 (20211123)。TD-4279A 血糖测试仪及血糖试纸(杭州 泰博科技);RM2016 病理切片机(上海 徕卡仪器有限公司);Nikon Eclipse CI 正置光学显微镜(日本 尼康);激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物喂养、分组及观察

SPF 级雄性 6 周龄 *ApoE*^{-/-} 小鼠 24 只,给予喂养普通饲料适应性喂养 1 周。1 周后,随机分为普通饮食组(ordinary diet group)、高脂饮食组(high-fat diet group)、达格列净组(high-fat diet + dapagliflozin group)、格列美脲组(high-fat diet + glimepiride group),每组 6 只。普通饮食组予以普通饲料饲养,其余各组均高脂饲料(配方:1%胆固醇,0.2%胆酸钠,10%猪油,10%蛋黄粉,78.8%基础饲料)喂养,同时达格列净组予以 10 mg/(kg·d)生理盐水溶解灌胃,格列美脲组予以 0.5 mg/(kg·d)生理盐水溶解灌胃,普通饮食组及高脂饮食组分别等量生理盐水灌胃。高脂饲料阴凉干燥避光保存,每天每只 5 g 投食。饲养室环境通风良好,温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(50 $\pm$ 10)%,12 h/12 h 交替照明和避光。自由饮水,不同喂养及药物干预后,禁食 8 h 尾静脉取血检测空腹血糖,连续喂养 8 周后,戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉麻醉后处死,取小鼠主动脉、肾皮质按照后续实验操作进行。

1.3.2 HE 染色检测主动脉斑块

各组小鼠采用多聚甲醛从左心室灌流后,取出主动脉,4 $^{\circ}$ C PBS 中清洗 3 次,4%多聚甲醛固定,制备石蜡切片,HE 染色,利用光学显微镜进行观察并拍照,进行图片数据分析,计算校正斑块面积(斑块面积/血管截面积)%。

1.3.3 免疫组化检测斑块 NHE1

各组病理切片在 1 mmol/L EDTA 缓冲液(pH=9.0)高压修复 3 min(气压阀冒大气开始计时),抗原修复石蜡切片完成后,3% BSA 室温封闭 30 min,加入 3% BSA 配制的 NHE1 一抗(1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 清洗后,加入二抗,室温孵育 50 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水封片,观察并拍照,用图像分析软件 Image J Pro Plus 6.0 进行分析。

1.3.4 定量 PCR 检测各组 SGLT2 mRNA 表达

以高表达 SGLT2 的正常小鼠肾皮质为阳性对

照($n=6$),根据说明提取各组主动脉总 RNA,按照逆转录及 PCR 试剂盒操作,分别取每组 2 μ g 总 RNA 反转录合成 cDNA,按照 10 μ L 反应体系进行扩增,反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 15 min,60 $^{\circ}$ C 30 s,后两步 40 个循环。引物设计:小鼠 SGLT2 基因 mRNA (NM-133254.5) 及 GAPDH 基因 (NM-008084.3) 为模板自行设计引物,SGLT2 基因:正向 5'-CATTGGTGTGCTTGTGGT-3',反向 5'-CGAGACAATGGTAAGCCCCA-3';GAPDH 基因:正向 5'-GGTTGCTCCTGCGACTTCA-3',反向 5'-TGCTCCAGGGTTTCTTACTCC-3',上海生工公司合成。所有样本的 Ct 值均由荧光定量 PCR 仪读取,得到样本中各基因的 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.3.5 免疫印迹法检测 SGLT2 表达

为了显示各组 SGLT2 表达情况,以高表达 SGLT2 的正常小鼠肾皮质组织作为阳性对照($n=6$),称取适量肾皮质、高脂饮食组、高脂饮食+达格列净组及高脂饮食+格列美脲组主动脉组织,选择从左心室发出后向下延伸约 2 cm 的主动脉,选择的肾皮质大约与此相同重量。液氮捣碎,提取蛋白质,以蛋白浓度 5~10 μ g/ μ L 为标准,以每组总蛋白质量 30 μ g 计算出各组上样体积,经 SDS-PAGE 电泳,湿法转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1.5 h,一抗(SGLT2 1:1000)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温封闭 2 h,ECL 显色,图像分析软件 Image J 进行灰度值分析。

1.3.6 细胞培养、分组及处理

RAW264.7 细胞培养于含高糖 DMEM 培养基(Hyclone),将培养瓶内生长至约 80%的细胞胰酶消化离心,细胞沉淀浓重悬成每毫升 1.5×10^5 个的细胞悬液,每孔 2 mL 细胞悬液加入 6 孔板中,待细胞生长至汇合率>80%,给予达格列净(终浓度:10 μ mol/L)、阿米洛利(终浓度:20 μ mol/L)以及脂多糖(LPS,终浓度:100 ng/mL)分别或同时干预 24 h,分为空白对照组(Blank control group)、脂多糖组(LPS group)、脂多糖+达格列净组(LPS + dapagliflozin group)、脂多糖+阿米洛利组(LPS + amiloride group)、脂多糖+达格列净+阿米洛利组(LPS+dapagliflozin+amiloride group),共 5 组。

1.3.7 检测各组细胞 NHE1 的表达情况

不同药物干预六孔板内细胞 24 h 后,提取蛋白,NHE1 一抗稀释比例(1:1000),其余方法同动物部分 Western blot 操作。

1.3.8 检测 pH 值回复率(NHE1 活性)

采用荧光比率法检测细胞内 pH^[10],将生长有融合度约 80% 的 RAW264.7 细胞的盖玻片加入 SNARF-1/AM 溶液,37℃ 孵育 30 min,洗涤后,激光共聚焦显微镜下,以激发波长为 530 nm,检测发射波长为 580 nm 和 630 nm 荧光强度,计算其比率。采取 NH₄Cl 酸负荷法检测细胞内 pH 值回复率(NHE1 活性),采用 30 mmol/L NH₄Cl 溶液浸浴 3 min,无钠溶液漂洗 5 min 维持细胞内短暂酸中毒,继而加或不加达格列净或阿米洛利的含钠溶液漂洗使 Na⁺/H⁺ 交换加速,即促进 NHE1 活性增加。不同 pH 高钾溶液、SNARF-1/AM 负载及 nigericin 孵育 30 min,以 pH 值和荧光强度比制作胞内 pH 标准曲线。

1.3.9 检测各组 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-10 表达

酶联免疫吸附法检测各组 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 IL-10 表达,收集各组细胞培养上清,依据 ELISA 试剂盒操作说明,测定各组 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10 的分泌,自动酶标仪在 450 nm 处读取数值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,两组间差异比较方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 T_2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

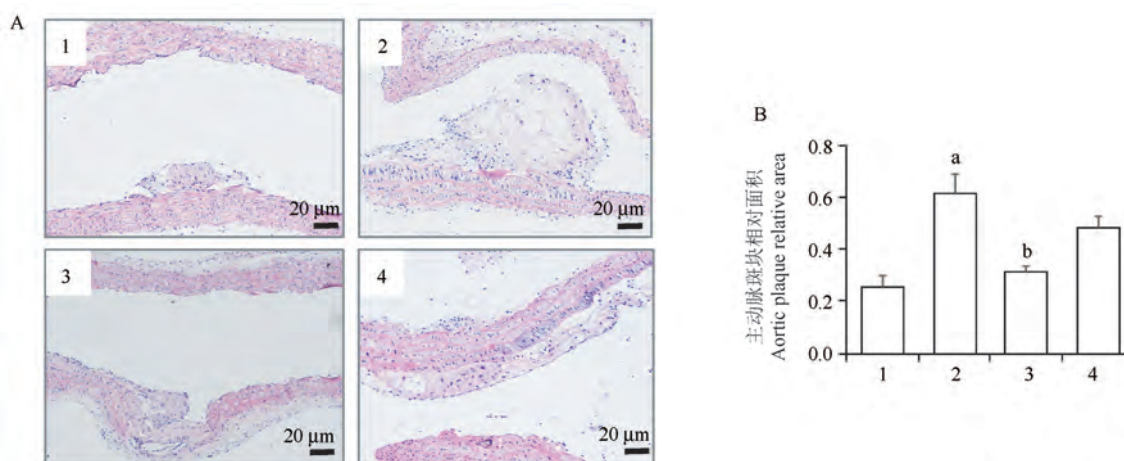
2 结果

2.1 达格列净减少非糖尿病 AS 形成

为排除血糖降低对 AS 形成的影响,以高脂饮食+格列美脲为对照,检测高脂饮食+达格列净干预对高脂饮食喂养 *ApoE*^{-/-} 小鼠 AS 形成的影响。结果提示(图 1A、1B)与普通饮食组相比,高脂饮食组斑块显著增加($P < 0.05$);高脂饮食+达格列净组 AS 斑块面积低于高脂饮食组及高脂饮食+格列美脲组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),而高脂饮食+格列美脲组较高脂饮食组差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外,喂养过程中,药物处理后监测血糖(如表 1 所示),高脂饮食组血糖较普通饮食组升高,但差异无明显统计学意义($P > 0.05$),高脂饮食+达格列净组、高脂饮食+格列美脲组与高脂饮食组相比均可轻微减低血糖趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示相对于高脂饮食+格列美脲组,高脂饮食+达格列净抑制斑块形成,还是血糖观察结果均提示达格列净减少非糖尿病 AS 形成。

2.2 AS 斑块 SGLT2 蛋白及 mRNA 极低表达

为明确 SGLT2 抑制剂是否影响 AS 斑块 SGLT2 表达,采用普通饮食组肾皮质作为阳性对照,检测 SGLT2 在主动脉斑块的蛋白及 mRNA 表达。结果显示,与肾皮质阳性对照组比较,高脂饮食组、高脂



注:A:主动脉 HE 染色;B:主动脉的斑块面积分析。1:普通饮食组;2:高脂饮食组;3:高脂饮食+达格列净组;4:高脂饮食+格列美脲组。与普通饮食组相比,^a $P < 0.05$;与高脂饮食组和高脂饮食+格列美脲组相比,^b $P < 0.05$ 。

图 1 达格列净对 *ApoE*^{-/-} 小鼠主动脉中动脉粥样硬化斑块的影响($n = 6$)

Note. A, HE staining of aorta. B, Plaque area analysis of the aorta. 1, Ordinary diet group. 2, High-fat diet group. 3, High-fat diet+dapagliflozin group. 4, High-fat diet+glimepiride group. Compared with ordinary diet group, ^a $P < 0.05$. Compared with high-fat diet group and high-fat diet+glimepiride group, ^b $P < 0.05$.

Figure 1 Effect of dapagliflozin on atherosclerotic plaques in the aorta of *ApoE*^{-/-} mice

饮食+达格列净组、高脂饮食+格列美脲组主动脉斑块中 SGLT2 蛋白及 mRNA 表达均非常低 ($P<0.05$) (图 2A~2C), 且高脂饮食组、高脂饮食+达格列净组、高脂饮食+格列美脲组 3 组间 SGLT2 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。提示主动脉 AS 内极低表达 SGLT2, 且 SGLT2 抑制剂达格列净亦未影响 SGLT2 表达, SGLT2 抑制剂可能并非通过 SGLT2 靶点抗 AS 作用。

2.3 达格列净抑制 AS 斑块 NHE1 蛋白表达

因 NHE1 可促进 AS 斑块形成, 检测 SGLT2 抑制剂达格列净是否改变 AS 斑块 NHE1 表达, 结果显示, 与普通饮食组相比, 高脂饮食组斑块中 NHE1 表达有上升趋势, 但无统计学意义 ($P<0.05$)。而在高脂饮食喂养基础上, SGLT2 抑制剂达格列净处理后斑块内 NHE1 相对于高脂饮食组表达下调 ($P<0.05$), 降糖药格列美脲组斑块内 NHE1 虽较高脂饮食组有所下降, 但差异无统计学意义 (图 3A、3B)。提示 NHE1 蛋白表达减低可能在 SGLT2 抑制剂达格列净抗 AS 中发挥作用。

2.4 达格列净抑制 RAW264.7 细胞 NHE1 蛋白表达及活性

2.4.1 RAW264.7 细胞 NHE1 蛋白表达

为验证动物实验结果, 以脂多糖诱导 NHE1 蛋白表达, 给予 SGLT2 抑制剂达格列净或 NHE1 抑制剂阿米洛利干预, 检测 RAW264.7 细胞 NHE1 表达。结果如图 4A、4B 显示, 与空白对照组相比, 脂多糖组的 NHE1 蛋白水平上调 ($P<0.05$), 而达格列净以及阿米洛利均可逆转脂多糖诱导的 NHE1 蛋白水平升高 ($P<0.05$), 然而, 阿米洛利+达格列净联合干预下, 与阿米洛利或达格列净单独干预相比, NHE1 蛋白水平无明显变化 ($P>0.05$)。提示达格列净或许通过 NHE1 受体作用, 进而影响 NHE1 蛋白水平。

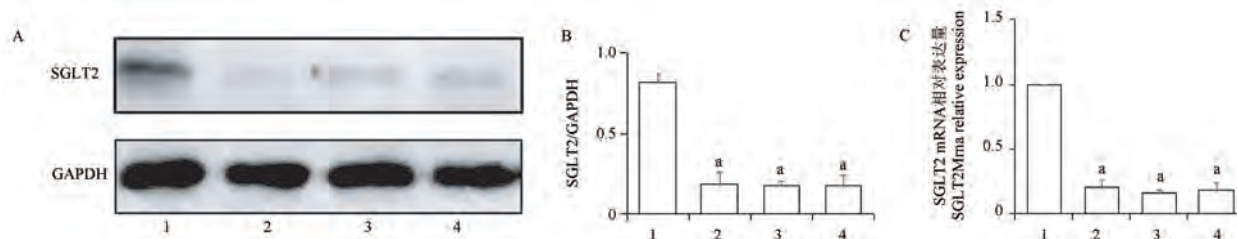
2.4.2 RAW264.7 细胞 NHE1 活性

NHE1 功能方面, 使用 SNARF-1/AM 双荧光强度比率法检测 SGLT2 抑制剂达格列净对 RAW264.7 细胞静息 pH 值, 结果显示相对于对照组, 在达格列净、阿米洛利单独或同时存在下, 细胞

表 1 6 各组小鼠血糖变化情况 ($\bar{x}\pm s$, mmol/L, $n=6$)

Table 1 Changes in blood glucose of mice in each group

组别 Groups	0 周 0 weeks	2 周 2 weeks	4 周 4 weeks	6 周 6 weeks	8 周 8 weeks
普通饮食组 Ordinary diet group	5.28±0.97	5.08±1.01	4.97±0.80	5.15±0.99	5.17±0.91
高脂饮食组 High-fat diet group	5.33±0.60	5.10±0.88	5.28±0.71	5.35±0.63	5.30±0.86
高脂饮食+达格列净组 High-fat diet+dapagliflozin group	5.13±0.46	4.92±0.56	4.60±0.98	4.62±0.94	4.82±0.63
高脂饮食+格列美脲组 High-fat diet+glimepiride group	5.34±0.41	4.85±0.83	4.88±0.99	4.45±0.92	4.63±1.06
<i>F</i>	0.40	0.13	0.62	1.41	0.61
<i>P</i>	0.95	0.94	0.62	0.27	0.62



注: A: 免疫印迹法检测主动脉 SGLT2 蛋白表达量; B: 主动脉 SGLT2 蛋白表达量分析; C: qPCR 检测主动脉 SGLT2 mRNA 表达量。1: 普通饮食组; 2: 高脂饮食组; 3: 高脂饮食+达格列净组; 4: 高脂饮食+格列美脲组。与普通饮食组相比, ^a $P<0.05$ 。

图 2 主动脉组织中 SGLT2 表达情况 ($n=6$)

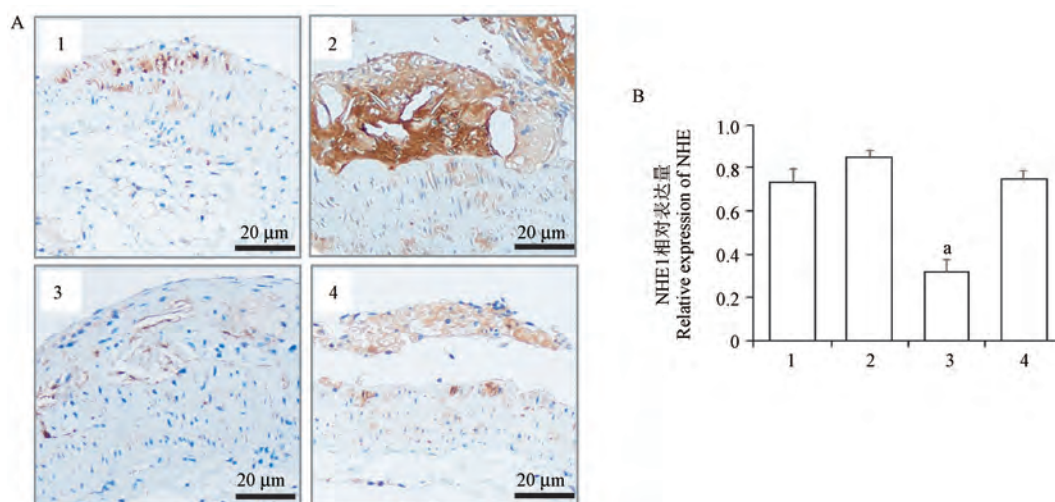
Note. A, Western blot detection of aortic SGLT2 protein expression. B, Analysis of aortic SGLT2 protein expression. C, qPCR detection of aortic SGLT2 mRNA expression. 1, Ordinary diet group. 2, High-fat diet group. 3, High-fat diet + dapagliflozin group. 4, High-fat diet + glimepiride group. Compared with ordinary diet group, ^a $P<0.05$.

Figure 2 SGLT2 expression in aortic tissue

静息状态下 pH 值降低,而 3 组静息 pH 值差异无统计学意义(图 5A)。进而检测 NH_4Cl 脉冲酸负荷后 pH 回复率即 NHE1 活性,结果显示与空白对照组相比,在达格列净、阿米洛利单独或同时存在下,细胞内 NHE1 活性均降低($P<0.05$);与达格列净组相比,细胞内 NHE1 活性无明显变化($P>0.05$)(图 5B)。达格列净干预,细胞内 pH 值及细胞内 NHE1 活性变化效应与达格列净与阿米洛利同时处理时效应相同,提示达格列净可能通过抑制 NHE1 活性改变细胞内 pH 值。

2.5 达格列净抑制 RAW264.7 细胞中炎症情况

与空白对照组比,LPS 组细胞上清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 含量显著增加($P<0.05$),IL-10 含量显著减少($P<0.05$);与 LPS 组比,LPS+达格列净组及 LPS+阿米洛利组可下调脂多糖诱导 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 含量($P<0.05$),上调 IL-10 含量($P<0.05$);与 LPS+阿米洛利组比较,LPS+阿米洛利+达格列净组 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 含量无统计学差异($P>0.05$)(表 2)。结果提示达格列净可能通过 NHE1 途径抑制 LPS 诱导炎症效应。

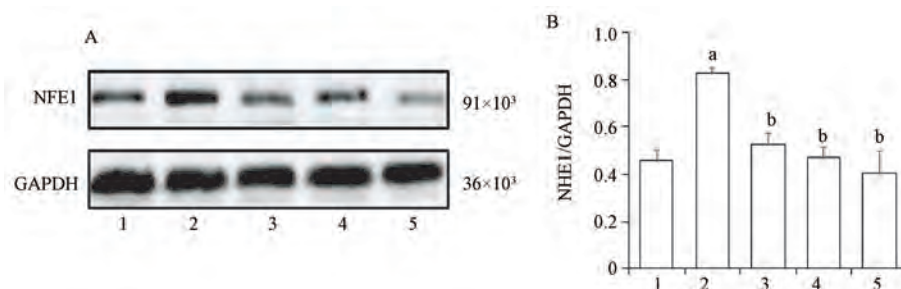


注:A:免疫组化检测主动脉斑块中 NHE1 表达量;B:主动脉斑块中 NHE1 表达量分析。1:普通饮食组;2:高脂饮食组;3:达格列净组;4:格列美脲组。与高脂饮食组相比,^a $P<0.05$ 。

图 3 达格列净对 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠主动脉斑块组织中 NHE1 表达的影响($n=6$)

Note. A, Immunohistochemical detection of NHE1 expression in aortic plaques. B, Analysis of NHE1 expression in aortic plaques. 1, Ordinary diet group. 2, High-fat diet group. 3, Dapagliflozin group. 4, Glimepiride group. Compared with high-fat diet group, ^a $P<0.05$.

Figure 3 Effect of dapagliflozin on NHE1 expression in aortic plaque tissue of $\text{ApoE}^{-/-}$ mice

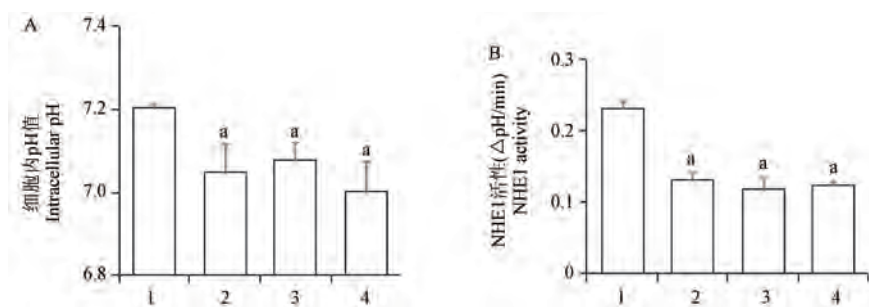


注:A:免疫印迹法检测 RAW264.7 细胞中 NHE1 表达量的变化;B:RAW264.7 细胞中 NHE1 表达量分析。1:空白对照组;2:LPS 组;3:LPS+达格列净组;4:LPS+阿米洛利组;5:LPS+达格列净+阿米洛利组。与空白对照组相比,^a $P<0.05$;与 LPS 组比较,^b $P<0.05$ 。

图 4 达格列净对 RAW264.7 细胞 NHE1 蛋白表达的影响($n=3$)

Note. A, Western blot was used to detect the changes of NHE1 expression in RAW264.7 cells. B, Analysis of NHE1 expression in RAW264.7 cells. 1, Blank control group. 2, LPS group. 3, LPS+dapagliflozin group. 4, LPS+amiloride group. 5, LPS+dapagliflozin+amiloride group. Compared with Blank control group, ^a $P<0.05$. Compared with LPS group, ^b $P<0.05$.

Figure 4 Effects of dapagliflozin on NHE1 protein expression in RAW264.7



注:A;SNARF-1/AM 荧光法检测 RAW264.7 细胞中 pH 变化分析;B;RAW264.7 细胞中 NHE1 活性变化分析。1:空白对照组;2:达格列净组;3:阿米洛利组;4:达格列净+阿米洛利组。与空白对照组比较, $^aP<0.05$ 。

图 5 达格列净对 RAW264.7 细胞 NHE1 活性的影响($n=3$)

Note. A, Analysis of pH changes in RAW264.7 cells detected by SNARF-1/AM fluorescence method. B, Analysis of changes in NHE1 activity in RAW264.7 cells. 1, Blank control group. 2, Dapagliflozin group. 3, Amiloride group. 4, Dapagliflozin+amiloride group. Compared with Blank control group, $^aP<0.05$.

Figure 5 Effect of dapagliflozin on NHE1 activity in RAW264.7 cells

表 2 各组细胞上清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 与 IL-10 含量比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL, $n=3$)

Table 2 Comparison of the contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the supernatant of cells in each group

组别 Groups	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
空白对照组 Blank control group	491.8 $\pm$ 33.57	71.58 $\pm$ 6.16	1458 $\pm$ 43.52	578.6 $\pm$ 56.99
LPS 组 LPS group	1010 $\pm$ 61.63 ^a	151.6 $\pm$ 7.39 ^a	2943 $\pm$ 59.27 ^a	253.1 $\pm$ 51.71 ^a
LPS+达格列净 LPS+dapagliflozin group	597.6 $\pm$ 43.06 ^b	123.9 $\pm$ 4.09 ^b	1458 $\pm$ 119.46 ^b	424.3 $\pm$ 43.22 ^b
LPS+阿米洛利组 LPS+amiloride group	575.8 $\pm$ 39.31 ^b	119.3 $\pm$ 9.16 ^b	1576 $\pm$ 39.31 ^b	425.7 $\pm$ 63.96 ^b
LPS+阿米洛利+达格列净组 LPS+amiloride+dapagliflozin group	545.7 $\pm$ 23.44 ^b	123.9 $\pm$ 6.82 ^b	1466 $\pm$ 89.28 ^b	395.6 $\pm$ 42.06 ^b
<i>F</i>	73.29	52.42	218.5	14.71
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003

注:与空白对照组比较, $^aP<0.05$;与 LPS 组比较, $^bP<0.05$

Note. Compared with Blank control group, $^aP<0.05$. Compared with LPS group, $^bP<0.05$.

3 讨论

AS 斑块形成以脂代谢异常、动脉壁炎症为重要特征的病理过程。SGLT2 抑制剂是目前唯一被临床试验证实具有降低心血管疾病风险的降糖药。本研究结果显示 SGLT2 抑制剂达格列净可减少 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 AS 斑块形成,进而表明 SGLT2 抑制剂达格列净不仅可抑制斑块 NHE1 表达,还可抑制细胞 NHE1 活性以及 LPS 诱导炎症因子释放,这些作用亦可被 NHE1 抑制剂阿米洛利所拮抗,提示抑制 NHE1 表达及活性,或许是 SGLT2 抑制剂抗 AS 的新机制。

3.1 达格列净减少非糖尿病 AS 形成

SGLT2 抑制剂是一种通过阻断肾近端小管中的 SGLT2 来达到抑制肾葡萄糖重吸收的新型降糖药。SGLT2 抑制剂具有心血管的保护作用,可以降低血

糖、改善心脏功能。此外, SGLT2 抑制剂还可抑制抗炎因子表达、改善免疫细胞表型以及机体酮体代谢等^[11]。研究表明 SGLT2 抑制剂能减少糖尿病小鼠 AS 斑块形成^[12-13],从而减弱 AS 的发生发展。本研究发现在 $ApoE^{-/-}$ 敲除小鼠中普通饮食喂养仍有少量斑块形成,而高脂饮食喂养会使斑块生长明显,且高脂饮食组的斑块增加可被 SGLT2 抑制剂达格列净抑制,非 SGLT2 抑制剂降糖药格列美脲组 AS 斑块却无明显减少,提示达格列净可减少非糖尿病 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 AS 斑块形成,降糖药格列美脲无抗 AS 效应。本研究采用经典 $ApoE^{-/-}$ 小鼠制作动脉粥样硬化模型,使用高脂饮食喂养可使其模型成功率高,而普通饮食组造成典型 AS 模型所需时间更长,在本研究时间范围内难以成功,故本研究采用了普通饮食组做空白对照,高脂饮食喂养制作模型。此

研究还发现各组小鼠血糖在达格列净及格列美脲不同降糖药物处理下,相对于高脂饮食组,小鼠血糖虽有下降趋势,但无明显统计学差异,可能有以下原因:(1)可能实验动物系非糖尿病模型;(2)检测血糖时采用的尾部静脉血较少;(3)测量血糖方法不精确;(4)实验小鼠样本量少,故本实验并不排除达格列净通过影响小鼠血糖进而对斑块的影响。有趣的是,两种降糖药均未明显降低小鼠正常血糖,本研究再次重现既往降糖药 SGLT2 抑制剂抑制非糖尿病小鼠 AS 斑块形成的结果^[14-16],这意味着有必要深入探讨 SGLT2 抑制剂减少 AS 形成的新机制,为选择 SGLT2 抑制剂治疗 AS 相关疾病提高新的研究策略^[11]。

3.2 AS 斑块 SGLT2 蛋白及 mRNA 极低表达

SGLT2 抑制剂在体内从两方面发挥作用:(1)主要通过肾小管上皮细胞 SGLT2 靶向作用;(2)脱靶效应^[17]。因本实验研究高脂饮食诱导 AS 模型情况下,主动脉内 SGLT2 的表达情况,故本研究仅列出了高脂饮食喂养情况下主动脉内 SGLT2 的表达情况,未罗列出普通饮食组斑块内的 SGLT2 表达情况,同高脂饮食组呈相同水平。本研究发现高脂饮食喂养下,与肾皮质高表达 NHE1 mRNA 及蛋白质相比,小鼠主动脉斑块 SGLT2 蛋白和 mRNA 表达非常低;无论是否达格列净干预,动脉斑块 SGLT2 表达无明显改变,提示 SGLT2 高度特异性表达于肾小管^[18],SGLT2 可能对斑块发生发展作用有限,而 SGLT2 抑制剂的脱靶效应可能发挥重要作用。研究发现 SGLT2 抑制剂恩格列净通过脱靶效应降低心肌细胞 NHE1 活性,抑制心肌细胞凋亡^[7-8]。

3.3 达格列净抑制 NHE1 蛋白表达

本研究在 AS 斑块及巨噬细胞上探讨了 SGLT2 抑制剂是否具有抑制 NHE1 的脱靶效应。我们发现高脂饮食组相较普通饮食组斑块内 NHE1 表达增加,且高脂饮食组内增加的 NHE1 可被 SGLT2 抑制剂达格列净药物所抑制,而格列美脲无此生理效应。达格列净可抑制斑块内 NHE1 表达。

本文从动物体内实验中探究了达格列净对 NHE1 的抑制作用,选择 RAW 巨噬细胞 LPS 诱导体外炎症模型,探究达格列净对体外细胞炎症模型下 NHE1 的作用,发现达格列净可降低细胞内 pH 以及抑制 NHE1 活性,且这些作用亦可被 NHE1 抑制剂阿米洛利所拮抗,提示 SGLT2 抑制剂能通过脱靶效应抑制 NHE1 活性。NHE1 广泛分布于各种细

胞的细胞膜^[19]。

3.4 达格列净抑制 RAW264.7 细胞中炎症情况

本研究通过检测各组药物作用后培养细胞中的炎症因子的变化,发现 LPS 诱导的促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的增加以及抗炎因子 IL-10 的减少炎症因子释放可被达格列净逆转。且达格列净的逆转效应与 NHE1 抑制剂单独或共同处理时效应相接近,提示达格列净的抗炎效应可能通过抑制 NHE1 产生。

NHE1 将胞外 Na⁺ 及胞内 H⁺ 进行交换,主要参与调节细胞内 pH 值。本研究以及我们之前研究均表明 AS 斑块中 NHE1 表达增高^[19],斑块炎症细胞浸润部位 pH 值降低。炎症或缺血区域常会出现 pH 值呈酸性,酸性环境又导致斑块环境内的巨噬细胞功能异常,促进 AS 斑块形成^[20]。即提示酸性环境与斑块发生发展可相互促进。新近有研究 Fluralozone 能通过抑制 NHE1 抗 AS^[21],亦提示了 NHE1 在 AS 中的关键作用。虽然本研究未检测达格列净干预后斑块内 pH,但我们研究表明 SGLT2 抑制剂可通过抑制 NHE1 活性抑制 AS 斑块形成,将达格列净的抗 AS 效应与 NHE1 联系起来,缩短 NHE1 基础研究的临床转化。

AS 斑块中巨噬细胞及平滑肌细胞是泡沫细胞的两个主要来源,而本研究在斑块组织中未能区别何种细胞 NHE1 表达。鉴于单核巨噬细胞是 AS 斑块主要组成细胞,故以巨噬细胞作为研究对象,发现达格列净抑制细胞 NHE1 蛋白表达及 NHE1 活性,抑制 LPS 诱导炎症因子的释放,且这种抑制效应并未被 NHE1 抑制剂阿米洛利增强。我们的研究结果与 SGLT2 抑制剂能通过抑制巨噬细胞向 M1 细胞分化而抑制炎症因子释放一致^[13],同时 NHE1 也参与 M1 细胞分化^[22],提示 SGLT2 抑制剂可能通过抑制 NHE1 表达及活性发挥抗炎作用。

3.5 研究的不足及结论

本研究尚未对斑块酸化程度进行研究,未对 SGLT2 抑制剂作用于 NHE1 基因敲除小鼠探究其抗 AS 机制,本课题组将在后续的研究中进行完善。

总之,尽管本研究未能在机制上深入研究,但结果表明 SGLT2 抑制剂可能通过抑制 NHE1 表达及活性而发挥抗 AS 作用。这些发现或许会深化 SGLT2 抑制剂心血管保护作用的认识,拓展 SGLT2 抑制剂临床运用,为探讨 NHE1 参与 AS 斑块形成的机制研究和临床转化提供新思路。

参考文献:

- [1] Malo ME, Fliegel L. Physiological role and regulation of the Na^+/H^+ exchanger [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84(11): 1081–1095.
- [2] Liu CL, Zhang X, Liu J, et al. Na^+/H^+ exchanger 1 determines atherosclerotic lesion acidification and promotes atherogenesis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3978.
- [3] Braunwald E. SGLT2 inhibitors: the statins of the 21st century [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(11): 1029–1030.
- [4] Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med* 2015, 373(22): 2117–2128.
- [5] Chen YC, Jandeleit-Dahm K, Peter K. Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor dapagliflozin stabilizes diabetes-induced atherosclerotic plaque instability [J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(1): e022761.
- [6] Zelniker TA, Braunwald E. Mechanisms of cardiorenal effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(4): 422–434.
- [7] Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, et al. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na^+/H^+ exchanger, lowering of cytosolic Na and vasodilation [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(3): 722–726.
- [8] Iborra-Egea O, Santiago-Vacas E, Yurista SR, et al. Unraveling the molecular mechanism of action of empagliflozin in heart failure with reduced ejection fraction with or without diabetes [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4(7): 831–840.
- [9] 李迎新, 黄霖. 动脉粥样硬化动物模型制作方法的介绍 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 70–73.
- [10] 莫显刚, 王兰, 郭静, 等. 过表达 NHE1 通过上调钙蛋白酶活性降低 RAW264.7 细胞 ABCA1 蛋白表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(1): 12–16.
- [11] Liu Z, Ma X, Ilyas I, et al. Impact of sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors on atherosclerosis: from pharmacology to pre-clinical and clinical therapeutics [J]. *Theranostics*, 2021, 11(9): 4502–4515.
- [12] Al-Sharea A, Murphy AJ, Huggins LA, et al. SGLT2 inhibition reduces atherosclerosis by enhancing lipoprotein clearance in Ldlr type 1 diabetic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 271: 166–176.
- [13] Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, et al. Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143396.
- [14] Dimitriadis GK, Nasiri-Ansari N, Agrogiannis G, et al. Empagliflozin improves primary haemodynamic parameters and attenuates the development of atherosclerosis in high fat diet fed ApoE knockout mice [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 494: 110487.
- [15] Han JH, Oh TJ, Lee G, et al. The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE mice fed a western diet [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(2): 364–376.
- [16] Lee SG, Lee SJ, Lee JJ, et al. Anti-inflammatory effect for atherosclerosis progression by sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT-2) inhibitor in a normoglycemic rabbit model [J]. *Korean Circ J*, 2020, 50(5): 443–457.
- [17] Chen S, Coronel R, Hollmann MW, et al. Direct cardiac effects of SGLT2 inhibitors [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 45.
- [18] Sabolic I, Vrhovac I, Erer DB, et al. Expression of Na^+/D -glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(8): 1174–1188.
- [19] 杨卉, 莫显刚, 王兰, 等. ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块中 NHE1 与 Netrin-1 表达上调 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(6): 777–783.
- [20] Sarigianni M, Tsapas A, Mikhailidis DP, et al. Na^+/H^+ exchanger-1: a link with atherogenesis? [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(12): 1545–1556.
- [21] Huang N, Qiu Y, Liu Y, et al. Fluralazine protects endothelial function in atherosclerosis by ameliorating NHE1 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(10): 1310–1320.
- [22] Zhang X, Li J, Luo S, et al. IgE contributes to atherosclerosis and obesity by affecting macrophage polarization, macrophage protein network, and foam cell formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 597–610.

[收稿日期] 2022-04-08

黄汕梅,李畅,马梓珊,等. 含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 19-26.
Huang SM, Li C, Ma ZS, et al. Protection of ischemic myocardium in mice by buccal administration of Xiaoshixionghuang San [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 19-26.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.003

含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究

黄汕梅^{1,2}, 李 畅^{1,2}, 马梓珊^{1,2}, 郭玉洪², 赵洋洋², 刘 原², 银帮巧²,
刘 鹰^{1*}, 唐耀平^{1,2,3*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011;
3. 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530200)

【摘要】 目的 探索硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的作用机制。**方法** 将 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组 (Blank)、假手术组 (sham)、模型组 (AMI)、雄黄组 (XH)、硝石组 (XS) 和硝石雄黄组 (XSXH)。分别在造模后第 12、24 和 36 h, 采用 ELISA 法检测各组血清肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶 (creatinase isoenzymes, CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平; 在造模后第 14 天, 采用一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒检测各组血清中总 NO 的含量; 采用苏木素-伊红染色法检测小鼠梗死心肌的病理损伤, 经 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色后测定心肌梗死面积; 在服用雄黄和硝石雄黄散 12 h 和第 14 天, 采用相关试剂盒检测各组血清中谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、谷草转氨酶、肌酐和尿素氮等肝功能指标。**结果** 硝石雄黄组小鼠血清中 cTnI、CK-MB 和 LDH 水平较模型组、雄黄组和硝石组显著降低 ($P < 0.05$); 假手术组血清中 NO 水平较高, 发生心肌缺血后, NO 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比, 雄黄组和硝石组能显著提高心肌梗死小鼠的 NO 水平 ($P < 0.01$); 与单味硝石或雄黄相比, 硝石雄黄组 NO 含量显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 硝石雄黄组小鼠心肌梗死面积显著减小 ($P < 0.05$); 该方具有明显改善小鼠心肌病理损伤的作用。与空白组相比, 雄黄组的肝肾功能各项指标显著升高 ($P < 0.01$), 硝石雄黄组的肝肾功能指标无显著差异 ($P > 0.05$)。**结论** 在心肌缺血时, 当 L-Arginine-eNOS-NO 通路被抑制后, 硝石雄黄散可通过 NO_3^- - NO_2^- -NO 通路调节小鼠体内的 NO 水平, 对小鼠缺血心肌起到显著的保护作用; 且对小鼠的肝肾功能无明显的急性毒性和亚急性毒性影响。

【关键词】 硝酸盐; 亚硝酸盐; 一氧化氮; 硝石雄黄散; 心肌缺血

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0019-08

Protection of ischemic myocardium in mice by buccal administration of Xiaoshixionghuang San

HUANG Shanmei^{1,2}, LI Chang^{1,2}, MA Zishan^{1,2}, GUO Yuhong², ZHAO Yangyang², LIU Yuan²,
YIN Bangqiao², LIU Ying^{1*}, TANG Yaoping^{1,2,3*}

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China. 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011. 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine with High Infectious Diseases, Nanning 530200)

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81774115, 81460721); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCSY2020025)。

【作者简介】 黄汕梅 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合心血管疾病防治。E-mail: huangshanmei104@126.com

【通信作者】 唐耀平 (1969—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合心血管疾病防治。E-mail: tangyp2014@gxtcmu.edu.cn

刘鹰 (1968—), 女, 学士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合心血管疾病防治。E-mail: xdtly001@163.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of Xiaoshixionghuangsan in regulating NO levels to protect ischemic myocardium in mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into Blank, sham, model (AMI), Xionghuang (XH), Xiaoshi (XS) and Xiaoshixionghuang (XSH) groups. Following establishment of the mouse myocardial infarction model, Blank, sham operation, and model groups were given normal saline, whereas the other groups were given corresponding intervention drugs. Serum levels of cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by ELISA at 12, 24 and 36 h after modeling. On the fourteenth day after modeling, total NO contents in serum were detected with an NO kit, pathological damage of the infarcted mouse myocardium was detected by hematoxylin and eosin staining, and the infarcted area was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. At 12 h and 14 days after Xiaoshixionghuang San administration, serum alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, creatinine, and urea nitrogen were detected by staining. **Results** Serum levels of cTnI, CK-MB and LDH in the XSH group were significantly lower compared with AMI, XH and XS groups ($P<0.05$). Serum NO levels in the sham group were high, but were significantly decreased in the AMI group ($P<0.05$). Compared with the AMI group, NO levels in mice with myocardial infarction were significantly increased in XH and XS groups ($P<0.01$). Compared with single XS or XH, NO contents in the XSH group were significantly increased ($P<0.001$). Compared with the AMI group, myocardial infarct sizes in the XSH group were significantly reduced ($P<0.05$). In addition, the decoction markedly improved the degree of pathological damage to the myocardium in mice. Compared with the Blank group, indexes of liver and kidney function in the XH group were significantly increased ($P<0.01$), and there was no significant difference in these indexes in the XSH group ($P>0.05$). **Conclusions** When the classical pathway L-Arginine-eNOS-NO pathway is inhibited during myocardial infarction, Xiaoshixionghuang San can regulate the level of NO in mice through the NO_3^- - NO_2^- -NO pathway to elicit a significant protective effect on ischemic mouse myocardium without obvious toxic effects on liver or kidney function.

【Keywords】 nitrate; nitrite; nitric oxide; Xiaoshixionghuang San; myocardial ischemia

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary artery diseases, CAD) 严重危害着民众的健康,是导致死亡的主要原因之一^[1-2]。CAD 的发展主要是由于斑块在冠脉内不断的堆积使冠脉逐渐狭窄,从而导致心肌组织缺血缺氧,严重时可出现急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI)^[3]。近年来,越来越多的学者将研究投向中医经典方剂,通过深入探索其中的作用机制,找到防治心肌缺血的新靶点和新策略。

早在公元 8 世纪,《敦煌遗书》中就记载用硝石雄黄散“治中恶,急心痛,手足逆冷者,顷刻可杀人,其人唇舌青紫者,着舌以通心气。硝石五钱匕,雄黄一钱匕。上二味,共为极细末,启病者舌,着散一匕于舌下,少时即定;若有涎出,令病者随涎咽下,必愈”^[4]。其疗效显著,具有很高的临床运用价值和开发前景,是中医药中不可多得的用于临床心血管急症的方药。但遗憾的是,目前在临床上很少使用硝石雄黄散治疗 CAD。究其原因,一方面可能是对硝石雄黄散防治 CAD 的作用机制不明确;另一方面,可能是担心雄黄 (主要成分四硫化四砷, As_4S_4) 的毒性^[5]。从方药的组成及给药途径来看,硝石雄黄散作用途径很可能与临床常用的硝酸酯类药物

完全不一样。本研究从探索硝石雄黄散对小鼠心肌梗死面积、心肌梗死标志物、血清 NO 水平以及肝肾功能的影响,初步揭示硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的作用机制及其生物安全性,为进一步研发提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性未交配的 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重 (20 ± 5) g,由广西中医药大学动物中心统一购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK (湘) 2019-0004],检疫合格后于广西中医药大学实验动物中心饲养、造模并取材 [SYXK (桂) 2019-0001]。饲养环境温度 (25 ± 2) °C,相对湿度 60%,光照 12 h/12 h 明暗循环,每笼 5 只 C57BL/6J 小鼠,并严格按照 3R 原则给予人道关怀。动物实验过程严格遵守国际实验动物伦理学要求,经过广西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (DW20210929-177)。

1.2 主要试剂与仪器

中药硝石 (成都金山化学试剂有限公司,批号: 20200504); 中药雄黄 (湖南淳芝宝药业有限责任公

司)。据参考文献^[6-7]报道,硝石雄黄散中的硝石又名火消,其主要成为硝酸钾(KNO_3),为保证实验的一致性,统一用硝酸钾(货号:GB/T647-2011)代替硝石。每种中药材均为同一批次,由广西中医药大学科学实验中心统一购进。

氧气(广西瑞达化工科技有限公司, Lot: 210028);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司, Lot: 202006);总 NO 检测试剂盒(上海碧云天生物公司, Lot: No. 120820210604);小鼠心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzymes, CK-MB)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)ELISA 试剂盒(江苏博深生物科技有限公司, Lot: 20210630044 T、20210630043 T、20210630042 T);2,3,5-三苯基氯化四氮(北京索莱宝科技有限公司, Lot: NO. 520C031);4%多聚甲醛通用型组织固定液(biosharp, 批号: 71040900);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酐等测试盒(南京建成生物工程研究所; Lot: 20210715、20210714);尿素氮测试盒(苏州科铭生物技术有限公司, Lot: 20210716)。

Tecan Infinite 200Pro 酶标仪(中国上海迪奥生物科技有限公司);HM-325E 病理组织切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BX54 MRF-S 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);557040 型号小动物呼吸机、Table Top 小动物麻醉机、Germinator500 干式消毒器、小鼠心梗手术器械等(美国 HarvardBioscience 公司);全能型成像分析系统、1658033 型电泳仪、电转仪和电源(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及中药含服

将 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组(Blank, $n=30$)、假手术组(sham, $n=30$)、模型组(AMI, $n=30$)、雄黄组(XH, $n=30$)、硝石组(XS, $n=30$)和硝石雄黄组(XSXH, $n=30$);按《敦煌遗嘱》记载:“硝石五钱匕,雄黄一钱匕……着散一匕于舌下”^[8]换算成现代单位^[9],成人 1 d 服用的剂量为硝石 10 g 和雄黄 2 g 混合研磨成细粉,取 2 g 于舌下含服(含 1.67 g 硝石和 0.33 g 雄黄)。通过等效剂量公式:人体剂量(mg)/人体体重(kg) $\times 9.1 \times$ 小鼠体重(kg),计算小鼠每天服用硝石雄黄剂量为 6.5 mg(含 5.42 mg

硝石和 1.08 mg 的雄黄)^[10]。在制备模型前 1 周及造模成功之后,每只小鼠以 20 mg/kg 剂量腹腔注射 N-硝基-L-精氨酸甲酯阻滞剂(N-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME)30 min 后,采用异氟烷麻醉各组小鼠后,按分组将药粉散在小鼠舌下,每日 1 次。在模型建立后,详细记录各组小鼠的存活情况。

1.3.2 心肌缺血模型制备

准备好实验小鼠,放置进麻醉盒内,连接好 Table Top 小动物麻醉机,利用异氟烷麻醉成功后,行气管插管并连接呼吸机(参数:Vt:200 μL ;PIP:30 cmH_2O ;PEEP:2 cmH_2O),于颈胸部脱毛备皮,常规消毒后,将第 3、4 肋间的皮肤与肌肉在胸骨左侧 2 mm 处切开 1 cm 左右,打开胸腔并充分暴露心脏,将心脏表面的心包膜撕开,用 8.0 线按浅近宽出的手法将冠状动脉左前降至结扎(约在左心耳下 1~2 mm 处),见心尖部变白后挤出胸腔的空气,关胸缝合。之后将小鼠放在 37℃ 的恒温板上进行复苏和心电图检查,结果见心电图 ST 段抬高,即为心肌缺血模型建立成功的标志^[11]。

1.3.3 组织取材及检测

在造模后的第 12、24、36 h 和第 14 天取样。将小鼠放入小动物麻醉机中麻醉后取血,在 4℃ 条件下静置 2 h 后以转速 4000 r/min 离心 10 min,取上清备用。取小鼠心脏,在生理盐水中将心包膜等物质洗净,将心室腔内的血挤压干净。造模后第 14 天取下的心脏,清理干净后将部分心脏放入 -20℃ 的冰箱内冷冻 2 h 后进行 TTC 染色,其余部分放入含有 2 mL 4%多聚甲醛通用型组织固定液的 EP 管中,后续用作 HE 染色。剩余的脏器在清理干净后, -80℃ 保存备用。

(1) 血清心肌梗死标志物

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测造模 12、24 和 36 h 后,小鼠血清中心肌梗死标志物 cTnI、CK-MB 和 LDH 等指标。

(2) NO 水平检测

使用 Griess 法检测造模 14 d 后血清中 NO 水平,实验操作严格按说明书执行。

(3) TTC 染色和 HE 染色检测心肌梗死面积大小

用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液溶解 TTC 染色剂粉末,配置成 2% TTC 溶液,避光保存。从 -20℃ 的冰箱中取出造模第 14 天取下的心脏,垂直于长轴方向

将心脏切成 2~3 mm 厚的切片。将切片放入含有 2% TTC 溶液的 EP 管中,按说明书操作。染色后放入固定液中过夜,次日拍照。造模第 14 天取下的心脏从固定液中取出脱水后,进行常规的石蜡包埋,切片,HE 染色,脱水封片,显微镜下观察分析。

(4) 肝肾功能检测

使用微板法和微量法检测服用硝石雄黄散后第 12 h 和第 14 天小鼠血清中各项肝肾功能指标(ALT、AST、AKP、肌酐和尿素氮),严格按试剂盒说明书试剂盒操作。

1.4 统计学方法

所有计量资料数据采用 IBM Corporation SPSS 25.0 统计软件进行分析,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据采用独立样本 t 检验和方差分析组间的差异性。以 $P<0.05$ 来表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立小鼠心肌梗死模型

各组小鼠在建立心肌梗死模型之前的生命体征正常,心电图结果显示为正常心电图,如图 1A 所示;建立心肌梗死模型后,心电图结果显示:ST 段明显抬高,如图 1B 所示,即表明小鼠心肌缺血模型造模成功。

2.2 硝石雄黄散对 NO_3^- - NO_2^- -NO 通道的调控

2.2.1 L-精氨酸-NO 途径的阻断

腹腔注射 L-NAME 后,小鼠的心肌组织中内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)蛋白表达明显受抑制,如图 2 所示;即体内依赖 eNOS 蛋白生成 NO 的经典途径 L-精氨酸-NO 途径受到抑制,体内 NO 由补充途径 NO_3^- - NO_2^- -NO 途径生成。

2.2.2 硝石雄黄散对 NO 生物活性的影响

与空白组相比,假手术组 NO 水平无显著变化

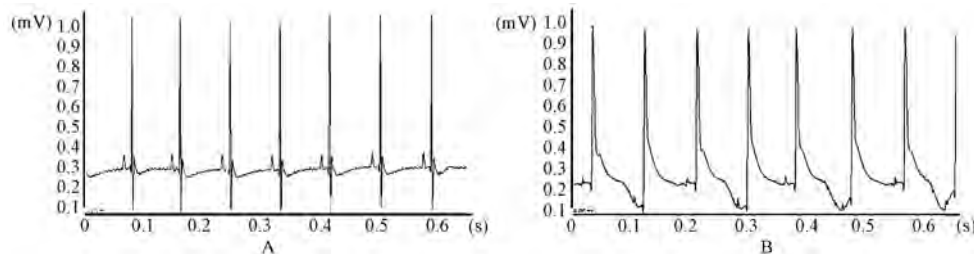
($P>0.05$),两组血清中 NO 水平较高;发生心肌梗死后,NO 水平显著降低($P<0.05$);与模型组相比,雄黄组和硝石组能显著提高心肌梗死小鼠的 NO 水平($P<0.01$);而硝石雄黄组血清 NO 含量最高,为 $19.56 \mu\text{mol/L}$ ($P<0.001$),见图 3。

2.3 硝石雄黄散对小鼠血清心肌梗死标志物的影响

与空白组相比,假手术组中血清梗死标志物 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平无显著变化($P>0.05$)。在模型组形成后,血清心肌标记物 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平与空白组和假手术组相比显著升高($P<0.05$),硝石雄黄组小鼠血清中 cTnI、CK-MB 和 LDH 水平较雄黄组和硝石组明显降低($P<0.05$),见表 1。

2.4 硝石雄黄散保护小鼠心肌梗死的病理学实验

TTC 染色结果显示:假手术组与空白组相比,心肌染色后呈现鲜红色,无明显差异;发生心肌梗死后,白色梗死区域面积明显增加($P<0.05$);与模型组相比,经雄黄治疗后白色梗死区域大小无明显变化($P>0.05$);经硝石和硝石雄黄散治疗后梗死区域明显减少($P<0.05$),硝石雄黄组与其他组相比,其白色心肌梗死部分显著减小($P<0.01$)。HE 染色结果显示:空白组和假手术组心肌组织正常,心肌细胞结构和轮廓完整分明、紧密有序地排列,胞核清晰可见,与胞质分界清晰;模型组心肌细胞破裂坏死,排列分散紊乱,心肌细胞空泡变性明显,间隙变大内有炎性细胞浸;与模型组相比,硝石组与雄黄组可见部分心肌细胞结构较完整,排列整齐有序,心肌细胞空泡性改变减少,细胞间隙变小,仍有少量地炎性细胞浸润;硝石雄黄组可见心肌细胞着色较浅,细胞结构与轮廓较完整清晰,排列较为整齐紧密,但仍有个别细胞核与胞质分界不清晰。见图 4 和图 5。

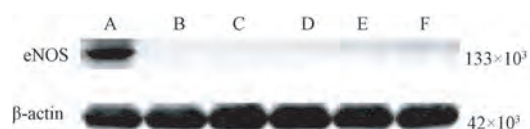


注:A:建立心梗模型之前的心电图;B:建立心梗模型之后的心电图。

图 1 小鼠心肌缺血模型建立前后心电图结果

Note. A, Ecg before myocardial infarction model was established. B, Ecg after myocardial infarction model was established.

Figure 1 Ecg results before and after establishment of myocardial ischemia model in mice

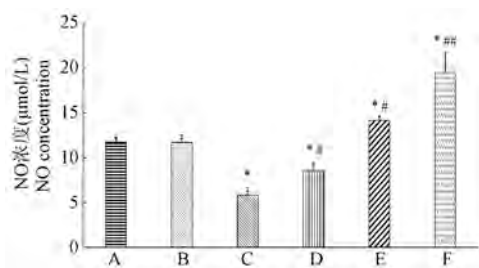


注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:雄黄组; E:硝石组; F:硝石雄黄组。

图2 eNOS 蛋白 Western blot 检测结果

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group.

Figure 2 eNOS protein Western blot test results



注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:雄黄组; E:硝石组; F:硝石雄黄组。与空白组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$ 。

图3 各组小鼠血清 NO 水平

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group. Compared with Blank group, * $P < 0.05$. Compared with AMI group, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$.

Figure 3 Serum NO level of mice in each group

表1 硝石雄黄散对小鼠血清心肌梗死标志物的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of Xiaoshixionghuang San on serum myocardial infarction markers in mice

组别 Group	空白组 Blank group	假手术组 Sham group	模型组 AMI group	雄黄组 XH group	硝石组 XS group	硝石雄黄组 XSXH group
cTnI (pg/mL)	5.12±0.40	5.16±0.84	52.11±0.90*	38.62±3.19*#	30.31±1.88*#	20.92±2.07*##
CK-MB (pg/mL)	74.76±1.54	73.88±1.29	431.03±16.16*	303.33±13.65*#	218.77±8.61*#	122.56±4.99*##
LDH (ng/mL)	3.19±0.08	3.13±0.10	13.53±0.63*	10.93±0.26*#	8.48±0.23*#	5.76±0.18*##

注:与空白组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$ 。

Note. Compared with Blank group, * $P < 0.05$. Compared with AMI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$.

表2 硝石雄黄散对小鼠肝肾功能的影晌($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of Xiaoshixionghuang San on liver and kidney function in mice

	急性毒性 Acute toxicity			亚急性毒性 Subacute toxicity		
	空白组 Blank group	雄黄组 XH group	硝石雄黄组 XSXH group	空白组 Blank group	雄黄组 XH group	硝石雄黄组 XSXH group
AST 活力(卡门氏单位) AST vigour (Carmen's unit)	73.68±6.54	141.14±6.72*	76.90±0.38	74.96±5.58	137.56±5.58**	78.45±3.06
ALT 活力(卡门氏单位) ALT vigour (Carmen's unit)	16.49±0.58	91.46±0.20*	17.07±0.17	24.43±0.52	95.50±0.38**	24.85±0.29
AKP 活力(金氏单位/100 mL) AKP vitality (King unit / 100 mL)	7.76±0.65	15.77±0.81*	8.02±0.10	7.83±0.87	21.20±0.45**	8.08±0.62
肌酐含量(μmol/L) Creatinine content (μmol/L)	19.95±4.18	48.45±7.62*	26.71±7.63	18.95±3.83	54.53±12.48**	20.96±1.52
尿素氮含量(mg/mL) Urea nitrogen content (mg/mL)	0.20±0.01	0.46±0.03*	0.21±0.01	0.21±0.02	0.56±0.02**	0.21±0.01

注:急性毒性,与空白组相比, * $P < 0.01$;亚急性毒性,与空白组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Acute toxicity, compared with Blank group, * $P < 0.01$. Subacute toxicity, compared with Blank group, ** $P < 0.01$.

2.5 硝石雄黄散对小鼠肝肾功能的影响

心肌梗死模型小鼠经雄黄和硝石雄黄散干预后 12 h 和第 14 天,硝石雄黄组小鼠血清中 ALT、AST、AKP、肌酐和尿素氮等含量与空白组相比,无明显差异($P > 0.05$),雄黄组各项肝肾功能指标均显著升高($P < 0.01$),见表 2。

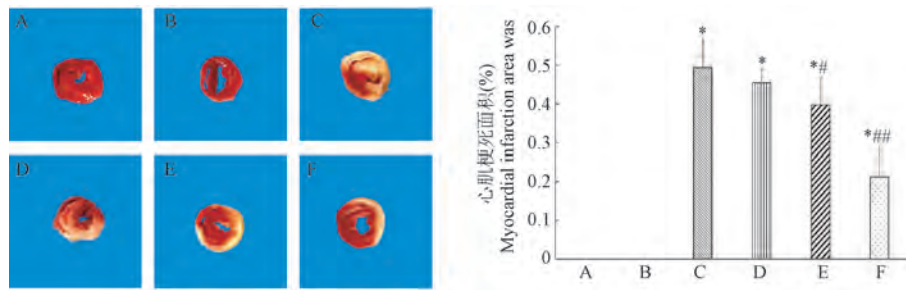
2.6 硝石雄黄散对小鼠存活情况的影响

通过比较整个实验过程各组小鼠的存活情况发现,与模型组相比,硝石雄黄组的小鼠存活情况明显改善(图 6)。

3 讨论

近些年来,对 CAD 的防治无论在技术上还是在策略上,均取得了重大进展,但其发病率和死亡率仍居高不下,许多问题亟待解决。寻找解决 CAD 的新策略、新技术和新药物,仍是临床的迫切需求,对传统方药的研发是近年来的热点。

CAD 属于中医“胸痹”范畴^[12]。早在公元 8 世纪的《敦煌遗书》就记载了治疗 CAD 心绞痛的硝石雄黄散,疗效显著,由于其作用机制和临床安全性不明,使得它在临床中被长期忽视。硝石雄黄散由硝石和雄黄组成,硝石即硝酸盐(NO_3^-)^[6]。目前大

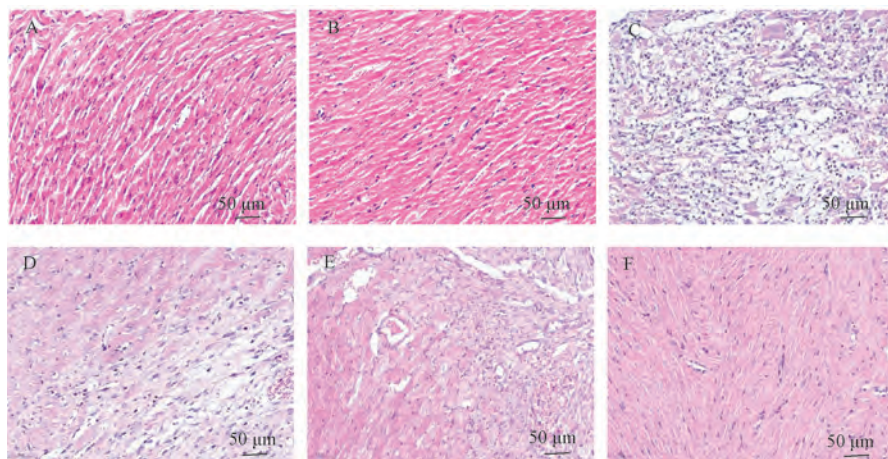


注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 雄黄组; E: 硝石组; F: 硝石雄黄组。与空白组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 各组小鼠梗死面积 TTC 染色结果

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group. Compared with Blank group, * $P < 0.05$. Compared with AMI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 TTC staining results of infarct area of mice in each group

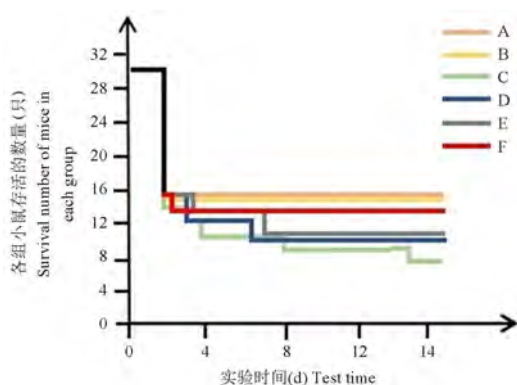


注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 雄黄组; E: 硝石组; F: 硝石雄黄组。

图 5 小鼠心肌组织 HE 染色结果

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group.

Figure 5 HE staining results of mouse myocardial tissue



注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 雄黄组; E: 硝石组; F: 硝石雄黄组。

图 6 各组小鼠存活情况

Note. A, Blank group. B, Sham group. C, AMI group. D, XH group. E, XS group. F, XSXH group.

Figure 6 Survival of the mice in each group

部分实验结果表明:硝酸盐在介导肿瘤、炎症、缺氧及酸中毒的病理生理过程中发挥了重要的作用,尤其对心血管系统的有益作用已经通过人体临床实验得到证实;当口服一定量的 NO_3^- 时,可舒张患者的血管,使血压降低,肌肉血流增强,循环耗氧量降低等^[13-15]。动物实验表明: NO_3^- 可以提高大鼠抗氧化能力来预防心脏、肾等某些器官的缺血再灌注损伤^[16-18]。这些实验均证实了 NO_3^- 是心血管健康中的重要分子。人体内 NO_3^- 的水平与 NO 水平密切相关。 NO 分子在体内极其不稳定被氧化成稳定的 NO_3^- 和亚硝酸盐 (NO_2^-) 分子储存在血液与组织中, NO 水平与 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 水平在体内维持动态平衡^[19]。早有大量的研究表明 NO 是一种通过调节血管内环境的平衡来抵御心血管疾病的气体信号分子^[20-21]。它主要通过诱导局部血管舒张、抑制白

细胞与内皮细胞黏附、平滑肌细胞迁移和增殖以及血小板聚集来促进局部血管循环系统的多种有益作用,维持血管功能^[22-23]。当发生心肌缺血缺氧时,L-Arginine-NOS-NO 途径受到抑制,体内 NO 水平降低^[24]。人体产生 NO 有两条途径。当抑制 L-Arginine-NOS-NO 通路时,另一条补充途径被激活,即还原型辅酶 I/还原型辅酶 II 被硝酸还原酶作为电子供体催化 NO_3^- 和 NO_2^- 的单电子发生还原反应生成 NO 来保护缺血心肌,即 $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ 通路^[25-26]。

《中国药典》中记载了:“雄黄的功用:解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟……”。文献研究表明雄黄含有的重金属砷,其可对脏器尤其是肝与肾造成不同程度的毒性损伤^[24];一项雄黄对昆明小鼠的急性毒性研究结果显示:雄黄可造成小鼠部分肝细胞及肾小管个别上皮细胞轻度水肿^[27]。李奕诺等^[28]在纳米雄黄对小鼠的急性毒性研究中发现:其对小鼠的半数致死量为 309.72 mg/kg;因干预致死的小鼠可见双肺、肝弥漫性充血,脾肿大发黑,小肠壁弥漫性充血,小肠胀气,部分肠道肿胀并发黑坏死。张秀娟等^[5]发现采用雄黄干预小鼠 3 周后,药物干预组小鼠血清中的 ALT、AST、ALP 和 γ -谷氨酰转肽酶的水平较空白组均明显升高;实验结果提示雄黄对小鼠肝结构和功能造成损伤以及肾小管轻度浊肿。Huo 等^[29]在采用代谢组学的方法研究雄黄对小鼠肝的亚慢性毒性发现:雄黄的亚慢性毒性机制与亚急性毒性机制相同,均为扰乱能量代谢、胆碱代谢和氨基酸代谢。上述实验研究证实雄黄以及含雄黄制剂的长期大剂量摄入可导致砷蓄积性的肝肾损伤,因此硝石雄黄散的毒副作用备受关注。

本研究在阻断 L-Arginine-NOS-NO 通路后,分别采用硝石、雄黄以及硝石雄黄散整方给药干预。结果发现,与空白组和假手术组相比,当小鼠发生心肌梗死后,血清中 NO 水平明显降低($P < 0.05$),血清心肌标记物 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平显著升高($P < 0.05$),心肌梗死面积明显增加($P < 0.05$),心肌细胞破裂坏死,排列分散紊乱,心肌细胞空泡变性明显,间隙变大内有炎性细胞浸;经药物干预后,模型小鼠血清中 NO 水平明显提高($P < 0.01$);其中,经硝石雄黄散整方干预后,模型小鼠血清中 NO 含量最高,为 19.56 $\mu\text{mol/L}$,明显高于其他各组($P < 0.01$);硝石雄黄组小鼠血清中 cTnI、CK-MB 和 LD 水平较雄黄组和硝石组明显降低($P < 0.05$);各组

TTC 染色心肌梗死区均缩小,硝石雄黄组与其他组相比,其白色心肌梗死部分显著减小($P < 0.01$);HE 染色显示各组均有保护小鼠缺血心肌细胞的作用,但以硝石雄黄组最为明显,在显微镜下可见有个别细胞核与胞质分界不清晰,大部分心肌细胞结构与轮廓完整清晰,排列较为整齐紧密,无细胞空泡性改变。实验提示硝石雄黄散具有良好的保护缺血心肌的作用,而雄黄能促进 NO_3^- 经 $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ 通路还原成 NO,增强整方药效。

为了确定硝石雄黄散是否对肝肾功能存在急性毒性和亚急性毒性的损害,本研究分别检测了小鼠在服用硝石雄黄散后 12 h 和第 14 天血清中肝肾功能的指标。实验结果显示:与空白组相比,服用雄黄和硝石雄黄散后 12 h 和第 14 天,雄黄组血清中肝肾功能指标具有显著的差异($P < 0.01$);硝石雄黄组血清中肝肾功能相关指标差异不具有统计学意义($P > 0.05$),证实了硝石雄黄散对小鼠肝肾功能无急性和亚急性毒性影响($P > 0.05$),整方使用具有安全性。

综上所述,当经典途径 L-Arginine-NOS 途径受到抑制时,舌下含服硝石雄黄散可显著提高体内 NO 水平,降低 cTnI、CK-MB 和 LDH 等心肌梗死标志物的水平,缩小梗死面积,保护缺血缺氧心肌细胞和组织,明显改善小鼠的存活情况。硝石雄黄散通过 $\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^- - \text{NO}$ 途径产生大量的 NO 改善心肌缺血,改善心肌组织缺血损伤,这可能是硝石雄黄散治疗 CAD 心绞痛的作用机制之一。同时,实验数据证实了硝石雄黄散对小鼠的肝肾功能没有明显的损伤。这表明了硝石雄黄散是一种治疗 CAD 的安全有效药物,为在临床安全推广使用提供实验依据。但雄黄是如何提供硝石保护缺血心肌的作用机制以及雄黄为什么在本方中的毒副作用明显消失的机制需要进一步的深入探索,提示课题组将硝酸盐作为提升 NO 水平的体外供体药物需要继续进行深入研发。

参考文献:

- [1] 江宜乐,荣媛媛,邢明青,等. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血浆 Elabela 水平变化及其与冠状动脉狭窄程度的关系[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(5): 557-560.
- [2] 白延平,陈俊民,刘智娜. 伊伐布雷定通过调控 TIMP-1 表达对冠心病大鼠抗心肌纤维化和心肌保护作用的机制[J]. 西部医学, 2021, 33(8): 1126-1132.
- [3] 崔海玲,林虹. 冠心病心肌缺血后心电图波形变化规律与炎性因子表达关系[J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(4): 445-

- 448, 453.
- [4] 刘新, 马鸿斌, 李朝平, 等. 敦煌医方——硝石雄黄散贴敷至阳穴防治冠心病心绞痛 61 例临床研究 [J]. 中医杂志, 2001, 42(3): 153-155.
- [5] 张秀娟, 白雪莹, 陆童, 等. 雄黄对小鼠肝脏功能损伤的初步研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 56-58.
- [6] 邵江娟, 吕翔, 路长珍, 等. 硝石化学成分研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(4): 306-307.
- [7] 宋亚东, 周曼曼, 谢明, 等. 芒硝、朴硝与硝石的本草考证 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(8): 57-60.
- [8] 刘新, 崔庆荣, 李朝平, 等. 硝石雄黄散贴敷至阳穴防治冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2000, 17(2): 43-46.
- [9] 曾小鹏, 武晓丽. 《敦煌中医药全书》中的量词(一) [J]. 名作欣赏, 2013, 23: 106-107.
- [10] 陈汉斌. 醇式黄连碱的合成与抗炎、抗胃溃疡作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [11] 黄汕梅, 郭玉洪, 赵洋洋, 等. 基于 NO_3^- - NO_2^- -NO 通道探索白酒在瓜蒌薤白白酒汤保护小鼠缺血心肌中的佐使作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(4): 23-27.
- [12] 郑丽莉. 芎归六君子汤对实验性大鼠冠心病的治疗作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 23-27, 55.
- [13] Coggan AR, Peterson LR. Dietary nitrate enhances the contractile properties of human skeletal muscle [J]. Exerc Sport Sci Rev, 2018, 46(4): 254-261.
- [14] Pawlak-Chaouch M, Boissiere J, Gamelin FX, et al. Effect of dietary nitrate supplementation on metabolic rate during rest and exercise in human: a systematic review and a meta-analysis [J]. Nitric Oxide, 2016, 53: 65-76.
- [15] Weitzberg E, Lundberg JO. Novel aspects of dietary nitrate and human health [J]. Annu Rev Nutr, 2013, 33(1): 129-159.
- [16] Lee JW, Lee DH, Park JK, et al. Sodium nitrite-derived nitric oxide protects rat testes against ischemia/reperfusion injury [J]. Asian J Androl, 2018, 21(1): 92-97.
- [17] Carlstrom M, Persson AE, Larsson E, et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(3): 574-585.
- [18] Tian R, Peng R, Yang Z, et al. Supplementation of dietary nitrate attenuated oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic vasculature through inhibition of NADPH oxidase [J]. Nitric Oxide, 2020, 96: 54-63.
- [19] Piknova B, Park JW, Kwan Jeff Lam K, et al. Nitrate as a source of nitrite and nitric oxide during exercise hyperemia in rat skeletal muscle [J]. Nitric Oxide, 2016, 1: 55-56.
- [20] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. Nature, 1980, 288(5789): 373-376.
- [21] Kevil CG, Kolluru GK, Pattillo CB, et al. Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(3): 576-593.
- [22] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. Pharmacol Rev, 1991, 43(2): 109-142.
- [23] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium [J]. Lancet, 1987, 2(8567): 1057-1058.
- [24] Morris SM Jr. Arginine metabolism in vascular biology and disease [J]. Vasc Med, 2005, 10(1): S83-S87.
- [25] Pinheiro LC, Montenegro MF, Amaral JH, et al. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(4): 701-709.
- [26] Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control [J]. J Clin Invest, 2005, 115(8): 2099-2107.
- [27] 苗加伟, 刘晓丽, 梁世霞, 等. 牛黄解毒片、雄黄与其他砷化物急性毒性的比较研究 [J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3): 217-221.
- [28] 李奕诺, 田野, 赵宇, 等. 纳米雄黄的急性毒性实验 [J]. 解放军药学报, 2015, 31(1): 13-16.
- [29] Huo T, Fang Y, Zhao L, et al. ^1H NMR-based metabolomic study of sub-chronic hepatotoxicity induced by realgar [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 192: 1-9.

[收稿日期]2022-04-06

杜宝香,于钦辉,孙启慧,等. 甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型的建立及验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 27-33.

Du BX, Yu QH, Sun QH, et al. Establishment and validation of a pneumonia-enteritis model in mice infected with influenza H1N1 virus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 27-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.004

甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型的建立及验证

杜宝香,于钦辉,孙启慧,王立清,杨 勇*,容 蓉*

(山东中医药大学,济南 250355)

【摘要】 目的 建立稳定的 H1N1 流感病毒肺炎-肠炎小鼠模型,为胃肠型流感的病理基础及抗病毒药物研究提供工具和手段。**方法** BALB/c 小鼠随机分为 4 组($n=6$),10 倍半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose, 10 TCID₅₀)组、1 TCID₅₀ 组、0.1 TCID₅₀ 组和对照组。除对照组外,其他 3 组小鼠滴鼻感染不同剂量的 H1N1 流感病毒。感染病毒后,每天测量小鼠的肛温、体重,观察小鼠皮毛及精神状态等,连续 7 d。处死后测定小鼠脏器指数、RT-PCR 检测肺组织中甲型流感病毒 H1N1 M 基因及小肠组织中视黄酸受体相关孤儿受体 γ t (retinoid-related orphan nuclear receptor, ROR- γ t) 的 mRNA 表达量。对筛选出的最佳感染剂量进行实验验证。**结果** 与对照组小鼠相比,模型组小鼠 10 TCID₅₀ 组和 1 TCID₅₀ 组体重呈显著下降趋势,肺指数明显升高($P<0.01$),胸腺指数明显降低($P<0.01$ 、 $P<0.05$),肺部病毒载量及小肠组织中 ROR- γ t 的 mRNA 表达量显著升高,出现背弓佝偻、精神不振、呼吸急促等现象,两个组的死亡率分别为 67%和 17%。0.1 TCID₅₀ 组小鼠指标虽有相似趋势,但无显著性差异。对 1 TCID₅₀ 感染剂量进行实验验证,与对照组相比,病理切片结果显示,模型组小鼠肺及小肠组织出现严重病理损伤,肺组织中白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 17A(IL-17A)及小肠组织中粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和 IL-2 显著升高,但肠组织中 IL-6 和白细胞介素 33(IL-33)显著降低。**结论** 1 TCID₅₀ 病毒感染为建立小鼠肺炎-肠炎模型的最佳浓度,且经过后期多批次的建模实验,证实该模型建立方法稳定、可靠,为抗病毒研究提供良好的病理模型。

【关键词】 小鼠;模型;流感;肺炎;肠炎

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0027-07

Establishment and validation of a pneumonia-enteritis model in mice infected with influenza H1N1 virus

DU Baoxiang, YU Qinhui, SUN Qihui, WANG Liqing, YANG Yong*, RONG Rong*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable mouse model of pneumonia enteritis caused by H1N1 influenza virus, and provide tools and means for study of the pathological basis of gastrointestinal influenza and antiviral drugs. **Methods** Experimental mice were randomly divided into four groups ($n=6$): 10 TCID₅₀, 1 TCID₅₀, 0.1 TCID₅₀ and control. All

【基金项目】 国家自然科学基金(81873220, 81774167);山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2020CXGC010505)。

【作者简介】 杜宝香(1993—),女,博士研究生,研究方向:中药活性成分发现与质量控制研究。E-mail: dubaoxiang1209@163.com

【通信作者】 杨勇(1972—),男,博士,副教授,博士研究生导师,研究方向:中药抗病毒的药效和机制以及经方的现代研究。

E-mail: yy7204@163.com

容蓉(1970—),女,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药活性成分发现与质量控制研究。E-mail: rosierong@163.com

* 共同通信作者

mice except the control group were intranasally infected with different doses of H1N1 influenza virus. After infection with the virus, the anal temperature and body weight of mice were measured every day, and their fur and mental state were observed for 7 consecutive days. After death, the organ index of mice was measured and mRNA expression of the H1N1 M gene of influenza virus in lung tissue and ROR- γ t in small intestine were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the body weight of model group mice in 10 TCID₅₀ and 1 TCID₅₀ groups decreased significantly, the lung index increased significantly ($P < 0.01$), the thymus index decreased significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), and mRNA expression of the H1N1 M gene of influenza virus and ROR- γ t in small intestine increased significantly ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). The mortality of 10 TCID₅₀ and 1 TCID₅₀ groups were 67% and 17%, respectively, while the other groups were 0. Although there were similar trends in indexes of the 0.1 TCID₅₀ group, there was no significant difference. An infection dose of 1 TCID₅₀ was verified. Compared with the control group, the result of histological sections displayed serious pathological injuries in the lung and small intestine of the model group. Moreover, relative expression of IL-2, IL-6, IFN- γ and IL-17A in the lung tissue, as well as GM-CSF and IL-2 in small intestine, was significantly increased; in contrast, IL-6 and IL-33 in intestine were significantly decreased. **Conclusions** 1 TCID₅₀ virus infection was the best concentration for establishing a mouse pneumonia enteritis model. The establishment method of this model is stable and reliable, providing a good pathological model for antiviral research.

【Keywords】 mice; model; influenza; pneumonia; enteritis

现代药理研究发现,流感病毒感染肺组织并在内大量增殖,会造成严重的肺部炎症损伤^[1]。临床数据表明,甲型 H1N1 流感患者早期表现与普通流感相似,包括发热、咽痛、咳嗽、全身酸痛,部分病例表现为呕吐、腹泻^[2]。Dogra^[3]发现,与普通流感比较,甲型 H1N1 流感患者的腹泻、呕吐等胃肠道症状较为多见。缪媛媛等^[4]曾对 1200 例普通流感与 513 例甲型 H1N1 流感患者的临床症状进行比较研究,结果表明,甲型 H1N1 流感患者出现胃肠道症状者明显增多。且甲型 H1N1 确诊病例中腹泻、呕吐等胃肠炎症状多为呼吸道系统的伴随症状。

目前对于小鼠 H1N1 病毒模型的建立多为单独的肺炎模型^[5-6],对于肺炎-肠炎模型的研究报道甚少。本文以 BALB/c 雄性小鼠为实验动物,滴鼻感染不同浓度的 H1N1 病毒,筛选出造模的最佳感染浓度,并对其进行多次验证,建立了稳定的肺炎-肠炎模型,为抗 H1N1 病毒药物的研究提供更加全面的病理模型。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 36 只(4 周龄,15~18 g),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2021-0006]。动物实验在山东中医药大学抗病毒协同创新中心进行[SYKX(鲁)2017-0022],饲养温度(22±2)℃,相对湿度 40%~60%,本研究实验方案合理,经本院伦理委员会批准

(DWSY202003013),符合实验动物的“3R”原则研究。

1.1.2 病毒

甲型流感病毒 H1N1/PR8 株,-80℃保存于山东中医药大学抗病毒协同创新中心,使用前在 9 日龄 SPF 鸡胚中扩增得到尿囊液,测定血凝效价。使用 Reed-Muench 法测定病毒毒力,-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液(辰欣药业股份有限公司,批号:D18216041);RNA store 样品保存液-DP408、动物组织总 RNA 提取试剂盒-DP431(RNAPrep Pure Tissue Kit)、cDNA 反转录试剂盒-KR106、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒-FP205 均购自天根公司。

ND-one 超微量分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司);荧光定量 PCR 仪(CFX Connect Real-time System,美国伯乐公司);R583 S、R540IE 型呼吸麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司);生物安全柜(上海立申科学仪器有限公司,型号:HF safe-1500);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司,型号:ST-16R)。

1.3 实验方法

1.3.1 流感病毒鸡胚扩增

9~11 日龄鸡胚放置 37℃孵育箱种孵育 1 d,定时翻动鸡胚。选择生长良好鸡胚,于生物安全柜内,画出气室边界和胎位,在胚胎面与气室交角边缘约 1 mm 处做标记。然后用消毒后的镊子尖头对

准鸡胚尿囊腔端打破蛋壳。取病毒液用流水冲浸融化,用生理盐水稀释成不同的浓度,每只鸡胚接种 0.1 mL。接种后用无菌棉胶带封口,置于 37℃ 继续孵育 48 h。用无菌吸管通过绒毛尿囊膜进入尿囊腔,吸取鸡胚尿囊液,3000 r/min 4℃ 离心 15 min,取上清于-80℃ 冰箱保存。用 0.5% 的鸡红细胞测定其血凝效价为 1:320。

1.3.2 Reed-Muench 法测定病毒毒力

采用半对数稀释法稀释病毒,稀释的病毒接种于 96 孔 MDCK 细胞板,待细胞病变停止后,根据 Reed-Muench 方法对病毒滴度进行计算,计算出病毒每 0.1 mL 的 TCID₅₀,经测定病毒 TCID₅₀ = 1×10⁵/0.1 mL。

1.3.3 流感小鼠模型的建立

BALB/c 小鼠按照体重和肛温随机分成 4 组(*n* = 6):对照组、流感模型组(10 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组、0.1 TCID₅₀ 组)。3 个模型组,按照组别分别滴鼻感染 10 TCID₅₀、1 TCID₅₀、0.1 TCID₅₀ 不同浓度的流感病毒,每只 20 μL,对照组小鼠滴鼻接种等量的生理盐水,每天记录小鼠体重、肛温变化,观察小鼠的精神状态、发病及死亡情况。处理后第 7 天处死小鼠进行取材。

1.3.4 造模指标观察

(1)生理状态观察

接种病毒后,每日观察小鼠肛温、体重变化、大便形状、隐血情况,连续 7 d。并参照文献^[7] 标准,进行 DAI 评分,评分标准见表 1。

(2)死亡率

计算每组动物的死亡率:死亡率 = 死亡动物(只)/动物总数(只)×100%

(3)脏器指数

实验结束后,摘取各组动物肺、胸腺、脾等脏器,准确称量并计算脏器指数。

(4)RT-PCR 检测肺组织中甲型流感病毒 H1N1

M 基因及肠组织中 ROR-γt 的 mRNA 表达

使用 RT-PCR 检测肺组织中甲型流感病毒 H1N1 M 基因及肠组织中 ROR-γt 的 mRNA 表达。根据小鼠死亡率、肺部病毒载量及肠道组织中 ROR-γt 的 mRNA 相对表达量确定最佳的染毒剂量。实验所需引物均由生工生物有限公司进行设计并合成。引物序列碱基见表 2。严格按照试剂盒说明书完成总 RNA 的提取、RNA 纯度及浓度测定、RNA 逆转录为 cDNA 及相关细胞因子基因相对表达量的检测。

1.3.5 造模结果验证

BALB/c 小鼠按照体重和肛温随机分成 2 组(*n* = 6):对照组、模型组。根据 1.3.2 项方法,对模型组小鼠滴鼻感染 H1N1 病毒,感染剂量为上述实验筛选出的最佳病毒剂量。取小肠及肺组织,进行 HE 染色。利用 RT-PCR 技术检测肺组织中 IL-2、

表 1 DAI 评分标准

Table 1 DAI score standard

评分 Score	体重下降(%) Weight lost	粪便粘稠度 Stool consistency	隐血或血便 Occult or gross bleeding
0	0	正常 Normal	无 None
1	1%~5%	软便 Loose stool	/
2	5%~10%	黏液样便 Mucinous stool	便潜血 Feces occult blood
3	10%~20%	/	/
4	>20%	稀液样便 Dilute stool	肉眼血便 Bloody stool

注:正常粪便:成形颗粒粪便;软便:半成形大便,不黏附于肛门;黏液样便:大便不成形,粪便里及肛门周围有肉眼可见的黏液;稀液样便:可黏附于肛门的稀水样粪便。DAI = (体重下降分值+粪便粘稠度分值+便血分值)/3。

Note. Normal stools, Well-formed pellets. Loose stool, Pasty stools which do not stick to the anus. Mucinous stool, Stools are not formed, and there is mucus visible to the naked eye in the feces and around the anus. Dilute stool, Liquid stools that stick to the anus. DAI = (combined score of weight lost, stool consistency and bleeding)/3.

