

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991年3月创刊

第32卷 第10期 2022年10月30日出版

目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

- Minor CCI 与经典 CCI 大鼠模型成模特点的比较研究 王厚融, 刘志凤, 于天源, 张英琦, 焦谊, 刘迪, 徐亚静, 官乾(1)
- 冠心病气虚血瘀证模型大鼠与临床患者舌象特征的比对研究 王瑾茜, 雷诗卉, 李薇, 杨蕙, 杨益, 刘侃, 蔺晓源, 胡国恒, 郭纯, 陈亚(8)
- 黄连解毒汤活性成分保护帕金森症脑神经细胞损伤机制的研究 张忠文, 陈国华, 黄露麒, 梅俊华, 邵卫, 梅瑰(17)
- 中心静脉导管监测肺动脉压的兔急性肺栓塞模型的制备 龙嘉琪, 赵文丽, 彭发全, 吴蓓, 李跃兵(24)
- 妊娠期糖尿病致子代先天性肾脏及尿路畸形大鼠模型的建立 欧阳辰昕, 王城, 朱芮樟, 廖君左, 敬鹏, 何文飞, 赵丹(32)
- 基于 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬探讨右美托咪定抗肠缺血再灌注的作用 周瑜, 贾静, 王璐, 周敏(40)
- 过表达 miR-202-5p 通过抑制 PCSK9 减轻阿尔茨海默病神经损伤 徐沛沛, 赵树华, 王江波, 姚先丽, 白金(49)
- TNFAIP1 对 RhoA 的泛素化调节在黑色素瘤进展中的作用 肖潇, 冯浩, 唐桦, 李可, 李蓝(59)
- 高糖高脂食物对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠生长和代谢指标改变影响的研究 戴丽军, 黄月玲, 叶炳飞, 邝桂星, 侯敏, 安胜利(69)
- 开心散对双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{1-42}$ 致 AD 大鼠的治疗作用及机制研究 裴海鸾, 马贝贝, 王婷婷, 李瑞吉, 刘金辉, 于尚玥, 娄天宇, 左泽平, 田时秋, 李依林, 王晨晓, 田颖颖, 田骄, 赵新月, 刘闯, 郭玉东, 王晶, 王志斌(78)
- 苦参碱对妊娠高血压大鼠内皮损伤和 JAK2/STAT3/SOSC1 信号通路的影响 李玲, 武建利, 李珊, 曲广第(91)
- 对香豆酸诱导弥漫性大 B 细胞淋巴瘤细胞内质网应激介导的凋亡 侯著法, 赵冰洁, 车虹, 易文静, 刘培佳, 刘松山(98)

研究进展

- 过敏性紫癜动物实验模型的对比分析及建模思路探讨 段凤阳, 徐闪闪, 丁樱, 郭婷, 宋纯东, 张霞(104)

不同化学物质建立肝损伤动物模型的作用机制	王雨欣,王倩,田颖(109)
肿瘤心脏病学动物模型的研究进展	张钰,孟婷婷,田鹏,郑燕,苏国海(115)
基于中西医临床病证特点的病毒性肺炎动物模型分析	狄培琰,张双丽,康乐,苗明三(123)
肠道菌群在抑郁症发生中的调控机制研究进展	陈文璐,闫晓如,高继萍,宋国华(130)
抗新型冠状病毒的药物治疗	柴华锋,王珂,宋淑亮(136)
银屑病病证结合模型的研究进展	赵宁,底婷婷,齐聪,王亚卓,李萍(142)
胃食管反流病分子生物学的研究进展	董茗茗,柴秀坤,刘学臣,何云,李艾迪,蒋树林(148)
简讯	(122,129)
广告信息	(内插1,封二,封三)

主 管

中国科学技术协会

主 办

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

主 编

秦 川

编辑部主任

董令赢

编 辑

《中国比较医学杂志》编辑部

出 版

《中国比较医学杂志》编辑部

发 行

《中国比较医学杂志》编辑部

100021,北京市朝阳区潘家园南里5号

电话:010-67779337

传真:010-67770690

E-mail: bjb@cnilas.org

<http://zgswdw.cnjournals.com/zgbjxzz/ch/index.aspx>

本期执行主编 靳洪涛

本期责任编辑 董令赢 孙 烨

广告发布登记

京朝工商广登字 20170142 号

照 排

同方知网(北京)技术有限公司

印 刷

北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号

82-917

定 价

每期 50.00 元,全年 600 元

中国标准连续出版物号

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

2022 年版权归中国实验动物学会所有

本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 32, Number 10, October 30, 2022

CONTENTS

- Comparison of the characteristics of Minor and classic CCI models
WANG Hourong, LIU Zhifeng, YU Tianyuan, ZHANG Yingqi, JIAO Yi, LIU Di, XU Yajing, GUAN Qian(1)
- Comparative study of tongue features between model rats and clinical patients with Qi deficiency and blood stasis
syndrome of coronary heart disease *WANG Jinxi,
LEI Shihui, LI Wei, YANG Hui, YANG Yi, LIU Kan, LIN Xiaoyuan, HU Guoheng, GUO Chun, CHEN Ya*(8)
- Mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in protecting against brain nerve cell damage in
Parkinson's disease
..... *ZHANG Zhongwen, CHEN Guohua, HUANG Luqi, MEI Junhua, SHAO Wei, MEI Gui*(17)
- A rabbit model of acute pulmonary embolism using central venous catheter to monitor pulmonary artery pressure
..... *LONG Jiaqi, ZHAO Wenli, PENG Faquan, WU Bei, LI Yuebing*(24)
- Establishment of a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract in offspring due to
gestational diabetes mellitus
OUYANG Chenxin, WANG Cheng, ZHU Ruizhang, LIAO Junzuo, JING Peng, HE Wenfei, ZHAO Dan(32)
- Effect of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury based on miR-146a/Sirt6 signaling-mediated
autophagy *ZHOU Yu, JIA Jing, WANG Lu, ZHOU Min*(40)
- Overexpression of miR-202-5p attenuates nerve damage in Alzheimer's disease by inhibiting PCSK9
..... *XU Peipei, ZHAO Shuhua, WANG Jiangbo, YAO Xianli, BAI Jin*(49)
- Regulation of RhoA ubiquitination by TNFAIP1 in melanoma progression
..... *XIAO Xiao, FENG Hao, TANG Hua, LI Ke, LI Lan*(59)
- Effects of a high sucrose-high fat diet on alterations of growth and metabolism in BALB/c and C57BL/6J mice
..... *DAI Lijun, HUANG Yueling, YE Bingfei, KUANG Guixing, HOU Min, AN Shengli*(69)
- Therapeutic effect and mechanisms of Kaixin San in AD rats induced by bilateral A β ₁₋₄₂ injection into the CA1 area
of the hippocampus *PEI Hailuan, MA Beibei, WANG Tingting,
LI Ruiji, LIU Jinhui, YU Shangyue, LOU Tianyu, ZUO Zeping, TIAN Shiqiu, LI Yilin, WANG Chenxiao,
TIAN Yingying, TIAN Jiao, ZHAO Xinyue, LIU Chuang, GUO Yudong, WANG Jing, WANG Zhibin*(78)
- Effect of matrine on endothelial injury and the JAK2/STAT3/SOSC1 signaling pathway in rats with pregnancy-

induced hypertension	<i>LI Ling, WU Jianli, LI Shan, QU Guangdi</i> (91)
Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma cells by <i>p</i> -coumaric acid	<i>HOU Zhufa, ZHAO Bingjie, CHE Hong, YI Wenjing, LIU Peijia, LIU Songshan</i> (98)
Comparative analysis of animal models of Henoch-Schönlein purpura and discussion on modeling ideas	<i>DUAN Fengyang, XU Shanshan, DING Ying, GUO Ting, SONG Chundong, ZHANG Xia</i> (104)
Mechanisms of chemicals in establishing animal models of liver injury	<i>WANG Yuxin, WANG Qian, TIAN Ying</i> (109)
Research progress on animal models of cardio-oncology	<i>ZHANG Yu, MENG Tingting, TIAN Peng, ZHENG Yan, SU Guohai</i> (115)
Analysis of animal models of viral pneumonia based on clinical syndrome characteristics of traditional Chinese and Western medicines	<i>DI Peiyan, ZHANG Shuangli, KANG Le, MIAO Mingsan</i> (123)
Research progress on the regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence of depression	<i>CHEN Wenlu, YAN Xiaoru, GAO Jiping, SONG Guohua</i> (130)
Drug treatment against coronavirus disease 2019	<i>CHAI Huafeng, WANG Ke, SONG Shuliang</i> (136)
Research progress of disease-syndrome combination models of psoriasis	<i>ZHAO Ning, DI Tingting, QI Cong, WANG Yazhuo, LI Ping</i> (142)
Research progress on molecular biology of gastroesophageal reflux disease	<i>DONG Mingming, CHAI Xiukun, LIU Xuechen, HE Yun, LI Aidi, JIANG Shulin</i> (148)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Institute of Laboratory Animal Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

DONG Lingying(董令赢)

Editing

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

Publishing

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

Distributor

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: 010 - 67779337
Fax: 010 - 67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgzydw.cnjournals.com/zghjyzz/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2022 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

王厚融,刘志凤,于天源,等. Minor CCI 与经典 CCI 大鼠模型成模特点的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 1-7.

Wang HR, Liu ZF, Yu TY, et al. Comparison of the characteristics of Minor and classic CCI models [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.001

Minor CCI 与经典 CCI 大鼠模型成模特点的比较研究

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

(1.北京中医药大学针灸推拿学院,北京 102488;2.北京中医药大学东方医院,北京 100078)

【摘要】 目的 比较研究轻度和经典方法诱导的大鼠慢性压迫性神经损伤(chronic constriction injury, CCI)模型的成模特点,为基础研究实验设计提供参考。方法 将 18 只 8 周龄 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、Minor CCI 组和经典 CCI 组,每组 6 只。于坐骨神经结扎铬制可吸收外科缝线,Minor CCI 组结扎 1 根,经典 CCI 组结扎 4 根。3 组动物于造模前和造模后 7、14、21、28 d 检测机械缩足反射阈值、热缩足反射潜伏期和累积疼痛评分变化情况。透射电镜观察坐骨神经超微结构变化情况。结果 Minor CCI 组和经典 CCI 组机械缩足反射阈值和热缩足反射潜伏期痛敏趋势一致,Minor CCI 组累积疼痛评分较经典 CCI 组低。Minor CCI 组造模后出现痛敏,造模后 14 d 进入平台期,约 10 d,各症状逐渐恢复;经典 CCI 组造模后出现痛敏,造模后 14 d 进入平台期,造模后 28 d 痛敏依然稳定甚至出现进一步敏化。Minor CCI 组和经典 CCI 组坐骨神经超微结构变化一致,均表现为髓鞘结构破坏、崩脱,形成髓鞘球、自噬体等。结论 Minor CCI 模型更稳定,痛敏症状可维持至造模后 28 d,基本无自残现象,适用于短期实验设计,可最大程度减小实验动物的痛苦。经典 CCI 模型痛敏症状持久,造模后 28 d 依然处于平台期,但自残现象明显,适用于中、长期实验设计。

【关键词】 周围神经病理性疼痛;慢性压迫性神经损伤模型;SD 大鼠;疼痛

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0001-07

Comparison of the characteristics of Minor and classic CCI models

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

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China.

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

【Abstract】 **Objective** To compare the characteristics of the chronic constriction injury model in SD rats induced by Minor and classic CCI, and to provide a reference for the experimental design of basic research. **Methods** Eighteen 8-week-old SD male rats were randomly divided into sham, Minor CCI, and classic CCI groups with six animals in each group. The 1-ligature was ligated on the sciatic nerve in the Minor CCI group, and the 4-ligature was ligated in the classic CCI group. Animals in the three groups were examined before modeling and at 7, 14, 21 and 28 days after modeling for the mechanical withdrawal threshold, thermal withdrawal latency, and accumulated pain score. Ultrastructural changes of the sciatic nerve were observed by electron microscopy. **Results** Nociceptive symptoms of Minor and classic CCI groups were the same in terms of the mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency. Additionally, the accumulated pain score of the Minor CCI group was lower than that of the classic CCI group. Ultrastructural changes of the sciatic nerve in Minor and classic CCI groups were the same. Both of them showed destruction and disintegration of the myelin structure,

【基金项目】国家自然科学基金项目(82074573,81674094)。

【作者简介】王厚融(1995—),男,在读博士研究生,研究方向:推拿治疗周围神经损伤的机理。E-mail:wanghourong@bucm.edu.cn

【通信作者】于天源(1965—),男,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:推拿治疗周围神经损伤的机理。

E-mail:yutianyuan@sina.com

formation of myelin spheres and autophagosomes. **Conclusions** The Minor CCI model is more stable and nociceptive symptoms can be maintained for up to 28 days after modeling, basically without self-mutilation, which is suitable for short-term experimental design and minimizes the pain of experimental animals. The classic CCI model has long-lasting nociceptive symptoms that remain in the plateau period for 28 days after modeling, but the self-mutilation phenomenon is obvious, which is suitable for medium and long-term experimental designs.

[Keywords] peripherally induced neuropathic pain; chronic constriction injury; SD rat; pain

神经病理性疼痛是由躯体感觉系统损伤或疾病导致的疼痛^[1],基于损伤或疾病位置可分为中枢型和周围型(peripherally-induced neuropathic pain, pNP),其中 pNP 临床较常见^[2]。pNP 诊断困难、症状严重、机制复杂,现尚无有效的治疗手段,临床上 pNP 完全缓解率低于 20%^[3-4]。由于临床研究获取信息有限,pNP 的机制探索、药物研发基本全部来自于啮齿动物实验,其中慢性压迫性神经损伤模型(chronic constriction injury, CCI)是科学研究中最常应用的动物模型^[5]。但经典 CCI 模型程度重,不适合干预早期、短期干预等科学实验设计,所以演变出聚乙烯软管束缚代替结扎^[6]、硅胶环挤压代替结扎^[7]、普通非吸收缝合丝线代替铬制可吸收肠线^[8]、分级 CCI 模型(graded CCI model)^[9-10]等不同的造模方式。本实验对 SD 大鼠常用的 Minor CCI 模型和经典 CCI 模型疼痛表现和成模特点进行研究,以期对不同实验设计模型选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 18 只,体重(200±10)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],饲养于北京中医药大学实验动物中心[SYXK(京)2020-0033],3 只/笼,饲料由北京中医药大学实验动物中心提供。本实验经过北京中医药大学 IACUC 的批准(BUCM-4-2020111103-4087),并在操作过程中按照 3R 原则给予实验动物充分的人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

动物用异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,规格 R510-22-10);戊巴比妥钠(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,CAS:57-33-0);电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,规格 G1102)。可吸收性外科缝线(山东博达医疗用品股份有限公司,规格铬制 4-0);电子天平(美国双杰(兄弟)集团有限公司,TCA 6 kg/1 g);电子机械测痛仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号 BIO-EVF5);热

刺痛仪(成都泰盟软件有限公司,型号 PL-200);超薄切片机(徕卡显微系统(上海)贸易有限公司,型号 EM UC-7)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物适应性饲养

SD 大鼠购入后置于室温(25±1)℃,相对湿度(50±5)%的饲养室内,适应性饲养 7 d 后开始正式实验,期间每日实验人员与大鼠进行接触(daily handling),使大鼠熟悉实验人员,减少行为学应激反应,最大程度确保痛觉测试的真实性。

1.3.2 痛觉均一筛选

适应性饲养结束后,所有动物进行痛觉均一筛选,痛觉敏感或迟钝的动物从本实验排除。痛觉均一筛选使用机械缩足反射阈值和热缩足反射潜伏期两种方法进行。

机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT):评估大鼠机械痛敏变化。使用电子机械测痛仪,设置单位为 g。将刺激探头对准后足底面测试部位,开始刺激。逐渐、稳定增加刺激量,待大鼠出现缩足、舔足时,记录数值。

热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL):评估大鼠温度痛敏变化。使用热刺痛仪,设置参数为 intensity 50%,cut off 30 s。将红外热源对准后足底面测试部位,开始刺激。待动物出现缩足、舔足时,记录数值。如因大鼠走动或梳理动作使记录停止,间隔 10 min 再测量一次。

1.3.3 实验动物分组

痛觉均一筛选合格的 18 只 SD 大鼠,采用随机数组表法随机分为 3 组,假手术组、Minor CCI 组、经典 CCI 组,每组各 6 只。

1.3.4 模型建立

模型制备方法同前人所述进行^[5,9],包含一些细节变化,如下所述:SD 大鼠通过气体麻醉,待角膜反射消失;俯卧位固定在鼠板,右侧髂股交界区剃毛,碘伏消毒;右侧下肢垫一棉垫,沿右侧坐骨神经干体表投影切 2 cm 切口,钝性分离,暴露坐骨神经干;用铬制 4-0 可吸收性外科缝线松散的在坐骨神

经干上结扎,每个线结间距 1 mm;结扎力度以不影响神经外膜血流、结扎线结可在神经干上滑动、不出现腿部肌肉颤动为宜;其中假手术组仅暴露神经不结扎,Minor CCI 组在坐骨神经上结扎 1 根线结,经典 CCI 组在坐骨神经上结扎 4 根线结;逐层缝合;待大鼠苏醒后,转移至饲养室。

1.3.5 行为学检测

环境参数设置:行为学评价实验室室温及相对湿度与饲养室保持一致。

测试时间点:造模前、造模后 7、14、21、28 d。

全部测试均由同一实验人员进行以保证测试结果的准确、均一、可比。在正式测试开始前 20 min 将动物放入测试环境内。待探索行为和梳理毛发行为停止,大鼠的状态静止、放松时进行测试。每足测试 3 次,固定相同位置(图 1)进行测试,每次测试间隔 10 min,取 3 次测试的平均值。

MWT:操作见 1.3.2。

TWL:操作见 1.3.2。

累积疼痛评分(accumulated pain score, APS):评估大鼠痛觉强度。将大鼠放在测试笼内,底部为玻璃板,轻敲笼子边缘使大鼠移动,观察右后足的情况。评分标准为右后足不着地,计 2 分;右后足着地不负重,计 1 分;右后足着地且负重,计 0 分。后足部皮肤由粉变白判断为负重。

1.3.6 透射电镜观察

最后一次行为学测试结束后,大鼠称重,用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处死;为避免血液污染样本,先腹主动脉取血 5~7 mL;再取坐骨神经干段,电镜液中-4℃保存;经过固定、脱水、渗透、包埋、聚合后,横切 60 nm 厚片,染色后透射电镜观察。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 统计软件对所得数据进行分析处理。所有数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为表现变化

各组大鼠行为表现变化见表 1。假手术组大鼠精神正常;被毛顺滑、有光泽;右后足形态正常;趾甲正常(图 2A);站立、行走、休息时姿势正常;大便正常;手术切口恢复良好。

Minor CCI 组大鼠精神正常;被毛较顺滑、偶见

脱毛;右后足外翻、微屈,形成隆起;偶见啃噬趾甲现象(图 2B);站立时可见右足跟骨部负重,能维持站立姿势;行走时可见跛行;休息时右侧足不负重,偶见左侧卧位或右足尖着地;大便正常;手术切口恢复良好。

经典 CCI 组大鼠可见烦躁不安;被毛凌乱、无光泽,可见脱毛;右后足外翻、蜷缩,似“握拳”状;可见自残现象,啃噬趾甲、趾骨,局部出现红、肿、热、流血等(图 2C);不喜站立姿势,站立时右足抬起、常见跌倒,难以维持站立姿势;行走时跛行;休息时呈腰部以下左侧卧位、右足抬起不着地;可见大便色黑质干;手术切口恢复良好。

2.2 大鼠痛觉变化

2.2.1 MWT 结果

如图 3 所示,造模前,3 组大鼠结果无统计学差异($P > 0.05$),可以进行后续比较。造模后 7 d,与假手术组相比,Minor CCI 组和经典 CCI 组 MWT 显著下降($P < 0.05$),说明模型制备成功,Minor CCI 组与经典 CCI 组相比无统计学差异($P > 0.05$)。造模后 14、21、28 d,与假手术组相比,Minor CCI 组和经典 CCI 组 MWT 均显著下降($P < 0.05$),Minor CCI 组与经典 CCI 组相比均无统计学差异($P > 0.05$),说明模型制备时,Minor CCI 与经典 CCI 造模方法所形成的机械痛觉敏化趋势、程度基本一致,无差别。

2.2.2 TWL 结果

如图 4 所示,造模前,3 组大鼠结果无统计学差异($P > 0.05$),可以进行后续比较。造模后 7 d,与假手术组相比,Minor CCI 组和经典 CCI 组 TWL 显著下降($P < 0.05$),说明模型制备成功,Minor CCI 组与经典 CCI 组相比无统计学差异($P > 0.05$)。造模后 14、21 d,与假手术组相比,Minor CCI 组和经典 CCI 组 TWL 均显著下降($P < 0.05$),Minor CCI 组与经典 CCI 组相比均无统计学差异($P > 0.05$)。造模后 28 d,

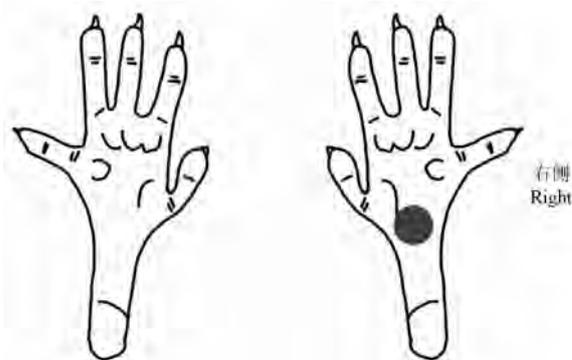


图 1 行为学测定点

Figure 1 Behavioral measurement site

表 1 各组大鼠行为表现变化
Table 1 Behavioral performance changes in each group

组别 Groups	精神状态 Mental state	被毛 Hair	右后足形态 Right hind paw posture	右后足趾甲 Right hind paw claw	站立姿势 Standing posture	行走姿势 Walking posture	休息姿势 Resting posture	大便 Feces
假手术组 Sham group	正常 Normal	顺滑、有光泽 Smooth, glossy	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal	正常 Normal
Minor CCI 组 Minor CCI group	正常 Normal	偶见脱毛 Occasional hair loss	外翻、微屈 Everted, slightly bent	偶见啃噬 Occasional gnawed	能维持 Able to sustain	跛行 Limping	不负重 No weight bearing	正常 Normal
经典 CCI 组 Classic CCI group	烦躁不安 Dysphoria	脱毛、凌乱、无光泽 Hair loss, messy, lusterless	外翻、蜷缩 Everted, clenched	啃噬 Gnawed	常跌倒 Frequently fall down	跛行 Limping	左侧卧位 Left lateral position	色黑质干 Dark, dry

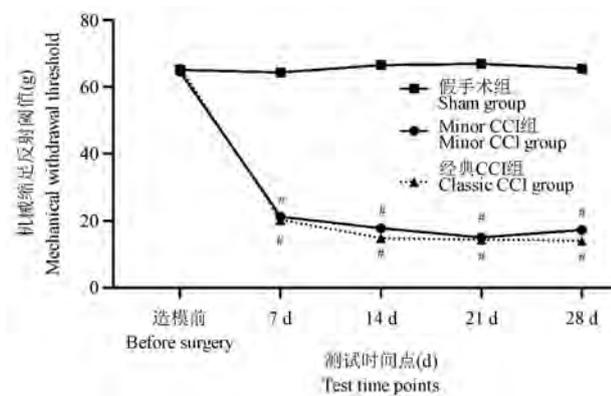


注: A: 假手术组; B: Minor CCI 组; C: 经典 CCI 组。

图 2 右后足自残现象

Note. A, Sham group. B, Minor CCI group. C, Classic CCI group.

Figure 2 Self-mutilation phenomenon of the right hind paw



注: 与假手术组比, # $P < 0.05$ 。

图 3 机械缩足反射阈值结果

Note. Compared with the sham group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Results of mechanical withdrawal threshold

与假手术组相比, Minor CCI 组和经典 CCI 组 TWL 显著下降 ($P < 0.05$), Minor CCI 组与经典 CCI 组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明模型制备时, Minor CCI 与经典 CCI 造模方法所形成的温度痛觉敏化程度基本一致, 无差别, 但在造模后 28 d 时, Minor CCI 组呈现恢复趋势。

2.2.3 APS 结果

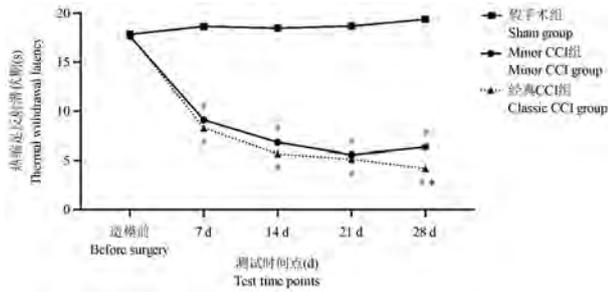
如图 5 所示, 造模前, 3 组大鼠结果无统计学差

异 ($P > 0.05$), 可以进行后续比较。造模后 7 d, 与假手术组相比, Minor CCI 组和经典 CCI 组 APS 显著下降 ($P < 0.05$), 说明模型制备成功, Minor CCI 组与经典 CCI 组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。造模后 14 d, 与假手术组相比, Minor CCI 组和经典 CCI 组 APS 显著下降 ($P < 0.05$), Minor CCI 组与经典 CCI 组相比无统计学差异 ($P > 0.05$)。造模后 21、28 d, 与假手术组相比, Minor CCI 组和经典 CCI 组 APS 均显著下降 ($P < 0.05$), Minor CCI 组与经典 CCI 组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明模型制备时, Minor CCI 与经典 CCI 造模方法所形成的疼痛强度趋势基本一致, 但 Minor CCI 组较经典 CCI 组轻。

2.3 坐骨神经超微结构变化

Minor CCI 组 (图 6A、图 6B): 可见坐骨神经干大部分髓鞘结构已经破坏, 出现中度、重度崩脱, 扭曲形成漩涡状或髓鞘球。板层间隙疏松, 轴索萎缩, 线粒体呈空泡样变, 可见少量自噬体形成。

经典 CCI 组 (图 6C、图 6D): 可见坐骨神经干大部分髓鞘结构已经破坏, 出现重度崩脱, 扭曲形成漩涡状或髓鞘球, 甚至空泡样变性。板层间隙疏松, 偶见絮状细胞骨架, 轴索萎缩, 线粒体呈空泡样变, 可见自噬体形成。

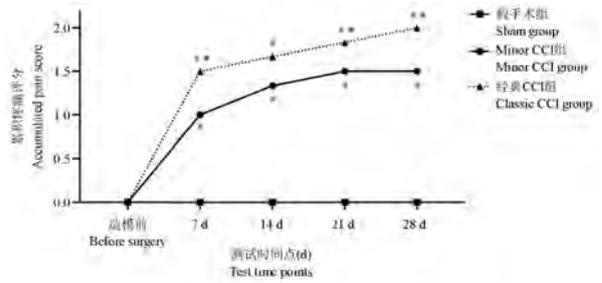


注:与假手术组比, # $P < 0.05$;与 Minor CCI 组比, * $P < 0.05$ 。

图 4 热缩足反射潜伏期结果

Note. Compared with the sham group, # $P < 0.05$. Compared with the Minor CCI group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Results of thermal withdrawal latency

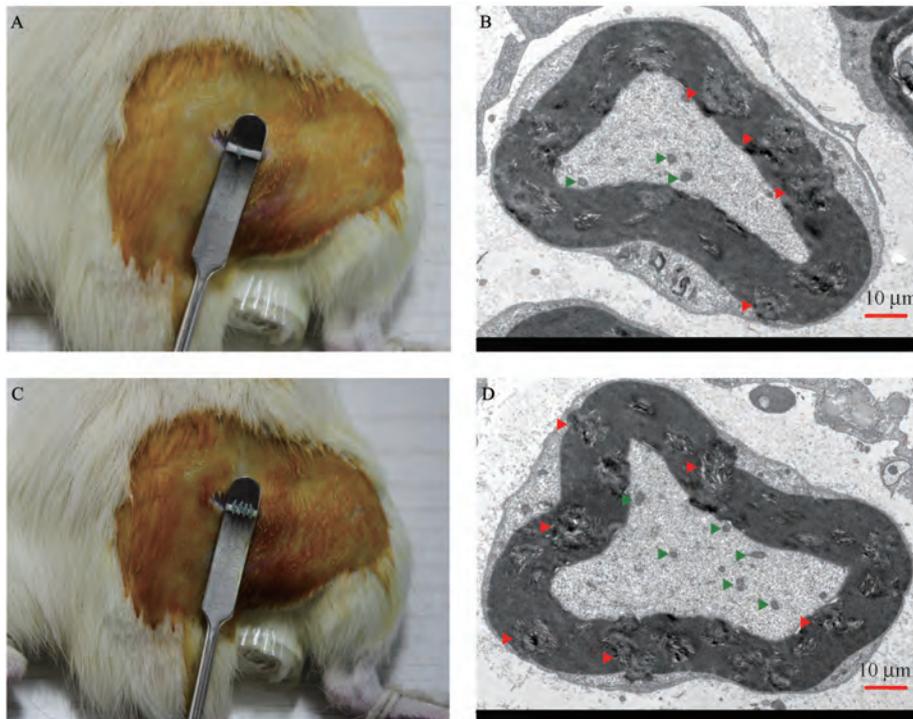


注:与假手术组比, # $P < 0.05$;与 Minor CCI 组比, * $P < 0.05$ 。

图 5 累积疼痛评分结果

Note. Compared with the sham group, # $P < 0.05$. Compared with the Minor CCI group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Results of accumulated pain score



注:A、B; Minor CCI 组; C、D; 经典 CCI 组。绿色箭头:自噬体;红色箭头:髓鞘球。

图 6 坐骨神经慢性结扎与超微结构变化

Note. A/B, Minor CCI group. C/D, Classic CCI group. Green arrows, Autophagosome. Red arrows, Myelin sphere.

Figure 6 Sciatic nerve chronic gut ligation and ultrastructural changes

3 讨论

不同干预手段、不同实验周期应选择相应的 pNP 动物模型。近年来,国内外对于 pNP 动物模型的研究有诸多报道,研究发现不同部位、方法、力度等因素对成模程度、症状持续时间、行为指标等有较大影响^[11]。因此,对于科研人员而言,针对不同干预手段、不同实验周期选择适合的 pNP 动物模

型,了解不同模型的成模特点、症状表现规律对于减少实验偏倚、得出真实结论有重要的辅助意义。

本研究比较了 Minor CCI 模型和经典 CCI 模型的成模特点及疼痛表现情况,除坐骨神经结扎烙制可吸收外科缝线数量不同外,其余研究因素均相同。经典 CCI 模型是 1988 年,由 Bennett 等^[5]创立发明的一种神经病理性痛和炎性痛的复合疼痛模型,此造模方法能在不损伤神经完整性的情况下较

好的模拟临床 pNP, 得到科研人员的认可, 广泛用于 pNP 的科学研究中。经典 CCI 模型制备原理是使用 4 根规格 4-0 铬制可吸收性外科缝线在坐骨神经干进行结扎, 每根线结间隔 1 mm。结扎对神经干产生持续性、慢性的压迫和束缚, 同时线结逐渐膨胀, 导致坐骨神经内水肿, 水肿的神经进一步与线结产生对抗, 逐渐形成神经自我缩窄, 结扎远端神经纤维出现脱髓鞘改变, 部分变性、坏死, 形成神经病理性疼痛。

不同材质线材诱导的疼痛特点不同。由于铬制可吸收外科缝线线材硬度高、产量减小^[12]等因素出现造模时结扎力度不均等不良影响, 在科研实践中逐渐演变出多种线材替代方案。部分研究人员使用普通医用丝线代替铬制线, 但普通丝线无膨胀系数, 不能对神经干产生持续、过度压迫, 虽能诱发与铬制线相同的机械痛敏症状, 但温度痛敏程度较铬制可吸收外科缝线低^[8, 13]。聚乙烯软管在造模过程中使用方便, 造模耗时最短, 最初为诱导标准化 pNP 而发明^[6]。但聚乙烯软管在实际应用过程中容易脱落或半脱落导致造模失败, 同时聚乙烯软管对神经的压迫力度不如普通丝线和铬制线, 痛敏程度较低。铬制可吸收外科缝线制作过程使用铬溶液, 提高了线材的强度、韧性和抗机体吸收能力^[14]。同时, 铬溶液含有多种外源性致炎因子, 分解时需要蛋白水解酶参与, 可在局部形成类似“敏化-炎症鸡尾酒”微环境^[15], 形成炎症病理性疼痛。与坐骨神经缩窄出现的神经病理性疼痛结合, 诱导机械痛敏、温度痛敏等与临床 pNP 相似的自发性疼痛、痛敏、超敏、触诱发痛等症状。因此, 经典 CCI 模型的这类造模方法结合铬制可吸收线材是最佳模拟临床 pNP 的动物模型制备方法。

Minor CCI 模型和经典 CCI 模型是最常用的分级 CCI 模型。分级 CCI 模型是从经典 CCI 模型发展而来^[9], 保留了经典 CCI 模型的优点, 将结扎数量分为 1 根、2 根、3 根等, 其中 Minor CCI 模型结扎 1 根、经典 CCI 模型结扎 4 根。经典 CCI 模型造模方法对于结扎力度的描述包括“松散地绑”“神经直径几乎没有收缩”“不阻碍神经外膜血管系统循环”“有时在周围肌肉中产生一个小而短暂的抽搐”等。结合文献报道和前期实验经验, 结扎紧、力度中会引起周围肌肉的颤动和抽搐, 进而导致成模后期动物自残行为增加, 造模侧肢体麻木, 影响行为学指

标的准确性^[13]。因此, 本研究要求在结扎过程中不出现任何周围肌肉颤动。

本研究中虽已经保证结扎操作过程中未出现结扎过度、周围肌肉颤动情况, 但经典 CCI 组动物仍表现出部分肢体自残现象, 包括啃噬足趾, 轻者啃噬趾甲, 重者部分足趾或半足缺失, 导致造模侧后足皮肤色红、局部肿胀、皮温升高、活动后出血。MWT 用于评估大鼠的机械触觉痛敏变化情况, TWL 用于评估大鼠温度觉痛敏变化情况, APS 用于评估大鼠的痛觉强度、站立姿势、休息姿势等变化情况。刘永达等^[16]按照经典 CCI 造模方法建立模型, 通过 MWT 测试发现造模后出现痛敏表现, 造模后 3 d 模型建立成功, 至造模后 7 d 痛敏程度持续增加。本研究中造模后经典 CCI 组出现痛觉过敏表现, 测试过程极难进入安静、放松状态, 测试稳定性较差。MWT、TWL 均降低, APS 评分升高。造模后 7 d 成模, 造模后 14 d 进入痛敏症状平台期, 稳定至造模后 28 d, 其中 TWL 和 APS 表现出敏化程度加重趋势。坐骨神经超电镜观察到髓鞘结构破坏, 髓鞘球形形成, 轴索萎缩、线粒体空泡样变, 自噬体形成等。均与文献报道一致^[16-18]。Minor CCI 组仅少数动物出现啃噬指甲现象, 但无一例流血, 造模侧足皮肤颜色正常。行为学测试方面, Minor CCI 组造模后出现痛觉过敏表现, 动物能较快进入静止、放松的状态。MWT、TWL 均降低, 与经典 CCI 组痛敏症状程度相当, Minor CCI 组 APS 评分升高, 但程度较经典 CCI 组低。造模后 7 d 成模, 造模后 14 d 进入平台期, 约 10 d 后, 各项痛敏症状开始逐渐恢复。Minor CCI 组与经典 CCI 组的坐骨神经超微结构表现无差异, 观察到相似改变。

综上所述, Minor CCI 造模方法能更好的模拟临床 pNP 症状表现, 同时成模更稳定, 实验动物受到的痛苦更少, 适合短期的科研实验设计。经典 CCI 造模方法成模程度较重, 行为学结果稳定性偏低, 适合中长期的科研实验设计。本研究为 pNP 等慢性疼痛疾病科学实验设计中, 选择符合实验动物福利规范的、稳定且可重复的、与临床相似且可调整的动物模型提供参考依据。

参考文献:

- [1] 周围神经病理性疼痛诊疗中国专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(5): 321-328.

- [2] Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations [J]. Arch Neurol, 2003, 60 (11): 1524-1534.
- [3] 唐谦, 王林, 朱焱. 2016 年贵阳市社区中老年人慢性疼痛流行病学特征分析 [J]. 现代预防医学, 2017, 44(18): 3330-3333.
- [4] Hales CM, Martin CB, Gu Q. Prevalence of prescription pain medication use among adults; United States, 2015-2018 [J]. NCHS Data Brief, 2020, 369: 1-8.
- [5] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1988, 33(1): 87-107.
- [6] Mosconi T, Kruger L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations [J]. Pain, 1996, 64(1): 37-57.
- [7] O'Brien JP, Mackinnon SE, MacLean AR, et al. A model of chronic nerve compression in the rat [J]. Ann Plast Surg, 1987, 19(5): 430-435.
- [8] 王维, 冯泽国, 马涛, 等. 铬制肠线与丝线制作 CCI 模型效果比较 [J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(5): 480-482.
- [9] Grace PM, Hutchinson MR, Manavis J, et al. A novel animal model of graded neuropathic pain: utility to investigate mechanisms of population heterogeneity [J]. J Neurosci Methods, 2010, 193(1): 47-53.
- [10] Staikopoulos V, Qiao S, Liu J, et al. Graded peripheral nerve injury creates mechanical allodynia proportional to the progression and severity of microglial activity within the spinal cord of male mice [J]. Brain Behav Immun, 2021, 91: 568-577.
- [11] Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2011, 25(1): 1-28.
- [12] 《针灸技术操作规范 第 10 部分: 穴位埋线》项目组. 中华人民共和国国家标准(GB/T 21709.10-2008) 针灸技术操作规范 第 10 部分: 穴位埋线 [J]. 中国针灸, 2009, 29(5): 405-406.
- [13] 马骋, 李翠贤, 易建良, 等. 不同材料制备大鼠神经病理性疼痛 CCI 模型的比较 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 555-557.
- [14] 刘慧敏. 聚丙交酯新型埋线材料与羊肠线的临床应用比较 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(38): 7185-7192.
- [15] Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, et al. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1993, 54(1): 57-69.
- [16] 刘永达, 韩光, 王志彬, 等. 两种不同神经病理性疼痛模型中自噬的改变 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(7): 489-493.
- [17] 刘巍, 陈佳, 唐晓婷, 等. 大鼠坐骨神经损伤后早期脊髓背角小胶质细胞活化状态和活化类型的变化规律 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 37-41, 105.
- [18] 李明珠, 王文萍, 金圣博. 奥沙利铂诱导的神经病理性疼痛大鼠模型研究及其在中医方面应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 278-285.

[收稿日期] 2022-04-29

王瑾茜,雷诗卉,李薇,等. 冠心病气虚血瘀证模型大鼠与临床患者舌象特征的比对研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 8-16.

Wang JX, Lei SH, Li W, et al. Comparative study of tongue features between model rats and clinical patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 8-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.002

冠心病气虚血瘀证模型大鼠与临床患者舌象特征的 比对研究

王瑾茜¹,雷诗卉¹,李薇¹,杨蕙¹,杨益¹,刘侃¹,蔺晓源¹,
胡国恒²,郭纯¹,陈亚^{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】 目的 本研究旨在寻求 CHD 气虚血瘀证病证结合动物模型与 CHD 气虚血瘀证临床患者舌象共通的特异性指标。方法 使用 matlab 软件将冠心病气虚血瘀证临床患者舌图像进行分割并提取相关特征,利用 RF 模型分类识别临床全样本及动物全样本,制作 RF 预测模型并评估预测价值,计算各指标 AUC 以判定其诊断价值。结果 与 CHD 气虚血瘀证临床诊断密切相关的舌象特异性指标有 4 个,分别是 M₁、M₂、M₃、M₅。采用 RF 分类判别结果提示模型预测 FPR 为 15.2%,TPR 为 83.3%,最佳界值为 0.5,敏感度为 81.4%,特异性为 76.0%,准确率为 85.7%,圆周卷积为 0.6991,AUC 为 0.8151。M₁、M₂、M₅ 的诊断价值较高(AUC 分别为 0.9040、0.9254、0.9610),M₃ 的诊断价值中等(AUC=0.7708)。在大鼠模型上 M₁、M₂、M₃、M₅ 特征值与正常组大鼠比较存在统计学差异,采用 RF 分类判别的 FPR 为 14.8%,TPR 为 83.1%,AUC 为 0.8755,最佳界值为 0.5,敏感度为 81.8%,特异性为 75.6%,准确率为 83.1%,圆周卷积为 0.6451。M₁、M₂、M₅ 的诊断价值较高(AUC 分别为 0.9130、0.9304、0.9088),M₃ 的诊断价值中等(AUC=0.7496)。结论 CHD 气虚血瘀证病证结合动物模型与 CHD 气虚血瘀证临床患者的舌象特征拟合度高,M₁、M₂、M₃、M₅ 特征值是 CHD 气虚血瘀证临床样本和动物模型的共通的特异性指标。

【关键词】 冠心病;气虚血瘀证;病证结合动物模型;舌象特征;随机森林

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)10-0008-09

Comparative study of tongue features between model rats and clinical patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome of coronary heart disease

WANG Jinxi¹, LEI Shihui¹, LI Wei¹, YANG Hui¹, YANG Yi¹, LIU Kan¹, LIN Xiaoyuan¹, HU Guoheng²,
GUO Chun¹, CHEN Ya^{1*}

(1. the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China.

2. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208)

【Abstract】 **Objective** This study aimed at finding a common specific indication of tongue images between model rats and patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome of CHD. **Methods** Images of tongues of patients with Qi deficiency and blood stasis syndrome of CHD were divided by matlab software and relevant features were extracted. Whole clinical and animal samples were classified and identified using an RF model and the predictive value of the model was

【基金项目】 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40418);湖南省中医药科研项目(2021179,2021172);长沙市科技计划项目(kq2014222, kq2014224);湖南省卫健委科研计划项目(202103010864);湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ057)。

【作者简介】 王瑾茜(1991—),女,助理研究员,博士,研究方向:心血管疾病的中医药防治。E-mail:wjx0929@homail.com

【通信作者】 陈亚(1986—),女,主治医师,硕士,研究方向:心脑血管疾病的中医药防治。E-mail:273067155@qq.com

evaluated by the ROC. AUC was calculated to determine the diagnostic value of each index. **Results** Four indications named M_1 , M_2 , M_3 and M_5 were closely related to the diagnosis of CHD with Qi deficiency and blood stasis syndrome. In RF classification, FPR was 15.2%, TPR was 83.3%, the best boundary value was 0.5, sensitivity was 81.4%, specificity was 76%, accuracy was 85.7%, circumferential convolution was 0.6991, and AUC was 0.8151. AUC indicated that all variables had diagnostic value, among which M_1 , M_2 and M_5 had high diagnostic values and M_3 had a moderate diagnostic value. In the rat model, significant differences in the characteristic values of M_1 , M_2 , M_3 and M_5 were observed compared with the normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In RF classification, FPR was 14.8%, TPR was 83.1%, AUC was 0.8755, the best boundary value was 0.5, sensitivity was 81.8%, specificity was 75.6%, accuracy was 83.1%, and circumferential convolution was 0.6451. AUC suggested that M_1 , M_2 , M_3 and M_5 had diagnostic value. Among them, M_1 , M_2 and M_5 had high diagnostic values and M_3 had a moderate diagnostic value. **Conclusions** The RF method can be used as a method of tongue image recognition in CHD with Qi deficiency and blood stasis syndrome. The characteristic values of M_1 , M_2 , M_3 and M_5 can be used as specific indications of clinical samples and animal models of CHD with Qi deficiency and blood stasis syndrome. The rat model of CHD Qi deficiency and blood stasis syndrome is in line with the digital characteristics of tongue diagnosis in patients.

【Keywords】 coronary heart disease; Qi deficiency and blood stasis syndrome; disease-syndrome combined model; tongue features; random forest

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是一种复杂的慢性炎症性疾病,其原因多因向心脏供氧的冠状动脉发生狭窄和重塑所致^[1]。中医将 CHD 归属于“胸痹”、“心痛”和“厥心痛”等范畴,气虚血瘀作为本病的主要病机,是中医界研究的热点^[2]。病证结合动物模型作为从中医临床走向基础研究的枢纽,对于揭示中医证候的本质具有重要意义^[3]。本课题组前期建立了 CHD 气虚血瘀证病证动物模型,并且对模型大鼠的舌质、舌色进行了定性、定量分析,但对模型舌图像的判定缺乏与临床患者之间的拟合校对,模型的可靠度有待进一步认证^[4]。因此,探讨 CHD 气虚血瘀证动物模型与临床患者的舌象特征是否吻合,是本课题组需要重点研究的内容。基于随机森林 (random forest, RF) 算法的图像分类识别系统具有抗噪声能力强、训练速度快等优势,满足动物模型与临床患者舌图像复杂的识别要求^[5]。针对本课题组前期研究工作的不足,本研究建立了一种 CHD 气虚血瘀证大鼠模型与临床患者之间舌图像的校对方法,首先运用 matlab 软件将 CHD 气虚血瘀证临床患者舌体进行分割,提取舌质颜色、舌苔颜色、裂纹比例和齿痕圆形度等舌图像特征,筛选出证型的特异性指标,运用 RF 模型分类识别临床全样本,通过制作受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 以评估模型的预测价值,并计算 ROC 曲线下方的面积 (area under curve, AUC) 以判定各指标的诊断价值。随后通过并评估模型的预测价值及各指标的诊断价值以验证在 CHD 气虚血瘀证患者舌象提取的特

异性指标在模型大鼠舌象中是否存在意义。本研究旨在寻求 CHD 气虚血瘀证模型大鼠与临床患者的舌图像之间是否存在共通的特异性指标,以期为病证结合动物模型的可靠性提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

16 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,体重在 (280 ± 20)g 之间,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK(湘)2019-0004],饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物房 [SYXK(湘)2020-0010]。实验动物饲养条件为:18℃ ~ 21℃,湿度保持 40% ~ 70%,环境空气控制为每分钟换气 10 次;保持每天 12 h 光照和 12 h 黑暗环境。本文涉及的实验动物,均经湖南中医药大学医学伦理委员会监管和批准实施 (IACUC20201010-3),实验过程遵循 3R 原则。

1.1.2 临床样本

模型训练与测试过程中,采用的临床样本由湖南中医药大学第一附属医院老年病科陈亚主治医师提供。共包含 99 个实例样本。本文涉及的临床样本,均经湖南中医药大学医学伦理委员会监管和批准实施 (IACUC2020605C)。

1.2 主要试剂与仪器

注射用青霉素钠 (华北制药, 86347); 异氟烷 (瑞沃德, 03121)。ALC-V10 型小动物呼吸机购自中国奥尔科特公司; BL-420 型心电图机购自中国

泰盟公司; NikonZ50 型微单相机购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 临床诊断标准

(1)CHD 诊断:参照 1979 国际心脏病学会和协会及世界卫生组织(WHO)临床命名标准化联合专题报告关于 CHD 命名及诊断标准的建议。(2)气虚血瘀证辨证:参照《中华人民共和国中医药行业标准·中医病证诊断疗效标准》所制定的标准。(3)健康人确定:排除各类心脑血管疾病、各项检查均证实为健康人。

1.3.2 临床样本拍摄标准

患病组 49 例,健康组 50 例。规定早上 8:00 为统一观察时间点,于实验室固定点拍摄,被测者采取坐位,面对自然光线,伸舌时将舌体伸出口外,舌体放松,舌尖自然下垂。

1.3.3 动物分组及实验干预

大鼠随机分为 2 组:正常组、模型组。每组各 25 只。正常组大鼠正常饲养,模型组于实验第 1~21 天采用“力竭+控食”制备气虚血瘀证证候模型,如图 1A。于实验第 22 天采用“冠状动脉左前降支结扎法”制备冠心病病理模型,如图 1B。造模结束后,模型组大鼠恢复正常饮食、作息,期间不采用任何造模手段,模型组大鼠状态及心电图变化如图 1C、图 1D。以第 25 天上午 8:00 为统一观察时间点,麻醉后即刻暴露大鼠舌体,面对自然光线进行拍摄。

1.3.4 舌图像分割

包括舌体分割、舌质舌苔分离两个阶段。

(1)舌体分割

运用 I 分量和 Cb 分量的运算处理,得到舌体初始轮廓;采用 otsu 方法计算图像最佳阈值。按阈值进行二值化,计算公式为 $I/10+Cb \times 7/10$,提取出舌

体区域,获得二值化后舌体轮廓。

(2)舌质舌苔分离

将原始图片进行滤波降噪处理,并进行填充,采用快速 K 均值聚类方法灰度化图片,将 RGB 图像颜色实现量化线性转换,将原始图片进行滤波降噪处理,并进行填充,采用 K-均值聚类方法,最后将聚类结果展示出来。

1.3.5 特征提取

对舌质颜色、舌苔颜色、裂纹、齿痕特征进行提取。

(1)颜色特征提取

舌图像颜色包括两部分:舌质颜色和舌苔颜色。在提取过程中选用 HSI 颜色空间作为颜色特征空间。完成对舌质色调分量(H)、饱和度(S)分量及舌苔色调分量(H)的提取,并将舌质颜色的色调分量(H)和饱和度(S)分别赋值给 M_1 、 M_2 ,舌苔颜色的色调分量(H)赋值给 M_3 。

(2)裂纹特征提取

裂纹一般出现在舌中区域。将舌体切割为九份,取正中的一份,对黑色部分占总体的占比进行计算,并赋值给 M_4 。

(3)齿痕特征提取

通过舌体的圆形度特征检测舌体边缘是否存在齿痕情况,计算区域圆度(circularity),并赋值给 M_5 。

1.3.6 RF 分类及预测价值

将每样本筛选后得到的特异性指标作为集合赋值给 XX,采用递归分割思想,将 XX 分割成两份子样本集,根据训练集数据训练分类模型和根据分类模型识别测试集(predX)类别。将随机性分类(Y)设置为 1、2 两类,其中 1 代表 CHD 气虚血瘀证,2 代表正常。运用对数据进行自举的方式分别抽取总样本的 80% 例样本作为训练集,将 RF 决策

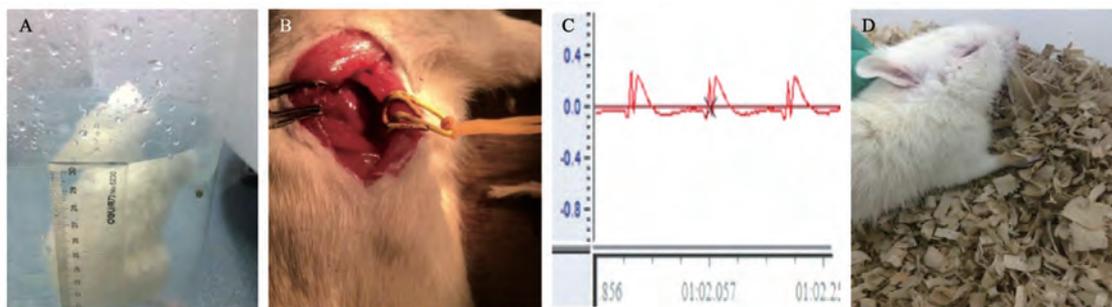


图 1 冠心病气虚血瘀证动物模型制备方法

Figure 1 Preparation method of animal model of CHD with Qi deficiency and blood stasis syndrome

树数目设置成 500,对样本集进行抽样训练。得出 RF 模型的预测结果与实际结果对比,计算 RF 模型判别的最佳阈值、敏感度、特异性、准确率、圆周卷积、AUC。并得出各特异性指标的 ROC。具体流程如图 2 所示。

1.4 统计学方法

采用统计学软件 prism 9.3.1 和 matlab 分析实验数据,根据不同的数据特点采用不同的检验法:计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,如果满足正态及方差齐性,采用成组 t 检验,不满足者采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。matlab 负责数字森林法数据。

2 结果

2.1 冠心病气虚血瘀证临床样本舌图像识别

2.1.1 舌图像分割

(1) 舌体分割

在舌图像色差校正阶段,统一色差值为 7.05。在舌图像分割和苔质分离阶段,设定聚类区域数目为 2,得到舌体分割结果如图 3 所示。

(2) 舌质特征提取与分析

分别提取出舌苔区域、舌质区域、裂纹区域、齿痕区域,如图 4A 所示。通过对舌质 H 分量 (M_1)、舌质 S 分量 (M_2)、舌苔 H 分量 (M_3)、裂纹特征 (M_4)、齿痕特征 (M_5) 指标的对比,发现两组间 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_5 特征值均存在显著性差异 ($P<0.01$), M_4 不存在统计学差异 ($P = 0.4909 > 0.05$)。如图 4B 所示。

(3) 构建模型的参数

筛选出表中的 4 个指标作为构建 RF 预后模型的特异性参数。如表 1 所示。

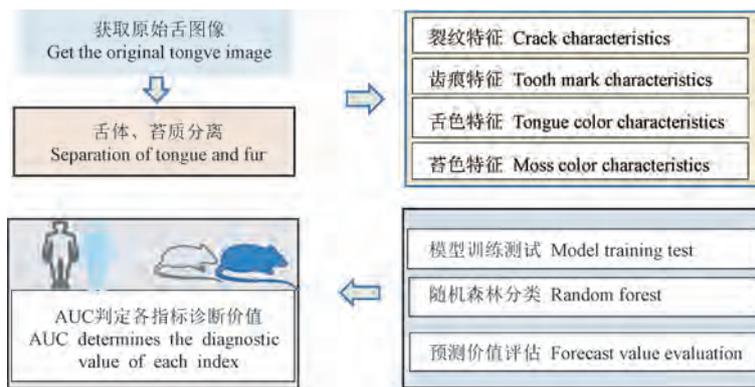


图 2 临床样本与动物模型的比对分析

Figure 2 Comparative analysis of clinical samples and animal models

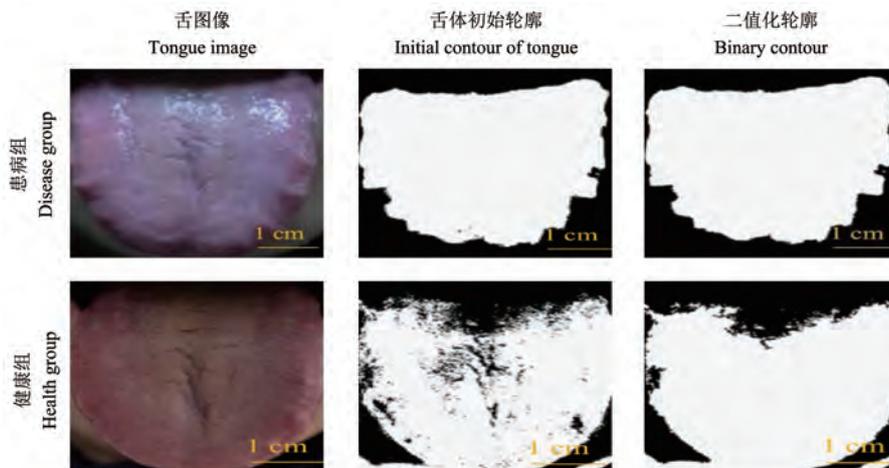
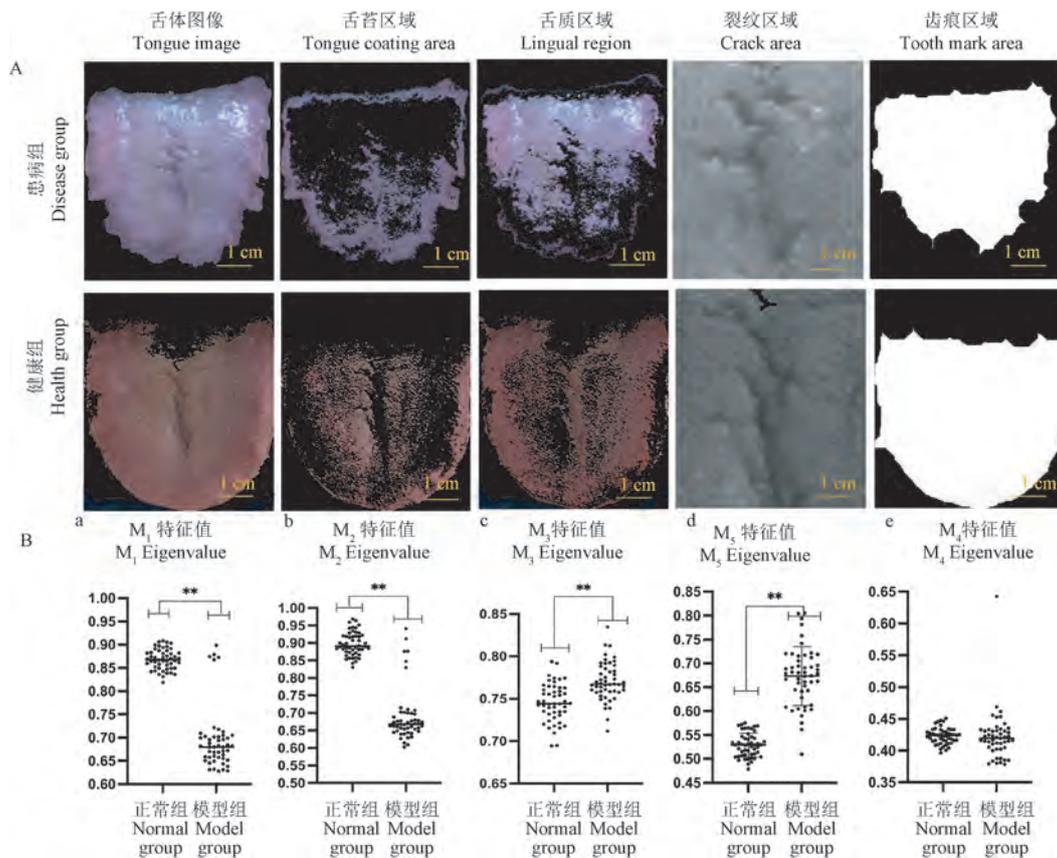


图 3 临床样本舌质分离

Figure 3 Tongue separation of clinical samples



注:A:舌图像特征分离;B:舌图像 $M_1 \sim M_5$ 特征值比较。与正常组特征值相比, $** P < 0.01$ 。

图 4 临床样本舌质特征提取与分析

Note. A, Feature separation of tongue image. B, Comparison of $M_1 \sim M_5$ eigenvalues of tongue images. Compared with the eigenvalues of the normal group, $** P < 0.01$.

Figure 4 Tongue feature extraction and analysis of clinical samples

表 1 筛选后得到的特异性指标

Table 1 Specific indexes obtained after screening

参数名称 Parameter name	M_1	M_2	M_3	M_5
指标名称 Indicator name	舌质 H 分量 H component of tongue proper	舌质 S 分量 S component of tongue proper	舌苔 H 分量 H component of tongue coating	齿痕特征 Tooth mark characteristics

2.1.2 RF 模型预测的结果

运用四格表及 ROC 确定 RF 模型判别 FPR 为 15.2%, TPR 为 83.3%, 判别 CHD 气虚血瘀证患者的最佳界值为 0.5, 敏感度为 81.4%, 特异性为 76%, 准确率为 85.7%, 圆周卷积为 0.6991, AUC 为 0.8151。如表 2、表 3 所示。RF 在给出预测结果的同时, 同样计算出各变量 AUC 曲线下面积, 得出各变量均具有诊断价值, 其中 M_1 、 M_2 、 M_5 的 AUC 值均在 0.9 以上, 提示诊断价值较高, M_3 的 AUC 值在 0.7~0.9 之间, 提示诊断价值中等。如图 5 所示。

表 2 RF 模型的预测结果与实际结果对比

Table 2 Comparison between prediction results of random forest model and actual results

预测结果 Prediction results	实际结果 Actual results	
	患者 Patients	健康人 Healthy persons
患者 Patients	49	9
健康人 Healthy persons	8	50

2.2 RF 法预测动物模型

2.2.1 舌图像分割

(1) 舌体分割

在舌图像色差校正阶段,统一色差值为 7.05。在舌图像分割和苔质分离阶段,设定聚类区域数目为 2,得到舌体分割结果。如图 6 所示。

(2) 舌质特征提取

分别提取正常大鼠与冠心病气虚血瘀证病证

结合模型大鼠舌质 H 分量 (M_1)、舌质 S 分量 (M_2)、舌苔 H 分量 (M_3) 及齿痕特征 (M_5),如图 7A 所示。两组间 M_1 、 M_2 、 M_3 特征值存在显著性差异 ($P < 0.01$), M_5 特征值存在统计学差异 ($P < 0.05$),如图 7B 所示。

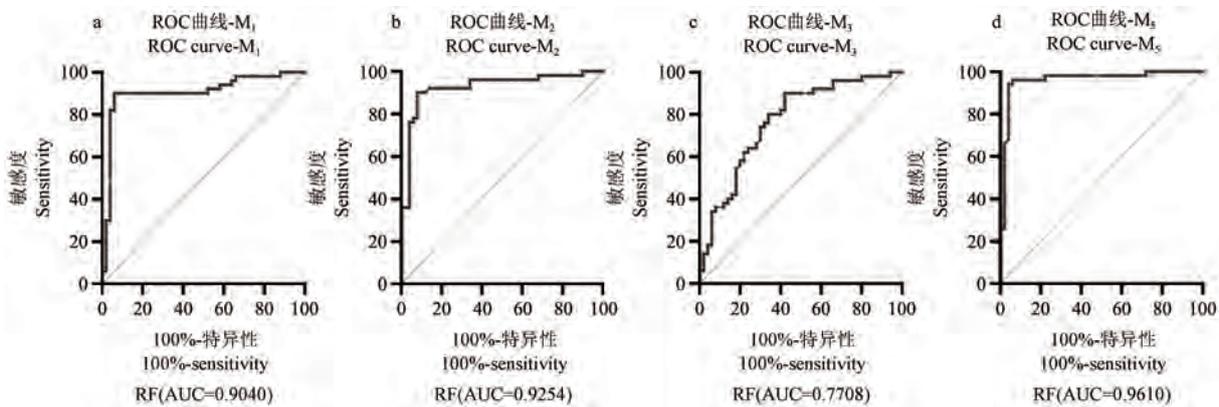
2.2.2 RF 法模型的预测价值

运用 RF 法得出 AUC 曲线下面积、敏感性、特异性、准确率及圆周卷积如下表。运用四格表及受

表 3 RF 法模型的预测价值

Table 3 Prediction value of random forest method model

变量 Variable	曲线下面积 Area under curve	界值 Boundary value	敏感度 Sensitivity	特异性 Specificity	准确率 Accuracy	圆周卷积(循环卷积) Circular convolution(cyclic convolution)
RF	0.8151	0.5	81.4%	76.9%	85.7%	0.6991



注:RF:RF 模型;a: M_1 特征值;b: M_2 特征值;c: M_3 特征值;d: M_5 特征值。AUC:曲线下面积。

图 5 RF 预测变量的 ROC 曲线

Note. RF, Random forest model. a, M_1 characteristic value. b, M_2 characteristic value. c, M_3 characteristic value. d, M_5 characteristic value. AUC, Area under curve.

Figure 5 ROC curve of RF predictive variables

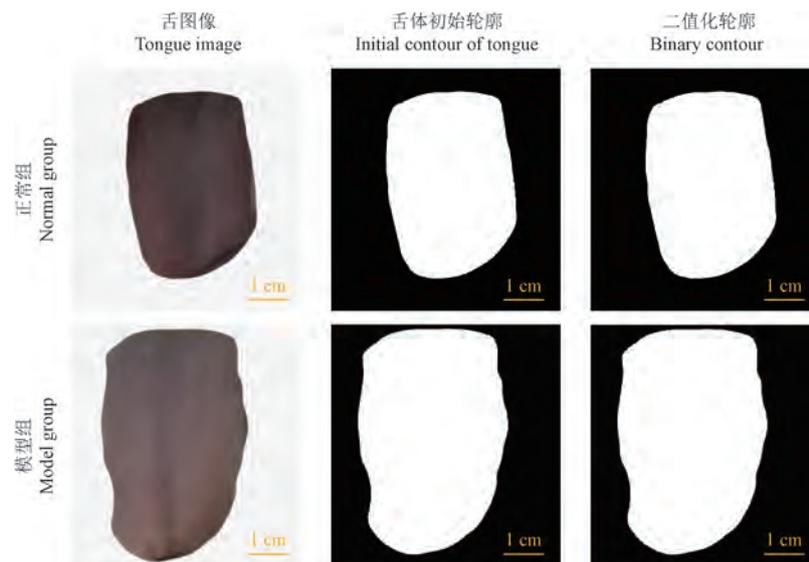


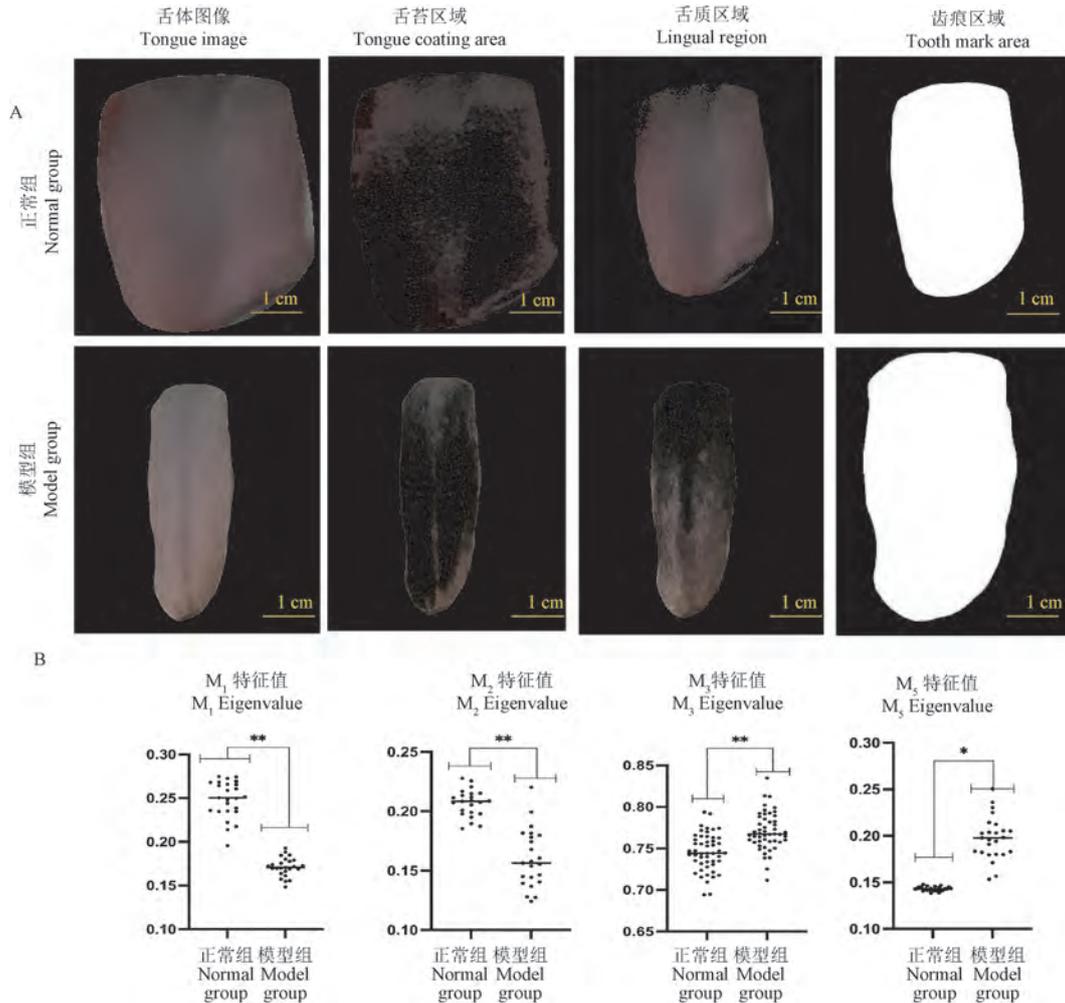
图 6 大鼠样本舌质分离

Figure 6 Separation of tongue substance

试者工作曲线(ROC 曲线)确定 RF 模型判别 FPR 为 14.8%,TPR 为 83.1%,判别 CHD 气虚血瘀证模型的最佳界值为 0.5,敏感度为 81.8%,特异性为 75.6%,准确率为 83.1%,圆周卷积为 0.6451。如表 4、表 5 所示。RF 在给出预测结果的同时,同样计算出各变量 AUC 曲线下面积,得出各变量均具有诊断价值,其中 M_1 、 M_2 、 M_5 的诊断价值较高, M_3 的诊断价值中等。如图 8 所示。

表 4 RF 模型的预测结果与实际结果对比
Table 4 Comparison between prediction results of random forest model and actual results

预测结果 Prediction results	实际结果 Actual results	
	模型鼠 Model rats	正常鼠 Normal rats
模型鼠 Model rats	25	5
正常鼠 Normal rats	6	25



注:A:舌图像特征分离;B:与正常组特征值相比, ** $P < 0.01$ 。

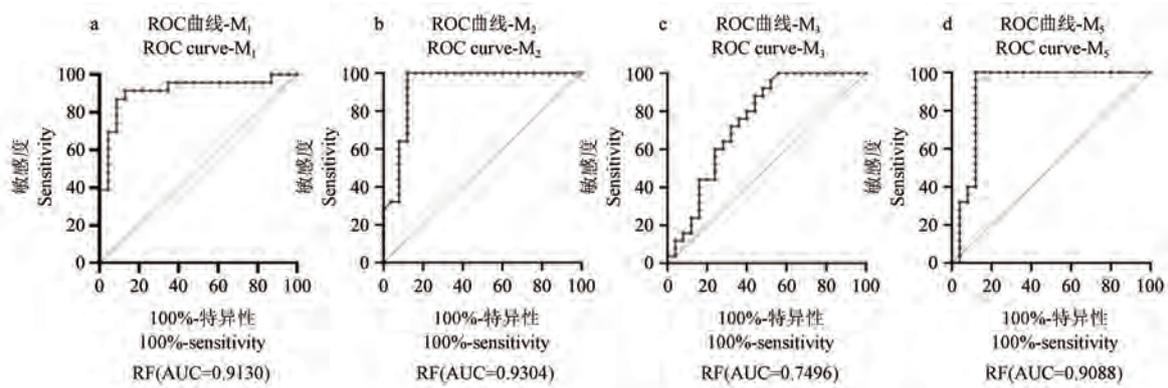
图 7 舌质特征提取与分析

Note. A, Tongue image feature separation. B, Compared with the eigenvalues of the normal group, ** $P < 0.01$.

Figure 7 Tongue feature extraction and analysis

表 5 RF 法模型的预测价值
Table 5 Prediction value of random forest method model

变量 Variable	曲线下面积 Area under curve	界值 Boundary value	敏感度 Sensitivity	特异性 Specificity	准确率 Accuracy	圆周卷积(循环卷积) Circular convolution(cyclic convolution)
RF	0.8755	0.5	81.8%	75.6%	83.1%	0.6451



注:RF:RF 模型;a: M_1 特征值;b: M_2 特征值;c: M_3 特征值;d: M_5 特征值。AUC:曲线下面积。

图 8 RF 预测变量的 ROC 曲线

Note. RF, Random forest model. a, M_1 characteristic value. b, M_2 characteristic value. c, M_3 characteristic value. d, M_5 characteristic value. AUC, Area under curve.

Figure 8 ROC curve of RF predictive variables

3 讨论

在中国,CHD 是导致死亡的主要原因之一^[6],最近一项研究报告表明,从 2010 年到 2030 年,CHD 患者复发和死亡的风险将增加 3.3 倍^[7]。中医药被广泛用于预防和治疗 CHD,并在我国临床实践中已显示出良好的疗效^[8]。流行病学调查表明,气虚血瘀证是 CHD 患者中最突出的证候^[9]。然而目前关于 CHD 气虚血瘀证的客观化研究甚少。动物模型作为实验假说和临床假说的基础,是生物医学科学研究中所建立的具有人类疾病模拟性表现的观察对象和材料。病证结合动物模型作为目前而言最适合中医药研究的模型,是中医从临床走向基础研究的枢纽。

课题组前期建立了 CHD 气虚血瘀证病证结合大鼠模型,参照“舌质 RGB 数据分布范围表”对舌色 RGB 值评估,发现该模型大鼠较正常大鼠舌面 R、G、B 值下降且差异均有统计学意义($P < 0.05$);采用 HE 染色发现模型大鼠较正常大鼠舌面丝状乳头的角化层、上皮层高度降低、固有层微血管数量增加,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果均符合 2002 年版《中药、天然药物治疗冠心病心绞痛临床研究指导原则》CHD 气虚血瘀证“舌淡紫、苔薄白”的舌象特征。此外,前期研究采用免疫组织化学法发现模型大鼠舌尖组织丝状乳头固有层 PGI₂ 水平下降、TXA₂ 水平上升,且与正常组比较, TXA₂ T/P 比值变化明显($P < 0.05$),提示该模型具备气虚血瘀证的分子学特点。但由于动物与人之

间的差异性(包括大鼠本身舌的结构、色彩特点),我们很难切实从单纯的色彩维度完成模型与临床患者之间的比对^[10],如何在两组数据中提取出潜在信息和特征指标,并将不同生物体中的生物学特征通过信息化处理的方式相互关联,进而分析 CHD 气虚血瘀证模型大鼠与临床患者舌象特征指标间的吻合程度,是目前课题组亟待解决的问题。RF 作为新兴起的、高度灵活的一种机器学习算法,可通过捕捉图像中的信息,建立数据与生物特征之间的关系,最终实现判别定性,目前已被广泛应用于生物医学领域^[11-14]。秉承“从临床中来,到临床中去”的研究理念,本研究运用 RF 从 CHD 气虚血瘀证患者及 CHD 气虚血瘀证模型大鼠舌图像中的舌质颜色特征、舌苔颜色特征、裂纹特征、齿痕特征等舌诊客观化参数中寻求共同的特异性指标,以期通过信息化处理的方式判断 CHD 气虚血瘀证模型与临床患者舌象特征的吻合程度,进一步确定模型的可靠性。

本研究从临床患者的舌诊图像出发,运用 matlab 软件对舌图像做舌体分割及苔质分离,提取出舌质颜色特征、舌苔颜色特征、齿痕特征、裂纹特征,并分别将参数赋值给 $M_1 \sim M_5$,使用 t 检验和卡方检验对二分类指标进行了初步筛选,得到了与 CHD 气虚血瘀证诊断密切相关的相关参数 4 个,分别是 M_1 、 M_2 、 M_3 和 M_5 ,随后将临床样本集的所有舌诊图像的 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_5 作为集合赋值给 X,用 RF 构建分类模型并完成模型的训练识别,得出假阳性率(false positive rate, FPR)为 15.20%,真阳性率(true positive rate, TPR)为 83.30%,AUC 为 0.8151,

最佳界值为 0.5, 敏感度为 81.80%, 特异性为 75.60%, 准确率为 83.10%, 圆周卷积为 0.6451。本研究通过计算出各变量 AUC, 得出各变量均具有诊断价值, 其中 M_1 、 M_2 、 M_5 的诊断价值较高(0.9 以上), M_3 的诊断价值中等(0.7~0.9)。RF 法不仅确保了操作规程的质量控制与结果的真实性, 且操作相对简单, 可以提高筛选参数的效率, 并且可以充分体现在 matlab 软件运算环境下 RF 法的运算速度及精度^[15]。随后本研究对冠心病气虚血瘀证大鼠模型的舌图像做了进一步分析, 使用 t 检验和卡方检验验证了 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_5 特征值在大鼠模型上亦存在显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 采用特异性指标 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_5 建立数据集。完成冠心病气虚血瘀证动物模型分类识别, 验证随机森林识别法准确率为 85.69%, 敏感度为 81.8%, 特异性为 75.60%, 说明 RF 预测模型的可靠性。再结合预测结果发现, M_1 、 M_2 、 M_5 的诊断价值较高(0.9 以上), M_3 的诊断价值中等(0.7~0.9)。得出 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_5 特征值作为 CHD 气虚血瘀证临床样本和动物模型的特异性指标的可行性。揭示了 CHD 气虚血瘀证大鼠模型与临床患者在舌象特征方面的相似度高, 可为今后药效评价提供模型的诊断支持。

参考文献:

- [1] Lim SY, Selvaraji S, Lau H, et al. Application of omics beyond the central dogma in coronary heart disease research: a bibliometric study and literature review [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 140(10): 50-69.
- [2] Yang J, Tian S, Zhao J, et al. Exploring the mechanism of TCM formulae in the treatment of different types of coronary heart disease by network pharmacology and machine learning [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159(34): 105034.
- [3] Lang HY, Guo M, Chu YT, et al. Study of establishing disease-syndrome combined with animal model for immune thrombocytopenic purpura without additional conditions [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 3(3): 135-140.
- [4] 王瑾茜, 蔺晓源, 刘侃, 等. 冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 602-609.
- [5] Asadi S, Roshan S, Kattan MW, et al. Random forest swarm optimization-based for heart diseases diagnosis [J]. *J Biomed Inform*, 2021, 115: 103690.
- [6] Zhang XH, Lu ZL, Liu L. Coronary heart disease in China [J]. *Heart*, 2008, 94(11): 26-31.
- [7] 赵冬. 中国冠心病二级预防: 差距和思考 [J]. *中华内科杂志*, 2009, 48(10): 26-30.
- [8] Zhang H, Wang WR, Lin R, et al. Buyang Huanwu decoction ameliorates coronary heart disease with Qi deficiency and blood stasis syndrome by reducing CRP and CD40 in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 130(1): 98-102.
- [9] 刘永平. 补阳还五汤在缺血性中风恢复期肢体麻木患者的应用 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2013, 5(9): 2.
- [10] 王瑾茜, 胡国恒, 蔺晓源, 等. 益气活血方对气虚血瘀型冠心病模型大鼠的影响研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(5): 529-534.
- [11] Wang X, Wang X, Lou Y, et al. Constructing tongue coating recognition model using deep transfer learning to assist syndrome diagnosis and its potential in noninvasive ethnopharmacological evaluation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114905.
- [12] Gao Y, Zhu Z, Sun F. Increasing prediction performance of colorectal cancer disease status using random forests classification based on metagenomic shotgun sequencing data [J]. *Synth Syst Biotechnol*, 2022, 7(1): 574-585.
- [13] Alam MZ, Rahman MS, Rahman MS. A random forest based predictor for medical data classification using feature ranking [J]. *Inform Med Unlocked*, 2019, 15(2): 48-52.
- [14] Wei SF, Zhou XZ, Wu W, et al. Medical image super-resolution by using multi-dictionary and random forest [J]. *Sustain Cities Soc*, 2018, 37(4): 358-370.
- [15] Simon H, Loris M, Jeffrey N. On the use of random forest for two-sample testing [J]. *J Comput Graph Stat*, 2022, 170(35): 167-173.

[收稿日期] 2021-06-22

张忠文,陈国华,黄露麒,等. 黄连解毒汤活性成分保护帕金森症脑神经细胞损伤机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 17-23.

Zhang ZW, Chen GH, Huang LQ, et al. Mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in protecting against brain nerve cell damage in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 17-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.003

黄连解毒汤活性成分保护帕金森症脑神经细胞损伤机制的研究

张忠文,陈国华,黄露麒,梅俊华,邵卫,梅瑰*

(武汉市第一医院神经内科,武汉 430022)

【摘要】 目的 探讨黄连解毒汤活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤的保护作用及其机制。方法 将 SH-SY5Y 细胞分为 5 组:空白对照组、模型组、巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组。空白对照组的细胞培养基中不添加任何物质,其余各组加入 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium ions, MPP⁺) 构建帕金森病(Parkinson's disease, PD)细胞模型。巴马汀组中添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 的巴马汀,汉黄芩素组中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的汉黄芩素,京尼平苷组中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的京尼平苷。CCK-8 检测细胞活力, Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡情况,免疫荧光检测 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的表达情况,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的水平, Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平。结果 MPP⁺ 刺激 SH-SY5Y 细胞后,模型组细胞活力明显下降, α -Syn 荧光强度增强,TH 阳性细胞显著减少。巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷分别干预后,细胞增殖活力显著升高, α -Syn 荧光强度减弱,TH 阳性细胞增加。TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 的水平明显降低,Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平降低,而 Bcl-2 mRNA 的表达增加。结论 黄连解毒汤活性成分能抑制炎症因子的释放从而抑制炎症反应,为帕金森症脑神经细胞损伤的治疗提供理论基础。

【关键词】 黄连解毒汤;帕金森症;炎症反应;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0017-07

Mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in protecting against brain nerve cell damage in Parkinson's disease

ZHANG Zhongwen, CHEN Guohua, HUANG Luqi, MEI Junhua, SHAO Wei, MEI Gui*

(Department of Neurology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of the active ingredients in Huanglian Jiedu decoction in preventing brain nerve cell damage in a cell model of Parkinson's disease. **Methods** SH-SY5Y cells were divided into five groups: control group, model group, palmatine group, wogonin group and geniposide group. No substance was added to the cell culture medium of the control group, whereas 500 $\mu\text{mol/L}$ of 1-methyl-4-phenylpyridinium ions (MPP⁺) was added to the other groups to create a cell model of Parkinson's disease. The palmatine group was

[基金项目] 国家自然科学基金(81673914)。

[作者简介] 张忠文(1974—),男,硕士,副主任医师,研究方向:帕金森及运动障碍疾病。E-mail:zzwtougao@163.com

[通信作者] 梅瑰(1982—),女,硕士,住院医师,研究方向:帕金森及运动障碍疾病。E-mail:45711427@qq.com

supplemented with 10 $\mu\text{mol/L}$ of palmatine, the wogonin group was supplemented with 50 $\mu\text{mol/L}$ of wogonin, and the geniposide group was supplemented with 50 $\mu\text{mol/L}$ of geniposide. The cell viability was detected by CCK-8, cell apoptosis was evaluated using Hoechst 33258 staining, and the expressions of α -synuclein (α -Syn) and tyrosine hydroxylase (TH) were detected by immunofluorescence. The concentrations of the tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA levels of the apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and Caspase-3 were detected by Real-time PCR. **Results** MPP⁺ stimulation significantly decreased the viability of SH-SY5Y cells; the α -synuclein fluorescence intensity was significantly increased, and the number of TH-positive cells was significantly decreased. Intervention with palmatine, wogonin and geniposide significantly increased the viability, decreased the α -synuclein fluorescence intensity, and increased the number of TH-positive cells; furthermore, the concentrations of TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-1 β and the expression levels of Bax and Caspase-3 mRNA were significantly reduced, whereas the level of Bcl-2 mRNA was increased. **Conclusions** The active ingredients of Huanglian Jiedu decoction inhibit the release of inflammatory factors and thus inhibit the inflammatory response, providing a theoretical basis for the treatment of brain nerve cell injury in Parkinson's disease.

【Keywords】 Huanglian Jiedu decoction; Parkinson's disease; inflammatory response; apoptosis

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见于老年人的神经系统退行性疾病,在全球人口中 65 岁以上人群发病率高达 1.5%^[1]。PD 涉及黑质致密部多巴胺能神经元的进行性死亡,出现运动迟缓、震颤和姿势异常等运动障碍^[2]。到目前为止,PD 发病的确切机制仍不完全清楚。目前,帕金森病的治疗如康复、多巴胺前体、多巴胺激动剂和抗胆碱能药物可以缓解症状^[3]。此外,许多药物会产生许多副作用,比如左旋多巴引起的运动障碍、断断续续的现象、疲惫、幻觉和妄想^[4]。因此迫切需要有效的治疗方法来阻止或减缓多巴胺能细胞的死亡。

近年来,从天然产物中分离出的高效低毒化合物用于神经退行性疾病治疗的研究受到了人们的广泛关注^[5]。黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味中药组成,具有抗炎、抗氧化、抗脑缺血、保护神经元等作用,可用于脑血管疾病、痴呆、炎症等疾病的治疗^[6]。有研究表明,黄连解毒汤对 MPTP 所致的帕金森病小鼠有防治效果^[7],但其主要成分对帕金森病的作用及其作用机理还有待研究。研究发现,黄连解毒汤的主要成分巴马汀、汉黄芩素和京尼平苷均能抑制炎性细胞因子的产生,进而抑制炎症反应来保护细胞免受损伤^[8-10]。但它们是否通过抑制炎症反应保护神经元细胞鲜见报道。1-甲基-4-苯基吡啶(MPP⁺)是一个带正电荷的分子。MPP⁺通过干扰线粒体氧化磷酸化诱导大量氧化应激,导致多巴胺能神经元损伤^[11]。SH-SY5Y 细胞系具有多种神经元特性和多巴胺能神经元的儿茶酚胺能表型,被广泛用作帕金森病研究的多巴胺能神经元的体外模型^[12]。因此,本研究拟使用 MPP⁺处

理 SH-SY5Y 细胞构建 PD 模型,再用黄连解毒汤中 3 种活性成分巴马汀、汉黄芩素和京尼平苷处理模型细胞,模拟黄连解毒汤在 PD 发生和发展中的作用,然后检测细胞存活率、凋亡、炎症因子和 α -突触核蛋白(α -Syn)、酪氨酸羟化酶(TH)的表达,探讨黄连解毒汤活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 购自 Gibco 公司(货号:C11330500BT);胎牛血清购自 TBD(货号:TBD11HT);MPP⁺碘化物购自 sigma 公司(货号:D048);CCK-8 购自 BestBio(货号:BB-4202);Hoechst 33258 购自碧云天公司(货号:C1017);Triton X-100 购自 absin 公司(货号:abs9149); α -Syn、TH 抗体购自 Bioswamp 公司(货号:PAB31491、MAB46040);TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 试剂盒购自 Bioswamp 公司(货号:HM10001、HM10115、HM10205 和 HM10206);TRIzol 购自 ambion 公司(货号:15596026),反转录所用试剂购自 TaKaRa 公司,SYBR Green 染料购自 KAPA Biosystems 公司(货号:KM4101);PCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。CO₂ 恒温培养箱购自 Thermo 公司(型号 311);倒置荧光显微镜购自 Leica 公司(型号 DMIL LED)。

1.3 实验方法

1.3.1 SH-SY5Y 细胞的培养及 PD 细胞模型的构建及鉴定

将 SH-SY5Y 细胞以每毫升 1×10^5 个的密度接种于培养瓶内,用 10% FBS 的 DMEM 培养基 37℃、5% CO₂ 培养。当细胞生长达到 80% 汇合时,以 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 比例传代培养。取 SH-SY5Y 细胞接种于 96 孔板分为对照组和 MPP⁺ 组,对照组加入 10% FBS 的 DMEM 培养基,MPP⁺ 组中加入含 500 μmol/L 的 MPP⁺ 的 10% FBS 的 DMEM 培养基^[13],于 37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后,CCK-8 检测细胞活力。

1.3.2 化合物浓度筛选

将构建成功的 PD 模型细胞按照不同成分分别进行下列实验。巴马汀:在培养基中分别加入 0、3.5、7、10、12.5 μmol/L 的巴马汀培养 24 h;汉黄芩素:在培养基中分别加入 0、10、30、50、60 μmol/L 的汉黄芩素培养 24 h;京尼平昔:在培养基中分别加入 0、10、30、50、60 μmol/L 的京尼平昔培养 24 h。细胞处理完成后,使用 ELISA 检测筛选出巴马汀、汉黄芩素、京尼平昔的最佳作用浓度。

1.3.3 实验分组及处理

将对数生长期的 SH-SY5Y 细胞分为 5 组:空白对照组、模型组、巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平昔组。空白对照组的细胞培养基中不添加任何物质培养 24 h;其余各组加入 500 μmol/L 的 MPP⁺ 构建 PD 细胞模型。巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平昔组 3 组添加相应浓度的药物,培养 24 h 后,CCK-8 检测细胞活力,计算抑制率。

1.3.4 Hoechst 33258 染色

SH-SY5Y 细胞接种 12 孔板处理 24 h 后,加 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 清洗后加入 1 mL Hoechst 33258 染色液,室温染色 5 min。PBS 清洗后于荧光显微镜下拍照。

1.3.5 免疫荧光

SH-SY5Y 细胞接种 12 孔板处理 24 h 后,PBS 清洗后加入 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 清洗,加入 1 mL 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。1 mL 5% BSA,37℃ 封闭 1 h,弃去封闭液。加入 300 μL PBS 稀释后的一抗,4℃ 孵育过夜。次日,PBS 清洗后加入 300 μL PBS 稀释后的二抗,37℃ 孵育 1 h。加入 300 μL 抗荧光淬灭封片液(含 DAPI),于荧光显微镜观察拍照。

1.3.6 ELISA 检测细胞中炎症因子 TNF-α、IFN-γ、IL-6 和 IL-1β 的水平

严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞中 TNF-α、IFN-γ、IL-6 和 IL-1β 的水平。

1.3.7 Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达水平

采用 TRIzol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA,测定提取的 RNA 纯度和浓度。将提取的 RNA 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明方法逆转录获得 cDNA。Real-time PCR 扩增体系如下:SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μL,上游引物(10 μmol/L)0.5 μL,下游引物(10 μmol/L)0.5 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH₂O 8 μL,总体积为 20 μL。反应条件如下:95℃ 预变性 3 min,扩增 95℃ 5 s,56℃ 10 s,72℃ 25 s 共计 40 个循环,最后 65℃ ~ 95℃ 制备溶解曲线,以 GAPDH 为内参基因。计算相对表达量。待测基因引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

采用 Graph pad 8.0 软件对数据进行统计分析,实验数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,每两组间比较应用 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

如图 1 所示,与空白对照组比较,模型组 SH-SY5Y 细胞增殖活力显著降低(*P* < 0.01),结果表明 PD 细胞模型构建成功。

2.2 巴马汀、汉黄芩素、京尼平昔浓度的筛选

如图 2 所示,巴马汀组细胞中 IFN-γ、IL-6 和 IL-1β 的浓度在 0~12.5 μmol/L 的范围内呈下降趋势,而 TNF-α 的浓度在 0~10 μmol/L 的范围内呈下降趋势,在 12.5 μmol/L 的时候浓度增加,显示巴马汀的最佳作用浓度为 10 μmol/L。汉黄芩素组细胞中

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequences(5'-3')
Bax-F	TTCAGGGGATGATTGCC
Bax-R	GCCTTGAGCACCAGTTTG
Bcl-2-F	CTGGTGGACAACATCCG
Bcl-2-R	GGAGAAATCAAACAGAGCC
Caspase-3-F	GGTTCATCCAGTCGCTTT
Caspase-3-R	ATTCTGTTGCCACCTTTC
GAPDH-F	GGGAAACTGTGGCCTGAT
GAPDH-R	GACTGGGTGTCGCTGTGA

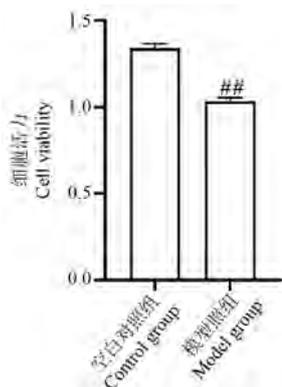
TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 的浓度在 0~60 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内呈下降趋势,但在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 60 $\mu\text{mol/L}$ 时无明显差异,表明汉黄芩素的最佳作用浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。京尼平苷组细胞 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-1 β 的浓度在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内呈下降趋势,而 IL-6 的浓度在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内呈下降趋势,在 60 $\mu\text{mol/L}$ 的时候浓度增加,显示京尼平苷的最佳作用浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 药物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

与空白对照组比较,模型组 SH-SY5Y 细胞增殖活力显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组中 SH-SY5Y 细胞增殖活力显著升高 ($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 Hoechst 33258 染色结果

如图 4 所示, Hoescht 33258 染色后空白对照组的细胞出现较弱的均匀的蓝色荧光。而 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞后,细胞核大量呈浓染致密的固缩形态伴着较强的荧光。巴马汀组、汉黄芩素组、京尼



注:与空白对照组相比, ^{##} $P < 0.01$ 。

图 1 CCK-8 法检测细胞活力

Note. Compared with control group, ^{##} $P < 0.01$.