表 2 基因序列

Table 2 Sequences of the primers

cDNA	F	R
Ppia	5'-CGCTTGCTGCAGCCATGGTC-3'	5'-CAGCTCGAAGGAGACGCGGC-3'
H1N1	5'-CTTCTAACCAGGTCGAAAC-3'	5'-CGTCTACGCTGCAGTCCTC-3'
ROR-γt	5'-TGTCCCGAGATGCTGTCAAGTTTG-3'	5'-TCCTGTTGCTGCTGCTGTTGC-3'
GM-CSF	5'-TTCAAGAAGCTAACATGTGTGC-3'	5'-GGTAACTTGTGTTTCACAGTCC-3'
IL-2	5'-GCAGCTCGCATCCTGTGTAC-3'	5'-CTGCTGTGCTTCCGCTGTAGAG-3'
IL-6	5'-GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA-3'	5'-CCAGGTAGCTATGCTACTCCAGAA-3'
IL-17A	5'-CCAGGGAGAGCTTCATCTGT-3'	5'-CTTGGCCTCAGTGTGTTGAC-3'
IL-33	5'-GCTGCGTCTGTTGACACATT-3'	5'-CACCTGGTCTTGCTCTTGCT-3'
IFN-γ	5'-CTTGAAAGACAATCAGGCCATC-3'	5'-CTTGGCAATACTCATGAATGCA-3'

IL-6、IFN- γ 、IL-17A 及肠组织中 GM-CSF、IL-2、IL-6 和 IL-33 的 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA) LSD 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 造模实验结果

2.1.1 流感模型小鼠造模指标检测

小鼠滴鼻感染流感病毒后,与对照组小鼠相比,小鼠 10 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组体重在接种病毒后第 3 天开始呈下降趋势(图 1),出现背弓佝偻、精神不振和软便等现象,在第 6 天开始两组小鼠出现黏液状粪便,平均 DAI 评分分别为(2.00 $\pm$ 0.00)分和(1.50 $\pm$ 0.12)分。而 0.1 TCID₅₀ 组小鼠体重直到第 7 天才出现下降趋势,且粪便状态一直正常。各组小鼠肛温变化不明显。

2.1.2 各组小鼠死亡率、脏器指数及肺组织中 H1N1 的 M 基因 mRNA 表达

接种病毒后,对照组、0.1 TCID₅₀ 组小鼠无死亡现象,10 TCID₅₀ 组小鼠、1 TCID₅₀ 组小鼠均出现不同数量的死亡。10 TCID₅₀ 死亡率为 67%,1 TCID₅₀

组死亡率为 17%。与对照组相比,各模型组小鼠肺指数明显升高,胸腺指数明显下降,脾指数无显著性差异。以 Ppia 为管家基因,分析目的基因的相对表达。与对照组小鼠相比,各模型组小鼠甲型流感病毒 H1N1 mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.05$) (见表 3)。

2.1.3 各组小鼠肠组织 ROR- γ t mRNA 相对表达量

与对照组相比,10 TCID₅₀ 组、1 TCID₅₀ 组小肠组织 ROR- γ t 相对表达量显著升高($P < 0.05$),0.1 TCID₅₀ 组虽有升高趋势,但是无显著性差异(图 2)。综合各组模型小鼠体重、死亡率、脏器指数、肺部病毒载量及肠道 ROR- γ t 的 mRNA 相对表达量筛选出最佳染毒剂为 1 TCID₅₀。

2.2 造模验证结果

2.2.1 小鼠肺与肠组织病理学指标检测

HE 染色结果见图 3。结果显示对照组小鼠肺组织呈正常形态,黏膜上皮无变性坏死脱落,管壁及周围组织无炎性细胞浸润、肺泡间隔无增厚。模型组小鼠肺组织见坏死细胞及大量渗出物,周围肺组织结构不清晰,嗜中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润,肺泡壁增厚;小肠组织同样出现小肠绒毛萎缩断裂,淋巴细胞浸润等明显的组织病理学改变,说明小鼠肺及肠道组织出现严重的炎症损伤。

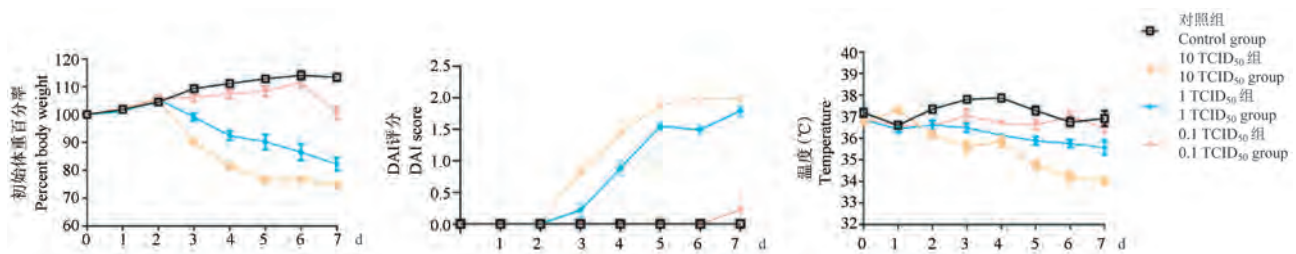


图 1 各组小鼠体重、肛温和 DAI 评分图

Figure 1 Body weight, rectal temperature DAI score in each groups

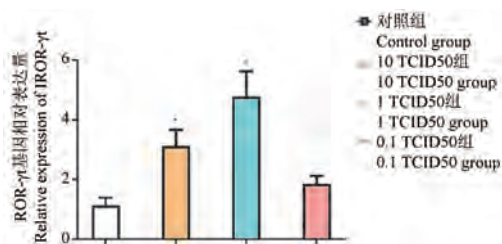
表 3 各组小鼠死亡率、脏器指数和病毒载量

Table 3 The mortality, organ index and viral load of different mice in each group

组别 Groups	死亡率(%) Mortality rate	肺指数 Lung index	胸腺指数 Thymus index	脾指数 Spleen index	病毒载量 Viral load
对照组 Control group	0	6.75 $\pm$ 0.54	2.6 $\pm$ 0.24	4.79 $\pm$ 0.97	0
10 TCID ₅₀ 组 10 TCID ₅₀ group	67	19.95 $\pm$ 4.86**	1.03 $\pm$ 0.32**	4.03 $\pm$ 0.53	37.79 $\pm$ 20.27**
1 TCID ₅₀ 组 1 TCID ₅₀ group	17	13.02 $\pm$ 3.62**	1.77 $\pm$ 1.27*	4.74 $\pm$ 0.85	1.42 $\pm$ 1.05**
0.1 TCID ₅₀ 组 0.1 TCID ₅₀ group	0	8.85 $\pm$ 1.08**	2.84 $\pm$ 0.22	4.17 $\pm$ 0.59	1.58 $\pm$ 2.34**

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

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



注:与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图2 各组小鼠 ROR- γ t 基因相对表达量

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

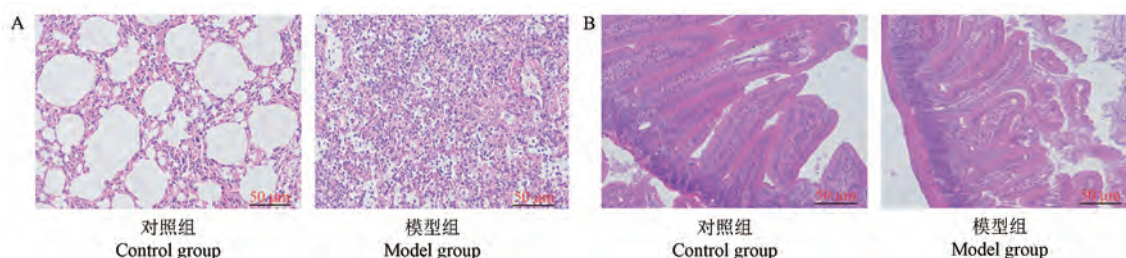
Figure 2 The mRNA expression of ROR- γ t in four groups

2.2.2 小鼠肺组织细胞因子的基因表达

与对照组相比,模型组小鼠肺组织中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-17A、IFN- γ 的相对表达量均显著升高,表明小鼠肺炎模型建立成功(图4)。

2.2.3 小鼠肠组织细胞因子的基因表达

与对照组相比,模型组小鼠肠组织中细胞因子 GM-CSF、IL-2 的相对表达量显著升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$),表明小鼠肠炎模型建立成功,但 IL-6 和 IL-33 的表达量显著降低(图5)。

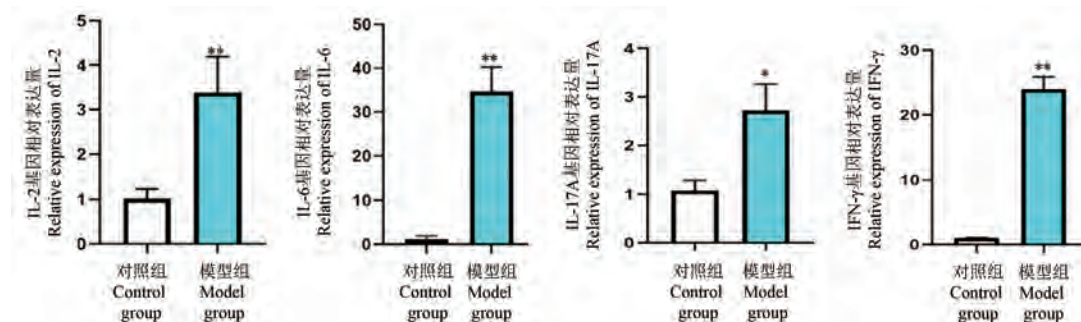


注:A:肺组织;B:小肠组织。

图3 各组小鼠组织病理形态观察

Note. A, Lung tissue. B, Intestine tissue.

Figure 3 Histopathological changes of different mice tissues in each groups

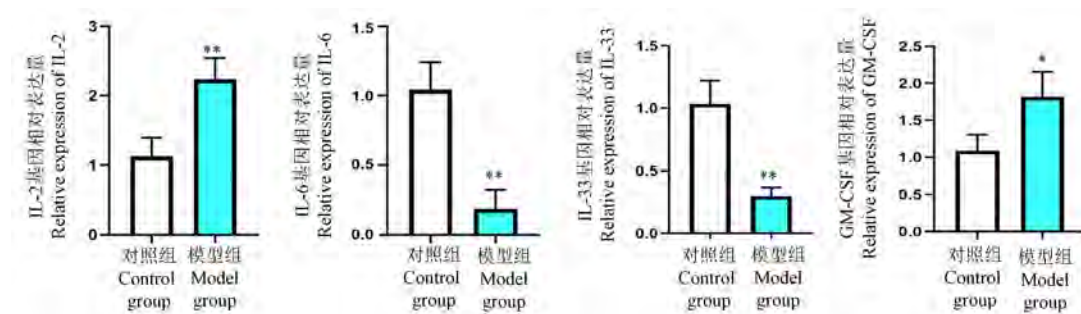


注:与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图4 各组小鼠肺组织细胞因子相对表达量

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

Figure 4 Relative expression of lung cytokines in different mice of each group



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图5 各组小鼠小肠组织细胞因子相对表达量

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

Figure 5 Relative expression of intestine cytokines in different mice of each group

3 讨论

造模过程中,我们通过小鼠肺和小肠组织的炎症损伤及 DAI 指数来评估小鼠胃肠型流感的严重程度。为了评估该模型是否建立成功,在本研究中,肺指数、肺部病毒载量以及肺组织中炎症因子被用作肺炎模型的评价指标。DAI 评分、小肠组织病理损伤及肠道炎症因子的表达量被用作肠炎模型的评价指标。与对照组相比,若感染 H1N1 小鼠肺指数、肺部病毒载量以及肺和小肠中炎症因子升高,DAI 指数升高,且出现明显的组织病理损伤,表明小鼠肺炎-肠炎模型成功建立。

造模过程中,模型组小鼠的体重呈现持续性下降趋势,且小鼠出现精神萎靡、呼吸急促等现象,感染病毒后 7 d,1 TCID₅₀ 和 10 TCID₅₀ 组小鼠体重明显低于对照组,但肛温变化不明显;小鼠肺、胸腺等脏器指数出现显著性差异,但是脾指数变化不明显;孙启慧^[8]以肺指数及 H1N1 基因相对表达量为指标成功建立流感模型,小鼠感染流感模型后,肺指数变大,肺组织 H1N1 基因相对表达量显著升高 ($P<0.01$),因此肺部病毒载量及肺指数可以作为评估流感模型的一个重要指标。与对照组相比,1 TCID₅₀ 和 10 TCID₅₀ 组小鼠肠组织变细、变短,肠道细胞因子 ROR- γ t 显著升高 ($P<0.05$),而 ROR- γ t 作为 Th17 细胞等淋巴细胞的转录因子,当其表达升高时会诱导 Th17 细胞过度分泌 IL-17、IL-22、GM-CSF 等炎症因子,致使肠道免疫失调,造成炎症损伤^[9],因此选定 ROR- γ t 的基因相对表达量为流感所致肠道炎症损伤的指标。

各检测数据显示,小鼠滴鼻感染 10 TCID₅₀、1 TCID₅₀ 浓度病毒后,造模结果较理想,但是,10 TCID₅₀ 组小鼠死亡率过高,不利于实验取材,且 1 TCID₅₀ 组小鼠 ROR- γ t 基因相对表达量更高,综合流感模型小鼠死亡率及肠道细胞因子表达情况确定感染剂量为 1 TCID₅₀。

对 1 TCID₅₀ 病毒感染剂量进行验证,病理切片显示模型组小鼠肺组织见坏死细胞及大量渗出物,周围肺组织结构不清晰,炎性细胞浸润,肺泡壁增厚。RT-PCR 结果显示,肺部炎症因子 IL-2、IL-6、IFN- γ 及 IL-17A 显著升高。IL-17 是 T 细胞诱导炎症反应的早期启动因子,可以通过促进释放前炎性

细胞因子来放大炎症反应,IL-17 与受体结合后,导致 NF- κ B 靶基因及 MAPK 的激活,与 IFN- γ 产生协同作用,激活 C/EPB,动员、募集及活化中性粒细胞,从而介导肺部组织炎症^[10-11]。

小肠病理切片显示,模型组小鼠出现绒毛萎缩断裂,淋巴细胞浸润等病变,肠道炎症因子 GM-CSF 和 IL-2 显著升高,IL-6 与 IL-33 显著降低。IL-6 是一种多效性细胞因子,在不同的组织及微环境中显示出不同的作用,在炎症方面,既具有促进炎症的功能,也具有抵抗炎症的作用。当 H1N1 病毒通过呼吸道传播进入肺组织后,刺激宿主调动巨噬细胞活化免疫系统,使 IL-6 分泌增加,IL-6 可通过募集单核细胞至抗原感染部位,诱导炎症细胞黏附、聚集,抑制 Treg 细胞分化及抑制 T 细胞凋亡,导致肺血管的通透性增加,引起肺间质水肿,发挥促炎作用。在肠道组织中,IL-6 可通过信号转导,激活转录激活因子 3 (STAT3),促进上皮细胞增殖,抑制其凋亡,从而达到抗炎效果。Cao 等^[12]研究发现与正常小鼠相比,IL-6^{-/-} 小鼠促进了葡聚糖磷酸钠盐诱导的结肠炎的发生。Ye 等^[13]发现,与 IL-10 缺陷小鼠相比,IL-6 与 IL-10 双重缺陷的小鼠可通过抑制 Treg/CTLA-4、促进 IL-1 β /Th2 通路显著加重了肠道炎症,展现出更早的疾病发作,且会诱导全身炎症。同时,也有一些肠炎模型中,IL-6 表现出升高的趋势^[14-16]。因此,IL-6 在肠道炎症中的作用存在较大争议,是我们今后研究的重点。

与 IL-6 类似,IL-33 参与多种自身免疫性疾病的发生和进展,但其在不同自身免疫性疾病中的作用和机制不尽相同(甚至各异),提示其作用的多样性。例如:通过诱导 Th2 免疫应答而缓解 Th1/Th17 介导的 EAE^[17];通过作用于肥大细胞,可促进 Th1/Th17 免疫应答来参与类风湿关节炎发生^[18]。段利华等^[19]的研究发现,体外给予小鼠 IL-33 可缓解 TNBS 诱导的肠炎,其机制可能与上调 Treg 相关。因此,与正常对照组相比,本研究模型组小鼠肠组织中 IL-33 显著性降低是正常情况,但其具体机制有待于进一步研究。

综上所述,甲型 H1N1 流感病毒小鼠肺炎-肠炎模型造模成功,最佳感染剂量为 1 TCID₅₀,该造模方法稳定、可靠,胃肠型流感的病理基础及抗病毒药物研究提供工具和手段。

参考文献:

- [1] 孙世惠, 吴小红, 刘晨风, 等. 人 H7N9 禽流感病毒与 H1N1 流感病毒感染小鼠病理学损伤的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 103-104.
- [2] 范运峰, 曲萍, 田克恭. A/H1N1 流感-世界关注的焦点 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 241-244.
- [3] Dogra S. Emergence of swine origin influenza (H1N1 Virus) [J]. JK Science, 2009, 11(4): 167.
- [4] 缪媛媛, 张志强, 刘刚, 等. 以急性胃肠炎为首表现的重症甲型 H1N1 流感一例报告 [J]. 中国全科医学, 2010, 3(6): 584-584.
- [5] 胡秋萍, 戴卫平, 刘建兴, 等. 流感病毒致小鼠急性肺损伤模型建立及利巴韦林干预作用研究 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(6): 244-249.
- [6] 顾立刚, 周芸, 景珊, 等. 流感病毒 FM1 感染对小鼠肺损伤的作用机制及毒热平注射液的干预作用 [A]. 2008 中华中医药学会全国中医体质学术研讨会暨国际传统医药创新与发展态势论坛论文汇编 [C]; 2008.
- [7] 齐宇, 王开, 伊淑帅, 等. 产肠毒素大肠杆菌 K88 诱发 BALB/c 鼠肠炎模型的建立及评价 [J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(1): 19-22.
- [8] 孙启慧. 麻黄细辛附子汤治疗肾阳虚外感证小鼠代谢组学研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [9] Tibarewala D, Roy S, Majumder P. Novel interleukin 17 antibody quickly reduces psoriasis and also its role in immunity and inflammation [J]. J Pharm Innov, 2016, 5(5): 14.
- [10] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 763-776.
- [11] Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH. The IL-17 family of cytokines in psoriasis: IL-17A and beyond [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1682.
- [12] Cao Q, Lin Y, Yue C, et al. IL-6 deficiency promotes colitis by recruiting Ly6C^{hi} monocytes into inflamed colon tissues in a CCL₂-CCR₂-dependent manner [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 904: 174165.
- [13] Ye M, Joosse ME, Liu L, et al. Deletion of IL-6 exacerbates colitis and induces systemic inflammation in IL-10-deficient mice [J]. J Crohns Colitis, 2020, 14(6): 831-840.
- [14] 张凯, 邓子辉, 薛辉, 等. 溃疡性结肠炎患者血清中 Leptin 与炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平及意义 [J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(4): 386-388.
- [15] 范文涛, 王攀红, 王倩. 马齿苋多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠组织 IL-6/STAT3 及 NF- κ B 的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(3): 263-267.
- [16] 毛婧, 朱莹, 周瑾, 等. 溃结宁膏穴位敷贴对实验性溃疡性结肠炎大鼠 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(7): 4.
- [17] 赖林. IL-33 敲除加重实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 疾病 [A]. 第十一届全国免疫学学术大会论文汇编 [C]; 2016.
- [18] 黄鹤卿, 李忆农. IL-33 与类风湿关节炎相关性 [J]. 医学综述, 2010, 16(11): 1614-1617.
- [19] 段利华, 石桂秀. IL-33 通过诱导 AAM 缓解小鼠实验性肠炎 [A]. 第二届免疫学博士生论坛论文汇编 [C]; 2013.

[收稿日期] 2022-02-11

《中国实验动物学报》刊期变更通知

为缩短出版周期,及时反映本学科最新科技动态,应广大读者、作者要求,本刊向主管部门及北京市新闻出版局提出申请变更刊期。经批准《中国实验动物学报》自 2022 年 8 月份起由双月刊变更为月刊。从 2023 年期起全年共 12 期。

欢迎读者积极订阅! 欢迎各位学者踊跃投稿!

张雪儿, 安红伟. 缺氧诱导因子 1 α 对小胶质细胞 M1 极化的影响及其机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 34-38.

Zhang XE, An HW. Effect of hypoxia-inducible factor 1 α on microglia M1 polarization and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 34-38.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.005

缺氧诱导因子 1 α 对小胶质细胞 M1 极化的影响及其机制研究

张雪儿, 安红伟*

(广西中医药大学第三附属医院神经内科, 广西 柳州 545000)

【摘要】 目的 研究缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 对小胶质细胞 M1 极化的影响及其影响机制。**方法** 将小胶质细胞 (BV-2 细胞) 随机分为 6 个组: Control 组和 10、50、100、200、500 μ g/L 重组 HIF-1 α 蛋白刺激处理组。采用荧光共聚焦法观察各组 BV-2 细胞的形态变化; 采用免疫蛋白印迹法定量分析重组 HIF-1 α 蛋白刺激处理后 NF- κ B p65、p-STAT1 和 TRAF6 蛋白含量变化。**结果** 与对照组相比, 重组 HIF-1 α 蛋白刺激后小胶质细胞胞体变大, 呈圆形或吞噬状, 突起变粗变短; 胞内 NF- κ B p65、TRAF6 蛋白较对照组显著增加, 不同浓度重组 HIF-1 α 蛋白刺激处理组对比结果有显著差异。**结论** HIF-1 α 可刺激小胶质细胞 M1 极化, 不同浓度重组 HIF-1 α 蛋白刺激处理有量效关系, 其机制可能与通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路调节 TRAF6 和 NF- κ B 活化有关。

【关键词】 缺氧诱导因子 1 α ; 缺血性卒中; 小胶质细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0034-05

Effect of hypoxia-inducible factor 1 α on microglia M1 polarization and its mechanism

ZHANG Xueer, AN Hongwei*

(Department of Neurology, the Third Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Liuzhou 545000, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) on microglia M1 polarization and its mechanism. **Methods** Microglia (BV-2 cells) were randomly divided into six groups: control, 10, 50, 100, 200 and 500 μ g/L recombinant HIF-1 α groups. Morphological changes of BV-2 cells were observed by fluorescence confocal microscopy. Changes of nuclear factor (NF)- κ B p65, p-STAT1 and TRAF6 protein contents after recombinant HIF-1 α protein stimulation were quantitatively analyzed by Western blot. **Results** Compared with the control group, microglia cells stimulated by recombinant HIF-1 α protein became larger, round or phagocytic, and their processes became thicker and shorter. Intracellular NF- κ B p65 and TRAF6 proteins were significantly increased compared with the control group, and the result of groups with varying concentrations of recombinant HIF-1 α protein stimulation were significantly different. **Conclusions** HIF-1 α can stimulate microglial M1 polarization and there was a dose-effect relationship between different concentrations of recombinant HIF-1 α , which may be related to the regulation of TRAF6 and NF- κ B activation through the TLR4/Myd88/NF- κ B pathway.

【Keywords】 HIF-1 α ; ischemic stroke; microglial

【基金项目】 国家自然科学基金 (81760413); 柳州市重点研发科技计划项目 (2019BJ10611); 中医药适宜技术开发与推广项目 (GZSY21-64)。

【作者简介】 张雪儿 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑血管病的基础与临床。E-mail: 540076344@qq.com

【通信作者】 安红伟 (1971—), 男, 主任医师, 硕士, 研究方向: 脑血管病的基础与临床。E-mail: ahw0305@163.com

缺血性卒中(ischemic stroke)是指脑缺血缺氧导致脑组织损伤,进而产生神经功能缺损的一类疾病,其主要原因为脑供血动脉狭窄或闭塞。缺血性卒中是全球致死和残疾的第二大原因^[1]。小胶质细胞(microglial)作为大脑的巨噬细胞,可以监测微环境并启动免疫应答。在对各种脑损伤的反应中,小胶质细胞被激活并极化为 M1 型小胶质细胞(促炎)或 M2 型小胶质细胞(抗炎)^[2]。这些小胶质细胞所产生的免疫调节分子如各种炎症因子和趋化因子分别与缺血性脑卒中后的继发性脑损伤或脑修复密切相关;近年来,许多研究发现在脑灌注不足动物模型中发现小胶质细胞数量显著增加,且小胶质细胞 M1 极化产生的炎症免疫反应与缺血性脑卒中息息相关^[2-4]。转录激活因子 1(signal transducers and activators of transcription1, STAT1)、核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)是小胶质细胞 M1 极化相关通路中的关键因子^[1]。近期研究发现在机体缺血缺氧状态下, HIF-1 α 表达升高,小胶质细胞活化明显^[5]。因此,研究推测 HIF-1 α 参与小胶质细胞活化极化过程。本研究用不同浓度的重组 HIF-1 α 蛋白处理体外培养的小胶质细胞,观察 HIF-1 α 对小胶质细胞形态的影响以及对小胶质细胞 p-STAT1、NF- κ B p65 和 TRAF6 蛋白的表达影响,以期明确 HIF-1 α 是否参与小胶质细胞 M1 极化过程以及其参与机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠小胶质细胞—BV-2 细胞系(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基(gibco, 货号: C11330500BT); 南美胎牛血清(gibco, 货号: 10270106); 双抗(gibco, 货号: 15140122); 重组 HIF-1 α 蛋白(prospec, 货号: PRO-477); 蛋白 marker(thermo, 货号: 26616); iba1 抗体(novus biologicals, 货号: NB100-1028); 猴抗羊 IgG-FITC(proteintech, 货号: SA00003-3); DAPI(abcam, 货号: ab104139); GAPDH(CST, 货号: D16H11); NF- κ B p65(bioss, 货号: BSM-33059M); p-STAT1(santa, 货号: sc-8394); TRAF6(santa, 货号: sc-8409); 羊抗兔 IgG(bioss, 货号: bs-0295G); 羊抗鼠 IgG(bioss, 货号: bs-40296G); 10% 山羊血清(beyotime, 货号: C0265); BSA(biofroxx, 货号: 4240GR100); meilunbio 飞克特

超敏 ECL 发光液(meilunbio, 货号: MA0186); 抗体稀释液(beyotime, 货号: WB100D)。

共聚焦显微镜(nikon); 化学发光仪(BLT); 酶标仪(thermo); 电泳槽(晟利科技, 货号: seli-1-0248); 电泳仪(bio-rad); 电转芯(easybio, 货号: BE6092); CO₂ 培养箱(biobase)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

采用 DMEM/F12 培养基、胎牛血清和双抗培养 BV-2 小胶质细胞,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱培养并传代。取对数生长期细胞,接种于 24 孔板(细胞爬片提前置于 24 孔板内)和 6 孔板,加培养基培养 1 d 后随机分为 6 组: Control 组、10、50、100、200 和 500 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组,每组设 3 个副孔。Control 组不作处理;重组 HIF-1 α 蛋白处理组分别用重组 HIF-1 α 蛋白 10、50、100、200 和 500 μ g/L 处理 BV-2 细胞 24 h。

1.3.2 iba1 荧光共聚焦

吸净二十四孔板里的培养基, PBS 洗 1 遍;用 4% 多聚甲醛将二十四孔板里的细胞爬片固定 15 min, PBS 洗 3 遍;用 0.5% Triton 通透细胞爬片 10 min, 洗 3 遍;扣出细胞爬片放入湿盒,用 10% 山羊血清室温保湿封闭 1 h;往每张爬片上滴加 Iba1 抗体(1:500, 羊抗) 4℃ 保湿孵育过夜。次日洗 3 遍后,滴加猴抗羊 IgG-FITC(1:100), 室温保湿避光孵育 1 h, 洗 3 遍, DAPI 避光复染后,共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

1.3.3 蛋白免疫印迹

按照上述分组处理细胞后,收集各组细胞,采用 BCA 法对各组蛋白进行定量,计算上样量。取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,湿转法电转移至 PVDF 膜,据需要的目的蛋白分子量切取条带,BSA 封闭 2 h,放入稀释好的 GAPDH(1:1000, 兔抗)、NF- κ B p65(1:1000, 兔单克隆抗体)、p-STAT1(1:200, 鼠单克隆抗体)和 TRAF6(1:200, 鼠单克隆抗体), 4℃ 孵育过夜,后放置于羊抗兔 IgG(1:5000)、羊抗鼠 IgG(1:5000), 4℃ 孵育 2 h,加入发光液,放入仪器成像。采用 Image J 软件测量条带灰度值并进行分析。

1.4 统计学方法

数据采用 Graphpad Prism 9.2 进行统计分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-ANOVA), *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义,所有实验均重复 3 次以上。

2 结果

2.1 重组 HIF-1 α 蛋白对小胶质细胞形态的影响

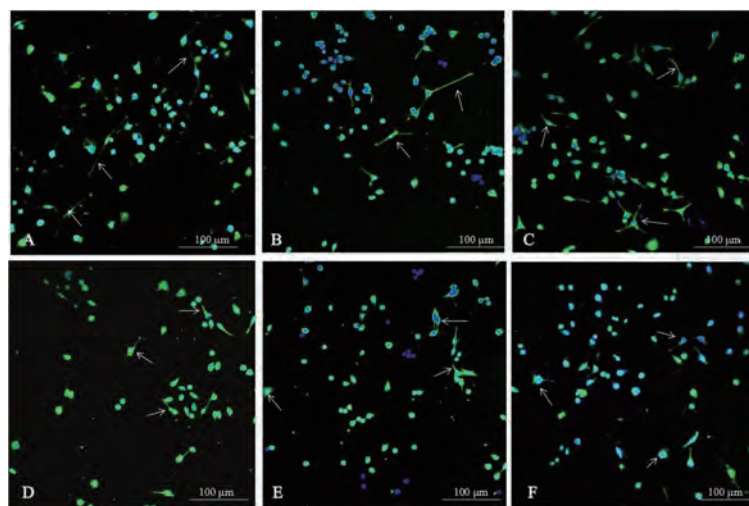
Control 组可观察到 BV-2 细胞突起较多,呈细长状,且胞体较为扁平(图 1A 箭头);与 Control 相比,10、50 $\mu\text{g/L}$ 重组 HIF-1 α 蛋白处理组 BV-2 变化相对不明显,仅为突起稍变短(图 1B、1C 箭头);然而,与 Control 组相比,100、200、500 $\mu\text{g/L}$ HIF-1 α 重组蛋白组 BV-2 细胞可观察到突起变少变粗短,胞体变圆变钝(图 1D、1E 箭头),尤其 500 $\mu\text{g/L}$ 组 BV-2 细胞类似于巨噬细胞,胞体相对更为圆钝(图 1F 箭头)。

2.2 蛋白免疫印迹检测结果

重组 HIF-1 α 蛋白刺激前后的细胞 NF- κB p65 和 TRAF6 蛋白表达具有统计学差异($P < 0.05$), p-STAT1 蛋白表达不具有统计学差异($P > 0.05$)。Control 组 NF- κB p65 和 TRAF6 蛋白表达量很少,经 HIF-1 α 重组蛋白刺激后,不同浓度组 NF- κB p65 和 TRAF6 蛋白表达量升高(图 2)。给予重组 HIF-1 α 蛋白刺激后,与 Control 组相比,50 $\mu\text{g/L}$ 浓度以上各组 NF- κB p65 表达均明显上升,100 $\mu\text{g/L}$ 浓度以上各组 TRAF6 表达均明显升高,且 NF- κB p65 和 TRAF6 蛋白表达在刺激浓度不同的组间也有明显差异(图 3, $P < 0.05$);然而不同浓度组 p-STAT1 蛋白与 Control 相比含量均无统计学意义(图 3, $P > 0.05$)。

3 讨论

缺血性脑卒中一直是老年人病死及致残的一大原因,对社会及个人均产生较大的负担。M1 型小胶质已被证实可分泌促炎细胞因子,使机体保持促炎状态,进而促进缺血性脑卒中后脑损伤的发生^[6]。研究表明在缺血性卒中发生后, M1 型小胶质细胞被活化,从而发挥有害作用。梗死模型小鼠中发现,小胶质细胞数量显著增加,小胶质细胞趋于 M1 型极化,其产生的趋化因子可将 CD8⁺ 的杀伤 T 细胞招募到缺血脑组织,被认为是加重脑梗死的主要因素^[7],而其分泌炎症因子可增加缺血性卒中后内皮坏死和血脑屏障渗漏,进一步促进神经炎症和脑水肿,最终导致预后不良^[8]。因此,本研究从 M1 型小胶质细胞极化的影响因素及其机制进行探讨,为探索治疗缺血性卒中新方向奠定基础。研究表明当机体缺氧时,体内 HIF-1 α 上升,大脑内小胶质细胞活化且炎症介质表达增高,当抑制 NF- κB 的活化, HIF-1 α 的产生减少^[9],此外,在癫痫小鼠体中, HIF-1 α 表达增加可导致小胶质细胞数量增加,并诱导其极化至 M1 型,从而触发促炎介质的释放^[10],且当下调 HIF-1 α 表达及其参与通路可减少小胶质细胞 M1 型极化,从而减弱机体炎症反应^[11]。虽然上述过往及最新研究均表明 HIF-1 α 可能与小胶质细胞 M1 型极化相关,但是 HIF-1 α 是否



注:A:对照组;B:10 $\mu\text{g/L}$ 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;C:50 $\mu\text{g/L}$ 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;D:100 $\mu\text{g/L}$ 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;E:200 $\mu\text{g/L}$ 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;F:500 $\mu\text{g/L}$ 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组。

图 1 缺氧诱导因子 1 α 诱导小胶质细胞 M1 极化

Note. A, Control group. B, 10 $\mu\text{g/L}$ HIF-1 α treatment group. C, 50 $\mu\text{g/L}$ HIF-1 α treatment group. D, 100 $\mu\text{g/L}$ HIF-1 α treatment group. E, 200 $\mu\text{g/L}$ HIF-1 α treatment group. F, 500 $\mu\text{g/L}$ HIF-1 α treatment group.

Figure 1 HIF-1 α induced polarization of M1 in microglia

能直接作用于小胶质细胞进而引起其 M1 极化并不明确,因此,本研究采用体外实验证明 HIF-1 α 对小胶质细胞的作用。本研究采用重组 HIF-1 α 蛋白胞外直接刺激小胶质细胞,用共聚焦免疫荧光显微镜观察小胶质细胞的形态,发现小胶质细胞形态偏向 M1 型极化,说明 HIF-1 α 可能促使小胶质细胞发生 M1 型极化。目前国内外关于 HIF-1 α 对小胶质细胞 M1 型极化的作用机制并不明确。过往研究表明当机体缺血/缺氧时,NF- κ B 在小胶质细胞内被激活,从而促使小胶质细胞释放促炎细胞因子,如 IL-

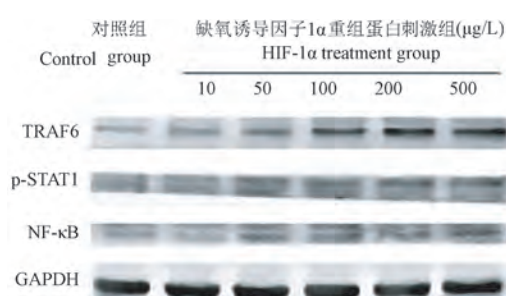
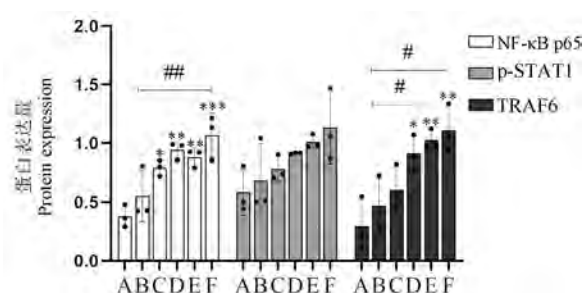


图 2 蛋白免疫印迹检测 BV-2 细胞 NF- κ B p65、p-STAT1 和 TRAF6 表达

Figure 2 Expressions of NF- κ B p65, p-STAT1 and TRAF6 in BV-2 cells were investigated by Western blot



注:A:对照组;B:10 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;C:50 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;D:100 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;E:200 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组;F:500 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 200、500 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组相比, # $P < 0.05$;与 500 μ g/L 缺氧诱导因子 1 α 重组蛋白刺激组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 3 缺氧诱导因子 1 α 对 NF- κ B p65、p-STAT1 和 TRAF6 蛋白表达量的影响

Note. A, Control group. B, 10 μ g/L HIF-1 α treatment group. C, 50 μ g/L HIF-1 α treatment group. D, 100 μ g/L HIF-1 α treatment group. E, 200 μ g/L HIF-1 α treatment group. F, 500 μ g/L HIF-1 α treatment group. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with 200 and 500 μ g/L HIF-1 α treatment group, # $P < 0.05$. Compared with 500 μ g/L HIF-1 α treatment group, ## $P < 0.01$.

Figure 3 Effects of HIF-1 α on the expression of NF- κ B p65, p-STAT1 and TRAF6 proteins

1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 等,最终导致继发性脑功能受损;转录因子 NF- κ B 被证实可以激活小胶质细胞,并将这些激活的细胞转化为 M1 表型,黄芩素通过减少 NF- κ B p65 的核转位抑制 NF- κ B 信号转导,抑制小胶质细胞 M1 极化,从而减少促炎因子 IL-6、IL-18 和 TNF- α 的释放^[12],此外,抑制激活的 NF- κ B 上调可减少 HIF-1 α 的产生,从而减弱缺血性卒中后产生的一系列的脑神经免疫炎症反应^[13]。本研究聚焦于 NF- κ B p65 蛋白,发现经过重组 HIF-1 α 蛋白刺激后,NF- κ B p65 表达量明显上升(图 3),说明 NF- κ B p65 参与小胶质细胞 M1 型极化过程。既往研究发现小胶质细胞 M1 极化涉及的通路包括酪氨酸激酶 (janus kinase, JAK)/

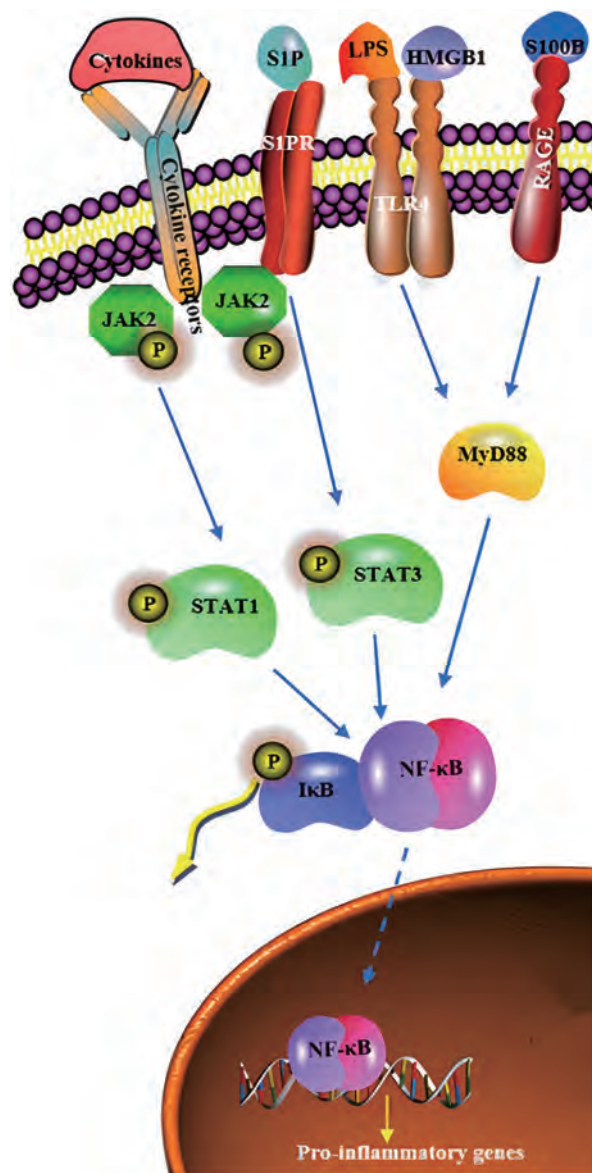


图 4 小胶质细胞 M1 极化的机制图^[1]

Figure 4 Mechanistic diagram of M1 polarization in microglia

STAT1/NF- κ B 通路、JAK2/STAT3/NF- κ B 通路和 Toll 样受体 (toll-like receptor-4, TLR4)/髓样分化蛋白抗原 (myeloid differential protein-88, myd88)/NF- κ B 通路^[1], 具体见图 4。在缺氧状态时, 发现激活的 BV-2 细胞中 p-STAT1 水平显著升高, 同时 M1 小胶质细胞标记物白细胞分化簇 (cluster of differentiation, CD68) 表达水平升高^[14]。Luo 等^[15]和 Zhou 等^[16]发现 TLR4 是小胶质细胞 M1 极化可能的细胞因子受体, 而 TRAF6 是 TLR4/Myd88 通路中的关键因子, TRAF6 可能与小胶质 M1 极化有关。为了验证 p-STAT1 和 TRAF6 对小胶质细胞 M1 极化的影响, 本研究检测了 p-STAT1 和 TRAF6 蛋白表达量, 发现 TRAF6 在重组 HIF-1 α 蛋白刺激后表达显著升高, 而 p-STAT1 表达没有显著变化 (图 3), 说明 TRAF6 和 NF- κ B p65 参与小胶质细胞 M1 极化过程, 我们推测 HIF-1 α 可能通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路引起小胶质细胞发生 M1 型极化, p-STAT1 经 HIF-1 α 刺激后无显著差异, 这可能是因为其主要经过其他通路使小胶质细胞发生 M1 型极化, 也可能是因为磷酸化的位点本次实验采用的位点, 可以增加其他磷酸化位点的 p-STAT1 进行再一次验证。然而有意思的是 NF- κ B p65 在 HIF-1 α 浓度为 50 μ g/L 以上才有明显升高, 而 TRAF6 需要 HIF-1 α 浓度达到 100 μ g/L 以上才有明显提高, 关于两个蛋白 HIF-1 α 刺激阈浓度的不同有待进一步研究; 但值得肯定的是两者在 HIF-1 α 为 10 μ g/L 时均不出现明显变化 (图 3), 且从共聚焦的图片来看, HIF-1 α 的刺激浓度超过 50 μ g/L 才会开始使小胶质细胞 M1 极化 (图 1), 这些结果说明需要达到一定的浓度 HIF-1 α 才能使小胶质细胞发生 M1 型极化。本研究初步探索了 HIF-1 α 对小胶质细胞 M1 极化的可能机制。然而, HIF-1 α 对小胶质细胞 M1 极化是否存在其他的共同作用机制尚不完全清楚, 需要进一步的体外和体内研究来证实。

综上, 本研究发现 HIF-1 α 可诱导小胶质细胞 M1 型极化, 其作用机制可能通过上调 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路来实现的。

参考文献:

- [1] Jiang CT, Wu WF, Deng YH, et al. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review) [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(5): 2006-2018.
- [2] Ma YY, Wang JX, Wang YT, et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke [J]. Prog Neurobiol, 2017, 157(10): 247-272.
- [3] Fowler JH, McQueen J, Holland PR, et al. Dimethyl fumarate improves white matter function following severe hypoperfusion; involvement of microglia/macrophages and inflammatory mediators [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(8): 1354-1370.
- [4] Liu M, Xu ZP, Wang L, et al. Cottonseed oil alleviates ischemic stroke injury by inhibiting the inflammatory activation of microglia and astrocyte [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 270-285.
- [5] Wang XT, Ma J, Fu Q, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in autophagic cell death in microglial cells induced by hypoxia [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 2097-2105.
- [6] Xiong XY, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke [J]. Prog Neurobiol, 2016, 142(1): 23-44.
- [7] Wang SW, Zhang H, Xu Y. Crosstalk between microglia and T cells contributes to brain damage and recovery after ischemic stroke [J]. Neurol Res, 2016, 38(6): 495-503.
- [8] Chen AQ, Fang Z, Chen XL, et al. Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 487-505.
- [9] Sheu SY, Hong YW, Sun JS, et al. Radix scrophulariae extracts (harpagoside) suppresses hypoxia-induced microglial activation and neurotoxicity [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(9): 324-333.
- [10] Butturini E, Boriero D, Carcereri-de Prati A, et al. STAT1 drives M1 microglia activation and neuroinflammation under hypoxia [J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 669(7): 22-30.
- [11] Xu JW, Tu YY, Wang Y, et al. Prodrug of epigallocatechin-3-gallate alleviates choroidal neovascularization via down-regulating HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 pathway and M1 type macrophage/microglia polarization [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121(1): 1-9.
- [12] Yang SL, Wang HG, Yang YL, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117(9): 1-12.
- [13] Liu R, Liao XY, Pan MX, et al. Glycine exhibits neuroprotective effects in ischemic stroke in rats through the inhibition of M1 microglial polarization via the NF- κ B p65/HIF-1 α signaling pathway [J]. J Immunol, 2019, 202(6): 1704-1714.
- [14] Fu M, Zhu YQ, Zhang JQ, et al. miR-221-3p suppresses the microglia activation and seizures by inhibiting of HIF-1 α in valproic acid-resistant epilepsy [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(8): 1-15.
- [15] Luo Y, Wang C, Li WH, et al. Madecassoside protects BV-2 microglial cells from oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury via inhibition of the toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. Brain Res, 2018, 1679(1): 144-154.
- [16] Zhou LJ, Liu ZJ, Wang ZX, et al. Astragalus polysaccharides exerts immunomodulatory effects via TLR4-mediated MYD88-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. Sci Rep, 2017, 7(3): 1-13.

[收稿日期] 2021-12-08

杨继梅, 卢文江, 周娇洁. miR-214 对异丙酚麻醉大鼠术后神经元损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 39-46, 81.

Yang JM, Lu WJ, Zhou JJ. Protective effect of miR-214 on neuronal injury in propofol-anesthetized thoracotomy rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 39-46, 81.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.006

miR-214 对异丙酚麻醉大鼠术后神经元损伤的保护作用

杨继梅, 卢文江*, 周娇洁

(乐山市人民医院麻醉科, 四川 乐山 614000)

【摘要】 目的 探讨 miR-214 对异丙酚麻醉诱导的神经元损伤的保护作用及生物学机制。**方法** 7 日龄 SD 雄性大鼠随机分为 4 组(每组 15 只):生理盐水组(NS)、异丙酚麻醉开腹探查组(模型)、miR-NC 组和 miR-214 组。除 NS 组外,其余组别建立异丙酚麻醉开腹探查模型。miR-NC 组和 miR-214 组分别在麻醉前将 miR-NC-agomir 或 miR-214-agomir 注射到海马内。采用免疫荧光法检测海马 mTORC1 的表达, TUNEL 染色检测海马组织细胞凋亡, RT-qPCR 分析海马组织中 miR-214 表达。分别将 miR-214 抑制剂和 mTORC1 抑制剂转染入 HT22 海马神经元细胞,然后暴露于异丙酚。采用流式细胞术分析细胞的存活情况和 Western blot 分析 TFEB、C-caspase3 蛋白表达。**结果** 与 NS 组相比,模型组大鼠海马中 miR-214 明显下调($P<0.05$),并且海马神经细胞凋亡显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,miR-214 组海马神经元凋亡减弱($P<0.05$)。生物信息学预测证明 mTORC1 和 miR-214 之间存在特异性结合位点。免疫荧光检测显示,与 NS 组比较,模型组诱导海马神经组织中 mTORC1 表达增加($P<0.05$),miR-214 治疗显著降低了 mTORC1 表达($P<0.05$)。此外,与 NC 对照组相比,si-mTORC1 转染导致暴露于异丙酚的 HT22 海马神经元细胞的凋亡率显著降低,并且 TFEB 表达显著增加($P<0.01$),以及 C-caspase3 降低($P<0.05$)。而 miR-214 抑制剂转染显著逆转了 si-mTORC1 的保护作用以及诱导的 TFEB、C-caspase3 蛋白表达的变化($P<0.05$)。**结论** miR-214 可能通过 mTORC1-TFEB 通路减轻异丙酚神经毒性,提高神经元的存活率。

【关键词】 miR-214;异丙酚;开腹探查;大鼠;神经元;mTORC1-TFEB 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0039-08

Protective effect of miR-214 on neuronal injury in propofol-anesthetized thoracotomy rats

YANG Jimei, LU Wenjiang*, ZHOU Jiaojie

(Department of Anesthesiology, Leshan People's Hospital, Leshan 614000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and biological mechanism of miR-214 on neuronal injury induced by propofol anesthesia, and elucidate the underlying mechanisms of this process. **Methods** Seven-day-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups (15 rats per group): normal saline (NS), propofol anesthesia thoracotomy exploration (model), miR-NC and miR-214. With the exception of the NS group, all groups underwent

【基金项目】 四川省卫生适宜技术推广项目(19SYJS56)。

【作者简介】 杨继梅(1990—),女,研究生,主治医师,研究方向:全麻术后认知功能影响。E-mail: caochuang9890@163.com

【通信作者】 卢文江(1963—),男,本科,主任医师,研究方向:全麻认知功能的影响。E-mail: yingyingxiaoaq2@163.com

establishment of the propofol anesthesia thoracotomy exploration model. In miR-NC and miR-214 groups, miR-NC-agomir or miR-214-agomir, respectively, were injected into hippocampus before anesthesia. Expression of mTORC1 in the hippocampus was detected by immunofluorescence, apoptosis was detected by TUNEL staining, and expression of miR-214 in hippocampus was analyzed by RT-qPCR. HT22 hippocampal neurons were transfected with an miR-214 inhibitor and mTORC1 inhibitor, and then exposed to propofol. Flow cytometry was used to analyze cell survival, whereas Western blot was used to analyze protein expression of TEFB and C-caspase3. **Results** Compared with the NS group, miR-214 in the hippocampus of the model group was significantly downregulated ($P < 0.05$) and apoptosis of hippocampal neurons was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, apoptosis of hippocampal neurons in the miR-214 group was decreased ($P < 0.05$). Bioinformatics prediction indicated the presence of a specific binding site between mTORC1 and miR-214. Compared with the NS group, expression of mTORC1 was increased in the model group ($P < 0.05$), and miR-214 treatment significantly reduced expression of mTORC1 ($P < 0.05$). In addition, compared with the NC group, si-mTORC1 transfection significantly reduced the apoptosis rate of HT22 hippocampal neurons exposed to propofol ($P < 0.05$), increased TFEF expression ($P < 0.01$), and decreased cleaved caspase 3 ($P < 0.05$). miR-214 inhibitor transfection significantly reversed the protective effect of si-mTORC1 and changes of TFEF and C-caspase3 protein expression induced by si-mTORC1 ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-214 attenuates propofol neurotoxicity through the mTORC1-TFEF pathway and improves the survival rate of neurons.

[Keywords] miR-214; propofol; thoracotomy; rat; neuron; mTORC1-TFEF pathway

每年数以百万计的婴儿或儿童在外科手术诊断中接受麻醉剂。然而,麻醉剂会导致包括灵长类和啮齿动物在内的哺乳动物大脑发育中普遍出现神经退行性变^[1]。异丙酚是一种常用于婴儿或儿童全身麻醉药物,尽管其具有短效的优点,但已被证实具有神经毒性,主要导致发育中大脑的神经元死亡^[2-3]。因此,进一步了解异丙酚神经毒性的潜在机制,寻找靶向治疗方法以消除异丙酚等麻醉药的副作用具有重要意义。microRNAs(miRs)是一类短的非编码 RNA 分子,可以与 mRNAs 中的多个序列结合,进一步下调靶基因,其调控作用解除可能导致神经系统疾病^[4]。大约 70% 的已知 miRs 在大脑中特异表达或富集,并在神经系统的功能和发育中发挥关键作用^[5]。前期研究支持异丙酚诱导的 miRs 影响啮齿类动物发育中海马星形胶质细胞的凋亡^[6]。此外,miR-223-3p/TIAL1 相互作用参与了体外右美托咪定对海马神经元细胞的保护作用^[7]。因此,我们推测异丙酚可能通过 miRs 对神经元损伤有一定调节作用。已经发现 miR-214 具有神经保护作用,其上调减轻了异氟醚诱导的神经元细胞的死亡脆弱性^[8]。此外,miR-214 的表观遗传减少上调星形胶质细胞集落刺激因子-1,并参与神经损伤引起的神经病理性疼痛^[9]。异丙酚对发育中大脑的神经毒性影响尚不完全清楚。在本研究中,我们假设 miR-214 上调可以抑制异丙酚麻醉开腹探查诱导的神经元损伤,并试图探索 miR-214 对神经元损伤保护作用的潜在生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体动物(specific pathogen free animal,SPF)7 日龄(P7)SD 雄性大鼠(体重 10~15 g)60 只,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],喂养于重庆医科大学实验动物中心[SYXK(渝)2018-0003],给予充足饲料和自由饮水,环境温度(22 ± 1)℃,湿度 50%左右,控制光照时间 7:00~19:00。动物实验经乐山市人民医院动物实验伦理委员会审核批准(KLLY-2019-023),并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗鼠 Akt 购自美国 Abcam 公司;mTORC1、TEFB、C-caspase3 和 GAPDH 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;FITC/TRITC 共轭二级抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;4',6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI),青霉素和链霉素,脂质体 2000 转染试剂购自美国 Sigma 公司;原位细胞死亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司;TRIzol 一步法购自美国 Invitrogen 公司;GoTaq qPCR Master Mix 购自美国 Promega 公司;DMEM/F-12 培养基购自美国 Gibco 公司;HT22 海马神经元细胞购自江苏 Bena Culture Collection 公司;miR-214 抑制剂和 mTORC1 抑制剂均购自上海吉玛制药技术有限公司;双氰胺蛋白测定法购自上海 Biotype 公司;增强化学发光试剂(ECL)购自美国 Pierce 公司;Annexin

V-FITC/碘化丙啶凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

H-500 透射电镜购自日本 Olympus Optical 公司; ECLIPSE Ti 显微镜购自日本 Nikon 公司; ABI7900HT 实时 PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将动物随机分为 4 组(每组 15 只):生理盐水组(NS),异丙酚麻醉开腹探查组(Model),异丙酚麻醉开腹探查+miR-NC-agomir 组(miR-NC),异丙酚麻醉开腹探查+miR-214-agomir 组(miR-214)。除 NS 组外,其余组腹腔注射 50 mg/kg 异丙酚,待翻正反射恢复(40~60 min)后,再注射 50 mg/kg 的异丙酚,维持麻醉 2 h。麻醉中,大鼠取仰卧位,常规消毒后,上腹部切口 3 cm,开胸后依次探查肝、胃、胰、脾、肾,探查时间 15 min,整个手术 1 h。miR-NC 组和 miR-214 组在异丙酚麻醉前 48 h 将 miR-NC-agomir 或 miR-214-agomir(20 nmol/L,广州锐博生物技术有限公司)注射到海马内。各组大鼠清醒 2 h 后取海马进行后续实验,每组 5 只进行透射电镜观察,5 只进行免疫组化和末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)染色,5 只用于 RNA 提取。

1.3.2 透射电镜

大鼠用 3%戊巴比妥钠溶液麻醉,然后分别用生理盐水、2%多聚甲醛和 2.5%戊二醛灌注。随后,切断大鼠的大脑,分离海马,将海马的 CA1 区组织(1 mm³)在 4℃ 用 2.5%戊二醛固定 2 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,用锇酸固定,用乙醇和丙酮脱水,用 Epon618 环氧树脂和 100%丙酮浸泡,最后在 36℃~60℃ 聚合,制备 50 nm 超薄切片。切片用醋酸铀酰和柠檬酸铅双重染色,然后用 H-500 透射电镜观察海马神经元的超微结构。

1.3.3 免疫荧光

免疫荧光法检测海马 mTORC1 的表达^[7]。大鼠用 3%戊巴比妥钠溶液麻醉,然后分别用生理盐水、2%多聚甲醛心内灌注,石蜡包埋切片进行免疫荧光。石蜡切片用 0.2% Tritonx-100 脱蜡渗透。然后将切片室温下与 10%正常山羊血清孵育 30 min,以阻断非特异性结合,然后在 4℃ 下与兔抗鼠 Akt(1:1000)、mTORC1(1:800)孵育过夜,并与

FITC/TRITC 共轭二级抗体(1:100)在室温下孵育 3 h。核染色用 4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)(500 ng/mL)处理 5 min,冲洗后在荧光显微镜下观察。

1.3.4 TUNEL 分析

使用原位细胞死亡检测试剂盒检测海马组织细胞凋亡^[8]。对脑海马切片进行脱蜡和再水化处理 20 min 后,PBS 冲洗 3 次。在暗处加入 TUNEL 反应混合物(TdT:核酸混合物=1:9),37℃ 下孵育 1 h。在室温下用 DAPI 处理切片 7 min。图像通过 ECLIPSE Ti 显微镜获得,并通过 Image J 软件进行分析。在海马 CA1 区随机选取 5 个区域,计算每个切片的 TUNEL 阳性细胞数。凋亡指数以凋亡细胞总数占细胞总数的比例计算。

1.3.5 实时定量 PCR(RT-qPCR)分析

用 TRIzol 一步法提取海马组织总 RNA,并在 0.2 mL 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的 PCR 管中加入 5 μg 样品 RNA、1 μg 随机引物和 DEPC-ddH₂O 至 20 μL,70℃ 变性 5 min,合成 cDNA^[7]。在 ABI7900HT 实时 PCR 系统上使用 GoTaq qPCR Master Mix 进行 RT-qPCR,反应条件为:95℃ 预变性 15 min,95℃ 40 次变性 20 s,60℃ 退火 34 s,2^{-ΔΔCt} 法检测 miR-214 的表达。所有引物均由上海生工生物技术有限公司设计。用于 qPCR 的引物序列如下:miR-214 正向:5'-TGCGCTGGCAGTGTCTTTAGC-3';反向:5'-CCAGTGGGTCCGAGGTA-3';U6 正向:5'-CTCGCTT CGGCAGCACA-3';反向:5'-GTGTCGTGGAGTCGG CAA-3'。

1.3.6 细胞培养与治疗

HT22 海马神经元细胞在含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F-12 培养基中培养^[7]。为确定异丙酚的神经毒性,将细胞暴露于不同浓度(0、20、40、60、80 和 100 μmol/L)异丙酚中孵育。为考察 miR-214 介导 mTORC1 在异丙酚刺激 HT22 海马神经元细胞中的保护作用,将细胞分为:si-NC+异丙酚组(si-NC+propofol)、si-mTORC1+异丙酚组(si-mTORC1+propofol)、si-mTORC1+异丙酚+anti-NC 组(si-mTORC1+propofol+si-NC)和 si-mTORC1+异丙酚+anti-miR-214 组(si-mTORC1+propofol+anti-miR-214)。

1.3.7 细胞转染

HT22 海马神经元细胞,以 5×10⁴ 个/孔接种于 24 孔板。然后用脂质体 2000 转染试剂,分别将

miR-214 抑制剂 (anti-miR-214, 50 nmol/L) 和 mTORC1 抑制剂 (si-mTORC1, 20 nmol/L) 转染入细胞。加入 miR-NC 或空慢病毒载体作为对照。转染 48 h 后, 收集细胞并将细胞暴露于 60 $\mu\text{mol/L}$ 异丙酚中孵育 24 h, 进行以下测定。

1.3.8 蛋白质印迹分析

分析所有实验组的蛋白质水平变化。处理后, 提取蛋白质, 并使用双氰胺酸蛋白质测定法测定。将等量的蛋白质装载到 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 电泳分离后转移到聚偏二氟乙烯膜上。在室温下用含有 0.1% 吐温-20 (TBST) 的 TBS 中的 5% 脱脂乳封闭膜 2 h, 然后将 mTORC1 抗体 (1 : 1000)、TEFB 抗体 (1 : 800)、C-caspase3 (1 : 1000) 和 GAPDH (1 : 1000) 第一抗体与膜在 4℃ 孵育过夜。用 TBST 清洗膜 3 次, 再用二级抗体 (1 : 5000) 在室温下孵育 30 min。最后用增强化学发光试剂 (ECL) 观察免疫反应信号。

1.3.9 流式细胞术分析

使用 Annexin V-FITC/碘化丙啶凋亡试剂盒处理细胞, 然后通过 FACSCalibur 流式细胞仪分析凋亡细胞。每个实验分别进行 3 次。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0。数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间的差异采用 *t* 检验进行评估, 多组间的差异采用单因素方差分析进行比较。重复测量资料采用重复测量的方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-214 在异丙酚麻醉开腹探查模型和细胞模型中表达失调

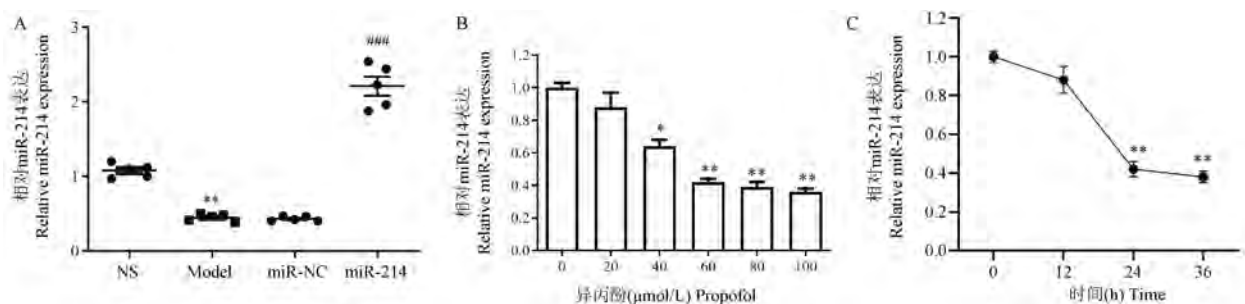
为了证实异丙酚麻醉开腹探查模型中 miR-214 的失调, 我们首先用 RT-qPCR 分析了 NS 组和模型组大鼠脑中 miR-214 的水平。结果发现, 与 NS 组相比, 模型组大鼠海马中 miR-214 明显下调 ($P < 0.01$)。此外, 与 miR-NC 组相比, miR-214 组大鼠海马中 miR-214 明显增加 ($P < 0.001$) (图 1A)。研究进一步使用异丙酚治疗 HT22 海马神经元细胞。在该模型中, 由异丙酚诱导的 miR-214 失调与动物模型的结果一致, 并且由异丙酚以剂量依赖性 (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$, 24 h) 和时间依赖性 (60 $\mu\text{mol/L}$, 0 ~ 36 h) 的方式降低 miR-214 水平 (图 1B、1C)。

2.2 miR-214 减轻异丙酚麻醉开腹探查诱导的神经细胞凋亡

采用透射电镜和 TUNEL 观察神经细胞凋亡情况。结果表明, 与 NS 组比, 模型组诱导海马神经细胞凋亡 ($P < 0.001$), 电镜下可见神经元肿胀、核碎裂。此外, 染色质密度降低, 凋亡小体出现, 突触间隙变宽, 突触后密度变薄。与模型组比, miR-214 组电镜下显示神经元细胞和突触缝隙的变化很细微, 并且海马神经元凋亡减弱 ($P < 0.01$) (图 2、图 3)。

2.3 miR-214 与 mTORC1 结合

为了进一步研究 miR-214 影响异丙酚麻醉开腹探查诱导的神经细胞凋亡的分子机制, 研究使用了



注: A: 大鼠海马组织中 miR-214 的表达; 与 NS 组相比, $**P < 0.01$; 与 miR-NC 组相比, $###P < 0.001$; B: 不同浓度异丙酚刺激下 HT22 细胞中 miR-214 的表达; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; C: 异丙酚不同刺激时间下 HT22 细胞中 miR-214 的表达; 与 0 h 组相比, $**P < 0.01$ 。

图 1 miR-214 在异丙酚麻醉开腹探查模型和细胞模型中表达失调

Note. A, Expression of miR-214 in rat hippocampus. Compared with NS group, $**P < 0.01$. Compared with miR-NC group, $###P < 0.001$. B, Expression of miR-214 in HT22 cells stimulated by different concentrations of propofol. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. C, The miR-214 expression in HT22 cells under different stimulation times of propofol. Compared with 0 h group, $**P < 0.01$.

Figure 1 miR-214 was dysregulated in a propofol-anaesthetized laparotomy model and a cellular model

一些在线靶点预测工具,包括 miRDB、miRanda 和 TargetScan,结果获得了 6 个候选靶基因(图 4A)。其中,mTORC1 已被证实参与神经元凋亡^[9],被选择用于随后的实验(图 4B)。在 mTORC1 的 3' UTR 和 miR-214 的种子序列之间观察到高度保守的配对(图 4C)。接下来,我们用荧光素酶报告分析法精确评估了 miR-214 抑制 mTORC1 的能力。正如预期的那样,用 miR-214 模拟物转染阻止了野生型荧光素酶表达,而突变体未观察到这些作用(图 4D)。此外,通过免疫荧光检测异丙酚麻醉开腹探查模型中 mTORC1 表达,与 NS 组比较,模型组诱导海马神经组织中 mTORC1 表达增加($P<0.05$),miR-214 治疗显著降低了 mTORC1 表达($P<0.05$)(图 5)。这些结果表明 mTORC1 是 miR-214 的直接靶基因。

2.4 miR-214 介导 mTORC1 在异丙酚刺激 HT22 海马神经元细胞中的保护作用

流式细胞术分析显示,si-mTORC1 转染的暴露于异丙酚的 HT22 海马神经元细胞的凋亡率显著低于 NC 对照组,而 miR-214 抑制剂转染显著逆转了 si-mTORC1 的保护作用(图 6)。Western blot 结果显示,si-mTORC1 转染的暴露于异丙酚的 HT22 海

马神经元细胞中 mTORC1 表达水平明显降低($P<0.05$),表明 si-mTORC1 转染的效率很高。与 NC 对照相比,si-mTORC1 转染导致暴露于异丙酚的 HT22 海马神经元细胞中 TFEB 表达显著增加($P<0.01$),以及 C-caspase3 降低($P<0.05$)。而 miR-214 抑制剂转染显著逆转了 si-mTORC1 诱导的 mTORC1、TFEB、C-caspase3 蛋白表达的变化($P<0.05$)(图 7、8)。

3 讨论

已经证实,早期暴露于异丙酚可能与长期学习和记忆损伤相关,并导致发育中大脑中广泛的神经元凋亡^[10]。miRs 已被证实参与神经系统疾病的病理过程^[5]。因此,在本研究中,我们试图探讨 miR-214 在异丙酚神经毒性中的潜在生物学机制以及可能的分子因素。我们发现 miR-214 在异丙酚麻醉开腹探查模型和细胞模型中表达失调。重要的是,miR-214 可以改善海马神经元凋亡。综上所述,这些数据表明 miR-214 在调节异丙酚麻醉开腹探查诱导的海马神经元损伤中的重要作用。

越来越多的证据表明,miRNAs 在调节麻醉剂诱导的神经细胞死亡或神经毒性方面起着重要作用

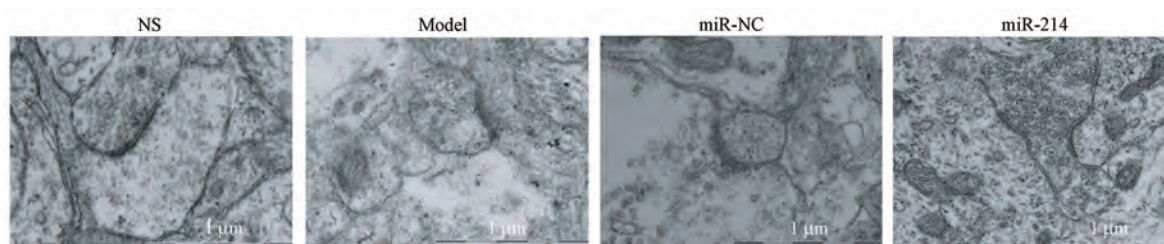
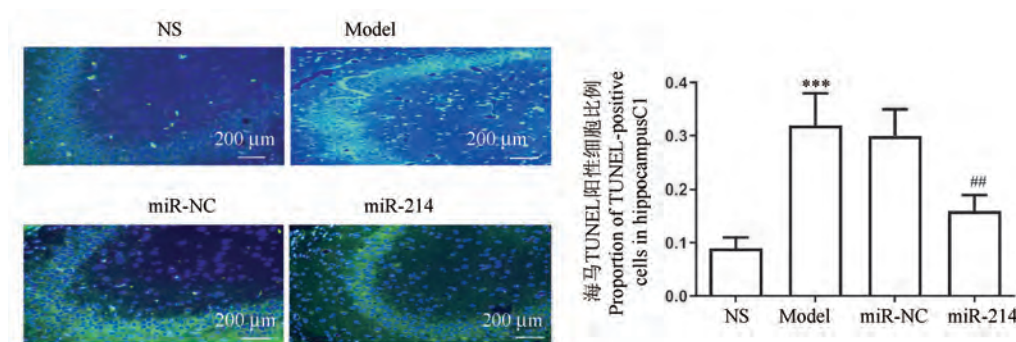


图 2 各组透射电镜扫描的典型图像

Figure 2 Typical images scanned by transmission electron microscopes in each group

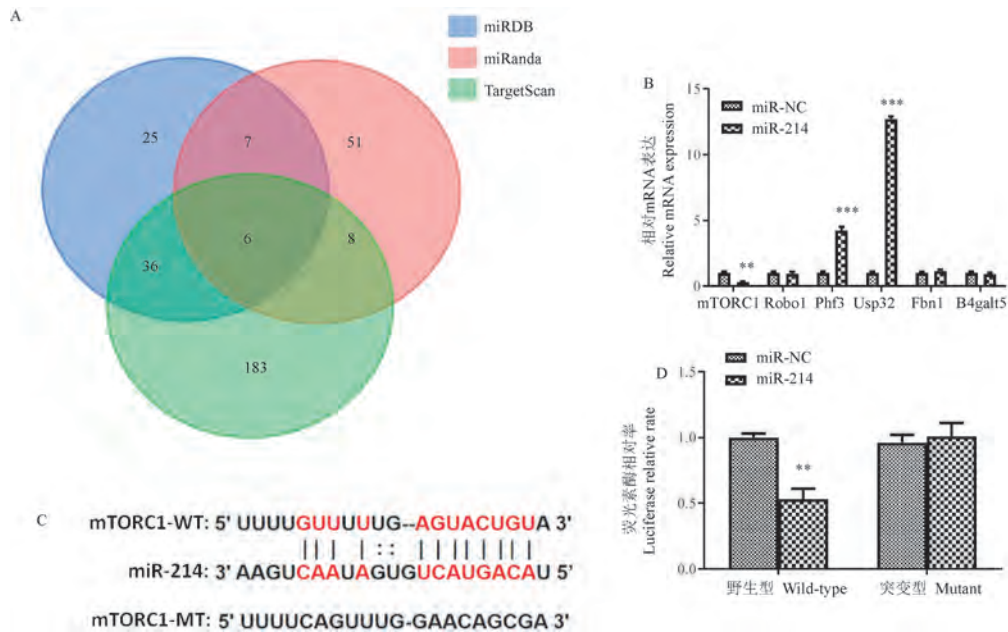


注:绿色染色表示 TUNEL 阳性细胞,蓝色染色表示细胞核。与 NS 组相比,*** $P<0.001$;与 Model 组相比,## $P<0.01$ 。

图 3 各组海马 TUNEL 染色的典型图像及定量分析

Note. Green staining indicates TUNEL positive cells, blue staining indicates cell nuclei. Compared with NS group, *** $P<0.001$. Compared with Model group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Typical images of hippocampus stained with TUNEL and quantitative analysis

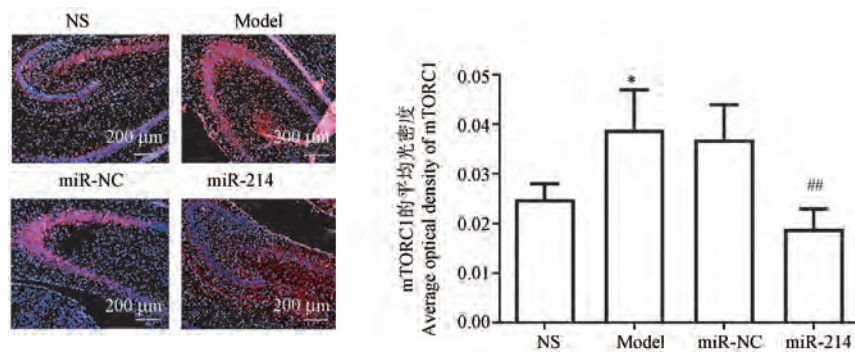


注:A;利用 miRDB、miRanda 和 TargetScan 三种在线预测工具预测 miR-214 的靶基因;B:潜在靶基因的相对 mRNA 水平;C:miR-214 和 mTORC1 之间的靶区;D:用 miR-NC 或 miR-214 模拟物转染 HT22 细胞,检测 mTORC1 3' UTR 荧光素酶活性。与 miR-NC 转染组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 miR-214 与 mTORC1 结合

Note. A, miRDB, miRanda and TargetScan were used to predict the target gene of miR-214. B, The relative mRNA levels of potential target genes. C, The target area between miR-214 and mTORC1. D, Transfection of HT22 cells with miR-NC or miR-214 mimics to detect mTORC1 3' UTR luciferase activity. Compared with miR-NC group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 miR-214 binds to mTORC1



注:红色染色分别表示 mTORC1 蛋白,蓝色染色表示细胞核。与 NS 组相比, * $P < 0.05$;与 Model 组相比, ## $P < 0.01$ 。

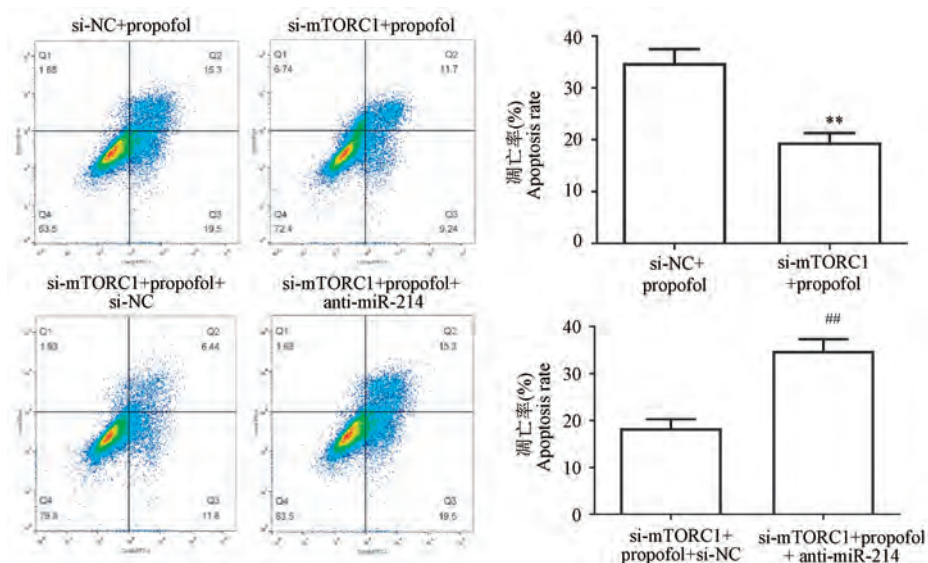
图 5 mTORC1 表达的免疫荧光图及定量分析

Note. Red staining indicates mTORC1 protein, and blue staining indicates cell nucleus. Compared with NS group, * $P < 0.05$. Compared with Model group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Immunofluorescence of mTORC1 expression and quantitative analysis

用^[11]。例如,研究发现 miR-132^[12]在调节布比卡因诱导的神经毒性中起重要作用。此外,氯胺酮上调海马 miR-34a 表达,慢病毒抑制 miR-34a 通过成纤维细胞生长因子受体 1 (FGFR1) 保护氯胺酮诱导的海马细胞凋亡和记忆损伤^[13]。氯胺酮诱导的 miR-375 上调和慢病毒介导的 miR-375 下调通过上调人脑源性神经营养因子 (BDNF) 改善了氯胺酮诱导的

神经细胞死亡和人类胚胎干细胞源性神经元的神经毒性^[14]。在目前的研究中,我们证明在异丙酚麻醉开腹探查模型中,大鼠海马中 miR-214 明显下调,并且在使用异丙酚治疗的 HT22 海马神经元细胞中,由异丙酚诱导的 miR-214 失调与动物模型的结果一致。异丙酚麻醉开腹探查模型和细胞模型中表达失调,这与前期研究一致^[8]。Wu 等^[8]研究发

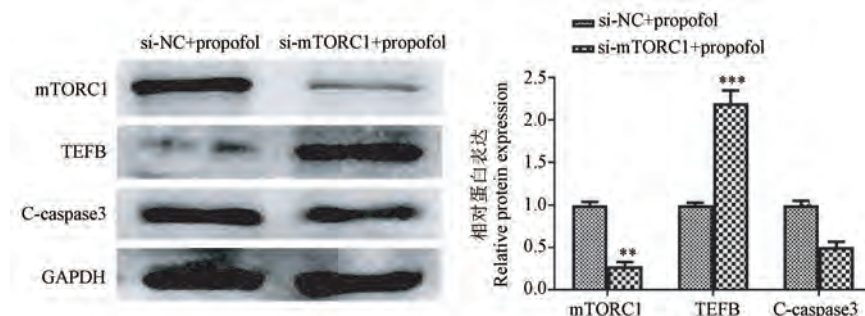


注:与 si-NC+异丙酚组相比, ** $P < 0.01$;与 si-mTORC1+异丙酚+si-NC 组相比, ### $P < 0.01$ 。

图 6 流式细胞术分析 HT22 海马神经元细胞凋亡

Note. Compared with si-NC+propofol group, ** $P < 0.01$. Compared with si-mTORC1+propofol+si-NC group, ### $P < 0.01$.