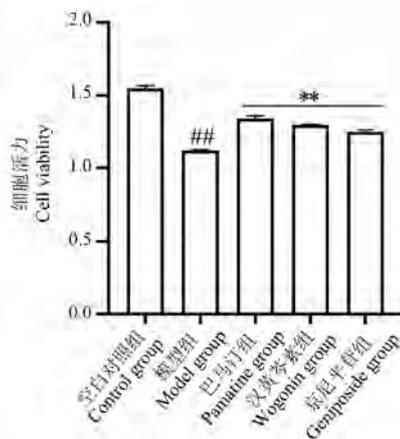
Figure 1 Cell viability was detected by CCK-8 method

2.5 免疫荧光检测 α -Syn、TH 的表达情况

如图 5 所示,免疫荧光检测观察到模型组 α -Syn 荧光强度强于空白对照组。而巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组分别干预细胞后,荧光强度减弱。镜下可见空白对照组中绿色荧光的 TH 阳性细胞较多,模型组 TH 阳性细胞显著减少。巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组 TH 阳性细胞均有不同程度的增加。结果表明,巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷组能抑制 α -Syn 的表达水平,对 SH-SY5Y 细胞具有保护作用。

2.6 ELISA 检测细胞中炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 的水平

如图 6 所示,与空白对照组比较,模型组细胞中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平苷分别干预细胞后,荧光均有不同程度减弱。



注:与空白对照组相比, ^{##} $P < 0.01$;与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。

图 3 药物对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

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

Figure 3 Effect of drugs on SH-SY5Y cell viability

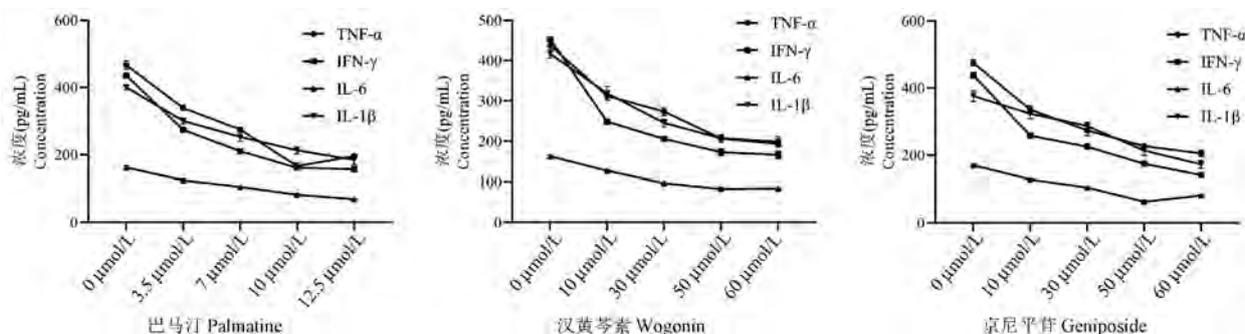


图 2 巴马汀、汉黄芩素和京尼平苷浓度的筛选

Figure 2 Screening of palmitate, wogonin and geniposide

平昔组细胞 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平昔组能抑制炎症因子的释放, 对 SH-SY5Y 细胞具有一定的保护作用。

2.7 Real-time PCR 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平

如图 7 所示, 与空白对照组比较, 模型组细胞中

Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平增加, 而 Bcl-2 mRNA 的表达减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 巴马汀组、汉黄芩素组、京尼平昔组细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平降低, 而 Bcl-2 mRNA 的表达增加 ($P < 0.01$)。结果表明, 黄连解毒汤活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤具有保护作用, 其作用机制可能与抑制 Bax、Caspase-3 的表达, 提高 Bcl-2 的表达有关。

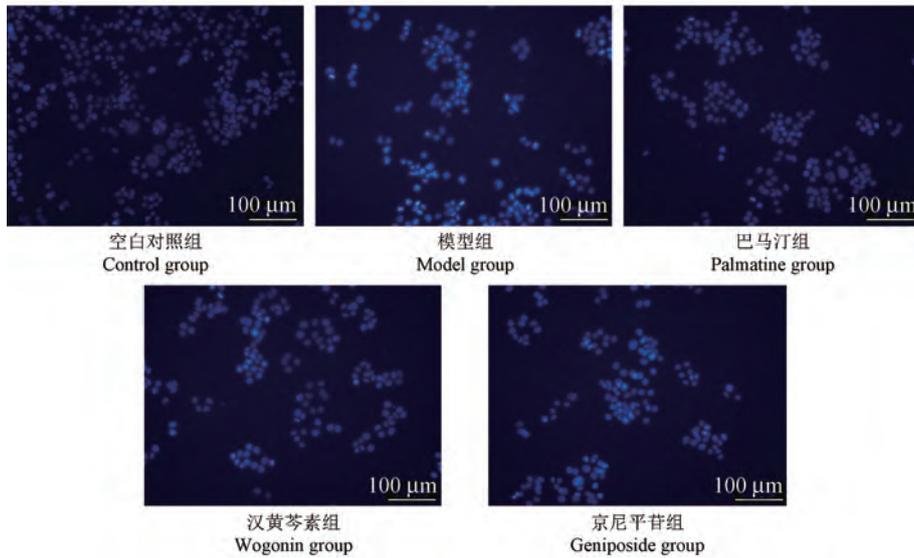


图 4 Hoechst 33258 染色

Figure 4 Hoechst 33258 staining

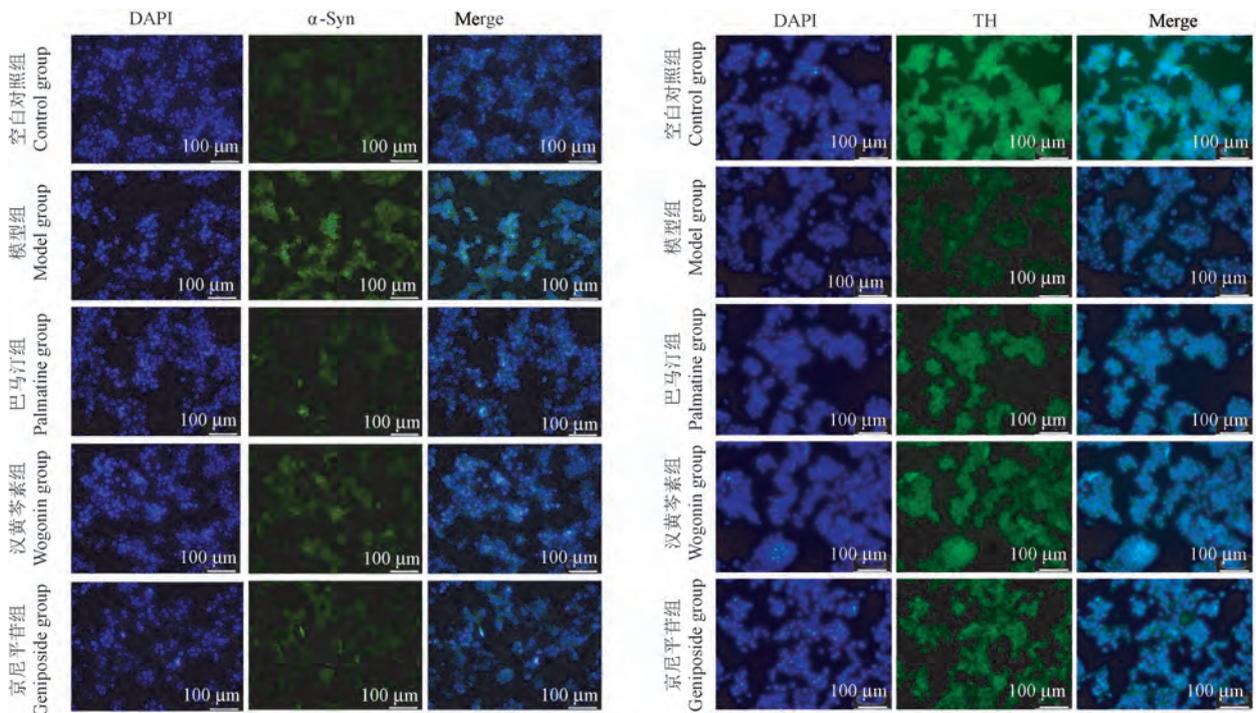
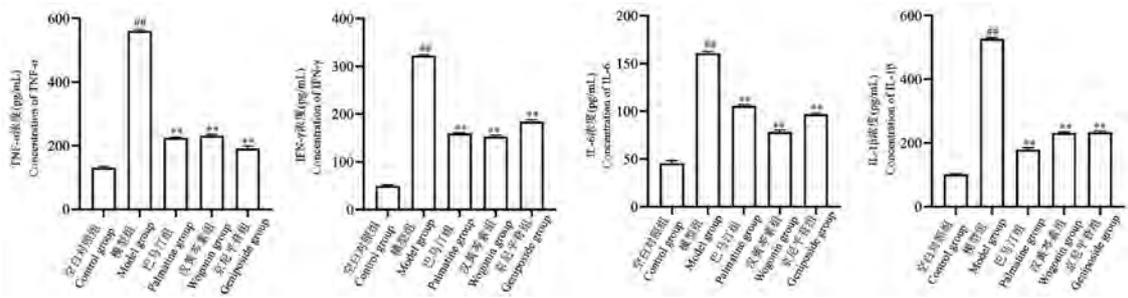


图 5 免疫荧光检测 α -Syn、TH 的表达情况

Figure 5 Expression of α -Syn and TH was detected by immunofluorescence

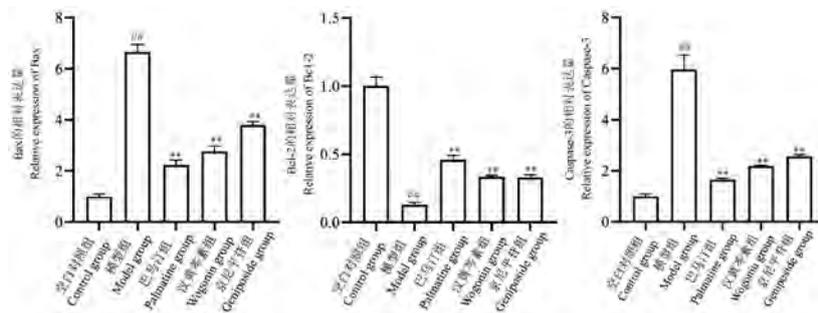


注:与空白对照组相比, ^{##} $P < 0.01$;与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。

图 6 炎症因子的水平

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

Figure 6 Levels of inflammatory factors



注:与空白对照组相比, ^{##} $P < 0.01$;与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。

图 7 Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA 的表达水平

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

Figure 7 Expression levels of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA

3 讨论

PD 是第二常见的与年龄相关的神经退行性疾病,其特征是多巴胺能(DA)神经元的进行性丢失和中脑黑质致密区胞质中路易小体的出现。慢性神经炎症也是帕金森病的病理生理学标志之一。研究表明,神经胶质细胞激活和促炎细胞因子水平升高是 PD 脑的共同特征^[14]。由于促进炎症细胞因子的释放而引起的星形胶质细胞和小胶质细胞的激活,加重了 DA 神经元的变性^[15],因此炎症过程被认为是 PD 和其他神经退行性疾病的一个有希望的干预靶点。

MPTP 在星形胶质细胞中被单胺氧化酶代谢,转化为电离的 MPP⁺,通过多巴胺转运体转移到 DA 神经元^[16]。研究发现, MPP⁺对 SH-SY5Y 细胞神经元产生明显的损伤,因此在疗效评价方面比其他 PD 模型有很大优势。本实验采用 MPP⁺干预 SH-SY5Y 细胞 24 h 制备体外 PD 模型,通过 CCK-8 检测,观察 MPP⁺组活力下降,对 SH-SY5Y 细胞有明显的抑制作用。在 PD 发病过程中,黑质致密部中 α -Syn 的逐渐聚集导致多巴胺能神经元的丢失,进一步通

过大脑中的神经元回路传播,从而促进疾病的进展^[17]。TH 存在于所有多巴胺能细胞中,是 DA 生物合成中的关键限速酶。TH 阳性神经元的减少会抑制 TH 的活性,导致 DA 合成的减少,可作为 PD 的直接指示因子^[18]。Ser129 磷酸化 α -Syn 比例的增加会对 TH 调节产生干扰,进一步对神经元存活产生负面影响^[19]。本实验用 MPP⁺干预 SH-SY5Y 细胞后, α -Syn 荧光强度增强, TH 阳性细胞显著减少,表明成功建立 PD 体外模型。巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷分别干预后,细胞增殖活力显著升高, α -Syn 荧光强度减弱, TH 阳性细胞增加,表明黄连解毒汤的活性成分对帕金森症脑神经细胞损伤具有一定的保护作用。

巴马汀是黄连和黄柏中的主要成分,能够阻断 ADAM17/EGFR 信号传导减弱胃上皮细胞的炎症反应。汉黄芩素是黄芩中的主要活性成分,能够直接作用免疫细胞抑制炎症细胞因子的产生,抑制炎症相关通路,如 MAPK、Akt、NF- κ B 和 JAK-STAT 等。京尼平苷是栀子中的主要活性成分,通过上调 miR-145-5p 抑制 NF- κ B 和 JNK 通路保护大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞免于炎症损伤^[8-10]。本研究

通过 ELISA 检测发现,在一定浓度范围内,巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷能抑制细胞中炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 IL-1 β 的水平。小胶质细胞是大脑中的一种免疫细胞,活化后产生和释放促炎细胞因子,对 DA 神经元造成损伤。大量研究报道炎症反应作用会激活细胞凋亡信号,进一步损害并导致器官衰竭。炎症介质会引起线粒体产生活性氧并释放细胞色素,形成凋亡小体以激活 Caspase-3。活化的 Caspase-3 切割 DNA 修复酶和细胞稳定蛋白,最终导致细胞凋亡^[20-21]。研究发现 PD 患者的纹状体和脑脊液中均有炎症因子如 IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的存在,同时 TNF- α 受体 R1、Bcl-2、Fas 和 Caspase-3 的表达水平增加^[22]。本实验研究结果显示, MPP⁺ 干预 SH-SY5Y 细胞后, Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平增加,而 Bcl-2 mRNA 的表达减少,而巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷干预后,细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达水平降低,而 Bcl-2 mRNA 的表达增加。结果表明,黄连解毒汤的活性成分能抑制炎症因子的释放,减少细胞凋亡情况。综上所述,黄连解毒汤的活性成分巴马汀、汉黄芩素、京尼平苷能有效制炎症因子的释放和细胞凋亡,对帕金森症脑神经细胞损伤具有保护作用,为临床应用提供新的依据。

参考文献:

- [1] Meissner WG, Frasier M, Gasser T, et al. Priorities in Parkinson's disease research [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(5): 377-393.
- [2] Campos-Acuña J, Elgueta D, Pacheco R, et al. T-cell-driven inflammation as a mediator of the gut-brain axis involved in Parkinson's disease [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 239.
- [3] Zhong J, Yu H, Huang C, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 by FCPR16 protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced decline of mitochondrial membrane potential and oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 47-58.
- [4] Agúndez JA, García-Martín E, Alonso-Navarro H, et al. Anti-Parkinson's disease drugs and pharmacogenetic considerations [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(7): 859-874.
- [5] Fan D, Liu L, Wu Z, et al. Combating neurodegenerative diseases with the plant alkaloid berberine; molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2019, 17(6): 563-579.
- [6] 刘雨浓, 张晓敏, 崔晓英, 等. 黄连解毒汤有效组分通过抑制 Caspase-11 靶点抗脓毒症的研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(1): 7-11.
- [7] 王帆, 陈晓光. 老年性痴呆防治中黄连解毒汤研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(5): 86-89.
- [8] Chen X, Wang R, Bao C, et al. Palmatine ameliorates *Helicobacter pylori*-induced chronic atrophic gastritis by inhibiting MMP-10 through ADAM17/EGFR [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 882: 173267.
- [9] Liao H, Ye J, Gao L, et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines: a comprehensive review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 133: 110917.
- [10] Ma S, Zhang C, Zhang Z, et al. Geniposide protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via up-regulation of miR-145-5p [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2875-2881.
- [11] Przedborski S, Tieu K, Perier C, et al. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, 36(4): 375-379.
- [12] Moreira S, Fonseca I, Nunes MJ, et al. Nrf2 activation by tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2017, 295: 77-87.
- [13] Zhong J, Xie J, Xiao J, et al. Inhibition of PDE4 by FCPR16 induces AMPK-dependent autophagy and confers neuroprotection in SH-SY5Y cells and neurons exposed to MPP⁺-induced oxidative insult [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 135: 87-101.
- [14] Booth H, Hirst WD, Wade-Martins R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis [J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(6): 358-370.
- [15] Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target [J]. *Transl Neurodegener*, 2015, 4: 19.
- [16] Liang Y, Chen C, Xia B, et al. Neuroprotective effect of echinacoside in subacute mouse model of Parkinson's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 4379639.
- [17] Bieri G, Brahic M, Bousset L, et al. LRRK2 modifies α -syn pathology and spread in mouse models and human neurons [J]. *Acta Neuropathologica*, 2019, 137(6): 961-980.
- [18] Tabrez S, Jabir NR, Shakil S, et al. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(4): 395-409.
- [19] Sato H, Arawaka S, Hara S, et al. Authentically phosphorylated α -synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(46): 16884-16894.
- [20] Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(6): 329-344.
- [21] Tsai R, Tsai C, Liu S, et al. Maackiain ameliorates 6-hydroxydopamine and SNCA pathologies by modulating the PINK1/parkin pathway in models of Parkinson's disease in *Caenorhabditis elegans* and the SH-SY5Y cell line [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4455.
- [22] Gordon R, Anantharam V, Kanthasamy AG, et al. Proteolytic activation of proapoptotic kinase protein kinase C δ by tumor necrosis factor α death receptor signaling in dopaminergic neurons during neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9(1): 82-99.

[收稿日期] 2021-06-22

龙嘉琪, 赵文丽, 彭发全, 等. 中心静脉导管监测肺动脉压的兔急性肺栓塞模型的制备 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 24-31, 39.

Long JQ, Zhao WL, Peng FQ, et al. A rabbit model of acute pulmonary embolism using central venous catheter to monitor pulmonary artery pressure [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 24-31, 39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.004

中心静脉导管监测肺动脉压的兔急性肺栓塞模型的制备

龙嘉琪¹, 赵文丽¹, 彭发全², 吴蓓¹, 李跃兵^{3*}

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第二医院病理科, 杭州 310005; 3. 浙江中医药大学附属第二医院麻醉科, 杭州 310005)

【摘要】 **目的** 通过用单腔中心静脉导管测量实验兔肺动脉压, 结合解剖及病理改变, 探讨该法制备兔急性肺栓塞模型的可行性和成功率。**方法** 中心静脉导管末端塑形后在导丝引导下经兔颈内静脉置入肺动脉, 连接 Medlab 生物信号采集处理系统行动态肺动脉压监测。经中心静脉导管注射自体血栓, 建立兔急性肺栓塞模型。根据目标肺动脉压力来控制注入血栓数量, 可得到严重程度和栓塞范围较为一致的急性肺栓塞模型。**结果** 造模成功率 100%, 栓塞后肺动脉压、血压、心率与栓塞前比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。心肺解剖证实导管在肺动脉主干, 病理检查发现肺动脉及肺小动脉存在血栓。**结论** 经颈静脉送入中心静脉导管建立兔急性肺栓塞模型, 既能保证栓子的完整性, 又能够获得连续且准确的肺动脉压力数据, 有效地建立了一种栓塞范围和严重程度可控的动物模型。该方法成功率较高、操作简便、使用经济, 为急性肺栓塞诊治的相关研究提供了实验基础。

【关键词】 急性肺栓塞; 肺动脉压; 中心静脉导管; 动物模型; 兔

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0024-08

A rabbit model of acute pulmonary embolism using central venous catheter to monitor pulmonary artery pressure

LONG Jiaqi¹, ZHAO Wenli¹, PENG Faquan², WU Bei¹, LI Yuebing^{3*}

(1. the Second School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.
2. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005.
3. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005)

【Abstract】 **Objective** To investigate the feasibility and success rate of a rabbit model of acute pulmonary embolism by using a central venous catheter to measure pulmonary artery pressure and assessing the anatomical and pathological changes. **Methods** The central venous catheter was placed into the rabbit pulmonary artery through the internal jugular vein using a guidewire and was connected to the Medlab biological signal acquisition and processing system for dynamic pulmonary artery pressure monitoring. A model of acute pulmonary embolism with relatively consistent severity and embolization range was created by controlling the number of thrombi injected via the catheter to obtain the target pulmonary artery pressure. **Results** The modeling success rate was 100%. After embolization, there were significant

【基金项目】 浙江省中医药科技计划重点项目 (2020ZZ012)。

【作者简介】 龙嘉琪 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 急性肺损伤, 老年患者围术期管理。E-mail: 1694443241@qq.com

【通信作者】 李跃兵 (1972—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 急性肺损伤, 老年患者围术期管理。E-mail: lyb1853@zcmu.edu.cn

changes in the pulmonary artery pressure, blood pressure, and heart rate of the rabbits ($P < 0.05$). Cardiopulmonary anatomic examination confirmed that the catheter was in the main pulmonary artery. Pathological examination revealed thrombi in the pulmonary artery and pulmonary arterioles. **Conclusions** A rabbit model of acute pulmonary embolism was established by inserting a central venous catheter through the jugular vein; this not only ensured the integrity of the thrombi, but also enabled the attainment of continuous and accurate pulmonary artery pressure data and effectively established an animal model with controllable embolization range and severity. This method has a high success rate, is technically simple and economical, and provides an experimental basis for the diagnosis and treatment of acute pulmonary embolism.

【Keywords】 acute pulmonary embolism; pulmonary artery pressure; central venous catheter; animal model; rabbit

急性肺栓塞 (acute pulmonary embolism, APE) 是内源性或外源性栓子堵塞肺循环系统导致的一系列病理生理综合征。它是全球死亡的一个重要原因,仅 2018 年就有 10 万多人死亡^[1]。APE 是西方国家住院患者心血管疾病死亡的第三大常见原因,仅次于冠心病和脑卒中^[2-3]。它起病凶险,因其症状不典型,缺乏特异性,极易漏诊和误诊,病死率高^[4]。早期诊断和干预至关重要,因为大多数 APE 死亡发生在最初几个小时至几天内,70% 以上的死亡发生在 1 h 内^[5]。因此建立一种栓塞范围及严重程度可控的动物模型用于实验研究十分重要,对于新药、新的诊疗器械和方法的开发与评估具有重要意义。目前用于 APE 模型制备的动物有很多,比如猴、猪、狗、兔、鼠等,但兔的纤溶系统、肺组织结构以及血管形态与人类更接近,因此,认为兔模型是 APE 比较理想的模型^[6]。当前,制备 APE 模型的方法也有很多,采用导管测量肺动脉压 (pulmonary arterial pressure, PAP) 是较为常用的方法^[7],但在术中准确测量 PAP 较为困难。Yu 等^[8]、贾振宇等^[9]在 X 线引导下,将导管置入肺动脉监测 PAP,该方法复杂、昂贵且具有放射性。也有人采用传统的颈外静脉置管法测量肺动脉压,其中大部分是根据实验动物的解剖结构直接插管的^[10-11],耗时且成功率较低。本研究是对传统颈静脉插管方法的进一步改进。通过在导丝的引导下将塑形的单腔中心静脉导管置入肺动脉,成功制备了可实时监测 PAP 的兔 APE 模型。此外,建立理想的 APE 模型需要解决两个问题:一是如何将血栓引入肺动脉;二是如何控制肺栓塞的严重程度。本研究有效地解决了这两个难题。既保证了血栓的完整性,又实现了 PAP 的实时动态监测。根据要达到的 PAP 来控制注入血栓的数量,使 APE 模型的严重程度能够“可视化”,有效地建立了栓塞范围和严重程度可控的动物模型。该方法成功率高、操作简单、经济适用,

为急性肺栓塞的诊断和治疗相关研究提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级雄性新西兰兔 6 只,5 月龄,体重 2.5 ~ 3.0 kg,购自新昌县大市聚镇欣健兔场 [SCXK (浙) 2020-0005],饲养于浙江中医药大学滨文校区动物中心普通环境 [SYXK (浙) 2018-0012],温度为 20℃ ~ 25℃,相对湿度为 60% ~ 70%。实验动物的使用遵循了 3R 原则,所有实验操作均获浙江中医药大学动物伦理委员会批准 (IACUC-20201102-03)。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷 (批号:20102001,厂家:深圳市瑞沃德生命科技有限公司);肝素钠 (批号:2006106,厂家:上海上药第一生化药业有限公司)。中心静脉导管套件 (规格:5 Fr、单腔 20 cm、16 Ga,批号:M201000013,厂家:新加坡柏盛国际有限公司);手术器械 (批号:20200802,厂家:张家港市浦伦医疗器械有限公司);Medlab 生物信号采集处理系统 (U/4C501H,南京美易科技有限公司);电热恒温水槽 (CU-600 型,上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 研究设计

选取 6 只雄性新西兰兔来建立一种栓塞范围和严重程度可控的急性肺栓塞兔模型。所有的动物都遵循相同的规程 (如图 1),并作为自身前后对照。术前制备好自体血栓以及对中心静脉导管塑形。麻醉诱导后,行股动脉穿刺,动态监测兔血压和心率。随后在导引钢丝的引导下从兔颈外静脉置入中心静脉导管至肺动脉,并连接 Medlab 生物信号采集系统进行肺动脉压动态监测。麻醉诱导后约 120 min 后,注入自体血栓,当平均肺动脉压达到 25 mmHg 时停止注栓,待稳定后记录血流动力学参数,

评估过程持续时间约为 30 min。约 180 min 时,对兔实施安乐死,并进行心肺解剖,观察中心静脉导管所在位置和血栓分布情况,以及对肺组织行病理检查。

1.3.2 血栓制作

从实验兔耳缘静脉取血 3 mL,装入无菌聚乙烯管中,室温静置 30 min,自凝后,于 37℃ 电热恒温水槽加热 2 h,用手术刀裁剪成直径为 1.5 mm,长为 4 mm 的柱形血栓(如图 2),用无菌生理盐水反复冲洗后,置于 4℃ 冰箱备用。

1.3.3 导管塑形

将缝合针弯曲为半径为 3 mm 左右的圆滑弧型,将塑形好的缝合针置于中心静脉导管的蓝色端,于 60℃ 电热恒温水槽加热 2 h 塑形。自然冷却后,拔出缝合针,导管形状(如图 3),导管前端的弧形有利于导管钩挂于主肺动脉,不容易从肺动脉滑出。导引钢丝前端弯曲的半径为 3 mm 左右的圆滑弧型(如图 4),该弧度与右室壁和肺动脉所形成的弧度相似,可避免导管在右心室内绕圈折返,而更容易进入肺动脉。有研究表明导管

前端弯曲比前端笔直置入时间缩短,并可减少右心耳和右心室穿孔等心血管损伤的风险^[11]。可利用导引钢丝这一特点在其导引下置入中心静脉导管而到达肺动脉。

1.3.4 麻醉

采用 3% 的戊巴比妥钠溶液按 1 mL/kg 的剂量,经耳缘静脉注射麻醉实验兔,麻醉后用棉绳将其四肢固定于手术板上,术中吸入异氟烷和空气的混合气体,用面罩罩住实验兔的嘴巴和鼻子维持麻醉。右侧大腿根部备皮、消毒、铺巾,手术切口右侧腹股沟区皮肤,暴露右侧股动脉,置入 22 G 静脉针,与三通管 Medlab 生物信号采集处理系统相连,监测有创血压,如图 5。

1.3.5 肺动脉置管

常规右侧颈前区备皮、消毒、铺巾,手术切口右侧颈前区皮肤,暴露右侧颈外静脉。于右侧颈外静脉近心端处,采用血管夹阻断血流,待血管充盈后,行远心端结扎,楔形剪开静脉血管,将上述制备的中心静脉导管内充满肝素盐水,插入右侧颈外静脉。由于导管较软,不易通过三尖瓣。此时可将导

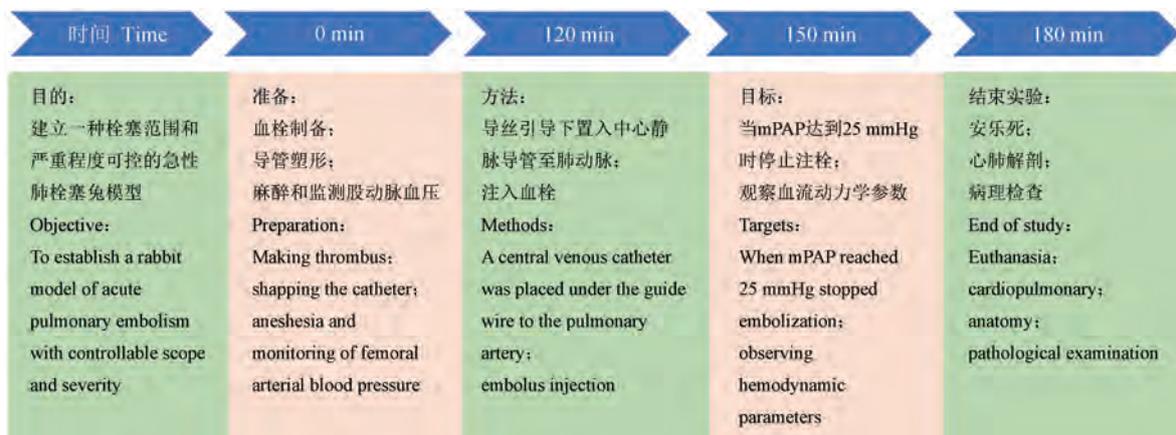


图 1 家兔肺栓塞模型制作流程图

Figure 1 Flowchart of making rabbit pulmonary embolism model

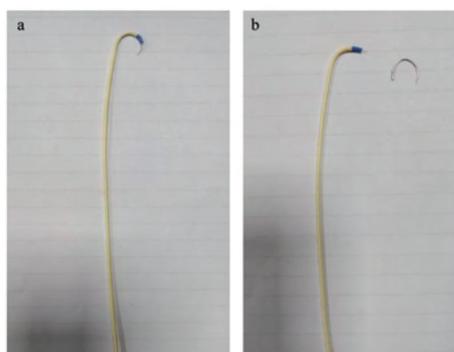


注:a:将血栓从聚乙烯管中取出;b、c:将血栓切成直径为 1.5 mm,长为 4 mm 的柱形血栓。

图 2 血栓制作示意图

Note. a, Removing the thrombus from the polyethylene tube. b/c, Thrombus was cut into a cylindrical thrombus with a diameter of 1.5 mm and a length of 4 mm.

Figure 2 Schematic diagram of thrombus



注:a:将弯曲的缝合针置入中心静脉导管;b:导管水浴冷却后,取出缝合针后导管的形状。

图 3 中心静脉导管塑形

Note. a, Placing the curved suture needle into the central venous catheter. b, Shape of the catheter after cooled.

Figure 3 Shapping the central venous catheter



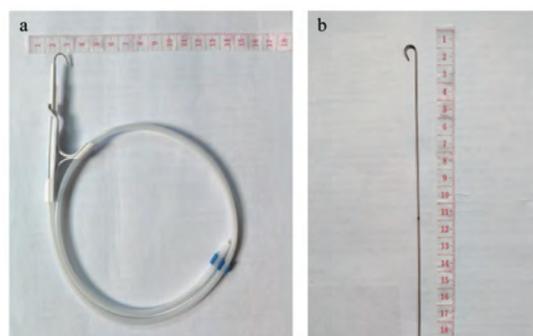
图 5 实验兔麻醉后,于右侧股动脉监测有创动脉血压

Figure 5 After anesthesia, the blood pressure of the femoral artery was monitored

引钢丝置入于中心静脉导管,在导引钢丝的引导下,使中心静脉导管经过右心房、右心室到达肺动脉。插入过程中,保持中心静脉导管和导丝的弧向下方,并根据插管的标记判断到达心脏部位,将插管左旋并向前推进。到达肺动脉后,利用头端的弯曲使导管前端钩挂于肺动脉瓣上,然后退出导引钢丝,将中心静脉导管通过三通管压力换能器和 Medlab 多通道生物信号分析系统相连。此时密切观察生理记录仪显示屏,当压力基线上升并出现肺动脉波形时(如图 6),立即将导管固定,并开始描记肺动脉压。如果插管失败,可将导管回拉 1 cm 左右,再次向前推进,直到出现肺动脉压波形。最后缝合颈部切口。

1.3.6 栓子注入

用注射器经导管注入自体血栓与生理盐水的混合液 5 mL,血栓注入时,控制注入速度,每注入一



注:a:前端弯曲半径为 3 mm 左右的圆滑弧型导引钢丝;b:导引钢丝的整体观。

图 4 导引钢丝

Note. a, A smooth arc guide wire with a front bending radius of about 3 mm. b, Overall view of guide wire.

Figure 4 Guide wire

条血栓间隔 30 s,当注入血栓约 5~7 个,平均肺动脉压达到 25 mmHg 时停止输注。

1.3.7 心肺解剖

数据采集结束后,过量麻醉(3%异戊巴比妥钠 100 mg/kg)处死家兔。解剖心脏及肺动脉,观察导管所在位置以及肺动脉内是否有栓子存在。

1.3.8 病理标本制作

观察肺组织外观,沿肺梗死区寻找血栓,并于血栓所在区域取材,切取肺组织块,灌注冲洗后甲醛固定 48 h,常规乙醇脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。本实验属于自身配对设计,对连续性变量进行正态性检验,符合正态分布的计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 t 检验进行比较;非正态分布计量资料采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型建立结果

6 只实验兔于血凝块注入即刻出现呼吸、心跳加快,血压一过性升高后出现下降,鼻翼扇动,呼吸困难,腹式呼吸加强,伴嘴唇紫绀,双肺可闻及干湿罗音,个别可闻及高调哮鸣音,少数有短暂呛咳,部分可见明显肌肉颤动,持续约 15~30 min 好转。实验观察期间,均无死亡,建模成功率 100%。

2.2 血流动力学指标

记录注栓前后的兔肺动脉压、血压、心率,所得压力波形(如图 7)。

2.3 血流动力学检测结果

对血栓注入前后的血流动力学进行比较, SPAP、DPAP、MPAP 均升高, MBP、SBP、HR 均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 如表 1 和图 8。

2.4 病理结果

2.4.1 肉眼观察

(1) 导管在肺动脉内

打开实验兔胸腔, 剪开右心室, 找到导管末端, 可观察到导管末端钩挂于主肺动脉(如图 9)。

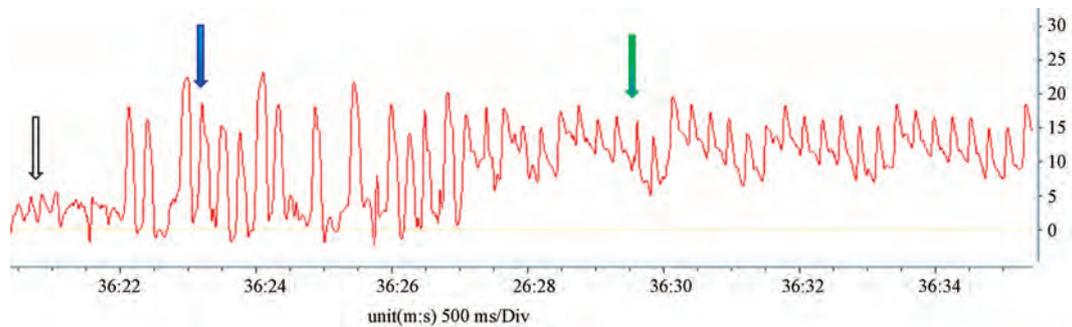
(2) 肺内发现血栓条

对 APE 兔离体肺组织标本进行肉眼观察, 并沿肺动脉走形剪开血管, 寻找血栓。于肺叶动脉及以

上肺动脉内和肺段动脉及以下均发现血栓若干(如图 10)。大多数栓子栓塞于肺动脉段水平, 多分布在膈叶动脉及其前基底段支、外基底段支、后基底段支, 少量分布于尖叶和心叶, 且右叶检塞率明显高于左叶。

2.4.2 显微镜下观察病理改变

对光, 调整好放大倍数, 在光学显微镜下观察兔 APE 肺组织病理改变。显微镜示兔肺动脉管腔内见较大血栓, 以混合血栓为主; 部分血管内皮细胞脱落坏死, 纤维素样变性; 动脉内膜平滑肌细胞部分透明及黏液样变性, 动脉壁增厚, 向腔内形成突起, 弹力纤维增生, 以及左心室壁肥厚(如图 11)。

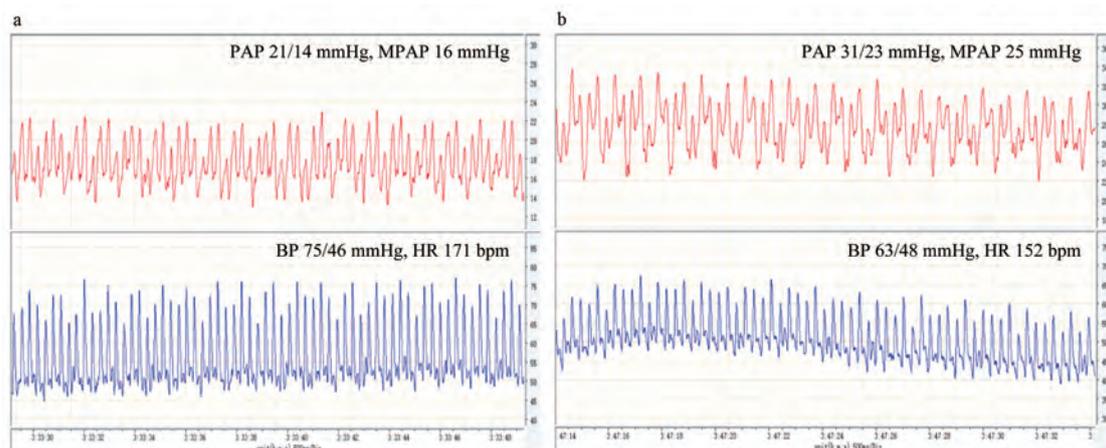


注: 黑色箭头: 导管在右心房, 压力较低; 蓝色箭头: 导管在右心室, 压力曲线波动幅度增大; 绿色箭头: 导管在肺动脉, 压力曲线波动幅度降低(走纸速度 500 ms/Div)。

图 6 从右房至右室再到肺动脉的压力波形变化

Note. Black arrow, Catheter is in the right atrium and the pressure is low. Blue arrow, Catheter is in the right ventricle, and the fluctuation of the pressure curve increases. Green arrow, Catheter in the pulmonary artery, and the fluctuation of the pressure curve decreases (at 500 ms/Div).

Figure 6 Pressure waveform changes from right atrium to right ventricle and then to pulmonary artery



注: a: 某实验兔注栓前的血流动力学参数: PAP: 21/14 mmHg, MPAP: 16 mmHg, BP: 75/46 mmHg, HR: 每分钟 171 次; b: 注入 5 个栓子后实验兔的 MPAP 达到 25 mmHg 停止注栓, 观察 5 min 后的血流动力学参数: PAP: 31/23 mmHg, BP: 63/48 mmHg, HR: 每分钟 152 次(PAP: 肺动脉压; BP: 血压; HR: 心率; 走纸速度为 500 ms/Div)。

图 7 注栓前后血流动力学参数的变化

Note. a, Hemodynamic parameters of an experimental rabbit before embolization. PAP, 21/14 mmHg. MPAP, 16 mmHg. BP, 75/46 mmHg. HR, 171 bpm. b, After the injection of 5 embolus, the MPAP of the experimental rabbits reached 25 mmHg and the embolus was stopped, and the hemodynamic parameters were observed 5 min later. PAP, 31/23 mmHg. BP, 63/48 mmHg. HR, 152 bpm (PAP, Pulmonary arteria pressure. BP, Blood pressure. HR, Heart rate, at 500 ms/Div).

Figure 7 Hemodynamic changes before and after embolization

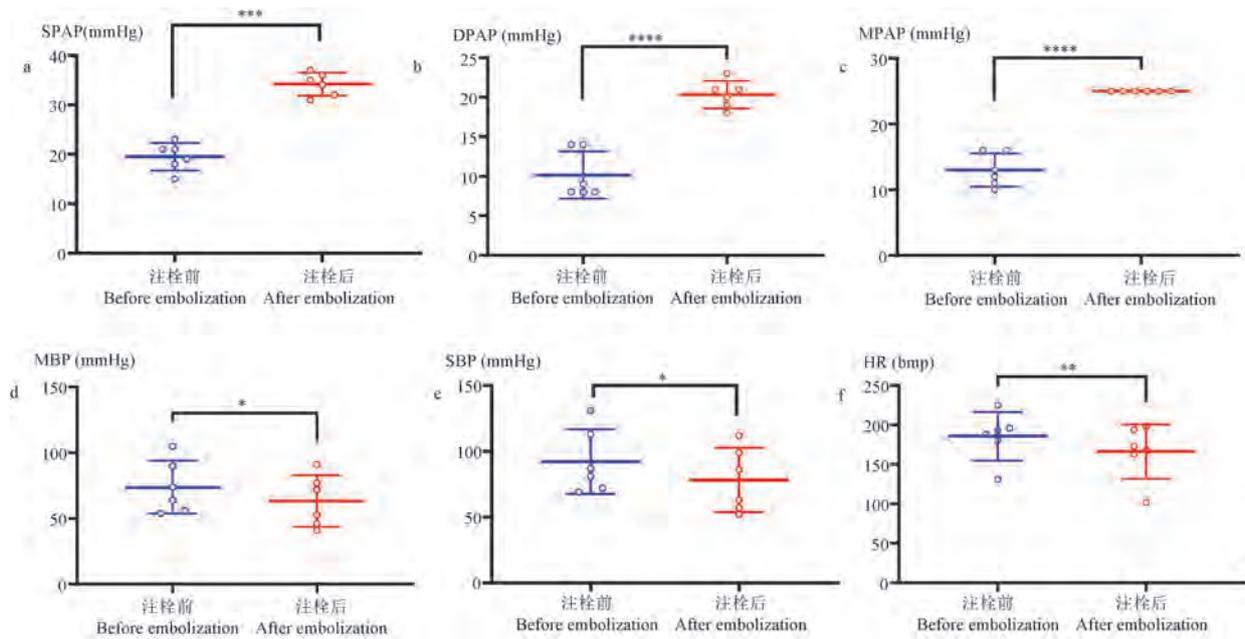
表 1 注栓前后兔 SPAP、DPAP、MPAP、MBP、SBP、HR 的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of SPAP, DPAP, MPAP, MBP, SBP and HR in rabbits before and after embolization

组别 Groups	SPAP (mmHg)	DPAP (mmHg)	MPAP (mmHg)	MBP (mmHg)	SBP (mmHg)	HR (bpm)
注栓前 Before embolization	19.5±2.8	10.2±3.0	13.0±2.5	73.8±20.2	92.2±24.6	185.7±30.7
注栓后 After embolization	34.2±2.3	20.3±1.76	25.0±0.0	63.3±19.7	78.2±24.5	166±34.5
t 值 t value	-7.546	-12.200	-11.619	3.548	3.863	4.963
P 值 P value	<0.001	<0.0001	<0.0001	<0.05	<0.05	<0.01

注: SPAP; 肺动脉收缩压; DPAP; 肺动脉舒张压; MPAP; 平均肺动脉压; MBP; 平均动脉压; SBP; 动脉收缩压; HR; 心率。

Note. SPAP, Systolic pulmonary artery pressure. DPAP, Diastolic pulmonary artery pressure. MPAP, Mean pulmonary arterial pressure. MBP, Mean arterial pressure. SBP, Systolic arterial pressure. HR, Heart rate.

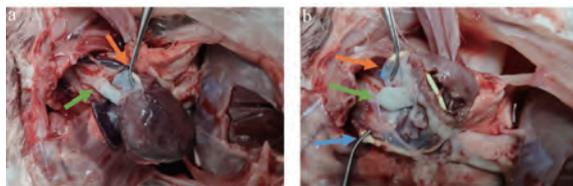


注: a~f: 兔注栓前与注栓后 SPAP、DPAP、MPAP、MBP、SBP、HR 的变化; c: 根据目标肺动脉压 25 mmHg, 来控制注入栓子的数目, 因此注栓后的肺动脉压都是相同的。与注栓前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 8 注栓前后兔的 SPAP、DPAP、MPAP、MBP、SBP、HR 变化趋势的比较 ($n=6$)

Note. a~f, Changes of SPAP, DPAP, MPAP, MBP, SBP and HR in rabbits before and after embolization. c, Controls the number of embolus injection according to the target pulmonary artery pressure of 25 mmHg, so the pulmonary artery pressure after embolization is the same. Compared with before embolization, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 8 Comparison of SPAP, DPAP, MPAP, MBP, SBP and HR before and after embolization

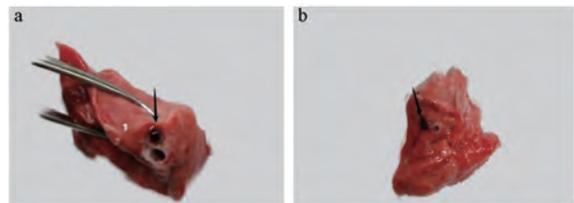


注: a: 打开胸腔后心肺的示意图; b: 剪开右心室, 暴露导管。黄色箭头: 肺动脉; 绿色箭头: 主动脉; 蓝色箭头: 上腔静脉。

图 9 实验兔的心肺解剖

Note. a, Schematic diagram of heart and lung after opening the chest. b, Cut open the right ventricle to expose the catheter. Yellow arrow, Pulmonary artery. Green arrow, Aorta. Blue arrow, Superior vena cava.

Figure 9 Cardiopulmonary anatomy of experimental rabbits

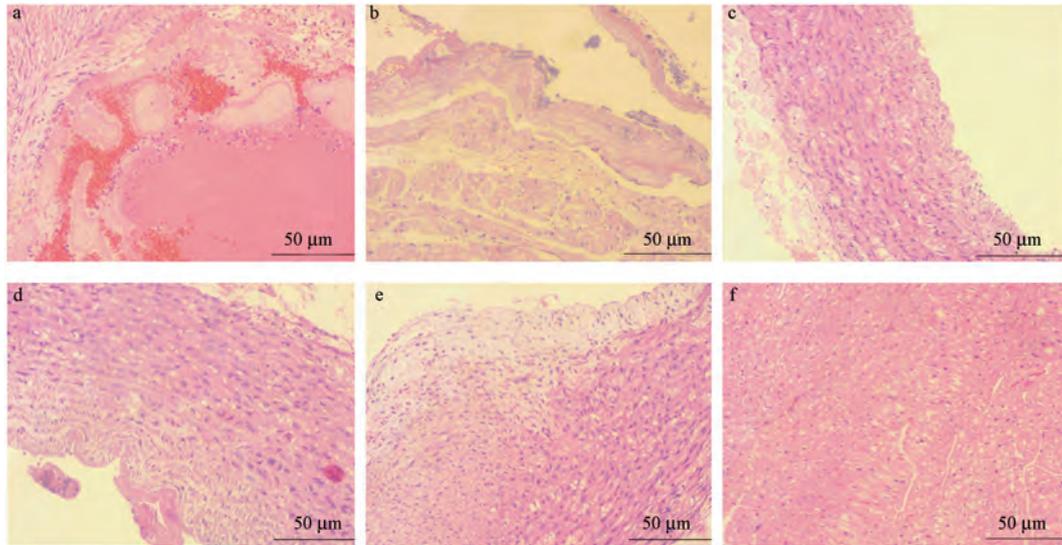


注: a: 左下肺发现血栓; b: 右下肺发现血栓。黑色箭头: 血栓。

图 10 肺内发现血栓条

Note. a, Thrombus was found in the left lower lung. b, Thrombus was found in the right lower lung. Black arrows, Thrombus.

Figure 10 Thrombus strips found in lung



注:a:肺动脉血栓形成;b:内皮细胞坏死脱落,血栓形成;c:动脉壁增厚,部分内皮细胞脱落;d:内皮细胞脱落,纤维素样变性;e:动脉壁增厚,向腔内突起;f:左心室壁增厚。

图 11 图 11 肺栓塞后实验兔肺组织病理改变(HE 染色)

Note. a, Pulmonary artery thrombosis. b, Endothelial cell necrosis and shedding, thrombosis. c, Arterial wall thickening, partial endothelial cell shedding. d, Endothelial cells abscission and fibrinoid degeneration. e, Arterial wall thickening and protruding into the lumen. f, Left ventricular wall thickening.

Figure 11 Pathological changes of experimental rabbit lung tissue after pulmonary embolism(HE staining)

3 讨论

在研究中,我们通过中心静脉导管建立了肺动脉栓塞的“可视化”模型。建模成功率高达 100%。如图 9 所示,心肺解剖证实导管位于肺动脉主干。如图 10、图 11 所示,组织病理学检查显示肺动脉和肺小动脉血栓形成,是诊断肺栓塞的金标准。稳定可靠的动物模型是研究 APE 发病机制和评估药物治疗的重要手段。建立理想的 APE 模型需要解决两个主要的问题:将栓子确切地引入肺动脉和有效地控制肺栓塞的严重程度。我们的发现有助于解决这些问题。首先,该方法确保了栓子的完整性。通过从颈外静脉置入中心静脉导管至肺动脉,自体血栓在进入肺动脉前一直在导管中流动,避免了其分解和自溶;另外,导管尖端位于肺动脉,血栓会确切地进入肺动脉。其次,值得注意的是,以往多根据肺血管内血栓的形状、分布、及血栓量来评估 APE 的病情严重程度是不准确的,由于血栓量的多少与病情的严重程度并不一定呈平行关系^[12]。肺动脉压对急性肺栓塞的严重程度和危险分层有一定的指导作用^[13-14]。因此在本研究中,采用的是控制相同的 PAP 的方法来确保肺栓塞的严重程度一致。

肺栓塞引起的肺动脉压的改变是肺循环障碍的重要临床表现和诊断依据^[15]。在心脏的 4 个腔室的右心室栓塞是最危险的,表现出更多的血流动力学不稳定性^[16]。栓子从右心室脱出,栓塞肺血管,导致肺血管横截面积减少,肺血管阻力渐进性增加。肺动脉有比较好的代偿功能,当栓子比较小且量不多时,肺动脉的横截面积减少低于 30% 时不会引起肺动脉压力升高;但当栓子比较大且量较多时,导致栓塞面积过大,肺动脉的横截面积减少超过 30%~50% 时,会使肺动脉压力升高^[17]。因此,肺动脉压监测被广泛应用于肺栓塞和肺动脉高压的诊断和治疗评价^[18]。右心导管测量 MPAP 是诊断肺动脉高压的金标准。肺动脉高压的血流动力学诊断标准为右心导管在海平面静止时测得的 MPAP 为 25 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)^[19]。故在本研究中,当 MPAP 超过 25 mmHg 时即停止注入栓子。

通常用于引入栓子的外周静脉为耳缘静脉、颈外静脉或股静脉等,但由于受限于外周静脉血管的直径,仅能引入直径较小的栓子,造成周围性肺栓塞。虽然通过节段性阻断下腔静脉能够在原位形成较大血栓,释放后形成中央型肺栓塞,但是这种方法操作繁琐,并且栓子大小不容易控制,肺动脉

栓塞程度难以一致。兔的肺动脉分支较小,主肺动脉直径约为 4~8 mm,左、右肺动脉主干约为 2.5~5.0 mm,肺段动脉为 1.0~2.5 mm。因此本研究将自体血栓剪成 1.5 mm×1.5 mm×4 mm 的柱形血栓,一方面可以保证栓子不阻塞肺动脉主干,防止急性右心衰竭而致死亡;另一方面,自体血栓经中心静脉导管送入主肺动脉处,血栓能确切地进入肺动脉并避免了血栓的自溶,尸检及病理学检查均显示栓子较恒定地嵌顿于双侧下肺动脉内,因此不同个体间肺栓塞程度趋于一致。该方法成功地模拟了人类肺栓塞的形成过程,同时通过肺动脉压控制肺栓塞面积不至于过大。

本研究是对传统颈静脉插管方法的进一步改进。通过放置中心静脉导管和导丝,成功制备了可实时监测 PAP 的兔 APE 模型。该模型具有以下优点:第一,导丝前端塑形的弧度与右室壁和肺动脉所形成的弧度相似,便于进入肺动脉,避免在心室内折返。此外,导丝具有良好的韧性和可控性。与直接置管相比,避免了软导管造成的置管困难,可显著缩短手术时间。第二,中心静脉导管前端的弯弧可使其更牢固地钩住肺动脉瓣,避免其从肺动脉脱垂。第三,导管前端放置于目标肺血管,可选择性地置入肺血栓主体中,为局部接触性溶栓、碎栓和吸栓等肺动脉腔内介入治疗提供便捷的操作,对评价导管技术及药物干预措施等 APE 诊治的相关研究提供实验基础^[20]。第四,模型的栓塞范围和严重程度可控。因此,该方法对 APE 的研究具有较高的科学和临床价值。然而,本研究方案也存在一定的局限性,由于实验设备的不足,未能测定家兔的心排量和分析其血气变化,若在后续的研究中进行补充,将会使该肺栓塞模型更加完善以及具有更加重要的临床指导意义。

综上所述,此种方法建立的 APE 模型操作方便、成功率较高、经济适用。通过导引钢丝引导,中心静脉导管较容易置入到肺动脉,且能实时、连续监测 PAP。根据所要达到的 PAP 来控制注入栓子的数量,使 APE 模型的严重程度变得“可视化”。因此,本研究很好地解决了 APE 模型制备的两大难题,既保证了栓子能确切地进入肺动脉,又有效地控制了肺栓塞的严重程度,是一种稳定性和可靠性较高的急性肺栓塞模型。本方法操作简便且接近真实的病理状态,具有很高的科研价值和可行性,可作为动物实验研究及临床研究的理想模型。

参考文献:

- [1] LeVarge BL, Wright CD, Rodriguez-Lopez JM. Surgical management of acute and chronic pulmonary embolism [J]. Clin Chest Med, 2018, 39(3): 659-667.
- [2] Raskob GE, Angchaisuksiri P, Blanco AN, et al. Thrombosis: a major contributor to global disease burden [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(11): 2363-2371.
- [3] Wendelboe AM, Raskob GE. Global burden of thrombosis: epidemiologic aspects [J]. Circ Res, 2016, 118(9): 1340-1347.
- [4] Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, et al. Corrigendum to: 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism [J]. Eur Heart J, 2015, 36(39): 2642.
- [5] Fukuda I, Daitoku K. Surgical embolectomy for acute pulmonary thromboembolism [J]. Ann Vasc Dis, 2017, 10(2): 107-114.
- [6] 缪冉, 翟振国. 慢性血栓栓塞性肺动脉高压动物模型研究进展 [J]. 中华医学杂志, 2015, 95(6): 474-476.
- [7] 吕翠平, 杨慧, 董小黎. 兔急性肺血栓栓塞模型建立及右心室压和心电图监测 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(11): 27-30, 83.
- [8] Yu D, Wang Y, Yu Y, et al. Acute beneficial effects of sodium nitroprusside in a rabbit model of massive pulmonary embolism associated with circulatory shock [J]. Am J Pathol, 2018, 188(8): 1768-1778.
- [9] 贾振宇, 赵林波, 卢光东. 不同程度急性肺动脉栓塞犬模型右心室功能变化的实验研究 [J]. 影像诊断与介入放射学, 2016, 25(1): 5-8.
- [10] Li LS, Lou YM, Liu J. Icarin inhibits pulmonary hypertension induced by monocrotaline through enhancement of NO/cGMP signaling pathway in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 7915415.
- [11] Tontodonati M, Ridley D, Remie R, et al. Improved method for the catheterization of the right ventricle in a rat model of pulmonary artery hypertension [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2020, 30(4): 535-537.
- [12] Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, et al. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the task force for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. Eur Heart J, 2008, 29(18): 2276-2315.
- [13] Tamura Y, Kumamaru H, Abe K, et al. Improvements in French risk stratification score were correlated with reductions in mean pulmonary artery pressure in pulmonary arterial hypertension: a subanalysis of the Japan Pulmonary Hypertension Registry (JAPHR) [J]. BMC pulmonary medicine, 2021, 21(1): 28.
- [14] Zhou W, Lin D, Zhong Z, et al. Roles of TRAFs in ischemia-reperfusion injury [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 586487.

(下转第 39 页)

欧阳辰昕,王城,朱芮樟,等. 妊娠期糖尿病致子代先天性肾脏及尿路畸形大鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (10): 32-39.

Ouyang CX, Wang C, Zhu RZ, et al. Establishment of a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract in offspring due to gestational diabetes mellitus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 32-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.005

妊娠期糖尿病致子代先天性肾脏及尿路畸形 大鼠模型的建立

欧阳辰昕^{1,2}, 王 城^{1,2}, 朱芮樟^{1,2}, 廖君左¹, 敬 鹏¹, 何文飞¹, 赵 丹^{1,2*}

(1. 川北医学院附属医院小儿外科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院肝胆胰肠研究所, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探索建立妊娠期糖尿病(GDM)致子代先天性肾脏及尿路畸形(CAKUT)SD大鼠模型的可行性。方法 自然合笼受孕的SD大鼠孕鼠30只,于孕1.5d一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ),据STZ浓度将孕鼠随机分为5组:STZ 30 mg/kg组、STZ 35 mg/kg组、STZ 40 mg/kg组、溶剂对照组(注射同剂量溶剂柠檬酸钠缓冲液)、空白对照组(不注射任何液体),每组6只,孕期监测孕鼠体重、血糖、流产情况。分娩第1天,记录子鼠存活率,解剖子鼠并观察泌尿系统畸形情况;子鼠横截面HE染色,多切面观察肾、输尿管异常情况,测量子鼠肾皮质厚度。结果 STZ 30、35、40 mg/kg 3组子鼠均观察到输尿管扩张积水(双侧均达单侧3倍以上)及肾发育不良,输尿管总积水率均超70%,HE染色镜下表现为输尿管扩张积水、输尿管壁发育不良、肾实质变薄、肾皮质厚度降低(较空白对照组减少20%以上)。3组孕鼠血糖均达建模标准,其中STZ 30 mg/kg组血糖均值低于40 mg/kg组($P < 0.05$);STZ 35 mg/kg组血糖孕早期低于STZ 40 mg/kg组($P < 0.05$),在孕中晚期无差异($P > 0.05$)。仅STZ 40 mg/kg组孕鼠流产(流产率33.33%),3组子鼠存活率均低于空白对照组($P < 0.05$)。结论 GDM大鼠子代CAKUT模型的建立具备可行性,SD大鼠孕1.5d一次性腹腔注射STZ 30 mg/kg方案,能安全稳定地使子鼠发生输尿管积水(单侧或双侧)和肾发育不良。

【关键词】 妊娠期糖尿病;先天性肾脏及尿路畸形;链脲佐菌素;子代;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0032-08

Establishment of a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract in offspring due to gestational diabetes mellitus

OUYANG Chenxin^{1,2}, WANG Cheng^{1,2}, ZHU Ruizhang^{1,2}, LIAO Junzuo¹, JING Peng¹, HE Wenfei¹, ZHAO Dan^{1,2*}

(1. Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China.

2. Institute of Hepatobiliary and Pancreaticoenteric Research, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

【Abstract】 **Objective** To explore the feasibility of establishing a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract (CAKUT) in offspring due to gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** Thirty naturally conceived SD rats were randomly divided into five groups by the concentration of streptozotocin (STZ) administered through a single intraperitoneal injection on day 1.5 of gestation: 30 mg/kg STZ, 35 mg/kg STZ, 40 mg/kg STZ, solvent control (injected with the same dose of sodium citrate buffer), and blank control (not injected with any liquid) group ($n = 6$ in

【基金项目】四川省卫生健康委员会科研课题(20PJ147);南充市科技项目市校科技战略合作专项(19SXHZ0113)。

【作者简介】欧阳辰昕(1992—),男,硕士,研究方向:小儿泌尿、小儿普外。E-mail:534452086@qq.com

【通信作者】赵丹(1982—),男,硕士,研究方向:小儿泌尿、小儿普外。E-mail:zd_5404@163.com

each group). Weight, blood glucose and abortion of pregnant rats were monitored during pregnancy. On the first day of delivery, the survival rates of offspring were calculated. Offspring were dissected and assessed for abnormalities of the urinary tract. HE staining of cross-sections of the offspring was performed, and renal and ureteral abnormalities were observed and recorded in multiple sections. Renal cortical thickness was measured in offspring. **Results** Ureteral dilatation and effusion (bilateral up to more than three times of unilateral) and renal dysplasia were observed in 30, 35 and 40 mg/kg STZ groups, and the total rates of ureteral effusion were >70%. HE staining revealed dilatation and effusion of the ureter, dysplasia of the ureteral wall, thinning of the renal parenchyma, and a reduction in the renal cortical thickness (more than 20% reduction compared with the blank control group). The blood glucose of all three groups reached the modeling standard, among which the mean blood glucose of the 30 mg/kg STZ group was lower than that of the 40 mg/kg STZ group ($P < 0.05$). Blood glucose in the 35 mg/kg STZ group was lower than that in the 40 mg/kg STZ group during early pregnancy ($P < 0.05$), and there was no difference during middle and late pregnancy ($P > 0.05$). Only pregnant rats in the 40 mg/kg STZ group aborted (33.33% abortion rate), and survival rates in all three groups were lower than that in the blank control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Establishment of a CAKUT model in offspring of GDM rats is feasible, and one intraperitoneal injection of 30 mg/kg STZ on day 1.5 of gestation in SD rats safely and stably causes ureteral effusion (unilateral or bilateral) and renal dysplasia in offspring.

【Keywords】 gestational diabetes mellitus; congenital kidney and urinary tract malformation; streptozotocin; offspring; rat

先天性肾脏及尿路畸形 (Congenital abnormalities of the kidney and urinary tract, CAKUT), 是对一系列先天性泌尿系统畸形的统称, 约占全部先天性畸形的 20%~30%^[1], 主要包括肾发育不良、先天性输尿管积水、多囊肾、肾盂输尿管连接部梗阻、重复肾/肾盂/输尿管、输尿管膀胱连接部梗阻、膀胱输尿管反流以及后尿道瓣膜等, 当前 CAKUT 发生机制研究主要集中在经典遗传学领域, 如基因突变、基因拷贝数变异、染色体变异等^[2-3], 随着表观遗传学理论的普及, 宫内环境因素对子代 CAKUT 的诱发机制, 逐渐成为关注热点, 其中也包括妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)。

GDM 是孕妇在妊娠期间首次发现的糖耐量异常, 是妊娠期常见的合并症之一^[4-5], 其在发展中及发达国家的发病率均逐年上升^[6-8], 可对母亲及子代产生长远危害, 其导致的畸形包括手足多指畸形、脊柱缺损、消化道畸形、神经系统畸形、先天性心脏病、先天性肾脏及尿路畸形等。国外 meta 分析指出: GDM 母亲子代患 CAKUT 的风险较正常人增加 39%^[9]。因此, 探索建立稳定有效的实验动物模型成为研究 GDM 导致子代 CAKUT 的第一步, 然而国外关于建立此类动物模型的研究报道不多, 国内尚无报道, 故本研究以此出发, 旨在探索并建立 GDM 导致子代 CAKUT 的稳定 SD 大鼠模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 10 周龄 SD 大鼠, 雌鼠 36 只, 雄鼠 18 只, 体重 240~260 g, 均购自川北医学院实验动物中心 [SCXK(川)2018-18], 饲养于川北医学院实验动物中心 [SYXK(川)2018-076], 饲养环境: 温度 20℃~25℃, 湿度约 50%, 12 h 昼夜明暗交替。饲料由动物中心统一供应 (北京科澳协力)。实验经川北医学院动物伦理审查委员批准 (IACUC-2022-03), 实验过程中对动物遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 上海源叶); pH 4.5 柠檬酸钠缓冲液 (北京索莱宝); 亚甲蓝注射液 (江苏济川); 4% 多聚甲醛 (安徽白鲨)。血糖仪及试纸 (湖南三诺, 安准型); 体视显微镜 (深圳奥斯微, T1-HD202); 正置显微镜 (日本尼康, Eclipse 55i); 电子分析天平 (上海良平, D1067428); 石蜡包埋机及冷冻台 (江苏普瑞斯星, PBM-A); 石蜡切片机 (德国莱卡, RM2245)。

1.3 实验方法

1.3.1 GDM 母鼠模型的构建

于晚间 20:00 将雌鼠与雄鼠 1:1 自然合笼, 次日晨 8:00 观察阴栓情况, 发现阴栓, 则记为孕 0.5 d (E 0.5)。按照受孕被检顺序, 选择 30 只孕鼠, 根据随机数字表法分到 5 组中 (STZ 30 mg/kg 组、STZ 35 mg/kg 组、STZ 40 mg/kg 组、溶剂对照组、空白对

对照组), 每组 $n=6$ 。于 E 0.5 晚予以禁食(不禁水), 时长 14~16 h, E 1.5 根据 STZ 剂量分组情况, 予孕鼠一次性腹腔内注射柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5)配置的 1% STZ 溶液(1 mL 柠檬酸钠缓冲液溶入 10 mg STZ), 其中溶剂对照组注射等量柠檬酸钠缓冲液, 空白对照组不予注射任何液体。注射后, 5 组孕鼠均禁食 4 h(不禁水), 4 h 后予正常饮水、喂食。E 1.5、E 3.5、E 6.5、E 9.5、E 12.5、E 15.5、E 18.5 孕鼠尾尖采血监测随机血糖并记录孕鼠体重变化情况。成模标准: 孕期 3 次随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L。喂养期间若发现母鼠未孕, 予以剔除出组并补充至 $n=6$ 。

1.3.2 子鼠泌尿系统形态学观察

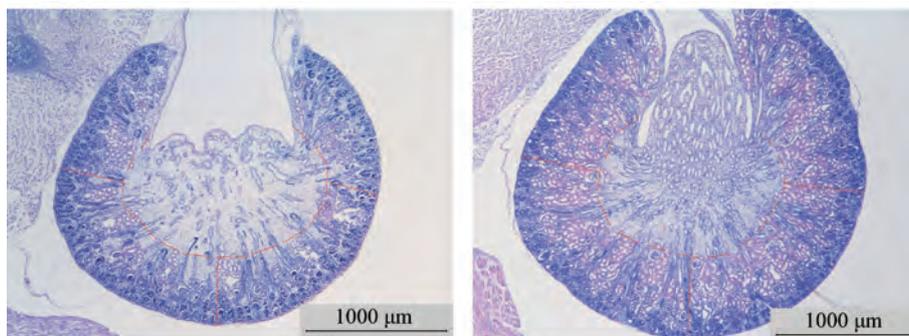
子鼠出生当天, 计算子鼠存活率(活仔数/产仔数), 颈椎脱臼法处死, 体视显微镜下操作, 子鼠仰卧位, 1 mL 针头固定四肢, 行下腹正中切口进入腹腔, 切口向上延伸至胸骨下缘, 棉签将腹腔内肝、胃肠道等脏器上拨, 修剪两侧腹壁及多余组织, 暴露后腹膜及泌尿系统, 记录畸形种类、数量, 亚甲蓝染色 30 s, Image view 软件拍照。

1.3.3 子鼠肾、输尿管 HE 染色及观察

子鼠泌尿系统连同躯干用 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规脱水、透明、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色(HE 染色), 显微镜观察, NIS-Elements 软件采集图像。

1.3.4 子鼠肾皮质厚度测量

按等距原则随机抽取子鼠肾门横截面 HE 切片, 每组 3 张, 每张测量一侧肾, 每个肾取点 3 处, 如图 1, 用环状虚线标记肾皮髓质交界, 肾乳头方向记为 0° , 顺时针 90° 、 180° 、 270° 定位 3 处, 从定位点向各自对应肾被膜作垂直线段, 线段长度即为肾皮质厚度, NIS-Elements 软件测量。



注: 环状红线圈外: 肾皮质。

图 1 肾皮质厚度测量方式图解

Note. Outside the circular red line, Renal cortex.

Figure 1 Illustration of renal cortical thickness measurement modality

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23 对数据进行统计分析, 计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 描述, 多样本计量资料采用单因素方差分析, 对不满足正态性、方差齐性者, 采用非参数检验; 计数资料率的统计采用卡方检验, 对超 1/4 单元格样本量不足 5 的, 采用 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 各组孕鼠孕期体重变化

随孕期进展, 各组孕鼠体重均逐渐上升, 且 STZ 30、35、40 mg/kg 3 组均有不同程度“多饮、多食、多尿”症状。STZ 40 mg/kg 组 2 只孕鼠在孕中晚期流产, 变化不纳入统计。各时间点组间孕鼠体重无统计学差异($P>0.05$), 见表 1。

2.2 孕鼠血糖值对比

STZ 30、35、40 mg/kg 3 组孕鼠血糖均符合建模浓度, 且血糖均显著高于空白对照组($P<0.05$), 其中 40 mg/kg 组多次测血糖超血糖仪测定范围(>33.3 mmol/L, 表显“H1”), 并有 2 只孕鼠在孕中晚期流产。各组孕鼠随机血糖变化情况见表 2, 溶剂对照组与空白对照组各时间点相比, 无统计学差异($P>0.05$)。STZ 30 mg/kg 组与 35 mg/kg 组各时间点相比, 无统计学差异($P>0.05$)。STZ 40 mg/kg 组各时间点均显著高于 STZ 30 mg/kg 组($P<0.05$)。STZ 35 mg/kg 组与 40 mg/kg 组相比, 在孕中晚期, 有两个时间点(E 12.5 和 E 18.5) 血糖值差异无统计学意义($P>0.05$), 这与 STZ 40 mg/kg 组孕鼠超出血糖仪检测范围的血糖值仅以 33.3 mmol/L 统计有关, STZ 40 mg/kg 组孕期血糖值实际可能更高。

2.3 孕鼠分娩情况

各组孕鼠分娩情况见表 3、表 4, STZ 40 mg/kg 组 2 只孕鼠于孕中晚期流产, 流产率为 33.3%, 其余各组孕鼠流产率均为 0。STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠存活率均低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠存活率无差异 ($\chi^2 = 0.659, P > 0.05$)。

2.4 子鼠泌尿系统畸形情况

体视显微镜下解剖活产子鼠, 溶剂对照组及空

白对照组输尿管均呈正常形态(图 2A), STZ 30、35、40 mg/kg 3 组均观察到输尿管扩张积水(图 2B 为双侧, 图 2C 为单侧)。表 5 为输尿管积水情况, STZ 30、35、40 mg/kg 3 组扩张积水总发生率均高于空白对照组 ($P < 0.05$) 且均达 70% 以上; 比较 STZ 30、35、40 mg/kg 3 组间输尿管积水构成比无差异 ($\chi^2 = 1.384, P > 0.05$), 即 3 组单侧积水率无差异、双侧积水率无差异, 且 3 组的双侧输尿管积水发生率均达单侧的 3 倍以上。

表 1 各组孕鼠不同时间点体重情况 ($\bar{x} \pm s, g$)

Table 1 Weight of pregnant rats in each group at different periods

组别 Groups	总只数(n) Total number	孕 1.5 d E 1.5	孕 3.5 d E 3.5	孕 6.5 d E 6.5	孕 9.5 d E 9.5	孕 12.5 d E 12.5	孕 15.5 d E 15.5	孕 18.5 d E 18.5
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	6	241.67±11.69	251.67±16.02	251.67±7.53	261.67±7.53	273.33±5.16	295.00±18.71	336.67±12.11
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	6	240.00±15.49	246.67±17.51	260.00±23.66	278.33±18.35	280.00±20.98	293.33±19.66	338.33±23.17
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	4	240.00±8.16	247.50±5.00	252.50±5.00	258.75±6.29	270.00±8.16	292.5±9.57	322.50±5.00
溶剂对照组 Solvent control group	6	243.33±5.16	251.67±7.53	258.33±7.53	268.33±7.53	276.67±5.16	301.67±7.53	346.67±16.33
空白对照组 Blank control group	6	238.33±4.08	246.67±5.16	253.33±5.16	265.00±8.37	270.00±6.32	293.33±5.16	340.00±10.95

表 2 各组孕鼠随机血糖对比 (mmol/L, $n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of random blood glucose in each group of pregnant rats

组别 Groups	孕 1.5 d E 1.5	孕 3.5 d E 3.5	孕 6.5 d E 6.5	孕 9.5 d E 9.5	孕 12.5 d E 12.5	孕 15.5 d E 15.5	孕 18.5 d E 18.5
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	2.82±0.88	19.77±1.23*	20.82±2.39*	20.87±2.51*	21.60±1.49*	22.48±3.15*	22.62±2.84*
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	3.83±1.00	22.68±2.17*	22.92±2.99*	22.58±1.17*	24.88±3.96*	22.63±3.37*	27.82±3.55*
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	3.23±1.45	29.63±2.90* [△]	29.60±3.17* [△]	32.30±1.75* [△]	30.37±2.85* [△]	30.02±2.81* [△]	31.17±3.35* [△]
溶剂对照组 Solvent control group	3.17±0.87	5.67±0.71 [△]	5.88±0.38 [△]	6.17±0.71 [△]	5.90±0.65 [△]	5.57±0.81 [△]	5.37±0.59 [△]
空白对照组 Blank control group	3.45±0.40	5.78±0.67 [△]	5.97±0.80 [△]	5.52±0.60 [△]	5.58±0.55 [△]	5.57±0.63 [△]	4.98±0.37 [△]

注: 与空白对照组相比, * $P < 0.05$; 与 STZ 30 mg/kg 组相比, [△] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. Compared with the 30 mg/kg STZ group, [△] $P < 0.05$.

表 3 孕鼠流产情况 ($n=6$)

Table 3 Abortion of pregnant rats

组别 Groups	流产只数(n) Number of abortions	流产率 Miscarriage rate
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	0	0
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	0	0
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	2	33.33%
溶剂对照组 Solvent control group	0	0
空白对照组 Blank control group	0	0

表 4 各组子鼠存活率

Table 4 Survival rate of offspring rats in each group

组别 Groups	产仔数(n) Number of births	活仔数(n) Number of live births	存活率 Survival rate
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	80	73	91.25%
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	79	71	89.87%
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	45	39	86.67%
溶剂对照组 Solvent control group	77	76	98.70%
空白对照组 Blank control group	72	70	97.22%

2.5 子鼠肾及输尿管 HE 染色组织形态学观察

2.5.1 镜下子鼠肾、输尿管异常

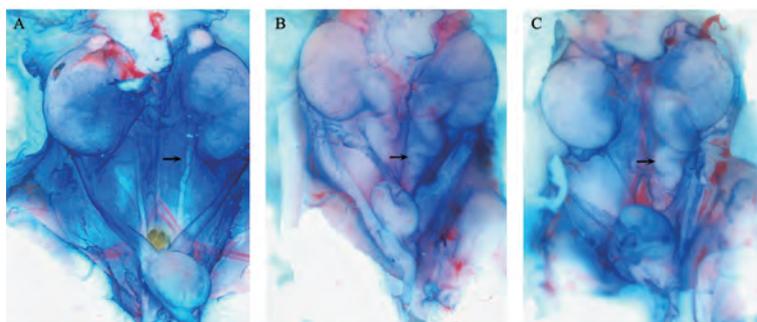
子鼠肾门部横截面 HE 染色全景图见图 3A, STZ 30、35、40 mg/kg 3 组均观察到输尿管扩张积水,肾发育不良(图 3B)。

与溶剂对照组及空白对照组相比,STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠肾实质发育不良,皮质变薄(图 4A、图 4B),输尿管结构异常,表现为管壁发育不

良,细胞层数减少(图 4C、图 4D)。

2.5.2 子代肾皮质厚度测定

测量方式见本文 1.3.4。如图 5 所示,STZ 30、35、40 mg/kg 3 组肾皮质厚度两两比较均无差异($P>0.05$);溶剂对照组及空白对照组皮质厚度无差异($P>0.05$)。STZ 30、35、40 mg/kg 3 组分别与空白对照组进行两两比较,肾皮质厚度均小于空白对照组($P<0.05$),厚度减少量均在 20%以上。



注:A:正常输尿管;B:双侧输尿管积水;C:单侧输尿管积水。→:输尿管。

图 2 子鼠输尿管示意图

Note. A, Normal ureter. B, Bilateral ureteral effusion. C, Unilateral ureteral effusion. →, Ureter.

Figure 2 Illustration of the ureter of the offspring rats

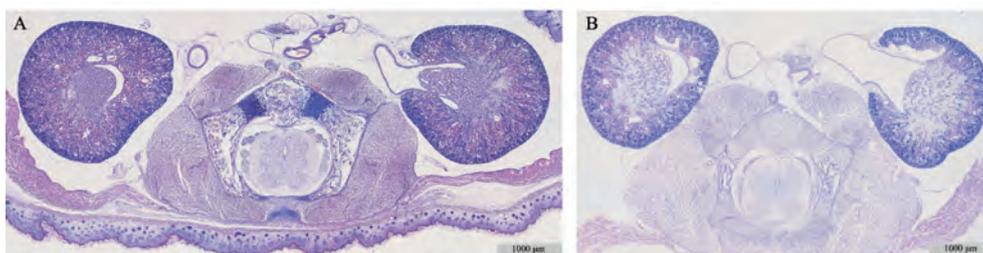
表 5 活产子鼠输尿管积水情况

Table 5 Ureteral effusion in surviving offspring rats

组别 Groups	单侧积水数 Unilateral ureteral effusions number	双侧积水数 Bilateral ureteral effusions number	总积水数 Total ureteral effusion number	正常数 Normal ureteral number
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	13(17.8%)	45(61.6%)	58(79.5%)	15(20.5%)
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	10(14.1%)	44(62.0%)	54(76.1%)	17(23.9%)
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	7(17.9%)	26(66.7%)	39(84.6%)	6(15.4%)
溶剂对照组 Solvent control group	0	0	0	76(100%)
空白对照组 Blank control group	0	0	0	70(100%)

注:():占所在组比例。

Note. (), Proportion in its group.

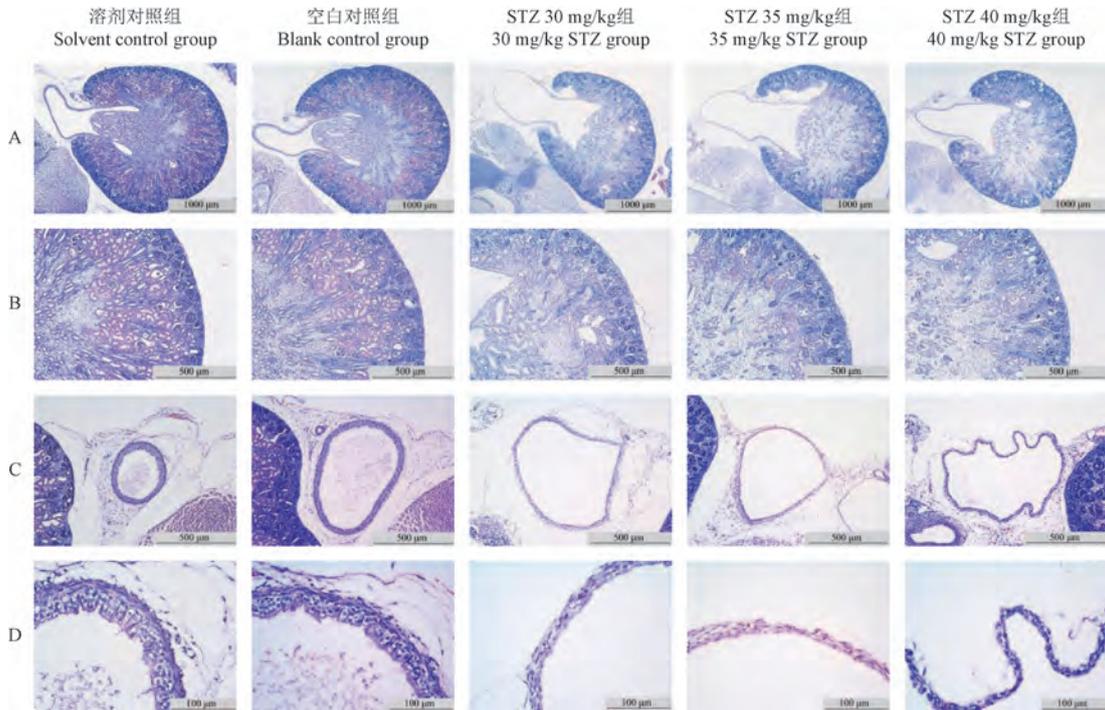


注:A:正常的肾及输尿管;B:输尿管积水、肾发育不良。

图 3 子鼠肾门部横截面全景图(HE 染色)

Note. A, Normal kidney and ureter. B, Ureteral effusion and renal dysplasia.

Figure 3 Cross-sectional panoramic view of the kidney hilum of the offspring rats (HE staining)

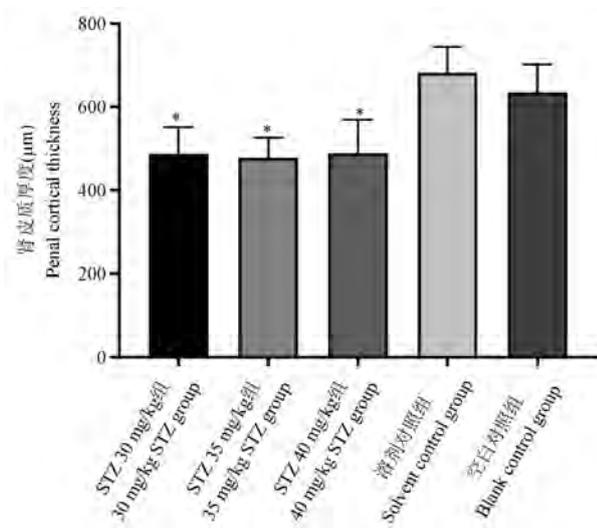


注:A、B: 肾门面横截面;C、D: 肾外输尿管横截面。

图 4 子鼠肾、输尿管横截面(HE 染色)

Note. A/B, Cross-sections of the kidney hilum. C/D, Cross-sections of the extra-renal ureter.

Figure 4 Kidney and ureter cross-sections of offspring rats (HE staining)



注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 子鼠肾皮质厚度情况

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

Figure 5 Renal cortical thickness in offspring rats

3 讨论

由于伦理问题和孕检的普及,无法获取孕期高血糖的典型临床病例,故想要深入研究此类问题,寻找微观预警、干预手段,需依赖于实验动物模型,

而 GDM 导致子代 CAKUT 的动物模型,国内外报道不多,Tran 等^[10]采用 Hoxb7-Green 小鼠,在 E 13 时腹腔一次性注射 STZ,发现子代肾发育不良;Hokke 等^[11]采用 C57BL/6J 小鼠,于 E 6.5 开始,连续 3 d 腹腔注射 STZ 建模,在胚胎 E 14.5 和 E 18.5 时剖宫产解剖子鼠,发现子鼠肾发育不良、输尿管积水、双输尿管及双集合管系统,但上述报道均未详述稳定动物模型的建立。

本课题组结合前人经验,选择 SD 大鼠腹腔注射 STZ 建模,需决定注射时间、频次及注射剂量。未选择饮食诱导建模或基因动物模型,是因为饮食诱导是使动物产生肥胖、胰岛素抵抗,在孕前引入了干扰因素,时间长、成本高;而基因敲除常为“全或无”,成本高。STZ 为亚硝胺类抗生素,代谢快,对其他组织、器官毒副作用小,诱导成功率高,现已被广泛用于糖尿病动物模型制备^[12-13]。STZ 的注射时间,需尽量早于大鼠泌尿系统发育时间,故于 E 1.5 注射,注射后 STZ 迅速代谢,降低了药物本身对子鼠泌尿系统发育的影响。STZ 的注射剂量,国内外尚无统一标准,注射浓度多介于 20~80 mg/kg,注射频次也分一次或多次^[10-11,14],在预实验中,STZ 25 mg/kg 及以下浓度的孕鼠,随机血糖有转阴可

能;而 STZ 45 mg/kg 及以上浓度孕鼠,随机血糖更易超血糖仪测量范围(>33.3 mmol/L),且孕鼠更易流产、子鼠更不易存活,故 STZ 浓度定为 30、35、40 mg/kg,一次性腹腔注射以减少对孕鼠的刺激。STZ 的溶剂为柠檬酸盐缓冲液(pH 4.2~4.5),故设置溶剂对照组,该组在孕鼠体重、血糖,子鼠存活率、输尿管积水率、肾皮质厚度等均与空白对照组无差异,排除了溶剂的可能干扰。

孕鼠与子鼠变化情况:(1)孕鼠:STZ 30、35、40 mg/kg 3 组孕鼠“三多”症状在孕早中期开始,至孕晚期尤为明显,但同时点 5 组孕鼠体重无差异,并无“一少”的出现,这与现有报道相互印证^[15],可能因为高血糖带来的消耗由多饮多食来代偿,使体重的减少并无统计学意义。对于孕鼠的随机血糖,STZ 30 mg/kg 组低于 40 mg/kg 组,35 mg/kg 组与 40 mg/kg 组在孕中晚期无统计学差异(E 12.5 和 E 18.5 时, $P>0.05$),因此 30 mg/kg 更加安全,且能够满足建模浓度 16.7 mmol/L 并保证子代稳定畸形发生。实验中 40 mg/kg 组部分孕鼠流产,说明较高剂量 STZ 升高了流产率。此外,预实验发现,雌鼠孕前体重 240 g 以上,可为孕期提供充足体质储备以应对孕期高糖的影响,不易流产。(2)子鼠:在 STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠中观察到输尿管积水(双侧或单侧)及肾发育不良,体现了 GDM 对子代泌尿系统的致畸作用,STZ 3 剂量组的子鼠存活率降低,再次说明母体妊娠期高血糖的危害巨大。STZ 3 剂量组子鼠输尿管积水构成比、肾皮质厚度无差异,说明实验设置的 STZ 浓度梯度在致畸效果上无明显差异,3 组的输尿管扩张积水总发生率均超 70%,远高于 Hokke 等^[11]报道的子鼠肾和尿路畸形率 26%,故本模型具有较高的致畸稳定性,但子鼠中未发现其报道的重复集合系统、重复输尿管等畸形,可能为样本量不足或建模条件不同所致,因此,探索新的 CAKUT 子病种模型或为后续实验的方向之一。输尿管及肾的畸形由镜下微观结构改变引起,进而将研究思路引向机制,目前该领域机制研究涉及活性氧机制^[16]、NF- κ B 通路、*Pax2* 基因^[17]、SHH 通路等^[18],但研究仍不多,期待后续实验予以探索。

本模型的意义及展望:本实验从 GDM 孕鼠模型建立方法、母鼠孕期及分娩情况、子鼠泌尿系统畸形情况等方面进行了研究,虽然在子鼠中仅观察到 CAKUT 子病种中的输尿管扩张积水及肾发育不

良,但该模型操作简便、周期适中、可重复性强,可为此领域研究奠定基础。在后续的研究中,本课题组将摸索使子代产生重复肾/输尿管、多囊肾等 CAKUT 其他子病种的条件,建立新的稳定动物模型;同时根据现有模型,从 RNA、蛋白、通路等方面进行机制研究;有序地提前子鼠解剖时间,从新生鼠提前到 E 18.5、E 15.5、E 12.5 的胎鼠,进一步探究母体 GDM 导致子代 CAKUT 的发生机制,力争从微观领域对 GDM 导致子代 CAKUT 的预警、干预提供新思路。

综上,SD 大鼠孕 1.5 d 一次性腹腔注射 STZ 30 mg/kg 建模方案,既能使子鼠产生稳定输尿管积水和肾发育不良,又能保证孕期较安全的血糖及较低的流产率,可作为优选建模方案。该模型或可为此类疾病的深入研究提供新思路。

参考文献:

- [1] Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(10): 791-802.
- [2] van der Ven AT, Vivante A, Hildebrandt F. Novel Insights into the pathogenesis of monogenic congenital anomalies of the kidney and urinary tract [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 29(1): 36-50.
- [3] Verbitsky M, Westland R, Perez A, et al. The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract [J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(1): 117-127.
- [4] Baz B, Riveline JP, Gautier JF. Endocrinology of pregnancy: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects [J]. *Eur J Endocrinol*, 2016, 174(2): R43-R51.
- [5] 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014) [J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 49(8): 561-569.
- [6] Gao C, Sun X, Lu L, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus in mainland China: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10(1): 154-162.
- [7] Anna V, van der Ploeg HP, Cheung NW, et al. Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005 [J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(12): 2288-2293.
- [8] Simeoni U, Barker DJ. Offspring of diabetic pregnancy: Long-term outcomes [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2009, 14(2): 119-124.
- [9] Parimi M, Nitsch D. A systematic review and meta-analysis of diabetes during pregnancy and congenital genitourinary abnormalities [J]. *Kidney Int Rep*, 2020, 5(5): 678-693.
- [10] Tran S, Chen YW, Chenier I, et al. Maternal diabetes modulates renal morphogenesis in offspring [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(5): 943-952.

- [11] Hokke SN, Armitage JA, Puelles VG, et al. Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e58243.
- [12] 周吉银, 周世文. 链脲菌素和四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠模型比较 [J]. *江西中医学院学报*, 2006, 18(4): 44-46.
- [13] Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review) [J]. *Acta Physiol Hung*, 2014, 101(4): 408-420.
- [14] 江心泳, 葛莉, 庞书勤, 等. 妊娠糖尿病大鼠造模方法研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2021, 38(1): 63-68.
- [15] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13 (3): 154-158.
- [16] Zhang SL, Chen YW, Tran S, et al. Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(7): 2105-2115.
- [17] Chen YW, Liu F, Tran S, et al. Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants [J]. *Kidney Int*, 2006, 70 (9): 1607-1615.
- [18] Zhao XP, Liao MC, Chang SY, et al. Maternal diabetes modulates kidney formation in murine progeny: the role of hedgehog interacting protein (HHIP) [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(9): 1986-1996.

[收稿日期]2022-04-27

(上接第 31 页)

- [15] Cao JY, Wales KM, Cordina R, et al. Pulmonary vasodilator therapies are of no benefit in pulmonary hypertension due to left heart disease: A meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 273: 213-220.
- [16] Wang Y, Hsi DH, Yuan W, et al. New experimental animal model of intracardiac thrombus created with epicardial echocardiographic guidance [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11 (5): 3092-3100.
- [17] Arrigo M, Huber LC. Pulmonary embolism and heart failure: a reappraisal [J]. *Card Fail Rev*, 2020, 7: e03.
- [18] Tapon V, Platt D, Xia F, et al. Monitoring for pulmonary hypertension following pulmonary embolism: the INFORM study [J]. *Am J Med*, 2016, 129(9): 978-985.
- [19] Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(1): 67-119.
- [20] Palm V, Rengier F, Rajiah P, et al. Acute pulmonary embolism: imaging techniques, findings, endovascular treatment and differential diagnoses [J]. *RoFo*, 2020, 192(1): 38-49.

[收稿日期]2022-01-28

周瑜,贾静,王璐,等. 基于 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬探讨右美托咪定抗肠缺血再灌注的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 40-48.

Zhou Y, Jia J, Wang L, et al. Effect of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury based on miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 40-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.006

基于 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬探讨右美托咪定抗肠缺血再灌注的作用

周瑜*, 贾静, 王璐, 周敏

(西南医科大学附属医院麻醉科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬在右美托咪定 (DEX) 抗肠缺血再灌注 (I/R) 损伤中的作用。方法 将 SD 大鼠随机分配到 3 组, 包括假手术组 (Sham)、I/R 组和 DEX 组, 每组 8 只大鼠。除 Sham 组外, 其余组建立肠道 I/R 模型。DEX 组大鼠在缺血前 30 min 通过腹腔注射 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DEX 进行药物治疗。体内进行肠道组织病理学检查和评分。在体外实验中, 大鼠小肠隐窝上皮细胞 (IEC-6 细胞) 在氧-葡萄糖剥夺/复氧 (OGD/R) 处理之前与 DEX 一起孵育。采用 MTT 法分析 IEC-6 细胞活力。分别采用 TUNEL 法和实时定量 PCR 检测肠道、IEC-6 细胞中的凋亡情况和 miR-146a 水平。采用蛋白质印迹法和免疫荧光检测肠道、IEC-6 细胞中 Sirt6、LC3 水平。结果 组织病理学分析表明 DEX 处理对 I/R 诱导的肠上皮损伤具有保护作用, 并以剂量依赖性方式恢复 OGD/R 暴露后细胞增殖。与 I/R 组相比, DEX 组大鼠肠道组织中细胞凋亡显著减少 ($P < 0.01$), miR-146a、Sirt6 和 LC3 II 表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。与体内结果一致, 体外研究发现 DEX 显著减轻 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞凋亡 ($P < 0.01$), 同时显著增加了 IEC-6 细胞中 miR-146a、Sirt6 和 LC3 II 表达 ($P < 0.01$)。此外, 在 IEC-6 细胞中进行的 miR-146a 抑制剂实验, 并发现 miR-146a 抑制剂削弱 DEX 诱导的改善作用, 还通过下调 Sirt6 表达抑制自噬激活。结论 DEX 通过调节 miR-146a/Sirt6 信号介导的自噬显示出对 I/R 损伤具有保护作用。

【关键词】 miR-146a; Sirt6; 自噬; 大鼠; 右美托咪定; 肠缺血再灌注

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0040-09

Effect of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury based on miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy

ZHOU Yu*, JIA Jing, WANG Lu, ZHOU Min

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of miR-146a/Sirt6 signaling-mediated autophagy in dexmedetomidine (DEX) treatment of intestinal ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** SD rats were randomly assigned to Sham, I/R, and DEX groups with eight rats in each group. Except for the Sham group, the other groups underwent intestinal I/R modeling. Rats in the DEX group were treated by an intraperitoneal injection of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DEX at 30 min before ischemia. *In vivo*, intestinal histopathological examination and scoring were performed. *In vitro* experiments, the rat small intestinal crypt epithelial cell line IEC-6 was treated with DEX before deprivation/reoxygenation (OGD/R)

【基金项目】 四川省医学科研基金立项项目 (20190057)。

【作者简介】 周瑜 (1985—), 男, 硕士, 研究方向: 麻醉。E-mail: jimy120@163.com

treatment. IEC-6 cell viability was analyzed by MTT assays. Apoptosis and miR-146a expression in intestines and IEC-6 cells were detected by TUNEL and quantitative real-time PCR, respectively. Sirt6 and LC3 expression in intestines and IEC-6 cells was detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** Histopathological analysis indicated that DEX treatment protected against I/R-induced intestinal epithelial damage and restored cell proliferation after OGD/R exposure in a dose-dependent manner. Compared with the I/R group, apoptosis in intestinal tissue of the DEX group was decreased significantly ($P < 0.01$), and of miR-146a, Sirt6 and LC3 II expression was increased significantly ($P < 0.05$). Consistent with the *in vivo* result, DEX significantly attenuated OGD/R-induced apoptosis of IEC-6 cells ($P < 0.01$) and significantly increased the expression of miR-146a, Sirt6 and LC3 II in IEC-6 cells *in vitro* ($P < 0.01$). Furthermore, miR-146a inhibitor treatment of IEC-6 cells supported that miR-146a inhibition attenuated DEX-induced improvement and inhibited autophagy activation by downregulating Sirt6 expression. **Conclusions** DEX has a protective effect against I/R injury by regulating miR-146a/Sirt6-mediated autophagy.

【Keywords】 miR-146a; Sirt6; autophagy; rat; dexmedetomidine; intestinal ischemia-reperfusion

缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 损伤是与高发病率和死亡率相关的常见病理过程,常继发于多种严重疾病^[1]。I/R 损伤的发病机制是多因素的,包括过度的炎性细胞因子释放、氧化应激和细胞凋亡^[2-3]。肠道 I/R 可能导致肠道屏障功能受损,肠道通透性增加和肠道菌群易位,导致严重的局部和全身炎症和多器官功能障碍综合征^[4]。右美托咪定 (dexmedetomidine, DEX) 是一种具有镇静和镇痛特性的 α_2 -肾上腺素受体激动剂。最近,DEX 已被鉴定为对多个器官的 I/R 损伤具有保护潜力^[5-6]。研究发现,DEX 可以保持肠道结构完整性并赋予肠道保护免受 I/R 损伤^[7]。然而,关于其潜在的机制仍然很大程度上未知。microRNA (miRNA) 作为一种小的非编码 RNA,通过抑制靶 mRNA 的翻译或稳定来调节转录后翻译^[8]。最近,一项研究报道 miR-146a 通过与 IRAK1 的 3' UTR 结合,可以抑制炎症细胞浸润,从而保护肾组织免受 I/R 损伤^[9]。在肠道 I/R 损伤方面,miR-146a 可通过调节自噬抑制肠上皮细胞凋亡,减轻 I/R 过程中的肠道损伤^[10]。值得注意的是,最近两项研究报道了 DEX 通过靶向 miR-146a 参与肺部和心脏保护^[11-12]。因此我们假设在肠道中,miR-146a 也可能在 DEX 对 I/R 损伤的保护功能中发挥作用,并旨在通过体内和体外研究评估它们之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 (体重 200~220 g) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0004]。大鼠饲养于西南医科大学实验动物中心 [SYXK (川) 2018-0003], 实验前 2 周使大鼠适应

实验室条件 ($(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、12 h/12 h 光照/黑暗、 $(50 \pm 5)\%$ 湿度、随意获取食物和水)。每笼饲养一只大鼠,实验前禁食 12 h。动物实验经西南医科大学附属医院动物实验伦理委员会审核批准 (XNYKLY-2021-016), 并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.1.2 细胞

IEC-6 细胞 (大鼠小肠隐窝上皮细胞) 获自上海生命科学研究院,接种在含有 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 非必需氨基酸的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 美国 Gibco 公司) 中培养。每 2~3 d 更换 1 次培养基,培养物保持在 37°C 含有 5% CO_2 的饱和湿度环境中。

1.2 主要试剂与仪器

Hanks 平衡盐溶液购自美国 Gibco 公司; MTT 试剂、Sirt6、HRP 偶联的二抗购自美国 Abcam 公司; TUNEL 染色检测试剂盒购自德国 Roche 公司; 兔抗 LC3 单克隆抗体购自武汉 Proteintech 公司; TRIzol、lipofectamine 试剂购自美国 Invitrogen 公司; TransStart Top Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司; SYBRTM Select Master Mix 购自美国 Thermo 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; β -actin 购自美国 CST 公司; miR-146a 抑制剂 Opti-MEM 购自美国 Ambion 公司。

DM4000B 光学显微镜购自德国 Leica 公司, 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; RS232C 核酸测定仪购自德国 Eppendorf 公司; 7500 快速实时荧光定量 PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; ChemiDoc XRS 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞氧-葡萄糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 模型和药物治疗

将 IEC-6 细胞 (每毫升 5×10^3 个) 接种在 96 孔

板中,当 80% 汇合时,细胞加入 DEX (0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$) 处理 1 h。之后,将细胞培养基更换为不含葡萄糖的 Hanks 平衡盐溶液,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的加湿培养箱 (1% O_2 、94% N_2 和 5% CO_2) 中孵育 4 h 模拟缺氧条件。4 h 后,将培养基换回标准 DMEM 培养基并在常氧环境下再维持 2 h 来模拟复氧期^[13]。在没有药物处理的标准条件下培养的细胞用作对照。

为了考察 miR-146a 抑制对 DEX 保护作用的影响,将细胞实验分为: Con 组、OGD/R 组、OGD/R+DEX 组、OGD/R+miR-146a 抑制剂组和 OGD/R+DEX+miR-146a 抑制剂组。除 Con 组外,其他组建立 OGD/R 模型。OGD/R+miR-146a 抑制剂组和 OGD/R+DEX+miR-146a 抑制剂组在建立 OGD/R 模型前,加入 miR-146a 抑制剂处理 24 h。

1.3.2 细胞活力测定

使用 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 测定法评估细胞活力。在不同的时间点将 MTT 试剂添加到每个孔中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 MTT 溶剂处理细胞 3 h,并在 OD 590 nm 处测量吸光度。

1.3.3 动物分组治疗

动物被随机分配到 3 组,包括假手术组 (Sham)、I/R 组和 DEX 组,每组 8 只大鼠。I/R 组和 DEX 组大鼠参照文献方法^[14] 建立大鼠肠道 I/R 模型,具体操作为大鼠用异氟醚吸入麻醉。中线剖腹探查后,夹住肠系膜上动脉并在 1 h 后再灌注。DEX 组大鼠在缺血前 30 min 以腹腔注射 25 $\mu\text{g/kg}$ DEX 药物治疗^[14],和 I/R 组注射 0.9% 生理盐水治疗。Sham 组接受相同的麻醉和中线剖腹手术,但不夹住肠系膜上动脉。再灌注后 6 h 处死所有动物,取出肠组织进行生化分析。

1.3.4 组织病理学检查

大鼠肠组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡切片用苏木精-伊红 (HE) 溶液染色。最后,通过 DM4000B 光学显微镜获得染色图像。根据 Chiu's 评分^[14] 评估不同组的相对肠损伤程度。

1.3.5 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL) 分析

采用 TUNEL 染色检测试剂盒进行 TUNEL 分析。收集对数期的 IEC-6 细胞并以每毫升 1×10^5 个细胞的密度接种在 24 孔板中。将浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$

的 DEX 加入细胞中预处理 12 h。OGD/R 损伤后,用 PBS 清洗细胞,在 12 孔板中加入 10% 甲醛固定 20 min。然后用 PBS 冲洗 3 次,用 0.5% Triton-100 渗透细胞 10 min。此外,为了检测体内细胞凋亡,石蜡组织切片用二甲苯和不同梯度的乙醇脱蜡至水合。PBS 冲洗 3 次后,将细胞或组织切片加入 100 μL (10 μL TdT + 95 μL 荧光素标记的 dUTP 溶液) TUNEL 混合液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿暗箱中孵育 1 h。阴性对照 (Con) 组加入 100 μL 荧光素标记的 dUTP 溶液。最后,使用荧光显微镜以 200 倍放大倍率捕获图像。

1.3.6 免疫荧光测定

将肠组织切片水合并并在柠檬酸盐缓冲液中孵育,用于脱蜡后的抗原修复。然后将样品在室温下用 3% BSA 非特异性封闭 2 h,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿暗箱中用兔抗 LC3 单克隆抗体 (稀释比 1 : 100) 孵育过夜。用 PBS 清洗 3 次后,将切片与 Alexa 荧光素标记的二抗孵育 1 h,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 DAPI 溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 染色 10 min。最后,通过荧光显微镜以 200 倍放大率获得免疫荧光图像。对于细胞分析,将 IEC-6 细胞 (每毫升 1×10^5 个细胞) 接种在 24 孔板中,然后用 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX 预处理 12 h。接下来,细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,OGD/R 损伤后用 0.5% Triton-100 冲洗 10 min。最后,将细胞与兔抗 LC3 一起孵育,其余步骤与大鼠样品相同。

1.3.7 定量实时 PCR 检测

使用 TRIzol 试剂从 IEC-6 细胞和大鼠肠组织中分离总 RNA,并使用 RS232C 核酸测定仪测定总 RNA 的浓度。然后使用 TransStart Top Green qPCR SuperMix 将总共 1000 ng RNA 被逆转录为 cDNA,并使用 SYBRTM Select Master Mix 在 7500 型实时荧光定量 PCR 系统上进行实时定量分析。本研究中基因的引物序列如下: U6: 5'-UGAGAACUGAAUCC AUGGGUU-3'; miR-146a-5p: 5'-UGAGAACUGAA UUCAUGGGUU-3'。

1.3.8 蛋白质印迹法

使用适当的冷裂解缓冲液从 IEC-6 细胞和肠组织中提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。然后将样品加载到 SDS-PAGE (8% ~ 12%) 上,并转移到 PVDF 膜。将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h,与靶向 β -actin (1 : 2000), Sirt6 (1 : 1200 稀释) 和 LC3 (1 : 1000 稀释) 的一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,后与 HRP 偶联的二抗 (1 : 5000) 在室温下孵育 1 h。

通过增强化学发光法和 ChemiDoc XRS 获取蛋白质条带图像。使用 Image J 软件计算条带强度,并将其归一化为 GAPDH 的条带强度。

1.3.9 体外抑制剂转染 miR-146a

IEC-6 细胞每毫升 5×10^3 个细胞接种在 24 孔板中。将 50 μL 含 miR-146a 抑制剂 (25 nmol/L, 终浓度) Opti-MEM 与含 1 μL lipofectamine 的 50 μL Opti-MEM 混合,并转染 IEC-6 细胞 6 h。然后用原始培养基再培养 24 h,用 DEX 预处理并建立 OGD/R 模型。等浓度的抑制剂阴性对照用作实验中非序列特异性效应的对照。最后,测定细胞凋亡、miR-146a 表达水平以及与信号相关的蛋白表达水平。

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。使用 SPSS 22.0 分析数据。使用 *t* 检验对两组之间的差异进行显著性评估,并使用单向方差分析 (ANOVA) 对两组以上的差异进行评估,然后进行事后 Tukey 或 Dunnett 多重比较检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DEX 在体内外对 I/R 和 OGD/R 损伤的保护作用

HE 染色显示,假手术组大鼠的肠粘膜上皮细胞完好无损,杯状细胞清晰可见。与假手术组相比,I/R 组大鼠肠黏膜上皮出现明显的肠道形态改变、大量炎性细胞浸润、固有层消化崩解、出血、溃疡形成。DEX 组的肠道形态学改变显著改善,其特

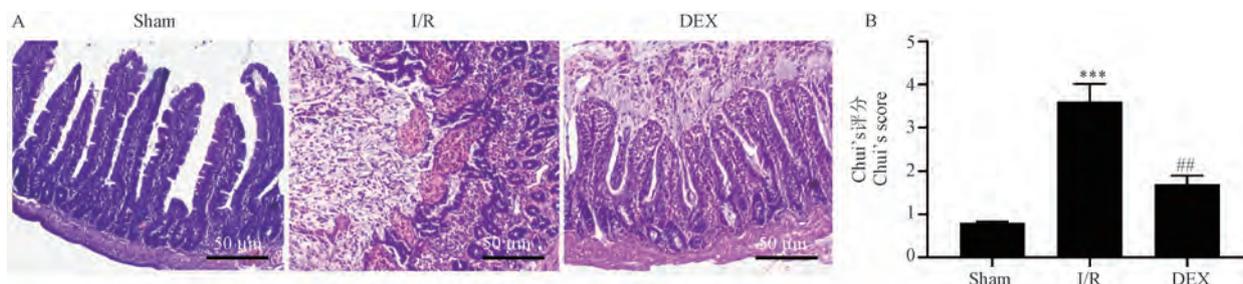
征是肠道组织学损伤评分 (Chiu's score) 降低。组织病理学分析表明 DEX 处理对 I/R 诱导的肠上皮损伤具有保护作用 (图 1)。为了模拟肠 I/R,对 IEC-6 细胞进行 4 h 的氧-葡萄糖剥夺,然后进行复氧 (OGD/R)。与对照组相比,在 OGD/R 暴露后观察到细胞活力大大降低。相反,DEX 治疗以剂量依赖性方式恢复细胞增殖并促进细胞存活。此外,由于 DEX 在 2 $\mu\text{mol/L}$ 时表现出最佳保护性能,存活率约为 90% (图 2),因此选择该浓度用于后续分析。

2.2 DEX 在体内和体外对 I/R 和 OGD/R 损伤后细胞凋亡的抑制作用

与 Sham 组相比,I/R 组大鼠肠道细胞凋亡显著增加 ($P < 0.001$)。DEX 组细胞凋亡显著低于 I/R 组 ($P < 0.01$) (图 3)。与体内结果一致,体外研究发现 DEX 显著减轻 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞凋亡 ($P < 0.01$) (图 4)。

2.3 DEX 对体外和体内 miR-146a/Sirt6 信号和 LC3 水平的影响

先前研究报道了 DEX 通过靶向 miR-146a/Sirt6 信号参与肺部保护^[11],为考察 DEX 是否通过靶向 miR-146a/Sirt6 信号在对 I/R 损伤的保护功能中发挥作用,研究考察 DEX 对体外和体内 miR-146a/Sirt6 信号的影响。与 Sham 组相比,I/R 组 miR-146a、Sirt6 在大鼠肠道组织中表达显著下调 ($P < 0.001$)。DEX 治疗显著增加了 I/R 大鼠肠道组织中 miR-146a、Sirt6 表达 ($P < 0.01$) (图 5、图 6)。与体内结果一致,体外研究发现 DEX 显著增加了 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞中 miR-146a 表达下调 ($P < 0.01$) (图 5)。此外,蛋白质印迹和免疫荧光测

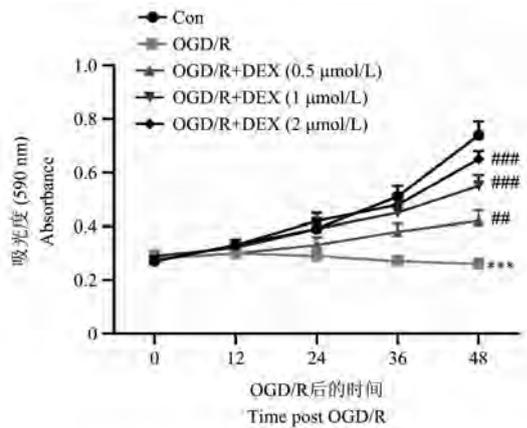


注:A:大鼠的肠粘膜的 HE 染色结果;B:Chiu's 评分。与 Sham 组相比,*** $P < 0.001$;与 I/R 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 1 DEX 在体内对 I/R 损伤的保护作用 (HE 染色, $n = 8$)

Note. A, HE staining results of the rat intestinal mucosa. B, Chiu's score. Compared with the Sham group, *** $P < 0.001$. Compared with the I/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Protective effect of DEX against I/R injury *in vivo* (HE staining)

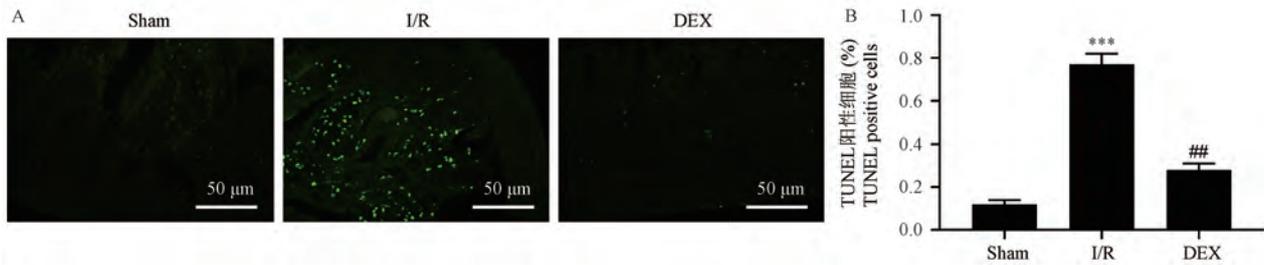


注:与 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比,## $P < 0.01$ 、### $P < 0.001$ 。

图 2 OGD/R 损伤和 DEX 处理对肠细胞增殖的影响

Note. Compared with Con group, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 2 Effects of OGD/R injury and DEX treatment on intestinal cell proliferation

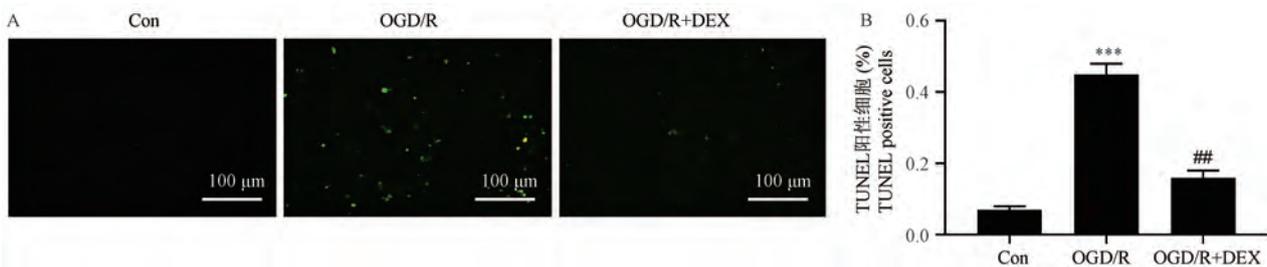


注:A:大鼠的肠粘膜的 TUNEL 染色结果;B:TUNEL 阳性细胞定量分析。与 Sham 组相比,*** $P < 0.001$;与 I/R 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 3 DEX 在体内对 I/R 损伤后细胞凋亡的抑制作用(TUNEL 染色, $n = 8$)

Note. A, TUNEL staining results of rat intestinal mucosa. B, Quantitative analysis of TUNEL positive cells. Compared with the Sham group, *** $P < 0.001$. Compared with the I/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 3 Inhibitory effect of DEX on apoptosis after I/R injury *in vivo* (TUNEL staining)



注:A:IEC-6 细胞的 TUNEL 染色结果;B:TUNEL 阳性细胞定量分析。与 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 4 DEX 在体外对 OGD/R 损伤后细胞凋亡的抑制作用(TUNEL 染色, $n = 3$)

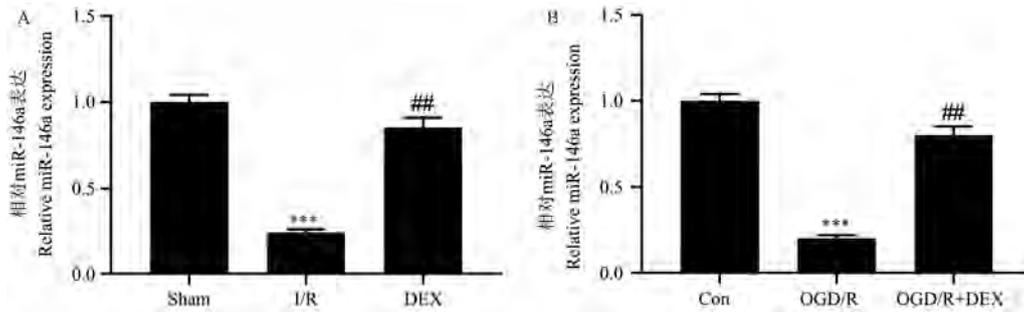
Note. A, TUNEL staining results of IEC-6 cells. B, Quantitative analysis of TUNEL-positive cells. Compared with Con group, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 4 TUNEL staining analysis of the effect of DEX on OGD/R injury-induced apoptosis of intestinal epithelial cells (TUNEL staining)

定用于检测体内和体外 LC3 的表达水平。如图 6 所示,与 Sham 组或对照组相比,I/R 组和 OGD/R 组 LC3 II 的表达水平降低,DEX 增加了 LC3 II 水平。免疫荧光证实了蛋白质印迹结果,DEX 显著增加了 I/R 大鼠肠组织和 OGD/R 处理的 IEC-6 细胞中 LC3 水平(图 7)。

2.4 在体外阻断 miR-146a 后 DEX 对细胞凋亡的影响

用 miR-146a 抑制剂转染 IEC-6 细胞,然后在 OGD/R 损伤前用 DEX 预处理。如图 8 所示,miR-146a 抑制剂降低了 DEX 治疗诱导的 miR-146a 上调($P < 0.01$)。与 OGD/R 组相比,miR-146a 抑制剂显著增加了凋亡细胞的数量,并减少了 Sirt6、LC3 II 的表达水平。此外,与 OGD/R+DEX 组相比,OGD/R+DEX+miR-146a 抑制剂组凋亡细胞的数量显著增加($P < 0.05$),和 Sirt6、LC3 II 的表达水平显著减少($P < 0.01$)(图 9~图 11)。

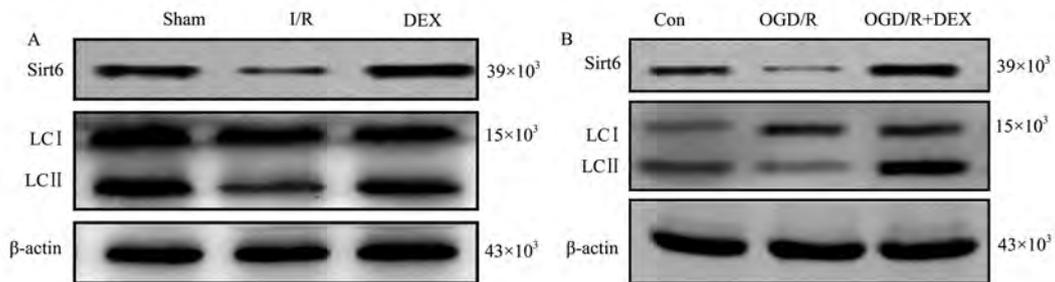


注:A;DEX 对 I/R 损伤大鼠肠组织中 miR-146a 表达水平影响;B;OGD/R 损伤诱导的肠上皮细胞中 miR-146a 表达水平影响。与 Sham 组或 Con 组相比,*** $P < 0.001$;与 I/R 组或 OGD/R 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 5 DEX 对体外和体内 miR-146a 水平的影响

Note. A, Effect of DEX on the expression level of miR-146a in intestinal tissue of rats with I/R injury. B, Effect of miR-146a expression level in OGD/R injury-induced intestinal epithelial cells. Compared with Sham group or Con group, *** $P < 0.001$. Compared with I/R group or OGD/R group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Effects of DEX on miR-146a levels *in vitro* and *in vivo*

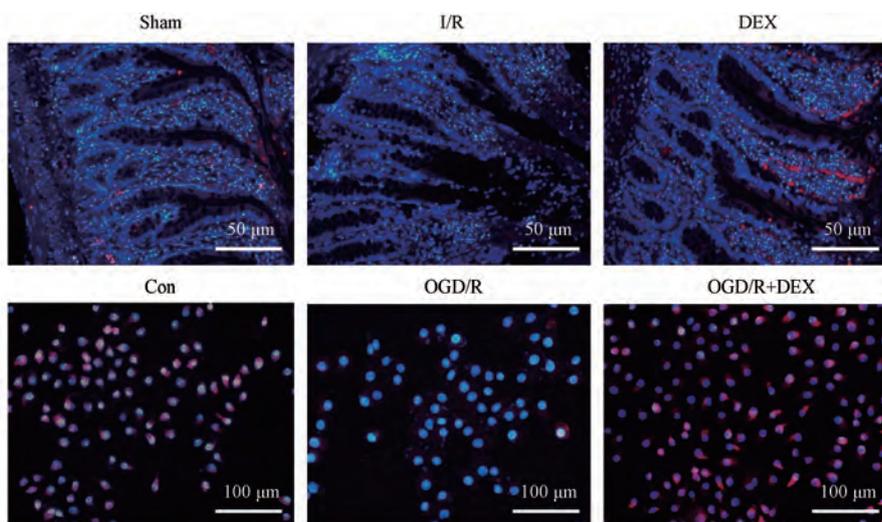


注:A;DEX 对 I/R 损伤大鼠肠组织中 Sirt6、LC3 表达水平影响;B;OGD/R 损伤诱导的肠上皮细胞中 Sirt6、LC3 表达水平影响。

图 6 DEX 对体外和体内 Sirt6 和 LC3 水平的影响

Note. A, Effect of DEX on the expression levels of Sirt6 and LC3 in the intestinal tissue of I/R injured rats. B, Effect of the expression levels of Sirt6 and LC3 in the intestinal epithelial cells induced by OGD/R injury.

Figure 6 Effects of DEX on Sirt6 and LC3 levels *in vitro* and *in vivo*



注:A;DEX 对 I/R 损伤大鼠肠组织中 LC3 表达水平影响;B;OGD/R 损伤诱导的肠上皮细胞中 LC3 表达水平影响。

图 7 DEX 对体外和体内 Sirt6、LC3 水平的影响(免疫荧光染色)

Note. A, Effect of DEX on the expression level of LC3 in the intestinal tissue of I/R injured rats. B, Effect of the LC3 expression level in the intestinal epithelial cells induced by OGD/R injury.

Figure 7 Effect of DEX on Sirt6 and LC3 levels *in vitro* and *in vivo* (Immunofluorescence staining)

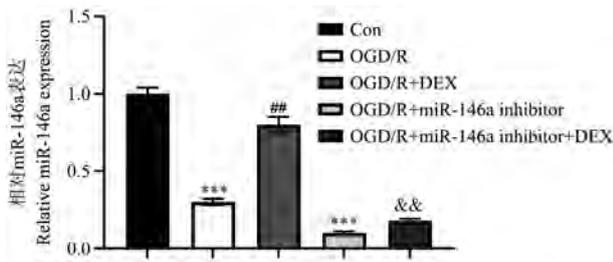
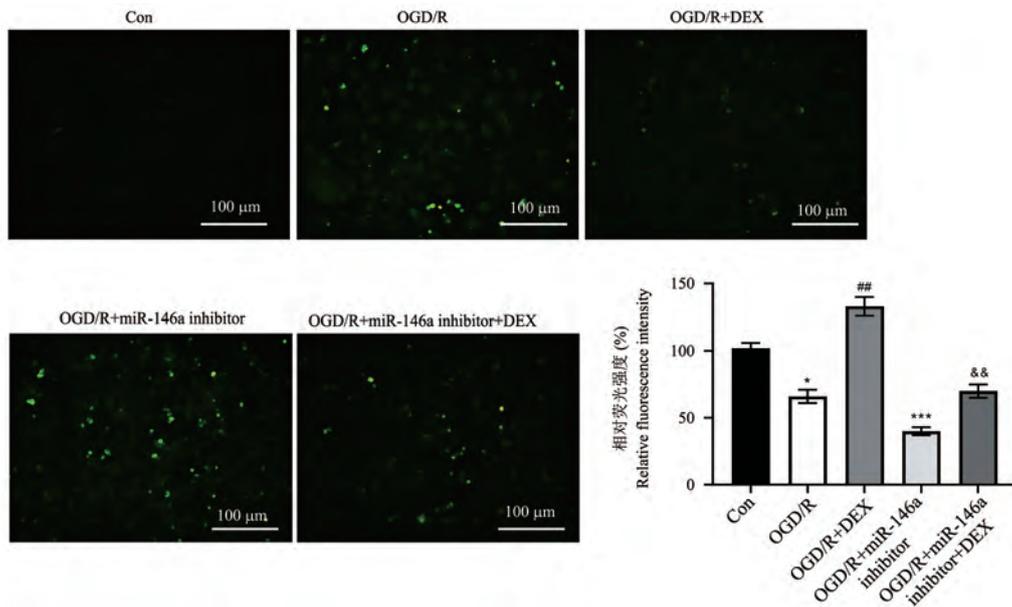


图 8 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞中 miR-146a 表达

Figure 8 Transfection of miR-146a inhibitor affects the expression of miR-146a in IEC-6 cells by DEX

3 讨论

肠道 I/R 损伤作为临床常见的严重疾病,威胁患者生命。肠道黏膜是肠道菌群与其内毒素之间的屏障^[6]。I/R 损伤引起的粘膜破坏可出现肠道细菌转移到体循环系统,并导致组织坏死、严重代谢紊乱和全身炎症反应综合征的快速进展^[6]。DEX 是一种成熟的治疗药物,先前研究发现 DEX 通过抑制炎症和细胞凋亡对肝、肾、脑和胃 I/R 损伤具有保护作用^[15-16]。然而,DEX 影响肠道 I/R 损伤的分子机制仍不清楚。本研究的结果表明,DEX 预处理显

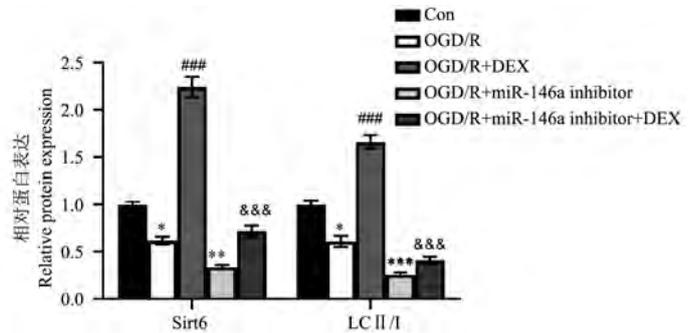
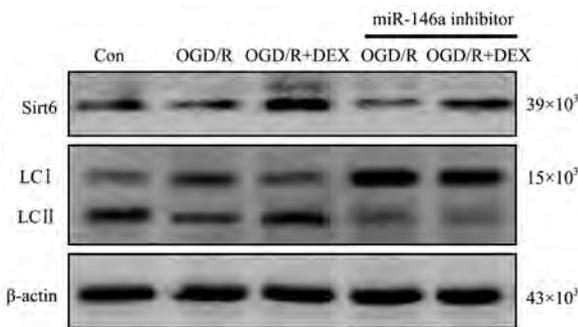


注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比, ## $P < 0.01$;与 OGD/R+DEX 组相比, && $P < 0.01$ 。

图 9 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞凋亡的保护(TUNEL 染色, $n = 3$)

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P < 0.01$. Compared with OGD/R+DEX group, && $P < 0.01$.

Figure 9 Transfection of miR-146a inhibitor affects the protection of DEX against apoptosis of IEC-6 cells (TUNEL staining)

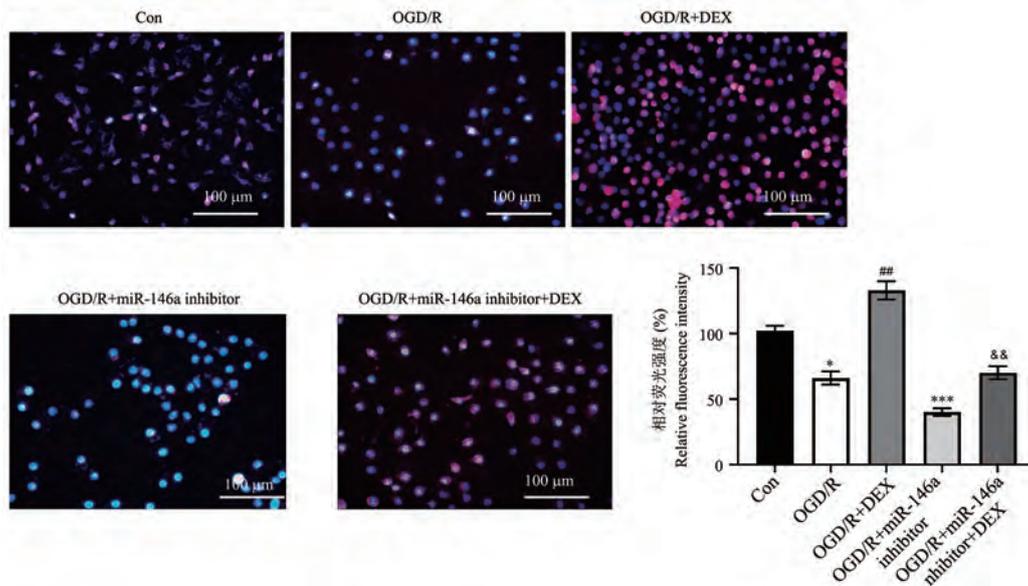


注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比, ### $P < 0.001$;与 OGD/R+DEX 组相比, &&& $P < 0.01$ 。

图 10 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞中 Sirt6、LC3 II 蛋白表达影响

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ### $P < 0.001$. Compared with OGD/R+DEX group, &&& $P < 0.01$.

Figure 10 Transfection of miR-146a inhibitor affects the effect of DEX on the expression of Sirt6 and LC3 II proteins in IEC-6 cells



注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 OGD/R 组相比, ## $P < 0.01$;与 OGD/R+DEX 组相比, && $P < 0.01$ 。

图 11 转染 miR-146a 抑制剂影响 DEX 对 IEC-6 细胞中 LC3 蛋白表达(免疫荧光染色, $n = 3$)

Note. Compared with Con group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with OGD/R group, ## $P < 0.01$. Compared with OGD/R+DEX group, && $P < 0.01$.

Figure 11 Transfection of miR-146a inhibitor affected the expression of LC3 protein in IEC-6 cells by DEX (Immunofluorescence staining)

著改善了 OGD/R 诱导的 IEC-6 细胞活力下降,并且 DEX 可改善肠道 I/R 诱导的组织病理学损伤并降低 Chiu 评分,这是肠黏膜损伤的重要指标^[6]。此外,DEX 显著降低了凋亡细胞的数量,提示 DEX 对 I/R 损伤的保护作用可能与抑制细胞凋亡有关。

自噬作为细胞稳态的关键调节剂,在自噬性细胞死亡中起重要作用,并作为信号平台促进不同细胞死亡途径的激活和整合,选择性降解自噬相关因子^[17]。例如,增加的自噬活性有助于缓解肠道 I/R 诱导的炎症反应^[2]。此外,自噬通过降解哺乳动物细胞中的抗凋亡因子或受损分子和细胞器先于细胞凋亡^[18]。目前认为,自噬在缺血性疾病中发挥有益还是有害作用取决于环境压力因素,包括氧气可用性的变化、I/R 损伤的严重程度,以及不同器官对缺血的耐受性,可能导致受影响器官中自噬通量的变化^[19]。本研究表明,DEX 预处理上调了肠道 I/R 损伤中的自噬活性,其特征是在体内和体外均增加了 LC3 II 水平。由于自噬是一个高度动态和多步骤的过程,自噬标记蛋白 LC3 水平的增加可能是自噬活性增加或自噬体-溶酶体融合受阻的结果^[20]。因此,我们的研究结果表明,DEX 通过增强自噬活性来减轻肠道 I/R 损伤。

越来越多的证据表明 miRNA 分子可以作为各

种疾病的靶向治疗剂。先前的研究发现,miR-146a 可以缓解 I/R 损伤,例如肾 I/R 和心肌 I/R 损伤^[9,21]。至于肠道 I/R 损伤,之前的研究表明 miR-146a 在 I/R 和 OGD/R 期间的表达降低,并且在 OGD/R 期间抑制 miR-146a 表达进一步抑制自噬并加重细胞死亡,而 miR-146a 过表达通过上调 Sirt6 增加体外自噬激活来减轻 OGD/R 损伤。提示 miR-146a/Sirt6 信号通过调节自噬作用于 OGD/R^[10,22]。此外,先前研究已经证实了 miR-146a 可以通过靶向 Sirt6 来调节炎症、氧化应激、纤维化等病理过程^[23]。本研究发现,DEX 在体内和体外均增加了 miR-146a/Sirt6 信号水平。Sirt6 介导的自噬在控制凋亡信号传导中起关键作用。为了进一步研究 DEX 对 miR-146a/Sirt6 信号的影响,我们在体外进行了 miR-146a 抑制剂测试,并发现 miR-146a 抑制剂削弱 DEX 诱导的改善作用,还通过下调 Sirt6 表达抑制自噬激活。这些发现表明,DEX 通过激活 OGD/R 受损的自噬通量来减轻 OGD/R 损伤。

此外,DEX 对 I/R 损伤的保护作用很可能还涉及除 miR-146a/Sirt6 级联之外的许多细胞功能。据报道,DEX 上调 HIF-1 α 以抑制 I/R 诱导的神经元自噬^[24]。ERK 和 Akt 信号通路参与 DEX 介导的肾 I/R 损伤中氧化应激和炎症的减弱^[15]。此外,也有

报道称 DEX 通过 PPAR γ /STAT3 信号通路调节巨噬细胞 M2 的活化来减轻肝的 I/R 损伤^[6]。这与我们模型中观察到的细胞凋亡减少一致,表明在 I/R 损伤和 DEX 治疗期间存在复杂的细胞间通讯。总体而言,所有这些发现都确定了 DEX 赋予保护功能的复杂性,而对潜在机制的更严格探索不仅需要扩大我们对 I/R 的了解,而且还需要提供针对 I/R 损伤的新预防策略。

参考文献:

- [1] 陈榕, 李维, 曾滋, 等. 自噬在缺血后处理减轻小鼠肠缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(4): 412-415.
- [2] Li B, Yao X, Luo Y, et al. Inhibition of autophagy attenuated intestinal injury after intestinal I/R via mTOR signaling [J]. J Surg Res, 2019, 243: 363-370.
- [3] Barzegar M, Kaur G, Gavins FNE, et al. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury [J]. Stem Cell Res, 2019, 37: 101421.
- [4] Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, et al. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. J Clin Biochem Nutr, 2018, 63(1): 26-32.
- [5] Sun Z, Zhao T, Lv S, et al. Dexmedetomidine attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury through both anti-inflammation and anti-apoptosis mechanisms in rabbits [J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 209.
- [6] He L, Hao S, Wang Y, et al. Dexmedetomidine preconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts with endothelial dysfunction [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 114: 108837.
- [7] 李斌, 唐隽娇, 何祥虎, 等. 右美托咪定通过激活 PI3K/Akt 通路对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(1): 15-19.
- [8] 唐剑, 刘艳秋, 高鸿, 等. 低温缺血再灌注心律失常大鼠心肌 miRNA 表达的变化及靶基因预测 [J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(7): 885-888.
- [9] Li X, Liao J, Su X, et al. Human urine-derived stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via exosomal miR-146a-5p which targets IRAK1 [J]. Theranostics, 2020, 10(21): 9561-9578.
- [10] Liu ZZ, Leng WT, Zhang JM, et al. miR-146a-5p/TXNIP axis attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy via the PRKAA/mTOR signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 197: 114839.
- [11] Li N, Li S, Wu Y, et al. Dexmedetomidine targets miR-146a and participates in the progress of chronic obstructive pulmonary disease *in vivo* and *in vitro* [J]. Genes Genomics, 2021, 43(12): 1371-1379.
- [12] He L, Wang Z, Zhou R, et al. Dexmedetomidine exerts cardioprotective effect through miR-146a-3p targeting IRAK1 and TRAF6 via inhibition of the NF- κ B pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110993.
- [13] Li LX, Yin LH, Gao M, et al. MiR-23a-5p exacerbates intestinal ischemia-reperfusion injury by promoting oxidative stress via targeting PPAR alpha [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 180: 114194.
- [14] Liu XM, Chen QH, Hu Q, et al. Dexmedetomidine protects intestinal ischemia-reperfusion injury via inhibiting p38 MAPK cascades [J]. Exp Mol Pathol, 2020, 115: 104444.
- [15] Li J, Chen Q, He X, et al. Dexmedetomidine attenuates lung apoptosis induced by renal ischemia-reperfusion injury through α_2 AR/PI3K/Akt pathway [J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 78.
- [16] Li P, Zhang Y, Liu H. The role of Wnt/ β -catenin pathway in the protection process by dexmedetomidine against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Life Sci, 2019, 236: 116921.
- [17] 黄基峰, 张怡, 晏琛. 线粒体自噬在肿瘤干细胞中作用的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47(5): 255-259.
- [18] Yang Y, Dong F, Liu X, et al. Crosstalk of oxidative damage, apoptosis, and autophagy under endoplasmic reticulum (ER) stress involved in thifluzamide-induced liver damage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environ Pollut, 2018, 243: 1904-1911.
- [19] Xu D, Chen L, Chen X, et al. The triterpenoid CDDO-imidazolide ameliorates mouse liver ischemia-reperfusion injury through activating the Nrf2/HO-1 pathway enhanced autophagy [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e2983.
- [20] Zhao H, Chen H, Xiaoyin M, et al. Autophagy activation improves lung injury and inflammation in sepsis [J]. Inflammation, 2019, 42(2): 426-439.
- [21] Shu L, Zhang W, Huang G, et al. Troxerutin attenuates myocardial cell apoptosis following myocardial ischemia-reperfusion injury through inhibition of miR-146a-5p expression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 9274-9282.
- [22] Akbari G. Emerging roles of microRNAs in intestinal ischemia/reperfusion-induced injury: a review [J]. J Physiol Biochem, 2020, 76(4): 525-537.
- [23] Xiao X, Xu M, Yu H, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 354.
- [24] Gao Y, Yin H, Zhang Y, et al. Dexmedetomidine protects hippocampal neurons against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis through activation HIF-1 α /p53 signaling [J]. Life Sci, 2019, 232: 116611.

[收稿日期] 2022-06-22

徐沛沛,赵树华,王江波,等. 过表达 miR-202-5p 通过抑制 PCSK9 减轻阿尔茨海默病神经损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 49-58.

Xu PP, Zhao SH, Wang JB, et al. Overexpression of miR-202-5p attenuates nerve damage in Alzheimer's disease by inhibiting PCSK9 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 49-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.007

过表达 miR-202-5p 通过抑制 PCSK9 减轻阿尔茨海默病神经损伤

徐沛沛¹, 赵树华¹, 王江波², 姚先丽¹, 白金^{1*}

(1. 郑州大学附属郑州中心医院康复医学科, 郑州 450001; 2. 河南中医药大学附属郑州人民医院康复医学科, 郑州 450014)

【摘要】 目的 探讨 miR-202-5p 对前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 的调控作用, 及对阿尔茨海默症 (AD) 神经元损伤的影响。方法 SD 大鼠用侧脑室注射 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$ 1-42) 法建立 AD 模型, 随机分正常对照组、模型组、ago-miR-202-5p 组、ago-NC 组、PCSK9 抑制剂组。给药结束后进行空间记忆及学习能力检测; 尼氏染色检测脑皮层组织神经元变化; 神经元核抗原 (NeuN) 免疫荧光染色法检测脑皮层组织神经元数目; ELISA 法检测脑脊液中 PCSK9、 β -淀粉样蛋白 42 ($A\beta$ 42)、 β -淀粉样蛋白 40 ($A\beta$ 40)、总胆固醇 (TC) 及脑皮层组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、磷酸化 Tau 蛋白 (P-tau) 水平; qRT-PCR 法检测脑皮层组织 miR-202-5p 表达水平; Western blot 法检测脑皮层组织 PCSK9、LDL 受体相关蛋白 1 (LRP-1)、载脂蛋白 E (ApoE) 及淀粉前体蛋白 (APP)、 β 位点 APP 剪切酶 1 (BACE1) 蛋白表达。双荧光素酶验证 miR-202-5p 对 PCSK9 的靶向调控作用。建立体外 AD 细胞模型, 共转染 miR-202-5p mimic 及 PCSK9 过表达载体 (pcDNA-PCSK9), 探究 PCSK9 过表达对 miR-202-5p 作用的逆转。结果 与正常对照组相比, 模型组大鼠空间记忆及学习能力降低, 脑皮质神经元损伤及数目减少, 脑脊液中 PCSK9、 $A\beta$ 42、 $A\beta$ 40、胆固醇水平升高, 脑皮质组织中 P-tau 及炎症因子水平升高, miR-202-5p 表达降低, PCSK9 活化介导的 BACE1-APP- $A\beta$ 生成途径活性升高, LRP-1-ApoE 介导的促胆固醇摄取及 $A\beta$ 清除活性降低 ($P < 0.05$)。miR-202-5p 过表达或 PCSK9 抑制剂干预治疗, 均可抑制 $A\beta$ 42、 $A\beta$ 40 沉积引起的神经元损伤, 减少炎症因子分泌, 并抑制 PCSK9 活化介导的 BACE1、APP、 $A\beta$ 生成, 提高 LRP-1-ApoE 介导的促胆固醇摄取及 $A\beta$ 清除 ($P < 0.05$)。miR-202-5p 与 PCSK9 之间存在靶向调控作用。PCSK9 上调, 可部分减弱 miR-202-5p 过表达发挥的抗 AD 作用 ($P < 0.05$)。结论 过表达 miR-202-5p 可通过抑制 PCSK9 活化抑制 $A\beta$ 生成并促进 LRP-1-ApoE 介导的促胆固醇摄取及 $A\beta$ 清除, 进而发挥抗 AD 神经损伤作用。

【关键词】 miR-202-5p; 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 阿尔茨海默症; β -淀粉样蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0049-10

Overexpression of miR-202-5p attenuates nerve damage in Alzheimer's disease by inhibiting PCSK9

XU Peipei¹, ZHAO Shuhua¹, WANG Jiangbo², YAO Xianli¹, BAI Jin^{1*}

(1. Department of Rehabilitation Medicine, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China. 2. Department of Rehabilitation Medicine, Zhengzhou People's Hospital Affiliated to Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450014)

【基金项目】 2018 年河南省医学科技攻关计划项目 (2018020808)。

【作者简介】 徐沛沛 (1982—), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 神经康复、运动损伤康复。E-mail: physician82@126.com

【通信作者】 白金 (1980—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 神经康复、运动损伤康复。E-mail: 6985965@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of miR-202-5p on proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and its effect on neuronal damage in Alzheimer's disease (AD). **Methods** SD rats were injected with amyloid β (A β) 1-42 into the lateral ventricle to establish an AD model and were randomly divided into normal control, model, ago-miR-202-5p, ago-NC and PCSK9 inhibitor groups. After the administration, spatial memory and learning ability tests were performed. Nissl staining was used to detect neuronal changes in cerebral cortex tissue. Neuron nuclear antigen (NeuN) immunofluorescence was used to detect the number of neurons in cerebral cortex tissue. ELISAs were used to measure the levels of PCSK9, β -amyloid 42 (A β 42), β -amyloid 40 (A β 40), and total cholesterol (TC) in cerebrospinal fluid and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and phosphorylated Tau protein (P-tau) in cerebral cortex tissues. qRT-PCR was used to measure miR-202-5p expression in cerebral cortex tissue. Western blot was used to detect PCSK9, LDL receptor-related protein 1 (LRP-1), apolipoprotein E (ApoE), amyloid precursor protein (APP), and β site APP shearing enzyme 1 (BACE1) protein expression in cerebral cortex tissue. Dual luciferase assays were used to verify targeted regulation of PCSK9 by miR-202-5p. An *in vitro* AD cell model was established and cotransfected with miR-202-5p mimic and an PCSK9 overexpression vector (pcDNA-PCSK9), and then reversal of the effect of PCSK9 overexpression on miR-202-5p was explored. **Results** Compared with the normal control group, the spatial memory and learning ability of rats in the model group were decreased, cerebral cortex neuron damage and number were decreased, PCSK9, A β 42, A β 40 and cholesterol levels in the cerebrospinal fluid were increased, P-tau and inflammatory factors levels in the cerebral cortex were increased, miR-202-5p expression was decreased, activity of the PCSK9 activation-mediated BACE1-APP-A β production pathway was increased, and LRP-1-ApoE-mediated promotion of cholesterol uptake and A β clearance activity were decreased ($P < 0.05$). miR-202-5p overexpression or PCSK9 inhibitor treatment suppressed neuronal damage caused by A β 42 and A β 40 deposition, reduced inflammatory factor secretion, inhibited BACE1, APP and A β production mediated by PCSK9 activation, and increased LRP-1-ApoE-mediated promotion of cholesterol uptake and A β clearance ($P < 0.05$). There was a targeted regulatory effect between miR-202-5p and PCSK9. Upregulation of PCSK9 partially attenuated the anti-AD effect of miR-202-5p overexpression ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-202-5p overexpression inhibits A β production by suppressing PCSK9 activation and promoting LRP-1-ApoE-mediated cholesterol uptake and A β clearance, thereby exerting anti-AD nerve injury effect.

【Keywords】 miR-202-5p; proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Alzheimer's disease; β -amyloid

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 多发于老年人群,是诱导老年人死亡的第五大疾病^[1]。过往研究发现,随着年龄及衰老的发展, β -淀粉样蛋白 (amyloid β , A β) 大量积累引起的神经炎症反应是导致 AD 患者神经系统损伤及记忆丧失、认知障碍及行为改变的主要原因^[2]。近来有研究发现,脑内胆固醇失衡,是导致 AD 患者 A β 代谢异常及神经炎症发生的关键因素之一^[3]。文献报道发现,具有监管胆固醇稳态的重要调节因子-前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 可在 AD 患者的脑脊液中呈异常高表达^[4],且 PCSK9 的高表达一方面可通过抑制神经元摄取胆固醇而阻断神经元发育再生^[5],另一方面可通过影响 β 位点 APP 剪切酶 1 (β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 表达来引起 A β 加工及代谢异常,而导致 A β 积聚及神经炎症反应的发生^[6]。但引起 AD 患者 PCSK9 异常变化的基因调控机制还不甚清楚。

miRNA 是参与 AD 神经系统病变的重要调控因子,大量研究发现,AD 患者 A β 积聚,与 miRNA 的

异常表达关系密切^[7]。已有文献显示,miR-202-5p 可通过靶向抑制淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的 3' UTR 端,而降低 AD 患者 A β 沉积引起的神经系统损伤^[8]。但 AD 患者 PCSK9 表达的升高是否与 miR-202-5p 表达的异常有关还未见报导。本研究建立 AD 体内外模型,干预 miR-202-5p 及 PCSK9 表达后,对此进行验证探究,以期 AD 的基因靶向治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠 50 只,体重 260~280 g,由中国医学科学院医学实验动物研究所提供 [SCXK (京) 2021-0004]。所有大鼠均饲养在郑州大学 (药物研究院) [SYXK (豫) 2018-0004],饲养温度为 22℃~25℃,湿度控制在 55% 左右。无菌手术在郑州大学 (药物研究院) 进行。本实验经郑州大学附属郑州中心医院动物伦理委员会批准 (20210617-0012),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

小鼠脑皮质神经元 (Sci-L-0956, 上海圻明生物科技有限公司); PCSK9 抑制剂-Aliro (YSRIBIO-C4745, 上海研生实业有限公司); A β 1-42 (A4558, 美国 Sigma 公司, 使用前, 将 A β 1-42 肽以 200 μ mol/L 浓度溶解于无菌双蒸水中, 37 $^{\circ}$ C 静置 24 h, 14000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 制成可溶性 A β 1-42 寡聚体备用); A β 42、A β 40 ELISA 试剂盒 (JH-R30135、JH-R30130, 上海继和生物科技有限公司); PCSK9 ELISA 试剂盒 (EK-M28850, 上海酶研生物科技有限公司); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、磷酸化 Tau 蛋白 (P-tau)、总胆固醇 (TC) ELISA 试剂盒 (FN-AQ-M0183、E-R-0067、1529384953、EK-R38996, 武汉菲恩生物科技有限公司、深圳海思安生物技术有限公司、上海江莱生物技术有限公司、上海酶研生物科技有限公司); PCSK9、负责神经元胆固醇摄取相关因子-LDL 受体相关蛋白 1 (LRP-1)、载脂蛋白 E (ApoE) 及 APP、BACE1 等兔抗大鼠抗体均购自英国 abcam 公司。FC 酶标仪购自 ThermoFisher; BX43 光学显微镜购自日本奥林巴斯; Dounce 组织匀浆器购自海德创业 (北京) 生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立及分组

取大鼠 40 只, 参照文献^[9]方法, 将大鼠麻醉后, 经侧脑室注射 5 μ L 浓度为 80 μ mol/L 的 A β 1-42, 2 d 1 次, 连续 8 d, 建立大鼠 AD 模型, 用水迷宫试验检测大鼠学习记忆能力, 若大鼠出现学习记忆能力下降现象, 视为造模成功。将造模成功大鼠按随机数字表法分模型组、ago-miR-202-5p 组、ago-NC 组、PCSK9 抑制剂组, 每组 10 只, 另取 10 只大鼠侧脑室注射 5 μ L 无菌双蒸水, 相同时间后, 作为正常对照组。各组于造模成功后开始给药, ago-miR-202-5p 组及 ago-NC 组经侧脑室注射 5 μ L 浓度为 25 μ mol/L 的 miR-202-5p 激动剂 (ago-miR-202-5p) 及阴性对照 (ago-NC) 进行干预治疗, 3 d 1 次, 连续 15 d; PCSK9 抑制剂-Aliro 参照文献^[10]经侧脑室注射 16 mg/kg 的 PCSK9 抑制剂 Aliro, 3 d 1 次, 连续 15 d。正常对照组及模型组经侧脑室注射等量双蒸水。

1.3.2 大鼠空间记忆及学习能力检测

制备水迷宫试验平台 (直径为 150 cm 的圆形水池, 水深 60 cm, 水温 (23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 水池分为 4 个象限,

第一象限内含距水面 1~2 cm 的逃生平台, 直径 14 cm, 高 29 cm)。将大鼠面朝池壁从第 4 象限放入水中, 120 s 后未找到平台的引导其找到平台, 并让其在平台上停留 10 s, 进行连续训练 5 d, 每天训练 4 次, 第 6 天用摄像头记录大鼠自主找到逃生平台的时间, 即逃避潜伏期, 逃逸潜伏期越短, 预示其空间记忆能力越强。撤去水下逃生平台, 将大鼠从第 4 象限面朝池壁投入池中, 并让其自由游泳 120 s, 摄像头记录统计大鼠 120 s 内穿越原平台位置的次数, 穿越原平台次数越高预示其空间学习能力越好。

1.3.3 ELISA 法检测脑脊液及脑皮层组织相关因子

各组大鼠, 断头取脑, 解剖取脑脊液 2 mL, 按 ELISA 试剂盒方法检测 PCSK9、A β 42、A β 40 及 TC 水平; 剥取完整脑皮层组织, 分成两部分, 一部分置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 备用, 另一部分剪取约 1 g 粉碎研磨后取匀浆液, 按 ELISA 试剂盒方法检测 TNF- α 、IL-1 β 、P-tau 水平, 剩余脑皮层组织置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.4 尼氏及神经元核抗原 (NeuN) 免疫荧光染色法检测脑皮层组织神经元形态及数目变化

将 4% 多聚甲醛中固定的脑皮层组织, 制成厚为 5 μ m 的石蜡切片, 脱蜡、透化及抗原修复处理后, 按尼氏染色液说明书方法染色后, 于光镜下观察神经元形态变化, 滴加 1:500 的 NeuN 一抗孵育过夜后, 用 0.5% 的驴抗兔二抗 IgG 避光孵育处理 10 min 后, DAPI 核染 10 min, 晾干及封片后, 光镜下观察, Image Pro-Plus 6.0 软件计算每视野下单位面积下 NeuN 阳性染色神经元数目。

1.3.5 qRT-PCR 法检测脑皮层组织 miR-202-5p 表达

粉碎脑皮层组织, 提取 RNA, 逆转录得到 cDNA, 行 PCR 反应 (反应体系: cDNA 1 μ L; SYBR GREEN 反应液 5 μ L, PCR 引物各 0.8 μ L, H₂O 3 μ L, 反应条件: 90 $^{\circ}$ C 预变性 60 s, 1 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 45 个循环)。miR-202-5p (5'-GTCACATGCTGGGTCCAACAAA-3', 5'-GCCGTCCTATGCACTC-3') 以 U6 为内参用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因相对表达水平, 引物序列由大连宝生生物公司合成。

1.3.6 Western blot 法检测脑皮层组织相关蛋白表达

粉碎脑皮层组织, 组织匀浆器匀浆得匀浆液,

提取蛋白,BCA 法测定蛋白总浓度,制备浓缩胶及分离胶,取 60 μg 蛋白行电泳和转膜反应,加入 1:900 的一抗 PCSK9、LRP-1、ApoE、APP、BACE1 抗体,及 1:1 200 的内参 β -actin 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,HRP 羊抗兔二抗室温孵育 40 min,化学发光法液显色后,用以 Image J 软件分析条带相对灰度值。

1.3.7 双荧光素酶报告试验验证 miR-202-5p 与 PCSK9 的靶向关系

starbase 网站预测 miR-202-5p 和 PCSK9 的结合位点。建立含有 miR-202-5p 结合位点的 PCSK9-3' UTR 野生型 (WT) 和 PCSK9-3' UTR 突变型 (MUT) 片段,克隆至荧光素酶报告质粒中,Lipofectamine 2000 转染试剂将 PCSK9-3' UTR-WT、PCSK9-3' UTR-MUT 荧光素酶报告质粒,分别与 mimic NC 或 miR-202-5p mimic 共转染至 293 T 细胞中,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.3.8 AD 细胞模型共转染 miR-202-5p mimic 及 PCSK9 过表达质粒 (pcDNA-PCSK9) 对皮质神经元损伤的影响

取小鼠原代皮质神经元冻存管,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴复苏后,取适量加入 DMEM 培养基 (含 5% 胎牛血清) 中进行传代培养及计数。取对数期生长良好的神经元,按 1×10^8 个/孔的密度接种于 6 孔板内,设置为空白组、A β 诱导组 (参照文献^[11] 加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 凝聚态的 A β 1-42 培养 1 h 作为 AD 细胞模型)、miR-202-5p mimic 组 (在 A β 诱导组基础上转染 miR-202-5p mimic)、mimic-NC 组 (在 A β 诱导组基础上转染 miR-202-5p mimic 阴性对照载体-mimic-NC)、miR-202-5p mimic + pcDNA-PCSK9 组 (在 A β 诱导组基础上共转染 miR-202-5p mimic 及 pcDNA-PCSK9)、miR-202-5p mimic + pcDNA-NC 组 (在 A β 诱导组基础上共转染 miR-202-5p mimic 及 pcDNA-PCSK9 阴性对照载体-pcDNA-NC), 每组设置 6 个复孔。空白组加入培养基正常培养; Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染,各组细胞培养 48 h 后,取细胞上清液,用 ELISA 法检测 PCSK9、TC、TNF- α 、IL-1 β 、P-tau 水平; 取细胞按 Honchest33258 染色液说明书方法,染色后于显微镜下观察细胞核损伤状况;按 1.3.5 及 1.3.6 方法测基因及相关蛋白表达。

1.4 统计学方法

以 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计分析,

计量资料以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较进行单因素方差分析,进一步两组间比较行 *snk-q* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 miR-202-5p 或抑制 PCSK9 对大鼠脑皮层组织 miR-202-5p 表达的影响

与正常对照组 (1.09 \pm 0.10) 相比,模型组大鼠脑皮层组织中 miR-202-5p 表达 (0.14 \pm 0.10) 降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,ago-miR-202-5p 组大鼠脑皮层组织中 miR-202-5p 表达 (0.81 \pm 0.12) 升高 ($P < 0.05$); PCSK9 抑制剂组 (0.11 \pm 0.11)、mimic-NC 组 (0.12 \pm 0.10) 大鼠脑皮层组织 miR-202-5p 表达与模型组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 过表达 miR-202-5p 或抑制 PCSK9 对 AD 大鼠空间学习记忆能力的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠逃避潜伏期延长,穿越平台次数减少 ($P < 0.05$),预示其空间记忆及学习能力降低。与模型组相比,ago-miR-202-5p 组及 PCSK9 抑制剂组大鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数升高 ($P < 0.05$),且 ago-miR-202-5p 组对上述指标的改善效果,好于 PCSK9 抑制剂组 ($P < 0.05$)。ago-NC 组与模型组相比,差异不显著 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 过表达 miR-202-5p 或抑制 PCSK9 对 AD 大鼠脑皮层神经元形态变化的影响

正常对照组大鼠脑皮层神经元细胞结构正常,层次清晰,其数目为每平方毫米 (55.50 \pm 5.00) 个。模型组大鼠神经元细胞体积变小,排列紊乱、核固

表 1 大鼠平均逃避潜伏期、穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Average escape latency and times of crossing the platform in rats

组别 Groups	平均逃避潜伏期 (s) Average escape latency	穿越平台次数 (次) Number of crossing platforms (times)
正常对照组 Normal control group	18.00 \pm 1.00	4.86 \pm 0.49
模型组 Model group	36.21 \pm 3.64 [*]	1.21 \pm 0.31 [*]
ago-miR-202-5p 组 ago-miR-202-5p group	26.05 \pm 2.57 [#]	3.87 \pm 0.46 [#]
PCSK9 抑制剂组 PCSK9 inhibitor group	29.07 \pm 2.26 ^{#Δ}	2.85 \pm 0.37 ^{#Δ}
ago-NC 组 ago-NC group	36.08 \pm 3.68 ^{Δ}	1.68 \pm 0.48 ^{Δ}

注:与正常对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与 ago-miR-202-5p 组相比, ^{Δ} $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal control group,^{*} $P < 0.05$. Compared with the model group,[#] $P < 0.05$. Compared with the ago-miR-202-5p group, ^{Δ} $P < 0.05$.

缩且染色较深、胞体拉长收缩呈多角形, NeuN 阳性染色的神经元细胞数目为每平方毫米 (30.05 ± 3.00) 个, 与正常对照组相比减少 ($P < 0.05$)。ago-miR-202-5p 组及 PCSK9 抑制剂组大鼠脑皮层神经元核固缩、胞体拉长收缩现象缓解, NeuN 阳性染色的神经元细胞数目为每平方毫米 (49.02 ± 4.10) 个、(40.00 ± 4.00) 个, 与模型组相比增多, 且 ago-miR-202-5p 组对神经元损伤的改善作用优于 PCSK9 组 ($P < 0.05$)。ago-NC 组神经元细胞数目为每平方毫米 (30.20 ± 3.02) 个, 与模型组相比, 神经元形态相近, 数目差异不显著 ($P > 0.05$), 见图 1。

2.4 过表达 miR-202-5p 或抑制 PCSK9 对 AD 大鼠脑脊液中 PCSK9、Aβ42、Aβ40、TC 水平的影响

与正常对照组相比, 模型组大鼠脑脊液中 PCSK9、Aβ42、Aβ40、TC 水平升高 ($P < 0.05$)。与

模型组相比, ago-miR-202-5p 组及 PCSK9 抑制剂组大鼠脑脊液中 PCSK9、Aβ42、Aβ40、TC 水平降低 ($P < 0.05$), 且 ago-miR-202-5p 组对上述指标的改善效果好于 PCSK9 抑制剂组 ($P < 0.05$)。ago-NC 组与模型组相比, 上述指标差异不显著 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.5 过表达 miR-202-5p 或抑制 PCSK9 对 AD 大鼠脑皮层组织中 TNF-α、IL-1β、P-tau 水平的影响

与正常对照组相比, 模型组大鼠脑皮层组织中 TNF-α、IL-1β、P-tau 水平升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, ago-miR-202-5p 组及 PCSK9 抑制剂组大鼠上述指标水平降低 ($P < 0.05$), 且 ago-miR-202-5p 组对上述指标的改善效果好于 PCSK9 抑制剂组 ($P < 0.05$)。ago-NC 组与模型组相比, 上述指标差异不显著 ($P > 0.05$), 见图 3。

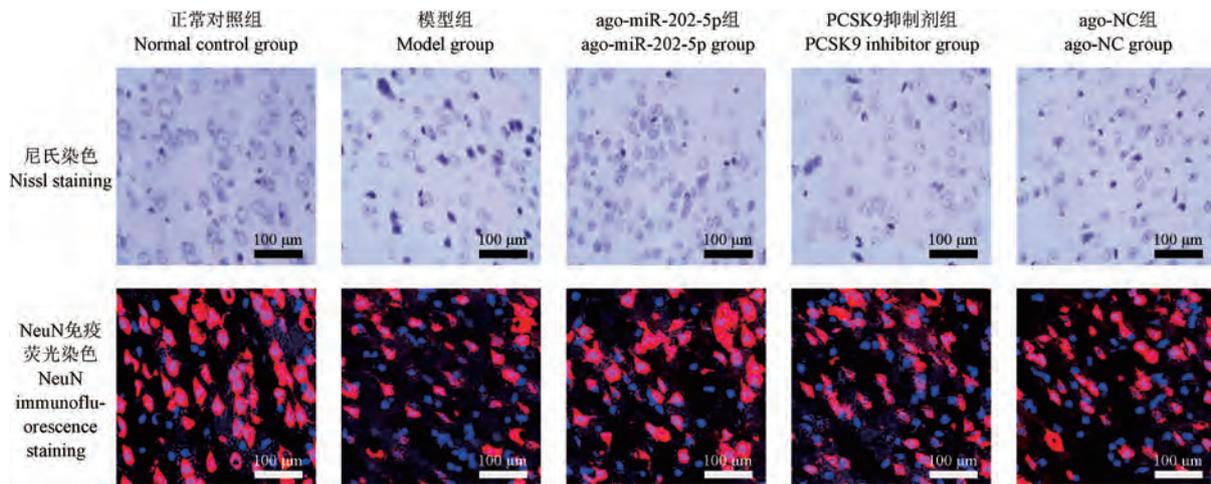
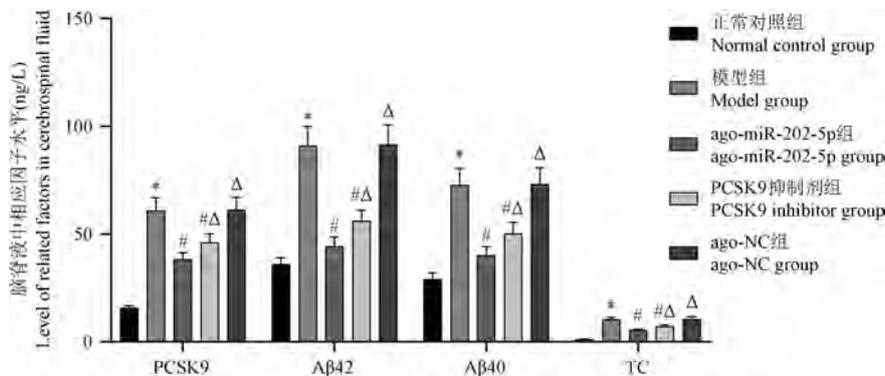


图 1 大鼠脑皮层组织尼氏染色及 NeuN 免疫荧光染色图

Figure 1 Nissl staining and NeuN immunofluorescence staining of rat cerebral cortex



注: 与正常对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$; 与 ago-miR-202-5p 组相比, Δ $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠脑脊液中 PCSK9、Aβ42、Aβ40、TC 水平比较

Note. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the ago-miR-202-5p group, Δ $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of PCSK9, Aβ42, Aβ40 and TC levels in rat cerebrospinal fluid

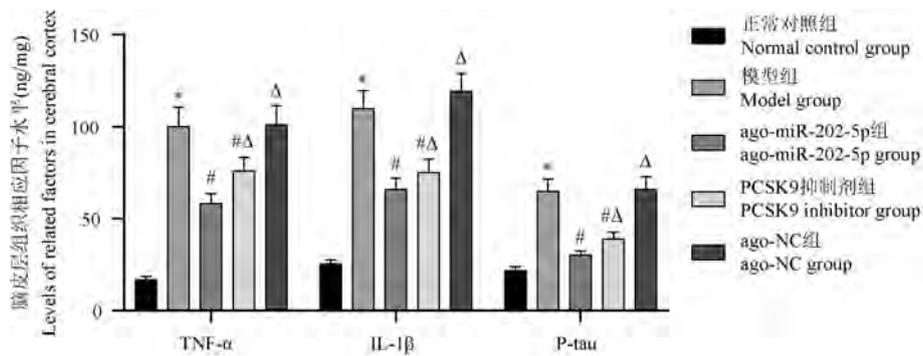
2.6 过表达 miR-202-5p 或抑制 PCSK9 对 AD 大鼠脑皮层组织 PCSK9 及下游 LRP-1、ApoE、APP、BACE1 蛋白表达的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠脑皮层组织中 LRP-1、ApoE 表达降低,PCSK9、APP、BACE1 蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,ago-miR-202-5p 组及 PCSK9 抑制剂组大鼠脑皮层组织中 LRP-1、ApoE 表达升高,PCSK9、APP、BACE1 蛋白表达降低($P<0.05$),且 ago-miR-202-5p 组对上述指标的改善效果好于 PCSK9 抑制剂组($P<0.05$)。ago-NC 组与

模型组相比,上述指标差异不显著($P>0.05$),见图 4。

2.7 miR-202-5p 对 PCSK9 靶向调控的影响

starbase 网站预测 miR-202-5p 与 PCSK9 存在结合位点。双荧光素酶试验发现,共转染 miR-202-5p mimic 和无突变的 PCSK9-WT 载体,可使 293 T 细胞中荧光素酶活性显著下降(0.98 ± 0.07 vs 0.34 ± 0.04 , $P<0.01$),而共转染 miR-202-5p mimic 和发生突变的 PCSK9-MUT 载体对荧光素酶活性无显著作用(0.97 ± 0.07 vs 0.93 ± 0.08 , $P>0.05$),见图 5。

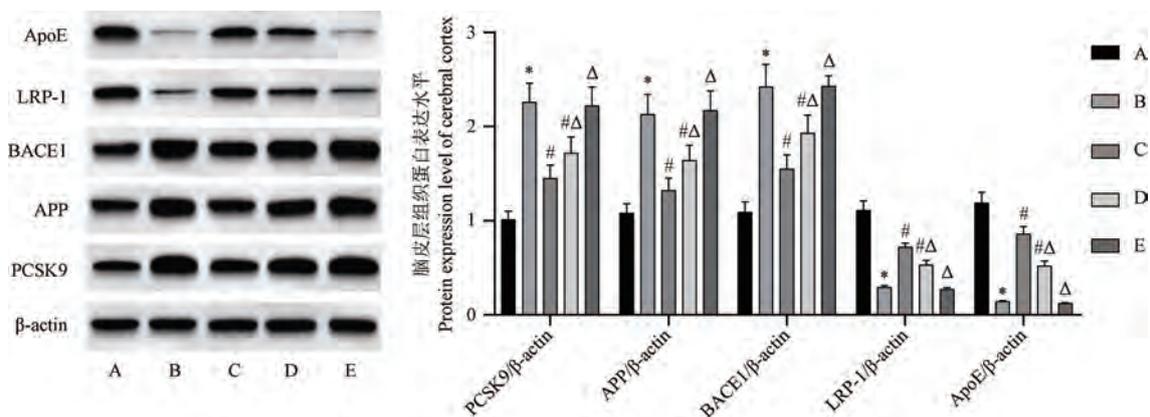


注:与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与 ago-miR-202-5p 组相比,Δ $P<0.05$ 。

图 3 大鼠脑皮层组织中 TNF-α、IL-1β、P-tau 水平比较

Note. Compared with the normal control group,* $P<0.05$. Compared with the model group,# $P<0.05$. Compared with the ago-miR-202-5p group,Δ $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of TNF-α, IL-1β and P-tau levels in rat cerebral cortex



注:A:正常对照组;B:模型组;C:ago-miR-202-5p 组;D:PCSK9 抑制剂组;E:ago-NC 组。与正常对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与 ago-miR-202-5p 组相比,Δ $P<0.05$ 。

图 4 大鼠脑皮层组织蛋白表达水平比较

Note. A, Normal control group. B, Model group. C, ago-miR-202-5p group. D, PCSK9 inhibitor group. E, ago-NC group. Compared with the normal control group,* $P<0.05$. Compared with the model group,# $P<0.05$. Compared with the ago-miR-202-5p group,Δ $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of protein expression levels in rat cerebral cortex

2.8 共转染 miR-202-5p 及 pcDNA-PCSK9 对 AD 模型皮质神经元细胞损伤及相应水平的影响

Honchest 33258 染色可见,空白组神经元细胞核形态正常;A β 诱导组神经元细胞核不规则、核膜破裂、核质固缩、核仁碎裂呈颗粒状;miR-202-5p mimic 组及 miR-202-5p mimic+pcDNA-NC 组神经元细胞胞膜较完整,细胞核固缩及损伤较 A β 诱导组减轻;miR-202-5p mimic+pcDNA-PCSK9 组神经元细胞损伤较 miR-202-5p mimic 组加重;mimic-NC 组细胞损伤与模型组相近,见图 6。

与空白组相比, A β 诱导组细胞上清液中 PCSK9、TC、TNF- α 、P-tau 水平升高 ($P < 0.05$)。A β 诱导组相比, miR-202-5p mimic 组、miR-202-5p mimic + pcDNA-NC 组、miR-202-5p mimic + pcDNA-PCSK9 组细胞上清液中上述水平降低 ($P < 0.05$)。与 miR-202-5p mimic 组相比, miR-202-5p mimic + pcDNA-PCSK9 组细胞上清液中各指标升高 ($P < 0.05$)。mimic-NC 组与模型组相比, miR-202-5p mimic 组与 miR-202-5p mimic + pcDNA-NC 组相比, 上述指标差异不显著 ($P > 0.05$), 见图 7。

2.9 共转染 miR-202-5p 及 pcDNA-PCSK9 对 AD 模型皮质神经元细胞 miR-202-5p/PCSK9 轴及下游蛋白表达影响

与空白组相比, A β 诱导组细胞上清液中 miR-202-5p、LRP-1、ApoE 表达降低, PCSK9、BACE1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与 A β 诱导组相比, miR-202-5p mimic 组、miR-202-5p mimic + pcDNA-NC 组、miR-202-5p mimic + pcDNA-PCSK9 组细胞 miR-202-5p、LRP-1、ApoE 表达升高, PCSK9、BACE1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与 miR-202-5p mimic 组相比, miR-202-5p mimic + pcDNA-PCSK9 组 LRP-1、ApoE 表达降低, PCSK9、BACE1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), miR-202-5p 表达差异不显著 ($P > 0.05$)。mimic-NC 组与模型组相比, miR-202-5p mimic 组与 miR-202-5p mimic + pcDNA-NC 组相比, 上述指标差异不显著 ($P > 0.05$), 见图 8。

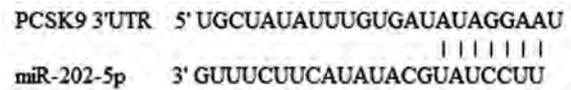


图 5 miR-202-5p 和 PCSK9 的靶向关系

Figure 5 Targeting relationship between miR-202-5p and PCSK9

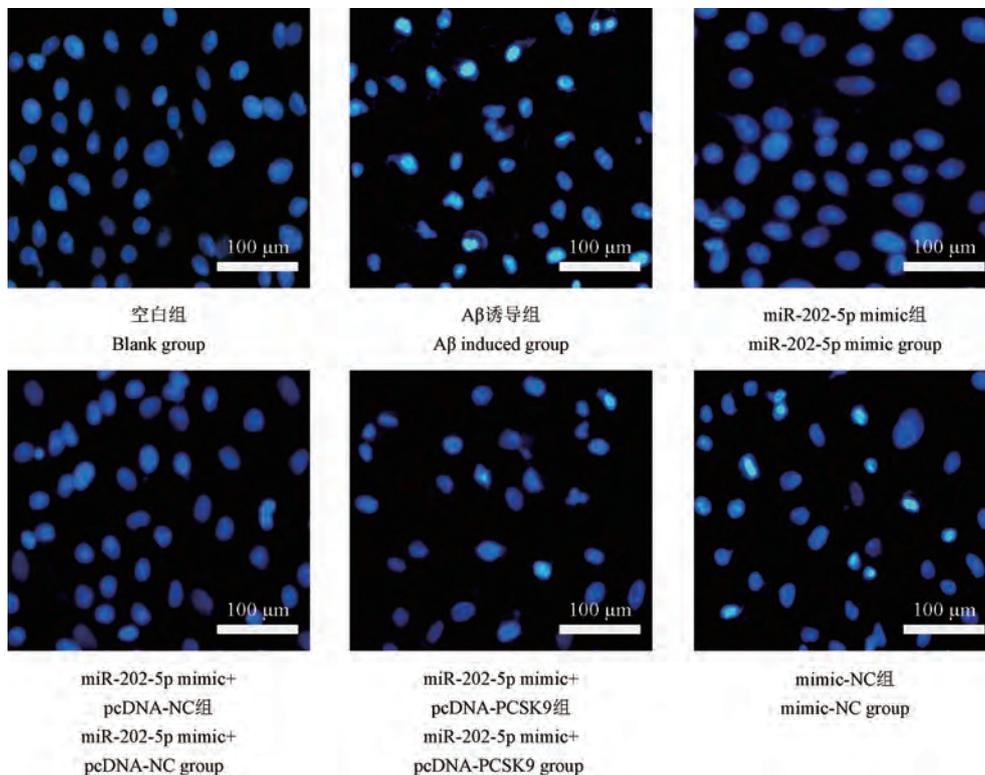
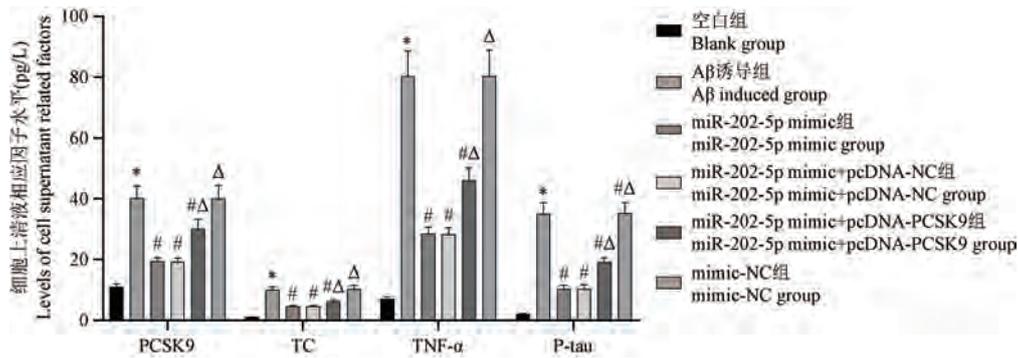


图 6 脑皮质神经元 Honchest33258 染色图

Figure 6 Honchest33258 staining of cerebral cortical neurons

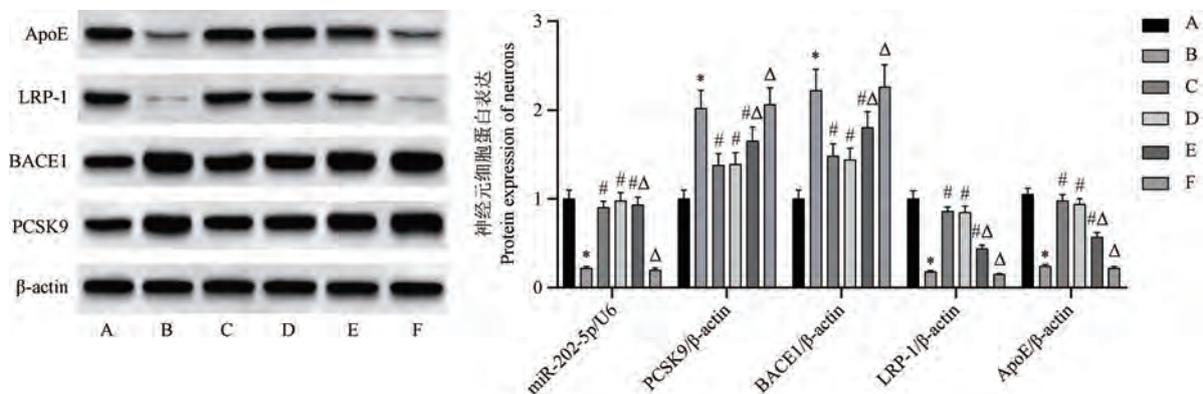


注:与空白组相比,* $P<0.05$;与A β 诱导组相比,# $P<0.05$;与miR-202-5p mimic组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图7 细胞上清液中 PCSK9、TC、TNF- α 、P-tau 水平比较

Note. Compared with blank group, * $P<0.05$. Compared with A β induction group, # $P<0.05$. Compared with miR-202-5p mimic group, $\Delta P<0.05$.

Figure 7 Comparison of PCSK9, TC, TNF- α , P-tau levels in cell supernatant



注:A:空白组;B:A β 诱导组;C:miR-202-5p mimic组;D:miR-202-5p mimic+pcDNA-NC组;E:miR-202-5p mimic+pcDNA-PCSK9组;F:mimic-NC组。与空白组相比,* $P<0.05$;与A β 诱导组相比,# $P<0.05$;与miR-202-5p mimic组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图8 脑皮质神经元细胞蛋白表达比较

Note. A, Blank group. B, A β induced group. C, miR-202-5p mimic group. D, miR-202-5p mimic+pcDNA-NC group. E, miR-202-5p mimic+pcDNA-PCSK9 group. F, mimic-NC group. Compared with blank group, * $P<0.05$. Compared with A β induction group, # $P<0.05$. Compared with miR-202-5p mimic group, $\Delta P<0.05$.

Figure 8 Comparison of protein expression in cerebral cortex neurons

3 讨论

随着社会老龄化的加重,AD已成为急需解决的世界难题。据美国联邦调查局统计,美国10年间由于AD导致的死亡人数已增加了146.2%;到本世纪中叶,美国65岁以上的AD病人可能增加至1380万,而中国AD病人将突破2800万,成为世界上AD病人最多的国家^[12]。AD带来的不仅是巨大的经济负担,还有死亡的威胁^[13]。故探寻有效的措施防止AD发生、减缓AD发展进程显得尤为重要。

国际工作组已将脑脊液中A β 水平纳入AD诊断指标中^[14]。探究A β 生成及清除机制,可能对逆转AD患者A β 积聚引起的神经纤维缠结、神经元炎

性损伤及丢失等神经系统损伤有重大研究价值^[15]。大量文献研究发现,AD发生时,大量生成的BACE1可裂解并切割APP的671至672间肽键,并在 γ 分泌酶水解条件下生成A β 40、A β 42而发挥神经毒性作用^[16]。本研究经脑内注射A β 1-42发现大鼠脑脊液中A β 42、A β 40水平、脑皮层组织P-tau、炎症因子TNF- α 、IL-1 β 水平均升高的同时,促A β 42、A β 40生成的BACE1表达也显著升高,大鼠表现出神经元损伤、丢失及空间记忆及学习能力降低,提示造模成功。A β 1-42体外诱导的神经元凋亡过程中,也检测到BACE1水平的升高,证实BACE1切割APP生成的A β ,可能是AD发生的关键因素。

近来研究发现,脑内胆固醇变化会影响A β 代

谢并导致 AD 神经变性^[17]。文献报道发现,胆固醇是脑内髓鞘的重要组成部分,可参与神经元及突触发育、神经炎性产生、受损细胞膜的维持和修复过程^[18]。但胆固醇不能透过血脑屏障而只能在大脑原位的局部神经系统合成^[19],而随着年龄的增长,成年神经元会逐渐失去合成胆固醇的能力,而不得不依赖星形胶质细胞产生胆固醇,并将胆固醇转运至神经元^[20]。星形胶质细胞将胆固醇转运至神经元的过程中,必须经过 ApoE、LRP1 的颗粒转运^[21-22]。但 AD 患者脑脊液中大量产生的 PCSK9 可降解 ApoE、LRP1,使神经元对胆固醇的摄取吸收减少,而神经元胆固醇的消耗增加、摄取吸收减少,势必会导致 A β 肽代谢及 tau 蛋白磷酸化异常而引起神经元凋亡^[23-24]。Zhang 等^[25]研究发现星形胶质细胞产生的胆固醇,不能被神经元摄取后,可在临近脂筏、膜微域中积累,而为不溶性 A β 片段提供稳定的沉积环境,并进一步诱导 A β 的产生,认为胆固醇稳态变化,是影响 A β 产生的关键因素,这与杨宏艳等^[26]胆固醇转运抑制剂加重星形胶质瘤细胞促 BACE1-APP-A β 生成及 AD 发展,观点相一致。PCSK9 是参与胆固醇调节的重要因子^[27],近来研究发现 AD 患者 PCSK9 的大量产生,可能与 BACE1 切割 APP 介导 A β 生成活性升高有关,认为 BACE1 大量升高可能刺激 PCSK9 的大量产生,来抑制 BACE1 切割 APP 并阻断 A β 生成来发挥神经保护作用^[28]。但也有研究发现,PCSK9 的产生不仅可诱导 Bcl/Bax-Caspase9 凋亡活性的升高来促进神经凋亡,还可降解并抑制 ApoE、LRP1(具有促 A β 清除、促神经元胆固醇摄取)表达,来加速 A β 生成并阻碍其清除,而参与 AD 发生发展过程^[29-30]。Xue 等^[31]及 Abuelezz 等^[6]等发现,AD 患者 PCSK9 的高度表达,在降低 LRP-1 引起神经元胆固醇摄取减少及 A β 清除受损的同时,还诱导 TOLL 样受体 4 通路活化而导致炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 分泌,进而导致神经元炎症损伤。本研究也在 AD 大鼠脑脊液及体外 AD 模型细胞上清液中,检测到 PCSK9 表达的升高,皮层组织及神经细胞中 ApoE、LRP1 表达的降低,用 PCSK9 抑制剂-Aliro 可明显抑制 PCSK9 升高、ApoE 及 LRP1 降低,而降低 A β 生成、发挥抗 AD 神经元炎症损伤症状,提示干预 PCSK9 表达,可缓解 AD 过程中 A β 沉积及神经损伤。

miRNA 也是参与 AD 患者 A β 生成、清除及神经元损伤的关键调节因子。大量文献研究发现,多

种 miRNA 可通过抑制 BACE1 或 APP 的产生,而抑制 A β 沉积及 AD 神经损伤^[32]。miRNA 中的 miR-202-5p 可作为抑癌基因而参与乳腺癌、前列腺癌、口腔癌等肿瘤细胞异常增殖过程,近来研究发现,在脑缺血及神经元应激性凋亡过程中,miR-202-5p 表达也异常降低,并认为 miR-202-5p 异常表达也参与神经系统损伤过程^[33]。Dong 等^[8]发现 miR-202-5p 在 AD 患者血清中表达降低,且 miR-202-5p 与 APP 的 3' UTR 端有靶向结合位点,并认为 miR-202-5p 发挥抗 AD 作用,可能与靶向抑制 APP 表达而阻断 A β 生成有关。但 miRNA 可通过调节多个靶蛋白发挥生物学效应,miR-202-5p 的抗 AD 作用,除 APP 外还可能通过其他靶蛋白发挥作用。本研究发现,miR-202-5p 也与 PCSK9 之间存在靶向结合位点,过表达 miR-202-5p 可通过抑制 PCSK9 表达来上调 ApoE、LRP1 表达,发挥抗胞外胆固醇分泌、抗 A β 生成及 AD 神经炎性损伤作用。上调 PCSK9 表达后,可部分减弱 miR-202-5p 的抗 A β 生成及神经炎性因子分泌作用。

综上所述,过表达 miR-202-5p 可通过抑制 PCSK9 活化抑制 A β 生成并促进 LRP-1/ApoE 介导的促胆固醇摄取及 A β 清除,进而发挥抗 AD 神经损伤作用。这为 AD 的基因靶向治疗提供一定参考。但 PCSK9 与 BACE1-A β 生成途径的调控关系还存在争议较多,ApoE-LRP1 促胆固醇摄取及 A β 清除作用盲点也较多,这需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, et al. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention [J]. J Prev Alzheimers Dis, 2021, 8(3): 313-321.
- [2] Takeda K, Uda A, Mitsubori M, et al. Mitochondrial ubiquitin ligase alleviates Alzheimer's disease pathology via blocking the toxic amyloid- β oligomer generation [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 192.
- [3] Shi W, Wu H, Liu S, et al. Progesterone suppresses cholesterol esterification in APP/PS1 mice and a cell model of Alzheimer's disease [J]. Brain Res Bull, 2021, 173: 162-173.
- [4] Zimetti F, Caffarra P, Ronda N, et al. Increased PCSK9 cerebrospinal fluid concentrations in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 55(1): 315-320.
- [5] Adorni MP, Ruscica M, Ferri N, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, brain cholesterol homeostasis and potential implication for Alzheimer's disease [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 120.
- [6] Abuelezz SA, Hendawy N. HMGB1/RAGE/TLR4 axis and

- glutamate as novel targets for PCSK9 inhibitor in high fat cholesterol diet induced cognitive impairment and amyloidosis [J]. *Life Sci*, 2021, 273: 119310.
- [7] Gabr MT, Brogi S. MicroRNA-based multitarget approach for Alzheimer's disease; discovery of the first-in-class dual inhibitor of acetylcholinesterase and microRNA-15b biogenesis [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(17): 9695-9704.
- [8] Dong LH, Sun L, Zhang WJ, et al. Reduced serum miR-202 may promote the progression of Alzheimer's disease patients via targeting amyloid precursor protein [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(8): 730-738.
- [9] 刘亭, 毕竟, 王盼, 等. MAPK/ERK 信号通路参与褪黑素对阿尔茨海默病大鼠小脑的神经保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(3): 402-407.
- [10] Ginsberg HN, Rader DJ, Raal FJ, et al. Efficacy and safety of alirocumab in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia and LDL-C of 160 mg/dl or higher [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2016, 30(5): 473-483.
- [11] 张琳, 杨菁, 刘赞华, 等. 阿尔茨海默病细胞模型中 β 淀粉样蛋白介导 ERK 信号通路的 STEP₆₁ 负性调控 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(28): 4507-4512.
- [12] Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, Llamas Velasco S, et al. Report by the spanish foundation of the brain on the social impact of Alzheimer disease and other types of dementia [J]. *Neurologia (Engl Ed)*, 2021, 36(1): 39-49.
- [13] Davis EJ, Broestl L, Abdulai-Saiku S, et al. A second X chromosome contributes to resilience in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(558): eaaz5677.
- [14] Baglietto-Vargas D, Forner S, Cai L, et al. Generation of a humanized A β expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2421.
- [15] 崔雨婷, 王亚琦, 王培昌, 等. 阿尔茨海默病中 β 淀粉样蛋白的生成及清除的调节 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(2): 176-181.
- [16] Ray B, Maloney B, Sambamurti K, et al. Rivastigmine modifies the α -secretase pathway and potentially early Alzheimer's disease [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 47.
- [17] Behl T, Kaur I, Sehgal A, et al. The interplay of ABC transporters in A β translocation and cholesterol metabolism; implicating their roles in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(4): 1564-1582.
- [18] Genaro-Mattos TC, Anderson A, Allen LB, et al. Cholesterol biosynthesis and uptake in developing neurons [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(8): 3671-3681.
- [19] González-Ramírez EJ, Goñi FM, Alonso A, et al. Mixing brain cerebroside with brain ceramides, cholesterol and phospholipids [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13326.
- [20] Du C, Hou J, Wang C, et al. Effects of safflower yellow on cholesterol levels in serum and brain tissue of APP/PS1 mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(4): 557-569.
- [21] Jeong W, Lee H, Cho S, et al. ApoE4-induced cholesterol dysregulation and its brain cell type-specific implications in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(11): 739-746.
- [22] Guay SP, Houde AA, Breton E, et al. DNA methylation at LRP1 gene locus mediates the association between maternal total cholesterol changes in pregnancy and cord blood leptin levels [J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2020, 11(4): 369-378.
- [23] O'Connell EM, Lohoff FW. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in the brain and relevance for neuropsychiatric disorders [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 609.
- [24] Zhao XS, Wu Q, Peng J, et al. Hyperlipidemia-induced apoptosis of hippocampal neurons in apoE^{-/-} mice may be associated with increased PCSK9 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2): 712-718.
- [25] Zhang X, Hu J, Zhong L, et al. Quercetin stabilizes apolipoprotein E and reduces brain A β levels in amyloid model mice [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 108: 179-92.
- [26] 杨宏艳, 都晓辉, 包亚男, 等. U18666A 对星形胶质瘤 U373 细胞 APP 代谢及 A β 生成的影响 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(22): 16-20.
- [27] Bamji AN. Do PCSK9 inhibitors do anything more than reduce LDL cholesterol [J]. *BMJ*, 2020, 368: 1159.
- [28] Wu Q, Tang ZH, Peng J, et al. The dual behavior of PCSK9 in the regulation of apoptosis is crucial in Alzheimer's disease progression (Review) [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(2): 167-171.
- [29] Picard C, Poirier A, Bélanger S, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in Alzheimer's disease: A genetic and proteomic multi-cohort study [J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0220254.
- [30] 范磊, 陈静, 任进, 等. PCSK9 与多种代谢相关疾病发生发展关系的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(5): 507-512.
- [31] Xue SZ, Juan P, Qi W, et al. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 456: 107-114.
- [32] Thangavelu B, Wilfred BS, Johnson D, et al. Penetrating ballistic-like brain injury leads to MicroRNA dysregulation, BACE1 upregulation, and amyloid precursor protein loss in lesioned rat brain tissues [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 915-936.
- [33] Li B, Huang Z, Meng J, et al. MiR-202-5p attenuates neurological deficits and neuronal injury in MCAO model rats and OGD-induced injury in Neuro-2a cells by targeting eIF4E-mediated induction of autophagy and inhibition of Akt/GSK-3 β pathway [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 51: 101497.