Figure 6 Flow cytometry analysis of apoptosis in HT22 hippocampal neurons

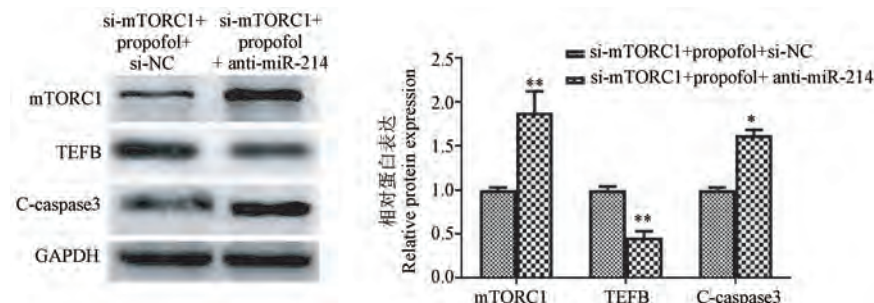


注:与 si-NC+异丙酚组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 Western blot 分析 si-mTORC1 对暴露于异丙酚的 HT22 海马神经元细胞中 mTORC1、TEFB、C-caspase3 蛋白表达影响及定量分析

Note. Compared with si-NC+propofol group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 7 Effect of si-mTORC1 on the expression of mTORC1, TEFB, C-caspase3 proteins in HT22 hippocampal neurons exposed to propofol was analyzed by Western blot



注:与 si-mTORC1+异丙酚+si-NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 8 HT22 海马神经元细胞中 mTORC1、TEFB、C-caspase3 蛋白表达。

Note. Compared with si-mTORC1+propofol+si-NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 8 Expression of mTORC1, TEFB, C-caspase3 proteins in HT22 hippocampal neurons

现,异氟醚通过抑制 miR-214 的表达增加了神经元细胞的死亡,而 miR-214 过表达显著抑制异氟醚诱导的 SH-SY5Y 细胞活力降低、LDH 释放、凋亡和氧化应激,提示 miR-214 对异氟醚诱导的 SH-SY5Y 细胞神经毒性具有神经保护作用。此外,前期研究表明,miR-214 通过抑制激活转录因子 4 和 zeste 2 多梳抑制复合物 2 亚单位增强子的表达来保护红细胞免受氧化应激^[15]。Yang 等^[16]报道,miR-214 通过激活雷帕霉素(mTOR)途径的 Akt/哺乳动物靶点,在糖尿病肾病中对氧化应激具有保护作用。因此,上述结果证实 miR-214 下调与异丙酚引起的神经毒性有关。

众所周知,miRNAs 通过下调靶基因来发挥其生物学功能。为了进一步了解 miR-214 作用于异丙酚引起的神经毒性的机制,我们使用了几种在线预测工具,如 TargetScan、miRDB 和 miRanda,确定了雷帕霉素复合物 1(mTORC1)为 miR-214 的新靶点,荧光素酶报告分析进一步证实了这种靶点。mTORC1 是 mTOR 蛋白超家族的一员,其在协调能量、生长信号与细胞生长、分裂中发挥重要作用,并对多种胁迫作出反应。mTORC1 信号通路的失调导致癌症、代谢疾病和糖尿病^[17]。最近研究发现,mTORC1 过表达抑制缺血再灌注损伤神经元自噬相关 mRNA 翻译,诱导神经元损伤^[18]。此外,还有研究发现,慢性 mTORC1 抑制可挽救小鼠因神经元 Depdc5 丢失导致的行为和生化缺陷^[19]。故本研究选择 mTORC1 作为 miR-214 调控异丙酚引起的神经细胞凋亡中的靶标,结果显示,miR-214 治疗显著降低了异丙酚麻醉开腹探查大鼠海马中 mTORC1 表达。此外,si-mTORC1 转染对暴露于异丙酚的 HT22 海马神经元细胞存活具有有利影响。研究还发现 miR-214 抑制剂消除了 si-mTORC1 对异丙酚诱导的 HT22 海马神经元细胞的保护作用。因此,mTORC1 可能是 miR-214 的下游效应物。值得注意的是,本研究发现 si-mTORC1 转染的 HT22 海马神经元细胞中 TFEB 蛋白表达显著增加。TFEB 是转录因子的螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链转录因子家族的一员,其受到 mTORC1 机制靶点的负调控,这是限制自噬诱导的主要已知因素^[20]。mTORC1 的抑制导致 TFEB 的激活;最近发现,TFEB 的激活对于阿尔茨海默病和神经退行性疾病的治疗均产生有益影响^[21]。因此,miR-214 可能通过 mTORC1-TFEB 通路保护异丙酚麻醉开腹探查诱导的神经元损伤。

综上所述,本研究发现异丙酚暴露可导致神经元损伤。miR-214 预处理可通过 mTORC1-TFEB 通路减轻异丙酚神经毒性,提高神经元的存活率。我们的发现可能为开发新的预防异丙酚诱导的神经损伤的治疗方法和临床麻醉管理提供新的见解。

参考文献:

- [1] 王加仑,廉海光,林凤颜,等. 新生小鼠七氟醚暴露对其青春记忆及突触可塑性的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 513-517.
- [2] 唐楠,杜平均,夏丰娜,等. 超声引导下甲磺酸罗哌卡因腹横肌平面阻滞联合异丙酚静脉镇静麻醉在幼儿下腹部手术与术后镇痛中的应用[J]. 实用疼痛学杂志, 2019, 15(3): 219-225.
- [3] 常成,彭丽佳,罗靖,等. 丙泊酚麻醉对新生大鼠海马神经元自噬的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(6): 669-671.
- [4] 徐畅,牛姣姣,周俊飞,等. 微小 RNA-96 通过抑制胰岛素样生长因子 1 受体调控七氟醚诱导新生大鼠认知功能障碍[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(2): 265-267.
- [5] Sun ZZ, Lv ZY, Tian WJ, et al. MicroRNA-132 protects hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2017, 30(3): 253-263.
- [6] Hao W, Zhao ZH, Meng QT, et al. Propofol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury via miR-133a-5p regulating the expression of MAPK6[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(5): 495-504.
- [7] Wang Q, Yu H, Yu H, et al. miR-223-3p/TIAL1 interaction is involved in the mechanisms associated with the neuroprotective effects of dexmedetomidine on hippocampal neuronal cells in vitro[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 805-812.
- [8] Wu Q, Shang Y, Shen T, et al. Neuroprotection of miR-214 against isoflurane-induced neurotoxicity involves the PTEN/PI3K/Akt pathway in human neuroblastoma cell line SH-SY₅Y[J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 678: 108181.
- [9] Liu L, Xu D, Wang T, et al. Epigenetic reduction of miR-214-3p upregulates astrocytic colony-stimulating factor-1 and contributes to neuropathic pain induced by nerve injury[J]. Pain, 2020, 161(1): 96-108.
- [10] 黄海娟,陆辉. 丙泊酚镇静对大鼠认知功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(11): 1552-1554.
- [11] 许奎斌,赵洪伟. MicroRNAs 在各种麻醉剂诱导的神经毒性中作用的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2020, 43(2): 151-155.
- [12] Guan L, Li T, Jiang J. Bupivacaine-induced neurotoxicity is modulated by epigenetic axis of long noncoding RNA SNHG16 and Hsa-miR-132-3p[J]. Neurotox Res, 2020, 38(1): 175-183.

(下转第 81 页)

李丽红,李欣,李硕,等. PGC-1 α 在槲皮素通过雌激素样作用减轻 FFA 诱导肝细胞脂肪变性中的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 47-54.

Li LH, Li X, Li S, et al. Quercetin protects against free fatty acid-induced hepatocyte steatosis by an estrogen-like effect involving PGC-1 α [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 47-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.007

PGC-1 α 在槲皮素通过雌激素样作用减轻 FFA 诱导肝细胞脂肪变性中的机制

李丽红^{1,2}, 李欣¹, 李硕¹, 杨艳萍¹, 郭建红^{1*}

(1.山西医科大学病理生理学教研室,肝病研究所,太原 030001;2.临汾职业技术学院医学系,山西 临汾 041000)

【摘要】 目的 探讨槲皮素(quercetin, Que)对游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)诱导肝细胞脂肪变性的雌激素样保护作用及机制。方法 CCK-8 法检测细胞活力,油红 O 染色观察脂质蓄积,雌激素以不同方式干预 HepG2 细胞,确定药物最佳干预方式为后处理方式。以后处理方式将 HepG2 细胞暴露于不同浓度的雌激素和槲皮素,确定药物最佳干预浓度。细胞随机分为 4 组:对照组(Control)、模型组(FFA)、阳性药雌激素对照组(E2)和槲皮素组(Que)。GPO-PAP 法测定甘油三酯(triglyceride, TG)含量;DCFH-DA 法检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)蛋白含量;实时定量 PCR(Real-time PCR)检测肝细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、过氧化物酶体增殖剂激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、肉碱棕榈酰转移酶 1 α (carnitine palmitoyl transferase 1 α , CPT1 α)和乙酰辅酶 A 羧化酶 1(acetyl-CoA carboxylase, ACOX1)mRNA 表达。结果 确定 1 μ mol/L 雌激素和 30 μ mol/L 槲皮素后处理用于后续实验。与对照组相比,模型组红色脂滴显著增多、TG 含量明显增加($P<0.001$),PGC-1 α 、PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 mRNA 的表达均下降($P<0.05$),ROS 水平升高,TNF- α 蛋白含量增多($P<0.01$);与模型组相比,雌激素组和槲皮素组均可明显降低红色脂滴和 ROS 水平,雌激素组($P<0.05$)和槲皮素组($P<0.05$)均使 TG 含量降低,雌激素组($P<0.001$)和槲皮素组($P<0.01$)均使 PGC-1 α 的表达明显上调,雌激素组($P<0.001$)和槲皮素组($P<0.01$)使 TNF- α 蛋白含量均明显减少,并显著上调 PPAR α ($P<0.01$)、CPT1 α ($P<0.001$)和 ACOX1($P<0.001$)的表达水平。槲皮素组与雌激素组相比,上述指标差异均无统计学意义。结论 槲皮素通过诱导 PGC-1 α 表达,激活脂肪酸 β 氧化、减轻氧化应激以及抑制炎症反应,发挥雌激素样作用,最终改善肝细胞脂肪变性。

【关键词】 槲皮素;脂肪变性;雌激素样作用;PGC-1 α ;脂肪酸 β 氧化;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0047-08

Quercetin protects against free fatty acid-induced hepatocyte steatosis by an estrogen-like effect involving PGC-1 α

LI Lihong^{1,2}, LI Xin¹, LI Shuo¹, YANG Yanping¹, GUO Jianhong^{1*}

(1. Department of Pathophysiology, Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. Department of Medicine, Linfen Vocational and Technical College, Linfen 041000)

【基金项目】山西中医药大学“肝炎性疾病中西医结合基础研究创新团队”资助项目(2018TD-016);山西省研究生教育改革研究课题(2020YJJG136)。

【作者简介】李丽红(1983—),女,硕士研究生,研究方向:肝病理生理与相关疾病。E-mail: 251645189@qq.com

【通信作者】郭建红(1968—),女,教授,硕士生导师,研究方向:肝病理生理与相关疾病。E-mail: sgs7551@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the estrogen-like protective effect and mechanism of quercetin on free fatty acids (FFA)-induced hepatocyte steatosis. **Methods** Cell viability was detected by CCK-8 assay, and lipid accumulation in hepatocytes was observed by Oil Red O staining. Following administration of various estrogen intervention paradigms to HepG2 cells, the optimal drug intervention was determined to be post-treatment. HepG2 cells were exposed to different concentrations of estrogen and quercetin in a post-treatment manner to determine the optimal concentration of drug intervention. Cells were randomly divided into four groups: Control, model (FFA), positive drug estrogen control (E2), and quercetin (Que). Triglyceride (TG) levels were determined using the glycerol phosphate oxidase peroxidase (GPO-PAP) method. Reactive oxygen species (ROS) levels were detected using DCFH-DA. Protein contents of tumor necrosis factor α (TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), carnitine palmitoyl transferase 1 α (CPT1 α), and acetyl-CoA carboxylase (ACOX1) were measured by Real-time PCR. **Results** It was determined that 1 $\mu\text{mol/L}$ estrogen and 30 $\mu\text{mol/L}$ quercetin post-treatment of HepG2 cells was optimal for subsequent experiments. Compared with the control group, numbers of red lipid droplets and TG contents were significantly increased ($P < 0.001$); expression levels of PGC-1 α , PPAR α , CPT1 α and ACOX1 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$); ROS levels were increased; and TNF- α protein levels were significantly increased ($P < 0.01$) in the FFA group. Compared with the FFA group, both the estrogen and quercetin group displayed significantly reduced levels of red lipid droplets and ROS. Moreover, both the estrogen group ($P < 0.05$) and quercetin group ($P < 0.05$) exhibited significantly decreased TG contents, and both the estrogen group ($P < 0.001$) and quercetin group ($P < 0.01$) exhibited significantly upregulated expression of PGC-1 α . In addition, both the estrogen group ($P < 0.001$) and quercetin group ($P < 0.01$) displayed significantly decreased TNF- α protein contents and significantly upregulated expression levels of PPAR α ($P < 0.01$), CPT1 α ($P < 0.001$), and ACOX1 ($P < 0.001$). There was no significant difference in the above indicators between the quercetin group and estrogen group. **Conclusions** Quercetin exerts an estrogen-like effect by inducing expression of PGC-1 α , activating fatty acid β oxidation, reducing oxidative stress, and inhibiting inflammatory response, ultimately improving hepatic steatosis.

【Keywords】 quercetin; steatosis; estrogen-like effects; PGC-1 α ; fatty acid β oxidation; oxidative stress

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是指在没有大量饮酒或任何继发性原因的情况下, 肝出现过度的脂质蓄积, TG 是主要的脂质储存形式^[1-2]。随着超重、肥胖和糖尿病的流行, 近来, 国际专家小组将 NAFLD 重新命名为代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD)^[3]。重要的是, 绝经后女性 NAFLD 的患病率持续增加且肝纤维化程度和/或肝癌的进展率更高^[2]。我们在前期的实验中发现小鼠去除卵巢后 24 周, 可发生肝脂肪变性, 且腹股沟皮下脂肪、腹膜后脂肪组织增多^[4]。目前, 临床针对该疾病激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT) 是最直接、有效的方式, 但使用 HRT 可能会增加冠状动脉、中风等疾病风险^[5], 因此, 有必要寻求新的药物治疗绝经后女性 NAFLD。

NAFLD 的经典发病机制是“二次打击”学说, 一次打击是胰岛素抵抗致肝细胞脂质过度蓄积, 二次打击是过量的脂质引发氧化应激, 进一步导致肝细胞炎症反应, 最终加速肝细胞坏死和纤维化^[6]。随

着研究结果不断丰富, 目前“多重打击”的发病机制更盛行。虽然其涉及的致病因素广泛, 但脂质积累、氧化应激和炎症反应仍是 NAFLD 主要的发病机制^[7]。肝 PGC-1 α 在 NAFLD 发病机制起着至关重要的作用^[8], 作为一种核转录共激活因子, 它不仅可通过诱导肝 PPAR α 的表达激活脂肪酸 β 氧化以减少肝细胞脂质积累, 而且可根据能量需求控制抗氧化酶基因的表达以消除氧化应激。此外, PGC-1 α 可通过抑制 NF- κ B 降低炎症反应^[9-11]。

先前研究表明, 雌性小鼠在高脂饮食条件下可增加脂肪酸氧化基因 PPAR α 的表达。同时, 雌性小鼠一方面可上调 PGC-1 α 表达来增加抗氧化酶基因水平而减轻氧化应激损伤, 另一方面, 还可降低肝炎症因子水平的表达^[1,12]。槲皮素是一种低毒性、副作用少的天然植物化学物质, 其在改善肝脂质积累方面具有很强的潜力, 甚至被称为植物性的雌激素^[13]。然而, 槲皮素是否有类似雌激素的机制通路抵抗 NAFLD 发生, 尚不清楚。本实验以 PGC-1 α 为突破点, 基于前期的在体实验^[4], 在体外肝细胞脂肪变性模型中, 比较槲皮素和雌激素对脂肪酸

氧化基因表达、ROS 和 TNF- α 的影响,探讨其中可能涉及的类似保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人 HepG2 细胞株购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

槲皮素(北京索莱宝科技有限公司,Q8010);雌二醇(MCE 公司, HY-B0141);油酸钠(S30245)和棕榈酸钠(S31807),均购自上海源叶生物有限公司;胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,11011-8611);DMEM 高糖培养基(SC102-01),购自赛文创新(北京)生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(MCE 公司, HY-K0301-500T);油红 O 染色液(G1260)和苏木素染色液(G1120),均购自北京索莱宝科技有限公司;TG 测试盒(南京建成生物工程研究所,A110-1-1);BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,AR0146);ROS 检测试剂盒(大连美伦生物技术有限公司,MA0210);人 TNF- α ELISA 试剂盒(Bioswamp 公司, HM10001);总 RNA 提取试剂(MF034-01)、逆转录试剂盒(MF166-01)和 Real-time PCR 试剂盒(MF013-05),均购自北京聚合美生物科技有限公司。细胞培养箱、低温超速离心机 and 分光光度计(Eppendorf 公司,德国);IX71 荧光显微镜(OLYMPUS 公司,日本);全波长酶标仪(Molecular Devices 公司, SpectraMax190, 美国);普通 PCR 仪(Bio-Rad 公司, T100™ Thermal Cycler, 美国);荧光定量 PCR 仪(STRATAGENE 公司, MX3005P, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HepG2 细胞采用 DMEM 高糖完全培养基(含 1%青霉素/链霉素和 10%胎牛血清),于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱传代培养。

1.3.2 细胞分组

细胞分为 4 组:对照组(Control)、模型组(FFA)、阳性药雌激素对照组(E2)和槲皮素组(Que)。(1)Control 组用正常培养基培养;(2)FFA 组用 1 mmol/L 混合 FFA 溶液(油酸:棕榈酸=2:1)干预 24 h;(3)以 100 nmol/L 雌激素预处理(E2/FFA)、联合处理(FFA+E2)和后处理(FFA/E2)确定药物最佳干预方式为后处理方式。E2/FFA:100 nmol/L E2 预处理 24 h+FFA 干预 24 h;FFA+E2:

100 nmol/L E2 和 FFA 同时处理 24 h;FFA/E2:FFA 干预 24 h +100 nmol/L 雌激素后处理 24 h。(4)分别以 100 nmol/L、1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 雌激素后处理(FFA/E2 100 nmol/L、FFA/E2 1 μ mol/L 和 FFA/E2 10 μ mol/L)以及(10、20 和 30) μ mol/L 槲皮素后处理(FFA/Que10、FFA/Que20 和 FFA/Que30)确定药物最佳干预浓度。按以上分组情况加入相应的培养液培养 48 h 后检测各项指标。在细胞处理(从造模到雌激素、槲皮素干预结束)48 h 后,ROS 再行 DCFH-DA 荧光孵育 30 min 后检测,其它指标直接按相应的实验方法检测。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力

HepG2 细胞以每升 8×10^7 个密度接种到 96 孔板,培养 24 h,吸出培养基,加入不同浓度的 E2 溶液 100 μ L 培养 24 h,再加入 CCK-8 试剂 10 μ L 培养 1 h,酶标仪于 450 nm 处测吸光度值。同法检测不同浓度的 Que 溶液吸光度值。

1.3.4 油红 O 染色观察脂质蓄积

细胞处理后,吸出培养基,PBS 洗涤,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤,加入油红 O 工作液染色 15 min,PBS 洗涤,加入苏木素染核 1 min,PBS 洗涤,显微镜下观察拍照。

1.3.5 GPO-PAP 法测定 TG 含量

细胞处理后,收集到 1.5 mL 离心管,每离心管加入 200 μ L 裂解液,冰上静置 40 min。裂解液直接按照 TG 测试盒说明书操作测 TG 含量,余下裂解液离心后取上清,遵循 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测蛋白浓度以校正 TG 含量。

1.3.6 DCFH-DA 法检测 ROS 水平

细胞处理后,PBS 洗涤,加入 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 荧光探针孵育 30 min,PBS 洗涤,荧光显微镜下观察拍照。

1.3.7 ELISA 测定 TNF- α 含量

细胞处理后,细胞培养液收集到 1.5 mL 离心管,于 4℃,1500 r/min 离心 10 min,取上清,遵循 ELISA 试剂盒说明书测 TNF- α 蛋白含量。

1.3.8 Real-time PCR 检测目的基因表达水平

细胞处理后,使用总 RNA 提取试剂提取细胞总 RNA,分光光度计测 RNA 浓度,逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,按照 Real-time PCR 试剂盒配制 20 μ L PCR 反应体系于荧光定量 PCR 仪扩增。PCR 反应体系:Template DNA, 2 μ L;2X Realtime PCR Super mix, 10 μ L;Primer 1 (10 μ mol/L), 0.5 μ L;Primer 2 (10 μ mol/L), 0.5 μ L;DEPC 水, 7 μ L。

PCR 反应条件:预变性 95℃,30 s,1 个循环;PCR 反应 95℃,15 s,60℃,15 s,72℃,30 s,40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.9 图像采集与制图

采用 OLYMPUS 光学显微照相系统采集油红 O 染色和免疫荧光染色,使用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制统计图。

1.4 统计学方法

数据使用 SPSS 23.0 进行统计分析,实验数据均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 确定药物最佳干预方式与最佳干预浓度

CCK-8 结果表明,0~10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的雌激素与 0~30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的槲皮素均不会损害细胞活力,其中 100 nmol/L 雌激素细胞活力最高($P<$

0.0001),见图 1,所以选择 100 nmol/L 雌激素确定药物最佳干预方式。与 FFA 组相比,药物后处理方式红色脂滴最少(图 2A),因此以后处理方式确定药物最佳干预浓度。与 FFA 组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素后处理红色脂滴均明显减少(图 2B),结合 1 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素使细胞活力明显提高($P<0.001$)。因而,采用 1 $\mu\text{mol/L}$ 雌激素后处理用于后续实验。与 FFA 组相比,30 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素后处理红色脂滴最少(图 2C)。因而,采用 30 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素后处理用于后续实验。

2.2 槲皮素改善 HepG2 细胞脂肪变性

采用油红 O 染色观察肝细胞脂质蓄积。与对照组相比,模型组红色脂滴显著增多;而与模型组相比,雌激素组和槲皮素组均使红色脂滴明显减少,见图 3。

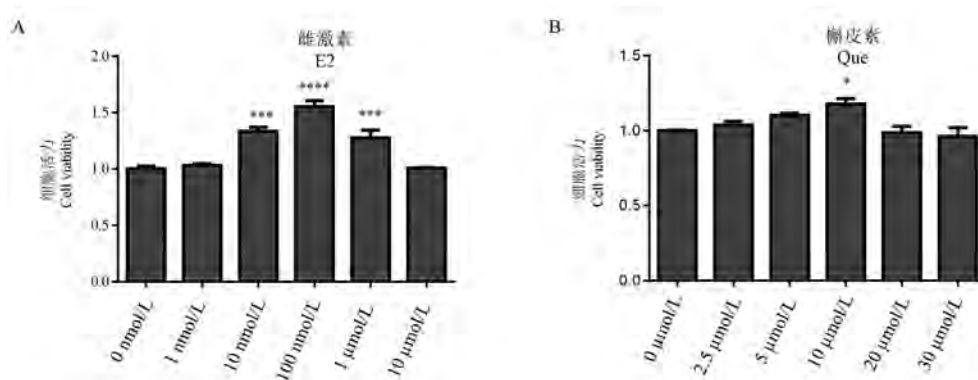
2.3 槲皮素降低 HepG2 细胞 TG 含量

肝细胞 TG 含量可反映肝细胞脂质积累的程度。与对照组相比,模型组肝细胞 TG 含量明显增加($P<0.001$);而与模型组相比,雌激素组($P<$

表 1 实时定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequence for Real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度(bp) Product length
GAPDH	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R:TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138
PGC-1 α	F:CACTCCTCCTCATAAAGCCAAC R:GGACTTGCTGAGTTGTGCATA	190
PPAR α	F:GATATGGAGACACTGTGTATGGCTGAG R:ACCTCCGCCTCCTGTCTCTGG	83
CPT1 α	F:TCTACCATGATGGGCGGCTGCT R:CGTCTGGGCTCGTGCGACATT	663
ACOX1	F:ACTCGCAGCCAGCGTTATG R:AGGTCAGCGATGCCAAAC	84



注:与 0 nmol/L 雌激素组比, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与 0 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素组比, * $P<0.05$ 。

图 1 不同浓度雌激素和槲皮素处理 HepG2 细胞的细胞活力

Note. Compared with the 0 nmol/L E2 group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ Que group, * $P<0.05$.

Figure 1 Cell viability of HepG2 cells treated with different concentrations of estrogen and quercetin

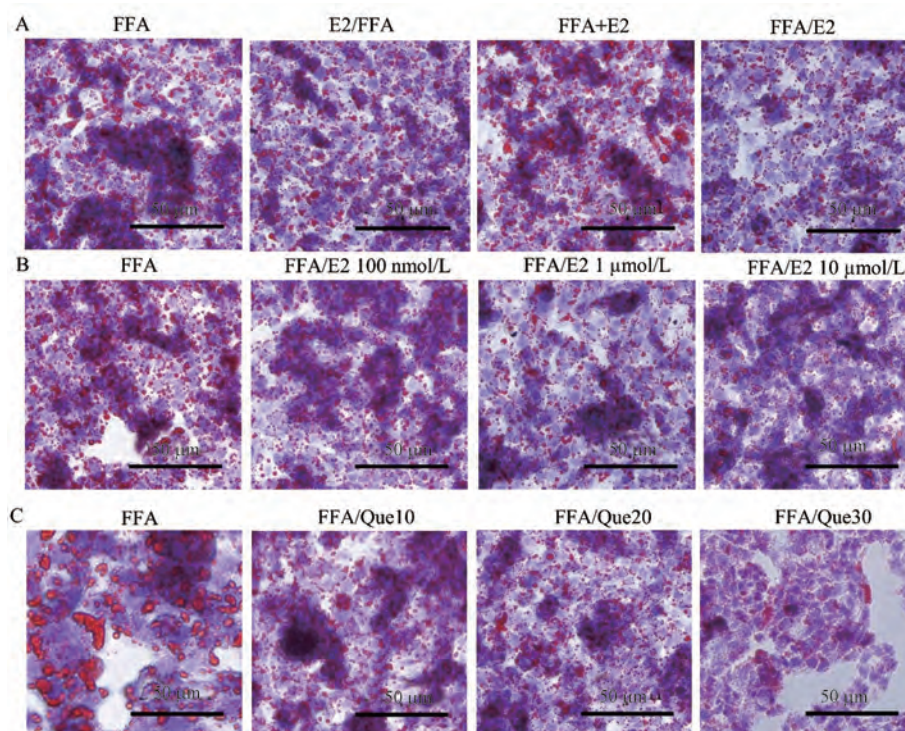
0.05)和槲皮素组($P<0.05$)使肝细胞 TG 含量均降低了;槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义,见图 4。

2.4 槲皮素上调 HepG2 细胞 PGC-1 α 表达

PGC-1 α 在调节脂肪酸 β 氧化功能、氧化应激和炎症反应方面起着关键作用,采用 Real-time PCR 检测 PGC-1 α mRNA 表达。与对照组相比,模型组 PGC-1 α mRNA 的表达下降($P<0.05$);而与模型组相比,雌激素组($P<0.001$)和槲皮素组($P<0.01$)使 PGC-1 α 的表达均明显上调;槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义,见图 5。

2.5 槲皮素激活 HepG2 细胞脂肪酸 β 氧化功能

PPAR α 是脂肪酸氧化代谢的主要调节因子,其下游靶基因 CPT1 α 和 ACOX1 分别可反映线粒体和过氧化物酶体脂肪酸 β 氧化功能,采用 Real-time PCR 检测 PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 mRNA 表达。与对照组相比,模型组 PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 mRNA 的表达均下降($P<0.05$);与模型组相比,雌激素组和槲皮素组均可使 PPAR α ($P<0.01$)、CPT1 α ($P<0.001$)和 ACOX1 ($P<0.001$)的表达显著上调;槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义,见图 6。



注:A:不同处理的雌激素对 HepG2 细胞脂滴的影响;B:不同浓度的雌激素对 HepG2 细胞脂滴的影响;C:不同浓度的槲皮素对 HepG2 细胞脂滴的影响。

图 2 雌激素和槲皮素对 HepG2 细胞脂滴的影响

Note. A, Effect of different treatments of estrogen on lipid droplets in HepG2 cells. B, Effect of different concentrations of estrogen on lipid droplets in HepG2 cells. C, Effect of different concentrations of quercetin on lipid droplets in HepG2 cells.

Figure 2 Effect of estrogen and quercetin on lipid droplets in HepG2 cells

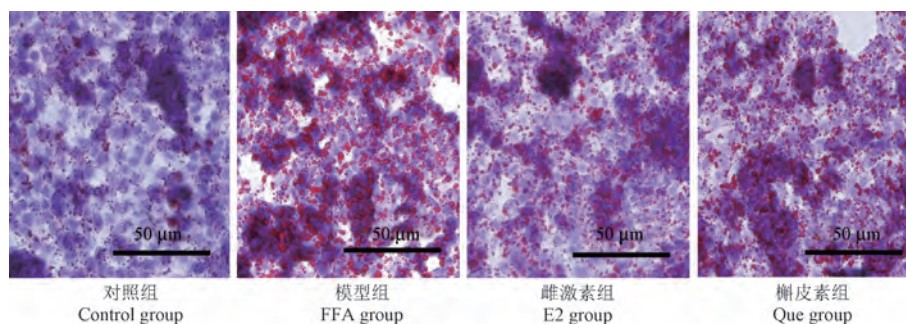


图 3 油红 O 染色 HepG2 细胞脂滴变化

Figure 3 Lipid droplet changes in HepG2 cells by oil red O staining

2.6 槲皮素减轻 HepG2 细胞氧化应激

细胞内 ROS 水平可反映细胞的氧化应激程度,DCFH-DA 孵育后采用荧光显微镜观察肝细胞 ROS 荧光强度变化。与对照组相比,模型组 ROS 绿色荧光信号明显增强;而与模型组相比,雌激素组和槲皮素组 ROS 绿色荧光信号均减弱,见图 7。

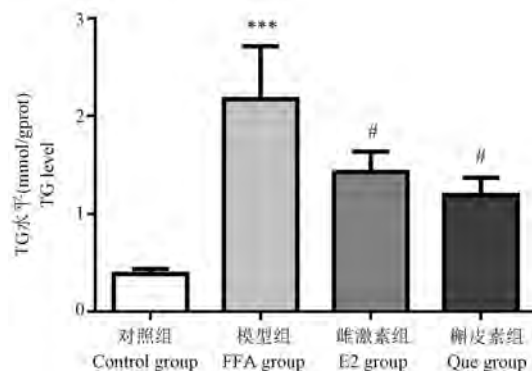
2.7 槲皮素抑制 HepG2 细胞炎症反应

TNF- α 是 NAFLD 发生发展中主要的炎症因子,采用 ELISA 检测 TNF- α 蛋白含量。与对照组相比,模型组肝细胞 TNF- α 蛋白含量增多 ($P < 0.01$);而与模型组相比,雌激素组 ($P < 0.001$) 和槲皮素组 ($P < 0.01$) 均使肝细胞 TNF- α 蛋白含量明显减少;槲皮素组与雌激素组相比差异无统计学意义,见图 8。

3 讨论

单纯性肝脂肪变性可发展为非酒精性脂肪性肝炎,显著增加了肝纤维化和肝硬化风险,甚至发展为肝细胞癌^[14]。PGC-1 α 的表达异常与 NAFLD 发生发展密切相关。研究报道,患者肝 PGC-1 α 的低表达可促进 NAFLD 发生发展^[15];PGC-1 α 基因敲除小鼠在短期饥饿后易发生肝脂肪变性^[16]。本实验显示,模型组 PGC-1 α 的表达下降,出现脂质积累和脂肪变性,表明 PGC-1 α 低表达促使肝细胞脂肪变性的发生发展。槲皮素与阳性药雌激素的作用类似,可上调 PGC-1 α 的表达,减轻肝细胞脂质积累和脂肪变性,初步验证了槲皮素的雌激素样肝保护作用。PGC-1 α 的表达上调不仅与槲皮素改善肝细胞脂肪变性有关,并且与激活脂肪酸 β 氧化、减轻氧化应激以及抑制炎症反应有关。

体内脂肪酸主要通过脂肪酸 β 氧化清除,肝是脂肪酸 β 氧化最活跃的组织之一。如果脂肪酸 β 氧化障碍则使肝游离脂肪酸积聚和脂肪生成增加,促使 NAFLD 的形成。因此,激活脂肪酸 β 氧化功能是阻止 NAFLD 发生的关键。肝中大量表达 PPAR α ,作为一种配体激活转录因子,能有效诱导线粒体和过氧化物酶体脂肪酸 β 氧化途径的基因表达^[17]。CPT1 α 是线粒体脂肪酸 β 氧化的关键酶,它是一个完整的线粒体外膜蛋白,可促进脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化^[18-19],但线粒体缺乏极长链脂肪酸(very long-chain fatty acids, VLCFAs)氧化所需的酶。ACOX1 是 VLCFAs 在过氧化物酶体 β

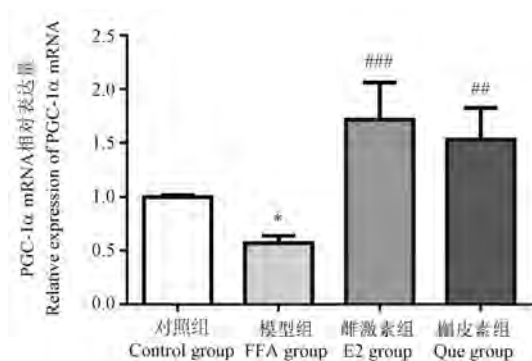


注:与对照组相比,*** $P < 0.001$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 4 HepG2 细胞 TG 含量

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. Compared with the FFA group, # $P < 0.05$.

Figure 4 TG content of HepG2 cells

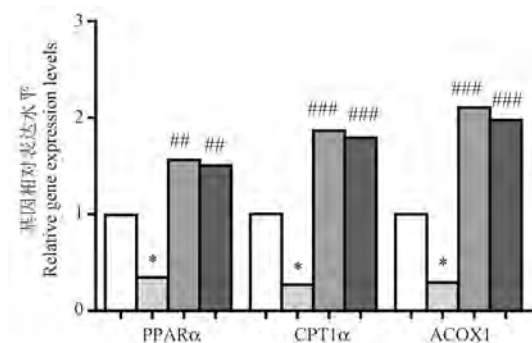


注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 5 HepG2 细胞中 PGC-1 α mRNA 表达水平

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the FFA group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 5 PGC-1 α mRNA expression level in HepG2 cells



注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 6 HepG2 细胞中脂肪酸 β 氧化基因相对表达水平

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the FFA group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 6 Relative expression levels of fatty acid β oxidation genes in HepG2 cells

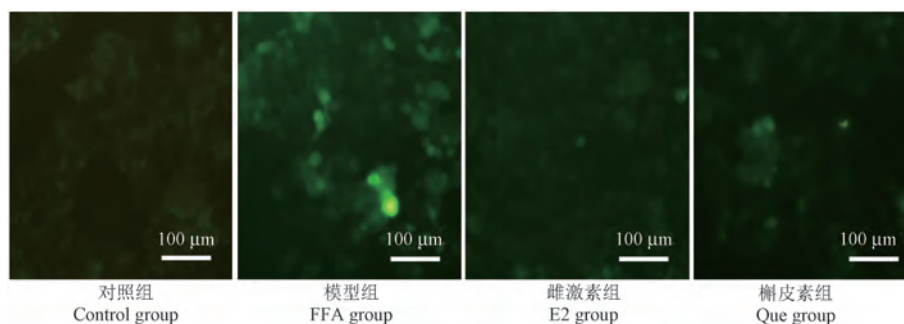
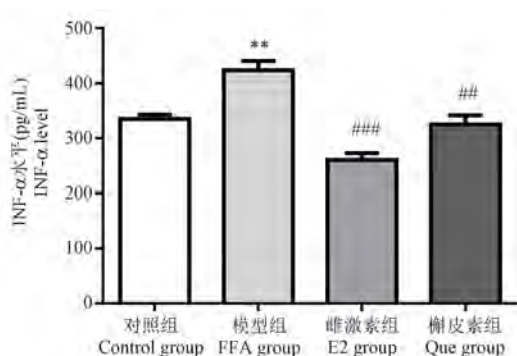


图 7 DCFH-DA 染色 HepG2 细胞 ROS 水平

Figure 7 ROS level of HepG2 cells by DCFH-DA staining



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 8 HepG2 细胞 TNF- α 水平

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$. Compared with the FFA group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 8 TNF- α level in HepG2 cells

氧化中的限速酶, VLCFAs 被氧化成中链或长链脂肪酸,随后被输出到线粒体再进一步氧化^[18,20],因此,过氧化物酶体在脂肪酸 β 氧化中也起着重要作用。大鼠高脂饮食喂养后,脂肪酸 β 氧化基因 CPT1 α 和 ACOX1 表达降低,诱导了肝脂质积累^[18]。此外, NASH 患者肝中 PPAR α 的表达降低^[17,20]。本研究发现,模型组 PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 的表达均下降,表明 PPAR α 及下游靶基因 CPT1 α 和 ACOX1 的低表达与肝脂质积累有关。雌激素干预后,PPAR α 、CPT1 α 和 ACOX1 的表达均明显上调,激活了脂肪酸 β 氧化功能,从而改善肝细胞脂肪变性。欣喜的是,槲皮素干预后出现了雌激素类似的结果,再次验证了它的雌激素样肝保护作用。

氧化应激在 NAFLD 发生发展中扮演着重要的决定因素^[21]。NAFLD 的主要病理特征是大量游离脂肪酸堆积在肝细胞,线粒体脂肪酸 β 氧化增加呼吸链电子产生过量 ROS,引发氧化应激,致肝细胞损伤。线粒体过量 ROS 氧化细胞质和线粒体不饱

和脂肪酸产生脂质过氧化产物,损伤线粒体功能,加重肝脂肪变性。同时,线粒体过量 ROS 激活肝细胞或 Kupffer 细胞产生炎症因子,引起肝炎性反应^[22-23]。本实验发现,模型组 ROS 和炎症因子 TNF- α 水平升高,这些变化与 PGC-1 α 的表达下降同时发生,表明脂肪酸超载时 PGC-1 α 的表达下降与氧化应激和炎症反应有关。与阳性药雌激素结果一致,槲皮素抑制 ROS 和 TNF- α 生成,减轻了氧化应激和炎症反应,进一步证明槲皮素发挥了雌激素样肝保护作用。本研究还存在局限性, FFA 培养的 HepG2 细胞虽显示出脂质沉积、氧化应激和炎症反应等方面特征,但 HepG2 细胞株与生理条件下肝细胞存在差异,还需谨慎考虑其是否能完全模拟 NAFLD 的所有特征。因此,后续实验将会研究原代小鼠肝细胞以确认更接近临床的数据。鉴于细胞实验不能完全模拟在体的环境因素,未来将会进行在体实验进一步验证槲皮素对绝经后女性 NAFLD 的影响及作用机制。

综上所述,在脂肪酸超载的条件下,PGC-1 α 表达下降在肝细胞脂质积累方面起着重要作用,并且与脂肪酸 β 氧化功能障碍、氧化应激以及炎症反应密切相关。槲皮素可诱导 PGC-1 α 表达,激活脂肪酸 β 氧化、减轻氧化应激以及抑制炎症反应,最终改善肝细胞脂肪变性。这些结果与雌激素的作用高度一致,提示槲皮素发挥了雌激素样肝保护作用。

参考文献:

- [1] Galmés-Pascual BM, Martínez-Cignoni MR, Morán-Costoya A, et al. 17 β -estradiol ameliorates lipotoxicity-induced hepatic mitochondrial oxidative stress and insulin resistance [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 150: 148-160.
- [2] Lee C, Kim J, Jung Y. Potential therapeutic application of estrogen in gender disparity of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. Cells, 2019, 8(10): 1259.
- [3] Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for

- metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(1): 202–209.
- [4] 卜浩林, 李丽红, 李欣, 等. 长期高蛋白饮食对 OVX 小鼠肝脂肪变性和脂肪堆积的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(11): 69–75.
- [5] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2002, 288(3): 321–333.
- [6] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842–845.
- [7] Fang YL, Chen H, Wang CL, et al. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: from "two hit theory" to "multiple hit model" [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(27): 2974–2983.
- [8] Ahrens M, Ammerpohl O, von Schönfels W, et al. DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(2): 296–302.
- [9] Morris EM, Meers GME, Booth FW, et al. PGC-1 α overexpression results in increased hepatic fatty acid oxidation with reduced triacylglycerol accumulation and secretion [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(8): G979–G992.
- [10] Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, et al. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3): 562–573.
- [11] Pérez S, Rius-Pérez S, Finamor I, et al. Obesity causes PGC-1 α deficiency in the pancreas leading to marked IL-6 upregulation via NF- κ B in acute pancreatitis [J]. *J Pathol*, 2019, 247(1): 48–59.
- [12] Besse-Patin A, Léveillé M, Oropeza D, et al. Estrogen signals through peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α to reduce oxidative damage associated with diet-induced fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 243–256.
- [13] Hur HJ, Jeong YH, Lee SH, et al. Quercitrin ameliorates hyperlipidemia and hepatic steatosis in ovariectomized mice [J]. *Life (Basel)*, 2020, 10(10): 243.
- [14] Ye Q, Zou B, Yeo YH, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(8): 739–752.
- [15] Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, et al. Association between PPARGC1A polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *BMC Gastroenterol*, 2008, 8: 27.
- [16] Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(4): e101.
- [17] Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver [J]. *Biochimie*, 2017, 136: 75–84.
- [18] Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, Rychlicki C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation stimulates hepatic lipid oxidation and restores hepatic signalling alteration induced by a high-fat diet in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Liver Int*, 2011, 31(9): 1285–1297.
- [19] Tan Z, Xiao L, Tang M, et al. Targeting CPT1A-mediated fatty acid oxidation sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy [J]. *Theranostics*, 2018, 8(9): 2329–2347.
- [20] Griffin EN, Ackerman SL. Lipid metabolism and axon degeneration: an ACOX1 balancing act [J]. *Neuron*, 2020, 106(4): 551–553.
- [21] Rodrigues G, Moreira AJ, Bona S, et al. Simvastatin reduces hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic steatohepatitis experimental model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3201873.
- [22] Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(6): 928–940.
- [23] 周帆, 彭君伟, 范伏岗, 等. 自噬与氧化应激在非酒精性脂肪性肝病发病机制中的关系 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(8): 1805–1808.

[收稿日期] 2022-01-14

胡哲,赵军,宋晷,等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的脑保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 55-61.

Hu Z, Zhao J, Song W, et al. Protective effect of ginkgo biloba extract on the brain in a cerebral ischemia-reperfusion injury rat model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 55-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.008

银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的 脑保护作用

胡 哲¹, 赵 军², 宋 晷³, 闫旭升³, 杨占君^{3*}, 贾建新^{3*}

(1. 包头医学院卫生健康学院解剖学教研室, 内蒙古 包头 014050; 2. 包头医学院第三临床医学院神经外科, 内蒙古 包头 014050; 3. 包头医学院人体解剖学教研室, 内蒙古 包头 014040)

【摘要】 目的 脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)严重影响神经功能, 本实验计划探讨银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)对 CIRI 模型大鼠神经功能是否具有改善作用及其相关机制。**方法** 闭塞大鼠大脑中动脉 2 h, 随后再灌注 22 h 制备 CIRI 大鼠模型, 给予不同剂量(25、50、100 mg/(kg·d))的 GBE 腹腔注射 15 d, 全程给药结束后对各组动物进行神经功能评分, 评价 GBE 对 CIRI 模型大鼠运动功能的影响; 采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色评价 GBE 对脑梗死的影响; 蛋白免疫印迹法检测自噬标志性蛋白和凋亡相关蛋白的表达量; ELISA 法检测血清中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。**结果** GBE 可明显提高 CIRI 模型大鼠的神经功能评分, 明显减小脑梗死体积; 显著上调血清 SOD 与 GSH-px 的活性, 以及降低 MDA 的含量; GBE 可明显提高 Beclin-1 的蛋白表达量、LC3-II/LC3-I 和 Bcl-2/Bax 的蛋白表达量比值, 相反降低了 Caspase-3 的蛋白表达量。**结论** GBE 改善 CIRI 模型大鼠的运动功能障碍可能是通过抑制氧化应激与凋亡进而激活自噬系统, 实现对脑细胞的保护作用。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤; 银杏叶提取物; 自噬; 凋亡; 氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0055-07

Protective effect of ginkgo biloba extract on the brain in a cerebral ischemia-reperfusion injury rat model

HU Zhe¹, ZHAO Jun², SONG Wei³, YAN Xusheng³, YANG Zhanjun^{3*}, JIA Jianxin^{3*}

(1. Health School of Baotou Medical College, Baotou 014050, China. 2. Department of Neurosurgery, Third Clinical Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014050. 3. Department of Human Anatomy of Baotou Medical College, Baotou 014040)

【Abstract】 Objective The exact pathogenesis of cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) remains unclear. This study explored whether ginkgo biloba extract (GBE) can improve neurological function in a CIRI rat model and the related mechanisms. **Methods** The CIRI rat model was induced by middle cerebral artery occlusion for 2 h, followed by reperfusion

【基金项目】 内蒙古自治区卫生计生委科研计划项目(201701080)。

【作者简介】 胡哲(1975—), 男, 副教授, 医学硕士, 研究方向: 中蒙药对中枢神经系统退行性疾病的防治。E-mail: 1197832792@qq.com

【通信作者】 贾建新(1981—), 男, 教授, 医学博士, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治。E-mail: jiajianxindx@163.com

杨占君(1968—), 男, 教授, 医学博士, 研究方向: 中枢神经系统退行性疾病的防治。E-mail: yzj8330@163.com

* 共同通信作者

for 22 h. Varying dosages of GBE were administered intraperitoneally for 15 days. Subsequently, CIRI model rats were scored for neurological function to evaluate the effect of GBE on their motor function. In addition, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining was used to detect the volume of infarcted brain, Western blot was used to detect expression of autophagy marker proteins and apoptosis-related proteins, the serum activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH-px) and serum level of malonaldehyde was detected by ELISA. **Results** GBE significantly improved the neurological function scores of CIRI model rats, markedly reduced cerebral infarction volumes, and significantly upregulated the activities of serum SOD and GSH-px, while decreasing the level of MDA. In addition, GBE significantly increased protein expression of Beclin-1 and protein expression ratios of LC3-II/LC3-I and Bcl-2/Bax, while remarkably reducing protein expression of Caspase-3. **Conclusions** GBE improved the motor dysfunction of CIRI model rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis, as well as activating the autophagy system to achieve a protective effect on brain cells.

【Keywords】 cerebral ischemia-reperfusion injury; ginkgo biloba extract; autophagy; apoptosis; oxidative stress

脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 是指脑组织在缺血后恢复血流灌注时, 反而加重组织损伤及功能障碍的现象^[1]。CIRI 是一个非常复杂的病理生理学过程, 涵盖多个环节, 在脑组织缺血过程中, 血管阻塞使下游脑组织血流中断, 脑细胞失去能量及氧的供应, 引起脑细胞的功能障碍或死亡^[2]。现阶段, CIRI 的发病机制仍未完全阐明, 涉及兴奋性氨基酸的释放增加、能量代谢障碍、细胞发生酸中毒、自由基的堆积、细胞内 Ca^{2+} 浓度的失稳、凋亡基因的大量激活等^[3-5]。

银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract, GBE) 是从银杏叶中获得的醇提物, 主要有效成分包括黄酮类和萜内酯类, 具有多种生物效应, 诸如抗炎、抑制神经细胞凋亡和兴奋性氨基酸的释放、抗氧化和氧自由基损伤等。既往研究显示, GBE 对 CIRI 的神经功能具有显著的改善作用, 但其确切的分子机制仍未知^[6]。本研究计划探讨 GBE 是否对 CIRI 模型大鼠具有治疗作用及可能机制, 旨在为临床 CIRI 提供新治疗靶点及中草药的研发提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 7~8 周龄, 体重 260~280 g, 实验大鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2019-0010] 提供。饲养于包头医学院实验动物中心 [SYXK (蒙) 2018-0001], 自主进食水、维持饲料。包头医学院实验动物伦理委员会已批准相关研究工作 (包院字 20201102), 所有实验动物在饲养和实验过程中均按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

银杏叶提取物 (北京中检院); 2,3,5-氯化三苯

基四氮唑 (TTC, Sigma 公司, 美国); 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) (武汉新启迪生物科技有限公司); Beclin-1、LC3-II、LC3-I、Bcl-2、Bax、Caspase-3、 β -actin 抗体 (Proteintech 公司, 美国)。低温高速离心机 (Thermo 公司, 美国); -80°C 超低温冰箱 (Thermo 公司, 美国); 垂直板电泳槽 (北京六一生物科技有限公司); 酶标仪 (Thermo 公司, 美国); 蛋白凝胶成像分析系统 (上海 Tanon 科技有限公司); 移液枪 (Eppendorf 公司, 德国); 脱色摇床 (北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CIRI 动物模型的制备以及神经功能评分

本实验所用动物模型的制备方法参照改良的 Zea-longa 线栓法^[5], 闭塞大鼠左侧大脑中动脉 (middle cerebral artery, MCA) 2 h, 随后再灌注 22 h, 术前 12 h 禁食不禁水。大鼠用 2% (100 mg/kg) 戊巴比妥钠 (0.3 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 仰卧颈部备皮消毒, 暴露左侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA), 并将迷走神经与之分离。向远心端将颈内动脉 (internal carotid artery, ICA) 和颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 的起始部进行钝性分离, 在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处挂线备用。用微动脉夹暂时夹闭 ICA, 然后近心端结扎 CCA、ECA。在 CCA 分叉部约 4 mm 处剪一小口, 将栓线插入到 ICA, 用绕在 CCA 远心端的细线轻轻系牢栓线。线栓经 CCA、ICA 置入 MCA, 出现阻力时停止前进并轻轻系牢 CCA 远心端的细线, 缺血 2 h 后拔出栓线实现再灌注 22 h, 局部放置凝胶海绵止血, 待止血完全后缝合切口, 常规消毒。

1.3.2 实验动物分组、给药

动物给予充足饮水和饮食, 12 h 明暗交替。将

60 只动物分为两组,10 只动物作为空白对照组,其余 50 只动物用于 CIRI 模型制备。模型制备完成后,神经功能评分评价动物造模效果,神经功能评分法采用国际通用的 Zea-Longa 评分法^[7],神经功能评分为 0~4 分 5 级:0 分,功能表现无缺陷;1 分,瘫痪侧前爪不能彻底伸展;2 分,行走时向瘫痪侧偏移甚至转圈;3 分,行走时向瘫痪侧倾倒;4 分:无法自主活动、意识丧失或死亡。实验剔除 0 分和 4 分的动物,动物神经功能评分 ≥ 2 分确定为模型制备成功,剔除造模失败的动物,成模的动物随机分为以下 4 组:模型组、GBE 低、中、高剂量组(25、50、100 mg/(kg·d))。GBE 用无菌蒸馏水溶解,调整 GBE 各剂量组药物浓度,保证各剂量组给药体积等量(0.5 mL)。模型组给予同等体积的无菌生理盐水,连续给药 15 d。

1.3.3 蛋白标本、组织切片的存取和制备

全程实验结束后,所有动物常规麻醉,主动脉采血 1 mL 置于 EP 管备用。每组半数动物取脑,冻存于超低温冰箱以备后用。半数动物用于 TTC 染色计算脑梗死面积。

1.3.4 TTC 染色以及脑梗死体积的计算

实验结束后将用于 TTC 染色的大鼠断头取脑,生理盐水灌注脑组织,-20℃ 放置数分钟,冠状位将大脑用脑膜均分为 5 片。将切好的脑片放入 2% TTC 染液中,37℃ 避光染色 20 min,4% 多聚甲醛固定,将染好的脑片排列于平板上拍照。脑底有血凝块、动脉环血栓形成的动物予以排除。脑梗死体积通过梗死体积比率表示(梗死体积比率=各切面梗死面积之和/各切面面积之和 $\times 100\%$),用 IPP (Image Pro-Plus) 图像分析软件进行计算。

1.3.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

脑组织称重后进行蛋白裂解,蛋白在冰浴环境下超声破碎数次。4℃ 离心 12000 r/min 离心 15 min,提取并测定浓度,每 100 μ L 样品蛋白加入 4 $\times$ Buffer 33.3 μ L 后振荡混匀,沸水煮沸 10 min 使蛋白变性。蛋白上样,恒压 80 V 浓缩胶电泳,恒压 120 V 分离胶电泳,300 mA 湿转膜约 60 min;室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后漂洗;一抗孵育 4℃ 摇床过夜,次日 T-TBS 液漂洗数次;室温下二抗避光孵育 1 h 后漂洗数次;成像分析系统对条带进行统计分析。

1.3.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

实验全部结束后,各组动物经腹腔注射麻

醉。抽取大鼠尾静脉血 0.3~0.5 mL 置于预冷的 EP 管,随后 4℃ 离心 15 min(5000 r/min),留取 100 μ L 血清备用。检测血清 SOD 和 GSH-px 活性、MDA 的含量,具体操作步骤根据试剂盒说明书进行。

1.4 统计学方法

实验数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。实验数据多样本均数的两两比较采用 SNK- q 检验分析,多样本率的两两比较采用 χ^2 分割法分析,以 $P<0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果

2.1 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经功能评分和运动状态的影响

本实验用于模型制备的大鼠 50 只,最终造模成功 48 只,死亡 1 只(麻醉致死),造模失败 1 只,模型成功率为 96.00%。CIRI 造模手术后 24 h 对大鼠进行第 1 次 Longa 神经功能评分,神经行为学评分为(2.80 $\pm$ 0.39)分,与空白对照组比较存在显著性差异($P<0.05$)。成模动物运动障碍主要表现为左侧眼裂变小,右侧前肢瘫痪,行走时向右侧转圈或向右侧倾倒,部分动物出现四肢直立性战栗或全瘫痪等。周期给药结束后,对各组动物进行第 2 次神经功能评分,与空白对照组比较,其余 4 组动物神经功能评分均存在显著性差异($P<0.05$);与模型组相比,各剂量组神经行为学评分均明显的降低($P<0.05$),运动障碍症状显著改善,但中剂量组(1.51 $\pm$ 0.22)分与高剂量组(1.60 $\pm$ 0.26)分动物神经行为学评分之间无显著性差异($P>0.05$)。与第 1 次神经功能评分比较,模型组动物神经行为学评分有所减小,但无显著性差异($P>0.05$),运动障碍症状未见显著改善;而 GBE 各剂量组动物运动障碍症状均出现明显改善,神经功能评分均明显降低($P<0.05$),尤其以中、高剂量组改变更为显著,详见表 1。

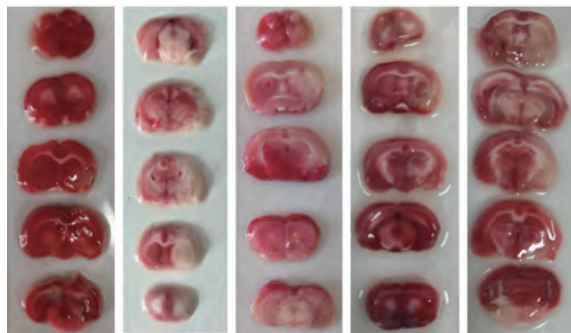
2.2 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑梗死体积的影响

TTC 染色后的脑组织非梗死区呈鲜红色,梗死区灶呈苍白色。空白对照组大鼠脑组织呈鲜红色,模型组大鼠左侧大脑半球部分区域呈苍白色。模型组、GBE 各剂量组梗死体积比率与空白对照组比较均存在显著性差异($P<0.05$);与模型组比较,GBE 各剂量组梗死体积比率均出现显著性减小($P<$

0.05), 尤以中剂量组、高剂量组更为显著, 剂量组之间梗死体积比率无显著性差异(图 1、表 1)。

2.3 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠血清 ELISA 氧化应激指标的影响

与空白对照组相比, 模型组 MDA 的含量出现了明显增加($P < 0.05$), 而 SOD 与 GSH-px 的活性均出现了显著性降低($P < 0.05$); GBE 低剂量组 GSH-px 的活性较空白对照组显著性降低($P < 0.05$), 而 MDA 的含量显著性升高($P < 0.05$); GBE 中、高剂量组与空白对照组比较上述氧化应激指标



注: a: 空白对照组; b: 模型组; c: GBE 低剂量组; d: GBE 中剂量组; e: GBE 高剂量组。

图 1 TTC 染色显示各组动物脑梗死体积比率

Note. a, Control group. b, Model group. c, Low GBE group. d, Intermediate GBE group. e, High GBE group.

Figure 1 TTC staining shows the volume ratio of cerebral infarction area in each group

表 1 各组动物神经功能评分、梗死体积比率的比较($n=12$)

Table 1 Neurological function score and infarct volume ratio were compared in each group

组别 Groups	术后 24 h Post-operation 24 h	GBE 给药 15 d GBE administration 15 d
空白对照组 Control group	0	0
模型组 Model group	2.91±0.45 [*]	2.75±0.39 [*]
GBE 低剂量组 Low GBE group	2.66±0.32 [*]	1.92±0.25 ^{*##}
GBE 中剂量组 Intermediate GBE group	2.84±0.41 [*]	1.51±0.22 ^{*##}
GBE 高剂量组 High GBE group	2.78±0.38 [*]	1.60±0.26 ^{*##}

注: 与空白对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与术后 24 h 相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, $^*P < 0.05$. Compared with model Group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with post-operation 24 h, $^{\Delta}P < 0.05$.

表 2 各组 ELLISA 检测血清 SOD、GSH-px 的活性与 MDA 含量的比较($n=12$)

Table 2 ELLISA detects the serum activities of SOD, GSH-px and MDA content in each group

组别 Groups	超氧化物歧化酶 (U/mL) SOD	谷胱甘肽过氧化物酶 (nmol/L) GSH-px	丙二醛 (nmol/L) MDA
空白对照组 Control group	225.24±20.05	52.65±5.18	1.95±0.27
模型组 Model group	155.41±12.65 [*]	30.34±3.38 [*]	3.51±0.36 [*]
GBE 低剂量组 Low GBE group	195.53±18.27 [#]	40.09±4.77 ^{*#}	2.74±0.30 ^{*#}
GBE 中剂量组 Intermediate GBE group	214.26±17.80 [#]	45.28±4.42 [#]	2.22±0.33 [#]
GBE 高剂量组 High GBE group	207.61±12.71 [#]	44.23±3.90 [#]	2.35±0.39 [#]

注: 与空白对照组相比, $^*P < 0.05$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

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

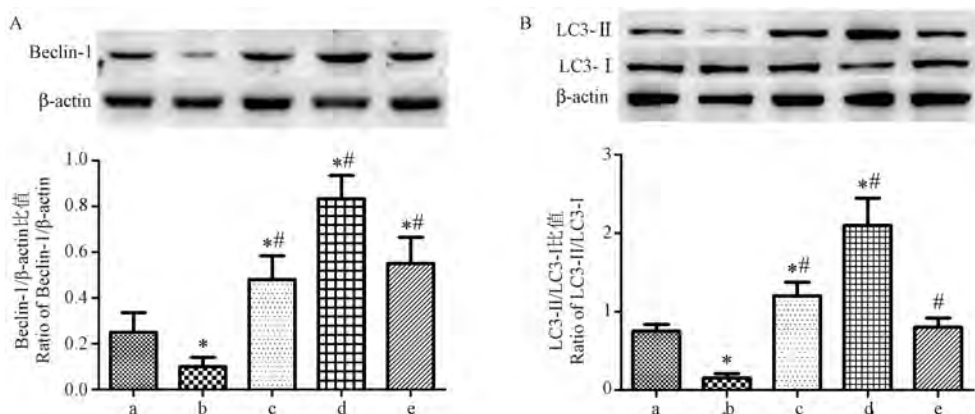
均无显著性差异($P > 0.05$)。与模型组比较, GBE 各剂量组血清 MDA 的含量均出现了显著性下降($P < 0.05$), SOD 与 GSH-px 的活性均显著升高($P < 0.05$), 其中尤以中剂量组对上述指标的影响最为显著(详见表 2)。上述实验结果表明, GBE 可以显著抑制脑缺血再灌注损伤模型大鼠的氧化应激损伤程度, GBE 具有明显的抗氧化损伤作用。

2.4 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织自噬相关蛋白表达的影响

模型组的 Beclin-1 蛋白表达量较空白对照组明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 各 GBE 剂量组 Beclin-1 的表达量均出现了明显升高($P < 0.05$), 但以中剂量对 Beclin-1 的表达量的影响最为显著(图 2A)。与空白对照组相比, 模型组 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量比值明显降低($P < 0.05$), 与模型组比较, 各 GBE 剂量组 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量比值均出现了明显升高($P < 0.05$), 但以中剂量对 LC3-II/LC3-I 的蛋白表达量比值的影响最为显著(图 2B)。上述结果表明, GBE 可以显著上调脑缺血再灌注损伤模型大鼠的自噬水平。

2.5 GBE 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织凋亡相关蛋白表达的影响

模型组的 Bcl-2/Bax 蛋白表达量比值较空白对照组明显降低($P < 0.05$), 而 Caspase-3 的蛋白表达量显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较, 各 GBE 剂量组 Bcl-2/Bax 的蛋白表达量比值均出现了明显升

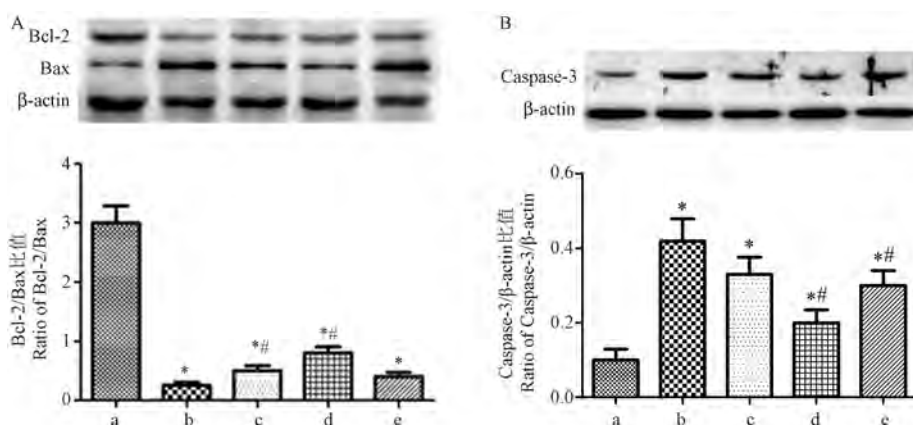


注:a;空白对照组;b;模型组;c;GBE 低剂量组;d;GBE 中剂量组;e;GBE 高剂量组。A;Beclin-1 蛋白;B;LC3-II/LC3-I 蛋白。与空白对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图2 蛋白免疫印迹检测各组动物脑组织 Beclin-1 蛋白和 LC3-II/LC3-I 蛋白的表达

Note. a, Control group. b, Model group. c, Low GBE group. d, Intermediate GBE group. e, High GBE group. A, Beclin-1. B, LC3-II/LC3-I. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 2 Western blot detects the protein expression level of Beclin-1 and LC3-II/LC3-I in brain tissues of each group



注:a;空白对照组;b;模型组;c;GBE 低剂量组;d;GBE 中剂量组;e;GBE 高剂量组。A;Bcl-2/Bax 蛋白;B;Caspase-3 蛋白。与空白对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图3 蛋白免疫印迹检测各组动物脑组织 Bcl-2/Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达

Note. a, Control group. b, Model group. c, Low GBE group. d, Intermediate GBE group. e, High GBE group. A, Bcl-2/Bax. B, Caspase-3. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 3 Western blot detects the protein expression ratio of Bcl-2/Bax and Caspase-3 in brain tissues of each group

高,但以低剂量组、中剂量最为显著 ($P<0.05$);各 GBE 剂量组 Caspase-3 的蛋白表达量均出现了明显降低 ($P<0.05$),但以中剂量、高剂量组对 Caspase-3 的蛋白表达量的影响最为显著。上述结果表明,GBE 可以显著抑制脑缺血再灌注损伤模型大鼠细胞凋亡水平(图3)。

3 讨论

目前,GBE 广泛用于临床治疗帕金森病和阿尔茨海默病等中枢神经系统退行性疾病,并取得了较好的疗效^[8-10]。本文研究发现,GBE 可以明显减小

MCAO 模型大鼠脑梗死区域面积,并且显著提高了神经功能评分,表明 GBE 对 CIRI 脑组织具有显著的保护作用,这与既往报道相一致^[11-13]。本实验结果显示,GBE 在低中剂量 ($25 \sim 50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 给药区间随给药剂量的增加,药效作用呈现逐渐增加的趋势,而高剂量组 ($100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 药效作用呈现下降趋势, $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组药效作用达到高峰,提示 GBE 改善 MCAO 模型大鼠的最佳剂量应该趋于 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 附近。

既往研究证明,再灌注引发的继发性脑损伤中氧化应激损伤发挥关键作用^[14]。本实验中大脑中

动脉闭塞(MCAO)引起脑组织缺血缺氧诱发梗死,进而导致神经功能障碍和神经细胞的不可逆损伤。恢复血液再灌注的过程对脑组织造成了进一步的损伤,大量自由基产生,对细胞造成了氧化应激损伤。既往研究报道,GBE 具有显著的抗氧化应激损伤的作用,GBE 通过清除自由基减轻缺血再灌注损伤,进而发挥神经保护作用^[15]。本实验结果显示,MCAO 在引起脑组织梗死的同时出现血清 SOD 与 GSH-px 的活性明显降低,MDA 的含量明显增加,表明机体发生了严重的氧化应激损伤;GBE 干预后可以明显减小梗死区的体积,同时引起 CIRI 模型大鼠血清 SOD 与 GSH-px 的活性明显增加,MDA 的含量明显减小,表明 GBE 具有显著的抗氧化应激药效作用,其可能通过减轻机体氧化应激损伤与清除自由基对 CIRI 发挥脑保护作用。

既往研究显示,细胞凋亡可能在 CIRI 的病理过程中起着重要的作用^[16]。神经凋亡与 Bcl-2(抑制细胞凋亡)和 Bax(促进细胞凋亡)的表达相关,Bax 表达升高导致线粒体通透性增加,诱导 Cytc 释放进入胞质,激活 Caspase-3 引起细胞凋亡。既往报道,凋亡的发生与 CIRI 后所产生氧自由基、炎症因子诱发而引起^[17]。银杏叶提取物(EGb761)能够有效清除氧自由基,抑制脂质的氧化,显著提高 Bcl-2/Bax 蛋白表达量比值,提示银杏叶可抑制神经细胞的凋亡,对 CIRI 模型动物脑损伤发挥显著的保护作用^[18-19]。本研究结果显示,GBE 可显著提高 CIRI 模型大鼠脑组织 Bcl-2/Bax 的蛋白表达量比值,相反降低了 Caspase-3 的蛋白表达量,GBE 引起 CIRI 模型大鼠血清 SOD 与 GSH-px 的活性明显增加,MDA 的含量明显减小,表明 GBE 具有显著的抗氧化应激药效作用,实验结果说明 GBE 通过抗氧化应激抑制了 CIRI 的神经损伤和细胞凋亡。

自噬(autophagy)是机体通过细胞内自噬溶酶体清除降解受损细胞器及体内大分子物质的过程,在细胞体内发挥“清道夫”的作用。自噬通过平衡细胞的合成和分解代谢,维持机体内环境稳态,发挥机体自身保护和防御作用^[20]。Beclin-1 是酵母 Atg6/Vps30 的同源基因,Beclin-1 调控哺乳动物自噬体的形成和成熟,是自噬体形成的必需分子,其可以将其他的自噬蛋白定位在吞噬泡,故越来越多的学者将其作为衡量自噬发生程度的标记物之一^[21-22]。LC3-II 是自噬体形成的生物学标志,定位于自噬体膜上。在 ATG7 及 ATG3 共同作用下,胞

质中游离的 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺结合酯化形成 LC3-II,而 LC3-I 是由哺乳动物酵母菌 ATG8 的同源基因 LC3 在自噬相关蛋白 ATG4 的作用下脱去羟基生成^[23]。

郝莉等^[24]研究表明,银杏酮酯能提高自然衰老大鼠的海马 LC3-II 蛋白表达水平,通过调控机体自噬水平改善自然衰老相关的学习认知功能障碍。当机体遭受缺血缺氧等应激刺激时,神经细胞存活率明显降低,激活自噬能显著抑制细胞死亡,故认为自噬激活对应激状态下的神经细胞具有保护作用^[25-26]。本研究结果显示,GBE 能显著抑制机体氧化应激损伤程度,同时 Beclin-1 与 LC3-II/LC3-I 的表达量均显著上调,这提示 GBE 极有可能是通过激活自噬,进而对 CIRI 模型大鼠神经细胞发挥保护作用,最终改善脑缺血再灌注损伤的神经功能表现。该实验结果为临床 CIRI 的防治开辟了新思路,也为中草药的开发与利用提供了实验依据。

综上所述,本研究结果表明 GBE 可以通过增强机体自噬水平、提高机体抗氧化应激损伤和抗凋亡,发挥对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用,进而改善 MCAO 模型大鼠的行为功能,从而达到保护缺血性脑卒中的目的,进而为脑缺血再灌注损伤的治疗提供新的靶点及治疗策略。

参考文献:

- [1] Stegner D, Klaus V, Nieswandt B. Platelets as modulators of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2505.
- [2] Yang B, Zang LE, Cui JW, et al. Melatonin plays a protective role by regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 pathway to improve autophagy, inflammation and oxidative stress of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3177-3188.
- [3] 靳晓飞, 张弋宁, 周晓红, 等. 黄芪甲苷对脑缺血再灌注大鼠炎症因子及超微结构的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 1-6.
- [4] 王瑜, 王天龙, 赵磊, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对小鼠 TMEM166 基因和神经细胞自噬的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 28-32.
- [5] 曹慧, 宋玉晨, 张颖, 等. 红景天苷对脑缺血再灌注模型大鼠的治疗作用及其在脑组织中的动态含量研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(2): 180-186.
- [6] 韩望, 方伟荣, 李远曼, 等. 银杏黄酮和银杏内酯醇比在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. *时珍国医医药*, 2019, 30(1): 89-91.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*,

- 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Song W, Zhao J, Yan XS, et al. Mechanisms associated with protective effects of Ginkgo biloba leaf extraction in rat cerebral ischemia reperfusion injury [J]. J Toxicol Environ Health A, 2019, 82(19): 1045-1051.
- [9] 袁海虹, 周薇, 吴国忠, 等. 银杏叶提取物保护视网膜缺血-再灌注损伤与自噬的关系 [J]. 上海交通大学学报医学版, 2014, 34(5): 635-639.
- [10] 赵军, 武月娥, 张健敏, 等. 银杏叶提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠氧化应激和炎症的治疗作用 [J]. 包头医学院学报, 2019, 35(1): 61-63, 92.
- [11] 饶江燕, 王倩, 王钰淳, 等. β -石竹烯通过激活自噬减轻小鼠脑缺血/再灌注损伤的研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4): 932-936.
- [12] Yang YM, Liu PF, Chen LX, et al. Therapeutic effect of Ginkgo biloba polysaccharide in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury [J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(2): 1383-1388.
- [13] Tang YP, Zhou GS, Yao LJ, et al. Protective effect of Ginkgo biloba leaves extract, EGb761, on myocardium injury in ischemia reperfusion rats via regulation of TLR-4/NF- κ B signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 86671-86680.
- [14] 刘自然, 霍东升, 贾建新, 等. 5-(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基) 罗丹宁对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 37-42.
- [15] Diamond BJ, Bailey MR. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety [J]. Psychiatr Clin North Am, 2013, 36(1): 73-83.
- [16] Nagy Z, Nardai S. Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside [J]. Brain Res Bull, 2017, 134: 30-37.
- [17] Smith DL, Soria JC, Morat L, et al. Human telomerase reverse transcriptase (Hthrt) and Ki-67 are better predictors of survival than established clinical indicators in patients undergoing curative hepatic resection for colorectal metastases [J]. Ann Surg Oncol, 2004, 11(1): 45-51.
- [18] 吕建国, 孙燕玲. 大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区细胞凋亡及银杏叶提取物的保护作用 [J]. 解剖学杂志, 2018, 41(4): 395-399.
- [19] 张春军, 董琦, 董凯. 银杏叶对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡、Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(23): 3714-3716.
- [20] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double edged sword [J]. Science, 2004, 306(5698): 990-995.
- [21] 李媛, 靳晓飞, 周晓红, 等. 黄芪甲苷对脑缺血/再灌注损伤大鼠细胞自噬的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11): 2037-2042.
- [22] Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin1 complexes [J]. Biochimie, 2008, 90(2): 313-323.
- [23] 赵安东, 李玉亮, 辛益妹, 等. 银杏叶提取物对大鼠脑缺血再灌注氧化损伤的保护作用 [J]. 空军医学杂志, 2013, 29(2): 93-95.
- [24] 郝莉, 徐玉英, 郭春霞, 等. Beclin1 在银杏酮酯改善衰老大鼠学习记忆中的作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2018, 32(5): 45-49.
- [25] Wang P, Xu Y, Wei K, et al. ARRB1/ β -arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1 dependent autophagy in cerebral ischemia [J]. Autophagy, 2014, 10(9): 1535.
- [26] 丁培炎, 王冬, 赫曼, 等. 短期禁食诱导自噬对大鼠脑缺血损伤的保护作用 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(3): 201-204.

[收稿日期] 2021-01-29

曹银利,孙亚洲,崔清洋,等. 罗汉果皂苷 V 对胎粪吸入综合征大鼠的保护作用及其初步机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 62-68.

Cao YL, Sun YZ, Cui QY, et al. Protective effect and possible mechanism of mogroside V in rats with meconium aspiration syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 62-68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.009

罗汉果皂苷 V 对胎粪吸入综合征大鼠的保护作用及其初步机制研究

曹银利*, 孙亚洲, 崔清洋, 何晓敬, 李珍珍

(新乡医学院第一附属医院儿科, 河南 新乡 453000)

【摘要】 目的 观察罗汉果皂苷 V 对胎粪吸入综合征(MAS)大鼠急性肺损伤的保护作用,并初步探讨其作用机制。**方法** 将 48 只健康 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、罗汉果皂苷 V 低、中、高剂量组(2.5、5、10 mg/kg)和地塞米松组(0.5 mg/kg),8 只/组;采用经口直视气管插管法构建 MAS 模型;罗汉果皂苷 V 低、中、高剂量组及地塞米松组于造模后灌胃给药,模型组和假手术组给予等量生理盐水灌胃。采用 HE 染色观察肺组织病理变化;测量肺组织湿干质量比(W/D);ELISA 法检测血清和肺泡灌洗液肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6 (IL-10)、白介素 1 β (IL-1 β) 水平;比色法检测肺组织中丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性;Western blot 检测肺组织 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、磷酸化 JNK(p-JNK)蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组肺组织病理评分、W/D 升高($P<0.05$),肺泡灌洗液及血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高($P<0.05$),肺组织 MDA 与 MPO 水平升高、SOD 水平降低($P<0.05$),肺组织 p-JNK 蛋白表达水平上调($P<0.05$)。与模型组比较,罗汉果皂苷 V 中、高剂量组及地塞米松组肺组织病理评分、W/D 降低($P<0.05$),肺泡灌洗液及血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平降低($P<0.05$),肺组织 MDA 与 MPO 水平降低、SOD 水平升高($P<0.05$);罗汉果皂苷 V 中、高剂量组肺组织 p-JNK 蛋白表达水平下调($P<0.05$)。**结论** 罗汉果皂苷 V 可能通过抑制 JNK 磷酸化,减轻 MAS 病程中炎性和氧化应激损伤而发挥急性肺损伤保护作用。

【关键词】 胎粪吸入综合征;罗汉果皂苷 V;肺损伤;炎症;c-Jun 氨基末端激酶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0062-07

Protective effect and possible mechanism of mogroside V in rats with meconium aspiration syndrome

CAO Yinli*, SUN Yazhou, CUI Qingyang, HE Xiaojing, LI Zhenzhen

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of mogroside V against acute lung injury in rats with meconium aspiration syndrome (MAS) and to explore its possible mechanism. **Methods** Forty-eight healthy Wistar rats were randomly divided into sham operation, model, low-, medium- and high-dose mogroside V groups (2.5, 5 and 10 mg/kg) and a dexamethasone group (0.5 mg/kg) with eight mice per group. MAS models were established by oral tracheal intubation. After modeling, low-, medium- and high-dose mogroside V groups, and the dexamethasone group were

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20190444)。

[作者简介] 曹银利(1979—),女,硕士,研究方向:新生儿重症相关诊疗研究。E-mail:xyxy2006@163.com

administered the indicated doses of drugs, whereas model and sham operation groups were administered the same volume of normal saline. Pathological changes of lung tissues were observed by HE staining. The wet-to-dry weight ratio (W/D) of lung tissues was calculated. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-6, and IL-1 β in serum and bronchoalveolar lavage fluid were measured by ELISA. Malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in lung tissues were detected by colorimetry. Protein expression of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and phosphorylated JNK (p-JNK) in lung tissues was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the pathological score of lung tissues and W/D were increased ($P<0.05$), TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were increased in bronchoalveolar lavage fluid and serum ($P<0.05$), MDA and MPO were increased in lung tissues, the SOD level was decreased ($P<0.05$), and p-JNK protein expression in lung tissues was upregulated in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological score of lung tissues and W/D were decreased ($P<0.05$), TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were decreased in bronchoalveolar lavage fluid and serum ($P<0.05$), MDA and MPO were decreased in lung tissues, while the SOD level was increased in medium- and high-dose mogroside V groups, and the dexamethasone group ($P<0.05$). p-JNK protein expression was downregulated in lung tissues in medium- and high-dose mogroside V groups ($P<0.05$). **Conclusions** Mogroside V may reduce inflammatory and oxidative stress damage in MAS rats by inhibiting JNK phosphorylation and thus protect them against acute lung injury.

【Keywords】 meconium aspiration syndrome; mogroside V; lung injury; inflammation; c-Jun N-terminal kinase (JNK)

胎粪吸入综合征 (meconium aspiration syndrome, MAS) 是胎儿发生宫内窘迫或产时窒息时排出的胎粪被吸入呼吸道并引起气道阻塞、炎症反应造成急性肺损伤,严重可导致呼吸衰竭以及多脏器功能损害,病死率达 3%~12%^[1-2]。目前研究表明,胎粪吸入所致的呼吸道炎症、氧化应激损伤等是 MAS 所致急性肺损伤中的关键病理机制^[3]。然而,目前临床上针对该病仍缺乏有效的治疗手段。我国传统中药罗汉果被用作肺缓和剂,具有润肺、清热、利咽等多种功效。罗汉果皂苷是罗汉果提取物中的主要成分,被发现具有抗氧化、护肝、抗疲劳、抗肿瘤、抗炎抑菌、止咳祛痰等广泛的药理活性^[4-6]。在动物模型中,罗汉果皂苷可以抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡,改善心肌损伤和心功能^[7]。报道显示,罗汉果皂苷 V 对 LPS 诱导的急性肺损伤具有保护作用^[8]。在 MAS 病程中,引起急性肺损伤的始动因素不同,罗汉果皂苷 V 对 MAS 所致的急性肺损伤是否具有保护作用尚不清楚。本研究旨在观察罗汉果皂苷 V 对 MAS 大鼠急性肺损伤的保护作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性新生 Wistar 大鼠 48 只,体重 (28 $\pm$ 4) g, 14~28 日龄,购自河南省实验动物中心 [SCXK (豫) 2017-0001], 饲养于本院实验动物中心 [SYXK (豫) 2020-0011]。本研究经新乡医学院第一附属

医院伦理委员批准 (IACUC-20201016), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

罗汉果皂苷 V (纯度 $\geq$ 98%, 成都曼思特生物科技有限公司, 批号 200903); 兔抗鼠 JNK (美国 CST 公司, 批号 201106); p-JNK (美国 CST 公司, 批号 201008); GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 210107); TNF- α (批号 201204)、IL-6 (批号 201105)、IL-1 β (批号 200901) ELISA 检测试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司; MDA (批号 210309)、SOD (批号 210407) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。一次性静脉留置针 (Thermo 24G); 酶标免疫分析仪 (Biotek MK3)。

1.3 实验方法

1.3.1 胎粪溶液制备

收集本院产科健康新生儿娩出后初次胎粪, 冷冻干燥 24 h 后研磨成粉末状, 以生理盐水配置为 60 mg/mL 混悬液, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 动物模型制备与分组

将 48 只新生 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、罗汉果皂苷 V 低、中、高剂量组和地塞米松组, 每组 8 只。大鼠 MAS 模型建立方式参考文献^[8]: 将大鼠以 40 mg/kg 2% 苯巴比妥钠腹腔内注射麻醉, 仰卧位固定于 45 $^{\circ}$ 角倾斜的操作台上; 将开口器小心放入口腔并固定在下门齿上; 待声门开放, 用一端连接有 2 mL 一次性塑料滴管且拔除针芯的 24 号 Y 型静脉留置针软管小心插入。插管成功

后经滴管缓慢注入 2 mL/kg 的预先配置好的胎粪混悬液(使用生理盐水稀释至 60 mg/mL),同时轻轻挤压塑料滴管,30 s 后快速拔管。假手术组采用同样的手术方式,但术中不使用生理盐水替代胎粪注入;实验中剔除胎粪注入后 6 h 内死亡的大鼠。MAS 模型建立后 30 min 插胃管,罗汉果皂苷 V 低、中、高剂量组参考文献^[9]分别灌胃 2.5、5、10 mg/kg 罗汉果皂苷 V(以 0.3 mL 生理盐水溶解),地塞米松组灌胃 0.5 mg/kg 地塞米松;假手术组和模型组同时给予等量生理盐水。

1.3.3 各组大鼠样本采集及处理

灌胃后 6 h^[8],使用苯巴比妥钠将大鼠麻醉,采集大鼠股动脉血 2 mL,制备抗凝血,分离血清,应用血气分析仪进行血气分析,检测动脉血氧分压(PaO₂);然后左心室放血处死,采集血样离心后留取血清;结扎右肺行左肺肺泡灌洗并收集肺泡灌洗液;分离右肺组织,将右上肺组织置于 10% 福尔马林中固定 24 h,将剩余的肺组织于 -80℃ 保存。

1.3.4 大鼠肺组织 HE 染色及病理评分

取固定后的肺组织,依次脱水、透明、包埋和 4 μm 连续切片。将切片按步骤行苏木精和伊红染色。封片后在光镜下每张切片随机取 10 个视野观察,并参照 Turhan 等^[10]方法进行评分,即按 3 个特征分为 0~4 分,(1)白细胞浸润范围:0 分为 0%,1 分为 0~25%,2 分为 >25%~50%,3 分为 >50%~75%,4 分别为 >75%~100%;(2)肺泡腔白细胞量:0=无,1=偶有,2=大量,3=几乎充满肺泡腔,4=肺泡腔充满白细胞并扩张;(3)肺泡腔渗出物量:0=无渗出物,1=偶见,2=清晰可见,3=几乎充满,4=肺泡腔充满渗出物并扩张。

1.3.5 大鼠肺组织湿/干重比(W/D)测定

取部分右下肺组织,吸干表面水分并称量其湿重(W)后,将其置烤箱中,设置烘干温度为 70℃,烘烤 24 h 至恒重,称量并记录干重(D),计算肺组织 W/D。

1.3.6 大鼠肺组织 MDA、SOD、MPO 检测

取部分肺组织匀浆后离心,采用比色法检测上清液丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)以及髓过氧化物酶(MPO)水平,操作严格按照试剂盒说明进行。

1.3.7 ELISA 法检测大鼠血清及肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平

将采集的血样和肺泡灌洗液离心后取上清液,

ELISA 法检测 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量,均按相应试剂盒说明操作,最后使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值,并根据绘制的标准曲线计算各样品中待测指标含量水平。

1.3.8 Western blot 检测大鼠肺组织相关蛋白表达

使用 BCA 法定量提取的肺组织蛋白后,取 40 μg 蛋白上样经 SDS-PAGE 电泳转印至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,分别加入 GAPDH、JNK、p-JNK 一抗 4℃ 孵育过夜;洗膜后加入二抗,室温继续孵育 2 h;使用 ECL 法显色,Image J 分析条带灰度值。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 统计数据,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料,多组间比较采取单因素方差分析,两两比较使用 SNK 法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗汉果皂苷 V 对 MAS 大鼠肺组织病理损伤的影响

光镜下可见假手术组大鼠肺泡腔清晰,肺泡及间质无明显充血、渗出及炎症细胞浸润,肺组织病理评分为(4.14±0.26)分;模型组大鼠肺泡壁毛细血管充血,肺泡腔及间质渗出增多,炎性细胞浸润明显,肺组织病理评分为(7.29±2.11)分,较假手术组明显升高($P < 0.05$);低剂量罗汉果皂苷 V 处理后肺组织损伤及炎性细胞浸润有所改善,肺组织病理评分为(6.95±2.93)分,但与模型组比较无统计学差异($P > 0.05$),而中高剂量罗汉果皂苷 V 及地塞米松处理后,肺组织损伤明显减轻,炎性细胞浸润显著改善,肺组织病理评分分别为(6.24±0.82)分、(5.46±0.71)分和(5.59±0.85)分,均较模型组明显降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 罗汉果皂苷 V 对 MAS 大鼠 PaO₂、W/D 及 MPO 水平的影响

与假手术组比较,模型组 W/D 及肺组织 MPO 水平升高($P < 0.05$),PaO₂ 水平降低($P < 0.05$);与模型组比较,罗汉果皂苷 V 中、高剂量组及地塞米松组 W/D 及肺组织 MPO 水平均降低($P < 0.05$),PaO₂ 水平升高($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 罗汉果皂苷 V 对 MAS 大鼠炎症细胞因子水平的影响

与假手术组比较,模型组肺泡灌洗液及血清

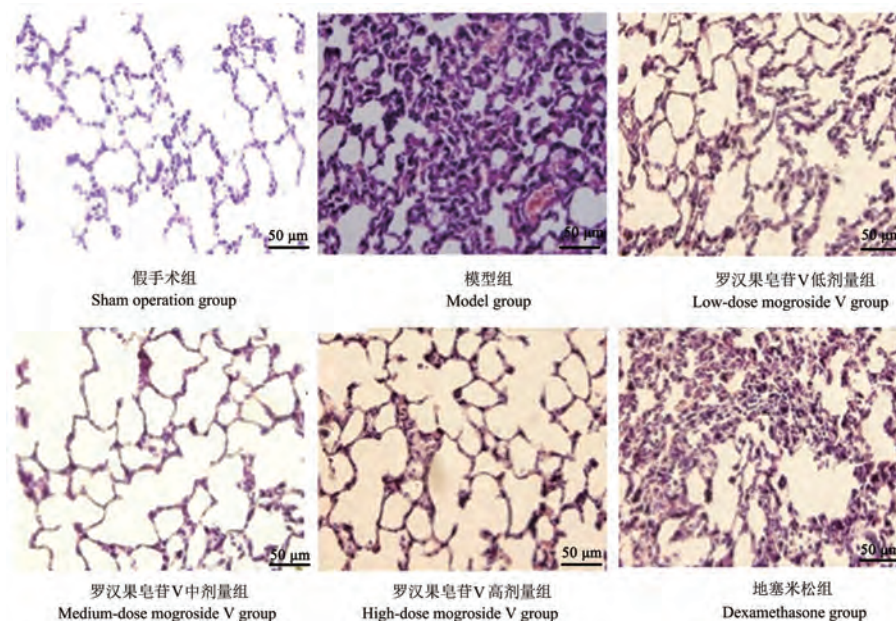
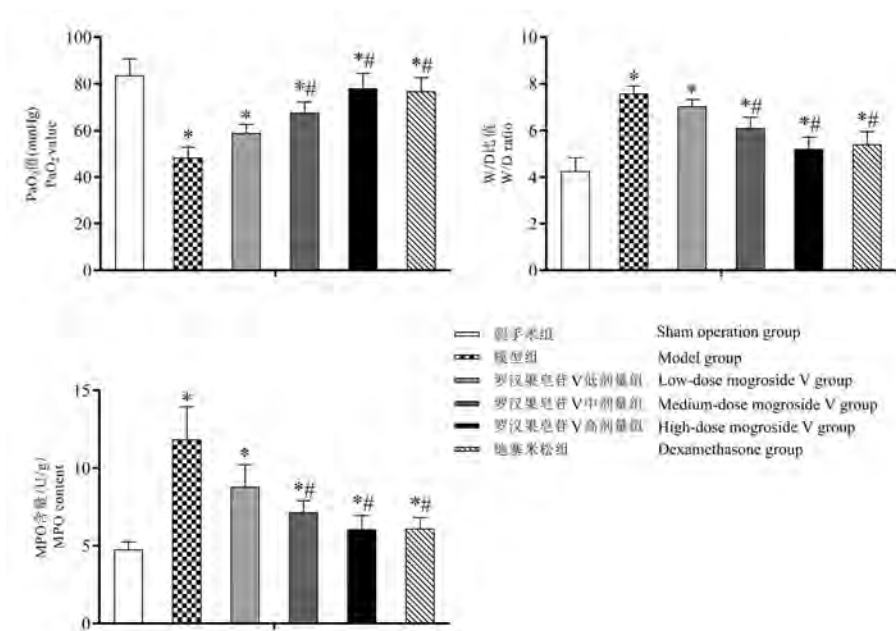


图 1 各组大鼠肺组织病理改变

Figure 1 Pathological changes of lung tissues of rats in each group



注:与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠 PaO₂、W/D 及 MPO 水平比较

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of PaO₂, W/D and MPO levels of rats in each group

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 罗汉果皂苷 V 中、高剂量组及地塞米松组肺泡灌洗液及血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

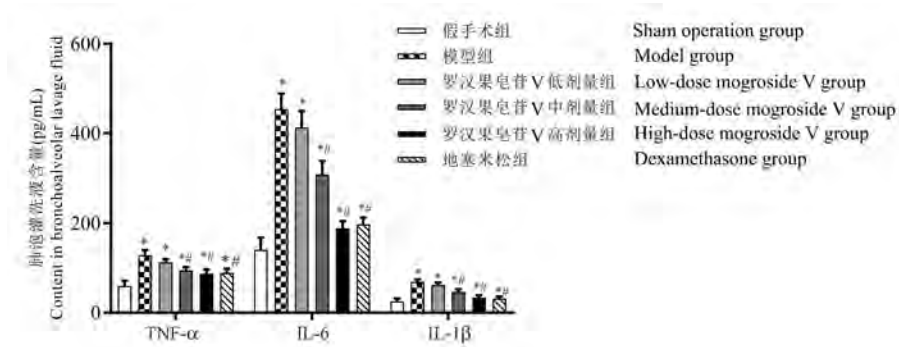
2.4 罗汉果皂苷 V 对 MAS 大鼠肺组织 SOD、MDA 水平的影响

与假手术组比较, 模型组 MDA 水平升高 ($P < 0.05$), SOD 水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 罗

汉果皂苷 V 中、高剂量组及地塞米松组 MDA 水平降低 ($P < 0.05$), SOD 水平升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.5 罗汉果皂苷 V 对 MAS 大鼠 JNK 信号通路的影响

与假手术组比较, 模型组 p-JNK 水平升高 ($P < 0.05$), JNK 水平无显著改变 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 罗汉果皂苷 V 中、高剂量组 p-JNK 水平降低 ($P < 0.05$), JNK 水平无显著改变 ($P > 0.05$)。见图 6。

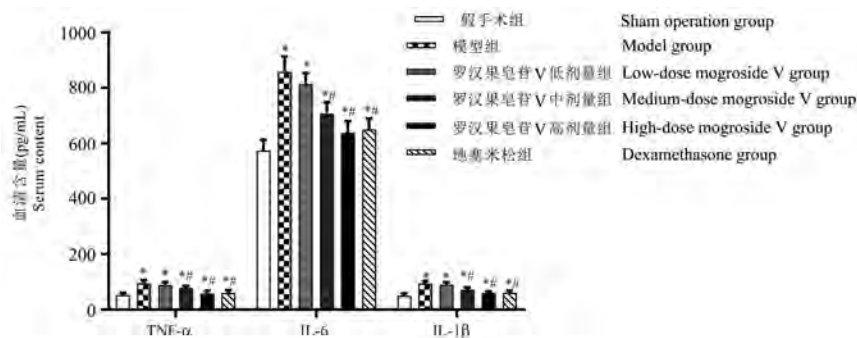


注: 与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Comparison of TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels in bronchoalveolar lavage fluid of rats in each group

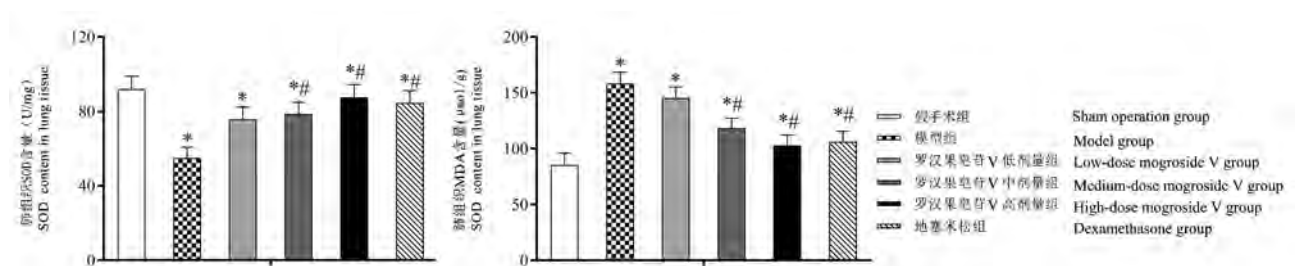


注: 与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平比较

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of serum TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels of rats in each group

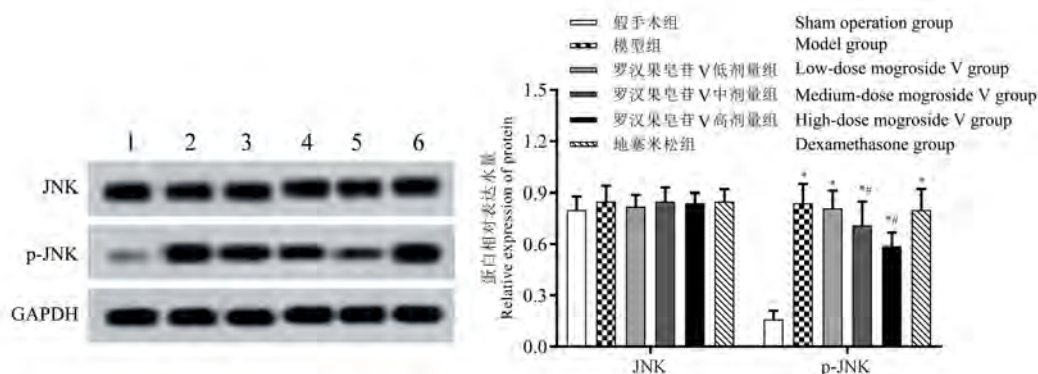


注: 与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠肺组织 SOD、MDA 水平比较

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Comparison of SOD and MDA levels in lung tissues in each group



注:1:假手术组;2:模型组;3~5:罗汉果皂苷 V 低、中、高剂量组;6:地塞米松组。与假手术组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠肺组织 JNK、p-JNK 蛋白表达

Note. 1, Sham operation group. 2, Model group. 3~5, Low-dose, medium-dose and high-dose mogroside V groups. 6, Dexamethasone group.

Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 6 Expressions of JNK and p-JNK proteins in the lung tissues of rats in each group

3 讨论

炎症及氧化应激损伤已被证实是 MAS 诱导急性肺损伤的重要机制。地塞米松作为临床上常用的激素类药物,被证实能通过抑制炎症因子形成对急性肺损伤具有保护作用,但糖皮质激素可能导引起新生儿感染、消化道出血等副作用,其临床应用受限。本实验选择地塞米松作为阳性对照药物,探讨罗汉果皂苷 V 对 MAS 急性肺损伤的保护作用。本研究中采用经口直视气管插管法建立新生大鼠 MAS 模型,在注入胎粪后大鼠出现呼吸、肤色改变等明显的急性肺损伤表现,组织病理学分析发现模型组大鼠肺组织间隙渗出较多,炎性浸润明显,符合 MAS 急性肺损伤的病理改变^[11]。另外模型组肺 W/D 较假手术组增加,由此可见本研究成功构建了大鼠 MAS 模型。罗汉果皂苷 V 是从罗汉果中提取的天然产物,据报道罗汉果皂苷 V 在小鼠过敏性哮喘模型中显示出抗炎作用^[12]。本研究结果显示,使用 5、10 mg/kg 罗汉果皂苷 V 处理 MAS 大鼠明显降低了促炎细胞因子、W/D、MPO 水平以及肺组织病理损伤,且不同剂量罗汉果皂苷 V 的作用效果表现出明显的剂量依赖趋势,其中高剂量的罗汉果皂苷 V 抗炎、改善 W/D 及肺组织病理损伤的效果与 0.5 mg/kg 地塞米松相近,对 MAS 模型大鼠显示出良好的治疗潜力。

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 是参与 MAS 急性肺损伤炎症过程的典型细胞因子,主要由单核细胞和巨噬细胞释放^[13]。本研究评估了各组促炎细胞因子水平

变化,发现 MAS 模型血液和肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 显著升高,而 5、10 mg/kg 罗汉果皂苷 V 治疗组上述促炎细胞因子水平显著下降。此外,本研究检测到胎粪吸入后 6 h 左右, MAS 模型大鼠肺组织中 MPO 水平明显升高, MPO 是中性粒细胞的激活标志,证明 MAS 病程中存在中性粒细胞过度活化,炎症因子的过度表达。在肺组织病理学检查中,同样也发现炎症细胞数量减少。水肿是炎症的典型特征,罗汉果皂苷 V 被报道有抑制小鼠耳水肿的作用。本研究测定了取样肺组织的 W/D 比值,结果提示与模型组相比, 5、10 mg/kg 罗汉果皂苷 V 可降低 W/D 比值,提示其对肺水肿有抑制作用。以上这些结果提示罗汉果皂苷 V 对 MAS 急性肺损伤的保护作用可能与抑制炎症反应有关。

氧化应激是 MAS 致急性肺损伤的另一机制。氧化应激使肺组织内对抗氧化损伤的抗氧化酶 SOD 活力降低,脂质过氧化产物产生增加^[14]。MDA 是体现脂质过氧化程度的重要标志物,相关报道显示 MDA 水平与肺损伤大鼠病情程度具有紧密联系^[15],本研究结果提示 5、10 mg/kg 罗汉果皂苷 V 升高 SOD 活力,减少肺组织 MDA 形成,以抑制氧化应激对 MAS 新生大鼠的肺损伤作用。JNK 信号转导通路是介导炎症介质和氧化应激产生的途径之一。既往研究显示, JNK 激活可能激活下游信号通路触发炎症状态,加剧 MAS 进展^[16]。JNK 磷酸化是其活化并促进下游靶基因表达的关键标志,为阐明罗汉果皂苷 V 抗炎、抗氧化作用的可能分子机制,本研究中使用 Western blot 实验分析了 JNK 及

p-JNK 蛋白的表达变化,结果发现 MAS 模型组 p-JNK 蛋白表达显著上调,而中、高剂量罗汉果皂苷 V 可以明显抑制 JNK 的磷酸化水平,因此推测罗汉果皂苷 V 可能通过抑制 JNK 磷酸化激活,减轻新生大鼠 MAS 病程中炎性和氧化应激损伤。Shi 等^[9]研究发现,罗汉果皂苷 V 对 LPS 诱导的急性肺损伤具有保护作用,其机制与抑制核因子 κ B 的激活有关。NF- κ B 是 Toll 样受体信号通路的下游转录因子,Toll 样受体家族在识别 LPS 等配体后激活并引起 NF- κ B 的活化,促进促炎细胞因子的释放^[17];而在 MAS 病程中,诱发肺部炎症反应的始动因素为胎粪吸入,其所涉及的信号通路与 LPS 诱导的急性肺损伤可能不同;结合本研究结果笔者认为罗汉果皂苷 V 改善 MAS 急性肺损伤的机制不同于上述报道。

综上所述,罗汉果皂苷 V 可能通过抑制 JNK 磷酸化激活,减轻 MAS 病程中炎性和氧化应激损伤而发挥急性肺损伤保护作用。

参考文献:

- [1] 黄静,林新祝. 新生儿胎粪吸入综合征并发肺出血的临床特征及预后分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(11): 6-10.
- [2] 姜莉,李宇宁,张兴道,等. 牛肺表面活性物质治疗新生儿胎粪吸入综合征的疗效研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(1): 135-138.
- [3] Kumar A, Kumar P, Basu S. Endotracheal suctioning for prevention of meconium aspiration syndrome: a randomized controlled trial [J]. Eur J Pediatr, 2019, 178(12): 1825-1832.
- [4] Liu H, Wang C, Qi X, et al. Antiglycation and antioxidant activities of mogroside extract from *Siraitia grosvenorii* (Swingle) fruits [J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(5): 1880-1888.
- [5] Tao L, Yang J, Cao F, et al. Mogroside III E, a novel anti-fibrotic compound, reduces pulmonary fibrosis through toll-like receptor 4 pathways [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2017, 361(2): 268-279.
- [6] Chen J, Jiao D, Li Y, et al. Mogroside V inhibits hyperglycemia-induced lung cancer cells metastasis through reversing EMT and damaging cytoskeleton [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2019, 19(11): 885-895.
- [7] 黄文蔚,洪李锋,郭璠,等. 罗汉果皂苷对阿霉素心肌损伤大鼠氧化应激和凋亡调节作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(6): 39-42.
- [8] 宋嘉. 胎粪吸入诱导新生大鼠急性肺损伤信号通路及西地那非作用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [9] Shi DF, Zheng M, Wang Y, et al. Protective effects and mechanisms of mogroside V on LPS-induced acute lung injury in mice [J]. Pharm Biol, 2014, 52(6): 729-734.
- [10] Turhan AH, Atc A, Muslu N, et al. The effects of pentoxifylline on lung inflammation in a rat model of meconium aspiration syndrome [J]. Exp Lung Res, 2012, 38(5): 250-255.
- [11] 吴芳,李宛卫,陈龙,等. 采用新生大鼠制备胎粪吸入综合征动物模型的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(19): 2148-2152.
- [12] Song J, Qian B, Pan C, et al. Protective activity of mogroside V against ovalbumin-induced experimental allergic asthma in Kunming mice [J]. J Food Biochem, 2019, 43(11): e12973.
- [13] 杨莉,郑建臣,王玉华,等. 桑黄素对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠的保护作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(20): 2438-2445.
- [14] Kopincova J, Mikolka P, Kolomaznik M, et al. Modified porcine surfactant enriched by recombinant human superoxide dismutase for experimental meconium aspiration syndrome [J]. Life Sci, 2018, 203(1): 121-128.
- [15] 陈芋熹,史佳,吴建华,等. 外源性 NAD 对大鼠内毒素性急性肺损伤时线粒体膜电位的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(12): 1506-1508.
- [16] Li GQ, Chen M. Cardioprotective effect of erythropoietin in rats with acute myocardial infarction through JNK pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 153-160.
- [17] Kopincova J, Mikolka P, Kolomaznik M, et al. Selective inhibition of NF- κ B and surfactant therapy in experimental meconium-induced lung injury [J]. Physiol Res, 2017, 66(2): 227-236.

[收稿日期] 2022-07-01

唐津天,唐润娟. miR-30 靶向调控 Zeb2 相关通路抑制胆囊癌细胞 EMT 进程 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 69-75.
Tang JT, Tang RJ. miR-30 inhibits EMT of gallbladder cancer cells via Zeb2-related pathways [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 69-75.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.010

miR-30 靶向调控 Zeb2 相关通路抑制 胆囊癌细胞 EMT 进程

唐津天^{1*}, 唐润娟²

(1.新疆维吾尔自治区肿瘤医院肝胆胰外科,乌鲁木齐 830000;2.新疆医科大学第二附属医院康复科,乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨小 RNA-30(miR-30)在胆囊癌(GBC)上皮间充质转化(EMT)进程中的作用和潜在机制。**方法** qRT-PCR 用于检测胆囊上皮细胞和癌细胞系 miR-30 相对表达水平;过表达 miR-30 后采用 MTT、平板克隆实验用于检测细胞增殖能力;细胞划痕实验和 Transwell 小室试验分别评估细胞迁移和侵袭能力;Western blot 用于评估细胞 EMT 相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin)和 EMT 相关转录因子(Snail、Slug 和 Zeb2)的表达水平。拯救实验用于探索 miR-30 与 Zeb2 的靶向调控关系。**结果** miR-30 在 2 个代表性 GBC 细胞系(GBC-SD 和 NOZ)中明显下调($P<0.05$)。过表达 miR-30 会抑制 GBC-SD 细胞增殖、克隆形成、细胞迁移、细胞侵袭和 EMT 过程($P<0.05$),而过表达 Zeb2 可以逆转 miR-30 导致的 EMT 抑制作用($P<0.05$)。**结论** miR-30 通过靶向 Zeb2 减弱 GBC 细胞的 EMT 进展,表明 miR-30 是一种肿瘤抑制因子,可作为 GBC 的新型潜在分子治疗靶点。

【关键词】 胆囊癌;miR-30;Zeb2;EMT

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0069-07

miR-30 inhibits EMT of gallbladder cancer cells via Zeb2-related pathways

TANG Jintian^{1*}, TANG Runjuan²

(1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Xinjiang Cancer Hospital, Urumqi 830000, China.
2. Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

【Abstract】 Objective This study aimed to explore the role and potential mechanism of miR-30 in EMT of gallbladder cancer (GBC). **Methods** qRT-PCR was used to measure the relative expression level of miR-30 in gallbladder epithelial cells and cancer cell lines. After overexpression of miR-30, MTT and colony formation assays were used to assess cell proliferation. Wound healing and Transwell assays were used to evaluate cell migratory and invasive abilities, respectively. Western blot was used to evaluate the expression levels of EMT-related proteins (E-cadherin, N-cadherin and Vimentin) and EMT-related transcription factors (Snail, Slug and Zeb2). A rescue experiment was carried to explore the regulatory relationship between miR-30 and Zeb2. **Results** miR-30 was significantly downregulated in two representative GBC cell lines (GBC-SD and NOZ) ($P<0.05$). Overexpression of miR-30 inhibited GBC-SD cell proliferation, colony formation, migration, invasion and EMT ($P<0.05$). Overexpression of Zeb2 reverses the EMT inhibitory effect caused by miR-30 ($P<0.05$). **Conclusions** miR-30 attenuates EMT of GBC cells by targeting Zeb2, which indicates that miR-30 is a tumor suppressor and can be used as a novel therapeutic target for GBC.

【Keywords】 gallbladder cancer; miR-30; Zeb2; EMT

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2021D01C399)。

[作者简介] 唐津天(1981—),男,博士研究生,副主任医师,研究方向:肝胆胰良恶性肿瘤的诊断和治疗。E-mail: pzgtud@163.com

胆囊癌(gallbladder carcinoma, GBC)是胆管疾病中最常见和最具侵袭性的恶性肿瘤,该病的全球发病率每年增加^[1],患者的5年生存率<5%^[2]。尽管诊断和治疗的技术有所进步,但GBC的临床结果并没有显著改善,因为早期转移和延误的诊断^[3]。手术切除是目前唯一有效的治疗方法,因为缺乏能够减轻或预防GBC转移的治疗方案^[4]。因此,阐明介导GBC发生和进展的分子机制具有重要的意义。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为18~25个核苷酸的小型非编码RNA分子^[5]。作为基因表达的内源性抑制因子,miRNA可以直接与特定目标信使RNA(mRNA)的3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'-UTR)结合,以诱导mRNA降解或抑制蛋白质翻译^[6]。因此,这些小分子可以作为肿瘤启动子或抑制子^[7]。在这些miRNA中,位于染色体区域6q13的miR-30已被报道在几种人类癌症中失调^[8-11]。然而,miR-30在GBC中的具体角色和潜在作用机制仍然未知。

因此,在本研究中,我们探索了miR-30在GBC细胞系中的肿瘤抑制作用及其对上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进展的影响。我们发现miR-30可能是通过调控E盒结合锌指蛋白2(zinc finger E-box binding protein 2, Zeb2)介导EMT进程的关键因子。

1 材料和方法

1.1 细胞

人GBC细胞系GBC-SD和NOZ购自中国科学院上海生命科学研究院;正常人胆囊上皮细胞系HGBEC购自美国ATCC细胞库。GBC-SD和NOZ细胞系在高糖DMEM培养基中培养,HGBEC细胞系在RPMI 1640中培养。培养基均补充10%胎牛血清,细胞系均在37℃和5% CO₂的湿润环境下培养。

1.2 主要试剂与仪器

高糖DMEM培养基(美国Gibco公司);RPMI 1640培养基(美国HyClone公司);胎牛血清(美国Gibco公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);miR-X miRNA First-Strand Synthesis 逆转录试剂盒、miR-X miRNA qRT-PCR SYBR 试剂盒(美国Clontech Laboratories公司);pCMV表达载体(上海龙钱生物科技有限公司);Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);MTT试剂盒(日本Dojindo公司)

8 μm小室、Matrigel胶(美国BD Biosciences公司);结晶紫(美国Sigma公司);RIPA蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);一抗[兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、β-肌动蛋白(β-actin)和HRP偶联的二抗(美国Cell Signaling Technology公司)。酶标仪(美国Bio-Rad公司);化学发光系统(美国Millipore公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 寡核苷酸、质粒构建及细胞转染和分组

合成miRNA模拟物(miR-mimic)以及阴性对照物(miR-NC)购自上海百奥生物技术有限公司。将全长Zeb2 cDNA(GenBank ID号:NM_9839)克隆到pCMV表达载体(Zeb2)中,空载质粒(Vector)用作阴性对照。GBC-SD细胞接种在6孔板中并使用Lipofectamine 2000进行转染。根据转染物不同,将细胞分为空白组、miR-30阴性对照组和miR-30转染组,空白组细胞不给予任何处理,正常培养;miR-30阴性对照组和miR-30转染组分别转染miR-30 NC和miR-30 mimic。另将细胞分为miR-30阴性对照组、miR-30转染组、miR-30转染+Zeb2阴性对照组和miR-30转染+Zeb2转染组,分别转染miR-30 NC、miR-30 mimic、miR-30 mimic+共表达质粒Zeb2 Vector和miR-30 mimic+共表达质粒Zeb2至GBC-SD细胞。miRNA的序列用Primer Premier 4.0软件设计,如下所示:miRNA-NC F: 5'-TCTGAGGCTAA CCACGGTCTGTA-3'和R: 5'-CTGATTAAGTGTTCAT ACTCATAC; miR-30 mimic F: 5'-TGTAACATCC TACTCTCAGC-3'和R: 5'-CTCGCTTCGGCAGC ACACCGACT-3'。质粒转染:在每个6孔板中加入2 μg质粒,持续48 h,然后用G418(200 μg/mL)处理细胞。

1.3.2 qRT-PCR

用TRIzol试剂从培养的正常人胆囊上皮细胞系HGBEC及GBC-SD和NOZ细胞系以及空白组、miR-30阴性对照组和miR-30转染组细胞中提取总RNA,并使用miR-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 逆转录为cDNA。随后使用miR-X miRNA qRT-PCR SYBR 试剂盒通过聚合酶链式反应扩增并测量目的RNA表达。核内小RNAU6作为内参。相对RNA表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法定量。本文所用引物用Primer Premier 4.0软件设计,序列如下所示:miR-

30 F: 5'-CAGCTGCAAACATCCGACTG-3' 和 R: 5'-GCCACTGTAAACATCCTCGAC-3'; U6 F: 5'-CCCTTCGGGACATCCGATA-3' 和 R: 5'-TTTGTGCGTGT CATCCTTGC-3'。

1.3.3 MTT

根据制造商的说明,通过 MTT 试剂盒评估 miR-30 阴性对照组和 miR-30 转染组细胞增殖,并通过酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度。

1.3.4 平板克隆试验

miR-30 阴性对照组和 miR-30 转染组细胞接种在 6 孔板中,培养 14 d。用 4% 多聚甲醛固定细胞并用 0.1% 结晶紫染色,计算每个细胞系的克隆总数。

1.3.5 细胞迁移

将 miR-30 阴性对照组和 miR-30 转染组细胞接种在无血清培养基中的 6 孔板中并生长至 90% 密度,用无菌 200 μ L 移液器尖端在培养皿正中线处垂直划痕。在划痕伤口放置后 0 h 和 48 h 测量划痕面积,计算迁移率。

1.3.6 细胞侵袭

使用 24 孔板中的 8 μ m 小室过滤器进行细胞迁移和侵袭测定。miR-30 阴性对照组和 miR-30 转染组(每毫升 3×10^4 个)细胞接种在上室,用 Matrigel 胶包被。细胞在 200 μ L 无血清培养基中培养。将 500 μ L 补充有 10% FBS 的培养基加入下室。细胞培养 24 h,然后将迁移到下部隔室并粘附膜上的细胞用甲醇固定并用结晶紫染色。对细胞进行拍照,对每个孔中随机选择的 3 个视野中的细胞进行计数。

1.3.7 Western blot

RIPA 蛋白提取试剂盒用于提取 miR-30 阴性对照组、miR-30 转染组、miR-30 转染+Zeb2 阴性对照组和 miR-30 转染+Zeb2 转染组细胞内总蛋白。等量的细胞蛋白用 SDS-PAGE 电泳分离,转移到 PVDF 膜上,用适当的一抗(兔抗 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug、Zeb2 和 β -actin)和 HRP 偶联的二抗孵育。化学发光系统用于印迹显影。

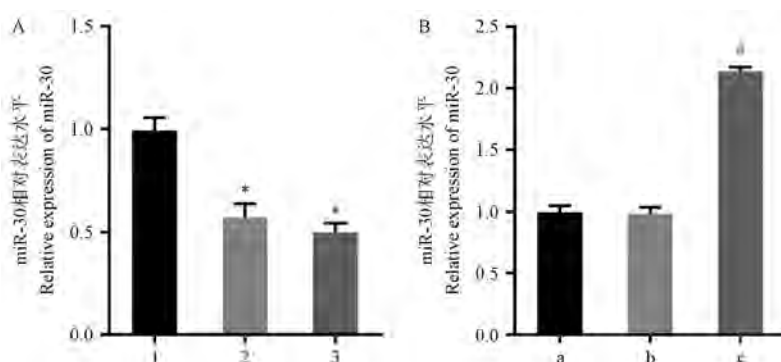
1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 19.0 软件进行分析。两组之间平均表达水平的差异通过独立样本 *t* 检验进行评估。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30 在正常和胆囊癌细胞中的表达水平差异

我们验证了 miR-30 在正常胆囊上皮细胞和胆囊癌细胞的表达水平,以确定 miR-30 在胆囊癌细胞中的角色,结果显示同正常胆囊细胞上皮细胞相比,两种胆囊癌细胞 GBC-SD 和 NOZ 中 miR-30 表达水平明显下调,具有统计学差异($P < 0.05$) (图 1A)。为了观察 miR-30 对 GBC-SD 细胞生物学功能的改变,我们通过转染 miR-30 mimic 或其阴性对照 miRNA 探索其对细胞增殖的影响。如图 1B 所示,同转染 miR-30 阴性对照组细胞相比,转染 miR-30 mimic (miR-30 转染组)细胞 miR-30 表达水平显著



注:1:人胆囊上皮细胞 HGBEC;2:人胆囊癌细胞 GBC-SD;3:人胆囊癌细胞 NOZ。a:空白组;b:miR-30 阴性对照组;c:miR-30 转染组。与人胆囊上皮细胞 HGBEC 相比, * $P < 0.05$;与 miR-30 阴性对照组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 miR-30 在正常和胆囊癌细胞中的表达水平差异

Note. 1, Gallbladder epithelial cells HGBEC. 2, Human gallbladder cancer cells GBC-SD. 3, Human gallbladder cancer cells NOZ. a, Control group. b, miR-30 negative control group. c, miR-30 transfection group. Compared with the human gallbladder epithelial cell HGBEC, * $P < 0.05$. Compared with the miR-30 negative control group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Difference in the expression level of miR-30 between normal and gallbladder cancer cells

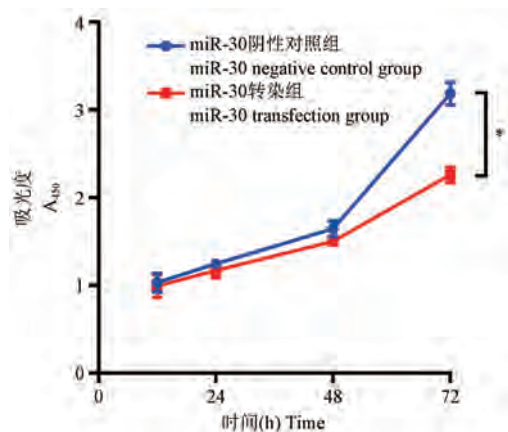
上调($P<0.05$)。而空白组和阴性对照组之间没有显著的统计学差异($P>0.05$)。

2.2 过表达 miR-30 可以明显抑制 GBC-SD 细胞增殖

通过 MTT 试验检测细胞增殖能力的改变。如图 2 所示,同 miR-30 阴性对照组细胞相比,miR-30 转染组细胞增殖能力明显抑制($P<0.05$)。

2.3 过表达 miR-30 可以明显抑制 GBC-SD 细胞克隆形成

通过平板克隆试验检测细胞增殖数目的改变。如图 3 所示,同 miR-30 阴性对照组的细胞数目相比,miR-30 转染组细胞增殖数目明显减少($P<0.05$)。

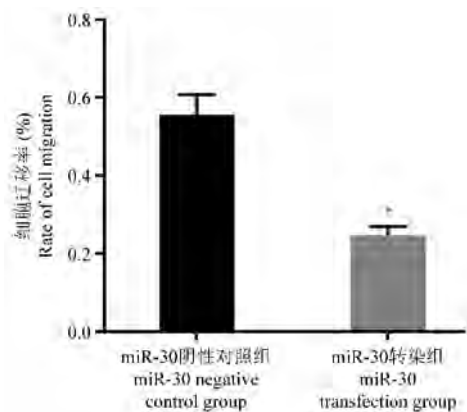


注:与 miR-30 阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 2 miR-30 和 miR-NC 对 GBC-SD 细胞增殖的影响

Note. Compared with miR-30 negative control group, * $P<0.05$.

Figure 2 Effects of miR-30 and miR-NC on the proliferation of GBC-SD cells



注:与 miR-30 阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 miR-30 和 miR-NC 对 GBC-SD 细胞迁移能力的影响

Note. Compared with miR-30 negative control group, * $P<0.05$.

Figure 4 Effects of miR-30 and miR-NC on the migratory ability of GBC-SD cells

2.4 过表达 miR-30 可以明显抑制 GBC-SD 细胞迁移能力

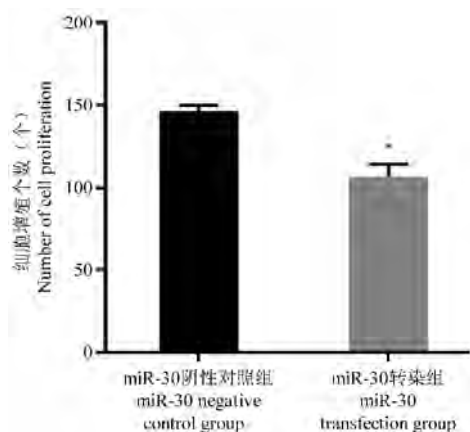
通过划痕试验检测细胞迁移能力改变。如图 4 所示,同 miR-30 阴性对照组细胞相比,miR-30 转染组细胞迁移率明显降低($P<0.05$)。

2.5 过表达 miR-30 可以明显抑制 GBC-SD 细胞侵袭能力

通过 TransWell 小室试验检测细胞迁移能力改变。如图 5 所示,同 miR-30 阴性对照组细胞相比,miR-30 转染组细胞侵袭明显减少($P<0.05$)。

2.6 过表达 miR-30 可以明显抑制 GBC-SD 细胞 EMT 进程

为了研究 miR-30 是否参与了 GBC-SD 细胞的

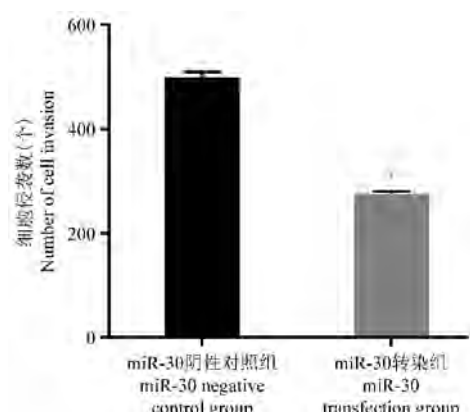


注:与 miR-30 阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 3 miR-30 和 miR-NC 对 GBC-SD 细胞克隆数目的影响

Note. Compared with miR-30 negative control group, * $P<0.05$.

Figure 3 Effects of miR-30 and miR-NC on the colony number of GBC-SD cell



注:与 miR-30 阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 5 miR-30 和 miR-NC 对 GBC-SD 细胞侵袭能力的影响

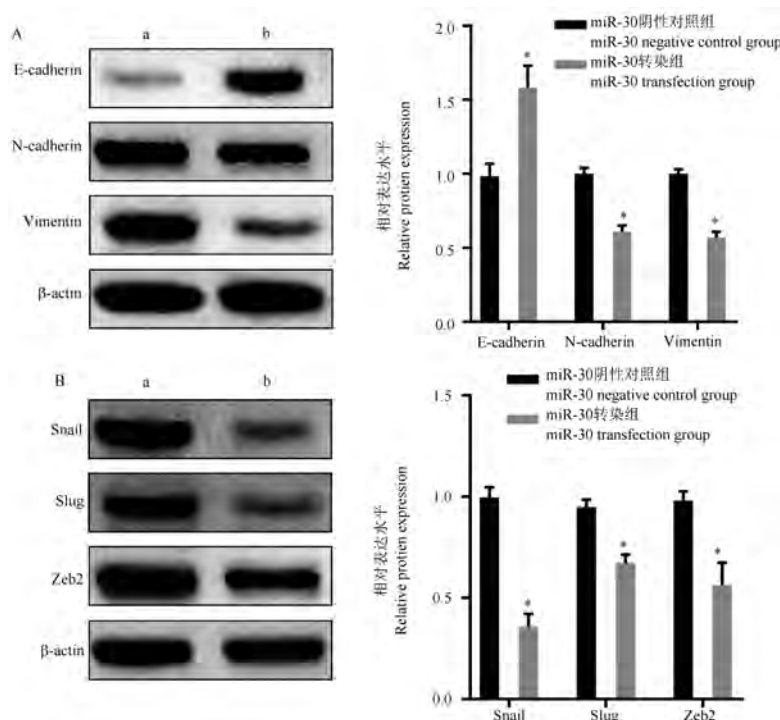
Note. Compared with miR-30 negative control group, * $P<0.05$.

Figure 5 Effects of miR-30 and miR-NC on the invasive ability of GBC-SD cells

EMT 进程,我们评估了细胞被 miR-30 或 miR-NC 处理后的 EMT 标志物蛋白 (E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin) 的表达水平,图 6 结果显示,同 miR-30 阴性对照组细胞相比, E-cadherin 表达水平在转染 miR-30 mimic 细胞中显著升高,而 N-cadherin 和 Vimentin 表达水平显著下降 ($P < 0.05$), EMT 相关转录因子 (Snail、Slug 和 Zeb2) 蛋白水平下调 ($P < 0.05$)。

2.7 过表达 Zeb2 可以逆转 miR-30 导致的 EMT 抑制作用

为验证 E-cadherin 能被 EMT 相关的转录因子 Zeb2 靶向结合,进行了拯救试验。共表达质粒 Zeb2 +miR-30 或其阴性对照物 Vector+miR-30 分别转染 GBC-SD 细胞,结果显示 Zeb2 可以明显逆转 miR-30 所引起的 EMT 相关蛋白 (E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin) 的表达水平 ($P < 0.05$) (图 7)。

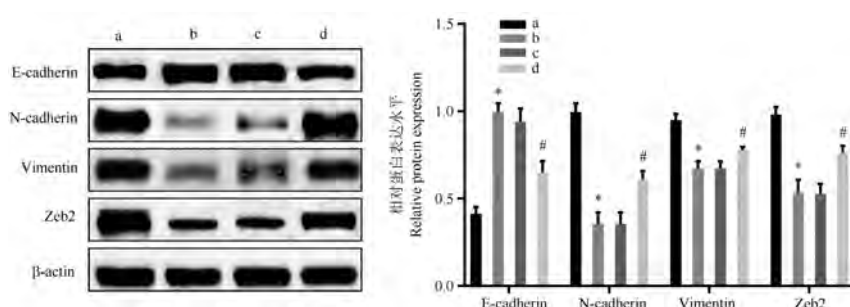


注:a;miR-30 阴性对照组;b;miR-30 转染组。与 miR-30 阴性对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 miR-30 和 miR-NC 对 GBC-SD 细胞 EMT 的影响

Note. a, miR-30 negative control group. b, miR-30 transfection group. Compared with miR-30 negative control group, * $P < 0.05$.

Figure 6 Effects of miR-30 and miR-NC on the EMT of GBC-SD cells



注:a;miR-30 阴性对照组;b;miR-30 转染组;c;miR-30 转染+Zeb2 阴性对照组;d;miR-30 转染+Zeb2 转染组。与 miR-30 阴性对照组相比, * $P < 0.05$;与 miR-30 转染+Zeb2 阴性对照组比较, # $P < 0.05$ 。

图 7 过表达 Zeb2 对 miR-30 引起 GBC-SD 细胞 EMT 的逆转作用

Note. a, miR-30 negative control group. b, miR-30 transfection group. c, miR-30 transfection+Zeb2 negative control group. d, miR-30 transfection+Zeb2 transfection group. Compared with miR-30 negative control group, * $P < 0.05$. Compared with miR-30 transfection+Zeb2 negative control group, # $P < 0.05$.

Figure 7 The reversal effect of overexpression of Zeb2 on the EMT of GBC-SD cells caused by miR-30

3 讨论

证据表明 miRNAs 在多种癌症中失调^[12],并作为肿瘤抑制因子或启动子发挥作用^[13]。研究揭示了 GBC^[14]中的许多 miRNA 特征,但 miRNA 在 GBC 中的发病机制中的确切作用仍不清楚。我们选择 miR-30 作为本研究的目标分子,表明了 miR-30 在 GBC 的发生和发展中起着重要作用。我们发现与正常胆囊上皮细胞相比,GBC 细胞中 miR-30 的表达显著下调。miR-30 家族的成员包括 miR-30b、miR-30c、miR-30d 和 miR-30e。作为一组肿瘤抑制因子,miR-30 家族在许多人类癌症中被下调,包括结直肠癌^[15]、肺癌^[16]、甲状腺癌^[17]和胃癌^[18]。我们证明 miR-30 显著抑制 GBC 细胞增殖、迁移和侵袭。

EMT 是一种生物学过程,通过该过程,上皮细胞失去极性和粘附能力,并获得间充质细胞的迁移和侵袭特性^[19]。EMT 在调节许多人类癌症的肿瘤侵袭和转移中起关键作用^[20-21]。miRNA 是 EMT 的关键的调节因子^[22],通过参与 EMT 相关信号通路并与 EMT 相关转录因子相互作用。例如,miR-30 通过直接靶向因子(Snail、Slug 和 Zeb2)3' UTR 抑制 EMT 的进展^[23]。Snail 是 EMT 的中心调节剂,已观察到它在所有 EMT 过程中发挥作用,并与侵入行为相关^[24]。Snail 通过直接调节上皮和间充质基因转录激活 EMT。Snail 通过其羧基末端锌指结构域与 E-cadherin 启动子区域上的 E-box DNA 序列结合抑制 E-cadherin 表达^[25]。Slug 是 Snail 超家族的另一个成员,在 EMT 进展中的作用与 Snail 类似,通过抑制 E-cadherin 表达和增强 Vimentin 和纤连蛋白表达行使功能^[24]。Slug 受 MMP-19 正向调控可与 Slug 启动子区域结合,随后激活的 Slug 可增加受体酪氨酸激酶 Axl 的表达,以通过正反馈环路维持 Slug 表达并稳定 GBC 细胞中的 EMT^[26]。Zeb2 是一种可驱动 EMT 的转录因子,其表达通常在 Snail 表达激活之后^[27]。Zeb2 在 GBC 侵袭位点高表达并通过抑制 E-cadherin 和 T-cadherin 表达并在转录水平增加 N-cadherin 和 Vimentin 表达提高侵袭潜力^[28]。在本研究中,我们发现用 miR-30 mimic 处理改变了 EMT 相关蛋白的表达,包括 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin。并阻止了 EMT 转录因子的 Snail、Slug 和 Zeb2 的上调。另外,过表达 miR-30 可以明显逆转 GBC-SD 细胞 EMT 进程。

我们在体外实验中证明了 miR-30 在 GBC 细胞增殖和迁移和侵袭中的关键作用,可能是通过靶向 EMT 相关转录因子 Zeb2。我们的研究结果提供了对 GBC EMT 进展机制的新见解,表明 miR-30 可能作为抑制 GBC 的新靶点。

参考文献:

- [1] Song X, Hu Y, Li Y, et al. Overview of current targeted therapy in gallbladder cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 230.
- [2] Baichan P, Naicker P, Devar JWS, et al. Targeting gallbladder cancer: a pathway based perspective [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(3): 2361-2369.
- [3] Erdem S, White RR. Incidental gallbladder cancer: permission to operate [J]. *Ann Surg Oncol*, 2020, 27(4): 980-982.
- [4] Lam R, Zakko A, Petrov JC, et al. Gallbladder disorders: a comprehensive review [J]. *Dis Mon*, 2021, 67(7): 101130-101135.
- [5] Sun HD. microRNA-195-5p inhibits malignant progression of gallbladder cancer by regulating Wnt3a [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(24): 7635-7642.
- [6] Panni S, Lovering RC, Porras P, et al. Non-coding RNA regulatory networks [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(6): 194411-194417.
- [7] An Y, Zhang Z, Shang Y, et al. miR-23b-3p regulates the chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ATG12 and HMGB2 [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(5): 1766-1769.
- [8] Yin H, Wang Y, Wu Y, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing of miR-29/miR-30 targets LOXL4 and contributes to tumorigenesis, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer [J]. *Theranostics*, 2020, 10(19): 8494-8512.
- [9] Sun T, Liu Z, Zhang R, et al. Long non-coding RNA LEF1-AS1 promotes migration, invasion and metastasis of colon cancer cells through miR-30-5p/SOX9 axis [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13(3): 2957-2972.
- [10] Huang XY, Zhang PF, Wei CY, et al. Circular RNA circMET drives immunosuppression and anti-PD1 therapy resistance in hepatocellular carcinoma via the miR-30-5p/snail/DPP4 axis [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 92-96.
- [11] Zhou J, Gong G, Tan H, et al. Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2915-2923.
- [12] He B, Zhao Z, Cai Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [13] Ferragut Cardoso AP, Udoh KT, States JC. Arsenic-induced changes in miRNA expression in cancer and other diseases [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 22(3): 115306-115310.
- [14] Tiwari PK. Epigenetic biomarkers in gallbladder cancer [J].

- Trends Cancer, 2020, 6(7): 540–543.
- [15] Huang X, Zhu X, Yu Y, et al. Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis [J]. Cancer Lett, 2021, 5(2): 66–82.
- [16] Zhong S, Golpon H, Zardo P, et al. miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer [J]. Transl Res, 2021, 23(2): 164–196.
- [17] Colombo C, Minna E, Gargiuli C, et al. The molecular and gene/miRNA expression profiles of radioiodine resistant papillary thyroid cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 245–247.
- [18] Baj J, Korona-Główniak I, Forma A, et al. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition and tumor microenvironment in helicobacter pylori-induced gastric cancer [J]. Cells, 2020, 9(4): 1055–1057.
- [19] Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133(3): 110909–110911.
- [20] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212–226.
- [21] Roy S, Sunkara RR, Parmar MY, et al. EMT imparts cancer stemness and plasticity: new perspectives and therapeutic potential [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2021, 26(2): 238–265.
- [22] El Bezawy R, Cominetti D, Fenderico N, et al. miR-875-5p counteracts epithelial-to-mesenchymal transition and enhances radiation response in prostate cancer through repression of the EGFR-ZEB1 axis [J]. Cancer Lett, 2017, 395(2): 53–62.
- [23] Cao G, Li S, Shi H, et al. Schisandrin B attenuates renal fibrosis via miR-30e-mediated inhibition of EMT [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 385(9): 114769–11473.
- [24] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition [J]. Cell Res, 2009, 19(2): 156–172.
- [25] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178–196.
- [26] Lee DG, Lee SH, Kim JS, et al. Loss of NDRG2 promotes epithelial-mesenchymal transition of gallbladder carcinoma cells through MMP-19-mediated Slug expression [J]. J Hepatol, 2015, 63(6): 1429–1439.
- [27] Fu X, Deng X, Xiao W, et al. Downregulation of NEAT1 sensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine through modulation of the miR-506-3p/ZEB2/EMT axis [J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(8): 3841–3856.
- [28] Adachi Y, Takeuchi T, Nagayama T, et al. Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer [J]. FEBS Lett, 2009, 583(2): 430–436.

[收稿日期] 2021-12-09

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgxydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

艾奎,李桢.紫菀酮改善 OVA 诱导哮喘 SD 幼鼠的免疫反应及 TLRs 的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 76-81.

Ai K, Li Z. Shionone improves immune responses and Toll-like receptor expression in ovalbumin-induced asthmatic rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 76-81.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.011

紫菀酮改善 OVA 诱导哮喘 SD 幼鼠的免疫反应及 TLRs 的表达

艾 奎,李 桢*

(武汉市第三医院光谷院区儿科,武汉 430074)

【摘要】 目的 研究紫菀酮对卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导哮喘 SD 幼鼠的 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 表达和免疫反应的影响。**方法** 将 24 只 SD 幼鼠随机分为对照组、模型组、紫菀酮组和地塞米松组,每组 6 只。观察幼鼠行为学变化,苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察治疗后肺组织病理学情况,qPCR 检测血浆中 TLRs mRNA 的表达量;ELISA 检测血清中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-13 的表达水平。**结果** 模型组幼鼠呼吸急促,打喷嚏口鼻发紫,分泌粘液,亢奋易怒;支气管粘膜充血水肿,支气管上皮细胞脱落,气道及肺组织周围有大量炎症细胞浸润。紫菀酮和地塞米松用药后,幼鼠呼吸较为平缓,粘液分泌减少,亢奋易怒也有所减少,但地塞米松组出现了攻击性增强的现象;支气管粘膜充血水肿的程度有所缓解,气道及肺组织周围炎症细胞的数量也有所减少。与模型组比,紫菀酮组和地塞米松组 TLR1、TLR9、TLR10 mRNA 的表达量显著升高 ($P < 0.01$),TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 mRNA 的表达量显著降低 ($P < 0.01$),TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-13 的水平显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 紫菀酮能够改善 OVA 诱导的哮喘 SD 幼鼠肺组织的炎症情况,并能使 TLRs 的表达量产生变化,为后续研究紫菀酮对 TLRs 信号通路的作用机制打下了基础。

【关键词】 紫菀酮;哮喘;免疫反应;Toll 样受体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0076-06

Shionone improves immune responses and Toll-like receptor expression in ovalbumin-induced asthmatic rats

AI Kui, LI Zhen*

(Department of Pediatrics, Guanggu Hospital Area, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430074, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of shionone on Toll-like receptor (TLR) expression and immune responses in ovalbumin (OVA)-induced asthmatic rats. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into four groups (six rats per group): control, model, shionone and dexamethasone. The behavioral changes of young mice were observed, as was their lung histopathology after hematoxylin and eosin staining. mRNA expression of TLRs in plasma was detected by qPCR, and serum expression levels of inflammatory cytokines tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-4 and IL-13 were detected by ELISA. **Results** Rats in the model group were short of breath, sneezed, displayed a purple nose and mouth, secreted mucus and were hyperactive and irritable. In addition, these rats exhibited bronchial mucosa hyperemia edema, bronchial epithelial cell death, and large numbers of infiltrating inflammatory cells in

[基金项目] 武汉市卫健委科研项目 (WZ21C52)。

[作者简介] 艾奎 (1974—),男,本科,主治医师,研究方向:儿科。E-mail: 826939800@qq.com

[通信作者] 李桢 (1972—),女,本科,主治医师,研究方向:儿内科。E-mail: 347541130@qq.com

the airway and lung tissue. After treatment with shionone and dexamethasone, young mice breathed more easily and exhibited decreased mucus secretion and irritability; however, aggression was increased in the dexamethasone group. The degree of hyperemia and edema of bronchial mucosa was relieved, and numbers of inflammatory cells around the airway and lung tissue were reduced. Compared with the model group, mRNA expression levels of TLR1, TLR9 and TLR10 in shionone and dexamethasone groups were significantly increased ($P < 0.01$), whereas mRNA expression levels of TLR2~TLR8 were significantly decreased ($P < 0.01$). Levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4 and IL-13 were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** Shionone can improve the immune response of OVA-induced SD rats and alter the expression of TLRs, laying the foundation for further study of the mechanism of shionone on TLR signaling pathways.

【Keywords】 shionone; asthma; immune response; Toll-like receptors

哮喘是最常见的呼吸道疾病之一,具有较高的发病率和死亡率,我国约有 4 千万人患有哮喘^[1]。哮喘起病早,多发于婴幼儿期,小儿哮喘的症状主要为咳嗽、胸闷、呼吸困难、反复发作的喘息等,且多发于凌晨和夜间,其病因主要包括遗传和环境等因素,空气污染、呼吸道感染、气候转变、过敏原、食物等均可诱发哮喘^[2-3]。气道慢性炎症是哮喘的主要特征,免疫功能紊乱是形成气道炎症的基础,而 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是固有免疫系统的主要组分,已被证实能够调节并加速气道炎症^[4-5]。

西医治疗哮喘的传统药物主要以糖皮质激素为主,短期内具有良好效果,但长期服用会产生耐药性和副作用,且停药后易复发^[6]。诸多研究表明中医药在治疗哮喘上具有明显优势,能有效改善哮喘患者的症状,降低气道高反应性^[7]。紫菀酮(shionone)是紫菀最主要的有效活性成分,具有抗炎作用,能够通过抑制炎症细胞因子的产生来减轻肺部炎症从而减轻哮喘^[8],由此推测紫菀酮作用下 TLRs 的表达可能也会受到影响。本研究首先构建卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导哮喘幼鼠模型,并用紫菀酮进行干预治疗,通过比较紫菀酮干预后 TLRs 表达量的变化及肺组织的炎症情况,从而找到紫菀酮治疗哮喘时差异表达的 TLRs,为后续深入探究紫菀对 TLRs 先天免疫反应信号通路的作用机制打下基础,并有望找到新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 5 日龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重为 18~22 g,来源于三峡大学[SCXK(鄂)2017-0012],在武汉华联科生物技术有限公司进行实验[SYXK(鄂)2018-0104],动物合格证号:No. 00288340,设施使用证号:NO. 320730208624181627。饲养条件:

室温 21℃~25℃,相对湿度 50%~70%,喂养过程中幼鼠自行摄食及饮水。实验过程中遵循了 3R 原则,经武汉华联科生物技术有限公司伦理审批委员会批准(HLK-20210801-01)。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠、卵清蛋白(美国 Sigma 公司;货号: P3761、A5503-50G);氢氧化铝、地塞米松(中国阿拉丁公司;货号: A110525-500 g、D137736-1 g);紫菀酮(上海源叶生物科技有限公司;货号: B21703-20 mg);二甲苯(北京沃凯生物科技有限公司;货号: 40091060);碳酸锂、冰醋酸、中性树脂(国药集团上海有限公司;货号: 20022818、10000218、213);伊红(中国 Solarbio 公司;货号: E8090);苏木素(上海碧云天生物技术有限公司;货号: C0107);TRIzol(美国 ambion 公司;货号: 15596026);SYBR FAST qPCR Master Mix(美国 KAPA Biosystems 公司;货号: KM4101);反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司;货号: 2690A);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-13 ELISA 试剂盒(中国 Bioswamp 公司;货号: RA20035、RA20020、RA20607、RA20088、RA20034)。

电子天平(舜宇光学科技有限公司;型号: FB124);手术直剪、显微剪、显微镊(上海金钟手术器械厂;型号: J21070、WA1020、WA3040);正置显微镜、石蜡切片机(徕卡显微系统有限公司;型号: DM1000、RM2235);摊片烤片机、生物组织包埋机(沈阳恒松科技有限公司;型号: TK7218、HS-B 型);PCR 仪(杭州柏恒科技有限公司;型号: GE48527);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司;型号: CFX-Connect 96);微量分光光度计、酶标分析仪、酶标洗板机(杭州奥盛仪器有限公司;型号: Nano-300、AMR-100、APW-200)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建及鉴定

SD 幼鼠适应性饲喂 3 d 后,在 1、14 d 分别注射

200 μL OVA (40 μL OVA+2 mg 氢氧化铝, 溶解于 200 μL 灭菌的 PBS 中) 致敏, 第 28~31 天每天用 5% OVA 雾化 30 min 激发哮喘发作, 随后鼻内注射 20 μL OVA (40 mg/mL) 1 次, 当幼鼠出现呼吸加快、口唇发钳、点头呼吸等哮喘症状时表示哮喘模型构建成功。末次雾化、滴鼻激发后观察 30~60 min, 依据症状(喷嚏、流涕、鼻痒)对幼鼠的行为学症状进行打分, 采用叠加量化加分的方法, 所得总分大于 5 分即建模成功。行为学症状分级评分标准见表 1。

1.3.2 实验分组及取材

将幼鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、紫菀酮组、地塞米松组, 每组 6 只。对照组幼鼠正常喂养, 不作处理; 模型组 OVA 诱导哮喘; 紫菀酮组 OVA 诱导哮喘后紫菀酮按照每日 80 mg/kg 剂量灌胃治疗, 连续 7 d; 地塞米松组 OVA 诱导哮喘后每天 1 次雾化吸入 10.5 mg/kg 剂量的地塞米松, 连续 7 d。最后 1 次给药后 2 h, 称体重, 麻醉处死, 取血分离血清, 接着迅速剥离右肺, 摘取右肺中叶, 置于 10% 福尔马林中固定备用, 其余肺组织标本放置去酶 EP 管中, 注入 RNAlate 试剂, 立即放入 4℃ 冰箱, 24 h 后转入 -80℃ 冰箱冻存备用。

1.3.3 行为学观察

滴鼻激发后观察幼鼠哮喘一般体征, 记录饮食、体重、哮喘一般体征包含是否烦躁不安, 呼吸是否困难, 口鼻是否有粘液等, 药物干预过程中观察幼鼠呼吸的变化。

1.3.4 HE 染色病理学观察

将固定好的右肺叶取横切面, 石蜡包埋后切片, 厚度约为 3 μm , 水浴展片并及时烤片, 按照苏木精-伊红染色法的步骤进行组织染色, 显微镜观察支气管粘膜及粘膜下炎症细胞浸润及酸性粒细胞的浸润情况。

1.3.5 qPCR 检测 TLRs 受体因子 (TLR1~TLR10) 的表达

TRIzol 法提取总 RNA, 后逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 扩增。扩增体系: SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH₂O 8 μL 。反应程序: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 5 s, 56℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 25 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。引物序列见表 2, PCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。

1.3.6 ELISA 检测支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达

按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-13 的表达水平。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 25.0 和 Excel 进行统计学分析, 数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。P<0.05 差异具有统计学意义。

表 1 SD 幼鼠行为学症状分级评分标准

Table 1 Behavioral symptom grading and scoring standards of young SD rats

评分 Score	喷嚏 (个) Sneeze (number)	流涕 Rhinorrhea	鼻痒 Rhinocnesmus
1	1~3	仅前鼻孔 Only anterior nares	轻度抓鼻 Mild scratch nose
2	4~10	超过前鼻孔 Beyond the anterior nares	频繁抓鼻 Often scratch nose
3	>11	流涕满面 Runny nose full face	持续抓鼻 Constant scratch nose

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	扩增片段 大小 (bp) Amplified fragment size
TLR1-F	TCTGGGATTGAGCGGTT	121
TLR1-R	ACACTTGGGATCTTCTTTTTC	
TLR2-F	TAGAAACGGTAACAATACGGAG	187
TLR2-R	AGATTTTCGCTGAGGCTAAG	
TLR3-F	TCTGCTTGCGAAGAGGAA	111
TLR3-R	TCCGAGACCCAAGTGCTAC	
TLR4-F	TGATGCATTGTGATCTACTCG	140
TLR4-R	TGGCAGCAATGGCTACAC	
TLR5-F	TTTCTTCGCTCCGTGCC	282
TLR5-R	TTGTGACTATGAGGGTGATGA	
TLR6-F	TGGTCTTTTCATCCGAATAGC	173
TLR6-R	GTGCTGGAGGGTCAGATTC	
TLR7-F	CAACTGTCCCTGCGAGAT	254
TLR7-R	CCAGACAAACCACACAGCA	
TLR8-F	GGAAGAGTGTATGAGCCATAG	245
TLR8-R	GGATGCGTCTTTGGTGTC	
TLR9-F	GAAACTGGATGTCAGTAGCAA	214
TLR9-R	CAGCAGTAAGTCTACAAAGGGT	
TLR10-F	TTCTGACTGACCTCCCTGG	121
TLR10-R	AGAGTCTTTACCTCCTGGCA	
GAPDH-F	CAAGTTCAACGGCAGAG	138
GAPDH-R	CCAGTAGACTCCACGACAT	

2 结果

2.1 模型鉴定及行为学变化

模型组的行为学症状为 (7.00 ± 0.89) 分, 表明模型构建成功。

对照组幼鼠呼吸和精神状态均正常; 实验前期模型组、紫菀酮组和地塞米松组幼鼠均出现呼吸急促, 打喷嚏口鼻发紫, 有粘液分泌, 亢奋易怒的情况; 紫菀酮组用药 3 d 后呼吸仍急促, 口鼻颜色呈紫红色, 4 d 后个别幼鼠出现怠惰嗜睡的情况, 用药后期幼鼠粘液分泌减少或消失, 呼吸趋于平缓, 亢奋易怒的情况也有所减少; 地塞米松组用药后期呼吸较为平缓, 仍打喷嚏, 但几乎不抓鼻, 还出现攻击性增强的情况, 而紫菀酮组未出现攻击性增强的现象。整个实验过程未出现幼鼠死亡, 所有实验正常进行。

2.2 SD 幼鼠肺组织病理学变化

HE 染色结果如图 1 所示。对照组幼鼠的肺泡和支气管正常, 无炎症细胞; 模型组的支气管粘膜充血水肿, 各级支气管上皮细胞呈现不同程度的脱

落, 气道及肺组织周围有大量炎症细胞浸润, 主要包括嗜酸性粒细胞、肥大细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等; 与模型组相比, 紫菀酮组和地塞米松组的支气管粘膜充血水肿的程度有所缓解, 气道及肺组织周围炎症细胞的数量也有所减少。

2.3 各组 TLRs 受体因子表达水平的比较

结果如表 3 所示。与对照组相比, 模型组 TLR1、TLR9、TLR10 mRNA 的表达量显著降低 ($P < 0.01$), TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 mRNA 的表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 紫菀酮组和地塞米松组 TLR1、TLR9、TLR10 mRNA 的表达量显著升高 ($P < 0.01$), TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8 mRNA 的表达量显著降低 ($P < 0.01$)。

2.4 各组炎症因子表达水平的比较

结果如表 4 所示。与对照组相比, 模型组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-13 的水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 紫菀酮组和地塞米松组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-13 的水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

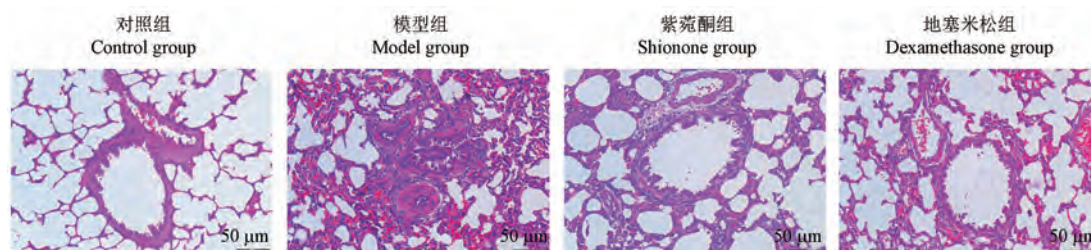


图 1 SD 幼鼠肺组织 HE 染色结果

Figure 1 HE staining results of lung tissue of young SD rats

表 3 各组 TLRs 受体因子表达水平的比较

Table 3 Comparison of TLRs receptor factor expression levels in each group

TLRs	对照组 Control group	模型组 Model group	紫菀酮组 Shionone group	地塞米松组 Dexamethasone group
TLR1	1.00±0.08	0.18±0.02 *	0.44±0.04 * [^]	0.33±0.02 * [^]
TLR2	1.01±0.12	4.19±0.32 *	2.33±0.19 * [^]	2.39±0.17 * [^]
TLR3	1.00±0.09	5.56±0.54 *	1.86±0.12 * [^]	2.36±0.21 * [^]
TLR4	1.01±0.11	4.17±0.28 *	1.82±0.15 * [^]	2.44±0.35 * [^]
TLR5	1.00±0.07	4.96±0.29 *	2.10±0.22 * [^]	2.16±0.21 * [^]
TLR6	1.00±0.10	5.51±0.47 *	2.15±0.18 * [^]	2.45±0.26 * [^]
TLR7	1.01±0.16	5.01±0.38 *	2.62±0.24 * [^]	2.33±0.16 * [^]
TLR8	1.01±0.17	5.19±0.38 *	1.98±0.12 * [^]	2.67±0.24 * [^]
TLR9	1.00±0.10	0.19±0.02 *	0.45±0.04 * [^]	0.32±0.02 * [^]
TLR10	1.00±0.06	0.12±0.01 *	0.42±0.03 * [^]	0.40±0.05 * [^]

注: 与对照组相比, * $P < 0.01$; 与模型组相比, [^] $P < 0.01$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.01$. Compared with model group, [^] $P < 0.01$.

表 4 各组炎症因子表达水平的比较

Table 4 Comparison of the expression levels of inflammatory factors in each group

炎症因子 (pg/mL) Inflammatory factor	对照组 Control group	模型组 Model group	紫菀酮组 Shionone group	地塞米松组 Dexamethasone group
TNF- α	49.70 $\pm$ 11.86	412.37 $\pm$ 40.91 [*]	137.85 $\pm$ 13.10 ^{*^}	172.55 $\pm$ 8.09 ^{*^}
IL-1 β	43.53 $\pm$ 2.13	248.85 $\pm$ 22.92 [*]	101.90 $\pm$ 16.78 ^{*^}	99.99 $\pm$ 19.61 ^{*^}
IL-6	46.62 $\pm$ 2.53	268.32 $\pm$ 21.91 [*]	122.91 $\pm$ 13.36 ^{*^}	151.86 $\pm$ 4.78 ^{*^}
IL-4	38.35 $\pm$ 8.50	256.43 $\pm$ 38.02 [*]	120.10 $\pm$ 4.52 ^{*^}	103.59 $\pm$ 8.56 ^{*^}
IL-13	12.60 $\pm$ 4.96	115.55 $\pm$ 13.31 [*]	52.80 $\pm$ 10.20 ^{*^}	51.10 $\pm$ 6.09 ^{*^}

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

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

3 讨论

支气管哮喘是一种由遗传和环境等因素引发的气道慢性炎症性疾病,多种细胞和细胞成分参与其中^[9]。目前,世界范围内有超过 3 亿人患有哮喘,且患病率呈逐年升高的趋势^[10]。哮喘目前仍无法被根治,对人类健康具有严重危害,因此进一步研究哮喘的发病机制,对治疗哮喘、改善预后以及研制新药物具有重要意义。本研究用 OVA 诱导哮喘幼鼠模型,结果显示行为学评分大于 5 分,表明模型构建成功。

紫菀具有消痰止咳、抗炎、抗氧化的功效,紫菀酮是提取自紫菀的 1 种三萜类化合物,是紫菀的主要有效活性成分^[8]。研究表明,紫菀酮能够通过降低诱导型一氧化氮合酶的表达抑制核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活发挥抗炎作用^[11]。本研究发现紫菀酮能够改善哮喘幼鼠肺组织的病理变化,表明紫菀酮对治疗哮喘具有一定的作用。

气道炎症和气道重塑是哮喘的病理基础,多种炎症细胞和介质参与哮喘的发生和发展^[12]。辅助性 T 淋巴细胞(helper T cell, Th) 1/Th2 失衡对哮喘的发生发展具有重要影响,能够促进嗜酸性粒细胞向气道的迁移和浸润,促进哮喘炎症形成^[13]。活化的 Th2 细胞能够分泌 IL-4, IL-4 能够促进免疫球蛋白 E 的分泌,从而参与哮喘的气道炎症^[14]。IL-13 是 Th2 型细胞因子,通过促进黏液分泌、提高气道免疫球蛋白 E 的水平、促进肺部嗜酸性粒细胞浸润等介导气道炎症^[15]。TNF- α 能够活化 NF- κ B 信号通路,介导多种炎症细胞因子在肺组织中大量浸润,调节哮喘患者的炎症反应^[16]。IL-1 β 能够活化 Th2 细胞促进气道炎症部位嗜酸性粒细胞的活化^[17]。IL-6 是适应性免疫的主要参与者,由先天免疫细胞分泌,能够诱导 Th2 效应细胞的扩张^[18]。本研究检测了相关炎症因子在血清中的水平,结果显示,紫

菀酮能够降低炎症因子的水平,表明紫菀酮能够抑制哮喘中的炎症反应,与王芳等^[11]的研究结果一致。

TLRs 是一种模式识别受体,能够连接先天性免疫和获得性免疫,机体内各个部位均有分布,在巨噬细胞、中性粒细胞和上皮细胞等多种细胞内均有表达^[19]。目前人体中已经鉴定出 10 种 TLR,分别命名为 TLR1~TLR10,主要位于细胞膜上,是参与炎症反应的重要因子,TLRs 通过激活巨噬细胞释放促炎细胞因子,激活周围细胞产生黏附和趋化因子,最终将炎症细胞募集到炎症部位^[20-21]。研究表明,TLRs 参与哮喘的发生^[22]。杨艳等^[23]发现敲除 TLR4 基因能够减轻哮喘模型小鼠的气道炎症,并能纠正 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的失衡。本研究检测了 TLR1~TLR10 的水平,结果显示,紫菀酮能显著升高 TLR1、TLR9 和 TLR10 的水平,而显著降低其他 TLRs 水平,表明紫菀酮通过调节 TLRs 的水平抑制炎症反应,控制哮喘的发生和发展,与上述研究结果一致。

综上所述,紫菀酮能够调节 OVA 诱导哮喘 SD 幼鼠的炎症反应,并能使 TLRs 的表达量产生变化,其机制是否与 TLRs 先天免疫反应信号有关还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 段亚辉,秦雪梅,李震宇. 中药干预哮喘的作用机制及调控信号通路研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3700-3706.
- [2] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma [J]. Lancet, 2018, 391(10122): 783-800.
- [3] Ramratnam SK, Bacharier LB, Guilbert TW. Severe asthma in children [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2017, 5(4): 889-898.
- [4] Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity [J]. Cell, 2020, 180(6): 1044-1066.
- [5] Zakeri A, Yazdi FG. Toll-like receptor-mediated involvement of

- innate immune cells in asthma disease [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(1 Pt A): 3270-3277.
- [6] 陈淑珍. 中药单体治疗哮喘的作用与机制研究进展 [J]. *中医药学报*, 2021, 49(10): 89-93.
- [7] 汪奎, 牛彩琴, 张博达. 中医药治疗支气管哮喘慢性持续期的研究进展 [J]. *黔南民族医学学报*, 2021, 34(2): 113-115.
- [8] 鲜恩英, 边巴卓玛, 格央, 等. 紫菀酮抑制 HeLa 细胞迁移侵袭的作用及机制 [J]. *高原科学研究*, 2021, 5(2): 57-63.
- [9] 王丹, 杨丹, 王小虎, 等. 支气管哮喘发病中的固有免疫机制 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(3): 228-231.
- [10] Boonpiyathad T, Sözen ZC, Satitsuksanoa P, et al. Immunologic mechanisms in asthma [J]. *Semin Immunol*, 2019, 46: 101333.
- [11] 王芳, 任刚, 潘玲玲, 等. 紫菀酮基于 NF- κ B 信号通路的体外抗炎机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(4): 1430-1433.
- [12] Banno A, Reddy AT, Lakshmi SP, et al. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(9): 1063-1079.
- [13] 冯海燕, 谭建新. IL-4、IL-5 和 IL-13 与哮喘发生发展的关系 [J]. *心理医生*, 2017, 23(3): 119-120.
- [14] 刘渝. 血清 IL-10、IL-4 及 IgE 在小儿支气管哮喘中的检测意义分析 [J]. *中外医疗*, 2017, 36(2): 31-31.
- [15] 唐学武, 王文革. 白介素 13 参与哮喘发病机制的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2018, 38(23): 1810-1814.
- [16] Vieira CP, de Oliveira LP, Da Silva MB, et al. Role of metalloproteinases and TNF- α in obesity-associated asthma in mice [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118191.
- [17] Caucheteux SM, Hu-Li J, Guo L, et al. IL-1 β enhances inflammatory TH2 differentiation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(3): 898-901.
- [18] Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation [J]. *Mol Immunol*, 2002, 39(9): 531-536.
- [19] Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 461.
- [20] 张铭露, 吴彦霖, 张媛, 等. Toll 样受体在慢性疾病中的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(3): 215-219.
- [21] Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 391-412.
- [22] 张军, 李成城. Toll 样受体在支气管哮喘发生中作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2018, 58(40): 95-98.
- [23] 杨艳, 薛征. TLR4 基因敲除对哮喘小鼠气道炎症的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(24): 2945-2949.

[收稿日期] 2022-02-14

(上接第 46 页)

- [13] Zhao X, Sun Y, Ding Y, et al. miR-34a inhibitor may effectively protect against sevoflurane-induced hippocampal apoptosis through the Wnt/ β -Catenin pathway by targeting Wnt1 [J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(10): 1205-1213.
- [14] Zhao X, Shu F, Wang X, et al. Inhibition of microRNA-375 ameliorated ketamine-induced neurotoxicity in human embryonic stem cell derived neurons [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 844: 56-64.
- [15] Gao M, Liu Y, Chen Y, et al. miR-214 protects erythroid cells against oxidative stress by targeting ATF4 and EZH2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 92: 39-49.
- [16] Yang S, Fei X, Lu Y, et al. miRNA-214 suppresses oxidative stress in diabetic nephropathy via the ROS/Akt/mTOR signaling pathway and uncoupling protein 2 [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 3530-3538.
- [17] 王敏, 余薇, 查文良. 自噬和线粒体自噬在糖尿病心肌病中的作用研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(10): 1337-1340.
- [18] Hua R, Wei H, Liu C, et al. Phosphorylated mTORC1 represses autophagic-related mRNA translation in neurons exposed to ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15915-15923.
- [19] Yuskaitis CJ, Rossitto LA, Gurnani S, et al. Chronic mTORC1 inhibition rescues behavioral and biochemical deficits resulting from neuronal Depdc5 loss in mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(17): 2952-2964.
- [20] Sun X, Zhou Y, Zhang R, et al. Dsty mutation leads to congenital scoliosis-like vertebral malformations in zebrafish via dysregulated mTORC1/TFEB pathway [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 479.
- [21] Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, et al. mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-19.

[收稿日期] 2021-11-14

时萍,陶野,王晨静,等. 塞来昔布调节 miR-129-5p/HMGB1 抑制 TNF- α 诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子分泌[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 82-89.

Shi P, Tao Y, Wang CJ, et al. Celecoxib regulates miR-129-5p/HMGB1 to inhibit TNF- α -induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cell inflammatory cytokine secretion [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 82-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.012

塞来昔布调节 miR-129-5p/HMGB1 抑制 TNF- α 诱导 类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子分泌

时萍,陶野,王晨静,李欣,柳艳平,曹玉*

(青岛大学附属医院,山东 青岛 266001)

【摘要】 目的 探讨塞来昔布对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导类风湿关节炎 (RA) 成纤维样滑膜细胞 (FLSs) MH7A 炎症因子分泌的影响及其机制。**方法** 以 0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 MH7A 细胞 24 h 后,采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力以筛选无毒性作用浓度;采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blot 法分别检测 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中炎症因子白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 水平和微小 RNA (miR)-129-5p 表达水平以及高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 表达水平;双荧光素酶报告基因实验检测 miR-129-5p 和 HMGB1 的靶向关系;转染 miR-129-5p mimics 或 HMGB1-siRNA 至 MH7A 细胞中,观察 miR-129-5p 过表达或下调 HMGB1 表达对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响;另外,将 miR-129-5p inhibitor 转染至 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞中,观察 miR-129-5p 低表达对 10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用下 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响。**结果** 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活性差异无统计学意义 ($P>0.05$),但 20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活性明显降低 ($P<0.05$)。在 TNF- α 诱导下,2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布可呈浓度依赖性抑制 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平和细胞中 HMGB1 蛋白表达并促进 miR-129-5p 表达;miR-129-5p 可与 HMGB1 靶向结合,且 miR-129-5p 可负向调控 HMGB1 蛋白表达;miR-129-5p 过表达或下调 HMGB1 表达后,TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显降低 ($P<0.05$);并且,miR-129-5p 低表达可明显逆转 10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布对 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平抑制作用。**结论** 塞来昔布可抑制 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌,其作用机制可能与调控 miR-129-5p/HMGB1 有关。

【关键词】 类风湿关节炎;炎症因子;塞来昔布;微小 RNA-129-5p;高迁移率族蛋白 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0082-08

Celecoxib regulates miR-129-5p/HMGB1 to inhibit TNF- α -induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cell inflammatory cytokine secretion

SHI Ping, TAO Ye, WANG Chenjing, LI Xin, LIU Yanping, CAO Yu*

(Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of celecoxib on the secretion of MH7A inflammatory factor in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis (RA) induced by tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Methods** MH7A

[作者简介] 时萍 (1975—),女,本科,研究方向:药物试验。E-mail: sp82911767@163.com

[通信作者] 曹玉 (1974—),男,博士,主任药师,研究方向:药物试验。E-mail: Jidi1767@126.com

cells were treated with 0, 2.5, 5, 10, 20 or 40 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib for 24 h before detecting cell viability by MTT assay to screen non-toxic concentration. Enzyme-linked immunosorbent assay, real-time fluorescent quantitative PCR, and Western blot were used to detect levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , microRNA (miR)-129-5p, and high mobility group box-1 protein (HMGB1) in the supernatant of TNF- α -induced MH7A cells treated with 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib. A double-luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between miR-129-5p and HMGB1, and transfection of miR-129-5p mimics or HMGB1 siRNA into MH7A cells was performed to observe the effect of miR-129-5p overexpression or downregulation of HMGB1 expression on TNF- α -induced inflammatory factor secretion in MH7A cells. In addition, an miR-129-5p inhibitor was transfected into MH7A cells induced by TNF- α to observe the effect of low miR-129-5p expression on TNF- α -induced secretion of inflammatory factors in MH7A cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib.