[收稿日期] 2022-02-17

肖潇,冯浩,唐桦,等. TNFAIP1对RhoA的泛素化调节在黑色素瘤进展中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 59-68.

Xiao X, Feng H, Tang H, et al. Regulation of RhoA ubiquitination by TNFAIP1 in melanoma progression [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 59-68.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.008

TNFAIP1对RhoA的泛素化调节在黑色素瘤进展中的作用

肖潇,冯浩*,唐桦,李可,李蓝

(湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)皮肤科,长沙 410000)

【摘要】 目的 探讨肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白1(TNFAIP1)介导的RhoA泛素化在黑色素瘤增殖和侵袭中的作用。方法 进行生物信息学分析以检测黑色素瘤中TNFAIP1和RhoA的表达,然后测定黑色素瘤患者的临床组织的表达。分别通过RT-qPCR和蛋白质印迹测定评估基因或蛋白质的表达。体外构建TNFAIP1和或RhoA过表达的人皮肤黑色素瘤细胞系WM2664和A2058模型。细胞增殖和侵袭分别通过集落形成、CCK-8和Transwell测定进行研究。将表达TNFAIP1和Ub-K48的质粒共转染到处理过的黑色素瘤细胞中,同时进行免疫沉淀测定以确定TNFAIP1和RhoA之间的相互作用。建立体内模型以确认TNFAIP1和RhoA对肿瘤生长和转移的影响。结果 与癌旁正常组织相比,肿瘤组织中TNFAIP1表达显著降低($P<0.01$)和RhoA表达显著升高($P<0.01$)。TNFAIP1高表达的黑色素瘤患者预后良好,而具有RhoA高表达的黑色素瘤患者预后不良。在体外,TNFAIP1的过表达显著抑制黑色素瘤细胞的增殖和侵袭。TNFAIP1介导K48连接的RhoA泛素化以促进其降解。进一步的救援实验发现,RhoA过表达在体内和体外显著抑制了TNFAIP1过度表达在黑色素瘤增殖和侵袭中的调节作用。结论 TNFAIP1在黑色素瘤中发挥肿瘤抑制作用,其通过诱导RhoA泛素化抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。

【关键词】 肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白1;RhoA;黑色素瘤;侵袭;增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)10-0059-10

Regulation of RhoA ubiquitination by TNFAIP1 in melanoma progression

XIAO Xiao, FENG Hao*, TANG Hua, LI Ke, LI Lan

(Department of Dermatology, Hunan Provincial People's Hospital, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of tumor necrosis factor α -induced protein 1 (TNFAIP1)-mediated RhoA ubiquitination in melanoma cell proliferation and invasion. **Methods** Bioinformatics analysis was performed to assess TNFAIP1 and RhoA expression in melanoma cell, followed by analyzing its expression in clinical tissues from melanoma patients. Gene and protein expression was assessed by RT-qPCR and Western blot assays, respectively. Human skin melanoma cell lines WM2664 and A2058 overexpressing TNFAIP1 and/or RhoA were established *in vitro*. Cell proliferation and invasion were investigated by colony formation, CCK-8 and Transwell assays. Plasmids expressing TNFAIP1 and RhoA were cotransfected into treated melanoma cells and immunoprecipitation assays were performed to determine the interaction between TNFAIP1 and RhoA. An *in vivo* model was established to confirm the effects of TNFAIP1

[基金项目] 湖南省中医药科研计划项目(201977)。

[作者简介] 肖潇(1986—),女,博士,主治医师,研究方向:皮肤光老化,表观遗传学。E-mail: xiaoxiao2022@163.com

[通信作者] 冯浩(1975—),女,博士,主任医师,研究方向:皮肤黑色素瘤和泛素化调控。E-mail: keyok098@163.com

and RhoA on tumor growth and metastasis. **Results** Compared with adjacent normal tissues, TNFAIP1 expression was significantly decreased ($P < 0.01$) and RhoA expression was significantly increased ($P < 0.01$) in tumor tissues. Melanoma patients with high TNFAIP1 expression had a good prognosis, whereas melanoma patients with high RhoA expression had a poor prognosis. *In vitro*, TNFAIP1 overexpression significantly inhibited melanoma cell proliferation and invasion. TNFAIP1 mediated K48-linked ubiquitination of RhoA to promote its degradation. Rescue experiments showed that RhoA overexpression significantly inhibited the regulatory role of TNFAIP1 overexpression in melanin cell proliferation and invasion *in vivo* and *in vitro*. **Conclusions** TNFAIP1 has a tumor suppressor role in melanoma, which inhibits tumor cell proliferation and invasion by inducing RhoA ubiquitination.

【Keywords】 tumor necrosis factor α -induced protein 1; RhoA; melanoma; invasion; proliferation

恶性黑色素瘤起源于黑色素细胞,主要发生在皮肤中,具有高度转移性肿瘤的特征,约 5% 的患者在初始诊断时出现远处转移^[1]。尽管免疫治疗或靶向治疗药物产生显著的临床益处,将五年总生存率提高到 35%~50%,但很大一部分转移性黑色素瘤患者对治疗仍无反应^[2]。因此,寻找黑色素瘤进展的原因对于进一步改进治疗策略仍然至关重要。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 1 (tumor necrosis factor α -induced protein 1, TNFAIP1) 是一种众所周知的 BTB (bric-a-brac, tramtrack and broad complex) 结构域结构域蛋白,它在 DNA 合成、细胞凋亡、细胞迁移和免疫反应中起关键作用^[3-4]。新出现的证据表明 TNFAIP1 降低与非小细胞肺癌、子宫癌、胃癌等癌症转移和进展密切相关^[5-6]。然而, TNFAIP1 在黑色素瘤中的潜在机制鲜有报道。TNFAIP1 的一个主要抑癌机制涉及底物降解和蛋白质稳定性^[5]。最近研究发现, TNFAIP1 通过介导 RhoA 的泛素化来控制肺癌细胞迁移^[5]。RhoA 是小 GTP 酶 Rho 亚家族的成员,已证实靶向 RhoA 调节耐药黑色素瘤基因转录^[7]。然而, TNFAIP1 是否通过介导 RhoA 的泛素化参与黑色素瘤进展仍不清楚。因此,我们通过生物信息学分析检测了黑色素瘤组织中 TNFAIP1 和 RhoA 的表达。此外,我们还在黑色素瘤细胞中研究了 TNFAIP1 和 RhoA 之间的相互作用和功能。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

18 只 SPF 级 BALB/c 裸鼠(雌性,6~8 周,体重 18~22 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2018-0001]。小鼠饲养于湖南省实验动物中心[SYXK(湘)2018-0003],在标准动物房饲养,湿度为 40%~70%,温度为 20℃~22℃,12 h

的光/暗循环。动物实验经湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院)动物实验伦理委员会审核批准(HNRMLY-2020-014),并严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.1.2 细胞

人皮肤黑色素瘤细胞系 WM2664 和 A2058 均购自美国典型培养物保藏中心。细胞接种在含有 10% 胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司)、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 Roswell Park Memorial Institute 1640 培养基(美国 Gibco 公司)中培养。

1.1.3 临床样本

于 2015 年 3 月至 2020 年 10 月期间,从本院收集了 82 名黑色素瘤患者的黑色素瘤组织和邻近组织(距肿瘤至少 5 cm)。在所有黑色素瘤患者中,男性患者 54 例,女性患者 28 例,平均年龄(53.11 ± 9.16)岁(范围 36~74 岁)。病程(4.25 ± 2.24)个月;瘤体位置:手背部 23 例,手指甲下 15 例,外阴 4 例,头面部 16 例,下肢 24 例。其中伴淋巴结转移 37 例,不伴淋巴结转移 45 例;根据皮肤癌的 Clark 分级定义:I 级 19 例,II 级 14 例,III 级 11 例,IV 级 22 例,V 级 16 例。所有患者均无其他临床病理特征,未接受术前治疗,如放疗或化疗。根据世界卫生组织标准进行黑色素瘤的组织学诊断。所有收集的组织的组织在 -80°C 下储存直至使用。研究经本院伦理委员会批准同意(20140843-1)。

1.2 主要试剂与仪器

Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; TNFAIP1、RhoA 的过表达质粒和 Ub 及其突变体的质粒以及带有各种标签(Flag/HA/Myc) TNFAIP1 购自上海 Genepharma 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; PrimeScript^{RT} 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Fast SYBR Green PCR 试剂购自美国 Applied Biosystems 公司; CCK-8、山羊抗兔 IgG 多克隆二抗购自上海 Beyotime 公司; Matrigel、抗 HA、

Myc、Flag 抗体购自美国 Sigma 公司;增强型放射免疫沉淀测定裂解物、二辛可宁酸蛋白质定量试剂盒购自武汉 Boster 公司;抗 TNFAIP1、RhoA、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、GAPDH、Ki-67 抗体购自美国 Abcam 公司。ABI PRISM 7300 RT-PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司。光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析

下载了来自 UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/>) 的 TCGA 数据库中的黑色素瘤相关数据,并且仅对具有来自 RNA-seq 的生存数据和基因表达数据的患者进行了总体生存分析。对于每个基因,使用 TCGA 样本 id、时间(day_to_death 或 day_to_last_follow-up 时间)、状态(活着或死亡)和表达水平(高表达或低/中表达)的列构建了一个制表符分隔的输入文件。样品分为以下两组:高表达组(TPM 值高于上四分位数)和低/中表达组(TPM 值低于上四分位数)。Kaplan-Meier 生存曲线图是为每种 TCGA 癌症类型中的每个基因创建的,带有“survival”包和“survminer”包。通过对数秩检验比较高表达和低/中表达样本的存活曲线。Kaplan-meier 生存分析的详细步骤在相应的网站 (<https://ucsc-xena.gitbook.io/project/overview-of-features/kaplan-meier-plots>) 中描述。

1.3.2 细胞转染

取对数生长细胞用胰蛋白酶消化,以每孔 1×10^5 接种到 6 孔板中,并根据 Lipofectamine 2000 的说明转染,24 h 后达到约 75% 融合。用 TNFAIP1 和 RhoA 的过表达质粒以及泛素(Ub)-wt、Ub-K48、Ub-K63 单独或组合转染细胞。

1.3.3 定量逆转录 PCR(RT-qPCR)

使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA。按照 PrimeScript RT 试剂盒的说明,将 RNA 反向转录成 cDNA。然后,通过 Fast SYBR Green PCR 试剂和 ABI PRISM 7300 RT-PCR 系统对 cDNA 进行 RT-qPCR。以 GAPDH 为内参照基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算每个基因的相对表达水平。引物序列如下: GAPDH: Forward: 5'-CGAGCCACATCGCTCAGACA-3', Reverse: 5'-GTGCTGAAGACGCCAGTGA-3'; TNFAIP1: Forward: 5'-ACACCAGACCGCAGCTCC A-3', Reverse: 5'-TCGTGGAAGATTTCCGGT GTC-3'; RhoA: Forward: 5'-TCCATTGCTGCTGTC

TGATTTGTAG-3', Reverse: 5'-AGCAAGGCATGAGT TGCACA-3'。

1.3.4 细胞增殖试验

通过 CCK-8 和克隆形成测定法评估细胞的增殖。将细胞(5×10^3 个/孔)接种到 96 孔板中并培养过夜。随后,每孔加入 CCK-8(10 μ L),再孵育 2 h。然后,通过酶标仪测量吸光度(450 nm)。对于细胞集落形成测定,将癌细胞(100 个/孔)接种在 12 孔板中,并在 37°C 培养箱中生长 14 d。将菌落(>50 个细胞)固定 10 min。随后,应用结晶紫(1%)对菌落染色 5 min。在显微镜下测量菌落数($\times 200$ 放大倍数)。

1.3.5 Transwell 检测

为了检查癌细胞的侵袭能力,将 1.0×10^6 个癌细胞和 200 μ L 不含血清的培养基添加到用 Matrigel (8 μ m) 预处理的上室中。同时,将含有 10% FBS 的 600 μ L 培养基加入下室。培养 48 h 后,用 0.1% 结晶紫对下室细胞进行染色,光镜下观察计数。

1.3.6 蛋白质印迹

用含有蛋白酶抑制剂的增强型放射免疫沉淀测定裂解物裂解细胞,然后使用二辛可宁酸蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白质通过 10% SDS-PAGE 分离,并电泳转移到 PVDF 膜上。将膜在室温下用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h,与抗 TNFAIP1(1:1000)、RhoA(1:1000)、E-cadherin(1:1000)、N-cadherin(1:1000)、Vimentin(1:1000)、Flag(1:2000)、HA(1:2000)、Myc(1:1000)和 GAPDH(1:1000)在 4°C 下过夜。随后,应用山羊抗兔 IgG 多克隆二抗(1:5000)孵育膜 1 h。应用 ECL 化学发光显示印迹。通过 Image J 软件对条带进行量化,并标准化为 GAPDH。

1.3.7 泛素化测定

将指定的质粒转染到黑色素瘤细胞中。转染 48 h 后,将细胞与 MG132(50 μ g/mL)一起培养 8 h,收获并在 IP 裂解缓冲液中裂解。使用 2 mg 抗 HA 标签抗体或 IgG 对细胞裂解物进行免疫沉淀,然后进行蛋白质印迹和 IP 测定。

1.3.8 异种移植小鼠模型

将小鼠随机分为载体组、TNFAIP1 组和 TNFAIP1+RhoA 组,每组 6 只。将稳定转染的 TNFAIP1 过表达或 RhoA 处理过表达 TNFAIP1 的 WM2664 细胞(1×10^6 个)或载体转染细胞皮下注

射到裸鼠的右背侧。在指定的时间点监测肿瘤体积。注射后两周,处死小鼠,切除肿瘤,称重,拍照,免疫组化染色。

1.3.9 免疫组化染色

将肿瘤组织在 4%多聚甲醛中固定过夜,石蜡包埋,并切成 5 μm 厚的切片。将石蜡切片脱蜡并再水合,并在室温下在 3% H_2O_2 中孵育 25 min,在羊血清中封闭 30 min。然后,样品用 TNFAIP1 (1:2000)、RhoA (1:200)、Ki-67 (1:200) 等一抗在 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。之后,将样品与二抗 (HRP 标记) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 30 min。最后,加入新鲜制备的二氨基联苯胺进行显色。在光学显微镜下观察组织。

1.4 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 21.0 进行处理。测量数据表示为平均数 \pm 标准误差 ($\bar{x}\pm s\bar{x}$)。通过配对样本 t 检验检查黑色素瘤组织和相邻组织之间的数据。使用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组之间的比较。使用重复测量方差分析和 Tukey's post-test 进行不同时间点的组间比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TNFAIP1 和 RhoA 在黑色素瘤中的表达及临床功能鉴定

在黑色素瘤患者收集的 82 个临床样本观察到,与癌旁正常组织相比,肿瘤组织中 TNFAIP1 表达显著降低 ($P<0.01$) 和 RhoA 表达显著升高 ($P<0.01$) (图 1)。此外,通过 TCGA 数据库采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验绘制生存曲线。分析发现, TNFAIP1 高表达的黑色素瘤患者预后良好。具有 RhoA 高表达的黑色素瘤患者预后不良。此外, RhoA 表达与肿瘤转移密切相关 (图 2)。

2.2 TNFAIP1 的过表达在体外抑制黑色素瘤细胞增殖、侵袭

为了研究 TNFAIP1 的功能,通过转染 TNFAIP1 构建过表达 TNFAIP1 的黑色素瘤细胞,并通过 RT-qPCR 进行验证 (图 3)。与载体组相比, TNFAIP1 组显著抑制了黑色素瘤细胞的活力、克隆数和侵袭数 ($P<0.01$) (图 4)。TNFAIP1 组黑色素瘤细胞中 N-cadherin 和 Vimentin 的表达较载体组显著降低 ($P<0.01$),而 E-cadherin 的表达增加 ($P<0.01$) (图

5)。总之, TNFAIP1 过表达抑制了黑色素瘤细胞的增殖、侵袭。

2.3 TNFAIP1 调节 RhoA 泛素化

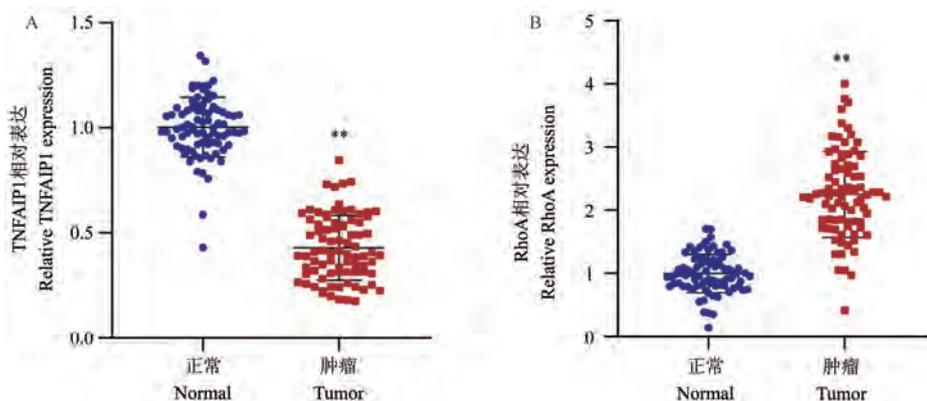
现已知在肝癌中 TNFAIP1 可以通过泛素化修饰降解 RhoA^[8]。本研究中,共免疫沉淀 (Co-IP) 的结果证实了 TNFAIP1 和 RhoA 在过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中的直接相互作用 (图 6)。此外,标记的 TNFAIP1 在 WM2664 细胞中转染,然后进行内源性 IP 测定。结果表明 TNFAIP1 和 RhoA 之间存在直接相互作用 (图 6)。接下来,分析了 TNFAIP1 介导的 RhoA 泛素化。TNFAIP1 和 Ub 共转染到过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中,结果显示 TNFAIP1 显著促进了 RhoA 的泛素化。过表达的 TNFAIP1 主要促进 RhoA 的 K48 泛素化并部分抑制其 K63 泛素化 (图 7)。K48 连接的泛素化主要通过蛋白酶体途径介导降解,这与 RhoA 的蛋白酶体降解一致。为了更好地证明 TNFAIP1 促进了 K48 连接的 RhoA 泛素化,我们用 TNFAIP1 和 Ub-K48 共转染过表达 RhoA 的 WM2664 细胞,然后用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理 WM2664 细胞。根据蛋白质印迹,在 TNFAIP1 过表达后, RhoA 被 Ub 修饰 (图 8),表明 TNFAIP1 确实显著促进了 RhoA 的 K48 连接的泛素化修饰。

2.4 RhoA 上调显著逆转了 TNFAIP1 过表达体外对黑色素瘤细胞的影响

为了进一步证实 RhoA 和 TNFAIP1 之间的分子关联,数据显示, TNFAIP1 过表达对黑色素瘤细胞中 RhoA 水平的影响被 RhoA 显著逆转 (图 9)。RhoA 的过表达显著恢复了 TNFAIP1 过表达诱导的细胞增殖和侵袭抑制作用 (图 10)。同样,在 TNFAIP1 过表达的黑色素瘤细胞中, RhoA 的过表达提高了 N-钙粘蛋白和波形蛋白水平,但降低了 E-钙粘蛋白水平 (图 11)。综上, RhoA 的过表达在体外对 TNFAIP1 的生物功能产生了负面影响。

2.5 RhoA 上调显著逆转了 TNFAIP1 过表达体内对黑色素瘤细胞的影响

为了评估 TNFAIP1 在黑色素瘤细胞肿瘤发生中的作用,用裸鼠进行了皮下异种移植实验。结果表明,过表达 TNFAIP1 的 WM2664 细胞形成的肿瘤在大小和重量上均明显小于载体组细胞形成的肿瘤,同时 RhoA+TNFAIP1 组肿瘤在大小和重量均明显高于 TNFAIP1 组 ($P<0.001$) (图 12)。免疫组织

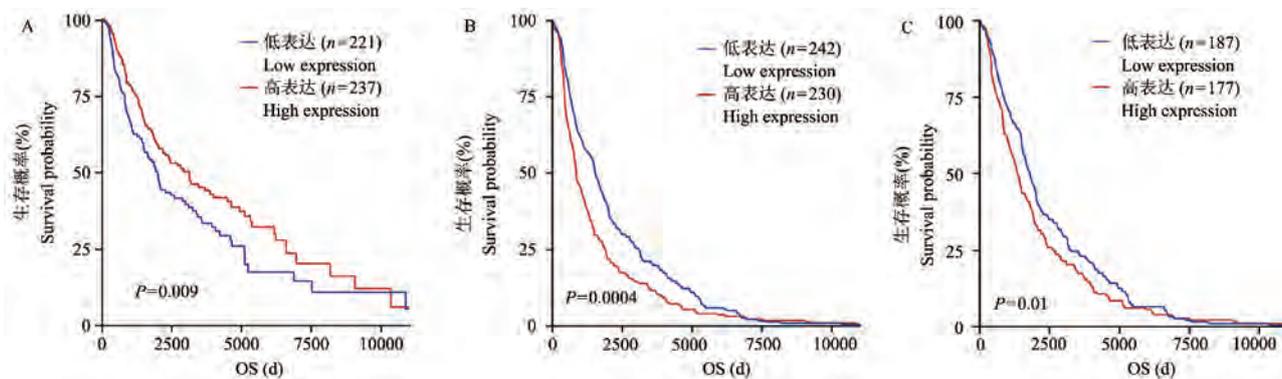


注: A: 黑色素瘤组织样品中 TNFAIP1 的表达; B: 黑色素瘤组织样品中 RhoA 的表达。与正常组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 1 TNFAIP1 和 RhoA 在黑色素瘤中的表达

Note. A, TNFAIP1 expression in melanoma tissue samples. B, RhoA expression in melanoma tissue samples. Compared with normal group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Expression of TNFAIP1 and RhoA in melanoma

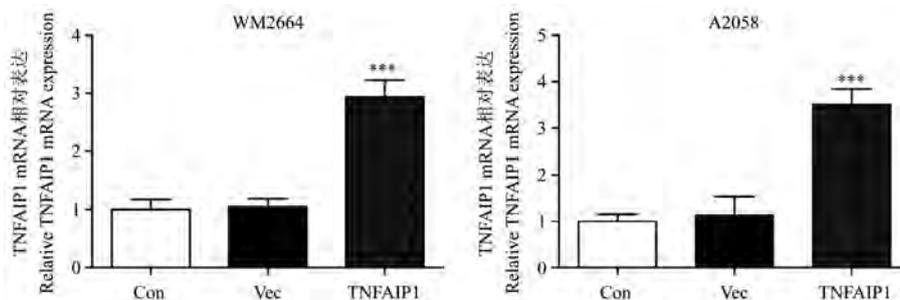


注: A: Kaplan-Meier 生存曲线反映了 TNFAIP1 高表达或低表达的黑色素瘤患者的生存差异; B: Kaplan-Meier 生存曲线反映了 RhoA 高表达或低表达的黑色素瘤患者的生存差异; C: Kaplan-Meier 生存曲线反映了 RhoA 高表达或低表达的转移性黑色素瘤患者的生存差异。

图 2 TNFAIP1 和 RhoA 在黑色素瘤中的临床功能鉴定

Note. A, Kaplan-Meier survival curve reflects the survival difference of melanoma patients with high or low expression of TNFAIP1. B, Kaplan-Meier survival curve reflects the survival difference of melanoma patients with high or low expression of RhoA. C, Kaplan-Meier survival curves reflect differences in survival between patients with metastatic melanoma with high or low expression of RhoA.

Figure 2 Clinical function identification of TNFAIP1 and RhoA in melanoma

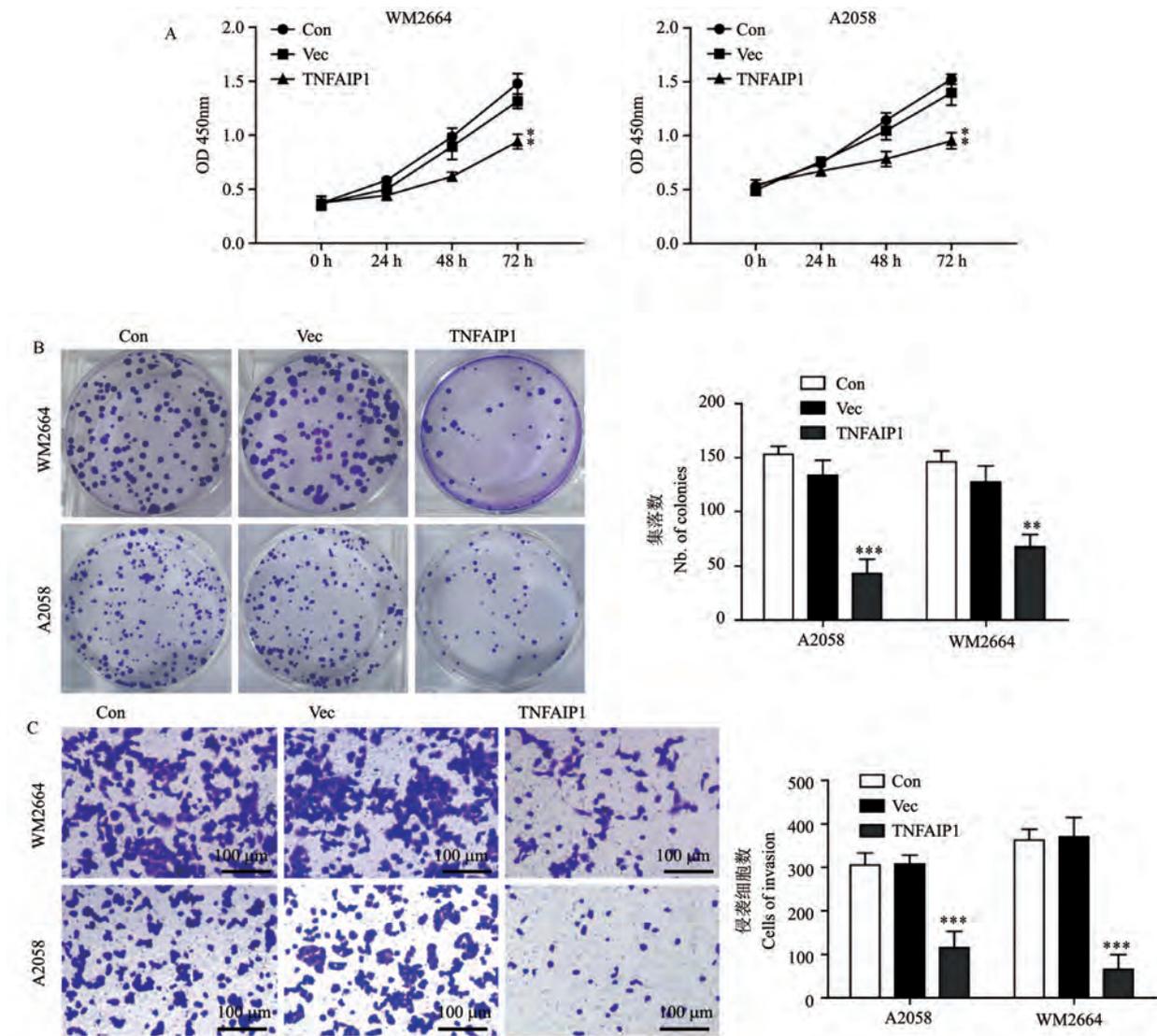


注: 与 Vec 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 3 通过 RT-qPCR 鉴定黑色素瘤细胞中转染物

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

Figure 3 Identification of transfection in melanoma cells by RT-qPCR



注:A:通过 CCK-8 法检测黑色素瘤细胞的活力;B:通过集落形成测定法评估黑色素瘤细胞的增殖;C:通过 Transwell 测定评估黑色素瘤细胞的侵袭。与 Vec 组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 4 TNFAIP1 过表达在体外抑制黑色素瘤细胞的增殖、侵袭

Note. A, Melanoma cell viability was detected by CCK-8 assay. B, Melanoma cell proliferation was assessed by colony formation assay. C, Melanoma cell invasion was assessed by Transwell assay. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

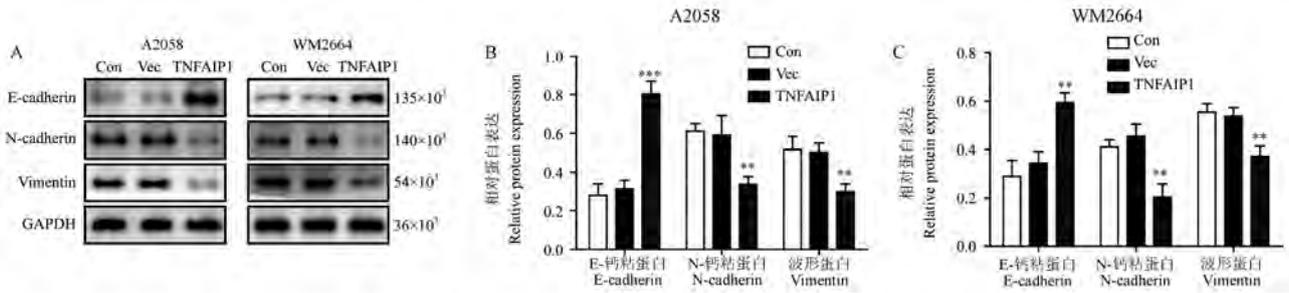
Figure 4 TNFAIP1 overexpression inhibits the proliferation and invasion of melanoma cells *in vitro*

化学染色显示,与载体组相比,TNFAIP1 组肿瘤样本中 TNFAIP1 阳性细胞的百分比显著增加 ($P < 0.01$),和 RhoA、Ki-67 阳性细胞的百分比显著降低 ($P < 0.01$)。RhoA+TNFAIP1 组则逆转了 TNFAIP1 组的这些变化 ($P < 0.05$) (图 13)。总之,这些结果表明 TNFAIP1 通过 RhoA 介导黑色素瘤细胞的生长、侵袭和肿瘤发生。

3 讨论

全世界黑色素瘤的发病率持续上升,导致严重

的社会经济问题^[9]。在本研究中,我们发现 TNFAIP1 在人黑色素瘤组织样本中表达下调,TNFAIP1 低表达是黑色素瘤患者的不良预后因素,表明 TNFAIP1 可能是一种生物标志物黑色素瘤。在进一步研究中,我们评估了 TNFAIP1 在黑色素瘤增殖和侵袭中的意义。结果表明,黑色素瘤细胞中 TNFAIP1 过表达抑制细胞增殖、侵袭。从机制上讲,我们通过 Co-IP 验证 TNFAIP1 直接与 RhoA 结合,并诱导 RhoA 泛素化。这些发现揭示了 TNFAIP1/RhoA 可能是黑色素瘤的治疗靶点。

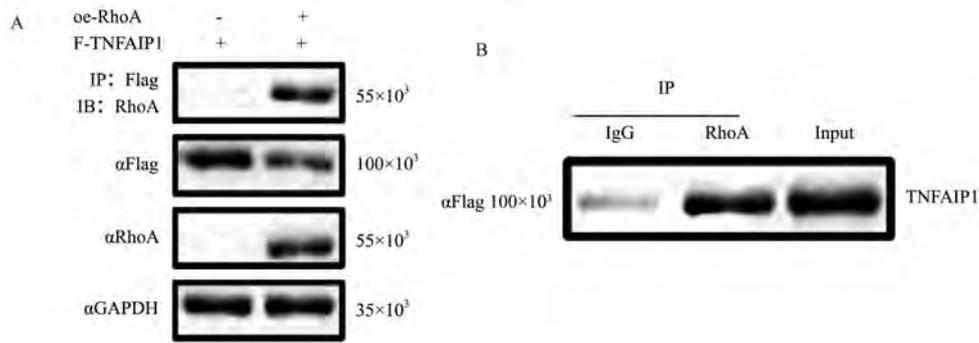


注:与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 通过蛋白质印迹定量黑色素瘤细胞中的 E-钙粘蛋白、波形蛋白和 N-钙粘蛋白水平

Note. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Quantification of E-cadherin, vimentin and N-cadherin levels in melanoma cells by Western blot

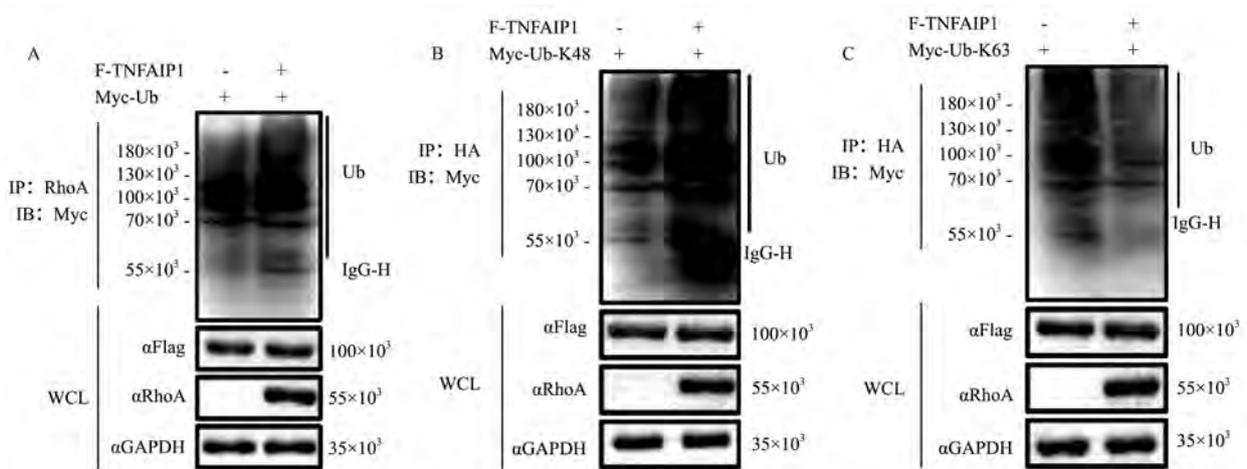


注:A:通过 Co-IP 验证 WM2664 细胞中 RhoA 和 TNFAIP1 之间的相互作用;B:通过 IP 验证 WM2664 细胞中 TNFAIP1 与内源性 RhoA 之间的相互作用。

图 6 TNFAIP1 与 RhoA 之间的相互作用

Note. A, Validation of the interaction between RhoA and TNFAIP1 in WM2664 cells by Co-IP. B, Validation of the interaction between TNFAIP1 and endogenous RhoA in WM2664 cells by IP.

Figure 6 Interaction between TNFAIP1 and RhoA



注:A:RhoA 连接的 RhoA 泛素化,B:K48 连接的 RhoA 泛素化,C:K63 连接的 RhoA 泛素化。

图 7 TNFAIP1 对过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中 Rho、K48、K63 连接的 ARhoA 泛素化的影响

Note. A, RhoA-linked RhoA ubiquitination. B, K48-linked RhoA ubiquitination. C, K63-linked RhoA ubiquitination.

Figure 7 Effect of TNFAIP1 on the ubiquitination of Rho, K48, K63-linked ARhoA in WM2664 cells overexpressing RhoA

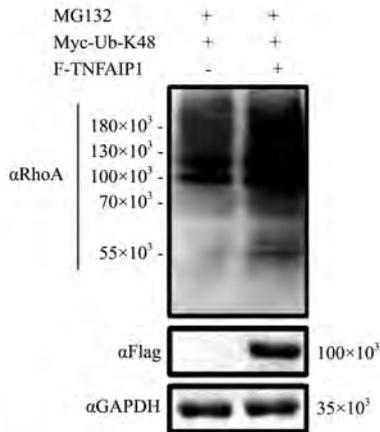


图 8 TNFAIP1 对 MG132 处理的过表达 RhoA 的 WM2664 细胞中 K48 连接的 RhoA 泛素化的影响

Figure 8 Effect of TNFAIP1 on ubiquitination of K48-linked RhoA in MG132-treated WM2664 cells overexpressing RhoA

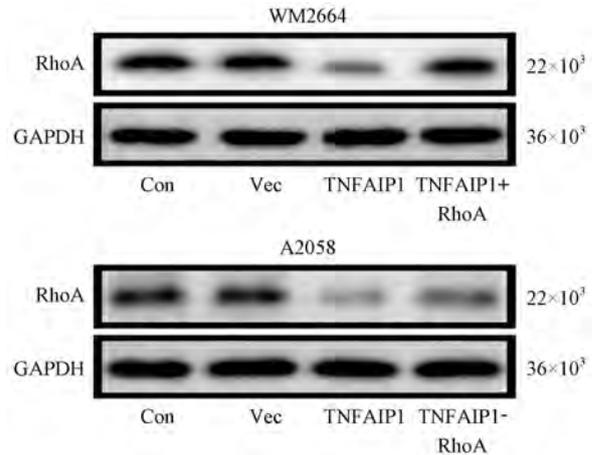
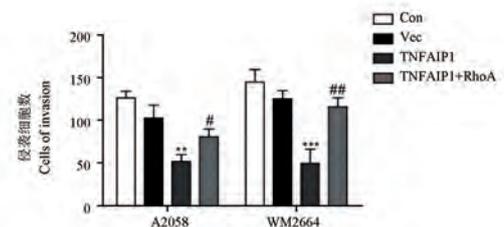
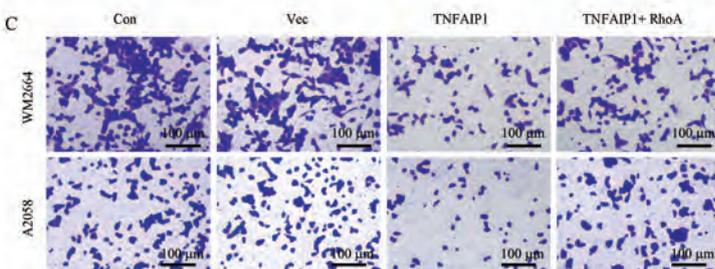
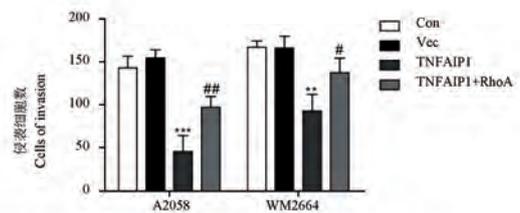
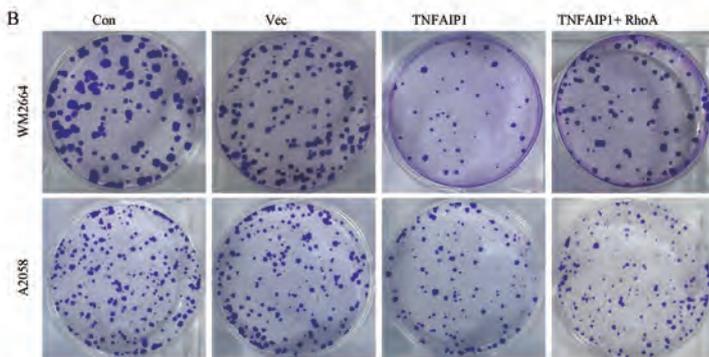
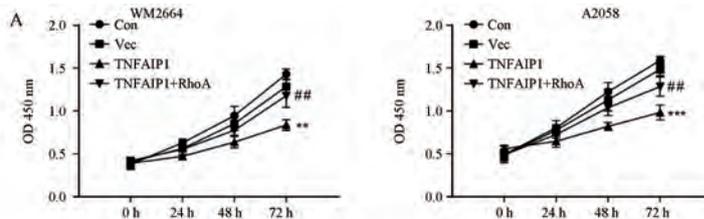


图 9 RhoA 对过表达 TNFAIP1 的肿瘤细胞中 RhoA 的蛋白水平影响

Figure 9 Effect of RhoA on the protein level of RhoA in tumor cells overexpressing TNFAIP1

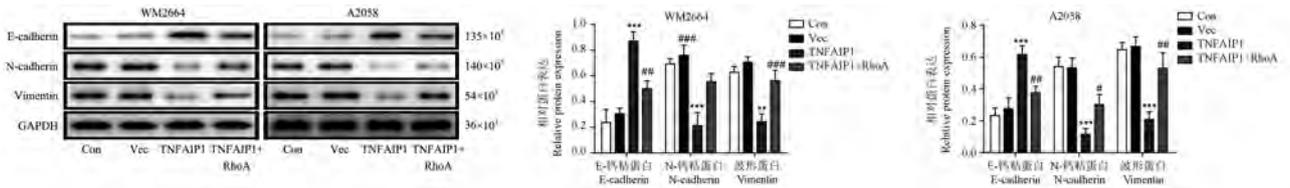


注:A:通过 CCK-8 法检测黑色素瘤细胞的活力;B:通过集落形成测定法评估黑色素瘤细胞的增殖;C:通过 Transwell 测定评估黑色素瘤细胞的侵袭。与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 TNFAIP1 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 10 RhoA 上调对 TNFAIP1 过表达对黑色素瘤进展的影响

Note. A, Melanoma cell viability was detected by CCK-8 assay. B, Melanoma cell proliferation was assessed by colony formation assay, C, Melanoma cell invasion was assessed by Transwell assay. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 10 Effect of RhoA upregulation on the overexpression of TNFAIP1 and the progression of melanoma



注:与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 TNFAIP1 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

图 11 通过蛋白质印迹定量黑色素瘤细胞中的 E-钙粘蛋白、波形蛋白和 N-钙粘蛋白水平

Note. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 11 Quantification of E-cadherin, vimentin and N-cadherin levels in melanoma cells by Western blot

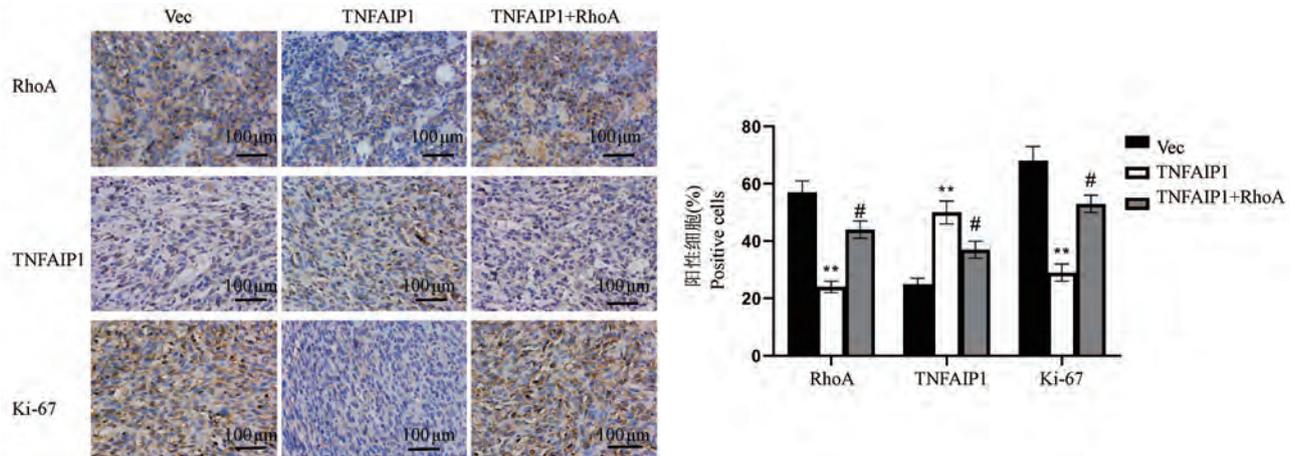


注:A:肿瘤体积,B:肿瘤代表图和重量。与 Vec 组相比, *** $P < 0.001$; 与 TNFAIP1 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 12 RhoA 上调体内对 TNFAIP1 过表达黑色素瘤细胞的增殖影响

Note. A, Tumor volume. B, Tumor representative graph and weight. Compared with the Vec group, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, ### $P < 0.001$.

Figure 12 Effect of RhoA upregulation on proliferation of melanoma cells overexpressing TNFAIP1 *in vivo*



注:与 Vec 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 TNFAIP1 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 13 免疫组化分析检测 TNFAIP1、RhoA 和 Ki-67 的表达

Note. Compared with the Vec group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the TNFAIP1 group, # $P < 0.05$.

Figure 13 Immunohistochemical analysis to detect the expression of TNFAIP1, RhoA and Ki-67

TNFAIP1 调节多种细胞生物学过程,包括蛋白质转运和降解、信号传导和转录^[10]。越来越多的报告表明,TNFAIP1 在多种人类恶性肿瘤中下调,在细胞增殖、凋亡和侵袭中起关键作用^[11-12]。例如,Li 等^[5]报道 CRL3BD9 E3 泛素连接酶复合物通过靶向 TNFAIP1 降解以抑制癌细胞迁移。还有研究表明

TNFAIP1 下调导致结肠、乳腺癌和甲状腺癌细胞的细胞增殖减少、周期停滞和细胞凋亡增加^[4-5]。一致地,本研究发现 TNFAIP1 在黑色素瘤组织中下调。此外,TNFAIP1 过表达显著降低了黑色素瘤细胞体外增殖、侵袭和 EMT 表型,并在体内抑制了肿瘤生长,表明 TNFAIP1 可能是黑色素瘤的肿瘤抑制因子。

RhoA 已被充分证明是一种促进肿瘤存活、进展和迁移的转录因子^[13-14]。相关研究发现, RhoA 介导的肌动蛋白丝和粘着斑的形成加速黑色素瘤增殖和迁移^[15]。此外, RhoA 上调通过激活波形蛋白驱动黑色素瘤细胞上皮间质转化^[16-17]。先前的数据表明, TNFAIP1 作为底物特异性接合器, 通过介导 RhoA 的多泛素化和降解参与细胞骨架结构的调节^[18]。本研究发现 RhoA 在黑色素瘤组织中上调, 具有高表达 RhoA 的黑色素瘤患者预后不良。此外, RhoA 表达与肿瘤转移密切相关。这些发现强调了 RhoA 作为黑色素瘤转移靶点的重要性。据报道, RhoA 是一种半衰期短的不稳定蛋白质, 可被 TNFAIP1 泛素酶降解^[19]。泛素酶被认为在调节肿瘤发生和发展中发挥作用, 并已成为一类新的抗癌靶点^[20-21]。目前, 关于 TNFAIP1 对 RhoA 泛素化的具体位点没有详细描述。本研究发现 TNFAIP1 介导了 RhoA 的 K48 连锁泛素化。此外, TNFAIP1 通过调节泛素介导的 RhoA 降解抑制了黑色素瘤细胞增殖、侵袭和 EMT 表型, 而 RhoA 基因过表达挽救了 TNFAIP1 过表达引起的所有效应。因此, RhoA 可能是黑色素瘤细胞中 TNFAIP1 的下游因子。

总之, 我们的数据表明 TNFAIP1 在黑色素瘤中发挥肿瘤抑制作用, 其通过诱导 RhoA 泛素化抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。因此, TNFAIP1-RhoA 轴可能是黑色素瘤潜在的抗癌靶点。

参考文献:

- [1] Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, et al. Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(7): 626-636.
- [2] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(16): 1535-1546.
- [3] Xiao Y, Huang S, Qiu F, et al. Tumor necrosis factor α -induced protein 1 as a novel tumor suppressor through selective downregulation of CSNK2B blocks nuclear factor- κ B activation in hepatocellular carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102603.
- [4] Tang X, Tangkham T, Aljahdali B, et al. The role of TNF- α induced protein 1 in the activation of pro-apoptotic proteins [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(4): 1123-1129.
- [5] Li L, Zhang W, Liu Y, et al. The CRL3 BTBD9 E3 ubiquitin ligase complex targets TNFAIP1 for degradation to suppress cancer cell migration [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 42.
- [6] Mao Y, He JX, Zhu M, et al. Circ0001320 inhibits lung cancer cell growth and invasion by regulating TNFAIP1 and TPM1 expression through sponging miR-558 [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(2): 468-477.
- [7] Maiques O, Fanshawe B, Crosas-Molist E, et al. A preclinical pipeline to evaluate migrastatics as therapeutic agents in metastatic melanoma [J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(5): 699-713.
- [8] Liu Y, Zhang W, Wang S, et al. Cullin3-TNFAIP1 E3 ligase controls inflammatory response in hepatocellular carcinoma cells via ubiquitination of RhoB [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 617134.
- [9] Henley SJ, Ward EM, Scott S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics [J]. *Cancer*, 2020, 126(10): 2225-2249.
- [10] Xiao Y, Li Y, Zhang H, et al. TNFAIP1 is upregulated in app/ps1 mice and promotes apoptosis in sh-sy5y cells by binding to RhoB [J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(6): 1221-1233.
- [11] Guo F, Yuan Y. Tumor necrosis factor alpha-induced proteins in malignant tumors: progress and prospects [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 3303.
- [12] 许斐钰, 陈果, 龙胜文, 等. 过表达 TNFAIP1 促进替莫唑胺对人脑胶质瘤细胞 U251 迁移和侵袭的抑制作用 [J]. *激光生物学报*, 2021, 30(2): 178-184.
- [13] Kalpana G, Figy C, Yeung M, et al. Reduced RhoA expression enhances breast cancer metastasis with a concomitant increase in CCR5 and CXCR4 chemokines signaling [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16351.
- [14] Nam S, Kim JH, Lee DH. RHOA in gastric cancer: functional roles and therapeutic potential [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 438.
- [15] Liu H, Seynhaeve ALB, Brouwer RWW, et al. CREPT promotes melanoma progression through accelerated proliferation and enhanced migration by RhoA-mediated actin filaments and focal adhesion formation [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 33.
- [16] Sajib MS, Zahra FT, Park JH, et al. Role of endothelial RhoA in melanoma and lung cancer trans-endothelial migration and metastasis [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 368.
- [17] Zheng Q, Peng X, Zhang Y. Cytotoxicity of amide-linked local anesthetics on melanoma cells via inhibition of Ras and RhoA signaling independent of sodium channel blockade [J]. *BMC Anesthesiol*, 2020, 20(1): 43.
- [18] Podieh F, Hordijk PL. Regulation of Rho GTPases in the vasculature by Cullin3-based E3 ligase complexes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 680901.
- [19] Dubiel W, Dubiel D, Wolf DA, et al. Cullin 3-based ubiquitin ligases as master regulators of mammalian cell differentiation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43(2): 95-107.
- [20] 申香玉, 史磊, 申远. 泛素特异性蛋白酶在肿瘤发生发展中的作用 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(4): 693-706.
- [21] 俞卿, 熊秀芳, 孙毅. 靶向 Cullin-RING E3 泛素连接酶的抗肿瘤策略及相关药物研发进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(1): 1-19.

戴丽军,黄月玲,叶炳飞,等. 高糖高脂食物对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠生长和代谢指标改变影响的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 69-77.

Dai LJ, Huang YL, Ye BF, et al. Effects of a high sucrose-high fat diet on alterations of growth and metabolism in BALB/c and C57BL/6J mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 69-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.009

高糖高脂食物对 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠生长和代谢指标改变影响的研究

戴丽军¹,黄月玲¹,叶炳飞¹,邝桂星²,侯敏^{3*},安胜利^{4*}

(1.广州医科大学实验动物中心,广州 511436;2.广州市番禺区第六人民医院,广州 511442;
3.广州医科大学附属肿瘤医院,广州 510095;4.南方医科大学公共卫生学院生物统计系,广州 510515)

【摘要】 目的 通过近交系 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠,对高糖高脂 (high-sucrose-high fat, HSHF) 食物在生长代谢方面进行平行研究,探讨基于不同品系、不同性别的小鼠,HSHF 食物对其生长代谢的差异化影响。**方法** 2 个品系的仔鼠在第 25 天断奶后按性别分组饲养,一组饲喂维持饲料(标准食物),另一组饲喂高糖高脂(HSHF)饲料。每两周称量 1 次体重至 24 周实验结束,实施安乐死术后取材。分析生长曲线、血糖、血脂水平、脏器指数(脾、肝、肺)等参数和脏器组织病理。**结果** 动物生长曲线、血糖、血清低密度脂蛋白和甘油三酯的水平与其品系直接相关;动物性别对这些参数有重要影响。HSHF 食物显著改变了雌性的生长曲线,但对雄性无显著影响;提高了代谢参数,其中对血清脂质的影响具有品系或性别特异性。肝脂肪变化的程度、脾指数的变化均与品系和性别相关;肺未见组织病理改变。**结论** HSHF 食物引起的小鼠生长代谢的改变与动物的品系和性别有着显著的相关性,性别的相关性更多的是通过品系发挥作用。

【关键词】 品系;性别;高糖高脂食物;生长发育;代谢

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0069-09

Effects of a high sucrose-high fat diet on alterations of growth and metabolism in BALB/c and C57BL/6J mice

DAI Lijun¹, HUANG Yueling¹, YE Bingfei¹, KUANG Guixing², HOU Min^{3*}, AN Shengli^{4*}

(1. Laboratory Animal Center of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China.
2. the Sixth People's Hospital of Panyu District, Guangzhou 511442. 3. Affiliated Cancer Hospital and Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510095. 4. Department of Bio-Statistics, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

【Abstract】 **Objective** To study the effects of a high sucrose-high fat (HSHF) diet on growth and metabolism of inbred BALB/c and C57BL/6J mice in parallel. **Methods** Litters of the two strains were weaned and separated by sex on day 25. Males and females of each strain were randomly divided into two groups. One group was fed a standard diet and other a HSHF diet from weaning until termination of the study (24 weeks). The parameters analyzed were the growth

[基金项目]广东省科技计划项目(2013B060300023)。

[作者简介]戴丽军(1969—),女,副教授,研究方向:疾病动物模型。E-mail:lijundai@gzmu.edu.cn

[通信作者]侯敏(1963—),女,副主任医师,研究方向:病理学。E-mail:gyminhou@163.com

安胜利(1976—),男,副教授,研究方向:医学统计。E-mail:asl0418@126.com *共同通信作者

curve, levels of blood glucose and serum lipids, organ index (spleen, liver and lungs), and histology of these organs.

Results The strain determined the basal patterns of the growth curve, levels of blood glucose and serum low-density lipoprotein and triglycerides. Sex played a role in some of these parameters. The HSHF diet significantly altered the basal growth curve of females, but not males. In terms of metabolic parameters, the HSHF diet mostly increased their values. However, alterations of serum lipids were specific to the strain or sex. The severity of fatty changes in the liver varied with the strain and sex. Alterations of the spleen index depended significantly on the strain and sex. No histological changes were observed in the lungs. **Conclusions** Alterations of growth and metabolism caused by the HSHF diet were significantly influenced by the strain and sex. However, sex mainly modified differences determined by the strain.

【Keywords】 strain; sex; high sucrose-high fat diet; growth; metabolism

长期以来,富含脂肪的食物与肿瘤发生风险之间的相关性一直是流行病学研究的重点^[1-2]。喜食高脂、高糖、高油、腌熏食品等的不良饮食习惯,富含脂肪和纤维含量低的食物,均会增加人类罹患癌症的风险并使肿瘤发生率显著升高^[3-4]。多项研究表明,高糖、高脂或高糖高脂(high-sucrose-high fat, HSHF)食物均会促进肿瘤的形成和发展,或升高死亡率^[5-7],但在肺肿瘤方面鲜有相关报道。本项目组前期试验发现 BALB/c 对乙基亚硝脒(ENU)敏感,适于制备原发性肺肿瘤模型,而 C57BL/6J 则相反。因此在后续的 HSHF 食物对小鼠原发性肺肿瘤的影响研究中,选用不同性别的两个近交系 BALB/c 和 C57BL/6J 来进行分析比较。实验观察到 HSHF 食物加速了 BALB/c 和 C57BL/6J 肺肿瘤的发展,这一加速作用存在品系和性别间的差异^[8]。

要深入探讨 HSHF 食物对肺肿瘤演进过程的作用机制,首先就要了解 HSHF 食物对正常动物生长代谢的影响。因此本文就不同食物条件下,实验对照组 BALB/c 和 C57BL/6J 部分生长代谢指标的差异化改变进行了比较分析,试图找出高糖高脂食物与两个小鼠品系在遗传和性别上的相关性,为进一步研究 HSHF 食物对肿瘤发生发展的作用机制提供对照参考和背景资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠购自广州中医药大学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0034],SPF 级,4~6 周龄,15~18 g,雌性 40 只,雄性 15 只,实验所用动物为其子代,数量见表 1。动物饲养及实验在广州医科大学实验动物中心[SYXK(粤)2021-0168]完成,均通过广州医科大学实验动物福利伦理委员会审批(2014-068),实验过程遵循 3R 原则。技术人员均具备在该设施中从事动物实验的资质。

1.2 主要试剂与仪器

Co₆₀ 辐照灭菌的维持饲料和 HSHF 饲料(含

200 g/kg 蔗糖和 150 g/kg 猪油)由广东省医学实验动物中心提供;饲料组分、动物交配方法及妊娠天数的确定等,笔者前期已进行详细描述^[8];TCHO 试剂盒(140307,上海丰汇);LDL 试剂盒、HDL 试剂盒、TG 试剂盒(7021200707、7020200707、7032170614,长春汇力)。自动组织病理处理器(徠卡,上海,中国);血糖仪(Accu-Chek Active,罗氏,中国);紫外分光光度计(UV-7502 型,上海鑫茂,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及实验过程

仔鼠出生后第 25 天断奶,称重后,按品系、性别随机分为维持饲料组(标准食物)和 HSHF 饲料组(HSHF 食物)分笼饲养,每笼 4~5 只。从断奶到实验结束(满 24 周),每两周测量 1 次体重(精确度:0.01 g)。

1.3.2 样品采集和处理

样本采集前,小鼠禁食 4 h。称量最终体重。麻醉后采血,4℃ 离心收集血清,按 0.5 mL 等份分装,-80℃ 保存备用。

1.3.3 标本处理

采血结束时测定血糖,处死小鼠后,解剖收集全肺(包括气管)、肝和脾样本,称量湿重(精确度:0.001 g)。通过气管向肺内注入磷酸缓冲福尔马林后将全肺、整个脾和来自最大肝叶的一块肝组织放

表 1 用于样本采集的小鼠数量

Table 1 Numbers of mice used for sample collection

小鼠 Mouse	性别 Sex	标准食物组 Group of the standard diet	高脂高糖食物组 Group of the HSHF diet
BALB/c	雌性 Female	24	19
	雄性 Male	20	18
C57BL/6J	雌性 Female	7	12
	雄性 Male	10	11

入固定液中,固定 24~48 h,按标准程序进行石蜡包埋,5 mm 切片,HE 染色。

1.3.4 血脂指标测定

各组随机选取 5 只小鼠的血清,按照试剂盒的说明程序测量总胆固醇(TCHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。测量前,将血清置于室温下,样品在 37℃ 水浴中孵育 10 min(TG、LDL 和 HDL)或 15 min(TC)后,测定光密度值(OD)并转换为实际浓度(mmol/L)。

组织病理评估:各组随机选取 3~4 只小鼠肺、脾和肝的病理切片进行评估。

1.3.5 数据分析生长曲线

通过每两周称量的体重计算。器官指数是小鼠器官的湿重与其最终体重的比值,反映器官相对于最终体重的比例。因为这些器官指数均为小数,为便于阅读和绘图,将以实际值乘以系数表示。肺、脾指数所乘系数为 1000,肝指数所乘系数为 100。

1.3.6 相对比值

为了更直观地反映 HSHF 食物的影响,以便从更多维度体现其变化幅度,本文引入了相对比值的概念,即各指标的 HSHF 食物组平均值与标准食物组平均值之比。例如:相对生长曲线为 HSHF 食物组与标准食物组在各观察时间点的平均体重之比;相对器官指数是两种食物的器官指数平均值之比;相对血糖值是两种食物的血糖平均值之比;血脂各指标的相对比值是两种食物的血脂各指标平均值之比。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件,通过重复测量及方差分析方法,对小鼠性别、品系、食物等因素进行统计分析。所有数据均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较因是否服从正态分布或方差齐性而相应地采用独立样本 *t* 检验或非参数检验 Mann-Whitney *U* test;计数资料以绝对数和相对数指标表示,组间比较用 χ^2 检验;不同时间的体重变化用重复测量方差分析,固定时间点,按照性别分层,不同品系间的单独效应分析采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同品系小鼠的生长曲线及 HSHF 食物对小鼠生长曲线的影响

图 1 表示不同性别小鼠的生长曲线(图 1A、图 1B)和相对生长曲线(图 1C、图 1D),反映从断奶到

24 周龄不同性别 BALB/c 和 C57BL/6J 的生长模式。

同一性别的两个品系,生长曲线存在显著差异(图 1A、图 1B),HSHF 食物显著改变了小鼠的基础生长模式。两性品系间生长曲线差异显著,品系与年龄的交互作用具有统计学意义(雌性 $F=4.146$, $P=0.000$;雄性 $F=3.207$, $P=0.003$),即 HSHF 食物对小鼠生长曲线的影响具有品系的差异,后经过二次统计学分析,品系的差异仅在雌性中显著($F=18.869$, $P=0.000$),在雄性中不显著($F=0.154$, $P=0.697$),在雌、雄小鼠的相对生长曲线图中看得比较清楚(图 1C、图 1D)。在 HSHF 饲料影响下,雄性小鼠生长曲线的模式在品系间明显不同(图 1C),而雌性小鼠的生长变化趋势非常一致(图 1D)。

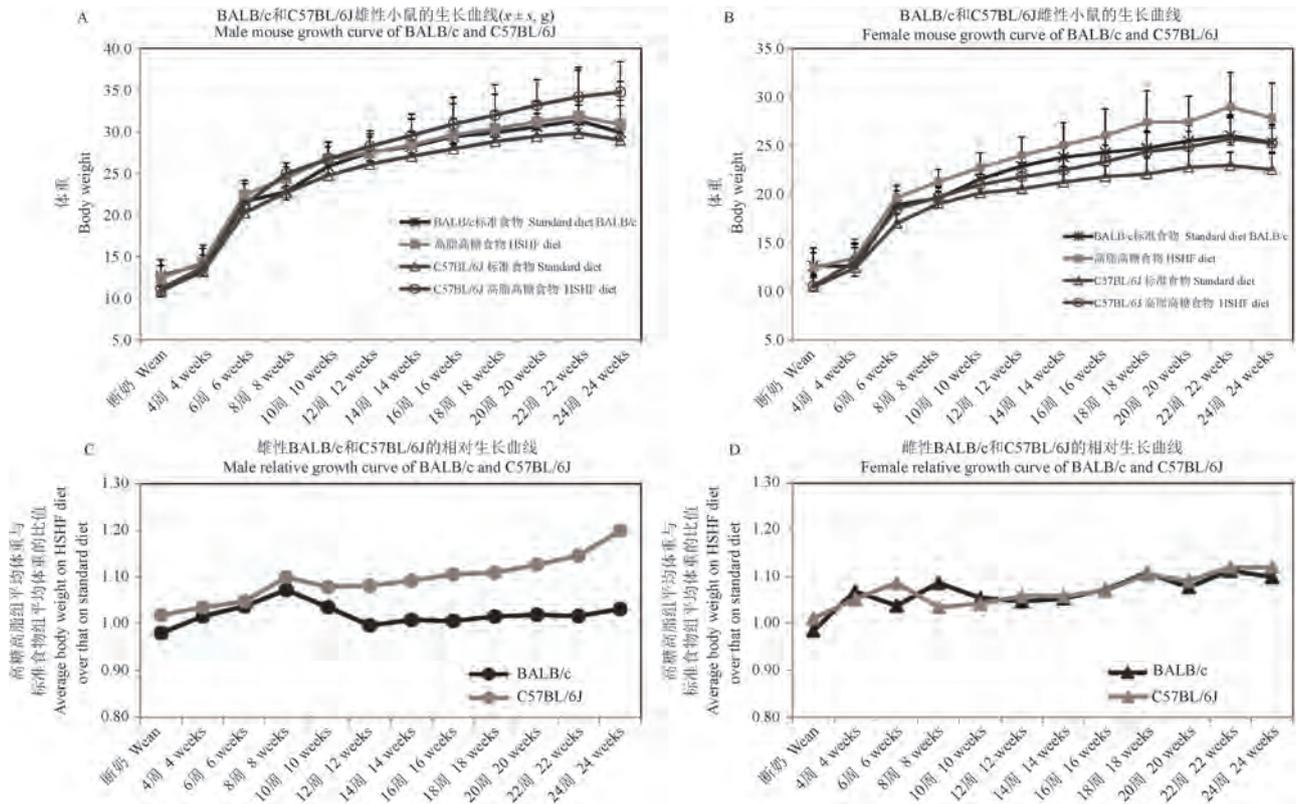
2.2 不同品系、不同性别小鼠血糖水平及 HSHF 食物对小鼠血糖升高的影响

在标准食物组,小鼠血糖在品系间($F=38.499$, $P=0.000$)和性别间($F=12.344$, $P=0.001$)间均存在显著差异(图 2A),且品系与性别的交互作用(品系×性别)有统计学意义($F=12.160$, $P=0.001$)。结果表明 C57BL/6J 的血糖水平高于 BALB/c 的(品系差异),在 C57BL/6J,雄性的血糖高于雌性的(性别差异);而在 BALB/c,雌性高于雄性的(品系与性别的交互作用),也证实了血糖水平存在品系和性别的差异(图 2A)。

HSHF 食物显著提高了小鼠的血糖($F=25.481$, $P=0.000$),但是所增加的幅度因品系和性别而有所不同,主要是显著地增加雄性的血糖,分别为 C57BL/6J 雄性 1.22 倍, BALB/c 雄性 1.24 倍,雄性显著高于雌性的($F=4.674$, $P=0.033$)(图 2B),且性别与食物的交互作用存在显著相关,意味着 HSHF 食物对雄性血糖的影响要显著大于对雌性的,而且逆转了 BALB/c 品系雌雄性基础血糖的模式。

2.3 品系和性别对血清脂质及 HSHF 食物对血脂变化的影响

所测定的血清脂质数值列入表 2,表 3 则列举了品系、性别、食物与各血脂指标的统计学分析结果。在标准食物组,4 个血脂指标存在品系之间或性别之间差异,其中 BALB/c 的 TG 水平远高于 C57BL/6J 的(表 2)。品系因素在 LDL 和 TG 中作用显著,性别因素在 HDL、LDL 和 TCHO 中作用显著,似乎只有 LDL 同时受到了品系和性别的影响(表 3)。

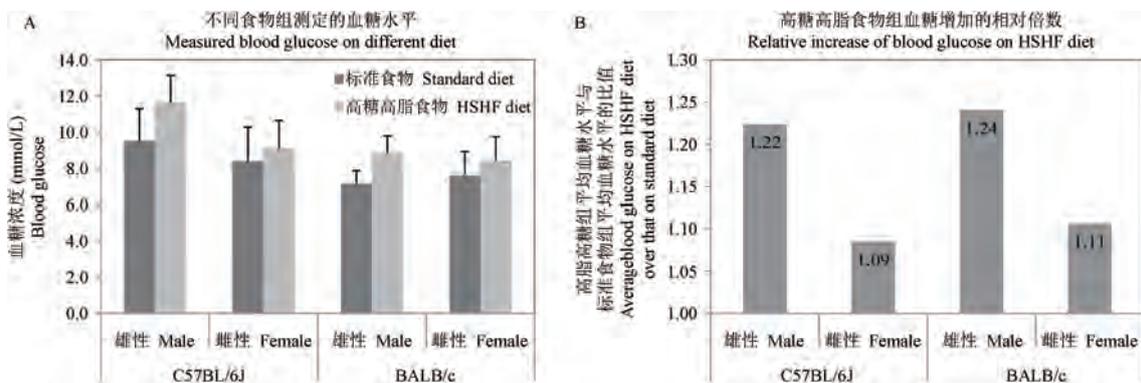


注: A, B: 断奶至 24 周龄, 两个品系不同性别小鼠的生长曲线(平均体重); C, D: 两个品系不同性别小鼠的相对生长曲线。

图 1 高糖高脂(HSHF)食物对小鼠生长曲线的影响($\bar{x} \pm s, g$)

Note. A/B, Growth curve was graphed by the average body weight from weaning to 24 weeks and presented by sex. C/D, Relative growth curve in the female or the male group of BALB/c and C57BL/6J.

Figure 1 Effects of the HSHF diet on the growth curve



注: A: 血糖水平在品系和性别间差异显著; B: HSHF 食物的相对血糖指数更清楚地显示了血糖增加的幅度。

图 2 HSHF 食物对血糖水平的影响

Note. A, Levels of blood glucose in both strains and sexes. B, Magnitudes of increases in the blood glucose were shown more clearly by the relative increases of blood glucose on the HSHF diet.

Figure 2 Effects of the HSHF diet on levels of blood glucose

HSHF 食物组与标准食物组的比值直观地反映了 HSHF 食物对血脂水平的影响(如表 2 第 5~6 行所示)。与标准食物比, HSHF 食物不同程度地提高了除雌性 TG 外的其它血脂指标(表 2), 其中 HDL 和 TCHO 升高显著。HSHF 食物对 TG 的影响主要

反映在性别与食物以及品系与食物显著的交互作用(性别×食物; 品系×食物, 表 3), 即: HSHF 食物提高了两个品系雄性的 TG, 而降低了雌性的 TG(表 2); HSHF 食物所引起的不同性别小鼠 TG 升高或降低的幅度, BALB/c 的均高于 C57BL/6J 的(表 3)。

2.4 不同品系的肝指数基础模式及 HSHF 食物引起的肝脂肪变性程度的影响

肝指数在品系间存在显著差异 ($F = 53.884, P = 0.000$), 而性别间差异不明显 ($F = 0.026, P = 0.872$), 换句话说, 就是不同的品系肝指数的基础模式可能不同, 在本实验所应用的 C57BL/6J 中, 雌、雄性的肝指数几乎是一致的, 而在 BALB/c 中, 雄性的肝指数值要高于雌性的, 尽管没有统计学差异 (图 3A)。

HSHF 食物显著提高了肝指数 ($F = 179.897, P = 0.000$), 其中 C57BL/6J 雄性和 BALB/c 雌性增加幅度较大, 而 BALB/c 的增加幅度又比 C57BL/6J 大得多 (图 3A), 相对肝指数更直观地反映了其增加幅度 (图 3B)。通过比较品系与食物以及性别与食物之间的交互作用, 可以了解到 HSHF 食物对肝

的影响在品系 ($F = 31.544, P = 0.000$) 和性别 ($F = 4.193, P = 0.043$) 间存在显著差异; 品系间, 对 BALB/c 的影响大于 C57BL/6J; 性别间, 在 BALB/c 对雌性的影响大于雄性, 而在 C57BL/6J 则正好相反 (图 3A、图 3B)。

组织病理检查显示: 标准食物组单层肝细胞构成的肝板辐射到终末肝小静脉, 肝窦清晰可见 (图 3C)。HSHF 食物组肝细胞增大, 肝窦消失, 肝细胞胞浆呈泡沫状, 部分胞浆中出现不同大小的空泡 (图 3D), 说明 HSHF 食物引起了肝的脂肪变性。

总之, 小鼠的品系和性别对 4 个血脂指标水平起着复杂的决定作用。HSHF 食物选择性地显著提高 HDL 和 TCHO, 并显著影响特定品系和性别的 TG, 对 LDL 则无明显影响 (表 3)。

表 2 血清脂质水平 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Levels of serum lipids

食物分组 Group of diet	品系 Strains	雌性 Female				雄性 Male			
		高密度脂蛋白 HDL	低密度脂蛋白 LDL	总胆固醇 TCHO	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白 HDL	低密度脂蛋白 LDL	总胆固醇 TCHO	甘油三酯 TG
标准食物 Standard diet	C57BL/6J	1.540±0.078	0.494±0.084	1.886±0.225	0.866±0.101	2.010±0.419	0.446±0.097	2.226±0.409	0.874±0.204
	BALB/c	1.432±0.150	0.322±0.008	1.634±0.135	1.854±0.203	2.002±0.281	0.282±0.036	2.288±0.302	1.430±0.287
高糖高脂食物 HSHF diet	C57BL/6J	2.120±0.333	0.642±0.075	3.952±0.388	0.864±0.068	3.222±0.453	0.902±0.074	4.950±0.453	0.908±0.132
	BALB/c	2.374±0.431	0.776±0.239	3.998±1.045	1.586±0.129	3.556±0.350	0.570±0.039	4.376±0.398	1.498±0.124
高糖高脂食物/ 标准食物 HSHF diet/ standard diet	C57BL/6J	1.377	1.300	2.095	0.998	1.063	2.022	2.224	1.039
	BALB/c	1.658	2.410	2.447	0.855	1.776	2.021	1.913	1.048

表 3 采用单因素方差分析的血脂统计分析结果
Table 3 Statistical results of serum lipids analyzed by univariate analysis of variance

比较类别 Compare categories	高密度脂蛋白 HDL		低密度脂蛋白 LDL		总胆固醇 TCHO		甘油三酯 TG	
	F 值 F value	P 值 P value						
品系 Strain	0.836	0.367	8.865	0.006**	0.073	0.789	175.466	0.000**
性别 Sex	63.331	0.000**	79.787	0.000**	119.653	0.000**	2.372	0.133
食物 Diet	20.900	0.000**	0.000	1.000	8.271	0.007**	5.647	0.024*
品系×性别 Strain×sex	1.405	0.245	3.631	0.066	0.320	0.576	0.436	0.514
品系×食物 Strain×diet	0.258	0.615	0.014	0.906	0.136	0.715	10.605	0.003**
性别×食物 Sex×diet	2.533	0.121	0.014	0.906	1.016	0.321	4.278	0.047*
品系×性别×食物 Strain×sex×diet	1.249	0.272	0.000	1.000	2.103	0.157	2.651	0.113

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

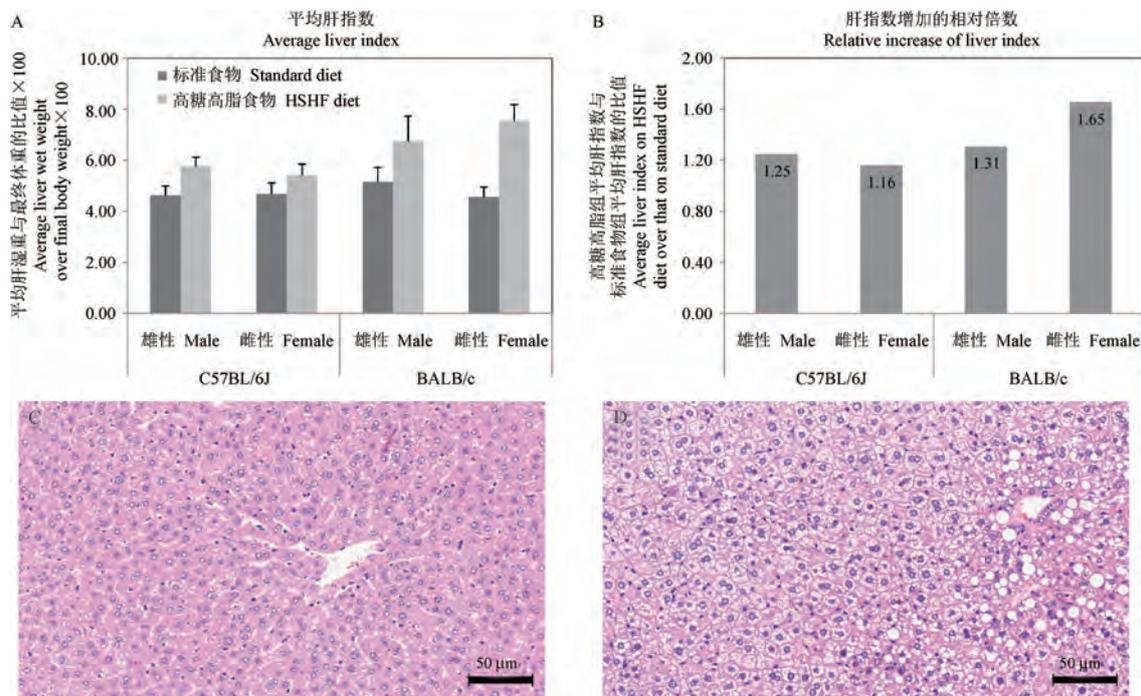
笔者尝试通过对泡沫状胞浆肝细胞百分比和空泡状(忽略大小)胞浆肝细胞数量的半定量评分系统(表 4)来评估 HSHF 食物引起的肝脂肪化的程度。该评分系统的实际评估效果良好,通过统计 HSHF 食物组中 3 或 4 只小鼠的平均得分,直观反映了肝脂肪化的严重程度(表 5)。结果显示: BALB/c 雄性得分最低,即其所受影响最小,脂肪化程度最低。对应比较显示,组织病理结果与肝指标及半定量评价结果基本一致。图 3B 中 BALB/c 雄性的相对肝指数较高可能是基于其最终体重相对较轻的原因(图 1B)。

总之,食物引起的小鼠肝脂肪化具有品系和性别的特异性。从组织学上来看,这种特异性主要表

现在标志着肝细胞脂肪变性程度的胞浆空泡化肝细胞的数量上。

2.5 不同品系两性小鼠的脾指数及 HSHF 食物对小鼠脾指数的影响

小鼠脾指数在品系($F = 26.611, P = 0.000$)和性别($F = 4.397, P = 0.038$)间存在显著差异, C57BL/6J 的基础模式为雌性的脾指数高于雄性的,而 BALB/c 的则相反(图 4A)。HSHF 食物改变了脾指数,但统计分析结果处于临界状态($F = 3.923, P = 0.050$),可能与脾指数变化的趋势不同所致(图 4A),在 C57BL/6J 小鼠,脾指数只是略有升高(图 4B),而在 BALB/c 小鼠,脾指数明显缩小,且雄性的缩小要显著大于雌性的(图 3B),脾指数的基础



注:A:小鼠肝指数;B:小鼠相对肝指数;C:标准食物组的肝组织病理改变;D:HSHF 食物组的肝组织病理改变。

图 3 HSHF 食物对肝的影响

Note. A, Average liver index in both sexes of C57BL/6J and BALB/c mice. B, Relative liver index in both sexes of C57BL/6J and BALB/c mice. C, Liver histology on the standard diet. D, Liver histology on the HSHF diet.

Figure 3 Effects of the HSHF diet on the liver

表 4 半定量评价肝脂肪改变程度的评分系统

Table 4 Scoring criteria to semiquantify the severity of liver fatty changes

泡沫状胞浆肝细胞 Foamy cytoplasm		空泡状胞浆肝细胞 Vacuoles in cytoplasm	
占肝细胞的百分比(%) Percentage of liver cells	评分 Scores	细胞数量 Amount of cells	评分 Scores
≤50%	1	很少 Few	1
>50% and ≤70%	2	有一些 Some	2
>70%	3	很多 Many	3

模式被改变,这一改变可由品系与食物之间存在的显著交互作用($F=6.939, P=0.010$)证实。

小鼠脾组织病理检查结果显示:脾细胞小,白色髓质不明显。与标准食物相比,HSHF 食物所引起的组织学或细胞学变化需要更加深入细致的研究,有待进一步探讨。

2.6 组织病理观察 HSHF 食物对肺的影响

小鼠肺指数在性别间存在显著差异($F =$

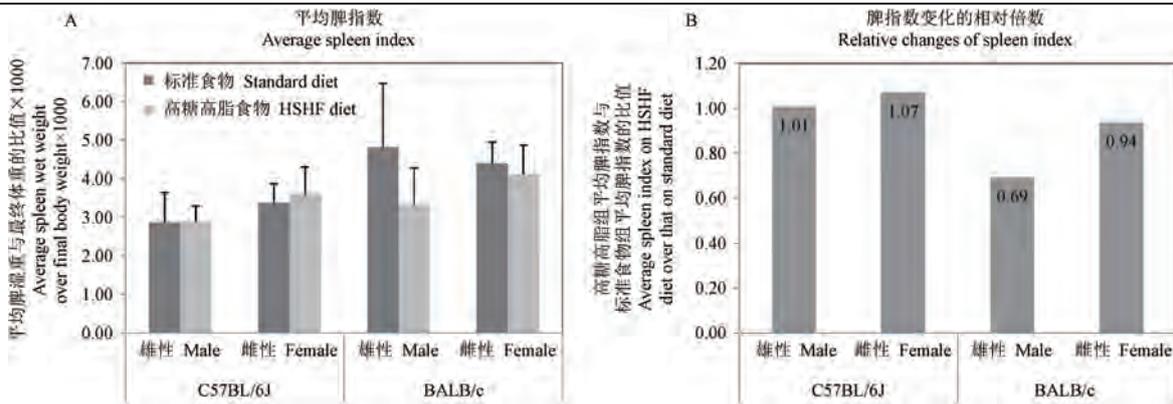
$18.580, P=0.000$),两个品系的肺指数雌性的均大于雄性的(图 5)。没有观察到品系与食物之间或性别与食物之间的交互作用,虽然 HSHF 食物(除 BALB/c 雌性外)的肺指数呈下降趋势,但差异无统计学意义($F=3.079, P=0.082$)(图 5A)。

肺组织病理观察结果显示,与标准食物相比,HSHF 食物对小鼠肺组织没有产生任何可观察到的组织病理变化(图 5B)。

表 5 HSHF 食物影响肝脂肪变性程度的半定量评价

Table 5 Semiquantified severity of fatty changes in the liver on the HSHF diet

品系/性别(小鼠数量)	泡沫状胞浆肝细胞的平均评分	空泡状胞浆肝细胞的平均评分	肝脂肪化的严重程度(两个评分之和)
Strain and sex (Number of mice)	Average scores of foamy cytoplasm	Average scores of vacuoles	Severity of fatty changes (Addition of 2 scores)
BALB/c 雄性(4)	2.75	1.25	4.00
BALB/c 雌性(3)	3.00	2.00	5.00
C57BL/6J 雄性(3)	3.00	2.00	5.00
C57BL/6J 雌性(3)	3.00	1.67	4.67

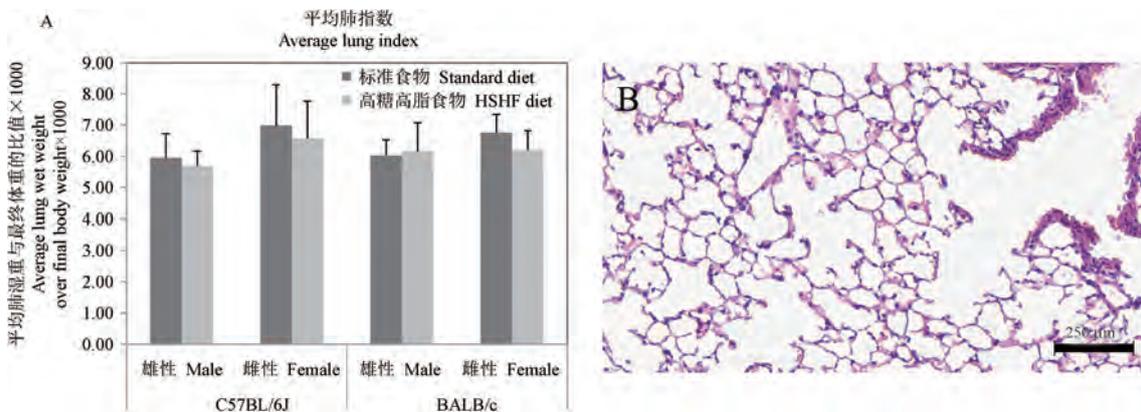


注:A:平均脾指数;B:高糖高脂组脾指数变化的相对倍数。

图 4 高糖高脂(HSHF)食物对小鼠脾的影响

Note. A, Average spleen index. B, Relative changes of the spleen index on the HSHF diet.

Figure 4 Effects of the HSHF diet on the spleen



注:A:平均肺指数;B:高糖高脂组小鼠肺组织镜下未见明确病理改变。

图 5 HSHF 食物对肺的影响

Note. A, Lung index in mouse. B, Histology of the lung on the HSHF diet did not show any recognizable morphological changes

Figure 5 Effects of the HSHF diet on the lung

3 讨论

本研究的不足之处是实验所用 C57BL/6J 仔鼠数量较少,导致 BALB/c 和 C57BL/6J 数量不均,虽然实验中增加了 C57BL/6J 雌性母鼠的数量,但由于 C57BL/6J 仔鼠的存活率较低,所以在有限的实验时间内 C57BL/6J 的后代数量仍较 BALB/c 为少,这有可能影响结果分析的质量。笔者在之前的报道中对这一现象进行了仔细分析^[9],一个合理的解释是,实验中腹腔注射的酸性磷酸盐缓冲液可能对孕期和哺乳期的 C57BL/6J 影响更大。考虑到使用的是全同胞兄妹交配的近交系后代,且数量已能满足统计分析要求,因此笔者认为本实验中 C57BL/6J 仔鼠的数量是足以反映真实情况的。

本研究通过对 BALB/c 和 C57BL/6J 的生长曲线、血糖、血脂、器官指数及器官组织病理等指标进行观察分析,探讨了在标准食物上两个近交系小鼠的生长代谢模式及其在 HSHF 食物上的差异化反应。结果显示,每个研究指标几乎都存在品系间的差异,虽然也观察到性别对各指标的复杂化影响(血糖和血脂),但这些影响仍需通过品系与性别的交互作用而由品系起最终决定作用,说明 BALB/c 和 C57BL/6J 在遗传上具有较大差异,而且这些差异直接决定了两个品系各自的生长代谢模式。HSHF 食物对各指标的影响,也取决于品传及性别。

尽管存在各自代谢途径上的差异^[10-11],HSHF 食物对生长代谢的影响效果可能与高脂食物类似^[12],高糖高脂食物中糖的比例较高会加重脂肪的影响效应。本文实验中,HSHF 饲料的热量值为 4.4 cal/g,维持饲料为 3.4 cal/g^[8],从断奶到 24 周龄,连续 HSHF 食物,会导致 BALB/c 和 C57BL/6J 小鼠的肥胖、高血糖、血脂异常和脂肪肝变性^[13]等。有研究描述和讨论了动物对高脂食物的不同反应^[14-15],与之相比,本研究有 4 点新发现:

首先,HSHF 食物对动物生长的影响可能具有性别特异性。实验中,只有 BALB/c 雄性在经过一个快速生长期后,在每个观察时间点其生长曲线都只出现了小幅增长(图 1B);血糖(图 2B)和 TG(表 2)升幅最大;而脂肪肝化程度最低(表 5)。其 HDL 的增加(表 2)表明肝细胞正在努力运输多余的脂肪到外周组织。综合上述结果设想: BALB/c 雄性小鼠可能不能良好地适应 HSHF 食物,因此 HSHF 饲料的摄入量最少。表明,对增加的膳食脂肪,不仅

不同品系小鼠的反应不同^[16],而且不同性别小鼠的反应也不一致。

其次,HSHF 食物对小鼠脾的影响可能也具有品系和性别的特异性。脾指数(图 4A)在两个品系之间、在同一品系的两个性别之间均存在显著差异。HSHF 食物提高了 C57BL/6J 的脾指数,但降低了 BALB/c 的脾指数,但在脾的组织 and 细胞水平没有观察到明显变化。由于在类似的研究中很少有关于脾改变的报道,因此 HSHF 食物引起两个品系小鼠脾指数变化的原因还有待进一步研究^[17]。BALB/c 雄性对 HSHF 饲料的摄入量下降、脾指数却大幅降低(图 4B)说明在生长发育阶段 HSHF 食物对这一品系雄性小鼠脾的影响是巨大的,同时也表明 HSHF 食物的影响不只局限于代谢系统,也可涉及到更广泛的系统^[12]。

第三,组织病理结果显示,HSHF 食物对肺的影响是有限的。整体看来,肺指数有极小幅度的下降,这可能是源于动物最终体重的增长(图 5A)。BALB/c 雄性小鼠肺指数升高,可能是因为其肥胖个体较少、最终体重增长幅度较小所致。据报道,HSHF 食物可通过影响肺细胞的代谢而影响肺的代谢组分^[18];但在本实验中,与标准食物组相比,HSHF 食物组的 HE 染色切片上未观察到明显的组织病理改变(图 5B)。

最后,本文建立了一种对肝脂肪变性程度进行有效评估的半定量评分方法(图 3D),将该评分方法与相应的血脂检测结果进行比照,可以更清晰地解释 HSHF 食物对动物肝代谢的影响。本文尝试借助该方法建立一种分析模式,通过比照印证多种相对精准的结果,多方位地对食物影响动物生长代谢的复杂性进行剖析,从而进一步提高数据的可靠性和分析的有效性。

本实验中小鼠生长代谢结果显示,遗传(品系)差异是造成小鼠不同食物环境下生长代谢发生改变的首要原因。小鼠基因组成确立了其食物诱导肥胖引起生长代谢相关改变的基本模式^[19]。其他因素如性别,将在特定情况下发挥影响作用:在高脂食物作用下,性别是主要的影响因素(78%)^[14]。本研究提供了一些证据,表明性别的影响可能依赖于基因。血糖水平是遗传决定性性状受性别影响的典型例子(从统计学上看是遗传与性别交互作用的结果)。遗传和性别的交互作用在高脂或 HSHF 食物引起的各种疾病中都有报道^[20-22]。

综上所述, HSHF 食物对小鼠生长代谢的影响是复杂的; 遗传是主要的决定因素, 性别以性别特异性或遗传-性别特异性的方式通过遗传起作用。本研究为食物对动物生长代谢的影响提供了基础数据和系统分析, 同时也为探讨 HSHF 食物对 ENU 诱导的肺肿瘤的作用提供了前提和帮助。

参考文献:

- [1] Gordon-Dseagu VLZ, Thompson FE, Subar AF, et al. A cohort study of adolescent and midlife diet and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP diet and health study [J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 186(3): 305-317.
- [2] Yang JJ, Yu D, Takata Y, et al. Dietary fat intake and lung cancer risk; a pooled analysis [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(26): 3055-3064.
- [3] 万绍平, 易芳, 王青青, 等. 中国肿瘤健康教育现状与对策分析 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(11): 955-961.
- [4] 苗晋鑫, 宋韶鹤, 李秀敏. 结直肠癌小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 267-272.
- [5] 骆文锦, 陈香均, 马林强, 等. 肥胖动物模型的研究及应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(10): 16-21.
- [6] Kearns CE, Apollonio D, Glantz SA. Sugar industry sponsorship of germ-free rodent studies linking sucrose to hyperlipidemia and cancer: An historical analysis of internal documents [J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(11): e2003460.
- [7] Zhu Y, Aupperlee MD, Haslam SZ, et al. Pubertally initiated high-fat diet promotes mammary tumorigenesis in obesity-prone FVB mice similarly to obesity-resistant BALB/c mice [J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(6): 928-935.
- [8] Dai L, Huang Y, Ye B, et al. Natural evolution of lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) and the impact of a high sucrose-high fat diet on tumor evolution assessed by tumor histology in inbred BALB/c and C57BL/6J mice [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(11): 4735-4745.
- [9] 戴丽军, 黄月玲, 周敏仪, 等. 妊娠晚期腹腔注射酸性磷酸缓冲液对两个近交系小鼠繁育生理影响的对比分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(10): 27-32.
- [10] Fernandes-Lima F, Monte TL, Nascimento FA, et al. Short exposure to a high-sucrose diet and the first 'hit' of nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Cells Tissues Organs*, 2015, 201(6): 464-472.
- [11] Soto M, Chaumontet C, Mauduit CD, et al. Intermittent access to a sucrose solution impairs metabolism in obesity-prone but not obesity-resistant mice [J]. *Physiol Behav*, 2016, 154: 175-183.
- [12] Burchfield JG, Kebede MA, Meoli CC, et al. High dietary fat and sucrose results in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(15): 5731-5745.
- [13] 饶文婷, 罗尚菲, 张雅心, 等. 阿魏酸对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(1): 36-42.
- [14] Ingvorsen C, Karp NA, Lelliott CJ. The role of sex and body weight on the metabolic effects of high-fat diet in C57BL/6N mice [J]. *Nutr Diabetes*, 2017, 7(4): e261.
- [15] 张森, 洪芬芳, 杨树龙. 肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 122-127.
- [16] Ehrich TH, Kenney JP, Vaughn TT, et al. Diet, obesity, and hyperglycemia in LG/J and SM/J mice [J]. *Obes Res*, 2003, 11(11): 1400-1410.
- [17] Buchan L, St Aubin CR, Fisher AL, et al. High-fat, high-sugar diet induces splenomegaly that is ameliorated with exercise and genistein treatment [J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11(1): 752.
- [18] Showalter MR, Nonnecke EB, Linderholm AL, et al. Obesogenic diets alter metabolism in mice [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190632.
- [19] Sinasac DS, Riordan JD, Spiezio SH, et al. Genetic control of obesity, glucose homeostasis, dyslipidemia and fatty liver in a mouse model of diet-induced metabolic syndrome [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2016, 40(2): 346-355.
- [20] Henderson-Redmond AN, Lowe TE, Tian XB, et al. Increased ethanol drinking in "humanized" mice expressing the mu opioid receptor A118G polymorphism are mediated through sex-specific mechanisms [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 138: 12-19.
- [21] Rebholz SL, Jones T, Herrick RL, et al. Hypercholesterolemia with consumption of PFOA-laced Western diets is dependent on strain and sex of mice [J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 46-54.
- [22] Saqui-Salces M, Tsao AC, Gilliland MG, et al. Weight gain in mice on a high caloric diet and chronically treated with omeprazole depends on sex and genetic background [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(1): G15-G23.