Results Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, the activity of MH7A cells treated with 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib exhibited no significant difference ($P>0.05$). However, the activity of MH7A cells decreased significantly after 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib treatment ($P<0.05$). Under induction by TNF- α , 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib inhibited IL-6 and IL-1 β levels in the supernatant of MH7A cells, as well as expression of HMGB1 protein, and promoted the expression of miR-129-5p in a concentration-dependent manner. miR-129-5p can target and bind to HMGB1 to negatively regulate its expression. After overexpression of miR-129-5p or downregulation of HMGB1 expression, levels of IL-6 and IL-1 β in the supernatant of MH7A cells induced by TNF- α were significantly decreased ($P<0.05$). Low expression of miR-129-5p significantly reversed the inhibitory effects of 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib on TNF- α -induced IL-6 and IL-1 β levels in the supernatant of MH7A cells. **Conclusions** Celecoxib can inhibit TNF- α -induced inflammatory factor secretion by MH7A cells, and its mechanism may be related to the regulation of miR-129-5p/HMGB1.

【Keywords】 rheumatoid arthritis; inflammatory factor; celecoxib; miR-129-5p; high mobility group box-1 protein

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种病程漫长和致残率高的自身免疫性疾病,以关节滑膜炎、软骨和骨质破坏为主要病理特征,可导致关节畸形与功能障碍^[1]。近年来,因我国老龄化人口增多,RA 发病率有明显升高趋势,给人们身体健康和生活质量带来很大威胁^[2]。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast like synoviocytes, FLSs) 是滑膜炎增生导致 RA 发生的重要细胞,其异常增生可释放大量致炎因子,引起关节受损^[3]。因此,如何有效抑制 FLSs 炎症因子的分泌对 RA 治疗具有重要意义。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类细胞内重要的基因调控因子,其异常表达与包括 RA 在内的多种疾病发生发展密切相关。miR-129-5p 是 miRNAs 家族成员,据报道在 RA-FLSs 中表达下调,且发挥着抑制 RA-FLSs 增殖和诱导凋亡的作用^[4]。研究发现,miR-129-5p 可通过靶向调控高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 抑制炎症反应减轻脊髓损伤^[5],而 HMGB1 在 FLSs 炎症因子的分泌过程中发挥着重要的促进作用^[6]。由此猜测,miR-129-5p 可能通过靶向调控 HMGB1 介导 FLSs 炎症反应。塞来昔布是一种高选择性环氧合酶 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂和非甾体类抗炎药,常用来缓解 RA 临床症状^[7],但其抗 RA 炎症

的作用机制尚不完全清楚。有研究发现,塞来昔布可通过抑制 HMGB1 表达减轻癫痫发生后的神经炎症损伤^[8]。那么,塞来昔布是否通过调控 miR-129-5p 从而影响 HMGB1 表达来发挥抗 RA 的作用? 因此,本研究以人 RA-FLSs 细胞系 MH7A 为研究对象,采用肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导及塞来昔布干预后观察 miR-129-5p 和 HMGB1 表达变化,初步探讨 miR-129-5p/HMGB1 在塞来昔布抗 RA 中的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 细胞

人 RA-FLSs 细胞系 MH7A (批号:201203) 购于上海冠导生物工程有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青霉素链霉素溶液、TRIzol 试剂、总蛋白质提取试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司 (批号:201216、201110、201209、210120、210109、200204); 塞来昔布、脂质体 2000、人白细胞介素 (interleukin, IL)-6 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、人 IL-1 β ELISA 试剂盒、实时荧光定量 PCR

(real time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司(批号:201225、201106、201003、201212、201219、210101); miR-129-5p mimics、miR-129-5p inhibitor、mimics-NC、inhibitor-NC、HMGB1-siRNA、NC-siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成。凝胶成像仪 Miulab GIS-500(批号:180524)购自北京乾明基因技术有限公司;实时荧光定量 PCR 仪(批号:200426)购自翌圣生物公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

使用含 100 U/mL 青霉素链霉素双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内常规培养 MH7A 细胞。

1.3.2 MTT 法检测 MH7A 细胞活力

将对数生长期的 MH7A 细胞接种至 96 孔板上,常规培养贴壁后,每孔加入 100 μL 终浓度为 0、2.5、5、10、20 和 40 μmol/L 塞来昔布,并设 3 个平行孔;孵育 24 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液(浓度为 5 g/L);孵育 4 h 后,弃培养基并向每孔中加入二甲亚砜 150 μL;摇床震荡使结晶物充分溶解后,采用酶标仪在波长 492 nm 处检测各孔 MH7A 细胞吸光度值。实验重复次数为 3。

1.3.3 ELISA 法检测 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平

实验分为(1)对照组:不做处理;(2)诱导组:加入 20 ng/mL TNF-α 100 μL^[9]; (3)诱导+(2.5、5 和 10 μmol/L) 塞来昔布组:分别加入 2.5、5 和 10 μmol/L 塞来昔布 100 μL 预处理 1 h 后再加入 20 ng/mL TNF-α 100 μL,每组设置 3 个复孔。将对数生长期的 MH7A 细胞接种至 96 孔板上,于培养箱内常规培养;待细胞贴壁后,根据上述分组处理细胞 24 h 后,收集各组细胞上清液,严格按照 IL-6 和 IL-1β ELISA 试剂盒说明书检测 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平。实验重复次数为 3。

1.3.4 RT-qPCR 检测 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达水平

收集按照 1.3.3 中实验分组处理结束后的各组 MH7A 细胞,按照 TRIzol 试剂说明书提取 MH7A 细胞总 RNA 后,使用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及完整性;将 RNA 行逆转录合成 cDNA 后,以此为模板,按照 RT-qPCR 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 扩增;将 U6 作为内参照,2^{-ΔΔCt} 法计算 MH7A

细胞中 miR-129-5p 表达水平。其中,扩增程序:95℃ 预变性 6 min 后,转入 38 个循环阶段 95℃ 15 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s。由上海生工生物工程股份有限公司合成的引物序列如下:miR-129-5p 上游 5'-GTGCTTATAGTGCAGGTA-3',下游 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'; U6 上游 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游 5'-CGCTTCACGAA TTTGCGTGTCA-3'。实验重复次数为 3。

1.3.5 Western blot 检测 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达

收集按照 1.3.3 中实验分组处理结束后的各组 MH7A 细胞,根据总蛋白提取试剂盒说明书抽提 MH7A 细胞总蛋白后,采用二奎咻甲酸法检测总蛋白浓度;将变性后的蛋白样品行 SDS-PAGE 分离后,转膜;以 5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5 h 后,加入稀释 2000 倍的 HMGB1 抗体和 GAPDH 抗体 4℃ 孵育过夜;次日,加入稀释 5000 倍的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h;经化学发光剂显影曝光后,以 GAPDH 作为内参照,采用 Image J 软件分析 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平。实验重复次数为 3。

1.3.6 细胞转染

将对数生长期的 MH7A 细胞接种至 6 孔细胞板上,常规培养至 65%~75% 融合度时,参照脂质体说明书进行瞬时转染;其中,将仅转染 mimics-NC、miR-129-5p mimics、inhibitor-NC、miR-129-5p inhibitor 的 MH7A 细胞分别记为 mimics-NC 组、miR-129-5p mimics 组、inhibitor-NC 组、miR-129-5p inhibitor 组;将转染 mimics-NC、miR-129-5p mimics、NC-siRNA、HMGB1-siRNA 且经 20 ng/mL TNF-α 处理的 MH7A 细胞分别记为诱导+mimics-NC 组、诱导+miR-129-5p mimics、诱导+NC-siRNA 组和诱导+HMGB1-siRNA 组;将转染 inhibitor-NC、miR-129-5p inhibitor 且经 20 ng/mL TNF-α 和 10 μmol/L 塞来昔布处理的 MH7A 细胞分别记为诱导+药物+inhibitor-NC 组、诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组,每个处理组均设 3 个复孔。在转染 6 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h 后收集各组细胞及上清液,参照上述方法检测 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达、HMGB1 蛋白表达及细胞上清液中 IL-6 和 IL-1β 水平。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验

采用生物信息学软件预测到 HMGB1 3' UTR 与 miR-129-5p 之间存在互补的结合位点;将 HMGB1

3' UTR 与 miR-129-5p 结合位点序列和定点突变后的序列克隆重组至 psiCHECK-2 载体上,分别构建 psiCHECK-2-HMGB1 野生型 (HMGB1-wt) 载体和 psiCHECK-2-HMGB1 突变型 (HMGB1-mut) 载体。参照脂质体 2000 说明书将 HMGB1-wt、HMGB1-mut 载体分别与 miR-129-5p mimics、miR-129-5p inhibitor 及相应阴性对照共转染至 MH7A 细胞中;转染 48 h 后,参照荧光素酶活性检测试剂盒说明书检测 MH7A 细胞荧光素酶活性。实验重复次数为 3。

1.4 统计学方法

计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,运用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,正态性检验采用 Shapiro-Wilk 方法,数据均符合正态分布,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 塞来昔布对 MH7A 细胞活力的影响

经 0、2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后, MH7A 细胞活力分别为 (0.68 ± 0.05)、(0.71 ± 0.05)、(0.66 ± 0.03)、(0.62 ± 0.03)、(0.58 ± 0.03) 和 (0.50 ± 0.02)。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$),但 20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理后 MH7A 细胞活力明显降低($P<0.05$)。

2.2 塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响

与对照组比较,诱导组 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显升高($P<0.05$);与诱导组比较,诱导+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组、诱导+5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组和诱导+10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 MH7A 细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平均明显降低($P<0.05$),且呈塞来昔布浓度依赖性(见表 1)。

表 1 各组细胞上清液中 IL-6 和 IL-1 β 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 1 Comparison of IL-6 and IL-1 β levels in cell supernatant of each group

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	35.52 $\pm$ 3.05	48.75 $\pm$ 4.26
诱导组 Induction group	97.46 $\pm$ 6.18 [*]	125.63 $\pm$ 9.55 [*]
诱导+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 Induction+2.5 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group	85.68 $\pm$ 5.02 [#]	116.58 $\pm$ 7.36 [#]
诱导+5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 Induction+5 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group	72.68 $\pm$ 4.35 [#]	91.07 $\pm$ 6.21 [#]
诱导+10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 Induction+10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group	55.75 $\pm$ 3.23 [#]	70.56 $\pm$ 6.10 [#]
<i>F</i>	264.281	190.652
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导组相比, [#] $P<0.05$ 。

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

2.3 塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞中 miR-129-5p 和 HMGB1 表达的影响

与对照组比较,诱导组 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达水平明显降低,而 HMGB1 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与诱导组比较,诱导+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组、诱导+5 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组和诱导+10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 MH7A 细胞中 miR-129-5p 表达水平明显升高,而 HMGB1 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),且塞来昔布浓度越高变化越明显(见图 1 和表 2)。

2.4 miR-129-5p 与 HMGB1 靶向关系的验证

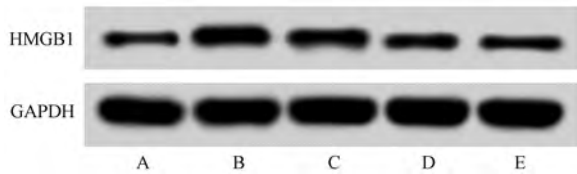
Targetscan Human 软件预测到 HMGB1 3' UTR 中存在能够与 miR-129-5p 互补的结合位点。与相应阴性对照比较, miR-129-5p mimics 可使转染 HMGB1-Wt 载体质粒的 MH7A 细胞荧光素酶活性明显降低,而 miR-129-5p inhibitor 可使其荧光素酶活性明显升高($P<0.05$);同时, miR-129-5p mimics 能使 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平明显降低,而 miR-129-5p inhibitor 则使 HMGB1 蛋白表达水平明显升高(见图 2 和表 3)。

2.5 miR-129-5p 过表达对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响

与对照组比较,诱导组细胞中 miR-129-5p 表达水平明显降低,而细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显升高($P<0.05$);与诱导组比较,诱导+mimics-NC 组上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$);与诱导+mimics-NC 组比较,诱导+miR-129-5p mimics 组 miR-129-5p 表达水平明显升高,而 IL-6、IL-1 β 水平明显降低($P<0.05$)(见表 4)。

2.6 下调 HMGB1 表达对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌的影响

与对照组比较,诱导组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平均明显升

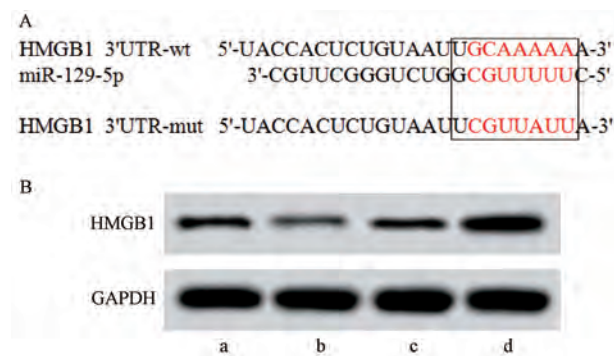


注:A:对照组;B:诱导组;C:诱导+2.5 μmol/L 塞来昔布组;D:诱导+5 μmol/L 塞来昔布组;E:诱导+10 μmol/L 塞来昔布组。

图 1 Western blot 检测 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达

Note. A, Control group. B, Induction group. C, Induction+2.5 μmol/L celecoxib group. D, Induction+5 μmol/L celecoxib group. E, Induction+10 μmol/L celecoxib group.

Figure 1 Western blot detection of HMGB1 protein expression in MH7A cells



注:A:miR-129-5p 与 HMGB1 3' UTR 结合位点;B:Western blot 检测 miR-129-5p 对 HMGB1 蛋白表达的影响。a:mimics-NC 组;b:miR-129-5p mimics 组;c:inhibitor-NC 组;d:miR-129-5p inhibitor 组。

图 2 miR-129-5p 与 HMGB1 靶向关系的验证

Note. A, miR-129-5p and HMGB1 3' UTR binding site. B, Western blot to detect the effect of miR-129-5p on the expression of HMGB1 protein. a, mimics-NC group. b, miR-129-5p mimics group. c, inhibitor-NC group. d, miR-129-5p inhibitor group.

Figure 2 Verification of the targeting relationship between miR-129-5p and HMGB1

表 2 各组细胞中 miR-129-5p 和 HMGB1 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Comparison of miR-129-5p and HMGB1 protein expression levels in cells of each group

组别 Groups	miR-129-5p	HMGB1/GAPDH
对照组 Control group	1.00±0.00	0.20±0.02
诱导组 Induction group	0.23±0.03 [*]	0.56±0.04 [*]
诱导+2.5 μmol/L 塞来昔布组 Induction+2.5 μmol/L celecoxib group	0.28±0.03 [#]	0.45±0.03 [#]
诱导+5 μmol/L 塞来昔布组 Induction+5 μmol/L celecoxib group	0.36±0.04 [#]	0.33±0.03 [#]
诱导+10 μmol/L 塞来昔布组 Induction+10 μmol/L celecoxib group	0.55±0.06 [#]	0.24±0.03 [#]
F	630.193	212.840
P	<0.001	<0.001

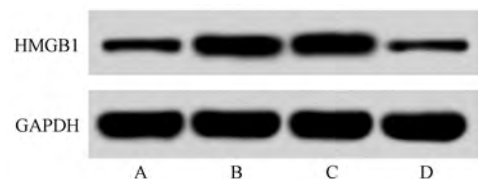
注:与对照组相比, * $P<0.05$;与诱导组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the induction group, [#] $P<0.05$.

高($P<0.05$);与诱导组相比较,诱导+NC-siRNA 组 HMGB1 蛋白表达水平和 IL-6、IL-1 β 水平差异均无统计学意义($P>0.05$);但诱导+HMGB1-siRNA 组 HMGB1 蛋白表达水平和 IL-6、IL-1 β 水平较诱导+NC-siRNA 组均明显降低($P<0.05$)(见图 3 和表 5)。

2.7 miR-129-5p 低表达可逆转 10 μmol/L 塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞的影响

与诱导组比较,诱导+药物组细胞中 miR-129-5p 表达水平明显升高,而细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显降低($P<0.05$);诱导+药物+inhibitor-NC 组和诱导+药物组比较上述各指标差异均无统计学意义($P>0.05$);与诱导+药物+inhibitor-NC 组比较,诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组细胞中 miR-129-5p 表达水平明显降低,而细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平明显升高($P<0.05$)(见图 4 和表 6)。



注:A:对照组;B:诱导组;C:诱导+NC-siRNA 组;D:诱导+HMGB1-siRNA 组。

图 3 Western blot 检测各组细胞中 HMGB1 蛋白表达

Note. A, Control group. B, Induction group. C, Induction+NC-siRNA group. D, Induction+HMGB1-siRNA group.

Figure 3 Western blot detects the expression of HMGB1 protein in each group of cells

表 3 各组细胞荧光素酶活性及 HMGB1 蛋白表达水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 3 Comparison of cell luciferase activity and HMGB1 protein expression level in each group

组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity		HMGB1/GAPDH
	HMGB1-wt	HMGB1-mut	
mimics-NC 组 mimics-NC group	1.00±0.00	1.00±0.00	0.22±0.03
miR-129-5p mimics 组 miR-129-5p mimics group	0.26±0.02 [*]	0.94±0.08	0.09±0.02 [*]
inhibitor-NC 组 inhibitor-NC group	0.95±0.07	1.02±0.09	0.21±0.03
miR-129-5p inhibitor 组 miR-129-5p inhibitor group	1.72±0.12 [#]	0.96±0.08	0.57±0.03 [#]
<i>F</i>	650.117	2.297	497.323
<i>P</i>	<0.001	0.096	<0.001

注:与 mimics-NC 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 inhibitor-NC 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with mimics-NC group, ^{*} $P<0.05$. Compared with inhibitor-NC group, [#] $P<0.05$.

表 4 各组细胞中 miR-129-5p 表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 4 Comparison of the expression level of miR-129-5p in the cells of each group and the level of IL-6 and IL-1 β in the cell supernatant

组别 Groups	miR-129-5p	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	1.00±0.00	33.85±3.25	46.85±5.02
诱导组 Induction group	0.21±0.02 [*]	99.52±6.45 [*]	128.47±8.96 [*]
诱导+mimics-NC 组 Induction+mimics-NC group	0.23±0.03	103.25±8.02	131.56±8.84
诱导+miR-129-5p mimics 组 Induction+miR-129-5p mimics group	0.86±0.08 [#]	62.38±5.26 [#]	75.84±5.62 [#]
<i>F</i>	752.341	270.682	286.632
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导+mimics-NC 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction+mimics-NC group, [#] $P<0.05$.

表 5 各组细胞中 HMGB1 蛋白表达水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 5 Comparison of HMGB1 protein expression level in cells of each group and IL-6 and IL-1 β levels in cell supernatant

组别 Groups	HMGB1/GAPDH	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	0.20±0.03	35.08±3.11	49.05±4.35
诱导组 Induction group	0.55±0.04 [*]	98.23±6.27 [*]	129.68±10.02 [*]
诱导+NC-siRNA 组 Induction+NC-siRNA group	0.57±0.04	102.28±9.67	131.18±9.86
诱导+HMGB1-siRNA 组 Induction+HMGB1-siRNA group	0.18±0.03 [#]	68.86±4.12 [#]	80.26±6.64 [#]
<i>F</i>	329.520	218.992	221.669
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导+NC-siRNA 组相比, [#] $P<0.05$ 。

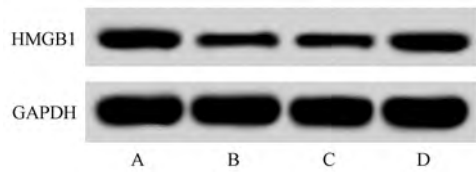
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction+NC-siRNA group, [#] $P<0.05$.

表 6 各组细胞中 miR-129-5p 和 HMGB1 蛋白表达水平以及细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 6 Comparison of the expression levels of miR-129-5p and HMGB1 protein in each group of cells and the levels of IL-6 and IL-1 β in the cell supernatant

组别 Groups	miR-129-5p	HMGB1/GAPDH	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
诱导组 Induction group	1.00±0.00	0.57±0.05	96.48±6.13	128.48±10.02
诱导+药物组 Induction + drug group	2.08±0.12 [*]	0.25±0.03 [*]	54.75±3.28 [*]	67.56±5.35 [*]
诱导+药物+inhibitor-NC 组 Induction+drug+inhibitor-NC group	2.11±0.10	0.24±0.03	55.60±3.47	69.15±6.03
诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组 Induction+drug+miR-129-5pinhibitor group	0.75±0.06 [#]	0.48±0.03 [#]	72.12±4.50 [#]	94.48±6.85 [#]
<i>F</i>	651.471	190.385	170.465	137.859
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与诱导组相比, ^{*} $P<0.05$;与诱导+药物+inhibitor-NC 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the induction group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the induction+drug+inhibitor-NC group, [#] $P<0.05$.



注:A:诱导组;B:诱导+药物组;C:诱导+药物+inhibitor-NC 组;D:诱导+药物+miR-129-5p inhibitor 组。

图 4 Western blot 检测各组细胞中 HMGB1 蛋白表达

Note. A, Induction group. B, Induction+drug group. C, Induction+drug+inhibitor-NC group. D, Induction+drug+miR-129-5p inhibitor group.

Figure 4 Western blot detection of HMGB1 protein expression in each group of cells

3 讨论

塞来昔布是一种能够缓解关节炎症症状的抗炎药,可通过特异性抑制 COX-2 活性使炎症前列腺素生成减少,进而起到抗炎止痛的作用^[10]。近年来,有研究指出,塞来昔布可通过抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路活性减轻软骨组织炎症损伤发挥抗骨关节炎的作用^[11];然而,塞来昔布对 RA-FLSs 炎症的影响及其作用机制并不清楚。滑膜炎是 RA 典型的病理特征,而 TNF- α 诱导的滑膜细胞促炎因子 IL-6 和 IL-1 β 等的分泌是该过程发生的重要因素^[12];因此, TNF- α 常被用作 FLSs 炎症因子分泌的诱导剂^[13-15]。本研究以 20 ng/mL TNF- α 刺激后发现,人 RA-FLSs MH7A 细胞上清液中促炎因子 IL-6、IL-1 β 水平和 MH7A 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平明显升高,miR-129-5p 表达水平明显降低,而塞来昔布可剂量依赖性的降低 IL-6、IL-1 β 和 HMGB1 表达水平,增加 miR-129-5p 表达水平。上述结果表明 HMGB1 及 miR-129-5p 参与 RA 滑膜炎的发生,二者有作为疾病潜在治疗靶点的潜能,而塞来昔布抗 RA 滑膜炎的作用机制可能与调控 miR-129-5p 和 HMGB1 蛋白表达有关。

miR-129-5p 是 miRNAs 家族成员,被报道在 RA-FLSs 中表达下调,且可通过调控胰岛素样生长因子 1 受体 (Insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)/Src/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/早期生长应答 1 (early growth response 1, Egr-1) 信号通路调控 RA 细胞增殖和凋亡^[4]。还有研究表明,miR-129-5p-TTK 是控制早期 RA 进展的潜在 RNA 调节途径^[16]。

CircASH2L 通过抑制 miR-129-5p / 同源域相互作用蛋白激酶 2 (homeodomain interacting protein kinase 2, HIPK2) 轴来促进 RA-FLS 细胞的生长,运动和炎症^[17]。富含 miR-129-5p 的人滑膜间充质干细胞外泌体 (HS-MSC-Exo) 显著降低了软骨细胞的炎症反应和细胞凋亡^[18]。本研究发现,miR-129-5p 过表达可显著抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞炎症因子分泌,提示,miR-129-5p 在 RA 滑膜炎过程中发挥着重要的抑制作用,其过表达可能是改善 RA 滑膜炎的重要策略。有研究指出,miR-129-5p 过表达可通过靶向 HMGB1 减轻炎症反应改善心力衰竭大鼠心功能和缺血再灌注后的神经损伤^[18-19]。本研究双荧光素酶报告基因实验证实,miR-129-5p 可与 HMGB1 靶向结合, HMGB1 是 miR-129-5p 的靶基因。HMGB1 是细胞核内一种非组蛋白,在细胞活性、凋亡和缺血/缺氧等异常情况下可被释放至核外,激活下游相关因子启动级联式炎症反应,与包括 RA 在内的多种免疫类疾病发生发展密切相关^[20]。在 RA 患者关节液和关节滑膜中 HMGB1 存在异常高表达,且 HMGB1 可通过促进炎症因子 TNF- α 和 IL-17A 等促进滑膜炎^[21-23]。本研究发现 HMGB1 表达沉默可抑制 TNF- α 诱导的 MH7A 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 水平。研究结果从反面证实, HMGB1 在 RA 滑膜炎过程中发挥着重要的促进作用。此外,本研究还发现 miR-129-5p 表达沉默可逆转塞来昔布对 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌和 HMGB1 蛋白表达的抑制作用,结果提示,塞来昔布可通过上调 miR-129-5p 表达引起其靶基因 HMGB1 表达降低进而发挥抗 RA 滑膜炎的作用。

综上所述,塞来昔布可抑制 TNF- α 诱导 MH7A 细胞炎症因子分泌,其作用机制可能与激活 miR-129-5p/HMGB1 有关。然而,塞来昔布抗 RA 滑膜炎的作用机制可能还与其它基因或通路有关,还需后续进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王思捷, 廖淑珍, 招春飞, 等. 间充质干细胞源外泌体治疗类风湿性关节炎动物模型和临床研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 109-112.
- [2] 白雪, 付瑞嘉, 乐世俊, 等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 265-275.
- [3] 熊翱, 熊仁平, 彭艳, 等. 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

- [4] Zhang Y, Yan N, Wang X, et al. MiR-129-5p regulates cell proliferation and apoptosis via IGF-1R/Src/ERK/Egr-1 pathway in rheumatoid arthritis [J]. Biosci Rep, 2019, 39(12): 1–10.
- [5] Wan G, An Y, Tao J, et al. MicroRNA-129-5p alleviates spinal cord injury in mice via suppressing the apoptosis and inflammatory response through HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway [J]. Biosci Rep, 2020, 40(3): 1–15.
- [6] 周亚欧, 龚震, 李通, 等. 高迁移率族蛋白 1 联合白细胞介素-1 β 及脂多糖对类风湿关节炎患者成纤维样滑膜细胞增殖及炎症因子分泌的影响 [J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(7): 437–440.
- [7] 刘奕兵, 王超. 塞来昔布对老年膝骨性关节炎患者炎症因子、骨代谢和血液流变学指标的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(19): 4713–4715.
- [8] Morales-Sosa M, Orozco-Suárez S, Vega-García A, et al. Immunomodulatory effect of Celecoxib on HMGB1/TLR4 pathway in a recurrent seizures model in immature rats [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2018, 170(1): 79–86.
- [9] 吕邵娃, 崔杰, 段继新, 等. 类叶牡丹提取物对 TNF- α 诱导的人类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞因子的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(2): 143–148.
- [10] 郑志远, 卑明健, 张柳. COX-2 选择性抑制剂在骨关节炎中作用的研究进展 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2019, 22(2): 182–186.
- [11] 陈小青, 林金丁, 张华昆, 等. 塞来昔布对骨关节炎大鼠模型抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(10): 1315–1317.
- [12] 蔡辉, 姚茹冰, 王圆圆. 单味中药及有效成分对类风湿关节炎炎性细胞因子 TNF- α 的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(12): 5–8.
- [13] Zhang C, Chang J, Wu W, et al. Activation of GPR43 suppresses TNF- α -induced inflammatory response in human fibroblast-like synoviocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 684(1): 108297–108297.
- [14] Brandstetter B, Dalwigk K, Platzer A, et al. FOXO₃ is involved in the tumor necrosis factor-driven inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes [J]. Lab Invest, 2019, 99(5): 648–658.
- [15] Zhang Y, Wang S, Dong H, et al. LAIR-1 shedding from human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis following TNF- α stimulation [J]. Clin Exp Immunol, 2018, 192(2): 193–205.
- [16] Cheng Q, Chen X, Wu H, et al. Three hematologic/immune system-specific expressed genes are considered as the potential biomarkers for the diagnosis of early rheumatoid arthritis through bioinformatics analysis [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 18–28.
- [17] Li X, Qu M, Zhang J, et al. CircASH2L facilitates tumor-like biologic behaviours and inflammation of fibroblast-like synoviocytes via miR-129-5p/HIPK₂ axis in rheumatoid arthritis [J]. J Orthop Surg Res, 2021, 16(1): 302–312.
- [18] Qiu M, Liu D, Fu Q. MiR-129-5p shuttled by human synovial mesenchymal stem cell-derived exosomes relieves IL-1 β induced osteoarthritis via targeting HMGB1 [J]. Life Sci, 2021, 269(1): 118987–118997.
- [19] Xiao N, Zhang J, Chen C, et al. MiR-129-5p improves cardiac function in rats with chronic heart failure through targeting HMGB1 [J]. Mamm Genome, 2019, 30(9–10): 276–288.
- [20] Li XQ, Chen FS, Tan WF, et al. Elevated microRNA-129-5p level ameliorates neuroinflammation and blood-spinal cord barrier damage after ischemia-reperfusion by inhibiting HMGB1 and the TLR3-cytokine pathway [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 205–216.
- [21] Kaur I, Behl T, Bungau SG, et al. Exploring the therapeutic promise of targeting HMGB1 in rheumatoid arthritis [J]. Life Sci, 2020, 258(1): 1–11.
- [22] 张玉萍, 姚茹冰, 蔡辉. HMGB1 对类风湿关节炎作用的研究进展 [J]. 现代医学, 2015, 43(9): 1203–1204.
- [23] Benedetti G B, Bonaventura P, Lavocat F, et al. IL-17A and TNF- α increase the expression of the antiapoptotic adhesion molecule amigo-2 in arthritis synoviocytes [J]. Front Immunol, 2016, 27(7): 254–262.

[收稿日期] 2021–12–08

付佳,曹宇勃,刘飒.褪黑素调控 NF- κ B 信号通路调节胃癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡及其机制 [J].中国比较医学杂志,2022,32(9):90-96,108.

Fu J, Cao YB, Liu S. Melatonin regulates the NF- κ B signaling pathway to regulate Th1/Th2 immune balance in mice with gastric cancer and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 90-96, 108.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.013

褪黑素调控 NF- κ B 信号通路调节胃癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡及其机制

付 佳,曹宇勃,刘 飒*

(中国医科大学附属第四医院 第二肿瘤内科,沈阳 110000)

【摘要】 目的 探究褪黑素调控 NF- κ B 信号通路调节胃癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡的机制。方法 将 50 μ g (约含有细胞 1×10^6 个)胃癌细胞一次性注射到小鼠左侧前肢皮下,在建模 7 d 后触摸到瘤体生成提示胃癌移植瘤小鼠模型建模成功。10 只健康小鼠作为对照组,建模成功的小鼠分为模型组、模型+褪黑素组,每组 10 只。模型+褪黑素组皮下多点注射褪黑素(10 mg/kg,每天 1 次,21 d),其余组注射等量的生理盐水。采用游标卡尺、天平测量各组肿瘤体积、重量。通过免疫组化检测肿瘤组织中 Ki67 和 Bcl2 评估胃癌细胞增殖和凋亡。通过 ELISA 检测外周血 IFN- γ 和 IL-4 的水平。通过流式细胞术检测外周血 Th1 和 Th2 细胞比例。通过 qPCR 和 Western blot 检测肿瘤组织和淋巴细胞中 NF- κ B mRNA 和蛋白水平。**结果** 与对照组相比,模型组、模型+褪黑素组的肿瘤体积、质量、Ki67 和 Bcl2 染色强度、IL-4 水平、Th2 细胞比例、NF- κ B mRNA 和蛋白表达均显著升高($P < 0.05$),IFN- γ 水平、Th1 比例、Th1/Th2 比值显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,模型+褪黑素组的肿瘤体积、质量、Ki67 和 Bcl2 染色强度、IL-4 水平、Th2 细胞比例、NF- κ B mRNA 和蛋白表达均显著降低($P < 0.05$),IFN- γ 水平、Th1 比例、Th1/Th2 比值显著升高($P < 0.05$)。**结论** 褪黑素可能通过调控 NF- κ B 通路抑制胃癌移植瘤小鼠模型的肿瘤生长,并调节 Th1/Th2 平衡。

【关键词】 胃癌;褪黑素;Th1 细胞;Th2 细胞;NF- κ B;免疫

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0090-07

Melatonin regulates the NF- κ B signaling pathway to regulate Th1/Th2 immune balance in mice with gastric cancer and its mechanism

FU Jia, CAO Yubo, LIU Sa*

(the Second Department of Oncology, the 4th Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of melatonin regulating Th1/Th2 immune balance via targeting nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in mice with gastric cancer. **Methods** Gastric cancer cells (50 μ g, approximately 1×10^6 cells) were injected subcutaneously into the left forelimb of mice. After 7 days of modeling, tumor formation was felt, indicating that the model of transplanted gastric cancer tumor was successfully established. Ten healthy mice were used as the control group, whereas successfully modeled mice were divided into model and model+melatonin groups ($n = 10$ mice per group). The model+melatonin group was subcutaneously injected daily with melatonin (10 mg/kg,

[作者简介]付佳(1988—),女,硕士,住院医师,研究方向:肿瘤内科。E-mail: jiopklnmg11@163.com

[通信作者]刘飒(1966—),女,博士,研究方向:肿瘤内科。E-mail: 276058547@qq.com

1 time/d, 21 d), whereas the other groups were injected with the same amount of normal saline. Tumor volumes and masses were measured using a vernier caliper and balance, respectively. Proliferation and apoptosis of gastric cancer cells in tumor tissues were assessed by immunohistochemical detection of Ki67 and Bcl2. Levels of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-4 in peripheral blood were detected by ELISA. Ratios of Th1 to Th2 cells in peripheral blood were detected by flow cytometry. Levels of NF- κ B mRNA and protein were detected by qPCR and Western blot, respectively, in tumor tissues and lymphocytes. **Results** Contrast with the control group, the tumor volumes and masses, Ki67 and Bcl2 staining intensities, IL-4 levels, percentage of Th2 cells, NF- κ B mRNA and protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$), and the IFN- γ levels, the percentage of Th1 cells and Th1/Th2 ratio were significantly decreased in model and model+melatonin groups ($P < 0.05$). Contrast with model group, tumor volumes and masses, Ki67 and Bcl2 staining intensities, IL-4 levels, percentage of Th2 cells, NF- κ B mRNA and protein expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$) and the IFN- γ levels, the percentage of Th1 cells and Th1/Th2 ratio were significantly increased in the model+melatonin group ($P < 0.05$). **Conclusions** Melatonin may inhibit tumor growth in mouse models of gastric cancer and regulate the balance of Th1/Th2 by regulating the NF- κ B pathway.

【Keywords】 gastric cancer; melatonin; Th1 cells; Th2 cells; NF- κ B; immunity

调查统计显示,每年新发的胃癌病人和因胃癌死亡的病人接近 80 万~100 万例,占全部的恶性肿瘤 5.7%和 8.2%,胃癌的发病率和死亡率分别排名第 6 和第 2^[1],严重威胁了人类的生命健康,因此,急需更全面有效的治疗手段。目前,研究显示免疫抑制在肿瘤的发生和进展中起着重要的作用,Th1 型免疫细胞可通过促进干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的表达提高机体的免疫反应,从而抑制胃癌的增殖和侵袭^[2]。Th2 细胞则发挥免疫抑制作用,并通过白介素-4 (interleukin-4, IL-4) 等的表达促进肿瘤生长、血管生成和进展^[3]。患者外周血中的 Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移可提高机体免疫力促进胃癌的清除^[4]。褪黑素是一种人体内产生的吲哚胺,主要由松果体在应对黑暗时产生,近年来研究发现褪黑素具有抗癌作用,细胞研究表明褪黑素会抑制胃癌细胞的增殖,但是其体内抗胃癌能力尚不明确^[5]。也有研究表明褪黑素具有提高机体免疫力的作用^[6],但是其是否具有调节胃癌免疫抑制的作用仍不清楚。核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活会调控细胞的转录功能,从而调节胃癌细胞增殖、分化、转移、炎症反应^[7]。此外,NF- κ B 通路还参与 T 淋巴细胞向 Th1/Th2 的分化^[8]。本研究旨在分析褪黑素调控 NF- κ B 信号通路调节胃癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡及其机制

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠共 30 只,6~8 周龄,体重 18~22 g,均由上海斯莱克实验动物中心提供

[SCXK(沪)2019-0020],饲养于锦州医科大学[SYXK(辽)2019-0007]。本研究通过了锦州医科大学的医学伦理委员会审批(2020PS001K),实验的全过程均遵循了 3R 的原则,给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞

人胃癌细胞 MKN45(ATCC® CCL-185,美国)。

1.2 主要试剂与仪器

胃癌细胞载体 microcarrier 6 (ELYON BIO 公司,美国);DMEM 培养基血清和抗体 (Invitrogen 公司,美国);褪黑素 (>99%,YT1414,北京伊塔生物,中国);Ki67 (ab15580)、Bcl2 (ab182858) 免疫组化染色抗体 (Abcam 公司,美国);ELISA 试剂盒 (碧云天公司,中国);兔单克隆 P65 抗体 (ab32536)、标记 HRP 的山羊抗兔二抗以及兔单克隆 GAPDH 抗体 (ab181602) (购自美国的 Abcam 公司);RNeasy Mini 相关的试剂盒、TRIzol (购自德国的 QIAGEN GmbH 公司);SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (购自中国的 TaKaRa 公司);PVDF 膜 (购自美国的 Millipore 公司);BD Golgi Stop™ 试剂盒 (BD-554715,上海创赛科技,中国)。Nanodrop 2000 的仪器和 ECL 的显色试剂盒 (购自美国的 Thermo Fisher 公司);大鼠的 Th1/Th2 表型相关的抗体试剂以及流式细胞仪 (购自美国的 Becton Dickinson 公司);PCR 仪 (ABI7900,ABI 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

根据文献^[9]利用正常免疫小鼠构建胃癌移植瘤。首先,将 MKN45 细胞放置于 DMEM 的培养基中进行培养(内含链霉素 0.1 mg/mL、10%的胎牛血清、青霉素 100 U/mL)。细胞的培养环境为温度

37℃、湿度 95%以及 CO₂ 浓度 5%的培养箱中培养。之后再向其中加入细胞载体 microcarrier 6 使之饱和,同时加入 100 ng/mL 的 SDF-1 α 和 VEGF 并共同孵育 3 h。然后将 50 μ g 的(约含有细胞 1×10^6 个胃癌细胞)一次性注射到小鼠左侧前肢皮下,在建模 7 d 后可以触摸瘤体的生成即说明成功建模。

1.3.2 实验分组

20 只建模成功的小鼠分为模型组、模型+褪黑素组,每组 10 只;10 只健康小鼠为对照组。模型+褪黑素组小鼠在其肿瘤附近皮下多点注射 10 mg/kg 的褪黑素,每日 1 次,其余组注射等量的生理盐水^[10]。干预 21 d(建模后 28 d)后,通过颈椎脱臼处死小鼠,取出胃组织或者肿瘤组织,通过眼眶采集外周血。

1.3.3 肿瘤生长情况

观察肿瘤的每天具体生长的情况,于第 28 天的时候统计肿瘤具体的重量和体积,采用游标卡尺测量小鼠的皮下肿瘤的具体大小情况,然后对体积进行计算,公式则为:体积 = [(长度 $\times$ 宽度)/2]³ $\times$ 0.5236。

1.3.4 免疫组化染色检测肿瘤组织中 Ki67 和 Bcl2 蛋白

通过检测 Ki67 和 Bcl2 蛋白分析细胞增殖和凋亡情况。将组织在 10%甲醛中固定,后包埋在石蜡中,切成 4 μ m 厚的切片。然后把切片置于表面被 0.1%浓度的聚 L 赖氨酸涂满的载玻片上,脱蜡(二甲苯),用梯度浓度的乙醇(浓度由高到低为 100%~70%)逐步的水合,之后再用 PBS 给予洗涤。通过 pH=6.0 的柠檬酸钠缓冲液处理切片后给予热诱导的修复。在室温情况下,用 30%浓度过氧化氢将玻片处理约 10 min 的时长从而达到对内源性的过氧化物酶封闭的作用。用 PBS 仔细的冲洗之后,在室温的情况下用牛血清的白蛋白(浓度为 5%)给予 10 min 时长的玻片封闭。之后,将它们与 Ki67 或者 Bcl2 抗体(经过 1:100 的比例稀释)在 4℃的情况下过夜孵育。用 PBS 仔细的洗涤后,将各个玻片和特定的被生物素化二抗放置于 37℃的情况下给予 60 min 时长的孵育。通过和苏木精、3,3'-二胺联苯胺复染。于显微镜下仔细的观察,利用半定量法进行分析,染色的强度=染色评分(0~3 分) $\times$ 染色范围(0~4 分)。

1.3.5 ELISA 检测外周血 IFN- γ 和 IL-4

小鼠外周血离心(4℃,12000 r/min,20 min)后

利用移液枪将上层的全部血清慢慢的吸出之后,向里面加入相应的抗体孵育 2 h 的时长之后再往里面加适量的显色剂,10 min 时长反应结束后将其终止。然后对 450 nm 位置的吸光度给予检测,根据试剂盒提供的标准曲线算出 IL-4、IFN- γ 的浓度。

1.3.6 流式细胞术检测外周血 Th1、Th2 细胞

利用不同梯度的离心把淋巴细胞层从外周血里面抽吸出来,获得了全部的淋巴细胞。分别加入 2 μ L 的佛波酯/离子霉素混合物以及 2 μ L 的布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物,在 37℃下孵育 6 h。然后加入 3 μ L 的表面 CD4 荧光抗体,避光孵育 30 min。接下来,加入 300 μ L 的固定/透化试剂后在 4℃下孵育 30 min。向样本中加入 IFN- γ 或 IL-4 荧光抗体各 2 μ L,4℃下孵育 30 min。样本通过流式细胞仪分析,结果使用 FlowJo(Tree Star Inc.,美国)软件实施分析。CD4⁺IFN- γ ⁺ 作为 Th1 细胞,CD4⁺IL-4⁺则作为 Th2 细胞。

1.3.7 RT-qPCR 检测肿瘤组织中 NF- κ B mRNA

利用 TRIzol 试剂在 1.3.4 里面的淋巴细胞内或者组织中将总的 RNA 提取处理,并采用 Nanodrop 2000 仪器实施定量。通过 RNeasy Mini 的相关试剂盒逆转录全部的 mRNA,相应的 RT-qPCR 反应则采用 SYBR Premix Ex TaqTM 实施;95℃情况下反应时长 2 min,58℃情况下反应时长 20 s,然后在 72℃情况下反应时长 20 s(此步骤则循环 40 次),以 GAPDH 作为此次研究的内参,2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法将相对的 NF- κ B 表达水平计算出来。

1.3.8 Western blot 检测肿瘤组织中 NF- κ B 蛋白

将 1.3.4 里面的淋巴细胞内或者组织全部的裂解之后经过离心(温度设置为 4℃,速度设置为 12000 r/min,时长设置 5 min)将总蛋白全部的收集。通过 SDS-PAGE(浓度为 10%)将蛋白质分离,并将蛋白转至 PVDF 膜上。加入浓度为 5%的脱脂牛奶(温度为室温条件,时长设置为 2 h)封闭之后加入按照 1:500 比例稀释的 NF- κ B 抗体于 4℃情况下给予 8 h 时长的孵育,洗涤结束后向其中加入二抗(按照 1:2000 比例稀释,温度为室温条件,时长设置为 1 h)。条带则采用 ECL 给予可视化的处理,GAPDH 为此次研究的内参,分析相对的 NF- κ B 蛋白的表达具体情况。

1.4 统计学方法

统计学则采用 SPSS 19 软件分析,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)代表计数,用方差分析(ANOVA)评估,两两对比用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤生长的影响

与对照组比较,模型组、模型+褪黑素组的肿瘤体积和重量均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,模型+褪黑素组的肿瘤体积和重量均显著降低($P<0.05$),见表 1。

2.2 褪黑素对胃癌小鼠模型胃癌细胞增殖和凋亡的影响

与对照组比较,模型组、模型+褪黑素组的 Ki67 和 Bcl2 染色强度均显著增强($P<0.05$);与模型组比较,模型+褪黑素组的 Ki67 和 Bcl2 染色强度均显著减弱($P<0.05$),见图 1 和表 2。

2.3 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1 和 Th2 标志细胞因子表达水平的影响

与对照组比,模型组、模型+褪黑素组的 IFN- γ 水平显著降低,IL-4 水平显著升高($P<0.05$);与模型组比,模型+褪黑素组的 IFN- γ 显著升高,IL-4 水平显著降低($P<0.05$),见表 3。

2.4 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1/Th2 水平的影响

与对照组相比,模型组、模型+褪黑素组的外周血中 Th1 比例和 Th1/Th2 比值均显著降低($P<0.05$),Th2 细胞比例显著升高($P<0.05$);与模型组相比,模型+褪黑素组的外周血中 Th1 比例及 Th1/

Th2 的比值升高明显($P<0.05$),Th2 细胞的比例降低明显($P<0.05$),见图 2 和表 4。

表 1 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤生长的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of melatonin on tumor growth in a nude mouse model of gastric cancer

组别 Groups	体积(mm^3) Volume	重量(g) Mass
对照组 Control group	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	281.24 $\pm$ 27.63 *	0.31 $\pm$ 0.04 *
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	173.55 $\pm$ 24.72 *#	0.20 $\pm$ 0.03 *#

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

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

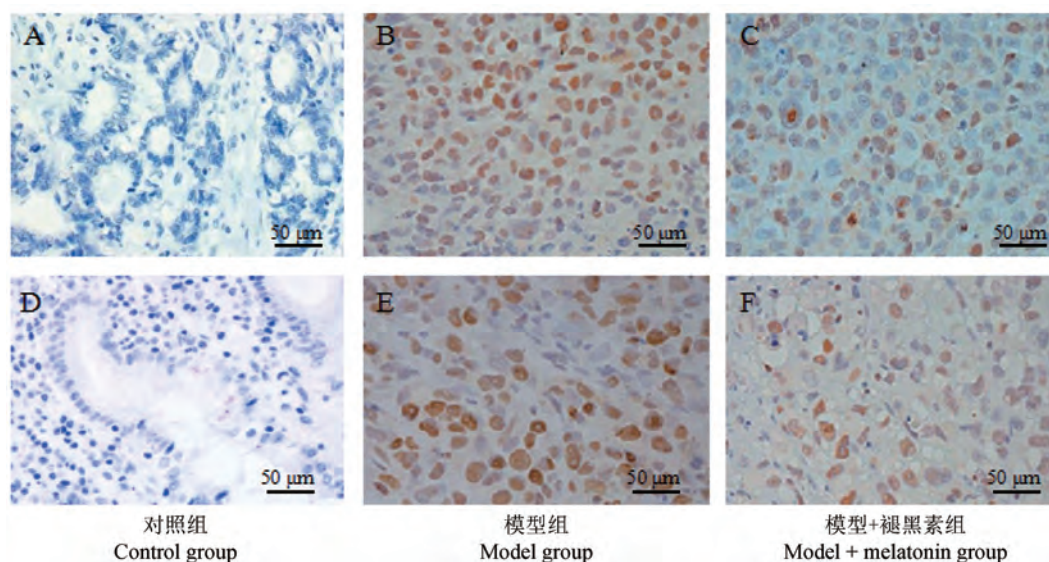
表 2 褪黑素对胃癌小鼠模型胃癌组织中 Ki67、Bcl2 染色强度的影响

Table 2 Effect of melatonin on the intensity of Ki67, Bcl2 staining in gastric cancer tissues of mouse models of gastric cancer

组别 Groups	Ki67 染色强度 Ki67 staining intensity	Bcl2 染色强度 Bcl2 staining intensity
对照组 Control group	1.12 $\pm$ 0.13	0.97 $\pm$ 0.10
模型组 Model group	6.43 $\pm$ 0.72 *	5.62 $\pm$ 0.68 *
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	2.15 $\pm$ 0.27 *#	1.98 $\pm$ 0.26 *#

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

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



注:A~C:蛋白 Ki67 的免疫组化染色;E~F:蛋白 Bcl2 的免疫组化染色。

图 1 免疫组化染色检测褪黑素对胃癌小鼠模型胃癌组织中蛋白 Ki67 和蛋白 Bcl2 表达水平的影响

Note. A~C, Immunohistochemical staining of protein Ki67. E~F, Immunohistochemical staining of protein Bcl2.

Figure 1 Effect of melatonin on the expression levels of protein Ki67 and protein Bcl2 in gastric cancer tissue of gastric cancer mouse model detected by immunohistochemical staining

2.5 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤组织中 NF- κ B 表达水平的影响

与对照组比,模型组、模型+褪黑素组的肿瘤组织中 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比,模型+褪黑素组 NF- κ B mRNA 和蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),见图 3 和表 5。

2.6 褪黑素对胃癌小鼠模型淋巴细胞中 NF- κ B 表达水平的影响

与对照组比,模型组、模型+褪黑素组的淋巴细胞中 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比,模型+褪黑素组的 NF- κ B mRNA 和蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),见图 4 和表 6。

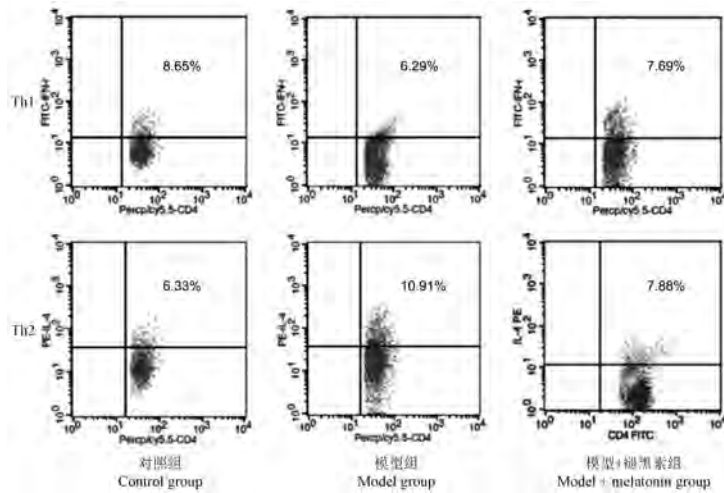


图 2 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1、Th2 细胞水平的影响

Figure 2 Effect of melatonin on the Th1, Th2 level of gastric cancer mouse model

表 3 褪黑素对胃癌小鼠模型 IFN- γ 和 IL-4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of melatonin on the expression of IFN- γ and IL-4 in a mouse model of gastric cancer

组别 Groups	IFN- γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
对照组 Control group	86.95 $\pm$ 9.74	7.26 $\pm$ 0.68
模型组 Model group	52.26 $\pm$ 6.85 *	15.32 $\pm$ 1.71 *
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	81.46 $\pm$ 11.09 **	10.14 $\pm$ 1.13 **

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

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

表 4 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1/Th2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of melatonin on Th1/Th2 levels in mouse models of gastric cancer

组别 Groups	Th1	Th2	Th1/Th2
对照组 Control group	8.68 $\pm$ 0.75	6.37 $\pm$ 0.65	1.36 $\pm$ 0.12
模型组 Model group	6.33 $\pm$ 0.71 *	11.02 $\pm$ 1.14 *	0.57 $\pm$ 0.07 *
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	7.62 $\pm$ 0.86 **	7.85 $\pm$ 0.84 **	0.97 $\pm$ 0.11 **

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

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

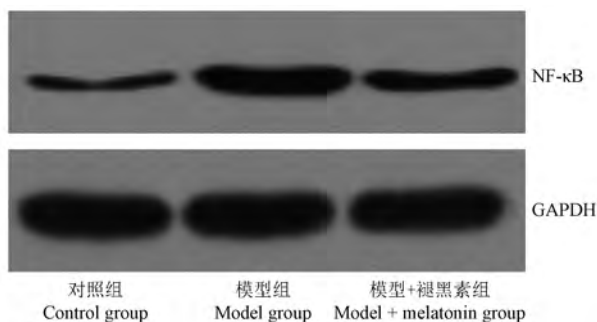


图 3 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤组织中 NF- κ B 蛋白相对的表达水平的影响

Figure 3 Effect of melatonin on the expression of NF- κ B protein in the tumor tissue of a mouse model of gastric cancer

表 5 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤组织中 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of melatonin on the expression levels of NF- κ B mRNA and protein in tumor tissues of gastric cancer mouse models

组别 Groups	NF- κ B mRNA	NF- κ B 蛋白 NF- κ B Protein
对照组 Control group	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.07
模型组 Model group	4.56 $\pm$ 0.42 *	3.92 $\pm$ 0.36 *
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	2.17 $\pm$ 0.20 **	1.86 $\pm$ 0.17 **

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

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

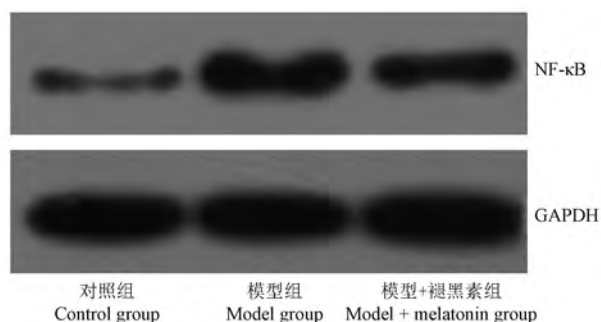


图 4 褪黑素对胃癌小鼠模型淋巴细胞中 NF-κB 蛋白表达水平的影响

Figure 4 Effect of melatonin on the expression of NF-κB protein in lymphocytes in mouse models of gastric cancer

表 6 褪黑素对胃癌小鼠模型淋巴细胞中 NF-κB 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Effect of melatonin on the expression of NF-κB in lymphocytes in mouse models of gastric cancer

组别 Groups	NF-κB mRNA	NF-κB 蛋白 NF-κB Protein
对照组 Control group	1.00±0.01	1.00±0.09
模型组 Model group	4.92±0.48 *	4.48±0.43 *
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	2.75±0.26 **	2.21±0.21 **

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

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

3 讨论

我国大部分胃癌患者在确诊时已处于中晚期,这使患者的死亡率大大升高^[11]。胃癌细胞的恶性增殖是导致治疗失败的主要原因^[12],寻找有效的抑制胃癌细胞增殖和促进其凋亡的药物对于胃癌治疗具有重要的临床意义。

褪黑素具有抗衰老、抗炎、促进睡眠、以及血管舒张和抗纤维化的功能^[13]。近年来,褪黑素的抗癌作用被逐渐发现,研究表明褪黑素可以抑制胰腺癌^[14]、卵巢癌^[15]、乳腺癌^[16]等的进展。最新研究发现褪黑素也具有抑制胃癌的功能,细胞实验结果表明褪黑素可通过介导自噬抑制胃癌细胞的增殖^[17]。Ki67 是肿瘤细胞有丝分裂必不可少的蛋白,NF-κB 蛋白的升高会促进 Ki67 蛋白的表达,从而促进胃癌细胞增殖^[18]。Bcl2 是经典的抗凋亡蛋白,Bcl2 蛋白的过表达是导致胃癌发生和进展的重要因素,并且 Bcl2 蛋白的表达也被 NF-κB 通路调控^[19]。本研究利用胃癌细胞构建了胃癌移植瘤小

鼠模型,结果表明皮下注射褪黑素可显著的抑制肿瘤组织的生长,并抑制肿瘤组织中增殖标志蛋白 Ki67 和抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达。此外,胃癌组织中 NF-κB mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,提示褪黑素则可在转录和翻译的水平上抑制 NF-κB 的表达。Colombo 等^[20]的研究表明褪黑素可通过抑制 NF-κB 通路的水平抑制乳腺癌和胃癌的进展。也有研究显示褪黑素通过抑制 NF-κB 通路抑制 COX-2 的表达,从而起到抗血液肿瘤的作用^[21]。本次研究结果表明褪黑素可在 mRNA 和蛋白的水平上抑制 NF-κB 的表达,从而 Ki67 和 Bcl2 蛋白的表达,这会降低胃癌细胞的增殖能力并诱导其凋亡,从而抑制胃癌移植瘤模型的生长,起到抗胃癌作用。

为进一步分析褪黑素抗胃癌的机制,本研究也基于 Th1/Th2 从免疫的水平上分析褪黑素的胃癌机制。研究发现免疫抑制参与胃癌的发生、生长和转移,机体免疫能力的降低导致体内生成的癌变细胞无法清除,从而导致肿瘤的发生^[22]。此外,机体免疫力的降低,以及肿瘤细胞的免疫逃逸特性,导致肿瘤组织不受限的生长并发生转移^[23]。Th1/Th2 细胞均是由 CD4⁺T 淋巴细胞分化而来的两个亚群,其中 Th1 细胞介导免疫和炎症反应,Th1 会通过分泌 IFN-γ 来促进炎症反应,并解除免疫抑制,促进肿瘤被免疫系统清除^[24]。Th2 细胞功能与 Th1 细胞相反,其可通过分泌 IL-4、IL-10 等诱导免疫抑制缓解炎症反应^[25]。在肿瘤中,Th2 细胞分化比例升高,介导免疫抑制,Th2 比例的升高也与胃癌患者不良预后有关^[26]。此外,Th1/Th2 细胞的分化和功能也受到 NF-κB 通路的调节,研究表明 H₂S 会通过介导 NF-κB 通路 Th1/Th2 失衡,从而加剧脂多糖诱导的肺炎^[27]。也有研究显示细辛素对胶原性关节炎的改善与 NF-κB 通路的下调和 Th1/Th2 平衡的回调有关^[28]。为分析褪黑素对胃癌动物模型 Th1/Th2 的影响,本研究利用免疫系统正常的小鼠构建胃癌移植瘤模型,结果表明与健康小鼠比较,胃癌模型小鼠外周血中 IFN-γ 的水平降低,IL-4 的水平升高,Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值显著降低,而 Th2 细胞比例升高,此外,淋巴细胞中 NF-κB mRNA 和蛋白的水平均显著升高,这说明胃癌移植瘤裸鼠模型中出现 Th1/Th2 的失衡,并且出现免疫抑制。而褪黑素不但提高了 IFN-γ、Th1 细胞比例和 Th1/Th2 水平,抑制了 IL-4 和 Th2 的水平,还在 mRNA 和蛋白的水平上显著抑制了淋巴细胞中 NF-κB 的

表达。刘静等^[29]的研究表明体内褪黑素的升高会促进 CD4⁺T 淋巴细胞的活化,从而提高机体的免疫力。也有研究表明褪黑激素可通过平衡重症肌无力中的外周血 Th1/Th2 比例发挥免疫调节作用^[30]。本次研究结果表明胃癌会引起 Th1 的降低和 Th2 的升高,从而影响机体的免疫反应诱发免疫抑制,而褪黑素则可通过的提高 NF- κ B 的表达提高 Th1 细胞比例并抑制 Th2 细胞分化,从而使失衡的 Th1/Th2 向 Th1 偏移,并促进 IFN- γ 的分泌抑制 IL-4 的分泌,解除免疫抑制,进而起到抗胃癌的功能。

此外,本次研究也存在某些局限性。首先,本研究是定性额,只提示了褪黑素一定程度上具有抗胃癌和调节 Th1/Th2 的作用,但是其治疗胃癌的剂量、安全性仍需要动物和临床研究。关于 NF- κ B 在褪黑素抗胃癌中的必要性仍需要挽救实验验证。并且褪黑素调控胃癌中 NF- κ B 的表达的分子机制仍需要深入研究。

综上所述,褪黑素可能通过调控 NF- κ B 通路抑制胃癌移植瘤小鼠模型的肿瘤生长,并调节 Th1/Th2 平衡。提示褪黑素可能是治疗胃癌的有潜力的药物。

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] Rocha GA, de Melo FF, Cabral MMDA, et al. Interleukin-27 is abrogated in gastric cancer, but highly expressed in other Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases [J]. Helicobacter, 2020, 25(1): 12667-12667.
- [3] 谭静, 林亚平, 赵欢, 等. 艾灸对胃荷瘤大鼠瘤体内 Th1、Th2 类细胞因子表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(12): 1061-1066.
- [4] 叶旭星, 何钦, 徐斌, 等. Th1/Th2 平衡与胃癌前病变危险因素及病理积分相关性分析 [J]. 中国现代医生, 2016, 54(5): 1-3.
- [5] Huang Y, Yuan K, Tang M, et al. Melatonin inhibiting the survival of human gastric cancer cells under ER stress involving autophagy and Ras-Raf-MAPK signalling [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(3): 1480-1492.
- [6] 李清, 王杰玉, 张晓丹, 等. 子宫腺肌病小鼠的药物疗效及其疼痛机制 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 516-520.
- [7] Fan H, Zhang S, Zhang Y, et al. FERMT1 promotes gastric cancer progression by activating the NF- κ B pathway and predicts poor prognosis [J]. Cancer Biol Ther, 2020, 21(9): 815-825.
- [8] Wang Z, Zhuo F, Chu P, et al. Germacrone alleviates collagen-induced arthritis via regulating Th1/Th2 balance and NF- κ B activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(3): 560-564.
- [9] 毕研贞, 孔令斌, 高鹏飞, 等. 基于 microcarrier 6 构建正常免疫小鼠人胃癌移植模型 [J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(5): 199-203.
- [10] 刘畅, 张宗恺, 贾佳, 等. 褪黑素介导小鼠肝 H22 肿瘤细胞自噬作用的研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(5): 26-31.
- [11] Gao K, Wu J. National trend of gastric cancer mortality in China (2003-2015): a population-based study [J]. Cancer Commun, 2019, 39(1): 24-29.
- [12] Miwa T, Kanda M, Umeda S, et al. Homeobox C10 influences on the malignant phenotype of gastric cancer cell lines and its elevated expression positively correlates with recurrence and poor survival [J]. Ann Surg Oncol, 2019, 26(5): 1535-1543.
- [13] Sun C, Liu L, Wang L, et al. Melatonin: a master regulator of plant development and stress responses [J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(1): 126-145.
- [14] Tamtaji OR, Mirhosseini N, Reiter RJ, et al. Melatonin and pancreatic cancer: current knowledge and future perspectives [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5372-5378.
- [15] Zare H, Shafabakhsh R, Reiter RJ, et al. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects [J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 26-29.
- [16] Amin N, Shafabakhsh R, Reiter RJ, et al. Melatonin is an appropriate candidate for breast cancer treatment: based on known molecular mechanisms [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 12208-12215.
- [17] 朱辉, 江婷婷, 黄晓琪, 等. 自噬增强拮抗褪黑素诱导的胃癌细胞增殖抑制作用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(4): 324-330.
- [18] Cui Y, Huang S, Cao J, et al. Combined targeting of vascular endothelial growth factor C (VEGFC) and P65 using miR-27b-3p agomir and lipoteichoic acid in the treatment of gastric cancer [J]. J Gastrointest Oncol, 2021, 12(1): 121-132.
- [19] Yu JH, Zheng JB, Qi J, et al. Bile acids promote gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 and MUC₂ expression via the FXR/NF- κ B signalling pathway [J]. Int J Oncol, 2019, 54(3): 879-892.
- [20] Colombo J, Jardim-Perassi BV, Ferreira JPS, et al. Melatonin differentially modulates NF- κ B expression in breast and liver cancer cells [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2018, 18(12): 1688-1694.
- [21] Tang YL, Sun X, Huang LB, et al. Melatonin inhibits MLL-rearranged leukemia via RBFOX3/hTERT and NF- κ B/COX-2 signaling pathways [J]. Cancer Lett, 2019, 443(1): 167-178.

(下转第 108 页)

尤越,李玲美,李磊,等. 细胞焦亡与心血管疾病的关系及中医药干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 97-108.
You Y, Li LM, Li L, et al. Relationship and Traditional Chinese Medicine intervention of pyroptosis and cardiovascular diseases [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 97-108.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.014

细胞焦亡与心血管疾病的关系及 中医药干预研究进展

尤 越^{1,2,3}, 李玲美^{1,2,3}, 李 磊^{1,2,3}, 韩 笑^{1,2,3}, 孟红旭^{1,2,3}, 付建华^{1,2,3*}, 刘建勋^{1,2,3}

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京 100091; 2. 国家中医心血管病临床医学中心, 北京 100091;
3. 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

【摘要】 细胞焦亡(Pyroptosis)是一种促炎的程序性细胞死亡方式,其发生依赖于半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)的激活,伴随大量促炎症因子释放。细胞焦亡的主要信号通路包括 Caspase-1 介导的经典通路和 Caspase-4、5、11 介导的非经典通路。此外, Caspase-3 和 Caspase-8 也可以分别通过裂解 Gasdermin E (GSDME) 和 Gasdermin D (GSDMD) 来诱导焦亡。近年来研究表明细胞焦亡在心血管疾病发生发展过程中扮演着重要的角色。本文就细胞焦亡与动脉粥样硬化、心肌缺血/再灌注、心衰、高血压、糖尿病性心肌病这些心血管疾病的关系及近年来中医药调控细胞焦亡干预心血管疾病方面进行综述,以期发挥中医药优势防治心血管疾病提供新思路。

【关键词】 中医药;细胞焦亡;心血管疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0097-12

Relationship and Traditional Chinese Medicine intervention of pyroptosis and cardiovascular diseases

YOU Yue^{1,2,3}, LI Lingmei^{1,2,3}, LI Lei^{1,2,3}, HAN Xiao^{1,2,3}, MENG Hongxu^{1,2,3}, FU Jianhua^{1,2,3*}, LIU Jianxun^{1,2,3}

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China.
2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Beijing 100091. 3. Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091)

【Abstract】 Pyroptosis, a pro-inflammatory programmed mode of cell death that relies on caspases, is accompanied by the massive release of pro-inflammatory factors. There are two main signaling pathways in pyroptosis: the classical pathway mediated by Caspase-1 and non-classical pathway mediated by Caspases-4, 5 and 11. In addition, Caspase-3 and Caspase-8 can induce pyroptosis by cleaving Gasdermin E and Gasdermin D, respectively. Recent studies have shown that pyroptosis plays an important role in the occurrence and development of cardiovascular diseases. This article briefly summarizes the relationship between pyroptosis and cardiovascular diseases including atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion, heart failure, hypertension, and diabetic cardiomyopathy. In addition, we review Traditional Chinese Medicine interventions explored in recent years to provide new ideas for the prevention and treatment of cardiovascular diseases that embrace the advantages of Traditional Chinese Medicine.

【Keywords】 Traditional Chinese Medicine; Pyroptosis; cardiovascular disease

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(82174219);北京市中医药科技发展基金项目(JJ-2020-78);中国中医科学院科技创新工程项目资助(CI2021A00912);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202007);北京市中医药科技发展资金青年规划项目(QN-2020-14)。

【作者简介】 尤越(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:血管中药药理研究。E-mail:youyue90996@163.com

【通信作者】 付建华(1970—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:血管中药药理研究。E-mail:jianhuaffcn@263.net

细胞焦亡是一种由 Gasdermin 介导的细胞程序性死亡方式,焦亡的发生会形成质膜孔,引起细胞肿胀和溶解,随后细胞膜破裂、促炎细胞因子释放,从而诱导和放大炎症反应。炎症反应是多种心血管疾病的基本病理特征,细胞焦亡及其相关炎症小体的激活与心血管疾病的发生发展密切相关^[1]。研究发现,多种中药复方、单体能够调控细胞焦亡防治心血管疾病^[2]。本文依据国内外相关研究进展,探讨细胞焦亡的分子机制及其与心血管疾病的关系,以及中医药对其干预的新探索,以期加深对细胞焦亡的认识,并为心血管疾病的防治提供中医药治疗新视角。

1 细胞焦亡的概述

细胞焦亡现象最早是 1992 年 Zychlinsky 在弗氏志贺氏杆菌感染的巨噬细胞中发现,1999 年在沙门氏菌感染的巨噬细胞中也观察到了类似的表型^[3-4]。其后相关研究表明,选择性 Caspase-1 抑制剂和敲除 Caspase-1 均能有效阻止弗氏志贺菌诱导的细胞死亡,而 Caspase-3 抑制剂却不能;提示存在一种新的细胞死亡形式,不依赖于经典凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达^[5-6]。2001 年, Cookson BT 和 Brennan MA 首次将细胞焦亡定义为一种由 Caspase-1 介导的程序性细胞死亡的新形式^[7]。2011 年, Kayagaki 等^[8]发现 Caspase-11 诱导的巨噬细胞焦亡可不依赖于 Caspase-1 的激活,并提出它是非经典炎症小体途径,但 Caspase-1/11 的下游信号通路尚未确定。直到 2015 年,两项独立研究确定 GSDMD 蛋白是 Caspase-1/11 的关键底物,细胞焦亡被重新定义为由 Gasdermin 介导的程序性细胞坏死^[9-10]。此外,最新研究发现, Caspase-3、Caspase-8 和 GSDME 蛋白也参与了细胞焦亡。2018 年, NCCD (细胞死亡命名委员会)将细胞焦亡定义为“一种调节性细胞死亡”,严重依赖于 Gasdermin 蛋白家族成员的质膜孔的形成,通常是炎症性 Caspase 激活的结果^[11]。细胞焦亡现象不仅存在于单核/巨噬细胞中,还存在于包括树突状细胞、肝细胞、内皮细胞、心肌细胞等其他细胞中^[12]。在生化与形态学上,细胞焦亡主要特征是细胞肿胀,细胞膜上快速形成直径为 10~15 nm 的膜孔^[13],细胞膜破裂,胞内容物流出,形成炎症小体并释放大量促炎因子包括白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18、高迁移率

族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 和热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)。

2 细胞焦亡的发生机制

2.1 依赖 Caspase-1 的经典焦亡通路

细胞焦亡是一种参与先天免疫的促炎型调节性细胞死亡 (regulatory cell death, RCD) 方式^[14]。先天免疫反应依赖于模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 来识别病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 和危险相关分子模式 (damage-associated molecular pattern, DAMP)。PRR 家族主要由核苷酸结合寡聚结构域样受体 (nucleotide-binding oligomerization domain like receptor, NLR)、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 以及黑色素瘤 2 缺失受体 (absent in melanoma 2-like receptor, ALR) 等几种不同受体^[15]组成。PAMP 或 DAMP 激活的 PRR 可诱导炎症反应^[16]。细胞焦亡是由炎症小体激活引起的,炎症小体是细胞内蛋白质复合物^[17]。目前研究较多的炎症小体有 NLRP1、NLRP3、NLRP4、AIM2 和 Pyrin。Pyrin 可以与接头蛋白 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 形成炎症小体复合物,并在体外激活 Caspase-1^[18]。研究最深入的炎症小体是 NLRP3 炎症小体,分别由传感器分子 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 组成。某些 PRR 家族,如 NLR 亚家族,是炎症小体复合物的关键组成部分。在细胞内和细胞外的刺激下,炎症小体的激活作为 Caspase-1 活化的分子信号平台,进而导致细胞死亡和炎症反应^[19]。各种刺激物对 NLR (NLRP4, 黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)、NLRP1 和 Pyrin) 的刺激导致典型炎症小体的组装^[20],从而将 pro-caspase-1 转化为具有活性的 Caspase-1。GSDMD 被 Caspase-1 裂解并激活,导致膜孔形成和炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18、HGRB 等释放,诱导细胞焦亡^[14]。

2.2 依赖 Caspase-4/5/11 的非经典焦亡通路

Caspase-11 通过两种方式间接引起细胞焦亡。一方面 Caspase-11 可直接识别并结合细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 作用于 GSDMD, 诱导 K⁺ 外流,激活 NLRP3 炎症小体并释放炎症因子,促进细胞焦亡;另一方面, Caspase-11 还能激活 pannexin-1 通道,释放 ATP,促进嘌呤受体 P2X7 膜通道的开

放和 K^+ 外流,诱导细胞焦亡。

Caspase-4、5 与 Caspase-11 是同源蛋白,其功能相似,也可以识别 LPS,促进 Caspase 快速寡聚、活化,切割 GSDMD-N,导致膜孔形成和炎性介质的分泌,引发细胞死亡和炎症^[21]。

目前对 Caspase-4、5、11 非经典通路的了解主要集中在其在感染性疾病中的作用上,对心血管疾病的作用研究较少^[22]。

2.3 其他 Caspase 介导的细胞焦亡

近期研究表明,GSDME 能够被 Caspase-3 切割,裂解生成 Asp270,后者产生靶向质膜的坏死 GSDME-N 片段,从而诱导细胞焦亡^[23]。Caspase-3 可将 GSDME 特异性切割成 N 端和 C 端片段。GSDME 的 N 端片段(GSDME-N)与 GSDMD-N 相似,两者均可诱导大面积细胞死亡^[24]。这些结果改变了以往认为 Caspase-3 的激活仅导致细胞凋亡的传统观念^[25]。研究发现,硬骨鱼只有 GSDME,可被 Caspase-1、3 和 7 裂解并诱导细胞焦亡^[26],这为进一步探索焦亡途径提供了实验模型。

研究发现 Caspase-8 的激活触发了 NLRP3 炎症小体^[27],提示 Caspase-8 可能诱发焦亡。随后,相关研究发现通过耶尔森氏菌效应蛋白 yopJ 抑制 tak1 激酶会引起 Caspase-8 依赖性的 GSDMD 裂解,并导致细胞焦亡,这意味着 Caspase-8 也是焦亡的调控因子^[28]。Caspase-8 与 Caspase-11 的联合还可以增强炎症反应^[29]。以上结果表明 Caspase-8/GSDMD 通路和 Caspase-3/GSDME 通路可能是细胞焦亡的其他机制。

3 细胞焦亡与心血管疾病的关系

心血管疾病是世界范围内引起死亡的主要原因,细胞焦亡在多种心血管疾病的病理过程中起着关键作用。细胞焦亡可能是心血管疾病的内源性调节因子,焦亡的发生及其病理产物可减少血管再生,破坏血管内皮细胞,破坏动脉壁斑块的稳定性,引起心肌肥大和心肌纤维化,加重疾病的损害,导致预后不良^[1]。

3.1 细胞焦亡与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是涉及多种因素的慢性炎症性疾病,细胞死亡和炎症是动脉粥样硬化发生和发展的两个关键因素^[30]。细胞焦亡作为一种促炎性的细胞死亡方式,在动脉粥样硬化

中发挥着重要的作用。细胞焦亡的发生会加重动脉粥样硬化斑块的不稳定性,导致斑块破裂和血栓形成,最终通过大量释放促炎细胞因子,引起急性心血管事件^[31]。

内皮细胞功能障碍和坏死是动脉粥样硬化的始动环节,内皮细胞焦亡可引起内皮功能障碍。动脉粥样硬化的一些危险因素可通过上调 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达,诱导内皮细胞焦亡,加重动脉粥样硬化斑块的发展^[32]。Yin 等^[33]、Wu 等^[34]发现,活化高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-}小鼠中的 Caspase-1 会促进内皮细胞的死亡;与 ApoE^{-/-}小鼠相比,Caspase-1 和 ApoE 双基因敲除小鼠的主动脉窦区动脉粥样硬化面积减少了 44%。Zeng 等^[35]发现,核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 抑制剂 BAY11-7082 可显著降低内皮细胞中 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 的表达。氧化三甲胺(trimethylamino oxido, TMAO)、氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)、尼古丁、丙烯醛等促进 NLRP3 介导的内皮细胞焦亡的机制均与线粒体损伤和活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生有关^[34,36]。位于线粒体内膜上的琥珀酸脱氢酶复合亚基 B(succinate dehydrogenase B, SDHB)在呼吸和氧化中起着至关重要的作用,SDHB 的过表达促进了 ROS 的产生,而 SDHB shRNA 的转染消除了 TMAO 诱导的人脐静脉内皮细胞焦亡^[37]。上述研究表明 ROS/NF- κB /NLRP3 轴在动脉粥样硬化过程中的内皮细胞焦亡中起重要作用。

巨噬细胞源性泡沫细胞是动脉粥样硬化斑块不稳定的关键因素^[38]。细胞焦亡是动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞坏死的主要方式^[39]。研究发现,低浓度长期 ox-LDL 处理可以使体外培养的泡沫细胞容易发生焦亡,从而促进动脉粥样硬化的发展^[40]。溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)是 ox-LDL 致动脉粥样硬化发生中具有高度促炎作用的关键因子^[41]。Corrêa 等^[42]报道,LPC 诱导单核、内皮细胞中泡沫细胞形成是依赖于 Caspase-1 的激活和 IL-1 β 的释放。最新研究表明,尼古丁通过增加 ROS 的产生,激活 TXNIP/NLRP3 炎症小体,引起巨噬细胞焦亡^[43]。NF 通路的关键蛋白 p65 的核转位促进了尼古丁诱导的巨噬细胞细胞焦亡,当 p65 被 siRNA 沉默时,尼古丁诱导的 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达在 RAW264.7 细胞中显著降低^[44]。

Peng 等^[45]报道线粒体外膜蛋白 NIX 通过激活线粒体自噬抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡;线粒体自噬通过维持线粒体膜电位和减轻 ROS 的产生来抑制巨噬细胞中 Caspase-1 的激活和 IL-1 β 的成熟;表明在动脉粥样硬化危险因素的刺激下,线粒体具有维持自身稳定性的机制来抵抗细胞焦亡。现有研究表明,ROS/NF- κ B/NLRP3 轴和线粒体也在动脉粥样硬化过程中的巨噬细胞焦亡中起关键的作用。此外,Caspase-11/GSDMD 非经典焦亡通路也与动脉粥样硬化的发病相关。Fidler 等^[46]发现巨噬细胞焦亡会加重动脉粥样硬化,而敲除 Caspase-1、11 或 GSDMD 基因可减轻 Jak2V617F 小鼠的动脉粥样硬化。

平滑肌细胞的焦亡可导致动脉粥样硬化斑块纤维帽变薄,并触发炎症反应,从而加剧斑块的不稳定性和脆弱性。研究表明,ox-LDL 通过激活 NLRP3 炎症小体诱导平滑肌细胞焦亡,而 Caspase-1 抑制剂 VX-765 可显著减少 ox-LDL 诱导的内皮细胞焦亡,减缓动脉粥样硬化的发展^[47]。研究表明,高脂饲料喂养可提高 ApoE^{-/-}小鼠 AIM2、GSDMD-N 的蛋白表达,增大动脉粥样硬化斑块面积;体外研究发现 AIM2 和 GSDMD-N 的表达与 ox-LDL 水平呈浓度依赖关系,且 NF- κ B 抑制剂可以减少 AIM2 的表达^[48]。

3.2 细胞焦亡与心肌缺血/再灌注损伤

冠状动脉急性闭塞可导致心肌梗死(myocardial infarction, MI),目前最好的解决方法是及时恢复血流,以防止心肌细胞过度死亡。然而,当血流再通时,缺血心肌虽然得以恢复正常灌注,其组织损伤反而呈进行性加重,这一病理过程称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)。炎症反应在 MI/RI 发生过程中起重要的作用,细胞焦亡过程会释放大量促炎因子,越来越多的证据表明,细胞焦亡与 MI/RI 密切相关。

Kawaguchi 等^[49]发现在 MI 死亡患者的心脏中存在 NLRP3 炎症小体成分。在心肌缺血的情况下,线粒体功能障碍和溶酶体不稳定会增加 K⁺外流,从而激活 NLRP3 炎症小体,促进细胞焦亡^[50]。由 NLRP3 炎症小体激活介导的细胞焦亡可加重糖尿病大鼠 MIRI 程度,且糖尿病 MIRI 大鼠 CK-MB 和 LDH 的释放量明显高于非糖尿病大鼠,并伴有 NLRP3 炎症小体活化和细胞焦亡的增加,而抑制

NLRP3 炎症小体的激活可明显改善 MIRI^[51]。钙蛋白酶的沉默可通过抑制 NLRP3/ASC/Caspase-1 轴的激活来改善 MIRI 所致的心肌功能障碍^[52]。通过抑制氧化应激和 NLRP3 介导的细胞焦亡,抑制 miR-29a 靶向沉默信息调节因子 2 相关酶 1(sirtuin, SIRT1)也可以改善 MIRI^[53]。以上研究结果表明 NLRP3 介导的细胞焦亡在 MI/RI 中起关键作用。

研究发现,Caspase-1 基因敲除小鼠在 MIRI 后左心室重构减弱,心肌梗死面积减少^[54],但是 Caspase-1 过度表达的小鼠,其心肌梗死面积会增加^[55]。研究发现,具有高度选择性的 Caspase-1 抑制剂 VX-765 可以减少 MIRI 损伤模型中的心肌梗死^[56]。因此,Caspase-1 可能是治疗心血管疾病的潜在靶点。

3.3 细胞焦亡与心衰

心力衰竭(heart failure, HF)是大多数心血管疾病的最终结果。心衰的主要病理生理特征是心脏结构和功能的改变,表现为心肌细胞和心脏成纤维细胞死亡、炎性细胞浸润、心肌纤维化、心脏肥大和心功能降低^[57]。近年来,研究表明细胞焦亡可能在心力衰竭中也起重要作用^[58]。

钙调神经磷酸酶转基因(calcineurin transgeneosis, CNTg)的过度表达会导致心脏肥大、炎症和心室扩张^[59]。NLRP3 炎症小体在 CNTg 小鼠衰竭心肌中被激活,经 IL-1 受体拮抗剂(IL-1-ra)治疗后,收缩功能得到改善;此外,NLRP3 基因敲除可降低血清 IL-1 β 和心肌 Caspase-1 活化,减少炎症反应,改善心脏收缩功能^[60]。这些结果证明 NLRP3 炎症小体通过 IL-1 β 促进心肌功能障碍相关的结构性心肌病,为心力衰竭的治疗提供了潜在方向。

病理性肥厚是心脏病中发生的一种主要改变,可导致心力衰竭。体外实验表明,在心肌肥厚模型中,Caspase-1 和 IL-1 β 的表达水平显著上调,随后用 Caspase-1 抑制剂和血管紧张素 II(Angiotensin II, Ang II)治疗心肌细胞,发现 Caspase-1 减弱了 Ang II 的促肥厚作用,这与 Caspase-1 和 IL-1 β 的下调有关,Caspase-1 通过上调 IL-1 β 来调控 Ang II 诱导的心肌肥大^[61]。以上结果表明,Caspase-1 介导的细胞焦亡与心肌肥厚的发病机制密切相关。

3.4 细胞焦亡与高血压

高血压(hypertension, HTN)是一种慢性、低度炎症性疾病,是动脉粥样硬化相关心血管疾病的危

险因素。虽然细胞焦亡和高血压之间的关系目前还没有明确,但是焦亡相关炎症小体的释放在高血压的发病过程中也扮演着重要的角色。

炎症是高血压发生的主要原因之一。研究发现,与正常人群比较,原发性高血压患者血清 IL-1 β 水平升高,鉴于 IL-1 β 的成熟依赖于 Caspase-1,高血压的发生可能与 Caspase-1 的激活有关^[62-64];另一项研究表明,pro-caspase-1 mRNA 在自发性高血压大鼠的主动脉和肾动脉中的表达增加,间接支持了这种可能性^[65]。此外,高盐还会增加小鼠肾中 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达,促进 Caspase-1 的激活,以及 IL-1 β 的成熟^[62]。NLRP3 炎症小体关键组分的表达下调可以延缓高血压的发展,抑制 NLRP3 炎症小体的药物可以降低血压。MCC950 是一种 NLRP3 受体阻滞剂,它可以部分逆转高盐诱导的小鼠高血压^[66]。因此,NLRP3 炎症小体可能是降压药物研发的一个潜在方向。

3.5 细胞焦亡与糖尿病性心肌病

糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病晚期常见的并发症,以心肌纤维化和心肌肥厚为特征,可导致心衰、心律失常和猝死等不良后果。代谢改变、线粒体功能障碍、氧化应激、炎症、细胞死亡都可能与 DCM 的发病机制有关,细胞焦亡在 DCM 过程中也发挥着重要作用。

研究发现,高糖可通过促进 NLRP3 或 AIM2 炎症小体的表达,从而激活 Caspase-1/GSDMD 介导的细胞焦亡,对糖尿病性心肌病产生影响^[67]。AIM2、Caspase-1、IL-1 β 和 GSDMD 在糖尿病性心肌病患者的心肌组织中的表达升高;而通过抑制 AIM2 炎症小体的表达,可以减轻细胞焦亡,对 DCM 起到改善作用^[68]。长链非编码 RNA Kcnq1ot1 在 DCM 小鼠左心室组织中升高,并结合 miR-214-3p 促进心脏成纤维细胞焦亡,而通过沉默 Kcnq1ot1 可以抑制 DCM 小鼠的心肌细胞焦亡,从而改善小鼠的心肌纤维化和心功能^[69]。以上结果表明,抑制细胞焦亡信号通路可能为 DCM 的治疗提供新的方向。

4 中医药调控细胞焦亡防治心血管疾病相关研究进展

随着细胞焦亡相关研究的进展,越来越多的中药复方、单体、有效成分被证明可以通过 NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 等焦亡信号通路相关分子,调控细胞焦亡,改善心血管疾病。其中,干预由 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 介导的细胞

焦亡是中药发挥心血管保护作用的重要机制。

4.1 抗动脉粥样硬化

清心解瘀方和左归降糖舒心方含药血浆均可下调 J774A.1 巨噬细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的表达,抑制细胞焦亡,从而发挥抗炎、稳定易损斑块的作用^[70-71]。化痰祛瘀方可通过调控 NLRP3/Caspase-1 通路影响细胞焦亡,降低 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 的蛋白表达水平,减少动脉粥样硬化家兔的血清及肝组织内 IL-18、IL-1 β 含量,从而改善动脉粥样硬化家兔肝脂质沉积^[72]。蛭龙活血通瘀胶囊可降低 U937 巨噬细胞焦亡率,下调 GSDMD-N、Caspase-1、ASC、NLRP3、IL-1 β 的表达水平,从而保护细胞^[73-74]。四妙勇安汤能够通过调控 TLR4/NLRP3/Caspase-1 通路抑制细胞焦亡,改善小鼠动脉粥样硬化斑块形成和心功能^[75]。研究还发现一些中药单体、有效成分、提取物也可通过调控细胞焦亡抗动脉粥样硬化^[76-81]。见表 1、表 2。

4.2 抗心肌缺血和缺血再灌注损伤

中药复方山楂煎剂可降低心肌缺血模型大鼠心肌细胞中 Caspase-1 的表达,增加 GSH-Px 含量,减少动脉粥样硬化积分,最终改善心肌缺血^[82]。柚皮苷和 β -细辛醚均可降低细胞焦亡相关蛋白 ASC、Caspase-1、GSDMD 和 NLRP3 的表达,减少炎症因子 IL-1 β 的释放,减少心肌缺血再灌注模型大鼠的心肌梗死面积^[83-84]。此外,研究还发现其他一些中药单体、有效成分、提取物也可通过调控细胞焦亡抗心肌缺血和缺血再灌注损伤^[85-91]。见表 1、表 2。

4.3 抗心力衰竭

中药复方及其含药血清可以通过调控细胞焦亡来改善心功能,减缓心衰。研究表明,中药复方制剂参葵通脉颗粒与心阳片均可通过降低 NF- κ B、NLRP3 的表达,抑制 Caspase-1、IL-1 β 的活化,进而调控细胞焦亡,改善慢性心衰;体外实验结果表明,心阳片可能通过混合谱系激酶 3(MLK3)/NLRP3 信号通路来减轻心肌炎症反应,抗心力衰竭^[92-93]。此外,心阳片含药血清还可降低 NLRP3、IL-1 β 、GSDMD、Caspase-1 mRNA 水平,抑制 cleaved-GSDMD、ASC 的蛋白表达水平,从而减少心肌细胞炎症,改善心功能^[94]。鹿芪方可减少心肌组织 ROS 含量,降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白的表达水平,可能通过抑制 ROS/NLRP3/Caspase-1 信号通路激活,减轻慢性心力衰竭小鼠心肌细胞焦亡^[95]。见表 1。

表 1 通过细胞焦亡抗心血管疾病中药复方总结

Table 1 Summary of Traditional Chinese Medicine compounds against cardiovascular diseases through cell pyroptosis

中药复方 Chinese herbal compound	实验模型 Experimental model	药理作用 Pharmacological action
清心解瘀方 Qingxin Jieyu formula	高脂饲料喂养致 ApoE ^{-/-} 小鼠 动脉粥样硬化模型 ApoE ^{-/-} mouse model of atherosclerosis induced by high fat diet	减少斑块沉积,降低斑块内脂质含量,降低血清 CRP、IL-18、IL-1 β 水平,降低 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白和 mRNA 的表达,通过抑制主动脉组织中 NLRP3 炎症小体的活化,发挥抗炎、稳定 AS 易损斑块的作用 ^[70] Reduced plaque deposition, lipid content in plaque, serum CRP, IL-18, IL-1 β levels, and protein and mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD. It plays an anti-inflammatory and stabilizing role in AS-vulnerable plaques by inhibiting the activation of NLRP3 inflammatory body in aortic tissue
	J774A.1 巨噬细胞焦亡模型 J774A.1 model of pyroptosis of macrophages	减少巨噬细胞焦亡,降低 NLRP3、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白和 mRNA 的表达,降低炎症因子 IL-1 β 的表达,抑制 NLRP3 炎症小体的活化 Decreased macrophage scortosis, decreased the expression of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD protein and mRNA, decreased the expression of inflammatory factor IL-1 β , inhibited the activation of NLRP3 inflammasome
左归降糖舒心 方(含药血浆) Zuogui Jiangtang Shuxin formula (medicated plasma)	氧化低密度脂蛋白诱导 J774A.1 巨噬细胞焦亡模型 Oxidative low density lipoprotein induces pyroptosis of J774A. 1 macrophages	降低 LDH 释放率,抑制 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达水平,从而抑制细胞焦亡 ^[71] Decreased LDH release rate and inhibited the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1 and GSDMD, thus inhibiting cell pyroptosis
化痰祛瘀方 Huatan Quyue formula	高脂饲料喂养结合免疫损伤法 建立兔动脉粥样硬化模型 High fat diet combined with immune injury to establish rabbit atherosclerosis model	改善脂质沉积;降低 Caspase-1、GSDMD、NLRP3 蛋白表达;减少血清及肝脏组织内 IL-18、IL-1 β 含量;其保护作用可能是通过调控 NLRP3/Caspase-1 通路影响细胞焦亡 ^[72] Improve lipid deposition; Decreased Caspase-1, GSDMD, NLRP3 protein expression; The contents of IL-18 and IL-1 β in serum and liver tissue were decreased. Its protective effect may be through regulating the NLRP3/Caspase-1 pathway to affect cell pyroptosis
蛭龙活血通瘀 胶囊 Zhilong Huoxue Tongyu Capsule	脂多糖和三磷酸腺苷诱导 U937 巨噬细胞焦亡模型 LPS and ATP induced pyroptosis of U937 macrophages	抑制巨噬细胞焦亡,降低 Gsdmd-N、Caspase-1、ASC 和 NLRP3 的蛋白表达水平 ^[73-74] It inhibited macrophage scortosis and reduced the protein expression levels of GSDMD-N, Caspase-1, ASC and NLRP3
四妙勇安汤 Simiao Yong'an Decoction	高脂饲料喂养致 ApoE ^{-/-} 小鼠 动脉粥样硬化模型 ApoE ^{-/-} mouse model of atherosclerosis induced by high fat diet	减少肝脏脂质沉积,降低血清中 TC、TG、LDL-C 水平,显著减少 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1 β mRNA 水平,降低 TLR4、NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、GSDMD 蛋白表达水平 ^[75] Decreased liver lipid deposition, decreased serum TC, TG, LDL-C levels, significantly decreased NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-18, IL-1 β mRNA levels, decreased TLR4, NF- κ B, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , GSDMD protein expression levels
复方山楂煎剂 Shanzha Decoction	SD 大鼠高脂饮食联合皮下多 点注射异丙肾上腺素致心肌缺 血模型 Myocardial ischemia model induced by high-fat diet combined with subcutaneous multi-point injection of isoproterenol in SD rats	降低血清 MDA、CK 含量、动脉粥样硬化积分和心肌组织中 Caspase-1 表达,提高 GSH-Px 活性,从而达到抗氧化应激与抗细胞焦亡的作用 ^[82] It can reduce the content of MDA and CK in serum, the atherosclerosis score and the expression of Caspase-1 in myocardial tissue, and improve the activity of GSH-Px, so as to achieve the effect of anti-oxidative stress and anti-cell pyroptosis
参葵通脉颗粒 Shenkui Tongmai Granules	SD 大鼠慢性心衰模型 Chronic heart failure model in SD rats	改善心功能,降低 TLR4、NF- κ B、NLRP3、IL-18、Caspase-1、IL-1 β 的蛋白表达水平,提高抗氧化酶含量,对心肌细胞焦亡具有一定抑制作用 ^[92] It can improve the cardiac function, decrease the protein expression levels of TLR4, NF- κ B, NLRP3, IL-18, Caspase-1 and IL-1 β , and increase the content of antioxidant enzymes. It has a certain inhibitory effect on cardiomyocyte pyroptosis
心阳片 Xinyang Tablet	C57 小鼠慢性心衰 Chronic heart failure in C57 mice	改善心功能及心肌纤维化,降低 NF- κ B、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-18、IL-1 β 、GSDMD 的蛋白表达水平 It improved cardiac function and myocardial fibrosis, and decreased the protein expression levels of NF- κ B, NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-18, IL-1 β and GSDMD
	HL-1 心肌细胞脂多糖处理 HL-1 myocardial cells treated with lipopolysaccharide	降低焦亡相关分子蛋白表达水平,与体内模型一致,其心脏保护作用与 MLK3/NLRP3 焦亡信号有关 ^[93] Reduced the expression level of coke death related molecular protein, which was consistent with the <i>in vivo</i> model, and its cardiac protective effect was related to the coke death signal of MLK3/NLRP3
心阳片(含药 血清) Xinyang Tablet (medicated plasma)	脂多糖和三磷酸腺苷诱导 HL-1 心肌细胞焦亡模型 HL-1 cardiomyocyte pyroptosis model induced by LPS and ATP	提高 HL-1 心肌细胞活力,降低心肌细胞炎症反应,抑制 NLRP3、IL-1 β 、GSDMD、Caspase-1 mRNA 水平,降低 NLRP3、Caspase-1、pro-Caspase-1、IL-18、pro-IL-1 β 、IL-1 β 、cleaved-GSDMD、ASC 的蛋白表达水平 ^[94] Increased HL-1 cardiomyocyte activity, decreased cardiomyocyte inflammation, The mRNA levels of NLRP3, IL-1 β , GSDMD, and Caspase-1 were inhibited, and the protein expression levels of NLRP3, Caspase-1, pro-Caspase-1, IL-18, pro-IL-1 β , IL-1 β , cleaved GSDMD, and ASC were decreased
鹿芪方 Luqi formula	C57 小鼠慢性心衰模型 C57 mouse model of chronic heart failure	减少心肌组织 ROS 含量,降低 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白的表达 ^[95] Decrease ROS content and NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expression in myocardial tissue

表 2 通过细胞焦亡抗心血管疾病中药成分总结

Table 2 Summary of TCM components against cardiovascular diseases through cell pyroptosis

中药成分 Chinese herbal compound	实验模型 Experimental model	药理作用 Pharmacological action
二氢杨梅素 Dihydromyricetin	棕榈酸诱导血管内皮细胞焦亡模型 Model of coke death induced by palmitic acid in vascular endothelial cells	减少血管内皮细胞死亡数量,改善细胞活力和细胞膜完整性,抑制 LDH、IL-1 β 释放,降低 NLRP3、Casp1 p20、IL-1 β 、ICAM-1 蛋白表达水平,抑制细胞焦亡 ^[76] Decreased the number of vascular endothelial cell death, improved cell viability and cell membrane integrity, inhibited the release of LDH and IL-1 β , decreased the protein expression levels of NLRP3, Casp1 p20, IL-1 β and ICAM-1, and inhibited cell pyroptosis
	SD 大鼠糖尿病动脉粥样硬化模型 Diabetic atherosclerosis model in SD rats	降低血糖,抑制血清内皮素 1 (ET-1) 和 IL-1 β 含量,以及焦亡蛋白 ASC、NLRP3、Caspase-1 的表达,减轻骨髓源性巨噬细胞焦亡 ^[77-78] Decreased blood glucose, inhibited serum endothelin 1 (ET-1) and IL-1 β , as well as the expression of ASC, NLRP3 and Caspase-1, and reduced bone marrow derived macrophage scortosis
芥子酸 Sinapic acid	高糖联合氧化低密度脂蛋白处理的巨噬细胞焦亡模型 Scortosis model of macrophages treated with high glucose combined with oxidized low density lipoprotein	降低 ASC、NLRP3、Caspase-1 的蛋白水平表达,减少细胞焦亡 Decreased ASC, NLRP3, Caspase-1 protein expression, and reduced cell coke death
	高同型半胱氨酸诱导的内皮细胞焦亡和凋亡模型 Model of scortosis and apoptosis of endothelial cells induced by high homocysteine	抑制 ET-1 和 IL-1 β 分泌,降低 Caspase-3、Caspase-1、ASC 和 NLRP3 的蛋白表达水平,抑制细胞焦亡和凋亡 It inhibited the secretion of ET-1 and IL-1 β , decreased the protein expression levels of Caspase-3, Caspase-1, ASC and NLRP3, and inhibited cell coke death and apoptosis
红景天苷 Salidroside	高脂饲料喂养致 ApoE ^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型 ApoE ^{-/-} mouse model of atherosclerosis induced by high fat diet	减轻脂质沉积和动脉粥样硬化斑块形成,减少细胞死亡,降低 Caspase-1、IL-1 β 和 GSDMD 蛋白表达水平和 TUNEL 阳性染色,从而减轻细胞焦亡 ^[79] Reduced lipid deposition and atherosclerotic plaque formation, reduced cell death, decreased Caspase-1, IL-1 β and GSDMD protein expression levels and TUNEL positive staining, and thus reduced cell coke death
	脂多糖和三磷酸腺苷诱导的人脐静脉内皮细胞焦亡模型 A model of pyroapoptosis induced by LPS and ATP in human umbilical vein endothelial cells	降低 Caspase-1 活化,抑制 IL-1 β 释放 Decreased Caspase-1 activation and inhibited IL-1 β release
姜黄素 Curcumin	氧化三甲胺致血管内皮细胞焦亡模型 A model of pyroptosis of vascular endothelial cells induced by trimethylamine oxide	降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 的蛋白表达水平,抑制 ROS 生成,上调 UQCRC1,拮抗细胞焦亡 ^[80] The protein expression levels of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β were decreased, ROS production was inhibited, UQCRC1 was up-regulated, and coke apoptosis was antagonized
葛根素 Puerarin	ox-LDL 诱导巨噬细胞焦亡模型 ox-LDL induced pyroptosis model of macrophages	降低炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 水平,抑制细胞焦亡蛋白 NLRP3、cleaved-Caspase-1 水平 ^[81] Decreased the mRNA levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , and inhibited the levels of cell apoptotic protein NLRP3 and cleaved Caspase-1
柚皮苷 Naringin	SD 大鼠心肌缺血再灌注模型 Myocardial ischemia reperfusion model in SD rats	减少 IL-1 β 、IL-18 和 MDA 含量,增加 SOD 活性和抑制率,降低 ASC、Caspase-1、GSDMD 和 NLRP3 的蛋白表达水平,其对大鼠 MI/RI 的保护作用可能与细胞焦亡信号通路有关 ^[83] It decreased the contents of IL-1 β , IL-18 and MDA, increased the activity and inhibition rate of SOD, and decreased the protein expression levels of ASC, Caspase-1, GSDMD and NLRP3. The protective effects of these drugs on MI/RI in rats may be related to the cell scoria signaling pathway

续表 2

中药成分 Chinese herbal compound	实验模型 Experimental model	药理作用 Pharmacological action
β -细辛醚 β -asarone	SD 大鼠心肌缺血再灌注模型 Myocardial ischemia reperfusion model in SD rats	改善心功能,减少心肌梗死面积,抑制炎性细胞浸润,降低血清中心肌肌钙蛋白 T (cTNT)、IL-1 β 水平和心肌组织中 MPO 含量,降低 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的蛋白表达水平 ^[84] It can improve cardiac function, reduce the size of myocardial infarction, inhibit inflammatory cell infiltration, reduce the levels of cTNT and IL-1 β in serum and MPO in myocardial tissue, and reduce the protein expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 and GSDMD
胡椒碱 Piperine	SD 大鼠心肌缺血再灌注模型 Myocardial ischemia reperfusion model in SD rats	提高心肌细胞存活率,改善心功能,抑制炎性细胞浸润,减少心肌梗死面积、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、ASC 的蛋白表达 ^[85] It can improve the survival rate of myocardial cells, improve cardiac function, inhibit inflammatory cell infiltration, and reduce the protein expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and ASC
白芍总苷 Total glucosides of paeony	SD 大鼠心肌缺血再灌注模型 Myocardial ischemia reperfusion model in SD rats	降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、ASC 的蛋白表达而减少心肌细胞焦亡 ^[86] Decreased the protein expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and ASC, and reduced cardiomyocyte scortosis
大黄素 Emodin	SD 大鼠心肌缺血再灌注模型 Myocardial ischemia reperfusion model in SD rats	减少心肌梗死面积,改善心肌细胞形态,降低 IL-1 β 水平,减少细胞焦亡 It can reduce the size of myocardial infarction, improve the morphology of myocardial cells, reduce the level of IL-1 β , and reduce cell pyrosis
	SD 新生大鼠原代心肌细胞缺氧/复氧模型 Model of hypoxia/reoxygenation of primary myocardial cells of newborn SD rats	恢复细胞活力,降低 GSDMD-N、Caspase-1、TLR4 蛋白表达,减少 IL-1 β 浓度,下调 MyD88、p-I κ B α 、p-p65、NLRP3 炎症小体和 ASC 表达 ^[54, 87] It also reduced the expression of GSDMD-N, Caspase-1 and TLR4 proteins, decreased the concentration of IL-1 β , down-regulated the expression of MyD88, p-I κ B α , p-p65, NLRP3 inflammasome and ASC
	脂多糖和三磷酸腺苷诱导的人脐静脉内皮细胞焦亡模型 A model of pyroapoptosis induced by LPS and ATP in human umbilical vein endothelial cells	增加细胞活性,降低细胞内 Caspase-1、NLRP3、IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达水平,从而减少细胞焦亡 Increased cell activity, decreased intracellular protein expression levels of Caspase-1, NLRP3, IL-1 β , IL-18, thereby reducing cell pyroptosis
芹菜素 Apigenin	H9C2 细胞更换血清及缺氧处理 H9C2 cells were replaced with serum and treated with hypoxia	降低 Caspase-1、NLRP3、GSDMD-N 的蛋白表达水平及上清中 IL-1 β 和 IL-18 含量,其改善心肌损伤的机制可能是改善心肌细胞焦亡 ^[88] The decrease of Caspase-1, NLRP3 and GSDMD-N protein expression levels and the contents of IL-1 β and IL-18 in supernatance may be the mechanism of improving cardiomyocyte scortosis
	C57 小鼠缺血再灌注损伤模型 Ischemia reperfusion injury model in C57 mice	减少心肌梗死面积、心肌细胞凋亡和炎性细胞浸润程度;降低 Caspase-1, NLRP3 蛋白的表达以及 IL-1 β 表达水平;减少细胞焦亡 ^[89] Reduce the size of myocardial infarction, myocardial cell apoptosis and inflammatory cell infiltration degree; Decreased Caspase-1, NLRP3 protein expression and IL-1 β expression level; Reduce cell pyrosis
天麻素 Gastrodin	人心脏微血管内皮细胞缺氧复氧模型 Model of hypoxia and reoxygenation of human heart microvascular endothelial cells	降低 Caspase-1, NLRP3 蛋白的表达及 IL-1 β 的表达水平 Decreased Caspase-1, NLRP3 protein expression and IL-1 β expression level
丹参酮 IIA Tanshinone IIA	原代小鼠心肌细胞过氧化氢处理致心肌细胞损伤模型 Myocardial cell injury model induced by hydrogen peroxide treatment of primary mouse myocardial cells	降低 GSDMD 和 Caspase-1 蛋白表达水平,减少 IL-1 β 和 IL-18 含量,促进长链非编码 RNA AK003290 表达,从而抑制心肌细胞损伤和细胞焦亡 ^[90] Decreased the expression of GSDMD and Caspase-1 proteins, decreased the content of IL-1 β and IL-18, and promoted the expression of long-chain non-coding RNA AK003290, thus inhibiting cardiomyocyte injury and cell coke death
龙血竭 Dragon's blood	SD 大鼠心肌缺血再灌注模型 Myocardial ischemia reperfusion model in SD rats	减少心肌梗死面积,降低 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA 的表达水平和细胞焦亡率 ^[91] It also decreased the size of myocardial infarction, the mRNA expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 and IL-1 β and the coke death rate

5 总结与展望

目前,关于细胞焦亡与心血管疾病关系的机制研究主要集中在动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤、心衰这些疾病,对心血管其他疾病如高血压、心肌炎等研究报道相对较少。心血管疾病中关于细胞焦亡研究的主要关注点在于发病过程中是否存在细胞焦亡现象及焦亡相关炎症小体的表达程度,但对于细胞焦亡如何加快心血管疾病发展进程的机制尚不清楚。细胞焦亡信号通路包括 Caspase-1 介导的经典通路, Caspase-4、5、11 介导的非经典通路,以及近年来新发现的 Caspase-3、8 通路。其中 NLRP3 和 Caspase-1 在心血管疾病中的研究最为广泛,非经典通路 Caspase-4/5/11 在心血管疾病中的作用研究较少,而 Caspase-3/8 能否通过调控细胞焦亡途径在心血管疾病中发挥作用的研究尚未见报道。进一步探索与细胞焦亡相关的新的信号通路,将为开发新的治疗药物提供重要依据。这些可能是未来心血管领域的研究方向。因此,与心血管疾病相关的细胞焦亡发生与调控机制需要更细致深入的研究。

中医药具有多组分、多靶点等特点,但中药复方通过细胞焦亡途径防治心血管疾病的报道相对较少,且中医药对心血管疾病中细胞焦亡的相关机制研究较为单一,缺少对其激活机制的深入探索。未来应深入探讨细胞焦亡的发生机制,针对细胞焦亡的各环节、各靶点研究中医药干预的作用机制及物质基础,为新的中药复方新药开发提供思路,为中医药防治心血管疾病提供新的策略。

参考文献:

- [1] Zhou W, Chen C, Chen Z, et al. NLRP3: A novel mediator in cardiovascular disease [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 5702103.
- [2] 王启芝, 刘敏, 刘雨, 等. 细胞焦亡分子机制及其相关疾病中医药研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(12): 140-144.
- [3] Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ, et al. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages [J]. Nature, 1992, 358(6382): 167-169.
- [4] Hersh D, Monack DM, Smith MR, et al. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to Caspase-1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(5): 2396-2401.
- [5] Hilbi H, Moss JE, Hersh D, et al. Shigella-induced apoptosis is dependent on Caspase-1 which binds to IpaB [J]. J Biol Chem, 1998, 273(49): 32895-32900.
- [6] Haimovich B, Venkatesan MM. Shigella and Salmonella: death as a means of survival [J]. Microbes Infect, 2006, 8(2): 568-577.
- [7] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. Trends Microbiol, 2001, 9(3): 113-114.
- [8] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets Caspase-11 [J]. Nature, 2011, 479(7371): 117-121.
- [9] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling [J]. Nature, 2015, 526(7575): 666-671.
- [10] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.
- [11] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3): 486-541.
- [12] Edgeworth JD, Spencer J, Phalipon A, et al. Cytotoxicity and interleukin-1 β processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(5): 1464-1471.
- [13] Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. Nature, 2016, 535(7610): 153-158.
- [14] Shi J, Gao W, Shao F, et al. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 245-254.
- [15] Yu ZW, Zhang J, Li X, et al. A new research hot spot: The role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications [J]. Life Sci, 2020, 240: 117138.
- [16] Guo H, Callaway JB, Ting JP, et al. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. Nat Med, 2015, 21(7): 677-687.
- [17] Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives [J]. J Inflamm Res, 2015, 8: 15-27.
- [18] Chae JJ, Cho YH, Lee GS, et al. Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice [J]. Immunity, 2011, 34(5): 755-768.
- [19] Gong T, Yang Y, Jin T, et al. Orchestration of NLRP3 inflammasome activation by ion fluxes [J]. Trends immunol, 2018, 39(5): 393-406.
- [20] Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation [J]. J Cell Biol, 2016, 213(6): 617-629.
- [21] Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. Nature, 2014, 514(7521): 187-192.
- [22] Yi YS. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical

- sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Immunology*, 2017, 152(2): 207–217.
- [23] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through Caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 99–103.
- [24] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, et al. Cleavage of DFNA5 by Caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14128.
- [25] Rogers C, Erkes DA, Nardone A, et al. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment Caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1689.
- [26] Jiang S, Gu H, Zhao Y, et al. Teleost Gasdermin E is cleaved by Caspase 1, 3, and 7 and induces pyroptosis [J]. *J Immunol*, 2019, 203(5): 1369–1382.
- [27] Vince JE, Silke J. The intersection of cell death and inflammasome activation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11–12): 2349–2367.
- [28] Orning P, Weng D, Starheim K, et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers Caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death [J]. *Science*, 2018, 362(6418): 1064–1069.
- [29] Mandal P, Feng Y, Lyons JD, et al. Caspase-8 collaborates with Caspase-11 to drive tissue damage and execution of endotoxin shock [J]. *Immunity*, 2018, 49(1): 42–55.
- [30] Grootaert MOJ, Bennett MR. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(11): 2326–2339.
- [31] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476: 28–37.
- [32] Xi H, Zhang Y, Xu Y, et al. Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyro-apoptosis in endothelial cells [J]. *Circ Res*. 2016, 118(10): 1525–1539.
- [33] Yin Y, Li X, Sha X, et al. Early hyperlipidemia promotes endothelial activation via a Caspase-1-sirtuin 1 pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(4): 804–816.
- [34] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 171.
- [35] Zeng ZL, Chen JJ, Wu P, et al. OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7475–7491.
- [36] Jiang C, Jiang L, Li Q, et al. Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells [J]. *Toxicology*, 2018, 410: 26–40.
- [37] Wu LM, Wu SG, Chen F, et al. Atorvastatin inhibits pyroptosis through the lncRNA NEXN-AS1/NEXN pathway in human vascular endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 293: 26–34.
- [38] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 709–721.
- [39] Martinet W, Coornaert I, Puylaert P, et al. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 306.
- [40] Nogiec A, Bzowska M, Demczuk A, et al. Phenotype and response to PAMPs of human monocyte-derived foam cells obtained by long-term culture in the presence of oxLDLs [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1592.
- [41] Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(30): 3209–3220.
- [42] Corrêa R, Silva LFF, Ribeiro DJS, et al. Lysophosphatidylcholine induces NLRP3 inflammasome-mediated foam cell formation and pyroptosis in human monocytes and endothelial cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 2927.
- [43] Mao C, Li D, Zhou E, et al. Nicotine exacerbates atherosclerosis through a macrophage-mediated endothelial injury pathway [J]. *Aging*, 2021, 13(5): 7627–7643.
- [44] Xu S, Chen H, Ni H, et al. Targeting HDAC6 attenuates nicotine-induced macrophage pyroptosis via NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2021, 317: 1–9.
- [45] Peng X, Chen H, Li Y, et al. Effects of NIX-mediated mitophagy on ox-LDL-induced macrophage pyroptosis in atherosclerosis [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(7): 1481–1490.
- [46] Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis [J]. *Nature*, 2021, 592(7853): 296–301.
- [47] Li Y, Niu X, Xu H, et al. VX-765 attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice by modulating VSMCs pyroptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 389(1): 111847.
- [48] Pan J, Han L, Guo J, et al. AIM2 accelerates the atherosclerotic plaque progressions in ApoE^{-/-} mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 487–494.
- [49] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2011, 123(6): 594–604.
- [50] Toldo S, Mezzaroma E, Mauro AG, et al. The inflammasome in myocardial injury and cardiac remodeling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(13): 1146–1161.
- [51] Qiu Z, Lei S, Zhao B, et al. NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9743280.
- [52] Yue RC, Lu SZ, Luo Y, et al. Calpain silencing alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury through the NLRP3/ASC/Caspase-1 axis in mice [J]. *Life Sci*, 2019, 233: 116631.
- [53] Ding S, Liu D, Wang L, et al. Inhibiting microRNA-29a protects myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting SIRT1 and suppressing oxidative stress and NLRP3-mediated pyroptosis pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 372(1):

- 128–135.
- [54] 吴树宁, 王凯, 施思, 等. 大黄素预处理对 LPS/ATP 诱导的人脐静脉内皮细胞焦亡的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(4): 410–414.
- [55] Rauf A, Shah M, Yellon DM, et al. Role of Caspase 1 in ischemia/reperfusion injury of the myocardium [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 74(3): 194–200.
- [56] Do Carmo H, Arjun S, Petrucci O, et al. The Caspase 1 inhibitor VX-765 protects the isolated rat heart via the RISK pathway [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2018, 32(2): 165–168.
- [57] Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance [J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 19–44.
- [58] Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Butler J. From risk factors to structural heart disease: the role of inflammation [J]. Heart Fail Clin, 2012, 8(1): 113–123.
- [59] Somers JR, Beck PL, Lees-Miller JP, et al. iNOS in cardiac myocytes plays a critical role in death in a murine model of hypertrophy induced by calcineurin [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(3): H1122–H1131.
- [60] Crosby JR, Seifert RA, Soriano P, et al. Chimaeric analysis reveals role of Pdgf receptors in all muscle lineages [J]. Nat Genet, 1998, 18(4): 385–388.
- [61] Bai Y, Sun X, Chu Q, et al. Caspase-1 regulate AngII-induced cardiomyocyte hypertrophy via upregulation of IL-1 β [J]. Biosci Rep, 2018, 38(2): BSR20171438.
- [62] Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(4): 752–765.
- [63] Saito T, Miyagawa K, Chen SY, et al. Upregulation of human endogenous retrovirus-K is linked to immunity and inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2017, 136(20): 1920–1935.
- [64] Dalekos GN, Elisaf M, Bairaktari E, et al. Increased serum levels of interleukin-1 β in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? [J]. J Lab Clin Med, 1997, 129(3): 300–308.
- [65] Chen H, Lu ZZ, Wei H, et al. Induction of ICE and inhibition of c-fos, jun D and zif 268 in 12-month old spontaneously hypertensive rats [J]. Life Sci, 1997, 61(2): PL27–PL31.
- [66] Krishnan SM, Ling YH, Huuskens BM, et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(4): 776–787.
- [67] Chen Y, Hua Y, Li X, et al. Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 42.
- [68] Wang X, Pan J, Liu H, et al. AIM2 gene silencing attenuates diabetic cardiomyopathy in type 2 diabetic rat model [J]. Life Sci, 2019, 221: 249–258.
- [69] Yang F, Qin Y, Lv J, et al. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 1000.
- [70] 鞠建庆. 清心解瘀方调控巨噬细胞焦亡稳定动脉粥样硬化易损斑块的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [71] 杨金伟, 喻嵘, 吴勇军, 等. 左归降糖舒心方含药血浆对 ox-LDL 诱导 J774A.1 巨噬细胞焦亡及凋亡的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(4): 332–339.
- [72] 陈宁, 贾连群, 宋囡, 等. 化痰祛瘀方对动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(20): 1755–1757, 53, 1758–1759.
- [73] 刘孟楠, 任维, 罗钢, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对 U937 巨噬细胞焦亡的影响 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2371–2374.
- [74] 刘孟楠, 任维, 张伟, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊抑制 NLRP3 炎症小体活化抗 U937 巨噬细胞焦亡的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 6.
- [75] 于宁, 宋囡, 王莹, 等. 四妙勇安汤抑制焦亡通路 TLR4/NLRP3/Caspase-1 防治动脉粥样硬化机制研 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 199–203, 279.
- [76] 胡琴. 二氢杨梅素通过 Nrf2 抑制 NLRP3 炎症小体调控的血管内皮细胞焦亡的作用及机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2017.
- [77] Han Y, Qiu H, Pei X, et al. Low-dose sinapic acid abates the pyroptosis of macrophages by downregulation of lncRNA-MALAT1 in rats with diabetic atherosclerosis [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2018, 71(2): 104–112.
- [78] 裴星, 韩勇, 丘红, 等. 芥子酸拮抗同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞凋亡及焦亡 [J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(11): 1096–1101.
- [79] Xing SS, Yang J, Li WJ, et al. Salidroside decreases atherosclerosis plaque formation via inhibiting endothelial cell pyroptosis [J]. Inflammation, 2020, 43(2): 433–440.
- [80] 赵金理. 姜黄素拮抗氧化三甲胺致血管内皮细胞焦亡及其机制研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2020.
- [81] 章平衡, 李春燕, 刘永源, 等. 葛根素通过抑制 ox-LDL 诱导巨噬细胞焦亡通路活化稳定 AS 易损斑块 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(18): 2212–2216.
- [82] 李月, 李想. 复方山楂煎剂对心肌缺血模型大鼠心肌 Caspase-1 表达的影响 [J]. 中国民间疗法, 2020, 28(11): 97–100.
- [83] 王婷婷, 张健, 张再媛, 等. 柚皮苷抑制大鼠心肌缺血/再灌注损伤诱导的细胞焦亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(6): 1019–1026.
- [84] Xiao B, Huang X, Wang Q, et al. Beta-asarone alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory response and NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(7): 1046–1051.
- [85] Guo X, Hu S, Liu JJ, et al. Piperine protects against pyroptosis in myocardial ischaemia/reperfusion injury by regulating the miR-383/RP105/AKT signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 244–258.

- [86] 郑亚萍, 刘春杰. 白芍总苷对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞焦亡及 NLRP3 炎症小体表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 910-914.
- [87] Ye B, Chen X, Dai S, et al. Emodin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis in cardiomyocytes [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 975-990.
- [88] Li W, Chen L, Xiao Y. Apigenin protects against ischemia-/hypoxia-induced myocardial injury by mediating pyroptosis and apoptosis [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2020, 56(4): 307-312.
- [89] Sun W, Lu H, Lyu L, et al. Gastrodin ameliorates microvascular reperfusion injury-induced pyroptosis by regulating the NLRP3/caspase-1 pathway [J]. J Physiol Biochem, 2019, 75(4): 531-547.
- [90] 易娜, 李贺, 游三丽, 等. 丹参酮 II A 通过 AK003290 减轻 H₂O₂ 诱导的原代小鼠心肌细胞焦亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(6): 1035-1041.
- [91] 梁仪琳. 龙血竭总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞焦亡及 NLRP3 炎症小体表达的影响 [D]. 百色: 右江民族医学院, 2021.
- [92] 严士海, 王晗, 李婕, 等. 参葵通脉颗粒对慢性心衰大鼠模型心肌细胞焦亡及相关因子的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(2): 168-170.
- [93] Wang J, Deng B, Liu J, et al. Xinyang Tablet inhibits MLK3-mediated pyroptosis to attenuate inflammation and cardiac dysfunction in pressure overload [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274: 114078.
- [94] 郭依宁, 刘景, 王俊岩, 等. 心阳片含药血清调控 NLRP3 介导细胞焦亡保护心肌细胞炎症损伤的作用及机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 92-96, 271.
- [95] 张晓青, 瞿惠燕, 赵丹丹, 等. 基于 ROS/NLRP3/Caspase-1 通路的鹿芪方对慢性心力衰竭小鼠心肌细胞焦亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(10): 93-98.

[收稿日期]2021-12-25

(上接第 96 页)

- [22] Wang TT, Zhao YL, Peng LS, et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway [J]. Gut, 2017, 66(11): 1900-1911.
- [23] Liu J, Wu S, Zheng X, et al. Immune suppressed tumor microenvironment by exosomes derived from gastric cancer cells via modulating immune functions [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 14749-14753.
- [24] Jia Y, Kodumudi KN, Ramamoorthi G, et al. Th1 cytokine interferon gamma improves response in HER2 breast cancer by modulating the ubiquitin proteasomal pathway [J]. Mol Ther, 2021, 29(4): 1541-1556.
- [25] Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, et al. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells [J]. Front Immunol, 2020, 11(1): 2025-2029.
- [26] 高磊, 刘寒松, 胡扬喜, 等. 复元和中汤联合 SOX 化疗方案对胃癌患者外周血 Th1/Th2 的影响 [J]. 中医学报, 2019, 34(1): 154-158.
- [27] Wang W, Chen M, Jin X, et al. H₂S induces Th1/Th2 imbalance with triggered NF-κB pathway to exacerbate LPS-induced chicken pneumonia response [J]. Chemosphere, 2018, 208(1): 241-246.
- [28] Dai Q, Wang M, Li Y, et al. Amelioration of CIA by asarinin is associated to a downregulation of TLR9/NF-κB and regulation of Th1/Th2/Treg expression [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(7): 1172-1178.
- [29] 刘静, 黄新华, 赵燕, 等. 乌司他丁对老年患者腹腔镜子宫全切手术后早期褪黑素水平和认知功能的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(8): 747-751.
- [30] Chang T, Niu C, Sun C, et al. Melatonin exerts immunoregulatory effects by balancing peripheral effector and regulatory T helper cells in myasthenia gravis [J]. Aging, 2020, 12(21): 21147-21160.

[收稿日期]2022-02-08

刘志恒,袁霞红,刘林. 抑郁症动物模型及其在中医药研究运用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 109-114.

Liu ZH, Yuan XH, Liu L. Progress on depressive animal models and their application in Traditional Chinese Medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 109-114.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.015

抑郁症动物模型及其在中医药研究运用进展

刘志恒²,袁霞红^{1,2},刘林^{1*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410007;2.湖南中医药大学,长沙 410208)

【摘要】 目前抑郁症临床西药治疗上存在着毒副作用大、停药后容易反复等问题,急切需要中医药治疗手段的参与,同时也需要中医药相关方面的基础研究。但在其基础研究中,动物实验面临着相关的问题,即基于现代医学病因病理理论的抑郁症动物模型不能很好地适用于中医药研究。所以把疾病模型和证候模型相结合以构建适用于中医药动物实验的病证结合动物模型。本文以目前运用于抑郁症的病证结合动物模型的制备以及相关研究为切入点,以求使其更科学合理应用到中医药创新研究。

【关键词】 抑郁症;郁证;中医药;动物模型;病证结合模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0109-06

Progress on depressive animal models and their application in Traditional Chinese Medicine

LIU Zhiheng², YUAN Xiaohong^{1,2}, LIU Lin^{1*}

(1. the First Affiliated Hospital of Hunan Traditional Chinese Medicine University, Changsha 410007, China.

2. Hunan Traditional Chinese Medicine University, Changsha 410208)

【Abstract】 There are many problems in the clinical treatment of depression, such as the high toxicity and side effects of drugs, and high relapse rate after medication withdrawal. Accordingly, there is an urgent need for the application of Traditional Chinese Medicine approaches. Likewise, increased basic research of Traditional Chinese Medicine is also needed. However, use of animal experiments for basic research creates some problems. In particular, animal models of depression based on modern medical etiology and pathology theory cannot be well applied to research of Traditional Chinese Medicines. Therefore, disease and syndrome models are often combined to construct a combination model of disease and syndrome suitable for animal experiments of Traditional Chinese Medicines. This article describes the preparation of a combination disease and syndrome model that uses correlative research as the starting point to make it more scientifically and reasonably applied to innovative research of Traditional Chinese Medicines.

【Keywords】 depression; stagnation syndrome; Traditional Chinese Medicine; animal model; combination model of disease and syndrome

随着物质条件和生活水平的提高,不仅是生理上的疾病,同时心理精神类疾病的发生率也同样在

提升。根据流行病学调查数据显示,抑郁症已成为严重威胁人类健康的第二大疾病^[1],其以显著而持

【基金项目】 国家自然科学基金 (82004346, 82104793); 湖南省自然科学基金 (2021JJ30018, 2019JJ50461); 湖南省科技创新计划资助 (2021RC3102); 湖南省教育厅项目 (20B448, 20B433); 湖南省中医药管理局重点项目 (2021205); 湖南中医药大学校级重点项目 (2019XJJJ032, 2019XJJJ070); 长沙市杰出创新青年培养计划项目 (kq1802008); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目 (2018-2020)。

【作者简介】 刘志恒 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病。E-mail: 867639551@qq.com

【通信作者】 刘林 (1984—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中药新药开发与研究。E-mail: 286410883@qq.com

久的情绪低落为主要临床特征,主要表现为心境低落、意志活动减退、思维迟缓和认知功能损害,同时可伴有睡眠障碍、焦虑,甚者可出现严重的自残或自杀行为。尽管现在大众对抑郁症的关注日益提高,但其发病机制尚未明确,可能与遗传因素、生物因素、社会因素等相关。现有的临床药物治疗方案,存在其毒副作用明显,停药后容易复发等问题,而且目前在抗抑郁药物的研发进展上并无突破^[2]。相较之下,以祖国医学为主要治疗手段的临床治疗中明显取得相对不错的疗效。所以从中医药基础研究出发,以祖国医学的角度去探索抑郁症的发病机制和相关药物的治疗机制是一个新的突破口。根据传统医学中“同病异治”和“辨证论治”的理论指导,抑郁症患者群体有着相对一致的主症和相对差异较大的伴发症,所以针对其个体的不同情况,采取的药物和治疗方案也不相一致。因此,在中医药基础研究中,建立与传统医学相对应的证候抑郁证动物模型是关键环节。

1 抑郁症动物模型的制备

理想的抑郁症造模动物主要有两个要求:第一点是其生理病理机制与人类高度相似;第二点是与人类抑郁症发病机制相似,且抑郁症症状能被人类使用所使用的抗抑郁药物所缓解^[3]。这些要求都是为了更好的模拟人类机体,从而对抑郁症发病机制和治疗方法的研究产生更具有可行性且有信服力的结果。

1.1 造模动物种类及品系的选取

目前应用于抑郁症造模的动物主要有大鼠、小鼠、非人灵长类动物^[4]等,其中以小鼠、大鼠最为常用^[5]。虽然非人灵长类动物与人类有较高的亲缘关系,情感神经中枢和内分泌都与人有较高的重合度,因而作为最理想的实验动物^[6],但其造价昂贵,样本量稀少,因此不多论述。目前最常用于制备抑郁证动物模型的动物种类是小鼠、大鼠。

不同品系的小鼠都有其独特的表型跟适用方向,是目前疾病动物研究中应用最广的动物模型。其具有体积小、价格低、同时还可从网络获取基因组测序图谱、方便采取基因工程技术诱导小鼠模型建立等优势^[7]。目前国内外常用的小鼠有:KM 小鼠^[8-9],BALB/c 小鼠^[10]、C57BL/6J 小鼠^[11-12]等。与小鼠相比较,抑郁症造模实验中大鼠的体重变化

和行为学观测数据更为明显,使抗抑郁药物的效果及其指标更具有参考性。常用的大鼠品系主要有 Sprague Dawley (SD) 大鼠^[13]、Wistar 大鼠^[14]、Wistar Kyoto (WKY) 大鼠^[15-16]、Flinder Resistant Line (FSL) 大鼠^[17]、Fawn-Hooded (FH) 大鼠^[18]。

1.2 模型制备方法

应激作为人类抑郁症发病的主要原因之一,且通过人为手段给予动物不同的应激因素来制备的抑郁证动物模型能有效地被临床抗抑郁药物所缓解,故应激造模是目前最常用的方法之一,其中包括行为绝望模型^[19-20]、习得性无助模型^[21]、社会应激模型^[22-23]、慢性不可预知温和性模型等。慢性不可预知温和性应激 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 是应激模型中最为常用的一种,通过每日不定时给予动物不同的较温和的刺激因子,一般是两种以内,连续 2 d 不重复,从而对动物造成长时间稳定的应激压力,引起实验动物类抑郁症相关行为的出现^[24]。该造模方法有效地避免了单一应激可能会引起动物的适应性的问题,同时具备高度有效性,所以可靠性较强^[25],是一种较为广泛使用的抑郁症造模方法。

除了应激造模外,还有手术造模、药物诱导造模、遗传造模等方式。手术造模稳定性高、且无药物交互影响,但模型制备难度高,不同动物操作不一,而且难以保证实验动物的操作一致性。药物诱导模型是针对目前广泛认可的抑郁症发病机制,通过药物的方式去诱导抑郁症的发生^[26-27],主要用于筛选专一性靶点的抗抑郁药物。但以药物诱导的抑郁证与人类抑郁症的发病机制有一定的差异,因此该造模方式受到一定的使用限制^[28]。遗传造模是通过近代杂交或者基因手段去构建抑郁证动物模型。有研究表明,抑郁症有明显的家族易感性,且与部分基因存在关联^[29],但是通过对单一基因或多个基因位点执行基因敲除等手段构建的抑郁证动物模型尚不稳定,且存在重复性不高、造价昂贵等问题,所以一般较少使用。

2 病证结合动物模型进展

抑郁症,属于传统医学里的“郁证”范畴。现代不同的医家在继承前人的知识下对抑郁症又有了不同的理解与阐述。有医家认为肝主疏泄,对情志有重要的调节作用,故情志内伤以致肝气郁结,肝

的生理特性受到影响,则发为郁证^[30]。而肝、脾二者各为木土,根据五行相生相克,肝气郁结,易木旺乘土,故脾亦失健运,此理论是“见肝之病,知肝传脾”思想重要体现^[31],所以临床上既有肝气郁结证型,也有肝郁脾虚证型病人。同时有医家在临床对抑郁症患者进行观察,发现其常伴随神疲乏力,反应迟钝,忧愁多思等心神失养,心神不振症状,从而提出阳气抑竭、神颓志衰也是抑郁症的病机之一^[32]。还有医家主张肾主精,肝藏血,而精血同源,肝肾藏精血以充养脑髓,只有精血充足,脑髓得以充盈,人的精神活动得以正常维持^[33]。若肝肾的生理功能失调,也容易发生抑郁症。总而言之,基于传统医学中的“整体观念”,不同脏腑病变都有可能引起抑郁症的发生。临床上主要包括了这几种证型:肝气郁滞、肝郁脾虚、肝肾阴虚等^[34]。

动物实验是中医药与现代医学接轨的重要桥梁,所以构建适合于中医药研究的动物模型是重中之重。以传统医学的角度看来,一个疾病的发生不是单一的病因起作用,而是综合性的病因与机体内在因素相互作用,最终呈现出的一个病理状态^[35]。很明显,单纯地构建疾病动物模型不能满足中医学概念中的“整体观念”以及“辨证论治”。因此在制备单一的抑郁症动物模型基础上,结合证候模型来模拟人类抑郁症发病以及其证型特点,以构建病证结合抑郁症动物模型运用于中医药基础研究^[36]。

2.1 肝郁气滞证郁证动物模型

目前肝郁气滞证型抑郁症动物模型的具体制备方式主要是 CUMS 造模和慢性束缚性应激(chronic restraint stress, CRS)造模。有学者基于传统医学中“肝属木,主疏泄,喜条达而恶抑郁”的理论,认为肝郁气滞模型造模的关键应是造成“郁怒”,故采用慢性束缚性应激造模来构建肝郁气滞证型抑郁症动物模型^[37]。通过将小鼠被困于自制的束缚管中,只有四肢能进行微小的动作,且随着小鼠体重的增加,体积增大,造模小鼠全身被限制于狭小空间内,使其郁怒,从而构建肝郁气滞证型抑郁症动物模型。其动物模型在符合抑郁症相关行为学改变的前提下,与同实验的肝郁脾虚证型抑郁症动物模型相比,旷场自我活动次数明显要少,符合肝郁气滞证表现。而运用 CUMS 构建肝郁气滞证型抑郁症小鼠,同样是通过“郁怒”病因来诱发肝的疏泄失常,气机不畅,以致肝郁气滞证型郁证的发

病^[38]。造模成功后,小鼠蔗糖水摄取量减少,表现了对奖赏的不敏感,同时还有体重增加速度减缓,内分泌系统活性异常等一系列表现,符合临床上抑郁症患者的表现。而在此动物模型上使用具有疏肝理气作用的逍遥散,能明显减轻甚至消除其抑郁症状,以证明该肝郁气滞病证结合模型的成功^[39]。现有研究者通过使用疏肝、疏肝健脾、健脾三种不同主要功效的代表中药复方汤剂比较不同治则对肝郁气滞证抑郁症动物模型海马中神经递质相关表达基因的不同干预作用^[40]。结果显示疏肝和疏肝健脾两种代表方剂对该动物模型都有着明显的抗抑郁作用,而健脾组的中药复方则无明显作用。这不仅说明了在肝郁气滞证型抑郁症的治疗中,疏肝理气是其最重要的治则,可对大鼠海马的神经递质受体基因表达有促进作用,同时也验证了该证候动物模型的成功制备,具备证候的独特性。

2.2 肝郁脾虚证郁证动物模型

目前针对中医药研究实验所使用的肝郁脾虚证型抑郁症动物模型基本为 CRS 动物模型^[41]或 CUMS 动物模型。近来有学者基于“苦寒败胃,而胃与脾相表里”的中医学理论,结合 CUMS 造模方法和大黄水溶液灌胃构建肝郁脾虚证型抑郁症动物模型。其模型小鼠表现活动速度减缓、活跃度下降、蔗糖偏好指数降低、悬尾不动时间和强迫游泳不动时间延长等典型抑郁症状;同时还出现进食欲望下降、体重增长缓慢、大便稀溏的肝郁脾虚症状,说明该小鼠模型同时具备抑郁症表现和肝郁脾虚证的相关表现^[42]。也有研究者根据“味过于酸,肝气以津,脾气乃绝”的中医理论,在 CRS 制备的肝郁气滞证型抑郁症动物模型基础上,同时全天给动物饮用 5% 食醋溶液^[37]。该模型相对于单纯的 CRS 模型在旷场实验中爬行格数明显降低,强迫性游泳不动时间延长,可能与“脾主肉”有关,脾虚则肌肉萎缩,进而少动,这对病证结合动物模型制备的探索和评估证候模型有一定启示作用。

有研究表明 BALB/c 小鼠在不同的抑郁症造模方式下均表现出明显且稳定的气虚证候易感性体质,主要表现为前爪抓力下降,负重游泳时间下降和掌纹血色度下降等^[43]。同时该小鼠的肝郁脾虚证郁证症状能被健脾益气代表中医方剂四君子汤所逆转,小鼠肌肉和海马中 PKA-CREB 信号表达均明显增加^[44]。此说明了该品系所制备的抑郁症动

物模型符合气虚证候,同时还提示了四君子汤改善气虚证候治疗抑郁症的机制可能与 PKA-CREB 信号通路有关,为探究抑郁症发病机制提供新的思路。接着再有进一步的研究,以理气为主要功效的中药复方越鞠丸治疗 BALB/c 小鼠的气虚证抑郁症并无四君子汤般显著。虽然对小鼠抑郁症同样有治疗作用,也提高了肌肉和海马中 PKA-CREB 信号表达,但其气虚证症状并无改善^[45]。此说明了越鞠丸也同样可能是通过调节 PKA-CREB 信号通路来达到治疗抑郁症的效果。通过构建不同的病证结合抑郁症动物模型,以不同的中药复方汤剂去探索其共同点,也许可以为抑郁症的发病基础机制提供一种新思路,同时其中不同的点也许可以为中医药不同证型的区别提供现代理论基础,也是为抑郁症患者个体间的差异提供更好的治疗方案以及研发更好的对症药物。

2.3 肝肾阴虚证郁证动物模型

有研究通过对比 CUMS 结合温燥药灌胃、CUMS 结合悬尾以及 CUMS 结合甲状腺激素注射此 3 种肝肾阴虚证抑郁症动物模型制备方法,以寻求一种较符合肝肾阴虚证的模型^[46]。从结果来看,CUMS 结合甲状腺激素注射诱导的肝肾阴虚证抑郁症模型大鼠处于一种阴虚型亢奋的状态;其表现为易惊怒、大便干燥、毛湿无光泽、捉拿时反应剧烈,因而明显较其他两种制备方法更具有代表性^[47]。但通过化学药物诱导的中医证候相关表现存在一个共同的缺点,即由药物诱导所表现出来的症状与中医理论中的病因病机不符。有研究表明,以滋肾阴为主要功效的忧虑康液不仅能对阴虚证抑郁症小鼠的行为学有逆转作用,同时能修复肾、肾上腺、足跖汗腺细胞形态学损伤,以及降低血浆环腺苷酸(cAMP)含量,甚至高剂量的忧虑康液比滋补肾阴的代表方六味地黄丸有着更好的治疗效果。也有研究表示,以滋补肝肾为主要功效的滋肾益脑方在由 CUMS 结合甲状腺激素注射制备的肝肾阴虚证抑郁症小鼠身上,可对抗由慢性应激引起的行为学变化,同时还可使海马区的 *BDNF*、*TrkB* 基因表达明显升高^[48-49]。这些研究都不单单说明了该中药复方汤剂的临床意义和其治疗药理机制,同时也为探索抑郁症的发病机制提供了新的思路。

2.4 其他证型

除了上述证型,传统医学中的郁证还有其他证

型,如心脾两虚、气郁化火、阳虚^[50]等。有研究指出通过利血平注射造模的抑郁症小鼠出现体温下降以及行动能力下降等阳虚症状,因此可把该模型用作阳虚证抑郁症的研究中。而临床上针对心脾两虚证和气郁化火证两种郁证的复方中药汤剂,即归脾汤^[51]和丹栀逍遥散^[52]在抑郁症实验中对 CUMS 抑郁症动物模型都有明显的抗抑郁效果,故其药理机制还需要进一步的探索。在抑郁症临床治疗上中医药治疗具有很高的研究价值。

3 小结与展望

目前抑郁症临床西药治疗方案,存在其毒副作用明显,停药后容易复发等问题,而以祖国医学为主要治疗手段的临床治疗中明显取得相对不错的疗效。所以以祖国医学的角度出发,探索以中医药治疗为主的临床治疗方案,以中医药理论的视角去探索抑郁症的发病机制,也许能够成为抑郁症发病机制的突破点。

动物实验是所有医学基础研究的基石,但目前中医药基础研究的动物实验环节尚存在着问题。目前最适用于中医药基础研究的动物模型是病证结合动物模型,其优点主要有:(1)其是根据现代医学的病理病因理论复制出来的疾病模型,所以符合现代医学理论对动物模型的要求;(2)其同样基于中医整体观念及辨证论治等中医药特色传统理论,把人类疾病某特定阶段所表现出来的症状在动物身上加以复制,使其具有中医药特色;(3)其同时符合现代医学与传统医学的相关理论,所以对于中医药基础研究来说,病证结合动物模型是中医药研究与现代医学的结合点。但缺点同样是明显的:(1)目前评估证候动物模型成功与否的标准尚未能从定性向定量转变,即使有学者提出相关的定量标准也没有得到大多数认可;(2)难以用现代医学的生化指标或者病理标准去评估证候动物模型是否成功;(3)病证结合动物模型的制备尚未有统一的标准,都是依据各自对传统医学的理解来设置相关的应激因素,通常是单一因素或多个因素来制备,这与人类生活中由综合性病因引起疾病的发生有一定的差别;(4)与单纯的疾病动物模型制备和证候动物模型制备相比,病证结合模型的制备都要困难,且重复性较低,不利推广。目前对于病证结合动物模型的评估大多采取以方测证或者以药测证

的方法评估动物模型证候方面的表现,同时用现代医学的行为表现学、生理病理学表现去评估动物模型疾病方面的表现。病证结合动物模型作为一种现代医学知识理论和传统医学知识理论相结合的产物,对中医药基础研究有着不可或缺的作用,虽然目前问题也同样存在着许多,但今后会在不断的发展下变得完善,为中医药理论和现代医学理论相融合作出巨大的贡献。

参考文献:

- [1] Shen P, Hu Q, Dong M, et al. Venlafaxine exerts antidepressant effects possibly by activating MAPK-ERK1/2 and P13K-AKT pathways in the hippocampus [J]. Behav Brain Res, 2017, 335: 63-70.
- [2] Ionescu DF, Papakostas GI. Current trends in identifying rapidly acting treatments for depression [J]. Curr Behav Neurosci Rep, 2016, 3(2): 185-191.
- [3] Yan HC, Cao X, Das M, et al. Behavioral animal models of depression [J]. Neurosci Bull, 2010, 26: 327-337.
- [4] Worlein JM. Nonhuman primate models of depression: effects of early experience and stress [J]. ILAR J, 2014, 55(2): 259-273.
- [5] 苗明三, 曹利华, 方晓艳, 等. 抑郁症动物模型制备规范(草案) [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3119-3123.
- [6] Meyer JS, Hamel AF. Models of stress in nonhuman primates and their relevance for human psychopathology and endocrine dysfunction [J]. ILAR J, 2014, 55(2): 347-360.
- [7] Alpers CE, Hudkins KL. Mouse models of diabetic nephropathy [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011, 20(3): 278-284.
- [8] 张洪, 鲍波. 浅谈国内 BALB/c 小鼠及 KM 小鼠的基本生物学特性 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(3): 252-254.
- [9] 张中启. 国内昆明种小鼠和 Wistar 大鼠适合作强迫性游泳抑郁模型动物 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(5): 592-593.
- [10] Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 99: 101-116.
- [11] Faye C, McGowan JC, Denny CA, et al. Neurobiological mechanisms of stress resilience and implications for the aged population [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(3): 234-270.
- [12] 徐龙进, 王可洲. 小鼠慢性应激性抑郁症易感品系筛选及其易感机制初步研究 [A]. 第十二届中国实验动物科学年会 (2016·南宁) 论文集 [C]; 2016.
- [13] Nguyen KT, Gates CA, Hassell JE, et al. Evaluation of the effects of altitude on biological signatures of inflammation and anxiety- and depressive-like behavioral responses [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2021, 111: 110331.
- [14] 李杉杉, 刘新民, 王琼. 基于文献数据库的慢性不可预见性温和应激诱发抑郁症动物模型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 77-83.
- [15] Malkesman O, Weller A. Two different putative genetic animal models of childhood depression-a review [J]. Prog Neurobiol, 2009, 88(3): 153-169.
- [16] 刘红梅, 李琦, 宋苗, 等. 解郁丸对 WKY 抑郁样大鼠前额叶皮层与海马树突棘的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 1049-1054.
- [17] Overstreet DH, Wegener G. The flinders sensitive line rat model of depression-25 years and still producing [J]. Pharmacol Rev, 2013, 65(1): 143-155.
- [18] 熊庭旺, 吴芹, 刘杰, 等. FH/Wjd 大鼠与 SD 大鼠焦虑易感性比较 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(5): 722-726.
- [19] 乔向阳, 王晓英, 刘宏云. 不同研究条件对 BALB/c 小鼠强迫游泳实验的影响 [J]. 海南医学, 2012, 23(2): 24-26.
- [20] Xu D, Qiao T, Wang Y, et al. Alginate nanogels-based thermosensitive hydrogel to improve antidepressant-like effects of albiflorin via intranasal delivery [J]. Drug Deliv, 2021, 28(1): 2137-2149.
- [21] Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, et al. Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression [J]. Pharmacol Ther, 2011, 132(3): 242-267.
- [22] Wei Y, Wang G, Chen J, et al. Maternal deprivation induces cytoskeletal alterations and depressive-like behavior in adult male rats by regulating the AKT/GSK3 β /CRMP2 signaling pathway [J]. Physiol Behav, 2021, 242: 113625.
- [23] Donahue RJ, Muschamp JW, Russo SJ, et al. Effects of striatal Δ FosB overexpression and ketamine on social defeat stress-induced anhedonia in mice [J]. Biol Psychiatry, 2014, 76(7): 550-558.
- [24] Zhu Y, Qu Y, Zhang J, et al. Phencylonate hydrochloride exerts antidepressant effects by regulating the dendritic spine density and altering glutamate receptor expression [J]. Behav Pharmacol, 2021, 32(8): 660-672.
- [25] 赵谦, 王安娜, 高雪松, 等. 慢性不可预见性温和应激致抑郁样大鼠模型的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(4): 344-353.
- [26] Bai G, Qiao Y, Lo PC, et al. Anti-depressive effects of Jiao-Tai-Wan on CORT-induced depression in mice by inhibiting inflammation and microglia activation [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114717.
- [27] Gerhard DM, Wohleb ES, Duman RS. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity [J]. Drug Discov Today, 2016, 21(3): 454-464.
- [28] 苗茸茸, 曲显俊. 抑郁症动物模型的研究进展 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(3): 80-85.
- [29] 李谨, 汪水利, 李云庆, 等. 抑郁症易感基因的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(1): 103-106.

- [30] 隋璐, 王晓红. 抑郁症“从肝论治”现代研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(2): 168-170.
- [31] 陈锦明, 江学敏, 王维斌, 等. “见肝之病, 知肝传脾”思想在抑郁症防治中的运用 [J]. 福建中医药, 2020, 51(2): 49-50, 56.
- [32] 吴建林. 从心阳探讨抑郁症的病机关键 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(6): 597, 601.
- [33] 张晶晶, 李涛. 肝肾同治法治疗慢性肾衰竭抑郁症临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(12): 1891-1895.
- [34] 谈荣珍, 章新友, 张玉娇, 等. 抑郁症的证型与体质及其关系的文献研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(4): 32-36.
- [35] 傅益群, 吕健. 动物模型与中医证候关系释义 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(9): 1665-1666.
- [36] 林传权. 病证结合动物模型研究的进展及存在问题分析 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3601-3604.
- [37] 周国儿, 吴静, 黄云娟, 等. “肝郁气滞”及“肝郁脾虚”型抑郁症动物模型建立初探 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(5): 1035-1038.
- [38] 张军会, 李铭, 李智辉. 肝郁证动物模型造模方法与判定标准纵览 [J]. 山西中医, 2012, 28(8): 51-53.
- [39] 金光亮, 南睿, 郭霞珍. 慢性应激肝郁证大鼠模型的建立 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(2): 18-21.
- [40] 于琦, 金光亮. 三种复方对慢性应激肝郁模型大鼠海马 5-HT_{1A} 受体基因表达的影响 [J]. 北京中医药, 2008, 27(1): 57-59.
- [41] Zheng QL, Zhu HY, Xu X, et al. Korean red ginseng alleviate depressive disorder by improving astrocyte gap junction function [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 281: 114466.
- [42] 童萍, 李玉芳, 李睿博, 等. 基于“病证结合”构建与评价一种新的抑郁症肝郁脾虚证小鼠模型 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1): 50-53.
- [43] 周欣, 薛文达, 李守雪, 等. 不同抑郁症模型下证候差异的品系依赖性研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(2): 151-156.
- [44] 陈茵, 邹之璐, 何骁隼, 等. 抑郁证气虚证候模型小鼠的药物反证与分子信号研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(2): 147-151.
- [45] 徐联调, 李文佳, 陈茵, 等. BALB/c 和 129/S1 小鼠的抑郁与气虚证共易感差异性及越鞠丸干预作用的分子研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(11): 2278-2285.
- [46] 陈晓阳, 陈容, 李晟, 等. 肾阴虚抑郁症大鼠模型的建立及评价 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(5): 28-31.
- [47] 丁凤敏, 陈家旭, 邹小娟, 等. 抑郁症中医证候动物模型研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 245-247.
- [48] 史冰, 李晟, 陈晓阳, 等. 忧虑康液对抑郁肾阴虚模型大鼠的滋肾阴作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 171-175.
- [49] 秦莉花, 李晟, 陈晓阳, 等. 滋肾益脑方对肾阴虚抑郁模型大鼠脑源性神经营养因子、酪氨酸激酶受体 B 基因表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(5): 1293-1295.
- [50] 丁元庆. 抑郁症病机与经方证治 [J]. 山东中医杂志, 2020, 39(4): 323-326, 394.
- [51] 陈宝忠, 王璐, 刘春秋, 等. 归脾汤对抑郁模型大鼠脑内 5-HT 及 NE 含量的影响 [J]. 中医药信息, 2014, 31(5): 14-15.
- [52] 龚胜兰, 富文俊, 黄彬青, 等. 抑郁症海马神经可塑性损伤机制探讨及丹栀逍遥散调控作用的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(3): 663-666.

[收稿日期] 2021-11-15

丁甜甜,吕凤凤,赵巧英,等. 外泌体在系统性硬化症中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 115-121.

Ding TT, Lyu FF, Zhao QY, et al. Research progress of exosomes in systemic sclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 115-121.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.016

外泌体在系统性硬化症中的研究进展

丁甜甜^{1,2}, 吕凤凤³, 赵巧英³, 孙晓林^{3*}, 王永福^{2,3*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014010; 2. 内蒙古科技大学包头医学院
第一附属医院风湿免疫科, 内蒙古 包头 014010; 3. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院中心实验室
(内蒙古自治区自体免疫学重点实验室), 内蒙古 包头 014010)

【摘要】 外泌体是由大多数细胞分泌的小囊泡。外泌体及其包含的 microRNA、mRNA、蛋白质在细胞间通讯中起重要作用。研究表明外泌体具有免疫调节作用, 参与自身免疫性疾病的发病及免疫治疗, 并可作为诊断疾病的有效生物标志物。此外, 外泌体可被用作药物传递的生物载体。系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)是一种复杂的自身免疫性疾病, 发病机制包括血管损伤、免疫异常、内脏器官及皮肤纤维化。近年来, 在研究 SSc 的发病机制方面取得了不错的进展, 推动了临床治疗方面的研究。本文综述了外泌体的组成、功能, 外泌体在 SSc 发病以及诊治方面的潜在作用。

【关键词】 外泌体; 系统性硬化症; 免疫调节; 诊断; 治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0115-07

Research progress of exosomes in systemic sclerosis

DING Tiantian^{1,2}, LYU Fengfeng³, ZHAO Qiaoying³, SUN Xiaolin^{3*}, WANG Yongfu^{2,3*}

(1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China.
2. Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010. 3. Central Laboratory of the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology (Key Laboratory of Autoimmunity of Inner Mongolia), Baotou 014010)

【Abstract】 Exosomes are small vesicles that can be secreted by most cells. Exosomes and their miRNA, mRNA and proteins play an important role in intercellular communication. Specifically, exosomes play an immunoregulatory role, participate in the pathogenesis and immunotherapy of autoimmune diseases, and can be used as effective biomarkers for diagnosis of diseases. In addition, exosomes can be used as biological carriers for drug delivery. Systemic sclerosis (SSc) is a complex autoimmune disease whose pathogenesis includes vascular damage, immune abnormalities, and fibrosis of internal organs and skin. In recent years, good progress has been made in the study of the pathogenesis of SSc, which has promoted research on clinical treatments. This article reviews the composition and function of exosomes, and their potential role in the pathogenesis, diagnosis and treatment of SSc.