[收稿日期] 2022-05-31

裴海鸾,马贝贝,王婷婷,等.开心散对双侧海马CA1区注射 $A\beta_{1-42}$ 致AD大鼠的治疗作用及机制研究[J].中国比较医学杂志,2022,32(10):78-90,141.

Pei HL, Ma BB, Wang TT, et al. Therapeutic effect and mechanisms of Kaixin San in AD rats induced by bilateral $A\beta_{1-42}$ injection into the CA1 area of the hippocampus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 78-90, 141.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.010

开心散对双侧海马CA1区注射 $A\beta_{1-42}$ 致AD大鼠的治疗作用及机制研究

裴海鸾¹,马贝贝¹,王婷婷¹,李瑞吉¹,刘金辉¹,于尚玥¹,娄天宇¹,左泽平²,田时秋¹,李依林¹,王晨晓¹,田颖颖¹,田 骄¹,赵新月¹,刘 闯¹,郭玉东³,王 晶^{1*},王志斌^{2*}

(1.北京中医药大学中药学院,北京 102488;2.北京同仁堂研究院,北京 100071;
3.北京市药品检验研究院,北京 102200)

【摘要】 目的 考察开心散对双侧海马CA1区注射 $A\beta_{1-42}$ 致AD大鼠的治疗效果,初步明晰其作用机制。方法 以“ β -淀粉样蛋白毒性学说”为依据,使用脑立体定位仪在SD大鼠双侧海马CA1区注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚肽段,从而复制AD大鼠模型。将痴呆大鼠随机分为模型组、石杉碱甲组、开心散低剂量组、中剂量组与高剂量组,每组10只。另取10只大鼠颅内注射等量的生理盐水为假手术组,正常大鼠10只作为空白对照组。连续灌胃给药30 d。通过Morris水迷宫行为学测试观测大鼠学习记忆成绩的变化;HE染色及Nissl染色观察脑组织病理形态;ELISA法检测脑组织中胆碱能神经递质(ACh、AChE、ChAT)、炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)及 β -淀粉样蛋白(APP、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$)的含量;IHC法解析皮层、海马组织中tau蛋白及GSK-3 β 的表达水平;Western blot法察看脑组织中BAX与BCL-2的表达程度。**结果** 与模型组相比,开心散干预组大鼠逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数增多,在目标象限的停留时间及游泳路程所占百分比均有增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);皮层、海马组织神经元数量增多,形态结构趋于正常,且尼氏小体数量增加,胞浆着色变深;脑组织中AChE活性减弱,ChAT及ACh含量明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、APP、 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 的含量显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);皮层、海马组织中tau蛋白及GSK-3 β 的阳性表达量皆有下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);BAX蛋白的表达水平趋于下降,且BCL-2/BAX的比值有不同程度的升高趋势($P>0.05$)。**结论** 开心散对AD损伤大鼠的痴呆症状与脑组织损伤有较好的治疗效果,其作用机制涉及到胆碱能系统的修复、炎症因子释放的抑制、 β -淀粉样蛋白的清除及tau蛋白磷酸化水平的调控。

【关键词】 开心散;AD大鼠;脑组织;治疗作用;作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0078-13

Therapeutic effect and mechanisms of Kaixin San in AD rats induced by bilateral $A\beta_{1-42}$ injection into the CA1 area of the hippocampus

PEI Hailuan¹, MA Beibei¹, WANG Tingting¹, LI Ruiji¹, LIU Jinhui¹, YU Shangyue¹, LOU Tianyu¹, ZUO Zeping², TIAN Shiqiu¹, LI Yilin¹, WANG Chenxiao¹, TIAN Yingying¹, TIAN Jiao¹, ZHAO Xinyue¹, LIU Chuang¹, GUO Yudong³, WANG Jing^{1*}, WANG Zhibin^{2*}

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

2. Beijing Tongrentang Research Institute, Beijing 100071. 3. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102200)

【基金项目】北京中医药大学科研发展基金(2019-ZXFZJJ-099)。

【作者简介】裴海鸾(1998—),女,硕士研究生,研究方向:内分泌药理及神经药理。E-mail:phl980430@163.com

【通信作者】王晶(1973—),女,博士,副教授,研究方向:消化药理及呼吸药理。E-mail:wangj@bucm.edu.cn

王志斌(1966—),男,博士,教授,研究方向:中药质量控制标准及药理毒理研究。E-mail:wangzhibin4804@126.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To examine the therapeutic effect of Kaixin San in rats with AD caused by bilateral A β_{1-42} injection into CA1 area of the hippocampus, and to preliminarily clarify its mechanisms. **Methods** Using the “ β -amyloid protein toxicity theory”, the rat model of AD was established by bilaterally injecting A β_{1-42} oligopeptide segments in the CA1 region of the hippocampus of SD rats using a brain stereotaxic instrument. The rats were randomly divided into model, Hupezine A, Kaixin San low, middle and high dose groups, with 10 rats in each group. Another 10 rats were subjected to intracranial injection of an equal amount of physiological saline as the sham operation group and 10 normal rats were used as the blank control. The rats were subjected to continuous intragastric administrations for 30 days. Changes in learning and memory performance were observed by the Morris water maze behavioral test. HE and Nissl staining was used to visualize pathological morphology of the brain. The contents of cholinergic neurotransmitters (ACh, AChE and ChAT), proinflammatory factors (TNF- α , IL-6 and IL-1 β), and β -amyloid protein (APP, A β_{1-40} and A β_{1-42}) in brain tissue were measured by ELISA. Expression of tau protein and GSK-3 β in cortical and hippocampal tissues was detected by IHC. BAX and BCL-2 expression in brain tissues was measured by Western blot. **Results** Compared with the model group, rats in the Kaixin San treatment groups had a significantly shorter escape latency, an increased number of platform crossings, and an enhanced dwell time and percentage of swimming distance to the total distance in the target quadrant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The numbers of neurons in cortical and hippocampal tissues were increased, the morphological structure tended to be normalized, the number of Nissl bodies increased, and the cytoplasm darkened. AChE activity was attenuated, and ChAT with ACh levels were significantly increased in brain tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). TNF- α , IL-6, IL-1 β , APP, A β_{1-40} and A β_{1-42} contents were decreased markedly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Expression of tau protein and GSK-3 β in both cortical and hippocampal tissues was downregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). BAX protein expression decreased, and the ratio of BCL-2/BAX tended to increase to various degrees ($P > 0.05$). **Conclusions** Kaixin San has a good therapeutic effect on dementia symptoms and brain tissue damage in AD-injured rats, and its mechanisms involve the repair of the cholinergic system, inhibition of proinflammatory factor release, clearance of β -amyloid protein, and regulation of tau protein phosphorylation.

【Keywords】 Kaixin San; AD rats; brain tissue; therapeutic effect; mechanism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿并进行性发展的神经系统退行性疾病, 该病多发于 65 岁以上的老年人, 病者在患病后 7~10 年内即不可避免地走向死亡^[1-2]。AD 患者临床表现为长时间的认知功能衰退、情节记忆与身体机能持续恶化、精神行为和睡眠-觉醒周期混乱, 伴随明显的语言系统缺陷、情绪波动异常以及严重的生活能力丧失。AD 典型的病理特征为 β -淀粉样蛋白 (amyloid beta-protein, A β) 的积聚与沉积^[3]、tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[4]、慢性神经炎症^[5] 以及显著的突触损伤与神经元丢失^[6]。全球现今约有 4400 万人罹患 AD, 随着社会人口老龄化的加剧与 AD 病症患者趋于年轻化, 预计在 2050 年 AD 病人数量将增至 1 亿。疾病的迅速发展在毁坏个人健康与家庭安定的同时, 也为社会工作与全球经济带来沉重负担。

开心散记载于唐代药王孙思邈所著的《备急千金要方·卷十四·小肠腑》中, 主治“好忘”, 由人参、远志、石菖蒲及茯苓四味中药组成。开心散复

方中人参大补元气, 安神益智; 远志祛痰开窍, 解郁宁心, 二者共用可除邪气, 养心血, 散痰涎, 利九窍, 补脏腑之精亏, 使耳目聪明, 强志不忘。茯苓利水渗湿, 健脾宁心; 石菖蒲开窍豁痰、化湿、醒神益智, 两药配伍可化血积, 治痹痛, 定心气, 去痰阻, 理五脏经络之气乱、湿浊, 使精神通透, 心脑畅明。由此全方共奏益气养心、补虚、化痰、除湿利窍及安神益智之功, 这与 AD“脏腑亏损, 髓海空虚, 瘀血、痰浊阻塞经络脑窍”的病因病机格外契合, 因此常被用于临床治疗“善忘”病症。

近年来, 国内学者对开心散靶向痴呆的药理学研究愈发关注, 但多集中于网络药理学预测^[7]、效应物质发掘^[8]及单一信号通路如氧化应激^[9]、神经炎症^[10]、脑内神经再生^[11]的验证, 关于开心散经典药理活性的多环节考察仍为罕见。因此, 本研究拟采用双侧海马 CA1 区注射 A β_{1-42} 造模损伤 SD 大鼠为研究对象, 并参照 AD 发生发展的相关学术论点设立检测因素与靶标, 对开心散复方抗痴呆的药理活性进行较为全面地考证与筛查, 以期为经典古方的进一步开发及深层次的通路挖掘提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级体重为(260~300)g 的 SD 大鼠,雌雄各半,70 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0011],动物饲养在北京市药品检验研究院[SYXK(京)2020-0041],本研究由北京市药品检验所实验动物伦理委员会审查通过,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

石杉碱甲片(河南太龙药业股份有限公司,批号:190304);开心散浸膏粉(由上海绿谷生命园医药有限公司提供,批号:190301)。

$A\beta_{1-42}$ (BIOS, 货号:bs-0107P);二甲亚砜(DMSO)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20180404);甲苯胺蓝染液(货号:G1032)、苏木精-伊红染液(货号:G1003)、GSK-3 β (货号:GB11099)、Tau(货号:GB11178)、 β -actin(货号:GB12001)及 BAX(货号:GB11690)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;BCL-2(Affinity,货号:BF9103)。乙酰胆碱(ACh)试剂盒(货号:CEA912Ge)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)试剂盒(货号:SEB929Ra)、乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒(货号:SEB447Ra)、淀粉样前体蛋白(APP)试剂盒(货号:SEB020Ra)、 $A\beta_{1-40}$ 酶联免疫吸附试剂盒(货号:CEA864Ra)、 $A\beta_{1-42}$ 酶联免疫吸附试剂盒(货号:CEA946Ra)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒(货号:SEA133Ra)、白介素-6(IL-6)检测试剂盒(货号:SEA079Ra)及白介素-1 β (IL-1 β)检测试剂盒(货号:SEA563Ra)均由武汉云克隆科技股份有限公司提供。

Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所制,型号:DMS-2);脑立体定位仪(北京众实迪科技发展有限责任公司,型号:ZS-FD/S);KDS Legato130 微量注射泵(美国 KD scientific 公司);微型手持式颅钻(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号:78001);高速组织研磨仪(Servicebio,型号:KZ-II);酶标检测仪(BioTeK,型号:Epoch)。

1.3 实验方法

1.3.1 AD 大鼠的模型制备

(1) $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的孵育

将 1 mg 的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段($A\beta_{1-42}$)溶于 44 μ L 的二甲亚砜(DMSO)中,再缓慢加入 PBS 溶液(456 μ L),边加边轻摇混匀,定容到所需浓度

(2 μ g/ μ L)。封口膜封好后,将溶液放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 7 d,使其聚集老化。

(2) 动物术前筛选

将大鼠适应性喂养 7 d 后进行筛选,经 Morris 水迷宫实验判别其空间学习记忆能力,淘汰游泳行为过于迟钝的大鼠,将筛选出的正常大鼠随机分为 3 组:空白组 10 只,假手术组 10 只,其余归入造模组。

(3) 手术过程

大鼠麻醉后,将其置于脑立体定位仪上进行固定;定位手术区,局部备皮,酒精消毒;剪开大鼠头部皮肤,切口沿中线分布,长度约 15 mm,将颅骨表面粘膜拨开固定,使颅骨充分暴露;参照《大鼠脑立体定位图谱》^[12],确定前囟位点并标记,钻孔位点定位于前囟后方 3.6 mm,旁开 2 mm,以 1.0 mm 钻头钻孔;注射点定位于大鼠海马 CA1 区,即自钻孔位垂直颅骨表面向内进针约 4.3 mm;恒速垂直注射,双侧各注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体 5 μ L,以 1 μ L/min 的速度持续注射 5 min,注射后留针 5 min,再缓慢撤针,以确保溶液充分弥散;操作结束后,用牙科水泥封闭钻孔,以青霉素粉涂于切口处以防感染,随后缝合切口,碘伏擦拭消毒;将大鼠置于电热毯上等候苏醒,使其平稳度过术后虚弱期。假手术组大鼠参照上述操作注射等量的生理盐水。术后恢复 3~7 d。

(4) 痴呆大鼠判别

用 Morris 水迷宫定位航行实验测试其逃避潜伏期,以空白组大鼠 4 次训练的平均逃避潜伏期(学习成绩)作为参考值(所有空白大鼠学习成绩的平均值记为 A),并计算出同 1 d 内每只造模大鼠的平均逃避潜伏期(记为 B),若(B-A)/B>20%则判定造模成功,归为痴呆大鼠。

1.3.2 分组及给药

将 50 只判定造模成功的痴呆大鼠按逃避潜伏期随机分为 5 组:模型组、石杉碱甲组(0.046 mg/kg)、开心散低剂量组(11.48 mg/kg)、开心散中剂量组(22.96 mg/kg)与开心散高剂量组(45.92 mg/kg),每组 10 只。连续灌胃给药 30 d,每日 1 次。空白组、假手术组与模型组给予等量的纯化水。

1.3.3 Morris 水迷宫行为学测试

(1) 定位航行试验

试验共历时 5 d,每天定于固定时间段,每个时间段训练 4 次。4 次训练即将动物分别从 4 个不同的起始点(不同象限)放入水中。动物找到平台后或 120 s 内找不到平台(潜伏期记为 120 s),则由实

验者将其拿上平台,在平台上休息 15 s,再进行下一次试验。每日以动物 4 次训练测得逃避潜伏期的平均值作为动物当日的学习成绩。前 2 d 的定位航行试验作为适应性游泳训练以熟悉迷宫环境,统计动物在第 3、4、5 天的学习成绩变化。

(2) 空间探索试验

第 6 天撤除原平台,将动物任选 1 个入水点放入水中,所有动物必须为同一入水点,记录动物在 2 min 内跨越原平台的次数、在目标象限的停留时间、目标象限的游泳路程及游泳总路程,计算得出目标象限游泳路程所占总路程的百分比(目标象限游泳路程/游泳总路程)。

1.3.4 标本采集

Morris 行为学测试结束后,每组随机选取 4 只大鼠,低温环境下快速断头取脑,置于冰砖上矢状切割脑组织,左侧半脑组织用 4% 的多聚甲醛溶液固定,4℃ 保存,用于病理染色及免疫组化分析;右侧半脑低温下进行海马和皮层的分离,并将海马、皮层分别用锡箔纸包裹,置于冻存管,-80℃ 保存,备用于 Western blot 检测;剩余的各组大鼠在低温环境下快速断头取脑,以冷生理盐水清洗去除残血,滤纸吸干后用锡箔纸包裹,-80℃ 冻存,以供 ELISA 检测。

1.3.5 HE 染色与 Nissl 染色

采用 HE 染色及 Nissl 染色法观察各组大鼠脑组织的病理形态与损伤状况,在 400 倍成像下查看皮层、海马组织各区域神经元的数量、结构与排列,并分析尼氏小体的数目与着色深浅,截图采集图像。

1.3.6 酶联免疫吸附法(ELISA)

样本处理:准确称取待测脑组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积 0.9% 的生理盐水,并放入匀浆珠,冰水浴条件机械匀浆,制成 10% 的脑组织匀浆,低温(4℃)离心 10 min (3500 r/min),分离上清液备检。

检测指标:胆碱能神经递质(ACh、ChAT 及 AChE)、炎症因子(TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β)及 β -淀粉样蛋白(APP、A β ₁₋₄₀ 及 A β ₁₋₄₂)。

1.3.7 免疫组化染色分析(IHC)

采用 IHC 法检测大脑组织中 tau 蛋白、GSK-3 β 的表达水平:在 400 倍成像下分别截取海马及皮层区域内互不重叠的 3 个视野,分别测量每张切片中海马及皮层区域各 3 个视野阳性表达的积分光密度(integrated optical density, IOD)值,IOD 值越高,代表阳性表达越强。

1.3.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)

使用 Western blot 法测定皮层、海马组织中 BAX、BCL-2 的表达程度:分析目标条带的光密度值,将目的条带灰度值/内参条带灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SAS 8.2 软件进行处理,各组数列均呈正态分布时,数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 ANOVA 进行单因素方差分析,同时用 LSD-*t* 检验法进行组间的多重比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 开心散对 AD 大鼠学习记忆能力的影响

2.1.1 开心散对 AD 大鼠逃避潜伏期的影响

定位航行实验结果显示,与空白组或假手术组相比,模型组大鼠在第 3、4、5 天的逃避潜伏期明显延长,差异有统计学意义($P<0.05$)。相较于模型组,在第 3 天,开心散低、中、高剂量组逃避潜伏期明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);第 4 天,石杉碱甲组、开心散低、中剂量组逃避潜伏期显著缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$);第 5 天,石杉碱甲组、开心散中剂量组逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$)(结果见表 1、图 1)。

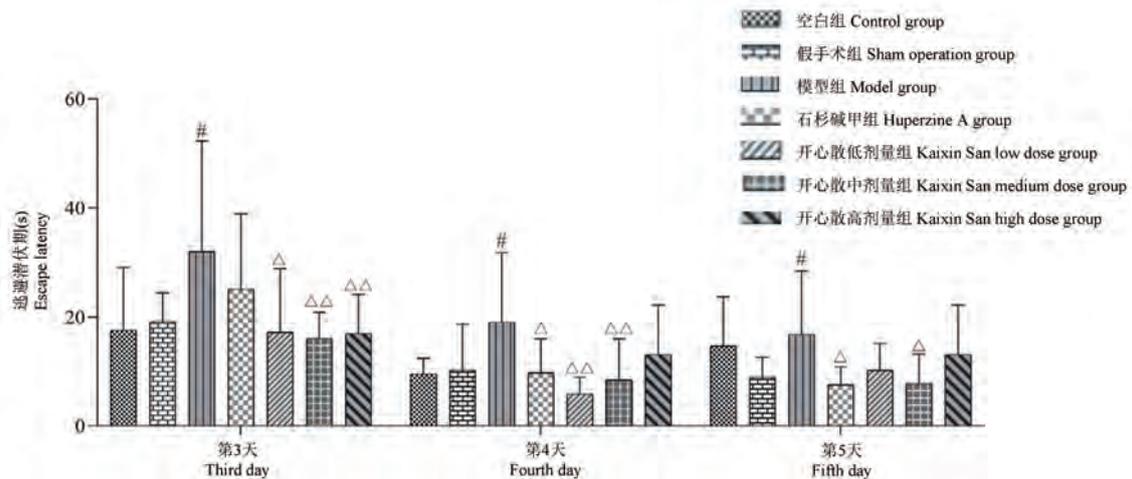
2.1.2 开心散对 AD 大鼠空间探索能力的影响

与空白组或假手术组相比,模型组穿越平台次数、目标象限停留时间及游泳路程所占百分比均明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于模型组,开心散中、高剂量组的穿越平台次数增加($P<0.05$);开心散低、高剂量组的目标象限停留时间与游泳路程所占百分比均明显提升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(结果见表 2、图 2)。

2.2 开心散对 AD 大鼠脑组织病理形态的影响

2.2.1 HE 染色

HE 染色结果显示,空白组、假手术组大鼠皮层神经元边界清晰,形态规则;海马组织神经元数量丰富、排列紧密,形态结构正常。与空白组相比,模型组皮层、海马组织均可见神经元皱缩,皮质细胞数量明显减少,细胞间隙增大;海马组织细胞排列散乱无序,细胞层数减少,形态不规则,甚至出现核仁消失。相较于模型组,各给药组脑组织病理形态有不同程度的改善,皮层神经元数量增多,皱缩状态缓解;海马区域细胞排列较整齐,细胞层数增加,形态结构趋于正常(结果见图 3)。



注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 开心散对 AD 大鼠逃避潜伏期的影响

Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 1 Effect of Kaixin San on escape latency in AD rats

表 1 开心散对 AD 大鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Kaixin San on escape latency in AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	n	逃避潜伏期(s) Escape latency		
			第 3 天 Third day	第 4 天 Fourth day	第 5 天 Fifth day
空白组 Control group	/	9	17.59±11.17	9.52±2.91	14.74±9.01
假手术组 Sham operation group	/	8	19.26±5.19	10.26±8.47	8.92±3.70
模型组 Model group	/	10	32.11±20.17 [#]	19.11±12.74 [#]	16.86±11.66 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	9	25.22±13.65	9.74±6.30 Δ	7.56±3.29 Δ
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	8	17.22±11.70 Δ	5.85±3.10 $\Delta\Delta$	10.19±4.99
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	7	16.11±4.80 $\Delta\Delta$	8.41±7.62 $\Delta\Delta$	7.76±5.44 Δ
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	10	17.02±7.20 $\Delta\Delta$	13.10±9.13	13.11±9.13

注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表 2 开心散对 AD 大鼠空间探索能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Kaixin San on spatial exploration ability of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	n	穿越平台次数(次)	目标象限停留时间(s)	目标象限路程所占百分比(%)
			Number of crossing platform	Target quadrant residence time	Percentage of target quadrant path
空白组 Control group	/	9	6.56±1.88	50.79±8.47	40.27±5.71
假手术组 Sham operation group	/	8	7.13±2.10	51.76±10.15	40.27±6.38
模型组 Model group	/	10	5.20±2.86 [#]	44.05±6.54 [#]	32.93±7.78 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.0460	9	5.67±1.58	46.98±5.79	37.99±5.17
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	8	5.88±2.23	51.99±9.04 Δ	40.25±6.84 Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	7	8.14±3.53 Δ	48.67±7.80	37.29±5.53
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	10	7.60±2.01 Δ	54.73±6.64 $\Delta\Delta$	41.92±5.05 $\Delta\Delta$

注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

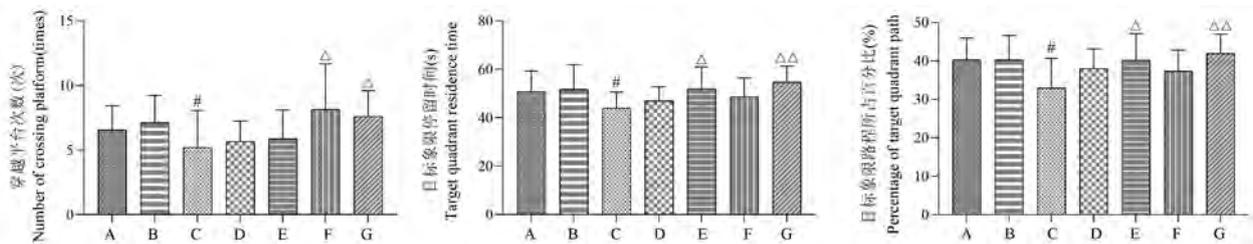
Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

2.2.2 Nissl 染色

Nissl 染色结果显示,空白组、假手术组大鼠皮层及海马组织神经元排列整齐、均匀,细胞结构完整;尼氏小体数量丰富,形态正常,尼氏物质呈深蓝色颗粒或斑块状染色。与空白组相比,模型组皮层、海马中尼氏小体数量明显减少,染色变浅,神经元排列散乱且间隙明显增大。相较于模型组,各给药组脑组织病理状况有不同程度的改善,其皮层及海马组织中尼氏小体数量增加,且海马 CA1 区细胞排列紧密整齐,胞浆着色变深(结果见图 4)。

2.3 开心散对 AD 大鼠脑组织中胆碱能神经递质的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 ChAT 的活性及 ACh 的含量均明显降低, AChE 的活性升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相较于模型组,开心散低、高剂量组 ACh 的含量明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);石杉碱甲组、开心散低、中剂量组 ChAT 的活性增强,且 AChE 的活性显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (结果见表 3、图 5)。

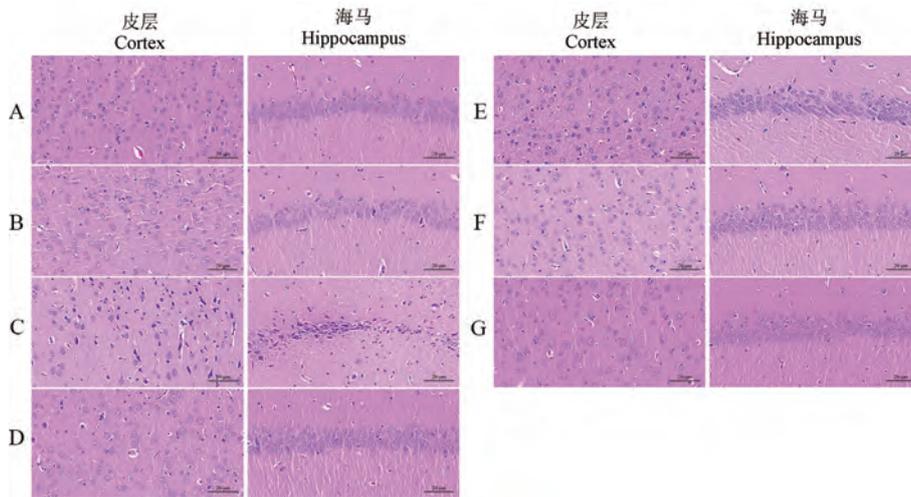


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,[^] $P < 0.05$,^{^^} $P < 0.01$ 。

图 2 开心散对 AD 大鼠空间探索能力的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, [#] $P < 0.05$. Compared with the model group, [^] $P < 0.05$, ^{^^} $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of Kaixin San on spatial exploration ability of AD rats

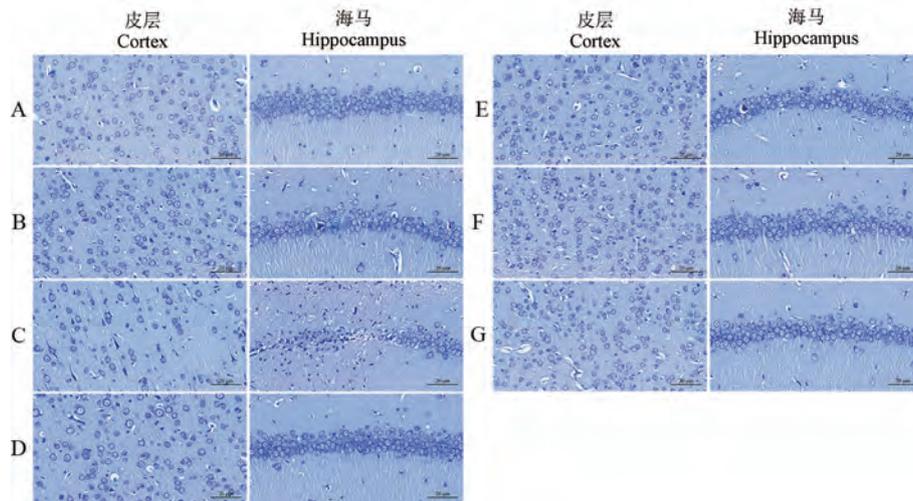


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。

图 3 开心散对 AD 大鼠脑组织病理形态的影响(HE 染色)

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 3 Effect of Kaixin San on pathological morphology of brain tissue in AD rats (HE staining)

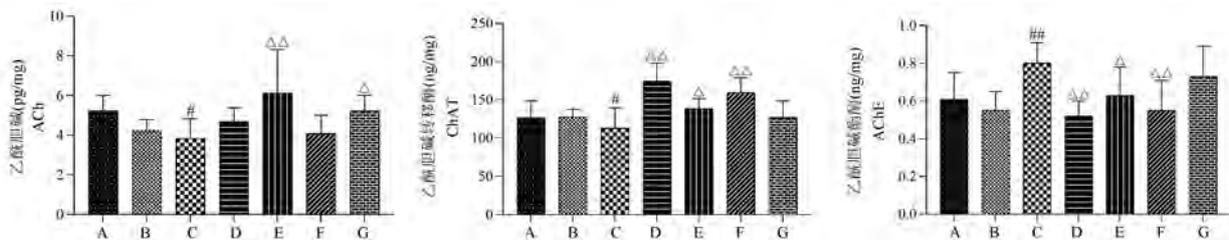


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。

图 4 开心散对 AD 大鼠脑组织病理形态的影响(Nissl 染色)

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 4 Effect of Kaixin San on pathological morphology of brain tissue in AD rats (Nissl staining)



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 5 开心散对 AD 大鼠胆碱能神经递质的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 5 Effect of Kaixin San on cholinergic neurotransmitter in AD rats

表 3 开心散对 AD 大鼠胆碱能神经递质的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Kaixin San on cholinergic neurotransmitter in AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	ACh (pg/mg)	ChAT (ng/mg)	AChE (ng/mg)
空白组 Control group	/	5.23±0.78	126.29±22.26	0.61±0.14
假手术组 Sham operation group	/	4.24±0.54	127.70±10.20	0.55±0.10
模型组 Model group	/	3.84±0.98 [#]	113.12±26.33 [#]	0.80±0.11 ^{##}
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	4.68±0.70	174.64±23.47 $\Delta\Delta$	0.52±0.08 $\Delta\Delta$
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	6.13±2.19 $\Delta\Delta$	138.43±13.36 Δ	0.63±0.15 Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	4.08±0.92	159.35±19.74 $\Delta\Delta$	0.55±0.16 $\Delta\Delta$
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	5.23±0.78 Δ	127.07±21.50	0.73±0.16

注:与空白组或假手术组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

2.4 开心散对 AD 大鼠脑组织中炎症因子的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子的含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。相较于模型组,

石杉碱甲组、开心散低剂量组 TNF- α 的含量明显下降($P < 0.05$);石杉碱甲组、开心散低、中剂量组 IL-1 β 与 IL-6 的含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(结果见表 4、图 6)

表 4 开心散对 AD 大鼠脑组织炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Effect of Kaixin San on inflammatory factors in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	TNF- α (pg/mg)	IL-1 β (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)
空白组 Control group	/	8.58 \pm 2.76	8.62 \pm 1.35	7.32 \pm 1.46
假手术组 Sham operation group	/	8.38 \pm 1.53	8.24 \pm 0.86	6.32 \pm 0.58
模型组 Model group	/	13.30 \pm 2.19 ^{##}	11.51 \pm 1.26 ^{##}	10.03 \pm 1.62 ^{##}
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	9.46 \pm 2.63 Δ	7.99 \pm 1.69 $\Delta\Delta$	7.60 \pm 1.66 Δ
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	9.52 \pm 3.37 Δ	9.24 \pm 1.57 Δ	7.23 \pm 2.00 Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	13.24 \pm 2.44	8.50 \pm 2.54 $\Delta\Delta$	6.81 \pm 2.49 $\Delta\Delta$
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	10.22 \pm 3.10	10.63 \pm 1.75	8.35 \pm 2.31

注:与空白组或假手术组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

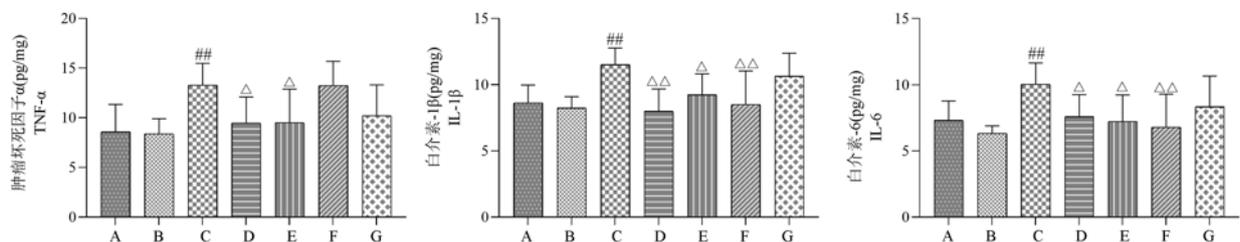
Note. Compared with the control group or sham operation group,^{##} $P < 0.01$. Compared with the model group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$.

表 5 开心散对 AD 大鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Effect of Kaixin San on β -amyloid protein content in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	APP (ng/mg)	A β ₁₋₄₀ (pg/mg)	A β ₁₋₄₂ (pg/mg)
空白组 Control group	/	1.07 \pm 0.20	32.25 \pm 9.67	16.43 \pm 3.53
假手术组 Sham operation group	/	1.07 \pm 0.19	27.64 \pm 7.89	14.18 \pm 1.98
模型组 Model group	/	1.83 \pm 0.22 ^{##}	40.38 \pm 6.81 [#]	22.25 \pm 3.64 ^{##}
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	1.09 \pm 0.16 $\Delta\Delta$	30.25 \pm 6.46	13.82 \pm 3.65 $\Delta\Delta$
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	1.06 \pm 0.32 $\Delta\Delta$	33.98 \pm 14.58	21.71 \pm 8.60
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	1.62 \pm 0.56	26.19 \pm 9.53 Δ	12.35 \pm 3.15 $\Delta\Delta$
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	1.24 \pm 0.37 $\Delta\Delta$	30.31 \pm 5.32	16.35 \pm 2.24 Δ

注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$. Compared with the model group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$.



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

图 6 开心散对 AD 大鼠脑组织炎症因子的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group,^{##} $P < 0.01$. Compared with the model group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of Kaixin San on inflammatory factors in brain tissue of AD rats

2.5 开心散对 AD 大鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白含量的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 APP、 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 的含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);相较于模型组,石杉碱甲组、开心散低、高剂量组 APP 的含量显著下降($P<0.01$);开心散中剂量组 $A\beta_{1-40}$ 的含量降低($P<0.05$);石杉碱甲组、开心散中、高剂量组 $A\beta_{1-42}$ 的含量均明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (结果见表 5、图 7)。

2.6 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白磷酸化的影响

2.6.1 开心散对 AD 大鼠皮层、海马组织中 tau 蛋白表达水平的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠皮层、海马组织中 tau 蛋白棕黄色阳性表达产物明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);相较于模型组,开心散中剂量组皮层组织中 tau 蛋白的阳性表达量显著下降($P<0.05$);石杉碱甲组、开心散低剂量组海马组织中 tau 蛋白的表达水平均有下

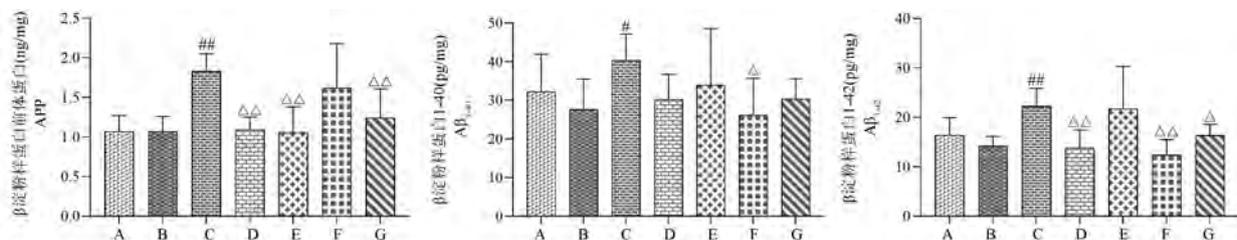
调($P<0.05$) (结果见表 6、图 8、图 9)。

2.6.2 开心散对 AD 大鼠皮层、海马组织中 GSK-3 β 表达水平的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠皮层、海马组织中 GSK-3 β 棕黄色免疫阳性产物明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于模型组,石杉碱甲组、开心散高剂量组皮层组织中 GSK-3 β 阳性表达量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);石杉碱甲组、开心散低、中、高剂量组海马组织中 GSK-3 β 表达水平均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(结果见表 7、图 10、图 11)

2.7 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 与 BAX 表达水平的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 BAX 蛋白的相对表达量升高,且 BCL-2/BAX 的比值下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。相较于模型组,各给药组脑组织中 BAX 蛋白的表达水平趋于下调($P>0.05$),且 BCL-2/BAX 的比值有不同程度的升高趋势($P>0.05$) (结果见表 8、图 12、图 13)。



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 7 开心散对 AD 大鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白含量的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

Figure 7 Effect of Kaixin San on β -amyloid protein content in brain tissue of AD rats

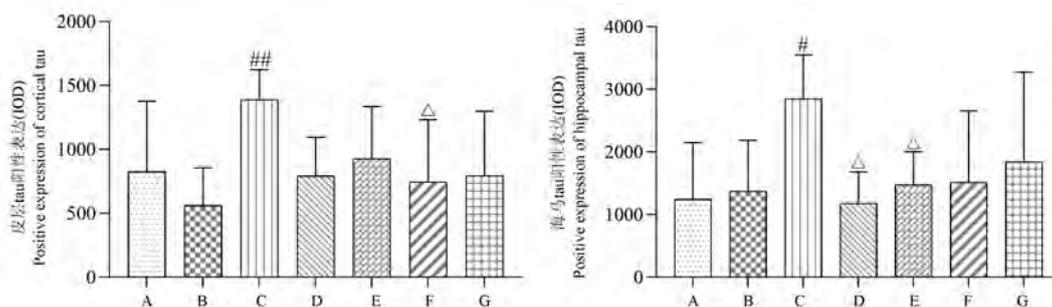
表 6 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Kaixin San on the expression of tau in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	皮层 (IOD) Cortex	海马 (IOD) Hippocampus
空白组 Control group	/	826.97 \pm 552.16	1244.68 \pm 906.16
假手术组 Sham operation group	/	561.62 \pm 295.79	1374.30 \pm 814.44
模型组 Model group	/	1390.36 \pm 233.98 ^{##}	2849.53 \pm 702.32 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	792.01 \pm 304.28	1181.80 \pm 500.61 Δ
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	928.21 \pm 408.26	1479.75 \pm 523.92 Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	747.18 \pm 486.63 Δ	1515.77 \pm 1139.74
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	793.42 \pm 505.62	1845.28 \pm 1432.42

注:与空白组或假手术组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the model group, $\Delta P<0.05$.

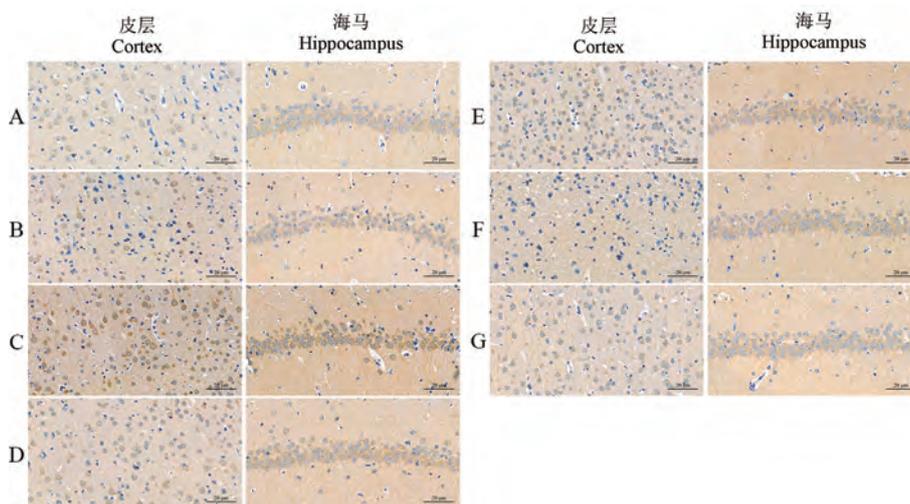


注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 石杉碱甲组; E: 开心散低剂量组; F: 开心散中剂量组; G: 开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 8 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 8 Effect of Kaixin San on the expression of tau in brain tissue of AD rats



注: A: 空白组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 石杉碱甲组; E: 开心散低剂量组; F: 开心散中剂量组; G: 开心散高剂量组。

图 9 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 9 Effect of Kaixin San on the expression of tau in brain tissue of AD rats

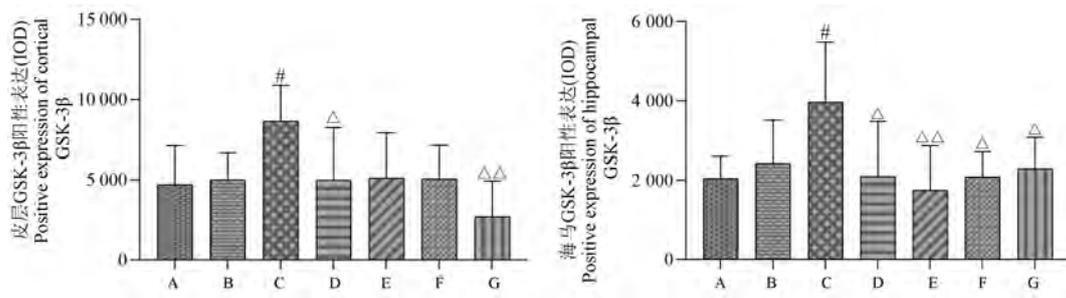
表 7 开心散对 AD 大鼠脑组织中 GSK-3 β 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 7 Effect of Kaixin San on GSK-3 β expression in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	皮层 (IOD) Cortex	海马 (IOD) Hippocampus
空白组 Control group	/	4693.20 ± 2424.03	2047.70 ± 554.39
假手术组 Sham operation group	/	5004.02 ± 1654.56	2421.76 ± 1088.99
模型组 Model group	/	8641.52 ± 2230.49 [#]	3967.49 ± 1515.58 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	4974.27 ± 3274.99 Δ	2102.58 ± 1375.84 Δ
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	5113.12 ± 2794.35	1752.94 ± 1119.70 Δ Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	5068.12 ± 2072.73	2091.91 ± 627.92 Δ
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	2692.39 ± 2236.57 Δ Δ	2290.97 ± 785.73 Δ

注: 与空白组或假手术组相比, # $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group, # $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

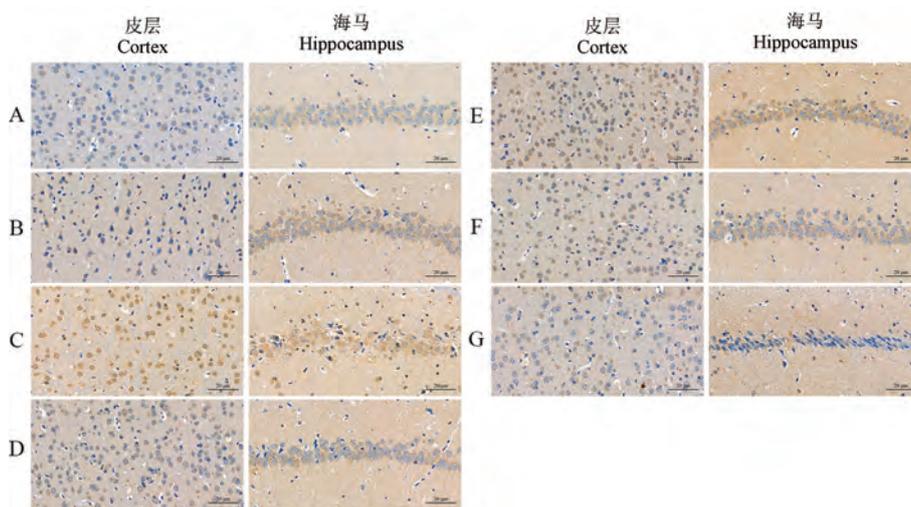


注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:石杉碱甲组; E:开心散低剂量组; F:开心散中剂量组; G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, # $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 10 开心散对 AD 大鼠脑组织中 GSK-3 β 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San medium dose group. Compared with the control group or sham operation group, # $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 10 Effect of Kaixin San on GSK-3 β expression in brain tissue of AD rats



注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:石杉碱甲组; E:开心散低剂量组; F:开心散中剂量组; G:开心散高剂量组。

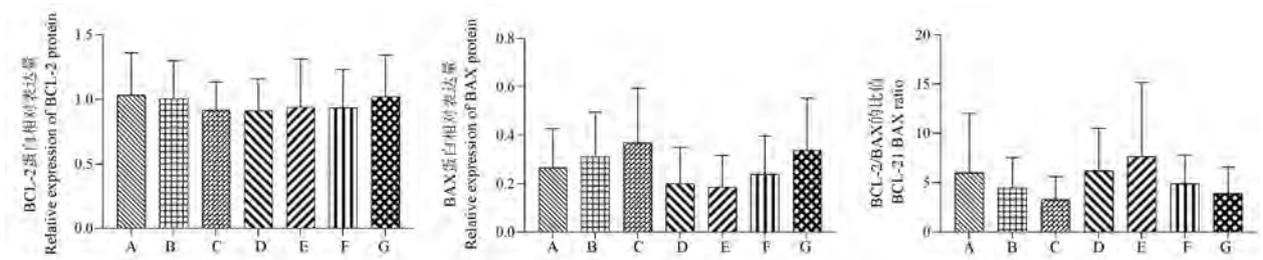
图 11 开心散对 AD 大鼠脑组织中 GSK-3 β 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Shamoperation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 11 Effect of Kaixin San on GSK-3 β expression in brain tissue of AD rats

表 8 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 及 BAX 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 8 Effect of Kaixin San on expression of BCL-2 and BAX in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	BCL-2	BAX	BCL-2/BAX
空白组 Control group	/	1.030 \pm 0.331	0.266 \pm 0.160	6.032 \pm 5.970
假手术组 Sham operation group	/	1.004 \pm 0.296	0.312 \pm 0.183	4.478 \pm 3.089
模型组 Model group	/	0.916 \pm 0.219	0.371 \pm 0.223	3.298 \pm 2.352
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	0.909 \pm 0.248	0.201 \pm 0.151	6.227 \pm 4.265
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	0.938 \pm 0.374	0.186 \pm 0.132	7.675 \pm 7.486
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	0.933 \pm 0.299	0.241 \pm 0.155	4.914 \pm 2.918
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	1.019 \pm 0.324	0.339 \pm 0.214	3.920 \pm 2.667

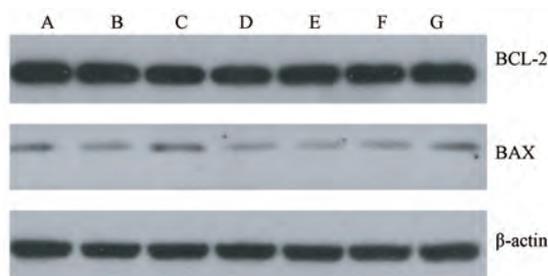


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组

图 12 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 及 BAX 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 12 Effect of Kaixin San on expression of BCL-2 and BAX in brain tissue of AD rats



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。

图 13 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 及 BAX 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 13 Effect of Kaixin San on expression of BCL-2 and BAX in brain tissue of AD rats

3 讨论

Morris 水迷宫作为现今应用最广泛的考察啮齿类动物空间学习与长期记忆的行为学测试^[13],提供了一套评估不同认知域功能的灵活方式,其中最广为人知的隐藏平台训练(定位航行)和空间探索检验可有效评测鼠类的空间记忆与记忆保持能力^[14]。本研究中,经开心散治疗后, Aβ₁₋₄₂ 造模后的大鼠水迷宫各项测试成绩有较明显提升,说明开心散可在一定程度上改善机体的认知导航能力。

AD 作为一类中枢神经系统渐进性衰退病症,从起病、发展到恶化、死亡的整个过程均涉及到特有的病理生理学改变,HE 染色与 Nissl 染色可通过简单的染料组合揭示细胞细节与超微结构分布,借此可推断神经元的功能状态与畸变信息^[15]。病理

形态观察证实,相较于模型组,给药组大鼠皮层、海马组织病理状况有所改善,神经元数量增多,尼氏小体数目增加,形态结构趋于正常,表明开心散可缓解 AD 动物的脑组织损伤,恢复神经元的生理功能。

ACh 参与大脑信息处理的神经传导,与人的记忆行为及学习认知功能密切相关。AD 的病变伴随着脑内 ACh 的“合成-传递-摄取”链失衡、ChAT 与 AChE 的活性失常,胆碱能神经系统出现明显缺陷,进而导致机体学习记忆功能障碍^[16]。ELISA 检测证明,经开心散干预的 AD 大鼠脑组织中 AChE 活性降低,ChAT 与 ACh 的含量上升,进一步揭示了开心散对胆碱能神经传递的靶向作用,间接维持 ACh 合成、降解过程的动态平衡。

慢性免疫炎症反应是 AD 发生并且逐渐恶化的关键诱因^[17-19],随着机体年龄的增长和 Aβ 的持续生成与集聚,小胶质细胞(MG)与星形胶质细胞(AS)在长期慢性活化过程中被过度激活,导致炎症细胞因子如 IL-1β、IL-6、TNF-α 的大量生成与释放,脑组织局部炎症反应加重,神经元受损、变性甚至死亡^[20]。研究过程中观察到,AD 大鼠经开心散治疗后,脑组织中的炎症因子含量均下降,证明开心散可抑制促炎因子的过度释放,由此减轻脑内炎症微环境的毒性效应。

Aβ 是由淀粉样前体蛋白(APP)水解生成的正常代谢物,在 β-分泌酶和 γ-分泌酶的剪辑切割下,APP 可降解为以 Aβ₁₋₄₀ 和 Aβ₁₋₄₂ 为代表的 Aβ 肽段^[21]。在健康机体内,Aβ 的产生与降解可保持动态平衡;然而当机体发生衰老、受到物理或化学损伤时,会导致“Aβ-APP”代谢链失常,Aβ 因此聚积沉淀形成弥漫性的神经炎斑^[22]。经给药治疗后的

AD 鼠脑内 A β 相关蛋白含量均有降低,表明开心散可减少 A β 的异常蓄积,使其生成与清除状态趋于平衡。

Tau 蛋白是一类与微管相关的组分,可与微管结合促进其稳定并组装成束,协助神经细胞间的物质转运^[23]。由于机体的衰老和致病因素的入侵,蛋白激酶如 GSK-3 β 活性的失衡,促使 tau 蛋白的异常修饰和过度磷酸化,进而破坏了微管的结构和稳定性,轴突运输、信号传导等生理功能损坏,最终导致神经元的变性死亡和痴呆的发生^[24]。开心散干预后的 AD 大鼠皮层、海马组织内 tau 蛋白及其磷酸化激酶 GSK-3 β 的表达水平明显下调,证明开心散可调控 tau 蛋白磷酸化水平,维护中枢神经系统的正常运转。

BCL-2 蛋白质大家族主导着细胞对诱发凋亡的各种刺激及损害的敏感性与抵抗力^[25]。根据结构同源性与功能可分为抗凋亡蛋白(以 BCL-2 为代表)与促凋亡蛋白(以 BAX 为代表)^[26],BCL-2 与 BAX 在大脑中的比例介导着神经元的存活^[27]。研究发现,开心散治疗后的 AD 大鼠脑组织中 BAX 蛋白的表达量有所降低,且 BCL-2/BAX 的比值趋于升高,表明开心散在一定程度上可干涉凋亡因子对神经元的毁伤,进而减少其凋亡的发生。

然而,本研究旨在对开心散抗痴呆的药理活性进行全面筛查与验证,所采用的海马 CA1 区注射 A β ₁₋₄₂ 寡聚体致痴呆模型只能复制 AD 的部分症状与病因,且研究所设立的指标与靶点较为宽泛,缺乏针对单一神经功能系统或完整信号蛋白通路的侧重考查,还需在后续研究中加以补充探索。

由以上可知,开心散对双侧海马 CA1 区注射 A β ₁₋₄₂ 造模大鼠的痴呆症状与脑组织损伤有较好的治疗作用和缓解效果,其作用机制涉及到胆碱能神经递质、炎症因子、 β -淀粉样蛋白、tau 蛋白磷酸化水平以及凋亡因子等多靶点、多通路的靶向调控与干预,此研究也进一步证实开心散抗痴呆的药理活性,其作为治疗“好忘”的经典古方具备进一步挖掘的价值。

参考文献:

[1] 贾亚泉,宋军营,曾华辉,等.阿尔茨海默病动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2021,29(3):381-386.
[2] 陈晓培,王虹,李瑞晟,等.姜黄素对阿尔茨海默病小鼠海马 InR 和 IGF1R 表达的影响[J].中国实验动物学报,2013,21(1):27-31,95-96.

[3] 牟朝清,马进.阿尔茨海默病的病因病机研究进展[J].山西医药杂志,2019,48(4):435-438.
[4] 刘金颖,孙林琳,钱园园,等.阿尔茨海默病性别差异及其机制研究[J].中风与神经疾病杂志,2020,37(2):190-192.
[5] Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(6): 881-895.
[6] 胡建庆,赵俊,卢梦晗,等.“通督启神”针法治疗阿尔茨海默病的理论探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(8):2634-2640.
[7] 毕婷婷,战丽彬,张栎婧.基于中药整合药理学平台探究开心散治疗 AD 的物质基础与作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(16):135-141.
[8] 初航,卢盛文,孔玲,等.基于中医方证代谢组学的开心散干预老年痴呆症大鼠的效应物质动态分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2016,18(10):1653-1669.
[9] 刘江华,杨晶,张京兰,等.开心散对 A β ₁₋₄₂ 诱导 Alzheimer 病大鼠模型 Keap-1/Nrf2/MnSOD 信号通路的作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(5):25-32.
[10] 王彬斌,冯晓晓,恩特扎尔·别克,等.开心散对 APP/PS1 小鼠神经炎症和 A β 沉积的作用研究[J].中草药,2021,52(24):7511-7519.
[11] 李妍,时悦,李巍,等.开心散调控 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路促进 AD 模型小鼠脑内神经再生[J].中药药理与临床,2020,36(5):73-78.
[12] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社;1991.
[13] Ran LY, Xiang J, Zeng XX, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis indicated that neurotoxicity of rats with chronic fluorosis may be in mechanism involved in the changed cholinergic pathway and oxidative stress [J]. J Trace Elem Med Biol, 2021, 64: 126688.
[14] Yang G, Qian C, Zhang C, et al. Hepcidin attenuates the iron-mediated secondary neuronal injury after intracerebral hemorrhage in rats [J]. Transl Res, 2021, 229: 53-68.
[15] Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology [J]. Int J Surg Pathol, 2014, 22(1): 12-32.
[16] Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, et al. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase [J]. J Comp Neurol, 1983, 216(1): 53-68.
[17] Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, et al. Higher serum sTNFR1 level predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 22(4): 1305-1311.
[18] McGeer EG, McGeer PL. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 19(1): 355-361.

(下转第 141 页)

李玲, 武建利, 李珊, 等. 苦参碱对妊娠高血压大鼠内皮损伤和 JAK2/STAT3/SOSC1 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 91-97.

Li L, Wu JL, Li S, et al. Effect of matrine on endothelial injury and the JAK2/STAT3/SOSC1 signaling pathway in rats with pregnancy-induced hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 91-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.011

苦参碱对妊娠高血压大鼠内皮损伤和 JAK2/STAT3/SOSC1 信号通路的影响

李玲*, 武建利, 李珊, 曲广第

(新疆医科大学第一附属医院产科, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨苦参碱对妊娠高血压(PIH)大鼠内皮损伤及酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导子和转录激活子 3/细胞因子信号转录抑制因子 1(JAK2/STAT3/SOSC1)信号通路的影响。方法 将 60 只孕鼠随机分成正常对照组、模型对照组、低剂量苦参碱组、高剂量苦参碱组、硫酸镁组, 每组 12 只。正常对照组之外的各组孕鼠在妊娠第 12 天通过灌胃 50 mg/kg 亚硝基左旋精氨酸甲酯构建 PIH 大鼠模型。在妊娠第 16 天, 低、高剂量苦参碱组分别灌胃 50、100 mg/kg 苦参碱, 硫酸镁组灌胃 100 mg/kg 硫酸镁, 正常对照组和模型对照组则灌胃等体积的生理盐水。分别使用大鼠无创血压计和考马斯亮蓝法检测各组孕鼠妊娠第 16 天(给药前)、第 17 天、第 21 天的尾动脉血压及 24 h 尿蛋白含量; 酶联免疫分析试剂盒检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10、内皮素(ET)、血栓素 B2(TXB2)、一氧化氮(NO)、6-酮前列腺素 F1 α (6-keto-PGF1 α)水平; 蛋白免疫印迹法检测大鼠胎盘组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOSC1 蛋白表达水平。结果 妊娠第 17、21 天, 模型对照组孕鼠血压、24 h 尿蛋白含量明显高于正常对照组($P < 0.05$), 低、高剂量苦参碱组孕鼠血压、24 h 尿蛋白含量明显比模型对照组低($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型对照组大鼠血清中 SOD、IL-10、NO 和 6-keto-PGF1 α 水平降低, MDA、TNF- α 、IL-6、ET 和 TXB2 以及胎盘组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、SOSC1 蛋白水平升高($P < 0.05$); 与模型对照组相比, 低、高剂量苦参碱组 SOD、IL-10、NO 和 6-keto-PGF1 α 依次增加, MDA、TNF- α 、IL-6、ET 和 TXB2 以及胎盘组织中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、SOSC1 蛋白水平依次降低($P < 0.05$); 与硫酸镁组相比, 高剂量苦参碱组上述指标均无明显改变($P > 0.05$)。结论 苦参碱降低 PIH 模型大鼠血压、尿蛋白含量、炎症反应及氧化应激水平, 抑制 JAK2、STAT3 磷酸化及 SOSC1 蛋白表达, 进而缓解 PIH 大鼠内皮损伤。

【关键词】 苦参碱; 酪氨酸蛋白激酶 2; 信号转导子和转录激活子 3; 细胞因子信号转录抑制因子 1; 妊娠高血压; 内皮损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0091-07

Effect of matrine on endothelial injury and the JAK2/STAT3/SOSC1 signaling pathway in rats with pregnancy-induced hypertension

LI Ling*, WU Jianli, LI Shan, QU Guangdi

(Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of matrine on endothelial injury and the Janus-activated kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3/suppressor of cytokine signaling-1 (JAK2/STAT3/SOSC1) signaling

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2020D01C244)。

【作者简介】 李玲(1975—), 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 妊娠期高血压疾病。E-mail: liling2244@163.com

pathway in rats with pregnancy-induced hypertension (PIH). **Methods** Sixty pregnant rats were randomly separated into normal control group, model control group, low dose matrine group, high dose matrine group and magnesium sulfate group, with 12 rats in each group. Pregnant rats in each group except the normal control group were intragastrically administered 50 mg/kg nitroso-L-arginine methyl ester on day 12 of pregnancy to establish a PIH rat model. On day 16 of pregnancy, low and high dose matrine groups were administered intragastrically with 50 and 100 mg/kg matrine, respectively, the magnesium sulfate group was administered intragastrically with 100 mg/kg magnesium sulfate, and normal and model control groups were administered intragastrically with an equal volume of saline. A rat non-invasive sphygmomanometer and Coomassie blue staining were used to assess tail artery blood pressure and the 24 h urine protein content of pregnant rats in each group on day 16 (before administration), day 17 and day 21 of pregnancy. Enzyme-linked immunoassays were used to determine the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-10, endothelin (ET), thromboxane B2 (TXB2), nitric oxide (NO), and 6-keto-prostaglandin F1 α (6-keto-PGF1 α). Western blot was used to measure JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 and SOSC1 protein expression in rat placental tissue. **Results** On the days 17 and 21 of pregnancy, blood pressure and the 24 h urine protein content of pregnant rats in the model control group were significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.05$), and blood pressure and the 24 h urine protein content of pregnant rats in low and high dose matrine groups were significantly lower than those in the model control group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, serum levels of SOD, IL-10, NO and 6-keto-PGF1 α in the model control group were lower, and MDA, TNF- α , IL-6, ET and TXB2 levels and p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 and SOSC1 protein expression in placental tissue were higher ($P < 0.05$). Compared with the model control group, SOD, IL-10, NO and 6-keto-PGF1 α in low and high dose matrine groups were increased sequentially, and MDA, TNF- α , IL-6, ET and TXB2 levels and p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3, and SOSC1 protein expression in placental tissue were decreased sequentially ($P < 0.05$). Compared with the magnesium sulfate group, the above indicators in the high dose matrine group showed no significant changes ($P > 0.05$). **Conclusions** Matrine decreases blood pressure, urinary protein content, inflammatory responses, and oxidative stress, inhibits JAK2 and STAT3 phosphorylation and SOSC1 protein expression, and then alleviates endothelial injury in PIH rats

【Keywords】 matrine; Janus-activated kinase 2; signal transducer and activator of transcription 3; suppressor of cytokine signaling-1; pregnancy-induced hypertension; endothelial injury

妊娠高血压 (pregnancy-induced hypertension, PIH) 是影响女性妊娠过程正常进行的重要疾病, 其病发率高, 临床上 PIH 患者在妊娠 20 周以后常出现血压异常升高、尿蛋白增高等症状, 不仅会损伤孕妇的脑、心、肾等器官, 还是导致胎儿和产妇死亡的重要原因^[1]。研究表明, 妊娠早期胎盘相对灌注不足可能导致胎盘异常释放抗血管生成因子进入母体循环, 致使孕妇和胎儿发生血管内皮损伤, 进而引发高血压^[2]。而 PIH 也会导致胎盘组织缺血缺氧, 进而使孕妇体内的炎症应答机制被激活, 造成血管内皮功能障碍^[3]。此外, 过度的氧化应激也会导致血管内皮功能障碍, 从而诱发炎症反应和氧化应激, 加快 PIH 进展^[4]。一些理论认为内皮功能障碍是 PIH 的诱因, 因为内皮功能受损会破坏胎盘的生理过程, 导致抗血管生成因子释放进入母体循环, 从而导致内皮细胞损伤^[5-6]。相关文献显示, 酪氨酸蛋白激酶 2 (janus activated kinase 2, JAK2)/信

号转导子和转录激活子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路在细胞生长分化和免疫方面起重要作用, 细胞因子信号转录抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling-1, SOSC1) 是一种细胞因子生物活性的内源性抑制剂, 其通过 JAK/STAT 信号通路传导^[7]。已有研究表明, JAK2/STAT3/SOSC1 通路的抑制与 PIH 血管内皮细胞分泌功能有关^[8]。苦参碱是一种生物碱, 主要提取自苦参等豆科植物中, 药理作用广泛。目前关于苦参碱在抗肿瘤方面的研究较多^[9], 近年来发现其在治疗血管损伤方面也有一定的效果^[10]。然而, 到目前为止并未有研究报道苦参碱对 PIH 的影响。硫酸镁是临床上常用的缓解 PIH 的药物, 其能够减轻患者的痉挛症状, 调节器官的血液灌注情况, 故常用作 PIH 研究的阳性药物^[11]。因此, 本研究将制备 PIH 大鼠模型, 以硫酸镁为阳性对照, 探讨苦参碱对 PIH 大鼠内皮损伤的影响以及可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 30 只(7~8 周龄,280~320 g)和雌性大鼠 60 只(7~8 周龄,220~270 g)均购自上海市公共卫生临床中心[SCXK(沪)2020-0002]。所有 SD 大鼠均饲养在新疆医科大学第一附属医院动物房内[SYXK(新)2018-0003]。本研究的动物实验均获得本院动物伦理委员会批准(K2007-05),且所有实验步骤均严格按照国际疼痛研究协会的动物保护原则进行,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

亚硝基左旋精氨酸甲酯(L-NAME)购自美国 Sigma 公司(批号:N5751);硫酸镁购自河北武罗药业有限公司(批号:国药准字 H13022977);苦参碱,纯度 $\geq 98\%$,购自成都瑞芬思生物科技有限公司(批号:K-002);内皮素(ET)ELISA 检测试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司(批号:ARB13558);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒购自上海研谨生物科技有限公司(批号:YOYO、F12630);血栓素 B2(TXB2)、6 酮前列腺素 F₁ α (6-keto-PGF₁ α)、一氧化氮(NO)ELISA 检测试剂盒购自上海乔羽生物科技有限公司(批号:QY-SE2052、QY-SX1804、QY-WN1888);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 ELISA 检测试剂盒购自美国 Abcam 公司(批号:ab236712、ab234570、ab214566);JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOCS1 抗体购自美国 CST 公司(批号:74987、66245、9139、4113、68631)。大鼠无创血压计购自上海玉研科学仪器有限公司(型号:STARR MouseOx Small Animal Vit);多功能酶标仪购自华泰和合(北京)商贸有限公司(型号:4200 酶标仪);分光光度计购自上海光学仪器一厂(型号:722)。

1.3 实验方法

1.3.1 PIH 大鼠模型的构建与给药方法

SD 大鼠适应性饲养 1 周后,将雌雄大鼠按照 1:2 的比例关在同一个笼子里进行交配。次日,收集雌性大鼠的阴道分泌物,若在显微镜下观察到精子的存在,则视为大鼠的怀孕日。将 60 只孕鼠随机分成 5 组,即正常对照组、模型对照组、低剂量苦参碱组、高剂量苦参碱组、硫酸镁组,每组 12 只孕鼠。

正常对照组除外,其余各组孕鼠在妊娠第 12 天,通过连续 1 周灌胃 50 mg/kg L-NAME 构建 PIH 大鼠模型^[12],若孕鼠 16 d 的血压比造模前的血压增加量 ≥ 20 mmHg,尿蛋白 $\geq (+)$ 时,则表示造模成功^[13]。在妊娠第 16 天,低、高剂量苦参碱组分别灌胃 50、100 mg/kg 苦参碱(依据朱新业等^[14]的研究和前期预实验确定),硫酸镁组灌胃 100 mg/kg 硫酸镁^[15],正常对照组和模型对照组则灌胃等体积的生理盐水,每天 1 次,连续 6 d^[16]。

1.3.2 各组孕鼠血压和 24 h 尿蛋白含量的检测

从妊娠第 12 天开始,每天检测使用大鼠无创血压计检测各组孕鼠的尾动脉血压并收集其 24 h 内的尿液,采用考马斯亮蓝法检测其尿蛋白含量。分别记录妊娠第 12 天(造模前)、第 16 天(给药前)、第 17、21 天的血压和上述时间的 24 h 尿蛋白含量。

1.3.3 ELISA 检测各组孕鼠血清中相关因子的水平

将各组妊娠至 21 d 的孕鼠麻醉后,经尾静脉取血,将其收集在抗凝管中,离心后取上清液,使用 ELISA 试剂盒检测 SOD、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-10、ET、TXB₂、NO、6-keto-PGF₁ α 水平。

1.3.4 蛋白免疫印迹法检测胎盘组织内 JAK2/STAT3/SOCS1 信号通路相关蛋白表达

各组孕鼠给药结束后,立即使用 40 mg/kg 体积分数为 1%戊巴比妥钠进行麻醉,并进行剖宫产,取出胎盘组织。从胎盘组织中提取总蛋白,使用 BCA 试剂盒检测其浓度,然后将等量的样品与加样缓冲液均匀混合,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,结束后转膜,1 h 后用牛血清白蛋白封膜;加入一抗 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、SOCS1 或 β -actin,均稀释 1000 倍,次日,加入二抗,接着孵育 1 h,再添加 ECL 发光试剂,使用 Image 软件对显影的条带灰度值进行分析。

1.4 统计学方法

符合正态分布的计量数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 23.0 进行分析,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较使用 Turkey 事后检验;采用重复测量的方法比较各组孕鼠妊娠第 12、16、17、21 天的血压和 24 h 尿蛋白含量差异, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦参碱对各组孕鼠不同时期血压的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠妊娠第 16、17、21 天的血压明显升高 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,低、高剂量苦参碱组大鼠妊娠第 17、21 天的血压依次降低 ($P < 0.05$),而高剂量苦参碱组大鼠妊娠第 17、21 天的血压与硫酸镁组没有明显差异 ($P > 0.05$);在妊娠第 16 天时(给药前),各组大鼠血压变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.2 苦参碱对各组孕鼠不同时期 24 h 尿蛋白含量的影响

各组大鼠妊娠第 12 天时(造模前)的 24 h 尿蛋白含量差异不明显,不具有统计学意义 ($P > 0.05$);模型对照组大鼠妊娠第 16、17、21 天的 24 h 尿蛋白含量显著高于正常对照组 ($P < 0.05$);低、高剂量苦参碱组、硫酸镁组大鼠妊娠第 17、21 天的 24 h 尿蛋白含量显著低于模型对照组 ($P < 0.05$),且随着苦参碱剂量的增加,大鼠 24 h 尿蛋白含量依次降低 ($P < 0.05$),见表 2。

2.3 苦参碱对各组孕鼠氧化应激的影响

模型对照组与正常对照组比较,SOD 含量显著下降,MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$);与模型对照组比较,低、高剂量苦参碱组大鼠 SOD 含量依次升高,MDA 含量依次降低 ($P < 0.05$),而 SOD 与 MDA 在高剂量苦参碱组与硫酸镁组中的含量差异不明显 ($P > 0.05$),见表 3。

2.4 苦参碱对各组孕鼠炎症反应的影响

模型对照组与正常对照组相比,TNF- α 、IL-6 水平提高,IL-10 水平降低 ($P < 0.05$)低、高剂量苦参碱组和硫酸镁组与模型对照组相比,TNF- α 、IL-6 水平下降,IL-10 水平上升 ($P < 0.05$),不同剂量苦参碱组的指标差异显著 ($P < 0.05$),而高剂量苦参碱组与硫酸镁组中的 TNF- α 、IL-6、IL-10 含量无显著变化 ($P > 0.05$),见表 4。

2.5 苦参碱对各组孕鼠血管内皮细胞中活性物质的影响

与正常对照组相比,模型对照组孕鼠血清 ET 和 TXB2 增加、NO 和 6-keto-PGF1 α 减少,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型对照组相比,低、高剂量苦参碱组孕鼠血清 ET 和 TXB2 呈剂量依赖性降低、NO 和 6-keto-PGF1 α 呈剂量依赖性升高 ($P < 0.05$),而高剂量苦参碱组与硫酸镁组中的上述指标差异不大 ($P > 0.05$),见表 5。

2.6 苦参碱对各组孕鼠胎盘组织中 JAK2/STAT3/SOSC1 信号通路蛋白表达的影响

模型对照组 p-JAK2/JAK2 与 p-STAT3/STAT3 值及 SOSC1 蛋白水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$);与模型对照组相比,低、高剂量苦参碱组 p-JAK2/JAK2 与 p-STAT3/STAT3 值及 SOSC1 蛋白水平依次下降,表现为剂量依赖性 ($P < 0.05$),而高剂量苦参碱组与硫酸镁组中蛋白表达水平均无显著差异 ($P > 0.05$),见图 1 和表 6。

表 1 苦参碱对各组孕鼠不同时期血压的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12, \text{mmHg}$)

Table 1 Effect of matrine on blood pressure of pregnant rats in different periods

组别 Groups	第 12 天 D12	第 16 天 D16	第 17 天 D17	第 21 天 D21
正常对照组 Normal control group	108.12 \pm 7.15	109.59 \pm 7.08	110.48 \pm 7.21	110.91 \pm 6.53
模型对照组 Model control group	109.42 \pm 8.51	136.94 \pm 6.89 ^a	138.63 \pm 6.94 ^a	152.34 \pm 7.75 ^a
低剂量苦参碱组 Low dose matrine group	109.78 \pm 7.92	135.53 \pm 6.92 ^a	124.61 \pm 7.12 ^{ab}	121.46 \pm 7.42 ^{ab}
高剂量苦参碱组 High dose matrine group	110.26 \pm 8.16	135.48 \pm 6.94 ^a	112.74 \pm 7.34 ^{bc}	106.57 \pm 7.48 ^{bc}
硫酸镁组 Magnesium sulfate group	111.32 \pm 8.23	135.59 \pm 7.03 ^a	112.52 \pm 7.65 ^{bc}	104.61 \pm 7.23 ^{bc}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型对照组比较,^b $P < 0.05$;与低剂量苦参碱组比较,^c $P < 0.05$ 。下表同。

Note. Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$. Compared with model control group, ^b $P < 0.05$. Compared with low dose matrine group, ^c $P < 0.05$. The same in the following tables.

表 2 苦参碱对各组孕鼠不同时期 24 h 尿蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12, \text{mg}$)

Table 2 Effects of matrine on 24 h urinary protein content in pregnant rats at different periods

组别 Groups	第 12 天 D12	第 16 天 D16	第 17 天 D17	第 21 天 D21
正常对照组 Normal control group	6.26 \pm 0.65	6.19 \pm 0.65	6.22 \pm 0.69	6.34 \pm 0.58
模型对照组 Model control group	6.42 \pm 0.59	8.87 \pm 0.46 ^a	9.01 \pm 0.58 ^a	8.47 \pm 1.56 ^a
低剂量苦参碱组 Low dose matrine group	6.54 \pm 0.71	8.83 \pm 0.45 ^a	7.86 \pm 0.64 ^{ab}	7.36 \pm 0.63 ^b
高剂量苦参碱组 High dose matrine group	6.52 \pm 0.69	8.79 \pm 0.51 ^a	6.54 \pm 0.67 ^{bc}	6.42 \pm 0.54 ^{bc}
硫酸镁组 Magnesium sulfate group	6.36 \pm 0.68	8.77 \pm 0.49 ^a	6.48 \pm 0.62 ^{bc}	6.19 \pm 0.51 ^{bc}

表 3 苦参碱对各组孕鼠氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effects of matrine on oxidative stress of pregnant rats in each group

组别 Groups	SOD (U/mL)	MDA (mmol/mL)
正常对照组 Normal control group	113.25±12.21	1.81±0.29
模型对照组 Model control group	79.13±8.84 ^a	4.15±0.51 ^a
低剂量苦参碱组 Low dose matrine group	95.46±10.03 ^{ab}	2.96±0.46 ^{ab}
高剂量苦参碱组 High dose matrine group	108.34±11.56 ^{bc}	1.84±0.24 ^{bc}
硫酸镁组 Magnesium sulfate group	109.21±11.67 ^{bc}	1.82±0.26 ^{bc}

表 4 苦参碱对各组孕鼠炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

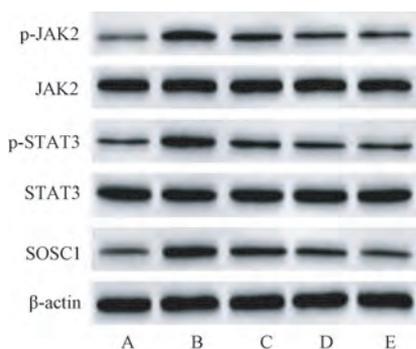
Table 4 Effects of matrine on inflammatory response of pregnant rats in each group

组别 Groups	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
正常对照组 Normal control group	136.48±32.13	133.75±3.68	281.57±41.35
模型对照组 Model control group	265.69±28.42 ^a	239.42±18.49 ^a	154.63±31.46 ^a
低剂量苦参碱组 Low dose matrine group	183.74±21.36 ^{ab}	193.54±26.13 ^{ab}	223.17±39.24 ^{ab}
高剂量苦参碱组 High dose matrine group	138.25±24.45 ^{bc}	137.57±17.51 ^{bc}	276.62±40.15 ^{bc}
硫酸镁组 Magnesium sulfate group	137.64±23.28 ^{bc}	135.82±15.24 ^{bc}	278.98±41.23 ^{bc}

表 5 苦参碱对各组孕鼠血管内皮细胞中活性物质的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effects of matrine on active substances in vascular endothelial cells of pregnant rats in each group

组别 Groups	ET (pg/mL)	NO (pg/mL)	TXB2 (pg/mL)	6-keto-PGF1 α (pg/mL)
正常对照组 Normal control group	2.65±0.41	28.34±3.53	405.61±33.48	584.74±45.12
模型对照组 Model control group	6.97±0.95 ^a	14.65±2.89 ^a	649.74±51.65 ^a	371.35±39.48 ^a
低剂量苦参碱组 Low dose matrine group	3.89±0.64 ^{ab}	21.36±3.04 ^{ab}	523.57±48.62 ^{ab}	456.34±41.57 ^{ab}
高剂量苦参碱组 High dose matrine group	2.73±0.52 ^{bc}	27.95±3.12 ^{bc}	436.41±43.15 ^{bc}	569.45±43.96 ^{bc}
硫酸镁组 Magnesium sulfate group	2.71±0.49 ^{bc}	28.11±3.23 ^{bc}	435.24±41.34 ^{bc}	574.63±45.78 ^{bc}



注: A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 低剂量苦参碱组; D: 高剂量苦参碱组; E: 硫酸镁组。

图 1 各组孕鼠胎盘组织中 JAK2/STAT3/SOS1 信号通路蛋白免疫印迹图

Note. A, Normal control group. B, Model control group. C, Low dose matrine group. D, High dose matrine group. E, Magnesium sulfate group.

Figure 1 Western blot of JAK2/STAT3/SOS1 signaling pathway in placental tissues of pregnant rats in each group

表 6 苦参碱对各组孕鼠胎盘组织中 JAK2/STAT3/SOS1 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Effects of matrine on protein expression of JAK2/STAT3/SOS1 signaling pathway in placental tissues of pregnant rats in each group

组别 Groups	p-JAK2/ JAK2	p-STAT3/ STAT3	SOS1/ β -actin
正常对照组 Normal control group	0.24±0.09	0.33±0.08	0.27±0.09
模型对照组 Model control group	0.63±0.15 ^a	0.67±0.18 ^a	0.60±0.12 ^a
低剂量苦参碱组 Low dose matrine group	0.45±0.08 ^{ab}	0.48±0.09 ^{ab}	0.43±0.08 ^{ab}
高剂量苦参碱组 High dose matrine group	0.32±0.06 ^{bc}	0.35±0.06 ^{bc}	0.31±0.06 ^{bc}
硫酸镁组 Magnesium sulfate group	0.31±0.05 ^{bc}	0.33±0.04 ^{bc}	0.29±0.05 ^{bc}

3 讨论

PIH 的主要并发症是血管内皮损伤和功能障碍,对产妇和围产儿都有非常严重的影响^[17]。其临床表现主要是妊娠后期孕妇血压的持续升高和尿蛋白含量的增多。硫酸镁是目前临床上用来缓解 PIH 疾病的一种药物,既能有效的降低孕妇的血压,又不会对胎儿的血压和健康产生影响,故硫酸镁经常被用作 PIH 大鼠实验的阳性对照^[18]。本研究通过灌胃 L-NAME 制备的 PIH 模型大鼠妊娠第 17、21 天的血压及 24 h 尿蛋白含量均明显升高($P < 0.05$),这与通过皮下注射 L-NAME 构建的 PIH 模型大鼠的结果类似^[19],提示 PIH 大鼠造模成功,可进行深入研究。

苦参碱是四环素-喹诺列齐啉类生物碱,是提取自苦参的活性物质,有清热、利尿、抗病毒、抗肿瘤等作用^[20]。国内外研究显示,苦参碱不仅可以减轻缺血再灌注大鼠心肌损伤,还对缺氧/复氧诱导的大鼠心脏微血管内皮细胞凋亡有保护作用^[21-22]。苦参碱可通过降低 MDA 含量及 TNF- α 等促炎因子水平、提高 SOD 含量发挥其抗氧化和抗炎作用^[23-24]。ET、TXB₂、NO 和 6-keto-PGF₁ α 由血管内皮细胞分泌而来,是血管活性标志物,与血管平滑肌细胞增殖的调节和血管张力有关。ET 是调节血压的一种收缩因子,其过量表达使得内皮通透性增加,致使胎盘受损^[25]。NO 参与调节妊娠期血管舒张和反应性,其含量的下降可引发高血压。TXB₂ 和 6-keto-PGF₁ α 分别为 TXA₂ 和前列腺素 2 (PGI₂) 的代谢稳定形式,正常情况下,二者是一种相互拮抗、相互作用的动态平衡关系,是保持机体血压正常的基础,但在原发性高血压患者中 TXB₂ 显著上调,6-keto-PGF₁ α 显著下调,二者的平衡关系被打破^[26]。本研究发现低、高剂量苦参碱及硫酸镁干预均可显著降低 PIH 大鼠的血压和 24 h 尿蛋白含量、减缓血管受损(ET、TXB₂ 含量降低,NO、6-keto-PGF₁ α 含量升高),提示苦参碱可以明显改善 PIH 大鼠血压、尿蛋白,降低血管受损程度。

据报道 PIH 与氧化应激,血管内皮损伤、胎盘营养不良等因素有关^[27]。孕妇早期身体上出现的炎症对孕妇不会造成影响,只是一种生理应激反应。子痫是 PIH 疾病的一种,在其孕妇胎盘或血清中的炎症因子水平比正常孕妇高出许多^[28]。在 PIH 大鼠中,MDA 水平上升,SOD 活性下降,进而使

大鼠体内的氧化应激损伤加重^[13,29]。机体过度的氧化应激诱发炎症因子的表达,TNF- α 、IL-6 是促进炎症的细胞因子,IL-10 是抵抗炎症的细胞因子。魏双燕等^[30]发现在 PIH 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 显著上调,IL-10 显著下调。JAK2/STAT3/SOSC1 信号通路与炎症的发生有关^[31]。而近年的研究发现,JAK2/STAT3 通路在 PIH 模型大鼠体内被激活,JAK2、STAT3 磷酸化水平的增高诱导 SOSC1 蛋白表达,当使用 JAK2 抑制剂 A490 处理后,上述蛋白表达水平均被减弱,PIH 症状也得到缓解^[8]。本研究发现 PIH 大鼠组织中 JAK2、STAT3 磷酸化及 SOSC1 蛋白表达水平、血清炎症反应(TNF- α 、IL-6 水平升高,IL-10 水平降低)及氧化应激水平(MDA 含量升高,SOD 含量降低)明显升高,提示 PIH 的发生机制可能与炎症反应、氧化应激受损有关。而低、高剂量苦参碱及硫酸镁干预均可降低炎症反应,提高抗氧化应激水平,抑制 JAK2、STAT3 磷酸化及 SOSC1 蛋白表达水平,表明苦参碱可以减轻 PIH 大鼠炎症反应,抑制 JAK2、STAT3 磷酸化及 SOSC1 的活化,提高抗氧化能力进而减缓内皮损伤。

综上所述,苦参碱可降低 PIH 模型大鼠的血压及尿蛋白含量,抑制 JAK2、STAT3 磷酸化及 SOSC1 的表达,改善其氧化应激及炎症反应导致的内皮损伤,为苦参碱在临床上治疗 PIH 提供理论依据,但由于 PIH 发病机制复杂,后续还需深入研究。

参考文献:

- [1] Thoulas JC, Robertson L, Denadai L, et al. Hypertensive disorders of pregnancy and adult offspring cardiometabolic outcomes: a systematic review of the literature and meta-analysis [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2016, 70(4): 414-422.
- [2] Pant V, Yadav BK, Sharma J. A comparative study to assess SFLT-1: PLGF ratio in pregnant women with and without preeclampsia [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2019, 493(1): S260-S267.
- [3] Bazzano AN, Green E, Madison A, et al. Assessment of the quality and content of national and international guidelines on hypertensive disorders of pregnancy using the AGREE II instrument [J]. *BMJ Open*, 2016, 6(1): e009189.
- [4] Ou M, Zhao H, Ji G, et al. Long noncoding RNA MALAT1 contributes to pregnancy-induced hypertension development by enhancing oxidative stress and inflammation through the regulation of the miR-150-5p/ET-1 axis [J]. *FASEB J*, 2020, 34(5): 6070-6085.
- [5] Henriques AC, Carvalho FH, Feitosa HN, et al. Endothelial dysfunction after pregnancy-induced hypertension [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2014, 124(3): 230-234.

- [6] Tannetta D, Sargent I. Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2013, 15(6): 590-599.
- [7] Zhu M, Wang H, Chen J, et al. Sinomenine improve diabetic nephropathy by inhibiting fibrosis and regulating the JAK2/STAT3/SOCS1 pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Life Sci*, 2021, 265(1): 118855-118881.
- [8] Luo JY, Fu D, Wu YQ, et al. Inhibition of the JAK2/STAT3/SOCS1 signaling pathway improves secretion function of vascular endothelial cells in a rat model of pregnancy-induced hypertension [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3-4): 527-537.
- [9] 胡锦丹, 王宇. 苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(5): 171-175.
- [10] Zhang S, Guo S, Gao XB, et al. Matrine attenuates high-fat diet-induced *in vivo* and ox-LDL-induced *in vitro* vascular injury by regulating the PKC α /eNOS and PI3K/Akt/eNOS pathways [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2731-2743.
- [11] 周玲. 硫酸镁治疗妊娠期高血压疾病的临床效果研究 [J]. *中国医药指南*, 2016, 14(32): 84-85.
- [12] Wang Y, Huang M, Yang X, et al. Supplementing punicalagin reduces oxidative stress markers and restores angiogenic balance in a rat model of pregnancy-induced hypertension [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(4): 409-417.
- [13] 陈雅婷, 李莉, 巫梦雪, 等. 黄芩苷对妊娠期高血压大鼠胎盘 sFIT-1 及 PLGF 表达的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(22): 2381-2385.
- [14] 朱新业, 高登峰, 牛小麟, 等. 苦参碱对自发性高血压大鼠心肌间质纤维化的作用和机制 [J]. *心脏杂志*, 2005, 17(6): 528-531.
- [15] Liu Y, Xiong M, Zhou F, et al. Effect of baicalin on gestational hypertension-induced vascular endothelial cell damage [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(10): 300060520934288.
- [16] 黄作香, 张小莎, 周刚. 黄芪甲苷对妊娠期高血压模型大鼠胎盘组织中 HIF-1 α 、sFLT-1 和 PLGF 表达水平的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(16): 1684-1688.
- [17] Alma LJ, De Groot CJM, De Menezes RX, et al. Endothelial dysfunction as a long-term effect of late onset hypertensive pregnancy disorders: High BMI is key [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2018, 225: 62-69.
- [18] Ma L, Li L, Han P, et al. Effect of the drug combination of magnesium sulfate and phentolamine on homocysteine and C-reactive protein in the serum of patients with pregnancy-induced hypertension syndrome [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 3682-3688.
- [19] 陈丽敏, 汪佳佳, 金苏菊. 丹参素对妊娠高血压大鼠妊娠结局的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(8): 977-980.
- [20] 郭晓玲, 康丽霞, 任美芳. 苦参碱联合 Akt 信号通路抑制剂影响肾癌细胞的活力与凋亡 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 99-105.
- [21] 张静, 秦方, 付莉, 等. 苦参提取物通过 JAK/STAT 信号通路减轻缺血再灌注大鼠心肌损伤的实验研究 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22(2): 177-181.
- [22] Zhao XB, Qin Y, Niu YL, et al. Matrine inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiac microvascular endothelial cells in rats via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 117-124.
- [23] 李娟, 姚遥, 韩怀钦, 等. 苦参碱对 LPS 诱导的阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆功能和脑内神经炎症的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 134-139.
- [24] 卢迎宏, 王丹, 井海云. 苦参碱对 oxLDL 诱导的血管平滑肌细胞炎症反应及增殖凋亡的影响及分子机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(4): 537-543.
- [25] Cox AG, Gurusinge S, Abd Rahman R, et al. Sulforaphane improves endothelial function and reduces placental oxidative stress *in vitro* [J]. *Pregnancy Hypertens*, 2019, 16(1): 1-10.
- [26] 汤艳丽, 汤峥冬, 童秋瑜, 等. 针灸联合硝苯地平控释片对原发性高血压病人血浆 TXA₂/PGI₂ 平衡及血液流变学的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(24): 3890-3893.
- [27] Xu K, Zang X, Peng M, et al. Magnesium Lithospermate B downregulates the levels of blood pressure, inflammation, and oxidative stress in pregnant rats with hypertension [J]. *Int J Hypertens*, 2020, 2020: 6250425.
- [28] Balasubramanian D, Gelston CAL, Mitchell BM, et al. Toll-like receptor activation, vascular endothelial function, and hypertensive disorders of pregnancy [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 121(1): 14-21.
- [29] 杨明凤, 冉利梅. 姜黄素对妊娠高血压大鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 89-94.
- [30] 魏双燕, 李霞, 陈莉, 等. 酪氨酸蛋白激酶 2 特异性抑制剂 AG490 对妊娠期高血压综合征大鼠血管内皮细胞分泌功能的作用机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(21): 3457-3460.
- [31] Chen Y, Chen L, Yang T. Silymarin nanoliposomes attenuate renal injury on diabetic nephropathy rats via co-suppressing TGF- β /Smad and JAK2/STAT3/SOCS1 pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 271: 119197.

[收稿日期]2022-03-19

侯著法,赵冰洁,车虹,等.对香豆酸诱导弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞内质网应激介导的凋亡[J].中国比较医学杂志,2022,32(10):98-103.

Hou ZF, Zhao BJ, Che H, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma cells by *p*-coumaric acid [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 98-103.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.012

对香豆酸诱导弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞内质网应激介导的凋亡

侯著法,赵冰洁,车虹,易文静,刘培佳,刘松山*

(成都中医药大学附属医院血液科,成都 610072)

【摘要】 目的 探讨对香豆酸诱导弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞内质网应激介导的凋亡。方法 选择弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞(OCI-LY1),以不同浓度对香豆酸(0,0.4,0.8,1.6,3.2 mmol/L)作用于OCI-LY1细胞,采用CCK8法检测其抑制率及半数抑制浓度(IC₅₀);随后设置分组:(1)空白对照组、对香豆酸(1/2 IC₅₀组、IC₅₀组、2 IC₅₀组);(2)空白对照组、对香豆酸 IC₅₀组、4-PBA组(5 mmol/L)、4-PBA+IC₅₀组,采用CCK8检测细胞活性;流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1α蛋白相对表达量。结果 对香豆酸以剂量依赖性方式抑制OCI-LY1细胞增殖,其IC₅₀值为2.601 mmol/L;与空白对照组相比,1/2 IC₅₀组、IC₅₀组、2 IC₅₀组细胞抑制率、细胞凋亡及GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1α蛋白表达明显升高($P<0.01$);与IC₅₀组相比,4-PBA组、4-PBA+IC₅₀组细胞抑制率、细胞凋亡及GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1α蛋白表达明显降低($P<0.01$);与4-PBA组相比,4-PBA+IC₅₀组细胞抑制率、细胞凋亡及GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1α蛋白表达明显升高($P<0.01$)。结论 对香豆酸抑制OCI-LY1细胞增殖,可能通过激活OCI-LY1细胞内质网应激从而诱导细胞凋亡。

【关键词】 弥漫性大B淋巴瘤;对香豆酸;内质网应激;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0098-06

Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma cells by *p*-coumaric acid

HOU Zhufa, ZHAO Bingjie, CHE Hong, YI Wenjing, LIU Peijia, LIU Songshan*

(Department of Hematology, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma cells by *p*-coumaric acid. **Methods** Diffuse large B-cell lymphoma cell line OCI-LY1 was treated with *p*-coumaric acid (0, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mmol/L) and the inhibition rate and half-inhibition concentration (IC₅₀) was determined by CCK8 assays. Subsequently, groupings were set as follows: (1) control group and *p*-coumaric acid groups (1/2 IC₅₀, IC₅₀ and 2 IC₅₀). (2) control group, *p*-coumaric acid IC₅₀ group, 4-PBA group (5 mmol/L) and 4-PBA+IC₅₀ group. Cell activity was assessed by CCK8 assays. Apoptosis was detected by flow cytometry. Relative expression of GRP78, ATF6, CHOP, p-PERK and p-IRE1α proteins was detected by Western blot. **Results** *p*-Coumaric acid inhibited

[作者简介]侯著法(1970—),男,副主任医师,研究方向:血液病中西医结合研究。E-mail:houshufa2021@163.com

[通信作者]刘松山(1968—),男,主任医师,研究方向:血液病中西医结合研究。E-mail:pine009@163.com

OCI-LY1 cell proliferation in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of 2.601 mmol/L. Compared with the control group, the cell inhibition rate, apoptosis, and GRP78, ATF6, CHOP, p-PERK and p-IRE1 α protein expression were significantly increased in the 1/2 IC_{50} , IC_{50} and 2 IC_{50} groups ($P < 0.01$). Compared with the IC_{50} group, the cell inhibition rate, apoptosis and GRP78, ATF6, CHOP, p-PERK, p-IRE1 α protein expression were significantly decreased in the 4-PBA group and 4-PBA+ IC_{50} group ($P < 0.01$). Compared with the 4-PBA group, cell inhibition rate, apoptosis and GRP78, ATF6, CHOP, p-PERK and p-IRE1 α protein expression were significantly increased in the 4-PBA+ IC_{50} group ($P < 0.01$). **Conclusions** *p*-Coumaric acid inhibits OCI-LY1 cell proliferation, possibly by activating endoplasmic reticulum stress and inducing apoptosis.

【Keywords】 diffuse large B lymphocytoma; *p*-coumaric acid; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是成人最常见和最具侵袭性的淋巴组织肿瘤之一, 占非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin Lymphoma, NHL) 病例的 30% ~ 40%^[1]。DLBCL 具有浸润性生长快、恶性程度高、预后差等特点^[2]。早期淋巴瘤的治愈率约为 40% ~ 60%, 而晚期淋巴瘤的 5 年生存率不到 30%, 尽管目前标准 R-CHOP (利妥昔单抗、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松) 治疗方案可以提高 DLBCL 患者的有效率, 但 30% ~ 40% 的患者对治疗无效或治疗后复发, 这表明标准的细胞毒治疗有其局限性^[3-4]。因此, 有必要寻找新的治疗药物或治疗策略, 以有效地提高 DLBCL 患者的生存率或延缓其复发。

目前, DLBCL 的治疗临床应用最广泛的为西药, 中药是一个全新的选择, 研究报道中医药已广泛应用于癌症的治疗, 天然产物/草药可以为包括 DLBCL 在内的多种肿瘤的单一疗法或联合治疗提供其他策略^[5]。对香豆酸 (*p*-coumaric acid, *p*-CA) 是白花蛇舌草的主要成分, 白花蛇舌草作为一种被广泛研究的抗肿瘤中草药, 已被证明可以抑制 NHL 细胞增殖^[6]。此外, 研究报道对香豆酸组合物可抑制白血病细胞株 Kasumi-1 的增殖, 具有抗肿瘤作用^[7]。然而, 对香豆酸对 DLBCL 的作用尚不清楚。研究显示葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 的诱导和未折叠蛋白反应 (UPR) 的激活在致癌性进展中起着关键作用, 因此, 可以利用癌细胞对这些 UPR 信号通路的生存依赖性增加来进行抗癌研究^[8]。基于此, 本研究拟探讨对香豆酸对 DLBCL 的作用, 并初步探讨其作用机制, 以期对 DLBCL 的治疗提供潜在方法。

1 材料和方法

1.1 细胞

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 OCI-LY1 细胞 (批号:

BFN60808875) 购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 主要试剂与仪器

对香豆酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸 (4-PBA) 购自 Sigma; CCK8 试剂、细胞凋亡检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V/PI 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 抗体及 β -actin 抗体均购自英国 Abcam 公司; Western blot 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 发光试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。低温高速离心机购自湖南湘仪集团; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司; Bio-Rad 全功能成像仪购自上海天能科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK8 法检测细胞增殖

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、95% 湿度培养箱中培养, 隔天换液, 传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

取对数生长期细胞, 按照 5×10^3 个/孔的细胞量将细胞接种于 96 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、95% 湿度培养箱中培养 24 h, 分组加入不同浓度对香豆酸 (0、0.4、0.8、1.6、3.2 mmol/L), 每个样本设 6 个平行孔, 继续培养 24 h。随后, 每孔加入 10 μ L CCK8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 2 h, 通过酶标仪测量 450 nm 处的光密度值 (OD) 来评估细胞增殖情况。抑制率 (%) = $[1 - (OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$, 计算对香豆酸 IC_{50} 进行后续实验。

1.3.2 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡

取对数生长期细胞, 按照 5×10^5 个细胞/皿的密

度接种细胞至 60 mm 培养皿中,培养 24 h 后设置分组为:(1)空白对照组、对香豆酸(1/2 IC_{50} 组、 IC_{50} 组、2 IC_{50} 组);(2)空白对照组、对香豆酸 IC_{50} 、4-PBA 组(5 mmol/L)、 IC_{50} +4-PBA 组。按组别分别加入对香豆酸或 4-PBA。采用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测细胞凋亡,将细胞用冰冷磷酸盐缓冲液洗涤后,用含有 Annexin V 和 PI 的结合缓冲液在室温黑暗环境中孵育 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡并分析各组细胞凋亡率。

1.3.3 Western blot 检测 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达

设置分组:(1)空白对照组、对香豆酸(1/2 IC_{50} 组、 IC_{50} 组、2 IC_{50} 组);(2)空白对照组、对香豆酸 IC_{50} 、4-PBA 组(5 mmol/L)、 IC_{50} +4-PBA 组,按组别分别干预。24 h 后收集细胞并用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解,BCA 试剂盒测量细胞裂解物中的蛋白质浓度,经 10% SDS-PAGE 电泳后,将分离出的蛋白质转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温孵育 1 h 后,分别与 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α (1:500)或 β -actin(1:1000)一抗在 4 $^{\circ}C$ 下孵育过夜,再与辣根过氧化物酶偶联二抗在室温下孵育 2 h。ECL 试剂盒检测免疫反应条带,使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像,Image-ProPlus 分析光密度,以 β -actin 为内参,对照组目标蛋白质相对含量为 1,计算各组蛋白质的相对表达量,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

运用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对香豆酸对 OCI-LY1 细胞增殖的影响

对香豆酸以剂量依赖性方式抑制 OCI-LY1 细胞的增殖,对香豆酸对 OCI-LY1 细胞的 IC_{50} 值为 2.601 mmol/L(图 1)。

2.2 对香豆酸对 OCI-LY1 细胞凋亡的影响

与空白对照组相比,对香豆酸 1/2 IC_{50} 组、 IC_{50} 组、2 IC_{50} 组细胞凋亡明显增加($P<0.01$),且呈现剂量依赖性(图 2)。

2.3 对香豆酸对 OCI-LY1 细胞内质网应激相关蛋白表达的影响

与空白对照组相比,对香豆酸 1/2 IC_{50} 组、 IC_{50} 组、2 IC_{50} 组 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显升高($P<0.01$)(图 3)。

2.4 抑制内质网应激对对香豆酸作用 OCI-LY1 细胞的影响

流式细胞凋亡结果显示,与空白对照组相比, IC_{50} 组、 IC_{50} +4-PBA 组细胞凋亡明显升高,4-PBA 组细胞凋亡明显降低($P<0.05$);与 IC_{50} 组相比,4-PBA 组、 IC_{50} +4-PBA 组细胞凋亡明显降低($P<0.01$);与 4-PBA 组相比, IC_{50} +4-PBA 组细胞凋亡明显升高($P<0.05$)(图 4A、图 4C)。CCK8 检测结果显示,与空白对照组相比, IC_{50} 组、 IC_{50} +4-PBA 组细胞抑制率明显升高($P<0.01$);与 IC_{50} 组相比,4-PBA 组、 IC_{50} +4-PBA 组细胞抑制率明显降低($P<0.01$);与 4-PBA 组相比, IC_{50} +4-PBA 组细胞抑制率明显升高($P<0.01$)(图 4B)。Western blot 检测结果显示,与空白对照组相比, IC_{50} 组、4-PBA+ IC_{50} 组细胞 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显升高,4-PBA 组细胞 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显降低($P<0.01$);与 IC_{50} 组相比,4-PBA 组、4-PBA+ IC_{50} 组细胞 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显降低($P<0.01$);与 4-PBA 组相比,4-PBA+ IC_{50} 组细胞 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显升高($P<0.01$)(图 4D)。

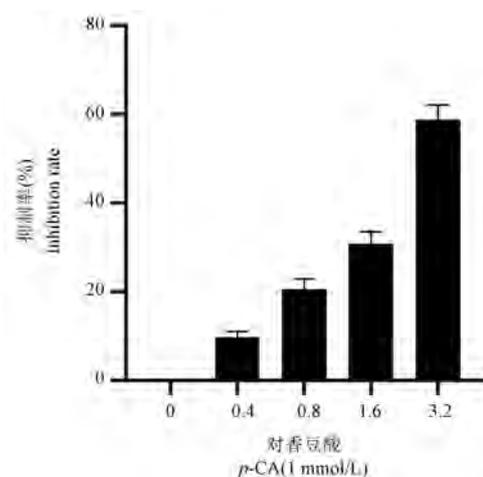
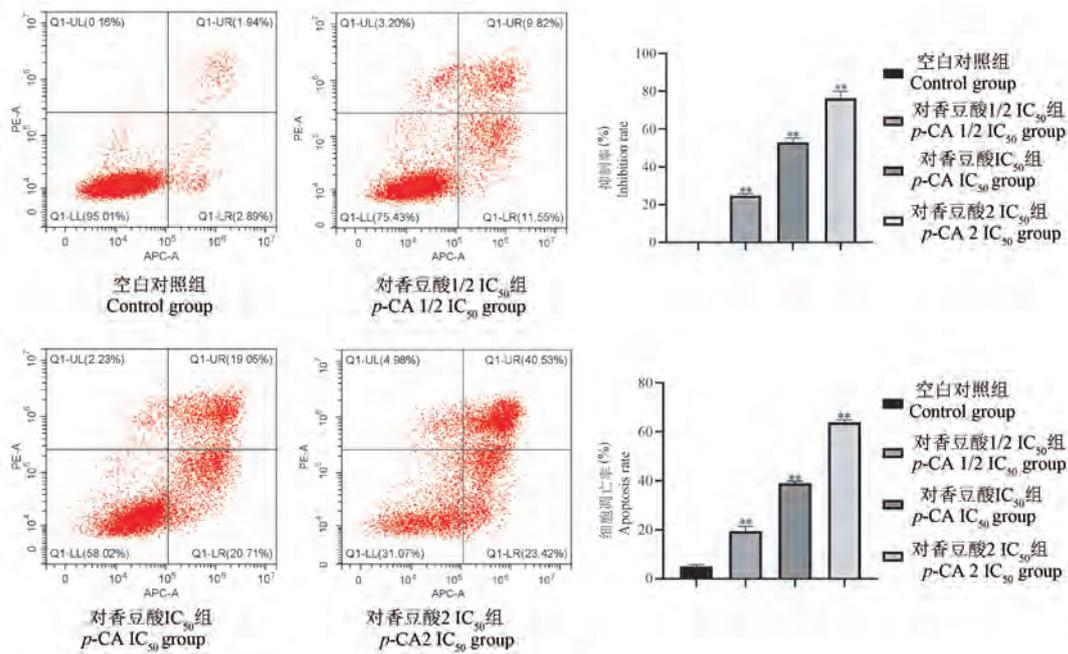


图 1 对香豆酸对 OCI-LY1 细胞增殖的影响

Figure 1 Effect of *p*-coumaric acid on the proliferation of OCI-LY1 cells

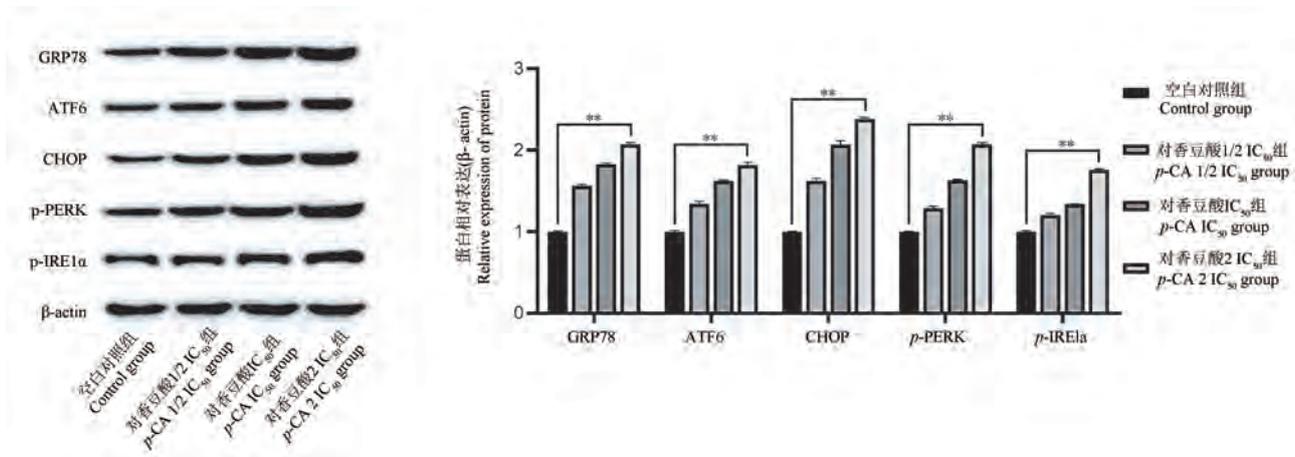


注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图2 对香豆酸对 OCI-LY1 细胞凋亡的影响

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

Figure 2 Effect of *p*-coumaric acid on apoptosis of OCI-LY1 cells



注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图3 对香豆酸对 OCI-LY1 细胞内质网应激相关蛋白表达的影响

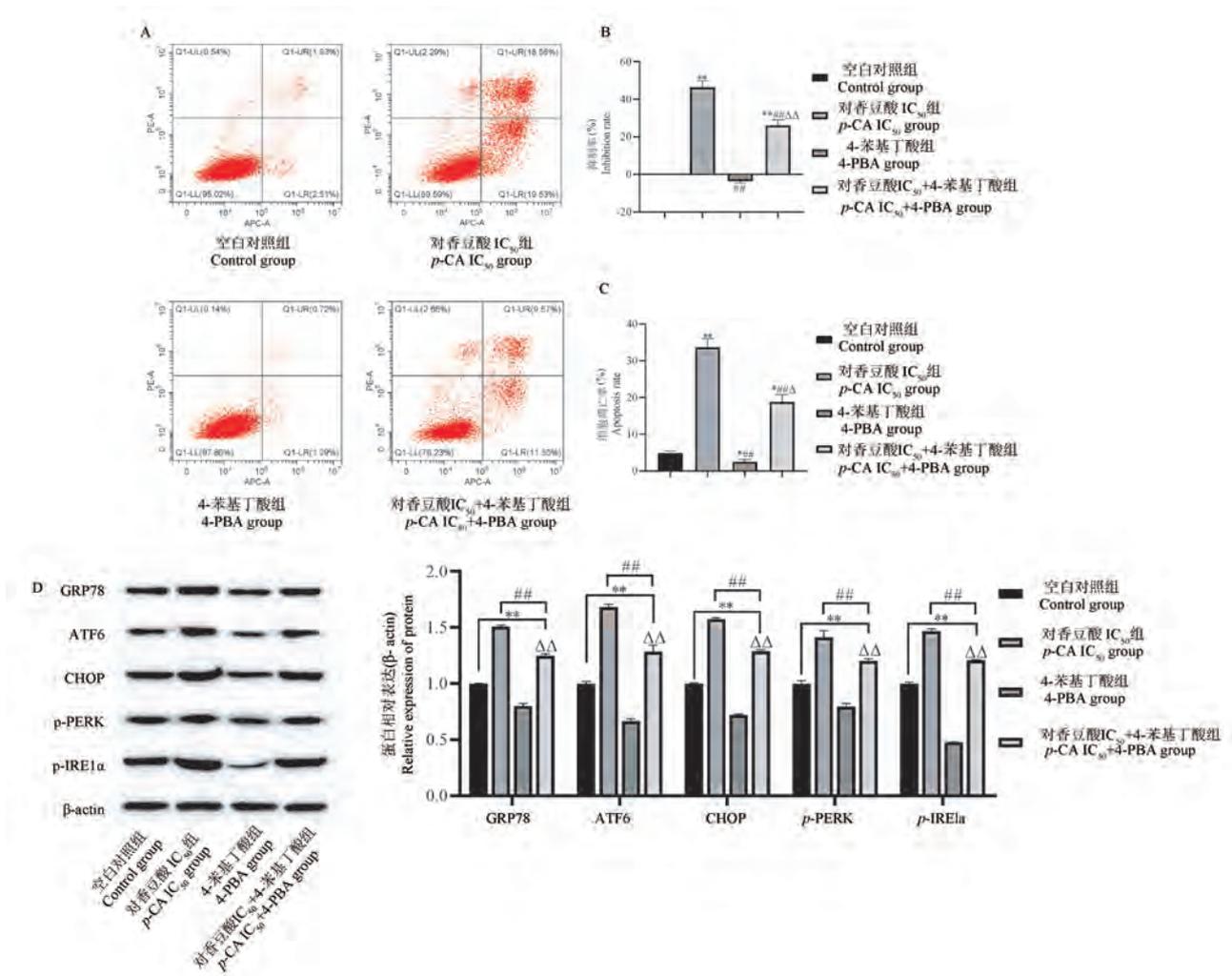
Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of *p*-coumaric acid on the expression of endoplasmic reticulum stress-related proteins in OCI-LY1 cells

3 讨论

DLBCL 患者预后较差,虽然应用 R-CHOP 治疗方案可以进一步提高化疗效果,但近 40% 的患者会出现复发/难治性问题^[4]。因此,迫切需要有效的新治疗方法和/或新药来改善治疗结果。对香豆酸作为白花蛇舌草的主要成分之一,对香豆酸可通过

调节某些 microRNA 的表达在 SNU-16 胃癌细胞中发挥其抗癌作用^[9]。可通过激活 PERK-eIF2 α -ATF-4-CHOP 通路抑制结肠癌细胞 Grp78 上调进而诱导细胞凋亡^[10]。此外,对香豆酸可通过改善 1,2-二甲基胍给药大鼠结肠的解毒和凋亡过程来抑制息肉的形成^[11]。然而,对香豆酸在 DLBCL 中的作用尚未得到深入研究。由此,本研究以 OCI-LY1 细胞



注:与空白对照组相比,** $P < 0.01$;与 IC₅₀ 组相比,## $P < 0.01$;与 4-PBA 组相比,ΔΔ $P < 0.01$ 。

图 4 抑制内质网应激对对香豆酸作用 OCI-LY1 细胞的影响

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$. Compared with IC₅₀ group, ## $P < 0.01$. Compared with 4-PBA group, ΔΔ $P < 0.01$.

Figure 4 Effects of endoplasmic reticulum stress inhibition on *p*-coumaric acid-acting OCI-LY1 cells

为研究对象,探讨了香豆酸对 OCI-LY1 细胞凋亡的诱导作用及机制。

研究已表明成功的抗癌治疗涉及有效和特异的肿瘤细胞死亡^[12]。在本研究中,对香豆酸诱导了恶性 OCI-LY1 细胞的凋亡,且呈现剂量依赖性方式降低其存活率。表明对香豆酸对 OCI-LY1 细胞凋亡具有促进作用。研究显示肿瘤细胞中内质网应激机制决定细胞的命运,在包括淋巴瘤在内的大多数肿瘤中参与细胞凋亡^[13]。在正常情况下,内质网应激结合的传感器,即 PERK、IRE1α 和 ATF6 通过 GRP78 的关联而保持在非激活状态;在内质网应激条件下,GRP78 从传感器上解离,未折叠蛋白反应被激活,游离的 GRP78 作为伴侣帮助新合成的蛋白质实现正确的折叠^[14-15]。此外,PERK 激活导致

eIF2α 磷酸化,阻止大部分蛋白质的翻译,但持续的 PERK 信号上调转录因子 CHOP,从而诱导 DNA 损伤蛋白,下调生存期蛋白(Bcl2)^[16]。最后,ATF6 转位到高尔基体,在那里它的胞浆片段(ATF6f)控制内质网应激相关的降解基因^[17]。在本研究中,我们研究了 GRP78 及其下游靶点在对香豆酸干预的 OCI-LY1 细胞中的表达,结果显示对香豆酸干预的 OCI-LY1 细胞中 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1α 蛋白表达明显升高,说明对香豆酸通过诱导长时间的內质网应激来抑制适应性反应。本研究得到了先前研究的证实,这些研究报道了某些化合物,如蝴蝶苷 B(Oroxin B)、EHMT2 抑制剂 Bix-01294 等,能够诱导 B 淋巴瘤细胞抑瘤性内质网应激,从而导致细胞凋亡^[18-19]。为了进一步明确对香

豆酸是否通过内质网应激影响 OCI-LY1 细胞凋亡, 本研究采用内质网应激抑制剂 4-PBA 作用细胞, 结果显示, 与对香豆酸 IC₅₀ 组相比, 4-PBA 组、4-PBA+IC₅₀ 组细胞凋亡及 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显降低, 但相比 4-PBA 组, 4-PBA+IC₅₀ 组细胞凋亡及 GRP78、ATF6、CHOP、p-PERK、p-IRE1 α 蛋白表达明显升高。提示对香豆酸诱导的细胞凋亡是由内质网应激介导的, 内质网应激进一步诱导了下游的凋亡信号。

综上所述, 本研究表明对香豆酸可能激活了内质网应激信号, 进而诱导 OCI-LY1 细胞凋亡, 是一种有效的治疗 DLBCL 的潜在预防药物, 对提高 DLBCL 的治疗效果具有重要的药用价值。

参考文献:

- [1] Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma [J]. Pathology, 2018, 50(1): 74-87.
- [2] Wang L, Li LR, Young KH. New agents and regimens for diffuse large B cell lymphoma [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 175.
- [3] Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment [J]. Am J Hematol, 2019, 94(5): 604-616.
- [4] Mondello P, Mian M. Frontline treatment of diffuse large B-cell lymphoma: beyond R-CHOP [J]. Hematol Oncol, 2019, 37(4): 333-344.
- [5] 王瑜, 朱明了, 何施燕, 等. 紫云英苷诱导 DLBCL 细胞系 OCI-LY8 凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(5): 885-890.
- [6] 李华, 周云, 温省初, 等. 白花蛇舌草通过 PI3K/Akt 信号通路抑制人非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞增殖 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(20): 3495-3499.
- [7] 陈智, 林圣云, 蒋剑平, 等. 白花蛇舌草对香豆酸组合物对急性髓系白血病细胞 Kasumi-1 生长抑制作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(9): 1089-1094.
- [8] Hernandez I, Cohen M. Linking cell-surface GRP78 to cancer: From basic research to clinical value of GRP78 antibodies [J]. Cancer Lett, 2022, 524: 1-14.
- [9] Jang MG, Ko HC, Kim SJ. Effects of *p*-coumaric acid on microRNA expression profiles in SNU-16 human gastric cancer cells [J]. Genes Genomics, 2020, 42(7): 817-825.
- [10] Sharma SH, Rajamanickam V, Nagarajan S. Antiproliferative effect of *p*-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer [J]. Chem Biol Interact, 2018, 291: 16-28.
- [11] Sharma SH, Rajamanickam V, Nagarajan S. Supplementation of *p*-coumaric acid exhibits chemopreventive effect via induction of Nrf2 in a short-term preclinical model of colon cancer [J]. Eur J Cancer Prev, 2019, 28(6): 472-482.
- [12] Su Z, Yang Z, Xu Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 48.
- [13] Debernardi J, Pioche-Durieu C, Cam EL, et al. Verotoxin-1-induced ER stress triggers apoptotic or survival pathways in burkitt lymphoma cells [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(5): 316.
- [14] Best S, Hashiguchi T, Kittai A, et al. Targeting ubiquitin-activating enzyme induces ER stress-mediated apoptosis in B-cell lymphoma cells [J]. Blood Adv, 2019, 3(1): 51-62.
- [15] Best S, Liu T, Bruss N, et al. Pharmacologic inhibition of the ubiquitin-activating enzyme induces ER stress and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and ibrutinib-resistant mantle cell lymphoma cells [J]. Leuk Lymphoma, 2019, 60(12): 2946-2950.
- [16] Steinmetz TD, Schlötzer-Schrehardt U, Hearne A, et al. TFG is required for autophagy flux and to prevent endoplasmic reticulum stress in CH12 B lymphoma cells [J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2238-2256.
- [17] Shigemi Z, Baba Y, Hara N, et al. Effects of ER stress on unfolded protein responses, cell survival, and viral replication in primary effusion lymphoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(3): 565-572.
- [18] Yang P, Fu S, Cao Z, et al. Oroxin B selectively induces tumor-suppressive ER stress and concurrently inhibits tumor-adaptive ER stress in B-lymphoma cells for effective anti-lymphoma therapy [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 288(2): 269-279.
- [19] Xu L, Gao X, Yang P, et al. EHMT2 inhibitor BIX-01294 induces endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis and autophagy in diffuse large B-cell lymphoma cells [J]. J Cancer, 2021, 12(4): 1011-1022.

[收稿日期] 2022-04-14

段凤阳,徐闪闪,丁樱,等. 过敏性紫癜动物实验模型的对比分析及建模思路探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 104-108.

Duan FY, Xu SS, Ding Y, et al. Comparative analysis of animal models of Henoch-Schönlein purpura and discussion on modeling ideas [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 104-108.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.013

过敏性紫癜动物实验模型的对比分析及建模思路探讨

段凤阳^{1,2}, 徐闪闪^{1,2}, 丁樱^{1,2*}, 郭婷^{1,2}, 宋纯东^{1,2}, 张霞^{1,2}

(1.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000;2.河南中医药大学儿科医学院,郑州 450000)

【摘要】 过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是儿童时期常见的全身性小血管炎病变,容易引起肾损伤,相较于本病大量临床研究报道,有关动物实验模型的文献报道相对较少。现对比分析当前国内外HSP动物实验模型的构建机理、造模方法及优缺点,就HSP动物模型构建思路进行探讨分析,为本病的科学研究提供参考。

【关键词】 过敏性紫癜;动物实验模型;思路探讨

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)10-0104-05

Comparative analysis of animal models of Henoch-Schönlein purpura and discussion on modeling ideas

DUAN Fengyang^{1,2}, XU Shanshan^{1,2}, DING Ying^{1,2*}, GUO Ting^{1,2}, SONG Chundong^{1,2}, ZHANG Xia^{1,2}

(1. the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China.

2. Pediatric Medical College of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Henoch-Schönlein purpura (HSP) is a common systemic small vasculitis in childhood, which easily causes kidney damage. Compared with the large number of clinical studies on this disease, there are relatively few reports on animal models. Here, we systematically summarize the establishment, modeling method, advantages and disadvantages of the current domestic and foreign HSP animal models, expound the research status and existing problems of HSP animal models, and discuss and analyze the HSP animal model establishment to provide ideas and references for scientific research on this disease.

【Keywords】 Henoch-Schönlein purpura; animal experimental model; thought discussion

过敏性紫癜(Henoch-Schönlein purpura, HSP)是儿童时期常见的血管炎,紫癜性肾炎(HSPN)是过敏性紫癜最严重的并发症,是儿童时期最常见的继发性肾小球疾病,具有患病率逐渐升高,病程迁延,部分患儿可进展为慢性肾衰竭等特点,现代医学治疗尚无统一方案^[1-4]。目前关于HSP或HSPN的报道多以临床研究为主,鉴于医学伦理等直接人体实验的局限性,有关本病病因探索,病机阐述,疗

效评价及新药研发等方面受到极大限制,故构建HSP动物实验模型意义重大。通过查阅国内外文献,笔者发现当前有关本病动物实验模型存在文献报道少、构建方法各异且存在学术争鸣等特点,下面将从国内外建立HSP动物模型的制备思路、理论依据、造模方法及优缺点等方面进行归纳分析,探讨HSP动物实验模型的建构思路,以供相关科研人员参考。

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81873343);河南省卫生健康委员会中医药青苗人才(豫卫中医函[2021]16号);河南省中医药科学研究专项课题(2021ZPZX019)。

【作者简介】段凤阳(1984—),男,在职博士研究生,研究方向:中医药防治小儿肾脏疾病。E-mail:duanfengyang2013@sina.com

【通信作者】丁樱(1951—),女,本科,主任医师,教授,研究方向:中医药治疗儿童肾脏病。E-mail:dingying3236@sina.com

1 参照 IgA 肾病实验动物模型法建立的 HSP 实验动物模型

HSP 又称 IgA 相关性血管炎, HSPN 和 IgA 肾病病理上均表现为肾小球系膜区以 IgA 为主的免疫球蛋白沉积和系膜增生^[5]。Reamy 等^[6]认为二者本质上是同一种疾病的全身系统受累或单独肾受累的不同表现形式。国内韩冰虹等^[7]参照 IgA 肾病动物实验模型法探讨了 HSP 动物实验模型的构建, 即选用 20 只 KM 小鼠口服麦胶蛋白+尾静脉注射印度墨水稀释液。实验前 3 周模型组小鼠尾静脉注射印度墨水, 剂量为 4 mg/100 g, 每周 1 次, 共 3 周, 后予含麦胶蛋白的酸化饮用水灌胃, 剂量为每只 0.5 mL, 隔日 1 次, 持续至 14 周末, 最后予尾静脉注射麦胶蛋白液体, 每天 1 次, 每只 0.2 mL, 连续 3 d。该模型建成后有 3 例小鼠出现了皮肤紫癜表现, 皮肤和肾组织形态学变化与人类 HSP 基本一致。沈银红等^[8]、杨云等^[9]等通过此种造模方法发现实验小鼠 24 h 尿蛋白定量、血清循环免疫复合物 (circulating immune complex, CIC) 水平、血清炎症指标、肾组织氧化应激水平均出现了明显改变; 苗丰等^[10]通过此种造模方法发现, 模型组小鼠血清尿素氮、肌酐、晚期氧化蛋白产物及 CIC 水平明显升高, 肾病理显示系膜区可见大量 CIC 沉积, 基质大量增加, 基底膜增厚。最近的基础研究表明, HSP 的发病机制与细胞免疫失衡有关, 主要表现为与 Th17 细胞相关的 ROR γ t 高表达和 Treg 细胞相关的 Foxp3 表达显著降低^[11-12]。贵琳等^[13]在研究 TLR4 单克隆抗体对 HSP 小鼠的保护作用的实验中, 通过 qRT-PCR 技术发现, 此种造模方式除肾损伤与 HSP 相似外, ROR γ t 与 Foxp3 在皮肤及肾的表达与 HSP 相同。尽管如此, 此种造模方式以印度墨水封闭网状内皮系统, 导致内皮系统功能障碍, 然后持续给予抗原刺激免疫系统, 促进 IgA 的产生及沉积, 从而获得与 HSPN 相似的病理细胞因子学改变, 但 HSP 特征性皮疹的出现率却偏低。

2013 年黄华等^[14]借鉴 IgA 肾病造模方法, 采用牛清白蛋白 (BSA) + 脂多糖 (LPS) + 四氯化碳 (CCl₄) 进行 HSPN 造模, 实验动物为 KM 雌性小鼠, 首先予 10% 免疫原 BSA 1200 mg/kg 灌胃, 隔日 1 次, 持续 6 周; 后予蓖麻油 0.5 mL + CCl₄ 0.1 mL 皮下注射, 每周 1 次, 持续 6 周; 再以 0.9% 氯化钠溶液配制 0.025% LPS 每只小鼠尾静脉注射 0.05 mg, 在第 3、5 周注射, 每周 1 次。造模结束后

有 10 只模型组小鼠死亡, 尿蛋白阳性率为 90%。此种造模方式以血尿、蛋白尿检查均阳性作为造模成功标志, 但应用药物种类多, 操作复杂, 动物死亡率高。

近年来, 随着中医中药治疗 HSP 的发展, 中西医结合构造 HSP 动物模型的研究逐渐深入。其造模思路主要是在 IgA 肾病实验动物模型法的基础上侧重发挥中医思想, 首先以中医热性药物灌胃造就动物血热的偏颇体质模型, 然后参照应用麦胶蛋白作为饮食抗原复感外邪, 加以印度墨水封闭网状内皮系统 (RES) 的经典 IgA 肾病造模方法, 建立 HSP 实验动物模型, 在造模前中后期分别对实验动物进行一般状况、血尿免疫检测及皮肤肾病理改变观察监测。张奕星等^[15]参考了黄华等关于 HSPN 动物模型的研制思路, 综合模拟中医热证与 IgA 肾病动物模型, 对紫癜性肾炎实验动物模型进行了中医病证结合的深入探索, 首先运用 BSA 联合 LPS 及 CCl₄ 方法造就 IgA 肾病 SD 大鼠模型, 即于室温 30℃ 下以蒸馏水配制 10% 免疫原 BSA, 隔天灌胃持续 8 周 (400 mg/kg), 皮下注射蓖麻油 0.3 mL + CCl₄ 0.1 mL, 每周 1 次, 共 9 周, 于 6、8、10、12 周每只小鼠尾静脉注射 0.025% LPS 0.2 mL, 并于第 9 周开始隔天灌服 10 mg/kg 的 25% 干姜水复合中医热型动物模型。结束后模型组 6 只大鼠出现了肉眼血尿, 2 只出现皮肤瘀斑, 尿蛋白及红细胞计数升高, 肾病理符合 HSPN 变化, 并以此模型探讨了丹芍颗粒 III 对 HSPN 大鼠血尿蛋白尿和肾组织部分蛋白的影响^[16]。这种方式创新了 HSP 动物实验模型的造模方法, 为中医药治疗 HSP 的机理研究提供了思路。

上述 HSP 动物实验模型的构建理论依据来源于现代医学认为 IgA 肾病和 HSPN 的病理表现相似, HSPN 可理解为伴有皮肤紫癜等肾外表现的 IgA 肾病。故造模成功后多偏重于肾损伤的同质性, 对于皮损症状出现的关注度偏低。麦角蛋白联合印度墨水法存在造模时间长, 血尿出现率低、皮肤紫癜出现例数少等不足, 牛清白蛋白+脂多糖+四氯化碳法虽造模时间短, 但造模药物多, 操作复杂, 费用及动物死亡率高, 存在造模药物诱发动物模型脏器损伤的风险。尽管如此, 在此种造模思路的影响下, 亦出现了运用中医证型联合 IgA 肾病动物实验模型的病证结合模型, 推动了中医中药对 HSP 的研究。

2 依据Ⅲ型超敏反应原理构建 HSP 动物实验模型

目前世界公认的过敏性紫癜的发病诱因主要归结于感染原和过敏原,由过敏原介导的Ⅲ型过敏反应,又称免疫复合物型过敏反应^[17-18]。潘仕红等^[19]采用卵清蛋白(OVA)作为抗原,诱导并激发Ⅲ型变态反应,构建了 HSP 大鼠模型,具体操作如下:取 10 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周,然后给予 10 mg/kg OVA 乳化溶液干预,包括 OVA 溶液(20 mg/mL)和弗氏完全佐剂以 1:1 混合,腹腔注射,每周 1 次,共 3 周。3 周后再予 10 mg/mL OVA 生理盐水溶液尾静脉注射,同时给予 0.3% OVA 生理盐水溶液皮内注射,分 5 个注射点,每个点 0.2 mL。此种造模方式 80% SD 大鼠的腹部和尾部出现散在皮肤紫癜,血清炎症因子明显升高,肾病理显示系膜细胞及基质增生,免疫荧光 IgA 免疫复合物颗粒状沉积(+++)。李彦红等^[20-21]根据 HSP 发病病因与过敏及机体自身的遗传因素有关等因素,通过构建免过敏性体质,再依据Ⅲ型超敏反应原理构建了 HSP 兔模型,其建模方法分为 3 部分:先构建过敏体质,即以萆拨、干姜、胡椒水 1:1:1 混合口服给药 3 周,记录动物活动量、体温、日饮水量及血常规;再连续抗原刺激致敏,即腹腔注射含卵圆蛋白与弗氏完全佐剂 1:1 混合乳化溶液(每只 1 mL),每周 1 次,连续 3 周;然后抗原冲击激发过敏反应,即耳缘静脉注射卵圆蛋白生理盐水(10 mg/mL)0.5 mL,背部剪毛,皮内注射 0.3% 卵圆蛋白生理盐水共 1 mL,分 5 点,每点 0.2 mL。抗原激发 24 h 后测动物模型血尿等一般情况,2 周后解剖,取皮肤、肾等做病理及 IgA、C3 免疫荧光检测。造模结束后发现,此种造模法模型组动物皮肤瘀斑出现率明显提高,血液中 IgA 明显升高,补体 C3 降低,皮肤及肾病理改变符合 HSPN 表现,经与 HSP 患儿的血液学和免疫学特征比较,发现该 HSP 模型可以模拟儿童 HSP 特征^[22-24]。候兆玉等^[25]运用此种造模方式发现并证实,模型组家兔血清 IgA 含量明显升高,与临床 HSPN 患者相关血清学检测具有一致性。

采用Ⅲ型超敏反应原理 HSP 实验动物模型,具有造模时间短,操作简单,能很好地模拟 HSP 皮肤瘀斑等优点,有助于研究 HSP 组织炎症和损伤相关的分子机制。但模型组动物皮肤瘀斑仅出现在局部注射部位,与 HSP 自发性皮肤瘀斑不同,对过敏反应和上游免疫机制的研究有限等不足。

3 针对 HSP 动物实验模型的学术争鸣

尽管 HSP 动物实验模型的构建研究已经持续了数十年,且实验物种由小鼠,丰富至大鼠、兔等,但是现有模型是否真正的代表 HSP,并满足临床研究需要,国内外专家意见并不一致。部分学者认为 HSP 是一种以 IgA 为主的免疫复合物介导的白细胞破裂性血管炎,主要累及皮肤、胃肠道、关节及肾,上述动物实验模型仅检测了皮肤或肾的 IgA 或 C3 沉积,对于其他免疫球蛋白 IgG、IgM 是否沉积或是否以 IgA 沉积为主关注不足;另外现有动物模型的皮损改变是局部刺激引起,并非 HSP 自发性出现,且大多数实验动物物种不表达 IgA 受体 Fc α R1,这就忽略了中性粒细胞通过 Fc α R1 激活的影响^[26-27]。因此,这些模型是否具有 HSP 发病机制的代表性尚不清楚。对此,Li 等^[28]提出了不同意见,由于 HSP 的主要特征是 IgA 免疫复合物的沉积,C3 是该病的主要病理因素,所以实验主要是基于 IgA 沉积和 C3 检测,此结果与国外文献报道一致^[29-30],且其在实验初期检测了 IgG 及 IgM 水平,但仅存在部分模型和少数对照组中;其次,临床中 HSP 自发性皮肤紫癜一定程度上属于血管过敏反应的外在表现,IgA 和 Fc α R1 之间的相互作用可能在 IgA 血管炎(IgAV)的发病机制中发挥作用,但也可能属于一种新的发病机制,与探讨 IgA 免疫复合物通过激活补体途径引起 HSP 的免疫机制并不冲突。

4 HSP 动物实验模型现状述评及思路探讨

4.1 HSP 动物实验模型现状及不足

目前国内外关于 HSP 动物实验模型的探索主要发生于 2000 年以后,且以国内学者为主^[31]。就造模方法而言,主要分为基于借鉴 IgA 肾病模型的麦胶蛋白+印度墨水法、牛清白蛋白+脂多糖+四氯化碳法、卵清蛋白+和弗氏完全佐剂法和参照中医血热理论的“病证结合”模型;就实验动物而言,主要包括麦胶蛋白联合印度墨水的昆明雌性小鼠,清白蛋白+脂多糖+四氯化碳 SD 雄性大鼠以及卵蛋白法选择大耳白兔或 SD 雄性大鼠,中西医结合的“病证结合”模型多选择 SD 雄性大鼠和大耳白兔;就造模时间而言,多在 3~15 周不等;就造模观察指标而言,主要涵盖皮损、血、尿等实验室检查、HSP 细胞因子检测以及皮肤和肾病理形态及免疫复合物沉积。现就造模时间、造模方法、优缺点梳理如下。详见表 1。

无论是参照 IgA 肾病实验动物模型法,还是依据 III 型过敏反应原理构建法,虽然最终获得了不同程度的皮肤改变及肾损伤,并经历了从单纯复制 IgA 肾病病理状态到逐步丰富和发展到遵循 HSP 发生发展规律,病症结合的模拟人类 HSPN 临床表现及病理特点的过程。但就目前 HSP 动物实验模型的构建而言,仍然存在以下问题:第一,充分参照 IgA 肾病模型的造模方法不仅难以实现皮肤紫癜的肾外表现,而且 HSPN 和 IgA 肾病毕竟存在发病年龄和预后的差异^[34],因此该造模法难以完全模拟 HSPN 疾病发展变化;第二,采用 III 型过敏反应原理下构建模型,虽然更接近与 HSP 的临床及病理特征,但是难以全面解释 HSP 的发病机制及免疫损伤机制^[35]。

4.2 HSP 动物实验模型的构建思路与展望

结合文献复习,笔者认为 HSP 动物实验模型的建立须具备以下两个原则:一是高度的相似性原则,即紫癜性肾炎动物实验模型不能单纯追寻皮肤或肾病理改变的相似性,更应复合其自身发病规

律,即不仅仅包含皮肤紫癜,更应侧重于本病发病原因、机体免疫学变化等因素,因此李彦红等^[23]依据 III 型过敏反应原理构建的 HSP 动物实验模型与临床的契合度更高;二是稳定的可重复性原则,任何经典模型的建立都要经历千万次实验的重复,而基于重复实验的稳定性是我们更好的研究该病的发病机理和研发治疗新药的重要保证。基于以上问题,笔者认为在目前国内外尚缺乏成熟的 HSP 实验动物模型的情况下,对于 HSP(尤其是 HSPN)的研究,通过细胞培养体外实验交互验证的方式探索 HSP 动物实验模型可能是提高 HSP 动物实验模型成熟性的方法之一。

任何一种动物模型的构建都是一项艰巨和复杂的工作,它需要伴随着科学技术的发展,不断地探索创新和完善。HSP 病因复杂,发病机制尚未明确,单纯皮损及肾病理的改变并不能完全反映其发病本质。未来的研究不仅需要更大的动物队列样本进一步阐明病因,更需要集中在相关免疫学指标及细胞因子水平、基因及遗传水平等方面进行深入探讨。

表 1 HSP 动物实验模型构建情况归纳表
Table 1 Summary table of HSP animal experiment model construction

建模方法 Modeling methods	年份 Year	实验动物 Experimental animals	方法 Method	优点 Advantages	不足 Inadequate
借鉴 IgA 肾病模型法 Refer to the IgA nephropathy model method	2001 年 2001 year	昆明小鼠 KM mice	麦角蛋白+印度墨水 Ergot protein + indian ink	符合 HSP 内皮系统损伤及免疫活化 Consistent with HSP endothelial system injury and immuno-activation	周期长,皮损出现率低 Cycle is long and the incidence of lesions is low
	2003 年 2003 year	SD 大鼠 SD rats	BSA+葡萄球菌肠毒素 ^[32] BSA+ Staphylococcus enterotoxin	操作方便,重复率高 Easy to operate, high repetition rate	实验药物毒性强 Experimental drugs are highly toxic
III 型过敏反应原理法 Type III anaphylaxis principle method	2013 年 2013 year	昆明小鼠 KM mice	牛清白蛋白+脂多糖+四氯化碳 BSA+LOS+CCL ₄	造模时间短 Short molding times	操作复杂,死亡率高 Operation is complex, the mortality rate is high
	2010 年 2010 year	大耳白兔 Big-eared white rabbit	卵白蛋白 + 弗氏完全佐剂 ^[33] OVA+Freud's complete adjuvant	时间短,操作性强,重复率高 Short molding times, Strong operability and high repetition rate	皮损非自发性 Skin changes are not spontaneous
“病证结合”模型法 “Combination of disease evidence” model method	2013 年 2013 year	大耳白兔/SD 大鼠 Big-eared white rabbit/SD rats	卵白蛋白+弗氏完全佐剂+干姜、芫荽、胡椒水煎剂 OVA + Freud's complete adjuvant + dried ginger, custard, pepper decoction	时间短,操作性强,重复率高;适用于中医、中西医结合研究 Short molding times, Strong operability and high repetition rate, Suitable for TCM research	皮损非自发性 Skin changes are not spontaneous
	2014 年 2014 year	SD 大鼠 SD rats	BSA + LOS + CCL ₄ + 湿热环境+干姜水 BSA+LOS+CCL ₄ +humid heat environment + dry ginger water	时间短,适用于中医、中西医结合研究 Short molding times, Suitable for TCM research	操作复杂,死亡率高 Operation is complex, the mortality rate is high

参考文献:

- [1] Leung AKC, Barankin B, Leong KF. Henoch-Schönlein purpura in children; an updated review [J]. *Curr Pediatr Rev*, 2020, 16 (4): 265-276.
- [2] Chen JY, Mao JH. Henoch-schönlein purpura nephritis in children; incidence, pathogenesis and management [J]. *World J Pediatr*, 2015, 11(1): 29-34.
- [3] Wang K, Sun X, Cao Y, et al. Risk factors for renal involvement and severe kidney disease in 2731 Chinese children with Henoch-Schönlein purpura; a retrospective study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(38): e12520.
- [4] Kurnia B. Henoch-Schönlein Purpura in children; the role of corticosteroids [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7 (11): 1812-1814.
- [5] Kawasaki Y, Suyama K, Hashimoto K, et al. Methylprednisolone pulse plus mizoribine in children with Henoch-Schoenlein purpura nephritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2011, 30(4): 529-535.
- [6] Reamy BV, Servey JT, Williams PM. Henoch-Schönlein purpura (IgA vasculitis); rapid evidence review [J]. *Am Fam Physician*, 2020, 102(4): 229-233.
- [7] 韩冰虹, 赵瑛, 金基成, 等. 关于麦胶蛋白 IgA 肾病模型在过敏性紫癜研究中应用的探讨 [J]. *中国中医药科技*, 2001, 8(6): 379-381.
- [8] 沈银红, 沈红, 冶雪凤. 霉酚酸酯对过敏性紫癜小鼠模型皮肤血管炎性水平及免疫功能的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(22): 2361-2364.
- [9] 杨云, 马喜兴, 王大虎, 等. 孟鲁司特对过敏性紫癜小鼠炎症因子的影响及其作用机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(8): 1222-1225.
- [10] 苗丰, 丰晨然, 董琳琳, 等. 青紫颗粒对麦胶蛋白致小鼠肾损伤的保护作用 [J]. *中国药师*, 2021, 24(11): 1967-1974.
- [11] Li B, Ren Q, Ling J, et al. The change of Th17/Treg cells and IL-10/IL-17 in Chinese children with Henoch-Schönlein purpura; a PRISMA-compliant meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(3): e13991.
- [12] 王强, 史洋溢, 曹玫, 等. Th17 细胞/Treg 细胞失衡在儿童过敏性紫癜发病机制中的作用 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(5): 1391-1396.
- [13] 贵琳, 朱松柏, 郑荣浩, 等. TLR4 单克隆抗体对过敏性紫癜小鼠损伤的保护作用及其机制 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2020, 49(1): 39-44.
- [14] 黄华, 马丽杰, 李寅如. 固本培元化痰颗粒对紫癜性肾炎的实验研究 [J]. *内蒙古中医药*, 2013, 32(35): 47-49.
- [15] 张奕星, 袁斌, 周立华, 等. 过敏性紫癜性肾炎动物模型的探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2): 548-550.
- [16] 张奕星, 袁斌, 徐建亚, 等. 丹芍颗粒 III 对紫癜性肾炎大鼠血尿、蛋白尿和肾组织 nephrin 及 podocin 的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(4): 373-377.
- [17] 杨剑敏, 姜林林, 高原, 等. 外周血免疫细胞、免疫球蛋白、补体及 Gd-IgA1 在儿童过敏性紫癜中的表达及意义 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(23): 3391-3394, 3398.
- [18] 宋丹阳, 江雅静, 刘昱, 等. 过敏性紫癜患儿血清免疫指标及白细胞介素-6 水平与疾病复发的相关性分析 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2020, 34(10): 1026-1029.
- [19] 潘仕红, 钟建桥. 简化版过敏性紫癜大鼠模型的构建与鉴定 [J]. *四川医学*, 2021, 42(7): 669-672.
- [20] 李彦红, 朱华, 隋小龙, 等. 初步探讨过敏性紫癜兔模型的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5): 36-41, 103-104.
- [21] 李彦红, 朱华, 徐艳峰, 等. 过敏性紫癜兔模型的免疫学改变及机制初探 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 65-69, 11-12.
- [22] Li Y, Feng X, Huang L, et al. Hematologic and immunological characteristics of Henoch-Schönlein purpura in rat and rabbit models induced with ovalbumin based on type III hypersensitivity [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8862.
- [23] 李彦红, 黄澜, 朱华, 等. 血液免疫学指标在过敏性紫癜大鼠和兔模型及患儿体内的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(1): 62-67, 13.
- [24] Li Y, Sui X, Zhu H, et al. Histopathological and immunological changes during the acute and recovery phase in Henoch-Schönlein purpura rabbit model [J]. *Arch Dermatol Res*, 2017, 309(1): 21-30.
- [25] 侯兆玉, 张晓翠, 张红利, 等. 卵白蛋白诱导家兔过敏性紫癜动物模型的建立和评价 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(4): 589-593.
- [26] Wang F, Chen R, Li X, et al. Can such an animal model truly represent Henoch-Schönlein purpura? [J]. *Arch Dermatol Res*, 2018, 310(6): 533.
- [27] Heineke MH, Ballering AV, Jamin A, et al. New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura) [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(12): 1246-1253.
- [28] Li Y, Sui X, Zhu H, et al. Reply to the letter: "Can such an animal model truly represent Henoch-Schönlein purpura?" [J]. *Arch Dermatol Res*, 2018, 310(6): 535-536.
- [29] eineke MH, Ballering AV, Jamin A, et al. New insights in the pathogenesis of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura) [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(12): 1246-1253.
- [30] Hisano S, Matsushita M, Fujita T, et al. Activation of the lectin complement pathway in Henoch-Schönlein purpuranephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45(2): 295-302.
- [31] 韩冰虹. 过敏性紫癜实验动物模型和临床症状分级量化标准的探讨 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2004.
- [31] 孙铁秋, 汪受传, 金钟大, 等. 丹芍颗粒对大鼠实验性紫癜性肾炎肾组织 NO、NOS 含量的影响 [J]. *中国中医急症*, 2003, 12(2): 149-150.
- [32] 张雅绚. 过敏性紫癜动物模型制作与加味紫草汤对 arthus 反应作用的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [33] Sanders JT, Wyatt RJ. IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2008, 20(2): 163-170.
- [34] 徐闪闪, 王龙, 张霞, 等. 过敏性紫癜动物模型研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(3): 1539-1542.

[收稿日期] 2022-02-24

王雨欣,王倩,田颖.不同化学物质建立肝损伤动物模型的作用机制[J].中国比较医学杂志,2022,32(10):109-114.

Wang YX, Wang Q, Tian Y. Mechanisms of chemicals in establishing animal models of liver injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 109-114.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.014

不同化学物质建立肝损伤动物模型的作用机制

王雨欣¹,王倩¹,田颖^{2*}

(1.扬州大学旅游烹饪学院,江苏扬州 225127;2.扬州大学公共卫生学院,江苏扬州 225009)

【摘要】 肝作为人体代谢的主要器官,有着解毒、分泌胆汁等重要功能。一旦肝受损,有可能导致肝硬化、肝衰竭等不良后果。肝损伤作为肝疾病研究的基础,一直以来广受科学研究的关注。目前已有多种化学物质可建立不同发病机制的肝损伤模型。本文简要介绍了氧化应激、干扰RNA合成、影响酶的活性、诱导胆汁淤积和促进肿瘤细胞生成这五种化学途径致动物肝损伤的作用机制,从而为肝损伤研究提供更多思路。

【关键词】 化学性肝损伤;动物模型;作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0109-06

Mechanisms of chemicals in establishing animal models of liver injury

WANG Yuxin¹, WANG Qian¹, TIAN Ying^{2*}

(1. School of Tourism and Culinary Science, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China.
2. School of Public Health, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

【Abstract】 As the main organ of human metabolism, the liver has important functions such as detoxification and bile secretion. Liver damage may lead to adverse consequences such as cirrhosis and liver failure. As the basis of liver disease research, liver injury has been widely subject to scientific research. Various chemicals are available to model liver injury with different pathogenesises. This review briefly introduces five mechanisms of animal liver injury caused by several chemical pathways, such as oxidative stress, interference of RNA synthesis, regulating enzyme activity, cholestasis induction, and promotion of tumor cell formation to provide ideas to study liver injury.

【Keywords】 chemical-induced liver injury; animal model; mechanism

肝作为人体最大的解毒器官,主要负责清除体内产生的代谢废物和进入体内的有害物质,对机体起着重要的保护作用。当肝受到损伤时,它的功能也会受到严重影响,导致过多的脂肪和有毒代谢物等的堆积,造成肝纤维化、肝衰竭等症状,甚至更严重的肝癌。化学性肝损伤是指由有毒化学物质以及过量的酒精等引起的肝损伤^[1],同时,剂量和时间的差异也会对肝损伤的程度产

生不同的影响。目前用于治疗化学性肝损伤的药物十分有限,过度使用护肝片等还可能会加重肝损伤^[2],因此,研究具有不同作用机制的化学性肝损伤动物模型,有助于开发更多保肝护肝的保健食品和治疗肝病的有效药物。本文从化学物质的作用机制出发,综述了不同作用机制的化学物质引起动物肝损伤的途径和优缺点,为后续研究提供了更多的可能性靶点。

【基金项目】 国家自然科学基金(81472963);江苏省人兽共患病学重点实验室“护馨基金”(HX2102)。

【作者简介】 王雨欣(1999—),女,本科,研究方向:营养与健康。E-mail:wangyuxinwyx@yeah.net

【通信作者】 田颖(1978—),女,博士,副教授,研究生导师,研究方向:营养与健康。E-mail:tianyingjob@126.com

1 氧化应激

1.1 四氯化碳

四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)作为工业上广泛使用的一种有机化学毒物,易被肝吸收,现已成为建立化学性肝损伤模型最为常用的化学物质^[3],其作用机制主要是通过氧化应激反应及其导致的炎症反应造成肝细胞损伤。 CCl_4 进入机体后,可经细胞色素酶 P450(cytochrome P450, CYP450)代谢成为三氯甲基自由基($\cdot\text{CCl}_3$)、三氯甲基过氧自由基($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$)等活性氧自由基。活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量累积,进而与肝细胞膜上的大分子共价结合,诱导肝细胞膜脂质过氧化,引起膜结构与功能受损,导致肝细胞发生氧化应激反应;其次, $\cdot\text{CCl}_3$ 会直接攻击肝细胞线粒体,抑制膜上钙泵的活性,导致膜内外钙离子浓度失衡,从而影响肝细胞的代谢功能,导致肝细胞坏死。在氧化应激状态下,超氧化物歧化酶(superoxide dismutases, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)作为肝细胞内重要的抗氧化酶,会被大量消耗,含量显著下降。相反,脂质过氧化反应的终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量会显著上升。 CCl_4 代谢产物可激活肝枯否细胞,释放大量促炎因子^[4],刺激免疫细胞释放高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1, HMGB1)^[5],其主要受体之一 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)被激活,使 IL-1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK)与髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)解离并进入胞浆内,进而激活肿瘤坏死因子受体相关因子-6(tumor necrosis factor receptor associated factor-6, TRAF-6)^[6],诱导 I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK)复合物磷酸化,使核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的关键蛋白分子 NF- κ B p65 被转运到肝细胞核内并与特定 DNA 序列结合,导致肝细胞产生炎症反应。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)作为 NOD 样受体家族中最为重要的一员,可被 TLR4 信号激活形成 NLRP3 炎症小体,进而促进白细胞介素-18(interleukin 18, IL-18)等炎症因子的成熟与释放^[7]。进入肝细胞的 TLR4 信号诱导产生大量 NLRP3 炎症小体,进一步促进炎症因子释放,导致炎症级联放大反应^[8],造成炎症反应的

恶性循环,加剧肝细胞损伤与凋亡。此外, CCl_4 还可上调转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的表达^[9],从而激活肝纤维化的关键细胞——肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs),进而刺激成纤维细胞生成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度表达,诱导肝纤维化,导致肝损伤加重。

CCl_4 诱导的化学性肝损伤模型操作简单,成本低,能在较短时间内建立理想的化学性肝损伤模型。此外,其症状与人肝损伤较为相似,稳定性强。因此, CCl_4 是建立化学性肝损伤动物模型的首选化学物质。但 CCl_4 毒性较大,除肝外还会损伤其他脏器,特异性较低,因此 CCl_4 诱导的化学性肝损伤模型不适用于免疫机制等方面的研究^[10]。

1.2 硫代乙酰胺

硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)是工业上的杀菌剂,具有很强的肝毒性,其诱导肝损伤的机制与 CCl_4 相似,均可促使肝细胞发生氧化应激和脂质过氧化反应。TAA 经细胞色素 P450 家族成员 2E1(CYP2E1)活化,转化为 $\text{TASO}_2(\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2)$,可与磷脂酰乙醇胺脂等大分子共价结合,促进脂质过氧化,提高 MDA 水平并降低 SOD 和 GSH-Px 活性,白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子大量释放,进而激活 NLRP3 炎症小体,同时,TLR4/NF- κ B 通路和 TGF- β 1 通路被激活,加剧炎症反应与肝纤维化进程。磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路与多种肿瘤密切相关,其活性异常可引起肿瘤细胞的增殖与迁移^[11]。TLR4 信号可激活 PI3K/Akt 通路,促进肿瘤细胞增殖,进而可能会演变成肝癌。另外,c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路可参与细胞凋亡、分化等过程^[12],其上游因子细胞凋亡信号调节激酶 1(apoptosis signal-regulated kinase 1, ASK1)对氧化应激高度敏感,过度活化后可激活 JNK 通路。过量的 TAA 可促进 ASK1 磷酸化,激活 JNK 信号通路,从而诱导抗凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)和促凋亡基因 Bcl-2 相关 X 蛋白基因(bcl-2-associated X protein, Bax)表达失衡^[13],导致 Bax 蛋白表达增加并向线粒体膜外移动,增加线粒体通透性,释放细胞色素 c,诱导线粒体功能障

碍与凋亡诱导分子释放,破坏细胞修复过程。

TAA 造模可重复性高且不易逆转,诱导的肝纤维化模型与人肝纤维化相似,适合用于筛选抗纤维化药物等。然而,目前没有对 TAA 造模的剂量研究,因此造模之前需要查阅大量文献并进行预实验来确定最佳剂量。

氧化应激是化学物质致肝损伤最为常见的作用机制,除 CCl_4 、TAA 外,甲苯二异氰酸酯 (toluene diisocyanate, TDI)^[14]、玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEA)^[15] 等化学物质也可通过诱导氧化应激和脂质过氧化诱导肝细胞损伤。

2 干扰 RNA 合成

D-半乳糖胺 (D-galactosamine, D-GalN) 进入机体后可在半乳糖激酶和半乳糖-1-磷酸尿酰转移酶的作用下与三磷酸尿苷 (uridine triphosphate, UTP) 结合形成稳定的尿苷衍生物 UDP-D-GalN,即通过消耗肝中的 UTP 来抑制依赖 UTP 的 RNA 等大分子合成,导致肝细胞炎症和坏死^[16],是一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂。同时, D-GalN 可促进 ROS 释放,刺激肝细胞发生氧化应激反应,诱导肝细胞膜脂质过氧化并干扰线粒体正常功能,进而促进炎症因子表达,引起肝细胞损伤^[17]。此外, D-GalN 还可诱导肥大细胞细胞质中钙离子水平的增加,从而破坏肝细胞膜结构,促使肝细胞凋亡。使用 D-GalN 造模时一般将其与脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 或肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 联合使用,增强其肝毒性。LPS 作为一种内毒素,可诱导单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的表达,从而特异性激活单核细胞、巨噬细胞等^[18],进而参与体内免疫应答与炎症反应^[19]。此外 LPS 还可以与血浆中的脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 结合形成复合体,再与肝细胞表面的分化抗原簇基因 14 (cluster of differentiation 14, CD14)、骨髓分化因子 2 (myeloid differentiation factor 2, MD2) 受体结合,从而激活 TLR4。D-GalN/LPS 可识别并激活 TLR4/NF- κ B 通路,炎症因子表达量迅速升高并进一步激活体内的免疫应答,造成炎症因子级联放大,加重肝损伤,甚至导致重症肝炎等不可逆肝疾病。TNF- α 是一种炎症因子,肝受损后会大量释放,刺激机体发生炎症反应,并可直接破坏内皮细胞,导致肝细胞坏死^[20]。D-GalN 联合 TNF- α 主要通过内源性和外源性凋亡信号途径诱导化学性肝损伤^[21]。内源

性凋亡信号途径是通过激活 JNK 信号通路,增加 Bax 蛋白表达,引起线粒体膜通道孔通透性增加与细胞色素 c 的释放,诱导产生凋亡级联反应。外源性凋亡信号途径是将 TNF- α 与细胞表面 TNF- α 受体 1 (TNFR1) 结合,激活 Caspase-3,上调 Bax 基因,进而激活内源性凋亡途径^[22]。

D-GalN 是构建肝损伤和肝衰竭模型相对合适的化学物质,其特异性强,不会损害其他器官,但价格较高,且不同品系动物之间剂量差别较大,短期死亡率高,故应用范围小于 CCl_4 和 TAA。

此外, α -鹅膏蕈毒肽也可通过阻断 RNA 聚合酶从而抑制 RNA 合成^[23]。

3 影响酶的活性

人体代谢酒精途径主要有两种:酒精脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 途径和 CYP2E1 途径^[24]。大多数酒精在 ADH 的作用下利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) 转化为乙醛并产生 NADH,进而转化为无毒无害的代谢产物从体内排出^[25];少量经 CYP2E1 代谢,从呼吸和尿液中排出,同时会累积少量 ROS。与 ADH 作用相同的酶还有过氧化氢酶 (catalase, CAT), CAT 也可以参与到酒精代谢过程中。长期或过量摄入酒精会降低 NAD 与 NADH 的比例 (NAD^+/NADH),导致肝中过度脂肪堆积,形成脂肪肝;同时, ADH 与 CAT 活性降低,导致 CYP2E1 代谢增加及 ROS 过量累积,促进肝细胞发生氧化应激反应,激活 TLR4/NF- κ B 通路,加快肝损伤进程。ROS 还会诱导线粒体细胞色素 c 的释放,通过合成凋亡小体,进而激活 Caspase-3,引起线粒体 DNA 降解和肝细胞凋亡。长期暴露于酒精还会改变肠道微生物群和通透性,肠道中的 LPS 进入肝,激活肝枯否细胞且与 TLR4 作用,加重炎症反应。在酒精的刺激下,巨噬细胞被激活,从而释放大量促炎因子和趋化因子来损害肝,增加硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 的表达,进而促进 Caspase-1 介导的细胞凋亡通路,诱导肝炎症反应^[26]。此外,酒精在代谢过程中会形成多种蛋白质加合物并影响内质网中的蛋白质折叠,在正常状态下,肝细胞通过激活未折叠蛋白来维持内质网稳态,而过多酒精的会降低肝酶的活性,从而导致错误折叠蛋白和未折叠蛋白的大量堆积,引起内质网应激反应 (endoplasmic reticulum stress, ERS)^[27]。当肝细胞处于内质网应激状态时,蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) 被

过量的未折叠蛋白激活,从而使真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) 磷酸化,诱导活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 的转录,从而上调 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (CHOP) 的表达^[28-29],进而诱发肝细胞凋亡级联反应,导致肝细胞凋亡^[30-31]。

酒精性肝损伤模型具有较高的造模率,对临床研究具有重要意义,可用于开发更多预防酒精性肝损伤的保健食品和药物。但酒精造模存在品系和性别差异,部分动物模型成本高,且缺乏统一的造模标准。

异烟肼的作用机制与酒精类似,通过抑制线粒体中酶的活性^[32],干扰正常的能量代谢,导致肝细胞凋亡,从而造成肝细胞损伤。

4 诱导胆汁淤积

胆汁淤积通常伴随着胆汁酸在肝中过度积累,最终导致肝受损,如果不及时治疗,会导致肝纤维化、肝硬化等严重后果。用于诱导胆汁淤积性肝损伤模型的主要化学物质是 α -萘异硫氰酸酯 (α -naphthyl isothiocyanate, ANIT),其诱导的模型与人胆汁淤积症临床病理相似度较高。ANIT 进入机体后可与谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合,由于结合不稳定,ANIT 结合物在胆管中分解,直接损伤胆管上皮细胞,引起胆管周围炎症,导致胆汁堵塞和淤积,最终导致肝细胞损伤。正常状态下,胆汁酸可激活法尼醇受体 (farnesoid X receptor, FXR),促进其与小异二聚体伴侣 (small heterodimer partner, SHP) 的结合,通过多种途径抑制胆汁酸的合成、转运、重吸收等^[33-34],从而阻止肝细胞进一步损伤。ANIT 可下调 FXR 表达,导致 FXR 与 SHP 结合减少,降低其负反馈抑制细胞色素 P450 家族成员 7A1 (CYP7A1) 基因转录的能力^[35],导致 CYP7A1 表达增加,进而加速胆固醇转化为胆汁酸,增加胆汁酸合成。钠离子牛磺酸共转运多肽 (Na^+ dependent taurocholate cotransporter, NTCP) 与阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptides, OATPs) 是胆汁酸转运的主要转运蛋白,大约 90% 的胆汁酸都由 NTCP 转运^[36]。FXR 与 SHP 结合减少导致 NTCP 与 OATPs 表达减少,导致肝胆汁酸重吸收减少。人成纤维细胞生长因子 15/19 (fibroblast growth factor 15/19, FGF 15/19) 可通过抑制胆汁酸合成从而参与体内脂质、葡萄糖等调节过程^[37]。FXR 的下调可导致 FGF 15/19 的表达和分泌减少以及 CYP7A1 表

达的增加,进一步促进胆汁酸的合成^[38]。FXR 下调还可降低胆汁酸盐输出泵 (bile salt export pump, Bsep) 和多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, Mrp2) 的表达,减缓胆汁酸的排泄与转运,导致胆汁酸在肝中淤积。细胞色素 P450 家族中 3A4 (CYP3A4)^[39]、胆汁酸辅酶 A 合成酶 (BACS) 等代谢酶可增加胆汁酸的亲水性并促进胆汁酸的排泄。FXR 下调会导致 CYP3A4、BACS 等代谢酶表达下降,对胆汁酸的解毒作用减弱,大量有毒胆汁酸淤积在肝中,最终导致严重的肝损伤。ANIT 还可以降低肝的抗氧化防御能力,促使中性粒细胞产生大量 ROS,导致肝氧化应激和炎症。

ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤模型操作简便可靠,能很好地模拟了人胆汁淤积症,然而,ANIT 的灌胃给药对研究人员的操作水平有一定要求,且可能会对胃肠道造成损害,影响需口服或灌胃药物的疗效^[40]。

此外,由 3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶 (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, DDC)^[41] 诱导的胆汁淤积性肝损伤模型也常用于人胆汁淤积症的研究。

5 促进肿瘤细胞生成

二乙基亚硝胺 (N-nitrosodiethylamine, DEN) 是一种广泛存在于自然界的致癌物质,具有高度活性,对人和动物都有致癌性,且对肝具有特异性,经口摄入可能造成严重的肝损伤^[42],低剂量 DEN 可改变肝结构并诱导肝纤维化,同时可促进肝癌的典型特征,如肝细胞增生、癌细胞增殖等,因此 DEN 常用于建立动物肝纤维化和肝癌模型。DEN 在体内主要被 CYP2E1 羟基化,然后分解成具有高亲电活性的碳正离子等,导致 DNA 烷化损伤和肝细胞损伤,进而可能诱发癌症^[43]。由 CYP3E1 代谢过程中释放的大量 ROS 则会导致氧化应激损伤。DEN 代谢同时产生的重氮化合物在肝细胞 DNA 合成过程中与碱基结合,引起碱基错配或转录异常,导致 DNA 突变和肿瘤细胞生成。谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1) 是谷胱甘肽巯基转移酶家族的成员,可通过代谢多种致癌化合物来避免细胞 DNA 损伤^[44-45]。抑癌基因启动子区 CpG 岛的高甲基化会导致染色质空间结构的改变,从而阻止基因转录,并使抑癌基因沉默^[46]。DEN 可诱导 Gsp1 启动子高甲基化,降低 Gsp1 表达,使其代谢 DEN 化合物能力下降,同时抑癌基因沉默,导致肝细胞 DNA 严重受损以及肿瘤细胞大量生成。

信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是 IL-6/STAT3 通路中的一个重要信号因子, 可经 IL-6 激活后进入细胞核内与 DNA 应答元件结合, 调节细胞内 DNA 的转录和活性, 上调 Bcl-2 等基因表达, 从而促进肿瘤细胞增殖以及抑制肿瘤细胞凋亡^[47]。核受体共刺激因子 5 (nuclear receptor coactivator 5, NCOA5) 是一种核受体辅助调节因子, 能抑制肝炎症的相关因子释放, 进而抑制其下游的 STAT3 通路^[48]。DEN 可抑制 NCOA5 表达, 随后上调 STAT3 表达, 激活 IL-6/STAT3 信号通路, 导致炎症因子大量释放, 同时 Bcl-2 等基因表达增加, 导致大量肿瘤细胞增殖且凋亡受到抑制, 促使肝癌发生。

DEN 常用于诱导原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 模型, 便于更好地了解人 HCC, 剂量、暴露时间等均会影响 DEN 诱导肝损伤的特征。DEN 肝癌造模时间较长, 死亡率高, 毒性大, 实验操作时需要注意人员安全问题。

类似机制的化学物质还有黄曲霉素 B1 (aflatoxin B1, AFB1)^[49], 也可以通过改变 DNA 结构从而促进肿瘤细胞的增殖与迁移, 进而引发肝癌。

6 总结与展望

本文主要介绍了 CCl₄、TAA、D-GalN、酒精、ANIT 和 DEN 致动物肝损伤的作用机制, 主要有以下 5 种: (1) 氧化应激; (2) 干扰 RNA 合成; (3) 影响酶的活性; (4) 诱导胆汁淤积; (5) 促进肿瘤细胞生成。肝损伤是许多肝疾病研究的起点, 了解不同化学物质致肝损伤的作用机制, 可以探索更多有效治疗化学性肝损伤的活性物质。以上 5 种作用机制都可以作为化学性肝损伤研究的重点, 可以为研究保肝护肝的保健食品和治疗药物提供更多选择。

参考文献:

- [1] Wu Y, He Y, Wang R, et al. Preventive effect of flavonoid extract from the peel of Gonggan (*Citrus reticulata* blanco var. Gonggan) on CCl₄-induced acute liver injury in mice [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 5111-5121.
- [2] 于红红, 高晓燕. 护肝片对药物性肝损伤的防治作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(18): 2271-2274.
- [3] Tan HY, San-Marina S, Wang N, et al. Preclinical models for investigation of herbal medicines in liver diseases: update and perspective [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 4750163.
- [4] Li S, Wang CX, Liu NZ, et al. Anti-inflammatory effects of propofol on lipopolysaccharides-treated rat hepatic Kupffer cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 845-850.
- [5] Zhang H, Yang N, Wang T, et al. Vitamin D reduces inflammatory response in asthmatic mice through HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2915-2920.
- [6] Min Y, Kim MJ, Lee S, et al. Inhibition of TRAF₆ ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NF-κB activation and autophagy activation [J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1347-1358.
- [7] Alonso-Pérez A, Franco-Trepate E, Guillán-Fresco M, et al. Role of toll-like receptor 4 on osteoblast metabolism and function [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 504.
- [8] Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(3): 203-234.
- [9] Wang H, Che J, Cui K, et al. Schisantherin A ameliorates liver fibrosis through TGF-β1 mediated activation of TAK1/MAPK and NF-κB pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2021, 88: 153609.
- [10] 吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 小鼠实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 107-113.
- [11] Wang Y, Chu F, Lin J, et al. Erianin, the main active ingredient of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, inhibits precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) through suppression of the HRAS-PI3K-AKT signaling pathway as revealed by network pharmacology and *in vitro* experimental verification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114399.
- [12] Zhao Y, Jiang S, Zhang J, et al. A virulent *Bacillus cereus* strain from deep-sea cold seep induces pyroptosis in a manner that involves NLRP3 inflammasome, JNK pathway, and lysosomal rupture [J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 1362-1376.
- [13] 钟瑾, 蒋立文, 覃思, 等. 槲皮素对化学性肝损伤保护机制的研究及应用进展 [J]. *中国食物与营养*, 2019, 25(9): 65-70.
- [14] 刘保峰, 李旭东, 何宁, 等. 甲苯二异氰酸酯诱导大鼠肝损伤及对 HO-1 表达的影响 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2022, 33(1): 22-26.
- [15] 王萌, 周鸿缘, 桑锐, 等. 玉米赤霉烯酮致肝脏损伤机制研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42(12): 111-115.
- [16] Farghali H, Kgalalelo Kemelo M, Wojnarová L, et al. *In vitro* and *in vivo* experimental hepatotoxic models in liver research: applications to the assessment of potential hepatoprotective drugs [J]. *Physiol Res*, 2016, 65(4): S417-S425.
- [17] Ansari MA, Raish M, Bin Jordan YA, et al. Sinapic acid ameliorates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatitis in rats: role of nuclear factor erythroid-related factor 2/heme oxygenase-1 pathways [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(7): 592-608.
- [18] 陈恬璐, 马晓春, 李旭. 肝素抑制脂多糖诱导单核细胞与内皮细胞的黏附作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(10): 1281-1284.
- [19] Duan H, Zhang Q, Liu J, et al. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines

- to treat atherosclerosis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 168: 105599.
- [20] 袁廷东, 陈茂剑, 黄文剑, 等. 橙皮苷对急性肝损伤模型小鼠肿瘤坏死因子- α 和干扰素- γ 表达的影响 [J]. *医药导报*, 2015, 34(6): 714-717.
- [21] Czaja AJ. Targeting apoptosis in autoimmune hepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(12): 2890-2904.
- [22] 贾岩, 金欢欢, 李蒙蒙, 等. 肝细胞程序性坏死在肝损伤中的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(12): 1651-1655.
- [23] 陈宵. 鹅膏毒肽所致肝损伤的代谢组学研究以及毒理学作用机制验证 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2020.
- [24] Chen T, Li R, Chen P. Gut microbiota and chemical-induced acute liver injury [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 688780.
- [25] 侯鹏, 杨烁, 秦利静, 等. 活性多糖抗酒精性肝损伤机制的研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(1): 56-58.
- [26] 孙福荣, 王炳元. 细胞焦亡在酒精性肝病中的研究进展 [J]. *肝脏*, 2018, 23(10): 856-857.
- [27] Han D, Ybanez MD, Johnson HS, et al. Dynamic adaptation of liver mitochondria to chronic alcohol feeding in mice: biogenesis, remodeling, and functional alterations [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50): 42165-42179.
- [28] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 184-190.
- [29] Pihán P, Carreras-Sureda A, Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(9): 1478-1487.
- [30] Kim YS, Kim SG. Endoplasmic reticulum stress and autophagy dysregulation in alcoholic and non-alcoholic liver diseases [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26(4): 715-727.
- [31] 欧阳香, 程虹毓, 胡伟琼, 等. 黄酮类化合物抗酒精性肝损伤作用及机制研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(9): 1200-1205.
- [32] 郭瑶雪, 邓晔, 李春, 等. 异烟肼致线粒体损伤引起药物性肝损伤研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(3): 356-360.
- [33] Zhu QN, Xie HM, Zhang D, et al. Hepatic bile acids and bile acid-related gene expression in pregnant and lactating rats [J]. *Peer J*, 2013, 1: e143.
- [34] Kim KH, Choi S, Zhou Y, et al. Hepatic FXR/SHP axis modulates systemic glucose and fatty acid homeostasis in aged mice [J]. *Hepatology*, 2017, 66(2): 498-509.
- [35] Lee EA, Lee DI, Kim HY, et al. Cyp7a1 is continuously increased with disrupted Fxr-mediated feedback inhibition in hypercholesterolemic TALLYHO/Jng mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(1): 20-25.
- [36] Slijepcevic D, Roscam Abbing RLP, Katafuchi T, et al. Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice [J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1631-1643.
- [37] Cariello M, Pigionica M, Gadaleta RM, et al. The enterokine fibroblast growth factor 15/19 in bile acid metabolism [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 256: 73-93.
- [38] Gadaleta RM, Scialpi N, Peres C, et al. Suppression of hepatic bile acid synthesis by a non-tumorigenic FGF19 analogue protects mice from fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17210.
- [39] Chen J, Zhao KN, Chen C. The role of CYP3A4 in the biotransformation of bile acids and therapeutic implication for cholestasis [J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(1): 7.
- [40] 陶艳艳, 陈高峰, 刘成海. 常用急性肝损伤动物模型评价及其在中药药理研究中的应用 [J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(11): 12-19, 11.
- [41] 郑士宏. 芹菜素对 DDC 诱导的胆汁淤积性肝病的保护作用 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2021.
- [42] Tolba R, Kraus T, Liedtke C, et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1): 59-69.
- [43] 杨顺莉, 赵丽娇, 范腾蛟, 等. 铁卟啉催化二乙基亚硝胺羟基化的反应机理 [J]. *分子科学学报*, 2017, 33(1): 15-23.
- [44] Ali A, Kumar S, Kakaria VK, et al. Detection of promoter DNA methylation of APC, DAPK, and *GSTP1* genes in tissue biopsy and matched serum of advanced-stage lung cancer patients [J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(6): 423-430.
- [45] Markou A, Paraskevopoulos P, Lazaridou M, et al. Abstract 1716: *GSTP1* promoter methylation in *in vivo* isolated CTCs from high-risk prostate cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 1716.
- [46] 金春, 李蒙蒙, 李余佳, 等. 肝细胞癌的 RNA 甲基化修饰 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(7): 1339-1344.
- [47] Lokau J, Schoeder V, Haybaeck J, et al. Jak-stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): E1704.
- [48] 冯颖, 杨雪, 孙乐, 等. 扶正解毒消积方对二乙基亚硝胺诱导肝癌大鼠核受体共刺激因子 5-信号传导与转录激活因子 3 信号通路的调控机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7): 3711-3714.
- [49] 庞惠萍, 丁泽, 苏娜, 等. 黄曲霉毒素 B1 致肝脏损伤的机制 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40(12): 110-113.

[收稿日期] 2022-01-22

张钰,孟婷婷,田鹏,等. 肿瘤心脏病学动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 115-122.
Zhang Y, Meng TT, Tian P, et al. Research progress on animal models of cardio-oncology [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 115-122.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.015

肿瘤心脏病学动物模型的研究进展

张钰^{1,2}, 孟婷婷^{2,3}, 田鹏^{1,2}, 郑燕^{1,2,3*}, 苏国海^{1,2,3*}

(1.山东大学, 济南 250013; 2.济南市中心医院, 济南 250013;
3.专科转化研究中心, 山东第一医科大学附属中心医院, 济南 250013)

【摘要】 肿瘤心脏病学是涉及肿瘤学和心血管病学的新交叉学科,随着肿瘤治疗策略的突飞猛进发展,患者生存期得以延长的同时,治疗的副作用特别是心血管毒性受到越来越多的关注。肿瘤心脏病学动物模型的应用有助于了解心血管毒性的发病机制,寻找有效的心血管保护措施,防止发生不可逆的损伤。目前非荷瘤啮齿类动物的肿瘤心脏病学模型应用较为广泛,但不同研究中采用的建模方式差别较大。本文收集整理了近年来化疗、分子靶向治疗和放疗等抗肿瘤方案所建立的肿瘤心脏病学动物模型,总结了不同动物模型的优缺点和建模方法,并从模型的选择、用药剂量和检测指标等方面进行综述,对建立合适的动物模型提出了建议,助力临床肿瘤心脏病学的发展。

【关键词】 肿瘤心脏病学;心血管毒性;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0115-08

Research progress on animal models of cardio-oncology

ZHANG Yu^{1,2}, MENG Tingting^{2,3}, TIAN Peng^{1,2}, ZHENG Yan^{1,2,3*}, SU Guohai^{1,2,3*}

(1. Shandong University, Jinan 250013, China. 2. Jinan Central Hospital, Jinan 250013. 3. Research Center of Translational Medicine, Central Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250013)

【Abstract】 Cardio-oncology is a new interdisciplinary subject involving oncology and cardiovascular disease. With the rapid development of tumor treatment strategies, the survival of patients has been prolonged, and the side effects of treatments, especially cardiovascular toxicity, have received increasing attention. The establishment of an animal model of cardio-oncology is helpful to understand the pathogenesis of cardiovascular toxicity and take cardioprotective measures to prevent irreversible damage. Currently, non-tumor-bearing rodents are used in experiments. They are widely used, but there are few studies on animal modeling method. In this review, animal models of cardio-oncology established by anti-tumor treatments, such as chemotherapy, molecular targeted therapy, and radiotherapy, in recent years were collected and sorted, and the advantages and disadvantages of various animal models and modeling method were summarized. This article reviews the aspects of the developing clinical cardio-oncology and provides insights for the development of clinical cardio-oncology.