【Keywords】 exosomes; systemic sclerosis; immunoregulation; diagnosis; therapeutics

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81860294); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2019MS08055, 2021MS08045); 内蒙古自治区科技计划项目(201802089, 2019GG052)。

【作者简介】 丁甜甜(1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 自身免疫性疾病的研究。E-mail: dt1845915080@163.com

【通信作者】 王永福(1968—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 风湿免疫学的研究。E-mail: wyf5168@hotmail.com

孙晓林(1989—), 女, 博士, 主管检验师, 研究方向: 风湿免疫学的研究。E-mail: yolo_1010@126.com

* 共同通信作者

外泌体为 40~150 nm 的脂质双层膜囊泡,囊泡中包括蛋白质、DNA、RNA 及脂类等^[1],脂质双层膜能保护囊泡的内容物免受降解。外泌体在透射电子显微镜下类似于扁平的球体,是由多囊内体膜向内凸出并收缩而形成,当多囊内体膜与质膜相互融合时,外泌体被释放进入细胞外^[2]。几乎所有细胞都可自由分泌外泌体,如肿瘤细胞、B 细胞、T 细胞、中性粒细胞、肥大细胞、脂肪细胞、星形胶质细胞、神经元、血细胞和上皮细胞等^[3]。当细胞分泌外泌体后,可以在恶性积液、血浆、支气管肺泡灌洗液、唾液、母乳、附睾液和尿液等多种体液中发现^[3]。外泌体具有许多生物学功能,包括遗传物质运输、免疫反应调节、信号转导和细胞内通讯^[4]。外泌体的免疫调节功能与自身免疫性疾病的发病机制密切相关,在免疫治疗中发挥重要作用,并可作为诊断疾病的有效生物标志物,如干燥综合征(sjögren's syndrome, SS)、系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)和类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)等。本文旨在讨论外泌体在 SSc 中的最新进展。

1 外泌体

1.1 外泌体的概念

外泌体是大小为 40~150 nm 的细胞外球形囊泡,由多囊内体膜向内凸出并收缩而形成^[1]。外泌体含有蛋白质、核酸、脂质和各种细胞因子^[3]。外泌体中的蛋白质种类丰富,其中包括能够参与外泌体内部生物发生的蛋白质,如 ESCRT 复合体、ALIX、TSG101。与膜转运和融合功能密切相关的蛋白质,如 Rab GTPases 和膜联蛋白^[1]。外泌体还包括四分体蛋白(CD9、CD63、CD81 和 CD82)、热休克蛋白(HSP70、HSP90)、整联蛋白、II 类蛋白、上皮细胞黏附分子(EpCAM)和人表皮受体(HER)家族的成员等^[1]。外泌体中的核酸包括 RNA 和 DNA,其中 RNA 常与疾病的发生发展有关,主要包括微小核糖核酸(miRNA)、信使核糖核酸(mRNA)、长链非编码核糖核酸(lncRNA)。外泌体中的脂质主要包括胆固醇、鞘磷脂、己糖神经酰胺、磷脂酰丝氨酸和饱和脂肪酸等^[3],它们都是质膜的组成成分。正是由于外泌体内的蛋白质、核酸、脂质和各种细胞因子等使其在生物体内发挥功能。

1.2 外泌体的功能

外泌体参与细胞间信号转导,主要参与信息传递、炎症、抗原呈递、肿瘤生长、转移、血管生成等过

程^[5]。已有研究表明,外泌体在细胞间通讯中起独特的中介作用,当外泌体从细胞表面释放时,外泌体可被受体细胞摄取、吞噬、内化,从而释放内容物或与受体细胞物质交换实现信号交流。外泌体还可与受体细胞膜直接融合,将蛋白质、脂质、核酸等其他物质转运到受体细胞,激活或抑制各种信号通路,介导表型改变。另外,通过膜蛋白和表面粘附分子及受体,激活靶细胞内受体以及下游信号转导途径,外泌体无需进入靶细胞而发挥作用^[3,6]。此外,外泌体还参与免疫调节,包括抗原呈递、免疫监视、免疫激活和免疫抑制的调节等^[7]。

2 SSc

SSc 是一种病因不明的自身免疫性结缔组织疾病,分为弥漫性系统性硬化症(diffuse systemic sclerosis, dSSc)和局限性系统性硬化症(localized systemic sclerosis, lSSc)。目前关于系统性硬化症的发病机制尚未完全清楚,除了可能的遗传与环境因素外,还包括内皮损伤和纤维增生性血管病变、免疫系统异常和成纤维细胞功能障碍 3 大机制^[8]。免疫异常可能促进 SSc 纤维化,同时纤维化也可能促进免疫细胞活化。免疫异常也与 SSc 的血管病变有关。大多数研究表明血管损伤是免疫细胞的激活剂^[9]。因此免疫异常与血管损伤及皮肤器官纤维化 3 者相互影响。越来越多证据显示外泌体与 SSc 的血管损伤、免疫异常和纤维化密切相关。

3 外泌体与 SSc

3.1 外泌体与血管病变

外泌体已在多种疾病中得到广泛研究。例如外泌体可以促进血管生成,从而促进脊髓神经功能的恢复^[10]。外泌体以多种方式参与来自不同组织来源的肿瘤的发展,包括促进血管生成、转移和侵袭^[6]。

SSc 血管病变在 SSc 的发病机制中起着核心作用。器官和组织的血管系统形成过程包括血管形成和血管新生,SSc 血管病变主要是由两者之间的异常平衡引起。在 SSc 患者中,毛细血管和小血管的显著损失表明血管生成过程缺陷,组织缺血通常导致血管生成生长因子,如血管内皮生长因子(VEGF)的表达,导致血管扩张、增殖、内皮细胞迁移和腔壁稳定形成新血管。SSc 中血浆 VEGF 水平升高,这可以刺激血管生成。VEGF 及其受体

VEGFR1 和 VEGFR2 在 SSc 患者皮肤中的表达增加^[11]。除了 VEGF 水平升高外,SSc 患者表现出体内抗血管生成因子与促血管生成因子水平的异常,具体表现为血管抑素、白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)细胞因子以及趋化因子配体 4 蛋白(CXCL4)等抗血管生成因子水平的升高,内皮素-1、粘附分子、胎盘生长因子(PGF)和成纤维细胞生长因子 2(FGF-2)以及血小板衍生生长因子(PDGF)等促血管生成因子的过度表达^[8]。

中性粒细胞来源的外泌体参与 SSc 的血管病变。激活的中性粒细胞可释放外泌体,使幼稚的中性粒细胞致敏,并招募邻近的中性粒细胞^[12]。在研究 SSc 患者的外泌体对血管生成的作用时发现 SSc 患者的中性粒细胞外泌体抑制了人表皮微血管内皮细胞的增殖和迁移^[13],内皮细胞在新血管形成和伤口愈合过程中发挥重要作用,因此 SSc 患者的中性粒细胞来源的外泌体具有抑制血管生成的作用。

在研究外泌体对 SSc 伤口愈合中的假定作用时发现,与正常受试者相比,SSc 小鼠的血清外泌体水平显著降低。这种减少可能是由于 SSc 中的血管异常引起的外泌体从皮肤组织向血流的转移受到干扰。血清外泌体水平降低与 SSc 血管受累互为因果关系,具体表现为血清外泌体水平降低的 SSc 小鼠更易出现血管受累,有血管受累的 SSc 小鼠可能由于转移障碍而降低了血清外泌体水平,这反过来又通过下调 I 型胶原蛋白而导致伤口愈合延迟,形成恶性循环,导致更容易出现皮肤溃疡或凹陷性疤痕^[14]。在血清源性外泌体对 SSc 小鼠伤口愈合的影响实验中发现,相比于对照组缓冲液,用含外泌体的缓冲液处理的 SSc 小鼠皮肤伤口愈合加快,同时,外泌体处理的小鼠伤口组织中 I 型胶原 $\alpha 1$ 和 I 型胶原 $\alpha 2$ 的基因水平上调^[14]。因此,用血清来源的外泌体治疗 SSc 小鼠可加速小鼠伤口的愈合。

3.2 外泌体与免疫系统

SSc 的特征为自身抗体和细胞因子的产生以及免疫细胞的浸润和激活。参与的细胞因子主要包括 IL-4、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等,发病过程涉及多种免疫细胞,例如 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、肥大细胞和巨噬细胞等,在 SSc 患者的受累器官中 B 细胞、T 细胞和固有免疫细胞浸润普遍增加。先天免疫和适应性免疫在 SSc 的发病机制中扮演重要角色,先天和适应性免疫系统异常可以

引起自身抗体的产生,介导自身免疫^[11]。B 细胞主要参与自身抗体的产生,但没有证据证明 SSc 自身抗体在疾病中的直接因果意义,自身抗体的存在有助于 SSc 的诊断,并预测其严重程度和疾病进展,例如,在有限或弥漫性 SSc 患者中可检测到抗内皮细胞自身抗体和抗成纤维细胞抗体,并与内皮细胞凋亡和成纤维细胞激活有关^[8]。

免疫系统不同成分释放的外泌体可能会调节免疫反应。在 SSc 患者中已发现高水平的单核细胞来源的外泌体,并且其可能在调节内皮细胞凋亡中发挥作用,而内皮细胞凋亡是禽和人 SSc 皮肤病变的致病因素^[8]。CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞释放的外泌体分子可能在调节性 T 细胞介导的免疫抑制中发挥重要作用。研究表明,天然 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞释放的外泌体,类似于 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞,可抑制 CD8⁺T 细胞反应和抗肿瘤免疫,由于天然 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞在维持自身耐受中发挥重要作用^[15],因此,来自天然 CD8⁺CD25⁺调节性 T 细胞的外泌体可能成为 SSc 以及自身免疫性疾病免疫治疗的替代物。

不同免疫成分来源的外泌体发挥不同的免疫作用。B 细胞是第一个能够分泌外泌体的免疫细胞。抗原提呈细胞(APC)(如树突状细胞和 B 淋巴细胞等)分泌的外泌体富含共刺激分子以及主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类和 II 类复合物,APC 通过与抗原相互作用,抗原被蛋白酶降解成的多肽与 MHC 分子结合,此部分多肽即抗原肽,它们通过抗原肽在免疫调节中发挥重要作用^[16]。许多研究表明,外泌体的抗原呈递功能在刺激免疫反应中发挥关键作用^[4]。研究发现 B 细胞来源的外泌体可以通过激活 CD4⁺T 细胞,参与由淋巴细胞介导的抗原呈递^[17]。由于外泌体参与抗原呈递,即使缺乏抗原提呈细胞,外泌体也能够促进 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的活化,激活免疫反应^[18]。B 细胞衍生的淋巴母细胞样细胞系(LCL)产生 MHCII⁺FasL⁺外泌体,其可以诱导 CD4⁺T 细胞的凋亡^[19]。然而目前关于外泌体参与 SSc 自身免疫的研究缺乏证据,还需进一步探索。

3.3 外泌体与纤维化

纤维化是一种修复性过程,其特征为器官组织内过量纤维结缔组织的沉积。肌成纤维细胞是 SSc 纤维化的关键效应细胞。纤维化发生的一个重要过程是成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,由许多

促纤维化因子驱动^[20]。多种细胞可通过上皮-间质转化途径转化为肌成纤维细胞,如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞等,活化后的肌成纤维细胞可合成胶原蛋白,形成细胞外基质,从而导致纤维化^[21]。血管损伤和功能障碍最有可能导致局部组织缺血,从而促进组织纤维化。

多种信号通路可导致 SSc 纤维化,包括 TGF- β 信号、Wnt 信号、Toll 样受体 4 信号 (TLR4)、NOTCH 信号、活性氧 (ROS) 生成、腺苷单磷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 信号、IL-6 和白细胞介素 23 (interleukin 23, IL-23) 等其他因素^[5]。TGF- β 可诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,是导致 SSc 纤维化的最重要的生长因子,大部分由血小板产生。Wnt 途径是 SSc 中持续活化成纤维细胞的重要介质, Wnt-3a 激活 β -catenin,刺激成纤维细胞增殖和迁移,胶原凝胶收缩,肌成纤维细胞分化,并通过 TGF- β 信号传导增强纤维化基因表达。NOTCH 信号在 SSc 患者中被激活,并在纤维化中发挥重要作用。除此之外,与纤维化有关的信号还有 TLR4。先天免疫细胞对肌成纤维细胞的激活大多发生在 TLRs 的环境中,阻断 TLR4 信号传导导致肌成纤维细胞转化和基质重塑,从而预防和逆转纤维化^[22]。随着近年来对外泌体与自身免疫性疾病发病机制的深入研究,越来越多证据显示不同来源的外泌体及外泌体衍生的 RNA 与 SSc 的发病密切相关。

SSc 患者皮肤可出现钙质沉着,钙质沉着病可通过皮肤形成溃疡或感染^[20]。因此皮肤伤口的愈合对 SSc 患者至关重要。通过研究外泌体与不同纤维化疾病的相关性可知,实质细胞应激后通过释放外泌体,将应激信号传递给邻近的免疫细胞,如巨噬细胞,从而诱导几个器官的纤维化^[23-25]。皮肤再生依赖于皮肤细胞的增殖。在先前研究中评估了人类脂肪干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs) 来源的外泌体是否能够刺激人类真皮成纤维细胞的再生,从而促进伤口愈合,研究发现 ADMSCs 来源的外泌体可被人类真皮成纤维细胞内化,以剂量依赖的方式促进人类真皮成纤维细胞的增殖和迁移,刺激胶原合成,同时也增加了成纤维细胞中 n-钙粘蛋白、细胞周期蛋白-1 和 I 型和 III 型胶原等基因表达,微阵列分析显示了具有再生功能的 miRNAs 的富集,从而加速皮肤再生^[26]。另外,在研究人类 ADMSCs 来源的外泌体对皮肤伤口愈合的影响中发现,ADMSCs 及其来源的外泌体显

著增加了受体细胞中 miR-19b 的表达,而抑制 miR-19b 导致 ADMSCs 来源的外泌体的治疗效果降低。更进一步研究发现 ADMSCs 来源的外泌体 miR-19b 通过靶向趋化因子 CC 基序配体 1 (CCL1) 和调节通路促进皮肤伤口愈合^[27]。TGF- β 通路的激活可导致纤维化,从而促进伤口愈合。这一发现可能有助于开发新的促进伤口愈合的治疗方法。

成纤维细胞来源的外泌体也可以诱导纤维化。在 SSc 中,通过对比正常人皮肤成纤维细胞与 SSc 患者成纤维细胞发现,在 SSc 患者皮肤成纤维细胞中观察到外泌体标记 CD63、CD9 和 CD81 的表达增加,表明外泌体水平增加,而且来源于 SSc 患者成纤维细胞的培养基中 I 型胶原 $\alpha 1$ 和 I 型胶原 $\alpha 2$ 的 mRNA 水平显著增加,外泌体含量增加可能诱导 SSc 患者成纤维细胞 I 型胶原的表达增加,从而促进纤维化。此外,从 SSc 患者成纤维细胞培养基中分离的外泌体也可以刺激正常成纤维细胞中 I 型胶原的表达^[14]。由此证明外泌体可能参与 SSc 的纤维化。

研究发现中性粒细胞来源的外泌体包含许多参与 SSc 发病机制的特征性 miRNAs 和 lncRNAs,对 dSSc 患者中性粒细胞来源的外泌体 miRNA 和 lncRNA 表达谱进行系统分析,发现了与外泌体的 miRNAs、lncRNAs 和 mRNAs 相关的信号通路,包括 Wnt、AMPK、IL-23 和 NOTCH 信号通路,同时鉴定出信号通路中与 SSc 纤维化相关的基因对,dSSc 患者中性粒细胞来源的外泌体可激活 Wnt、AMPK、IL-23 和 NOTCH 信号通路,促进纤维化的发生^[5]。这是第一个系统分析 dSSc 患者中性粒细胞来源的外泌体 miRNA 和 lncRNA 表达谱的研究,一些与 SSc 纤维化相关的 lncRNA-miRNA-mRNA 可能是 dSSc 中潜在的生物标志物和治疗靶点,但这些 RNA 的生物学功能和四个相关信号通路有待进一步探索。

4 外泌体在 SSc 的诊治中的潜在应用

外泌体不仅可以作为生物标志物诊断疾病,还可以作为多种疾病的治疗剂。在临床诊断上,外泌体可能是有效的生物标志物,能够超越目前现有的侵入性方法的诊断。外泌体携带的各种蛋白质和 miRNAs,是包括自身免疫疾病在内的各种疾病的良好生物标志物的来源。外泌体中各种蛋白质水平变化的定量数据可以使这些蛋白质成为有价值的生物标志物,用于诊断 SSc、评估疾病进展和严重

程度或评估患者对治疗的反应。外泌体中的 miRNAs 作为生物标志物或在邻近和远处细胞中作为表型状态修饰者的潜力一直是研究热点。miRNAs 是小的(约 22 个核苷酸)、非编码和进化保守的 RNA,能够在转录后调节大量蛋白编码基因的表达,循环 miRNAs 成为 SSc 潜在的替代诊断和预后标记物^[28]。在临床治疗上,由于有天然的生物相容性和细胞靶向特性,外泌体成为一种有潜力的药物递送载体^[29]。目前有许多可用的药物输送的载体,如脂质体、纳米粒子、微胶粒、水凝胶等,但这些载体大多具有如生物利用度低、全身毒性高、较差的生物相容性及生物降解性等缺点。而外泌体和多囊泡体具有某些其他药物输送载体不具备的优点,如有机性、良好的生物利用度、稳定性高、具有很少或非常小的毒性和免疫原性^[12,30]。与传统的给药系统相比,纳米囊泡给药系统最大的优点是能够将药物提前送到特定的部位,也称为药物靶向。目前的证据表明,外泌体的使用还可以为未来无细胞癌症疫苗的开发奠定基础^[4]。

越来越多的研究证实外泌体对 SSc 模型小鼠有诊治作用。在博莱霉素诱导的 SSc 小鼠模型中研究脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)来源的外泌体对真皮纤维化的影响,结果表明 SSc 小鼠经 UCMSCs 来源的外泌体治疗后恢复了真皮结构,减少了真皮厚度,并增加了皮下脂肪组织厚度。此外,UCMSCs 来源的外泌体抑制 I 型胶原、III 型胶原和 α 平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)的表达。在 UCMSCs 来源的外泌体处理的小鼠中, TGF- β /Smad 信号通路也受到抑制^[31]。结果表明,UCMSCs 来源的外泌体可以通过下调 TGF- β /Smad 信号通路来减弱真皮纤维化中肌成纤维细胞的激活和胶原沉积,从而改善了 SSc 模型小鼠的皮肤纤维化。

另外,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)衍生的外泌体是低免疫原性的纳米载体,含有许多免疫调节因子,与 BM-MSCs 的作用相同,可通过自身发挥免疫调节功能,并且可通过添加抗炎分子和某些受体,特异性地靶向受损的组织或器官。由此可见,外泌体可能是治疗强直性脊柱炎和 SSc 等其他自身免疫性疾病的新药物^[32]。外泌体中的 miR-151-5p 是一种有前途的生物标志物。在 SSc 小鼠模型中,将从供体 BM-MSCs 释放的外泌体中含有的 miR-151-5p 转移

到受体 BM-MSCs 中,从而抑制 IL4R α 的表达和 mTOR 通路的下调以增强成骨分化并减少成脂分化^[33]。miR-151-5p 的全身给药可以减轻 SSc 小鼠的骨髓间充质干细胞损伤和皮肤硬化,挽救其骨量减少以及免疫障碍,这表明 miR-151-5p 可能是诊治 SSc 的特异性靶点。注射 BM-MSCs 来源的外泌体可显著抑制博莱霉素诱导的 SSc 小鼠皮肤纤维化和炎症。BM-MSCs 来源的外泌体显著减少了病变皮肤中胶原的数量和 α -SMA⁺ 肌成纤维细胞和 CD68⁺ 巨噬细胞的数量。它们还降低了成纤维细胞 I 型胶原和 TGF- β 受体 1 的表达。此外,miRNA 分析显示, BM-MSCs 来源的外泌体中有几种 miRNAs 具有抗纤维化潜能。在成纤维细胞中过表达 miR-196b-5p 显著抑制 I 型胶原蛋白 α 2 的表达^[34]。由此可知,外泌体 miR-196b-5p 抑制 I 型胶原蛋白的表达可能是 BM-MSCs 来源的外泌体抑制 SSc 小鼠模型皮肤纤维化的机制之一。因此,使用 MSCs 来源的外泌体可能是治疗系统性硬化症的一种潜在的治疗方法。

目前研究不仅局限于外泌体对 SSc 模型小鼠的治疗作用,也初步对 SSc 患者进行研究,从而探索外泌体在 SSc 中的临床应用。从 SSc 患者血清中分离外泌体,通过检测其 18 种抗纤维化和 9 种促纤维化 miRNA 的含量,与正常血清外泌体相比,SSc 血清外泌体中的 10 个抗纤维化 miRNAs 减少,6 个促纤维化 miRNAs 增加。此外,在 lcSSc 和 dcSSc 患者中,检测发现外泌体中的 8 个 miRNAs 水平显著不同^[35],这表明这些 miRNAs 可能是区分 SSc 亚型的有价值的生物标志物。从局限性或弥漫性 SSc 患者血清中分离的外泌体在体外引起正常人皮肤成纤维细胞中纤维化前基因表达和 I 型胶原及纤连蛋白产生和分泌,表明 SSc 患者的血清外泌体含有的 miRNA 显示出明显的纤维化特征,并在体外诱导正常成纤维细胞的纤维化表型^[35]。因此,血清来源的外泌体除了是 SSc 诊断和预后生物标志物的潜在来源外,可能是治疗 SSc 的一种新的模式,旨在防止促纤维化 SSc 表型扩展到身体未受影响的区域,从而阻止这种毁灭性疾病的纤维化的进展。

综上所述,这些发现表明外泌体尤其是间充质干细胞来源的外泌体在 SSc 的诊疗中显示出巨大的潜力,并且在许多自身免疫性疾病中发挥诊疗作用。然而使用外泌体作为治疗药物有局限性,外泌体的提取和分离技术不完善,导致提取率

低^[36]。另外,外泌体作为药物输送载体的装载效率低,这可能是由于外泌体内的一部分来源于它们的亲代细胞,从而导致容纳外源因子的空间有限^[37]。虽然在实际使用外泌体时面临巨大的挑战和困难,但这种内源性囊泡在生物医学领域显示出巨大的潜力,并将成为下一代先进的药物治疗。

5 结语

SSc 是一种复杂的慢性自身免疫性疾病,以血管病变、免疫异常、纤维化为特点。目前由于缺乏有效的诊断及治疗,会导致死亡的严重后果。外泌体是大多数细胞分泌的具有多种功能的小囊泡,外泌体与 SSc 的发病机制关系密切,并在血管病变、免疫异常、纤维化 3 个方面发挥作用。

在血清来源的外泌体与 SSc 血管病变的研究中发现皮肤溃疡和凹陷性疤痕的发生率在血清外泌体水平降低的 SSc 患者中显著增加。由此可假设,在 SSc 中所见的血管异常,特别是微血管病,可能导致外泌体从皮肤组织向血液转移障碍,从而导致血清外泌体减少,继而下调 I 型胶原蛋白而导致皮肤溃疡或凹陷性疤痕。血清外泌体减少引起的血管异常和 I 型胶原表达水平降低可能协同介导了 SSc 溃疡的延迟愈合。然而,研究比较了皮肤溃疡患者的血清和皮肤的外泌体水平,没有发现显著的相关性。此外,在 SSc 和正常皮肤中内皮细胞外泌体表达水平无明显差异。因此需要进一步的研究来证明这种假设。自身抗原和自身抗体的产生在自身免疫疾病的发病机制中起着重要作用。外泌体能否作为自身反应识别的目标触发或维持病理的自身免疫反应是外泌体能否在自身免疫性疾病中起作用的关键。研究发现外泌体中的自身抗原可被自身抗体所识别,并能在自身免疫性疾病患者中触发自身免疫反应,然而目前关于外泌体可作为 SSc 的自身抗原的研究缺乏证据,还需进一步探索。

外泌体有助于 SSc 的诊断及治疗,近年来,外泌体已成为自身免疫性疾病的潜在生物标志物和治疗剂。大量证据表明,外泌体在自身免疫性疾病的生理和病理功能中起着重要作用。然而,目前人们对这些囊泡结构的个体成分、精确功能以及针对其作为生物标志物、治疗载体和自身免疫性疾病的靶点尚未完全了解。外泌体的基础和应用研究仍处于早期阶段,与其他疾病相比,对 SSc 发病机制中外泌体的研究相对较少。对于外泌体用于临床仍需

更多的研究,首先,尽管在动物实验的基础上已初步证实了外泌体的安全性,但仍然需要大量实验来确保其用于临床的安全性;其次,外泌体可以来源于脂肪、脐带等不同的间充质干细胞,需要进一步实验探究不同间充质干细胞来源的外泌体的具体特性、对 SSc 的作用机制以及用于 SSc 乃至自身免疫性疾病的使用剂量及疗效。最后,目前外泌体的提取面临耗时耗力、纯度相对较低等问题,如何提高外泌体的纯度,高效提取外泌体也是需要考虑的问题。因此,目前仍需进一步探索外泌体的生物学和功能及外泌体在 SSc 发病以及诊治方面的潜在作用,使外泌体更安全高效的用于临床。

参考文献:

- [1] Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer [J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1208-1215.
- [2] Zhu T, Wang Y, Jin H, et al. The role of exosome in autoimmune connective tissue disease [J]. Ann Med, 2019, 51(2): 101-108.
- [3] Xu H, Jia S, Xu H. Potential therapeutic applications of exosomes in different autoimmune diseases [J]. Clin Immunol, 2019, 205: 116-124.
- [4] Natasha G, Gundogan B, Tan A, et al. Exosomes as immunotheranostic nanoparticles [J]. Clin Ther, 2014, 36(6): 820-829.
- [5] Li L, Zuo X, Liu D, et al. The profiles of miRNAs and lncRNAs in peripheral blood neutrophils exosomes of diffuse cutaneous systemic sclerosis [J]. J Dermatol Sci, 2020, 98(2): 88-97.
- [6] Liu Y, Shi K, Chen Y, et al. Exosomes and their role in cancer progression [J]. Front Oncol, 2021, 11: 639159.
- [7] Greening DW, Gopal SK, Xu R, et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer [J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 40: 72-81.
- [8] Colletti M, Galardi A, De Santis M, et al. Exosomes in systemic sclerosis: messengers between immune, vascular and fibrotic components [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4337.
- [9] Brown M, O'reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis [J]. Clin Exp Immunol, 2019, 195(3): 310-321.
- [10] Cao Y, Xu Y, Chen C, et al. Local delivery of USC-derived exosomes harboring ANGPTL3 enhances spinal cord functional recovery after injury by promoting angiogenesis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 20.
- [11] Pattanaik D, Brown M, Postlethwaite BC, et al. Pathogenesis of systemic sclerosis [J]. Front Immunol, 2015, 6: 272.
- [12] Deb A, Gupta S, Mazumder PB. Exosomes: a new horizon in modern medicine [J]. Life Sci, 2021, 264: 118623.
- [13] Li L, Zuo X, Xiao Y, et al. Neutrophil-derived exosome from systemic sclerosis inhibits the proliferation and migration of

- endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(2): 334–340.
- [14] Nakamura K, Jinnin M, Harada M, et al. Altered expression of CD63 and exosomes in scleroderma dermal fibroblasts [J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 84(1): 30–39.
- [15] Xie Y, Zhang X, Zhao T, et al. Natural CD8⁺25⁺ regulatory T cell-secreted exosomes capable of suppressing cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity against B16 melanoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 438(1): 152–155.
- [16] Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, et al. Exosomes: an overview of Biogenesis, composition and role in ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7(1): 14.
- [17] Zhang B, Yin Y, Lai RC, et al. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 518.
- [18] Admyre C, Johansson SM, Paulie S, et al. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(7): 1772–1781.
- [19] Klinker MW, Lizzio V, Reed TJ, et al. Human B cell-derived lymphoblastoid cell lines constitutively produce fas ligand and secrete MHCII⁺ FasL⁺ killer exosomes [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 144.
- [20] Hughes M, Herrick AL. Systemic sclerosis [J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2019, 80(9): 530–536.
- [21] Yu Y, Shen L, Xie X, et al. The therapeutic effects of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells on scleroderma [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2022, 19(1): 141–150.
- [22] Korman B. Evolving insights into the cellular and molecular pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis [J]. *Transl Res*, 2019, 209: 77–89.
- [23] Hirsova P, Gores GJ. Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015, 1(1): 17–27.
- [24] Zhang W, Zhou X, Zhang H, et al. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(5): F844–F851.
- [25] Vanhaverbeke M, Gal D, Holvoet P. Functional role of cardiovascular exosomes in myocardial injury and atherosclerosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 998: 45–58.
- [26] Choi EW, Seo MK, Woo EY, et al. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts [J]. *Exp Dermatol*, 2018, 27(10): 1170–1172.
- [27] Cao G, Chen B, Zhang X, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-19b promotes the healing of skin wounds through modulation of the CCL1/TGF- β signaling axis [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2020, 13: 957–971.
- [28] Wermuth PJ, Piera-Velazquez S, Rosenbloom J, et al. Existing and novel biomarkers for precision medicine in systemic sclerosis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(7): 421–432.
- [29] Taverna S, Pucci M, Alessandro R. Extracellular vesicles: small bricks for tissue repair/regeneration [J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5(4): 83.
- [30] Antimisiaris SG, Mourtas S, Marazioti A. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): 218.
- [31] Li M, Zhang HP, Wang XY, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate dermal fibrosis in a murine model of bleomycin-induced scleroderma [J]. *Stem Cells Dev*, 2021, 30(19): 981–990.
- [32] Baharloo H, Azimi M, Salehi Z, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a promising therapeutic ace card to address autoimmune diseases [J]. *Int J Stem Cells*, 2020, 13(1): 13–23.
- [33] Chen C, Wang D, Moshaverinia A, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in tight-skin mice identifies miR-151-5p as a therapeutic target for systemic sclerosis [J]. *Cell Res*, 2017, 27(4): 559–577.
- [34] Baral H, Uchiyama A, Yokoyama Y, et al. Antifibrotic effects and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes in a systemic sclerosis mouse model: Possible contribution of miR-196b-5p [J]. *J Dermatol Sci*, 2021, 104(1): 39–47.
- [35] Wermuth P, Piera-Velazquez S, Jimenez S. Exosomes isolated from serum of systemic sclerosis patients display alterations in their content of profibrotic and antifibrotic microRNA and induce a profibrotic phenotype in cultured normal dermal fibroblasts [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2017, 35(4): 21–30.
- [36] Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes [J]. *Methods*, 2015, 87: 3–10.
- [37] Meng W, He C, Hao Y, et al. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 585–598.

[收稿日期]2022-01-19

庞硕,罗卓慧,张连峰. TSPAN7 在癌症、神经系统疾病、HIV、I 型糖尿病中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 122-127.

Pang S, Luo ZH, Zhang LF. Role of TSPAN7 in cancer, neurological diseases, HIV and type I diabetes [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 122-127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.017

TSPAN7 在癌症、神经系统疾病、HIV、 I 型糖尿病中的作用

庞 硕,罗卓慧,张连峰*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会
人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 TSPAN7 是一种由位于 X 染色体上的 *tspan7* 基因所编码的四次跨膜糖蛋白,在脑组织和胰腺中高度表达。目前研究发现 TSPAN7 能够在细胞膜形成 TSPAN 富集微域 (Tspan-enriched microdomains, TEM) 或 TSPAN 网,参与调控细胞内外信息传递与物质交流、细胞骨架、细胞运动以及细胞形态等生物过程。同时,TSPAN7 在多种细胞中发挥至关重要的作用,在肿瘤细胞中,TSPAN7 作为一把双刃剑,通过在肿瘤细胞中的表达改变发挥促进或抑制肿瘤的能力;在免疫细胞中,TSPAN7 可以作为肌动蛋白成核和稳定的正调控因子,参与 DCs 形态发生;在神经细胞中,TSPAN7 参与突触传递和神经元形态发生;在胰岛细胞中,TSPAN7 通过调节 β 细胞的电压依赖性 Ca^{2+} 通道进而控制钙 (Ca^{2+}) 进入胰腺 β 细胞,影响胰岛素分泌。TSPAN7 在不同组织细胞中发挥相应作用,在生理和病理条件下发生改变,参与肿瘤、精神疾病、I 型糖尿病等多种疾病的发生发展。本文旨在综述 TSPAN7 在多种疾病中的作用机制,以期为动物模型研制、疾病诊断、药物干预治疗提供新思路。

【关键词】 TSPAN7;癌症; I 型糖尿病;HIV-1 蛋白;X 连锁的智力障碍;孤独症谱系障碍

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0122-06

Role of TSPAN7 in cancer, neurological diseases, HIV and type I diabetes

PANG Shuo, LUO Zhuohui, ZHANG Lianfeng*

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medicine College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 TSPAN7, a quadruple transmembrane glycoprotein encoded by the *tspan7* gene located on the X chromosome, is highly expressed in brain tissue and pancreas. TSPAN7 has been found to form Tspan-enriched microdomains or TSPAN networks in cell membranes, which are involved in the regulation of biological processes such as intra- and extracellular information and material exchange, cytoskeletal dynamics, cell motility and cell morphology. In tumor cells, TSPAN7 acts as a double-edged sword with the ability to either promote or suppress tumors through its altered expression in tumor cells. In immune cells, TSPAN7 can act as a positive regulator of actin nucleation and stabilization, and is involved in the morphogenesis of dendritic cells. In neuronal cells, TSPAN7 is involved in synaptic transmission and neuronal morphogenesis. In pancreatic islet cells, TSPAN7 controls the entry of calcium (Ca^{2+}) into pancreatic β -cells by

【基金项目】 国家自然科学基金(31970508)。

【作者简介】 庞硕(1994—),男,博士,研究方向:转基因动物模型的研究。E-mail: pangshuo@cnilas.org

【通信作者】 张连峰(1963—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:转基因动物模型的研制及心血管疾病动物模型的研究。

E-mail: zhanglf@cnilas.org

regulating voltage-dependent Ca^{2+} channels, thus affecting insulin secretion. TSPAN7 is also involved in the development of many diseases such as tumors, psychiatric disorders, and type 1 diabetes. This article reviews the mechanisms of TSPAN7 in various diseases, with a view to providing new ideas for animal model development, disease diagnosis, and drug intervention.

【Keywords】 TSPAN7; cancer; type I diabetes; HIV-1 protein; X-linked mental retardation; autism spectrum disorder

四次跨膜蛋白(tetraspanin, TSPAN)是一个跨膜糖蛋白家族^[1]。目前在哺乳动物中发现有 33 种 TSPAN,黑腹果蝇中鉴定出 37 种,秀丽隐杆线虫中鉴定出 20 种,在进化中高度保守^[2]。TSPAN 由 4 个跨膜结构域组成,分别为一个小的(a small extracellular domain, SEL)和一个大的细胞外环(a large extracellular loop, LEL)以及细胞内的 N-和 C-末端^[3-4]。TSPAN 在细胞膜形成 TSPAN 富集微域(Tspan-enriched microdomains, TEM)或 TSPAN 网,而发挥支架作用,参与多个生物过程,如迁移、细胞粘附、膜受体信号转导、外泌体分泌和抗原呈递^[5]。

TSPAN7 是 TSPAN 家族的一个成员,编码的蛋白(又称 TM4SF2/TALLA-1/CD231)是一种 249 个氨基酸组成的细胞表面糖蛋白^[5],在脑组织和胰腺中高度表达^[6]。编码 TSPAN7 的基因 *tspan7*(又称 *Tm4sf2*)在人、小鼠和大鼠均坐落在 X 染色体上。

TSPAN7 在多种细胞中发挥至关重要的作用,在肿瘤细胞中,TSPAN7 作为一把双刃剑,通过在肿瘤细胞中的表达改变发挥促进或抑制肿瘤的能力;在免疫细胞中,TSPAN7 可以作为肌动蛋白成核和稳定的正调控因子,参与 DCs 形态发生,从而在 HIV-1 感染过程中进行免疫调节^[3,7];在神经细胞中,TSPAN7 与 C 型激酶相互作用蛋白质 1(protein interacting with C kinase 1, PICK1)直接作用调节 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸(alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA)受体的运输,参与突触传递和神经元形态发生^[7];在胰岛细胞中,TSPAN7 通过调节 β 细胞的电压依赖性 Ca^{2+} 通道进而控制钙(Ca^{2+})进入胰腺 β 细胞,影响胰岛素分泌^[8]。TSPAN7 在不同组织细胞中发挥相应作用,在生理和病理条件下发生改变,参与肿瘤、精神疾病、I 型糖尿病等多种疾病的发生发展,因此,本综述旨在汇总 TSPAN7 在相关疾病进程中的作用。

1 TSPAN7 在癌症中的双刃剑作用

TSPAN 家族的多种蛋白参与癌症进程,能够通过调节肿瘤细胞的增殖和转移加重或是减轻癌症

的发展,同时还可通过改变细胞粘附、迁移或组织的侵袭能力参与癌症发展^[3]。其中 TSPAN7 在癌症的发生发展中是一把双刃剑,在一类肿瘤中表达升高,在另一类肿瘤中表达降低,发挥促进或抑制肿瘤的能力。

1.1 TSPAN7 表达下调的肿瘤

在肝癌(liver cancer)、膀胱癌(bladder cancer, BCa)、透明细胞肾细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)中,TSPAN7 的表达呈现下降的趋势,并有研究验证 TSPAN7 能够抑制肿瘤的发展。

胃癌、肝癌、结直肠癌和食管癌等消化道肿瘤在我国发病率较高^[9],在对 TSPAN7 在胃癌、肝癌和肠癌 3 个消化道肿瘤中表达进行分析时发现肝癌患者肝组织以及肝癌细胞系 HCC-LM3 和 HepG2 肝癌细胞中 TSPAN7 的表达明显下调,并且 TSPAN7 能够明显抑制 HCC-LM3 细胞的增殖、侵袭和转移,同时在动物体内也证实 TSPAN7 在体内具有抑瘤作用,因此认为 TSPAN7 在肝癌细胞中具有抑瘤作用,并且可能是肝癌的潜在生物标志物^[10]。

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,预后差复发率高,研究发现 TSPAN7 在膀胱癌患者的膀胱组织和膀胱癌细胞系 5637、T24 和 EJ 细胞表达下调,并且 TSPAN7 的高表达与膀胱癌的高 T 分期和肿瘤分级呈负相关,TSPAN7 高表达患者的生存期优于低表达患者。随后将膀胱癌细胞系过表达 TSPAN7,发现 TSPAN7 可能是通过调控 PTEN/PI3K/AKT 通路的多个关键成分抑制膀胱癌细胞增殖、细胞周期进展、侵袭和凋亡,因此,恢复 TSPAN7 的表达成为膀胱癌的一种新的治疗策略^[11]。在透明细胞肾细胞癌中,TSPAN7 基因表达越高,TSPAN7 阳性血管数量越少,细胞浸润和转移越少,提示 TSPAN7 可能是一种肿瘤生长抑制剂,影响肿瘤进展和转移^[12]。

1.2 TSPAN7 表达上调的肿瘤

在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)中,TSPAN7 的表达呈现升高的趋势,并有研究验证 TSPAN7 能够促进肿瘤的发展。

文献报道 TSPAN7 在肺癌细胞中上调,其高表达与肺癌患者的不良预后密切相关,表明 TSPAN7 在肺癌中起致癌作用^[13]。NSCLC 是肺癌的主要类型,NSCLC 肿瘤细胞侵袭组织以及转移是目前导致患者死亡的最主要原因^[13]。TSPAN7 在非小细胞肺癌患者组织以及 NSCLC 细胞系 H1299、H460、H292 和 A549 细胞中呈高表达趋势,TSPAN7 表达较高的患者总体生存率明显降低^[14]。进一步研究针对 NSCLC 细胞中过表达 TSPAN7,发现 NSCLC 细胞增殖明显增加,E-cadherin 表达减少,Vimentin 和 N-cadherin 表达增加,促进细胞上皮间质转化过程。NSCLC 异种移植模型小鼠实验进一步证实 TSPAN7 过表达促进 NSCLC 肿瘤生长,并与间质表型倾斜相关^[14]。

MM 是来自患者骨髓的转化浆细胞的克隆增殖为特征的第二常见血液学癌症^[15]。研究发现在 MM 患者骨髓中 TSPAN7 的表达增加^[16]。但是在 MM 的小鼠模型中,TSPAN7 过表达能够限制肿瘤的进展,这与癌细胞对骨髓基质细胞更强的粘附性和跨内皮迁移能力的增加有关。

TSPAN7 在不同肿瘤中的表达趋势各不相同,在不同肿瘤中发挥促进或抑制肿瘤的作用(表 1),可作为肿瘤的潜在生物标记物,用于癌症的诊断和治疗。

2 TSPAN7 在 HIV-1 感染过程中的免疫调节

树突状细胞是先天免疫系统的一部分,构成对病原体的第一层防御^[17]。其主要功能是捕捉病原随后将病原呈递给 T 淋巴细胞,进而启动先天和适应性免疫反应^[18]。在 HIV-1 病毒感染时,肛门直肠和生殖器部位淋巴结内的 DCs 与 HIV-1 结合,进入体内环境并传递给 T 淋巴细胞,但在这个过程中,HIV-1 病毒可能会进行逃逸,造成 CD4⁺T 淋巴细胞的感染^[19-20]。为进一步探究其作用机制,有研究对人类单核细胞来源的 DCs455 个关于细胞器和膜转运相关基因进行 shRNA 筛选,结果发现 100 多个基因在敲低时显著影响 HIV-1 的感染^[21],其中,TSPAN7 可以作为肌动蛋白成核和稳定的正调控因子,从而在维持树突上的病毒颗粒、限制 HIV-1 内吞

表 1 TSPAN7 在肿瘤发展进程中的作用
Table 1 The role of TSPAN7 in the progression of tumors

肿瘤 Tumour	肿瘤组织中表达趋势 Expression trends in tumor tissues	体外研究 <i>In vitro</i>	体内研究 <i>In vivo</i>	作者,时间,参考文献 Author, time, references
肝癌 Liver cancer	-	抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和转移 Inhibits the proliferation, invasion and metastasis of liver cancer cells	TSPAN7 在肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用,TSPAN7 下调则促进肿瘤的生长 TSPAN7 overexpression inhibits the transplanted tumor growth in nude mice. TSPAN7 downregulation promotes the tumor growth	Qi Y et al, 2020 ^[10]
膀胱癌 Bladder cancer	-	TSPAN7 抑制 BCa 细胞增殖和迁移,诱导 BCa 细胞凋亡和细胞周期阻滞 TSPAN7 inhibits proliferation and migration of BCa cells and induces apoptosis and cell cycle arrest in BCa cells	TSPAN7 的过表达抑制移植瘤裸鼠的肿瘤生长 Overexpression of TSPAN7 inhibits the transplanted tumor growth in nude mice	Yu X et al, 2020 ^[11]
非小细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	+	TSPAN7 过表达增加非小细胞肺癌细胞增殖 TSPAN7 overexpression increases the proliferation of non-small cell lung cancer cells	TSPAN7 的过表达促进移植瘤裸鼠的肿瘤生长 Overexpression of TSPAN7 inhibits the transplanted tumor growth in nude mice	Wang X et al, 2018 ^[14]
多发性骨髓瘤 Multiple myeloma	+	TSPAN7 过表达不影响骨髓瘤细胞的增殖,而增加其黏附和迁移 TSPAN7 overexpression does not affect the proliferation of myeloma cells, but increases their adhesion and migration <i>in vitro</i>	TSPAN7 过表达抑制 5TGM1/KaLwRij 系统性 MM 小鼠模型的肿瘤负荷 Overexpression of TSPAN7 reduces tumor burden in the 5TGM1/KaLwRij murine model of systemic MM.	Cheong CM et al, 2015 ^[16]

作用以及 HIV-1 有效转移到 T 淋巴细胞过程中起重要作用^[21]。

同时,在 HIV-1 蛋白 Nef 和 Vpu 感染后的人类 T 细胞系中,可能通过扰乱蛋白质的运输,限制细胞表面 TSPAN7 的表达^[22],并且进一步研究发现 TSPAN7 是 Nef 的互作蛋白,将 TSPAN7 掺入 HIV-1 病毒粒子包膜中可以降低其传染性^[23]。因此,TSPAN7 是肌动蛋白成核和细胞骨架稳定性的分子机制的关键,其分子机制的具体研究仍不完全,进一步研究对控制从树突状细胞到 T 淋巴细胞的 HIV-1 转移极为重要,同时对膜突出和内吞途径的生物学过程的研究也具有重要意义。

3 TSPAN7 在神经系统疾病进程中的作用

3.1 X 连锁智力障碍

X 连锁智力障碍 (X-linked intellectual disability/mental retardation, XLMR) 是一类以智力障碍为主要临床特征的遗传性疾病,在男性中的发病率为 1/600^[24]。研究发现,某些形式的 X 连锁精神发育迟缓与 TSPAN7 缺失 TM4 和 COOH 末端的细胞质尾密切相关,其中主要原因是染色体平衡易位和过早终止密码子^[24-25]。后续有研究发现在体外神经刺激后,TSPAN7 的 mRNA 表达上调,证明其在神经可塑性中发挥作用^[26]。为进一步探究其机制,研究者通过对大鼠原代神经元进行过表达和敲低 TSPAN7 观察其状态的变化,发现 TSPAN7 过表达有利于丝状伪足和树突棘的形成,而 TSPAN7 的敲低降低脊柱稳定性和头部大小,抑制兴奋性突触发育,限制受体诱导的突触传递^[7]。其作用机制主要是由于 TSPAN7 通过其 C 端与 PICK1 蛋白的 PDZ 结构域相互作用,竞争性抑制 PICK1 与 GluR2/3 的结合,参与 AMPA 受体的转运,进而影响 AMPA 受体的运输以及谷氨酸突触功能,同时有研究发现 TSPAN7 可以激活 PKC α ,使得胞内的 PKC α 转位至细胞膜上,与 PICK1 相结合,磷酸化 GluR2/3,导致在细胞膜上 GluR2/3 的定位不稳定,引起 AMPA 受体的内化^[27-28]。*tspan7* 基因敲除小鼠同样表现出海马兴奋性突触结构和功能的改变以及认知障碍。因此,TSPAN7 参与 X 连锁精神发育迟缓的疾病进程。

3.2 自闭症谱系障碍

自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorders,

ASD) 和精神分裂症 (schizophrenia, SCZ) 是两种常见的神经发育综合征,是环境和遗传因素共同作用的结果^[29-31]。对于这两种疾病,男性比女性受影响更严重,这可能部分是由 X 相关的遗传因素引起的^[32]。因此,有研究直接测序 ASD 患者的 111 个 X 连锁的突触基因,研究发现自闭症谱系障碍与 TSPAN7 的拷贝数变异密切相关^[33]。同时 *tspan7* 基因突变的患者偶尔会被诊断为 ASD^[34]。另外有研究发现 *tspan7* 基因敲除小鼠出现 ASD 相关表型,在 *tspan7* 基因敲除小鼠呈现出社交减少,刻板行为增加、快感缺乏等状态,其外侧僵核神经元表现出低兴奋性、异常的神经元放电模式并且改变的钠、钾电压门控离子通道功能^[35]。其作用机制主要是由于 *tspan7* 敲除引起下游 PKC 过度活化,激活 ERK/MAPK 信号通路,磷酸化钾离子电压门控通道上的 S616 残基,导致激活电压向更强的超极化电位转移,产生 ASD 样表型。因此,TSPAN7 参与自闭症谱系障碍的疾病进程,是疾病检测的潜在基因以及相关药物开发的潜在靶点。同时 TSPAN7 还能与多巴胺 D2 受体相互作用,并通过增强多巴胺 D2 受体的内化降低其表面表达,负调控多巴胺能神经元信号传递^[36]。TSPAN7 也是运动性癫痫罕见拷贝数变异的基因^[37]。

4 TSPAN7 在 I 型糖尿病中的作用

I 型糖尿病是一种自身的炎症状态,其表现为胰岛 β 细胞被 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞杀死,因此不再产生胰岛素^[38]。此类患者的一个临床症状是存在自身抗体。TSPAN7 在胰岛细胞中表达,TSPAN7 还可以通过调节 β 细胞的电压依赖性 Ca²⁺ 通道进而控制钙 (Ca²⁺) 进入胰腺 β 细胞,影响胰岛素分泌^[8]。用抗体与 TSPAN7 外部结构域结合,干扰其功能,直接导致 β 细胞的死亡或影响 β 细胞的功能^[39],35% 的 I 型糖尿病患者中存在抗 TSPAN7 自身抗体,TSPAN7 自身抗体已经作为 I 型糖尿病检测指标^[39-40]。进一步研究发现 TSPAN7 的细胞质 COOH 端和 NH₂ 端被确定为自身抗原表位^[41]。TSPAN7 是 I 型糖尿病中显示为自身靶点的蛋白,对其如何影响胰岛 β 细胞的相关机制以及药物的研发有待深入研究。

5 结语

TSPAN7 作为细胞表面的 4 次跨膜糖蛋白,目

前的研究揭示, TSPAN7 参与细胞内外信息与物质流的调控; 调节细胞骨架和细胞运动; 调节细胞形态等重要生物过程。TSPAN7 与精神疾病、肿瘤、糖尿病、病毒感染等疾病密切相关。TSPAN7 生理条件下的基因功能、与其相互作用的蛋白等方面有待深入研究, 目前已有研究发现 TSPAN7 敲除小鼠可作为自闭症和 X 连锁的智力障碍的动物模型, 由于 TSPAN7 在不同细胞中发挥不同作用, 可以通过基因编辑技术构建条件性敲除 *tspan7* 基因构建相应的疾病模型。TSPAN7 目前还发现是自闭症和 X 连锁智力障碍的风险基因, 并且 TSPAN7 自身抗体已经作为 I 型糖尿病检测指标, 随着后续 TSPAN7 的深入研究, 可以作为肿瘤、免疫、糖尿病、神经系统疾病等疾病检测的诊断基因, 并通过靶向 TSPAN7 治疗其相关疾病。TSPAN7 可以作为动物模型构建、疾病诊断、药物干预治疗的潜在新靶点。

参考文献:

- [1] Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, et al. Tetraspanins at a glance [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 17): 3641-3648.
- [2] Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins function as regulators of cellular signaling [J]. Front Cell Dev Biol, 2017, 5: 34.
- [3] Perot BP, Ménager MM. Tetraspanin 7 and its closest paralog tetraspanin 6: Membrane organizers with key functions in brain development, viral infection, innate immunity, diabetes and cancer [J]. Med Microbiol Immunol, 2020, 209(4): 427-436.
- [4] Berdichevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: More than meets the eye [J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 23): 4143-4151.
- [5] Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(10): 801-811.
- [6] Garcia E, Pion M, Pelchen-Matthews A, et al. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse [J]. Traffic, 2005, 6(6): 488-501.
- [7] Bassani S, Cingolani LA, Valnegri P, et al. The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking [J]. Neuron, 2012, 73(6): 1143-1158.
- [8] Dickerson MT, Dadi PK, Butterworth RB, et al. Tetraspanin-7 regulation of L-type voltage-dependent calcium channels controls pancreatic β -cell insulin secretion [J]. J Physiol, 2020, 598(21): 4887-4905.
- [9] Fidler MM, Bray F, Soerjomataram I. The global cancer burden and human development: A review [J]. Scand J Public Health, 2018, 46(1): 27-36.
- [10] Qi Y, Li H, Lv J, et al. Expression and function of transmembrane 4 superfamily proteins in digestive system cancers [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 314.
- [11] Yu X, Li S, Pang M, et al. TSPAN7 exerts anti-tumor effects in bladder cancer through the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. Front Oncol, 2020, 10: 613869.
- [12] Beckwith KA, Byrd JC, Muthusamy N. Tetraspanins as therapeutic targets in hematological malignancy: A concise review [J]. Front Physiol, 2015, 6: 91.
- [13] Nichols L, Saunders R, Knollmann FD. Causes of death of patients with lung cancer [J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(12): 1552-1557.
- [14] Wang X, Lin M, Zhao J, et al. TSPAN7 promotes the migration and proliferation of lung cancer cells via epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 8815-8822.
- [15] Cowan AJ, Allen C, Barac A, et al. Global burden of multiple myeloma: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016 [J]. JAMA Oncol, 2018, 4(9): 1221-1227.
- [16] Cheong CM, Chow AW, Fitter S, et al. Tetraspanin 7 (TSPAN7) expression is upregulated in multiple myeloma patients and inhibits myeloma tumour development *in vivo* [J]. Exp Cell Res, 2015, 332(1): 24-38.
- [17] Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells [J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(1): 45-51.
- [18] Merad M, Sathe P, Helft J, et al. The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31: 563-604.
- [19] Ahmed Z, Kawamura T, Shimada S, et al. The role of human dendritic cells in HIV-1 infection [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(5): 1225-1233.
- [20] Ménager MM. TSPAN7, effector of actin nucleation required for dendritic cell-mediated transfer of HIV-1 to t cells [J]. Biochem Soc Trans, 2017, 45(3): 703-708.
- [21] Ménager MM, Littman DR. Actin dynamics regulates dendritic cell-mediated transfer of HIV-1 to t cells [J]. Cell, 2016, 164(4): 695-709.
- [22] Haller C, Müller B, Fritz JV, et al. HIV-1 Nef and Vpu are functionally redundant broad-spectrum modulators of cell surface receptors, including tetraspanins [J]. J Virol, 2014, 88(24): 14241-14257.
- [23] Sato K, Aoki J, Misawa N, et al. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins [J]. J Virol, 2008, 82(2): 1021-1033.
- [24] Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, et al. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation [J]. Nat Genet, 2000, 24(2): 167

- 170.
- [25] Abidi FE, Holinski-Feder E, Rittinger O, et al. A novel 2 bp deletion in the *TM4SF2* gene is associated with MRX58 [J]. J Med Genet, 2002, 39(6): 430-433.
- [26] Boda B, Mas C, Muller D. Activity-dependent regulation of genes implicated in X-linked non-specific mental retardation [J]. Neuroscience, 2002, 114(1): 13-17.
- [27] Hirbec H, Francis JC, Lauri SE, et al. Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP [J]. Neuron, 2003, 37(4): 625-638.
- [28] Gallimore AR, Aricescu AR, Yuzaki M, et al. A computational model for the AMPA receptor phosphorylation master switch regulating cerebellar long-term depression [J]. PLoS Comput Biol, 2016, 12(1): e1004664.
- [29] Cardno AG, Gottesman, II. Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics [J]. Am J Med Genet, 2000, 97(1): 12-17.
- [30] Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, et al. Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a British twin study [J]. Psychol Med, 1995, 25(1): 63-77.
- [31] Sullivan PF. The genetics of schizophrenia [J]. PLoS Med, 2005, 2(7): e212.
- [32] Schöttle D, Briken P, Tüscher O, et al. Sexuality in autism: hypersexual and paraphilic behavior in women and men with high-functioning autism spectrum disorder [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2017, 19(4): 381-393.
- [33] Noor A, Gianakopoulos PJ, Fernandez B, et al. Copy number variation analysis and sequencing of the X-linked mental retardation gene TSPAN7/TM4SF2 in patients with autism spectrum disorder [J]. Psychiatr Genet, 2009, 19(3): 154-155.
- [34] Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, et al. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia [J]. Mol Psychiatry, 2011, 16(8): 867-880.
- [35] Murru L, Ponzoni L, Longatti A, et al. Lateral habenula dysfunctions in TM4SF2 (-/y) mice model for neurodevelopmental disorder [J]. Neurobiol Dis, 2021, 148: 105189.
- [36] Lee SA, Suh Y, Lee S, et al. Functional expression of dopamine D2 receptor is regulated by tetraspanin 7-mediated postendocytic trafficking [J]. FASEB J, 2017, 31(6): 2301-2313.
- [37] Dimassi S, Labalme A, Lesca G, et al. A subset of genomic alterations detected in rolandic epilepsies contains candidate or known epilepsy genes including GRIN2A and PRRT2 [J]. Epilepsia, 2014, 55(2): 370-378.
- [38] Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T cell-mediated beta cell destruction: autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8: 343.
- [39] Walther D, Eugster A, Jergens S, et al. Tetraspanin 7 autoantibodies in type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2016, 59(9): 1973-1976.
- [40] McLaughlin KA, Richardson CC, Ravishankar A, et al. Identification of tetraspanin-7 as a target of autoantibodies in type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2016, 65(6): 1690-1698.
- [41] Eugster A, Kraus G, Lidzba V, et al. Cytoplasmic ends of tetraspanin 7 harbour epitopes recognised by autoantibodies in type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2019, 62(5): 805-810.

[收稿日期]2021-12-07

武志慧,孙晓林,王慧. miRNA-125 家族与自身免疫性疾病关系的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 128-136.
Wu ZH, Sun XL, Wang H. Research progress on the relationship between miRNA-125 family and autoimmune diseases [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 128-136.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.018

miRNA-125 家族与自身免疫性疾病关系的研究进展

武志慧¹, 孙晓林¹, 王 慧^{2*}

(1. 包头医学院第一附属医院中心实验室(内蒙古自治区自体免疫学重点实验室), 内蒙古 包头 014010;
2. 包头医学院第一附属医院风湿免疫科, 内蒙古 包头 014010)

【摘要】 MicroRNAs(miRNAs)是一类内源性非编码小分子 RNA, 长度为 20~23 个核苷酸。MicroRNA-125(miR-125)是一个高度保守的 miRNA 家族, 由 miR-125a、miR-125b-1 和 miR-125b-2 组成。越来越多的证据表明 miR-125 参与体内的多种病理生理过程, 调节包括免疫细胞在内的多种细胞的稳态和分化, 与多种自身免疫性疾病密切相关, 有望成为新的治疗靶点。本文综述了 miR-125 家族与自身免疫性疾病、免疫细胞的关系及其最新研究进展。

【关键词】 miR-125b; 自身免疫性疾病; 免疫调节

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0128-09

Research progress on the relationship between miRNA-125 family and autoimmune diseases

WU Zhihui¹, SUN Xiaolin¹, WANG Hui^{2*}

(1. Central Laboratory of Baotou Medical College, Key Laboratory of Autoimmunology, Baotou 014010, China.
2. Department of Rheumatology, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010)

【Abstract】 MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous non coding small RNA, with a length of 20~23 nucleotides. MicroRNA-125 (miR-125) is a highly conserved miRNA family, which is composed of miR-125a, miR-125b-1 and miR-125b-2. More and more evidences show that miR-125 participates in a variety of pathophysiological processes *in vivo*, regulates the homeostasis and differentiation of a variety of cells, including immune cells, and is closely related to a variety of autoimmune diseases, which is expected to become a new therapeutic target. This paper reviews the relationship between miR-125 family and autoimmune diseases and immune cells.

【Keywords】 miR-125b; autoimmune diseases; immunoregulation

自身免疫性疾病(autoimmune disease, AID)是机体免疫功能紊乱、免疫细胞活化、自身抗体和免疫复合物大量产生导致多种组织器官功能受损为特征的一大类疾病, 主要包括类风湿性关节炎、系

统性红斑狼疮、干燥综合征等^[1]。近年来, AID 患病率呈上升趋势, 已成为危害人类健康的重要疾病之一^[2]。临床中通常以非甾体抗炎药^[3]、改善病情抗风湿药^[4]等药物治疗为主。虽然 AID 的诊断及治

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81860294, 81860295); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2019MS08055, 2021MS08045); 内蒙古自治区科技计划项目(201802089, 2019GG052)。

【作者简介】 武志慧(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向: miRNA 与自身免疫性疾病的关系。E-mail: 1183439326@qq.com

【通信作者】 王慧(1977—), 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向: 风湿免疫。E-mail: wanghui@126.com

疗已经取得了显著进展,但仍会出现胃肠道症状、造血系统异常、肝肾功能异常等不良反应^[5-6],患者预后不理想。近年来,国内外研究学者发现微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与多种 AID 的病理过程^[7-8],其中 miRNA-125 在 AID 中的作用备受关注。Xiu 等^[9]发现 miRNA-125b-5p 对甲状腺功能减退有调控作用,还有研究发现 miRNA-125 家族(包括 miRNA-125a、miRNA-125b1、miRNA-125b2)在过表达时,通过促进细胞增殖、减少细胞凋亡对小鼠造血系统起到调控作用^[10],Vasu 等^[11]研究证实 I 型糖尿病患者血清中 miRNA-125 水平与胰岛自身抗体水平呈正相关。以上研究表明,miRNA-125 家族在 AID 中起到一定的调控作用,本文对 miRNA-125 家族与 AID 关系的研究进展作一综述,旨在为 AID 的研究和治疗提供新思路。

1 miRNA 的表达与功能

miRNA 是一类单链非编码小分子 RNA,在多种生物学过程中调控基因的表达^[12],包括细胞的增殖、分化和凋亡等生理过程^[13-15]。miRNA 通过 RNA 聚合酶 II 转录形成一条内部具有发夹结构的双链 miRNA (pri-miRNA)。细胞核内的 pri-miRNA 在 RNA 结合蛋白 Dgcr 8 和 RNase III DROSHA 共同作用下切割成一个长度约 60 nt 的前体 miRNA (pre-miRNA)。pre-miRNA 与核输出蛋白 Exportin-5 结合后共同出核转运至细胞质,在细胞质中被 RNase III Dicer 切割成一条长约 22 nt 的成熟的 miRNA^[16-17]。该双链 RNA 被整合形成 RNA 诱导沉默复合体 (RISC),RISC 通过引导链 miRNA 的 Argonaute (AGO) 蛋白与靶 miRNA 中的 3' 非翻译区 (UTR) 结合,抑制蛋白翻译或促进 mRNA 降解。以上为 miRNA 生物合成的经典途径。除典型途径外,还存在一些非经典途径,如部分 miRNA 可来源于 RNA 内含子^[18]。大多数 miRNA 对基因表达起下调作用,部分 miRNA 促进基因的表达^[19-21]。此外,miRNA 与其靶 mRNA 之间并非一一对应的关系,一种 miRNA 可能调控多个 mRNA 靶点,一个 mRNA 靶点也可以被多种 miRNA 调控^[22]。

2 miRNA-125 概述

1993 年在线虫中发现第一个 miRNA (lin-4 和 let-7)^[23-24],至今,人类基因组中已经发现 2000 个 miRNA,在过去 miRNA 的潜在作用被忽略,但已有

研究证实 miRNA 的异常表达在自身免疫性疾病的发病机制中具有至关重要的作用^[22],其中高度保守的 microRNA-125 (miR-125) 家族受到广泛关注。

2.1 miRNA-125 家族的染色体定位

在人类基因组中,miR-125 家族分为 hsa-miR-125a、hsa-miR-125b 亚家族,其中 hsa-miR-125b 亚家族又分为 miR-125b-1 和 miR-125b-2^[25]。转录 miR-125a 的基因位于靠近 Hsa-miR-99b 和 Hsa-let-7e 的 19 号染色体上。miR-125b 由位于 11 号染色体上的 Hsa-miR-100、Hsa-let-7a-2 和 21 号染色体上的 Hsa-miR-99a、Hsa-let-7c 分别转录,并形成 miR-125b-1 和 miR-125b-2^[26]。根据 pre-miRNA 剪切位点不同 (3' 端和 5' 端),每个 miR-125 家族成员都可进一步分为 pre-miRNA-3p 和 pre-miRNA-5p,其中 miR-125-5p 表达量更高^[27]。

2.2 miRNA-125 家族的表达调控

miR-125 家族的生物学作用受到多种因素调节。在染色体水平上,主要通过染色体异位的方式进行调控,例如,t(2;11)(p21;q23)和 t(11;14)(q24;q32)染色体易位导致骨髓增生异常综合征和急性淋巴细胞白血病中 miR-125b-1 的过度表达^[28-30]。在基因水平上,甲基化是一种普遍存在的 RNA 转录后修饰方式,RNA 甲基转移酶 NSun2 对 pre-miR-125b 1/2、miR-125b 1/2 的甲基化作用,可抑制 pre-miR-125b2 向 miR-125 的加工过程,减弱 miR-125 对 RISC 的招募,并可减弱 miR-125b 在沉默基因中的作用^[31]。在转录水平上,PPAR γ 通过与 miR-125b 启动子上游反应元件的直接结合,促进 miR-125b 的表达^[32]。此外,上调 miR-125a 和 miR-125b 的表达水平可抑制卵巢癌细胞的侵袭和迁移能力^[33]。

3 miRNA-125 家族与免疫细胞的关系

3.1 粒细胞

多能造血干细胞分化为髓系干细胞和淋巴系干细胞,其中髓系干细胞分化出粒细胞祖细胞,包括嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和中性粒细胞^[34]。

miR-125a 在小鼠和人类造血干细胞 (HSCs) 中呈高表达,能够增强小鼠 HSCs 和祖细胞的迁移能力、生存能力以及更新能力^[35],其持续表达是诱导小鼠 HSCs 具有再生活性的必要条件^[36]。miR-125b 通过调节 CBF β 、ETS1、c-JUN 和 STAT3 等途径影响髓系干细胞的分化及转化^[28,37-38],miR-125 在中性

粒细胞、T 细胞、单核细胞、浆细胞样树突状细胞中均有特异性表达^[39],并对粒细胞的生成具有调节作用,miR-125a 能促进未成熟粒细胞的增殖^[40]。敲除小鼠的 miR-125a 基因会影响 G-CSF 信号传导,导致骨髓及循环系统中的中性粒细胞百分比降低,进一步研究发现,粒细胞生成的关键抑制因子 SOCS3 是 miR-125a 的直接靶基因^[41]。一项小鼠骨髓干细胞的体外研究发现,过表达 miR-125b 通过靶向 STAT3 辅助因子 c-JUN 和 Jund,阻断 G-CSF 诱导的粒细胞分化^[39]。在稳态条件下,粒细胞中过表达 miR-125b 可抑制粒细胞趋化性,而在炎症状态下,过表达 miR-125b 会导致小鼠存活率显著降低,总之,过表达 miR-125b 可能以炎症依赖的方式负调控粒细胞功能^[42]。

3.2 巨噬细胞

单核细胞分化为两种不同极化类型的巨噬细胞。经典活化途径是由 Toll 样受体 (TLR) 配体 (如 LPS、IFN- γ) 刺激巨噬细胞诱导产生具有促炎性的 M1 型巨噬细胞,替代活化途径是由 Th2 样细胞因子 (如 IL-4) 刺激巨噬细胞诱导产生具有抗炎性的 M2 型巨噬细胞^[43-44]。

miRNA 在巨噬细胞极化和炎症反应中发挥着重要的调节作用。miR-125a 在 M1 巨噬细胞中通过 Notch 信号通路与宿主基因 RBP-J 位点结合而表达水平上调^[45]。miR-125a-5p 在 M2 巨噬细胞中可能抑制了 TNFAIP3 编码的负调节因子 A20 的表达,增强了 NF- κ B 信号通路而表达上调^[46],并通过靶向 B7-H4 调节巨噬细胞的炎症状态^[47]。miR-125b 通过抑制促凋亡蛋白 BIK 和 MTP 18 的表达影响线粒体的功能,促进细胞凋亡,从而调节 M1 巨噬细胞对炎症的适应性^[48],其在巨噬细胞中的表达量高于其他免疫组织,并可促进 M1 巨噬细胞和 T 细胞活化、改善抗原呈递^[49]。在全身炎症反应中,miR-125b 可抑制 TNF- α mRNA 的翻译^[50],并在人巨噬细胞 NF- κ B 通路中起负调节作用^[51]。在小鼠巨噬细胞中,miR-125b 过表达增加了 IFN- γ 的表面激活标记物的表达,抑制 M1 型巨噬细胞活化的负性调控因子—IFN 调节因子 4 (IRF 4) 的表达,从而影响巨噬细胞的分化^[49],并通过靶向调控 STAT3 影响细胞的增殖与分化^[38]。miR-125b 还是单核细胞和 CD8⁺T 细胞内高表达的炎症趋化因子配体 4 (CCl4) 的负调节因子,参与了与年龄相关的免疫功能的改变^[52]。

3.3 T 细胞

T 细胞需要经历一个多阶段的发育过程。HSC/MPP 细胞分化为共同淋巴前体 (CLP) 细胞,在胸腺中进一步分化为双阴性 (CD4⁻、CD8⁻)、双阳性 (CD4⁺、CD8⁺) 和单阳性 (CD4⁺ 为辅助性 T 细胞、CD8⁺ 为杀伤性 T 细胞) 胸腺细胞。并逐步发育为各种效应 T 细胞^[53]。T 细胞通过 T 细胞抗原受体 (TCR) 识别抗原,大多数 TCR 由 α 、 β 链或 γ 、 δ 链组成,分别定义为 $\alpha\beta$ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞^[54]。

miR-125 家族在各种 T 细胞类型中具有不同的表达谱。在 $\gamma\delta$ T 细胞中 miR-125b-5p 的表达量低于 $\alpha\beta$ T 细胞,miR-125b-5p 过表达可抑制 $\gamma\delta$ T 细胞活化,并促进其凋亡,敲低 miR-125b-5p 可促进 $\gamma\delta$ T 细胞的体外细胞毒性^[55],miR-125b-5p 还可以调控白三烯合成的关键酶 5-脂氧合酶 (5-LO) 参与免疫炎症反应^[56]。Rossi 等^[57] 研究发现,miR-125b 通过调控分化过程中的多个编码基因来抑制 CD4⁺T 细胞分化,维持 CD4⁺T 细胞的初始状态。过表达 miR-125b 可通过靶向肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白 3 (A20) 增加急性 T 淋巴细胞白血病 CD4⁺ 细胞的数量,增加 T 细胞的葡萄糖摄取和耗氧量^[58]。miR-125a 在 T 细胞中高表达,通过 IL-6-STAT3 信号通路调节 Treg 的功能^[59],微 RNA-125a 通过靶向 ETS-1 抑制炎症性肠病患者的肠黏膜炎症此外,通过抑制效应 T 细胞因子 (Stat3、IFN- γ 和 IL-13) 来稳定 Treg 细胞的免疫调节能力^[60]。一项纳入 30 例 ITP 患者的研究表明,miR-125a-5p 可以降低 ITP 患者血浆中 CD4⁺T 细胞 CXCL 1 的水平^[61],过表达 miR-125a-5p 可促进 Foxp 3 的表达,抑制 ROR γ t 的表达,参与诱导 ITP 中 Treg/Th17 的免疫失衡^[62]。在脓毒症小鼠中过表达 miR-125 可以增加 T 细胞、NK 细胞活性及免疫球蛋白的表达,并抑制炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的释放和 T 细胞的凋亡^[63]。而 miR-125a 作为 Lnc-ITSN1-2 的海绵,可以刺激 IBD 患者血液中 Th1/Th17 细胞的分化^[64],通过靶向 ETS1 抑制 IBD 患者的肠黏膜炎症反应,促进了 IBD CD4⁺T 细胞向 Th1 细胞分化^[65]。

3.4 B 细胞

B 细胞经历发育和分化两个阶段,在骨髓中从 CLP 细胞发育为未成熟 B 细胞,进入循环系统后,在外周淋巴器官中,B 细胞在抗原的刺激下分化为免疫能力强的并可与特异抗原结合的成熟 B 细胞^[66]。

正常 B 细胞的发育需要 miR-125 表观沉默^[27], miR-125a 通过调节 NF- κ B 通路,抑制急性髓系白血病(AML) HL 60 细胞增殖和侵袭能力,阻断细胞 G2/M 期的周期^[67]。miR-125b 在骨髓细胞中表达明显,但在 B 淋巴细胞分化过程中表达沉默,过表达 miR-125b 导致骨髓窦内未成熟 B 细胞滞留并导致其凋亡增加,进一步研究发现,骨髓释放未成熟 B 细胞过程的关键调控因子 S1PR1 是 miR-125b 的直接作用靶点。强制表达 S1PR1 或采用 CRISPR/Cas9 介导的基因工程技术(在 S1PR1 3' UTR 中编辑 miR-125b 的结合位点),可以改善 B 细胞的滞留情况^[27]。在多发性骨髓瘤和自身免疫性疾病中 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1(BLIMP-1)和 IFN 调节蛋白-4(IRF-4)呈高表达,并且是浆细胞分化所必需的转录因子,miR-125a、miR-125b 在淋巴滤泡生发中心(GC)的 B 淋巴细胞中优先表达,miR-125b 的表达水平比 miR-125a 高 1000 倍,并可与 BLIMP-1、IRF-4 结合。miR-125b 过表达可抑制脂多糖(LPS)诱导的 B 淋巴细胞中 BLIMP-1 的表达和 IgM 的分泌,抑制了 B 细胞向浆细胞分化,而对 B 细胞活力无明显影响^[26]。以上结果表明,miR-125b 通过表观遗传调控影响 B 淋巴细胞的发育和分化。

3.5 其它免疫细胞

miRNA 转录起始位点 H3K4me3 和 H3K27 me3 的修饰可调控树突状细胞(DC)中 miRNA 的表达水平^[68],miR-125b 和 miR-99a 在 DC 中优先表达^[69],当用 TGF- β 处理单核细胞来源的 DC 时,miR-125b-1 的转录起始点会富集 H3K27me3,从而导致 miR-125b-1 表达减少^[68]。一项采用盲肠结扎穿孔诱导的脓毒症小鼠模型中观察到外源性转染 miR-125 后,可提高 NK 细胞活性,并抑制炎症因子的释放和 T 淋巴细胞的凋亡^[63]。

4 miRNA-125 家族与 AID 的关系

4.1 miRNA-125 家族与类风湿性关节炎

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性自身免疫性疾病,以进行性滑膜炎及关节软骨破坏并伴有全身炎症反应和自身抗体产生为特征,发病率接近总人口的 0.5%~1%^[70-71]。Murata 等^[72]对 102 例 RA 患者和 102 例健康者的血液样品采用综合阵列法对血浆中 miRNA 进行分析,结果发现,即使 RA 患者抗瓜氨酸蛋白抗体(ACPA)阴性,其血浆中 miR-125a-5p 水平仍高于健康对照组两

倍,提示 miR-125a-5p 可能是 RA 的潜在诊断指标。Liu 等^[73]发现 miR-125 在 RA 模型大鼠滑膜组织和滑膜细胞中表达下调,而 PARP 2 表达上调,进一步研究发现,miR-125 可能通过调节 PARP 2 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活性来抑制 RA 的进展。

4.2 miRNA-125 家族与系统性红斑狼疮

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种全身炎症性自身免疫性疾病,其特点是产生特异性抗体导致皮肤、关节、肾和中枢神经系统等多器官损害^[74]。MiRNA 是 SLE 相关信号通路和基因表达的重要调节因子^[75],有研究学者发现 SLE 患者 miR-125a 表达降低,进一步研究发现,miR-125a 通过靶向活化 T 细胞中的 KLF13,对炎症趋化因子 RANTES 的表达起负调控作用,miR-125a 的低表达可能是 SLE 患者 RANTES 表达升高的原因之一^[76]。通过纳米给药技术,将 miR-125a 导入狼疮小鼠脾脏 T 细胞中,发现 miR-125a 通过逆转效应 T 细胞与 Treg 细胞的失衡,显著减轻 SLE 疾病的进展^[77]。一项由 50 名 SLE 患者和 26 名健康对照者参加的基于微阵列分析的研究显示,SLE 患者中有 37 个 miRNAs 调控异常,其中 miR-125b 的表达下调并与狼疮性肾炎呈负相关,miR-125b 通过调节 ETS1 和 STAT3 水平参与 SLE 的发展^[78],高通量测序分析表明,miR-125b 可能是 SLE 的潜在生物标记物^[72]。雷公藤内酯醇可诱导 miR-125a-5p 的表达上调,降低 MRL/LPR 小鼠血清抗 dsDNA 水平、尿蛋白含量,改善肾组织的病理变化,提高 Treg 细胞比例^[79]。紫外线 B 辐射通过下调 SLE 患者 PBMCs 中 miR-125b-5p 的表达,上调 miR-125b-5p 靶基因 UVRAG 的表达来增强自噬活性^[80]。CircRNA 与 miR-125 的相互作用在 SLE 的发生发展中起着重要作用。Has-circ-0010957 通过调控 CD4⁺T 细胞中 miR-125b/STAT3 信号通路参与 SLE 的发病^[81],而 has-circ-0012919 作为 miR-125a-3p 的海绵,对系统性红斑狼疮 CD4⁺T 细胞中 CD11a 和 CD70 的甲基化有一定的抑制作用^[82]。在狼疮小鼠中,组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDI)选择性上调 miR-125b 的表达,使 B 细胞 AID 或 Blimp-1 的表达沉默,通过有效抑制类开关 DNA 重组(CSR)、体细胞高突变(SHM)和浆细胞分化来抑制 ANA、抗 dsDNA、IgG1、IgG2a 等自身抗体的产生,可以显著降低疾病活动度并延长了狼疮小鼠的寿命^[83]。

表 1 miR-125 在免疫细胞及自身免疫性疾病中的作用
Table 1 Role of miR-125 in immune cells and autoimmune diseases

微小 RNA MicroRNA	细胞/疾病 Cells/disease	功能 Function	参考文献 References
miR-125	NK 细胞 Natural killer cells	提高 NK 细胞活性,抑制炎症因子释放 Improve the activity of natural killer cells, inhibit the release of inflammatory factors	[63]
	巨噬细胞 Macrophage	巨噬细胞极化 Macrophage polarization	[45]
miR-125a	Treg 细胞 Regulatory T lymphocyte	抑制效应 T 细胞因子 (STAT3, IFN- γ 和 IL-13) 来稳定 Treg 细胞的免疫调节能力 Suppresses T cytokines (STAT3, IFN- γ and IL-13) to stabilize the immunoregulatory capacity of Treg cells	[59-60]
	粒细胞 Granulocyte	促进未成熟粒细胞增殖 Promote the proliferation of immature granulocytes	[40]
miR-125a-5p	巨噬细胞 Macrophage	巨噬细胞活化和炎症状态 Macrophage activation and inflammatory status	[46-47]
	巨噬细胞 Macrophage	巨噬细胞极化 Macrophage polarization	[46]
	单核细胞 Monocyte	减少线粒体呼吸 Reduced mitochondrial respiration	[48]
	初始 CD4 ⁺ T 细胞 Initial CD4 ⁺ T cells	初始 T 细胞状态的保存 Preserve the initial state of T cells	[57]
	巨噬细胞 Macrophage	巨噬细胞活化 Macrophage activation	[48-49]
miR-125b	单核细胞 Monocyte	促进线粒体延长导致细胞凋亡 Promote mitochondrial elongation and lead to apoptosis	[48]
	粒细胞 Granulocyte	阻断 G-CSF 诱导的粒细胞分化 Blocking G-CSF-induced granulocyte differentiation	[39]
	T 细胞 T lymphocyte	增加 T 细胞的葡萄糖摄取和耗氧量 Increase glucose uptake and oxygen consumption of T cells	[58]
	B 细胞 B lymphocyte	导致骨髓窦内未成熟 B 细胞滞留及增加其凋亡 Resulting in the retention of immature B cells in the bone marrow sinuses and increased apoptosis	[27]
	B 细胞 B lymphocyte	抑制 B 细胞向浆细胞分化 Inhibit the differentiation of B cells into plasma cells	[26]
miR-125a-5p	RA Rheumatoid arthritis	潜在诊断指标 Potential diagnostic indicators	[72]
miR-125	RA Rheumatoid arthritis	抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活性 Inhibit the activity of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway	[73]
miR-125a	SLE Systemic lupus erythematosus	逆转效应 T 细胞与 Treg 细胞的失衡 Reverse the imbalance between effector T cells and Treg cells	[77]
	SLE Systemic lupus erythematosus	调节 ETS1 和 STAT3 水平 Adjust ETS1 and STAT3 levels	[78]
miR-125b	SLE Systemic lupus erythematosus	抑制 CSR、SHM 和浆细胞分化来抑制 ANA、 抗 dsDNA、IgG1、IgG2a 等自身抗体的产生 Inhibit the differentiation of CSR, SHM and plasma cell to inhibit the production of ANA, anti dsDNA, IgG1, IgG2a	[83]
	银屑病 Psoriasis	调控 FGFR2 和 USP 2 来调节 HaCaT 的增殖和分化 Regulation of FGFR2 and USP2 to regulate the proliferation and differentiation of HaCaT	[88-89]
	银屑病 Psoriasis	抑制银屑病患者 HaCaT 的增殖 Inhibiting the proliferation of HaCaT in patients with psoriasis	[90]
miR-125a-5p	HT Hashimoto thyroiditis	潜在的生物标志物 Potential biomarkers	[95]
miR-125b	结肠炎 Colitis	抑制 Th17 细胞分化,提高 Treg 细胞比例 Inhibit Th17 cell differentiation and increase the proportion of Treg cells	[99]

4.3 miRNA-125 家族与银屑病

银屑病是常见的慢性炎症性皮肤病,在成年人中的发病率约在 0.14%~6.60%,存在地域和种族差异^[84],具体发病机制尚不明确,认为与遗传、环境及免疫异常调节等有关^[85]。与正常人相比,银屑病患者血清中 miR-125a、miR-125b 水平显著降低^[86-87],miR-125b 通过靶向调控成纤维细胞生长因子受体 2(FGFR2)和泛素特异性肽酶 2(USP2)来调节角质形成细胞(HaCaT)的增殖和分化^[88-89]。过表达 miR-125b 可抑制 USP2 的表达,并导致 NF- κ B 依赖的细胞因子减少,减轻皮肤炎症^[50]。miR-125b 还能抑制 Notch 信号通路上游蛋白 BRD 4 和配体 Jagged-1 的表达,通过激活 BRD4/Notch 信号通路来抑制银屑病患者 HaCaT 的增殖^[90]。AKT3 是 miR-125b 的另一个靶基因,过表达 miR-125b 可阻断 AKT 通路,抑制 HaCaT 的增殖^[91]。在 HaCaT 中 p63 是 miR-125b 的作用靶点,p63 通过介导 IKK 和 Jagged-1 复合物的激活,在 NF- κ B 和 Notch 信号通路中发挥重要作用^[92-93]。EZH 2 对 HaCaT 的增殖具有抑制作用,SFMBT1 和 EZH2 在银屑病皮肤组织中的表达显著增加,而 miR-125a-5p 的表达水平与 SFMBT1 的表达水平呈负相关,miR-125a-5p 可通过转化生长因子 β /smad 途径降低 IL-17A 水平,从而减轻银屑病的皮肤炎症^[94]。一项关于 miR-125a 水平与银屑病严重程度及治疗效果的研究发现,应用依那西普治疗的银屑病患者血浆中 miR-125a 水平升高,提示血清 miRNA-125a 的测定可以评估银屑病患者治疗效果^[87]。

4.4 miRNA-125 家族与其它

在桥本甲状腺炎(HT)患者中,miR-125a-5p 通过直接靶向 MAF 调节 Th1 细胞,参与 HT 的发病,是 HT 潜在的生物标志物^[95],而 PBMCs 中 miR-125a 的表达与自身免疫性甲状腺疾病(AITD)的发病及预后有关^[96]。原发性干燥综合征(PSS)患者 CD4⁺T 细胞中 miRNA-125b-5p 的表达水平与疾病活动性有关^[97]。miR-125b-5p 通过靶向骨性关节炎(OA)软骨细胞的 TRAF6/MAPKs/NF- κ B 通路,对包括 MMP-13 在内的炎症基因起负调控作用^[98]。IFN- γ 预处理骨髓间充质干细胞,可通过增加与 STAT3 3' UTR 结合的 miR-125a 和 miR-125b 水平来抑制 Th17 细胞分化,提高 Treg 细胞比例,从而抑制结肠炎的发生^[99]。

5 小结

在过去的几年里,我们对 miRNAs 在自身免疫性疾病中的研究逐渐深入。根据最近的研究数据可以得出 miR-125 家族是自身免疫反应中重要的调节因子,可调控自身免疫反应中复杂的信号通路,可能成为潜在的诊断标记物(表 1)。深入研究 miR125 在自身免疫疾病的作用机制,对开发出潜在而有效的治疗方法是十分重要的,并可为自身免疫性疾病制定新的诊断标准和治疗策略。

参考文献:

- [1] Kiang MV, Chin ET, Huynh BQ, et al. Correction to Lancet Infect Dis 2021: Routine asymptomatic testing strategies for airline travel during the COVID-19 pandemic: a simulation study [J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(8): e208.
- [2] 潘海峰,冷瑞雪,吴国翠,等.重大自身免疫性疾病的流行病学研究进展[J].中华疾病控制杂志,2018,22(11): 1093-1095, 1105.
- [3] Patil K, Mahajan U, Unger B, et al. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4367.
- [4] Geurts-Voerman G, Verhoef L, van den Bemt B, et al. The pharmacological and clinical aspects behind dose loading of biological disease modifying anti-rheumatic drugs (bDMARDs) in auto-immune rheumatic diseases (AIRDs): rationale and systematic narrative review of clinical evidence [J]. BMC Rheumatol, 2020, 4: 37.
- [5] Yoshikawa A, Yoshida S, Kimura Y, et al. Add-on iguratimod as a therapeutic strategy to achieve remission in patients with rheumatoid arthritis inadequately responding to biological DMARDs: A retrospective study [J]. Mod Rheumatol, 2018, 28(2): 227-234.
- [6] Millrine D, Kishimoto T. A brighter side to thalidomide: its potential use in immunological disorders [J]. Trends Mol Med, 2017, 23(4): 348-361.
- [7] Schell S, Rahman Z. miRNA-mediated control of B cell responses in immunity and SLE [J]. Front Immunol, 2021, 12: 683710.
- [8] Bi X, Guo X, Mo B, et al. LncRNA PICSAR promotes cell proliferation, migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by sponging miRNA-4701-5p in rheumatoid arthritis [J]. EBioMedicine, 2019, 50: 408-420.
- [9] Xiu L, Xing Q, Mao J, et al. miRNA-125b-5p suppresses hypothyroidism development by targeting signal transducer and activator of transcription 3 [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 5041-5049.
- [10] Wojtowicz E, Walasek M, Broekhuis M, et al. MicroRNA-125

- family members exert a similar role in the regulation of murine hematopoiesis [J]. *Exp Hematol*, 2014, 42(10): 909-918.
- [11] Vasu S, Kumano K, Darden C, et al. MicroRNA signatures as future biomarkers for diagnosis of diabetes states [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1533.
- [12] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [13] Ait-Aissa K, Nguyen Q, Gabani M, et al. MicroRNAs and obesity-induced endothelial dysfunction: key paradigms in molecular therapy [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 136.
- [14] Gomase V, Parundekar A. MicroRNA: human disease and development [J]. *Int J Bioinform Res Appl*, 2009, 5(5): 479-500.
- [15] Bushati N, Cohen S. MicroRNA functions [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175-205.
- [16] Starega-Roslan J, Kosciarska E, Kozłowski P, et al. The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(17): 2859-2871.
- [17] Finnegan E, Pasquinelli A. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(1): 51-68.
- [18] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 5-20.
- [19] Ørom U, Nielsen F, Lund A. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(4): 460-471.
- [20] Place R, Li L, Pookot D, et al. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(5): 1608-1613.
- [21] Vasudevan S, Tong Y, Steitz J. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [22] Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(5): 279-294.
- [23] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [24] Reinhart B, Slack F, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [25] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units [J]. *Genome Res*, 2004, 14: 1902-1910.
- [26] Gururajan M, Haga C, Das S, et al. MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(7): 583-592.
- [27] Li G, So A, Sookram R, et al. Epigenetic silencing of miR-125b is required for normal B-cell development [J]. *Blood*, 2018, 131(17): 1920-1930.
- [28] Bousquet M, Quelen C, Rosati R, et al. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the T(2;11)(p21;q23) translocation [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(11): 2499-2506.
- [29] Chapiro E, Russell L, Struski S, et al. A new recurrent translocation T(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2010, 24(7): 1362-1364.
- [30] Tassano E, Acquila M, Tavella E, et al. MicroRNA-125b-1 and BLID upregulation resulting from a novel IGH translocation in childhood B-Cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49(8): 682-687.
- [31] Yuan S, Tang H, Xing J, et al. Methylation by NSun2 represses the levels and function of microRNA 125b [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(19): 3630-3641.
- [32] Luo S, Wang J, Ma Y, et al. PPAR γ inhibits ovarian cancer cells proliferation through upregulation of miR-125b [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462(2): 85-90.
- [33] Lee M, Kim E, Jeon M. MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8726-8742.
- [34] Bardeol BW, Kenny EF, Sollberger G, et al. The balancing act of neutrophils [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(5): 526-536.
- [35] Wojtowicz EE, Broekhuis MJC, Weersing E, et al. MiR-125a enhances self-renewal, lifespan, and migration of murine hematopoietic stem and progenitor cell clones [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4785.
- [36] Luinburg DG, Dinitzen AB, Flohr Svendsen A, et al. Persistent expression of microRNA-125a targets is required to induce murine hematopoietic stem cell repopulating activity [J]. *Exp Hematol*, 2021, 94: 47-59.
- [37] Bousquet M, Nguyen D, Chen C, et al. MicroRNA-125b transforms myeloid cell lines by repressing multiple mRNA [J]. *Haematologica*, 2012, 97(11): 1713-1721.
- [38] Surdziel E, Cabanski M, Dallmann I, et al. Enforced expression of miR-125b affects myelopoiesis by targeting multiple signaling pathways [J]. *Blood*, 2011, 117(16): 4338-4348.
- [39] Allantaz F, Cheng DT, Bergauer T, et al. Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29979.
- [40] Wojtowicz EE, Lechman ER, Hermans KG, et al. Ectopic miR-125a expression induces long-term repopulating stem cell capacity in mouse and human hematopoietic progenitors [J]. *Cell stem cell*, 2016, 19(3): 383-396.
- [41] Qin Y, Wu L, Ouyang Y, et al. MiR-125a Is a critical modulator for neutrophil development [J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(10): e1007027.
- [42] Lee CW, Schoenherr C, Battmer K, et al. miR-125b regulates chemotaxis and survival of bone marrow derived granulocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0204942.

- [43] Chen YN, Hu MR, Wang L, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [44] Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 514.
- [45] Zhao JL, Huang F, He F, et al. Forced activation of notch in macrophages represses tumor growth by upregulating miR-125a and disabling tumor-associated macrophages [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(6): 1403–1415.
- [46] Graff JW, Dickson AM, Clay G, et al. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 21816–21825.
- [47] Diao W, Lu L, Li S, et al. MicroRNA-125b-5p modulates the inflammatory state of macrophages via targeting B7-H4 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(4): 912–918.
- [48] Duroux-Richard I, Roubert C, Ammari M, et al. miR-125b controls monocyte adaptation to inflammation through mitochondrial metabolism and dynamics [J]. *Blood*, 2016, 128(26): 3125–3136.
- [49] Chaudhuri AA, So AY, Sinha N, et al. MicroRNA-125b potentiates macrophage activation [J]. *J Immunol*, 2011, 187(10): 5062–5068.
- [50] El Gazzar M, McCall CE. MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(27): 20940–20951.
- [51] Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. Estradiol suppresses NF- κ B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages [J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 5029–5037.
- [52] Cheng NL, Chen X, Kim J, et al. MicroRNA-125b modulates inflammatory chemokine CCL₄ expression in immune cells and its reduction causes CCL₄ increase with age [J]. *Aging cell*, 2015, 14(2): 200–208.
- [53] Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(8): 666–673.
- [54] Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 371–394.
- [55] Zhu Y, Zhang S, Li Z, et al. miR-125b-5p and miR-99a-5p downregulate human $\gamma\delta$ T-cell activation and cytotoxicity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(2): 112–125.
- [56] Busch S, Auth E, Scholl F, et al. 5-lipoxygenase is a direct target of miR-19a-3p and miR-125b-5p [J]. *J Immunol*, 2015, 194(4): 1646–1653.
- [57] Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, et al. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺T cells by the microRNA miR-125b [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 796–803.
- [58] Liu Z, Smith KR, Khong HT, et al. miR-125b regulates differentiation and metabolic reprogramming of T cell acute lymphoblastic leukemia by directly targeting A20 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78667–78679.
- [59] Li D, Kong C, Tsun A, et al. MiR-125a-5p decreases the sensitivity of treg cells toward IL-6-mediated conversion by inhibiting IL-6R and STAT3 expression [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14615.
- [60] Pan W, Zhu S, Dai D, et al. MiR-125a targets effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7096.
- [61] Li JQ, Hu SY, Wang ZY, et al. MicroRNA-125-5p targeted CXCL₁₃: a potential biomarker associated with immune thrombocytopenia [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(4): 772–780.
- [62] Li JQ, Hu SY, Wang ZY, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits microRNA-125a-5p expression and induces immune imbalance of Treg/Th17 in immune thrombocytopenic purpura [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 905–911.
- [63] Chen JX, Xu X, Zhang S. Silence of long noncoding RNA NEAT1 exerts suppressive effects on immunity during sepsis by promoting microRNA-125-dependent MCEP1 downregulation [J]. *IUBMB life*, 2019, 71(7): 956–968.
- [64] Nie J, Zhao Q. Lnc-ITSN1-2, derived from rna sequencing, correlates with increased disease risk, activity and promotes CD4⁺ T cell activation, proliferation and Th1/Th17 cell differentiation by serving as a ceRNA for IL-23R via sponging miR-125a in inflammatory bowel disease [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 852.
- [65] Ge Y, Sun M, Wu W, et al. MicroRNA-125a suppresses intestinal mucosal inflammation through targeting ETS-1 in patients with inflammatory bowel diseases [J]. *J Autoimmun*, 2019, 101: 109–120.
- [66] Zan H, Casali P. Epigenetics of peripheral B-cell differentiation and the antibody response [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 631.
- [67] Shen MY, Wang Y, Cui SY, et al. MicroRNA-125a regulates proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia through targeting NF- κ B pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3594–3601.
- [68] Mei S, Liu Y, Bao Y, et al. Dendritic cell-associated miRNAs are modulated via chromatin remodeling in response to different environments [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e90231.
- [69] Tserel L, Runnel T, Kisand K, et al. MicroRNA expression profiles of human blood monocyte-derived dendritic cells and macrophages reveal miR-511 as putative positive regulator of Toll-like receptor 4 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(30): 26487–26495.
- [70] Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, et al. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? [J]. *Immunogenetics*, 2011, 63(8): 459–466.
- [71] Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4: S265–S272.
- [72] Murata K, Furu M, Yoshitomi H, et al. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69118.