【Keywords】 cardio-oncology; cardiovascular toxicity; animal models

【基金项目】 国家科技重大专项(2020ZX09201025);山东省自然科学基金面上项目(ZR2017MH050)。

【作者简介】 张钰(1997—),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤心脏病学。E-mail: zzyy9782@163.com

【通信作者】 郑燕(1976—),女,博士,主任技师,研究方向:肿瘤心脏病学。E-mail: 8793822@qq.com

苏国海(1965—),男,博士,主任医师,研究方向:心血管病。E-mail: gttstg@163.com *共同通信作者

随着抗肿瘤药物的不断更新,抗肿瘤疗效显著提高,肿瘤患者的病情得到好转,但随之而来的肿瘤本身对心功能的影响及抗肿瘤药物相关心血管毒性却成为肿瘤病人死亡的另一重要原因。在此背景下,作为研究肿瘤学和心血管病学的新型交叉学科,肿瘤心脏病学(cardio-oncology)应运而生^[1]。

抗肿瘤治疗过程中引起的心血管毒性是肿瘤心脏病学的主要研究内容之一。已有报道,传统的化疗药、靶向药、免疫检查点抑制剂和放疗等都可能引起潜在危及生命的心血管并发症,包括心力衰竭、高血压、心律失常、心肌炎和心肌缺血等^[1]。对其发病机制及保护性药物的研究引起越来越多的重视,正逐渐成为该领域的研究热点。动物模型在其中的作用不容忽视,当前大部分体内实验采用了啮齿类动物构建肿瘤心脏病学模型。然而,不同的研究中所选用的实验动物品系,药物剂量和评价指标存在较大差异^[2]。建立贴近于临床的肿瘤心脏病学动物模型,对研究抗肿瘤过程中发生心血管毒性的分子机制,寻找理想的生物标志物意义重大,可帮助医生制定合理的诊疗方案以预防和及时治疗心血管并发症。本文对当前已发表的肿瘤心脏病学动物模型进行综述,分析其特点,助力研究者构建合适的肿瘤心脏病学动物模型。

1 蒽环类药物动物模型

蒽环类药物是治疗乳腺癌、淋巴瘤、白血病的的一线用药,应用较广泛,包括阿霉素(doxorubicin, DOX)、柔红霉素、表柔比星等。蒽环类药物引起心血管毒性发病率较高且随着累积用药剂量的增大,心脏毒性的风险增高,是最早引起学者关注的产生心脏毒性的抗肿瘤药^[3]。当前研究发现蒽环类药物激发心脏毒性的机制有以下途径:活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生、钙超载、脂质过氧化和线粒体功能障碍等。相关研究的体内实验多采用小鼠、大鼠模型,根据研究目的分为急性损伤模型和慢性损伤模型。

1.1 小鼠模型

由于存在遗传背景清晰,操作方便,所采集的数据指标便于分析等有利因素,小鼠模型在肿瘤心脏病学研究中最为常用。当前大部分研究蒽环类药物动物模型采用 C57BL/6 小鼠,以腹腔注射方式给药。

1.1.1 非荷瘤小鼠模型

急性损伤模型为短期内大剂量给药:累积剂量 20~30 mg/kg 的阿霉素^[4-6],在用药后第 1~2 周超声显示射血分数比对照组下降 15%~30%,组织学检查发现心肌细胞间有大量炎性细胞浸润。

慢性损伤模型的给药方案在不同课题组差异较大:给药时间大约为 2~12 周,累积剂量 18~36 mg/kg 不等^[7-12]。观测时间点差异也较大(4~13 周),这与给药方案及检测手段的不同有关,实验结果超声示左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)比对照组下降 10%~20%,心肌坏死标志物升高等表现。较温和的给药方案如 3 mg/kg,每周 1 次,持续 12 周;与 5 mg/kg,每周 1 次,持续 4 周相比,其监测心脏毒性的时间点较长(12 周 vs. 4 周);同样 Noel 等^[8]采用每周注射 3 mg/kg 的用药方案,心脏磁共振(cardiac magnetic resonance imaging, CMR)在第 4 周发现异常,有明显的细胞外体积分数(extracellular volume fraction, ECV)增加,整体纵向应变(global longitudinal strain, GLS)恶化,而另一课题组超声在第 12 周监测到心脏损伤,提示采用磁共振可更早监测到心脏损伤^[11]。

比较不同课题组采取相同的给药方式得出的结果发现^[7,9],以 5 mg/kg 的剂量,每周给药 1 次,累积 20 mg/kg 的用药方案,可在第 4 周超声检测到心脏损伤,能获得较稳定的肿瘤心脏病动物模型,降低小鼠死亡率,缩短模型建立时间。

虽然是同种系小鼠,但在不同研究中存在周龄、体重不同,及实验室饲养条件等差异,导致小鼠对药物的耐受性不同,所以需要更多的研究探索,尽可能控制各项可变因素,以建立合适的建模方案。

1.1.2 荷瘤小鼠模型

荷瘤鼠模型较非荷瘤鼠模型能够更好地模拟肿瘤患者的真实情况,可同时观察化疗药对肿瘤的治疗效果及对心血管的影响。然而由于操作较复杂,当前检索到 6 篇蒽环类药物的荷瘤鼠模型,其中有 5 篇乳腺癌模型^[13-16],1 篇为肉瘤模型^[17]。

乳腺癌模型中,多数报道选择同种鼠源 4T1 乳腺癌细胞, BALB/c 小鼠乳腺脂肪垫原位或皮下成瘤,其中两项研究采用 10 mg/kg 大剂量短时间给药,累积 20~30 mg/kg,在第 2~3 周出现心肌损

伤^[14,16];另一项研究采用 4 mg/kg,每周给药 1 次,持续 3 周,在第 6 周检测到心肌损伤^[15]。

采用 C57BL/6 小鼠, E0771 乳腺癌细胞成瘤,成瘤后腹腔注射阿霉素 5 mg/kg,每周给药 1 次,持续 3 周,于第 3~4 周检测到心脏损伤^[16]。与非荷瘤 C57BL/6 小鼠模型相比,荷瘤鼠心肌损伤出现的时间较早。

另有一项报道中,为研究人源乳腺癌,将人乳腺癌细胞 TB474 接种于免疫缺陷 BALB/c 小鼠建模^[13],成瘤后 DOX 5 mg/kg,每周给药 1 次,累积剂量 40 mg/kg,于第 16 周检测到心脏损伤。

肉瘤模型为 KM 鼠,采用鼠源 S180 肉瘤细胞,皮下成瘤,每 d 给药 2 mg/kg,持续 10 d,成功建立急性心脏损伤模型^[17]。

以上荷瘤鼠动物模型首先要成瘤,然后给予抗肿瘤药,可观察药物对肿瘤和心血管的作用,对于同时研究抗癌作用和心脏保护治疗提供了较为适宜的模型手段。但由于当前报道较少,尚需要进行更多的探索,以寻找合适的建模方案(见表 1)。

1.2 大鼠模型

与小鼠相比,大鼠体积大,影像学观察更为清楚,解剖操作方便直观,存活率也较高。同样,由于操作简便,大鼠的非荷瘤模型较荷瘤模型应用广泛。Wistar 大鼠,SD 大鼠和 Fischer(F344)大鼠均有应用,其中 Wistar 大鼠使用较多(见表 2)。

用药方案多采用每隔 1~3 d 腹腔注射 1 次,累积 9~18 mg/kg,心肌损伤指标的检测时间在第 13~14 天^[18-22]。Sergazy 等^[22]采用单次大剂量(8 mg/kg)注射后第 8 天检测到心肌损伤血清标志物的异常。

有两项研究采用尾静脉注射的给药方式:小剂量多次给药(1.5 mg/kg,累积 9 mg/kg)于第 51 天检测到 LVEF 降低^[19]。单次尾静脉注射阿霉素 5 mg/kg,第 70 天超声出现肥厚型心肌病和扩张型心肌病两种变化^[20]。提示蒽环类药的慢性心脏毒性不容忽视。

Todorova 课题组的研究中构建了大鼠荷瘤模型:Fischer(F344)大鼠同种乳腺癌 MatBIII 细胞,乳腺脂肪垫接种成瘤。急性损伤模型采用单次腹腔给药 12 mg/kg,3 d 后观察到出现急性心脏损伤^[23];慢性损伤模型腹腔注射 2 mg/kg,1 周 2 次,累积 12 mg/kg,于 3 周后检测到心脏功能及心肌细胞毒

性改变^[24]。

总的来说,当前蒽环类肿瘤心脏病学动物模型研究较多,但仍需在不同课题组间进行比较,寻找稳定统一的建模方案,以利于课题组间进行研究结果的比较(见表 2)。

2 免疫抑制剂类动物模型

最近几年临床病例显示,免疫检查点抑制剂(checkpoint inhibitors, ICIs)能够有效的提高晚期肿瘤患者的生存率。然而免疫抑制疗法的心血管损伤也不容忽视,其中最显著的损伤就是急性心肌炎^[25],对其机制的研究引起了学者的广泛关注。Tay^[26]等和 Liu 等^[27]的研究中采用了荷瘤小鼠模型,分别皮下注射黑色素瘤细胞和结肠癌肺转移细胞建立荷瘤模型,腹腔注射给药,PD-L1 抗体每只 100~150 μg,PD-1 抗体每只 200~250 μg,在第 1 d 天观察到心肌标志物的异常升高,成功构建肿瘤心脏病动物模型。Michel 等^[28]为了研究抗 PD-1 疗法在治疗黑色素瘤中的心脏毒性作用,每隔 1 d 腹腔注射 250 mg PD-1 抗体,注射 6 次后检测到小鼠 LVEF 下降,整体径向应变下降 51%。在非荷瘤鼠模型的构建中,陈振寅等^[29]综合考量小鼠的存活率和临床患者的用药剂量分析,实验得出最适宜的建模方案为尾静脉注射抗 PD-L1 10 mg/kg 或抗 PD-1 12.5 mg/kg,每周 1 次,在第 4 周超声示 LVEF, LVFS 下降,诱发心血管损伤。也有课题组在第 1 天和第 14 天分别腹腔注射 PD-1 抗体 5 mg/kg,在第 28 天超声观察到 LVEF 和 LVFS 下降^[30-31]。

3 抗血管生成靶向药物类动物模型

新生血管的生成在肿瘤的生长和扩散起着至关重要的作用,因此血管生成抑制剂在抗肿瘤治疗中应用较为广泛。

研究报道此类的抗肿瘤药可以诱发心力衰竭,高血压,QT 间期延长和室性心律失常^[32]。当前研究主要针对血管生成抑制剂舒尼替尼和大分子单抗靶向药贝伐单抗展开,均采用小鼠非荷瘤模型:舒尼替尼 25~50 mg/kg,每天灌胃给药持续 2~6 周^[33-36]。贝伐单抗每周静脉给药 10 mg/kg,累积剂量 20~40 mg/kg^[35-36]。小鼠模型出现心脏毒性的最早时间在用药后的第 2 周,表现为超声显示 LVEF 下降,血清肌钙蛋白水平增高,血压增高等变化。

表 1 蒽环类小鼠动物模型
Table 1 Anthracenecline mouse animal model

动物品系 Animal	荷瘤细胞 Tumor cell	给药方案 Method	检测结果 Result	参考文献 References
C57BL/6	/	i. p 累积剂量 24 mg/kg i. p accumulated dose is 24 mg/kg	2 周后超声发现 LVEF 和 LVFS 降低,组织学有肌纤维的断裂和中断,电镜显示有自噬体形成 After 2 weeks of ultrasound, LVEF and LVFS were found to be reduced, histological muscle fibers were ruptured and interrupted, and electron microscopy showed autophagosome formation	[4]
	/	i. p 10 mg/kg, 1 周 3 次, 持续 1 周 i. p 10 mg/kg, 3 times a week for 1 week	1 周后超声示 LVEF 和 LVFS 降低,出现明显的心肌纤维化 After 1 week, ultrasound showed a decrease in LVEF and LVFS, and significant myocardial fibrosis appeared	[5]
	/	i. p 单剂量 20 mg/kg i. p single dose 20 mg/kg	第 8 天超声示 LVEF 和 LVFS 下降,肌钙蛋白水平增高,嗜酸性粒细胞增多,间质单核细胞浸润 On day 8, ultrasound showed a decrease in LVEF and LVFS, an increase in troponin levels, eosinophilia and interstitial monocyte infiltration	[6]
	/	i. p 累积剂量 18~20 mg/kg i. p cumulative dose 18~20 mg/kg	第 4 周超声 LVEF 和 LVFS 显著降低。CMR 中 T2 平均成像增加,ECV 增加,GLS 恶化。心房钠尿肽水平升高 At week 4 ultrasound LVEF and LVFS decreased significantly. T2 average imaging increases in CMR, ECV increases, GLS worsens. Atrial natriuretic peptide levels are elevated	[7-9,12]
	/	i. p 3 mg/kg, 2 d 1 次, 连续 2 周 i. p 3 mg/kg, once every two days for 2 weeks	第 8 周超声 LVEF 和 LVFS 低于正常, TUNEL 染色显示小鼠心肌细胞凋亡增加 At week 8, ultrasounds with LVEF and LVFS were lower than normal, and TUNEL staining showed increased apoptosis in mouse cardiomyocytes	[10]
免疫缺陷 BALB/c Immunodeficiency BALB/c	人乳腺癌细胞(TB474) Human breast cancer cells (TB474)	i. p 5 mg/kg, 1 周 1 次, 持续 2 个月 i. p 5 mg/kg, once a week for 2 months	第 12 周 DOX 组小鼠的收缩期左室内和舒张期左室内径显著高于对照组, LVEF 降低, 肌酸激酶, 乳酸脱氢酶水平升高 At week 12 mice in the DOX group had a higher diameter in the systolic left ventricle and diastolic left ventricular than in the control group, with decreased LVEF and elevated levels of creatine kinase and lactate dehydrogenase	[11]
	鼠系 4T1 乳腺癌细胞 Murine line 4T1 breast cancer cells	i. p 3 mg/kg, 1 周 1 次, 持续 12 周 i. p 3 mg/kg, once a week for 12 weeks	第四个月超声显示 DOX 组小鼠平均心脏质量下降, 舒张期、收缩期室间隔厚度降低, 轻微的心脏变形 The fourth month ultrasound showed that the average heart quality of the mice in the DOX group decreased, the thickness of the ventricular septum during the diastolic and systolic phases decreased, and the heart was slightly deformed	[13]
BALB/c	鼠系 4T1 乳腺癌细胞 murine line 4T1 breast cancer cells	i. p 6 mg/kg 或 10 mg/kg, 成瘤后第 2、8、15 天给药 i. p 6 mg/kg or 10 mg/kg, administered on days 2, 8, 15 after tumorigenesis	第 14 天超声显示 10 mg/kg 的 DOX 组平均心输出量、LVEF 和 LVFS 均有所下降 On day 14, ultrasound showed a decrease in average cardiac output, LVEF and LVFS in the DOX group of 10 mg/kg	[14]
	鼠系 4T1 乳腺癌细胞 murine line 4T1 breast cancer cells	i. p 4 mg/kg, 1 周 1 次, 持续 3 周 i. p 4 mg/kg, once a week for 3 weeks	首次治疗后第 6 周超声显示收缩功能下降, 心肌损伤标记物肌钙蛋白和脑钠肽上调 Ultrasound at week 6 showed decreased systolic function and upregulation of myocardial injury markers troponin and brain natriuretic peptides	[15]
昆明鼠 KM mouse	鼠系 4T1 乳腺癌细胞 murine line 4T1 breast cancer cells	i. p 10 mg/kg, 在第 1 天和第 5 天注射 i. p 10 mg/kg, injected on days 1 and 5	第 24 天, DOX 组的生存率开始下降 On day 24, survival in the DOX group began to decline	[16]
	鼠 S180 肉瘤细胞 murine S180 sarcoma cells	i. p 2 mg/kg, 1 d 1 次, 连续 10 天 i. p 2 mg/kg, once a day for 10 consecutive days	第 10 天, DOX 组乳酸脱氢酶明显增强, ROS 生成增加, 心肌细胞内钙浓度升高 After 10 days, lactate dehydrogenase was significantly enhanced in the DOX group, ROS production increased, and calcium concentrations in cardiomyocytes increased	[17]

表 2 蒽环类大鼠动物模型
Table 2 anthracycline rat model

动物品系 Animal	荷瘤细胞 Tumor cell	给药方案 Method	检测结果 Result	参考文献 References
SD	/	i. p 3 mg/kg, 2 d 1 次, 注射 6 次 i. p 3 mg/kg, once every 2 days, injected 6 times	第 2 周检测主动脉血流降低, 心率下降, 心输出量和每搏量下降, 肌钙蛋白增高 2 weeks detects decreased aortic blood flow, decreased heart rate, decreased cardiac output and stroke volume, and increased troponin	[18]
		尾静脉注射 1.5 mg/kg, 在第 8、11、14、17、20、23 天注射 6 次 Tail vein injection of 1.5 mg/kg, 6 injections on days 8, 11, 14, 17, 20, 23	第 51 天 LVEF 降低, 第 80 天 LVEF 显著降低, 等容舒张时间略增加 LVEF decreased on day 51, LVEF decreased significantly on day 80, and isotonic diastolic time increased slightly	[19]
		单次尾静脉注射 DOX 5 mg/kg A single tail vein injection of DOX 5 mg/kg	第 70 天超声出现肥厚型心肌病和扩张型心肌病两种变化 On day 70, two changes appeared in ultrasound: hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy	[20]
Wistar	/	i. p 2. 15 mg/kg, 3 d 1 次, 持续 3 周 i. p 2. 15 mg/kg, once every three days for 3 weeks	第 4 周组织学发现有明显的细胞水肿, 第 6 周 LVEF、LVFS 低于对照组 Histology at week 4 showed significant cytoedema, and at week 6 LVEF, LVFS was lower than in the control group	[21]
		i. p 2 mg/kg, 2 d 1 次, 持续 12 d i. p 2 mg/kg, once every two days for 12 days	第 13 天超声中 LVEF 和 LVFS 降低, 组织学出现心肌间质水肿, 血管结构改变 On day 13 of ultrasound there is a decrease in LVEF and LVFS, histological interstitial edema, changes in the structure of blood vessels	[22]
		单次 i. p 8 mg/kg Single i. p DOX 8 mg/kg	第 8 天 AST, 心肌肌钙蛋白 I 水平升高, 形态学上心肌内皮细胞水肿, 细胞器受损 On day 8 AST, the level of myocardial troponin I is elevated, morphologically myocardial endothelial cell edema, organelle damage	[22]
Fisher344	大鼠乳腺腺癌细胞系 MatBIII Rat breast adenocarcinoma cell line MatBIII	单次 i. p DOX 12 mg/kg Single i. p DOX 12 mg/kg	3 d 后 DOX 组食物摄入量减少, 超声显示舒张末期厚度增加, LVEF 下降 After 3 days, food intake decreased in the DOX group, ultrasound showed an increase in terminal diastolic thickness, and a decrease in LVEF	[23]
	大鼠乳腺腺癌细胞系 MatBIII Rat breast adenocarcinoma cell line MatBIII	i. p 2 mg/kg, 1 周 2 次, 持续 3 周 i. p 2 mg/kg, twice a week for 3 weeks	3 周后测量心输出量下降, 肌钙蛋白水平升高, 镜下可见心肌细胞空泡化, 线粒体肌浆网肿胀 After 3 weeks, cardiac output decreased, troponin levels increased, cardiac cell vacuolarization was seen microscopically, and mitochondrial myoplasmic reticulum swelling was seen	[24]

4 抗 HER-2 单克隆抗体类动物模型

单克隆抗体曲妥珠(赫赛汀)靶向抑制 HER-2 蛋白, 在 HER-2 过表达的乳腺癌、胃癌等的治疗中较多应用, 其心脏毒性的发病率在 1.7%~20%。曲妥珠单抗诱导心脏毒性的小鼠模型中, 多采用腹腔

注射 3~10 mg/kg 的曲妥珠, 累积剂量 9~20 mg/kg, 连续的超声检测, 最早在第 10 天可观察到左室舒张末期内径增加, 射血分数下降到 40%^[37-40]。Olorundare 等^[41] 和 Beiranvand 等^[42] 研究中采用大鼠模型, 腹腔注射曲妥珠单抗的用量为 2.25~20 mg/kg, 累积剂量在 15.75~60 mg/kg 范围内, 在

第 7 天出现血清 LDH 和肌钙蛋白水平增高,心肌组织检测能看到有明显的血管充血和冠状动脉微血栓的形成。

5 其他化疗药动物模型

肿瘤治疗中,各种化疗药的应用在杀伤肿瘤细胞的同时也会损伤正常组织,心肌损伤是常见的副作用之一。多篇研究中构建了顺铂急性心脏毒性大鼠模型;腹腔注射单剂量顺铂 7 mg/kg,第 5 天与对照组比较可观察到心肌标志物升高,氧化应激标志物明显增加,提示出现心肌损害^[43-45]。Zhao 等^[46]用小鼠建立慢性模型,腹腔注射 3~6 mg/kg 的顺铂,每周 1 次,累积剂量为 9 或 18 mg/kg,于第 24 天发现 3 mg/(kg·d)的小鼠心肌未见明显改变,而 6 mg/(kg·d)的小鼠超声发现有收缩和舒张功能受损。

烷基化剂环磷酰胺也是常用的化疗药物,临床研究发现,可诱发心肌病,心包炎甚至充血性心衰。Senthilkumar 等^[47]和 Viswanatha 等^[48]均采用雄性 Wistar 大鼠建模,分别腹腔注射 150 或 200 mg/kg 环磷酰胺,于用药的第 10、12 天检测到血清学心肌损伤指标出现异常。

以上传统化疗药及靶向药物在临床上引起心脏毒性的概率较蒽环类药物低,动物模型的研究相对较少。需要结合临床发病情况,包括发病患者的基础疾病、用药方案等,归纳其中的规律,寻找可能的影响因素。在动物实验中对各种影响因素进行考量,进行更加细致的研究探索才能建立较稳定的肿瘤心脏病模型。

6 放疗动物模型

放射治疗在晚期乳腺癌和一些胸部肿瘤中起到不可或缺的作用,然而超过一半的患者会发生辐射诱发的心脏功能障碍包括心包炎、缺血性心脏病、心肌纤维化,及心脏瓣膜异常。放疗模型一般选用啮齿类动物,10~12 周的成年雌性大鼠接受单剂量 24 Gy 心脏辐射治疗,CMR 检测发现在放疗后 10 周出现心肌应变恶化,心肌水肿^[49]。Lee 等^[50]采用小鼠连续 5 d 接受每日 2 Gy 的照射,10 Gy 为 1 个疗程,5 个疗程,总累积剂量为 50 Gy,在照射后的 18 个月小鼠心脏组织学显示心肌纤维化。

7 小结与展望

肿瘤心脏病学作为新型交叉学科,近年来受到

越来越多心血管和肿瘤学专家的关注,但学科发展仍处于起步阶段,相关动物模型的研究尚存在较多问题,不同研究团队采用的建模方式差异较大,不利于课题组间研究结果的相互比较。

当前最常见肿瘤心脏病学动物模型为啮齿类动物模型,但大部分研究采用的非荷瘤鼠建模,虽然取得了一定的研究成果,但与荷瘤鼠模型相比,后者具有以下优势:更能真实反映临床患者体内的情况;荷瘤鼠模型考虑了肿瘤本身对心脏的影响和抗肿瘤药代谢的影响,可同时评估药物的抗肿瘤和心血管毒性作用,精确反映抗肿瘤药在体内的作用及分子机制;更有助于寻找理想的心血管保护药物;具有心血管保护作用的同时与抗肿瘤药物无拮抗作用。

啮齿类肿瘤心脏病学动物模型也存在部分不足:(1)动物心脏的重量、心肌结构、心率、心肌离子通道的状态等方面与人类相比仍然有较大的差异。心血管表型的严重程度可能根据所使用的动物品系的遗传背景不同而不同,同样动物模型和人类患者的临床观察之间仍可能存在平移差距,例如,伊马替尼在啮齿类动物中引起心肌病,但在患者中似乎没有同样的效果。未来可采用猪、猴等大型实验动物来弥补这一不足。(2)人类的一些基础性疾病如高血压、糖尿病等尚未在动物模型中有很好的体现。可在建立稳定的荷瘤鼠心脏病模型的基础上,进一步引入以上基础性疾病,建立更精细的动物模型。同时在抗肿瘤药的给药方式、剂量,成瘤部位,心脏保护药物的给药时间点等方面进行细致考量。

总之,对于新兴学科肿瘤心脏病学,未来发展潜力巨大,但由于相关研究相对较少,加之存在肿瘤、抗肿瘤方案、患者的基础疾病等的复杂多样的影响因素,建立稳定可靠的动物模型是任重道远,随着各种实验技术的发展和检测水平的提高,相信肿瘤心脏病学动物模型将会更加完善,更贴切地模拟临床特征。

参考文献:

- [1] Bisceglia I, Cartoni D, Petrolati S. Concepts in cardiac oncology [J]. Eur Heart J Suppl, 2020, 22: L19-L23.
- [2] 李玉玲,杨建业,唐俊明,等.阿霉素诱导大鼠心衰模型不同方案的比较[J].中国比较医学杂志,2006,16(2):93-96,127.
- [3] Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC committee for

- practice guidelines: the task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(36): 2768–2801.
- [4] Xu ZM, Li CB, Liu QL, et al. Ginsenoside Rg1 prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through the inhibition of autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3658.
- [5] Yu X, Ruan Y, Shen T, et al. Dexrazoxane protects cardiomyocyte from doxorubicin-induced apoptosis by modulating miR-17-5p [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 5107193.
- [6] Saleh MF, Elsayad ME, Goda AE. Mitigation of doxorubicin-induced cardiotoxicity by dichloroacetate: potential roles of restoration of PGC-1 α /SIRT3 signaling and suppression of oxidative stress and apoptosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(21): 6573–6584.
- [7] Liu Y, Zhang W, Hu T, et al. A doxorubicin-induced murine model of dilated cardiomyopathy *in vivo* [J]. *J Vis Exp*, 2020, 159: e61158.
- [8] Noel CV, Rainusso N, Robertson M, et al. Early detection of myocardial changes with and without dexrazoxane using serial magnetic resonance imaging in a pre-clinical mouse model [J]. *Cardiooncology*, 2021, 7(1): 23.
- [9] Li LL, Wei L, Zhang N, et al. Levosimendan protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PTEN/Akt pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8593617.
- [10] Ma Y, Yang L, Ma J, et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 1904–1911.
- [11] Li X, Liang J, Qin A, et al. Protective effect of Di'ao Xinxuekang capsule against doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 287: 114943.
- [12] Reis-Mendes A, Padrão AI, Duarte JA, et al. Role of inflammation and redox status on doxorubicin-induced cardiotoxicity in infant and adult CD-1 male mice [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(11): 1725.
- [13] Hoffman RK, Kim BJ, Shah PD, et al. Damage to cardiac vasculature may be associated with breast cancer treatment-induced cardiotoxicity [J]. *Cardiooncology*, 2021, 7(1): 15.
- [14] Lee KJ, Wright G, Bryant H, et al. Cytoprotective effect of vitamin D on doxorubicin-induced cardiac toxicity in triple negative breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7439.
- [15] Li M, Sala V, De Santis MC, et al. Phosphoinositide 3-kinase γ inhibition protects from anthracycline cardiotoxicity and reduces tumor growth [J]. *Circulation*, 2018, 138(7): 696–711.
- [16] Ma P, Qin Y, Cao H, et al. Temporary blockade of interferon- γ ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity without influencing the anti-tumor effect [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110587.
- [17] Yao YF, Liu X, Li WJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in sarcoma 180 tumor-bearing mice [J]. *Life Sci*, 2017, 180: 151–159.
- [18] Zilinyi R, Czompa A, Czeglédi A, et al. The cardioprotective effect of metformin in doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of autophagy [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1184.
- [19] Lódi M, Priksz D, Fülöp GÁ, et al. Advantages of prophylactic versus conventionally scheduled heart failure therapy in an experimental model of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 229.
- [20] Kosić M, Nešić Z, Glumac S, et al. Paroxetine mitigates cardiac remodelling by doxorubicin and increases survival [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112411.
- [21] Boutagy NE, Feher A, Pfau D, et al. Dual angiotensin receptor-neprilysin inhibition with sacubitril/valsartan attenuates systolic dysfunction in experimental doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *JACC Cardio Oncol*, 2020, 2(5): 774–787.
- [22] Sergazy S, Shulgau Z, Fedotovskikh G, et al. Cardioprotective effect of grape polyphenol extract against doxorubicin induced cardiotoxicity [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14720.
- [23] Todorova VK, Kaufmann Y, Hennings L, et al. Oral glutamine protects against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity of tumor-bearing rats [J]. *J Nutr*, 2010, 140(1): 44–48.
- [24] Todorova VK, Siegel ER, Kaufmann Y, et al. Dantrolene attenuates cardiotoxicity of doxorubicin without reducing its antitumor efficacy in a breast cancer model [J]. *Translational Oncology*, 2020, 13(2): 471–480.
- [25] Esposito R, Fedele T, Orefice S, et al. An emergent form of cardiotoxicity: acute myocarditis induced by immune checkpoint inhibitors [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 785.
- [26] Tay WT, Fang YH, Beh ST, et al. Programmed cell death-1; programmed cell death-ligand 1 interaction protects human cardiomyocytes against T-cell mediated inflammation and apoptosis response *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2399.
- [27] Liu SY, Huang WC, Yeh HI, et al. Sequential blockade of PD-1 and PD-L1 causes fulminant cardiotoxicity—from case report to mouse model validation [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(4): 580.
- [28] Michel L, Helfrich I, Hendgen-Cotta UB, et al. Targeting early stages of cardiotoxicity from anti-PD1 immune checkpoint inhibitor therapy [J]. *Eur Heart J*, 2021, 43(4): 316–329.
- [29] 陈振寅, 王敏, 高三惠, 等. 抗 PD-L1 抗体的心脏毒性及甲状腺素的救治作用实验研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2021, 24(6): 394–403.
- [30] Xia W, Chen H, Chen D, et al. PD-1 inhibitor inducing exosomal miR-34a-5p expression mediates the cross talk between cardiomyocyte and macrophage in immune checkpoint inhibitor-related cardiac dysfunction [J]. *Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001293.
- [31] Xia W, Zou C, Chen H, et al. Immune checkpoint inhibitor induces cardiac injury through polarizing macrophages via modulating microRNA-34a/Kruppel-like factor 4 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 575.

- [32] Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, et al. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib [J]. *Lancet*, 2007, 370(9604): 2011–2019.
- [33] Sourdon J, Facchin C, Certain A, et al. Sunitinib-induced cardiac hypertrophy and the endothelin axis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3830–3838.
- [34] Aldemir MN, Simsek M, Kara AV, et al. The effect of adenosine triphosphate on sunitinib-induced cardiac injury in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(8): 1046–1053.
- [35] Bordun KA, Premez S, daSilva M, et al. The utility of cardiac biomarkers and echocardiography for the early detection of bevacizumab- and sunitinib-mediated cardiotoxicity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(4): H692–H701.
- [36] Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, Zambrano S, et al. Inflammatory and fibrotic processes are involved in the cardiotoxic effect of sunitinib; Protective role of L-carnitine [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 241: 9–18.
- [37] Kabel AM, Elkhoely AA. Targeting proinflammatory cytokines, oxidative stress, TGF- β 1 and STAT-3 by rosuvastatin and ubiquinone to ameliorate trastuzumab cardiotoxicity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 17–26.
- [38] Naresh NK, Misener S, Zhang Z, et al. Cardiac MRI myocardial functional and tissue characterization detects early cardiac dysfunction in a mouse model of chemotherapy-induced cardiotoxicity [J]. *NMR Biomed*, 2020, 33(9): e4327.
- [39] Asselin CY, Lam A, Cheung DYC, et al. The cardioprotective role of flaxseed in the prevention of doxorubicin- and trastuzumab-mediated cardiotoxicity in C57BL/6 mice [J]. *J Nutr*, 2020, 150(9): 2353–2363.
- [40] Goyal V, Bews H, Cheung D, et al. The cardioprotective role of N-Acetyl cysteine amide in the prevention of doxorubicin and trastuzumab-mediated cardiac dysfunction [J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(12): 1513–1519.
- [41] Olorundare O, Adeneye A, Akinsola A, et al. African vegetables (clerodendrum volubile leaf and irvingia gabonensis seed extracts) effectively mitigate trastuzumab-induced cardiotoxicity in wistar rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9535426.
- [42] Beiranvand E, Ostad SN, Ardakani EM, et al. *In vivo* evaluation of carvedilol cardiac protection against trastuzumab cardiotoxicity [J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2020, 70(4): 165–169.
- [43] Afsar T, Razak S, Almajwal A, et al. Evaluating the protective potency of *Acacia hydaspica* R. Parker on histological and biochemical changes induced by Cisplatin in the cardiac tissue of rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 20(1): 326.
- [44] El-Sawalhi MM, Ahmed LA. Exploring the protective role of apocynin, a specific NADPH oxidase inhibitor, in cisplatin-induced cardiotoxicity in rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 207: 58–66.
- [45] Ibrahim MA, Bakhaat GA, Tammam HG, et al. Cardioprotective effect of green tea extract and vitamin E on cisplatin-induced cardiotoxicity in mice: Toxicological, histological and immunohistochemical studies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108731.
- [46] Zhao L, Xing C, Sun W, et al. Lactobacillus supplementation prevents cisplatin-induced cardiotoxicity possibly by inflammation inhibition [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82(6): 999–1008.
- [47] Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, et al. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1–2): 335–342.
- [48] Viswanatha Swamy AH, Patel UM, Koti BC, et al. Cardioprotective effect of *Saraca indica* against cyclophosphamide induced cardiotoxicity in rats; a biochemical, electrocardiographic and histopathological study [J]. *Indian J Pharmacol*, 2013, 45(1): 44–48.
- [49] Ibrahim EH, Baruah D, Croisille P, et al. Cardiac magnetic resonance for early detection of radiation therapy-induced cardiotoxicity in a small animal model [J]. *JACC Cardio Oncol*, 2021, 3(1): 113–130.
- [50] Lee CL, Lee JW, Daniel AR, et al. Characterization of cardiovascular injury in mice following partial-heart irradiation with clinically relevant dose and fractionation [J]. *Radiother Oncol*, 2021, 157: 155–162.

[收稿日期]2022-02-17

《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!

狄培琰,张双丽,康乐,等.基于中西医临床病证特点的病毒性肺炎动物模型分析[J].中国比较医学杂志,2022,32(10):123-129.

Di PY, Zhang SL, Kang L, et al. Analysis of animal models of viral pneumonia based on clinical syndrome characteristics of traditional Chinese and Western medicines [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 123-129.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.016

基于中西医临床病证特点的病毒性肺炎动物模型分析

狄培琰,张双丽,康乐,苗明三*

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 病毒性肺炎是一种传染性极强的呼吸系统疾病,病程发展急骤且近年来发病率处于上升趋势,因此复制出更加符合中西医临床病证特点的动物模型尤为重要。本文通过对大量文献的归纳整理,对现有模型的方法、机制及原理进行总结,依据拟定的中西医临床诊断标准对各种模型的中西医吻合度进行评价。结果显示高脂饲料+病毒滴鼻+游泳 30 min 引起的湿热证型病毒性肺炎模型中西医临床吻合度较高,该模型动物表现的发热、咽痛、咳嗽、鼻塞流涕、呼吸困难等症状与人类病毒性肺炎临床特征较符合,且肺组织病理变化明显,气道上皮细胞脱落、支气管黏膜下及气管壁周围有大量炎性细胞浸润,高度符合病毒性肺炎湿热证型。本文通过分析病毒性肺炎各造模方法的优缺点,对改进完善其动物模型提出建议;同时为深入研究其发病机制及诊疗方法提供思路,以促进病毒性肺炎的临床研究。

【关键词】 病毒性肺炎;病证结合;动物模型;中西医;诊断标准

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0123-07

Analysis of animal models of viral pneumonia based on clinical syndrome characteristics of traditional Chinese and Western medicines

DI Peiyan, ZHANG Shuangli, KANG Le, MIAO Mingsan*

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

【Abstract】 Viral pneumonia is a highly infectious respiratory disease. The disease course develops rapidly and the incidence rate is increasing. Therefore, it is important to establish an animal model that corresponds to the clinical characteristics of traditional Chinese and Western medicines. This review summarizes the method, mechanisms and principles of the existing models by summarizing a large number of studies. In accordance with the proposed clinical diagnostic criteria of traditional Chinese and Western medicines, this study evaluated the anastomosis degree of traditional Chinese and Western medicines of various models. The result showed that the model of viral pneumonia with damp heat syndrome caused by a high fat diet, virus nasal drip, and swimming for 30 min had a high degree of clinical coincidence between traditional Chinese and Western medicines. The symptoms of fever, sore throat, cough, nasal congestion, runny nose, and dyspnea of the model animals are more consistent with the clinical characteristics of human viral pneumonia, and the pathological changes of lung tissue were obvious. There was a large number of inflammatory cells under the bronchial mucosa and around the tracheal wall, which was highly consistent with the damp heat syndrome type of viral pneumonia. By analyzing the advantages and disadvantages of each modeling method of viral pneumonia, this study provides suggestions on improving the animal model and ideas for in-depth study of the pathogenesis, diagnosis and treatment method to promote clinical research of viral pneumonia.

【Keywords】 viral pneumonia; combination of disease and syndrome; animal model; traditional Chinese and Western medicines; diagnostic criteria

【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);河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZYD02)。

【作者简介】 狄培琰(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中药学。E-mail:15136370813@163.com

【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

病毒性肺炎(viral pneumonia, VP)是由病毒感染导致的肺部炎症,通常是指上呼吸道感染、向下蔓延引发肺部炎症,导致肺换气功能障碍的疾病^[1]。该疾病传染性强,病程发展急骤。研究发现,病毒感染在非细菌性肺炎中占 25%~50%,是肺炎致死的主要原因^[2-3]。病毒性肺炎多发于 5 岁以下儿童,近年来成人重症病毒性肺炎的发病率呈上升趋势^[4]。本文通过对 VP 中西医病因病机及诊断标准进行归纳总结,对现有动物模型进行分析,有助于进一步研究 VP 疾病,为临床治疗奠定理论及实验基础。

1 病毒性肺炎的病因病机

1.1 现代医学发病机制

VP 的发生通常为机体免疫力下降、机体病变或病变后机体未痊愈状态病毒入侵呼吸道,进而侵袭肺部引起病变,严重时也可影响心、肝、肾等其它器官。引起 VP 的主要病原有流感性病毒、冠状病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒及鼻病毒等^[5-6]。目前较为常见多发的为流行性病毒肺炎,如甲型 H1N1 流感病毒、H7N9、H5N1 禽流感病毒等。致病严重且影响巨大的多为冠状病毒,如 SARS-CoV、COVID-19 等,传染性极强且初期表现较

不明显。常发于儿童的病毒性肺炎多为呼吸道合胞病毒、副流感病毒、人博卡病毒、人偏肺病毒、腺病毒等^[7]。不同病毒引起的肺炎病变程度差别较大,其治疗方式也不尽相同。

1.2 中医病因病机

病毒性肺炎在中医中并无确切的名称,通常将其归为“疫病、温毒、疫疔、时疫、温变、咳嗽、喘症”等范畴^[8-9]。中医认为 VP 的病因为正气不足、复感外邪;病位在肺,可累及其他器官^[8];病机为热毒痰瘀,肺壅气郁,痰湿瘀阻,气阴亏虚等交互作用^[10]。

2 病毒性肺炎的西医诊断标准与中医辨证标准

2.1 西医诊断标准

VP 的西医诊断标准参照 2006 年发行的《内科疾病诊断与疗效标准》^[11]、2008 年发行的《内科常见病诊断及治疗》^[12] 及相关文献^[13],主要分为临床症状、实验室检查、胸部 X 线检查、物理检查/体征、血白细胞计数、组织病理学特征等六方面,具体诊断标准见表 1。根据文献^[14]及疾病诊断主次关系对每项标准进行赋值,因临床症状较为直观明显,将其赋值 30%,实验室诊断可信度高,赋值 30%,其余四项各赋值 10%。

表 1 VP 的西医诊断标准

Table 1 Western medicine diagnostic criteria of VP

分类 Classification	表现 Performance
临床症状、病史 I Clinical symptoms and medical history I	(1)发热、头痛等上呼吸道感染症状。(2)重者有呼吸困难、意识障碍、休克心衰等。(3)有吸烟史、呼吸道疾病史等。 (1)Fever, headache and other symptoms of upper respiratory tract infection. (2) Severe cases include dyspnea, disturbance of consciousness, shock, heart failure, etc. (3) History of smoking, respiratory diseases, etc.
实验室诊断 II Laboratory diagnosis II	(1)病毒学/病原学:病毒分离呈阳性。 (1)Virology/etiology, virus isolation was positive. (2)血清学:病毒特异性 IgG、IgM、IgA 含量高于正常 4 倍或更多。 (2)Serology, contents of virus specific IgG, IgM and IgA are 4 times or more higher than normal.
胸部 X 线检查 III Chest X-ray examination III	主要为间质性肺炎的表现,肺纹理增多,少数可有肺实变和胸腔积液/阴影表现。 It is mainly the manifestation of interstitial pneumonia, with increased lung markings and a few may have lung consolidation and pleural effusion/shadow.
物理检查/体征 IV Physical examination/signs IV	(1)病变部位呼吸音减弱,可有干、湿啰音。(2)重症时可见吸气相三四征和身聚扇动,肺部可闻及广泛的干、湿啰音,往往合并休克、心衰、呼衰体征。 (1)Respiratory sound at the lesion site is weakened and there may be dry and wet rales. (2) In severe cases, three or four signs of inspiratory phase and body fan can be seen. Extensive dry and wet rales can be heard in the lungs, often combined with signs of shock, heart failure and respiratory failure.
血白细胞计数 V White blood cell count V	一般计数正常,也可稍高或偏低。继发细菌感染时白细胞总数和中性粒细胞增高。 Generally, the count is normal, but it can also be slightly higher or lower. The total number of leukocytes and neutrophils increased in secondary bacterial infection.
组织病理学特征 VI Histopathological features VI	弥漫性肺泡损伤,肺泡内出血,间质内多种炎性细胞渗出形成透明膜。 Diffuse alveolar injury, alveolar hemorrhage, exudation of a variety of inflammatory cells in the stroma and formation of hyaline membrane.

2.2 中医辨证标准

VP 中医诊断标准参照 2002 年发行的《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[15]、2019 年发行的《小儿病毒性肺炎中医诊疗指南》^[16] 及相关文献^[17-18]。中医临床证型分为风寒郁肺证、风热郁肺证、痰热郁肺证、毒热闭肺证、阴虚肺热证、肺脾气虚证、心阳虚衰证和邪陷厥阴证等。症状主要分为

临床主证、次证、舌脉等。评价 VP 动物模型与中医临床诊疗标准的吻合情况,见表 2,主证可归纳为:(1)发热、发汗异常;(2)咳嗽、咽痛、痰稀白/黏黄;(3)气急喘粗、头痛乏力。次证:(1)鼻塞流涕;(2)小便黄少,大便溏塞;(3)口干口渴;(4)心悸神乱、烦躁不安。根据文献^[14],将主证每项赋值 20%,次证每项赋值 10%,合计 100%。

表 2 VP 的中医诊断标准
Table 2 TCM diagnostic criteria of VP

辨证分型 Syndrome differentiation	主证 Main syndrome	次证 Secondary syndrome	
风寒郁肺证 Wind cold stagnation of lung syndrome	恶寒发热,无汗,头身疼痛,咳嗽,痰稀白易咯。 Cold and fever, no sweat, head and body pain, cough, thin white phlegm.	鼻塞流清涕,喉间痰嘶,咽不红,口不渴,小便清。 Nose is stuffy, the nose is clear, the throat is hoarse, the pharynx is not red, the mouth is not thirsty, and the urine is clear.	舌淡红,苔薄白,脉浮紧。 Tongue is light red, the moss is thin and white, and the pulse is floating and tight.
风热郁肺证 Wind heat stagnation of lung syndrome	发热恶寒,气急,咽痛,头痛,咳嗽,痰稠粘或黄。 Fever, aversion to cold, shortness of breath, sore throat, headache, cough, thick or yellow phlegm.	鼻塞,流清/黄涕,口渴欲饮,烦躁不安。 Stuffy nose, clear/yellow runny nose, thirsty, irritable.	舌质红,苔薄黄,脉浮数。 Tongue is red, the moss is thin and yellow, and the pulse is floating.
痰热郁肺证 Phlegm heat stagnation lung syndrome	高热不退,有汗,咳嗽,痰黄稠,气急喘促,咽红肿。 High fever, sweating, coughing, yellow and thick phlegm, shortness of breath, red and swollen pharynx.	面红,口渴欲饮,便秘,小便黄少,烦躁不安。 Blush, thirst, constipation, yellow urine, irritability.	舌质红,苔黄腻,脉滑数。 Tongue is red, the coating is yellow and greasy, and the pulse is slippery.
毒热闭肺证 Toxic heat blocking lung syndrome	高热炽盛,咳嗽喘憋,痰黄稠难咯或痰中带血,涕泪俱无。 High fever, cough and wheezing, yellow and thick phlegm, or blood in sputum, no tears.	恶心呕吐,烦躁口渴,小便短黄,大便秘结。 Nausea and vomiting, irritability and thirst, short yellow urine, constipation.	舌红少津,苔黄腻或黄燥,脉洪数。 Tongue is red and less fluid, the coating is yellow and greasy or yellow and dry, and the pulse is numerous.
阴虚肺热证 Yin deficiency and lung heat syndrome	干咳少痰,咯痰带血,低热盗汗。 Dry cough, less phlegm, hemoptysis, low fever and night sweat.	面色潮红,五心烦热。口干,神疲倦,夜不安,形消瘦,便秘,小便黄少,病程迁延。 His complexion is flushed and his heart is hot. Dry mouth, mental fatigue, restlessness at night, emaciation, constipation, yellow urine and prolonged course of disease.	舌红少津,苔少或花剥,脉细数。 Tongue is red and less fluid, the moss is less or the flower is peeled and the pulse is thin.
肺脾气虚证 Lung spleen qi deficiency syndrome	或有低热,自汗,久咳无力,痰稀白易咯,乏力气喘。 Or have low fever, spontaneous sweating, long cough weakness, thin white phlegm, fatigue and asthma.	形体偏瘦,纳差,口不渴,便溏,病程迁延,反复感冒。 Thin body, poor appetite, thirsty mouth, loose stool, prolonged course of disease, repeated colds.	舌质淡红,舌体胖嫩,苔薄白,脉无力或细弱。 Tongue is light red, fat and tender, the moss is thin and white and the pulse is weak or weak.
心阳虚衰证 Heart yang deficiency syndrome	多汗,呼吸浅促,四肢不温。 Sweating, shallow breathing and tepid limbs.	面色苍白,心悸动数,虚烦不安,神萎淡漠,小便减少。 Pale complexion, palpitation, virtual restlessness, listlessness, and reduced urination.	舌质淡紫,脉疾数,细弱欲绝。 Tongue is light purple, with a few pulse diseases and weak desire.
邪陷厥阴证 Syndrome of evil trapping Jueyin	壮热不退,口唇紫绀,气促,喉间痰鸣。 Strong heat does not subside, cyanosis of lips, shortness of breath, phlegm in the throat.	谵语狂躁,神识昏迷,口噤项强,角弓反张,四肢抽搐。 Delirium, manic, conscious coma, mouth silence, strong neck, angular tension, limb convulsions.	舌质红绛,脉细数。 Tongue is red and crimson and the veins are thin.

3 病毒性肺炎模型分析

常用于 VP 造模的动物主要为鼠类,其中小鼠使用频率最高,如: BALB/c 小鼠、KM 小鼠、ICR 小鼠等。豚鼠、金黄地鼠、叙利亚仓鼠、Wistar 大鼠以

及恒河猴也较为多用;其余可用的模型动物为:雪貂、树鼩、小型猪以及伊犁母马。不同类别的病毒性肺炎造模方式有所差异,其具体方法及模型吻合度见表 3。

表 3 VP 的模型分析
Table 3 VP model analysis

模型分类 Model classification	造模动物 Modeling animals	造模方法 Moulding method	模型特点/表现 Model characteristics	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics	
H5N1 禽流感病毒性肺炎 ^[19-20] H5N1 avian influenza viral pneumonia	恒河猴、雄性 KM 小鼠 Rhesus monkeys, male KM mice	经鼻滴入 H5N1 病毒液 H5N1 virus solution via nasal drip	非致命的流感病毒肺炎。病毒没有在肺外器官复制,人类研究中可用数据一致。 Non-fatal influenza virus pneumonia. The virus did not replicate in extrapulmonary organs, and the data available in human studies are consistent.	符合西医指标: I(1)(2)、II(1)(2)、IV(1)及 VI(1), 吻合度 70%; 中医: 主证(1)(2)、次证(1), 吻合度 50%。 Western medicine index: I(1)(2), II(1)(2), IV(1) and VI(1), 70% match; Chinese medicine: main evidence (1)(2), secondary evidence (1), 50% match.	
H7N9 禽流感病毒性肺炎 ^[21-22] H7N9 avian influenza viral pneumonia	雪貂、SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 Ferrets, SPF grade female BALB/c mice	经鼻滴入 H7N9 病毒液 H7N9 virus solution via nasal drip	与人感染后的变化相似程度较高。 High degree of similarity to changes in humans after infection.	符合西医指标: I(1)、II(1)(2)、V(1)及 VI(1), 吻合度 60%; 中医: 主证(1)(3)、次证(1)(4), 吻合度 60%。 Western medicine index: I(1), II(1)(2), V(1) and VI(1), 60% match; Chinese medicine: main evidence (1)(3), secondary evidence (1)(4), 60% match.	
流感性病毒肺炎 Influenza virus pneumonia	甲型 H1N1 流感病毒 Influenza A (H1N1) virus	BALB/c 小鼠、ICR 小鼠 ^[23-25] BALB/c mice, ICR mice	病毒液滴鼻感染/鼻腔内接种病毒 Viral drops for nasal infection/inoculation of virus in the nasal cavity	肺组织单核细胞浸润, 肺重增加, 体重减少。肺指数高。 Mononuclear cell infiltration in lung tissue, increased lung weight, decreased body weight. High lung index.	符合西医指标: I(1)、II(2)及 IV(1), 吻合度 35%; 中医: 主证(1)、次证(2)(4), 吻合度 40%。 In line with Western medicine index: I(1), II(2) and IV(1), 35% match; Chinese medicine: primary evidence (1), secondary evidence (2)(4), 40% match.
H3N2 流感病毒 ^[27-28] H3N2 influenza virus	SPF 级 BALB/c 小鼠雌性 ^[26] SPF grade female BALB/c mice	高脂饲料+病毒滴鼻+游泳 30 min High-fat feed + virus nose drops + swimming for 30 min	符合湿热证型病毒性肺炎的特征。 Consistent with the characteristics of damp-heat evidence of viral pneumonia.	符合西医指标: I(1)(2)、II(2)、IV(1)、V(1)及 VI(1), 吻合度 65%; 中医: 主证(1)(2)(3)、次证(2)(4), 吻合度 80%。 Western medicine index: I(1)(2), II(2), IV(1), V(1) and VI(1), 65% match; Chinese medicine: primary evidence (1)(2)(3), secondary evidence (2)(4), 80% match.	
麻疹/疱疹病毒 Measles/ herpes virus	SPF 级雌性 BALB/c 小鼠、雪貂 SPF grade female BALB/c mice, ferrets	病毒液滴鼻感染 Viral fluid drops for nasal infection	明显的上呼吸道感染的症状, 与人感染季节性流感病毒后的症状相似。 Obvious symptoms of upper respiratory tract infection, similar to those seen in people infected with seasonal influenza virus.	符合西医指标: I(1)、II(2)、V(1)及 VI(1), 吻合度 45%; 中医: 主证(1)(2)(3)、次证(1), 吻合度 70%。 Western medicine indexes were met: I(1), II(2), V(1) and VI(1), with 45% agreement; Chinese medicine: primary evidence (1)(2)(3), secondary evidence (1), with 70% agreement.	
马疱疹病毒 1 型 (EHV-1) 马鼻肺炎 ^[29] Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) equine rhinopneumonia	2~3 岁伊犁母马 2~3 years old Ili mare	鼻内喷雾 (超声雾化器) 感染病毒 Virus infection by intranasal spray (ultrasonic nebulizer)	临床体征观察能更好地体现动物发病的严重程度。 Clinical signs observation gives a better indication of the severity of the animal's illness.	符合西医指标: I(1)、II(1)、III(1)、IV(1)、V(1)及 VI(1), 吻合度 65%; 中医: 主证(1)(3)、次证(1)(4), 吻合度 60%。 Western medicine index: I(1), II(1), III(1), IV(1), V(1) and VI(1), 65% match; Chinese medicine: primary evidence (1)(3), secondary evidence (1)(4), 60% match.	
HCMV 人巨细胞病毒感染 ^[30] HCMV human cytomegalovirus infection	BALB/c 雌性小鼠 BALB/c female mice	尾静脉注射的方式接种 HCMV 病毒悬液 Inoculation of HCMV virus suspension by tail vein injection	出现典型的急性间质性肺炎症状。 Presence of typical symptoms of acute interstitial pneumonia.	符合西医指标: I(1)、II(1)、III(1)、IV(1)、V(1)及 VI(1), 吻合度 65%; 中医: 主证(1)(3)、次证(1)(4), 吻合度 60%。 Western medicine index: I(1), II(1), III(1), IV(1), V(1) and VI(1), 65% match; Chinese medicine: primary evidence (1)(3), secondary evidence (1)(4), 60% match.	

续表 3

模型分类 Model classification	造模动物 Modeling animals	造模方法 Moulding method	模型特点/表现 Model characteristics	与临床病症特点的吻合度 Consistency with clinical disease characteristics
SARS ^[31]	恒河猴 Rhesus monkey	病毒气管内接种 Intratracheal inoculation of virus	没有出现类似人类的临床症状,只有部分体温升高。 There were no human-like clinical signs and only partial elevation of body temperature.	符合西医指标:I(1)、III(1)、IV(1)及V(1),吻合度 40%;中医:主证(1)(2)、次证(2),吻合度 50%。 Western medicine index: I(1), III(1), IV(1) and V(1), 40% match; Chinese medicine: main evidence (1)(2), secondary evidence (2), 50% match.
冠状病毒 Coronavirus	hACE2 转基因小鼠 ^[32] hACE2 transgenic mice	鼻内接种 Intranasal inoculation	模型出现明显的肺部病变。 Model showed significant lung lesions.	符合西医指标:I(1)、II(2)、III(1)、V(1)及VI(1),吻合度 55%;中医:主证(1)(2)、次证(4),吻合度 50%。 Western medicine index: I(1), II(2), III(1), V(1) and VI(1), 55% match; Chinese medicine: main evidence (1)(2), secondary evidence (4), 50% match.
COVID-19	叙利亚金仓鼠/叙利亚仓鼠 ^[33-34] Syrian Golden Gopher	鼻腔内接种 Intranasal inoculation	出现类似于人体轻度感染的症状。 Appearance of symptoms similar to a mild human infection.	符合西医指标:I(1)、II(1)(2)、IV(1)及VI(1),吻合度 60%;中医:主证(3)、次证(4),吻合度 30%。 Western medicine index: I(1), II(1)(2), IV(1) and VI(1), 60% coincidence; Chinese medicine: primary evidence (3), secondary evidence (4), 30% coincidence.
	恒河猴 ^[35] Rhesus monkey	气管内、鼻内、眼和口服联合接种 Combined intratracheal, intranasal, ocular and oral vaccination	复制出与 COVID-19 患者病情相似的模型。 Replication of a model with a condition similar to that of COVID-19 patients.	符合西医指标:I(1)(2)、II(1)(2)、III(1)、IV(1)及VI(1),吻合度 80%;中医:主证(1)(3)、次证(1)(4),吻合度 60%。 Western medicine index: I(1)(2), II(1)(2), III(1), IV(1) and VI(1), 80% match; Chinese medicine: primary evidence (1)(3), secondary evidence (1)(4), 60% match.
呼吸道合胞病毒性肺炎 Respiratory syncytial virus pneumonia	Wistar 大鼠 ^[36] 、雌性豚鼠 ^[37] Wistar rats, female guinea pigs	鼻腔接种 RSV Long 株病毒 Nasal inoculation of RSV Long strain virus solution	肺泡壁明显增厚,肺间质可见大量淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性细胞浸润。 Alveolar wall was significantly thickened, and a large number of lymphocytes, plasma cells and eosinophils were seen in the interstitium.	符合西医指标:I(1)(2)、II(1)、IV(1)及VI(1),吻合度 55%;中医:主证(2)(3)、次证(1)(4),吻合度 60%。 Western medicine indexes: I(1)(2), II(1), IV(1) and VI(1), with a match of 55%; Chinese medicine: primary evidence (2)(3), secondary evidence(1)(4), with a match of 60%.
腺病毒 ADV ^[38] Adenovirus	3 型腺病毒感染 Adenovirus type 3 infection	滴鼻、静脉和纤维支气管镜复合接种方式 Combined nasal drip, intravenous and fiberoptic bronchoscopy inoculation methods	体温升高、体重下降;组织病理切片显示肺部出现腺病毒感染典型的间质性肺炎。 Increased body temperature and weight loss; histopathological sections showed interstitial pneumonia typical of adenovirus infection in the lungs.	符合西医指标:I(1)、II(1)(2)、IV(1)及VI(1),吻合度 60%;中医:主证(1)(2)(3)、次证(4),吻合度 70%。 Western medicine index: I(1), II(1)(2), IV(1) and VI(1), 60% match; Chinese medicine: main evidence (1)(2)(3), secondary evidence (4), 70% match.
腺病毒 ADV	3 型和 55 型腺病毒感染 Type 3 and 55 adenovirus infections	HAAdv3 和 HAAdv55 野生型腺病毒滴鼻 HAAdv3 and HAAdv55 wild-type adenovirus nasal drops	与感染患者病程相似,具有一定的模拟性。 Course of the disease is similar to that of infected patients, with some mimicry.	符合西医指标:I(1)、II(1)、III(1)、IV(2)及VI(1),吻合度 50%;中医:主证(2)(3)、次证(1)(4),吻合度 60%。 Western medicine index: I(1), II(1), III(1), IV(2) and VI(1), 50% match; Chinese medicine: main evidence (2)(3), secondary evidence (1)(4), 60% match.

4 讨论

VP 发病原因相对于其它疾病而言较为单一,多为自身正气不足即抵抗力下降复而外感风邪导致病毒入侵引起肺部病变,但分型种类较多。目前对于病毒性肺炎诊断重要的标准为临床表现是预兆,X 线影像学检查判断病变与否,病原学(咽拭子检测)与细胞病理学特征结合确定具体病变情况,

辅助以血清抗体检测。为了深入研究不同病毒引起的肺炎疾病情况,建立合适的动物模型十分有必要,结合上文中西医诊断标准对现有的动物模型进行评价分析,计算与临床症状的吻合度,深入思考各种模型的优势、不足,有望得到吻合度较高的 VP 动物模型。VP 造模方法主要有 3 大类:单纯引入病毒法(经鼻滴入病毒模型、鼻腔接种动物模型、尾静脉注射病毒法)、复合接种法(气管内、鼻内、眼和口

服联合接种;滴鼻、静脉和纤维支气管镜复合接种方式)以及中医证候模型(高脂饲料+病毒滴鼻+游泳 30 min)。

根据中西医诊断标准的赋值,我们评价了模型的吻合度,可以看到,与西医诊断标准吻合度较高的为气管内、鼻内、眼和口服联合接种 COVID-19 病毒肺炎动物模型(80%)、经鼻滴入 H5N1 病毒液肺炎动物模型(70%)、高脂饲料+病毒滴鼻+游泳 30 min 引起的湿热证型病毒性肺炎(65%)、尾静脉注射的方式接种 HCMV 病毒悬液(65%)、鼻内喷雾(超声雾化器)感染病毒肺炎动物模型(65%);与中医诊断标准吻合度较高的为:高脂饲料+病毒滴鼻+游泳 30 min 引起的湿热证型病毒性肺炎(80%)、滴鼻、静脉和纤维支气管镜复合接种 ADV 肺炎模型(70%)、H3N2 流感病毒滴鼻肺炎模型(70%)。综合来看,高脂饲料+病毒滴鼻+游泳 30 min 引起的湿热证型病毒性肺炎模型中西医临床吻合度较高,且有文献^[26,39]证明该模型动物能够表现发热、咽痛、咳嗽、鼻塞流涕、呼吸困难等人类病毒性肺炎临床特征,且肺组织病理变化明显,气道上皮细胞脱落、支气管黏膜下及气管壁周围有大量炎性细胞浸润,病毒性肺炎湿热证型;同样产生的烦躁不安,心悸失眠等现象与 VP 疾病特征极其相似。复合接种法模型也具有较好的临床吻合度,但该模型操作较为复杂,目前存在引起宿主免疫反应、导致感染细胞丢失以及外源基因表达短暂等问题,且感染受体的差异性对于模型研究制约较大,有待于进一步完善^[40-41]。其余几种模型的中西医临床吻合度不能有较强的正向关系,因此复制出更符合中医特征的病证结合 VP 动物模型是今后的重要任务。

VP 现代医学动物模型较为简单且完备,目前已有模型更偏向于西医模型,只有较少涉及中医证候模型,无法体现中医药辨证论治特点。近些年来临床上中医证候逐渐扩大,复制出更符合中西医病证结合特点的模型将有助于深入了解 VP 疾病的复杂病因病机,为进一步完善临床治疗研究提供思路,为研发药物提供实验基础。

参考文献:

- [1] 徐哲, 赵磊, 姜天俊, 等. 病毒性肺炎 [J]. 传染病信息, 2020, 33(1): 41-44.
- [2] Kao KC, Chiu LC, Hung CY, et al. Coinfection and mortality in pneumonia-related acute respiratory distress syndrome patients with bronchoalveolar lavage: a prospective observational study [J]. Shock, 2017, 47(5): 615-620.
- [3] Burk M, El-Kersh K, Saad M, et al. Viral infection in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur Respir Rev, 2016, 25(140): 178-188.
- [4] 姜清华, 李莉. 清热平喘汤配合推拿治疗风热闭肺型小儿重症病毒性肺炎临床研究 [J]. 国医论坛, 2017, 32(4): 28-31.
- [5] Feng L, Li Z, Zhao S, et al. Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in China, 2009-2013 [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99419.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 253-279.
- [7] 姚艳红, 路明, 刘燕娥, 等. 病毒性肺炎的流行对肺癌患者的影响和思考 [J]. 中国肺癌杂志, 2020, 23(4): 255-260.
- [8] 陈河雨, 陈滢宇. 中医药治疗病毒性肺炎临床研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(5): 747-751.
- [9] 车艳娇, 庞立健, 吕晓东, 等. 中医药科学防治病毒性肺炎的思路和方法 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 5922-5926.
- [10] 张思依, 吕文亮. 中医药防治病毒性肺炎的临床研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2020, 22(4): 125-129.
- [11] 朱文玲. 内科疾病诊断与疗效标准 [M]. 上海: 上海中医药大学出版社; 2006.
- [12] 唐路宁, 田文艳, 廖仁昊. 内科常见病诊断及治疗 [M]. 西安: 第四军医大学出版社; 2008.
- [13] 王贺新, 王正, 郑瑞, 等. 病毒性肺炎影像学诊断研究现状 [J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2021, 30(3): 77-84.
- [14] 田硕, 曹利华, 苗明三, 等. 基于临床中西医病症特点的中医药动物模型评价新方法 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 165-169.
- [15] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
- [16] 汪受传, 陈争光, 徐珊. 小儿病毒性肺炎中医诊疗指南 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(4): 304-308.
- [17] 陆权, 王雪峰, 钱渊, 等. 儿童病毒性肺炎中西医结合诊治专家共识(2019 年制定) [J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(10): 801-807.
- [18] 余学庆, 李建生, 王至婉, 等. 肺炎证候诊断标准的初步建立 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(6): 1273-1277.
- [19] 黎东明, 赖天文, 邓少嫦, 等. 恒河猴 H5N1 禽流感病毒性肺炎模型建立及其发病机制 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(8): 806-811.
- [20] 赵宏霞. H₅N₁ 高致病性禽流感病毒性肺炎动物模型建立及其发病机理相关研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [21] 邓巍, 许黎黎, 鲍琳琳, 等. 雪貂感染 H7N9 禽流感病毒动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1): 68-71, 14.
- [22] 朱华, 许黎黎, 鲍琳琳, 等. H7N9 禽流感病毒小鼠感染动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1): 18-21, 8.
- [23] 高慧, 肖芙蓉, 许小珍, 等. 草血竭纯化部分对小鼠甲型 H1N1 流感的疗效 [J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(7):

- 606-609.
- [24] 姚荣妹, 毛鑫, 曲天歌, 等. 喘可治注射液对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株致小鼠肺炎的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 43-49.
- [25] 刘通, 徐红日, 王成祥, 等. 白头翁抗流感病毒 FM₁ 所致肺炎炎症损伤的网络药理学分析及实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5867-5876.
- [26] 季旭明, 庄凌云, 崔有利, 等. 三仁汤对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1287-1289, 1537-1538.
- [27] 姜静. H3N2 流感病毒鼠肺适应株及其动物模型的建立 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [28] 鲍琳琳, 占玲俊, 邓巍, 等. 雪貂感染流感病毒 H3N2 动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 5-9, 86.
- [29] 车传忠, 鲍子磊, 胡月, 等. 马疱疹病毒 1 型感染马疾病模型的建立及评价 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(6): 2196-2203.
- [30] 庄晓亮, 木朝宇, 俞俊岭, 等. HCMV 急性间质性肺炎小鼠模型的建立 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(9): 1214-1217.
- [31] 鲜巧阳, 唐志佼, 王勇. 气管内接种病毒在建立 SARS 动物模型中的应用 [A]. 第五届中国中南地区实验动物科技论坛论文集汇编 [C]. 海南: 中国实验动物学会; 2005.
- [32] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. Nature, 2020, 583(7818): 830-833.
- [33] Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden syrian hamster model; implications for disease pathogenesis and transmissibility [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(9): 2428-2446.
- [34] Sia SF, Yan LM, Chin AWH, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters [J]. Nature, 2020, 583(7818): 834-838.
- [35] Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease and virus shedding in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 [J]. bioRxiv, 2020, 2020: 001628.
- [36] 曲百娜, 黄燕, 崔振泽, 等. RSV 感染幼龄大鼠肺组织 TSLP 与 Th2 反应的相关性分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(9): 1366-1370.
- [37] 杨婷, 屈波, 董晓斐. 哮喘对哮喘豚鼠 IL-6、TNF- α 的调节作用研究 [J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(7): 144-146.
- [38] 李潇, 冯立强, 李润峰, 等. 人腺病毒和流感病毒动物模型的建立及应用研究 [Z]. 广东: 广州医科大学附属第一医院, 2018-07-13.
- [39] 毕倩宇, 张桂菊, 崔有利, 等. 甘露消毒丹对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1840-1844.
- [40] 孙西魁, 刘兴龙, 冯立强. 人腺病毒感染动物模型的研究进展 [J]. 病毒学报, 2016, 32(6): 810-816.
- [41] 王玉泉, 马立宾, 于秋莲. 动物腺病毒载体的研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2009, 24(2): 180-183.

[收稿日期]2022-11-01

孕鼠免疫新冠灭活疫苗和免疫后感染对子代小鼠行为学的影响

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的 SARS-CoV-2 肺炎的大流行已经给全球公共卫生和医疗系统带来了巨大的压力和灾难性后果。孕妇感染新型冠状病毒后罹患重症的风险较高,不仅可能导致早产、流产等不良妊娠结局,还可能增加婴儿产后感染的概率,但是出于对孕妇和胎儿的保护,新冠灭活疫苗的研发未将孕妇列入 III 期临床试验。由于新冠灭活疫苗是一款全新的疫苗,有关其在妊娠期的安全性和有效性的数据有限,导致孕妇对接种疫苗心存顾虑,而动物疾病模型的相关研究可以为临床上孕妇及育龄期女性接种新冠灭活疫苗提供参考。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所的研究人员,结合前期的研究结果:孕鼠接种新冠疫苗后能够产生免疫反应,孕鼠免疫和免疫后感染其子代生长发育未表现出异常,出生时的组织病理学结果显示子代主要脏器包括后代小鼠大脑、脑干发育均未见明显异常,进一步研究了孕鼠免疫和免疫后感染对子代行为学的影响。本实验以 SARS-CoV-2 易感的 hACE2 孕鼠为研究对象,结果显示在旷场实验及 Morris 水迷宫实验中,F1 代成年后自由活动未受影响,并且具有良好的空间参考和学习记忆能力,提示 F0 代免疫和免疫后感染,其 F1 代成年后行为学能力未受影响,罹患神经精神疾病的风险未增加。

综上所述,本实验以 SARS-CoV-2 易感的 hACE2 孕鼠为研究对象,通过旷场实验和 Morris 水迷宫实验研究 F1 代小鼠成年后的自由活动行为、空间参考和学习记忆能力,旨在为临床上孕妇及育龄期女性接种新冠灭活疫苗提供参考。

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, 5(5): 430-435; <https://doi.org/10.1002/ame2.12261>)。

陈文璐, 闫晓如, 高继萍, 等. 肠道菌群在抑郁症发生中的调控机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 130-135.

Chen WL, Yan XR, Gao JP, et al. Research progress on the regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence of depression [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 130-135.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.017

肠道菌群在抑郁症发生中的调控机制研究进展

陈文璐¹, 闫晓如¹, 高继萍¹, 宋国华^{1,2*}

(1.山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001;

2.山西医科大学精神卫生学院, 太原 030001)

【摘要】 抑郁症已成为最常见的精神疾病, 其发病率逐年上升, 病因尚不明确, 因此, 迫切需要探索抑郁症的发病机制, 继而寻找相应的治疗手段。近年来, 随着抑郁症相关研究的不断增加, 肠道菌群成为抑郁症发病机制研究的新热点, 其能够通过多种途径直接或间接地影响大脑的功能, 调节压力、焦虑和抑郁等行为。本综述就肠道菌群与抑郁症动物模型实验研究和临床实验研究的联系、肠道菌群在抑郁症发生发展中的可能调控机制和益生菌的抗抑郁作用机制进行阐述, 以期对肠道菌群治疗抑郁症提供新的理论依据。

【关键词】 抑郁症; 肠道菌群; 益生菌; 调控机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0130-06

Research progress on the regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence of depression

CHEN Wenlu¹, YAN Xiaoru¹, GAO Jiping¹, SONG Guohua^{1,2*}

(1. Laboratory Animal Center, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Animal Model of Human Disease, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China. 2. School of Mental Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Depression has become the most common mental illnesses. Its incidence is increasing yearly and the cause remains unclear. Therefore, it is urgent to explore the pathogenesis of depression and find treatments. In recent years with the continuous increase of research related to depression, intestinal flora have become a new research hotspot in the pathogenesis of depression. Intestinal flora directly and indirectly affect brain functions through various mechanisms and regulate behaviors such as stress, anxiety and depression. This review discusses the relationship between intestinal flora and studies of animal models and clinical depression, the possible regulatory mechanism of intestinal flora in the occurrence and development of depression, and the anti-depressant mechanism of probiotics to provide a new theoretical basis for the treatment of depression by intestinal flora.

【Keywords】 depression; intestinal flora; probiotics; regulatory mechanism

【基金项目】 山西省卫健委“四个一批”科技兴医创新计划(2020SYS10); 山西省卫健委卫生健康科研课题(2021031)。

【作者简介】 陈文璐(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: chenwenlu199@163.com

【通信作者】 宋国华(1973—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@sxmu.edu.cn

抑郁症的临床表现为情绪低落、认知障碍和思维迟缓等,并且往往具有较高的发病率、复发率以及自杀率。数据显示,全球抑郁症患者已累计超过 3.5 亿,抑郁症已逐渐发展成为最常见的一种精神疾病,是当今重要的精神卫生问题^[1-2]。抑郁症作为一种多病因异质性的精神疾病,其发病机制尚不明确,脑内分子异常学说作为代表性学说用以探索抑郁症的发病机制,但社会环境、炎症因子和神经活动等许多复杂的因素都参与了抑郁症的发生发展^[3-4]。

越来越多的证据表明,在维持人类身体健康和防治各种疾病中,肠道菌群起着至关重要的作用,其对大脑功能的适当发展和维持也至关重要,存在于各种精神和神经疾病中^[4-5]。大量研究证明,肠道微生物区系紊乱作为抑郁症发生的潜在病因,通过微生物-肠-脑轴影响大脑的功能和行为,调节压力、焦虑和认知^[4,6]。由此可见,肠道菌群在调节抑郁症发生发展中发挥着重要的作用,该综述旨在对肠道菌群与抑郁症之间的联系、肠道菌群在抑郁症发生发展中的可能调控机制以及益生菌的抗抑郁作用机制进行阐述。

1 肠道菌群的概念

肠道菌群是人体肠道中一个复杂而庞大的微生物群落,主要由变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门构成,饮食、药物和疾病等因素都会影响肠道微生物的菌群分型,从而在体内形成不同的肠道微生态^[7]。依据肠道菌群对宿主的利弊关系不同,可将其详细划分为益生菌、中性菌和病原菌 3 大类,因此维持肠道菌群的稳定和平衡对有效维护人体健康尤为重要^[8]。

2 肠道菌群与抑郁症的联系

2.1 肠道菌群与抑郁症动物模型实验研究

近年来,抑郁症动物模型的相关实验研究越来越多,研究表明,肠道菌群和抑郁症存在密切联系。在不同方式诱导的抑郁动物模型中常伴随着肠道菌群的变化。通过分析斯皮尔曼(spearman)相关系数可知,肠道菌群的变化与抑郁样行为和抑郁相关指标有关^[9]。实验表明,慢性不可预知温和应激(CUMS)诱导的抑郁小鼠模型改变了肠道菌群的组成,主要表现为肠道菌群的多样性及丰富度发生了改变^[10]。另有研究发现,脂肪量和肥胖相关基因

(*Fto*)敲除小鼠表现为乳酸杆菌丰度增加,卟啉单胞菌科和螺杆菌含量较低,这些肠道微生物群的变化可减少 *Fto* 敲除小鼠的焦虑和抑郁样行为^[11]。Li 等^[12]研究 CUMS 大鼠的抑郁样症状和改变的粪便代谢物之间的潜在相关性时,发现肠道菌群的改变可能通过肠道代谢物的改变影响 CUMS 大鼠的抑郁样症状。与无特定病原体(SPF)大鼠相比,将抑郁患者的粪便微生物群移植到无菌(GF)啮齿类动物中会导致动物抑郁样行为的改变^[13]。Zheng 等^[14]研究抑郁样猕猴模型发现,抑郁样猕猴肠道菌群表现出的厚壁菌门紊乱与其抑郁样行为密切相关。综上所述,肠道菌群与抑郁症之间存在密切联系。

2.2 肠道菌群与抑郁症临床实验研究

为了更好地说明肠道菌群与抑郁症之间存在的联系,仅仅有动物模型实验研究还不够,还需结合大量的临床实验研究。口服益生菌有助于调节人体内的肠道微生物群组成,进而影响抑郁症状的发生。Messaudi 等^[15]将志愿者分为两组:益生菌制剂(PF)组和安慰剂(PL)组,PF 组 30 d 内联合服用瑞士乳杆菌 R0052 和长双歧杆菌 R0175,结果显示,经 PF 治疗的受试者的抑郁相关量表评分降低,说明口服益生菌能改善受试者的抑郁样症状。Slykerman 等^[16]研究发现在妊娠期和产后补充益生菌鼠李糖乳杆菌 HN001,可以减少孕妇的产后抑郁症状。大量证据显示,抑郁症患者存在明显的肠道菌群紊乱,表现为菌群多样性的减少,细菌的相对丰度发生明显改变^[17]。抑郁症患者在接受标准治疗之外,加以益生菌(如丁酸梭菌 MIYAIRI588)的辅助治疗,可有效改善抑郁症患者的菌群紊乱,从而产生显著的抗抑郁效果^[18-19]。综上所述,肠道菌群与抑郁症之间存在密切联系。

3 肠道菌群在抑郁症研究中潜在的调控机制

3.1 肠菌调控编码或非编码 RNA 影响抑郁症

生物体中的核糖核酸(RNA)种类繁多,功能复杂,一般按照是否编码蛋白质将其分为编码 RNA(coding RNA)和非编码 RNA(ncRNA)两大类。肠道菌群的缺失或失调均会导致中枢神经系统中 mRNA 和 ncRNA 的异常表达,进而引发神经精神疾病^[20-21]。因此,越来越多的研究通过 GF 小鼠、SPF 小鼠以及肠道微生物重定植无菌(CGF)小鼠等进行动物实验,证明了肠道菌群调控 mRNA 和 ncRNA 的表达水平,其在抑郁症的机制研究中具有重要

意义。

3.1.1 肠菌调控编码 RNA 影响抑郁症

mRNA 在转录过程中的异常表达与抑郁症的发病机制密切相关,表明 mRNA 在抑郁症的发生发展中可能具有重要作用^[22]。研究发现,肠道菌群失调主要通过改变相应基因的表达来干扰 RNA 转录和转录后调节^[21]。大量实验研究发现,肠道菌群调控大脑基因的转录,主要表现为 GF 小鼠海马 mRNAs 的差异表达以及 SPF 小鼠海马 mRNAs 的异常表达,表明肠道菌群显著影响小鼠海马 mRNAs 的表达水平,进而影响海马功能^[20,23]。海马作为情绪产生和调节的关键脑区,几十年来一直被认为在抑郁症的发病机制中起着关键作用^[24]。因此,肠道菌群可能通过调控海马 mRNAs 的表达水平影响海马的功能,进而在抑郁症的发生发展中发挥重要作用。

3.1.2 肠菌调控非编码 RNA 影响抑郁症

ncRNA 可大致分为两大类,即组成性 ncRNA 和调控性 ncRNA,其中调控性 ncRNA 主要指:微小 RNA(microRNA, miRNA)、环状 RNA(circRNA)和长链非编码 RNA(lncRNA)。肠道菌群主要作用于调控性 ncRNA,来调节抑郁症的发生发展。

大脑中的 microRNA 含量丰富,其调节神经元的发育和功能,可通过 3 种不同但相互关联的方式促进神经可塑性和记忆^[25]。研究发现,重度抑郁症患者接受抗抑郁药物治疗后,不同分型 miRNAs 的外周水平平均发生了变化^[25-26]。益生菌 VSL#3 可增加放线杆菌和拟杆菌的相对丰度,其通过上调 miR-146a 的表达,阻断 BTG2/Bax 轴改善术后认知功能障碍小鼠的认知功能^[27-28]。大量研究表明,阻断小胶质细胞的激活对治疗抑郁症至关重要。实验发现,miR-146a 表达的上调抑制脂多糖(LPS)和 CUMS 诱导的抑郁样小鼠海马区小胶质细胞的激活,并下调神经炎症相关蛋白的表达,从而改善小鼠的抑郁样行为^[29]。鉴于此,提示肠道菌群可通过调控 microRNA 的表达调节海马区小胶质细胞的激活状态,进而影响抑郁症的发生发展。

circRNA 在大脑中大量表达,在神经元突触中高度活跃,其对维持大脑健康至关重要,并在神经疾病中发挥着重要作用。环状 STAG1(circSTAG1)和环状 HIPK2(circHIPK2)的异常表达与星形胶质细胞功能障碍有关,而星形胶质细胞功能障碍在抑郁症中起关键作用^[30],因此 circRNA 可能参与调控抑郁症。观察慢性不可预知应激(CUS)诱导的抑郁

样小鼠模型发现,血浆和海马中 circSTAG1 的过表达和 circHIPK2 的下调均可逆转 CUS 诱导的星形胶质细胞功能障碍并显著减轻抑郁样行为^[31-32]。CUS 诱导的抑郁样小鼠肠道中厚壁菌、变形菌和拟杆菌的相对丰度发生改变,其与 circHIPK2 的表达水平相关,而 NLRP3 敲除小鼠粪便微生物移植可改善 CUS 小鼠的菌群紊乱,进而调控 circHIPK2 的表达并逆转星形胶质细胞的功能障碍,最终改善小鼠的抑郁样行为^[32]。因此,肠道菌群调控 circRNA 的表达水平调节星形胶质细胞的功能,对抑郁症的发生发展具有重要意义。

lncRNA 在中枢神经系统中高度表达,抑郁症患者 lncRNAs 的表达下调,抗抑郁治疗 6 周后,下调的 lncRNAs 得到明显的改善^[33]。与 SPF 小鼠相比,lncRNAs 在 GF 和 CGF 小鼠的海马区表达存在差异,说明肠道菌群对小鼠海马 lncRNA 具有重要的调控作用^[23]。GF 小鼠海马区差异表达的 lncRNAs 大多与环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)信号通路有关^[28],而 CREB 又是多条与抑郁症发生以及抗抑郁相关的细胞信号转导通路的交汇点,所以 CREB 及其信号通路与抑郁症密切相关^[34]。因此,肠道菌群可能通过调控小鼠海马 lncRNA 的表达水平影响 CREB 及其信号通路的正常功能,由此对抑郁症的发生过程产生调控作用。

3.2 肠菌调控不同信号通路影响抑郁症

近年来关于菌群-肠-脑轴与抑郁症的研究越来越多,参与其中的细胞信号转导通路也不断被发现,大量研究表明肠道菌群可以通过调控各种细胞信号转导通路,对抑郁症发挥重要的调控作用。肠道菌群可通过调控脑源性神经营养因子、核转录因子 κ B 和 Toll 样受体 4 及相关信号通路影响抑郁症的发生发展。

3.2.1 脑源性神经营养因子及其信号通路

脑源性神经营养因子(BDNF)是一种广泛表达于人脑的神经营养因子,是大脑发育中不可或缺的营养因子。Meta 分析指出,抑郁症患者的 BDNF 水平显著降低^[35]。酪氨酸激酶受体 B(TrkB)作为 BDNF 的特异性受体,与 BDNF 结合激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶信号通路,这些信号通路均参与抑郁症的发生发展^[36]。干酪乳杆菌干预通过激活 BDNF-TrkB 信号转导通路,抑制额叶皮质细胞外信号调节激酶 1/2(EKR1/2)和 p38

的磷酸化,逆转 CUMS 诱导的大鼠肠道菌群结构变化,从而有效地改善 CUMS 诱导的大鼠抑郁样行为^[37]。丁酸梭菌的治疗不仅增加了肠道菌群的物种多样性,还激活了小鼠海马中 BDNF 介导的磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路,从而改善 LPS 诱导的小鼠抑郁样行为^[28,38]。因此,肠道菌群可以通过调控 BDNF 信号通路影响抑郁症的发生发展。

3.2.2 核转录因子 κ B 及其信号通路

核转录因子 κ B (NF- κ B) 是一种普遍存在的转录因子,也是 NF- κ B 信号通路中最关键的分子。研究发现,在抑郁样小鼠模型中,抑制其 NF- κ B 信号通路,不仅可以下调 NF- κ B 的表达,还可通过阻断 p65 的磷酸化来逆转促炎细胞因子的增加和抗炎细胞因子的减少,来缓解大脑的炎性反应,进而发挥抗抑郁作用^[38]。益生菌(罗伊氏乳杆菌 NK33、青春型双歧杆菌 NK98 和格氏乳杆菌 NK109)通过逆转大肠杆菌 K1 诱导的肠道菌群失调,抑制小鼠海马区 NF- κ B 的激活,有效避免了大脑炎性反应的发生,减轻了 K1 诱导的认知障碍和抑郁样行为^[39-40]。因此,肠道菌群可能直接或间接调控 NF- κ B 信号通路,调节抑郁症的发生发展。

3.2.3 Toll 样受体 4 及其信号通路

Toll 样受体 (TLR) 是一种模式识别受体,TLR4 可通过两条通路,即髓系分化蛋白 88 (MyD88) 和 β 干扰素 Toll 样受体结构域衔接蛋白 (TRIF) 依赖的信号通路,发挥相应作用^[41]。TLR4 信号通路的变化存在于抑郁症患者及抑郁动物模型的外周循环系统或中枢神经系统中,且其与抑郁症免疫炎症过程关系密切^[42]。研究发现,小柴胡汤可逆转伴有抑郁症状的结直肠癌小鼠和患者的部分肠菌失调,使 TLR4 和 MyD88 的表达水平显著降低,同时减轻炎症反应^[43]。该研究说明肠道菌群可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路对癌症患者的抑郁症状发挥重要作用。对 LPS 诱导的抑郁小鼠进行德氏乳杆菌治疗,可逆转 LPS 小鼠大脑中 TLR4 mRNA 和 TLR4 蛋白表达的增加,进而抑制 TLR4 信号传导,显著减轻脑内炎症反应,发挥抗抑郁作用^[44]。因此,肠道菌群影响抑郁症的发生发展可能通过调控 TLR4 信号通路来实现。

4 益生菌的抗抑郁作用

益生菌是可对机体产生有益作用的活性微生物,

其主要由双歧杆菌属、乳杆菌属和兼性厌氧球菌组成^[45]。越来越多的研究表明,益生菌与抑郁症防治有关,主要通过调节免疫系统、内分泌系统以及中枢神经系统来实现^[46]。

服用益生菌可以使慢性轻度应激诱导的抑郁样小鼠海马中的促炎细胞因子 (IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α) 水平和吲哚胺 2,3-双加氧酶-1 蛋白水平降低,从而缓解认知障碍和抑郁等症状^[40,47],表明益生菌可能通过调节免疫炎症反应改善抑郁症。由于慢性应激诱导的抑郁样小鼠下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴功能亢进,而长双歧杆菌婴儿菌株 CCFM1025 可以通过抑制促肾上腺皮质激素释放因子、促肾上腺皮质激素和皮质酮分泌水平的升高来逆转应激诱导的 HPA 轴过度活化^[48],鉴于此,益生菌可能通过逆转 HPA 轴的功能亢进来治疗抑郁症。益生菌调节中枢神经系统发挥抗抑郁作用,主要与五羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA) 以及脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达有关。干酪乳杆菌和双歧杆菌均可使不同脑区的 5-HT 和 DA 浓度显著升高,进而改善应激诱导的大鼠抑郁样行为^[37,49]。慢性应激诱导的抑郁样大鼠给予瑞士乳杆菌 NS8,大鼠海马区 BDNF mRNA 的表达显著增加,进而产生抗抑郁作用^[50]。基于此,益生菌可能通过调节免疫炎症反应、HPA 轴功能以及中枢神经系统产生显著的抗抑郁作用。

5 总结和展望

肠道菌群与抑郁症发生密切相关,肠道菌群通过调控编码 RNA、非编码 RNA 以及各种信号通路,不仅可以调节海马、小胶质细胞以及星形胶质细胞的功能,而且可以调节 BDNF 的表达水平以及与抑郁症相关的免疫炎症反应,最终影响抑郁症的发生发展。目前临床上广泛使用的抗抑郁药物常伴有严重的副作用,且对一些难治性抑郁症和共病抑郁症的治疗效果仍欠佳,所以寻求新型抗抑郁药物迫在眉睫。由于益生菌没有明显的副作用,不仅可以逆转抑郁症引起的肠道菌群失调,而且可以通过调节免疫系统、内分泌系统以及中枢神经系统产生显著的抗抑郁作用。鉴于此,肠道菌群有望成为抑郁症治疗的一个新靶点,益生菌制剂有望成为一种新型抗抑郁药物,未来仍需不断进行探索,为抑郁症的发病机制研究及治疗提供更充分的证据。

参考文献:

[1] Guo Y, Sun J, Hu S, et al. Hospitalization costs and financial

- burden on families with children with depression: a cross-section study in Shandong Province, China [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(19): 3526.
- [2] Liu Q, He H, Yang J, et al. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: findings from the Global Burden of disease study [J]. *J Psychiatr Res*, 2020, 126: 134-140.
- [3] Slavich GM, Sacher J. Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: extending social signal transduction theory of depression to account for sex differences in mood disorders [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2019, 236(10): 3063-3079.
- [4] 叶飞, 郑鹏, 谢鹏. 抑郁症肠道微生物组紊乱假说的现状与展望 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 654-657.
- [5] Li Z, Zhu H, Zhang L, et al. The intestinal microbiome and Alzheimer's disease: a review [J]. *Animal Model Exp Med*, 2018, 1(3): 180-188.
- [6] Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, et al. Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(46): 15490-15496.
- [7] 卢明, 刘蕾, 刘婧, 等. 肠道微生物菌群分型的研究进展 [J]. *中国微生态学杂志*, 2020, 32(3): 345-351.
- [8] 周谷成, 肖义军. 肠道微生物与人体健康 [J]. *生物学通报*, 2019, 54(1): 11-13.
- [9] Zhang M, Li A, Yang Q, et al. Beneficial effect of alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. on CUMS-induced depression model mice via modulating gut microbiota [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 665159.
- [10] Li H, Wang P, Huang L, et al. Effects of regulating gut microbiota on the serotonin metabolism in the chronic unpredictable mild stress rat model [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2019, 31(10): e13677.
- [11] Sun L, Ma L, Zhang H, et al. *Fto* deficiency reduces anxiety- and depression-like behaviors in mice via alterations in gut microbiota [J]. *Theranostics*, 2019, 9(3): 721-733.
- [12] Li J, Jia X, Wang C, et al. Altered gut metabolome contributes to depression-like behaviors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *Transl Psychiatry*, 2019, 9(1): 40.
- [13] Yang Z, Li J, Gui X, et al. Updated review of research on the gut microbiota and their relation to depression in animals and human beings [J]. *Mol Psychiatry*, 2020, 25(11): 2759-2772.
- [14] Zheng P, Wu J, Zhang H, et al. The gut microbiome modulates gut-brain axis glycerophospholipid metabolism in a region-specific manner in a nonhuman primate model of depression [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(6): 2380-2392.
- [15] Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects [J]. *Br J Nutr*, 2011, 105(5): 755-764.
- [16] Slykerman RF, Hood F, Wickens K, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: a randomised double-blind placebo-controlled trial [J]. *EBioMedicine*, 2017, 24: 159-165.
- [17] 柯程仁, 叶兰仙. 青少年肠道菌群特征及益生菌对其抑郁症影响的研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(9): 855-859.
- [18] Miyaoka T, Kanayama M, Wake R, et al. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 as adjunctive therapy for treatment-resistant major depressive disorder: a prospective open-label trial [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2018, 41(5): 151-155.
- [19] Reininghaus EZ, Platzer M, Kohlhammer-Dohr A, et al. PROVIT; supplementary probiotic treatment and vitamin B7 in depression-a randomized controlled trial [J]. *Nutrients*, 2020, 12(11): 3422.
- [20] Chen JJ, Zeng BH, Li WW, et al. Effects of gut microbiota on the microRNA and mRNA expression in the hippocampus of mice [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 322: 34-41.
- [21] Liu L, Wang H, Yu Y, et al. Microbial regulation of a lincRNA-miRNA-mRNA network in the mouse hippocampus [J]. *Epigenomics*, 2020, 12(16): 1377-1387.
- [22] An T, He ZC, Zhang XQ, et al. Baduanjin exerts anti-diabetic and anti-depression effects by regulating the expression of mRNA, lincRNA, and circRNA [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 3.
- [23] Zhou C, Rao X, Wang H, et al. *Hippocampus*-specific regulation of long non-coding RNA and mRNA expression in germ-free mice [J]. *Funct Integr Genomics*, 2020, 20(3): 355-365.
- [24] Rao X, Liu L, Wang H, et al. Regulation of gut microbiota disrupts the glucocorticoid receptor pathway and inflammation-related pathways in the mouse *Hippocampus* [J]. *Exp Neurobiol*, 2021, 30(1): 59-72.
- [25] Hu Z, Jiang Y, Huo X, et al. Prospective role of microRNAs in depression [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(32): 3508-3521.
- [26] Penner-Goeke S, Binder EB. Epigenetics and depression [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2019, 21(4): 397-405.
- [27] Tang W, Meng Z, Li N, et al. Roles of gut microbiota in the regulation of hippocampal plasticity, inflammation, and *Hippocampus*-dependent behaviors [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 611014.
- [28] Mao L, Zeng Q, Su W, et al. Elevation of miR-146a inhibits BTG2/BAX expression to ameliorate postoperative cognitive dysfunction following probiotics (VSL#3) treatment [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(7): 3457-3470.
- [29] Liu CP, Zhong M, Sun JX, et al. miR-146a reduces depressive behavior by inhibiting microglial activation [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 463.
- [30] Gan H, Lei Y, Yuan N, et al. Circular RNAs in depression: Biogenesis, function, expression, and therapeutic potential [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111244.
- [31] Huang R, Zhang Y, Bai Y, et al. N⁶-methyladenosine modification of fatty acid amide hydrolase messenger RNA in circular RNA STAG1-regulated astrocyte dysfunction and

- depressive-like behaviors [J]. *Biol Psychiatry*, 2020, 88(5): 392-404.
- [32] Zhang Y, Huang R, Cheng M, et al. Gut microbiota from NLRP3-deficient mice ameliorates depressive-like behaviors by regulating astrocyte dysfunction via circHIPK2 [J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 116.
- [33] Cui X, Sun X, Niu W, et al. Long non-coding RNA: potential diagnostic and therapeutic biomarker for major depressive disorder [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 5240-5248.
- [34] 施学丽, 李玲, 曹智怡, 等. CREB 信号通路及抗抑郁中药关系的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(3): 349-352.
- [35] Shi Y, Luan D, Song R, et al. Value of peripheral neurotrophin levels for the diagnosis of depression and response to treatment: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2020, 41: 40-51.
- [36] 胡莺燕, 洪武, 方贻儒. 脑源性神经营养因子及其信号通路及与抑郁症 [J]. *上海精神医学*, 2009, 21(3): 185-187.
- [37] Gu F, Wu Y, Liu Y, et al. *Lactobacillus casei* improves depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by the BDNF-TrkB signal pathway and the intestinal microbiota [J]. *Food Funct*, 2020, 11(7): 6148-6157.
- [38] Lim DW, Park J, Han D, et al. Anti-inflammatory effects of Asian fawn lily (*Erythronium japonicum*) extract on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3809.
- [39] Han SK, Kim JK, Joo MK, et al. *Lactobacillus reuteri* NK33 and *Bifidobacterium adolescentis* NK98 alleviate *Escherichia coli*-induced depression and gut dysbiosis in mice [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(8): 1222-1226.
- [40] Yun SW, Kim JK, Lee KE, et al. A probiotic *Lactobacillus gasseri* alleviates *Escherichia coli*-induced cognitive impairment and depression in mice by regulating IL-1 β expression and gut microbiota [J]. *Nutrients*, 2020, 12(11): 3441.
- [41] Figueroa-Hall LK, Paulus MP, Savitz J. Toll-like receptor signaling in depression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2020, 121: 104843.
- [42] 汪露, 陈晋东. TLR4 信号通路及与抑郁症的研究进展 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(6): 725-729.
- [43] Shao S, Jia R, Zhao L, et al. Xiao-Chai-Hu-Tang ameliorates tumor growth in cancer comorbid depressive symptoms via modulating gut microbiota-mediated TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2021, 88: 153606.
- [44] Qiu X, Wu G, Wang L, et al. *Lactobacillus delbrueckii* alleviates depression-like behavior through inhibiting toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in mice [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(5): 366.
- [45] 刘晓芳, 钦佩, 黄晓东. 益生菌及其制剂的研究和应用 [J]. *食品与药品*, 2019, 21(6): 514-517.
- [46] 郑少君, 王志仁, 王永前, 等. 益生菌防治抑郁症的研究进展 [J]. *国际精神病学杂志*, 2019, 46(1): 24-26, 33.
- [47] Li N, Wang Q, Wang Y, et al. Oral probiotics ameliorate the behavioral deficits induced by chronic mild stress in mice via the gut microbiota-inflammation axis [J]. *Front Behav Neurosci*, 2018, 12: 266.
- [48] Tian P, Zou R, Song L, et al. Ingestion of *Bifidobacterium longum* subspecies infantis strain CCFM687 regulated emotional behavior and the central BDNF pathway in chronic stress-induced depressive mice through reshaping the gut microbiota [J]. *Food Funct*, 2019, 10(11): 7588-7598.
- [49] 罗国帅, 杨建立, 王承展, 等. 双歧杆菌对大鼠抑郁样行为及单胺神经递质的影响 [J]. *天津医科大学学报*, 2016, 22(5): 401-405.
- [50] Heidarzadeh-Rad N, Gökmen-Özel H, Kazemi A, et al. Effects of a psychobiotic supplement on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressive patients: a *Post hoc* analysis of a randomized clinical trial [J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2020, 26(4): 486-495.

[收稿日期] 2021-09-03

柴华锋,王珂,宋淑亮. 抗新型冠状病毒的药物治疗 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 136-141.

Chai HF, Wang K, Song SL. Drug treatment against coronavirus disease 2019 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 136-141.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.018

抗新型冠状病毒的药物治疗

柴华锋¹, 王珂^{2,3}, 宋淑亮^{2*}

(1.邹平市精神卫生中心,山东 邹平 256200;2.山东大学海洋学院,山东 威海 264209;
3.长治医学院附属和平医院,山西 长治 046500)

【摘要】 目前,新型冠状病毒在全球肆意蔓延,隐匿周期长,传播性强,感染率高,严重影响着人们的生活质量。而抗病毒药物种类繁多、作用特点不尽相同,应用于新冠肺炎的临床治疗缺乏确切证据,不良反应发生率相对较高。本文对小分子抗病毒药物、大分子生物药物、中药等治疗新冠肺炎药物的作用机制、临床应用、用法用量、治疗药物监测及不良反应等方面进行综述,以期为新冠肺炎的合理用药提供参考。

【关键词】 新型冠状病毒;抗病毒药物;合理用药;大分子生物药物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0136-06

Drug treatment against coronavirus disease 2019

CHAI Huafeng¹, WANG Ke^{2,3}, SONG Shuliang^{2*}

(1. Zouping Mental Health Center, Zouping 256200, China. 2. Marine College, Shandong University, Weihai 264209.
3. Heping Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi 046500)

【Abstract】 Currently, coronavirus disease 2019 (COVID-19), with its long hiding cycle and high infection rate, is spreading rapidly around the world and is seriously affecting people's quality of life. There are a wide variety of antiviral drugs with different activity characteristics used for COVID patients; however, there is a lack of definitive evidence on the best clinical treatment for COVID-19, and the incidence of adverse reactions is relatively high. This article reviews the mechanisms of action, clinical application, usage and dosage, and monitoring of therapeutic drugs and the adverse reactions of small-molecule antiviral drugs, macromolecular biological drugs, traditional Chinese medicine, and other drugs for the treatment of coronary pneumonia. The information aims to provide a reference for rational drug use to treat coronary pneumonia.

【Keywords】 COVID-19; antiviral drugs; rational drug administration; macromolecular biopharmaceuticals.

由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引发的COVID-19已在全球迅速蔓延,对公众身心健康构成巨大威胁,被世界卫生组织宣布为突发公共卫生事件^[1]。其传播性强、变异速度快、人群易感、严重威胁人类的生命和健康^[2]。新冠肺炎是一种新的病毒性传染病,症状从早期的发热、咳嗽、乏力到严重的呼吸

困难、肺炎,进展为多器官衰竭和死亡^[3]。截止2022年4月5日,中国累计确诊病例158793例,累计死亡病例4638例^[4]。

随着对新冠病毒认识的不断加深和治疗经验的积累,新冠肺炎的诊疗方案也在不断更新,其中包括小分子抗病毒药物利巴韦林、干扰素、磷酸氯喹、阿比多尔、奈玛特韦片/利托那韦片等;大分子

[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目(ZR2017MH040)。

[作者简介] 柴华锋(1970—),男,专科,主管药师,研究方向:临床药学。E-mail: zpchaihuafeng@163.com

[通信作者] 宋淑亮(1981—),男,硕士,高级实验师,硕士研究生导师,研究方向:心血管疾病。E-mail: songshuliang@sdu.edu.cn

生物抗病毒药物托珠单抗、COVID-19 人免疫球蛋白、康复者恢复期血浆、安巴韦单抗注射液(BR11-196)/罗米司韦单抗注射液(BR11-198);以及中药连花清瘟胶囊、疏风解毒胶囊、清肺排毒汤等药物疗法。由于年龄、性别、基础疾病、药物因素、遗传因素等多方面的影响,即使服用相同药物,每位患者的疗效也千差万别。因此临床药师需要综合考量每位病人特点,推荐最适宜的药物,促进临床科学合理用药^[5]。

抗新型冠状病毒治疗过程中存在着一定的用药风险,如注射剂雾化使用、剂量过大、疗程较长、治疗窗窄、相互作用等问题。因此,在临床用药过程中,医师和药师应当根据个体间药物代谢、药效、不良反应的差异,制定出最适宜的诊疗方案。本文结合不同抗病毒药物的药理学特点,分析探讨其临床应用价值,以期为患者指定科学的个体化用药方案,使抗病毒药物在发挥最佳治疗效果的同时,减少不良反应的发生。

1 小分子抗病毒药物

1.1 利巴韦林

利巴韦林是一种活性强、耐药率低、广谱的抗病毒药物,通过特异性抑制 RNA 聚合酶,抑制 RNA 病毒复制,干扰病毒转录从而发挥抗病毒作用^[6]。

利巴韦林因其良好的体外抗病毒活性而被推荐用于治疗 COVID-19。对 COVID-19 重症病例分析,利巴韦林静脉滴注 500 mg,每日 2~3 次,核酸阴转率、病死率、住院天数等方面无显著差异,表明利巴韦林对于严重新冠肺炎成人患者,无明显疗效^[7],更有患者出现脏器损害表现,转氨酶、胆红素、肌酐水平短时间内迅速升高,并出现血红蛋白水平下降的现象^[8]。而利巴韦林与干扰素联合治疗对 COVID-19 患者也无明显疗效^[9]。此外,有患者使用利巴韦林导致发生急性和严重高尿酸血症的可能性增加^[10]。故不推荐临床使用。

1.2 干扰素

干扰素(IFN)有 α 、 β 、 γ 3 种,IFN- α 是国际公认的较好的抗病毒药物。IFN- α 可增强机体免疫调节功能,激活免疫细胞,抑制病毒侵袭过程^[11]。

在新冠肺炎治疗过程中,干扰素多为联合用药,有研究表明,COVID-19 患者早中期使用干扰素二联疗法,能加快患者症状消退速度且治疗后免疫力增强,转阴率也显著升高^[12]。干扰素口服无效,

须注射给药。但是我国目前尚无 IFN- α 雾化制剂,多为 IFN- α 针剂雾化,注射液中的辅料可能会刺激支气管,从而诱发支气管痉挛、哮喘等不良反应出现^[13]。因此在治疗过程中需警惕不良反应的发生,一旦发生应立即停药,吸氧等对症治疗。

1.3 磷酸氯喹

氯喹为弱碱性药物,可改变内吞体酸碱度值,抑制经内吞途径侵入细胞的病毒,从而发挥抗病毒作用。近年来研究表明,氯喹对冠状病毒有一定抑制作用。但氯喹的治疗窗窄,发挥疗效剂量为 10 mg/kg,20 mg/kg 的剂量即被认为有毒,最小致死量为 30 mg/kg。

羟氯喹较氯喹增加了一个羟基基团,药效相当,但羟氯喹安全性相对较高,目前对 COVID-19 具有潜在疗效,尤其针对普通型患者整体治疗效果较好,可升高病毒转阴率,降低重症转化率^[14]。随着研究深入,发现羟氯喹可导致严重的心律失常,使患者病死率增高。2020 年 7 月,世界卫生组织已停止了羟氯喹治疗新冠肺炎的相关试验^[15]。氯喹、羟氯喹对新冠肺炎的治疗价值存在较大争议,故不推荐使用。

1.4 阿比多尔

阿比多尔可阻断病毒基因穿入细胞核而抑制病毒 DNA 和 RNA 合成^[16]。2020 年 2 月份,科研院士李兰娟团队研究发现,阿比多尔在较低浓度 10~30 μmol 时可以有效抑制冠状病毒^[17]。临床数据表明在新冠早期治疗中使用阿比多尔,可以减轻患者症状、减少并发症发生概率、降低抗菌药物使用率,改善病情,尽早康复^[18-19]。

但是在阿比多尔用药中也发现了新的、严重的不良反应。有报道指出新型冠状病毒肺炎患者口服阿比多尔后,出现红色丘疹^[20]。余珊等^[21]研究表明新冠肺炎患者口服阿比多尔颗粒,出现舌麻木的药物不良反应。因此在使用过程中应密切观察患者的症状体征,定期根据患者自身情况进行血常规、心电图的检查^[22]。

1.5 帕克洛维(Paxlovid)

2021 年 11 月 22 日,美国食品药品监督管理局(FDA)紧急授权(EUA)批准美国辉瑞制药公司治疗新冠病毒肺炎新药奈玛特韦(nirmatrelvir)片联用病毒蛋白酶增强药利托那韦(ritonavir)片共包装盒 Paxlovid 上市^[23]。2022 年 3 月 14 日,修订的新冠肺炎诊疗中国指南第九版中加入 Paxlovid 片,该药

作用于 SARS-CoV-2 主要蛋白酶,抑制该酶介导的蛋白质前体加工,抑制病毒复制,减少轻度或中度患者进展为重症,大大降低病死率^[24]。奈玛特韦为目前报道的病毒载量下降最快的药物,不同浓度奈玛特韦处理支气管上皮细胞,EC50 为 62 nmol/L 表明其具有显著的抗新冠病毒活性,对新冠病毒的以下变异株 α 、 γ 、 δ 、 λ 、Mu 和 Omicron 均能产生相似的抗病毒活性,体内小鼠,人体临床实验尚未发现严重不良反应^[25]。临床上数据有限,期待其能安全有效地应用于患者,成为疫情防控的新选择。

此外,一些其他小分子抗病毒药物治疗新冠肺炎也取得一定疗效,详情见表 1。

小分子药物大多为老药新用,针对性不足,疗效有限,其副作用明显,目前 WHO、国家药监局不继续推荐(单独)使用。帕克洛维在新型冠状病毒的防治中,发挥着积极的作用,不良反应与其他抗病毒药物相比少、轻、可控、不易发生耐药,安全性高,在临床上被优先选择。

2 大分子生物抗病毒药物

托珠单抗因阻断 IL-6 升高应用于 COVID-19 重型及危重型患者。一些医院报道指出,托珠单抗治疗重症新冠肺炎患者可缓解临床症状,降低死亡率,但也因阻断 IL-6 升高增加引起“细胞因子风暴”的可能性^[29]。所以说托珠单抗对病毒感染来说是“双刃剑”,重症患者是否适合应用及什么时机应用对于临床医师药师来说都是一种挑战。此外,有生育能力的妇女应在该药治疗期间及之后 3 个月内进行有效避孕;轻度肾功能损伤患者(肌酐清除率不小于 50~80 mL/min)无须调整托珠单抗剂量;中度或重度肾功能损伤患者需谨慎选用该药^[30]。

康复者恢复期血浆,血浆疗法的有效成份是特异性强的中和抗体,属于被动免疫疗法,是由人体免疫系统产生的,可以有效阻止病毒感染细胞。主要适用于重型、危重型的 COVID-19 患者。短时间内使用高滴度的血浆,有助于提高患者核酸转阴率,减少进一步传播的风险,减缓病情,防止疾病加重,阻断疾病进展^[23]。临床使用过程中,应注意输注中出现的轻微、自限,过敏反应以及血栓栓塞等事件。在患者救治时机的选择及疗程,需要更多高质量、大样本的数据研究进一步验证。

静注 COVID-19 人免疫球蛋白,系用 SARS-

CoV-2 感染后康复者恢复期血浆,能有效中和体内病毒,促进疾病恢复,其抗 SARS-CoV-2 总抗体效价比恢复期血浆高 3 倍^[31]。因此第八版诊疗方案中指出“静注 COVID-19 人免疫球蛋白可应急用于病情进展较快的普通型和重型患者”。静注 COVID-19 人免疫球蛋白(pH 4),在血浆亚甲蓝光照病毒灭活的基础上,经过低 PH 孵化病毒灭活法和纳米膜除病毒两种方法,安全性较高,应用于临床可缩短患者的阳性持续时间,降低炎症反应^[32]。

安巴韦单抗注射液(BRII-196)/罗米司韦单抗注射液(BRII-198),该联合用药由清华大学、深圳市第三人民医院和腾盛博药合作研发,美国 FDA 对该抗体针对的变异毒株活性鉴定,结果表明 BRII-196/BRII-198 对新冠病毒 α 、 γ 、 δ 、 λ 、Mu 和 Omicron 均保持敏感^[33]。2021 年 12 月 8 日,国家药品监督管理局应急批准注册申请,是首个中国自主知识产权新冠病毒中和抗体联合治疗药物^[34]。该抗体在临床试验研究中表明该药能在疾病进展高风险的新冠肺炎门诊患者中,使住院及死亡的复合终点风险降低 80%^[35]。

大分子生物抗病毒药物,在目前新冠病毒治疗过程中取得良好疗效。但是由于血浆来源有限,不能广泛使用。中和抗体可以特异性地与新冠病毒 S 蛋白结合,从而阻断 S 蛋白与宿主细胞受体 ACE2 的结合,抑制病毒感染人体细胞。因此,中和抗体有望成为新冠强效药。寻找 COVID-19 的单克隆抗体对于赢得抗击疫情至关重要。对抗病毒药物进行系统阐述详见表 2。

3 中药

中医药文化博大精深,也是我国的传统医学,此次抗击新冠肺炎中中药以其良好的疗效得到世界卫生组织的关注和认可。从第一版到第九版新冠肺炎诊疗方案,均要求发挥中医药作用,加强中西医结合治疗。其中清肺排毒汤、连花清瘟胶囊等对改善 COVID-19 患者症状起到了积极作用^[36]。

清肺排毒汤由麻黄、炙甘草、生石膏、杏仁等组成,具有抗病毒、解热、调节免疫等多种药理作用,对 COVID-19 患者体外有寒湿、体内有淤热等情况可通过多成分、多靶标对机体进行整体调控^[37]。尤其是 COVID-19 中免疫力低下的老年患者或并发基础疾病的患者,西药联合清肺排毒汤治疗可增加患者免疫力,提高转阴率,减缓症状^[37-39]。

表 1 一些抗病毒药物的作用对比
Table 1 Comparison of some antivirals drugs

药物名称 Drug name	法匹拉韦 ^[26] Favipiravir	瑞德西韦 ^[27] Remdesivir	洛匹那韦/利托那韦 ^[28] LPV/RTV
药代动力学 Pharmacokinetics	体外抗流感病毒半数有效浓度 3~20 μmol/L <i>In vitro</i> anti-influenza virus half effective concentration 3~20 μmol/L	半衰期为 0.39 h $T_{1/2} = 0.39$ h	半衰期为 5~6 h, 表观清除率为 6~7 L/h $T_{1/2} = 5\sim 6$ h, apparent clearance 6~7 L/h
作用机制 Mechanism	抑制病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,可阻断病毒 RNA 的复制和转录 Inhibits viral RNA-dependent RNA polymerase, which blocks viral RNA replication and transcription	竞争内源性三核苷酸磷酸,使病毒 RNA 合成受阻 Competes for endogenous trinucleotide phosphates, blocking viral RNA synthesis	通过对新型冠状病毒内肽酶 C30 的抑制而发挥抗病毒作用 Antiviral effect through inhibition of novel coronavirus endopeptidase C30
适应症 Indications	成人新型病毒或再次流行的流感 Novel virus or re-emerging influenza in adults	尚无数据 No data yet	重型新冠肺炎 Severe COVID-19
不良反应 Adverse reactions	血尿酸增加,腹泻 Increased blood uric acid, diarrhea	低血压,心脏骤停 Hypotension, cardiac arrest	腹泻、恶心、呕吐;房室传导阻滞及心肌梗死的风险 Diarrhea, nausea, vomiting; atrioventricular block and risk of myocardial infarction

表 2 部分新冠药物效果评价
Table 2 Evaluation of the efficacy of some coronavirus disease 2019 drugs

已上市或临床试验数据较好的药物 For drugs that have been marketed or have good clinical trial data	WHO、国家药监局不继续推荐(单独)使用或目前临床试验结果无效的药物 WHO and the State Food and Drug Administration do not continue to recommend (single) use or drugs whose current clinical trial results are ineffective
帕克洛维 Paxlovid	利巴韦林、干扰素 Ribavirin, interferon
康复者恢复期血浆 Convalescent plasma	磷酸氯喹、羟氯喹 Chloroquine phosphate, Hydroxy-chloroquine
静注 COVID-19 人免疫球蛋白 Intravenous COVID-19 human immune globulin	阿比多尔 Arbidol
安巴韦单抗注射液/罗米司韦单抗注射液 BRII-196/BRII-198	法匹拉韦、瑞德西韦、洛匹那韦/利托那韦 Favipiravir, Remdesivir, Lopinavir/Ritonavir

连花清瘟胶囊由银翘散合麻杏石甘汤化裁而来,其基础和临床疗效研究均显示可用于治疗 COVID-19。已有报道指出,连花清瘟可改善患者发热、咳嗽、乏力、气促、肺部湿罗音等新冠疾病相关症状;同时可以降低患者转重症的比例;对于疑似患者也可改善临床症状^[40-43]。值得注意的是,连花清瘟胶囊中多寒凉性药物,尤其在服药后约 30 min,可诱发患者腹胀、腹泻等胃肠道问题,空腹服药时不良反应症状更明显^[44]。

疏风解毒胶囊由虎杖、连翘、甘草、柴胡、板蓝根等 8 味药材组成,具有清热解毒、疏风解表的功效。主要针对疾病的早期,已有报道表明西药联合疏风解毒胶囊治疗 2 周,患者症状消减,肺部影像学情况改善、核酸转阴时间缩短,明显优于单纯西药治疗^[45-46]。金花清感颗粒主要成分包括黄芩、连翘、薄荷和甘草等,可以缩短病毒脱落时间,在我国

已用于治疗 COVID-19 患者,但其作用机制尚不清楚,临床试验研究已经系统评价金花清感颗粒治疗新冠肺炎具有良好疗效、较高安全性^[47-48]。

此外,研究表明一些中药注射剂血必净注射液、双黄连口服液,中药方剂化湿败毒方、宣肺败毒方等也都可用于治疗新冠肺炎。中医药通过辨证论治,整体化治疗 COVID-19 患者,早期服用可增强患者免疫力,快速退热,缓解症状,还能预防病情进一步恶化,降低危重患者死亡率,使恢复期患者更快康复^[49]。

4 结语与展望

新冠肺炎作为人类面临的新的疾病,给科研工作者带来巨大的挑战。由于 COVID-19 尚无特效药,目前多为经验性用药。“老药新用”不失为一种好的方法,在抢救患者生命后,我们更需关注药物

的不良反应,尤其是新的严重的不良反应。由于时间紧,疫情重,这些药物虽然已应用于新冠肺炎的临床治疗,但还需更进一步的研究提供确切证据,我们应总结抗击疫情的临床方案,深入探索,调整部分药物的使用剂量和疗程,以期更好地服务临床、服务患者。

新冠病毒传播迅速,不断出现新突变株,积极探索病毒的治疗方式和开发高效安全的抗病毒新药仍是严峻挑战。目前为奥密克戎株流行期,我国建立精准防控体系,坚持动态清零,及时调整防控方案和免疫策略。免疫学研究显示接种三针国产灭活疫苗可增强免疫系统中和抗体的能力,显著降低奥密克戎感染者疾病的严重程度。疫苗的上市推广给人类带来了曙光,研发出广谱、便捷、低成本的“特效药”对有效防控新冠疫情具有重要意义。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院首次建立新冠肺炎恒河猴模型,当选“中国生命科学十大进展”[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 138.
- [2] 薛岳进, 屈彬, 邵瑞, 等. 基于网络药理学分析宣肺败毒方治疗 SARS、MERS 和 COVID-19 的作用机制[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(12): 2473-2487.
- [3] 瞿韦坤, 唐超, 郝树立, 等. 疏风解毒胶囊联合阿比多尔治疗新型冠状病毒肺炎临床疗效观察[J]. 中国处方药, 2021, 19(3): 6-8.
- [4] World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard [EB/OL]. [2022-10-21]. <https://covid19.who.int>.
- [5] 王晖, 徐晓芳, 李荣. 治疗药物监测在环孢素 A 个体化给药中的应用及研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(6): 707-713.
- [6] 张泽华, 王乔宇, 赵志刚. 利巴韦林治疗新型冠状病毒等病毒性疾病的应用评价与药学监护[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(7): 721-725.
- [7] Gong W, Zhou T, Wu S, et al. A retrospective analysis of clinical efficacy of ribavirin in adults hospitalized with severe COVID-19 [J]. J Infect Chemother, 2021, 27(6): 876-881.
- [8] 雷贤英, 高晓岚, 刘勇, 等. 利巴韦林抗病毒治疗致重症新冠肺炎患者 1 例不良反应报道[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(11): 1971-1974.
- [9] Li H, Xiong N, Li C, et al. Efficacy of ribavirin and interferon-alpha therapy for hospitalized patients with COVID-19: A multicenter, retrospective cohort study [J]. Int J Infect Dis, 2021, 104: 641-648.
- [10] Sakran R, Frisch A, Elias A, et al. Acute and severe ribavirin-associated hyperuricemia and acute kidney injury: An underrecognized adverse effect [J]. Am J Health Syst Pharm, 2021, 78(9): 794-799.
- [11] 王教顺, 邓治邦, 袁晓民. 干扰素诱导跨膜蛋白抗病毒感染研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2019, 47(6): 81-86.
- [12] 刘玉梅. 阿比多尔联合 α -干扰素雾化吸入治疗新冠肺炎效果及对核酸、抗体 IgM 转阴率影响[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(9): 1499-1501.
- [13] 周帆, 张莹, 李维亮, 等. 重组人干扰素 α 1b 雾化吸入治疗新型冠状病毒肺炎的回顾性临床研究[J]. 中国药物应用与监测, 2020, 17(4): 218-222.
- [14] 陈军, 刘丹萍, 刘莉, 等. 硫酸羟氯喹治疗 2019 冠状病毒病 (COVID-19) 普通型患者的初步研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2020, 49(2): 215-219.
- [15] Stasi C, Fallani S, Voller F, et al. Treatment for COVID-19: An overview [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 889: 173644.
- [16] Xu R, Cui B, Duan X, et al. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV [J]. Int J Oral Sci, 2020, 12(1): 11.
- [17] 苏广胜, 谷秀. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 抗病毒药物治疗进展[J]. 疑难病杂志, 2020, 19(6): 548-551.
- [18] 曹迪. 阿比多尔抗病毒治疗研究进展[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(8): 718-722.
- [19] Han W, Quan B, Guo Y, et al. The course of clinical diagnosis and treatment of a case infected with coronavirus disease 2019 [J]. J Med Virol, 2020, 92(5): 461-463.
- [20] 熊培, 边原, 唐曦婷, 等. 阿比多尔致新型冠状病毒肺炎患者皮疹[J]. 药物不良反应杂志, 2020, 22(6): 373-374.
- [21] 余珊, 吴倪, 王芊入, 等. 盐酸阿比多尔颗粒致新型冠状病毒肺炎疑似患者舌麻木 1 例[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 919-920.
- [22] 孙希力, 张洁. 新型冠状病毒肺炎试用药物阿比多尔的临床应用研究进展[J]. 中国处方药, 2022, 20(1): 188-190.
- [23] 吴迪, 林芬, 陈晓红, 等. 恢复期血浆治疗快速进展重型新型冠状病毒肺炎二例并文献复习[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2022, 3(1): 33-43.
- [24] 张竞文, 胡欣, 赵紫楠, 等. 新冠病毒治疗药物奈玛特韦片/利托那韦片的作用机制和临床研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(10): 845-850.
- [25] 陈本川. 治疗新型冠状病毒肺炎新药—奈玛特韦 (nirmatrelvir) 片与利托那韦片组合用药 Paxlovid [J]. 医药导报, 2022, 41(7): 1073-1079.
- [26] 张竞文, 胡欣, 金鹏飞. 法匹拉韦治疗新型冠状病毒肺炎的可行性分析[J]. 中国药业, 2020, 29(6): 20-24.
- [27] 乔欢, 孙超. 潜在抗病毒药物瑞德西韦研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2020, 39(3): 141-145.
- [28] 文亨军, 陈秀琴, 魏占杰, 等. 克力芝联合糖皮质激素治疗重型新冠肺炎 2 例并文献复习[J]. 甘肃科技, 2020, 36(23): 98-101, 139.
- [29] 张媛媛, 钟艳艳, 王丽芹, 等. 托珠单抗治疗新型冠状病毒肺炎之商榷[J]. 临床药物治疗杂志, 2020, 18(9): 68-70.
- [30] 郑洁, 闫抗抗, 王焱. 免疫疗法治疗重症新冠肺炎合理性及药学监护探讨[J]. 中国药业, 2020, 29(24): 35-39.
- [31] 邢延涛, 韩韧, 梁小龙, 等. COVID-19 康复者恢复期血浆及 COVID-19 静注人免疫球蛋白的 IgG 亚类检测分析[J]. 国

- 际生物制品学杂志, 2021, 44(4): 181-185.
- [32] 宋美华, 张婷玉, 葛子若, 等. 静注 COVID-19 人免疫球蛋白 (pH 4) 治疗新型冠状病毒肺炎的疗效观察 [J]. 中国药物警戒, 2021, 1118(10): 905-909.
- [33] 金凤. 首款新冠特效药获批 [J]. 仪器仪表用户, 2021, 28(12): 49.
- [34] 杨婧, 荣文婉, 桓瑜, 等. 2021 年新冠病毒变异、跨种传播及疫苗和药物研究热点回眸 [J]. 科技导报, 2022, 40(1): 132-149.
- [35] 单思思, 王若珂, 张绮, 等. 安巴韦单抗注射液 (BRII-196) 及罗米司韦单抗注射液 (BRII-198) 中国首个自主知识产权新冠病毒中和抗体联合治疗药物 [J]. 中国医药导刊, 2022, 24(1): 2-8.
- [36] 任秀华, 祁星星, 左琴, 等. 方舱医院 813 例新型冠状病毒肺炎患者治疗用药分析 [J]. 医药导报, 2020, 39(7): 926-930.
- [37] 王晶亚, 李慧珍, 郭玉娜, 等. 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗老年新型冠状病毒肺炎 157 例临床疗效回顾性研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(20): 1788-1794.
- [38] 焦丽雯, 郭玉娜, 宗星煜, 等. 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗新型冠状病毒肺炎合并 2 型糖尿病患者 49 例回顾性临床研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(19): 1709-1714.
- [39] 张磊, 王芳, 马艳, 等. 清肺排毒汤联合西医常规疗法治疗新型冠状病毒肺炎合并心脑血管疾病 124 例回顾性研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(19): 1702-1708.
- [40] 吕睿冰, 王文菊, 李欣. 中药莲花清瘟治疗新型冠状病毒肺炎疑似病例 63 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2020, 61(8): 655-659.
- [41] 姚开涛, 刘明瑜, 李欣, 等. 中药莲花清瘟治疗新型冠状病毒肺炎的回顾性临床分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 8-12.
- [42] 程德忠, 李毅. 莲花清瘟颗粒治疗 54 例新型冠状病毒肺炎患者临床分析及典型病例报道 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 150-154.
- [43] 吕睿冰, 王文菊, 李欣. 中药莲花清瘟治疗新型冠状病毒肺炎疑似病例 63 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2020, 61(8): 655-659.
- [44] 熊微, 冉京燕, 谢雪佳, 等. 治疗新型冠状病毒肺炎中成药的药理作用与临床应用 [J]. 医药导报, 2020, 39(4): 465-476.
- [45] 颜成果, 闪海霞, 裴旭东, 等. 疏风解毒胶囊联合 α -干扰素和阿比多尔治疗普通型新型冠状病毒肺炎的疗效和安全性分析 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(3): 475-480.
- [46] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 疏风解毒胶囊治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的基础研究及抗 COVID-19 中药新药研发思路 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2273-2282.
- [47] Zhang Q, Cao F, Wang Y, et al. The efficacy and safety of Jinhua Qinggan granule (JHQG) in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. Medicine, 2020, 99(24): e20531.
- [48] 张佳莹, 李丽, 汪晓军, 等. 金花清感颗粒治疗成人新型冠状病毒肺炎患者的多中心前瞻性队列研究 [J]. 北京医学, 2021, 43(9): 866-870.
- [49] 黄俊, 李雄文, 李剑鹏, 等. 痰热清注射液联合 α -干扰素治疗新型冠状病毒感染的肺炎的疗效观察 [Z]. 广西: 梧州市第三人民医院, 2020.

[收稿日期] 2022-04-13

(上接第 90 页)

- [19] Magaki S, Mueller C, Dickson C, et al. Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment [J]. Exp Gerontol, 2007, 42(3): 233-240.
- [20] Tsai CL, Erickson KI, Sun HS, et al. A cross-sectional examination of a family history of Alzheimer's disease and ApoE epsilon 4 on physical fitness, molecular biomarkers, and neurocognitive performance [J]. Physiol Behav, 2021, 230: 113268.
- [21] Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases [J]. FEBS Lett, 2000, 483(1): 6-10.
- [22] Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β -peptide clearance in Alzheimer disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(10): a011452.
- [23] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, et al. A protein factor essential for microtubule assembly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975, 72(5): 1858-1862.
- [24] Pedersen JT, Sigurdsson EM. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(6): 394-402.
- [25] Zhang G, Liu A, Zhou Y, et al. Panax ginseng ginsenoside-Rg2 protects memory impairment via anti-apoptosis in a rat model with vascular dementia [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(3): 441-448.
- [26] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656.
- [27] Cui J, Shan R, Cao Y, et al. Protective effects of ginsenoside Rg2 against memory impairment and neuronal death induced by $A\beta_{25-35}$ in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 266: 113466.

[收稿日期] 2021-12-29

赵宁,底婷婷,齐聪,等. 银屑病病证结合模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 142-147.
Zhao N, Di TT, Qi C, et al. Research progress of disease-syndrome combination models of psoriasis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 142-147.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.019

银屑病病证结合模型的研究进展

赵宁¹,底婷婷²,齐聪¹,王亚卓¹,李萍^{2*}

(1.首都医科大学,北京 100071;2.首都医科大学附属北京中医医院
北京市中医药研究所 银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室,北京 100010)

【摘要】 银屑病是一种具有多基因遗传背景的慢性炎症性皮肤病,免疫系统紊乱是银屑病炎症发展和持续的原因,目前认为 IL-23/Th17 轴的过度激活是其主要发病机制。银屑病以红斑、鳞屑、浸润为主要特征,部分患者反复发作,给个人带来巨大的心理和经济负担。2018 版中国银屑病诊疗指南指出,银屑病基本证型为血热证、血瘀证、血燥证、热毒炽盛证、湿热蕴结证、风湿痹阻证,临床治疗需要依据不同证型辨证施治,因此银屑病的病证结合动物模型是研究中医治疗银屑病的重要基础。目前银屑病模型较多,而病证结合动物模型尚未形成体系,不能全面、整体的反映中医“证”的表现。本文对现有的病证结合模型进行了总结,以期能为银屑病辨证论治研究提供较为全面的基础支持。

【关键词】 银屑病;病证结合;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0142-06

Research progress of disease-syndrome combination models of psoriasis

ZHAO Ning¹, DI Tingting², QI Cong¹, WANG Yazhuo¹, LI Ping^{2*}

(1. Capital Medical University, Beijing 100071, China. 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Clinic and Basic Research with Traditional Chinese Medicine on Psoriasis, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010)

【Abstract】 Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease with a polygenic genetic background. Disorder of the immune system is the cause of the development and persistence of psoriasis inflammation. It is believed that overactivation of the IL-23/Th17 axis is the main pathogenesis of psoriasis. Psoriasis is mainly characterized by erythema, scale, and infiltration, and some patients have recurrent attacks, which cause psychological and economic burdens to individuals. The 2018 edition of the Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of psoriasis indicated that the basic syndrome types of psoriasis are blood-heat syndrome, blood stasis syndrome, blood dryness syndrome, heat-toxin syndrome, dampness-heat accumulation syndrome, and rheumatism obstruction syndrome. Clinical treatment needs to be based on the syndrome types of dialectical treatment. Therefore, the disease and syndrome of psoriasis combined with an animal model is an important basis to study traditional Chinese medicine in the treatment of psoriasis. There are many psoriasis models, but a combination of disease and syndrome animal model has not been established, which cannot fully and comprehensively reflect the performance of a traditional Chinese medicine syndrome. This review summarizes the existing disease-syndrome combination models to provide comprehensive basic support for the research of syndrome differentiation and treatment of psoriasis.

【Keywords】 psoriasis; disease-syndrome combination; animal model

[基金项目]北京市自然科学基金面上项目(7212165);国家自然科学基金青年项目(81904199)。

[作者简介]赵宁(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合基础(银屑病方向)。E-mail:871859059@qq.com

[通信作者]李萍(1965—),女,研究员,教授,博士研究生导师,研究方向:中医皮外科疾病临床及基础研究。E-mail:liping@bjzhongyi.com

银屑病是一种以皮肤红斑、鳞屑、丘疹为特征的慢性炎症性皮肤病,其病程较长,且易于复发,对患者的身体健康和精神状况造成很大的影响^[1]。目前银屑病相关动物模型种类较多,包括自发模型、外源诱发模型、异种移植模型、基因工程模型等。对中医研究银屑病来说,建立病证结合模型具有重要意义。一个合格的中医病证结合的银屑病模型,既要具有银屑病的病理特点,又要切合中医证候的特征,能够更好地从中医辨证的角度研究中药的疗效,探讨疾病病理生理变化与中医证候之间的关系,给中医治疗银屑病的基础研究提供支撑。本综述总结了相对稳定的银屑病中医病证结合模型,希望对中医研究银屑病提供基础支撑。

1 银屑病是由免疫介导的炎症性皮肤病

银屑病是一种具有多基因遗传特征的、由 T 淋巴细胞介导的炎症性皮肤病,固有免疫和适应性免疫反应的紊乱是银屑病炎症发展和持续的原因^[2]。银屑病典型表现为皮肤角化过度伴角化不全,颗粒层减少,棘层增厚,表皮突整齐向下延伸,毛细血管扩张、迂曲,并伴有淋巴细胞、中性粒细胞等浸润^[3]。在银屑病的发病过程中,树突状细胞在疾病的起始阶段起主要作用。在早期,多种因素导致角质形成细胞损伤,受损的角质形成细胞释放抗菌肽,包括 LL-37、 β -防御素和 S100 蛋白^[4]。LL-37-自身核苷酸复合物通过 Toll 样受体激活浆细胞样树突细胞,产生 I 型干扰素(干扰素- α 和干扰素- β),促进树突状细胞的成熟,分泌肿瘤坏死因子- α 、IL-23 和 IL-12,后两者分别调节 Th17 和 Th1 细胞亚群的分化和增殖^[5]。通过不同的 T 细胞亚群激活适应性免疫反应是驱动银屑病炎症维持阶段的主要因素^[6]。Th17 细胞分泌细胞因子 IL-17、IL-22、IL-21、IL-6、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 等,破坏角质形成细胞的屏障功能并促进其增殖,增加 I 型干扰素的产生。目前认为 IL-23/TH17 免疫轴是银屑病发病机制中的主要途径,靶向 TNF- α 、IL-23 和 IL-17 以及 JAK/STAT 等信号通路的药物在临床中疗效显著^[7]。银屑病还会产生多种合并症,包括心血管疾病、代谢综合征(肥胖、高血压、血脂紊乱和糖尿病)、慢性肾疾病、胃肠道疾病、情绪紊乱和恶性肿瘤等,这些发病机制是银屑病共病的共同发病机制^[8]。这些相关的并发症在一定程度上增加了银屑病患者的人数,并导致银屑病的慢性病程和复发。

2 银屑病是由外感邪气与人体气血津液相互作用而致病

中医对于银屑病的认识历史悠久,随着现代研究技术的进步,将中医的病机与现代医学的病理生理相结合,构建了中西结合的银屑病病机理论。中医认为银屑病是由内外合邪致病。大多数医家认为本病由风、湿、热、气血等诸多因素掺杂,诸邪郁结于体表,而致营卫失调,气血运行失畅而发病^[9]。

从气血津液辨证来看,“气”的异常可以“化风”也可以“化热”,表现在皮肤上则出现瘙痒、瘾疹、红斑、灼热等;当气的生成不足或耗散过多可出现气虚,导致出血、血滞、血瘀等^[10]。银屑病的分型与治疗常以“血”为切入点,“血”的异常表现为血热、血寒、血瘀、血燥、血虚等^[11]。银屑病患者素体血中蕴热,或性情急躁,七情内伤,气机壅滞,郁久化火;或恣食辛辣肥甘,饮食失节以致脾胃失和,郁而化热;或外邪入侵,损及机体,与气血相搏,常发为血热证,表现为皮肤潮红、出血等。随着病程日久,血热证逐渐转化为血瘀证或血燥证。热盛生毒,热毒壅盛煎熬阴血,日久则瘀血蕴结,经脉阻塞,导致血瘀证,表现为疼痛、肿块、面色黧黑、肌肤甲错;血热毒邪易伤阴血,燔灼津液,又血瘀阻脉,化燥生风,风燥久羁形成血燥,出现皮肤干燥瘙痒^[12]。气血津液相互依存,相互转化,相互制约,往往病理变化也会相互影响。当气虚不能运行津液,津液输布异常,滞于某处,表现为痰饮水湿,出现水肿、渗出等;湿邪积聚日久导致濡润功能异常,表现为干燥、肥厚、结节,可见燥湿并见的表象^[13]。

气血津液与内部脏腑经络相互影响,气血津液的化生依赖于脾胃的运化功能,脾胃的运化功能减弱导致痰浊湿邪停滞积聚^[14-15]。脾虚证银屑病脾虚为本,湿蕴为标。脾气虚衰导致痰饮水湿内生,蕴久热酿成毒,合而致病,共蕴于血分而发于肌表^[16]。素体脾虚者痰湿停滞日久,津液输布不利,发为燥证,燥湿互化致本病迁延不愈^[17]。研究表明,银屑病的复发与加重同患者的情绪与精神压力密切相关,肝郁化火,血热蕴肤;肝郁气滞、血瘀肌肤;肝阴亏虚、血燥风盛;肝脾失和、湿热蕴肤;肝火犯肺、风热外袭,提倡清肝、疏肝、柔肝的治肝之法^[18-19]。银屑病的辨证应将气血津液辨证与脏腑经络辨证结合起来,审查病因,对机体的整体功能状态进行评价,才能对疾病有完整和全面的认识。

3 目前银屑病病证结合模型研究进展

动物模型对疾病的病理机制及药物的治疗作用研究是至关重要的。银屑病病证结合模型不仅表现出角质形成细胞的异常增殖、角化过度伴角化不全、炎性细胞浸润等典型银屑病样改变,同时在多种复合因素的作用下,通过模拟中医病因病机,产生类似相应中医证型的变化,将“病”与“证”相结合,有利于中医药对银屑病治疗作用的研究。

3.1 血热型银屑病及其病证结合模型

银屑病初起多为血热证,病情发展迅速,相当于西医进行期,主要表现为皮损鲜红、皮疹较多新出、鳞屑数量多,常伴有口干舌燥、心烦易怒、大便干结、小便短、舌红、苔薄黄、脉数等血热证的全身表现^[20-21]。

杜欣^[22]采用灌胃干姜、肉桂水煎剂 9 g/kg, 0.2 mL/d, 持续 2 周,并在第 7 天于小鼠背部外涂咪喹莫特乳膏 42 mg, 第 15 天完成血热型银屑病病证结合模型造模,并使用该模型验证了凉血消斑汤能够抑制动物模型急性期的皮肤损伤,改善血热症状,降低体内甲状腺激素的代谢水平,治疗银屑病。

秦刚等^[23]采用给予复方热药(附子、干姜、肉桂)水煎剂灌胃 10 mL/kg, 0.2 mL/d, 连续给药 4 周建立血热证豚鼠模型,模型建立成功后,豚鼠双耳均涂抹 5% 盐酸普萘洛尔乳剂每只耳 0.1 mL, 厚度约 1.0 mm (1 mL = 1 cm³), 每只 10 mg, 每日 2 次, 连续 3 周, 建立血热证银屑病豚鼠模型; 并使用该模型验证了消银片对血热证银屑病豚鼠模型具有较好的治疗作用, 并对免疫系统具有一定的调整作用。

杨大伟等^[24]采用给予干姜、甘草煎煮液灌胃, 剂量为 10 mL/kg, 每天 1 次, 并在大鼠无毛区使用 5% 盐酸普萘洛尔乳剂外涂, 0.3 g/cm², 厚度约为 1.0 mm, 每天 3 次。另外将银屑病血热证大鼠置于固定器中, 垂直照射紫外灯光疗仪灯, 每天 1 次, 每次 1 h, 共 21 d 建立血热证银屑病模型。作者采用此模型明确了土槐丹四物汤加味通过降低大鼠血清中 T3、T4、TNF- α 、IL-17 的表达水平以改善血热证型银屑病的症状^[25]。

血热型银屑病病证结合模型主要是通过中医温阳药水煎剂灌胃联合常规银屑病造模的方法诱导造模(见表 1)。但血热模型的造模方法差异不大, 评价方法较少, 检测手段单一, 仍需进一步完善评价标准, 形成稳定、可靠地造模方法。

3.2 血瘀型银屑病及其病证结合模型

血瘀证银屑病常反复发作、难以治愈, 相当于西医静止期。血瘀证其病期多较久, 主要表现为皮损暗红、浸润肥厚、皮损经久不退、鳞屑厚、皮疹呈硬币状或大片融合, 鳞屑附着较紧, 颜色紫暗或暗褐, 瘙痒程度剧烈; 关节活动不利、面色晦暗、唇色紫青、肌肤甲错、小便黄赤、舌质紫暗生瘀点瘀斑, 脉弦细涩^[26]。

周萌等^[27]、Luo 等^[28]采用 5% 盐酸普萘洛尔乳剂均匀外涂豚鼠双耳背皮肤, 同时给予半高脂高糖饲料(基础饲料加蛋黄粉、胆固醇、猪油、蔗糖)喂养。于第 2 周开始以 1 mL/kg 剂量尾静脉缓慢注射 0.1 g/L 去甲肾上腺素注射液, 每天 1 次, 连续 3 周。同时, 将豚鼠放入冰水中每日游泳 5 min, 共 20 d, 并在造模第 1 天和第 10 天以 2.5 mL/kg 剂量尾静脉注射 50 g/L 小牛血清白蛋白, 由此成功建立了以血液流变学为主要检测方法的血瘀证模型。作者基于此模型探讨了血府逐瘀汤及理血消银汤治疗银屑病的作用机制^[29]。

樊丹采等^[30]建立血瘀模型分为气滞血瘀型和寒凝气滞血瘀型。气滞血瘀组采用固定法联合夹尾法进行造模, 每日将小鼠装入大小与小鼠体积相似的固定器中束缚 6 h, 并给予夹尾刺激 5 min, 其余时间活动和饮食正常, 连续造模 14 d; 寒凝气滞血瘀型则在气滞血瘀的基础上将小鼠放入 4℃~6℃ 冰水中每日游泳 30 min, 同时将每日进食量减少至正常小鼠的 1/3。

银屑病的血瘀证模型各家造模方法类似, 多采用静脉注射去甲肾上腺素、小牛血清白蛋白, 喂养高脂高糖饮食, 冰水游泳等方式内外因素联合进行造模(见表 1)。血瘀型银屑病模型主要按照寒凝血瘀及气滞血瘀的理论进行造模, 证型表现明显、检测内容多样, 是一种稳定地造模方法。

3.3 脾虚型银屑病及其病证结合模型

脾虚湿蕴型银屑病多发于四肢, 其典型皮损多表现为斑块淡红, 浸润肥厚, 上覆较厚鳞屑, 自觉瘙痒, 并伴有纳呆、乏力、四肢不温、便溏、舌淡胖有齿痕、舌苔腻、脉细滑等脾虚症状。

郭菲等^[31]采用 5% 盐酸普萘洛尔乳剂均匀外涂豚鼠耳背皮肤, 每日 3 次, 连续 2 周; 同时自第 8 天起灌服 10 mL/kg 大黄煎剂, 每天 2 次, 连续 7 d, 进行苦寒泻下药伤及脾胃的脾虚模型造模, 建立脾虚银屑病模型, 并采用该模型验证了健脾解毒汤治疗银屑病的潜在机制可能与抑制炎症反应及免疫调节有关^[32]。

表 1 中医病证结合模型归纳
Table 1 Summarization of traditional Chinese medicine combination model with disease and syndrome

证型 Syndromes	干预措施 Intervention measures	动物品种 Animal breed	模型表现 Model representation		模型评定指征 Evaluation and indication	参考文献 References
			单纯模型表现 Simple model representation	中医症候表现 Symptoms of traditional Chinese medicine		
血热型 Blood-heat syndrome	干姜、肉桂水煎剂灌服+咪喹莫特乳膏外涂	BALB/c 小鼠	逐渐出现皮损肥厚、红斑、鳞屑	饮水量增加,进食量减少,体重下降自主活动次数增加	血清中 T3、T4、TNF-α 含量升高	[22]
	附子、干姜、肉桂水煎剂灌服+盐酸普萘洛尔乳剂外涂	豚鼠	皮肤潮红,表面结痂,覆白色银屑,表面粗糙、质地变硬、厚度增加	口渴喜饮,饮水量增加,进食量减少	肛温升高全血黏度 LS、MS、HS 切值均显著升高	[23]
	干姜、甘草煎煮液灌服+紫外灯光疗仪照射+盐酸普萘洛尔乳剂外涂	SD 大鼠	逐渐出现红斑、丘疹、鳞屑	口渴喜饮,饮水量增多,进食量减少,体质量减轻排便量减少,质地干硬且颜色为亮黄色	肛温升高局部皮肤温度升高血清中 T3、T4、TNF-α、IL-17 水平升高	[24-25]
血瘀型 Blood stasis syndrome	去甲肾上腺素注射液和小牛血清白蛋白静脉注射+冰水游泳+盐酸普萘洛尔乳剂外涂+半高脂高糖饲料	豚鼠	皮损红肿,鳞屑增多,毛细血管扩张	舌质青紫瘀斑、舌下静脉曲张眼球颜色变黯	全血低切黏度、全血高切黏度、血浆比黏度、血沉、压积均明显升高血浆 ET-1、VEGF 均增加	[27-28]
	冰水游泳+进食量减少+固定器固定+夹尾刺激+盐酸普萘洛尔乳剂外涂	昆明小鼠	逐渐出现红斑、丘疹、鳞屑	体重减轻,蜷缩少动,皮毛无光泽爪甲、皮肤色黯,甚则紫黯	全血粘度升高	[30]
脾虚型 Spleen-deficiency syndrome	固定器固定+夹尾刺激+盐酸普萘洛尔乳剂外涂					
	大黄煎剂灌胃+盐酸普萘洛尔乳剂外涂	豚鼠	皮损浸润肥厚、基底潮红、上覆银白色鳞屑	泄泻、纳呆、消瘦毛发枯乱,质地稀软排便次数增加活动度减少		[31]
	大黄煎剂灌胃+己烯雌酚腹腔注射	昆明小鼠	逐渐出现红斑、丘疹、鳞屑	大、小便明显增多消瘦、少动、四肢无力、毛发枯涩	血清褪黑激素、可溶性 E 选择素、血浆内皮素-1 水平降低	[33]
湿热型 Dampness-heat accumulation syndrome	大黄煎剂灌服+限制饮食,隔日禁食+咪喹莫特乳膏外涂	BALB/c 小鼠	皮肤浸润肥厚、上覆鳞屑	拱背发抖、精神萎靡、呼吸急促、毛发蓬松、泄泻	D-木糖吸收实验水平降低	[35]
	湿热环境+高脂高糖饮食+白酒灌服+盐酸普萘洛尔乳剂外涂	豚鼠	皮肤红肿,肤温略高,覆盖鳞屑,毛细血管轻度扩张	体重减轻、纳呆、嗜睡懒动大便时干时溇	肛温升高、血脂水平升高等	[37]

郭姗姗等^[33]采用大黄伤及脾胃的方式建立脾虚模型,取生大黄冷浸过夜,煮沸后煎煮 10 min,去

渣取汁,每日灌服生药 1 g/mL 大黄煎煮液每只 0.6 mL,每天 1 次,连续 7 d。同时,小鼠于造模第 5 天

开始连续 3 d 进行己烯雌酚腹腔注射,每次 0.2 mg,每日 2 次,促使阴道上皮细胞处于增殖期状态,于第 8 天结束所有造模。采用该模型发现健脾解毒汤具有降低 ET-1 和 E-selectin 的作用^[34]。

翟春艳等^[35]采用大黄煎剂灌胃 0.2 mL/20 g,每天 1 次,并限制饮食,每天 75 g/kg,隔日禁食的方法进行脾虚造模,采用背部涂抹咪喹莫特乳膏的方式进行银屑病脾虚证的造模,并使用此模型观察到健脾养血解毒方通过调节 Treg/Th17 免疫平衡,改善脾虚-银屑病复合模型小鼠银屑病样皮损。

脾虚模型大多采用苦寒泻下药大黄伤及脾胃的方式进行造模,在此基础上进行银屑病的复合造模,得到银屑病脾虚模型,模型的表现指征符合脾虚证的特点(见表 1),但缺乏统一的检测指标,模型的评价存在问题。

3.4 湿热型银屑病及其病证结合模型

湿热证在银屑病进行期较为多见,证见皮损潮红,浸润糜烂,鳞屑较少,好发于褶皱部位,伴胸闷纳呆、口干不渴、下肢沉重、舌质红、苔白腻或黄腻、脉滑数等^[36]。

王玉芝^[37]通过给与高脂高糖饮食、白酒进行造模,即采用 200 g/L 蜂蜜水为饮用水,并 10 g/kg 油脂与 10 mL/kg 白酒隔日交替进行灌服共 2 周后,使用 5% 的盐酸普萘洛尔乳剂均匀外涂豚鼠双耳背皮肤 3 周,并从开始涂药起隔日放入温度为 $(32 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 95% 的人工气候箱中,共 3 次,每次 3 h。使用该模型,作者验证了预防性应用玉屏银屑方可降低造模动物的 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值,调节 T 淋巴细胞免疫水平,从而达到预防或减缓银屑病发生的作用^[38-40]。

4 银屑病病证结合模型总结与展望

目前,中医对于银屑病的研究逐步深入,病证结合的模型构建显得更为重要。银屑病中医病证结合模型不仅要反应致病因素对疾病的影响,还要将“病”和“证”连接起来,既要有疾病特征又要有中医证候特征。一个贴合临床的、稳定的中医病证结合模型,对临床中医病证和中药干预的研究具有较高的价值,既避免了单纯疾病模型的局限性,又丰富了传统证候模型的内容,为动物实验的中医银屑病研究提供了新思路和新方法。

银屑病的辨证方法有很多,现有的病证结合模型大多按照相应证型的病因病机,应用灌服相应性

味的中药、模拟环境等方法模拟致病因素构建病证结合模型,如恣食辛辣肥甘,导致脾胃失和,运化失司,久而郁热化火导致血热,因此血热型银屑病模型多采用灌服辛温大热的中药,如附子、干姜、肉桂,进行血热证的造模;而血热日久,热盛生毒,热毒壅盛煎熬阴血,日久则瘀血蕴结,经脉阻塞,导致血瘀证,因此血瘀型模型也采用喂养半高脂高糖饲料的方法进行造模;湿热证在气候潮湿、高温多雨的地区更易发生,体内湿饮停聚,客邪再至,内外相引,故病湿热,因此湿热型银屑病造模从控制温度和相对湿度入手,模拟湿热环境建立模型。中医证型模型的建立不仅可以通过施加外界因素的方法进行造模,还可以从内伤七情出发构建模型,如在血瘀型银屑病模型的构建中,给与小鼠夹尾刺激,并将其长时间固定在与小鼠体积相似的固定器中,致使气机郁滞,血液运行无力,诱发血瘀。

病证结合动物模型能够一定程度的模拟疾病的某一症状、反应致病因素对疾病的影响,对中医药相关作用机制的基础研究提供了支持。但银屑病的动物模型多采用复合方法进行造模,多数模型只是从银屑病的诱发因素下手,并不能反映临床患者证候的特点,如皮损的颜色的深浅紫暗、鳞屑的干燥肥厚、舌苔、脉象等,同时也没有相应的证候量表评分,限制了证候的评价问题。此外,多数病证结合模型都采用灌服中药的方法进行中医证型的造模,此类方法能够快速得到相应的体征表现,但是与后续的中医基础研究是否存在相互作用、造模成功停药以后是否还符合相应的证型表现也未可知,如建立脾虚模型采用大黄水煎剂灌胃伤及脾胃进行造模,但大黄中含有蒽醌类、黄酮类、鞣质类,抗炎、抗肿瘤效果显著,是否与后续的研究方药产生相互作用,干扰作用机制的探讨并不明确。此外,银屑病是遗传相关疾病,目前关于银屑病的易感基因与中医证型的相关性研究较少,未来银屑病病证结合模型的探索可以在这一方向进行探索。总而言之,银屑病病证结合模型的研究还具有较大的提升空间,从精准选取造模因素、完善模型评价标准等角度出发,建立符合临床实际情况、稳定可靠地病证结合模型,是中医药防治银屑病重要的研究领域,也将为中医药的深度开发提供坚实的基础。

参考文献:

- [1] Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, et al. Discovery of the IL-23/IL-17 signaling pathway and the treatment of psoriasis [J]. J

- Immunol, 2018, 201(6): 1605-1613.
- [2] Matos TR, O' Malley JT, Lowry EL, et al. Clinically resolved psoriatic lesions contain psoriasis-specific IL-17-producing $\alpha\beta$ T cell clones [J]. J Clin Invest, 2017, 127(11): 4031-4041.
- [3] Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1475.
- [4] Morizane S, Gallo RL. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis [J]. J Dermatol, 2012, 39(3): 225-230.
- [5] Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(1): 135-143.
- [6] Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines [J]. J Clin Invest, 1994, 94(1): 202-209.
- [7] Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review [J]. JAMA, 2020, 323(19): 1945-1960.
- [8] Takeshita J, Grewal S, Langan SM, et al. Psoriasis and comorbid diseases: epidemiology [J]. J Am Acad Dermatol, 2017, 76(3): 377-390.
- [9] 姜群群, 刘玲玲, 康玲, 等. 银屑病中西医研究进展 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(25): 144-148.
- [10] 林鹏, 李煜, 王红梅. 从卫气营血论治寻常型银屑病 [J]. 中医学报, 2021, 36(7): 1386-1391.
- [11] 范斌, 王洁, 李斌, 等. 秦万章辨治银屑病经验 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(1): 17-19.
- [12] 李顺鸿, 陈敬. 中医治疗银屑病血瘀证研究进展 [J]. 河南中医, 2020, 40(6): 969-972.
- [13] 周冬梅, 王萍, 陈维文, 等. 从血论治到气血津液论治银屑病的理论演变分析 [J]. 北京中医药, 2019, 38(8): 755-759.
- [14] 张玲. 段行武治疗寻常型银屑病经验 [J]. 中国民间疗法, 2017, 25(4): 4-5.
- [15] 胡文娟. 脾气虚证与寻常型银屑病的相关性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [16] 张蕊, 闵仲生. 闵仲生从脾论治寻常型银屑病经验 [J]. 山东中医药大学学报, 2018, 42(4): 330-331, 341.
- [17] 张金超, 陈朝霞, 李萍, 等. 银屑病“燥湿互化”的病机理论与“血分辨证”的关系 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1682-1684.
- [18] 李晓睿, 李咏梅. 马绍尧从肝辨治银屑病临床经验撷菁 [J]. 江苏中医药, 2018, 50(6): 20-22.
- [19] 张晓彤, 高云逸, 宋坪. 寻常型银屑病中医辨证特点概况及思考 [J]. 中医杂志, 2019, 60(20): 1732-1736.
- [20] 中医研究院广安门医院. 朱任康临床经验集: 皮肤外科 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- [21] 李晨丹, 李领娥, 孟娇玉, 等. 中医治疗寻常型银屑病血热证研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(4): 117-121.
- [22] 杜欣. 血热型银屑病动物模型的建立及凉血消斑汤对其治疗作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [23] 秦刚, 李洋, 杨志敏, 等. 银屑病(血热证)豚鼠复合模型的建立及评价研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2176-2180.
- [24] 杨大伟, 贾颖, 张皎皎. 基于血热证探讨银屑病病证结合动物模型的构建 [J]. 中医药导报, 2021, 27(2): 16-18, 23.
- [25] 杨大伟. 银屑病血热证大鼠模型的建立及土槐丹四物汤加味对其作用机制研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2021.
- [26] 郭昕炜, 王萍, 周冬梅, 等. “精-气-血-津液”综合辨证体系论治银屑病 [J]. 北京中医药, 2019, 38(9): 859-862.
- [27] 周萌, 伍秋云, 陈会茹. 银屑病血瘀证动物模型的构建探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(6): 1161-1163.
- [28] Luo Y, Ru Y, Zhao H, et al. Establishment of mouse models of psoriasis with blood stasis syndrome complicated with glucose and lipid metabolism disorders [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 6419509.
- [29] 梁莹, 周萌. 活血化瘀中药复方对小鼠银屑病模型的影响 [J]. 中国医药导报, 2009, 6(26): 9-11.
- [30] 樊丹采, 邓时贵, 卢传坚, 等. 血瘀致银屑病动物模型的建立及评价 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11): 2812-2814.
- [31] 郭菲, 刘红霞. 银屑病脾虚证豚鼠模型构建初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 242-245.
- [32] 郭菲, 文谦, 丰靓, 等. 脾解毒汤对脾虚型银屑病豚鼠模型的实验研究 [A]. 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会. 2015 全国中西医结合皮肤性病学术年会论文汇编 [C]; 2015.
- [33] 郭姗姗, 郭菲, 刘红霞. 银屑病模型与脾虚证银屑病病证结合模型相关指标的差异 [J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(4): 416-419.
- [34] 高源, 刘红霞. 健脾解毒汤对小鼠银屑病样模型的血管活性因子的影响 [J]. 新疆医学, 2011, 41(6): 122-125.
- [35] 翟春艳, 底婷婷, 王燕, 等. 健脾养血解毒方通过调节 Treg/Th17 免疫平衡改善脾虚-银屑病复合模型小鼠银屑病样皮损 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2888-2893, 3103-3106.
- [36] 周继福. 中医辨证施治银屑病临床经验 [J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(3): 340-341.
- [37] 王玉芝. 银屑病湿热证动物模型的构建 [J]. 山东中医杂志, 2013, 32(7): 489-490.
- [38] 王玉芝. 玉屏银屑方对湿热证型银屑病动物模型免疫调节作用的实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- [39] 王玉芝. 玉屏银屑方对湿热证型银屑病动物模型 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 江西中医药, 2013, 44(1): 69-71.
- [40] 王玉芝. 预防性应用玉屏银屑方对湿热证型银屑病动物模型细胞免疫功能影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(10): 22-24.

[收稿日期] 2021-12-29

董茗茗,柴秀坤,刘学臣,等. 胃食管反流病分子生物学的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 148-154.

Dong MM, Chai XK, Liu XC, et al. Research progress on molecular biology of gastroesophageal reflux disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 148-154.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.020

胃食管反流病分子生物学的研究进展

董茗茗,柴秀坤,刘学臣,何云,李艾迪,蒋树林*

(河北医科大学第二医院消化内科,石家庄 050000)

【摘要】 胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是消化内科的常见疾病,临床表现容易反复发作,同时胃食管反流病被认为是食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)发生的危险因素。家族研究显示 GERD 遗传率约为 30%, *COL3A1*、*ABAT* 基因与遗传风险显著相关;多种基因如 *IL-1* 基因簇、*GNB3*、*GSTP1* 与 GERD 发生风险密切相关。*TP53* 基因突变及 *EGF*、*MMP*、*CCND1*、*CDX2*、*COX-2* 的单核苷酸多态性会导致基因组不稳定,进而促使部分个体向 Barrett 食管及食管腺癌发展。本文就胃食管反流病发生及发展为食管腺癌过程中分子生物学的作用作一综述。

【关键词】 胃食管反流病; Barrett 食管; 食管腺癌; 分子生物学; 遗传风险位点; 单核苷酸多态性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0148-07

Research progress on molecular biology of gastroesophageal reflux disease

DONG Mingming, CHAI Xiukun, LIU Xuechen, HE Yun, LI Aidi, JIANG Shulin*

(Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

【Abstract】 Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a common disease in gastroenterology, and clinical manifestations are prone to recurrent attacks. It is considered a risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma (EAC). Family studies have shown that GERD heritability is approximately 30%, *COL3A1* and *ABAT* genes are significantly associated with genetic risk. Several genes, such as the *IL-1* gene cluster, *GNB3* and *GSTP1*, are strongly associated with the risk of GERD. Mutations in *TP53* and single nucleotide polymorphisms of *EGF*, *MMP*, *CCND1*, *CDX2* and *COX-2* cause genomic instability and promote the development of Barrett's esophagus and EAC in some individuals. This article reviews the role of molecular biology in the occurrence and development of GERD into EAC.

【Keywords】 gastroesophageal reflux disease; Barrett's esophagus; esophageal adenocarcinoma; molecular biology; genetic risk loci; single nucleotide polymorphisms

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是胃内容物反流至食管、口腔等多器官导致一系列临床表现和并发症的疾病^[1]。依据胃镜表现,可将 GERD 分为非糜烂性胃食管反流病(non-erosive gastroesophageal reflux disease, NERD)、反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)和 Barrett 食管

(Barrett's esophagus, BE)三种类型。据流行病学统计显示,以至少每周 1 次的反流和/或烧心为标准,GERD 在东亚人群患病率为 2.5%~7.8%,虽然低于世界范围内患病率 13.3%,但也有逐年上升的趋势^[2-3]。反复胃内容物反流引起食管粘膜的糜烂、溃疡,若损伤因素长期存在还可能发生化生^[4-5]。

[作者简介]董茗茗(1996—),女,硕士研究生,研究方向:胃食管反流病的发病机制及诊治。E-mail:mingmingdong21@126.com

[通信作者]蒋树林(1965—),男,博士,主任医师,研究方向:胃食管反流病的发病机制及诊治。E-mail:shulinjiang1@aliyun.com

在 GERD 患者中大约有 10%~15% 的 BE 患者,并以每年约 0.12%~0.6% 的速度进展到食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)^[6-8]。EAC 的 5 年总生存率仅约为 10%~15%,而在过去三十年里 EAC 的发病率稳步上升,在一些国家已经超过鳞状细胞癌,成为食管恶性疾病中最常见的组织学类型^[9-10]。环境因素和导致基因组不稳定性的遗传倾向共同调节正常鳞状上皮-糜烂上皮-肠上皮化生-异型增生-腺癌的发生过程,既往国内外学者已经对其中的分子转化和进展机制进行了大量研究。本综述旨在描述 GERD 发生及发展为 EAC 过程中主要的分子生物学作用。

1 从鳞状上皮到肠上皮化生

1.1 遗传基因

COL3A1 基因位于染色体 2q32.2, 编码 III 型胶原 $\alpha 1$ 链(*COL3A1*), 胶原单体组成原纤维后可以聚集成纤维, 为中空器官提供组织支撑结构。在 2009 年, Asling 等^[11] 在 GERD 显性遗传家族基因检测中发现 *COL3A1* 与 GERD 发生显著相关, 且 *COL3A1* 在儿童和成人 GERD 中均为疾病相关基因, 男性患者食管活检组织中 III 型胶原蛋白含量更高 ($P=0.03$)。此次研究为 GERD 存在结缔组织薄弱成分这一概念提供分子支持, 同时体现出性别在 GERD 的遗传风险中存在差异。在后续研究中对 36 个显示 GERD 显性传播的家族进行全基因组基因分型和连锁分析, 又确定了 16 号染色体上的基因 4-氨基丁酸氨基转移酶(aminobutyrate aminotransferase, *ABAT*) 内含子中的一个单核苷酸在儿童中具有显著的遗传相关性, 并且在动物实验中, 通过选择性 *ABAT* 抑制剂减少了约 57% 暂时性食管下括约肌松弛(TLESRs), 胃内容物反流也减少 70% 左右。Jirholt 等^[12] 进行的两项双胞胎研究表明, GERD 的遗传率约为 30%。*COL3A1* 和 *ABAT* 基因的发现不仅对 GERD 的发生机制做出了贡献, 还为遗传性危险因素增添了新成员, 但 *ABAT* 等位基因在瑞典成人病例对照队列中并未发现是 GERD 遗传的危险因素, 应该在不同人种显性遗传的家族中进行更多研究。

1.2 白细胞介素-1 基因簇与 GERD

白细胞介素-1(interleukin-1, *IL-1*) 基因簇位于 2q12 染色体, 由 *IL-1A*、*IL-1B* 和 *IL-1RN* 3 个相关基因组成, 分别编码促炎细胞因子 $IL-1\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 及

其内源性受体拮抗剂 $IL-1Ra$ ^[13]。*IL-1B* 在启动子 -511 和 -31 区域有两个双等位基因多态性, 分别代表 *C/T* 和 *T/C* 转换, 研究表明, 这两个区域的基因几乎处于完全连锁不平衡状态, 即基因并非完全随机组成单体型, 有些基因总是较多的在一起出现, 从而使某些单体型在群体中出现频率较高^[14]。而在 *IL-1RN* 的内含子中含有可变数量的串联重复多态性(VNTR), 串联重复指 DNA 短序列在特定的染色体位点以头到尾的方式重复, 每一个都是遗传等位基因, 共包括 5 种不同的等位基因, 即 *IL-1RN * 1* (4 次重复)、*IL-1RN * 2* (2 次重复)、*IL-1RN * 3* (5 次重复)、*IL-1RN * 4* (3 次重复) 和 *IL-1RN * 5* (6 次重复)。有研究称 *IL-1B-511 * T* 等位基因或 *IL-1B-31 * C* 等位基因的存在对 GERD 的发展具有保护作用, 不仅可能导致胃炎从而破坏壁细胞, 还能诱导胃体萎缩减少胃泌素刺激, 导致胃酸分泌减少从而降低 GERD 的严重程度^[15]。*IL-1RN * 2* 的存在与高 $IL-1Ra$ 和低 $IL-1\beta$ 释放有关, $IL-1\beta$ 和 $IL-1Ra$ 之间的平衡是局部组织炎症程度的决定因素, 已经证明在胃炎、胃癌、肠化生等多个疾病中起重要作用。Akçil 等^[16] 对不同程度的食管炎患者进行基因分析, 发现在幽门螺杆菌感染的情况下与对照组相比, RE 患者 *IL-1B-511 * TT* 基因型频率明显低于 NERD, 但在 *IL-1B-31* 和 *IL-1RN* 方面没有差异。同样, Ghoshal 等^[17] 在一项对 144 名 GERD 患者和 368 名来自印度的健康对照的研究中也证明了 *IL-1B-511 * T/IL-1RN * 1* 单倍型受试者患 GERD 的风险降低。但与前两项研究结果相反的是, 台湾一项研究表明 *IL-1B-511 * T/T* ($P=0.034$)、*IL-1B-31 * C/C* ($P=0.031$) 基因型和 *IL-1B-511 * T* ($P=0.044$) 和 *IL-1B-31 * C* ($P=0.040$) 等位基因与食管炎复发风险增加相关。为了明确 $IL-1$ 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs) 及基因的单倍型在 GERD 发生发展中究竟是保护因素还是风险基因, 一项对白种人进行的前瞻性研究结果显示单倍型 *T(IL-1A-889)C(IL-1B-511)C(IL-1B-3953)L(IL-1RN)*、*C(IL-1A-889)C(IL-1B-511)C(IL-1B-3953)L(IL-1RN)* 与 GERD 和 RE 的发生风险增加相关, 而 *T(IL-1A-889)C(IL-1B-511)T(IL-1B-3953)L(IL-1RN)* 可减少粘膜化生发生率, 降低 BE 的发生风险^[18], 但在此研究中没有分析被研究人员幽门螺杆菌感染情况, 不能说明有无感染之间各种基因的差异。综上研究, 在 GERD 患者中不同的单倍型可

能参与从 GERD 到 RE 和 BE 的进展,评估 IL-1B、IL-1RN 及单核苷酸多态性是有必要的,以此发现有风险发展 BE 和 EAC 的患者。但幽门螺旋杆菌的感染、人种区别也可能会对最终结果产生影响,具体作用机制暂不清楚,因此感染、GERD 发生发展及基因型之间的关系还需在不同人种间做大样本的深入研究。

1.3 蛋白酶激活受体-2

蛋白酶激活受体-2(protease-activated Receptor-2, PAR2) 是一种 G-蛋白偶联受体,存在于多种细胞中,如免疫细胞 MCs、上皮细胞和嗜酸性粒细胞,并与细胞趋化、炎症、血管扩张等相关^[14]。PAR2 在食管上皮中表达,很容易与胃食管反流物(胃酸、胰蛋白酶)相互作用,参与 GERD 的粘膜免疫发病机制。在动物模型中,上皮暴露于反流事件后 PAR2 表达上调,可能通过引起紧密连接蛋白的重新分布而增加食管上皮的通透性,同时激活上皮细胞大量分泌 IL-8 并引发促炎性粘膜免疫反应,导致上皮细胞间空间增大和上皮屏障进一步破坏,引起 GERD 的发生、发展^[19]。研究者认为 GERD 患者中上皮内存在 T 细胞和 MCs 浸润,MCs 参与应激诱导的食管粘膜功能障碍,而 PAR2 是潜在的中间因子。Winkelsett 等^[20]、Keita 等^[21] 鉴定了人类食管上皮中 PAR2 的表达,并证明了 PAR2 介导的途径在 GERD 相关粘膜改变的发病机制中的功能重要性。以上研究证明了 GERD 发病机制中免疫介导粘膜炎症的假说,也说明需要更多的研究来充分了解基因、受体、传导通路的作用和具体的发病机制,帮助我们识别高危患者、确定治疗目标以帮助更多患者。

1.4 谷胱甘肽-S-转移酶与 GERD

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione s-transferase, GST) 是 II 期解毒酶,存在于许多物种和组织中,包括人类胃肠道的上皮组织中,可以催化谷胱甘肽对多种疏水亲电试剂的亲核攻击,产生毒性更小、水溶性更强的化合物,在保护细胞免受氧化应激产物的伤害方面及防止肿瘤发展中具有重要作用。在正常食管上皮组织中, GSTP1 是 GST 的主要亚型, GSTP1 编码区内核苷酸+313 处的 A 转换为 G, 104 密码子将从 ATC 变为 GTC, 这将导致 GST 活性降低^[17]。GSTP1 * B 的等位基因频率在正常东方人群中为 23%,在白种人中为 30%^[22]。有研究发现, GSTP1 * B 等位基因与 GERD 易感性及 BE 发生相关, BE 患者中 GSTP1 * B 等位基因携带者相比

GERD 患者(OR 2.10, 95% CI: 0.99 ~ 4.44) 和健康对照组(OR 2.56, 95% CI: 1.30 ~ 5.05) 发现频率显著增加。国内一项研究发现变异 GSTP1 基因型 A/B 在 RE 患者、NERD、健康对照组中出现频率分别为 40%、25% 和 22%, 具有显著差异($P < 0.05$); 且在 GSTP1 基因型变异的受试者中, RE 发生风险增加 2.42 倍(OR = 2.42; 95% CI: 1.22 ~ 4.80)^[23]。以上研究结果提示我们 GSTP1 基因多态性可能是 RE 发病机制的高易感性因素之一。

1.5 G 蛋白 β 亚单位基因与 GERD

G 蛋白 β 亚单位基因(guanine nucleotide binding protein(Gprotein), beta polypeptide 3, GNB3) 位于染色体 12p13。G 蛋白在信号传导过程中起“分子开关”作用,介导对酸、神经递质和调节食管感觉功能的某些体液因子的反应,而在 G 蛋白亚单位中, β 亚单位是 α 亚单位以及某些信号转导受体和效应器的重要调节因子。有研究表明食管症状严重程度与反流负荷之间并无直接相关性,部分原因可能是 GERD 患者对食管症状的感知存在差异,而这一过程与基因决定感知信号转导相关。2018 年的一项研究表明,在接受动态反流试验的患者和无食管症状的对照组之间, GNB3 内 3 个单核苷酸多态性的等位基因 Rs2301339 ($P = 0.040$)、Rs5443 ($P = 0.011$) 和 Rs5446 ($P = 0.016$) 之间存在显著差异,而且与显性纯合子相比,尽管食管酸暴露水平和症状反流相关程度相似,但是隐性等位基因携带者 Rs2301339 * A、Rs5443 * T、Rs5446 * T 的反流症状更重、心理健康相关生活质量和贝克抑郁量表得分更差^[24]。在另一项病例对照研究(363 名白人 GERD 患者和 373 名健康对照) 结果中, GNB3825 * TT 可预测 G 蛋白活化增强,从而增加细胞或生理反应; GNB3825 * CC 使信号转导反应减弱。最近有研究发现希腊、日本人群中的炎症基因多态性 GNB3 与功能性消化不良中的上腹部疼痛综合征患者相关。因此表明 GNB3 基因的多态性可能介导食管粘膜对酸性递质的反应,导致患者出现反酸、烧心、疼痛等多样的临床表现,也为 GERD 患者对治疗的不同敏感性提供理论依据。

2 从肠上皮化生到腺癌

2.1 环氧合酶-2

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) 基因位于 1q25.2-q25.3, 编码 COX-2 蛋白,在细胞因子、炎

症介质、内毒素等诱导刺激下催化花生四烯酸转化为前列腺素。COX-2 可以促进细胞增殖、降低凋亡率,还能刺激血管生成,因此在炎症和肿瘤发生中发挥着重要作用^[25-26]。在体外实验中,反流物可刺激诱导食管上皮细胞过表达 COX2,COX2 的表达与胃肠粘膜的化生、癌变相关,而应用 COX2 抑制剂后降低了大鼠模型中 EAC 的发生风险。基于体外实验的结果,研究人员开展了一项病例对照研究,结果发现 COX-2-8473 * C 等位基因的存在可能使个体易患 EAC,但与 BE 或 GERD 的发生无关。也有研究表示 COX-2 启动子区域的两种多态性 -765 C/G、-1195A/G 与 EAC 发生相关,亚洲人群中 -765 * C 等位基因可能是 EAC 发生的危险因素。COX-2 作为预测肿瘤进展的可能生物标志物及选择性抑制 COX-2 作为 BE 的防治方法受到了广泛关注。在最近的随机多中心研究中,研究者发现应用大剂量的埃索美拉唑和阿司匹林可以改善 BE 患者的预后^[27]。

2.2 表皮生长因子

表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)基因位于 4q25,表皮生长因子(EGF)及其受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)属于酪氨酸激酶受体家族,结合后会发挥促进有丝分裂的作用,在粘膜损伤的保护和修复中具有重要作用,基因突变时会表达异常破坏上皮屏障的完整性,病理水平与胃肠道肿瘤发生相关。Cheung 等^[28]对 309 例 EAC 患者和 275 例健康对照者的 DNA 样本进行 EGF 基因分型,发现病例组中 EGF 变异(A/G 或 G/G)较对照组有显著差异($P=0.02$),且与 A/A 基因型相比,G/G 突变与 GERD 患者发生 EAC 风险显著增加相关($OR=9.7;95\%CI:3.8\sim 25.0;P<0.001$),同时 G/G 基因型与 GERD 存在高度显著的交互作用($P<0.001$)。Lanuti 等^[29]也提出与对照组相比,EGF-A61 * G/G 基因型会导致 EAC 发生风险增加约 2 倍($OR=1.81;95\%CI:1.2\sim 2.7$),且在伴有 BE 的 EAC 患者亚组中更高($OR=2.18;95\%CI:1.3\sim 3.7$)。2012 年,Menke 等^[30]为确定 EGF 基因多态性与 RE、BE、EAC 之间的关系,对荷兰白种人进行了队列研究,结果表示与 A/G($P=0.008$)和 A/A($P=0.002$)组相比,G/G 基因型的 EGF 表达显著降低。EGF 表达降低与 RE($OR=2.6;95\%CI:1.3\sim 5.2$)、BE($OR=3.0;95\%CI:1.5\sim 6.2$)和 EAC($OR=4.1;95\%CI:1.8\sim 9.7$)发生风险增加相关。体外研究发现,用酸性胆汁盐处理食管细胞可激活 EGFR

信号,而且在 22.2%~35% 的 BE 和 46.5%~80% 的 EAC 患者中发现 EGFR 蛋白表达增加^[31-32]。因此研究者认为 EGFR 信号的异常激活是由 EGFR 蛋白及其配体 TGF- α 和 EGF 的过度产生引起,在食管炎患者中 EGF 与 PG/COX-2 和 PPAR γ 系统相互作用,提出应用 EGFR 抑制剂和 PPAR γ 激动剂可以用来治疗进展为 BE 的慢性食管炎。

上述研究发现 EGF 的单核苷酸多态性也在食管粘膜上皮化生到异型增生以及随后转化为腺癌的进展中有一定作用,其中最主要的基因 G/G 突变,基因突变后遗传性 EGF 表达降低导致的粘膜保护减少可促进食管肿瘤的发展。因此基因分型可以用来识别 GERD 和 BE 中的高危患者,且 EGFR 的激活也与 BE 发生相关,阻断此信号传导途径可以用于治疗 BE。

2.3 TP53 基因

TP53 是位于染色体 17p13 的抑癌基因,又称原癌基因,TP53 基因编码的 p53 蛋白在调控细胞分裂、增殖、凋亡及 DNA 修复中有非常重要的作用。许多研究报告了 TP53 基因突变是迄今为止与癌症亚型(尤其实体瘤)关系最密切的基因^[33],该突变已被证明在绝大多数食管腺癌中发生,并且是 Barrett 食管向腺癌进展的潜在生物标志物^[34]。目前研究认为 TP53 在体内存在两条途径,一种是早期突变导致 TP53 失活,引起 p16 失活,最后激活 ERB-B2 原癌基因;另一种途径是 TP53 突变,随后全基因组加倍,最终基因组不稳定和原癌基因被激活^[35]。TP53 基因突变在进展为高度异型增生及 EAC 的 BE 患者中数量显著增加,使 BE 高度发育异常进展风险增加 13.8 倍($95\%CI:3.2\sim 61.0;P<0.001$)^[36-37]。研究表明,在酸性反流物刺激下,胃食管反流病患者中由自由基诱导的脂质过氧化和 COX2 酶产生的反应性异葡萄糖苷(reactive isolevuglandins,isoLG)会与 p53 结合导致 p53 活性被抑制^[27]。

2.4 基质金属蛋白酶

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)属于锌依赖性内肽酶,在 1962 年首次确定为胶原蛋白水解酶之一,参与细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的重塑。据报道基质金属蛋白酶参与调节肿瘤进展过程中的关键事件,如细胞存活和侵袭、转移发展和血管生成以及恶性转化等^[38]。在大约 MMP 的 30 种亚型中,小鼠 GERD 模型中 MMP3 和 MMP9 的水平上调,MMP1、MMP2、MMP7 和 MMP9 的表达与 BE 和 EAC 相关。由于发

现 *MMP* 基因多态性与 EAC 风险增加相关, Cheung 等^[39]对 309 名 EAC 患者和 279 名健康患者进行基因分型检测, 确定 *MMP-1* * 1G/2G (OR = 3.2, 95% CI: 2.0 ~ 5.1, $P < 0.001$) 和 *MMP-3* * 6A/5A (OR 1.8, 95% CI: 1.1 ~ 2.7, $P = 0.01$) 在 GERD 患者中与 EAC 风险增加独立相关, 且与不同严重程度 GERD 患者风险不同, 因此提出 *MMP-1* * 1G/2G、*MMP-3* * 6A/5A 的基因多态性与 GERD 病史相关, 并且协同增加了 EAC 的发生。另一项横断面研究也提出, 尽管 BE 患者组中没有上皮恶变, 但与对照组相比 BE 患者 *MMP-9* 和 *MMP-3* 表达增加。研究者通过动物实验提出通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路, 食管粘膜组织中的炎症因子 (*MMP3*、*MMP9*) 水平下调, 食管粘膜组织损伤减轻。无论是动物实验还是病例对照研究, 都证明了 *MMP* 基因多态性与 GERD、BE、EAC 相关, 不同的研究对表达调控的机制有一定帮助。

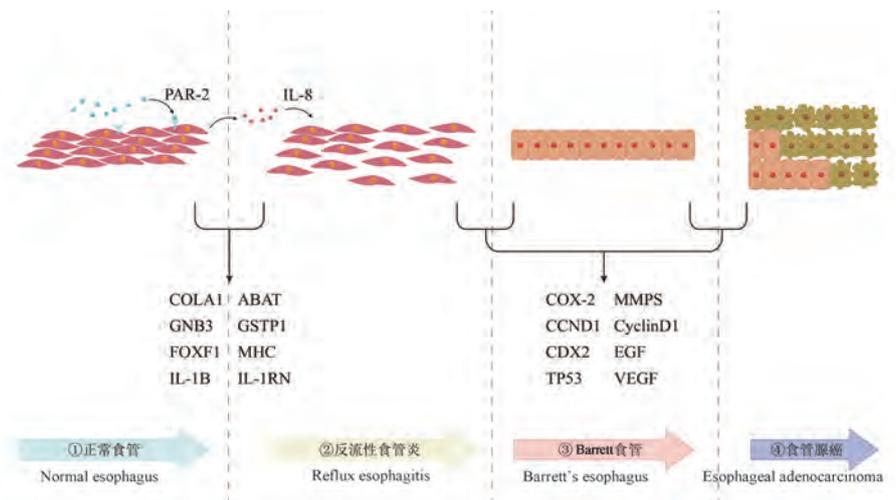
2.5 *CCND1* 基因与细胞周期蛋白 D1

细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 由位于人类 11q13 染色体的 *CCND1* 基因编码, 与细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDKs) 结合形成复合物后驱动细胞周期从 G1 期进展到 S 期增殖。*CCND1* 基因在外显子 4 (G870A) 中表现出单核苷酸多态性, *CCND1* * A/A 基因型的存在与 GERD、BE 和 EAC 的风险增加相关。研究人员发现与无症状患者相比, A/A 基因型与 GERD、BE 和 EAC 的

生风险增加 3~6 倍, 而且 15 名 (20%) GERD 患者、14 名 (11%) BE 患者和 14 名 (25%) EAC 患者中细胞周期蛋白 D1 的过度表达也存在显著差异 ($P = 0.001$)。在另一项小型病例对照研究中, 进展为食管腺癌的 BE 患者中 67% 的食管活检组织染色中发现了细胞周期蛋白 D1, 而在未进展的 BE 患者中比例只有 29%。因此具有 *CCND1* * A/A 基因型的个体对 GERD、相关疾病有易感风险, 同时细胞周期蛋白 D1 的过度表达可以用于鉴别有恶性肿瘤发生风险的 BE 患者。但在有关研究中并未发现基因型和细胞周期蛋白 D1 过度表达之间存在相关性^[40], 也有研究者提出细胞周期蛋白 D1 的表达似乎不能预测 BE 患者的肿瘤进展, *CCND1* 基因型与细胞周期蛋白 D1 的表达在 GERD 发生发展的作用仍然存在争议。

2.6 尾侧相关同源盒转录因子 2

尾侧相关同源盒转录因子 2 (caudal-related homeobox transcription factor 2, *CDX2*) 是一种特异性转录因子, 正常情况下仅在肠道表达, 指导和维持肠细胞的分化、促进肠道发育^[41]。既往研究显示胆汁酸处理后正常胃黏膜上皮细胞化生, *CDX2*、粘蛋白 2 (mucin 2, *MUC2*) 表达增加^[42]。在最近的一项研究中, 在用胆汁反流建立的大鼠模型和酸性培养基中的人食管鳞状上皮细胞中, 检测发现 Krüppel-like factor 5 (*KLF5*)、*CDX2* 及肠道标志物表达均增加。同时将 *KLF5* 表达载体转染食管上皮细胞可促进其向柱状细胞的分化同时 *CDX2* 表达增



注: *COL3A1*、*ABAT*、*IL-1* 基因簇、*COX-2*、*GNB3* 等基因与反流性食管炎发生相关, 同时 *TP53* 基因突变及 *EGF*、*MMP*、*CCND1*、*CDX2*、*VEGF* 参与 Barrett 食管向食管腺癌进展。

图 1 GERD 发生发展中主要基因改变图示

Note. *COL3A1*, *ABAT*, *IL-1* gene cluster, *COX-2*, *GNB3* and other genes are related to the occurrence of reflux esophagitis, while *TP53* gene mutation and *EGF*, *MMP*, *CCND1*, *CDX2*, *VEGF* are involved in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma.

Figure 1 Illustration of major genetic alterations in the development of GERD

加,基因敲除 *KLF5* 后可阻断 *CDX2* 等相关蛋白的表达^[43]。在另一项研究中,小鼠模型中的食管鳞状上皮暴露于酸和胆汁酸时,炎症和组织损伤激活信号通路,如 *sonic hedgehog*、*bmp4* 和核因子 κ B 表达,并下调 Notch 信号,最终导致 *Sox9*(诱导柱状分化)和 *Foxa2*、*Cdx1* 和 *Cdx2*(诱导肠道分化)的表达增加^[44]。因此 *CDX2* 目前被认为是层状鳞状上皮化生为柱状上皮的转录调节因子之一,但具体通路的调节与多因子相关,且目前研究多为动物实验,尽管这些结果提示我们新的生物标记物,但在临床广泛推荐前仍需进行大规模前瞻性临床试验。

3 其他与 GERD 发生、发展相关研究

2020 年 Westra 等^[45]的研究结果发现,F 单倍体在 EAC、BE 和 GERD 患者中的表达比例分别为 34%、27%、23%,提出 F 单倍体组是 EAC 的危险因素(OR1.5; 95% CI: 1.03 ~ 2.19, $P = 0.03$)。Lam 等^[46]也证明 *FOXF1* rs9936833 * C、*MHC* rs9257809 * A、*IGF1*rs6214、*GH*rs6898743、*BARX1* 及 *ADAMTS17* 有可能和 GERD 发生有关。同时基于对两个多代 BE 和/或 EAC 家族的测序,Verbeek 等^[47]也已经确定了两个可能致病的基因变体 *VSIG10L* 和 *MSX1*。然而,以上研究中发现的相关基因只是初步的观察结果,还需进一步在人群中进行大量研究加以验证。

4 小结与展望

GERD 是一种与多个炎症和代谢生物标志物循环水平相关的疾病,症状反复发生降低了患者的生活质量,随着基因组学的快速发展,目前已经发现 *COL3A1*、*ABAT*、*IL-1* 基因簇、*PAR2*、*COX-2*、*GNB3* 等基因与 GERD 发生风险相关,同时 *TP53* 基因突变及 *EGF*、*MMP*、*CCND1*、*cyclin D1*、*CDX2*、*VEGF* 的单核苷酸多态性促使部分个体向 BE 及 EAC 进展(如图 1)。这些研究进展丰富了疾病在生物学方面的理解,为疾病的预防及诊疗提供了新思路。但是部分信号通路主要是在体外实验中研究,未来的研究应该从健康患者向疾病状态的转化去深入了解,同时在不同人群中重复,希望建立生物标记物为早期发现、临床干预及靶向治疗提供可靠依据。

参考文献:

[1] Ustaoglu A, Nguyen A, Spechler S, et al. Mucosal pathogenesis in gastro-esophageal reflux disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2020, 32(12): e14022.

[2] Eusebi LH, Ratnakumaran R, Yuan Y, et al. Global prevalence of, and risk factors for, gastro-oesophageal reflux symptoms: a meta-analysis [J]. *Gut*, 2018, 67(3): 430-440.

[3] El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review [J]. *Gut*, 2014, 63(6): 871-880.

[4] Zavala-Solares MR, Fonseca-Camarillo G, Valdovinos M, et al. Gene expression profiling of inflammatory cytokines in esophageal biopsies of different phenotypes of gastroesophageal reflux disease: a cross-sectional study [J]. *BMC Gastroenterol*, 2021, 21(1): 201.

[5] Tack J, Pandolfino JE. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(2): 277-288.

[6] Menezes MA, Herbella FAM. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease [J]. *World J Surg*, 2017, 41(7): 1666-1671.

[7] Rubenstein JH, Shaheen NJ. Epidemiology, diagnosis, and management of esophageal adenocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(2): 302-317.

[8] Schlottmann F, Dreifuss NH, Patti MG. Obesity and esophageal cancer: GERD, Barrett's esophagus, and molecular carcinogenic pathways [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 14(6): 425-433.

[9] Schlottmann F, Patti MG, Shaheen NJ. From heartburn to barrett's esophagus, and beyond [J]. *World J Surg*, 2017, 41(7): 1698-1704.

[10] Sami SS, Ragunath K, Iyer PG. Screening for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: rationale, recent progress, challenges, and future directions [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2015, 13(4): 623-634.

[11] Asling B, Jirholt J, Hammond P, et al. Collagen type III α 1 is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia [J]. *Gut*, 2009, 58(8): 1063-1069.

[12] Jirholt J, Asling B, Hammond P, et al. 4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT): genetic and pharmacological evidence for an involvement in gastro esophageal reflux disease [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19095.

[13] Argyrou A, Legaki E, Koutserimpas C, et al. Risk factors for gastroesophageal reflux disease and analysis of genetic contributors [J]. *World J Clin Cases*, 2018, 6(8): 176-182.

[14] Izakovicova Holla L, Borilova Linhartova P, Hrdlickova B, et al. Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus [J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(9): 1161-1169.

[15] Kim JJ, Kim N, Hwang S, et al. Relationship of interleukin-1 β levels and gastroesophageal reflux disease in Korea [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(1): 90-98.

[16] Akçil G, Doğan İ, Cengiz M, et al. The role of interleukin-1 gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* in gastroesophageal reflux disease [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2014, 25(1): 81-85.

[17] Ghoshal UC, Chourasia D. Genetic factors in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2011, 30(2): 55-62.

- [18] Picos A, Vulturar R, Picos A, et al. Interleukin-1A and interleukin-1B gene polymorphisms in gastroesophageal reflux disease [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3394–3398.
- [19] Luskin KT, White AA, Lyons JJ. The genetic basis and clinical impact of hereditary α -tryptasemia [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, 9(6): 2235–2242.
- [20] Winkelsett L, Malfertheiner P, Wex T, et al. Mucosal two-step pathogenesis in gastroesophageal reflux disease; repeated weakly acidic stimulation and activation of protease-activated receptor-2 on mucosal interleukin-8 secretion [J]. *Digestion*, 2018, 98(1): 19–25.
- [21] Keita ÅV, Söderholm JD. Mucosal permeability and mast cells as targets for functional gastrointestinal disorders [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 43: 66–71.
- [22] Zendejdel N, Biramijamal F, Zendejdel N, et al. The role and frequency of glutathione S-transferase P1 polymorphism in Iranian patients affected with reflux esophagitis [J]. *Dis Esophagus*, 2010, 23(7): 603–607.
- [23] Liu B, Fan YJ, Wang ML, et al. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferases T1, M1 and P1 and susceptibility to reflux esophagitis [J]. *Dis Esophagus*, 2006, 19(6): 477–481.
- [24] Patel A, Hasak S, Nix BD, et al. Genetic risk factors for perception of symptoms in GERD; an observational cohort study [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(2): 289–297.
- [25] Nejat Pish-Kenari F, Qujeq D, Maghsoudi H. Some of the effective factors in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12): 6401–6404.
- [26] Abdi E, Latifi-Navid S, Zahri S, et al. Risk factors predisposing to cardia gastric adenocarcinoma; insights and new perspectives [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(13): 6114–6126.
- [27] Majka J, Wierdak M, Szlachcic A, et al. Interaction of epidermal growth factor with COX-2 products and peroxisome proliferator-activated receptor- γ system in experimental rat Barrett's esophagus [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318(3): G375–G389.
- [28] Cheung WY, Zhai R, Kulke MH, et al. Epidermal growth factor A61G gene polymorphism, gastroesophageal reflux disease and esophageal adenocarcinoma risk [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(8): 1363–1367.
- [29] Lanuti M, Liu G, Goodwin JM, et al. A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(10): 3216–3222.
- [30] Menke V, Pot RG, Moons LM, et al. Functional single-nucleotide polymorphism of epidermal growth factor is associated with the development of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [J]. *J Hum Genet*, 2012, 57(1): 26–32.
- [31] Pretto G, Gurski RR, Binato M, et al. Increase of epidermal growth factor receptor expression in progression of GERD, Barrett, and adenocarcinoma of esophagus [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(1): 115–122.
- [32] Caspa Gokulan R, Garcia-Buitrago MT, Zaika AI. From genetics to signaling pathways; molecular pathogenesis of esophageal adenocarcinoma [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1872(1): 37–48.
- [33] Hainaut P, Pfeifer GP. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(11): a026179.
- [34] Li S, Chung DC, Mullen JT. Screening high-risk populations for esophageal and gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2019, 120(5): 831–846.
- [35] McDaniel M, Conran RM. Educational case; Barrett esophagus [J]. *Acad Pathol*, 2019, 6: 2374289519848089.
- [36] Cook MB, Thrift AP. Epidemiology of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma; implications for screening and surveillance [J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2021, 31(1): 1–26.
- [37] Runge TM, Abrams JA, Shaheen NJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2015, 44(2): 203–231.
- [38] Palumbo A Jr, Meireles Da Costa N, Pontes B, et al. Esophageal cancer development; crucial clues arising from the extracellular matrix [J]. *Cells*, 2020, 9(2): E455.
- [39] Cheung WY, Zhai R, Bradbury P, et al. Single nucleotide polymorphisms in the matrix metalloproteinase gene family and the frequency and duration of gastroesophageal reflux disease influence the risk of esophageal adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(11): 2478–2486.
- [40] Salem ME, Puccini A, Xiu J, et al. Comparative molecular analyses of esophageal squamous cell carcinoma, esophageal adenocarcinoma, and gastric adenocarcinoma [J]. *Oncologist*, 2018, 23(11): 1319–1327.
- [41] 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.
- [42] Ku HJ, Kim HY, Kim HH, et al. Bile acid increases expression of the histamine-producing enzyme, histidine decarboxylase, in gastric cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(1): 175–182.
- [43] Xia Y, Fang Y, Zhang H, et al. Role of kruppel-like factor 5 in deoxycholic acid-mediated intestinal transdifferentiation of esophageal squamous epithelium [J]. *J Cancer*, 2019, 10(22): 5597–5607.
- [44] Naini BV, Souza RF, Odze RD. Barrett's esophagus; a comprehensive and contemporary review for pathologists [J]. *Am J Surg Pathol*, 2016, 40(5): e45–e66.
- [45] Westra WM, Rygiel A, Mostafavi N, et al. The Y-chromosome F haplogroup contributes to the development of Barrett's esophagus-associated esophageal adenocarcinoma in a white male population [J]. *Wiley-Blackwell*, 2020(9): doaa011.
- [46] Lam C, Liu WF, Bel RD, et al. Polymorphisms of the FOXP₁ and MHC locus genes in individuals undergoing esophageal acid reflux assessments [J]. *Dis Esophagus*, 2017, 30(2): 1–7.
- [47] Verbeek RE, Spittuler LF, Peute A, et al. Familial clustering of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in a European cohort [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(10): 1656–1663.