- [73] Liu K, Zhang Y, Liu L, et al. miR-125 regulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rheumatoid arthritis rats via PARP2 [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1): BSR20180890.
- [74] Miyagawa-Hayashino A, Yoshifuji H, Kitagori K, et al. Increase of MZB1 in B cells in systemic lupus erythematosus: proteomic analysis of biopsied lymph nodes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 13.
- [75] Dai Y, Huang YS, Tang M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Lupus*, 2007, 16(12): 939–946.
- [76] Zhao X, Tang Y, Qu B, et al. MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(11): 3425–3435.
- [77] Zhang J, Chen C, Fu H, et al. MicroRNA-125a-loaded polymeric nanoparticles alleviate systemic lupus erythematosus by restoring effector/regulatory T cells balance [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4414–4429.
- [78] Luo X, Zhang L, Li M, et al. The role of miR-125b in T lymphocytes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2013, 31(2): 263–271.
- [79] Zhao X, Tang X, Yan Q, et al. Triptolide ameliorates lupus via the induction of miR-125a-5p mediating Treg upregulation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71: 14–21.
- [80] Cao W, Qian G, Luo W, et al. miR-125b is downregulated in systemic lupus erythematosus patients and inhibits autophagy by targeting UVRAG [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 791–797.
- [81] He S, Du H, Wang Y, et al. Hsa_circ_0010957 level is increased and sponges microRNA-125b in CD4⁺T cells of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 469.
- [82] Zhang C, Wang X, Chen Y, et al. The down-regulation of hsa_circ_0012919, the sponge for miR-125a-3p, contributes to DNA methylation of CD11a and CD70 in CD4⁺T cells of systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Sci*, 2018, 132(21): 2285–2298.
- [83] White CA, Pone EJ, Lam T, et al. Histone deacetylase inhibitors upregulate B cell microRNAs that silence AID and Blimp-1 expression for epigenetic modulation of antibody and autoantibody responses [J]. *J Immunol*, 2014, 193(12): 5933–5950.
- [84] Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, et al. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study [J]. *BMJ*, 2020, 369: m1590.
- [85] Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 227–255.
- [86] Chatzikyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, et al. The role of microRNA-146a (miR-146a) and its target IL-1R-associated kinase (IRAK1) in psoriatic arthritis susceptibility [J]. *Scand J Immunol*, 2010, 71(5): 382–385.
- [87] Pei D, Cao J, Qin G, et al. Measurement of circulating miRNA-125a exhibits good value in the management of etanercept-treated psoriatic patients [J]. *J Dermatol*, 2020, 47(2): 140–146.
- [88] Xu N, Brodin P, Wei T, et al. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2 [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(7): 1521–1529.
- [89] Wei T, Folkersen L, Biskup E, et al. Ubiquitin-specific peptidase 2 as a potential link between microRNA-125b and psoriasis [J]. *Br J Dermatol*, 2017, 176(3): 723–731.
- [90] Pan M, Huang Y, Zhu X, et al. miR-125b-mediated regulation of cell proliferation through the Jagged-1/Notch signaling pathway by inhibiting BRD4 expression in psoriasis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5227–5236.
- [91] Zheng Y, Cai B, Li X, et al. MiR-125b-5p and miR-181b-5p inhibit keratinocyte proliferation in skin by targeting Akt3 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 862: 172659.
- [92] Candi E, Amelio I, Agostini M, et al. MicroRNAs and p63 in epithelial stemness [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(1): 12–21.
- [93] Wang MJ, Xu YY, Huang RY, et al. Role of an imbalanced miRNAs axis in pathogenesis of psoriasis: novel perspectives based on review of the literature [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 5498–5507.
- [94] Qu S, Liu Z, Wang B. EZH2 is involved in psoriasis progression by impairing miR-125a-5p inhibition of SFMBT1 and leading to inhibition of the TGFβ/SMAD pathway [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2021, 12: 2040622320987348.
- [95] Liu Y, Ding X, Xiong S, et al. Circulating microRNA expression profiling identifies miR-125a-5p promoting T helper 1 cells response in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1195.
- [96] Inoue Y, Watanabe M, Inoue N, et al. Associations of single nucleotide polymorphisms in precursor-microRNA (miR)-125a and the expression of mature miR-125a with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 178(2): 229–235.
- [97] Gong B, Zheng L, Lu Z, et al. Mesenchymal stem cells negatively regulate CD4⁺ T cell activation in patients with primary Sjögren syndrome through the miRNA-125b and miRNA-155 TCR pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 43.
- [98] Rasheed Z, Rasheed N, Abdulmonem WA, et al. MicroRNA-125b-5p regulates IL-1β induced inflammatory genes via targeting TRAF6-mediated MAPKs and NF-κB signaling in human osteoarthritic chondrocytes [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6882.
- [99] Yang R, Huang H, Cui S, et al. IFN-γ promoted exosomes from mesenchymal stem cells to attenuate colitis via miR-125a and miR-125b [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 603.

[收稿日期]2021-11-23

王雪,张媛鑫,田硕,等. 基于中西医临床病症特点的乳腺癌动物模型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 137-144.
Wang X, Zhang YX, Tian S, et al. Analysis of animal models of breast cancer based on clinical symptoms of Traditional Chinese and Western Medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 137-144.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.019

基于中西医临床病症特点的乳腺癌动物模型分析

王 雪[#], 张媛鑫[#], 田 硕, 彭孟凡, 武香香, 苗明三^{*}

(河南中医药大学, 郑州 450046)

【摘要】 目的 乳腺癌是我国女性发病率最高的恶性肿瘤, 严重影响了患者的身心健康, 制备出符合临床特征的乳腺癌动物模型, 对研究乳腺癌的发病机制和治疗方案至关重要。**方法** 以“乳腺癌”“动物模型”为主题, 检索知网、万方、维普和 PubMed 数据库, 以乳腺癌模型中西医临床诊断标准为依据, 将现有乳腺癌动物模型的品种、特征、造模方法进行总结, 根据乳腺癌的中西医临床病症特点进行吻合度评价。**结果** 发现现有的动物模型制备方法较单一, 大多以化疗致癌造模方法为主, 忽略了中医病因, 缺少中医病症结合模型, 与临床中多因素致病存在较大出入, 限制了中医药防治乳腺癌相关研究和临床应用。**结论** 乳腺癌模型评价以病理学诊断和瘤株(体)的形成为主, 与临床中、西医乳腺癌诊断标准存在一定差异。因此, 有必要进一步完善乳腺癌动物模型评价体系, 改进现有模型, 使中医药基础研究更加贴合临床实际。

【关键词】 乳腺癌; 乳岩; 动物模型; 病症结合

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0137-08

Analysis of animal models of breast cancer based on clinical symptoms of Traditional Chinese and Western Medicine

WANG Xue[#], ZHANG Yuanxin[#], TIAN Shuo, PENG Mengfan, WU Xiangxiang, MIAO Mingsan^{*}

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

【Abstract】 Objective Breast cancer is the malignant tumor with the highest incidence in women in China, which seriously affects the physical and mental health of patients. The preparation of animal models of breast cancer conforming to clinical characteristics is of great importance to the study of its pathogenesis and treatment. **Methods** Using “breast cancer” and “animal model” as search terms, we searched China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang, VIP and PubMed databases’ entries describing models of Chinese and Western Medicine clinical diagnostic criteria for breast cancer. We summarized breast cancer animal models of existing varieties, characteristics, and modeling method. Then we evaluated the consistency according to the clinical symptoms of Traditional Chinese and Western Medicine for breast cancer. **Results** We found that the existing animal model preparation method are relatively simple and mostly based on chemotherapy-induced cancer modeling method. Accordingly, these method ignore the etiology of Traditional Chinese Medicine and lack of combination model of Traditional Chinese Medicine disease. This result in large differences from

【基金项目】 国家中医药管理局标准化项目 (GZY-FJS-2020-219); 河南省重大公益专项 (201300310100); 河南省药品监督管理局科技计划项目 (2020DB050-55, 2020DB134-49)。

【作者简介】 王雪 (1994—), 在读硕士研究生, 研究方向: 中药学。E-mail: 1186062348@qq.com

张媛鑫 (1999—), 在读硕士研究生, 研究方向: 药理学。E-mail: zhangyuanxin525@163.com [#]共同第一作者

【通信作者】 苗明三 (1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中药药理学。E-mail: miaomingsan@163.com

clinical multi-factor disease observations, limiting research and clinical application of Traditional Chinese Medicine for the prevention and treatment of breast cancer. **Conclusions** Evaluation of breast cancer models is mainly based on pathological diagnosis and the formation of tumor strain (body), which is different from the Western and Chinese diagnostic criteria of breast cancer. Therefore, it is necessary to further improve the evaluation system of animal models of breast cancer, improve existing models, and make the basic research of Traditional Chinese Medicine more suitable for clinical practice.

【Keywords】 breast cancer; breast rock; animal model; combination of disease and symptom

乳腺癌是我国女性最高发的恶性肿瘤之一^[1],也是全球女性最常见且死亡率最高的癌症之一,其发病率每年以 3%~4% 的速度上升,最新研究发现,全球每 76 s 就有一位乳腺癌确诊患者,这极大威胁了女性的生命健康和生活品质^[2]。St. Gallen 共识专家组以循证医学为依据,根据治疗基础将乳腺癌分型分为 luminal A 型、luminal B 型、Erb-B2 过表达型、基底样型 4 类^[3],目前临床治疗多采用手术切除、放射线治疗、靶向治疗、内分泌、免疫及中医药调理等综合治疗模式^[4],其中,中医药治疗已成为我国乳腺癌治疗方式的重要组成部分。中医将乳腺癌归于“乳岩”范畴,其主要病因多由正虚邪盛、情志失调、经络受阻等因素引起^[5],治疗以扶正祛邪,调畅情志为主。

动物模型(animal model of human diseases)是具有人类疾病模拟性表现的动物实验对象和材料,是现代生物医学研究中极为重要的一种实验方法和手段^[6],能方便、高效地认识人类疾病的发生、发展规律和研究防治措施^[7]。现存的多数动物模型虽在一定程度反应了疾病的症状,但有些疾病模型的建立忽略了中医“证候”、“病症统一”等因素,存在模型动物宏观症状与人类临床相差较大的缺陷,不利于相关疾病的研究。本文总结现有的乳腺癌动物模型,将其与中西医临床病证特点的吻合情况进行分析,阐述模型存在的优缺点,提出中医模型完善方向,以期对乳腺癌的中医药治疗提供理论依据。

1 乳腺癌的病因病机

1.1 现代医学病因病机

临床中乳腺癌的高危因素有:家族成员中有乳腺癌患病史;生产年龄过大;初潮年龄过早(<12 岁)或绝经年龄较晚(>50 岁);肥胖患者;过量服用雌激素以及内分泌失调等^[8-9]。乳腺癌家族史:乳腺癌的发生率与亲属中癌症患者数量成正比^[10];初潮早、绝经晚方面:初潮年龄<12 岁,乳腺癌的确诊

率较高^[11];绝经时间异常与人体内的胰岛素样生长因子有关,生长因子表达越高,患乳腺癌的概率更大^[12];环境方面:苯并芘物质有强致癌性,主要存在于煤烟、香烟、汽车尾气、烹饪油烟等环境中,大量吸收后对机体产生不可逆的伤害^[13];内分泌失调:人体内分泌紊乱,雌二醇、催乳素等激素的升高,将会导致乳腺癌的发病率升高^[6]。

1.2 中医学病因病机

在传统祖国医学记载中,乳腺癌归属于“乳岩”范畴。《医学正传》云:“乳岩多生于忧郁积忿妇女”,乳房在经络循行中涉及到肝、胃、胆经,长期情志不畅,引起肝气郁结,气血运行紊乱,经络受阻,日久郁而化火,痰结血瘀,凝结于乳而致癌。《格致余论》中云:“忧怒抑郁,朝夕积累,脾气消阻,肝气积滞,遂成隐核”,情志失调可引起脏腑失和,经络受阻,气滞血瘀等症状^[14],中医认为情志失调是导致乳岩发生的最重要因素。《医学汇编·乳岩附论》云:“正气虚则为岩”,乳腺癌的发病以气血亏虚为本,痰毒血瘀为标^[15],正气亏虚可看作是乳腺癌的内因。

2 乳腺癌诊断标准及特点

2.1 西医乳腺癌诊断标准及特点

西医一般根据临床表现、病理影像学、细胞等相关检查进行判定,其中病理学和超声检查是诊断乳腺癌最重要的指标,依据乳腺癌诊疗规范(2018 年版)以及中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2019 年版)^[16]总结出西医乳腺癌诊断标准,见表 1。

2.2 中医诊断标准及特点

中医药作为传统祖国医学的特色疗法,治疗效果显著,但单纯中医不能确诊乳腺癌,需结合西医检查方可诊断。根据《中医外科常见病诊疗指南·乳癖》^[17],可将乳腺癌中医证型主要分为:肝郁气滞型,痰瘀互结型,冲任失调型。见表 2。

表 1 西医诊断标准
Table 1 Diagnostic criteria of

序号 Number	检测手段 Detection means	诊断指标 Diagnostic index
1	病理学诊断 Pathological diagnosis	(1) 乳腺肿块手术标本、全乳切除术标本、保乳手术标本经病理、组织学诊断者; (2) 经前哨淋巴结活检标本诊断; (3) 乳头、乳晕、皮肤、脉管和胸肌处活检为孤立肿瘤细胞, 同时又能排除其他器官原发癌者。 (1) Pathological diagnosis of breast masses, surgical specimens, total mastectomy specimens and breast conserving surgical specimens diagnosed by pathology and histology. (2) Diagnosis by sentinel lymph node biopsy. (3) The biopsy of nipple, areola, skin, vessel and pectoral muscle were isolated tumor cells, and the primary cancer of other organs could be excluded.
2	细胞学诊断 Cytological diagnosis	根据肿瘤标志物 CA15-3 和 CEA 检测乳腺癌是否转移, 当两者联合应用更有利于对肿瘤复发和转移的检验。 The combination of tumor markers CA15-3 and CEA to detect breast cancer metastasis is more conducive to the detection of tumor recurrence and metastasis.
3	X 线检查 X-ray examination	乳腺 X 线检查是诊断 DCIS(导管内癌) 最重要的方法: (1) 出现占位性病变; (2) 肿块边缘可表现为清楚, 遮蔽, 小分叶, 模糊, 星芒状; (3) 肿块形态包括圆形, 卵圆形和不规则形; (4) 伴有肿块密度的改变; (5) 可疑钙化的出现; (6) 以及结构扭曲; (7) 单侧导管扩张; (8) 合并征象: 包括皮肤凹陷、乳头凹陷回缩、皮肤增厚、小梁结构增粗、腋窝淋巴结肿大、结构扭曲和钙化等。 Mammography is the most important method for the diagnosis of DCIS (intraductal carcinoma): (1) Space occupying lesions. (2) The edge of the mass can be seen as clear, obscured, lobulated, fuzzy and stellate. (3) The shape of the mass includes round, oval and irregular. (4) Accompanied by the change of mass density. (5) Appearance of suspicious calcification. (6) And structural distortion. (7) Unilateral catheter dilatation. (8) Combined signs: including skin depression, nipple depression retraction, skin thickening, thickening of trabecular structure, enlargement of axillary lymph nodes, structural distortion and calcification.
4	超声检查 Ultrasonic examination	乳腺超声中出现四项即建议进行组织病理学检查: (1) 肿块形态大多不规则; (2) 边界较模糊; (3) 边缘不光整, 可呈现扇贝状, 成角状, 毛刺状; (4) 病灶与周围组织表现为: 皮下脂肪层水肿增厚; (5) 皮肤凹陷、凹凸不平; (6) 病灶周围水肿; 结构扭曲; (7) Cooper 韧带走向变化, 导管异常扩张以及走向的曲折。 There are four in breast ultrasound, that is, histopathological examination is recommended: (1) Most of the tumors were irregular in shape. (2) The boundary is fuzzy. (3) The edge is not smooth, but can be scallop shaped, angular and burr shaped. (4) The lesions and surrounding tissues showed edema and thickening of subcutaneous fat layer. (5) Sunken and uneven skin. (6) Perifocal edema; Structural distortion. (7) Cooper ligament trend changes, abnormal catheter expansion and tortuous trend.
5	其他 Others	(1) 乳腺 MRI 检查能够明确原发病灶, 从而提高乳腺癌的诊断, MRI 对术后或放疗后的纤维瘢痕与肿瘤复发的鉴别诊断有很大价值; (2) 伴随征象有乳头内陷, 皮肤增厚, 胸肌侵犯, 锁骨淋巴结异常肿大等可提高乳腺癌的诊断价值; (3) 诊断为 BI-RADS 4 类建议进行进一步检查: 细针抽吸细胞检查、空芯针穿刺活检、手术活检提供细胞学或组织病理学诊断。 (1) Breast MRI examination can identify the primary lesions and improve the diagnosis of breast cancer. MRI is of great value in differentiating fibroscars from postoperative radiotherapy or tumor recurrence. (2) Accompanying signs such as nipple inversion, thickening of the skin, invasion of pectoral muscle and abnormal enlargement of clavicular lymph nodes can improve the diagnostic value of breast cancer. (3) The diagnosis is BI-RADS category 4. Further examination is recommended: fine needle aspiration cell examination, empty core needle biopsy and surgical biopsy to provide cytological or histopathological diagnosis.

表 2 中医辨证
Table 2 TCM syndrome differentiation

序号 Number	证型 Syndrome type	症状 Symptom	舌脉 Lingual vein
1	肝郁气滞 Liver Depression and qi stagnation	(1) 乳房疼痛多胀痛; (2) 有肿块; (3) 与情志及月经周期密切相关; (4) 胸胁胀痛; (5) 烦躁易怒。 (1) Breast pain is mostly swelling pain. (2) There is a mass. (3) It is closely related to emotion and menstrual cycle. (4) Chest and flank swelling pain. (5) Irritability.	苔薄白或薄黄, 脉弦 Moss thin white or thin yellow, pulse string
2	痰瘀互结 Phlegm and blood stasis	(1) 乳房肿块; (2) 刺痛或胀痛; (3) 月经错后, 色暗有块; (4) 或伴痛经。 (1) Breast mass. (2) Tingling or swelling pain. (3) After menstruation error, dark color block. (4) Or with dysmenorrhea.	舌质淡暗或暗红有瘀斑, 舌下脉络青紫, 苔白或腻, 脉涩, 弦或滑 The tongue is light dark or dark red with ecchymosis, the vein under the tongue is blue and purple, the moss is white or greasy, and the pulse is astringent, stringy or slippery
3	冲任失调 ChongRen disorder	(1) 月经周期紊乱; (2) 月经量少色淡; (3) 腰膝酸软; (4) 神疲乏力; (5) 夜寐多梦; (6) 面色晦暗。 (1) Menstrual cycle disorder. (2) Small amount of menstruation and light color. (3) Weak waist and knees. (4) Mental fatigue. (5) Sleepy nights. (6) Dark complexion.	舌淡, 苔白, 脉濡细或沉细 The tongue is light, the moss is white, and the pulse is thin or heavy

表 3 现有动物模型分析
Table 3 Analysis of existing animal models

动物模型 Animal model	动物品种 Animal species	造模方法 Modeling method	模型特征 Model features	临床吻合度 Clinical coincidence
自发性乳腺癌小鼠模型 Mouse model of spontaneous breast cancer	TA2 小鼠、C3h 小鼠和 SNH 小鼠, 615 近交系小鼠 TA2 mice, C3h mice and SNH mice, 615 inbred mice	未经人工干预的特定品系的实验鼠类生长自发产生乳腺癌或者通过遗传育种技术培养的一类动物模型。 A type of animal model in which a particular strain of mice grows spontaneously to produce breast cancer without artificial intervention or through genetic breeding techniques.	优点: 减少人工干预, 使动物实验结果更准确, 更接近于临床乳腺癌的发病机制; 缺点: 自发性乳腺癌动物模型发病率低, 实验周期长, 影响因素复杂。 Advantages: reduce artificial intervention, make animal experimental results more accurate, more close to the clinical pathogenesis of breast cancer. Disadvantages: the animal model of spontaneous breast cancer has low incidence, long experimental period and complex influencing factors.	临床吻合度高, 自发性乳腺癌模型是体内实验中最适用于研究乳腺癌的病因、发生发展和防治, 尤其是预防性用药。症状符合乳腺癌西医诊断标准 1 中 (1) (2) (3); 2、3 中 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8); 4 中 (1) (2) (3) (4) (5) (6); 5 中 (1) (2); 符合中医诊断标准 1 中 (1) (2) (4) (5); 2 中 (1) (3); 3 中 (1) (2) (3) (5)。 The spontaneous breast cancer model is the most suitable <i>in vivo</i> experiment to study the etiology, occurrence, development and prevention of breast cancer, especially the preventive drug. The symptoms meet the western diagnostic criteria of breast cancer 1 in (1) (2) (3), 2 and 3 in (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8), 4 in (1) (2) (3) (4) (5) (6), 5 in (1) (2). Meet the TCM diagnostic criteria 1 in (1) (2) (4) (5), 2 in (1) (3), 3 in (1) (2) (3) (5).
诱发性动物模型 (多为化学制剂诱导) Induced animal models (mostly animal models of breast cancer induced by chemical agents)	大鼠、小鼠、兔和犬 Rats, mice, rabbits and dogs	常用二甲基苯甲酸烷 (DMBA) 和 N-甲基-N-亚硝基脲 (MNU) 两种致癌剂; 通过口服 (灌胃)、乳房局部皮肤涂抹、皮下注射、腹腔注射及静脉注射的方式给药。 Dimethylbenzoate (DMBA) and N-methyl-N-nitrosourea (MNU) are commonly used as carcinogens; The drug was administered orally (by gavage), local skin smear on the breast, subcutaneous injection, intraperitoneal injection and intravenous injection.	优点: 病因较为明确, 诱导方法多样, 相对应的乳腺癌动物模型多样化, 与人类发生的乳腺癌有较多相似之处 ^[29-30] ; 缺点: 肿瘤不易转移。 Advantages: the etiology is relatively clear, the induction methods are diverse, the corresponding animal models of breast cancer are diversified, and there are many similarities with human breast cancer ^[29-30] . Disadvantages: tumor is not easy to metastasize.	临床吻合度高, 常用于乳腺癌病因学和预防性研究。症状符合乳腺癌西医诊断标准 1 中 (1) (2) (3); 2、3 中 (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8); 4 中 (1) (2) (3) (4) (6); 5 中 (1) (2); 符合中医诊断标准 1 中 (1) (2) (4) (5); 2 中 (1) (3) (4); 3 中 (1) (2) (4)。 High clinical concordance, commonly used in etiological and preventive studies of breast cancer. The symptoms meet the Western diagnostic criteria for breast cancer 1 in (1) (2) (3), 2 and 3 in (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8), 4 in (1) (2) (3) (4) (6), 5 in (1) (2). Meet the Chinese diagnostic criteria 1 in (1) (2) (4) (5), 2 in (1) (3) (4), 3 in (1) (2) (4).

续表

动物模型 Animal model	动物品种 Animal species	造模方法 Modeling method	模型特征 Model features	临床吻合度 Clinical coincidence
移植动物模型 (异种移植) Transplantation animal model (xenotransplan- tation to establish animal model of breast cancer)	免疫缺陷 小鼠 (<i>SCID</i>)、 裸鼠 Immunodef- icient mice (<i>SCID</i>), nude mice	将人源乳腺癌细胞株或 发生恶性转化的细胞株 (多为 <i>MCF-7</i> 、 <i>MDA-MB-231</i> 和 <i>SK-BR-3</i>) 移植到 免疫缺陷小鼠(<i>SCID</i>)或 裸鼠体内。 Human breast cancer cell lines or malignant transformation cell lines (mostly <i>MCF-7</i> , <i>MDA-MB-231</i> and <i>SK-BR-3</i>) were transplanted into immunodeficient mice (<i>SCID</i>) or nude mice.	优点:移植成功率高,建模时间短, 成瘤部位具有较高特异性;缺点: 无法在体内观察肿瘤发生发展的 全过程,不适合乳腺癌的预防性研 究,并且模型只选用单一癌前突变 的病株,说服力较小。 Advantages: high success rate of transplantation, short modeling time, high specificity of tumor site; Disadvantages: The whole process of tumor occurrence and development cannot be observed in vivo, which is not suitable for preventive research of breast cancer. Moreover, the model only selects single precancerous mutation strain, which is less convincing.	临床吻合度低,用于病因学及发病前的 研究。症状符合乳腺癌西医诊断标准 1 中(1);2,3 中(1)(2)(3)(4)(8);4 中 (1)(2)(3)(5);符合中医诊断标准 1 中 (2)(5);2 中(1)(3);3 中(1)(4)。 Low clinical coincidence is used for etiology and premorbid studies. The symptoms met the Western diagnostic criteria for breast cancer 1 in (1), 2 and 3 in (1)(2)(3) (4)(8), 4 in (1)(2)(3)(5). Meet the Chinese diagnostic criteria 1 in (2)(5), 2 in (1)(3), 3 in (1)(4).
转基因动 物模型 Transgenic animal model	<i>MMTV-PyMT</i> 小 鼠、 <i>MMTV-Wnt-1</i> 小 鼠 和 <i>MMTV-ErbB2</i> 小 鼠 (单 一 转 基 因) <i>MMTV-neu</i> , <i>Ras</i> , <i>Myc</i> 小 鼠 (复合转基因) <i>MMTV-PyMT</i> mice, <i>mmtv- unt-1</i> mice and <i>mmtv-erbB2</i> mice (single transgenic mice) <i>MMTV neu</i> , <i>RAS</i> , <i>myc</i> mice, (compound transgenic mice)	指将目的外源基因 或特定 DNA 片段导 入动物受精卵中,稳 定遗传给下一 代 ^[31] 。 Refers to the target exogenous genes or specific DNA fragments into the fertilized eggs of animals, stable inheritance to the next generation ^[31] .	优点:可建立符合乳腺癌四个亚 型的模型,研究乳腺癌的发生发 展过程;缺点:要求技术高,可操 作性不强。 Advantages: the model can be established in line with the four subtypes of breast cancer to study the occurrence and development of breast cancer. Disadvantages: high technical requirements, operability is not strong.	临床吻合度高,常用于病因学及发病过程的研 究。症状符合乳腺癌西医诊断标准 1 中(1) (3);2,3 中(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8);4 中(1)(2)(3)(4)(5)(5)中(1)(2);符合乳腺 癌中医诊断标准 1 中(1)(2)(3)(5);2 中(1) (2)(3);3 中(1)(2)(4)。 The clinical anastomosis is high and is often used in the study of etiology and pathogenesis. The symptoms meet the Western diagnostic criteria of breast cancer 1 in (1)(3), 2 and 3 in (1)(2) (3)(4)(5)(6)(7)(8), 4 in (1)(2)(3)(4) (5), 5 in (1)(2). Meet the Chinese diagnostic criteria of breast cancer 1 in (1)(2)(3)(5), 2 in (1)(2)(3), 3 in (1)(2)(4).
基因工 程模型 Genetic engineering model	<i>BALB/c</i> 鼠 ^[32] 、 <i>IL-1β</i> 缺陷的 KO 小鼠 ^[33] 、 <i>C57BL/6-Brcal</i> 小鼠 ^[34] <i>BALB/c</i> mice, <i>IL-1β-KO</i> mice, <i>C57BL/ 6-BRCA1</i> mice	利用人工构建的特 异性切割 DNA 序列 的核酸酶对目标基 因进行敲除或插入。 Target genes are knocked out or inserted by artificially constructed nucleases that specifically cut DNA sequences.	优点:设计简单,特异性强,效率 高,研究基因功能最直接,最有 效的方式;缺点:步骤繁琐,活性 不能保证,同源重组效率低,可 操作性不强。 Advantages: simple design, strong specificity, high efficiency, the most direct and effective way to study gene function. Disadvantages: cumbersome steps, activity can not be guaranteed, homologous recombination efficiency is low, operability is not strong.	临床吻合度高,通过肿瘤细胞的研究发现乳腺 癌的增殖扩散机制。所构建的乳腺癌模型症状 符合西医诊断标准 1 中(1)(3);2,3 中(1)(2) (3)(4)(5)(6)(7)(8);4 中(1)(2)(3)(4) (5);5 中(1)(2);符合乳腺癌中医诊断标准 1 中(1)(2)(3)(5);2 中(1)(2)(3);3 中(1) (2)(4)。 The clinical anastomosis is high, and the proliferation and diffusion mechanism of breast cancer is found through the study of tumor cells. The symptoms of breast cancer model were consistent with western diagnostic criteria 1 in (1) (3), 2 and 3 in (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7) (8), 4 in (1)(2)(3)(4)(5), 5 in (1)(2). Meet the Chinese diagnostic criteria of breast cancer 1 in (1)(2)(3)(5), 2 in (1)(2)(3), 3 in (1)(2)(4).

3 模型动物的选择

乳腺癌模型可选动物有小鼠、大鼠、转基因鼠、免疫缺陷鼠、树鼩、犬、猪、兔和斑马鱼等。其中,大、小鼠因繁殖能力强、饲养条件低、实验操作简单等,应用最为广泛。转基因鼠,转基因鼠可明确基因功能,鉴别潜在的癌症基因和肿瘤标志物,利于发病机制的研究^[18],但成本较高,技术要求高。免疫缺陷鼠因能体现人类肿瘤微环境特征,常用于移植性乳腺癌动物模型的构建。树鼩也可作为乳腺癌的实验动物模型,但存在问题较多,比如其诱导出的肿瘤分型多为乳头状癌,并非人类常见的浸润性导管癌^[19-20];犬的基因组序列与人类具有高度相似性,在组织病理学、分子靶点、肿瘤遗传学特点以及给药后反应等方面与人类自发性乳腺肿瘤共同特征相似,但自发乳腺癌模型的犬类诱发较困难,大多是与犬相关的人源肿瘤异种移植模型^[21-22]。实验猪需要 5 个或更多致癌突变才能发生变化,现有的 BRCA1 缺陷乳腺癌的猪模型可用于实验研究,但 BRCA1 单倍基因缺失的小猪存活天数却不到 18 d,这很大程度限制了猪模型在乳腺癌方面的深入研究^[23]。相比猪,兔的乳腺癌模型造模周期短,肿瘤诱导成功率也较高,常应用于转移后的癌症模型,男性乳腺癌(MBC)较罕见,但其死亡率高于女性^[24],兔的腋淋巴结和肺的区域性淋巴组织转移和男性较类似,可用于构建兔 MBC 模型,但是,诱导的兔模型多为鳞癌而非临床乳腺癌的腺癌类型^[25]。斑马鱼与哺乳动物在生理和遗传方面有高度的相似性,可作为异种移植肿瘤模型,其透明的胚胎便于观察肿瘤的发生、侵袭以及转移等^[26],但是斑马鱼确存在无乳腺组织等缺点,其适用范围存在一定的局限性^[27]。通过查询文献,发现现有乳腺癌动物模型有自发性乳腺癌小鼠模型、诱发性动物模型(多为化学制剂诱导乳腺癌动物模型)、移植动物模型(异种移植建立乳腺癌动物模型)、基因工程模型(主要包括转基因,基因编辑,基因敲除),品种以大鼠、小鼠、转基因鼠、免疫缺陷鼠为主,总结造模方法,分析模型特征,进行临床吻合度的评价,具体见表 3。

4 讨论

乳腺癌模型主要有自发性、诱发性、移植性和基因工程(转基因、基因编辑)4 大类。自发性乳腺

癌模型减少了造模时人为因素对动物的影响,更接近于自然乳腺癌的发病特点,临床吻合度高,最适合研究乳腺癌的病因、发生发展以及预防性用药;但其人工培育时间长,实验周期长,实验成本较高。化学制剂诱导乳腺癌动物模型病因比较明确,诱导方法也多样化,与人类发生的乳腺癌有较多相似之处,适合研究临床上长期从事化工、长期接触电离辐射等职业乳腺癌患者的类型,是目前乳腺癌模型制备最常用的方法。移植动物模型移植癌细胞成功率高,应用广泛;但移植肿瘤缺少肿瘤形成的微环境和内环境,对乳腺癌发生发展过程的研究有一定限制性。基因工程有转基因和基因编辑两大类,转基因动物是指以实验方法导入外源基因,在染色体组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物,转基因模型的组织有较高特异性,是比较理想的动物模型;但其实验操作复杂、不易被影像学检测、成功率低、费用昂贵,临床应用并不广泛,并且转基因小鼠因外源基因注射后整合基因组的情况不是很明确,逐渐地被基因编辑鼠所替代;基因组编辑技术是一种通过同源重组手段定向改造(插入或敲除)基因组的技术,是进行基因组改造和探索基因功能的关键手段,近几年出现了多种新型基因组编辑工具,如锌指核酸酶、类转录激活因子效应物核酸酶以及 CRISPR/Cas9 技术,其中,CRISPR/Cas9 技术由于构建简单、成本低、效率高等特点,自发明以来迅速被研究人员广泛应用于各类科学研究中,成为了当今生命科学研究的热门技术。Moses 等^[35]和 Wang 等^[36]学者发现,利用 CRISPR/Cas9 技术可以有效激活 TNBC SUM159 细胞中 PTEN 这一与乳腺癌发生相关的基因,达到抑制肿瘤的目的,此技术还可通过干预 HER2 基因,抑制丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶信号通路,影响乳腺癌细胞的增殖。基因工程动物模型是在现代科学技术上开发的模型,可定向研究某基因在乳腺癌发生发展过程中的作用,但其忽视了后天情志因素对乳腺癌致病的影响,与临床乳腺癌患者的实际情况不符,研究发现,肿瘤细胞可被外部环境和心理应激反应等因素影响,改变和维持利于自身生存和发展的条件,促进肿瘤的生长和发展。因此,后期研究可考虑在基因编辑的基础上增加中医病因刺激,利用现代科技手段,从多角度出发,制备出与临床吻合度高的动物模型。中医证型分为肝郁气滞型、痰瘀互结型、冲任失调型 3 个证型,通过现有动物模型与临床

吻合度进行分析,发现自发型乳腺癌模型适用于肝郁气滞、冲任失调型;诱发性动物模型适用于肝郁气滞型、痰瘀互结型、冲任失调型;移植性动物模型适用于肝郁气滞型、痰瘀互结型;转基因动物模型适用于肝郁气滞型、痰瘀互结型、冲任失调型;基因编辑动物模型适用于肝郁气滞型、痰瘀互结型、冲任失调型。目前,成功的动物模型多以肿瘤成瘤率为主要标准,缺少行为学的指标,如对模型动物的痛阈值、活动状态等方面未作详细描述,与临床上乳腺癌患者的中、西医诊断标准存在一定差异。

乳腺癌死亡的主要原因是癌细胞的转移,但转移的潜在机制在目前来说仍是未知的,国内最常用的乳腺癌转移动物模型是通过皮下移植瘤构建的,由于其操作简便、周期短,常被用于药物药效筛选的研究中,但其忽视了肿瘤发生的微环境,在乳腺癌的疾病发展过程研究中受到一定限制。因此,建立肿瘤模型必须要考虑癌细胞的转移因素^[37]。制备小鼠乳腺移植瘤模型,可通过皮下注射、尾静脉注射、乳垫以及心内注射 4 种方法,最终发现乳垫注射制备的乳腺癌模型与临床病理较类似,比较适合药理学评价和疾病机制的研究^[38]。目前男性乳腺癌(MBC)是一种罕见的恶性肿瘤,其死亡率远远高于女性^[39]。最近几年,男性乳腺癌的发病率呈现出升高的趋势^[40],而在动物造模时多用雌性小鼠,雌雄有别,雄性的生理特点与患乳腺癌有哪些内在联系?值得我们进一步深入探讨。

两千多年前,《黄帝内经》中提出“上医治未病,中医治欲病,下医治已病”,预防远远大于治疗,近年来医院相继成立治未病中心,相应的也要多加开展预防乳腺癌发生的动物模型研究。《医学正传》云:“乳岩多生于忧郁积忿妇女”,乳房在经络循行中涉及到肝、胃、胆经,长期情志不畅,引起肝气郁结,气血运行紊乱,经络受阻,日久郁而化火,痰结血瘀,凝结于乳而致癌。现阶段,乳腺癌动物模型复制较少纳入中医因素,已有的造模方法以西药为主,缺少中医七情内伤等致病因素,而在祖国医学中情志因素是导致乳腺癌发生发展十分关键的因素,所以,可以在西医造模成功的前提下对实验动物施以恐吓法、夹尾法、噪声、四肢捆绑、强迫游泳以及冰水刺激等情志方面刺激,模拟临床上中医致病因素,提高“病”与“症”的结合。如罗畅等^[41]在化学致癌物的基础上用激怒应激法使大鼠形成气郁状态,大鼠乳腺癌的潜伏期缩短;邓卫芳等^[42]通

过对大鼠禁食禁水、快速旋转振荡、热应激以及彻夜光照等应激建立乳腺癌癌前病变“毒瘀互结”病证结合模型;张晓龙^[43]提出建立肝气郁结模型时,应遵从中医的致病原理,对动物“投其所恶”,从而使动物呈现出肝郁气结状态。乳腺癌动物模型制备方法多,且各具优缺点,改进现有模型或建立新的模型,增加中医“证”的因素,并将其作为未来模型构建的主要考虑因素,可使得乳腺癌研究更加贴合临床实际。

参考文献:

- [1] 郭兰伟,刘曙正,郑黎阳,等. 2013—2019 年河南省城市地区乳腺癌筛查结果分析[J]. 中国肿瘤, 2021, 30(4): 292-299.
- [2] 何玲,徐佳,罗弘杉,等. 体内外乳腺癌模型的研究进展[J]. 肿瘤, 2020, 40(10): 725-732.
- [3] 徐玲,刘荫华. 乳腺癌国际指南与中国临床实践[J]. 临床外科杂志, 2019, 27(3): 181-183.
- [4] 杨雯靖,念家云,杨国旺. 中西医结合治疗乳腺癌现状及展望[J]. 北京中医药, 2020, 39(10): 1009-1013.
- [5] 郭春花. 中西医结合治疗乳腺癌 30 例的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(15): 182-183.
- [6] 苗明三,马林纳,彭孟凡,等. 中医药物模型研究现状[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 141-146.
- [7] 王梓仪,黄淑敏,张倩,等. 基于中西医临床病症特点的甲状腺功能亢进症动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 192-198.
- [8] 赵文静,旺建伟,隋方宇,等. 乳腺增生与乳腺癌病因相关性研究[J]. 中医药学报, 2015, 43(3): 28-30.
- [9] 王连英,刘丽,陶旻枫,等. 饮食习惯与女性乳腺癌关系调查[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(32): 4630-4631.
- [10] 张雪,董晓平,管雅喆,等. 女性乳腺癌流行病学趋势及危险因素研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(1): 87-92.
- [11] Nielsen SM, White MG, Hong S, et al. The breast-thyroid cancer link: A systematic review and meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016, 25(2): 231-239.
- [12] 李丹娟,陈玮,周兴平,等. 绝经后乳腺癌与血清性激素及胰岛素样生长因子的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(23): 4456-4458.
- [13] 郑莹. 中国乳腺癌患者生活方式指南[J]. 中华外科杂志, 2017, 55(2): 81-85, 7.
- [14] 陈锐深. 现代中医肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社; 2003.
- [15] 朱明玥,吕志刚. 近代名老中医治疗乳腺癌经验浅析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3162-3166.
- [16] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2019 年版)[J]. 中国癌症杂志, 2019, 29(8): 609-680.
- [17] 中华中医药学会. 中医外科常见病诊疗指南[M]. 北京:中国中医药出版社; 2012.

- [18] 李日飞, 袁娜, 冶冬阳, 等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 113-118.
- [19] Elliot OS, Elliot MW, Lisco H. Breast cancer in a tree shrew (*Tupaia glis*) [J]. *Nature*, 1966, 211(5053): 1105.
- [20] Abdelmegeed SM, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8195-8205.
- [21] Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog [J]. *Nature*, 2005, 438(7069): 803-822.
- [22] 姜艺, 顾天豪, 夏添松. 特殊乳腺癌动物模型研究进展 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(2): 292-295, 309.
- [23] Adam SJ, Rund LA, Kuzmuk KN, et al. Genetic induction of tumorigenesis in swine [J]. *Oncogene*, 2007, 26(7): 1038-1045.
- [24] 王子行, 王年昌, 王翔宇. 男性乳腺癌临床研究进展及中国研究现状 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(7): 737-742.
- [25] Wang L, Yao Q, Wang J, et al. MRI and hybrid PET/CT for monitoring tumour metastasis in a metastatic breast cancer model in rabbit [J]. *Nucl Med Commun*, 2008, 29(2): 137-43.
- [26] Mercatali L, La Manna F, Groenewoud A, et al. Development of a Patient-Derived Xenograft (PDX) of breast cancer bone metastasis in a zebrafish model [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1375.
- [27] 陈锡强, 韩利文, 王希敏, 等. 人乳腺癌斑马鱼移植瘤模型建立 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 128-132.
- [28] 徐格格, 张宇, 刘维芳, 等. 乳腺癌预防模型研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(9): 2002-2006.
- [29] Zeweil MM, Sadek KM, Taha NM. et al. Graviola attenuates DMBA-induced breast cancer possibly through augmenting apoptosis and antioxidant pathway and downregulating estrogen receptors [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2019, 26: 15209-15217.
- [30] Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK, et al. The effect of zinc and melatonin supplementation on immunity parameters in breast cancer induced by DMBA in rats [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2018, 124(3): 247-252.
- [31] 王春统, 李建文. 中药防治乳腺癌的研究进展 [J]. 中国处方药, 2018, 16(2): 18-20.
- [32] Wang H, Tan Z, Hu H, et al. MicroRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1 [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 738.
- [33] Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, et al. Blocking IL-1 β reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(4): 1361-1369.
- [34] Wang H, Xiang D, Liu B, et al. Inadequate DNA damage repair promotes mammary transdifferentiation, leading to BRCA1 breast cancer [J]. *Cell*, 2019, 178(1): 135-151.
- [35] Moses C, Nugent F, Waryah CB, et al. Activating PTEN tumor suppressor expression with the CRISPR/Cas9 [J]. *System Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 14: 287-300.
- [36] Wang C, Zou J, Ma X, et al. Mechanisms and implications of ADAR-mediated RNA editing in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 411: 27-34.
- [37] Wang T, Meng J, Wang C, et al. Inhibition of murine breast cancer metastases by hydrophilic As₄S₄ nanoparticles is associated with decreased ROS and HIF-1 α downregulation [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 333.
- [38] 孙丽华, 崔海峰, 彭博, 等. 4 种方法制备小鼠乳腺癌移植瘤模型的比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(4): 449-455.
- [39] Fentiman IS, Fourquet A, Hortobagyi GN. Male breast cancer [J]. *Lancet*, 2006, 367(9510): 595-604.
- [40] Abdelwahab Yousef AJ. Male breast cancer: epidemiology and risk factors [J]. *Semin Oncol*, 2017, 44(4): 267-272.
- [41] 罗畅, 孙有智, 赵益, 等. 气郁状态对乳腺癌模型大鼠发病的实验研究 [J]. 江西中医药, 2021, 52(11): 27-30.
- [42] 邓卫芳, 裴晓华, 金华, 等. 乳腺癌癌前病变“毒瘀互结”模型大鼠生物表征变化及化瘀解毒法的调控 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1508-1512.
- [43] 张晓龙. 肝郁证动物模型实验研究评述 [J]. 中医学报, 2016, 31(3): 398-401.

[收稿日期]2021-11-01

刘梓昕,牛东芹,王东. 4T1 细胞成瘤的乳腺癌小鼠模型临床转化过程中的几个问题 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 145-152.

Liu ZX, Niu DQ, Wang D. Several problems in clinical transformation of 4T1 cell tumorigenic breast cancer mouse model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 145-152.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.020

4T1 细胞成瘤的乳腺癌小鼠模型临床转化过程中的几个问题

刘梓昕,牛东芹,王 东*

(江汉大学 医学院,武汉 430056)

【摘要】 动物实验是新化合物向临床转化的基础过程,也是评价其安全性和有效性的关键步骤,因此,合理的剂量设置、动物模型构建与适宜的给药方式是保证实验数据可靠的前提。但是在科学研究的实践中,研究者在选用动物实验条件等方面并没有形成统一标准,使药效评价出现偏差,不能有效促进新化合物向临床的转化。鉴于此种情况,笔者仅以顺铂参与的使用 4T1 细胞构建的异体移植瘤模型为例,来探讨铂类化合物治疗三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)的药效学研究中动物实验存在的问题与可能的解决方案,从而使动物实验更好的为临床转化服务。

【关键词】 顺铂;4T1 细胞;三阴性乳腺癌;动物模型;临床转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0145-08

Several problems in clinical transformation of 4T1 cell tumorigenic breast cancer mouse model

LIU Zixin, NIU Dongqin, WANG Dong*

(School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

【Abstract】 Animal experiments not only serve as a basic process of the clinical transformation of new compounds, but also a key step in evaluating the safety and effectiveness of new drugs. Therefore, reasonable dose setting, animal model construction, and appropriate administration method are prerequisites to ensure reliable experimental data. However, in practice, scientific researchers have not formed a unified standard for the selection of animal experimental conditions, leading to deviations in efficacy evaluations and failure to effectively promote the transformation of new compounds into clinical practice. In view of this situation, the author takes the allogeneic tumor model constructed by 4T1 cells with the participation of cisplatin as an example to explore problems and possible solutions in the pharmacodynamic study of platinum compounds for the treatment of triple negative breast cancer. It is our hope that such findings will facilitate animal experiments that better serve clinical transformation.

【Keywords】 cisplatin; 4T1 cell; TNBC; animal model; clinical transformation

世界卫生组织国际癌症研究机构在报告中指出,2020 年乳腺癌成为全球发病率最高的癌症^[1]。我国情况也不容乐观,2020 年乳腺癌新发病例约 42

万,死亡约 12 万。在众多乳腺癌亚型中,三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)的治疗最为困难^[2-4],因其不表达或低表达人表皮生长因子

【基金项目】 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2019233)。

【作者简介】 刘梓昕(1998—),女,硕士研究生,研究方向:铜配合物对结直肠癌的作用及机制。E-mail: 1223783753@qq.com

【通信作者】 王东(1982—),男,博士,讲师,研究方向:纳米药物治疗肿瘤的研究。E-mail: 363439365@qq.com

受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)、雌激素受体(estrogen receptor, ER)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)而难以从分子靶向等现代疗法中受益^[5-6],化疗成为当前较为有效的治疗方法^[7]。蒽环类与铂类药物是治疗 TNBC 的主要选择,其中铂类药物在临床实践中被推选为治疗 TNBC 的优选方案^[8-9]。但是这并非是最优方案,与其他亚型乳腺癌相比,其治疗手段有待拓展、疗效有待提高。

顺铂是铂类药物的典型代表,为第一个被 FDA 批准用于治疗恶性肿瘤的铂类药物^[10],然而,耐药性和严重的毒副作用使顺铂的应用大打折扣^[11-12]。近年来,通过结构修饰或者开发纳米药物^[13]等方法来克服铂类药物的不足成为临床前研究的热点。但无论使用哪种方法都要经过动物模型的验证,因此,正确选取动物模型和准确造模是药物获得临床应用的关键^[14-17]。但是,在具体实践中即使对于同一种动物模型,不同课题组的造模手段也会存在较大差异,这为客观评价实验效果带来诸多偏差。为了推进动物模型选择和构建的同质化,本文仅以顺铂参与的使用 4T1 细胞株构建的 TNBC 异体移植瘤模型为例,论述与分析实验研究中存在的问题并提出解决方案。

1 4T1 细胞株的应用中存在的问题及讨论

4T1 细胞株是由 Fred Miller 等学者分离得到的可移植型乳腺癌细胞^[18],因其恶性程度高易成瘤,自发向肺、肝、脑等部位转移成为广泛使用的移植瘤细胞。此外,4T1 细胞移植瘤模型的生长状态及

转移部位非常类似于人类晚期乳腺癌,成为评估晚期乳腺癌药物的良好模型。笔者统计了近年来 4T1 细胞在有顺铂参与的药效实验中的使用情况(表 1),并从细胞的种类、使用浓度、分散介质等方面进行总结。

由表可见,研究者在细胞的选用方面非常统一,绝大多数采用未经荧光素酶转染的细胞系进行相关研究,植瘤前细胞分散介质的选择上也比较一致,然而细胞数目与注射浓度在各研究中呈多样化。首先,在细胞类型选择方面两个亚类的 4T1 细胞被使用。就传统的 4T1 细胞而言,移植瘤的大小通过测量肿瘤的长径和短径尺寸计算而来,不同实验者对同一肿瘤的测量结果无法从客观上统一。而荧光素酶转染的细胞从一定程度上克服了上述缺点,可实现荧光定量测定,结果直观明了,具备更强的说服力,但其过渡依赖于贵重仪器,加之细胞构建方面费用较高未被广泛采用。笔者认为在采取适当措施的情况下,比如始终由同一测量者进行实验,传统 4T1 细胞即可满足实验精度要求。

其次,在细胞数目方面尚未有统一标准。从统计结果来看,细胞数目的使用范围在 $3 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 个/只小鼠之间,跨度可达 300 倍以上,这必然会影 响药效评价,不利于临床转化。因此,确立相对统一的细胞使用数目十分必要与急迫。但这并不是容易解决的事情,细胞数目的选择还涉及到移植瘤的类型(原位或皮下)、植瘤方式(直接注射或者手术植入)、实验目的(抑制转移或者抑制原发灶)等多方面的问题。作为一个折中方案, $(0.3 \sim 1.0) \times 10^6$ 个/只小鼠的细胞数目值得考虑。

表 1 4T1 细胞在异体移植瘤模型中的应用统计
Table 1 Application statistics of 4T1 cells in xenograft tumor model

细胞 Cells	分散介质 Disperse medium	细胞浓度 Cell concentration	细胞数 Cell number	参考文献 References
4T1	PBS	1×10^7	1×10^6	[19]
4T1	PBS	5×10^6	5×10^5	[19]
4T1	PBS	5×10^7	1×10^7	[20]
4T1	-	5×10^7	1×10^7	[21]
4T1	-	1×10^6	1×10^5	[22]
4T1	-	1×10^7	1×10^6	[23]
4T1	-	-	3×10^4	[24]
4T1	-	-	3×10^5	[25]
4T1-Luc	-	-	1×10^6	[26]
4T1	-	-	3×10^5	[27]
4T1	Normal saline	1.5×10^7	1.5×10^6	[28]
4T1	PBS	2×10^6	4×10^5	[29]

注:-:未给出相关数据。

Note. -, Relevant data are not displayed.

第三,在确认细胞数目的前提下,细胞浓度对植瘤效果也有显著影响。其影响往往是隐性的,比如细胞被悬浮在分散介质中有自发聚集沉淀的倾向,细胞浓度越大沉淀可能越快;细胞过密也会影响自身活性,最终导致移植瘤不均一。细胞浓度由细胞使用数目与注射体积确定,在一般的移植瘤模型中注射体积多为 100 μL ,因此细胞浓度在 10^7 级别及以下较为合理。为了保证模型均匀、药效评价客观,在实验过程中仍需注意某些问题:(1)最好将细胞按每只小鼠的注射量单独分装;(2)临注射前轻柔吹打使细胞充分分散;(3)在尽量短的时间内用完细胞,防止活性降低影响成瘤。

最后,细胞分散介质对成瘤有一定影响但不如其他因素重要,研究中使用 PBS 者较多,无血清的培养基与生理盐水^[28]也能满足植瘤需要。鉴于多篇参考文献没有明确给出所用介质,笔者不能做更详细的评价。

笔者课题组曾以 1×10^5 个/只小鼠的 4T1 细胞进行脂肪垫原位植瘤研究某种铜(Ⅱ)配合物的药效学实验,实验共使用 30 只 BALB/c 小鼠,通过手术切开小鼠第 4、5 对乳头附近的皮肤暴露脂肪垫注射 100 μL 4T1 细胞。在注射后的第 2 天观察并测

量肿瘤体积,30 只小鼠均成功植入肿瘤,平均体积为 $(90 \pm 9) \text{ mm}^3$,第 4 天观察平均体积为 $(260 \pm 71) \text{ mm}^3$,在第 16 天处死小鼠后检测肺转移结节,发现所有小鼠都有明显肺转移,说明植瘤成功且成功率 100%。在另外的实验中,笔者以尾静脉注射观察肺转移,在 4T1 细胞低至 3×10^4 个/只小鼠的数量时也能很好的发生肺转移,且成功率也为 100%。4T1 细胞易成瘤的特性为乳腺癌的药效学评价提供了极大的方便,然而,作为科研人员即使在使用 4T1 这种容易造模的细胞时也应该仔细选择成瘤的最佳条件以,从而避免实验偏差或资源浪费。

2 4T1 异体移植瘤模型中实验动物操作的问题及讨论

在乳腺癌异体移植瘤模型中,BALB/c 小鼠为近交系品种,具备遗传背景一致,对 4T1 细胞没有免疫排异,植瘤成功率高的特点^[30-31],成为使用最为普遍实验动物^[32-33]。笔者对表 1 所列文献的小鼠使用情况进行总结(表 2)。

由表可知,除 Zhou 等^[26]使用 BALB/c 裸鼠外,其余研究均使用 BALB/c 小鼠建立移植瘤模型,这是由所使用的细胞株决定的。Zhou 等^[26]使用荧光素酶转染的 4T1 细胞,裸鼠方便成像观测。也有研

表 2 4T1 异体移植瘤模型中实验动物操作状况
Table 2 Operation status of experimental animals in 4T1 xenograft tumor model

类别 Category	周龄 Week age	体重(g) Body weight	植瘤方式 Methods	植瘤位置 Sites	注射体积(μL) Injection volume	参考文献 References
BALB/c	4~6	18~22	直接注射 Direct injection	脂肪垫 Fat pad	100	[19]
BALB/c	/	18~20	直接注射 Direct injection	皮下 Subcutaneous tissue	200	[20]
BALB/c	/	18~22	直接注射 Direct injection	皮下 Subcutaneous tissue	200	[21]
BALB/c	8	22~25	手术接种 Surgical injection	脂肪垫 Fat pad	100	[22]
BALB/c	5	18~22	直接注射 Direct injection	皮下 Subcutaneous tissue	100	[23]
BALB/c	8~10	/	手术接种 Surgical injection	脂肪垫 Fat pad	/	[24]
BALB/c	4	20	直接注射 Direct injection	皮下 Subcutaneous tissue	/	[25]
BALB/c nude	4~5	16~20	皮下注射 Subcutaneous injection	脂肪垫 Fat pad	/	[26]
BALB/c	4	/	皮下注射 Subcutaneous injection	皮下 Subcutaneous tissue	/	[27]
BALB/c	4~5	18~20	皮下注射 Subcutaneous injection	脂肪垫 Fat pad	100	[28]
BALB/c	/	/	皮下注射 Subcutaneous injection	脂肪垫 Fat pad	200	[29]

注:-,未给出相关数据。
Note. -, Relevant data are not displayed.

究者将 4T1 细胞植入 BALB/c 裸鼠以对比普通 BALB/c 小鼠的成瘤状况,为合理选择实验动物提供理论依据^[34]。至于小鼠的年龄与体重则由植瘤方式和位置决定,多数研究采用 4~6 周龄、体重 18~22 g 的小鼠,然而这并非最佳选择。如果构建皮下瘤模型,4~6 周龄的小鼠足以满足要求;若是制作原位瘤采取脂肪垫注射的方法,此时小鼠的乳腺发育不够充分,接种时容易漏掉细胞。显然,7~8 周龄的小鼠更适合原位脂肪垫注射。鉴于 4T1 细胞为乳腺癌细胞系,脂肪垫注射比皮下植瘤在模拟病理状态上更加合理,由此而得出的药效学评价才能更客观和科学^[15]。即使在这样的前提下,笔者发现在造模过程中仍然存在较为严重的偏差,比如表 2 中多数研究者通过直接注射的方法造模。然而,这种方法不能准确的将细胞植入脂肪垫内,笔者曾以台盼蓝对小鼠直接脂肪垫注射然后剖开检测注射效果,结果表明部分台盼蓝泄漏至皮下组织。因此,笔者建议采取手术暴露脂肪垫的方式植瘤,这样可以保证均一和精确的模型构造。在减少小鼠创伤保证植瘤有效的前提下,Tavera-Mendoza 等^[35]提出了一种微创手术乳腺原位植瘤的方法,图 1 列

出了操作流程。在注射体积的问题上,等于或少于 100 μL 的注射量是正确的选择,否则将面临细胞泄漏的难题。

3 在 4T1 异体移植瘤中顺铂的使用问题及讨论

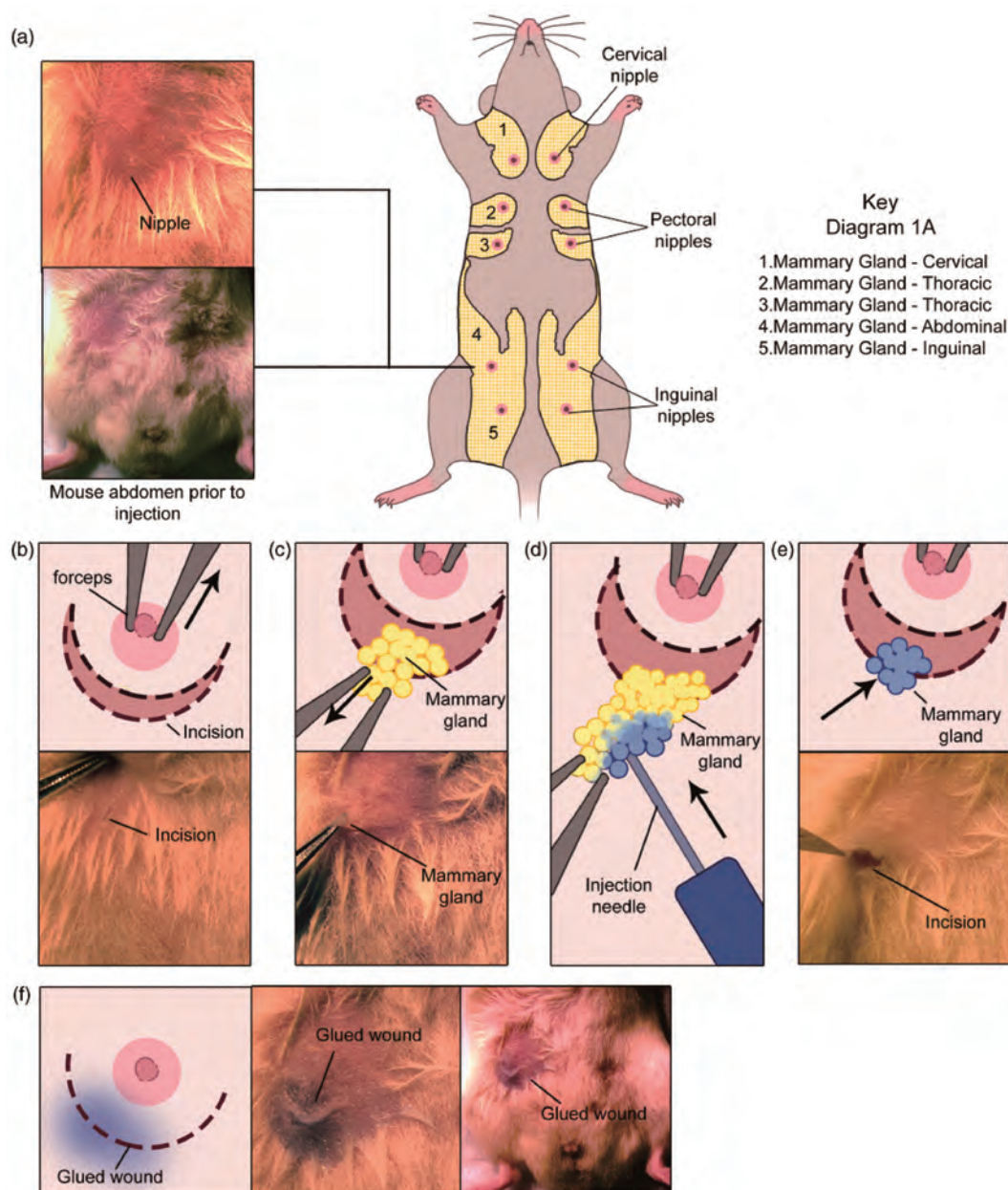
铂类药物以形成 DNA-铂交联物干扰 DNA 复制而抑制肿瘤增殖^[8],因其对携带乳腺癌易感基因 1/2 (Breast Cancer gene 1/2, BRCA 1/2) 突变的细胞敏感^[36],被推荐为晚期 TNBC 患者的救治药物,这些患者约 75% 携带 BRCA 1/2 突变。顺铂是最早开发的铂类药物,但其副作用大,应用受限,所以多种结构优化的铂类药物如卡铂^[37]、奥沙利铂^[38]等先后应用于临床。目前,仍有较多铂类化合物正处于临床前研究阶段^[10],如 Cheng 等^[39]报道了反式铂与 DNA 的作用,Muhammad 等^[40]研究了含有生物素的 Pt(IV) 配合物对乳腺癌细胞的抑制作用。纳米化的铂类药物也处于不断被开发的过程并取得突出进展,曾沛玉等^[41]制备了一种含顺铂前药的介孔硅纳米粒,任玉双等^[42]进行了顺铂前药接枝修饰硫代 DNA 及其自组装靶向纳米药物研究。顺铂在这些研究中通常当做阳性对照来使用,规范的给药

表 3 顺铂在 4T1 异体移植瘤中的应用现状
Table 3 Application status of cisplatin in 4T1 xenograft tumor

剂量(mg/kg) Dosages	频次 Frequencies	给药方式 Administrations	首剂标志 Initial dose marks	疗程 Course of treatments	研究目的 Purposes	参考文献 References
2	每天 1 次,连续 5 d 停 2 d Once a day, for 5 days, 2 days off	腹腔 Intraperitoneal injection	/	/	对照 Control	[17]
2	每天 1 次 Once a day	腹腔 Intraperitoneal injection	0.7~0.8 cm	15 d	联合用药 Drug combination	[17]
1	每天 1 次 Once a day	腹腔 Intraperitoneal injection	/	14 d	对照 Control	[18]
1	每 2 天 1 次 Once on alternate days	腹腔 Intraperitoneal injection	/	28 d	联合用药 Drug combination	[19]
2	每 2 天 1 次 Once on alternate days	尾静脉 Tail vein injection	80~120 mm ³	/	对照 Control	[20]
3	每周 3 次 3 times per week	腹腔 Intraperitoneal injection	植瘤后 5 d 5 d after modeling	9 次 9 times	对照 Control	[21]
3	每 2 天 1 次 Once on alternate days	尾静脉 Tail vein injection	50 mm ³	5 次 5 times	对照 Control	[22]
1 ^{Pt}	每周 1 次 Once a week	尾静脉 Tail vein injection	50 mm ³	3 次 3 times	对照 Control	[23]
1 ^{Pt} 、3 ^{Pt}	每 2 天 1 次 Once on alternate days	尾静脉 Tail vein injection	植瘤后 9 d 9 d after modeling	3 次 3 times	对照 Control	[24]
/	每 5 天 1 次 Once every five days	尾静脉 Tail vein injection	60~100 mm ³	5 次 5 times	联合用药及对照 Drug combination and control	[25]
3	每 3 天 1 次 Once every three days	腹腔 Intraperitoneal Injection	植瘤后 5 d 5 d after modeling	21 d	联合用药及对照 Drug combination and control	[26]

注: -, 未给出相关数据; Pt: 以铂元素计量。

Note. -, Relevant data are not displayed. Pt, Measured by platinum element.



注:a:腹部乳腺和乳头;b:在第四个乳头下方作小于3 mm(外部和尾部)的切口;c:暴露脂肪垫;d:细胞注射体积小于120 μL ;e:脂肪垫复位;f:用组织粘合剂密封切口。图片来自于参考文献^[35]。

图1 小鼠乳腺原位注射乳腺癌细胞的微创手术

Note. a, Abdominal mammary gland and nipple. B, Small incision 3 mm (external and caudal) below the fourth nipple. c, Exposed fat pad. d, Exposed fat pad can be injected with a volume 120 μL . e, Fat pad is allowed to go back to its position. f, Incision is sealed using tissue adhesive. The pictures are from reference^[35].

Figure 1 Less invasive procedure for orthotopic injection of breast cancer cells into the mouse mammary gland

方式及剂量是衡量新药药效的基础,然而在实践存在较多问题,笔者对顺铂在4T1细胞移植瘤中的应用现状进行总结,表3展示了研究中存在的某些问题。

顺铂是当前临床使用的抗肿瘤药物,在乳腺癌治疗中常规剂量为75 mg/m^2 ^[43],在联合治疗中的用量常为25 mg/m^2 ^[44],另有文献报道大剂量顺铂疗

法,其用量为150 mg/m^2 ^[45]。按照等效剂量换算^[46],小鼠对应的等效剂量分别为25、8.3、50 mg/kg 。然而,在实际动物实验中小鼠的使用剂量通常为1、2、3 mg/kg ,这可能是由小鼠对顺铂的耐受剂量决定的。所以,在选择剂量的同时有必要评价药物对实验动物的毒副作用,在相对安全的剂量下从事药效学研究。在药物剂量表达方式上也存在影

响药效评估的问题,大多数研究以化合物本身为度量标准,个别文献则以铂元素的质量为度量标准,Zhou 等^[26]和 Sengupta 等^[27]以 1 或 3 mg/kg 铂元素的剂量给药,忽略了配体对药物活性的影响,显然不符合临床用药标准,但是从实验目的上来看这又是合理的,因为二者均采用纳米药物提高顺铂的活性,顺铂被偶联在聚合物上。在动物实验中另外一项不规范在于给药频次,从表 3 的数据可知,即使相同的给药剂量,不同研究者的给药频次相差较大,这些偏差都应该以符合临床用药的标准予以校正。第三,各研究者在初次给药标志与疗程的问题上也远没有达到统一,笔者认为初次给药时间设定在移植瘤模型造模成功之后较为合理,即肿瘤大小在 50~100 mm³ 之间即可实施给药,总给药时间则由药物长期毒性实验确定。在给药方式上,多数研究者使用腹腔注射,少数报道采用尾静脉注射,这是实验目的决定的,例如纳米药物需尾静脉注射,作为对照的顺铂也应采取尾静脉注射的方式,在这一点上研究者们意见一致。在 4T1 细胞移植瘤药效学研究的实验中,顺铂的使用存在诸如剂量、频次、初次给药时间与疗程不统一的问题,作为研究者应充分考虑动物实验与临床应用有效转化的问题。

4 结语

常见的乳腺癌荷瘤小鼠模型包括皮下瘤、原位瘤和肺转移等模型。由于模型的多样性和实验目的的不同,所以在构建的模型方面并没有一个统一的参数,笔者仅就文献报道和个人经验做一个大体的总结,以供读者探讨。在构建皮下瘤模型中,(3~5)×10⁵ 细胞/小鼠较为合理,植瘤 5~9 d 可达到给药标准,且早期不会出现肿瘤迅速生长的现象,便于延长治疗周期及提高疗效;原位瘤则无需注射过多细胞,以(0.5~1)×10⁵ 细胞/小鼠较好;尾静脉注射肺转移模型注射细胞相对较多,以(0.5~1)×10⁶ 细胞/小鼠较为理想,若细胞注射过多则会导致肺组织损伤严重,小鼠过早死亡。就注射体积而言,应特别注意将脂肪垫造模的注射体积控制在 100 μL 以内,以防止泄露;其他的植瘤方式可将体积控制在 200 μL 以下。细胞浓度则由细胞数目与注射体积决定。在分散介质的选择上相对宽松,3 种造模方式均可选择 PBS 和无血清培养基,但是在注射肿瘤细胞时要注意不能一次在注射器中吸取过多

细胞,可保持在 5 只注射量以下,并及时更换注射器,防止注射期间细胞聚沉吸附到注射器壁上,从而避免植瘤不均一。在小鼠选择上,以 4~6 周龄的小鼠居多,但脂肪垫注射最好选择 7~8 周龄的小鼠,此时小鼠性成熟脂肪垫发育完善方便注射。如何选择实验条件最终由实验目的确定,考察物质的肿瘤抑制作用可选用皮下或脂肪垫植瘤,而肺转移则可选用尾静脉造模。

临床前药物评价是衔接临床应用与基础研究的桥梁^[47],而动物实验扮演着不可或缺的角色,准确而客观的动物实验包括细胞选择、动物选择、造模与给药观测等多个流程,每一步都可能对药效学研究产生重大影响。笔者以顺铂参与的使用 4T1 细胞株构建的 TNBC 异体移植瘤模型为例总结了研究中存在的问题,这些问题涉及到实验的每一个流程,从而使得动物实验中取得良好抗肿瘤效果的化合物在临床试验中屡屡失效,由此可见一斑。截至 2020 年 7 月,小鼠肿瘤生物学数据库显示至少有 19242 篇研究论文与小鼠肿瘤模型有关,仅由美国国立卫生研究院资助的正在进行的人源性异种移植瘤相关研究的总预算达到 1.16 亿美元之多。临床试验的失败沉重打击了药物开发的积极性,Yuan 等^[48]针对肿瘤模型探讨了临床试验失败的原因,在 184 个人源性异种移植瘤模型中有 170 个感染了小鼠病毒,这很可能导致该模型的评价药效的可靠性。除了实验过程存在偏差外,有些文献报道缺失相关信息,甚至是细胞数目、给药剂量、初次给药标志以及疗程等重要信息,这给不同研究者的交流带来很多不确定性,进而影响实验评价的客观性。全世界每年开展大量癌症移植瘤模型相关动物实验,错误设定实验条件将浪费大量人力、财力,而且给临床转化制造不可估量的困难,这就要求科研工作者慎重选择动物模型,以权威的参考文献为指导,严格执行实验流程,客观评价实验结果。新化合物进入临床研究的前提是动物实验,而动物实验的关键则在于统一而准确的操作规范,只有纠正实验偏差动物实验的数据才能更好的为临床转化服务。

参考文献:

- [1] Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020. [J/OL] <https://www.iarc.fr/fr/news-events/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>.

- [2] Bonaccorsi PM, La Bb Ozzetta M, Barattucci A, et al. Synthesis of curcumin cerivatives and analysis of their antitumor effects in triple negative breast cancer (TNBC) cell lines [J]. Pharmaceuticals, 2019, 12(4) : 1-19.
- [3] Sun X, Wang M, Wang M, et al. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer [J]. Front Oncol, 2020, 10(428) : 1-15.
- [4] Kim B, Hebert JM, Liu D, et al. A lipid targeting, pH-responsive nanoemulsion encapsulating a DNA intercalating agent and HDAC inhibitor reduces TNBC tumor burden [J]. Adv Therap, 2021, 4(3) : 2000211-2000211.
- [5] Mccann KE, Hurvitz SA. Innovations in targeted therapies for triple negative breast cancer [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2021, 33(1) : 34-47.
- [6] Khosravi-Shahi P, Cabezón-Gutiérrez L, Aparicio Salcedo MI. State of art of advanced triple negative breast cancer [J]. Breast J, 2019, 25(5) : 967-970.
- [7] Yu M, Gai C, Li Z, et al. Targeted exosome-encapsulated erastin induced ferroptosis in triple negative breast cancer cells [J]. Cancer Sci, 2019, 110(10) : 3173-3182.
- [8] 中国医师协会肿瘤医师分会乳腺癌学组. 铂类药物晚期乳腺癌应用专家共识(2020 版) [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(2) : 167-175.
- [9] Li CY, Zhang S, Zhang XB, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of triple-negative breast cancer (TNBC) in Chinese patients: a retrospective study [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(6) : 3779-3784.
- [10] 朱阳, 程璐洁, 刘扬中. 铂类抗肿瘤配合物的研究进展 [J]. 药学进展, 2020, 44(4) : 243-255.
- [11] 王悦璇, 刘秀均. 顺铂的作用靶点及耐药机制的研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(3) : 316-319.
- [12] 任俊, 柯重伟. 奥沙利铂抗肿瘤及其耐药机制的研究进展 [J]. 上海医药, 2021, 42(4) : 3-8.
- [13] Di H, Wu H, Gao Y, et al. Doxorubicin- and cisplatin-loaded nanostructured lipid carriers for breast cancer combination chemotherapy [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2016, 42(12) : 2038-2043.
- [14] Zeng L, Li W, Chen CS. Breast cancer animal models and applications [J]. Zool Res, 2020, 41(5) : 477-494.
- [15] 孙丽华, 崔海峰, 彭博, 等. 4 种方法制备小鼠乳腺癌移植瘤模型的比较研究 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(4) : 449-455.
- [16] 李日飞, 袁娜, 冶冬阳, 等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2) : 113-118.
- [17] 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.
- [18] Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model [J]. Curr Portoc Immunol, 2001, 5(39) : 1-16.
- [19] 赵帅. 九香虫血淋巴对小鼠乳腺癌移植瘤生长抑制作用 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [20] 孙浩, 沈卫星, 徐长亮, 等. 消癌解毒方联合顺铂通过调控组蛋白去甲基化酶抑制 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13) : 78-84.
- [21] 张荣嘎. 芪术蚤复方对乳腺癌模型小鼠的抑制作用及机制研究 [J]. 四川中医, 2018, 36(12) : 53-56.
- [22] Mohamad NE, Abu N, Yeap SK, et al. Bromelain enhances the anti-tumor effects of cisplatin on 4t1 breast tumor model *in vivo* [J]. Integr Cancer Ther, 2019, 18(1) : 1-7.
- [23] Li Y, Yue K, Li L, et al. A Pt (IV)-based mononitro-naphthalimide conjugate with minimized side-effects targeting DNA damage response via a dual-DNA-damage approach to overcome cisplatin resistance [J]. Bioorg Chem, 2020, 101(2020) : 1-9.
- [24] Milena J, Aleksandar A, Jelena P, et al. The organic ester O,O'-diethyl-(S, S)-ethylenediamine- N, N'-Di-2-(3-cyclohexyl) propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis [J]. Oncotarget, 2018, 9(46) : 28195-28212.
- [25] Paraskar A, Soni S, Basu S, et al. Rationally engineered polymeric cisplatin nanoparticles for improved antitumor efficacy [J]. Nanotechnology, 2011, 22(26) : 265101-265109.
- [26] Zhou FY, Feng B, Yu HJ, et al. Cisplatin prodrug-conjugated gold nanocluster for fluorescence imaging and targeted therapy of the breast cancer [J]. Theranostics, 2016, 6(5) : 679-687.
- [27] Sengupta P, Basu S, Soni S, et al. Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(28) : 11294-11299.
- [28] Yu T, Li YS, Gu XY, et al. Development of a hyaluronic acid-based nanocarrier incorporating doxorubicin and cisplatin as a pH-sensitive and cd44-targeted anti-breast cancer drug delivery system [J]. Front Pharmacol, 2020, 11(1) : 1370-1381.
- [29] Lee JO, Kang MJ, Byun WS, et al. Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51 [J]. Breast Cancer Res, 2019, 21(1) : 115-133.
- [30] 徐林, 蒋正刚, 李宝华, 等. 小鼠乳腺癌实验动物模型中 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的变化及意义 [J]. 复旦学报(医学版), 2006, 33(6) : 736-740.
- [31] Xia TS, Wang J, Yin H, et al. Human tissue-specific microenvironment: an essential requirement for mouse models of breast cancer [J]. Oncol Rep, 2010, 24(1) : 203-211.
- [32] 范萍, 王水, 查小明, 等. BALB/C 小鼠乳腺癌移植模型的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(7) : 873-873.
- [33] 严丽, 李莉, 郝芳, 等. BALB/c 小鼠乳腺癌 4 T1 细胞株移植模型的建立 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(6) : 794-796.
- [34] 王硕. 小鼠乳腺癌细胞 4T1 对不同品系小鼠乳腺癌模型的影响 [J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(4) : 11-13.
- [35] Tavera-Mendoza LE, Brown M. A less invasive method for orthotopic injection of breast cancer cells into the mouse mammary gland [J]. Lab Anim, 2017, 51(1) : 85-88.
- [36] 徐向勇, 王清, 许平, 等. 晚期非小细胞肺癌组织 ERCC1 和 BRCA1 表达与铂类化疗敏感性临床研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(3) : 178-182.

- [37] 陈艳宇, 傅思莹, 赵文珍, 等. 紫杉醇联合卡铂方案在三阴性乳腺癌新辅助化疗中的治疗效果及对患者病理变化的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(7): 1477-1480.
- [38] 徐亮, 梁文昌, 阚随随, 等. 紫杉醇、奥沙利铂与吉西他滨注射液联合治疗晚期三阴乳腺癌的效果及安全性 [J]. 现代医药卫生, 2020, 36(11): 1701-1703.
- [39] Cheng LJ, Li C, Yuan SM, et al. Reaction of Histone H1 with trans-Platinum complexes and the effect on DNA platination [J]. Inorg Chem, 2019, 58(9): 6485-6494.
- [40] Muhammad N, Sadia N, Zhu CC, et al. Biotin-tagged platinum (iv) complexes as targeted cytostatic agents against breast cancer cells [J]. Chem Commun, 2017, 53(72): 9971-9974.
- [41] 曾沛玉, 陈敏, 王丹, 等. 一种磁性介孔硅纳米复合物的制备及其对顺铂前药的释放研究 [J]. 广东化工, 2021, 48(5): 22-23.
- [42] 任玉双, 郭园园, 刘学怡, 等. 顺铂前药接枝修饰硫代 DNA 及其自组装靶向纳米药物研究 [J]. 高等学校化学学报, 2020, 41(8): 1721-1730.
- [43] 孙晓萌, 高社干. 三阴性乳腺癌的临床治疗现状及新进展 [J]. 实用癌症杂志, 2020, 35(6): 1037-1039.
- [44] 刘艳杰. 吉西他滨联合铂类药物治疗转移性三阴乳腺癌的分析 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(18): 160-161.
- [45] 张宪生, 陆家齐. 大剂量顺铂治疗晚期乳腺癌(附 36 例报告) [J]. 河北医药, 2002, 24(12): 941-942.
- [46] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [47] 肖洋洋, 卿吉琳, 李宝铤, 等. 鼻咽癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 108-112.
- [48] Yuan ZH, Fan XJ, Zhu JJ, et al. Presence of complete murine viral genome sequences in patient-derived xenografts [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2031-2043.
- [收稿日期] 2021-06-01

综述: 肠道微生物与肠病关系的研究进展

肠道微生物是指多达 $10^{13} \sim 10^{14}$ 种微生物聚集在营养丰富的肠道中, 共同构成了具有复杂且相对平衡的富有多样化特征的微生物群。肠道微生物参与物质代谢和宿主生理活动, 抑制病原微生物的生长。肠上皮细胞和黏液层与共生微生物共同构成肠上皮黏膜屏障维持肠道微生态稳态。肠道微生态失衡对多种系统疾病有重要影响, 尤其是炎症肠道疾病。根据世界卫生组织分类, 炎症肠病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 包括溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)。来自中国中央民族大学的研究者们总结归纳了目前肠道微生物在肠上皮黏膜屏障中的变化以及不同治疗方法干预后肠道微生物的变化。

文中提到, 肠黏液层分为内外黏液层, 外黏液层直接与微生物群接触且作为共生菌能量来源, 其中阿克曼菌和脆弱拟杆菌释放黏蛋白水解酶溶解黏液层为定植提供能量。在炎症肠病模型中, 存在大量具有促炎作用的微生物群, 且 UC 模型中拟杆菌门、厚壁菌门、变形杆菌的丰度更高; 在 CD 模型中厚壁菌门显著低于健康组, 尤其是健康组动态变化的微生物群与 CD 缺少的微生物群高度重叠。

本文也介绍了不同治疗方法对炎症肠病模型肠道微生物的影响, 包括益生菌、益生元、粪便微生物移植、饮食疗法、中草药干预, 这些方式均在不同程度上调节肠道微生物并改善肠病模型症状。

综上所述, 本文全面概括了目前肠道微生态与肠上皮黏膜屏障的关系以及不同肠道模型中肠道菌群的变化, 指出了研究者通过选择合适的动物模型来研究不同的菌群功能, 有利于进一步探索肠道微生态的功能机制以及开展相应的临床研究。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 8(4): 297-310; <https://doi.org/10.1002/ame2.12262>)。